Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Verbundvorhaben: Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Reduktion des Methanschlupfes von Gasaufbereitungsanlagen mittels Einsatz methanotropher Mikroorganismen; Teilvorhaben 1-2

Zuwendungsempfänger:

Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens e.V. (PFI)

Johannes Gutenberg-Universität Mainz (JGU)

Förderkennzeichen:

10NR108 bzw. 22010810, 22011711

Laufzeit:

01.06.2011 bis **31.05.2014 (Teilvorhaben 1)**

01.08.2011 bis **31.07.2014 (Teilvorhaben 2)**

Datum der Veröffentlichung:

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Projektbearbeitung

Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens e.V. (PFI) – Teilprojekt 1 (FKZ: 22010810)

Dr. Stefan Dröge

Johannes Gutenberg-Universität Mainz (JGU) – Institut für Mikrobiologie und Weinforschung - Teilprojekt 2 (FKZ: 22011711)

Prof. Dr. Helmut König, Dipl.-Biol. Julia Reuß

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren

Inhalt

I ZIELE 4

I.1 Aufgabenstellung 4

I.2 Planung und Ablauf des Vorhabens 5

I.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand 5

I.3.1 Stand der Technik bei der Produktion von Biomethan 5

I.3.2 Biomethananlagen in Deutschland 9

I.3.3 Methanotrophe Bakterien 9

I.3.4 Nachweis der Fachliteratur 12

I.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 13

II EINGEHENDE DARSTELLUNG – ERGEBNISSE 14

II.1 Auswahl potentieller Einsatzstämme (AP 1) 14

II.2 Überprüfung neuer Stämme und Stammscreening (AP2) 18

II.3 Stammoptimierung (AP 3) 54

II.4 Gewinnung des Zwischenproduktes Ameisensäure (AP 4) 64

II.5 Entwicklung eines Pilotreaktors im Technikumsmaßstab (AP 5) 72

II.6 Zusammenfassung 88

II.7 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse 89

II.8 Erkenntnisse von Dritten 89

II.9 Veröffentlichungen (erfolgte und geplante) 89

II.10 Literatur 90

I Ziele

I.1 Aufgabenstellung

Ziel des Forschungsvorhabens ist die Entwicklung eines alternativen Verfahrens zur Reduktion des Methanschlupfes aus Gasaufbereitungsanlagen zur Biomethanproduktion. Bei gängigen Verfahren zur Aufbereitung von Biogas auf Erdgasqualität (Biomethan) wie der Druckwechseladsorption (PSA) oder der Druckwasserwäsche (DWW) ergibt sich das Problem eines erhöhten Methanschlupfes im Abgas von ca. 2 %. Nach den Vorgaben des EEG ist der Methanschlupf auf einen Wert von maximal 0,5 % zu begrenzen. Um diesen Grenzwert zu erreichen, ist eine technisch aufwendige und kostenintensive Nachbehandlung des Abgases in Form einer thermischen oder katalytischen Nachverbrennung notwendig. Diese zusätzlichen Anlagenmodule erhöhen die spezifischen Investitionskosten der Gesamtanlage und begrenzen damit die Wirtschaftlichkeit. Weiterhin führt die Nachverbrennung des Methanschlupfes zu einer Verschlechterung der energetischen Bilanz.

Im Rahmen des Projektes soll eine wirtschaftlichere Alternative auf der Grundlage einer biologischen Entmethanisierung des Abgases mit Hilfe methanotropher Bakterien entwickelt werden. Hieraus ergeben sich die folgenden wissenschaftlich-technischen Ziele des Projektes

- Entwicklung eines Bioreaktors in einem technischen Maßstab mit den eine biologische Entmethanisierung von Abgasen demonstriert wird.
- Auswahl geeigneter Einsatzstämme methanotropher Bakterien, mit welchen das Reaktormodul effektiv betrieben werden kann. Parallel hierzu erfolgt ein Screening nach neuen, bislang nicht charakterisierten methanotrophen Mikroorganismen, um das Spektrum potentieller Einsatzstämme zu erweitern.
- Optimierung und Adaption der aussichtsreichsten Stämme im Labor- und Technikumsmaßstab
- Untersuchungen zur Gewinnung des Stoffwechselzwischenproduktes Ameisensäure zur Verbesserung der Energiebilanz
- Betrieb des Bioreaktors unter praxisnahen Bedingungen.

I.2 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Arbeitsprogramm der Verbundpartner PFI und JGU orientierte sich an den im Rahmen der Antragsstellung formulierten Zielen und der festgelegten Aufgabenverteilung. Im Rahmen des Kick-off-Meetings wurden diese konkretisiert und ein detaillierter Arbeitsplan festgelegt. Die Fortschritte innerhalb der einzelnen Arbeitspakete sowie die Meilensteinplanung wurden im Rahmen regelmäßiger Projekt-Meetings überprüft.

I.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand

I.3.1 Stand der Technik bei der Produktion von Biomethan

Hinsichtlich der Aufreinigung von Biogas auf Erdgasqualität kommen derzeit im Wesentlichen drei konkurrierende Verfahren zum Einsatz, die Druckwasserwäsche (DWW), die Druckwechseladsorption (DWA oder PSA; *Pressure Swing Adsorption*), sowie das Verfahren der Aminwäsche. DWW- und PSA sind bislang die am häufigsten eingesetzten Verfahren [4, 5].

Bei der Druckwasserwäsche handelt es sich um ein kontinuierliches Verfahren, dessen Prinzip auf den unterschiedlichen Löslichkeiten verschiedener Gase in Wasser beruht [6]. Das Rohbiogas wird hierbei im Gegenstrom zum Waschwasser durch eine Absorberkolonne geleitet. Dies geschieht bei einem Druck von typischerweise 6 bis 8 bar. Unter diesen Bedingungen löst sich das Kohlendioxid im Waschwasser, während der Methananteil weitgehend ungehindert passiert und am Kopfende der Kolonne abgezogen wird. Das mit Kohlendioxid beladene Waschwasser wird anschließend regeneriert. Hierzu wird das Wasser in der sogenannten Desorptionskolonne entspannt, so dass sich das CO_2 wieder löst und ausperlt. Das so regenerierte Waschwasser kann nun wieder der Absorberkolonne zugeführt werden. Die bei dem Verfahren insgesamt auftretenden Methanverluste liegen bei rund 3 bis 6 %. Der Methangehalt im Abgas liegt bei ca. 1 bis 2 % was eine Nachbehandlung erforderlich macht um den Grenzwert von 0,5 % zu unterschreiten.

Ein ebenfalls auf physikalischen Gesetzmäßigkeiten beruhendes, allerdings wasserfreies Verfahren, ist die sogenannte Druckwechseladsorption [7]. Hierbei wird das unterschiedliche Adsorptionsverhalten von Gasen an speziellen porösen Materialen genutzt, die als Adsorbens dienen. Diese haben die Eigenschaft, das im Rohbiogas enthaltende CO_2 stärker zu binden, wodurch das Methan in der Gasphase angereichert wird. Dies geschieht typischerweise bei erhöhten Drücken zwischen 8 und 10 bar, da sich unter diesen Bedingungen die Beladbarkeit des Adsorbers deutlich erhöht. Vom Prinzip her ist die Druckwechseladsorption zunächst ein diskontinuierliches Verfahren, da der Adsorber nach

einer gewissen Betriebsdauer vollständig mit CO_2 beladen ist und anschließend regeneriert werden muss. Dies geschieht über Druckentspannung und/oder Temperaturerhöhung. Um einen kontinuierlichen Betrieb zu gewährleisten, werden mindestens zwei Adsorber benötigt. In der Praxis werden allerdings meist mehrere Adsorber in Reihe geschaltet, was auch zu einer erhöhten Reinheit des Produktgases führt. Bei Anlagen, die mit dem DWA-Verfahren betrieben werden, liegen die Methanverluste zwischen 4 und 7 %, der Methangehalt im Abgas ähnlich wie beim DWW-Verfahren bei 1 bis 2 %.

Eine Alternative zu den dargestellten physikalischen Trennverfahren ist die chemische Wäsche des Rohbiogases. Das gängigste Verfahren ist hier die sogenannte Aminwäsche. Bei diesem Verfahren muss das Rohbiogas vor der eigentlichen Wäsche zunächst vollständig entschwefelt und getrocknet werden. Anschließend wird es in eine mit Füllkörpern gepackte Kolonne geleitet in der im Gegenstrom die Aminlösung durchgeleitet wird. In der Regel werden für die Aminlösung verschiedene Ethanolamin-Derivate verwendet. Das Prinzip beruht hierbei auf der Absorption von sauren Gasen durch die alkalische Lösung. Die mit CO_2 beladene Waschlösung wird am Boden der Kolonne abgezogen und anschließend regeneriert. Hierzu wird die Aminlösung erhitzt, um das CO_2 auszutreiben. Danach kann die Lösung erneut dem Prozess zugeführt werden. Im Unterschied zu den DWW- und DWA-Verfahren ist die Aminwäsche ein druckloses Verfahren. Das Rohbiogas muss vor der Aufbereitung also nicht verdichtet werden. Allerdings ist nach der Aufreinigung eine Verdichtung des Produktgases notwendig, um es in das Netz einspeisen zu können. Ein Vorteil der Aminwäsche ist die hohe Selektivität der Waschlösung. So können minimale Methanverluste von <0,1 % realisiert werden und eine Nachbehandlung des Abgases entfällt. Dem Gegenüber stehen allerdings einige verfahrenstechnische Nachteile. Die Aminwäsche-Anlagen haben einen sehr hohen Wärmebedarf für die Regeneration der Waschlösung. Zudem muss das Produktgas über Wärmetauscher erneut gekühlt und getrocknet werden. Nicht zuletzt sorgen die begrenzten Standzeiten der Aminlösungen für relativ hohe laufende Ausgaben für Betriebsmittel.

In der nachfolgenden Tabelle sind wesentliche Merkmale der beschriebenen Verfahren zur Biogasaufbereitung zusammengefasst.

Tabelle I-1: Verfahrensvergleich Druckwasserwäsche, Druckwechselsadsorption und Aminwäsche*.

Kennzeichen	Druckwasser-wäsche (DWW)	Druckwechsel-adsorption (PSA)	Aminwäsche
CH_4-Anreicherung	Bis ~ 97 %	Bis ~ 97 %	> 99 %
CH_4-Verluste	3 – 6 %	4 – 7 %	< 0,1 %
Abgasnachbehandlung notwendig	ja	ja	nein
Gastrocknung notwendig	ja	nein	ja
Entschwefelung Rohbiogas notwendig	nein	ja	ja
Betriebskosten	mittel	mittel	hoch
Strombedarf (je m^3 Rohgas)*	~ 0,3 $kW_{el.}$	~ 0,25 $kW_{el.}$	~ 0,13 $kW_{el.}$
Wärmebedarf (je m^3 Rohgas)*	keiner	keiner	~ 0,6 $kW_{th.}$
CO_2-Bildungsäquivalent aus Betriebsmitteln (je m^3 Rohgas)	~ 130 g	~ 110 g	~ 180 g

* Daten vom 20. Kasseler Abfall- und Energieforum, 2009; Vortrag Carbotec GmbH

Wie oben dargestellt, tritt bei den derzeit gängigen Verfahren der DWW und DWA ein nicht unerheblicher Methanschlupf im Abgas auf. Um die Vorgaben bezüglich des Methangrenzwertes von < 0,5 % einzuhalten, ist eine Nachbehandlung des Abgases notwenig. Wichtig ist dieser Grenzwert insbesondere unter Umweltgesichtspunkten, da Methan ein sehr starkes Treibhausgas darstellt. Nach einer aktuellen Studie würde sich die Klimabilanz einer Anlage ohne Abgasreinigung durch die erhöhten Methanemissionen deutlich verschlechtern [8]. Allerdings ist die Nachbehandlung des Abgases mit relativ hohen Zusatzkosten verbunden, welche die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens insgesamt belasten. Derzeit gängige Verfahren zur Nachbehandlung sind eine katalytische Nachverbrennung (KNV) oder eine thermische Oxidation mit sogenannten FLOX-Brennern (flammlose Oxidation). Hier müssen z. T. Biogas, Flüssiggas oder Erdgas zugemischt werden, um die Verbrennung zu gewährleisten.

Nach einem aktuellem Angebot der Fa. Malmberg betragen die Investitionskosten für eine katalytische Oxidation des Methanschlupfes 340.000 €. Dabei werden ca. 2 – 3 % der Gesamtmethanproduktion in thermische Energie umgesetzt, die nur unzureichend genutzt werden kann. Bei einer Anlage mit einer Durchsatzleistung von 1000 Nm^3/h an Rohgas (mit 52 % Methananteil) würde der Methanverlust ca. 130.000 Nm^3/a betragen. Gemäß nachfolgender Abbildung würde dies bei 8.300 Volllaststunden (Methanverlust 2 %) einen Gewinnverlust von 41.500 €/a bedeuten (Abb. 2). Dieser Verlust könnte reduziert werden, wenn durch den innovativen Ansatz Methan zu Ameisensäure umgesetzt und in den Methanfermenter zurückgeführt würde.

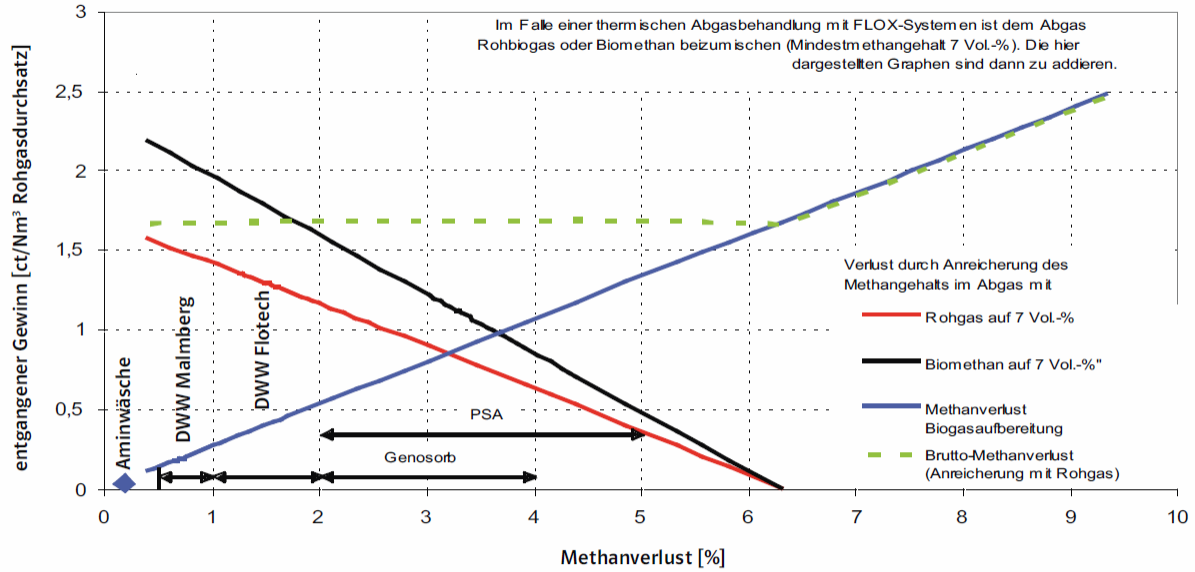

Abbildung I-1: Gewinnverlust durch Methanverlust [9].

Weitere Potentiale zur Reduktion der Investitionskosten für Gasaufbereitungsanlagen ergeben sich aus der Tatsache, dass bei einem höheren zulässigen Methanschlupf (nach der 1. Aufbereitungsstufe) bei den Druckwechseladsorptionsanlagen (PSA) 1 bis 2 Absorptionskolonnen eingespart oder der Verdichtungsdruck des Rohgases (auch bei der Druckwasserwäsche) und damit der Strombedarf deutlich gesenkt werden könnte. Mit dem neuen Verfahrensansatz könnten durch die Senkung der Investitions- und Betriebskosten von Biogasaufbereitungsanlagen (DWW und PSA) die Biogasaufbereitung auf Ergasqualität auch für kleinere Biogasanlagen (< 500 kW_{el}.) wirtschaftlich interessant sein.

I.3.2 Biomethananlagen in Deutschland

Der Zubau an neuen Biomethananlagen verlief in den zurückliegenden Jahren insgesamt schleppend. Im Jahr 2011 hatte sich der Zubau von Biomethananlagen im Vergleich zu 2010 noch leicht belebt. Insgesamt gingen 29 neue Anlagen in Betrieb nach 19 Anlagen im Jahr 2010. Der Zubau der Rohgasaufbereitskapazität stieg um rund 50 % von knapp 20.000 m^3/h im Jahr 2010 auf etwas mehr als 30.000 m^3/h. In der Summe erreichte die Aufbereitungskapazität aller in Deutschland betriebenen Anlagen rund 86.000 m^3/h (Quelle: Fachverband Biogas e.V.). In den Jahren 2012 und 2013 gingen erneut jeweils knapp 30 Anlagen in Betrieb und die Kapazität stieg auf ca. 144.000 m3/h. Aufgrund des insgesamt deutlich schlechteren Umfeldes und der veränderten Gesetzeslage für die Biogasbranche sind die aktuellen Prognosen für das Jahr 2014 sehr verhalten. Laut den jüngsten Schätzungen des Fachverbandes Biogas wird von lediglich 10 neuen Anlagen im Jahresverlauf ausgegangen.

In Bezug auf die eingesetzte Technik liegen bei den Neuanlagen noch keine abschließenden Zahlen vor. Im Jahr 2011 verwendeten von den neu in Betrieb genommenen Anlagen rund 40 % die Aminwäsche zur Aufbereitung, ebenfalls rund 40 % entfielen auf Druckwechseladsortion und Druckwasserwäsche. Die restlichen 20 % entfielen im Wesentlichen auf die sogenannte organisch-physikalische Wäsche (Fa. Haase). Neuartige Verfahren der Gasaufbereitung mittels Membrantechnologie sind zwar weiterhin in der Entwicklung (z.B. Polyimid-Hohlfasern von Evonik), derzeit gibt es aber noch keine marktreifen Lösungen.

I.3.3 Methanotrophe Bakterien

Eine Reihe von Mikroorganismen ist in der Lage, mit Einkohlenstoffverbindungen als alleiniger C-Quelle zu wachsen. Die Besonderheit dieser physiologischen Gruppe der sogenannten methylotrophen Bakterien ist, dass sämtliche Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen der Zelle *de novo* synthetisiert werden müssen [10]. Die Verwertung verschiedener oxidierter Einkohlenstoffverbindungen wie Methanol, Methylamin und Formiat ist hierbei relativ weit verbreitet. Die entsprechenden Bakterien sind in der Regel auch keine obligaten C_1-Verwerter, sondern können meist auch Zucker, verschiedene organische Säuren und Alkohole verwerten. Die Fähigkeit, neben den oben erwähnten oxidierten C1-Verbindungen auch Methan als alleiniges Wachstumssubstrat zu nutzen, ist jedoch einer bestimmten Untergruppe der Methylotrophen vorbehalten, den sogenannten methanotrophen Bakterien [11]. Diese sind aber systematisch nicht sehr nahe mit den fakultativen methylotrophen Bakterien verwandt (siehe Tab. 2). Die methanotrophen Mikroorganismen verfügen über ein

spezielles Enzymsystem, die Methan-Monooxygenase (MMO), mit der Methan unter der Bildung von Methanol zu einem ersten Stoffwechselzwischenprodukt oxidiert wird (siehe Abb. I-2).

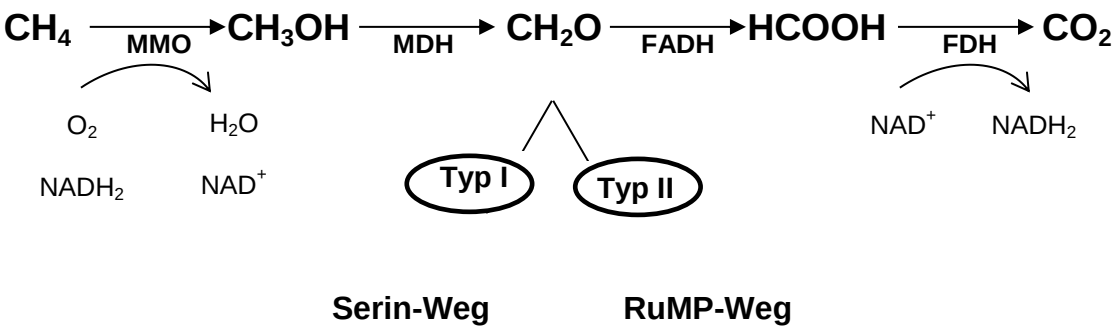

Abbildung I-2: Oxidation von Methan und Assimilation von Formaldehyd; MMO – Methan-Monooxygenase, MDH – Methanol-Dehydrogenase, FADH – Formaldehyd-Dehydrogenase, FDH – Formiat-Dehydrogenase.

Im Anschluss wird Methanol weiter über Formaldehyd und Formiat bis zum Kohlendioxid oxidiert. Auf der Ebene des Formaldehyd erfolgt die Kohlenstoffassimilation. Hierbei unterscheidet man Typ I Methanotrophe, die über den Ribulosemonophosphatzyklus (RuMP-Weg) assimilieren sowie Typ II Methanotrophe, welche den Serinweg nutzten [12]. Die unterschiedlichen Typen spiegeln sich hierbei auch in differierenden intrazellulären Membranstrukturen wieder.

Phylogenetisch lassen sich die bislang bekannten Typ I Methanotrophen den Gamma-Proteobakterien zuordnen, während die Gattungen der Typ II Methanotrophen der Alpha-Gruppe angehören. In Tabelle 2 sind wesentliche Merkmale der bislang beschriebenen Gattungen methanotropher Bakterien zusammengefasst.

Tabelle I-2: Charakteristika der wichtigsten Gattungen methanotropher Bakterien.

Merkmal	***Methylo-monas***	***Methylo-bacter***	***Methylo-coccus***	***Methylo-microbium***	***Methylo-sinus***	***Methylo-cystis***
Morphologie	Stäbchen	Kokken	Kokken	Stäbchen	Vibriod	Kokken, Stäbchen
Cystenbildung	ja	ja	ja	nein	nein	ja
Interne Membranen	Typ I	Typ I	Typ I	Typ I	Typ II	Typ II
C-Assimilation	RuMP	RuMP	RuMP	RuMP	Serin-Weg	Serin-Weg
N_2-Assimilation	nein	nein	ja	nein	ja	Ja
GC-Gehalt DNA [mol%]	51-59	49-60	59-66	49-60	62-67	62-67
Phylogenetische Zuordnung	γ-Proteo-bakterien	γ-Proteo-bakterien.	γ-Proteo-bakterien.	γ-Proteo-bakterien.	α-Proteo-bakterien	α-Proteo-bakterien

Die natürlichen Habitate methanotropher Bakterien finden sich typischerweise dort, wo Methan aus anaeroben Bereichen aufsteigt und auf Sauerstoff der aeroben Zone trifft [u.a. 13, 14]. Diese Verhältnisse finden sich beispielsweise in limnischen Sedimenten, Tundren, Feuchtgebieten oder auch Reisfeldern. Methanotrophe Bakterien spielen dabei für den globalen Kohlenstoffkreislauf eine wichtige Rolle, da sie Methan aus natürlichen Quellen in CO_2 und Biomasse überführen. Die Organismen sind daher auch unter klimatischen Gesichtspunkten von erheblicher Bedeutung, da ohne ihre Aktivität große Menge des starken Treibhausgases Methan in die Atmosphäre gelangen würde.

Seit langen gibt es intensive Bemühungen, spezielle Eigenschaften der methanotrophen Bakterien für kommerzielle bzw. industrielle Zwecke zu nutzten. Im Zentrum zahlreicher Forschungsvorhaben stand und steht beispielsweise der mikrobielle Abbau bestimmter toxischer Chemikalien [15, 16]. Hintergrund ist hierbei, dass die Methan-Monooxygenase der Methanotrophen eine relativ unspezifische Oxygenase darstellt. Daher sind die Organismen in der Lage, bestimmte halogenierte Kohlenwasserstoffe abzubauen. Giftige organische Lösungsmittel wie Chloroform, Dichlorethan und Trichlorethen (TCE) können auf diese Weise zu Kohlendioxid und Chloriden mineralisiert werden. Darüber hinaus wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um methanotrophe Bakterien für eine Methanolproduktion aus Methan einzusetzen [17].

I.3.4 Nachweis der Fachliteratur

[1] Richtlinie 2009/28/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen und zur Änderung und anschließenden Aufhebung der Richtlinien 2001/77/EG und 2003/30/ EG (2009)

[2] Fachverband Biogas – Branchenzahlen 2010 (www.biogas.org).

[3] Deutsche Energie-Agentur GmbH [dena] (2010). Biomethan im KWK- und Wärmemarkt – Status Quo, Potentiale und Handlungsempfehlungen für eine beschleunigte Marktdurchdringung.

[4] Urban, W. (2009) Biogaseinspeisung in das Erdgasnetz: neueste Marktentwicklungen im Bereich Gasaufbereitung und Netzeinspeisung. Gülzower Fachgespräche – Band 32; Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven. 237- 248.

[5] Beil, M. (2009) Praxiserfahrungen bei der Substitution von Erdgas durch Biomethan in Deutschland. Gülzower Fachgespräche – Band 32; Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven. 249 - 258.

[6] Richter, U. (2008) Biogasaufbereitung mit der Druckwasserwäsche. Tagungsband 6. Hanauer Dialog – Biogasaufbereitung zu Biomethan. 94 – 107.

[7] Schulte-Schulze Berndt, A. (2008) Biogasaufbereitung mit der Druckwechseladsorption. Tagungsband 6. Hanauer Dialog – Biogasaufbereitung zu Biomethan. 72 – 92.

[8] Vetter, A. & Arnold, K. (2010) Klima- und Umwelteffekte von Biomethan: Anlagentechnik und Substratauswahl.

[9] Dachs, G., Zach Ch. (2009) Biogasaufbereitungssysteme zur Einspeisung in das Erdgasnetz – ein Praxisvergleich

[10] Lidstrom, M. E. (1991) The aerobic methylotropic bacteria. Balows, Trüper, Dworkin, Harder & Schleifer, The Prokaryotes. Springer Verlag, New York. 431- 445.

[11] Hanson, R. S., Netrusov, A. I., & Tsuji, K. (1991) The obligate methanotrophic bacteria *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylosinus* and related bacteria. Balows, Trüper, Dworkin, Harder & Schleifer, The Prokaryotes. Springer Verlag, New York. 2350- 2365.

[12] Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996) Methanotrophic Bacteria. Microbiol. Rev. 60, 439 – 471.

13] Hanson, R. S. (1980) Ecology and diversity of methanotropic organisms. Adv. Appl. Microbiol. 26, 3 – 39.

[14] Holmes, A. J. N., Owens, J. P., & Murrell, J. C. (1995) Strategies for the detection of novel methanotrophs using molecular ecology techniques. Microbiology 41, 1947 – 1955.

[15] Alvarez-Cohen, L (1993) Application of methanotrophic bacteria for the bioremediation of chlorinated organics. Murrell & Kelley, Microbial growths on C1 compounds. Intercept Press, Andover, UK. 337 – 350.

[16] Hazen, T. C., Chakraborty, R., Fleming, J. M., Gregory, I. R., Bowman, J. P., Jimenez, L., Zhang, D., Pfiffner, S. M., Brockman, F. J., & Sayler, G. S. (2009) Use of gene probes to assess the impact and effectiveness of aerobic in situ bioremediation of TCE. Arch. Microbiol.191, 221-232.

[17] Lee, S. G., Goo, J.H., Kim, H. G., Oh, J.-I., Kim, Y. M., & Kim, S. W. (2004) Optimization of methanol biosynthesis from methane using *Methylosinus trichosporium* OB3b. Biotechnol. Lett. 26, 947 – 950.

I.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen der Charakterisierung von Neuisolaten erfolgten Kooperationen mit der Universität Regensburg (Reinhard Rachel, Zentrum für Elektronenmikroskopie der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin), der Justus Liebig Universität Gießen (Peter Kämpfer, Institut für angewandte Mikrobiologie), der amtlichen Materialprüfungsanstalt der Freien Hansestadt Bremen (Andreas Rabenstein, Jan Kuever) und der Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung in Berlin (BAM; PD Dr. Rüdiger Plarre).

II Eingehende Darstellung – Ergebnisse

II.1 Auswahl potentieller Einsatzstämme (AP 1)

Zunächst wurden Kulturen aus den Stammsammlungen der DSMZ und NCIMB bezogen. Hierbei handelte es sich um *Methylosinus sporium* (DSMZ 17706), *Methylocapsa acidiphila* (DSMZ 13967), *Methoylocystis hirsuta* (DSM 18500), *Methylococcus capsulatus* (NCIMB 11853), *Methylobacter luteus* (NCIMB 11914), *Methylomonas methanica* (NCIMB 11130), *Methylocaldum gracile* (NCIMB 11912) sowie *Methylocystis parvus* (NCIMB 11129). Die Inkubation erfolgte in den NMS-Medien DSMZ 1179 bei 30 °C unter Schütteln (siehe Tab. II-1 und 2). Zur Kultur wurden anaerobe Kulturröhrchen (Hungate-Röhrchen) gewählt. Diese wurden mit 7 ml Medium befüllt, über die eine Gasphase aus synthetischer Luft und Methan im Verhältnis 4:1 mit 1 bar Überdruck gegeben wurde. Lediglich *Methylosinus sporium* wurde bei 20 °C inkubiert.

Tabelle II-1: NMS-Medium I (DSMZ 1179)

$MgSO_4$ x 7 H_2O	1,00 g/L
$CaCl_2$ x 6 H_2O	0,20 g/L
Fe(III)NH_4-EDTA	0,004 g/L
KNO_3	1,00 g/L
KH_2PO_4	0,27 g/L
Na_2HPO_4 x 12 H_2O	0,72 g/L
Gereinigter Agar (optional)	12,50 g/L
Spurenelementlösung	0,50 ml/L

Auf pH 6,8 einstellen.

Tabelle II-2: Spurenelementlösung für NMS-Medium I

Na_2-EDTA	0,50 g/L
$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,20 g/L
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0,01 g/L
$MnCl_2$ x 4 H_2O	0,003 g/L
H_3BO_3	0,03 g/L
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,02 g/L
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,001 g/L
$NiCl_2$ x 6 H_2O	0,002 g/L
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,003 g/L

Hinsichtlich der Auswahl der geeignetsten Stämme erfolgte zunächst die Methodenentwicklung zur Bestimmung der Methan-, Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentration. Die entsprechenden Konzentrationen wurden gaschromatographisch bestimmt. Hierbei kann die Abbaurate des Methans ermittelt werden und somit auch ein schnelles Screening auf methanotrophe Bakterien in kultivierten Proben erfolgen. Weiterhin können verschiedene, aus Stammsammlungen bezogene, methanotrophe Bakterien hinsichtlich der Abbaugeschwindigkeit verglichen werden. Für die Untersuchungen kam ein GC 2014 von Shimadzu (Kyoto, Japan) mit einer gepackten 100/120 Carbosieve S-II-Säule und einem WLD zum Einsatz. Als Trägergas diente Helium mit einer Flussrate von 20 ml/min. Das Injektionsvolumen der Probe betrug stets 500 µl. Für ein schnelles Screening der gewonnenen Bakterienisolate auf Methanotrophe wurde ein isothermes Programm mit einer Ofentemperatur von 170 °C angewandt. Bei Notwendigkeit einer Peaktrennung von Sauerstoff und Stickstoff wurde ein Temperaturgradient verwendet. Die Ofentemperatur wird so zunächst für 5 min auf 35 °C gehalten und anschließend mit einer Rate von 15 °C/min auf 200 °C geheizt. Weiterhin wurde ein Gaschromatograph der Firma Varian (GC CP3800) mit einen Chromapak PLOT Molsieb (5 Å) und Temperaturgradient eingesetzt. Mit Hilfe dieser Programme ist es nun möglich den Sauerstoff-, Stickstoff- und Methanpeak zu trennen.

