

Untersuchungen der Mikroorganismengemeinschaft im Prozess der Bioabfall-Kompostierung

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Frau Kornelia Kosowski

geb. am 06.11.1981 in Halle/Saale

Gutachter/in:

1. Dr. habil. U. Lechner
2. Prof. Dr. G. Sawers
3. Prof. Dr. M. Martienssen

Tag der Verteidigung: 06.06. 2013

*„Stark sein bedeutet nicht nie zu fallen,
stark sein bedeutet immer wieder aufzustehen.“*

Anonym

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1 Kompost - ein Element der nachhaltigen Rohstoffwirtschaft	1
1.2 Ablauf des aeroben Kompostierungsprozesses	2
1.3 Regelung der Verwertung tierischer Abfälle	5
1.4 Mikrobiologie des Kompostierungsprozesses.....	8
1.5 Projekt Kompostierung mit Hygienisierungsphase.....	11
1.6 Zielstellung.....	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel	13
2.2 Kompostierung und Beprobung	13
2.2.1 Aufbau und Betrieb der Kompostierungsanlage	13
2.2.2 Probennahme und Lagerung.....	16
2.2.3 Probenaufarbeitung	16
2.3 Methoden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung von Kompost	16
2.3.1 TOC-Bestimmung	17
2.3.2 Ammonium-Stickstoff und Stickstoffoxid-Bestimmung	17
2.3.3 Trockengewicht.....	17
2.3.4 pH-Wert.....	18
2.3.5 Glukosebestimmung in Kompostproben	18
2.4 Medien.....	18
2.4.1 Medien zur Kultivierung von Mikroorganismen aus Kompostproben	18
2.4.2 Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i>	20
2.5 Keimzahlbestimmung von Mikroorganismen im Kompostmaterial	20
2.6 Anzucht und Konservierung von Isolaten aus Kompost	20
2.6.1 Kultivierung isolierter Bakterien.....	20
2.6.2 Zellanzucht und Ernte	21
2.6.3 Lyophilisation (Gefriertrocknung)	21
2.7 Methoden zur Charakterisierung von Bakterien	22
2.7.1 Verwendete Organismen und Plasmide	22
2.7.2 Mikroskopische Untersuchungsmethoden	23

2.7.3 Methoden zur Untersuchung physiologischer Eigenschaften	25
2.7.4 Bestimmung des G+C Verhältnis der DNA und des Chinonsystems von Kompostisolaten.....	27
2.8 Molekularbiologische Analysen.....	27
2.8.1 DNA-Extraktion	27
2.8.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Absorptionsspektrometrie	28
2.8.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
2.8.4 Agarosegelelektrophorese	32
2.8.5 Reinigung von PCR-Produkten.....	33
2.8.6 Klonierung von PCR-Produkten	33
2.8.7 Restriktionsanalyse amplifizierter ribosomaler DNA (ARDRA)	34
2.8.8 Isolierung von Plasmiden	35
2.8.9 Sequenzierung	35
2.8.10 Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (t-RFLP)	36
2.9 Untersuchungen von Kompostproben mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) und Chinonanalyse	37
2.9.1 FISH	37
2.9.2 Chinonanalyse von Kompostproben	40
3. Ergebnisse	42
3.1 Charakterisierung des Kompostierungsverlaufs.....	42
3.1.1 Kompostparameter	42
3.1.2 Untersuchungen zur aeroben Gesamtkeimzahl der Kompostierungsprozesse.....	46
3.2 Isolierung von dominanten Bakterien aus Kompost	49
3.2.1 Isolierung von Reinkulturen.....	49
3.2.2 Charakterisierung ausgewählter Isolate	52
3.3 Etablierung molekularer Fingerprint-Analysen zur kultivierungsunabhängigen Erfassung der typischen meso- und thermophilen Populationen	57
3.3.1 Restriktionsanalyse amplifizierter ribosomaler DNA (ARDRA) von Kompostproben aus Reaktor A	57
3.3.2 ARDRA von Kompostproben aus Reaktor B	60
3.3.3 Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus zur Verfolgung der Populationsdynamik	62
3.3.4 Verfolgung von ausgewählten Mikroorganismen mittels quantitativer PCR (q-PCR)...	68
3.4 Untersuchungen mittels Chinonanalyse	71
3.5 Untersuchungen mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	74

3.5.1 FISH von Kompostproben	74
3.5.2 Detektion von <i>Sphingobacteriaceae</i> Bakterium 28-4-3 in Kompostproben.....	76
3.6 Einsatz von Starterkulturen	77
3.6.1 Untersuchungen der Wachstumstemperaturen ausgewählter Isolate	78
3.6.2 Wachstumsversuche mit Kompostextrakt.....	78
3.6.3 Verwertungsspektrum und Enzymaktivitäten ausgewählter Isolate	79
3.6.4 Ermittlung geeigneter Applikationsmöglichkeiten von Impfmateri­al zur Beschleunigung des Kompostierungsprozesses.....	80
4. Diskussion	89
4.1 Bioabfallkompostierung in Modellreaktoren	89
4.2 Mikrobiologie der Bioabfall-Kompostierung.....	92
4.2.1 Nachweis von Kompostbakterien durch Kultivierung	94
4.2.2 Molekularbiologische Analyse der Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft während der Bioabfall-Kompostierung.....	97
4.3 Dynamik der Mikroorganismenzusammensetzung im Kompostierungsprozess	101
4.3.1 Die t-RFLP-Analyse als ein schnelles Werkzeug für die Analyse von Veränderungen in der mikrobiellen Community	101
4.3.2 Dynamik von Vertretern der <i>Sphingobacteriaceae</i> während der Kompostierung.....	104
4.3.3 Quantifizierung ausgewählter Bakterien im Kompostierungsprozess	105
4.3.4 Bestätigung der Zusammensetzung und Dynamik der Mikroorganismengemeinschaft durch Chinon- und FISH-Analyse.....	107
4.4 Einfluss von Starterkulturen auf die Kompostierung.....	110
5. Zusammenfassung.....	114
6. Literatur	116
7. Anhang.....	133

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
Amp	Ampicillin
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
bp	Basenpaare
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glukose
ca.	circa
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CY3	Cyanin-3
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extrakt (Kompostextrakt)
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EG	Europäische Gemeinschaft
<i>et al.</i>	und andere
f oder for	forward (Primer)
6-FAM	6-FAM-phosphoramidit [3',6'-Dipivaloylfluoresceinyl)-6-carboxamidohexyl)-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit]
FG	Frischgewicht
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
<i>g</i>	Fallbeschleunigung
G	Guanin
Gew.-%	Gewichtsprozent
i.d.R.	in der Regel
K	Kompostierungsprozess
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KBE	Koloniebildende Einheiten
KE	Kompostextrakt
kJ	Kilojoule
Log	logarithmische (Wachstumsphase) und Logarithmus
Lsg.	Lösung
MK	Menachinon(e)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n. a.	nicht auswertbar
n. d.	nicht detektiert/analysiert
NAI	Standard-Nähragar
NAI _{OG}	Standard-Nähragar ohne Glukose
NO ₃ ⁻	Nitrat

NO ₂ ⁻	Nitrit
NO _x ⁻	Stickstoffoxid
NB	Nährbouillon
NB _{OG}	Nährbouillon ohne Glukose
Nr.	Nummer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
part. ges.	partiell gesättigt
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pers.	persönliche (Mitteilung)
Pt	Platin
UQ	Ubichinon(e)
q-PCR	quantitative Real Time PCR
r oder rev	reverse (Primer)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Art
spp.	Arten
T	Thymin
T	Typstamm
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Brom-EDTA
Temp.	Temperatur
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TENS-Puffer	Tris/HCl-EDTA-NaCl-Puffer
TOC	Total-Organic-Carbon (Gesamter organischer Kohlenstoff)
t-RF	terminales Restriktionsfragment
t-RFs	terminale Restriktionsfragmente
t-RFLP	Terminaler-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
TG	Trockengewicht
U	Unit
UV	Ultraviolett
u. a.	und andere
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
VD	Verdünnungsstufe
VF	Verdünnungsfaktor
VM	Vancomycin
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen
z. B.	zum Beispiel
Abkürzungsverzeichnis der Bakterien-Gattungen:	
B.	<i>Bacillus</i>
E.	<i>Escherichia</i>
G.	<i>Geobacillus</i>
P.	<i>Pseudoxanthomonas</i>
U.	<i>Ureibacillus</i>

1. Einleitung

1.1 Kompost-ein Element der nachhaltigen Rohstoffwirtschaft

Nachhaltige Rohstoffwirtschaft ist im Angesicht der Materialverknappung ein globalisiertes Thema. Die weltweit gestiegene Nachfrage von Rohstoffen (z. B. Öl, Steinkohle) führt dabei zu einem Preisanstieg. Somit werden Sekundärrohstoffe aus Abfallfraktionen immer interessanter und die Rohstoffsicherung durch Abfalltrennung und hochwertiges Recycling erlangt dadurch zunehmend an Bedeutung (Kehres, 2006; Oechtering, 2009). Barth (2000) beschreibt, dass alleine in Deutschland bereits sieben Millionen Tonnen pro Jahr organische Abfälle durch biologische Techniken behandelt werden. Etwa zwei Millionen Tonnen sind gewerbliche Speisereste wovon ca. eine Million Tonnen von nicht zum Verzehr geeigneten, tierischen Nebenprodukten der Kategorie III stammen (Kohl, 2006, Hemen, 2006; Kap. 1.3, EG1774/2002). Eine wichtige Methode zur Verwertung von Abfällen stellt die Kompostierung dar (Fischer *et al.*, 2001). Kehres (2006) und Mäder *et al.* (2002) beschreiben, dass durch zunehmende Spezialisierungen von Ackerflächen, intensive Feldbewirtschaftungen, Monokulturen, Bodenerosionen und sich verändernde Umweltbedingungen zu einer stetigen Abnahme der Bodenfruchtbarkeit führen. Ein ausgeglichener Humusgehalt im Boden bildet jedoch eine Grundvoraussetzung für eine nachhaltige Bodenfruchtbarkeit (Kehres, 2006). Der Begriff Bodenfruchtbarkeit umfasst die Fähigkeit eines Bodens, Frucht zu tragen, d.h. den Pflanzen als Standort zu dienen und nachhaltig regelmäßige Pflanzenerträge von hoher Qualität zu erzeugen (Gisi *et al.* 1997; Patzel *et al.*, 2000; Ottow 2011). Durch den Einsatz von Düngern kann einer Abnahme der Bodenfruchtbarkeit entgegengewirkt werden. Gegenüber chemischen Düngemitteln besitzen biologische Dünger wie Kompost wichtige Vorteile, da die Bodenstruktur aufgelockert wird und zugleich Nährstoffe zugeführt werden, so dass das Pflanzenwachstum gefördert wird (Kehres, 2006; Oechtering, 2009). Die produzierten Komposte weisen über ihre Nährstoffäquivalente und Humus-C-Gehalte wesentliche Substitutionseffekte¹ für die Aufwertung von Mineraldünger, Torf und Humus auf (Kern *et al.*, 1998; Barth, 2000; Oechtering, 2009). Dagegen werden phosphor-, kalium- und kalziumhaltige Mineralien häufig für Kunstdünger eingesetzt. Bei der landwirtschaftlichen Anwendung von Kompost steht die Nährstoffzufuhr im Vordergrund (Kehres, 2006). Bei der landwirtschaftlichen

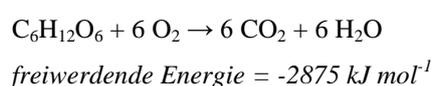
¹ Substitutionseffekt beschreibt die Nachfrageänderung in Abhängigkeit von einer Preisänderung des betreffenden Gutes, sinkt der Preis so steigt seine Nachfrage (Pindyck & Rubinfeld, 2009)

Anwendung von Kompost und Gärprodukten steht neben der Zufuhr komplexer Substanzen jedoch in erster Linie die Nährstoffzufuhr im Vordergrund (Kehres, 2006). Insbesondere bei hohen Mineraldüngerpreisen sind organische Dünger aus der Kreislaufwirtschaft eine wirtschaftliche Alternative zu Mineraldüngern und werden verstärkt nachgefragt (Thelen-Jüngling, 2011). Bahadir *et al.* (2000) beschreibt, dass durch den Einsatz von Kompost deren Verwendung um bis zu 10 % verringert werden könnte. Durch die Verteuerung von Mineraldünger und die Rohstoffverknappung vermutet Oechtering (2009), dass die Düngung mit Kompost weiter zunehmen wird und Maßnahmen geschaffen werden müssen, um hochwertige Kompostprodukte zu erzeugen, welche effizienter genutzt werden können. Kompost könnte somit einen viel erheblicheren Beitrag zur Erhöhung und zum Erhalt der Bodenfruchtbarkeit leisten als bisher (Ottow, 2011). Allerdings werden auch Bedenken hinsichtlich der unkritischen Anwendung von aus Abfällen hergestelltem Kompost geäußert, wie sie z. B. bei den Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)-Infektionen ins Gespräch gekommen sind. Ist durch die Kompostierung von Gurken und Tomaten, die zurückgenommen und nicht verkauft wurden, eine potentielle Übertragung oder Vermehrung dieser Krankheitserreger zu befürchten? Die geführte Debatte zeigt die Notwendigkeit einer sachgerechten Kompostierung oder Vergärung von Bioabfällen gemäß den Vorgaben der Bioabfall- und Düngemittelverordnung (BioAbfV, 1998; DüMV, 2008), so dass auch aus seuchenhygienischer Sicht ein unbedenkliches Produkt entsteht (Philipp *et al.*, 1998).

1.2 Ablauf des aeroben Kompostierungsprozesses

Die aerobe Kompostierung beschreibt einen Selbsterhitzungsprozess mit Sauerstoff, bei dem organisches Material zu einem stabilen Endprodukt umgesetzt wird (Finstein & Morris, 1975; Epstein, 1997; Fischer *et al.*, 2001; Ryckeboer *et al.* 2003a, b). Der Kompostierungsprozess ist umfassend und die Umsetzung des Abfall-Materials erfolgt in Kompostmieten und Reaktoren mit dafür vorgesehenen maschinellen Geräten (z. B. Wellen) oder manuell. Beim aeroben Abbau werden organische Substanzen (wie z. B. Glukose) durch die mikrobielle Aktivität mit Hilfe von Sauerstoff zu Kohlendioxid, Wasser und Biomasse umgesetzt und es werden dabei Humusstoffe aufgebaut (Hupe *et al.*, 1996). Der Abbau der Glukose ist in Gleichung 1 dargestellt.

Gleichung 1: Aerober Abbau von Glukose (nach Finstein & Morris, 1975)



Die freigesetzte Energie wird teilweise in Wärme umgewandelt und führt hierbei zur sogenannten Selbsterhitzung. Durch ständiges Belüften wird dem System Sauerstoff hinzugefügt und damit gleichzeitig die Bildung des Treibhausgases Methan (CH₄) verhindert (Strom, 1985 a, b; Thambirajah *et al.*, 1995; Hermann & Shann, 1997; Wang *et al.*, 2007).

Schon de Bertoldi *et al.* (1983) beschrieben die Kompostierung als mikrobiellen Prozess. Oft wurden hohe Temperaturen als notwendig erachtet, um eine gute Umsetzung des Komposts zu erreichen. Jedoch sind hohe Temperaturen ein Effekt der Kompostierung und direkt von mikrobiellen Aktivitäten abhängig (Strom, 1985a, b). Sie hängen unter anderem von der chemischen Zusammensetzung des Ausgangsmaterials, dem Wassergehalt, der Partikelgröße und der Sauerstoffversorgung ab (Helfer & Merrettig-Bruns, 2001). Nach Fischer *et al.* (2001) kann eine Kompostmiete eine maximale Temperatur von 82 °C erreichen. Finstein *et al.* (1980) beobachteten, dass zu hohe Temperaturen (>70 °C) zum Tod vieler Mikroorganismen führen können. Speziell angepasste *Bacillus*-Arten wie *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* und extrem thermophile Bakterien (Wachstumstemperaturen >70 °C, Fischer *et al.*, 2001) wie z. B. *Thermus* sp., können dagegen starke Erhitzungsvorgänge unbeschadet überstehen (Brock & Freeze, 1969; Finstein & Morris, 1975). Der Kompostierungsprozess wird in 4 Phasen eingeteilt, die wesentlich durch die vorherrschenden Temperaturen charakterisiert sind. Die Temperatur spielt bei der Stoffwechselaktivität sowie dem Abbau durch Mikroorganismen wie Bakterien (Prokaryonten) und Pilzen (Eukaryonten) eine tragende Rolle (Kutzner & Kempf, 1996). Der Begriff der „thermophilen Organismen“ ist in der Literatur unterschiedlich definiert (Fischer *et al.*, 2001). Daher sollen die nachfolgenden Definitionen für thermophil, thermotolerant und moderat-thermophil von Kristjansson & Stetten (1992) und Wiegel (1992) als Grundlage für diese Arbeit gelten. In Abbildung 1 ist ein vereinfachtes Schema zum Verlauf der Kompostierung gezeigt.

In der 1. Phase (mesophile Anlaufphase) etablieren sich mesophile Organismen (mesophile Pilze, *Actinomyceten* und *Bacteria*), die ihre maximale Wachstumstemperatur zwischen 20 und 42 °C erreichen. Es erfolgt eine intensive Bakterientätigkeit mit hoher Stoffwechselrate und dabei die Aufspaltung und Mineralisierung leicht abbaubarer organischer Stoffe (z. B. Zucker, Aminosäuren, Fette).