Abb. II-1 zeigt die Trennung des Gasgemisches CH_4 und synthetischer Luft (Verhältnis 1:1), welches den zu kultivierenden methanotrophen Bakterien als C-Quelle dient. Bei der isothermen Trennung, kann der O_2-Peak nicht vom N_2-Peak getrennt werden. Diese

Trennung wurde nur, wie oben beschrieben, durch Einsatz eines Temperaturgradienten erreicht (Abb. II-2)

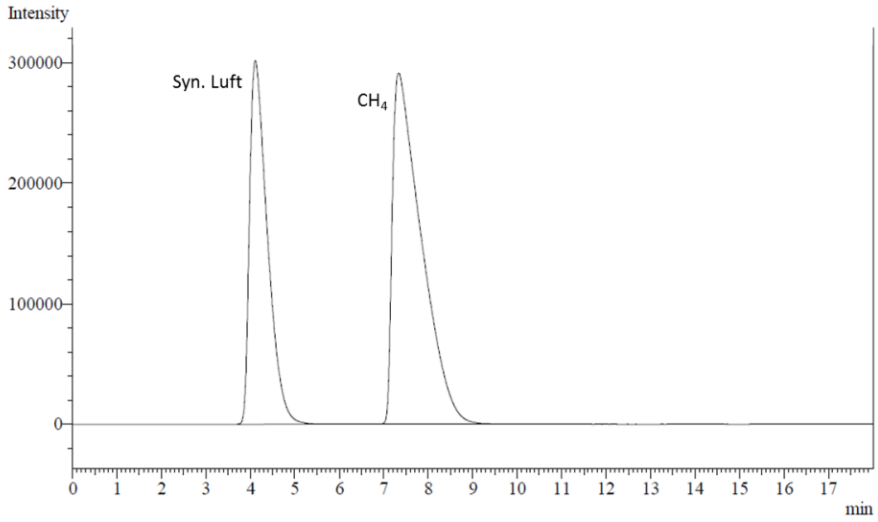

Abbildung II-1: Trennung eines Gasgemisches aus synthetischer Luft und Methan mittel GC mit isothermen Programm

Da dieses Programm jedoch nur eine Messung pro Stunde erlaubt und der Methan-Peak bei beiden GC-Programmen sauber getrennt wird, erfolgt ein erstes Screening auf methanotrophe Bakterien mit Hilfe des isothermen Programms. Durch diese Methode ist es folglich möglich, viele Bakterienproben auf ihre Fähigkeit zur Methanverwertung zu untersuchen und methanotrophe Bakterien zu identifizieren.

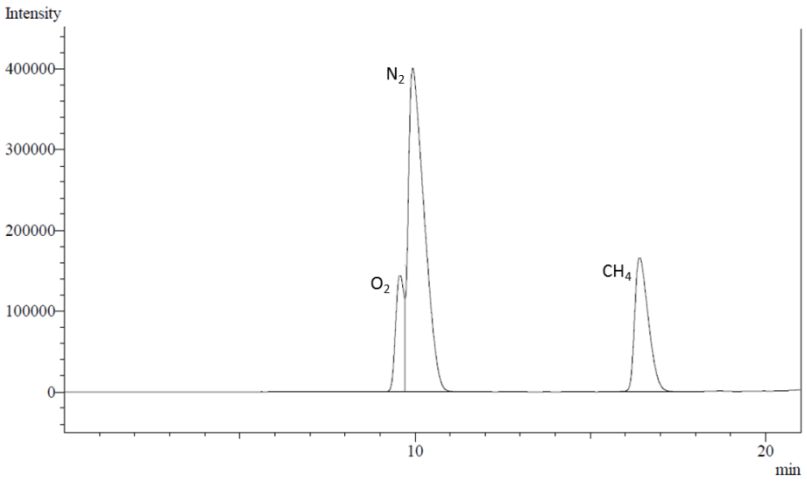

Abbildung II-2: Trennung eines Gasgemisches aus synthetischer Luft und Methan mittels GC mit Temperaturgradient

Der Methanverbrauch wurde in pmol pro Zelle über einen Zeitraum von 4 Tagen ermittelt. Zur effektiven Verwertung von Methan wurde eine Grenze von mind. 0,8 pmol/Zelle/96h festgelegt. Auf Grundlage der vergleichenden Untersuchungen der aus Stammkulturen

bezogenden Bakterien wurden zunächst die Stämme *Methylosinus sporium* (DSMZ 17706) und *Methoylocystis hirsuta* (DSM 18500) für die weiteren Untersuchungen im Rahmen des Arbeitspaktes 3 ausgewählt.

II.2 Überprüfung neuer Stämme und Stammscreening (AP2)

Identifizierung methanotropher Bakterien

Zum spezifischen und zeitnahen Nachweis methanotropher Bakterien in den gesammelten Umweltproben, wurde die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) nach Eller et al. (2001) angewandt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, Typ I (γ-Proteobakterien) und Typ II (α-Proteobakterien) gruppenspezifisch anhand ausgewählter 16S rRNA-Sequenzen zu detektieren. Zu diesem Zweck wurden drei Sonden synthetisiert. Mγ84 und Mγ705 dienten als Sondengemisch dem Nachweis von Typ I-Methanotrophen. Mα450 wurde als spezifische Sonde gegen Typ II-Methanotrophe eingesetzt. Als Fluoreszenzfarbstoff diente Cy3. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, synthetisiert. Detaillierte Eigenschaften der Sonden sind Tab. II-3 zu entnehmen.

Tabelle II-3: Verwendete Sonden zur spezifischen Detektion von Methanotrophen durch Ganzzellhybridisierung.

Oligoname	Sequenz (5‘ -> 3‘)	OD	Konzentration [pmol/µl]	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Gehalt	Modifikation
Mα450	ATC CAG GTA CCG TCA TTA TC (20)	10.4	100	55,3	6559	45 %	5‘-Cy3
Mγ705	CTG GTG TTC CTT CAG ATC (18)	8.5	100	53,7	5964	50 %	5‘-Cy3
Mγ84	CCA CTC GTC AGC GCC CGA (18)	1.1	100	62,8	5913	72,2 %	5‘-Cy3

Abb. II-3 zeigt exemplarisch die allgemein guten Ergebnisse der durchgeführten FISH, bei denen die in Tab. II-3 genannten Sonden Anwendung fanden. Abb. II-3A zeigt hierbei die Färbung des Termitenisolats B3/4-27 K94 aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Weinforschung (IMW) mit DAPI. Abb. II-4B zeigt eine Überlagerung der DAPI-Färbung mit der spezifischen Ganzzellhybridisierung der Mα450-Sonde. Da diese Typ II-Sonde am 5‘-Ende mit Cy3 modifiziert wurde, erschienen die Zellen rosa. Mit Hilfe der Ganzzellhybridisierung konnten nach den erlangten Ergebnissen in Umweltproben Typ I- und

Typ II-Methanotrophe spezifisch nachgewiesen werden. Proben, bei denen Methanotrophe durch diese Methode identifiziert wurden, sind Tab. II-10 zu entnehmen.

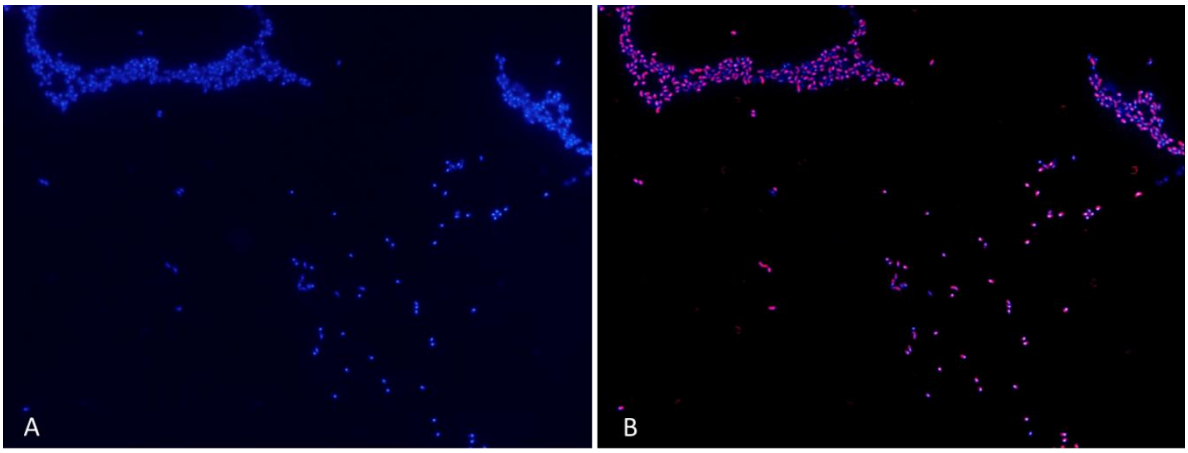

Abbildung II-3: Identifizierung des Termitenisolates B3/4-27 K94 als Typ II-Methanotroph mit Hilfe von FISH. A: DAPI-Färbung. B: Überlagerung der DAPI-Färbung mit der Cy3-markierten Mα450-Sonde.

Durch Verwendung spezifischer Primer konnte ein schnelles Screening auf Methanotrophe in unterschiedlichen Proben nun ebenso mit Hilfe der PCR durchgeführt werden (Cheng et al. 1999). Diese Primer amplifizieren einen 330 bp großen DNA-Abschnitt, der für eine Untereinheit der partikulären Methanmonooxygenase (pMMO), der sog. *pmoA* kodiert. Dieses Enzym ist charakteristisch für methanotrophe Bakterien und dient als spezifischer Marker dieser Prokaryotengruppe. Die Eigenschaften der verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. II-4 wiedergegeben, die PCR-Bedingungen in Tab. II-5 und Tab.II-6. Mit Hilfe der PCR wurden methanoxidierende Bakterien aus Mofetten des Maria Laacher Sees, dem Faulturm des Mombacher Zentralklärwerks sowie aus den Termiten *Neotermes castaneus, Reticuliterms flavipes, Kalotermes flavicollis, Mastotermes darwiniensis, Coptotermes formosanus, Hodotermes mossambicus* und *Incisitermes marginipennis* nachgewiesen. Durch serielle Verdünnung in NMS-Medium (Tab. II-1) konnten Reinkulturen gewonnen werden und die Identifizierung dieser Isolate konnte erfolgen.

Tabelle II-4: Verwendete Primer zur Identifizierung methanotropher Bakterien (Cheng et al. 1999). (F) Forward Primer; (R) Reversed Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	bp	GC [%]	T_m [° C]
pmof1 (F)	GGG GGA ACT TCT GGG GIT GGA C	22	63,6	71,5
pmof2 (F)	TTC TAY CCD RRC AAC TGG CC	20	56,3	59,0
pmor (R)	GGG GGR CIA CGT CIT TAC CGA A	22	54,5	62,2

Tabelle II-5: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung des *pmoA*-Gens. Der *pmoA*-Genabschnitt kodiert für eine Untereinheit der für methanotrophe Bakterien charakteristischen partikulären Methanmonooxygenase.

Komponente (Stammlösung)	Volumen [µl]	Bezogen auf 50 µl
Forward Primer: pmof1 (10 µM)	1	0,2 µM
Reverse Primer: pmor (10 µM)	1	0,2 µM
dNTP (40 mM)	1	800 µM
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM $MgCl_2$)	5	1 x
Wasser	39,5	
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5	2,5 U
Template-DNA (20 ng/µl)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

Tabelle II-6: Bedingungen für die PCR-Amplifikation der *pmoA*-Gens

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [° C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	45	1
4	Elongation	72	1
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Extension	72	10

Abb. II-4 gibt die Ergebnisse eines PCR-Laufs mit den spezifischen MOB-Primern wieder. Die PCR-Proben werden auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen und eine Spannung von ca. 100 V angelegt. Durch Ethidiumbromid wurde die DNA sichtbar gemacht. Durch Amplifizierung des pmoA-Gens wurde eine Bande von 330 bp generiert. Diese Bande ist gut bei der Positivkontrolle (PK) *Methylobacter luteus* zu erkennen, ebenso bei Proben aus verschiedenen Biotopen wie der Termite *Neotermes* als auch des Klärwerks. Die Negativkontrolle *E. coli* hingegen zeigt keine Bande, ebenso wie die Pansenprobe 538. In diesem Biotop konnten übereinstimmend mit den PCR-Ergebnissen keine Methanotrophen nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser Primer können also Proben relativ unkompliziert auf MOB-Präsenz hin untersucht werden.

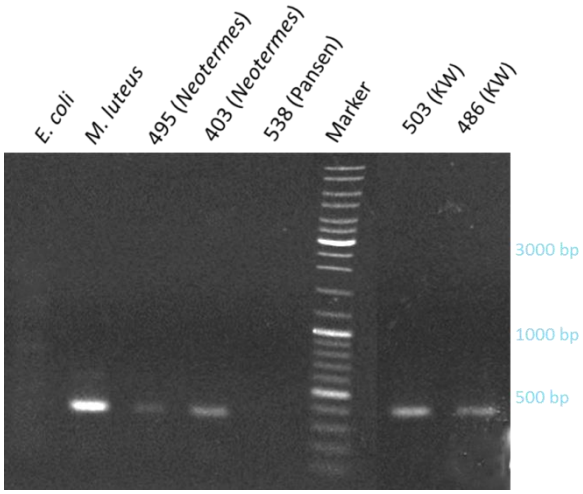

Abbildung II-4: PCR mit den Primern pmof1 und pmor zur schnellen Detektierung von MOB durch das *pmoA*-Gen. (KW) Klärwerk-Isolat. Die Ziffern geben die internen Bezeichnungen der Stämme an.

Nach Pester et al. (2007) ist jedoch eine weitere Verifizierung des pmof1/pmor-Genprodukts notwendig, um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um das *pmoA*-Gen handelt. Demgemäß wurden die Banden mit der Größe von 330 bp ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen GmbH, Hilden) aus dem Agarosegel extrahiert. Diese DNA diente als Template für eine weitere PCR mit dem Primerpaar pmof2/pmor (Tab. 6, Cheng et al. 1999) mit den gleichen Bedingungen wie für pmof1/pmor (Tab. II-5). Eine differenzierte Bande der Größe 178 bp in jeder Probe bestätigte, dass es sich um das *pmoA*-Gen handelt (Abb. II-5). Das Vorhandensein von MOB in den Proben konnte somit zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die im weiteren Verlauf des Projekts untersuchten Termiten-Isolate wurden wie folgt benannt: Stamm 610 (isoliert aus *Mastotermes darwiniensis*), Stamm 613 (*Neotermes castaneus*), Stamm 626 (*Mastotermes*

darwiniensis), Stamm 639 (*Mastotermes darwiniensis*) und Stamm 640 (*Incistitermes marginipennis*).

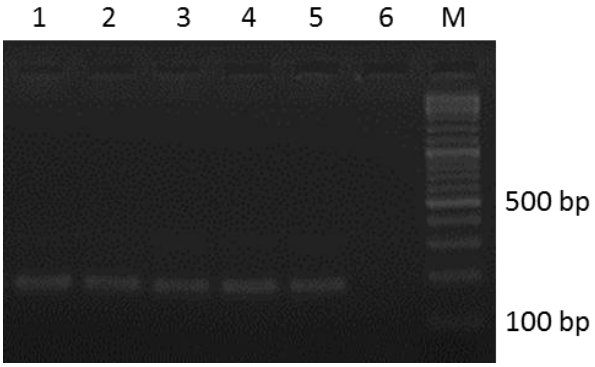

Abbildung II-5: Bestätigung der Identität des *pmoA*-Gens. Das 330 bp PCR-Product, welches mit Primern pmof1 und pmor gewonnen wurde, wurde als DNA-Template in einer PCR mit den Primern pmof2 und pmor genutzt in 1: *Incistitermes marginipennis*, 2: *Mastotermes darwiniensis*, 3: *Neotermes castaneus*, 4: *Methylocystis echinoides*, 5: *Methylobacter luteus*. Direkt aus *Escherichia coli* isolierte DNA wurde in Spur 6 verwendet. M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). PCR-Products mit einer Größe von 178 bp wurden in Spur 1 bis 5 entdeckt.

Anreicherung und Isolierung methanotropher Bakterien

Zu Beginn wurden potentiell methanotrophe Kulturen der Stammsammlung des IMWs (Institut für Mikrobiologie und Weinforschung) entnommen. Hierbei handelte es sich um die nicht näher bestimmten Isolate HM1, HM3 sowie HM4 aus der Termite *Hodotermes mossambicus*. Die Inkubation erfolgte in den NMS-Medien DSMZ 1179 (Tab. II-1), sowie DSMZ 632 (Tab. II-4) bei 30 °C unter Schütteln. Zur Kultur wurden anaerobe Kulturröhrchen, sog. Hungate-Röhrchen gewählt. Diese wurden mit 7 ml NMS-Medium II (DSMZ 632, Tab. II-7) befüllt, über die eine Gasphase aus synthetischer Luft und Methan im Verhältnis 4:1 mit 1 bar Überdruck gegeben wurde.

Tabelle II-7: NMS-Medium II (DSMZ 632)

Methanol	1,00 ml/L
$MgSO_4$ x 7 H_2O	1,00 g/L
$CaCl_2$ x 6 H_2O	0,20 g/L
Fe(III)NH_4-EDTA	0,004 g/L
KNO_3	1,00 g/L
KH_2PO_4	0,27 g/L
Na_2HPO_4 x 12 H_2O	0,72 g/L
Spurenelementlösung	0,50 ml/L
Gereinigter Agar	12,50 g/L

Auf pH 6,8 einstellen.

Spurenelementlösung:

Na_2-EDTA	500.000 mg/L
$FeSO_4$ x 7 H_2O	200.000 mg/L
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	10.000 mg/L
$MnCl_2$ x 4 H_2O	3.000 mg/L
H_3BO_3	30.000 mg/L
$CoCl_2$ x 6 H_2O	20.000 mg/L
$CaCl_2$ x 2 H_2O	1.000 mg/L
$NiCl_2$ x 6 H_2O	2.000 mg
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	3.000 mg/L

Ferner wurden methanotrophe Bakterien aus dem Faulturm des Mombacher Zentralklärwerks und Mofetten (natürliche Methanquellen) des Maria Laacher Sees in

Ufernähe, sowie den Termiten *Neotermes castaneus, Reticulitermes flavipes, Kalotermes flavicollis, Mastotermes darwiniensis, Coptotermes formosanus* sowie *Incisitermes marginipennis* isoliert. Hierfür wurden verschiedene Medien getestet: Mineralmedium DSMZ 457 (Tab. II-8 und II-9), Mineralmedium DSMZ 1007 (siehe Tab. II-10 und II-11), NMS-Medium I (DSMZ 1179; siehe Tab. II-1 und II-2) sowie NMS-Medium II (DSMZ 632; siehe Tab. II-7) welches als einzig verwendetes Medium eine C-Quelle, nämlich Methanol aufwies. Die C-Quelle der anderen Medien stellte das Methan in der Gasphase dar. Inkubiert wurde bei 30 °C sowie 20 °C, bei den Faulturmproben zusätzlich bei 37 °C.

Die Medien ohne interne C-Quelle wiesen untereinander keinen Unterschied bezüglich verbesserten Wachstums auf. Detektiert wurde hierbei eine optische Trübung des sonst klaren Mediums. Bei Einsatz des NMS-Mediums II (DSMZ 632) mit Methanol als C-Quelle konnte ein verstärktes Wachstum festgestellt werden. Insgesamt stellte sich heraus, dass bei jeder natürlichen Habitatprobe, also Mofette, Termitendarm und Faulturmschlamm, Wachstum in jedem Medium zu verzeichnen war. Die Ergebnisse sind in Tab. II-10 angegeben. Bei den Kulturen der Mofetten war die lichtmikroskopisch beobachtete Zellzahl niedriger als in Proben anderer Biotope. Ein Phänomen, welches durch die erhöhte Verdünnung durch Entnahme der Proben unter Wasser zu erklären ist. Um Untersuchungen zum Methanabbau durchführen zu können, wurde nun entsprechend der hier erlangten Ergebnisse das NMS-Medium I (DSMZ 1179) angewandt, zur schnellen Kultivierung das NMS-Medium II (DSMZ 632).

Tabelle II-8: Mineralmedium DSMZ 457

Na_2HPO_4	2,44 g/L
KH_2PO_4	1,52 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	0,50 g/L
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,20 g/L
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,05 g/L
Spurenelementlösung	10,00 ml/L

Auf pH 6,9 einstellen.

Tabelle II-9: Spurenelementlösung für DSMZ 457

EDTA	0,50 g/L
$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,20 g/L
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0,01 g/L
$MnCl_2$ x 4 H_2O	0,003 g/L
H_3BO_3	0,03 g/L
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,02 g/L
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,001 g/L
$NiCl_2$ x 6 H_2O	0,002 g/L
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,003 g/L

Tabelle II-10: Mineralmedium (DSMZ 1007)

KNO_3	0,25 g/L
KH_2PO_4	0,10 g/L
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,05 g/L
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,01 g/L
Spurenelementlösung	1,00 ml/L

Tabelle II-11: Spurenelementlösung für DSMZ 1007

EDTA	5,00 g/L
$CuCl_2$ x 5 H_2O	0,10 g/L
$FeSO_4$ x 7 H_2O	2,00 g/L
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0,10 g/L
$MnCl_2$ x 4 H_2O	0,03 g/L
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,02 g/L
$NiCl_2$ x 6 H_2O	0,02 g/L
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,03 g/L

Die Termiten *Neotermes castaneus, Reticulitermes flavipes, Kalotermes flavicollis, Mastotermes darwiniensis, Incisitermes marginipennis* sowie *Coptotermes formosanus* wurden freundlicherweise von der Bundesanstalt für Materialforschung und Materialprüfung (BAM, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Termiten wurden bei 30 °C in Glasgefäßen oder Kunststoffbehältnissen auf feuchtem Vermiculit gehalten. Als Nahrungsquelle diente Pappelholz. Zur Präparation der Termitendärme wurden die Termiten in einer Lösung aus 70 % Ethanol und 1 % Peressigsäure abgetötet und anschließend mit sterilem dH_2O abgespült. Mit Hilfe steriler Pinzetten wurde der Darm posterior aus dem Abdomen gezogen und in NMS-Medium suspendiert. Zunächst wurden die Termitenpräparate mittels der in Tab. II-4 beschriebenen *pmoA*-Primer auf MOB hin untersucht. Die positiven Proben von *Incisitermes marginipennis, Mastotermes darwiniensis* und *Neotermes castaneus* wurden schließlich mit Hilfe der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) auf den Zelltiter der MOB hin untersucht. Hierfür wurde das Protkoll von Yu et al. 2005 angewandt. Auch hier zielten die Primer auf die Gensequenz von *pmoA*. Bei der qPCR wurde das Fluorophor SYBR. Green eingesetzt, welches an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet. Dadurch kommt es zur Zunahme der Fluoreszenzemission. Mit zunehmenden Amplifikaten der PCR wird also eine Zunahme der Gesamtfluoreszenz erreicht. Um die Anzahl an Methanotrophen im Termitendarm zu untersuchen wurden die spezifische MOB-Primer A189 (5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3') und mb661 (5'-CCGGMGCAACGTCYTTACC-3') verwendet (Tab II-12). Die Reaktionen von 25 µl wurden in einem Realplex^2 ep Gradient Mastercycler durchgeführt. Die DNA wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen GmbH, Hilden) isoliert. Reaktionszusammensetzungen und Bedingungen der qPCR sind Tab II-13 und Tab II-14 zu entnehmen. Demgemäß wurde die MOB spezifische Zellzahl auf 10^2 bis 10^3 pro

Termitendarm determiniert. Durch die Verwendung von Typ I- und Typ II-spezifischen MOB-Primern konnte zum einen die Abwesenheit von Typ I MOB festgestellt werden. Typ II MOB wurden mit einem Titer von 0,3-1,4*10^3 in einem Gesamtdarm unabhängig der Termitenart, gefunden. Hierbei wurden keine MOB im Ösophagus detektiert, 0,5-0,65*10^2 Zellen im Mitteldarm und 0,2-1,3*10^3 Zellen im Hinterdarm, welcher somit den Darmabschnitt mit dem höchsten Titer darstellt (Abb. II-6).

Um die gesamt Bakterienanzahl zu bestimmen, wurden die Primer BAC338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3') und BAC805R (5'-GACTACCAGGGTATCTAATCC-3') angewandt. Der Reaktionsansatz entsprach dem bei Verwendung der Primer A189 und mb661. Es wurden so insgesamt 0,5-1,9*10^8 prokaryotische Zellen in einem ganzen Termitendarm gefunden, unabhängig von der Termitenart und somit auch von der Größe des Termitendarms. Die dichteste Zellzahl von 0,5-1,9*10^8 wurde im Hinterdarm ermittelt. Im Bereich des Ösophagus konnte der Titer auf 2,3-4,7*10^4, im Mitteldarm 3,6-8,4*10^4 Zellen bestimmt werden (Abb.II-6).

Tabelle II-12: Verwendete Primer zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft innerhalb des Termitendarms mittel qPCR. (F) Forward Primer; (R) Reversed Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	bp	GC [%]	T_m [° C]
BAC338F (F)	ACTCCTACGGGAGGCAG	17	65	72
BAC805R (R)	GACTACCAGGGTATCTAATCC	21	58	72
A189 (F)	GGNGACTGGGACTTCTGG	17	63	55
mb661 (R)	CCGGMGCAACGTCYTTACC	19	65	52

Tabelle II-13: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes bei qPCR zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft

Komponente	Volumen [µl]
Mastermix	12,5
PCR-Wasser	9,48
forward Primer (10 pmol)	1
reverse Primer (10 pmol)	1
Template-DNA	1
BSA	0,02
Gesamtmenge/Tube	25

Tabelle II-14: Bedingungen für die qPCR-Amplifikation bei qPCR zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [° C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	10
2	Denaturierung	94	0,1
3	Annealing	60 (für die Primer BAC338F, BAC805R) 56 (für die Primer A189, mb661)	1
5	40 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Schmelzkurve	60 → 95*	30

* kontinuierliche Erhöhung der Temperatur über 30 min in 20-Sekunden-Schritten.

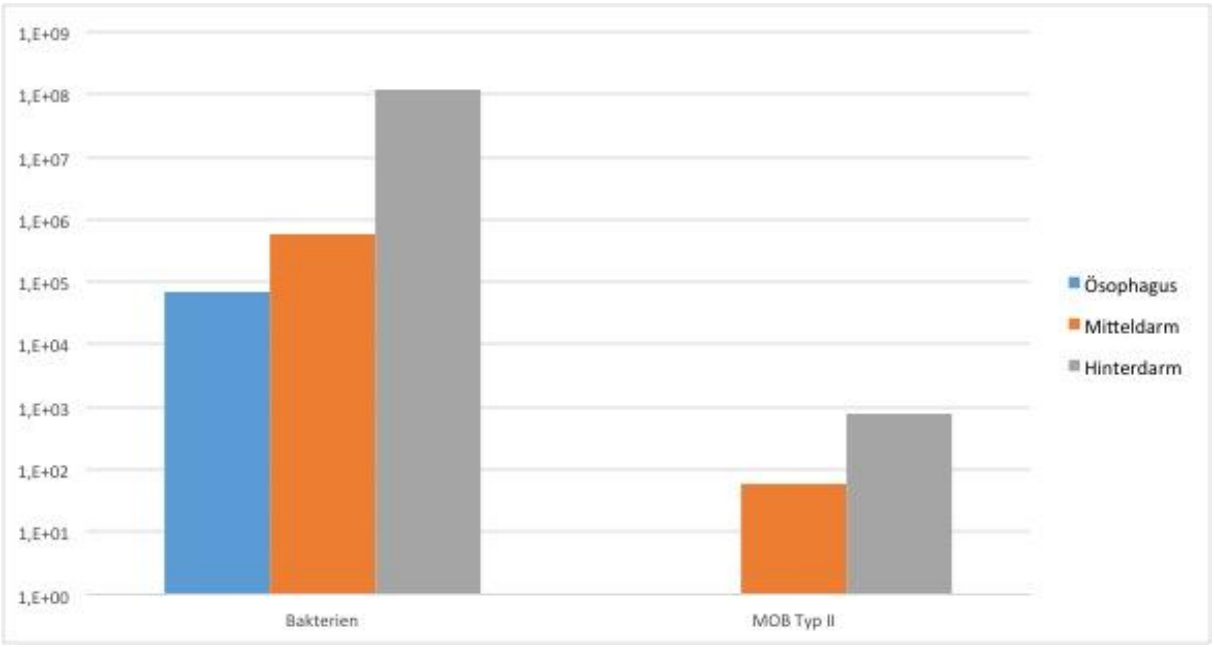

Abbildung II-6: Anzahl und Verteilung von Prokaryoten im allgemeinen und Typ II-MOB in einem Termitendarm von *Incisitermes marginipennis*

Abb.II-6 zeigt zum einen die Anzahl und Verteilung aller Prokayoten im Termitendarm. Hierfür wurden die universellen Bakterien-Primer BAC338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3') und BAC805R (5'-GACTACCAGGGTATCTAATCC-3') verwendet. Es wurden so insgesamt 0,5-1,9*10^8 prokaryotische Zellen in einem ganzen Termitendarm gefunden, unabhängig von der Termitenart und somit auch von der Größe des Termitendarms. Die dichteste Zellzahl von 0,5-1,9*10^8 wurde im Hinterdarm ermittelt. Im Bereich des Ösophagus konnte der Titer auf 2,3-4,7*10^4, im Mitteldarm 3,6-8,4*10^4 Zellen bestimmt werden.

Mit den Methanotrophen wurden Anreicherungskulturen angelegt.

Das Screening der Stammsammlung des IMWs erfolgte mit Hilfe von NMS-Medium II (DSMZ 1179). Es wurden insgesamt 72 nicht näher beschriebene Termitenisolate untersucht. In flüssigem Medium wurde der Kultivierungserfolg und Zellmorphologie lichtmikroskopisch untersucht. Die Koloniemorphologie wurde durch Ausstreichen der Stämme auf festem NMS-Medium II bestimmt. Tab. II-10 zeigt diejenigen Isolate, die in der Lage waren, mit Methan als alleiniger C-Quelle zu wachsen.

Tabelle II-10: Isolate methanotropher Bakterien (**- = kein Wachstum; (+) = schwaches Wachstum; + = gutes Wachstum; K = Kokken; S = Stäbchen; KS = kokkenförmiges Stäbchen; n.b. = nicht bestimmt; A = Anreicherungskultur; R = Reinkultur)**

Herkunft	Kulturnummer	Wachstum	Zellform	Kolonieform	FISH	CH_4-Verbrauch [pmol/Zelle/96 h]
IMW	MX 3 (A)	(+)	K, S	weiß, rund	Typ I, Typ II	8,00
	KZC 1 (R)	(+)	K, S	weiß, rund	Typ I	0
	KDX 8	(+)	K	weiß, rund	Typ I	3,12
	KOC 2	(+)	K	weiß, unregelmäßig	Typ II	n.b.
	KScCX 5	+	K	n.b.	Typ I, Typ II	n.b.
	NX 1 (A)	+	K	weiß, eckig	Typ I	0
	KD 16	+	K	weiß, unregelmäßig	Typ II	0
	KMC 11	+	S	weiß, unregelmäßig	Typ II	5,51
	KMX 6 (A)	+	K	weiß, rund	Typ I, Typ II	0
	KZC 2	+	K	weiß, unregelmäßig	Typ II	0
	KScC 7 (A)	+	K	weiß, rund	Typ I, Typ II	n.b.
	KMN 1	+	K	weiß, rund	Typ II	0
	KMX 8	+	K	weiß, rund	n.b.	n.b.
	HM 1	(+)	K	s. klein	Typ II	0,532
	HM 3	+	K	weiß, rund	Typ II	n.b.
	HM 4	+	S	weiß, rund	Typ II	11,11
	269	++	K, S	n.b.	Typ II	50,32
Faulturm	217 (A)	++	K	n.b.	Typ I, Typ II	n.b.
	503 (A)	+	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	19,31
	488 (A)	+	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	0
	487 (A)	+	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	n.b.
	486 (A)	+	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	20,40

Tabelle II-10 Fortsetzung

	482 (A)	+	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	50,93
	478 (A)	(+)	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	18,12
	288 (A)	(+)	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	15,74
Termite	610 (R)	+	KS	weiß-beige	Typ II	36,08
	613 (R)	+	KS	weiß-beige	Typ II	81,71
	626 (R)	+	KS	weiß-beige	Typ II	147,22
	639 (R)	+	KS	weiß-beige	Typ II	152,76
	640 (R)	+	KS	weiß-beige	Typ II	39,29
Mofette	301 (A)	+	K, S	n.b.	n.b.	n.b.
	476 (A)	+	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	n.b.
	397 (A)	(+)	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	n.b.
	306 (A)	+	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	18,63
	2 (A)	+	K, S	n.b.	Typ I, Typ II	0

Die hier gezeigten Stämme des IMWs bzw. Anreicherungskulturen der verschiedenen Habitate zeigten gutes Wachstum. Um eine zusätzliche Absicherung zu erhalten, dass es sich hierbei tatsächlich um methanotrophe Bakterien handelte, wurde zum einen der Nachweis mit Hilfe der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung sowie der Methanabbau mittels Gaschromatographie angewandt.

Zur Überprüfung der Reinheit wurden die Isolate lichtmikroskopisch untersucht sowie auf feste Komplexmedien (LB-Medium, Tab. II-16) ausgestrichen. Methanotrophe Reinkulturen zeigten hier kein Wachstum, da Methan als C-Quelle fehlte (Schaefer et al. 2002).

Tabelle II-16: LB (Luria Bertani) Medium

Trypton	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	10,00 g

Der pH wurde auf 7 eingestellt

Zusätzlich wurde die DNA der Isolate extrahiert und nach Amplifizierung partieller 16S rDNA-Fragmente durch PCR unter Zuhilfenahme der Primern Eubak1070rev (5'-AGCTGACGACAGCCAT-3') und EubakGC519for (5'-[CGCCCGCCGCGCCCCGCGC CCGGCCCGCCGCGGCCGCC] AGCAGCCGCGGTAATA-3') (Knopf 2010) mittels denaturierender Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) untersucht. Die DGGE stellt hier ein Verfahren zur Auftrennung gleich großer DNA-Sequenzen anhand ihres GC-Gehalts dar. Die Auftrennung erfolgt aufgrund eines ansteigenden Gradienten der denaturierenden Substanzen Harnstoff und Formamid in einem Polyacrylamidgel. Durchlaufen die DNA-Moleküle das Gel, so werden mit zunehmendem Gradienten die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen. Zunächst werden die beiden Wasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin gelöst, die drei Bindungen zwischen Guanin und Cytosin werden erst bei höheren Konzentrationen an Harnstoff und Formamid aufgebrochen. Je nach Sequenz werden die DNA-Doppelstränge also unterschiedlich aufgeschmolzen und durchlaufen so differierend schnell das Gel. Um das komplette Aufspalten in zwei Einzelstränge zu verhindern, wird eine sog. GC-Klammer aus etwa 30 - 40 Cytosin- und Guaninbasen an das 5'-Ende des forward Primers gebunden. Die DNA wird nur bis zu dieser Klammer aufgetrennt und kommt an einer sequenzspezifischen Stelle im Gel zum stehen. Die DGGE wurde nach Stantscheff et al. (2014) mit einem denaturierenden Gradienten in den Polyacylamidgelen von 30 bis 70% durchgeführt. Die Zusammensetzung eines Gels ist Tab 19 zu entnehmen. Der Lauf erfolgte in der Elektrophoresekammer D GENE™ System (Biorad, München) in 1x TAE Laufpuffer (Tab II-18) bei 60 °C. Es wurden jeweils 40 µl des PCR-Produkt aufgetragen, wobei eine Auftrennung über 12 h bei 50 V erfolgte. Die Isolate wiesen nur ein einziges 16S DNA-Genprodukt auf und bestätigten somit die Reinheit der Kulturen.

Tabelle II-17: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für die DGGE

Reagenz	**Gradienten-Grenzkonzentration [Angaben in g [Harnstoff] bzw. mL]**	
	30 %	**70 %**
Harnstoff	1,9	4,3
Formamid	1,8	4,2
ddH2O	8,5	4,5
40% Bisacrylamid	3,0	3,0
50 x TAE-Puffer	0,3	0,3
Glycerin	0,3	0,3
APS 1M	0,1	0,1
TEMED 1M	0,0045	0,0045

Tabelle II-18: TAE-Pufferzusammensetzung bei DGGE

Substanz	**50x TAE Puffer**
Tris	242 g
Na2EDTA (0,5M)	100 ml
Eisessig	57,1 ml
dH_20	ad 1000 ml

Der Puffer wurde auf pH 8,3 eingestellt. 1x TBE Puffer wurde durch eine 1:10 Verdünnung mit dH_20 hergestellt.

Neben der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die Isolate auch elektronenmikroskopisch mit dem CM 12 Transmission Mikroskop (Philips) an der Universität Regensburg mit Unterstützung von Prof. Reinhard Rachel untersucht. Hierbei wurde, wie in Abb. II-9 ersichtlich eine für Typ II charakteristische Anordnung der intracytoplasmatischen

Membran beobachtet. Es konnten keine Flagellen erkannt werden, was den Rückschluss zulässt, dass die Zellen nicht motil sind. Ein S-Layer fehlt.

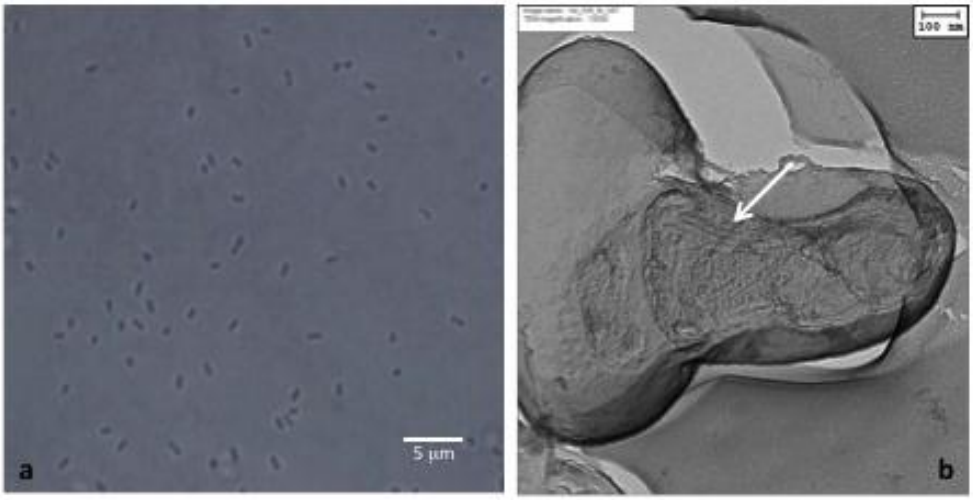

Abbildung II-9: Lichtmikroskopische (A) und TEM-Aufnahme (B) des Termitenisolates 640. A: Phasenkontrastaufnahme, 1000fache Vergrößerung. Die Zellen sind gut als langgezogene Kokken zu erkennen und liegen oft in Ketten zu zwei Zellen vor. TEM-Analysen mit 13000 facher Vergrößerung (B) zeigen eine für Typ II-MOB charakteristische parallele ICM-Anordnung entlang der Zellperipherie.

Zur Klärung verwandtschaftlicher Verhältnisse wurde eine SAPD-PCR (Nested Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode können unbekannte Organismen auf Art- und Stammniveau bestimmt werden (Pfannebecker 2008). Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist Tab. II-19 zu entnehmen. Die spezifischen Eigenschaften der getesteten Primer sind in Tab. II-20, die Reaktionsbedingungen in Tab. II-23 angegeben.

Tabelle II-19: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes der SAPD-PCR

Komponente (Stammlösung)	Volumen [µl]	Bezogen auf 25 µl
Primer (50 µM)	1	12 µM
dNTP (40 mM)	1	2 µM
$MgCl_2$ (20mM)	2	2 mM[a]
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM $MgCl_2$)	2,5	1 x
Wasser	12,5	
Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl)	1	1 U
Template-DNA (20 ng/µl)	5	100 ng
Gesamtvolumen	25	

[a] Die Gesamtkonzentration an $MgCl_2$ im Reaktionsansatz betrug 4 mM.

Tabelle II-20: Verwendete Primer zur SAPD-PCR

Primer	Sequenz (5' → 3')	bp	GC [%]	T_m [° C]
A-Not	AGC GGC CGC A	10	80	47,6
C-Not	AGC GGC CGC C	10	90	51,8
G-Not	AGC GGC CGC G	10	90	51,8
T-Not	AGC GGC CGC T	10	80	47,6

Tabelle II-21: Bedingungen für PCR-Amplifikation durch SAPD

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [° C]	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95	5 min
2	Denaturierung	94	1 min
3	Annealing	35	1 min
4	Temperaturanstieg	35 (+0,5)	12 s
5	15 Zyklen beginnend bei Nr. 4		
6	Annealing	42,5	1 min
7	Temperaturanstieg	42,5 (+1,5)	12 s
8	19 Zyklen beginnend bei Nr. 7		
9	Elongation	72	5 min
10	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
11	Finale Extension	72	10 min

Die verwendeten Primer der SAPD-PCR binden an komplementären Stellen der palindromen Erkennungssequenz der NotI-Restriktionsendonuklease (5‘-GCGGCCGC-3‘) und unterschieden sich lediglich durch ein an diese Sequenz angefügtes Nukleotid (s. Tab. II-20). So lagern sich die Primer an spezifische DNA-Stellen an und erzeugen für jede MOB-Art ein individuelles Bandenmuster.

Abb. II-10 zeigt die Auswertung der Amplifikate einer SAPD-PCR durchgeführt mit C-Not-Primer. Die Primer A- und G-Not zeigen dieselben Bandenmuster. Der Primer T-Not jedoch scheint für methanotrophe Mikroorganismen nicht geeignet zu sein, hier konnte kein Bandenmuster generiert werden. Die Proben werden nach durchgeführter SAPD-PCR auf ein 1,5 % Agarose-Gel mit Zusatz von 0,035 % Natronwasserglas aufgetragen und eine Spannung von 50 V über 3 h angelegt. Die DNA wurde durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Von Position 1 bis 7 in Abb. II-10 sind die aus Termiten isolierte Amplifikate aufgetragen, von Position 8 bis 12 die Amplifikate der Referenzstämme *Methylocystis parvus, Methylocystis bryophila, Methylocystis echinoides, Methylocystis rosea* bzw. *Methylocystis heyeri*. Es wurde hierbei nur die Gattung *Methylocystis* gewählt, da durch Voruntersuchungen mit universellen Bakterienprimern (PurEubak5 und PurEubak3, Tab. II-

25) festgestellt wurde, dass es sich bei den aus den verschiedenen Termiten isolierten methanoxidierenden Bakterien um *Methylocystis*-Arten handelte. Die verwendeten Referenzstämme konnten durch Einsatz des C-Not-Primers in untereinander sehr gut zu differenzierende Bandenmuster aufgetrennt werden. Die Proben 3, ein Isolat aus *Incisitermes marginipennis* sowie 6 und 7, beides *Mastotermes darwiniensis*-Isolate, wiesen das gleiche Bandenmuster auf. Es handelt sich hierbei offenbar um dieselbe *Methylocystis*-Art. Jedoch entspricht das Bandenmuster dieser Gruppe, wie auch das Muster der anderen aufgetragenen MOB-Isolate keinem der Referenzstämme. Dies ist ein starkes Indiz für die Isolierung bislang noch nicht beschriebener *Methylocystis*-Arten. Um diese Ergebnisse zu unterstützen, wurde eine nested SAPD-PCR (nSAPD-PCR) durchgeführt. Hierbei werden schwächere, jedoch unter Umständen wichtige Banden zur Art- und sogar Stammidentifizierung der SAPD-PCR an die Intensität der anderen Amplifikate angeglichen. Hierfür wird der PCR-Reaktion ein sog. Enhancer zur Beschleunigung der PCR-Reaktion beigefügt und auf den Einsatz einer Rampe verzichtet. Durch die Verwendung des nested Primers wie G-Not-G (Tab. II-22) bei Einsatz von G-Not in der ersten SAPD-Reaktion wird die Einwirkung nichtreproduzierbarer Amplifikate eliminiert oder zumindest stark herabgesetzt. Die Zusammensetzung der Reaktionen von 25 µl glichen prinzipiell denen der SAPD-PCR (Tab II-19) mit dem Zusatz von 2,5 µl 5 x Enhancer Solution P (Peqlap, Erlangen). Darüber hinaus diente als Template-DNA 1 µl SAPD-PCR-Produkt. Der Annealing-Schritt wurde bei 39 °C für die A-Not-Primer bzw. bei 41 °C für die C- und G-Not-Primern durchgeführt (Tab II-23).

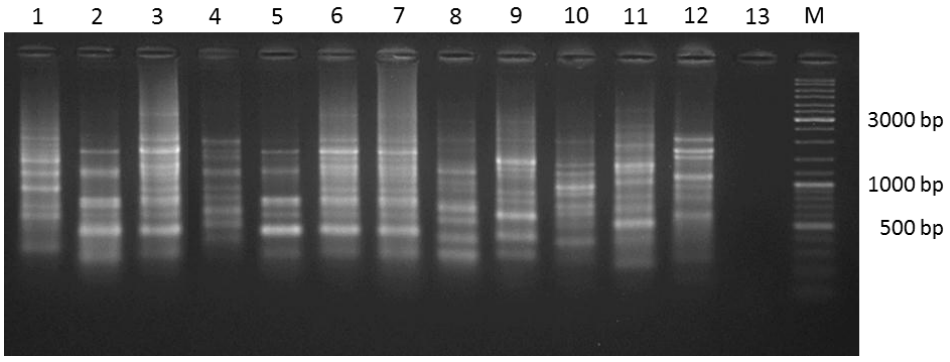

Abbildung II-10: SAPD-PCR mit C-Not-Primer zur Klärung von Verwandtschaftsverhältnissen der Termitenisolate. (1) *Neotermes*-Isolat 403; (2) *Hodotermes*-Isolat 506; (3) *Incisitermes*-Isolat 469; (4) *Hodotermes*-Isolat 270; (5) *Mastotermes*-Isolat 445; (6) *Mastotermes*-Isolat 637; (7)) *Mastotermes*-Isolat 634; (8) *Methylocystsis parvus;* (9) *Methylocystsis bryophila;* (10) *Methylocystsis echinoides*; (11) *Methylocystsis rosea;* (12) *Methylocystsis heyeri*; (13) Negativkontrolle: dH_2O; (M) Marker DNA Ladder Mix (Fermentas)

Tabelle II-22: Verwendete Primer bei nSAPD-PCR

Primer	Sequenz (5' → 3')	bp	GC [%]	T_m [° C]
A-Not-A	AGC GGC CGC AA	11	72	49,2
A-Not-C	AGC GGC CGC AC	11	81	52,9
A-Not-G	AGC GGC CGC AG	11	81	52,9
A-Not-T	AGC GGC CGC AT	11	72	49,2
C-Not-A	AGC GGC CGC CA	11	81	52,9
C-Not-C	AGC GGC CGC CC	11	90	56,7
C-Not-G	AGC GGC CGC CG	11	90	56,7
C-Not-T	AGC GGC CGC CT	11	81	52,9
G-Not-C	AGC GGC CGC GC	11	90	56,7
G-Not-G	AGC GGC CGC GG	11	90	56,7
G-Not-T	AGC GGC CGC GT	11	81	52,9

Tabelle II-23: Bedingungen für PCR-Amplifikation durch SAPD

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [° C]	Zeit
1	Initial-Denaturierung	95	5 min
2	Denaturierung	94	1 min
3	Annealing Primer[a]: A-Not-A, -C, -G, -T Primer[a]: C-Not-A, -C, -G, -T und G-Not-C, -G, -T	39 41	1 min
9	Elongation	72	5 min
10	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
11	Finale Elongation	72	10 min

[a] nur 1 Primer pro Reaktionsansatz

Die Agarosegelauswertung in Abb. II-11 zeigt distinktive Banden für jedes Isolat und jeden Referenzstamm, welche ein spezifisches Muster ergeben. Diese Muster wurden mit der Bio-1D Software (Vilber-Lourmat, Eberhardzell) ausgewertet und sind in Tab. II-24 angegeben. Die Isolate lassen sich auch bei dieser Stammspezifischen Analysemethode der SAPD-PCR nicht eindeutig den *Methylocystis*-Referenzstämmen zuordnen.

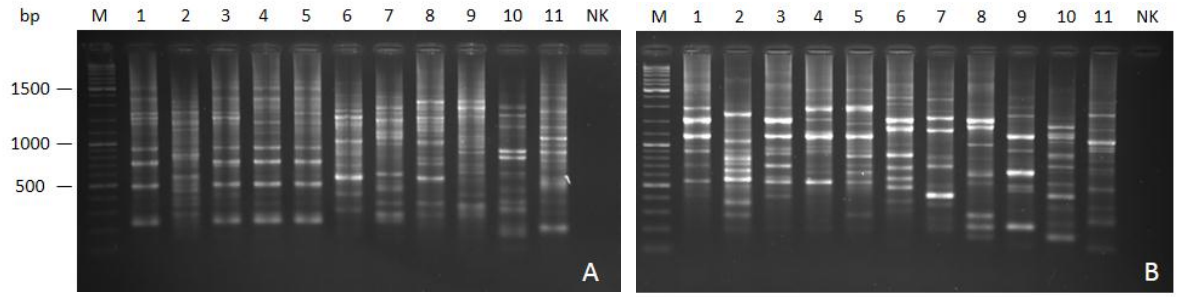

Abbildung II-11: SAPD- (A) and nSAPD- (B) PCR mit den Primern G-Not bzw. G-Not-G zur Generierung eines Stammtypischen DNA-Bandenmusters. M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); 1: Isolat 610; 2: Isolat 613: 3: Isolat 626; 4: Isolat 639: 5: Isolat 640; 6: *Methylocystis echinoides*; 7*: Methylocystis bryophil*; 8: *Methylocystis rosea*; 9: *Methylocystis hirsuta*; 10: *Methylocystis heyeri*; 11: *Methylocystis parvus*; NK: PCR-H_2O

Tabelle II-24: Identifikationsmuster der Termitenisolate und *Methylocystis*-Referenzstämme basierend auf ihren nSAPD-PCR-Fragmentmustern

Bakterienkultur	nSAPD-PCR Fragmentenlänge [bp]
Methylocystis echinoides	3429, 2451, 2081, 1550, 1322, 1000, 834, 700, 560, 486, 387, 348, 317
Methylocystis bryophila	3500, 2701, 2306, 1796, 1550, 1280, 800, 711, 507, 426, 361, 245, 209
Methylocystis rosea	3359, 2168, 1524, 1000, 792, 600, 522, 282, 214, 161
Methylocystis hirsuta	2451, 1941, 1684, 1524, 1148, 900, 622, 493, 466, 219
Methylocystis heyeri	1629, 1365, 1131, 1047, 834, 711, 647, 514, 419, 330, 224, 156
Methylocystis parvus	2168, 1941, 1684, 1300, 1031, 956, 886, 768, 673, 622, 473, 323, 240, 90
Isolat 610	3359, 3073, 2354, 1912, 1550, 1165, 970, 913, 732, 537, 500, 433
Isolat 613	4000, 1883, 1711, 1300, 1063, 900, 792, 741, 660, 552, 500, 374, 288, 204
Isolat 626	5535, 3359, 2306, 1941, 1524, 1148, 927, 859, 722, 560, 529, 419, 204
Isolat 639	3000, 2402, 1883, 1550, 1148, 970, 886, 634, 529, 479, 433, 374, 195
Isolat 640	5000, 3000, 1941, 1602, 1477, 1148, 900, 822, 722, 634, 529, 486, 446, 288, 204

Die Ergebnisse der nSAPD-PCR unterstützen die Vermutung, dass es sich bei den Isolaten um neue *Methylocystis*-Spezies handeln könnte. Um dies genauer zu analysieren wurde die komplette 16S rDNA sequenziert. Um die komplette 16S rDNA-Sequenz zu entschlüsseln, wurden zunächst Primer entwickelt. Abb. II-12 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer, Tab. II-25 zeigt deren spezifische Eigenschaften. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes sowie die spezifischen PCR-Bedingungen sind Tab. II-26 bzw. Tab. II-27 zu entnehmen. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma LGC Genomics in Berlin. Nur durch Kenntnis der kompletten 16S rDNA ist ein Abgleich der gewonnenen Sequenz mit denen in öffentlichen Sammlungen, wie bspw. NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) hinterlegten Sequenzen möglich und es können Aussagen zu Verwandtschaftsverhältnissen getroffen werden.

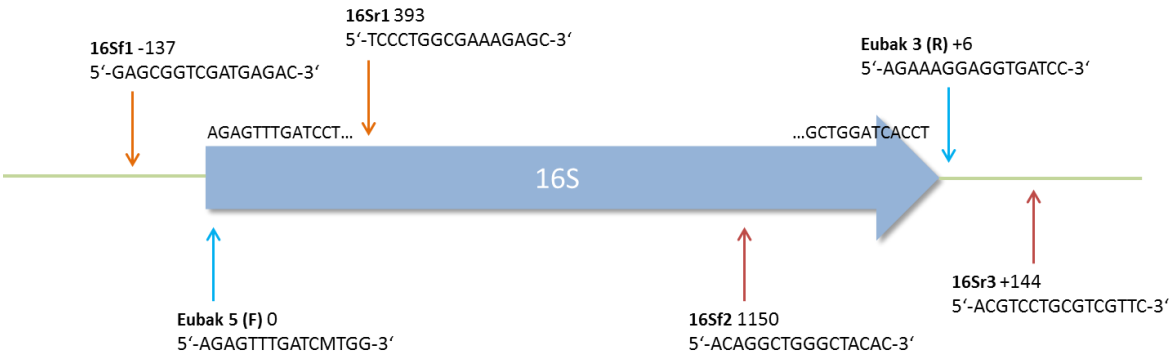

Abbildung II-12: Primer zur kompletten 16S rDNA-Sequenzierung

Tabelle II-25: Verwendeten Primer zur Sequenzierung der 16S rDNA (F: Forward-Primer, R: Reversed-Primer)

Primer	Sequenz (5' → 3')	bp	GC [%]	T_m [° C]
PurEubak3 (R)	AGA AAG GAG GTG ATC C	16	50	54,1
PurEubak5 (F)	AGA GTT TGA TCM TGG CT	17	44	53,5
16Sf1 (F)	GAG CGG TCG ATG AGA C	16	62,5	57,6
16Sr1 (R)	TCC CTG GCG AAA GAG C	16	62,5	62,9
16Sf2 (F)	ACA GGC TGG GCT ACA C	16	62,5	57,0
16Sr3 (R)	ACG AAG ACG GCG GCT G	16	68,7	66,7

Tabelle II-26: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung der 16S rDNA

Komponente (Stammlösung)	Volumen [µl]	Bezogen auf 50 µl
Forward Primer (10 µM)	1	0,2 µM
Reverse Primer: pmor (10 µM)	1	0,2 µM
dNTP (40 mM)	1	800 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	2	1mM[a]
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM $MgCl_2$)	5	1 x
Wasser	31	
Enhancer Solution P (5 x)	5	0,5 x
Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl)	2	2 U
Template-DNA (20 ng/µl)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

[a] **Die Gesamtkonzentration an $MgCl_2$ im Reaktionsansatz betrug 4 mM.**

Tabelle II-27: Bedingungen für die PCR-Amplifikation der 16S rDNA

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [° C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	95	5
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	56	1
4	Elongation	72	1
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Extension	72	10

Mit Hilfe der in Tab. II-25 eingesetzten Primer konnten bisher die komplette 16S rDNA-Sequenzen der Termitenisolate 610 (Isolat aus *Mastotermes darwiniensis*), 613 (Isolat aus *Netermes castaneus*), 626 (Isolat aus *Mastotermes darwiniensis*), 639 (Isolat aus *Mastotermes darwiniensis*) und 640 (Isolat aus *Incistitermes marginipennis*) konnten so die

16S DNA-Sequenzen gewonnen werden. Diese Sequenzen konnten jedoch nicht eindeutig den in Gendatenbanken (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) hinterlegten Sequenzen zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurde eine Analyse der zellulären Fettsäuren durch Prof. Peter Kämpfer an der Justus-Liebig-Universität durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle II-28 wiedergegeben.

Tabelle II-28. Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren der Termitenisolate (Stämme 610 - 640) und der MOB Referenzstämme. Mh: *Methylocystis hirsuta*; Mb: *Methylocystis bryophila*; Mp: *Methylocystis parvus*; Me: *Methylocystis echinoides*; Mr*: Methylocystis rosea*; Ml: *Methylobacter luteus*. Die Werte geben den Prozentsatz an den gesamten zellulären Fettsäuren wieder.

Fettsäure	Mh	Mb	Mp	Me	Mr	Ml	610	613	626	639	640
iso-$C_{14:0}$	-	-	-	-	-	-	-	1.6	-	-	-
iso-$C_{15:0}$	-	-	-	-	-	3.5	-	5.0	-	-	-
anteiso-$C_{15:0}$	3.5	-	-	-	-	-	-	1.8	-	-	-
iso-$C_{16:0}$	-	-	-	-	-	3.8	-	4.4	-	-	-
$C_{16:0}\omega7c$	1.1	18.7	-	1.3	18.6	2.2	-	-	1.5	-	1.6
$C_{16:0}$	4.2	11.4	4.7	2.3	17.7	12.8	1.7	7.2	2.0	1.0	2.0
anteiso-$C_{17:0}$	4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$C_{17:0}$cyclo	-	19.1	2.9	0.8	-	4.5	-	2.8	-	-	-
$C_{18:3}\omega6c$	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$C_{18:1}\omega8c$	43.5	17.1	44.2	93.7	63.7	58.1	95.2	55.1	93.6	94.7	84.2
$C_{18:1}\omega7c$	36.8	22.1	42.3	-	-	-	-	-	-	-	2.2
$C_{18:2}\omega7,12c$	3.8	11.5	5.9	1.8	-	14.7	2.7	22.2	2.2	2.8	-

Die MOB-Referenzstämme können gut voneinander unterschieden werden. Bei den Isolaten ähneln sich die Isolate 610 und 639 stark, eine gewisse Ähnlichkeit herrscht auch zwischen den Isolaten 626 und 640. Diese Übereinstimmung wiederspricht jedoch den Ergebnissen der (n)SAPD-PCR. Es gibt keine eindeutige Konformität der Fettsäuremuster der Isolate mit der der Referenzen, womit eine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Spezies nicht gegeben ist. Eine nähere Charakterisierung erfolgte durch MALDI-TOF-MS-, welche

freundlicherweise durch Dr. Andreas Rabenstein im MPA (Amtliche Materialprüfungsanstalt) Bremen durchgeführt wurde. Durch diese Analysemethode wurde eine enge Verwandtschaft der Isolate mit *Methylocystis bryophila* bzw. *Methylocystis parvus* ermittelt (Abb. II-13). Zur Klärung der systematischen Verwandtschaftsverhältnisse wird momentan eine Gesamtgenomsequenzierung durchgeführt.

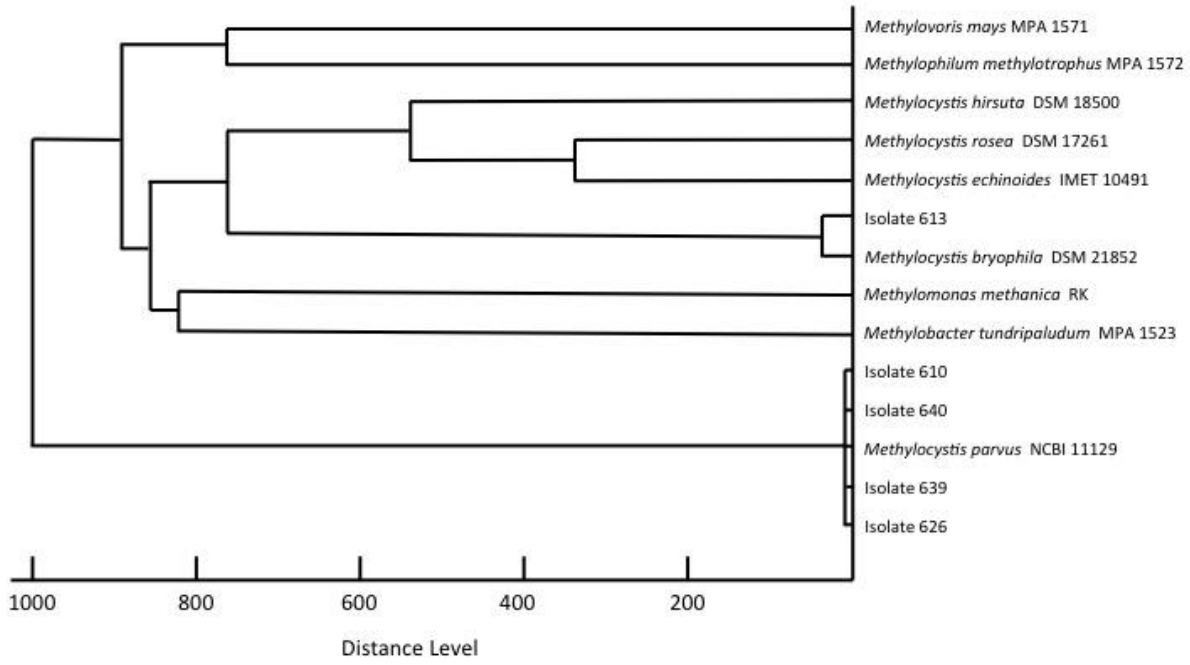

Abbildung II-13: Dendrogramm basierend auf MALDI-TOF massenspektrometrischen Analysen der Termitenisolate 610, 613, 626, 639, 640 und Referenzstämme.