Bei der sich anschließenden 2. Phase (thermophile Rottephase, 45-70 °C) kommt es zu einer kurzen lag-Phase (Stagnation, ohne signifikante Änderungen) und anschließendem Anstieg der Temperatur auf 50-60 °C, wobei auch Spitzenwerte von 70-80 °C erreicht werden können. Die Organismenpopulationen wechseln zu thermotoleranten Organismen, deren Temperaturgrenze für das Wachstum bei 45 °C liegt, moderat thermophilen Organismen,

deren optimale Wachstumstemperatur zwischen 50 und 55 °C und obere Temperaturgrenze bei 60 °C liegt sowie zu thermophilen Organismen (hauptsächlich *Bacteria*), deren optimale Wachstumstemperatur oberhalb 40 °C liegt und die bei einer Temperaturgrenze bis ca. 70 °C wachsen können. Es erfolgt ein weiterer Abbau komplexer organischer Stoffe (z. B. Lignin, Zellulose, Proteine, Hemizellulose). Weiterhin kommt es durch hohe Temperaturen zur Abtötung bakterieller Krankheitserreger, Viren und keimungsfähiger Samen (Kristjansson & Stetten, 1992; Wiegel, 1992).

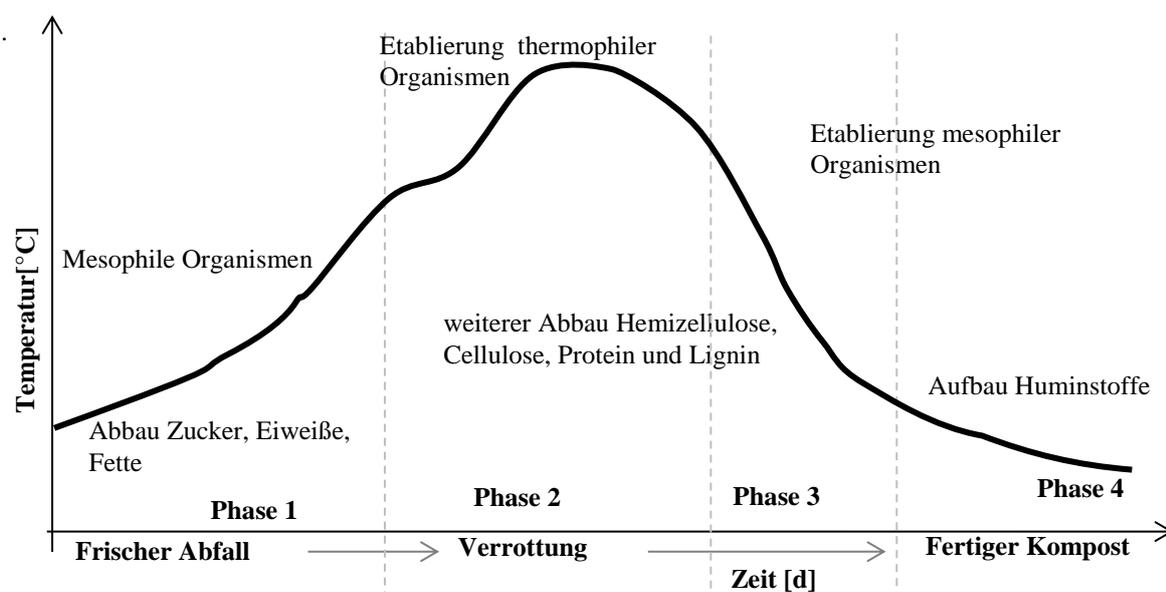


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema zum Verlauf der Stoffumsatzleistungen im Kompostierungsprozess (modifiziert nach Grabbe & Schuchardt, 1993)

In der 3. Phase (mesophile Abkühlphase) erfolgt die Abkühlung des Prozesses. Die Temperaturen fallen unter 45 °C. Dies führt zu einer erneuten Zunahme der mesophilen Organismen, es etablieren sich Mikroorganismen wie zu Beginn der Kompostierung, sowie neue Arten. Es erfolgen weitere Spaltungen von Poly- und Disacchariden zu Monosacchariden.

Die 4. Phase (Reifephase) ist ein weiterer Teil der Abkühlphase. Die Kompostierungstemperatur sinkt stetig ab und es findet der weitere Abbau schwer zersetzbarer Verbindungen, wie z. B. Lignin sowie der Aufbau von Huminstoffen statt (Strom, 1985a; Biddlestone *et al.*, 1987; Thambirajah *et al.*, 1995; Herrmann & Shann, 1997; Kämpfer *et al.*, 2001; Ryckeboer *et al.*, 2003a; Wang *et al.*, 2007).

Neben der Temperatur spielen auch noch andere Faktoren, wie z. B. der pH-Wert und der Feuchtegehalt des Materials eine wichtige Rolle bei der Kompostierung (Schloss *et al.*, 2005). Schloss *et al.* (2005) beobachteten, dass der Anfangs-pH-Wert im schwach-sauren Bereich

(pH 5-6) lag und im Verlaufe der Kompostierung in den neutralen bis schwach-basischen Bereich (7-8) wechselte. Um den Kompostierungsprozess stabil zu halten, sollte nach Nakasaki *et al.* (1993) der pH-Wert zwischen 7,2 und 8,2 liegen. Helfer & Merrettig-Bruns (2001) beobachteten jedoch gerade zum Anfang der Kompostierung oft einen zu niedrigen pH-Wert, was wahrscheinlich auf einen verstärkten Kohlenhydratabbau zurückzuführen war. Der optimale Feuchtegehalt schwankt nach Literaturangaben zwischen 40 und 70 % und sollte, um einen optimalen Rotteverlauf zu gewährleisten, zwischen 55-65 % und nicht unter 25 % liegen (Hupe *et al.*, 1996). Kutzner & Jäger (2004) beobachteten, dass bei zu trockenem Material die Stoffwechselfvorgänge beeinträchtigt werden und es bei zu feuchtem Material es zu anaeroben Zonen kommen kann. Weiterhin ist eine gute Durchmischung des Materials notwendig, um eine gleichmäßige Verteilung und Feuchtigkeit zu erhalten (Helfer & Merrettig-Bruns, 2001). Dazu gehört auch die Sauerstoffversorgung, um anaerobe Bereiche zu vermeiden und die Mikroorganismen optimal mit Sauerstoff zu versorgen. Die Struktur des abbaubaren, organischen Materials und das damit verbundene Porenvolumen (Luftporenvolumen) spielt für die Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen eine große Rolle (Helfer & Merrettig-Bruns, 2001). Kutzner & Jäger (2004) beschreiben, dass das Luftporenvolumen 20-30 % vom Porenvolumen betragen sollte, damit eine optimale Luftzufuhr der Mikroorganismen gewährleistet werden kann. Um zu beurteilen, ob der Reifegrad des Kompostes hoch genug ist, können diese Parameter sowie das C/N-Verhältnis und der Stickstoffgehalt herangezogen werden (de Bertoldi *et al.*, 1983; Haug, 1993; Das & Keener, 1997; Kämpfer *et al.*, 2001). Nach Hupe *et al.* (1996) beträgt bei Küchenabfällen das C/N-Verhältnis ca. 25:1 was sich jedoch durch den Rotteprozess auf Werte zwischen 15:1 bis 20:1 verringern kann.

1.3 Regelung der Verwertung tierischer Abfälle

Abfälle bestehen aus verschiedenen Inhaltsstoffen, wie z. B. tierischem Material oder auch Belebtschlamm aus Kläranlagen und können eine Vielzahl an pathogenen Bakterien und Viren enthalten (Kämpfer *et al.*, 2001). Tabelle 1 zeigt pathogene Mikroorganismen die schon in häuslichen Abfällen nachgewiesen wurden. Die seuchenhygienische Unbedenklichkeit von Abfallstoffen, die als organische Düngemittel genutzt werden sollen, wird durch nationale und europäische Vorgaben geregelt. Aufgrund der Anzahl der geltenden, gesetzlichen Regelungen sollen an dieser Stelle nur die Verordnungen näher erläutert werden, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit stehen.

Tabelle 1: In häuslichen Abfällen nachgewiesene, pathogene Mikroorganismengattungen und -gruppen (Kämpfer *et al.*, 2001)

Bakterien	Viren	Pilze	Parasiten
<i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Escherichia</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., <i>Hafnia</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Proteus</i> sp., <i>Salmonella</i> sp., <i>Serratia</i> sp., <i>Areomonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Kluyvera</i> sp.	Enteroviren, Hepatitis A- Virus	Aspergillus	Spulwürmer

Die Bioabfallverordnung (BioAbfV, 1998) beschreibt die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden. Sie gilt nur für unbehandelte und behandelte Bioabfälle und Gemische, die zur Verwertung auf diese Böden aufgebracht werden sollen. Diese Verordnung gilt nicht für tierische und nicht für den menschlichen Verzehr geeignete Nebenprodukte. Jedoch ist im Anhang 2 dieser Verordnung die Anforderung an die biologische Abfallbehandlung genannt, um mit Hilfe von Prozess- und Produktprüfungen die seuchenhygienische Unbedenklichkeit des Komposts festzustellen. Als hygienisch unbedenklich gilt das Produkt nur, wenn alle Prüfungsanforderungen erfüllt sind. Mit der direkten Prozessprüfung wird durch Einbringen von einem Test- oder Indikatororganismus, meistens *Salmonella Senftenberg* W775, der Wirkungsgrad des Verfahrens aus hygienischer Sicht für den gesamten Verfahrensablauf ermittelt. Die Indikatororganismen werden dem Verfahren gezielt zugesetzt, nach repräsentativen Zeitabschnitten wieder entnommen und auf Überlebensfähigkeit geprüft. Dabei sollten Salmonellen in 50 g Kompost nicht nachweisbar sein (BioAbfV, 1998; Ceustermans *et al.*, 2007)

Die Düngemittelverordnung (DüMV, 2008) ist eine Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln. Es dürfen Düngemittel und Stoffe, die organische Bestandteile enthalten, nur dann in Verkehr gebracht werden, wenn sichergestellt ist, dass sie bei der Ausbringung nicht für die Übertragung von Krankheiten bei Mensch und Tier verantwortlich gemacht werden können und keine Schäden an Pflanzen, Pflanzenerzeugnissen und Böden verursachen. Dafür müssen Anforderungen an Düngemittel hinsichtlich der seuchen- und phytohygienischen Unbedenklichkeit formuliert werden (DüMV, 2008).

Durch tierische Nebenprodukte in Futtermitteln und unsachgemäße Entsorgung, können sich BSE² (*Bovine spongiforme Enzephalopathie*) und andere Tierseuchen sowie auch chemische

²TSE/BSE: Bezeichnung für Hirnerkrankungen (Enzephalopathie), bei denen es zu einer schwammartigen Veränderung des Gehirngewebes kommt (Huang *et al.*, 2007).

Kontaminanten, wie Dioxine, verbreiten. Solche Fälle können eine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen. Es ist deshalb wichtig, dass dieses Material nicht unbehandelt der Umwelt wieder zugeführt wird (de Bertoldi *et al.*, 1982; Huang *et al.*, 2007). Deswegen wurde die Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 03. Oktober 2002 mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte erlassen. In dieser Verordnung werden Küchen- und Speiseabfälle betrachtet, die aus Restaurants, Catering-Einrichtungen, Groß- und Haushaltsküchen stammen und Erzeugnisse tierischen Ursprungs enthalten können. Dabei werden die tierischen Nebenprodukte je nach ihrem Risikopotential in drei Kategorien eingeteilt, wobei es sich stets um nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte Tierkörper oder Tierkörper Teile handelt (Barrena *et al.*, 2009; EU, 2002).

- Material der Kategorie I beschreibt alle tierischen Körperteile, einschließlich Häute, welche durch ihre Herkunft das Risiko der Übertragung einer Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathie (TSE)², zu der z. B. Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)² gehört, besitzen.
- Material der Kategorie II umfasst Abfälle, die mit anderen Krankheitserregern belastet sein können, welche von Tierkörpern, die zur Verhinderung der Ausbreitung von Tierseuchen geschlachtet wurden sowie von Abwässern aus Schlachthöfen stammen.
- Dagegen beschreibt Material der Kategorie III „Niedrig-Risiko-Produkte“ wie z. B. Tierkörper Teile, die nicht verseucht, aber trotzdem nicht mehr zum Verzehr geeignet sind (Barrena *et al.*, 2009).

Für die Entsorgung und Behandlung tierischer Abfälle der drei Kategorien gelten besondere Vorschriften, wobei eine Option stets die Verbrennung darstellt. Diese verursacht jedoch enorme Energiekosten, da das Material oft sehr feucht ist und somit eine Verbrennung erschwert. Die Neuregelung der EU-Kommission im Jahr 2006 (Nr. 1877/2006) erlaubte nun für Material der Kategorie III die Kompostierung von tierischen Abfällen. Durch die erzielbaren hohen Temperaturen stellt der Kompostierungsprozess eine geeignete, alternative Behandlungsmaßnahme gegenüber der Verbrennung dar. Dafür müssen jedoch folgende Richtlinien beachtet werden (siehe auch Anhang 1):

- Die Installation von Messanlagen für die Temperaturregelung während der gesamten Kompostierung ist wesentlich.
- Es muss sichergestellt sein, dass die Temperaturen im Prozess ausreichend hoch sind, um pathogene Mikroorganismen zu inhibieren.

- Ein Hygienisierungsschritt muss eingesetzt werden, der sicherstellt, dass für mindestens 1 h bei 70 °C kompostiert wird.
- Die Endprodukte dürfen keine *Salmonella* und nur 300 koloniebildende Einheiten (KBE)³ *E. coli*/g Kompostmaterial enthalten. Nach dem Kompostierungsprozess muss eine gründliche Säuberung und Desinfektion des Kompostreaktors vorgenommen werden.

1.4 Mikrobiologie des Kompostierungsprozesses

Die Mikroorganismenzusammensetzung von Kompostierungsprozessen wurde in zahlreichen Publikationen (z. B. Kutzner & Jäger, 1994; Beffa *et al.*, 1996; Blanc *et al.*, 1997; Kämpfer & Weissenfels, 2001; Hiraishi *et al.*, 2003b) näher beschrieben.

Viele Erkenntnisse zu den im Kompostierungsprozess vorkommenden Bakterien wurden durch kultivierungsabhängige Methoden gewonnen. So wiesen Epstein (1997), Kutzner (2000) und Kämpfer *et al.* (2001) auf den grundsätzlich hohen Anteil der Gattungen *Bacillus* und *Actinomyces* sowie dem Vorkommen mesophiler Pilze hin. Neben *Bacillus* wurden durch Stanek (1981) in der mesophilen Anlaufphase *Proteus* und *Micrococcus* nachgewiesen. Rüprich (1990) fand einen Anteil von bis zu 20 % an *Pseudomonas* sp. In der thermophilen Phase wurden grampositive und sporenbildende *Bacillus*- und *Geobacillus*-Arten (Strom, 1985 a, b; Rüprich, 1990) sowie thermotolerante Actinomyceten (Fischer *et al.* 2001; Wang *et al.*, 2007) nachgewiesen. Auch andere Arbeitsgruppen konnten Arten der Bacillen, Actinomyceten und Pseudomonaden isolieren (Kutzner & Jäger, 1994; Beffa *et al.*, 1996; Blanc *et al.*, 1997). Juteau *et al.* (2005), Dees & Ghiorse (2001) und Blanc *et al.* (1999) beschrieben *Bacillus*-Spezies als die dominanten Organismen im Kompost. Seit langem ist bekannt, dass nur ein kleiner Teil der in der Umwelt vorkommenden Bakterien mit den bisherigen Methoden kultiviert werden können. So wird angenommen, dass nur 0,3 % der Bodenbakterien kultivierbar sind (Amann, 1995). Für Kompost wurde der kultivierbare Anteil bis zu 54 % eingeschätzt (Narihiro *et al.*, 2003). Kultivierungsunabhängige Methoden stellen daher eine gute Möglichkeit dar, ein noch breiteres Spektrum der vorhandenen Bakterien zu erfassen. Deshalb wurden in den letzten Jahren verstärkt molekularbiologische Methoden, bei der in der Regel ribosomale RNA oder DNA verwendet werden, zur Untersuchung von

³ KBE: Koloniebildende Einheiten ist eine Größe für die Quantifizierung von Mikroorganismen, welche auf festen Nährböden eine Kolonie bilden und gezählt werden

Kompost angewendet (z. B. Dees & Ghiorse, 2001; Narihiro *et al.*, 2004). Dazu zählen unter anderem die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) sowie PCR-basierte Methoden wie z. B.: Restriktionsanalyse amplifizierter ribosomaler DNA (ARDRA), Terminaler-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (t-RFLP), Denaturierende-Gradientengel-Elektrophorese (DGGE) und Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP). In Tabelle 2 sind kultivierungsunabhängige Methoden zusammengefasst, die schon für die Analyse von Mikroorganismen im Kompost eingesetzt wurden.

Tabelle 2: Übersicht der schon für Kompost eingesetzten kultivierungsunabhängigen Nachweismethoden für Mikroorganismen mit ausgewählten Referenzen

Methoden	Referenzen
ARDRA, t-RFLP	Blanc <i>et al.</i> (1997); Dees & Ghiorse (2001); Tiquia <i>et al.</i> (2005b); Nakasaki (2005); Juteau <i>et al.</i> (2005); Székely <i>et al.</i> (2009); Partanen <i>et al.</i> (2010)
PCR-Methoden wie z. B. q-PCR	Ishii <i>et al.</i> (2000); Peters <i>et al.</i> (2000); Schloss <i>et al.</i> (2003a,b); Pedro <i>et al.</i> (2003); Miyatake & Iwabuchi (2005); Halet <i>et al.</i> (2006)
DGGE	Ishii <i>et al.</i> (2000); Pedro <i>et al.</i> (2001, 2003); Green <i>et al.</i> (2004); Juteau <i>et al.</i> (2005); Halet <i>et al.</i> (2006); Székely <i>et al.</i> (2009)
SSCP	Koschinsky <i>et al.</i> (1999); Peters <i>et al.</i> (2000); Fracchia <i>et al.</i> (2006)
FISH	Haruta <i>et al.</i> (2002); Hiraishi <i>et al.</i> (2003b); Green <i>et al.</i> (2004); Juteau <i>et al.</i> (2005)
Chinonanalytik	Koschinsky <i>et al.</i> (1999); Hiraishi <i>et al.</i> (2000, 2003 b); Peters <i>et al.</i> (2000); Tang <i>et al.</i> (2004); Fracchia <i>et al.</i> (2006)

Mittels FISH können Bakterien durch RNA-Sonden direkt im mikroskopischen Bild der Kompostprobe identifiziert werden (Hiraishi *et al.*, 1999).