Charakterisierung isolierter methanotropher Bakterien

Die aus Termiten isolierten Stämme wurden auf ihre physiologischen Eigenschaften hin untersucht. So wurde Methan als C-Quelle durch verschiedene organische Quellen in einer Konzentration von 0,2 % ersetzt. Ebenso wurden verschiedene stickstoffhaltige Substanzen auf ihre Verwertbarkeit durch Methanotrophe geprüft. Hierfür wurde KNO_3 aus dem NMS-Medium durch verschiedene N-Quellen mit einer Konzentration von 0,1 % ersetzt. Darüber hinaus wurde das Wachstum bei 37 ° C beobachtet. Alle Versuchsansätze wurden in flüssigem NMS-Medium angesetzt und das Wachstum photometrisch bei 600 nm bestimmt. Darüber hinaus wurde eine mögliche Resistenz gegenüber Hitze ermittelt, indem die untersuchten Stämme 5 Tage lang bei 30 ° C in Flüssigmedium kultiviert und anschließend über einen Zeitraum von 20 min 80 °C ausgesetzt wurden. Die so behandelten Methanotrophen wurden auf NMS-Festmedium ausplattiert. Konnte hier eine Kolonienbildung festgestellt werden, so kann auf Hitzeresistenz durch Cystenbildung

rückgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind in Tab. II-35 wiedergegeben. Es wurden 9 verschiedene Referenzstämme (*Methylocystis parvus, Methylocystis bryophila, Methylocystis echinoides, Methylosinus sporium, Methylomonas methanica, Methylobacter luteus, Methylocaldum gracile, Methylocystis rosea* und *Methylocystis hirsuta*) auf die gleichen physiologischen Eigenschaften hin untersucht wie die Termitenisolate, um eventuelle Verwandtschaften aufzudecken. Sollte ein Isolat dieselben Eigenschaften wie ein Referenzstamm aufweisen, so wäre dies ein Hinweis, dass es sich hierbei um die gleiche Art handelt. Allein anhand der Kolonie- und Zellmorphologie kann keine Differenzierung erfolgen, da sich Methanotrophe hierbei kaum unterscheiden. Lediglich *Methylocystis rosea* weißt abweichend von der üblichen weißen Kolonienfärbung eine rosafarbene Pigmentierung auf. Da dies bei keinem der Isolate zu beobachten ist, kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Isolaten um diese Methanotrophen-Art handelt. Die Exprimierung der sMMO, die lösliche Form der Methanmonooxygenase, welche manche Methanotrophe bei Kupfermangel bilden (Grosse et al. 1999) wurde durch einen kolorimetrischen Naphtalin-Oxidationsassay nach Bowman et al. (1993) nachgewiesen. Hierfür wurden die Kulturen in kupferfreiem Medium bis zur späten exponentiellen Phase angezogen und die Zellen mittels Ultraschall aufgebrochen. Diese Zellen wurden mit sterilem, kupferfreien Medium auf OD 0,3 (bei 600 nm) verdünnt. Es wurden 1 ml der Zellsuspension und 1 ml einer 235 µM Naphtalin-Lösung vermischt und bei 25 °C und 200 rpm über einen Zeitraum von 1 h inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer 0,2 % (w/v) Fast Blue BN-Lösung (Sigma) zugegeben und auf Farbumschlag hin bei 525 nm untersucht. Als Kontrolle dienten Isolate, die in Kupferhaltigem NMS-Medium gezogen wurden, sowie hitzegetötete und in kupferfreiem Medium angezogene Isolate. Diese Ergebnisse wurden durch PCR-Analysen nach Auman et al., 2000 unter Zuhilfenahme der Primer mmoXA (5‘-ACCAAGGARCARTTCAAG-3‘) und mmoXD (5’- CCGATCCAGATDCCRCCCCA -3’) (Tab. II-29). Die Reaktionsansätze und -Bedingungen sind Tab. II-30 bzw. Tab. II-31 zu entnehmen. *Methylocystis hirsuta, Methylocystis bryophila* und *Methylocystis echinoides* sind demgemäß in der Lage, sMMO bei Kupfermangel auszubilden, nicht jedoch *Methylocystis rosea, Methylocystis heyer, Methylocystis parvus* oder eines der Termiten-Isolate (Tab. II-35).

Tabelle II-29: Verwendeten Primer zum Nachweis des *sMMO*-Gens

Primer	Sequenz (5’ → 3’)	bp	GC [%]	T_m [° C]
mmoXA (F)	ACCAAGGARCARTTCAAG	18	45	50,0
mmoXD (R)	CCGATCCAGATDCCRCCCCA	20	64	60,0

Tabelle II-30: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung der 16S rDNA

Komponente (Stammlösung)	Volumen [µl]	Bezogen auf 50 µl
Forward Primer (10 µM)	1	0,2 µM
Reverse Primer: pmor (10 µM)	1	0,2 µM
dNTP (40 mM)	1	800 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	2	1mM[a]
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM $MgCl_{2)}$	5	1 x
Wasser	31	
Enhancer Solution P (5 x)	5	0,5 x
Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl)	2	2 U
Template-DNA (20 ng/µl)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

[a] **Die Gesamtkonzentration an $MgCl_2$ im Reaktionsansatz betrug 4 mM.**

Tabelle II-31: Bedingungen für die PCR zum Nachweis von sMMO

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [° C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	94	0,5
2	Denaturierung	92	1
3	Annealing	60	1
4	Elongation	72	1
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Extension	72	5

Zudem wurde die Zellstabilität gegenüber SDS nach Lindner et al. (2007) getestet. Hierbei wurden 195 µl der zu untersuchenden Kultur mit 5 µl einer SDS-Lösung versetzt und neben einer Überprüfung der Zelllyse auch eine eventuelle Abnahme der OD bei 620 nm gemessen. Alle Isolate und *Methylocystis*-Referenzstämme wiesen eine Stabilität gegenüber SDS bis zu 8% auf (Tab II-35). Potentielle Bildung von Poly-β-Hydroxybutyrat (PHB) wurde durch Färbung mit 0,03 % (w/v) Sudan Schwarz und 0,5 % (w/v) Safranin-Lösung nach

Wartiainen et al., (2006) analysiert. Bis auf *Methylocystis echinoides* waren alle untersuchten Isolate und Referenzstämme in der Lage PHB zu bilden (Tab II-36). Die Toleranz gegenüber NaCl wurde durch Zusatz von 0,01 bis 10 % NaCl zum Flüssigmedium untersucht. Bis zu einer Konzentration von 4 % konnte Wachstum bei *Methylocystis bryophila, Methylocystis rosea, Methylobacter luteus* und den Isolaten 610, 613, 626 und 640 durch photometrische Messung bei 600 nm festgestellt werden. *Methylocystis parvus* und das Isolat 639 tolerierten mit bis zu 3,5 % NaCl-Zusatz geringfügig weniger hohe Salzkonzentrationen. *Methylocystis hirsuta* und *Methylocystis echinoides* zeigten bei den getesteten Kulturen die geringste Toleranz mit Wachstum bis zu 3 bzw. 2,5 % (Tab II-35). Um tolerierten Temperaturbereich der Isolate zu ermitteln wurde das Wachstum bei 7 bis 50 °C getestet. *Methylocystis hirsuta* zeigte hierbei ab 20 °C Wachstum, das Isolat 639 ab 25 °C und der Rest ab 30 °C Wachstum. Isolat 610 ist bei der Temperaturtoleranz sehr eingeschränkt und toleriert nur Temperaturen bis 35 °C wie auch *Methylocystis hirsuta. Methylocystis bryophila, Methylocystis parvus, Methylocystis echinoides, Methylocystis rosea, Methylobacter luteus,* Isolat 613, 626 und 639 zeigten bis 40 °C Wachstum, Isolat 640 bis 45 °C. Das Temperaturoptimum lag bei allen Kulturen bei 30 °C außer bei Isolat 613, welches bei 35 °C das stärkste Wachstum aufzeigte (Tab II-35). Der Einfluss des pHs auf Wachstum wurde durch Einstellung des pH-Werts des entsprechenden Flüssigmediums auf pH 2 bis 12 getestet. Allgemein konnte Wachstum ab pH 5 festgestellt werden, allein *Methylocystis echinoides* tolerierte den etwas saureren pH von 4. *Methylocystis hirsuta* und Isolat 610 zeigten Wachstum bis pH 8, die restlichen untersuchten Kulturen bis hin zum alkalischen pH 10. Das Optimum hierbei liegt bei allen Kulturen zwischen pH 6 und 8 mit der Ausnahme von Isolat 613 mit pH 8 (Tab. II-35). Die Fähigkeit zur Stickstofffixierung wurde über den Nachweis des Nitrogenase-Reduktase-Gens (*nifH*) durch PCR nach Wartiainen et al., 2006 erbracht. Hierfür wurden die Primer nifH1 (5‘-TGYGAYCCNAARGCNGA-3‘) und nifH2 (5‘-ADNGCCATCATYTCNCC-3‘) verwendet (Tab. II-32). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen sind Tab II-33 bzw. Tab II-34 zu entnehmen. Die Auswertung des Agarosegels zeigte bei allen *Methylocystis*-Referenzen und Isolaten eine Amplifikation des *nifH*-Gens der Größe von etwa 350 bp.

Tabelle II-32: Verwendeten Primer zum Nachweis des Nitrogenase-Reduktase-Gens *nifH*

Primer	Sequenz (5’ → 3’)	bp	GC [%]	T_m [° C]
nifH1 (F)	TGYGAYCCNAARGCNGA	17	54	61
nifH2 (R)	ADNGCCATCATYTCNCC	17	50	60

Tabelle II-33: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung des Nitrogenase-Reduktase-Gens *nifH*

Komponente (Stammlösung)	Volumen [µl]	Bezogen auf 50 µl
Forward Primer (10 µM)	1	0,2 µM
Reverse Primer: pmor (10 µM)	1	0,2 µM
dNTP (40 mM)	1	800 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	2	1mM[a]
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM $MgCl_2$)	5	1 x
Wasser	31	
Enhancer Solution P (5 x)	5	0,5 x
Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl)	2	2 U
Template-DNA (20 ng/µl)	2	40 ng
Gesamtvolumen	50	

[a] **Die Gesamtkonzentration an $MgCl_2$ im Reaktionsansatz betrug 4 mM.**

Tabelle II-34: Bedingungen für die PCR zum Nachweis des Nitrogenase-Reduktase-Gens *nifH*

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [° C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	94	0,5
2	Denaturierung	92	1
3	Annealing	60	1
4	Elongation	72	1
5	35 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Extension	72	5

Die beobachteten physiologischen Eigenschaften der Isolate wiesen, wie Tab. II-35 zu entnehmen ist, im Allgemeinen jedoch keine Übereinstimmung mit den Referenzstämmen auf. Anhand physiologischer Merkmale kann demzufolge keine Analyse der verwandtschaftlichen Verhältnisse erfolgen, es ist aber ein weiterer Hinweis auf die Isolierung bislang noch nicht beschriebener *Methylocystis*-Arten.

Charakteristikum	Mh	Mb	Mp	Me	Mr	Ml	610	613	626	639	640
Koloniefärbung	weiß/ beige	weiß	weiß / beige	weiß	rosa	beige/ gelb	weiß / beige	weiß / beige	weiß / beige	weiß / beige	weiß / beige
Zellgröße [µm]	0.3-0.8 × 0.6-0.9	0.8-1.2 × 1.2-3.0	0.5-0.9 × 0.8-1.9	0.7-0.9 x 1.0-1.9	0.8-1.3 × 0.9-2.1	0.6-1.1 x 0.8-1.7	0.6-0.8 x 0.7-1.7	0.5-1.0 x 0.6-1.3	0.8-1.3 x 1.1-2.3	0.6-1.2 x 1.5-2.0	0.5-1.0 x 1.7-2.7
Zellform	hantelförmig, kurze Stäbchen	Kokkoide Stäbchen	Kokkoide Stäbchen	(Kokkoide) Stäbchen	(Kokkoide) Stäbchen	Kokkoide Stäbchen	Kokkoide Stäbchen	(Kokkoide Stäbchen)	Kokkoide Stäbchen	gebogene Kokkoide Stäbchen	Kokkoide Stäbchen
PHB-Produktion	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Hitzeresistenz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sMMO	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
nifH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH-Toleranz	5-8	5-10	5-10	4-10	5-10	5-10	5-8	5-10	5-10	5-10	5-10
Temperatur-Toleranz [°C]	20-35	30-40	30-40	30-40	30-40	30-40	30-35	30-40	30-40	25-40	30-45
Verwertbare N-Quellen	Aspartat Ornithin Aasparagin Glutamin	Aspartat Lysin Ornithin Aasparagin Glutamin	Aspartat Lysin Ornithin Aasparagin Glutamin	Aspartat Aasparagin Glutamin	Aspartat Ornithin Aasparagin Glutamin	Aspartat Lysin Ornithin Aasparagin Glutamin	Aspartat Ornithin Aasparagin Glutamin	-	Aspartat Ornithin Aasparagin Glutamin	Aspartat Ornithin Aasparagin Glutamin	Aspartat Ornithin Aasparagin Glutamin
Verwertbare C-Quellen	Methanol CH_4	Methanol CH_4	Methanol CH_4	Methanol CH_4	Methanol CH_4	Methanol CH_4	Methanol Methylamin CH_4	Methanol CH_4	Methanol CH_4	Methanol CH_4	Methanol CH_4
NaCl -Toleranz	<3%	<4 %	<3.5 %	<2.5 %	<4 %	<4%	<4 %	<4 %	<4 %	<3.5 %	<4 %
SDS-Stabilität	<8 %	<8 %	<8 %	<8 %	<8 %	<8 %	<8 %	<8 %	<8 %	<8 %	<8 %

Tabelle II-35: Charakteristische Merkmale methanotropher Termitenisolate (610, 613, 626, 639, 640) und ihrer Referenzstämme. Mh: *Methylocystis hirsuta;* Mb: *Methylocystis bryophila;* Mp: *Methylocystis parvus;* Me: *Methylocystis echinoides;* Mr: *Methylocystis rosea;* Ml: *Methylobacter luteus.*

Die Zusammensetzung der mikrobiellen Population im Termitendarm wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad) analysiert. Die Klonierung wurde mit dem pCR™II-TOPO®-Plasmid durchgeführt. Dieser Vektor weist an der Multiple Cloning Site (MCS) einen Überhang an 3‘-Thymidin auf. Die *Taq*-Polymerase der zuvor durchgeführten PCR mit den Primern Eubak3rev (5’-AGAAAGGAGGTGATCC-3’) und Eubak5for (5’-AGAGTTTGATCMTGGCT-3’) (Pfannebecker, 2008) (s. Tab II-25, II-26 und II-27) fügt an das 5‘-Ende des Amplifikats einen Adenin-Überhang an, wodurch eine Ligation des PCR-Inserts in die MCS des Plasmids erfolgt. Das verwendete Kit bedient sich hierbei statt einer DNA-Ligase einer Typ-I-DNA-Topoisomerase, welche kovalent an das 5‘-Ende des linearisierten Vektors angeheftet ist. Die Topoisomerase spaltet an der spezifischen Sequenz 5‘-CCCTT-3‘, wobei Energie freigesetzt wird, welche genutzt wird um eine kovalenten Bindung zwischen dem Phosphatrest des abgespaltenen Vektorstrangs und einem Tyrosylrest (Tyr-274) der Topoisomerase einzugehen (s. Abb. II-14). Diese Bindung wird wieder getrennt, wenn sich das 5‘-OH-Ende des Inserts an die Phospho-Tyrosylbindung räumlich annähert und die Fremd-DNA wird in den Vektor integriert, wobei sich die Topoisomerase von der DNA trennt (Invitrogen, 2012; May 2012). Der Vektor weißt eine Kanamycinresistenzkassette auf, mit der eine Selektion der erfolgreich transformierten Zellen auf Antibiotikahaltigem LB-Festmedium erfolgen konnte.

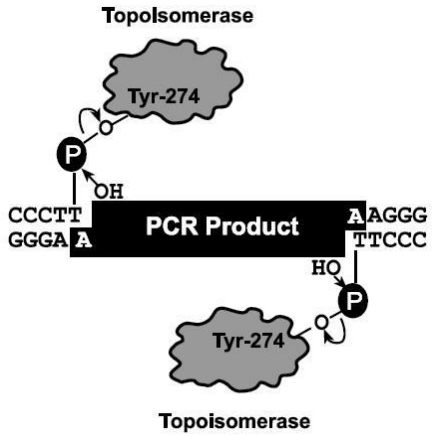

Abbildung II-14: Phosphotyrosin-Bindung der Typ-I-Topoisomerase. (Invitrogen, 2012).

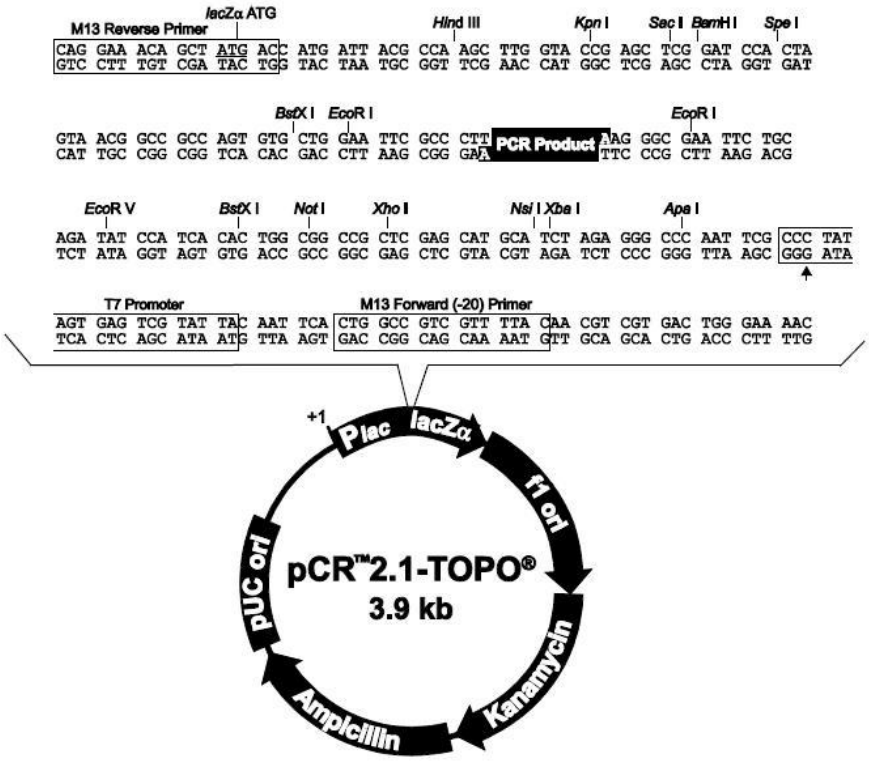

Abbildung II-15: Genmappe des verwendeten TOPO-Vektors

Die Transformation erfolgte chemisch nach Anleitung des Herstsllers in kompetente *E. coli*-Zellen. Die Inserts wurden mit Hilfe der im Kit enthaltenen Primern T7 und T3 (s. Tab II-36, II-37 und II-38) amplifiziert und mit Gelelektrophorese auf Größen zwischen 150 bis 1500 bp determiniert. Nur Klone, die ein Insert von mind. 1200 bp auswiesen wurden sequenziert. Die Daten wurden mit Sequenzen der NCBI-Gendatenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) abgeglichen. So konnten 29,4 % der Klone Spirochäten zugeordnet werden, 17,6 % der Bakterien waren Proteobacteria, von denen 11,7 % α-Proteobacteria darstellten, zu denen auch Typ II MOB gehören. Eine genauere Zuordnung war nicht möglich. Die restlichen 15,2 % wurden von Planctomycetales und Firmicutes gestellt (s. Tab. II-39).

Tabelle II-36: Verwendeten Primer zur Amplifizierung des Inserts bei Klonierungs-untersuchungen

Primer	Sequenz (5' → 3')	bp	GC [%]	T_m [° C]
T3 (F)	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	20	40	48
T7 (R)	TAATACGACTCACTATAGGG	20	40	48

Tabelle II-37: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur Amplifizierung des Inserts bei Klonierungsuntersuchungen

Komponente (Stammlösung)	Volumen [µl]	Bezogen auf 50 µl
Forward Primer (100 µM)	0,6	0,2 µM
Reverse Primer: pmor (100 µM)	0,6	0,2 µM
dNTP (40 mM)	1	800 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	2	1mM[a]
PCR-Puffer (10x) (enthält 20 mM $MgCl_2$)	5	1 x
Wasser	38,8	
Taq-DNA-Polymerase (1 U/µl)	2	2 U
Kolonie als Template-DNA	-	-
Gesamtvolumen	50	

[a] **Die Gesamtkonzentration an $MgCl_2$ im Reaktionsansatz betrug 4 mM.**

Tabelle II-38: Bedingungen für die PCR zur Amplifizierung des Inserts bei Klonierungsuntersuchungen

Nr.	Reaktionsschritt	Temperatur [° C]	Zeit [min]
1	Initial-Denaturierung	94	10
2	Denaturierung	94	1
3	Annealing	45	1
4	Elongation	72	2
5	25 Zyklen beginnend bei Nr. 2		
6	Finale Extension	72	10

Tabelle II-39: Bakterielle Zusammensetzung eines Termitendarms im Mittel.

Bakterienspezies	Häufigkeit [%]
Spirocheatales	29,4
β-Proteobacteria	17,6
α-Proteobacteria	11,7
Firmicutes	9,3
Planctomycetales	5,9

II.3 Stammoptimierung (AP 3)

Im Rahmen der kooperativen Arbeitsteilung wurden vom IMW verschiedene Stämme methanotropher Bakterien zur weiteren Bearbeitung an das PFI übergeben. Hierbei handelte es sich um Isolate aus Termitendärmen, aus Klärwerken sowie aus Mofetten. Weiterhin wurden am PFI Untersuchungen mit Stammkulturen methanotropher Bakterien aus der Sammlung der DSMZ durchgeführt. Die Bakterienkulturen wurden in einer flüssigen synthetischen Nährlösung angereichert. Die Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums ist in Tabelle II-40 aufgeführt.

Tabelle II-40: Zusammensetzung des NMS Medium eins; Quelle: in Anlehnung an {Whittenbury 1970 #27}

NMS-Medium I (DSMZ 1179)			**Spurenelementlösung; NMS-Medium I**		
$MgSO_4$ x 6 H_2O	1,000	g/L	Na_2-EDTA x 2 H_2O	0,561	g/L
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,134	g/L	$FeSO_4$ x 7 H_2O	0,200	g/L
Fe(III)-chlorid	0,002	g/L	$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0,011	g/L
KNO_3	1,000	g/L	$MnCl_2$ x 4 H_2O	0,003	g/L
KH_2PO_4	0,270	g/L	H_3BO_3	0,030	g/L
Na_2HPO_4 x 12 H_2O	0,720	g/L	$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,021	g/L
(optional) gereinigter Agar	12,500	g/L	$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,001	g/L
Spurenelementlösung	0,500	g/L	Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,002	g/L

Nach dem Herstellen des NMS-Medium I wird der pH-Wert 6,8 eingestellt. Dies erfolgte durch die Zugabe von 1M Natronlauge, beziehungsweise 1M Chlorwasserstoffsäure. Das Medium, welches später in die Petrischalen gegossen wurde, enthielt zusätzlich 20 g Agar. Als alternatives Wachstumssubstrat für Plattenkulturen wurde Methanol eingesetzt (5 ml je Liter Medium). Durch ein 50 °C warmes Wasserbad verhindert man eine vorzeitige Erhärtung. Für Flüssigkulturen wurden Hungate-Röhrchen sowie gasdicht verschließbare 150 ml Flaschen verwendet. Über eine Spritze wurden den Hungate-Röhrchen vier ml und den 150 ml Flaschen 44 ml des Methangemischs hinzugefügt. Es entstand ein Verhältnis von Luft zu Methan von vier zu eins. Anschließend werden die Gefäße autoklaviert. Während des Versuchs werden die Gasphasen teilweise verändert.

Nachfolgend sind die eingesetzten Gefäße mit den entsprechenden Zusammensetzungen aufgeführt:

16 ml Hungate-Röhrchen mit Schraubgewinde und Butylgummi-Septum

- 5 ml Medium
- Rest Luft
- Zusätzlich 4 ml Methangemisch (70% Methan und 30% Kohlendioxid)

154 ml Serum-Flaschen mit Aluminiumschraubverschluss und Butylgummi-Septum

- 30 ml Medium
- Rest Luft
- Zusätzlich 44 ml Methangemisch (70% Methan und 30% Kohlendioxid)

115 ml Serum-Flaschen mit Aluminium-Kappe und Butylgummi-Septum

- 22,4 ml Medium
- Rest Kohlendioxid
- Zusätzlich 54 ml Luft und 7,7 ml Methan

Petrischalen (VWR)

- pro Schale ca. 15 - 20 ml Medium
- 5 ml Methanol nach Autoklavieren in das gesamte Medium (1 Liter)

Die Bakterienstämme mit den Bezeichnungen 634, 635, 636 und 637 kommen nicht aus einer Stammsammlung. Sie wurden vom Projektpartner (JGU) aus Termiten und anderen Ökosystemen isoliert. Daneben wurden Untersuchungen an den Kulturen DSM 18500 und DSM 17706 aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) durchgeführt. Bei DSM 18500 handelt es sich um *Methylocystis hirsuta* (Lindner et al. 2007). Bei DSM 17706 um *Methylosinus sporium* (ex Romanovskaya et al. 1978, Bowman et al. 1993).

Zentraler Anhaltspunkt bezüglich der Aktivität und Abbaugeschwindigkeit war die Änderung der Gaszusammensetzung im Verlauf der verschiedenen Experimente. Für die entsprechenden Messungen bei den Untersuchungen im Labormaßstab wurde ein Gaschromatograph mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor eingesetzt (Fa. Varian).

Um eine möglichst hohe Oberfläche zu erhalten, auf denen sich die Bakterien ansiedeln können, wurden Füllkörper benutzt. Zunächst wurden Experimente mit Liapor Tonkugel durchgeführt (siehe Abb. II-16). Ein Vorteil dieser Körper ist die sehr große Oberfläche von rund 900 m^2 je m^3 Reaktorvolumen. Obwohl sich die Tonkörper als Aufwuchsfläche für die

Mikroorganismen als geeignet erwiesen, wurde der Einsatz des Materials aus technischen Gründen nicht weiter verfolgt.

Abbildung II-16: Aufwuchskörper Liapor (Ton)

Tests ergaben, dass die Tonkörper schon bei geringen mechanischen Belastungen im hohen Umfang feinkörnige Partikel abgeben. Diese würden sich im Verlauf der Fermentation in Dichtungen und Leitungen absetzten und den notwendigen Wartungsaufwand beim Betrieb des Reaktors deutlich erhöhen, außerdem wär mit einer geringen Standzeit der Reaktorfüllung zu rechnen. Daher wurden im weiteren Verlauf spezielle Kunststoffkörper aus HDPE untersucht (Abb. II-17).

Abbildung II-17: Aufwuchskörper HFX (HDPE)

Diese Körper erwiesen sich chemisch und mechanisch als ausreichend stabil und erreichen aufgrund der Wabenstruktur ebenfalls eine erhebliche Vergrößerung der Oberfläche. Erste Beimpfungsexperimente zeigten zudem, dass sich die Oberflächen gut als Besiedlungsflächen für die Mikroorganismen eignen. Im Hinblick auf den Vergleich und die Optimierung der Stämme wurden zunächst vergleichende Untersuchungen zur Wachstumsgeschwindigkeit auf Basis der optischen Dichte (O.D.;550 nm) durchgeführt. Abbildung II-18 zeigt den Wachstumsverlauf der Stämme 634, 635, 636, 637 sowie von DSM 18500 mit Medium NMS.

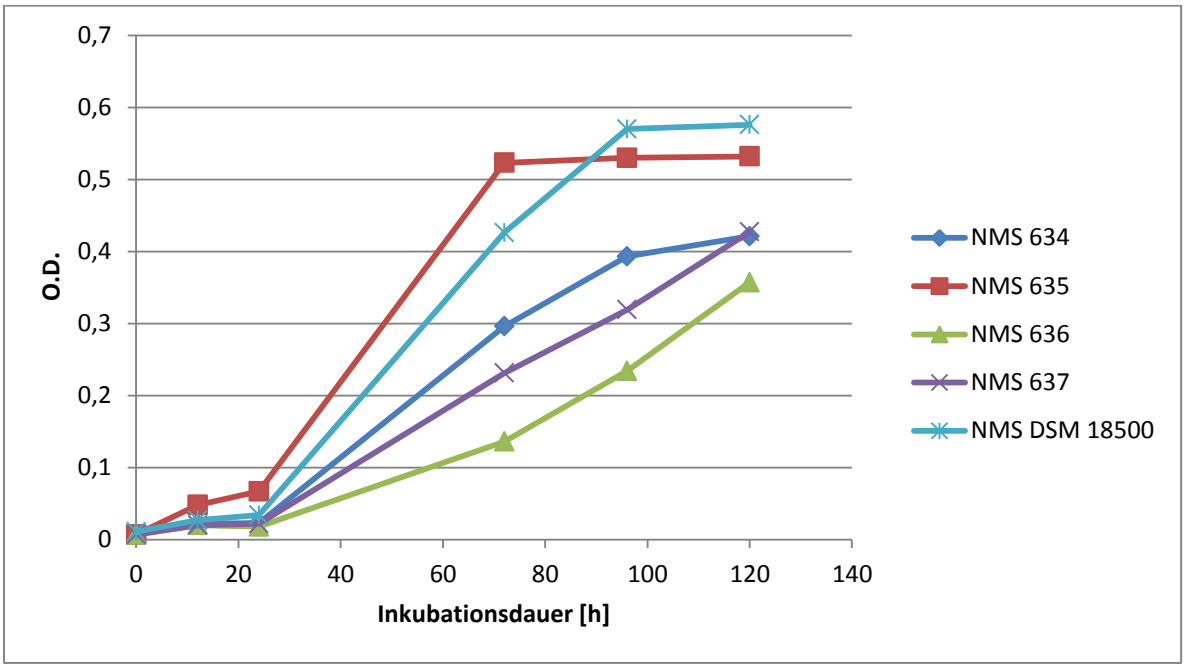

Abbildung II-18: Wachstumsverlauf der Stämme 634, 635, 636, 637 und DSM 18500. 634: *Mastotermes*-Isolat; 635: Isolat Kläranlage; 636: Isolat Mofette; 637: *Mastoteremes*-Isolat; DSM 18500: *Methylocystis hirsuta.*

Alle Stämme zeigten nach dem Animpfen eine lag-Phase zwischen 12 und 24 h. Das schnellste Wachstum war bei den Stämmen 635 und DSM 18500 festzustellen. Diese beiden Stämme erreichten mit einer O.D. zwischen 0,5 und 0,6 auch die höchste Zelldichte.

Im weiteren Verlauf wurde der Methanabbau durch die Kulturen überprüft. Beispielhaft ist der Abbau der Stämme NMS 634, 635, 636 sowie von DSM 18500 und DSM 17706 aufgeführt (siehe Abb. II-19, II-20, II-21, II-22 und II-23)

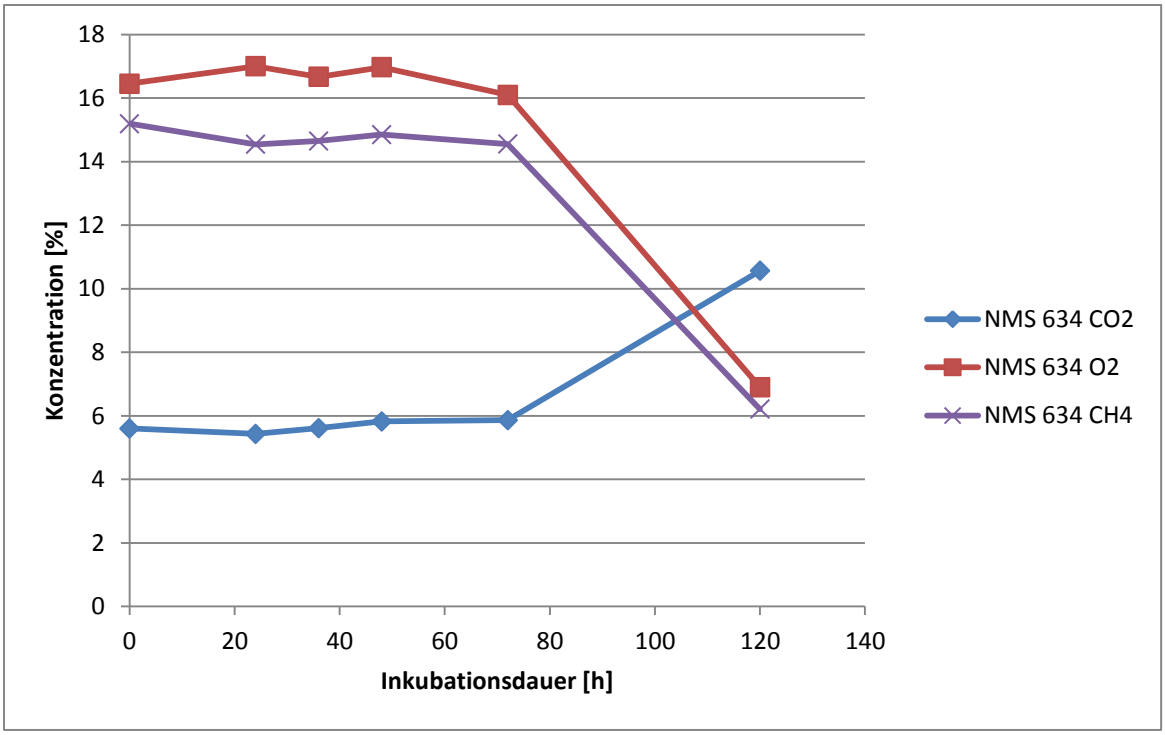

Abbildung II-19: Verlauf der Konzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid und Methan bei Stamm 634

Bei allen Stämmen war zunächst eine verlängerte lag-Phase zu beobachten, dies war allerdings versuchsbedingt da die Ansätze in einem größeren Maßstab durchgeführt wurden (100 ml Ansätze).

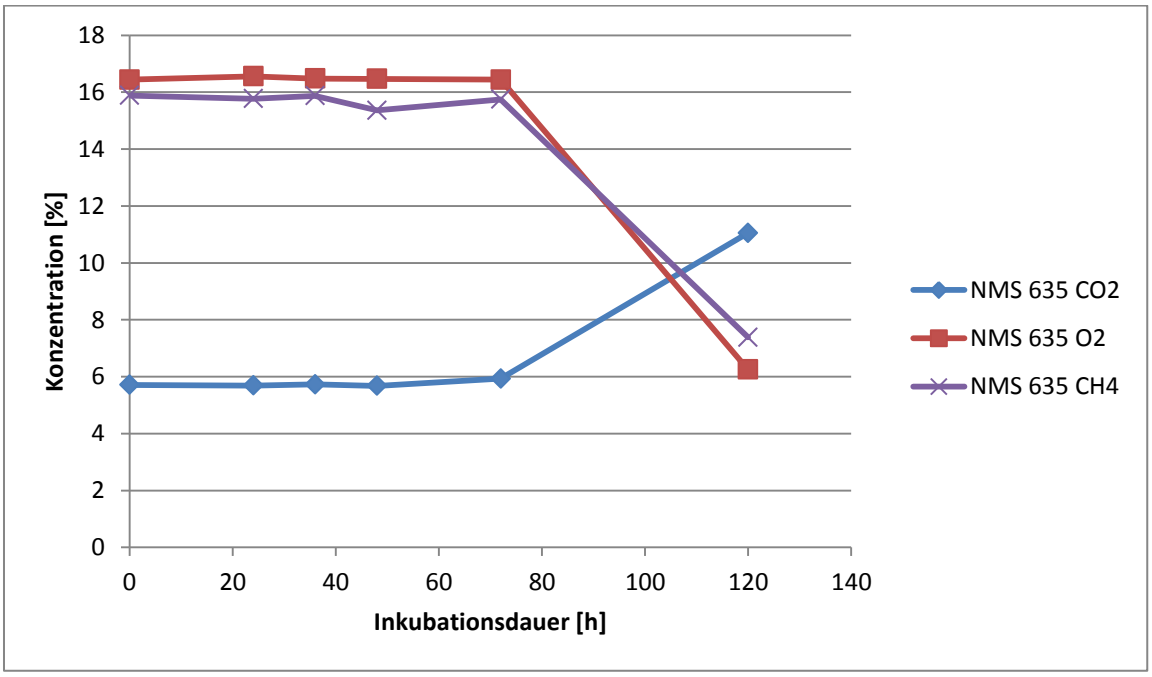

Abbildung II-20: Verlauf der Konzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid und Methan bei Stamm 635

Die Stämme 634 und 635 zeigten sehr ähnlichen Verlauf, nach Ende der lag-Phase wurden rund 2/3 des im Ansatz vorhandenen Methans innerhalb von ca. 48 h abgebaut. Im Anschluss verlangsamte sich der Abbau und auch nach längerer Inkubation verblieb ein Restgehalt Methan von 4-5 %.

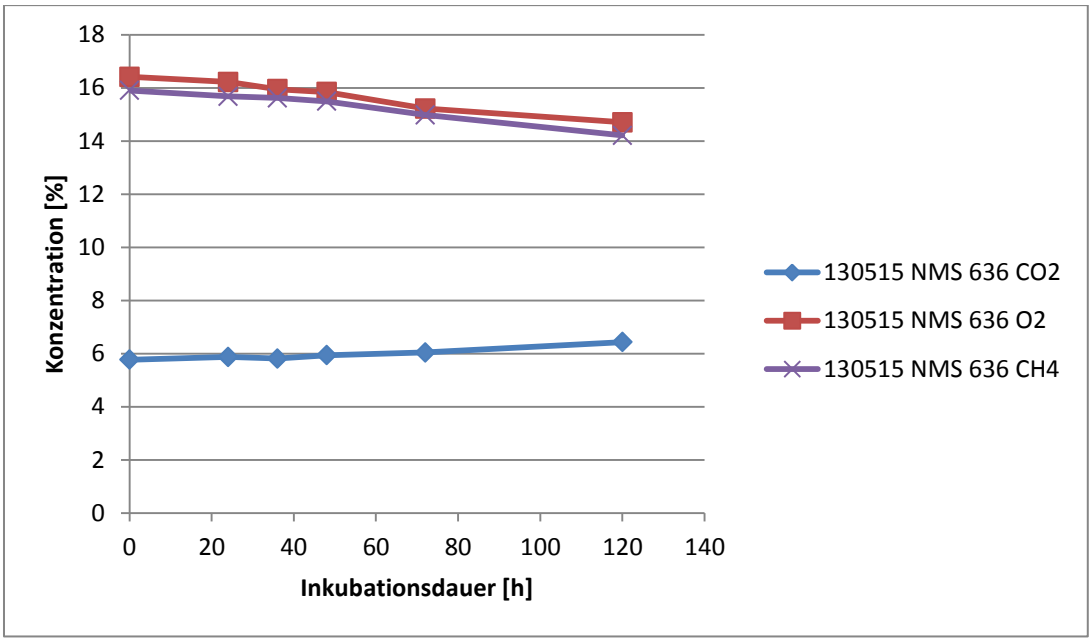

Abbildung II-21: Verlauf der Konzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid und Methan bei Stamm 636

Stamm 636 zeigte einen sehr langsamen Abbau, auch nach 120 h Inkubationsdauer lag der Methangehalt noch bei rund 14 %.

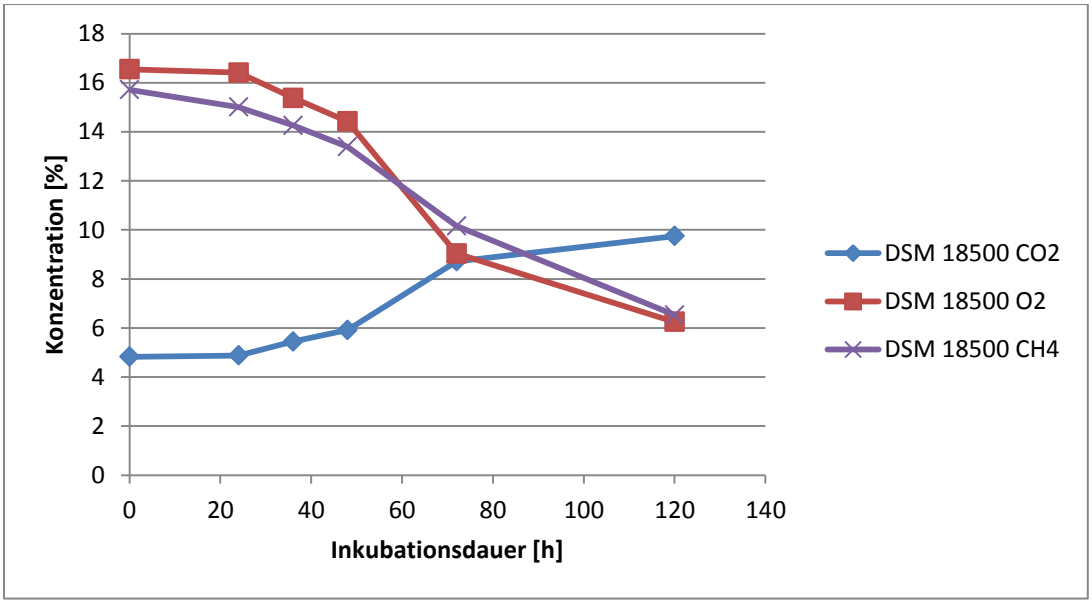

Abbildung II-22: Verlauf der Konzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid und Methan bei Stamm DSM 18500

Bei Stamm DSM 18500 wurden vergleichbare Endkonzentrationen erreicht, allerdings zeigte der Stamm ein schnelleres Wachstum, was sich in einer deutlich kürzeren lag-Phase bemerkbar machte.

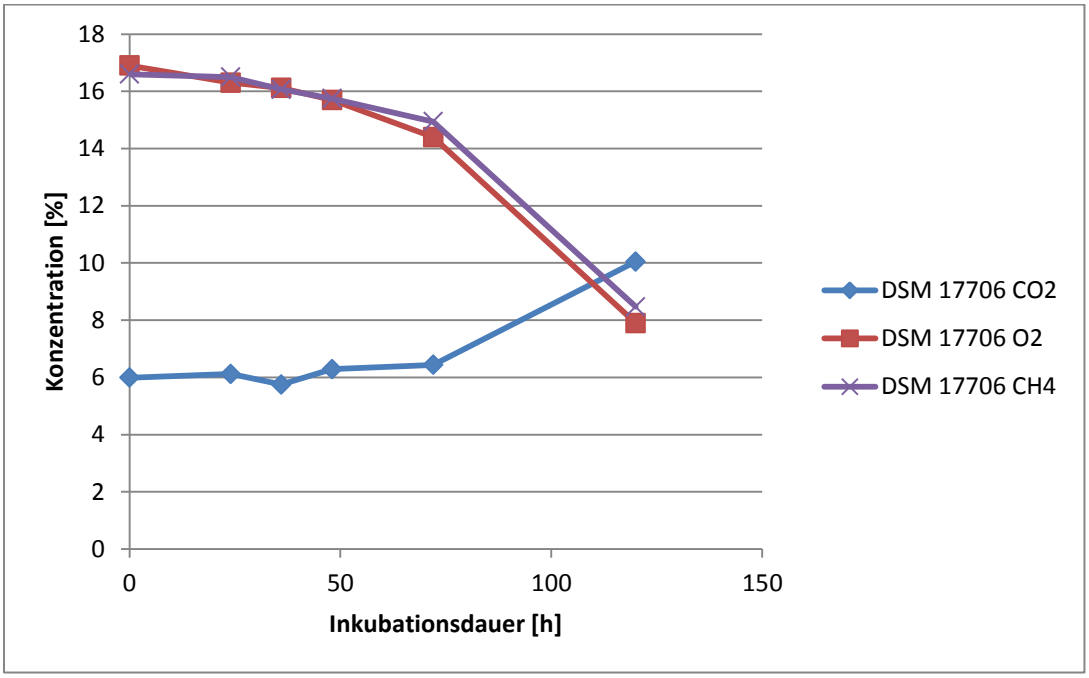

Abbildung II-23: Verlauf der Konzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid und Methan bei Stamm DSM 17706

Die Bakterienstämme sollen später in einem kontinuierlichen Verfahren Gas umwandeln können. Um diese Situation zu simulieren, wurden die bereits angewachsenen Bakterienstämme genutzt. Es wurden jene gewählt, die einen sehr schnellen Methanabbau aufweisen. Die Gasphase wurde unter sterilen Bedingungen neu beaufschlagt und der Abbau erneut analysiert.

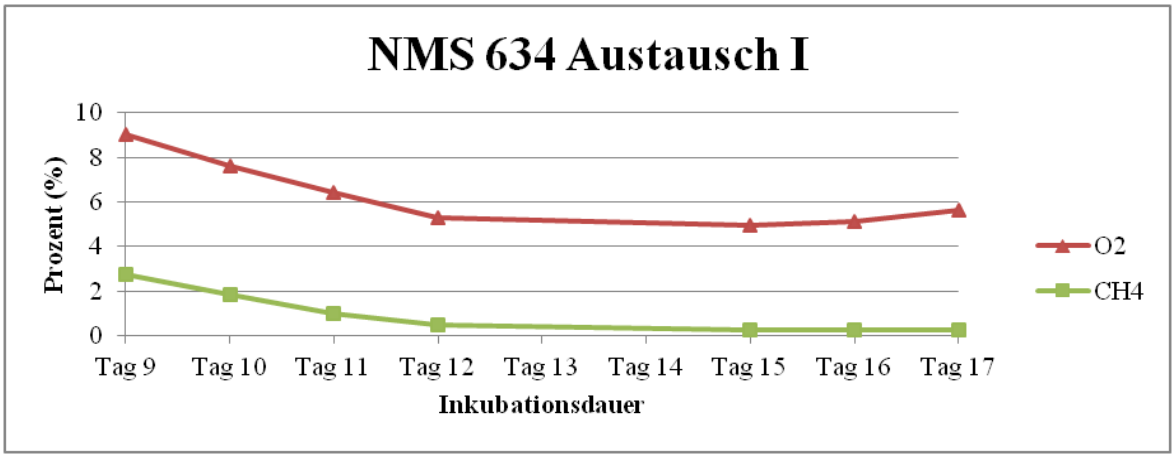

Abbildung II-24: Bakterienstamm 634 nach erstem Austausch der Gasphase

Die Inkubationsdauer entspricht der Anzahl an Tagen, seit die Kulturröhrchen beimpft wurden. Der neunte Tag entspricht Tag eins der Neubeaufschlagung. Methan und Sauerstoff werden schon ab dem ersten Tag der Beaufschlagung abgebaut. In Abbildung II-24 ist die Kultur 634 gezeigt. Bis Tag 12 sinkt der Methan- und Sauerstoffgehalt gleich schnell. Nach 15 Tagen liegt der Methangehalt unter 0,3 %.

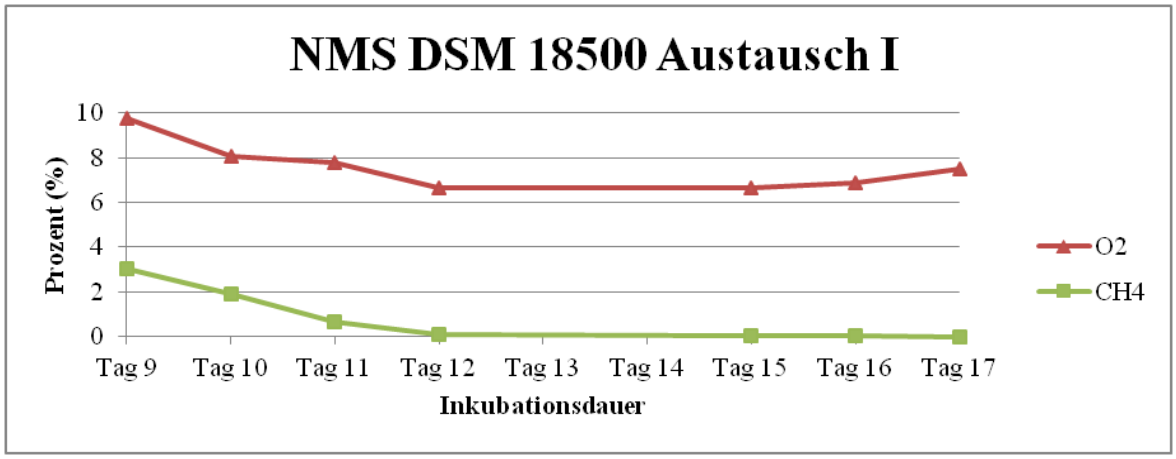

Abbildung II-25: Bakterienstamm DSM 18500 nach erstem Austausch der Gasphase

Die Abbildung II-25 zeigt den Bakterienstamm 18500 nach dem ersten Austausch der Gasphase. Auch hier beginnt der Anteil an Methan und Sauerstoff direkt an Tag neun der Inkubationszeit zu fallen. Am 12. Tag liegt der Wert unter 0,1 %. In den darauffolgenden Tagen sinkt die Konzentration weiter, bis am 17. Tag kein Methan mehr gemessen werden kann. Am 22. Tag der Inkubation wird erneut eine Gasphase beaufschlagt.

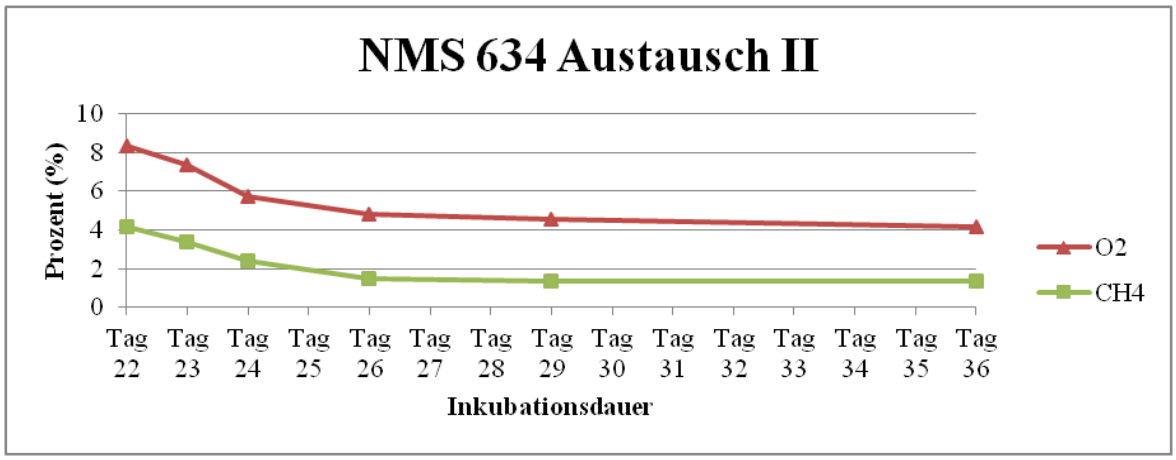

Abbildung II-26: Bakterienstamm 634 nach zweitem Austausch der Gasphase

In Abbildung II-26 ist die Kultur 634 zu sehen. Der Verlauf der Methan- und Sauerstoffkurve verläuft annähernd parallel. Ab dem ersten Tag des Gasphasenaustauschs findet der Abbau statt. Ab dem 26. Inkubationstag verlangsamt sich der Abbau deutlich. Im Gegensatz zur vorher beschriebenen Kultur hatten die Bakterien des Stammes DSM 18500 zu Beginn einen verlangsamten Stoffwechsel. Nach etwa drei Tagen Gasaustausch beschleunigt sich der Abbau bis zur letzten Woche (siehe Abb. II-27).

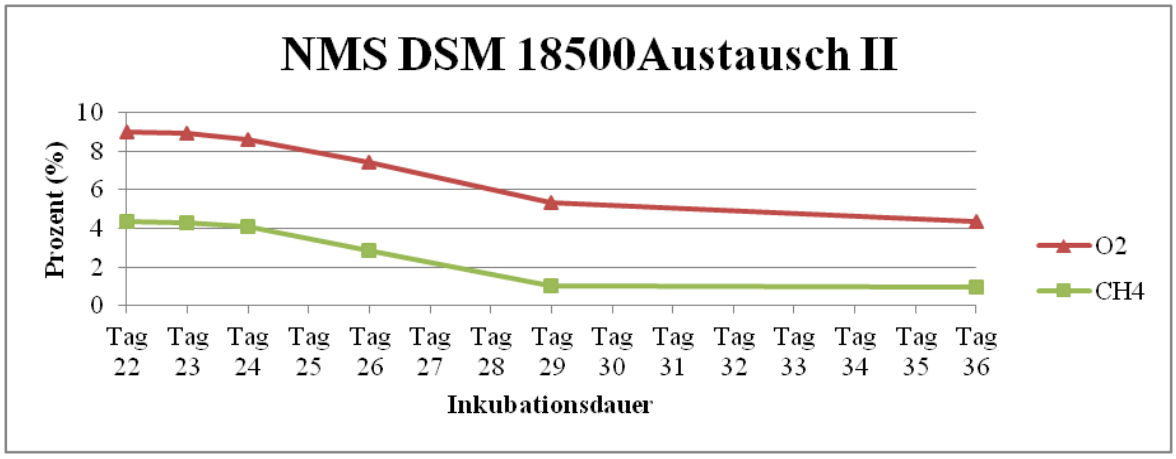

Abbildung II-27: Bakterienstamm DSM 18500 nach zweitem Austausch der Gasphase

Innerhalb der letzten sieben Tage wurden noch knapp 0,10 % Methan umgewandelt. Der Verbrauch an Sauerstoff ist prozentual annähernd gleich. Für einen unmittelbaren Vergleich, sind die prozentualen Abbaumengen der Messreihen in einem Balkendiagramm zu sehen (sieheII-28).

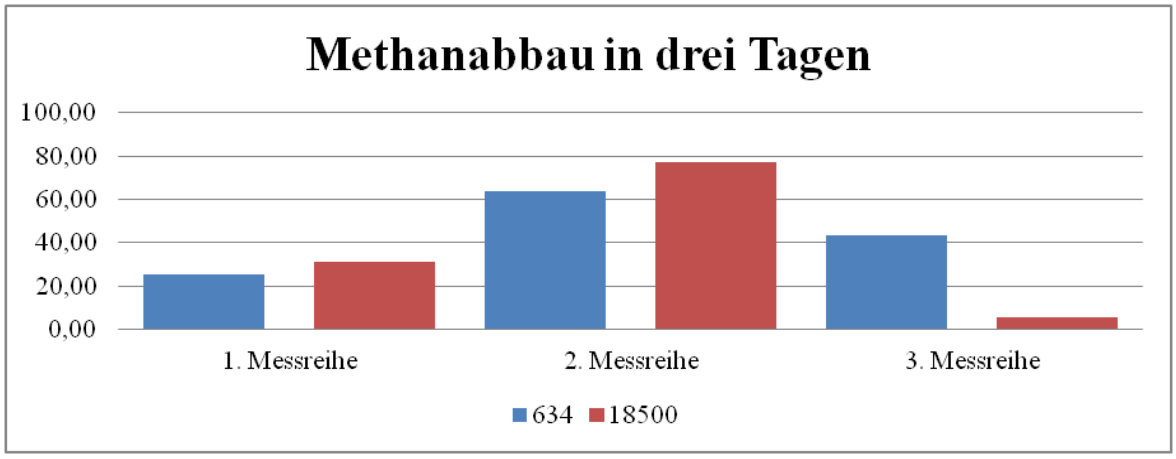

Abbildung II-28: Vergleich des Methanabbaus der 3 Messreihen innerhalb der ersten 3 Tage

Vom ersten Methanmesswert der neu gefüllten Gasphase wird der Anteil der Methankonzentration nach drei Tagen jeweils abgezogen. Je höher der Balken ist, desto mehr Methan wurde prozentual ab dem Startwert verbraucht. Die Kultur DSM 18500 hat in den ersten beiden Perioden der Messungen eine bessere Leistung gegenüber dem Bakterienstamm 634. Nach der zweiten Gasphasenänderung ist der Abbau nach den ersten drei Tagen jedoch deutlich niedriger. Beide Bakterienstämme erreichten nach der zweiten Beaufschlagung höhere Werte. Im Rahmen einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob sich die Bakterien auf einer Oberfläche dichter ansiedeln, als ausschließlich in dem Nährmedium. Dazu wurden Füllkörper gewählt, die durch den komplexen Aufbau eine maximale Oberfläche bieten.

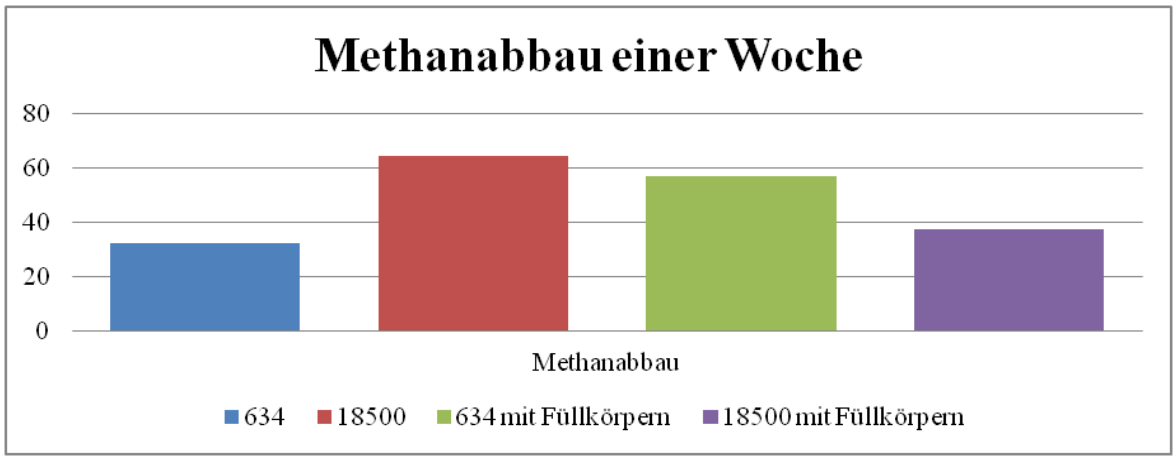

Abbildung II-29: Gegenüberstellung des Methanabbaus innerhalb einer Woche

Um einen direkten Vergleich zwischen den beiden Versuchen mit und ohne Füllkörpern zu erhalten wurden Referenzflaschen parallel gemessen. Die Kultur 634 mit Füllkörpern erreichte innerhalb der ersten Woche einen deutlich höheren Methanabbau, als im Referenzgefäß (siehe Abb. II-29). Bei dem Stamm DSM 18500 ist die Abbaugeschwindigkeit jedoch ohne Füllkörper deutlich schneller. Parallel zu den Messungen mit dem Gaschromatographen wurden auch Messungen zur OD durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass der OD Wert, bei Versuchen mit Füllkörper im Vergleich zu Versuchen ohne Füllkörper, sich kaum veränderten. Auch wenn die Konzentrationskurven der Gasphasen sich ähnlich waren. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die optimale Wachstumstemperatur des aussichtsreichsten Stammes 634 ermittelt. Im Folgenden ist der Methanabbau im Temperaturbereich zwischen 30 und 37,5 °C dargestellt.

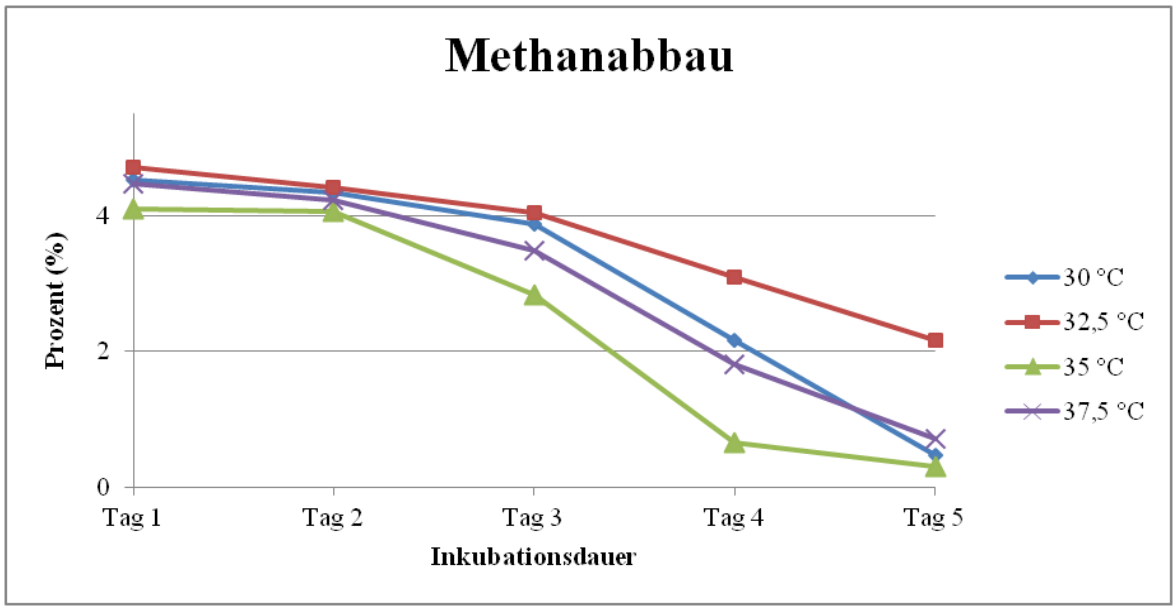

Abbildung II-30: Methanabbau in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Wie anhand der von Abb. II-30 ersichtlich lag das Optimum hinsichtlich Abbaugrad und Abbaugeschwindigkeit bei 35 °C. Auf Grundlage der ermittelten Daten wurde zunächst der Stamm 634 für die Versuche im Technikumsreaktor ausgewählt.