PCR-basierte Anwendungen haben eine hohe Sensitivität, sind jedoch zeitaufwändig, da meist eine extensive Probenaufarbeitung notwendig ist (Maynard *et al.*, 2005). Bei der DGGE handelt es sich um eine sequenzspezifische Trennung doppelsträngiger PCR-amplifizierter DNA-Fragmente der gleichen Länge durch ein denaturierendes Gradienten-Gel (Muyzer & Smalla, 1998). Anschließend erfolgt eine Sequenzanalyse mit der die Identifizierung der Mikroorganismen möglich ist.

Durch Klonierung von amplifizierten 16S rRNA-Genen und deren Restriktionsanalyse in einem Agarosegel ist es möglich, durch ARDRA Einblicke in die Diversität von Bakterienpopulationen zu erhalten. ARDRA ist jedoch eine sehr aufwändige Methode und kann in der Regel nur bedingt zur Erfassung zeitlicher Veränderungen von Mikroorganismengemeinschaften verwendet werden. Anhand der Häufigkeit von Bandenprofilen kann eine Aussage zur Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft

einer Probe erfolgen, auch wenn Bandenmuster oft nicht direkt interpretierbar sind, da sowohl die gleiche Bande von unterschiedlichen Bakterien stammen kann als auch durch eine Spezies mehrere Banden erhalten werden können (Ranjard *et al.*, 2000). Jedoch erlaubt die Sequenzierung von 16S rRNA-Genfragmenten eine taxonomische Zuordnung.

Mit t-RFLP kann dagegen die Populationsdynamik untersucht werden, da eine große Probenzahl in kurzer Zeit analysiert wird. Dabei werden fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte an 16S rRNA-Genen erzeugt, diese durch Restriktionsenzyme verdaut und die Größen der markierten Fragmente durch Kapillarelektrophorese analysiert. Die entstehenden terminalen Restriktionsfragmente erlauben eine Quantifizierung der einzelnen Organismengruppen, sie können jedoch nicht sequenziert werden. Um dennoch den erzeugten, terminalen Fragmenten Mikroorganismen zuordnen zu können, ist eine praktische oder theoretische Analyse der Schnittstellen von 16S rRNA-Genen beteiligter Mikroorganismen notwendig.

Bei der SSCP werden doppelsträngige PCR-Produkte mit Hilfe einer Lambda-Exonuclease in Einzelstrangmoleküle überführt und die Produkte auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die SSCP bietet einen entscheidenden Vorteil gegenüber der DGGE, da Homo- und Heteroduplex-Moleküle ausgeschlossen werden können und die Zahl der Banden reduziert wird (Schwieger & Tebbe, 1998; Seibold, 2002).

Eine weitere Möglichkeit zur kultivierungsunabhängigen Untersuchung der Populationsstruktur während der Kompostierung stellt die Untersuchung der Chinone dar (Hiraishi *et al.*, 2000, 2003a,b). Chinone sind lipidartige Moleküle und in allen atmenden Mikroorganismen vorhanden (Hiraishi *et al.*, 2003a). Sie sind in den Membranen verankert und transportieren Elektronen sowie Wasserstoff über reversible Redoxsysteme wie z. B. der Atmungskette (Barton, 2005). Abbildung 2 zeigt die chemische Struktur der Hauptchinone.

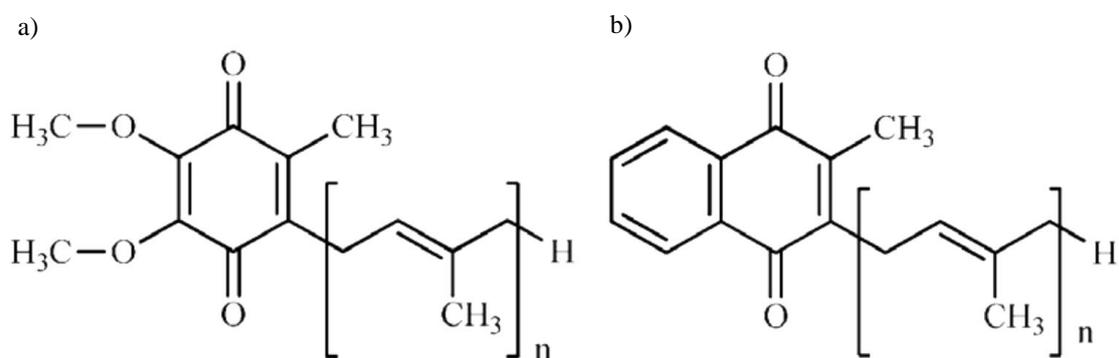


Abbildung 2: Chemische Struktur von a) Ubichinonen (UQ-n) und b) Menachinonen (MK-n). n steht für die Länge der Isoprenreste (Hanif *et al.*, 2012).

Ubichinone (UQ) sind Benzochinone und besitzen eine Prenylseitenkette, welche je nach Mikroorganismenart von unterschiedlicher Länge ist (Lytle *et al.*, 2001; Ottow, 2011). Sie

sind ein Indiz für das Vorkommen von *Proteobacteria*. Menachinone (MK) sind Naphtochinon-Derivate und besitzen ebenfalls Polyprenylseitenketten unterschiedlicher Länge. Menachinone sind sowohl in *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* als auch in *Bacteroidetes* vorhanden (Hiraishi *et al.*, 1999, Hiraishi *et al.*, 2003). Länge und Sättigungsgrad der Prenylseitenketten geben weitere Aufschlüsse über das Vorkommen bestimmter Mikroorganismengruppen. Limitierungen entstehen dadurch, dass gleiche Chinone in verschiedenen Phyla auftreten können. So besitzt ein großer Teil der *Firmicutes* und *Bacteroidetes* Menachinon 7 als Hauptkomponente des Chinonsystems (Hiraishi *et al.*, 1999; Krieg *et al.*, 2011). Nachteile der Chinonanalytik sind der hohe Zeitaufwand, der geringe Probendurchsatz und der große Verbrauch an organischen Lösungsmitteln (Hanif *et al.*, 2012).

1.5 Projekt Kompostierung mit Hygienisierungsphase

In einem von der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF) geförderten Forschungs- und Entwicklungsprojekt sollte die aerobe Kompostierung von Biomaterial untersucht werden, mit dem Ziel ein Verfahren zu entwickeln, welches auch die Fermentation von tierischen Abfällen der Kategorie III erlauben würde (EU-Verordnung Nr. 1877/2006). Das Versuchsmaterial bestand hauptsächlich aus regionalen Küchenabfällen. An dem Projekt waren neben dem Institut für Biologie/Mikrobiologie der MLU Halle-Wittenberg noch zwei weitere Kooperationspartner beteiligt. Diese waren das Institut für Tier- und Umwelthygiene der Freien Universität Berlin (FU Berlin) und die für die Kompostierung zuständige Firma BioSal Anlagenbau GmbH in Bad Lausick. An der FU Berlin sollte dabei der Kompostierungsprozess seuchenhygienisch untersucht werden, mit dem Ziel, die von der Verordnung (EG) Nr. 1877/2006 geforderten Parameter zu überprüfen. Die BioSal Anlagenbau GmbH stellte Kompostierungsreaktoren zur Verfügung, die teilweise mit einer Zusatzheizung ausgestattet waren, um die Hygienisierungsphase zielgenau steuern zu können. Die Reaktoren waren mit einer Temperaturmessung und -regelung ausgestattet, um die Kompostierungstemperatur zu überwachen, die Selbsterhitzungsphase für den Hygienisierungsprozess zu nutzen und dabei Energie einzusparen.

1.6 Zielstellung

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von Kompostierungsprozessen in zwei Reaktortypen (Reaktor A und Reaktor B(1)) mit dem Ziel, die Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft in verschiedenen Phasen des Kompostierungsprozesses und deren Dynamik zu untersuchen. Dazu sollten die physikalisch-chemischen Parameter und die Keimzahl meso- und thermophiler Bakterien bestimmt werden. Weiterhin sollten am Kompostierungsprozess beteiligte Bakterien isoliert, identifiziert und hinsichtlich kompostierungsrelevanter Eigenschaften charakterisiert werden. Die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft sollte kultivierungsunabhängig durch ARDRA ermittelt und deren Dynamik durch t-RFLP, Chinon-Analytik und FISH untersucht werden. Besonderes Interesse galt dem Einfluss der Hygienisierung auf die Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft. Weiterhin sollte das Verhalten ausgesuchter Bakterien mittels q-PCR verfolgt werden und ihr möglicher Einsatz als Starterkulturen überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte sowie deren Hersteller sind im Ergebnisteil angegeben.

Zur Herstellung der Nährmedien, Pufferlösungen und für molekularbiologische Arbeiten wurde zweifach entionisiertes Wasser verwendet, welches in dieser Arbeit als ddH₂O bezeichnet wird. Die genutzten Chemikalien wurden von den Firmen Bioline (Luckenwalde), Biomerieux (Nürtingen), Biometra (Göttingen), MBI Fermentas (St. Leon-Roth), Promega (Mannheim), Quiagen (Berlin) und Roth (Karlsruhe) in den Reinheitsgraden purum oder höher bezogen.

2.2 Kompostierung und Beprobung

2.2.1 Aufbau und Betrieb der Kompostierungsanlage

Die untersuchten Proben stammten von der BioSal Anlagenbau GmbH (Bad Lausick), im Folgenden „BioSal“ genannt. Bei den für die Kompostierung genutzten Materialien handelte es sich um tierische Abfälle aus Imbissständen und Restaurants, welche Obst-, Gemüseabfälle und Speisereste mit tierischen Bestandteilen wie z. B. Extremitäten und Tierkadaver umfassten. Den Abfällen wurden zusätzlich variable Mengen an Gartenabfällen, im Wesentlichen Laub, Baumschnitt, Strauch- und Rasenschnitt, Rindenmulch, Sägespäne und Papierschnipsel zugesetzt, wobei die beiden letzten Materialien dazu dienten, den Feuchtegehalt des Materials anzupassen. Die Befüllungen und die Probenentnahme erfolgten von BioSal-Mitarbeitern.

Der aerobe Kompostierungsprozess wurde personell, sowie computergesteuert kontrolliert und der Prozessverlauf wurde durch kontinuierliche Temperaturmessungen im Reaktor überwacht. Die ersten Versuche (Tabelle 3) wurden in einem Bioreaktor mit einer Kapazität von 400 l (Reaktor A, Dyn 0.5) durchgeführt. Die weiteren Abfälle wurden dann in einem 700 l Bioreaktor (Reaktor B1, Dyn 1.0) kompostiert. Bei den Versuchen mit Starterkulturen (Tabelle 3) erfolgte der Einbau einer Trennwand, wodurch ein Zweikammersystem entstand, so dass in beiden Kammern ein Volumen von 350 l vorhanden war (Reaktor B2). Die Belüftung der Reaktoren erfolgte durch Einblasen von Frischluft auf der Reaktorunterseite, um einen guten Umsatz der Rotte zu gewährleisten. Die Luftmenge des Reaktors A betrug

285 m³/h Zu- und Abluft, bei Reaktor B 2 × 300 m³/h Zuluft und 600 m³/h Abluft. Die Belüftung der Reaktoren erfolgte intervallartig, 2 min an und 10 min aus. Um nicht zu kalte Luft einzublasen und somit den Kompostierungsvorgang zu stören, wurde die Frischluft angewärmt. Die Umwälzung des Inputmaterials erfolgte durch eine rotierende Reaktorwelle im Abstand von 30 min für die Dauer von 3 min, wobei für die Drehrichtung 3× links und 3× rechts vorgegeben wurde. Somit konnte eine gute Durchmischung gewährleistet werden. Diese sorgte zusätzlich für eine stetige Durchlüftung und gleichmäßige Temperaturverteilung. Die Messung der Temperatur in Reaktor A erfolgte durch fünf Thermoelemente (Pt 100), von denen jeweils zwei an den beiden Reaktorlängsseiten und eines in der Mitte angebracht waren. In Abbildung 3 ist Reaktor A (a) und die Innenansicht der mit Kompost befüllten Kammer dargestellt (b).



Abbildung 3: Reaktor A (BioSal Anlagenbau GmbH, Bad Lausick). Komplettsicht (a) und Innenansicht (b). Um eine optimale Durchmischung des Materials zu gewährleisten, wurde eine rotierende Welle eingesetzt (b) und an drei unterschiedlichen Stellen Probenmaterial entnommen und vermischt. Die Temperatur wurde sowohl automatisch jeweils an den beiden Reaktorlängsseiten und in der Mitte sowie per Hand mit einer Messsonde bestimmt.

Im Reaktor B1 (Abbildung 4) befanden sich in jeder Reaktorhälfte vier Thermoelemente (Pt 100). Außerdem erfolgte die Temperaturmessung im Bereich der zentral gelagerten Wellen an ausgewählten Messstellen manuell. Für diese Arbeit wurden die Mittelwerte der manuellen Temperaturmessung (von Reaktor A oder B1/B2) als Bezugsgrößen verwendet. Es bestand zudem die Möglichkeit, durch Anschalten einer kammerintegrierten Heizung, welche in der Reaktormantelwand eingebaut war, eine künstliche Erhitzung des Kompostmaterials auf ca. 70 °C durchzuführen. Die Regelung dieser Heizung erfolgte automatisch durch Thermoelemente.



Abbildung 4: Reaktor B (BioSal Anlagenbau GmbH, Bad Lausick) als Komplettansicht. Für eine optimale Durchmischung des Materials wurde eine rotierende Welle eingesetzt. Die Temperatur wurde sowohl automatisch an den Wellen, links und rechts vom Reaktor und per Hand mit einer Messsonde bestimmt.

In dem Projektzeitraum wurden insgesamt 24 Kompostierungsläufe durchgeführt. Die Kompostierungsläufe, welche in dieser Arbeit näher untersucht wurden, sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Dabei steht Tag 0 für den Inputtag mit Abfallbefüllung des Reaktors. Sollte eine Zusatzbefüllung, Hygienisierung oder eine Beimpfung mit Starterkulturen erfolgt sein, ist dies gesondert vermerkt.

Tabelle 3: Untersuchte Kompostierungsprozesse

Kompost-prozess (K)	Reaktor-typ	Untersuchungs-zeitraum (d)	Inputmaterial	Bemerkungen
1	A	0-22 ¹	200 l Pappe, 100 l Küchenabfälle, 100 l Sägespäne, 20 l Rinde, 10 l Hühnermist <u>Zusatzbefüllung am Tag 7:</u> 150 l Pappe, 100 l Küchenabfälle	
2	A	0-6	160 l Pappe, 80 l Küchenabfälle, 80 l Sägespäne	
14	B1	21-37	120 l Pappe, 80 l Küchenabfälle, 160 l Sägespäne <u>Zusatzbefüllung am Tag 29:</u> 80 l Pappe, 80 l Küchenabfälle, 40 l Sägespäne	2 × Hygienisierung
17	B1	4-15	160 l Pappe, 200 l Küchenabfälle, 120 l Sägespäne	Hygienisierung
19	B2	0-11	je Kammer: 40 l Pappe, 120 l Küchenabfälle 60 l Rindenmulch <u>Zusatzbefüllung am Tag 3:</u> 30 l Pappe je Kammer	Hygienisierung, rechte Kammer mit Starterkulturen beimpft

Fortsetzung Tabelle 3

Kompostprozess (K)	Reaktor-typ	Untersuchungs-zeitraum (d)	Inputmaterial	Bemerkungen
20	B2	0-14	100 l Pappe, 160 l Küchenabfälle, 100 l Rindenmulch	Hygienisierung, rechte Kammer mit 10 l Rückstellprobe von Kontrollkammer K19 beimpft
21	B2	0-9	100 l Pappe, 160 l Küchenabfälle, 120 l Rindenmulch, 100 l Gartenabfälle	Hygienisierung rechte Kammer mit Starterkulturen beimpft
23	B2	0-6	80 l Pappe, 120 l Küchenabfälle, 220 l Rindenmulch	Hygienisierung rechte Kammer mit Starterkulturen beimpft

¹ Von K1 wurde hauptsächlich nur die erste Phase bis zur Selbsterhitzung untersucht, jedoch für die Gesamtkeimzahlbestimmung auch die 2. Phase nach der Zusatzbefüllung, sowie für ARDRA Tag 5 und Tag 19.

2.2.2 Probennahme und Lagerung

Um eine homogene Mischung der Proben zu erhalten, wurden von drei Stellen des Reaktors durch BioSal-Mitarbeiter Kompostproben entnommen. Die Proben wurden in Gefrierbeuteln bei -20 °C eingefroren. Nach dem Ende der Kompostierung eines jeden Kompostprozesses wurden die Proben mit Kühllakkus zum Institut für Mikrobiologie geschickt oder persönlich abgegeben. Bei Probeneingang wurde die Ankunftstemperatur bestimmt und die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Probenaufarbeitung

Für eine gute Durchmischung der einzelnen Proben wurden die gefrorenen Kompostproben durch mechanische Zerstückelung mit Hammer und Meißel bearbeitet. Bis zur weiteren Verwendung wurden dann jeweils zwei sterile 50 ml Reaktionsgefäße (Greiner Bioone, Essen) mit dem Kompostmaterial befüllt und bei -20 °C gelagert.