II.4 Gewinnung des Zwischenproduktes Ameisensäure (AP 4)

Um die Gewinnung des Zwischenproduktes Ameisensäure nachzuweisen, wurde zunächst ein Schwerpunkt auf die Detektion von Formiat gelegt. Als Grundlage für die Berechnung der theoretisch entstehenden maximalen Formiatkonzentration wurde der durchschnittliche Verbrauch von Methan durch die *Methylocystis*-Referenzstämmen *Methylocystis echinoides, M. rosea, M. heyeri, M. bryophila, M. hirsuta* und *M. parvus* gaschromatografisch nach 14 Tagen Inkubation auf 0,1 g/l bestimmt. Unter der Annahme, dass diese Menge an Methan komplett zu Formiat umgesetzt wird, könnten also maximal 0,1 g/l Formiat in einer Bormiolikultur aus 30 ml Medium und 70 ml Gasphase entstehen. Diese geringe Mengen an Formiat lassen sich am sichersten enzymatisch nachweisen. Hierfür wurde der UV-Test von r-biopharm (Mannheim) verwendet. Dieser Test beruht auf dem Prinzip, dass Formiat in Anwesenheit der Formiat-Dehydrogenase (FDH) quantitativ zu Bicarbonat oxidiert wird. Das entstehende NADH ist in seiner Konzentration äquivalent die des Formiats und kann photometrisch bei 330 nm nachgewiesen werden.

$$\text{Formiat} + NAD^+ + H_2O \xrightarrow{FDH} \text{Bicarbonat} + NADH + H^+$$

Vor der Messung eventuell gebildeten Formiats müssen die Zellen aufgeschlossen werden. Zunächst werden die Zellen der zu untersuchenden Kultur bei 4 °C und 4000 rpm über einen Zeitraum von 20 min pelletiert. Die Zellen werden in 0,9 %iger Natriumchloridlösung zweimal gewaschen und anschließend mit 0,5 ml Methanol versetzt und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei Raumtemperatur aufgeschlossen. Nun konnte der Formiatgehalt bestimmt werden.

Um die Gewinnung des Zwischenprodukts Formiat bei der CH_4-Oxidation zu erlangen, wurde versucht, die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase (FDH) herabzusetzen. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Formiat zu CO_2 (Abb. II-31). Da bei diesem Reaktionsschritt das obligate Reduktionsäquivalent $NADH/H^+$ entsteht, welches für die Energiegewinnung essentiell ist, wird von einem kompletten Knock-Out des Gens für die FDH abgesehen, einer potentiell letalen Mutation.

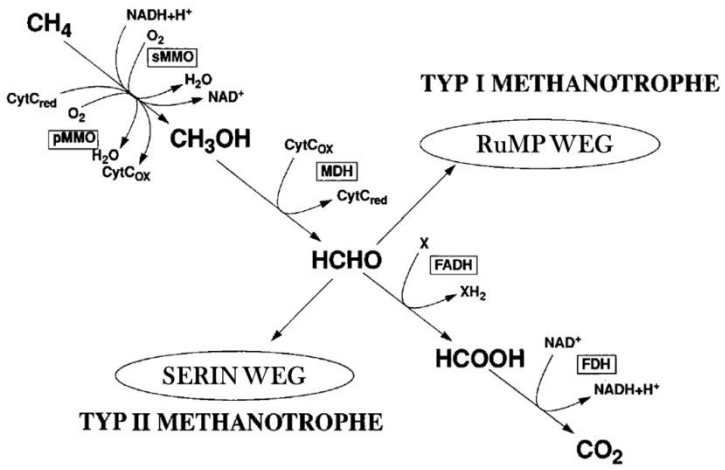

Abbildung II-31: Stoffwechselweg der Methanoxidation in Methanotrophen. MMO = Methanmonooxygenase, s = löslich (soluble), p = partikulär, MDH = Methanoldehydrogenase, FDH = Formiatdehydrogenase, X = Wasserstoffüberträger. Die MOB lassen sich in Typ I und Typ II unterscheiden, je nach Weg der Kohlenstofffixierung, der über den RuMP- bzw. den Serinweg erfolgt. Verändert nach Hanson et al. (1996)

Vielmehr wurde geprüft, ob die Enzymmenge durch RNA-Silencing herabgesetzt werden kann. Hierbei wird weniger Formiat zu CO_2 umgesetzt und Ameisensäure kann akkumulieren, jedoch werden weiterhin geringe Mengen zu CO_2 oxidiert, um die Energieversorgung der Zelle zu gewährleisten. RNA silencing ist ein natürlicher Mechanismus bei Pro- wie auch Eukaryoten, über den der Organismus die Genexpression kontrollieren kann. RNA-Silencing kann durch verschiedene Wirkmechanismen realisiert werden. Im vorliegenden Projekt wurde eine antisense RNA in das methanotrophe Bakterium eingebracht, welche komplementär zur Formiatdehydrogenase-kodierenden mRNA ist. Die in die Zelle eingebrachte antisense RNA und die mRNA bilden einen Komplex, welcher durch die Zelle als fremdartig erkannt und abgebaut wird (Good et al. 2011). Schematisch ist dieser Mechanismus in Abb. II-32 dargelegt.

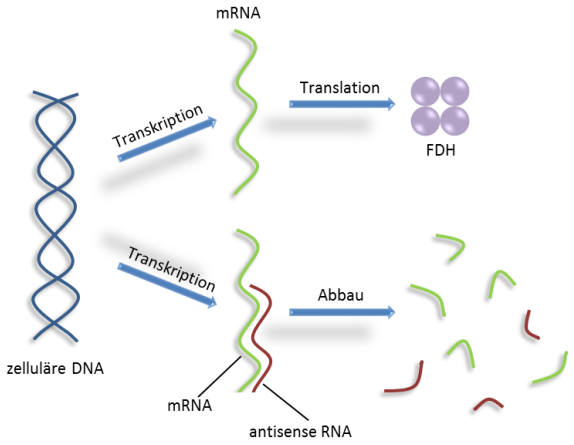

Abbildung II-32: Wirkungsweise der antisense RNA. Von der dsDNA wird durch Transkription eine mRNA generiert. Normaleweise wird diese tranlatiert und ein Protein (hier FDH) gebildet. Bindet jedoch die antisense RNA an die mRNA wird diese blockiert und der so entstandene Komplex abgebaut.

Letztendlich wird also die Translationsrate der FDH herabgesetzt, wobei die Expressionsrate unverändert bleibt. Es wird dementsprechend weniger Formiat umgesetzt, welches akkumuliert und letztendlich wieder Biogasanlagen zugeführt werden kann, wo es als Substrat für dortige Mikroorganismen dient. Das Einbringen der antisense RNA erfolgte über Plasmide, sogenannte Expressionsplasmide, welche einen für Methanotrophe geeigneten Promotor aufweisen müssen (Nakashima et al., 2012). Aus diesem Grund kann kein für diese Art von Experimenten üblicherweise herangezogene Expressionsplasmide für *E. coli*, eingesetzt werden, da dieser Promotor von Methan oxidierenden Bakterien nicht erkannt

werden würde. Stattdessen wurde der Vektor pMHA201 eingesetzt, der für die Verwendung in *Methylococcus capsulatus* Bath entwickelt und freundlicherweise von der Arbeitgruppe von Prof. Murrell der University of East Anglia (England) zur Verfügung gestellt wurde (Ali und Murrell 2009).

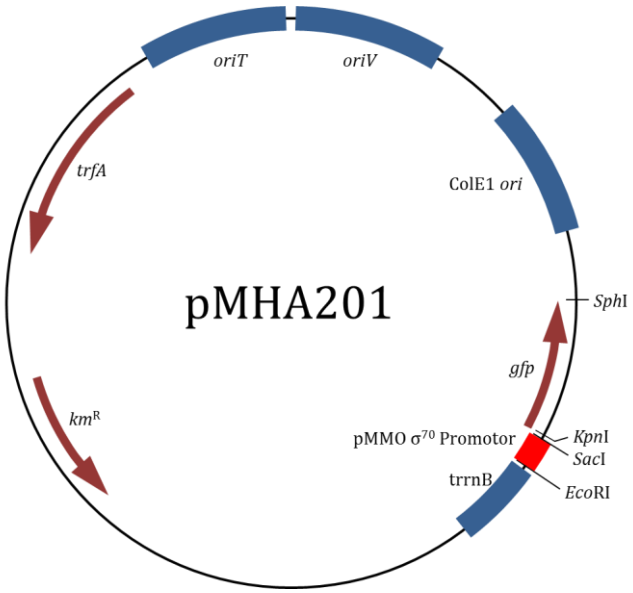

Abbildung II-33: Expressionsplasmid pMHA201

Wie in Abb. II-33 gezeigt, zeichnet sich dieser Vektor durch ein Kanamycin-Resistenz- (*Km*^{R}) und ein *gfp*-Gen aus. Zwischen die Schnittstellen *Eco*RI und *Sac*I wurde der für Methanotrophe geeignete Promotor pMMO σ^{70} eingefügt. Bakterien, die dieses Plasmid aufweisen, sind demgemäß über eine Kanamycinresistenz sowie GFP-Fluoreszenz zu identifizieren. Für die Expressionsversuche wurde zunächst das Plasmid pMHA201 durch Elektroporation in *E. coli* eingebracht. Hierfür wurden vorab elektrokompetente Zellen hergestellt (Farinha et al. 1990). Eine Vorkultur wurde aerob bei 37 °C und 220 UpM über Nacht in Reagenzgläsern angezüchtet. Die Hauptkultur wurde mit 1 % Inokulum aus der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 UpM bis zu einer ΔOD_{600} von 0,5 - 0,7 gezüchtet. In dieser Wachstumsphase weist *E. coli* die höchste Kompetenz auf. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 UpM, 4 °C und 10 min Laufzeit geerntet. Um Salz zu entfernen, wurde das Zellpellet zwei Mal mit 1/3 Volumenteilen der angesetzten Kultur Glycerin-MOPS-Puffer (15 % Glycerin in dH_2O (w/v), 1 mM MOPS) gewaschen und abschließend ein weiteres Mal mit 1/30 Volumenteilen. Die Zellen wurden abschließend in 1/50 Volumenteilen Glycerin-MOPS-Puffer resuspendiert und Aliquots à 40 µl bei -80 °C gelagert. Für die Elektroporation im Easyjet Prima der Fa. EquiBio wurde ein Ansatz aus 1 µl Plasmid-DNA und 40 µl elektrokompetenter Zellen in einer sterilen Elektroporationsküvette einem Puls von 2500 V ausgesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde in 1 ml vorgewärmtes

SOC-Medium (Tab. II-41) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 300 UpM inkubiert. 100 µl dieses Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar mit 0,1 % Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nur diejenigen Zellen, welche durch das Plasmid eine Kanamycinresistenz erworben haben, können auf diesen Platten wachsen (Monzel 2011).

Tabelle II-41: SOC-Medium

Hefeextrakt	5,00 g
Trypton	20,00 g
NaCl	0,60g
KCl	0,20 g
Glc	3,60 g
$MgSO_4$	10 mM
$MgCl_2$	10 mM

Das Medium wurde ohne Mg^{2+} hergestellt und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Vor Gebrauch wurde dem Nährmedium 20 mM (10 ml/l) einer 2 M Mg^{2+}-Lösung zugegeben, welche aus 1 M $MgCl_2$ x 6 H_2O und 1 M $MgSO_4$ x 7 H_2O hergestellt wurde. Der pH-Wert betrug 6,8 bis 7.

Eine gewachsene Kultur wurde in 5 ml LB-Medium mit 5 µl Kanamycin überführt und über Nacht bei 37 °C und 220 UpM bebrütet. Die gewachsenen Zellen wurden bei 4 °C und 6000 rpm für 4 min abzentrifugiert und das Pellet in 600 µl LB-Medium und 600 µl 50 % Glycerin resuspendiert und wurde bei -18 °C gelagert. Von diesem Ansatz werden 10 µl in 5 ml LB-Medium mit 5 µl Kanamycin gegeben und über 16 h bei 37 °C und 220 UpM kultiviert. Die so vervielfältigten Plasmide wurden durch das GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit von Sigma nach Anleitung des Herstellers isoliert. Der Plasmidgehalt wurde mit dem BioPhotometer plus der Fa. Eppendorf auf 341,4 ng/ml bestimmt. Das Plasmid pMHA201 stellt also ein sog. high copy Plasmid dar, welches in hoher Anzahl in der Zelle vorliegt. Um den Vektor nun in ein methanotrophes Bakterium einzubringen, wurde zunächst einer MOB-Kultur in 100 ml NMS-Medium auf eine ΔOD_{600} von 0,5 - 0,7 gezüchtet. Bei diesem ersten Versuch wurde *Methylocystis echinoides* herangezogen, ein methanotrophes Bakterium, das sich durch schnelles Wachstum auszeichnet. Die Zellen wurden nach Abkühlen auf 4 °C 10 min lang bei 2000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst mit 4 °C-kaltem sterilem Wasser und anschließend mit 4 °C-kaltem 10 % (v/v) sterilem Glycerin gewaschen. Danach wurde das Pellet in 1 ml 10 % Glycerin resuspendiert und die so gewonnenen elektrokompetenten Zellen (EKZ) in Aliquots bei -18 °C gelagert. Für die Elektroporation

wurden 50 µl EKZ und 2 µl Plasmid einem Puls von 2000 V ausgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde unverzüglich 30 °C-warmen NMS-Medium zugegeben, bei 30 °C 1 - 24 h bei 200 rpm kultiviert und anschließend 100 µl der Kultur auf kanamycinhaltigem (0,1%) NMS-Platten ausgestrichen und bei 30 °C 2 Wochen bebrütet (Toyama et al. 1998). Als Negativkontrolle wurden *M. echinoides,* welches das Plasmid und somit auch keine Kanamycin-Resistenz aufwies, auf kanamycinhaltigen Platten ausgestrichen. Es konnte kein Wachstum festgestellt werden. Infolgedessen wurde auf die Methode der erleichterten Konjugation von Ali et al. 2009 zurückgegriffen. In den Helferstamm *E. coli* S17-1 λpir wird durch Elektroporation nach oben beschriebener Methode das Plasmid eingebracht. Die Selektion erfolgreicher Transformanten erfolgte wie oben beschrieben durch die erworbene Kanamycinresistenz. Diese stellen nun den Donostamm für pMHA201 dar, *Methylocystis echinoides* den Rezipientenstamm. Beide Stämme wurden bis zu einer Zelldichte von $5*10^8$ inkubiert. 2 ml des Donors und 30 ml des Recipienten wurden gemischt, abzentrifugiert (3 min, 4 °C, 13000 g) und in 200 µl NMS-Medium I (Tab. 1) aufgenommen. Diese Suspension wurde auf einen 0,2 µm Nitrozellulosefilter (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gegeben und auf eine NMS I-Platte mit 0,02 % (w/v) Proteose-Pepton gelegt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C in Anaerobentöpfen mit einer Gasphase aus 75 % Luft und 25 % Methan. Auch hier konnte bei *Methylocystis echinoides* kein Wachstum verzeichnet werden.

Parallel zu den Transformationsversuchen wird analysiert, ob die Zugabe von artifiziellen Elektronenakzeptoren die Umsetzung von Formiat zu CO_2 unterbinden konnte. Hierfür wurden Elektronenakzeptoren mit einem Redoxpotential ausgewählt, welches geringfügig positiver ist als das des Formiat/CO_2-Redoxsystems mit einem $E^{0'}$ von -0,42 V. Demgemäß wurden Benzylviologen (-0,359 V), TTC (-0,08 V) und NAD^+ (-0,32 V) mit einer Konzentration von 0,1 g/l zum Medium von *Methylocystis echinoides* als schnellwachsender Typ II-MOB und *Methylobacter luteus* als Typ I-MOB, sowie den Isolaten 610, 613, 626, 639 und 640 zugegeben und über einen Zeitraum von 3 Wochen bei 30 °C bebrütet und auf Wachstum und Formiatbildung hin untersucht. Keine der Kulturen zeigte in den mit Benzylviologen versetzten Medien Wachstum. Bei Zugabe von TTC konnte kein Wachstum bei *Methylobacter luteus* verzeichnet werden, bei allen anderen Kulturen jedoch gutes Wachstum. Bei NAD^+-Zugabe konnte Wachstum in allen Kulturen beobachtet werden. In keinen der Kulturen mit zugegebenen artifiziellem Elektronenakzeptoren konnte die Bildung von Formiat nachgewiesen werden, eine Unterbrechung oder Verminderung der Umsetzung von Formiat zu CO_2 kann durch diese Methode nach den bisherigen Ergebnissen demzufolge nicht ermöglicht werden. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Formiat-Analoga Methylchlorformiat, Ethylchlorformiat und Butylchlorformiat auf Hemmung der FDH getestet. Auch hier konnte keine Bildung von Formiat nachgewiesen werden. Die Hemmung

der FDH scheint nicht möglich zu sein. Die Isolate sind jedoch in der Lage, bis zu 4,5 g/l Polyhydroxybuttersäure (PHB) zu bilden. Dieses kann als energiereiches Substrat anstelle von Formiat, zusammen mit der entstehenden Zellmasse in die Biogasanlagen rückgeführt werden.

Ein weiterer Ansatz diese Arbeitspakets ist der Ansatz, die Medienzusammensetzung so zu verändern, dass ein verstärkter Methanumsatz und somit Methanverbrauch zu verzeichnen ist. Ein Hauptaugenmerk wurde auf Substanzen gelegt, welche eine Rolle im Hauptstoffwechselweg der Oxidation von Methan zu CO_2 spielen. Die getesteten Substanzen sind Tab. II-42 zu entnehmen. Die Substanzen wurden jeweils in fünf verschiedenen Ansätzen getestet: die Normalkonzentration im NMS I-Medium wurde als 100 % gesetzt. Bei einem Ansatz wurde die zu untersuchende Substanz gänzlich weggelassen, einem weiteren wurden lediglich 10 % zugesetzt. Des Weiteren wurde die zu analysierende Substanz auf 200 % verdoppelt und in einem letzten Ansatz wurde schließlich die 10 fache Menge, also 1000 % zugegeben. Als zu untersuchende Kultur wurde das Termitenisolat 610 ausgewählt, da Voruntersuchungen mit den Termitenisolaten 613, 626, 639 und 640 zeigten, dass das Isolat 610 das schnellste Wachstum zeigt. Die Methanabbaurate wurde gaschromatographisch nach 5 Tagen Inkubation erfasst und ist Abb. II-34 zu entnehmen. Eine deutliche Steigerung der Methanumsatzrate konnte so bei der Reduzierung von SO_4, NO_3 und Kalium erreicht werden, wohingegen eine Erhöhung der Kupferkonzentration zum erhöhten Methanverbrauch führte.

Tabelle II-42: Einfluss bestimmter Substanzen auf Enzyme und Wachstum der MOB. pMMO: partikuläre Methanmonooxygenase; FDH: Formiatdehydrogenase; DH: Dehydrogenase

Substanz	Aktivierung	Inhibierung	Konzentration im Medium
Fe	pMMO FDH	Methanol-DH	12,8 µM
Cu	Methanol-DH	FDH	0,8 µM
Ca	Methanol-DH		1,8 mM
EDTA		FDH	11,8 µM
NO_3		pMMO	9,9 mM
Na_2		FDH	4,0 mM
K	Methanol-DH FDH		11,8 mM
Mg	DNA-Polymerase		4,4 mM
SO_4			4,4 mM

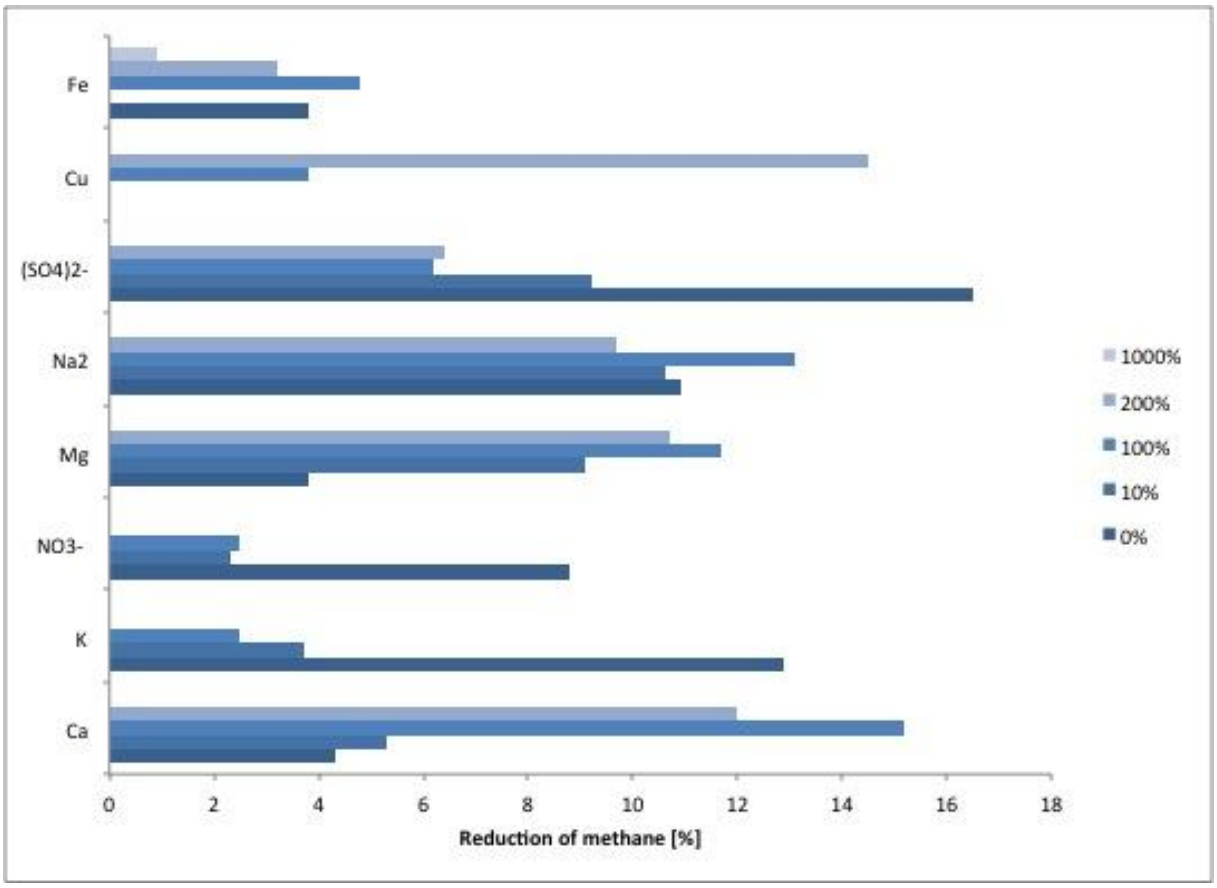

Abbildung II-34: Einfluss der Substanzkonzentration einzelner Medienbestandteile auf die Methanumsatzrate

II.5 Entwicklung eines Pilotreaktors im Technikumsmaßstab (AP 5)

Zentraler Aspekt des AP5 war die Entwicklung eines Bioreaktors in einem technischen Maßstab in dem die in den Vorarbeiten gewonnenen und charakterisierten Kulturen eingesetzt und getestet werden sollten. In der ersten Phase wurden die Vorplanungen für den Reaktor im Technikumsmaßstab durchgeführt und die technischen Zeichnungen für die Realisierung erstellt. Geplant wurde ein Reaktor mit einer Gesamthöhe von 4 m und einem Innendurchmesser von 0,324 m (siehe Abb. II-35). Hieraus ergibt sich ein Reaktorvolumen von ca. 330 l sowie ein Arbeitsvolumen von ca. 280 l. Der Behälter wurde auf einen Betriebsdruck von bis zu 16 bar ausgelegt (PN25) und kann über eine Mantelheizung im Bereich zwischen 20 und 80 °C temperiert werden. Im unteren Bereich des Reaktors wurde ein schräg stehendes Trennsieb installiert welches die Füllkörper zurückhält. Diese können über eine separate Öffnung aus dem Reaktor entfernt werden. Das Gas durchströmt den Reaktor von unten nach oben während die Flüssigkeit im Gegenstrom von oben auf die Füllkörpersäule gerieselt wird. Sowohl das Gas als auch die Flüssigkeit können im Kreislauf über den Reaktor gefahren werden. Zur Kontrolle und Überwachung der Anlage wurde ein Schaltschrank mit SPS und eine Visualisierung mit LCD Monitor und einer Visualisierungssoftware vorgesehen. Weiterhin sind Messstellen für Druck, pH-Wert und Temperatur sowie ein Gasmonitor zur Bestimmung der Gaszusammensetzung vorgesehen.

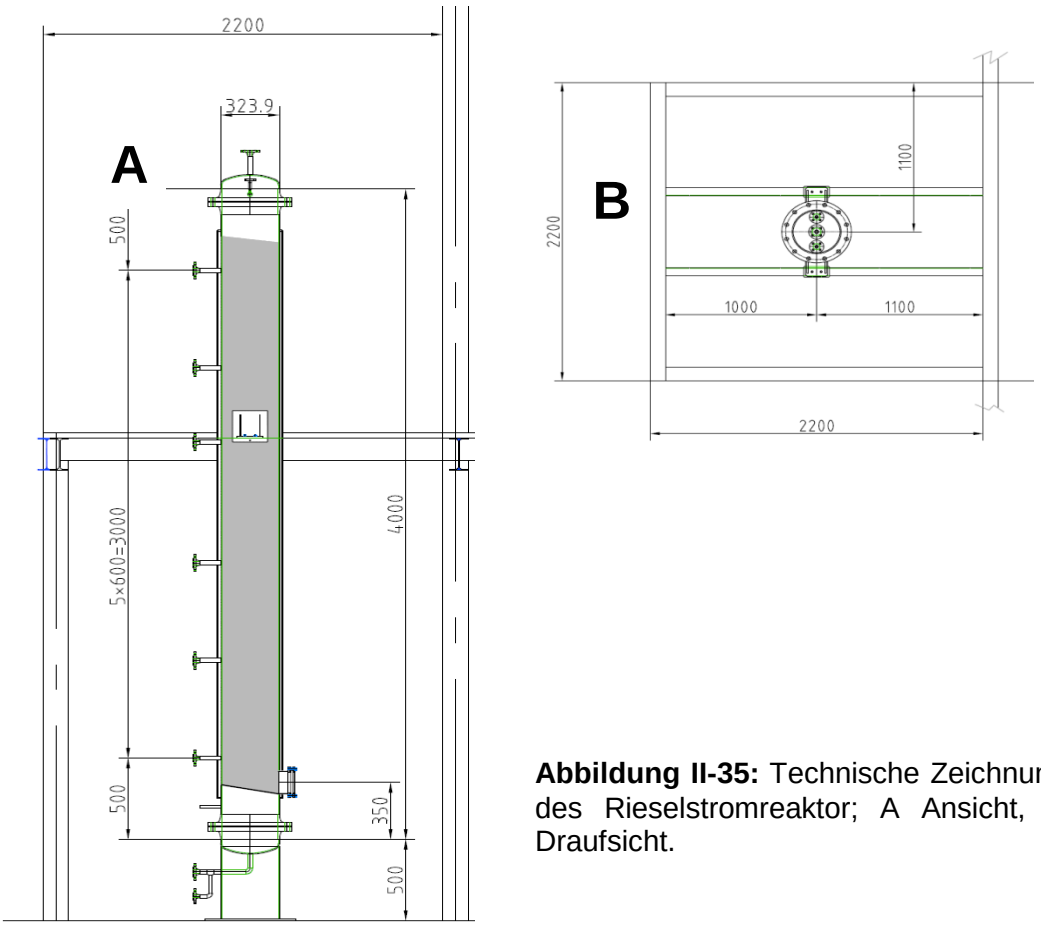

Abbildung II-35: Technische Zeichnung des Rieselstromreaktor; A Ansicht, B Draufsicht.

Nach Abschluss der Vorplanungen für den Reaktor wurde die Konstruktion der Komponenten beauftragt und die Anlage im Technikum des PFI sukzessive aufgebaut. Nach der Festlegung des prinzipiellen Verfahrensablaufes wurde das Fließschema für die Gesamtanlage entwickelt (Abb. II-37). Hierin können sämtliche Stoff- und Signalflüsse sowie die Positionen und Funktionen der einzelnen Aktoren definiert werden. Rote Linien stellen Gasleitungen dar, die blauen die Flüssigkeitsleitungen, wobei die Flussrichtungen durch die Gas- und Flüssigkeitspumpen [MG] und [MF] definiert sind, d.h. die Flüssigkeit wird unten aus dem Behälter abgezogen und beregnet von oben das Bett, während das Prozessgas oben abgezogen und von unten wieder eingebracht wird. Die Steuerluftleitungen sind schwarz gekennzeichnet, während die Signalleitungen für das Sicherheitssystem, die unabhängig von Schaltschrank und Software laufen, die gestrichelten Linien sind. Der Vorlagebehälter (links im Fließschema und Abbildung II-36) dient zum einen als Pufferspeicher für das Flüssigmedium und bietet zum anderen über Schleusensysteme Möglichkeiten zur Probenentnahme, zum Feststoffablass oder zur Substratzufuhr.

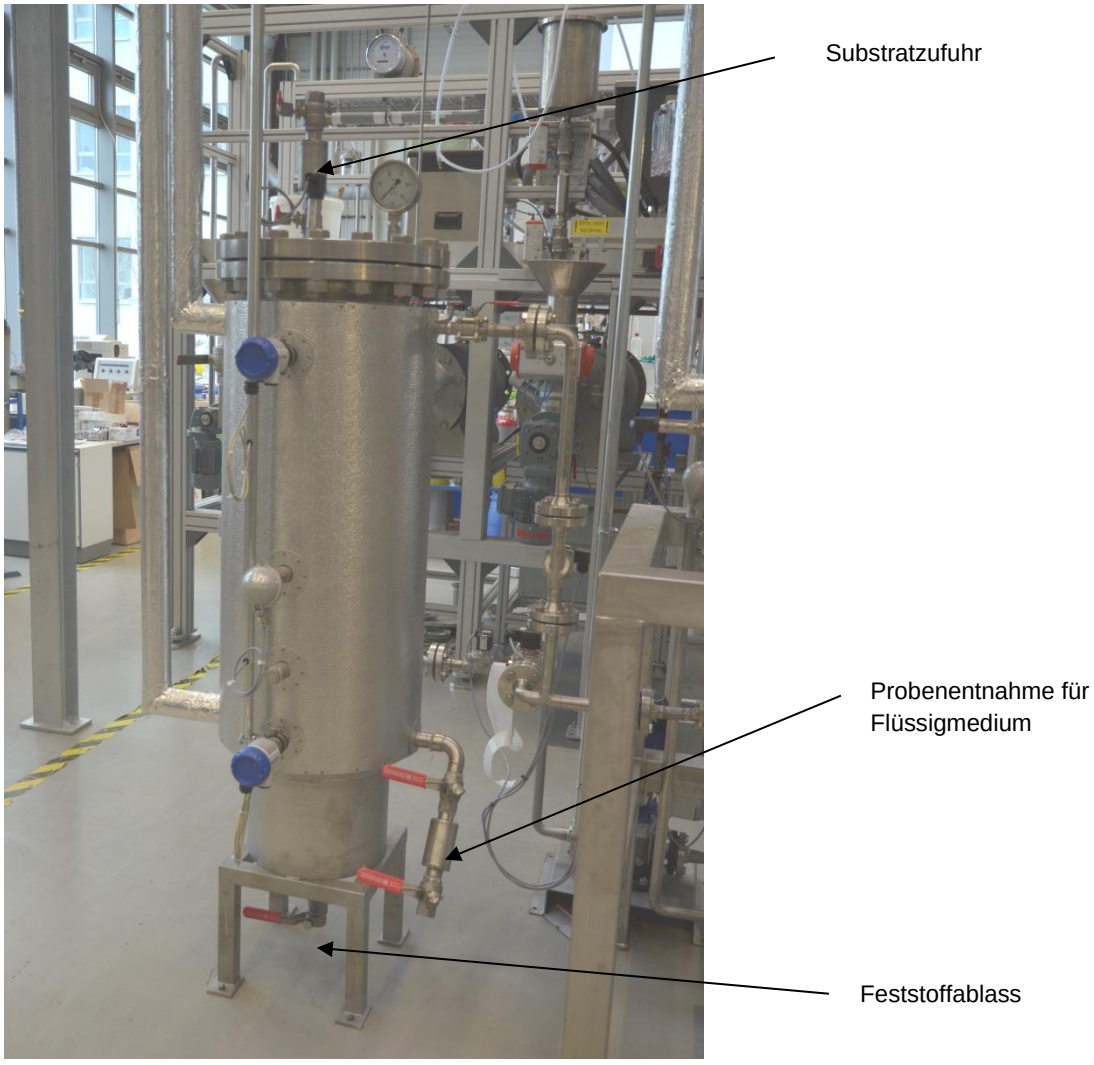

Abbildung II.36: Vorlagebehälter mit Schleusensystemen und Sensoren

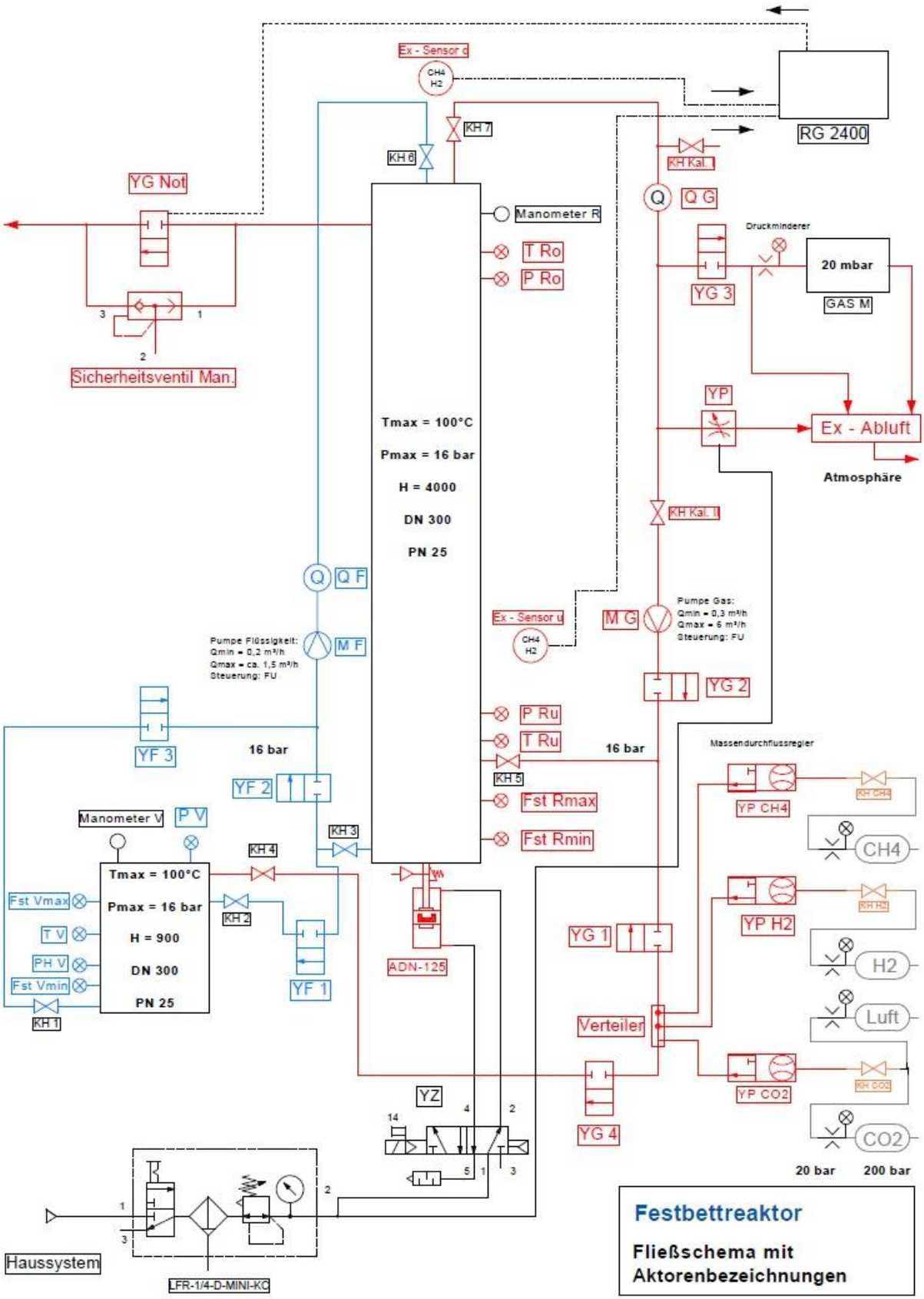

Abbildung II-37: Fließschema des Festbettreaktors

Aus dem Fließschema heraus wurden sämtliche Aktoren zusammen getragen, aufgelistet und mit einer Aktorenbezeichnung versehen. Jeder Aktor wurde, genau wie seine Einbauposition, entsprechend gekennzeichnet um auch im späteren Betrieb Wartung und Austausch zu vereinfachen. Beispielhaft ist der obere Füllstandsensor im Reaktor (Fst Rmax) mit den Kennzeichnungen dargestellt (Abb. II-38).

Abbildung II-38: Oberer Füllstandsensor im Hauptbehälter

Parallel dazu erfolgte eine Festlegung der Betriebsdaten für die Anlage, um die Einzelsysteme und die Behälter entsprechend Druck- und Temperaturzulassungen, Medienbeständigkeit, Leitungsquerschnitt und Kennlinien auszulegen. Der Festbettreaktor wurde, zusammen mit den Leitungen und dem Vorlagebehälter, für einen maximalen Behälterdruck von 16 bar und eine maximale Betriebstemperatur von 100°C ausgelegt, was der Nenndruckstufe PN 25 entspricht. Medienberührende Metallteile wurden ausschließlich aus Edelstahl V4A, 1.4571 gefertigt, bei Polymerwerkstoffen (Dichtungen, Membranen, etc.) wurde die zulässige Temperatur- und Medienbeständigkeit geprüft.

Im Anschluss erfolgte die Konstruktion der Gesamtanlage mit Autodesk Inventor 2012 (Abb. II-39). Aus der fertigen Konstruktion erstellte man dann die Bauteilzeichnungen für den Behälterbauer sowie die hausinterne Werkstatt, welche sämtliche Zusatzkomponenten gefertigt hat.

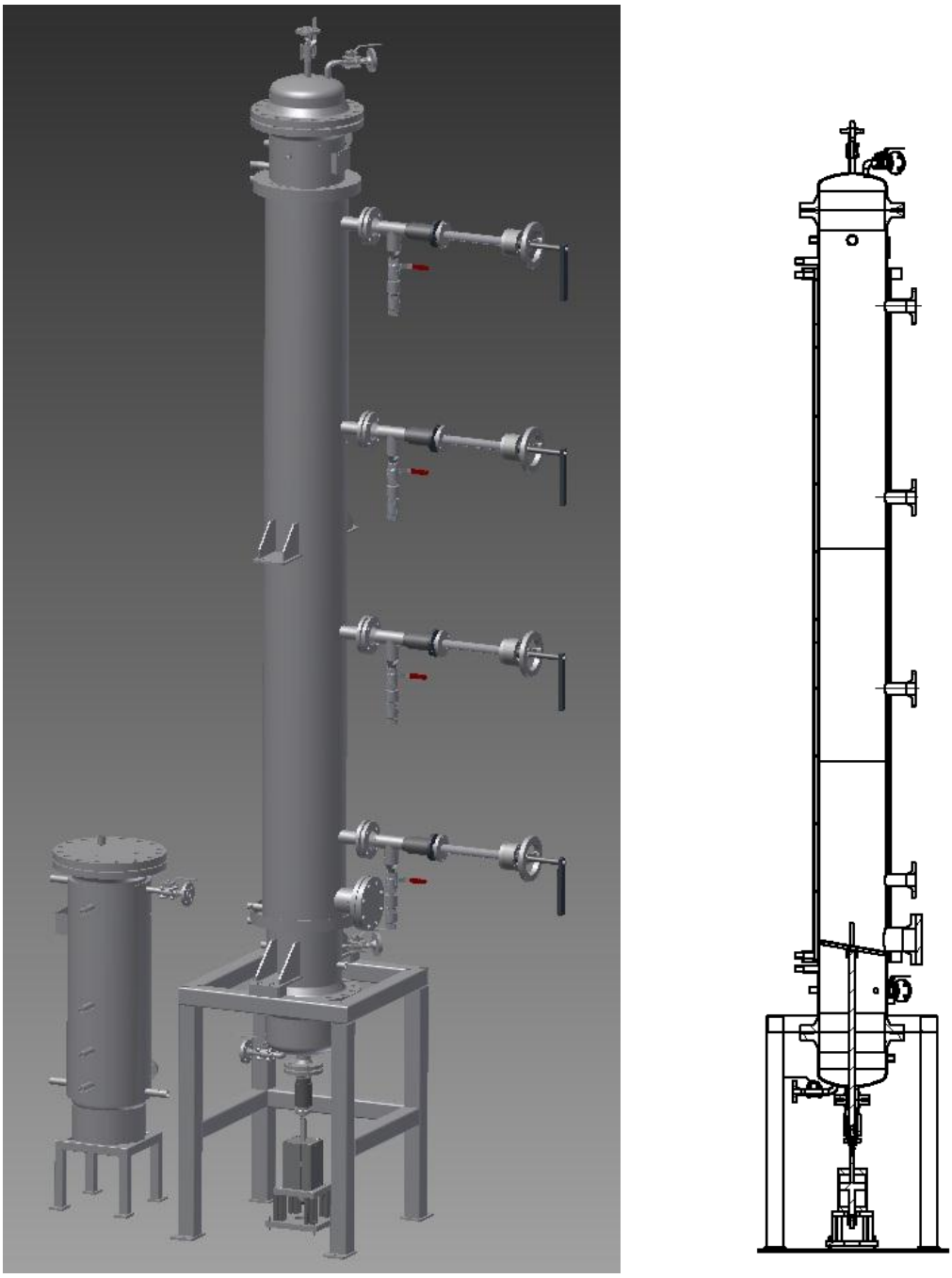

Abbildung II-39: Konstruktionsauszug aus Inventor in 3D mit Schnittzeichnung

Im Anschluss wurde die Gesamtanlage ins Technikum eingegliedert. Die Konstruktion des Rohrleitungsverlaufes und der Arbeitsbühne erfolgte in einer speziellen Software für den Anlagenbau (AutoCAD Plant 3D).

Weiterhin wurden die Sicherheitseinrichtungen für in Frage kommende Störfälle entwickelt. Hierzu gehören u.a. zwei Ex-Warnsensoren der Firma Dräger, die explosionsfähige Atmosphäre erfassen und die Daten in zwei Alarmstufen (20% und 40% der UEG) an ein zentrales Steuermodul weitergeben. Eine am oberen Behälterbereich angeschlossene Druckentlastungsleitung, die direkt in den Außenbereich führt, ist so ausgelegt, dass der

Hauptbehälter innerhalb von 30 Sekunden geleert werden kann. Die Freischaltung erfolgt durch zwei parallel geschaltete Ventile. Einmal durch ein manuelles Sicherheitsventil, welches öffnet, sobald der Behälterinnendruck den maximal zulässigen Wert überschreitet und einmal durch ein Magnetventil [YG NOT], welches direkt vom Steuermodul der Ex - Warnsensoren [RG2400] aus geschaltet wird, sobald einer der Sensoren 40 % der UEG erfasst. Somit kann, im Falle einer Leckage, das Gasgemisch im Behälter direkt in den Außenbereich geleitet werden und gelangt nicht in die Halle.

Die Auswahl der Einzelkomponenten (Sensoren, Messsysteme, Pumpentypen, etc.) erfolgte unter Berücksichtigung der Betriebsdaten, Einsatzbedingungen und der herstellerspezifischen Einbauvorgaben (Einlaufstrecken, Eintauchtiefen, etc.) und parallel mit der Behälterkonstruktion um eine optimale Integration der Aktorenanschlüsse (Muffen, Flansche, etc.) in die Anlage zu gewährleisten (Abb. II-40).

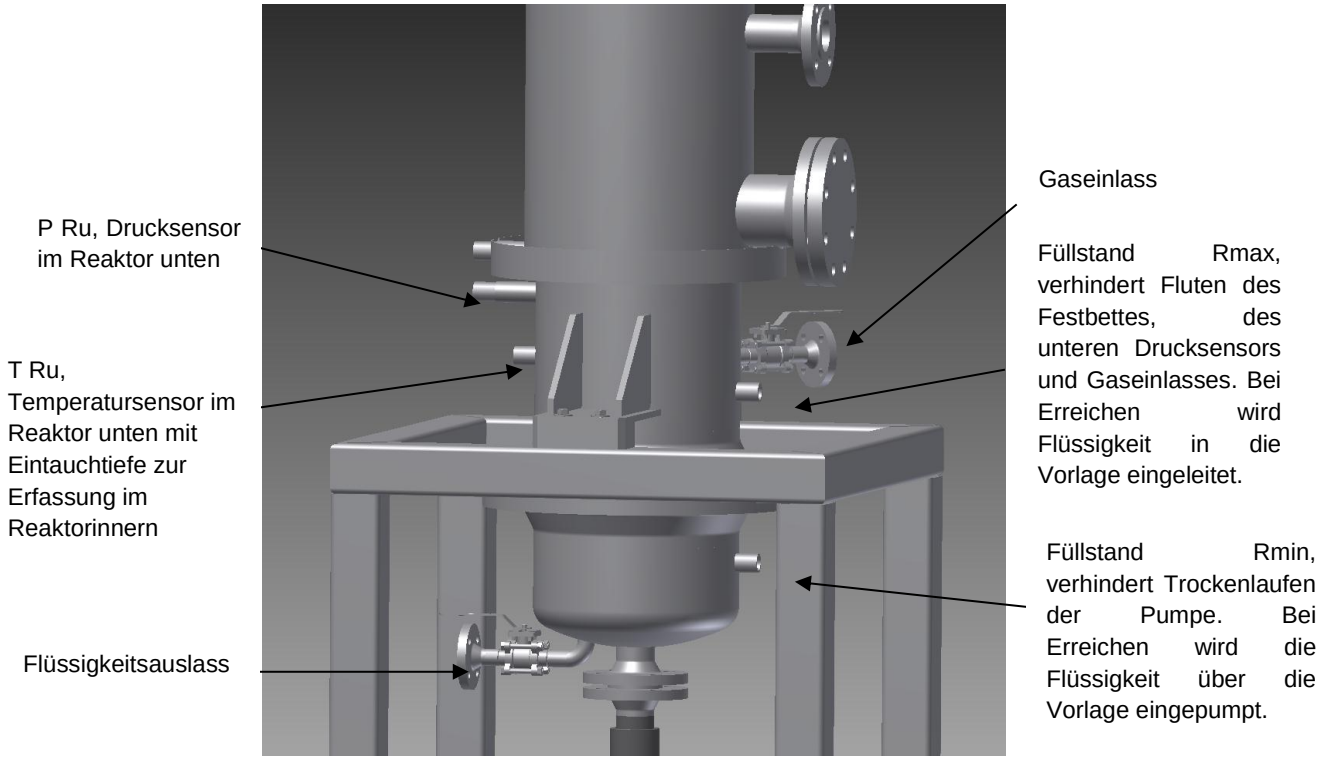

Abbildung II-40: Ansicht Reaktorunterteil mit den Medienzu- und Abläufen sowie den Sensoren

Die Erstellung der elektrischen Schaltpläne, die Planung und Auslegung des Schaltschrankes sowie die Programmierung der Steuerungssoftware wurde von der Technischen Abteilung des PFI ausgeführt (Abb. II-41).

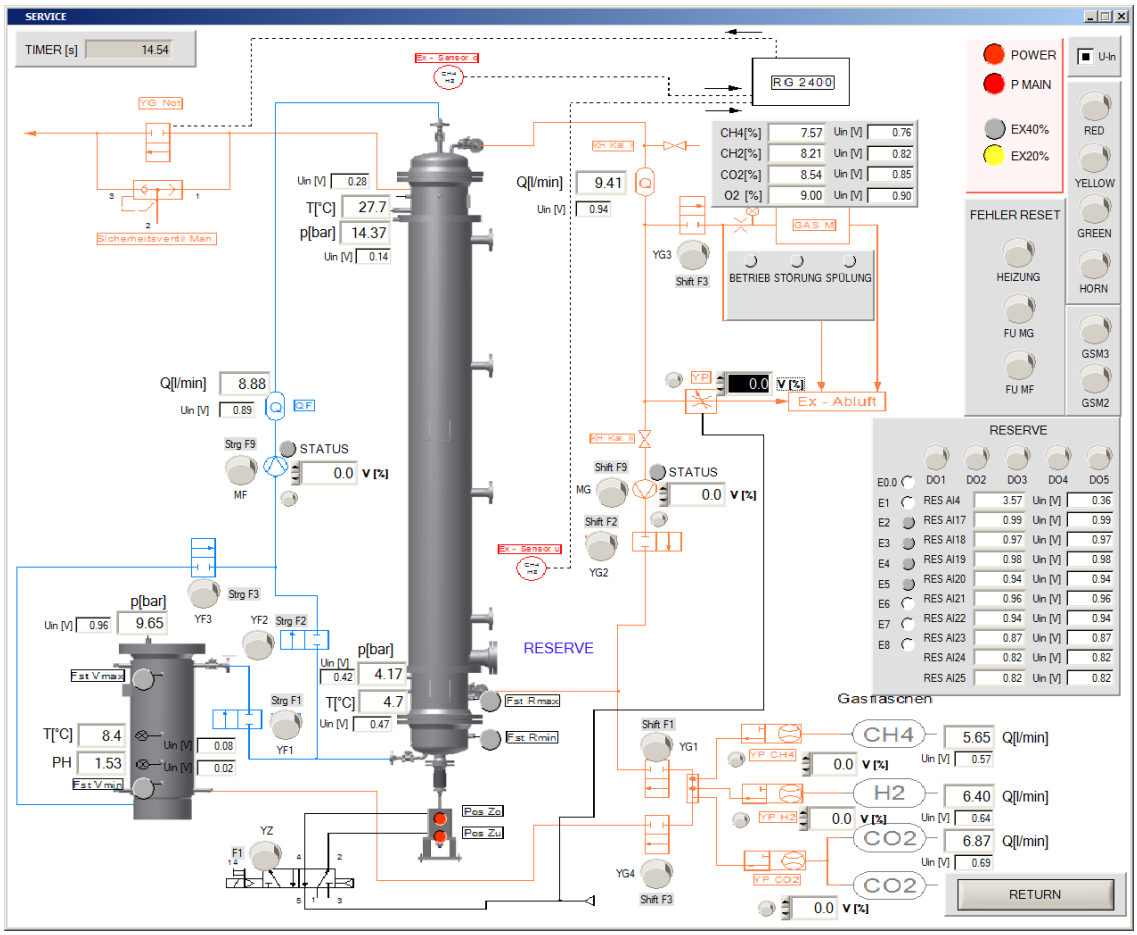

Abbildung II-41: Programmoberfläche der Steuerungssoftware

Während der Aufbau und die Zulassung der beiden Druckbehälter beim Behälterbauer stattfanden, erfolgte am PFI die Auslegung und Konstruktion sowie der Aufbau der Einzelkomponenten und Anbauteile. Hierzu gehörten neben dem speziellen Heizkreislauf (welcher später an die Doppelmäntel beider Reaktoren angeschlossen wird) auch das Dichtungssystem (Stopfbuchse), welches beim beweglichen Hubboden und den Probenahmesystemen für die Schüttung zum Einsatz kommt. Der Hubboden dient dazu, das gesamte Bett im Reaktor im laufenden Betrieb bewegen zu können um ein Zuwachsen zu verhindern. Dies geschieht mit Hilfe eines pneumatischen Kompaktzylinders, der über eine abgedichtete Welle den Siebboden, auf dem die Kugelschüttung aufliegt, nach oben drückt (Abb. II-42). Der Hub lässt sich mit Hilfe eines Anschlagsbegrenzers variieren, wobei 120 mm den maximalen Fahrweg des Zylinders darstellen. Die Verdichtung der Stopfbuchse erfolgt über die sogenannte Brille, die mit definiertem Drehmoment über sechs Schrauben angezogen wird.

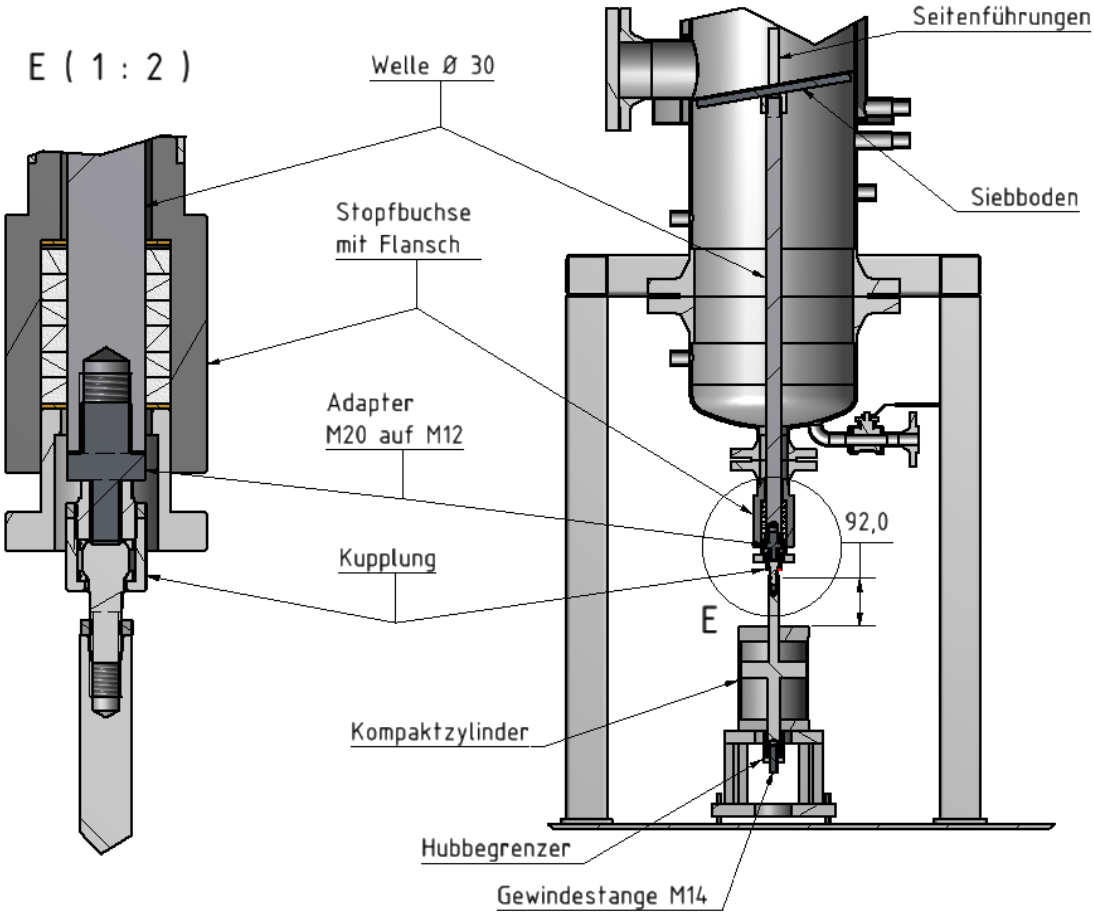

Abbildung II-42: Auszug aus einer Schnittzeichnung des Hubbodens mit Stopfbuchsendichtung

Von den Probenahmesystemen sind insgesamt 4 Stück über die Behälterhöhe verteilt an der Anlage angebracht (Abb. II-43). Sie dienen dazu, Stichproben aus dem Schüttgut im laufenden Betrieb zu entnehmen, um den mikrobiellen Bewuchs auf unterschiedlichen Höhen des Bettes zu analysieren. Die Abdichtung erfolgte ebenfalls über eine Stopfbuchsenpackung. Der Vorschub über eine gelagerte Gewindespindel ermöglicht die Entnahme von Schüttgut aus der Behältermitte, welches über ein Schleusensystem entnommen wird.

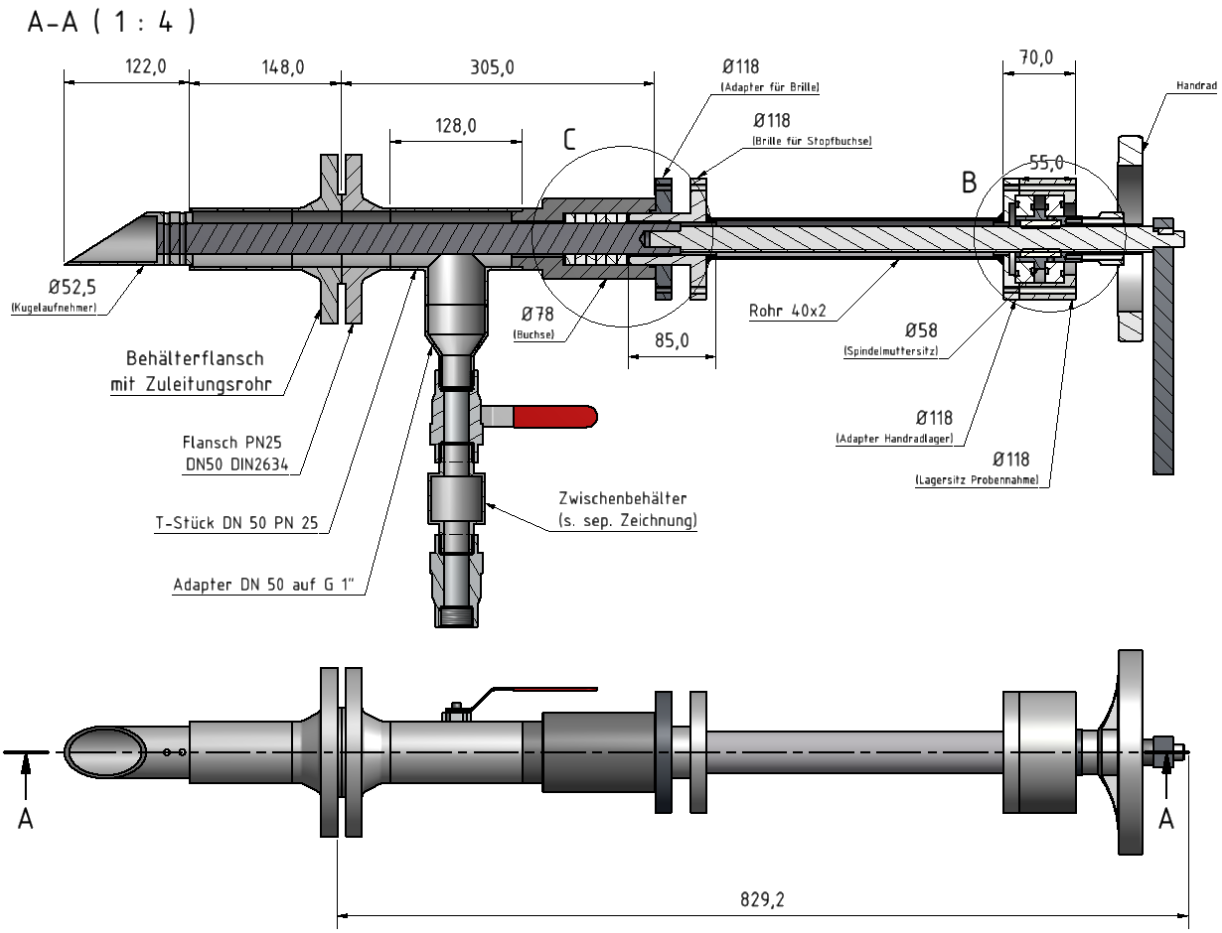

Abbildung II-43: Schnittansicht der Vorrichtung zur Probenahme von Schüttgut unter Betriebsbedingungen

Die Systemkomponenten zur Gasanalyse und Zirkulation wurden an einem Messtisch zusammengefasst. Hier befinden sich neben Gaszirkulationspumpe, Gasvolumenmessung und dem Analysegerät auch die Vorrichtungen zur Kalibrierung des Durchflussmessers während des Anlagenbetriebes sowie ein elektropneumatisches Proportionalventil [YP], dass dafür zuständig ist, den vorgegebenen Behälterinnendruck zu halten. Im Falle eines zu starken Druckanstieges kann kontrolliert Gas abgeführt werden (Abb. II-44).

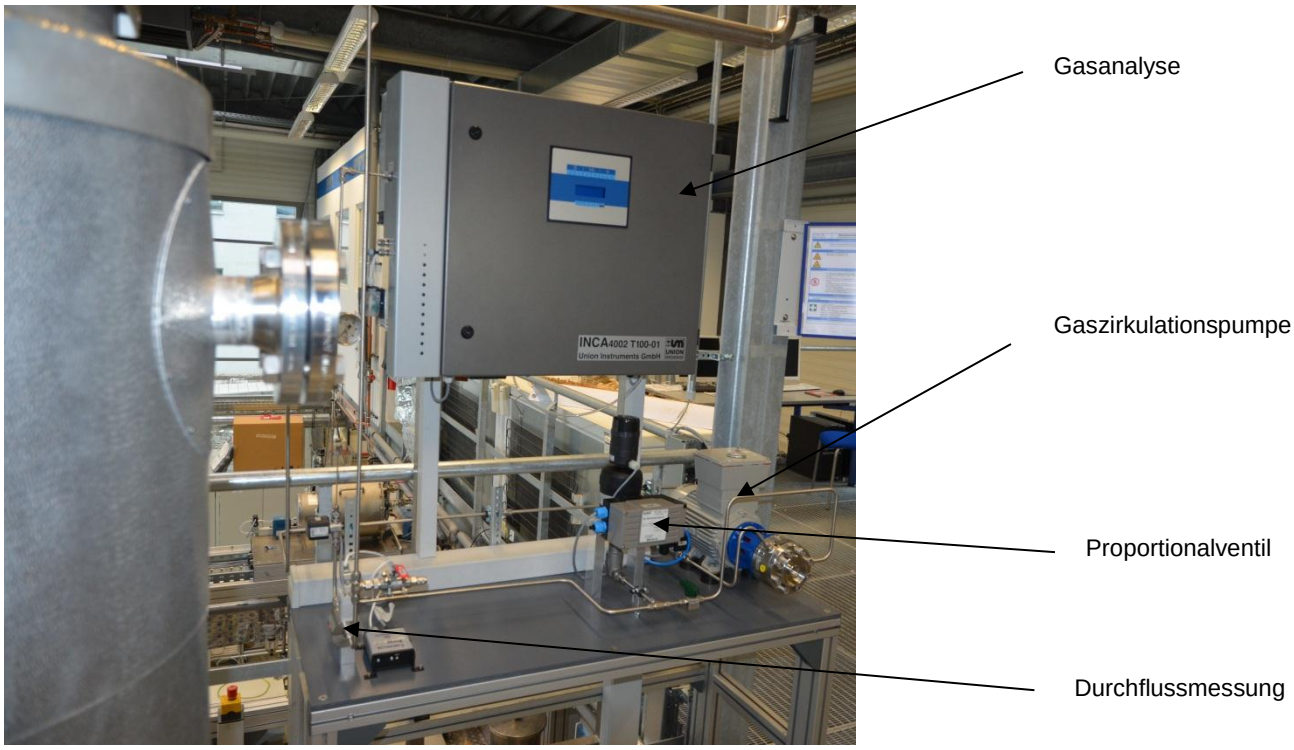

Abbildung II-44: Messtisch zur Regelung und Analyse der Prozessgase

Die Druckbeaufschlagung des Reaktors wird über Gasflaschen realisiert, die mit Hilfe von Massendurchflussregler kontrollierte Mengen an Prüfgasen entnommen bekommen (Abb. II-45). Diese werden in einem Verteiler zusammengeführt und wahlweise in den Haupt- oder Vorlagebehälter eingebracht.