2.3 Methoden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung von Kompost

Wenn nicht anders angegeben, wurde für alle experimentellen Versuche als Material tiefgekühlter Kompost verwendet. Die Aufarbeitung der Proben für die Bestimmung des

Gesamten-organischen-Kohlenstoffes (Total Organic Carbon, TOC), Ammonium-Stickstoff ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) und Stickstoffoxid (Summe aus Nitrit und Nitratbestimmung) wurde modifiziert nach Tiquia *et al.* (2001) durchgeführt. Es wurde 1 g Kompostmaterial mit ddH₂O verdünnt (1:10 (w/v)) und eine Stunde horizontal bei 150 rpm geschüttelt. Danach wurden die Proben zentrifugiert ($3400 \times g$, 30 min, RT) und anschließend über einen Faltenfilter filtriert. Die ermittelten Werte wurden auf 1 g FG bezogen.

2.3.1 TOC-Bestimmung

Die TOC-Messung wurde von den Labormitarbeitern der Kläranlage Halle-Nord durchgeführt. Sie erfolgte mit dem TOC-Analysator (Dimatoc 2000, Analysentechnik, Essen) gemäß DIN-Vorschrift EN 1484 für die Analyse der wässrigen Phase. Es wurde immer eine Dreifachbestimmung durchgeführt und davon der Mittelwert bestimmt.

2.3.2 Ammonium-Stickstoff und Stickstoffoxid-Bestimmung

2.3.2.1 Nitratbestimmung

Die Nitratbestimmung ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) wurde mittels der Küvettenmethode LCK339 (Hach Lange GmbH, Düsseldorf) mit dem Cadas 50S Spektralphotometer nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Messbereich lag bei 1-60 mg/l NO_3^- .

2.3.2.2 Nitritbestimmung

Die Nitritbestimmung ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) erfolgte wie bei Cataldo *et al.* (1975) beschrieben. Als Reagenz diente 5 %-ige Salicylsäure in konzentrierter Schwefelsäure. Der Messbereich lag bei 5-1000 mg/l.

2.3.2.3 Ammoniumbestimmung

Die Ammoniumbestimmung im Extrakt erfolgte mittels *Nesslers Reagenz* am Institut für Bioanalytik, Umwelt-Toxikologie und Biotechnologie Halle GmbH (IFB Halle).

2.3.3 Trockengewicht

Vor der Befüllung der Schälchen wurde das Leergewicht bestimmt. Es wurden 3×5 g Kompostmaterial in Keramikschälchen eingewogen. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Proben für drei Tage bei 80 °C. Jeden Tag wurde das Gewicht überprüft, um die

Gewichtskonstanz zu ermitteln. Dann wurde das Endgewicht ermittelt und das Trockengewicht bestimmt.

2.3.4 pH-Wert

Der pH-Wert wurde nach der Methode von Tiquia *et al.* (2002) im wässrigen Kompostextrakt bestimmt.

2.3.5 Glukosebestimmung in Kompostproben

Es wurde von jeder Probe 2×1 g Kompost mit 10 ml ddH₂O versetzt. Dann wurden die Proben für 1h bei 150 rpm bei 4 °C geschüttelt und anschließend 10 min bei $3400 \times g$, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Die Analyse der im Medium vorhandenen Glukose erfolgte mit dem Yellow Springs Instruments 2300 Glucose Analyzer (YSI, Yellow Springs, USA). Dessen Nachweisgrenze lag bei 0,001 g/l für β -D-Glukose. Diese Messung war hochspezifisch, andere Zucker wurden nicht detektiert. Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen, sowie pro Messung 3×30 μ l Probe analysiert und ein Mittelwert ermittelt.

2.4 Medien

2.4.1 Medien zur Kultivierung von Mikroorganismen aus Kompostproben

Um Mikroorganismen aus den Kompostproben zu isolieren und die Gesamt-Keimzahl (Kap. 2.5) der Kompostproben zu bestimmen, wurden verschiedene Medien genutzt. Diese sind nachfolgend aufgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen. Sämtliche Komponenten wurden in ddH₂O gelöst. Zur Sterilisation wurden die Medien bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Für die Bestimmung der Gesamt-Keimzahl und für Isolierungsversuche der Kompostbakterien wurde Reasoner 2A-Medium (R2A) und Standard-Nähragar I (NAI) als Fertigmedium nach Herstellerangaben hergestellt.

Wenn keine Glukose verwendet werden sollte, enthielt NAI folgende Bestandteile:

NAI_{OG}: 1,5 % Pepton aus Casein, 0,3 % Hefeextrakt, 0,6 % NaCl, (Agar 1,2 %), pH 7,5

R2A-Medium (Reasoner *et al.*, 1985) wurde nach Herstellerangaben hergestellt. Für Agarplatten wurde 1,2 % Agar zugefügt

Zur Kultivierung der isolierten Stämme wurde Nährbouillon mit (NB) und ohne Glukose (NB_{OG}) verwendet:

NB: 1,5 % Pepton aus Casein , 0,3 % Hefeextrakt, 0,6 % NaCl, pH 7,5

NB_{OG}: NB, 0,1 % Glukose, pH 7,5

2.4.1.1 Kompostextrakt-Medium (KE) nach Kleeberg (2000)

Zur Herstellung des Kompostextraktes wurden 10 g Kompost mit 100 ml ddH₂O versetzt und 20 h unter gelegentlichem Rühren bei RT stehen gelassen. Um grobe Kompostpartikel abzutrennen, wurde das Medium zentrifugiert (7800 × g, 15 min, 20 °C). Im Abstand von zwei Tagen wurde der Extrakt 3× 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Lagerung zwischen dem Autoklavieren erfolgte bei 30 °C (Tyndalisieren). Der pH-Wert wurde vor dem dritten Autoklavieren auf pH 7,2 eingestellt. Zur Verfestigung des Mediums wurde 1,5 % Agar zugegeben.

2.4.1.2 Malzagar zur Isolierung von Pilzen

Isolierungsversuche von Pilzen wurde mit Malzagar und Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) durchgeführt. Es wurde Malzagar (Roth, Karlsruhe) nach Herstellerangaben hergestellt und zusätzlich 40 mM ABTS zugegeben. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 50 °C über 48 h.

2.4.1.3 MNY-Medium nach Beffa *et al.* (1996)

Für die Isolierung von thermophilen Mikroorganismen wurde MNY-Medium wie bei Beffa *et al.* (1996) beschrieben hergestellt. Zusätzlich wurde 0,8 % NB und 0,2 % Hefeextrakt zum Medium zugesetzt.

2.4.1.4 Hemmen grampositiver Bakterien mit Vancomycin

Es wurden R2A (Roth, Karlsruhe) sowie NAI-Platten mit und ohne einer Endkonzentration von 1 mg/l Vancomycin hergestellt (Kap. 2.4). Die Zellen wurden wie in Punkt 2.5 beschrieben abgelöst. Dann wurde eine Verdünnungsreihe mit 0,9 %-iger NaCl-Lsg.

hergestellt und jeweils 1 ml auf die Agarplatten ausplattiert. Diese wurden bei 55 °C für zwei Tage und bei 30 °C für drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die KBE-Zahl (Süßmuth *et al.*, 1987) bestimmt und von Platten mit vereinzelt Kolonien Mikroorganismen isoliert. Diese wurden in weiteren Schritten näher charakterisiert und sequenziert (siehe Kap. 2.8).

2.4.2 Medium zur Anzucht von *E. coli*

Lysogeny broth-Medium (LB) wurde bei Klonierungsexperimenten und zur Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur verwendet. Durch Zusatz von Agar (1,5 % Agar) wurde es auch als Festmedium eingesetzt. LB-Medium wurde nach Sambrook *et al.* (1989) mit Ampicillin(Amp) hergestellt.

LB: 1,0 % Trypton/Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,0, 125 µg/ml Amp

Amp-Stammlösung (w/v) wurde erst nach Abkühlung des Mediums auf 50 °C hinzugefügt. Die Lagerung der LB-Agarplatten erfolgte bei 4 °C.

2.5 Keimzahlbestimmung von Mikroorganismen im Kompostmaterial

Nach der Probenaufarbeitung (Kap. 2.2.3) wurde wie bei Dees & Ghiorse (2001) beschrieben, 10 g zerkleinertes Kompostmaterial mit 90 ml 0,1 %-igem Tetranatriumpyrophosphat-Puffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und für 1 h, 150 rpm bei RT geschüttelt. Die groben Partikel wurden durch Zentrifugation bei $3661 \times g$ (Hettich, Tuttlingen) für 20 min abgetrennt. Es wurde 0,5 ml Überstand in eine Verdünnungsreihe eingesetzt und 100 µl wurden dann im Doppelansatz auf Agarplatten bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-15} ausplattiert. Die Keimzahlbestimmung erfolgte bei zwei verschiedenen Temperaturen, um die mesophilen (30 °C) bzw. thermophilen Bakterien (55 °C) zu erhalten. Die Inkubationszeit wurde jeweils auf drei (30 °C) und zwei (55 °C) Tage festgelegt. Die Auszählung der Kolonien erfolgte nach 24 und 48 h. Zur Berechnung der KBE-Zahl wurde die Methode nach Süßmuth *et al.* (1987) angewendet.

2.6 Anzucht und Konservierung von Isolaten aus Kompost

2.6.1 Kultivierung isolierter Bakterien

Um häufig vorkommende Mikroorganismen im Kompostmaterial zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit Bakterien aus verschiedenen Kompostchargen isoliert. Diese sollten für

potentielle Starterkulturen untersucht werden. Dafür wurden Bakterien sporadisch von den Platten, die zur Keimzahlbestimmung dienten (Kap. 2.4), bei 30 °C und 55 °C inkubiert, sowie mit unterschiedlichen Methoden isoliert, vereinzelt, sequenziert und anschließend in die Stammkultursammlung aufgenommen. Um sie für spätere Versuche zu konservieren, wurden die Organismen auf NAI (Kap. 2.4) angezogen. Die Kultivierung der isolierten Bakterien erfolgte bei ihrer Isolierungstemperatur auf einem Schüttler bei 150 rpm. Eine 70 ml-Vorkultur, inokuliert mit Zellmaterial von Agarplatten oder aus einer Glycerinkultur, diente als Inokulum für die 700 ml-Hauptkultur. Zur Bestimmung des Wachstums der Bakterienkulturen wurde die OD bei einer Wellenlänge von 600 nm am Photometer (Spekol 1500, Carl Zeiss Technology, Analytik Jena) gemessen. Als Leerwert wurde das Kulturmedium der Bakterienkultur eingesetzt.

Es wurde von jedem Kompostisolat 3×2 ml Zellsuspension aus der Vorkultur mit 1 Vol. sterilem Glycerin (50 %-ig) gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.6.2 Zellanzucht und Ernte

Die Hauptkultur wurde mit einer optischen Dichte (OD) von 0,1 der Vorkultur inokuliert. Das Wachstum wurde durch OD₆₀₀-Messung verfolgt. Die Zellernte erfolgte bei OD₆₀₀ 0,7 bis 1,2 in der exponentiellen Phase des Bakterienwachstums.

Die Ernte der Zellen erfolgte verteilt auf zwei 400 ml-Zentrifugenbecher durch Zentrifugation in der Sorval Zentrifuge mit $6812 \times g$, bei 4 °C für 20 min. Die Zellpellets wurden in je 15 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung aufgenommen und mit einem sterilen Glasstab resuspendiert und anschließend vereinigt. Für die Zellzahlbestimmung wurde 2×1 ml Zellmaterial abgenommen. Ein Röhrchen wurde bei -80 °C eingefroren und lyophilisiert und ein Röhrchen wurde sofort für die Zellzahlbestimmung verwendet. Die restlichen 28 ml wurden in 50 ml Greiner gefüllt und in der Zentrifuge (Hettich Universal 30 RF, Rotor 1424A, Hettich, Tuttlingen) bei $3661 \times g$ bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen bei -80 °C bis zur Lyophilisation gelagert.

2.6.3 Lyophilisation (Gefriertrocknung)

Die Lyophilisation ist ein Verfahren zur schonenden Trocknung, bei der die Eiskristalle ohne Übergang in den flüssigen Zustand verdampfen. Die Gefriertrocknungsanlage (Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode) bestand aus zwei Kammern, die durch eine beheiz- und kühlbare Stellfläche voneinander

getrennt waren. Vor der Lyophilisation der Proben wurden die Kammern auf $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Das zu trocknende Produkt wurde auf der Stellfläche platziert, die Kammern luftdicht verschlossen und evakuiert. Die Trocknung erfolgte bei einem Vakuum von 0,25 mbar und einer Gegenheizung der Stellfläche bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Methode wurde zur Trocknung von Zellen verwendet, um sie für die Lagerung bei RT zu immobilisieren. Dafür wurden die Zellen nach der Zellernte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens 1 h eingefroren, anschließend in die Gefriertrocknungsanlage gestellt und ü. N. vakuumgetrocknet.

2.7 Methoden zur Charakterisierung von Bakterien

2.7.1 Verwendete Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Bezeichnung und Herkunft der Organismen

Referenzorganismen für die Chinonbestimmung der Isolate	Referenz/ Herkunft	Hauptchinon
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Stammsammlung Institutsbereich für Mikrobiologie	UQ-8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090 ^T	Stammsammlung Institutsbereich für Mikrobiologie	UQ-9
<i>Aquamicrobium lusatiensis</i> S1	Stammsammlung Institutsbereich für Mikrobiologie	UQ-10
<i>Bacillus subtilis</i>	Stammsammlung Institutsbereich für Mikrobiologie	MK-7
Stamm für die Klonierung		
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue MRF [']	Stammsammlung Institutsbereich Mikrobiologie (Stratagene, Heidelberg)	
Referenzorganismen für FISH		Phyla
<i>Mycobacterium moriokaense</i> DFT601	Labor Hiraishi, University of Toyohashi; Japan	<i>Actinobacteria</i>
<i>Paenibacillus naphthalenovorans</i> TSY30	Labor Hiraishi, University of Toyohashi; Japan	<i>Firmicutes</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> TSY03	Labor Hiraishi, University of Toyohashi; Japan	α - <i>Proteobacteria</i>
<i>E. coli</i> IAM12119	Labor Hiraishi, University of Toyohashi; Japan	γ - <i>Proteobacteria</i>
<i>Achromobacter</i> sp. TSW30	Labor Hiraishi, University of Toyohashi; Japan	β - <i>Proteobacteria</i>
<i>Sphingobacteriaceae</i> sp. Stamm 28-4-3	diese Arbeit	<i>Bacteroidetes</i>

Die für FISH verwendeten Stämme wurden freundlicherweise von Prof. Akira Hiraishi (Toyohashi Universität, Japan) zur Verfügung gestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und deren Merkmale sind in Tabelle 5 aufgeführt. Bei dem Vektor handelte es sich um den pJET1.2/*blunt cloning vector* (Fermentas, St. Leon-Roth).

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Plasmide

Plasmid	Insert (16S rRNA Gen von)	Plasmid-Konzentration der Verdünnungsstufen (Kopienzahl/ml) ¹
p8-4-E12_42	<i>Bacillus</i> sp. Stamm 8-4-E12	$5,2 \times 10^x$
p8-4-7_28	<i>B. thermoamylovorans</i> Stamm 8-4-7	$3,8 \times 10^x$
p29-10-PAA_4	<i>G. pallidus</i> Stamm MS-X1 und 29-10-PAA	$7,8 \times 10^x$
pUt_17-1-2_7	<i>U. thermosphaericus</i> Stamm 17-1-2	$1,4 \times 10^x$
pPt_16-2-VM-2_4	<i>P. taiwanensis</i> Stamm 16-2-VM-2	$4,0 \times 10^x$

¹Die eingesetzten Verdünnungsstufen (x) waren 10^{11} , 10^9 und 10^7

2.7.2 Mikroskopische Untersuchungsmethoden

Die Kolonien ausgewählter isolierter Bakterien wurden makroskopisch (Kolonieform und -farbe) notiert und ihre mikroskopischen Zellmorphologien beschrieben. Mikroskopiert wurde am Axioskop Zeiss (Jena) mit Immersionsöl im Phasenkontrast bei 1000-facher Vergrößerung (Ph3 Plan Neofluar 100×/1,30 Oil und 10× Zählökular). Durch das Okular konnten mittels einer Kamera (AxioCam MRc, Zeiss, Jena) die Aufnahmen direkt dokumentiert werden.

2.7.2.1 Färbungen

Die Gramfärbung und Sporenfärbung wurde nach der Methode von Steinbüchel & Oppermann-Sanio (2003) durchgeführt.

2.7.2.2 Lebendzellzahlbestimmung

Die Bestimmung des Anteils der lebenden und toten Zellen wurde mit dem LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Poortgebouw, Niederlande) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die lyophilisierten Fluoreszenzfarbstoffe SYTO[®]9 und Propidiumjodid (PI) wurden jeweils in 2,5 ml ddH₂O aufgenommen und äquimolar gemischt. Die Konzentration von SYTO[®]9 entsprach 6 µM und von PI 30 µM. Unter dem geeigneten Filtersatz erschienen die lebenden Zellen durch SYTO[®]9 grün. PI konnte nur in membrangeschädigte, tote Zellen eindringen, diese Zellen erschienen mit dem Filtersatz rot (Tabelle 6). Das Gemisch wurde der Zellsuspension 1:1 zugesetzt und 2 min im Dunkeln

inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf einen mit 2 %-iger Agarose beschichteten und getrockneten Objektträger immobilisiert und im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Die Anzahl der toten (rot) und lebenden Zellen (grün) wurde bestimmt und das Verhältnis lebend zu tot konnte so prozentual berechnet werden.