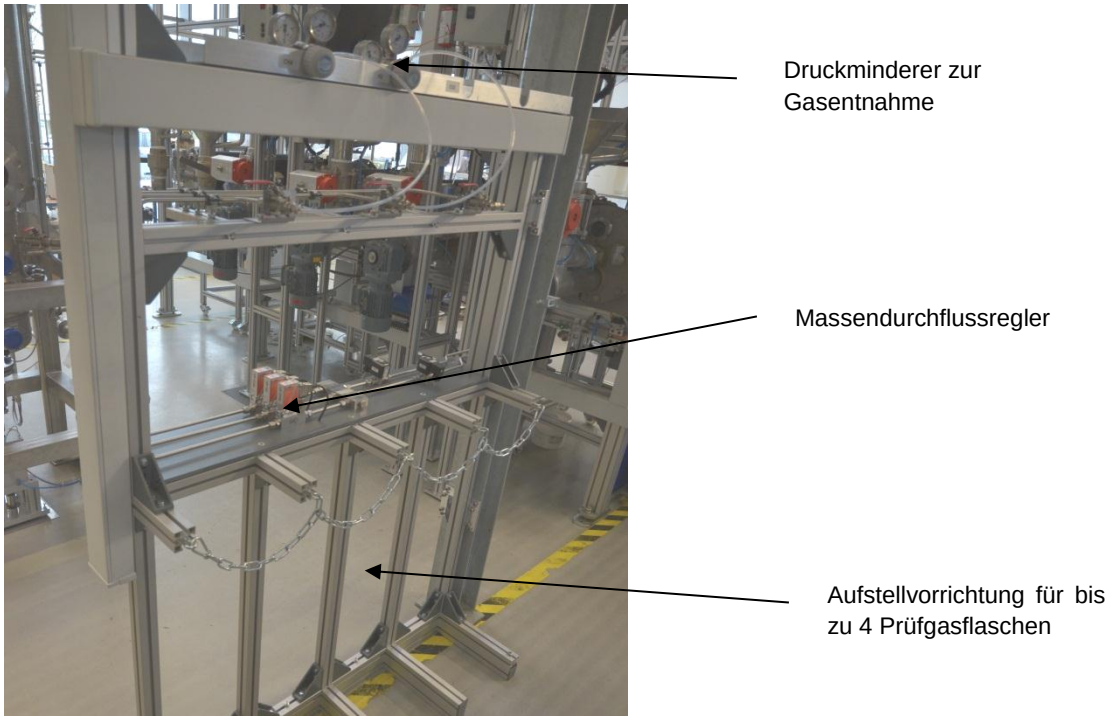

Abbildung II-45: Gasflaschenaufstellung mit Durchflussreglern zur Druckbeaufschlagung

Abbildung II-46: Gesamtansicht der Anlage im Technikum des PFI

Die Funktionsüberprüfung (Signalverunreinigungen, Korrelation mit der Software, etc.) sowie die Kalibrierung sämtlicher Sensoren bildeten zusammen mit dem Erstellen der Betriebsanweisung den Abschluss der Aufbauarbeiten. Die Abbildung II-46 zeigt die Gesamtansicht der aufgebauten Anlage.

Nachdem der Aufbau und die technische Inbetriebnahme der Anlage abgeschlossen waren erfolgten erste Testläufe mit ausgewählten Kulturen auf Grundlage der Ergebnisse aus den Arbeitspaketen 2 und 3. Die Voranzucht der Mikroorganismen erfolgte hierbei in zwei Stufen. Zunächst erfolgte, ausgehend von den jeweiligen Stammkulturen, eine Anzucht im 2 Liter Maßstab. Nachdem dem anwachsen wurde mit dieser Vorkultur der Vorlagebehälter des Reaktors angeimpft. Im Vorlagebehälter wurden die Kulturen im 40-50 Liter Maßstab kultiviert. Im Anschluss wurde die Kultur mittels der Flüssigkeitspumpe in den Hauptreaktor gepumpt und kontinuierlich im Kreislauf über das Festbett gerieselt. Die Gasphase aus CH_4, CO_2 und O_2 wurde im Gegenstrom mittels der Gaszirkulationspumpe ebenfalls im Kreislauf über das Festbett gepumpt. Die Überwachung der Gaskonzentrationen erfolgte kontinuierlich über den Gasmonitor.

In einem ersten Versuch mit dem Stamm 634 wurde zunächst die prinzipielle Funktion des Reaktors einschließlich aller Anschlussteile und Sensoren sowie die Aktivität der Mikroorganismen überprüft. Der Stamm 634 wurde zunächst ausgewählt da sich diese Kultur im Rahmen der Vorversuche im Labormaßstab als leistungsfähig in Bezug auf die Wachstumsgeschwindigkeit und den Methanabbau gezeigt hatte. Die Betriebsparameter und eingesetzten Volumina sind in Tabelle II-43 zusammengefasst.

Tabelle II-43: Betriebsparameter für den Reaktorbetrieb

Reaktorvolumen brutto:	330 l
Volumen Füllkörper:	40 l
Volumen Medium (NMS):	40 l
Temperatur:	35 °C
Druck:	2,5 bar
Gasvolumen (Nl):	798 l
CO_2-Konzentration Start:	79 %
CH_4-Konzentration Start:	4,2 %
O_2-Konzentration Start:	4,4 %
Fluss Medium:	7,6 l/min
Fluss Gas:	20 l/min

Der Methanabbau setzte nach einer kurzen lag-Phase und verlief weitgehend parallel mit dem gemessenen Rückgang der Sauerstoffkonzentration (siehe Abb. II-47). Über die Inkubationsdauer von 30 h nahm die CH_4-Konzentration von 4,2 % auf 1,6 % ab. Hieraus ergibt sich eine spezifische Methanabbaugeschwindigkeit von ca. 2L CH_4/h je m^3 Reaktorvolumen.

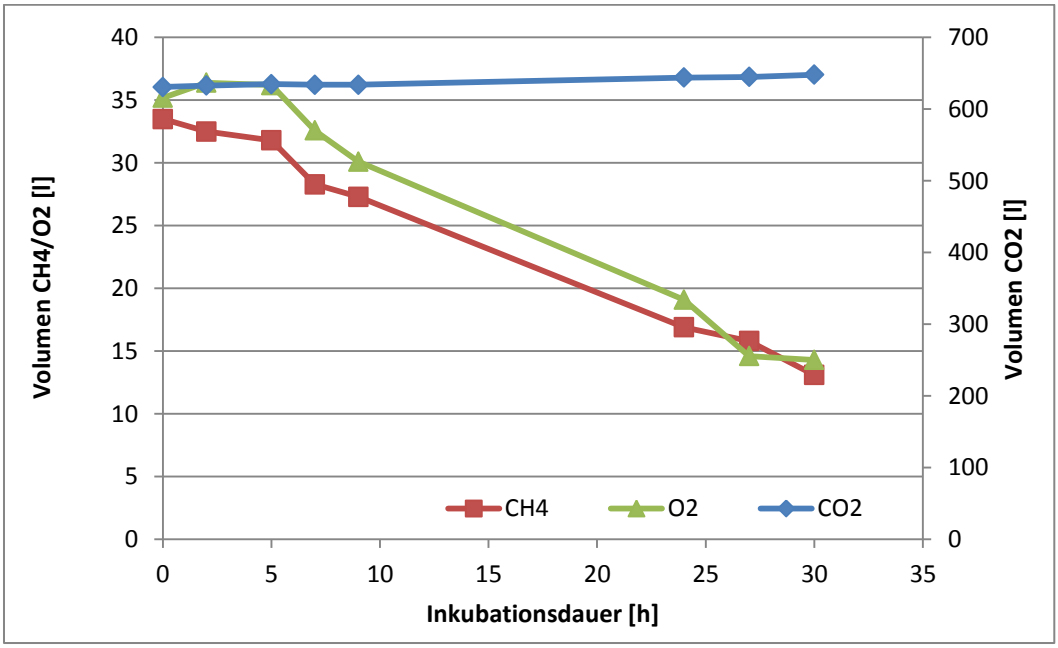

Abbildung II-47: Methanabbau von Stamm 634 bei 2,5 bar Betriebsdruck

Somit konnte die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Verfahrens im Rahmen der ersten Testläufe nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf Stand die Verfahrensoptimierung im Vordergrund um den spezifischen Abbaugrad deutlich zu steigern.

Im Rahmen verschiedener Serienuntersuchungen wurde der Einfluss der Parameter Medienvolumen, Temperatur, Druck sowie Fließgeschwindigkeit von Gas und Medium überprüft. Weiterhin wurden Untersuchungen zum Einfluss des Sauerstoff/Methan-Verhältnisses auf den Abbaugrad durchgeführt. Hierbei zeigte sich zunächst, dass sich durch eine Erhöhung des O_2/CH_4-Verhältnis sowie eine Erhöhung des Betriebsdruckes eine signifikante Steigerung der Methanabbaugeschwindigkeit erreichen lässt. Beispielhaft ist in Abbildung II-48 der Methanabbau unter den entsprechend optimierten Bedingungen dargestellt. Hierbei wurde der Druck auf 3,5 bar erhöht und das O_2/CH_4-Verhältnis von 1:1 auf ca. 1,3:1 gesteigert. Unter diesen Bedingungen konnte die spezifische Methanabbaugeschwindigkeit um rund 50 % auf 3L CH_4/h je m^3 Reaktorvolumen gesteigert werden.

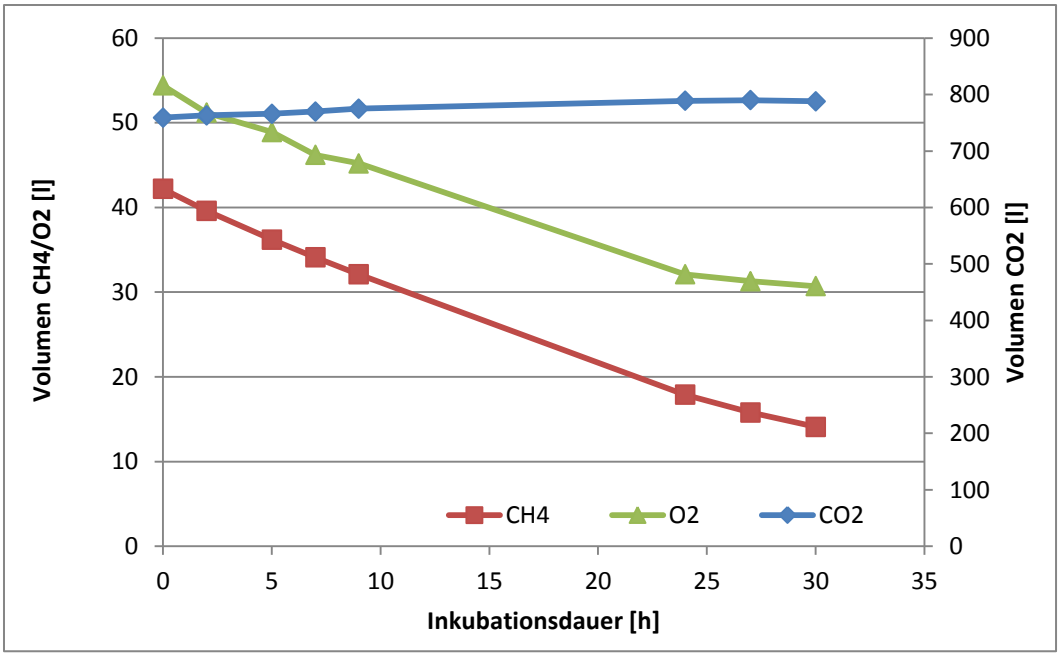

Abbildung II-48: Methanabbau von Stamm 634 bei 3,5 bar Betriebsdruck und erhöhten O2/CH4-Verhältnis

Weitere Optimierungsschritte betrafen das eingesetzte Medienvolumen sowie die verwendeten Medium- und Gasflussraten. Hierbei konnte eine weitere Erhöhung der Methanabbaugeschwindigkeit durch eine Erhöhung des Mediumvolumens von 40 auf 55 l sowie eine niedrigere Mediumflussrate bei erhöhter Gaszirkulation erreicht werden. Wie anhand der Abb. II-49 deutlich wird, hatten die geänderten Betriebsbedingungen eine diskontinuierliche Verlauf des Methanabbaus zur Folge.

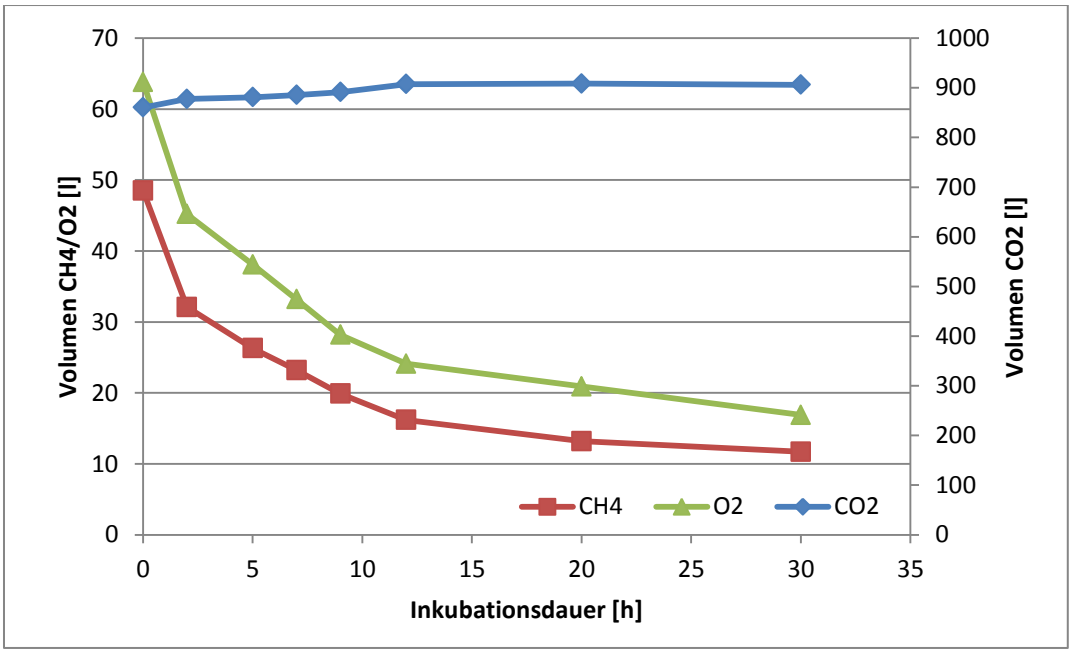

Abbildung II-49: Methanabbau von Stamm 634 bei optimierter Gas- und Flüssigkeitszirkulation und erhöhten Medienvolumen.

Über den gesamten Inkubationszeitraum von 30 h lag die spezifische Methanabbaugeschwindigkeit bei 4,1L CH_4/h je m^3 Reaktorvolumen. Innerhalb des Inkubationszeitraumes 0 bis 12 h lag die Abbaugeschwindigkeit allerdings deutlich höher (ca. 9 l/h*m^3). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter optimierten Fermentationsbedingungen die Abbaugeschwindigkeit in einer verstärkten Abhängigkeit von der vorliegenden Methankonzentration steht. So lag eine vergleichsweise hohe Abbaugeschwindigkeit insbesondere im Konzentrationsbereich zwischen 2 und 4 % vor, während ein deutliches Absinken bei Konzentrationen unterhalb von 1,5 % feststellbar.

Im weiteren Verlauf wurde mit dem Stamm 640 ein weiterer potentieller Einsatzstamm in die Untersuchungen einbezogen. Auch dieser Stamm wurde vom Projektpartner Uni Mainz zur Verfügung gestellt und hatte in Vortests vielversprechende Ergebnisse erzielt. Prinzipiell zeigte der Stamm 640 in den Tests eine ähnliche Fermentationscharakteristik wie Stamm 634, wobei die Abbaugeschwindigkeit im Vergleich nochmals gesteigert werden konnte. Im Rahmen der Tests mit Stamm 640 wurden zudem weitere Optimierungs- und Anpassungsschritte hinsichtlich der Betriebsparameter durchgeführt. Insbesondere wurde ein weitere Druckerhöhung auf 4,5 bar und eine Erhöhung der Fermentationstemperatur auf 37 °C durchgeführt. Unter optimalen Bedingungen konnte hierbei Reduktion der Methankonzentration von 6,7 % auf 0,35 % innerhalb von 28 h demonstriert werden (siehe Abb. II-50). Dies entspricht einer spezifischen Methanabbaugeschwindigkeit 8,5 L CH_4/h je m^3 Reaktorvolumen gesteigert werden. Innerhalb der ersten Fermentationsphase (0 – 5 h) konnten noch deutlich höhere spezifische Abbaugeschwindigkeiten von bis zu 45 L CH_4/h je m^3 Reaktorvolumen gezeigt werden. Allerdings zeigte auch der Stamm 640 einen Rückgang der Methanabbaurate bei niedrigen Methankonzentrationen.

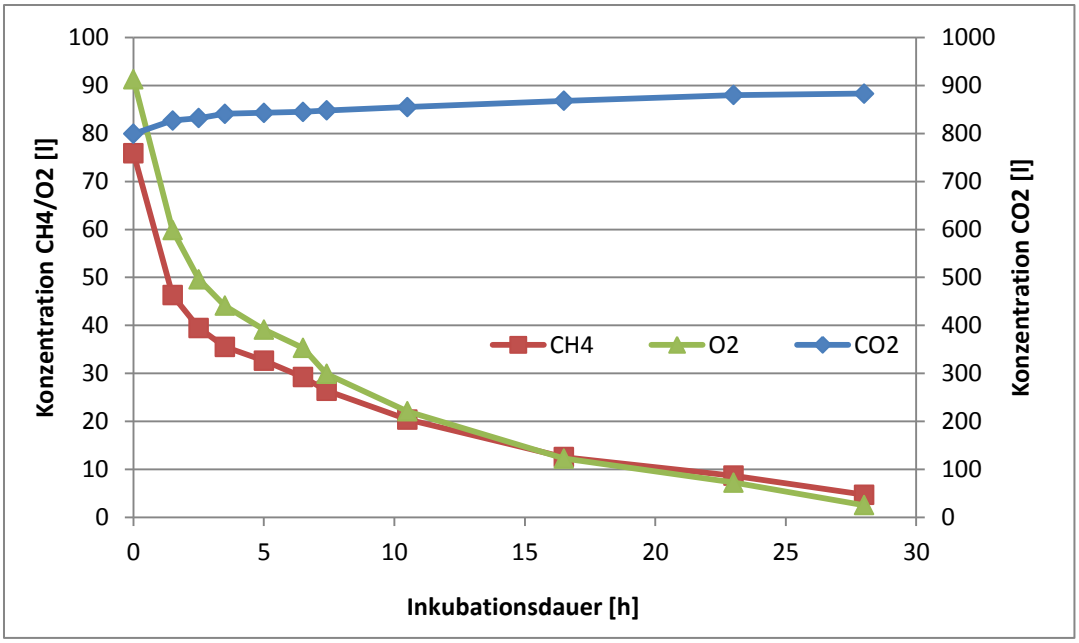

Abbildung II-50: Methanabbau von Stamm 640 unter optimierten Bedingungen.

In der letzten Phase des Projektes wurden Untersuchungen zu den möglichen Standzeiten des Bioreaktors durchgeführt. Hierbei wurden sowohl Stamm 634 als auch Stamm 640 getest. Hierbei wurden die Kulturen über Zeiträume von 4 bis 8 Wochen im Reaktormodul kultiviert ohne das Medium ausgetauscht oder Supplementstoffe zugeführt wurden. Im Anschluss erfolgten vergleichende Tests der spezifischen Abbaugeschwindigkeiten. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass innerhalb der untersuchten Zeiträume von bis zu 2 Monaten kein signifikanter Aktivitätsverlust feststellbar waren. Längerfristige Untersuchungen, insbesondere auch unter Bedingungen wechselnder Gasflüsse und Druckverhältnisse, sind Gegenstand laufender Untersuchungen.

II.6 Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektes konnten eine Reihe methanotropher Bakterien aus verschiedenen Ökosystemen isoliert und charakterisiert werden. Insbesondere Isolate aus Termitendärmen, welche sich überwiegend der Gattung *Methylocystis* zuordnen ließen, erwiesen sich als vielversprechende Einsatzstämme für den Betrieb des Pilotreaktors. Parallel zur Isolierung und Charakterisierung der potentiellen Einsatzstämme konnte die Planung, Entwicklung und der Aufbau der Pilotanlage in einem technischen Maßstab erfolgreich umgesetzt werden. Die Anlage wurde sowohl im Hinblick auf die Verfahrenstechnik als auch der Sicherheits- und Sensortechnik so ausgelegt das ein Upscaling in einen Demonstrationsmaßstab möglich ist. Im Rahmen umfangreicher Testläufe mit verschiedenen Einsatzstämmen konnte die Durchführbarkeit des neuartigen Verfahrens unter praxisnahen Bedingungen demonstriert werden. Die erzielten Methanabbaugeschwindigkeiten und Endkonzentrationen zeigten je nach Einsatzstamm und den Betriebs- und Fermentationsbedingungen eine erhebliche Schwankungsbreite. Unter optimierten Bedingungen wurden hierbei spezifische Abbaugeschwindigkeiten von bis zu 45 L CH_4/h je m^3 Reaktorvolumen erzielt. Im Hinblick auf das Upscaling des Verfahrens in einen Praxismaßstab ergibt sich hieraus ein notwendiges Reaktorvolumen von ca. 40 – 45 m^3 je 100 m^3/h Rohgaskapazität einer Biomethanaufbereitungsanlage. Optimierungs- und Entwicklungsbedarf besteht allerdings noch im Hinblick auf die zu erzielenden Endkonzentrationen im Abgas. Durch die rückläufige Abbaugeschwindigkeiten im niedrigen Konzentrationsbereich (<1,5 % Methan) sind Endkonzentrationen <0,5 % Methan im gereinigten Abgas auf dem aktuellen Stand der Entwicklung nur bei deutlich größeren Reaktorvolumina erreichbar. Ansatzpunkte um für eine weitere Verfahrensoptimierung sind der Einsatz von Mischkulturen sowie ein zweistufiges Verfahren bzw. eine Kombination von beiden. Das im Rahmen eines zusätzlichen Ansatzes verfolgte Ziel zur Gewinnung von Formiat zur Verbesserung der Energiebilanz lässt sich auf Grundlage der erzielten Ergebnisse derzeit nur schwer in die Praxis umsetzten. Insbesondere unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten erscheint die Rückführung der Zellmasse die sich aus dem Methan des Abgasstromes gebildet hat vielversprechender. Die überschussige Zellmasse des Reaktor kann problemlos in die Biogasanlagen als Substrat für die dortige prokaryotische Mikroflora zurückgeleitet werden. Hierdurch kann also der Methanschlupf als Nährstoffquelle zurück in Biogasanlagen überführt werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass das Methan des Abgases der Biogasaufbereitungsanlagen von den methanotrophen Bakterien zur Bildung des Biopolymers Polyhydroxybuttersäure (PHB) genutzt wurde. Hierdurch ergibt sich zukünftig das Potential einer weitergehenden stofflichen Nutzung.

II.7 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Im Rahmen des Projektes konnte die prinzipielle Durchführbarkeit eines völlig neuartigen Verfahrens zur Behandlung des Methanschlupfes von Biomethananlagen erfolgreich demonstriert werden. Auf der Grundlage der erzielten Ergebnisse wird das PFI die Verfahrensentwicklung weiter vorantreiben mit dem Ziel eine Demonstrationsanlage in einem Praxis-Maßstab zu entwickeln. Als Standort für die Demonstrationsanlage ist der Energiepark Pirmasens-Winzeln vorgesehen. Am Standort, an dem mittelfristig das Bioraffinerie-Konzept des PFI umgesetzt werden soll, ist seit 2013 die Biogasanlage des PFI in Betrieb. Aktuell im Aufbau an dem Forschungs- und Demonstrationsstandort befinden sich eine Gasaufbereitungsanlage sowie eine neuartige biologische Power2Gas-Anlage. In diesem Zusammenhang werden mehrere Festbett-Bioreaktoren im 30 m^3-Maßstab aufgebaut. Vorgesehen ist es einen dieser Reaktoren für die Weiterentwicklung des Verfahrens und die Demonstration der Praxistauglichkeit des Verfahrens zu nutzten.

Darüber hinaus wurden innerhalb des Projektes neue wissenschaftliche Erkenntnisse hinsichtlich der physiologischen Gruppe der methanotrophen Bakterien gewonnen. Insbesondere der Nachweis dieser Mikroorganismen in relevanter Zellzahl im Darm von Termiten und die Isolierung und Charakterisierung verschiedener Vertretern erbrachten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Diversität und dem Vorkommen methanotropher Mikroorganismen.

II.8 Erkenntnisse von Dritten

Nach Kenntnisstand der Zuwendungsempfänger liegen bisher noch keine Untersuchungen oder Ergebnisse von dritter Seite vor, die die Durchführung des Vorhabens wesentlich beeinflussen.

II.9 Veröffentlichungen (erfolgte und geplante)

Reuß J., König H., Dröge S. (2013). Isolation of methanotrophic bacteria from termite gut. Poster FTP 029. BIOspektrum Tagungsband zur Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) zusammen mit der Koninklijke Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (KNVM). Bremen 10. – 13. März 2013

Reuß J., König H., Dröge S. (2014). The use of methaotrophs from termite guts in biogas upgrading plants. Poster. International Conference on Biogas Microbiology (ICBM). Uppsala, Schweden 10. – 12. Juni 2014

Reuß J. (2014). Methanotrophic bacteria from termite gut. Vortrag GMV03. Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) zusammen mit der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM). Dresden

05. – 08. 10. 2014

Reuß J., Rachel R., Kämpfer P., Rabenstein A., Kuever J., Dröge S., König H. (2014). Isolation of Methanotrophic Bacteria from Termite Gut. *Arch Microbiol* (eingereicht am 20.11.2014)

Dröge S., Reuß J., König H. (2014). Alternative Nutzungsweisen für den Anlagenbestand – Bioraffinerie im Energiepark Pirmasens. Energieforen Leipzig. Leipzig 09.10.2014

Reuß J., (2014) Dissertation, Universität Mainz

II.10 Literatur

Ali H., Murrell C. (2009). Development and validation of promotor-probe vectors for the study of methane monooxygenase gene expression in *Methylococcus capsulatus Bath*. Microbiology **155**: 761-771

Auman A. J., Stolyar S., Costello, Lidstrom M. E. (2000). Methanotrophic Isolates from Freshwater Lake Sediment. *Appl Environ Microbiol* **66**, 5259-5266

Belova S. E., Kulichevskaya I.S., Bodelier P. L. E., Dedysh S. N. (2013). *Methylocystis bryophila* sp. nov., a novel facultatively methanotrophic bacterium from acidic *Sphagnum* peat, and emended description of the genus *Methylocystis* (ex Whittenbury et al. 1970) Bowman et al. 1993*. Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 1096-1104

Bowman J. P., Jimenez L., Rosario I., Hazen T. C., Sayler G. S. (1993). Characterization of the methanotrophic bacterial community present in a trichloroethylene-contaminated subsurface groundwater site. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2380-2387

Cheng Y. S., Halsey J. L., Fode K. A., Remsen C. C., Collins M. L. P. (1999). Detection of methanotrophs in groundwater by PCR. *Appl Environ Microbiol* **60**, 648-651

Eller G., Stubner S., Frenzel P. (2000). Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiol Lett* **198**, 91-97

Farinha M., Kropinski A. (1990). Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters*. J Bacteriol* **172**: 3496-3499

Good L., Stach J. (2011). Synthetic RNA Silencing in Bacteria – Antimicrobial Discovery and Resistance Breaking. *Frontiers in Microbiology* **2**: 185

Grosse S., Laramee L., Wendlandt K. D., McDonald I. R., Miguez C. B., Kleber H. P. (1999). Purification and characterization of the soluble methane monooxygenase of the type II methanotrophic bacterium *Methylocystis* sp. strain WI 14. *Appl Environ Microbiol.* **65**, 3929-3935

Hanson R.S., Hanson T.E. (1996). Methanotrophic Bacteria; FEMS Micobiological Reviews; 60:439-471

Invitrogen (13. März 2012). Anleitung zum TOPO® TA Cloning® Kit, abgerufen am 25. April 2014 von http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf

Knopf B. (2010). Methylierung von anorganischem Quecksilber im Intestinaltrakt des Kompostwurms *Eisenia foetida*. Dissertation Johannes Gutenberg-University Mainz, S. 43

Lindner A. S., Pacheco A., Aldrich H. C., Staniec A. C., Uz I., Hodson D. J. (2007). *Methylocystis hirsuta* sp. nov., a novel methanotroph isolated from a groundwater aquifer. *Int J Sys Evol Microbiol* **57**, 1891-1900

May T. (2012). Molekularbiologische Untersuchung methanogener Archaea und Charakterisierung von Eigenisolaten aus landwirtschaftlichen NawaRo-Biogasanlagen. Staatsexamensarbeit Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Monzel C. (2011). Die periplasmatische Domäne der Sensor-Histidinkinase DcuS von *Escherichia coli.* Diplomarbeit Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Nakashima N., Goh S., Tamura T. (2012). Substracting gene function by gene silencing and disruption in bacteria. *Current Biotechn* **1**: 166-174

Pester M., Tholen A., Friedrich M., Brune A. (2007). Methane oxidation in termite hindguts: Absence of Evidence and Evidence of Absence. *Appl Environ Microbiol* **73,** 2024–2028

Pfannebecker J. (2008). Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Art- und Stamm-Identifizierung pro- und eukaryotischer Organismen. Dissertation Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Schaefer J., Goodwin K., McDonald I., Murrell, J., Oremland R. (2002). *Leisingera methylohalidivorans* gen. nov., sp. nov., a marine methylotroph that grows on methyl bromide. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 851-859

Stantscheff R. Kuevert J., Rabenstein A., Seyfarth K., Dröge S., König H. (2014). Isolation and differentiation of methanogenetic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 5719-35.

Toyama H., Anthony C., Lidstrom M. (1998). Construction of insertion and deletion mxa mutants of Methylobacterium extorquens AM1 by electroporation. *FEMS Microbiology Letters* **166**: 1-7

Wartiainen I., Hestnes A. G., McDonald I. R., Svenning M. M. (2006). *Methylocystis rosea* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from arctic wetland soil, Svalbard, Norway (78° N). *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 541-547

Yu Y., Lee C., Kim J., Hwang S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng* **89**, 670-9