2.7.2.3 Färbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) zur Gesamtzellzahlbestimmung

Zur mikroskopischen Gesamtzellzahlbestimmung wurden die Zellen mit DAPI (Roth, Karlsruhe) angefärbt (Tabelle 6). Die Stammlösung (100 µg/ml) wurde mit sterilen ddH₂O hergestellt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Für die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen der Zellen wurde mit einer Konzentration der Arbeitslösung von 5 µg/ml gearbeitet.

Tabelle 6: Fluoreszenzfarbstoffe und verwendete Filtersätze am Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzfarbstoff	DAPI ¹	SYTO ^{®9} ²	PI ²
Anregungsmaximum	358 nm	480 nm	490 nm
Emissionsmaximum	461 nm	500 nm	635 nm
Filtersatz	4879-01 ³	4879-09 ³	4879-15 ³
Anregungsfilter	BP 365/ 12 nm	BP 450/ 490 nm	BP 546/ 12 nm
Strahlenteiler	395 nm	FT 520 nm	FT 580 nm
Emissionsfilter (Sperrfilter)	LP 397 nm	LP 520 nm	LP 590 nm

¹Roth (Karlsruhe), ²Molecular Probes (Europe, Poortgebouw, Niederlande), ³Zeiss (Oberkochen)

Zur Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Entnahme von 1 ml Probe, deren Versetzung mit 1 Vol. DAPI-Lösung (Endkonzentration: 2,5 µg/ml) und die Inkubation bei RT für 5-10 min im Dunkeln. Dann wurde die Probe auf einen mit 2 %-iger Agarose beschichteten Objektträger immobilisiert, mit Immersionsöl bedeckt und am Fluoreszenzmikroskop (Plan-NEOFLUAR Immersions-Objektiv (100×/1,3 Öl) beobachtet. Der Mittelwert wurde aus mehreren ausgezählten Filterausschnitten gebildet und anschließend mit dem Mikroskopfaktor, dem spezifischen Verdünnungsfaktor der Probe und dem Verdünnungsfaktor 2 (Probe zu DAPI entsprach 1:1) multipliziert. Daraus ergab sich die Zellzahl pro ml.

2.7.3 Methoden zur Untersuchung physiologischer Eigenschaften

2.7.3.1 Temperaturtoleranz

Um den von Bakterien tolerierten Temperaturbereich zu bestimmen, wurde der jeweilige Bakterienstamm auf NAI (Kap. 2.4) ausgestrichen und bei Temperaturen von: 5, 10, 16, 20, 25, 30, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70 und 75 °C inkubiert. Das Wachstum wurde bei niedrigen Temperaturen über den Zeitraum von mehreren Tagen, bei Temperaturen über 45 °C in der Regel nach 24 h beobachtet. Um die Platte vor Austrocknung zu schützen, erfolgte das Abkleben aller Platten mit Parafilm. Da jedoch trotzdem ab 45 °C eine schnellere Austrocknung des Agars erfolgte, wurde statt Agar 0,8 % Gelrite® (Roth, Karlsruhe) zum NB-Medium (Kap. 2.4) zugegeben, welcher laut Hersteller auch bei hohen Temperaturen ein Austrocknen verhindern sollte.

2.7.3.2 Salztoleranz

Die Bestimmung des vom jeweiligen Bakterienstamm tolerierten Salzgehalts erfolgte mit NB (Kap. 2.4) mit einem definierten Zusatz einer NaCl-Konzentration von 1 % bis 10 % NaCl, wobei die im Medium vorhandene NaCl-Konzentration mit berücksichtigt wurde. Die untersuchten Bakterien wurden bei 37 °C inkubiert und das Wachstum über mehrere Tage beobachtet.

2.7.3.3 Nachweis extrazellulärer Enzyme

Zum Nachweis von extrazellulären Enzymen wurden die Isolate auf M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.* 1989) mit 1 % Aminosäurelösung 1 und 2, 1 % Thiamin/HCL, 0,1 % der Spurenelementlösung SLA (Hormann und Andreesen, 1989) und 1 % C-Quelle (aus Stammlösung) ausplattiert. Die Aminosäurelösungen wurden vor der Zugabe zum Medium steril filtriert. Statt Agar wurde auch hier 0,8 % Gelrite® (Roth, Karlsruhe) zum Medium gegeben.

Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für mesophile und bei 45 °C für thermophile Bakterien. Die Hydrolyse von Tributyrin und Milcheiweiß wurde anhand der Aufklärung des Mediums, die Stärkehydrolyse durch Überschichten mit Jod-Jodkalium beobachtet.

Im späteren Verlauf der Untersuchungen wurden die Organismen mittels Api®ZYM-Test (Biomeriëux, Nürtingen) untersucht. Der Api®ZYM-Test ist eine Mikromethode zum halbquantitativen Nachweis von Enzymaktivitäten. Der Versuch wurde entsprechend den

Herstellerangaben durchgeführt. Für mesophile Organismen wurden die Teststreifen bei 37 °C und für thermophile Organismen bei 45 °C für 24-48 h inkubiert.

Tabelle 7: Zusätze zum M9-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Aminosäurelösung 1 (4 mg/ml) gelöst in ddH ₂ O	Aminosäurelösung 2 (4 mg/ml) gelöst in ddH ₂ O und mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt	C-Quelle
Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Prolin, Serin, Threonin, Valin	Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin	Stärke, Tributyrin, Xylan, Xylose, Glukose, Milchpulver, Saccharose

2.7.3.4 Untersuchung des Substratverwertungsspektrums

Der Api[®]20 NE-Test wurde zur Ermittlung von Eigenschaften in Bezug auf das Substratverwertungsspektrum verwendet.

Die Inkubation der Tests erfolgte bei 37 °C für mesophile Mikroorganismen und bei 45 °C für thermophile Mikroorganismen in einer befeuchteten Inkubationswanne für 24 bis 48 h. Die Behandlung mit Nachweisreagenzien und die Auswertung wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.7.3.5 Säurebildung

Für die Untersuchung zur Säurebildung wurden pro C-Quelle drei Röhrchen mit 10 ml Medium (1 % Pepton aus Casein (Roth), 0,6 % Hefeextrakt (Roth), 1 % NaCl (Roth), 0,005 % Phenolrot, pH 7,3) und 2 %-iger C-Quelle befüllt. Die C-Quellen wurden aus 40 %-igen, autoklavierten Stammlösungen steril zum Medium zugegeben. Es wurde jeweils 2 % (w/v) von Saccharose, L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Mannit, Glukose, Galaktose, Mannose oder Xylose dem Medium steril zugesetzt. Die Röhrchen wurden dann mit einer definierten Menge an Zellen angeimpft und bei 37 °C für 96 h inkubiert. Wachstum und Säurebildung wurden immer nach 24 h mittels OD₆₀₀ bestimmt und dokumentiert.

2.7.3.6 Wachstumsverhalten von Isolaten in Kompostextrakt-Medium

Zur Anzucht der Zellen diente NB_{OG}. Die Zellen wurden mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung 2× gewaschen und anschließend in KE-Medium (Kap. 2.4.1.1, ohne Agar) aufgenommen. Dann wurde das in Schüttelkolben vorbereitete KE-Medium mit den in KE-Medium aufgenommenen Zellen (1 ml) beimpft. Die Durchführung erfolgte als Doppelbestimmung. Als Negativkontrolle wurde unbeimpftes KE-Medium verwendet. Der Wachstumsversuch erfolgte schüttelnd bei 150 rpm und wurde über fünf Tage bei einer Inkubationstemperatur von 50 °C verfolgt. Da das Medium sehr dunkel war, erfolgte die Verfolgung des Wachstums mikroskopisch mittels DAPI-Färbung (Kap. 2.7.2.3, Tabelle 6).

2.7.4 Bestimmung des G+C Verhältnis der DNA und des Chinonsystems von Kompostisolaten

Die Anzucht der Zellen erfolgte mit NB (Kap. 2.4) bis zum Ende der logarithmischen Phase. Für die Bestimmung des G+C-Gehalts der DNA und für die Chinonanalyse wurde jeweils 350-500 mg lyophilisierte Biomasse eingesetzt. Die DNA-Extraktion, der Verdau zu den Nucleosiden und deren Quantifizierung durch HPLC erfolgten nach Lechner *et al.* (1995) und Tamaoka & Komagata (1984). Die Extraktion der Chinone sowie ihre Trennung und Analyse durch HPLC erfolgte im Vergleich zu aus Referenzstämmen (Tabelle 4) isolierten Chinonen nach Lechner *et al.* (1995).

2.8 Molekularbiologische Analysen

2.8.1 DNA-Extraktion

2.8.1.1 DNA-Extraktion aus Kompost

Für die DNA-Extraktion aus Kompostproben wurde der „PowerSoil™ DNA Isolation Kit“ (MO BIO Laboratories, Carlsbad) für alle Extraktionsexperimente genutzt. Die Durchführung entsprach dem Protokoll des Herstellers. Es wurde 0,25 g gefrorenes Kompostmaterial eingesetzt und mit 100 µl ddH₂O eluiert.

2.8.1.2 DNA-Extraktion aus Zellen

Für die Zellextraktion wurde der Kugelmühlenaufschluss angewendet. Die Extraktion erfolgte wie bei Kuske *et al.* (1998) beschrieben. Nach dem Zellaufschluss mit der Kugelmühle

(Schwingmühle MM2, Retsch, Haan) wurde die DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Zur Fällung der DNA wurden 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol. eiskalter Ethanol (99,8 %) verwendet und das Pellet mit 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen. Nach der Abnahme des letzten Überstandes wurde das Pellet für 10 min vakuumgetrocknet (SpeedVac SVC 100, Savant, Minnesota, USA) und anschließend in 50 µl ddH₂O aufgenommen. Die gereinigten DNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -21 °C gelagert.

2.8.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Absorptionsspektrometrie

Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten DNA aus Kompost oder von Zellen (Kap. 2.8.1) erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer (Nanodrop™ 1000, Thermo Scientific, Schwerte). Die Nukleinsäurenkonzentration errechnete sich aus der Extinktion bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor der gemessenen Probe und einem für DNA spezifischen Extinktionskoeffizienten. Die Absorption von $OD_{260} = 1,0$ entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA (dsDNA). Für diese Analyse wurde als Leerwert ddH₂O mitgeführt. Außerdem konnte eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurelösung getroffen werden, indem das Verhältnis A_{260} zu A_{280} bestimmt wurde. Bei einem Quotienten kleiner 1,7 war die Probe mit Proteinen kontaminiert, bei einem Wert zwischen 1,7 und 2,0 war von einer geringen Verunreinigung auszugehen.

2.8.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert.

2.8.3.1 Standard-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden im Primus 25 advanced Thermocycler und im Primus 96 advanced Thermocycler (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) durchgeführt. Für die Ansätze wurden dünnwandige, wärmeleitende 0,2 ml-Reaktionsgefäße verwendet. Die Zusammensetzung des 50 µl-Reaktionsansatzes für die jeweils verwendeten DNA-Polymerasen ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Es wurde immer eine Negativkontrolle (ddH₂O an Stelle des *templates*) mitgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Amplifikation der 16S rRNA-Gene für

die t-RFLP wurde mit dem 6-FAM-markierten *forward* Primer fD1 und dem *reverse* Primer Eub534r durchgeführt.

Tabelle 8: Reaktionsansätze für eine Standard-PCR

Komponenten	DNA-Polymerasen		
	<i>Taq</i> ¹	<i>Go-Taq-Flexi</i> ²	<i>Velocity</i> ^{TM 3}
PCR-Puffer	1×	1×	1×
MgCl ₂ (25 mM)	0 mM	1,8 mM	3,6 mM
<i>forward</i> -Primer (7µM)	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
<i>reverse</i> -Primer (7µM)	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM
dNTPs (2,5 mM)	125 µM	125 µM	250 µM
DNA-Polymerase (5U/ µl)	1 U	1 U	0,2 -2 U
<i>template</i>	1 µl	1 µl	1 µl
ddH ₂ O	ad. 50 µl	ad. 50 µl	ad. 50 µl

¹MLU Halle-Wittenberg Institut für Biologie/Mikrobiologie, rekombinant; ²Promega (Mannheim), ³Bioline (Luckenwalde)

Tabelle 9: Verwendete Primer für die PCRs

Primer	Sequenz (5' → 3')	<i>E-coli</i> Position ¹
fD1 ^{2,3}	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8-27
rP2 ³	ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT	1503-1492
Eub534r ⁴	ATT ACC GCG GCT GCT GG	518-534
796r ⁴	GGG TTG CGC TCG TTG	781-796

¹Position im *E. coli* 16S rRNA-Gen, ²dieser Primer wurde 6-FAM-markiert in der t-RFLP-Analyse eingesetzt

³Weisburg *et al.* (1991), ⁴Muyzer *et al.* (1993)

Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 10 dargestellt. Die *Annealing*-Temperatur der Primer errechnete sich nach Gleichung 2. Unterschieden sich die *Annealing*-Temperaturen der verwendeten Primer, so wurde die niedrigere Temperatur gewählt. Ausgehend von dem berechneten Wert, wurde die *Annealing*-Temperatur schrittweise erhöht, um eine höhere Spezifität der PCR-Reaktion zu erreichen.

Gleichung 2: $T_{\text{Annealing}} = [2 \times (\text{Anzahl A} + \text{T}) + 4 \times (\text{Anzahl G} + \text{C})] - 5 [^{\circ}\text{C}]$

Für die Klonierung in den pJET1.2/*blunt cloning vector* (Fermentas, St. Leon-Roth) wurden die 16S rRNA-Gene mit der *Taq*, *Go-Taq-Flexi* (Promega) oder der *Velocity*TM-DNA-Polymerase (mit einer *Proof-reading*-Eigenschaft) mit verschiedenen Primerkombinationen amplifiziert (Tabelle 8):

- Isolate: fD1/rp2 mit *Annealing*-Temperatur von 57 °C
- Kompost-DNA: fD1/534r mit *Annealing*-Temperatur von 54 °C

Tabelle 10: Temperaturprogramm der Standard-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95-96 °C	2 min
1. Denaturierung	94 °C	0,5 min
2. Annealing	50-58 °C	0,5 min
3. Elongation	72 °C	1,5 min
1.-3. 35 Zyklen		
Finale Elongation	72 °C	10 min
Ende	4-8 °C	max. ü.N.

2.8.3.2 Kolonie-PCR

Nach der Ligation von PCR-amplifizierten Fragmenten der 16S rRNA-Gene in den pJET1.2/*blunt cloning vector* und anschließende Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ (siehe auch Kap. 2.8.6), erfolgte eine Überprüfung des Plasmid-Inserts mit dem Vektor-spezifischen Primerpaar P_{JET} fw und P_{JET} rev (Tabelle 11). Dafür wurden die ausgewählten Klone in 50 µl ddH₂O resuspendiert und für 10 min bei 95 °C im Thermoblock aufgeschlossen. Die Amplifikation erfolgte mit der *Taq*-Polymerase (Tabelle 8) bei einer *Annealing*-Temperatur von 50 °C.

Tabelle 11: Primer für die Kolonie-PCR

Primer	Sequenz (5' → 3')	Referenz
P_{JET} fw	GGA TGG CTC GAG TTT TTC	diese Arbeit
P_{JET} rev	GAA TAT TGT AGG AGA TCT TC	diese Arbeit

2.8.3.3 Quantitative Real-Time-PCR (q-PCR)

Durch diese Methode wurde die Anzahl spezifischer 16S rRNA-Gene im Kompostmaterial bestimmt. Zur Amplifikation wurden für ausgewählte Kompostisolate sequenzspezifische, mit dem Programm „Arb“ (Ludwig *et al.*, 2004) abgeleitete Primer (5 µM) eingesetzt. Die erwarteten PCR-Produkte besaßen eine Größe von 100-300 bp. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Die q-PCR wurde im Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research, Quiagen, Berlin) durchgeführt.

Tabelle 12: Sequenz und Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten, gegen 16S rRNA-Gene gerichteten q-PCR-Primer

Primer ^{1,2}	Sequenz (5' → 3')	Zielorganismus (<i>E. coli</i> -Position) ²	Größe des PCR- Produktes
Eub341f	CCT ACG GGA GGC AGC AG	<i>Bacteria</i> (341-534)	169 bp
Eub534r	ATT ACC GCG GCT GCT GG		
Pseu_843f	TTGGGACTCAGTATCGAAGC	16-2-VM-2 (843-992)	150 bp
Pseu_992r	GGCAGTTCCGCGGATGTC		
Urei_78f	AAGCCTAGCTTTCATGAGG	17-1-2 (78-183)	139 bp
Urei_183r	ACATCAAAGCATGCACTTTG		
E12_989f³	TCT TGA CAT CCT TTT GCT CTC	8-4-E12 (989-1007/ 1256-1275)	289 bp
E12_1256r³	TTA ACC TCG CGG TTT TGC AG		
Gp_68 f³	GGA CCG AAG GGA GCT TG	MS-X1 und 29-10-PAA (68-86/199-218)	131 bp
Gp_199 r³	CGC CTT TCA ACC GAA AAC C		
Bta_995 f³	ATC TCC TGA CCG CCC TGG AG	8-4-7 (995-1111)	116 bp
Bta_1111r³	GGC AAC TAG AAC CAA GGG		

¹Die Primer wurden von Metabion (Martinsried) bezogen. ²Die spezifischen Oligonukleotidsequenzen wurden mit der Software Arb (Ludwig *et al.*, 2004) abgeleitet. ³Schmidt (2009)

Es wurde der „QuantiTectTMSYBR[®]Green PCR Kit“ (Quiagen, Berlin) nach Herstellerangaben angewendet. Als *template* wurde die mit dem PowerSoilTM DNA Isolation Kit (2.8.1.1) aus den Kompostproben isolierte DNA bzw. im Fall des externen Standards die Plasmid-DNA der Klone verwendet. Es wurde je Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Für die Quantifizierung der Kompostproben wurden drei Verdünnungsstufen des jeweiligen Plasmids (Tabelle 5) als externer Standard eingesetzt. Außerdem wurden bei jeder q-PCR zwei Negativkontrollen (ddH₂O statt *template*) mitgeführt. Das PCR-Programm ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Temperaturprogramm für die q-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung der <i>HotStarTaq</i> Polymerase	95 °C	15 min
42-44 Zyklen		
Denaturierung	94 °C	15 sec
<i>Annealing</i> ¹	57-60 °C	15 sec
Elongation und Fluoreszenzmessung	72 °C	15 sec

¹Je nach Primerpaar bestimmt nach Gleichung 2

2.8.3.4 Absolute Quantifizierung über den externen Standard

Plasmide, die als Insert die 16S rRNA Gene der ausgewählten Kompostisolate trugen, wurden als Standard für die Quantifizierung verwendet. Diese wurden mit den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Primern fD1 und rP2 amplifiziert (Tabelle 9). Die PCR-Produkte wurden mittels „GE Healthcare Reinigungskit (GE Healthcare, Wesslingen)“ nach Herstellerangaben gereinigt und mit 50 µl ddH₂O eluiert. Nach Messung der DNA-Konzentration (Kap. 2.8.2) wurde eine geeignete Menge Produkt nach Herstellerangaben in den pJET1.2/*blunt cloning vector* ligiert und in *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ transformiert. Die Plasmide wurden dann wie in Kap. 2.8.7.1 beschrieben isoliert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration der isolierten Plasmide bestimmt (Kap. 2.8.2) und die Kopienzahl aus der molekularen Masse aller Nukleotide des doppelsträngigen Plasmids, der Molarität bei einer gegebenen Konzentration und unter Nutzung der Avogadro-Konstante berechnet. Die eingesetzten Plasmide sind in Tabelle 14 ersichtlich.

Tabelle 14: Als Standard für die q-PCR verwendete Plasmide

Plasmid	Herkunft des klonierten 16S rRNA-Gens
p8-4-E12_42	<i>Bacillus</i> sp. 8-4-E12 ¹
p8-4-7_28	<i>B. thermoamylovorans</i> Stamm 8-4-7 ¹
p29-10-PAA_4	<i>G. pallidus</i> Stamm 29-10-PAA ¹
p16-2-VM-2_4	<i>P. taiwanensis</i> Stamm 16-2-VM-2
p17-1-2_1	<i>U. thermosphaericus</i> Stamm 17-1-2

¹Schmidt (2009)

Für die Standardkurven wurde jeweils 1 µl verschiedener Verdünnungsstufen (10^1 - 10^{12}) der Plasmide in die q-PCR eingesetzt. Mindestens drei Verdünnungsstufen des externen Standards wurden bei jeder q-PCR mitgeführt, um die eingesetzte genomische DNA quantifizieren zu können (Tabelle 5).

Für jeden q-PCR-Lauf wurde die Qualität der Amplifikate durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. So war ersichtlich, ob das spezifische Produkt gebildet wurde und ob unspezifische Produkte oder Primerdimere auftraten.

2.8.4 Agarosegelelektrophorese

Nach jeder PCR wurden die Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (Biozym, Heidelberg) überprüft. Vor dem Auftragen auf die Agarosegele wurden die Proben mit 1/5 Volumen des

sechsfach konzentrierten Blue/Orange Loading Dyes (Promega, Mannheim) versetzt. Für die Überprüfung von PCR-Produkten wurden 1 %-ige Agarose-Gele verwendet. Die Gele wurden mit $0,5 \times$ TAE-Puffer (20 mM Tris-Acetat, pH 8, 0,5 mM EDTA) hergestellt. Dieser Puffer diente anschließend auch als Laufpuffer. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-100 V und RT für 0,5-1 h. Anschließend wurden die Gele in einem Ethidiumbromid-Bad (500 ml ddH₂O, 50 µl Ethidiumbromid) gefärbt.

Für Restriktionsanalysen (ARDRA, Kap. 2.8.7) wurden 3,5 %-igen Gele genutzt. Diese Gele wurden mit $1 \times$ TBE-Puffer (89 mM TRIS-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA-Na₂, pH 8) hergestellt, welcher auch als Laufpuffer diente. Anstatt von Ethidiumbromid wurde GelRed™ (Biotrend, Köln) zur Visualisierung der DNA nach Herstellerangaben zugesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V, 4 °C für 2 h.

Die DNA-Fragmente der Agarosegele wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht (Gelimager, INTASR, Göttingen). Um Fragmentgrößen und DNA-Mengen abschätzen zu können, wurde der p-GEM® DNA Marker (Promega, Mannheim) auf das Gel aufgetragen.

p-GEM® DNA Marker (bp; Promega, Mannheim):

2645, 1605, 1198, 676, 517, 460, 396, 350, 222, 179, 126, 75, 65, 51

2.8.5 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem GE Healthcare Reinigungskit (GE Healthcare, Wesslingen) entsprechend den Herstellerangaben. Zur Elution wurde 50 µl ddH₂O verwendet.

2.8.6 Klonierung von PCR-Produkten

2.8.6.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

Eine Hauptkultur mit LB-Medium (siehe Kap. 2.4.2) wurde 1 %-ig mit *E. coli* XL1-Blue MRF⁻-Zellen angeimpft. Die Kultur wurde für 3 h bei 37 °C auf dem Schüttler angezogen. Anschließend wurden die Zellen steril in 50 ml-Reaktionsgefäße abgefüllt und 10 min auf Eis gelagert. Die Zellen wurden dann 10 min bei $3661 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt ($3661 \times g$, 10 min, 4 °C) wurde das Pellet in 2 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und auf Eis gelagert. Die 2 ml-Zellsuspension wurden mit einem Vol. sterilen Glycerin (50 %, v/v) gemischt und in vorgekühlten Reaktionsgefäßen á 100 µl

aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die CaCl₂-kompetenten Zellen wurden dann für die Transformation verwendet.

2.8.6.2 Ligation in den pJET-Vektor

Für die Klonierung der 16S rRNA-Gen-Amplifikate wurde der „GeneJET™ PCR Cloning Kit“ (Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Die gereinigten PCR-Produkte (Kap. 2.8.5) wurden zur Kontrolle in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.8.4) und anschließend die Konzentration photometrisch bestimmt (Kap. 2.8.2). Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die optimale Ligation wurde mit einem Insert/Vektor-Verhältnis von 3:1 erreicht. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte bei RT für 30 min. Der Ligationsansatz wurde direkt für die Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF⁻-Zellen eingesetzt.

2.8.6.3 Transformation in *E. coli*-Zellen

Der gesamte Ligationsansatz wurde den gefrorenen CaCl₂-kompetenten *E. coli* XL1-Blue MRF⁻-Zellen (100 µl) zugegeben, durch Rühren mit der Pipettenspitze gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C wurden die Zellen für 2 min auf Eis belassen. Abschließend wurden dem Gemisch 800 µl NB (Kap. 2.4) zugefügt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz (50, 100, 200 µl) auf selektiven Agarplatten (LB+Amp, Kap. 2.4.2) ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C kultiviert. Das Klonierungsergebnis wurde durch eine Kolonie-PCR kontrolliert (Kap. 2.8.3.2).

2.8.7 Restriktionsanalyse amplifizierter ribosomaler DNA (ARDRA)

Nach Ligation der 16S rRNA in den pJET1.2/*blunt cloning vector* (Fermentas, St. Leon-Roth), Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF⁻-Zellen und Reamplifikation der Inserts mittels Kolonie-PCR mit vektorspezifischen Primern, wurden die PCR-Produkte (200 ng/µl) über Nacht bei 37 °C mit einer Kombination von zwei Enzymen (Fermentas, St. Leon-Roth) MspI (5'-CCGG-3')/RsaI (5'-GTAC-3') und bei ungeschnittenen Produkten nochmal mit AluI (5'-AGCT-3')/BsuRI (5'-GGCC-3') verdaut. Es handelte sich dabei um Enzyme mit einer Vier-Basen-Erkennungssequenz. Der verwendete Ansatz für ARDRA ist in Tabelle 15 ersichtlich. Es wurde Y⁺/Tango^T –Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Die Auftrennung

der verdauten Fragmente und die anschließende Visualisierung erfolgten mit 3,5 %-igen Agarosegelen wie in Kap. 2.8.4 beschrieben.

Tabelle 15: Restriktionsansatz für ARDRA

Komponente	Endkonzentration im Ansatz
Enzym1(10U) ¹	0,6 U
Enzym2(10U) ¹	0,6 U
Puffer (10×) ¹	0,2-fach
PCR-Produkt	max. 15 µl
ddH ₂ O	ad. 18 µl

¹MBI Fermentas (St. Leon-Roth)

2.8.8 Isolierung von Plasmiden

Die ausgewählten Klone wurden in je 5 ml LB-Medium (Kap. 2.4.2) mit 125 µg/ml Amp^u. N. schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 5 min bei 11752 × g, RT (Mikroliterzentrifuge Z 160 M, Hermle Labortechnik, Wehingen) zentrifugiert und entsprechend den Herstellerangaben mit dem „High Yield™ Plasmid Isolation Kit“ (Süd-Laborbedarf, Gauting) isoliert und gereinigt. Anschließend wurde die Konzentration spektrometrisch bei 260 nm vermessen und für die Sequenzierung (Kap. 2.8.9) vorbereitet.

2.8.9 Sequenzierung

Die gereinigten PCR-Produkte oder Plasmid-DNA wurden abhängig von ihrer Konzentration in eine Sequenzierreaktion eingesetzt. Der Sequenzieransatz (7 µl) enthielt gereinigtes PCR-Produkt (Kap. 2.8.5) oder gereinigtes Plasmid (Kap. 2.8.8) mit einem 20 µM Primer (Tabelle 9). Die Sequenzierung erfolgte durch die SeqLab GmbH (Göttingen) und wurde anschließend mit dem Programm Finch TV (<http://www.geospiza.com>) ausgewertet. Sequenzvergleiche erfolgten mit Einträgen in der „Ribosomal Database Project“ (RDP) Datenbank (<http://rdp.cme.msu.edu>, Cole *et al.*, 2009). 16S rRNA-Teilsequenzen aus verschiedenen Sequenzierreaktionen wurden mit dem Programm „DNASIS“ miteinander verknüpft. Der Sequenzvergleich der 16S rRNA-Gene erfolgte mit dem Online-Programm „ClustalW“ (Thompson *et al.*, 1994) über das „European Bioinformatics Institute“ (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>). Für den theoretischen Verdau von

DNA-Sequenzen kam das Programm „Clone“ (Version 4.0, Scientific & Educational Software, Durham/NC, USA) zur Anwendung.

2.8.10 Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (t-RFLP)

In einer Standard-PCR (Kap. 2.8.3.1) wurden die 16S rRNA-Gene aus Gesamt-DNA von Isolaten oder Kompostproben bzw. aus Klonen oder Plasmiden mit 16S rRNA-Gen-Inserts mit den Primern fD1-6-FAM und Eub534r amplifiziert (Tabelle 9). Nach der Reinigung mit dem Reinigungskit (Kap. 2.8.5) und der Konzentrationsbestimmung der PCR-Amplifikate (Kap. 2.8.2), wurden die 6-FAM markierten Produkte aliquotiert und die Aliquots einzeln durch Restriktionsendonukleasen verdaut. Es wurden 2 ng/μl (nach Amplifikation aus Klonen oder Reinkulturen) bzw. 20 ng/μl (aus Kompostproben) gereinigtes PCR-Produkt eingesetzt. Als Restriktionsenzyme (Fermentas) wurden MspI, RsaI, AluI (mit Y⁺/Tango^T-Puffer) und BsuRI (mit Q⁺-Puffer) ausgewählt. Der Restriktionsverdau wurde nach dem in Tabelle 16 beschriebenen Ansatz durchgeführt. Der Verdau erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 μl mit je einem Restriktionsenzym für 6 h bei 37 °C.

Tabelle 16: Restriktionsansatz für die t-RFLP

Detergenz	Konzentration im Ansatz
Restriktionsenzym	1 U/μl
Restriktionspuffer (10×)	1×
<i>template</i> ¹	2–20 ng
ddH ₂ O	ad. 10 μl

¹2 ng bei Plasmid oder Reinkultur, 20 ng bei Kompostproben

Nach dem Verdau wurden die Proben mittels Ethanolfällung präzipitiert. Dafür wurde im ersten Schritt, nach Zugabe von 1,5 μl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 60 μl 99,8 %-igem eiskalten Ethanol, die DNA bei -20 °C für 60 min gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (13684 × g, RT, 20 min) wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 500 μl 70 %-igem Ethanol gewaschen (13684 × g, RT, 15 min). Danach erfolgte die Trocknung der Proben in der SpeedVac SVC 100 für 15 min.

2.8.10.1 Analyse der terminalen Restriktionsfragmente

Die getrockneten Proben wurden bei der SeqLab GmbH (Göttingen) analysiert. Die Analyse der 6-FAM markierten terminalen Restriktionsfragmente (t-RFs) erfolgte mit dem 3730

Kapillar-Sequenzierer (PE Applied Biosystem, Göttingen). Die Injektionszeit wurde optimiert und erfolgte mit 10 s bei 2000 V. Die erhaltenen Daten wurden mit der GeneMapper[®] 3.7 Software (Applied Biosystem, Carlsbad, USA) ausgewertet. Die Auswertung der t-RFLP-Daten erfolgte in einem Längenbereich von 50 bis 500 bp. Die Größe der t-RFs wurde durch Vergleiche mit dem internen Standard ROX-Gene-Scan 500 (PE Applied Biosystems, Darmstadt) ermittelt. Die relative Häufigkeit ausgewählter t-RFs wurde durch Berechnung des prozentualen Anteils ihrer Fläche an der gesamten Fläche aller Peaks ermittelt.

2.9 Untersuchungen von Kompostproben mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und Chinonanalyse

2.9.1 FISH

Die FISH-Untersuchungen wurden an der Toyohashi Universität, Japan, im Department für Environmental und Life Science durchgeführt.

2.9.1.1 Verwendete Oligonukleotidsonden für FISH

Für die Entwicklung und Auswahl der Sondensequenz wurde die *Probase*-Software (<http://www.microbial-ecology.net/probase/default.asp>) von Loy *et al.* (2007) verwendet. Die für FISH ausgewählten Oligonukleotidsonden wurden von der Firma Invitrogen (Tokyo, Japan) synthetisiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Für die universelle Bakterien EUB-Sonde wurde ein Mix aus EUB1, EUB2 und EUB3 (1:1:1) angewendet. Diese Sonden waren mit Alexa-5, alle weiter angegebenen Sonden mit dem Farbstoff Cy-3 jeweils am 5'-Ende markiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungssonden sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Oligonukleotidsonden für FISH

FISH-Sonde	Sequenz (5'→3')	Formamid-konzentration ⁸ (%)	Referenz	<i>E. coli</i> -Position
¹ EUB1	GCTGCCTCCCGTAGG AGT	10	Amann <i>et al.</i> (1990)	338–355
¹ EUB2	GCAGCCACCCGTAGGTGT	10	Daims <i>et al.</i> (1999)	338–355
¹ EUB3	GCTGCCACCCGTAGG TGT	10	Daims <i>et al.</i> (1999)	338–355
² CFB319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	35	Manz <i>et al.</i> (1996)	319–336
³ Spingo398	CGACGTTTGTTCCTAT	15	diese Arbeit	398–416

Fortsetzung Tabelle 17

FISH-Sonde	Sequenz (5'→3')	Formamid-konzentration ⁸ (%)	Referenz	<i>E. coli</i> -Position
⁴ LGC0	GGAAGATTCCCTACTGCTG	20	Hallberg <i>et al.</i> (2006)	355–373
⁵ HGC236	AACAAGCTGATAGGCCGC	30	Erhart <i>et al.</i> (1997)	236–253
⁶ GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	35	Manz <i>et al.</i> (1996)	1027– 1044
⁷ GAM42a_c	GCCTTCCCCTTCGTTT	35	Manz <i>et al.</i> (1996)	1027– 1044

¹Sonde für Gesamtbakterienzahl, ²Sonde für *Bacteroidetes*, ³Sonde für *Sphingobacteria* Stamm 28-4-3, ⁴Sonde für *Firmicutes*, ⁵Sonde für *Actinobacteria*, ⁶Sonde für γ -*Proteobacteria*, ⁷Sonde für γ -*Proteobacteria* competitor, ⁸Formamidkonzentration für eine Hybridisierungstemperatur bei 46 °C

2.9.1.2 Zellfixierung

Für die Paraformaldehyd-Lösung wurden 65 ml ddH₂O auf 60 °C erwärmt und 4 g Paraformaldehyd (PFA) zugegeben. Anschließend wurde tropfenweise 1 N NaOH-Lösung zugesetzt, bis das PFA gelöst war. Nach Zugabe von 33 ml 3× PBS-Lösung (30 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄, 390 mM NaCl, pH 7,2) wurde der pH-Wert mittels konzentrierter HCl-Lösung auf 7,2 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,2 µm Filter filtriert und die Lösung dann im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Es wurde 1 g Kompostprobe und 9 ml 1× PBS-Puffer für 60 s mit einem Ultraschallstab behandelt (20 kHz; 50 W) und anschließend zentrifugiert (10 min, 8000 rpm). Das Pellet wurde dann mit 3 Vol. frisch hergestellter, gekühlter 4 % (w/v) Paraformaldehyd-Lösung versetzt. Die Fixierung erfolgte für jeweils 3 h bei 4 °C. Die Proben wurden dann bei 10 min, 8000 rpm, 4 °C zentrifugiert, das Pellet mit 1× PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in 0,5 Vol 1× PBS/0,5 Vol. eiskaltem 99,9 %-igen Ethanol bei -20 °C gelagert.

2.9.1.3 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde auf speziellen Objektträgern (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Zur besseren Fixierung wurde 1 %-ige low melting point Agarose (Invitrogen, Tokyo, Japan) verwendet. Diese wurde erwärmt und zum vorgewärmten Probenansatz (auf 60 °C) gegeben (Tabelle 18). Anschließend wurde der Ansatz für weitere 10 min bei 60 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils 8 µl Probenansatz in die Aussparungen gegeben und anschließend an der Luft getrocknet. Danach wurden die Objektträger zur Dehydratisierung

und Nachfixierung der Zellen für jeweils 3 min in 50 %-, 80 %- und 99,9 %-igen (v/v) Ethanol getaucht (Ethanolreihe) und anschließend luftgetrocknet.

Tabelle 18: Probenansatz (vorgewärmt auf 60 °C)

	Volumen [μ l]
fixierte Probe (Kap. 2.9.1.2)	4
0,01 % SDS	0,8
1× PBS	2,4

Nach dem Trocknen der Objektträger wurden zur Hybridisierung auf jedes Feld 15 μ l des auf 46 °C vorgewärmten Hybridisierungspuffers (5 M NaCl, 1 M Tris/HCl, pH 8,0, 10 % (w/v) SDS, x % Formamid, Tabelle 17) mit jeweils 50 ng/ μ l fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidsonde (Tabelle 17) versetzt. Anschließend wurden die Objektträger horizontal in vortemperierten Gefäßen, welche mit Hybridisierungspuffer befeuchtetem Zellstoff (1-3 ml) ausgelegt wurden, gegeben und je 3 Stunden oder über Nacht bei 46 °C inkubiert.

2.9.1.4 Waschschritte und Detektion der fluoreszenzmarkierten Zellen

Nicht gebundene Sondenmoleküle wurden durch anschließende Waschschritte entfernt. Anschließend wurden die Objektträger in ein Probengefäß mit 50 ml vorgewärmtem Waschpuffer (5 M NaCl, 1 M Tris/HCl, pH 8,0, 10 % (w/v) SDS, x % Formamid, Tabelle 17, 0,5 M EDTA) überführt und für 20 min waagrecht liegend bei 48 °C inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend aus dem Waschpuffer entnommen, mit ddH₂O gespült und anschließend im Dunkeln luftgetrocknet. Die Präparate wurden dann mit ProLong[®] Gold-Antifade-Reagenz (Invitrogen, Tokyo, Japan) welche DAPI enthielt, eingebettet. Um ein Ausbleichen zu verhindern, erfolgte die Lagerung bis zum Mikroskopieren im Dunkeln.

Die Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX-50 und einer Flovel FD-120 M digital CCD Camera (Flovel, Tokyo, Japan) dokumentiert. Während des Mikroskopierens wurde folgende Filterkombination gewählt: Filtereinsatz 4879-15, Anregungsfilter BP 546/12 nm, Sperrfilter FT 580 nm und Emissionsfilter LP 590 nm. Für DAPI ist die Filterkombination in Tabelle 6 ersichtlich.

2.9.2 Chinonanalyse von Kompostproben

Die Extraktion und Bestimmung der Chinone mittels HPLC (Shimadzu, Japan) erfolgten nach einer bereits beschriebenen Methode von Hiraishi *et al.* (1996, 2000) in einer modifizierten Form.

Es wurden 2 g Kompost in 35 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,8) mit 1 mM Kalium-Ferricyanidlösung bei $12000 \times g$ für 5 min gewaschen. Anschließend wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit 10 ml desselben Puffers versetzt und die Probe mit einem Ultraschallstab 90 s, 50 W aufgeschlossen. Der Stab wurde mit 25 ml Chloroform-Methanol (2:1 v/v) gewaschen und die Lösung zur aufgeschlossenen Probe gegeben. Anschließend wurde diese für 5 min geschüttelt und bei RT für 10 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der verbleibende Rest über einen Faltenfilter (Toyo Roshi Kaisha Ltd, Japan) in einen Rundkolben filtriert. Anschließend wurde 1×20 ml Aceton zum Pellet gegeben, per Hand 5 min geschüttelt und anschließend wieder filtriert. Nach dreifacher Wiederholung mit 20 ml Chloroform-Methanol (2:1, v/v) wurden die vereinigten Aceton-Chloroform-Methanol-Extrakte mit Hilfe eines Wasserbades bei einer Temperatur von 37 °C (Eyela Digital Wasserbath SBG51, Japan) mit einem Rotationsverdampfer (Eyela N-N Series, Japan) unter Vakuum so lange eingedampft, dass nur noch wenige ml im Rundkolben vorhanden waren. Dann erfolgte die Extraktion mit 1 ml Aceton und 10 ml *n*-Hexan und die Extrakte wurden in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Mit ddH₂O wurde auf 45 ml aufgefüllt, anschließend für 5 min geschüttelt und dann bei 8000 rpm für 10 min, RT zentrifugiert.

Die obere Hexan-Phase wurde abgenommen und in einen neuen Rundkolben überführt. Dies wurde 3× wiederholt. Dabei wurden die oberen Phasen jeweils vereinigt und mittels Rotationsverdampfer eingeeengt. Der konzentrierte Extrakt wurde mit 2 ml Hexan aufgenommen und über eine mit Hexan voräquilibrierte Sep-Pak Plus Silica Säule (Waters Corporation Milford, Massachusetts, USA) gegeben.

Mittels Mikrofeder (einer Pumpe mit der Elutionspuffer durch einen Schlauch in einem definierten Intervall auf die Säule gegeben wurde (Furue Science Co Ltd, Japan)), wurden für 90 s die Menachinon (MK)-Fraktionen mit *n*-Hexan–Diethylether (98:2, v/v) und die Ubichinon (UQ)-Fraktionen mit *n*-Hexan–Diethylether (90:10, v/v) eluiert. Die Extrakte wurden dann bis zur vollständigen Trocknung eingeeengt. Die so eingeeengten Chinone wurden 3× mit 1 ml Aceton über einen Rundfilter gegeben, gelöst in Analysefläschchen überführt und bei -20 °C bis zur HPLC Analyse aufbewahrt.

- Säule: Agilent ZORBAX ODS 5µm [4,6 × 250mm]

- Detektor: Photodiodenarraydetektor SPD-M6A (Shimadzu, Japan)
- Auswertungs- und Steuersoftware: Class M10-A, Version 1.64 (Shimadzu, Japan)

Vor der Analyse mit der HPLC wurden die in Aceton gelösten Proben bis zur Trocknung eingeeengt und anschließend in 100 µl Aceton gelöst, wovon 20 µl Probe für die Analyse mit der HPLC eingesetzt wurden. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Als Laufmittel wurde mit Methanol/Diisopropylether (9:2 v/v) bei 30 °C aufgetrennt. Um die relative Konzentration der Chinone (mol-%) in den analysierten Kompostproben zu bestimmen, wurden Referenzorganismen eingesetzt (pers. Mitteilung Prof. Hiraishi, Japan). Diese Werte wurden zur Verfügung gestellt und zur Berechnung der relativen Konzentration der Chinone in den analysierten Kompostproben genutzt. Dadurch konnten sowohl die Retentionszeiten der verschiedenen Chinontypen ermittelt, als auch der prozentuale Anteil der Ubi- und Menachinone bestimmt werden. Als Gesamtanteil (100 %) wurde der Anteil an allen vorkommenden Chinonen in einer Probe angenommen und auf das Feuchtgewicht in 1 g Kompost bezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Kompostierungsverlaufs

Die ersten Kompostierungsversuche wurden in einem extra dafür gebauten Einkammerbioreaktor (siehe Kap. 2.2.1) mit einem Volumen von 400 l durchgeführt (Bezeichnung: Reaktor A). Nach den Vorversuchen wurde ein Einkammerbioreaktor (Kap. 2.2.1) mit kammerintegrierter Heizung und einem Volumen von 700 l (Bezeichnung: Reaktor B1) eingesetzt, in dem alle weiteren Versuche durchgeführt wurden. Die Starterkulturenversuche wurden ebenfalls im Reaktor B1 durchgeführt. Im Unterschied zu den Vorversuchen trennte eine Metallwand das beimpfte Material von der Kontrollkammer (Bezeichnung: Reaktor B2), so dass vergleichende Versuche stattfinden konnten. Die Kompostchargen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind in Tabelle 3 angegeben.

3.1.1 Kompostparameter

Um den Kompostierungsprozess zu charakterisieren, wurden die Temperatur, Nitrat-, Nitrit-, Ammonium-, TOC- und Wassergehalt sowie der pH-Wert verschiedener Kompostproben (Tabelle 3) bestimmt und verglichen. Dabei wurden die Kompostproben wie in Kap. 2.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Die Konzentration der anorganischen Stickstoff-Verbindungen und des TOC wurden in wässrigen Kompostextrakten bestimmt und wie unter Kap. 2.3. beschrieben ermittelt und auf das Frischgewicht (FG) des Kompostmaterials bezogen. Es wurden vier Kompostchargen, zwei aus Reaktor A (K1, K2) und zwei aus Reaktor B1 (K14, K17) näher charakterisiert und dargestellt (Tabelle 19 und 20).

Bei den untersuchten Prozessen von Reaktor A zeigte sich ein Temperaturverlauf wie in Kap. 1.2 beschrieben. Nach der Befüllung (Input) wurde eine mesophile Anfangsphase beobachtet, dann folgte eine Selbsterhitzungsphase mit Temperaturen zwischen 60-65 °C und anschließend eine mesophile Abklingphase. Bei K1 erfolgte an Tag 7 eine erneute Befüllung, wodurch keine vollständige mesophile Abklingphase stattfand (Abbildung 6a und 6b) sondern eine erneute Selbsterhitzung erfolgte. Dieser folgte dann eine mesophile Abklingphase.

Bei den Kompostprozessen K1 und K2 (Reaktor A) wurde am Inputtag ein hoher TOC-Wert (13,2 mg/g FG für K1; 8,7mg/g FG für K2) gemessen und nahm dann im Kompostierungsverlauf auf bis 3,3 mg/g FG ab, bei gleichzeitiger Zunahme der Temperatur (Tabelle 19). Dies lässt auf einen guten Rotteverlauf schließen, da bei einem optimalen

Rotteverlauf der TOC abnehmen sollte (Baldauf & Bergmeister, 2006). Dies korrelierte mit der Tendenz einer zunehmenden Ammonium-Konzentration. Da der Nitritgehalt sehr gering war (Konzentration $< 1 \mu\text{g/g}$ FG), wurde in Tabelle 19 und 20 die Summe NO_x^- -N (NO_3^- -N + NO_2^- -N) dargestellt. Der NO_x^- -N-Wert nahm bei K1 von $11 \mu\text{g/g}$ FG (Inputtag) auf $46,1 \mu\text{g/g}$ FG (Tag 4) zu und nach der thermophilen Phase bis auf $28,1 \mu\text{g/g}$ FG (Tag 7) wieder ab. Der NH_4^+ -N-Wert stieg ab dem Inputtag ($85 \mu\text{g/g}$ FG) stetig an und wurde auch am Tag 19 (nach der Befüllung, mesophile Abklingphase) mit einem 3-fach höheren Wert ($295 \mu\text{g/g}$ FG) detektiert. Bei K2 wurde am Inputtag ein höherer NO_x^- -N-Wert ermittelt, der dann abnahm, um danach wiederum bis zur thermophilen Phase (Tag 9) zuzunehmen. Am Tag der höchsten Temperatur (Tag 4) nahm der Wert erneut ab, so wie auch bei K1 (Tag 5, 65°C) beobachtet. Der NH_4^+ -N-Wert schwankte bei K2, nach dem Inputtag nahm er ab, um dann an Tag 3 und 4 wieder anzusteigen und schließlich wieder an Tag 5 abzunehmen. Der vergleichsweise geringe NO_x^- -N-Wert bei beiden Kompostierungsprozessen legt nahe, dass der Kompost am Ende des jeweiligen Prozesses noch nicht völlig ausgereift war. Auf eine diesbezügliche Analyse wurde jedoch verzichtet.

Tabelle 19: Änderung der physikalisch-chemischen Parameter vom Kompostmaterial in 2 verschiedenen Komposten von Reaktor A

Zeit (d)	Temperatur ($^\circ\text{C}$) ¹	Feuchtgehalt (%)	pH-Wert	Wasserextrahierbare Komponenten in 1 g Kompost (FG)		
				TOC (mg)	NO_x^- ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) (μg)	NH_4^+ -N (μg)
Kompostierungsprozess 1 (K1)						
0	11	65	4,3	13,2	11	85
3	55	57	7,0	4,7	35,3	90
4	54	52	8,5	4,9	46,1	95
5	65	54	8,9	4,6	40,8	100
6	57	48	8,9	4,6	34,4	105
7 ²	53	48	8,9	3,3	28,1	110
19	18	n. d.	n. d.	10,8	0,4	295
Kompostierungsprozess 2 (K2)						
0	n. d.	62	5,2	8,7	40	235
1	13	59	5,1	7,6	16,5	165
2	49	56	6,3	5,5	32,5	30
3	61	52	8,1	4,2	44,6	285
4	63	50	8,5	4,7	36,7	395
5	44	50	8,6	4,3	35,3	320
6	32	42	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

n. d.: nicht analysiert, ¹ Temperatur im Bereich der Wellen, Durchschnittswerte (BioSal GmbH, Bad Lausick), ² Nach 7 Tagen wurde Küchenabfall nachgefüllt (Tabelle 3)

Der Feuchtegehalt der untersuchten Kompostierungsprozesse K1 und K2 betrug am Inputtag über 60 Gew.-%. Da ein Feuchtegehalt von 40-50 Gew.-% als optimal für den Kompostierungsverlauf angesehen wird (Helfer & Merrettig-Bruns, 2001), scheint er somit zu Beginn des Kompostierungsprozesses noch nicht optimal eingestellt worden zu sein (Tabelle 19). Mit zunehmender Kompostierungsdauer ist bei K1 und K2 deutlich zu erkennen, dass der Wassergehalt abnimmt und während des Kompostierungsprozesses einen Wert um 40 Gew.-% erreichte. Der pH-Wert wurde aus dem wässrigen Eluat des Probenmaterials ermittelt (Kap. 2.3.4). Zu Beginn der Kompostierungsprozesse 1 und 2 lag der pH-Wert zwischen 4 und 5 (Tabelle 19). Mit Zunahme der Temperatur stieg auch der pH-Wert an und erreichte am Ende der Selbsterhitzungsphase einen Wert von über 8. De Bertoldi *et al.* (1982) beschrieben für einen Kompostierungsprozess einen pH-Wert zwischen 5,5 und 8 als optimal.

Von Reaktor B1 wurden die physikalisch-chemischen Parameter für die Kompostierungsprozesse 14 und 17 ermittelt, ersichtlich in Tabelle 20.

Die untersuchten Kompostierungsprozesse zeigten einem ähnlichen Verlauf wie bei Reaktor A beschrieben. Die Besonderheit gegenüber Reaktor A stellte die Hygienisierungsphase dar, die bei beiden Prozessen durchgeführt wurde. Bei K17 wurde die Hygienisierungsphase nach der Selbsterhitzungsphase angeschlossen (Tag 10, 72 °C). Darauf folgte eine mesophile Abklingphase. Bei K14 erfolgte nach einer mesophilen Anlaufphase gleich eine Hygienisierungsphase (Tag 22, 67 °C), wo es trotz Umwälzung des Materials durch eine Welle in Randgebieten des Reaktors zu sehr hohen Temperaturen von bis zu 80 °C kam (Daten nicht gezeigt, gezeigt sind Mittelwerte der Wellentemperaturen). Daraufhin schloss sich die mesophile Abklingphase an. Nach der Zusatzbefüllung an Tag 28 erfolgte ein wie bei Reaktor A beschriebener Kompostierungsverlauf mit Selbsterhitzungsphase. Diesem folgte ein erneuter Hygienisierungsschritt (Tag 37, 72 °C). Danach wurde wiederum eine mesophile Abklingphase beobachtet. Der Feuchtegehalt von K17 schwankte stark im Kompostierungsverlauf und fiel sogar bis unter 40 Gew.-%, stieg aber beim Abkühlungsprozess wieder über 60 Gew.-% an. Bei K14 konnte im Verlauf eine leichte Schwankung zwischen 38-45 Gew.-% festgestellt werden. Im Vergleich zu Reaktor A war der Feuchtegehalt geringer, was mit der langsameren Erhitzung korrelieren würde. Der pH-Wert zeigte einen ähnlichen Verlauf, wie bei Reaktor A. Nur bei K14 lag der pH-Wert nach der Zusatzbefüllung bei über 8, fiel im Verlauf des Kompostierungsprozesses auf 5 und stieg dann wieder an. Diese Entwicklung, zum Ende des Kompostierungsprozesses einen pH-Wert im leicht basischen Bereich (ca. 8) zu detektieren, konnte bei allen untersuchten Kompostierungsprozessen beobachtet werden.

Tabelle 20: Änderungen der physikalisch-chemischen Parameter vom Kompostmaterial in 2 verschiedenen Kompostierungsprozessen in Reaktor B1

Zeit (d)	Temperatur (°C)	Feucht-gehalt (%)	pH-Wert	Wasserextrahierbare Komponenten in 1 g Kompost (FG)		
				TOC (mg)	NO _x ⁻ (NO ₃ ⁻ +NO ₂ ⁻) (µg)	NH ₄ ⁺ -N (µg)
Kompostierungsprozess 17						
Nach erneuter Befüllung / Selbsterhitzungsphase						
4	48	38	4,1	18,6	17,7	340
7	61	44	8,2	33,1	242,2	1290
8	55	49	8,4	16,2	112,9	1120
9	49	57	8,3	17,8	112	920
Hygienisierungsphase						
10	72	43	7,4	16,6	109	1370
11	57	47	8,8	11,5	121	1580
Abklingphase						
14	24	69	8,2	17,6	157	1480
15	22	54	8,0	16,9	164	1300
Kompostierungsprozess 14						
Hygienisierungsphase						
21	33	38	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
22	67	42	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
23	59	41	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
24	34	47	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
25	19	46	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Zusatzbefüllung, Selbsterhitzungsphase mit anschließender Hygienisierungsphase						
28	13	39	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
29	12	45	8,8	7,3	79,4	1640
30	15	38	6,7	17,9	57,2	1645
31	48	40	5,5	13,2	37,2	1650
32	61	42	7,8	8,7	66	1655
35	40	41	8,7	11,5	80,3	1660
Hygienisierungsphase						
36	72	43	8,5	9,3	78,5	1665
37	45	39	8,9	10,8	67	1670

n. d.: nicht analysiert

Der TOC zeigte bei beiden untersuchten Chargen von Reaktor B keine eindeutige Tendenz. Im Vergleich zu Reaktor A lagen der TOC und der Ammonium-Gehalt wesentlich höher. Dies könnte wie der langsamere Temperaturanstieg auf eine etwas schlechtere Sauerstoff-Versorgung in diesem Reaktortyp schließen lassen. Bei K17 unterlag der NO_x⁻-Wert und der Ammoniumgehalt großen Schwankungen. Dagegen konnte bei K14 ein stabiler Ammoniumgehalt im Bereich zwischen 1640-1670 µg/G FG detektiert werden. Der NO_x⁻-Wert unterlag jedoch ebenso wie bei K17 starken Schwankungen.

Ottow (2011) beschrieb den Glukoseabbau von Mikroorganismen im Boden. Exemplarisch sollte für Kompostprozess 17 untersucht werden, ob im wässrigen Extrakt Glukose als Abbauprodukt von Polysacchariden und C-Quelle für Mikroorganismen nachweisbar ist.

Die Durchführung erfolgte wie in Kap. 2.3.5 beschrieben. In allen Proben (Abbildung 5) wurde Glukose im Bereich von 48-240 $\mu\text{g/g}$ FG nachgewiesen. Während der Selbsterhitzung (Tag 4-7) lagen die Werte zwischen 100-140 $\mu\text{g/g}$ FG. Mit Einsetzen der Hygienisierung (Tag 10, Probe nach 6 h, 72 °C) wurden über 80 $\mu\text{g/g}$ FG gemessen. Danach sank der Glukose-Wert auf unter 80 $\mu\text{g/g}$ FG und stieg bis zum Kompostierungsende nicht wieder an, was auf einen erhöhten Glukoseverbrauch schließen lässt. Somit konnte eine eindeutige Korrelation der Werte von der Glukose-Messung mit dem Temperaturanstieg und der Hygienisierungsphase beobachtet werden.

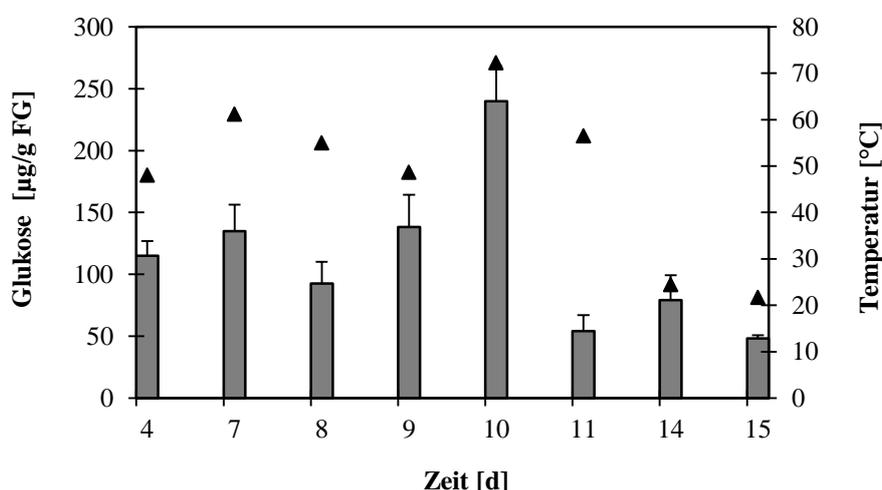


Abbildung 5: Verhalten des Glukosegehalts im Kompostierungsprozess 17. Es wurden an jedem Kompostierungstag zwei Proben genommen, eine Dreifachbestimmung je Probe durchgeführt und von dieser dann der Mittelwert gebildet. Angegeben sind die erhaltenen Glukose-Mittelwerte mit Standardabweichungen. Glukosegehalt (\blacksquare), Temperatur (\blacktriangle).

3.1.2 Untersuchungen zur aeroben Gesamtkeimzahl der Kompostierungsprozesse

Um einen Überblick über die mesophilen und thermophilen Gesamtkeimzahlen der Kompostierungstage zu erhalten, wurden die Bakterien wie in Kap. 2.5 beschrieben durch Schütteln in Natrium-Pyrophosphatpuffer vom Kompost abgelöst, auf verschiedenen Nährböden (NAI, R2A, Kap. 2.4) ausplattiert und bei Temperaturen von 30 $^{\circ}\text{C}$ und 55 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die ermittelte Gesamtkeimzahl wurde auf ein Gramm Trockengewicht (Kap. 2.3.3) bezogen.

Die Kompostierungsprozesse 1 und 2 von Reaktor A und von Reaktor B1 K14 und K17 wurden dafür ausgewählt und ihre Gesamtkeimzahl untersucht. Die höchsten Zellzahlen wurden nach Ausplattieren auf NAI erhalten, deshalb wurde dieses Medium zur Ermittlung der Lebendzellzahl für alle weiteren Versuche ausgewählt. In Abbildung 6 a-d sind die Gesamtzellzahlen der mesophilen und thermophilen Populationen in den untersuchten Kompostierungsprozessen über den angegebenen Zeitraum gezeigt. Bei K1 (Abbildung 6 a) wurde an Tag 7 eine Zusatzbefüllung durchgeführt, somit konnte in der ersten Phase keine deutliche mesophile Abklingphase erkannt werden und der Übergang von mesophiler Abklingphase zu mesophiler Anlaufphase war fließend, so dass schon nach kurzer Zeit wieder die thermophile Phase erreicht wurde. Das spiegelte sich jedoch nicht in der thermophilen Gesamtkeimzahl wider, die sich nach der ersten thermophilen Phase vermutlich nicht wieder erholen konnte und somit stagnierte. Nach Tag 17 erfolgte dann eine mesophile Abklingphase, was auch deutlich ersichtlich an der mesophilen Gesamtkeimzahl wurde, die in dieser Zeit wieder auf 1×10^{12} KBE/g TG anstieg. Die maximale Zellzahl der thermophilen Bakterien wurde bei Reaktor A nach ca. 4-7 Tagen erreicht, war aber zeitversetzt zur höchsten Temperatur. Bei K2 (Abbildung 6 b) blieb diese auch in der Abklingphase hoch, bei K1 folgte die thermophile Gesamtkeimzahl der Temperatur und nahm ab. In der Regel erreichte die Keimzahl thermophiler Bakterien ihr Maximum (K1: 10^8 KBE/g TG; K2: 10^{12} KBE/g TG) in oder kurz nach der Selbsterhitzungsphase. Während die Keimzahl mesophiler Bakterien bei K2 keinen deutlichen Bezug zur Temperatur zeigte und Maximalwerte von 3×10^{11} KBE/g TG erreichte, konnte bei K1 eine Korrelation zwischen Zu- bzw. Abnahme der Temperatur bis zu Maximalwerten von $6,4 \times 10^{12}$ KBE/g TG erkannt werden.

Die thermophile und mesophile Gesamtzellzahl von Reaktor B1 wurde im Kompostierungsverlauf mit zusätzlicher externer Erhitzung untersucht. Die Gesamtzellzahl folgte im Wesentlichen dem bereits in Reaktor A beobachteten Verlauf. Abbildung 6 c zeigt den ersten Hygienisierungsabschnitt während des Versuchs 14, bei dem bei Beginn der mesophilen Abklingphase eine Hygienisierungsphase durchgeführt wurde (Tag 22), dabei wurden ca. 67 °C erreicht. Die Thermophilen ($2,1 \times 10^{11}$ KBE/g TG) und Mesophilen ($2,4 \times 10^8$ KBE/g TG) fielen danach bis zum Tag 25 (19,3 °C) stetig ab. Mit sinkender Temperatur stieg die Zahl der Mesophilen auf $2,5 \times 10^{12}$ KBE/g TG und übertraf nach kurzer Zeit (am Tag 29, 12 °C) die der Thermophilen um ein Mehrfaches. Nachdem sich dann eine

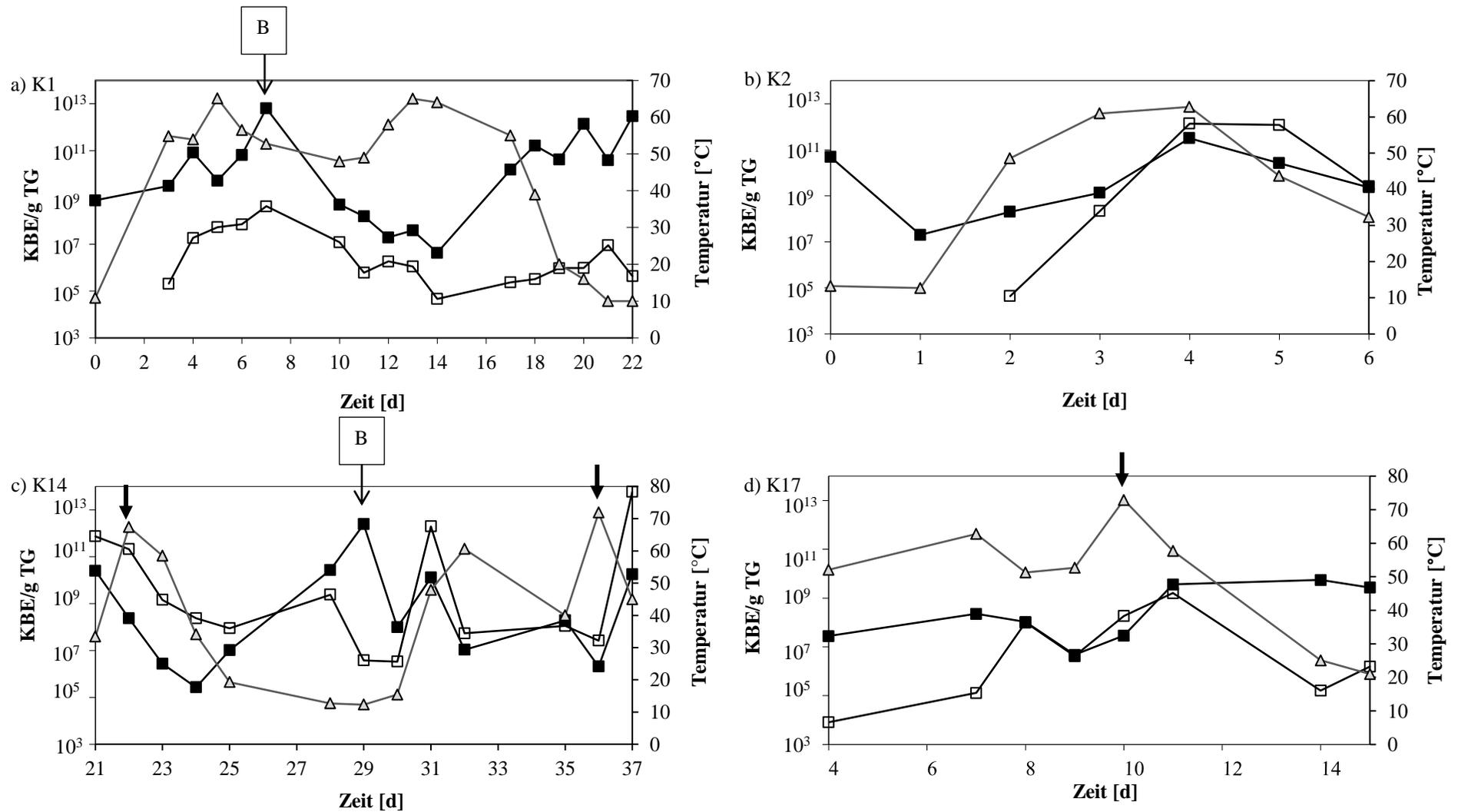


Abbildung 6: Verhalten der bei 30 °C und 55 °C bestimmten Gesamtkeimzahlen von den aus Reaktor A und B untersuchten Kompostierungsprozessen 1, 2, 14 und 17 mit ihren Kompostierungstemperaturverläufen. Die Gesamtkeimzahl wurde auf 1 g Trockengewicht bezogen. Verlauf der mesophilen Population (■) und der thermophilen Population (□) im Verhältnis zur Kompostierungstemperatur (Δ), schwarzer Pfeil zeigt Hygienisierung, B: Zusatzbefüllung (siehe auch Tabelle 3).

Selbsterhitzungsphase anschloss, stieg die thermophile Gesamtkeimzahl auf 2×10^{10} KBE/g TG fiel jedoch so wie die mesophile Gesamtkeimzahl anschließend wieder ab. Durch die anschließende Hygienisierungsphase mit Zusatzheizung wurden Temperaturen von ca. 72 °C erreicht. Die thermophile Gesamtkeimzahl stieg nach der Hygienisierungsphase um ein Vielfaches an und erreichte die höchsten Werte im Prozess ($5,6 \times 10^{13}$ KBE/g TG). Im Gegensatz zu Versuchen ohne Zusatzheizung nahm die mesophile Keimzahl nach der externen Erhitzung stärker ab und sank deutlich unter die der thermophilen Keimzahl. Bei Versuch 17 (Abbildung 6 d) zeigte sich ein Anstieg der thermophilen Mikroorganismen kurz nach der Selbsterhitzung. Es wurde am Tag 10 eine Hygienisierung durchgeführt, die Probeentnahme erfolgte 6 h später. Es konnte kein direkter Einfluss auf die mesophile und thermophile Gesamtkeimzahl gefunden werden. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Prozessen waren die Gesamtkeimzahlen eher niedrig und schwankten nicht so stark. Dabei traten ähnliche Verläufe der thermophilen Gesamtkeimzahlen auf, welche schon bei K1 (Reaktor A) beobachtet wurden.

3. 2 Isolierung von dominanten Bakterien aus Kompost

3.2.1 Isolierung von Reinkulturen

Die Reinkulturen wurden aus Proben verschiedener Kompostierungsprozesse und unterschiedlichen Phasen isoliert. Die Bakterien, die durch Inkubation bei 30 °C isoliert werden konnten, wurden als mesophil und Bakterien, die bei 55 °C isoliert wurden, als thermophil eingeschätzt. Für einige thermophile Isolate wurde jedoch in späteren Versuchen festgestellt, dass sie eher thermotolerant bis moderat thermophil waren und nur bis zu einer Temperatur von 55 °C wachsen konnten. Um möglichst viele verschiedene Mikroorganismen zu erfassen, wurden sowohl Komplexmedien, als auch ausgewählte Selektivmedien verwendet (Kap. 2.4.1). Von Komplexmedien wurden in der Regel Kolonien der höchsten Verdünnungsstufe isoliert, da sie vermutlich zu den zahlenmäßig häufigsten isolierbaren Bakterien im Kompost gehörten. Aufgrund schnellwachsender Bakterien auf den Agarplatten wurde vermutet, dass langsam wachsende Bakterien sich nicht etablieren konnten. Daher wurden zur Isolierung langsam wachsender Bakterien Versuche mit Kompostextrakt-Agar durchgeführt (Kap. 2.4.1.1). Die Mikroorganismen, welche auf Kompostextrakt-Agar isoliert wurden, wurden durch ein „E“ in ihrer Stammbezeichnung gekennzeichnet. Nach Versuchen mit MNY-Medium zur Isolierung von *Thermus* sp. (Beffa *et al.*, 1996) konnten zwei Bakterien isoliert werden, diese erhielten ein „MS-X“ in ihrer Stammbezeichnung (Kap.

2.4.1.2). Um schnell wachsende, grampositive Bakterien zu unterdrücken, wurde Vancomycin sowohl zu R2A-Agar als auch zu NAI-Platten zugesetzt (siehe Kap. 2.4.1.3). Die Mikroorganismen, welche nach Zusatz von Vancomycin isoliert wurden, erhielten ein „VM“ in ihrer Stammbezeichnung.

Tabelle 21: Isolierte Bakterienstämme aus verschiedenen Kompostierungsversuchen und der phylogenetische, nächstverwandte Typstamm.

a) bei 55 °C isolierte Stämme

Stamm	Größe der t-RFs (bp) MspI/AluI	Phylogenetischer Verwandter ¹ (Accession number)	16S rRNA-Gen-Sequenz-Identität [%]
<i>Firmicutes:</i>			
8-4-7; 8-4-5	132 /70 siehe Kapitel 3.3.3	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> (L27478)	99
29-10-PAB; 17-1-4; 23-10-A	137/68	<i>Bacillus licheniformis</i> (CP000002)	100
2-4-3	146/69	<i>Bacillus coagulans</i> (AB271752)	100
8-4-4; 17-1-2; 17-1-3; 15-1-2; 16-2-VM-1	168/75 siehe Kapitel 3.3.3	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> (AB101594)	99,9
8-4-3; 8-4-1; 16-2-VM-4	138/70	<i>Ureibacillus suwonensis</i> (AY850380)	99,8
MS-X1; 29-10-PAA; MS-X3	149/66 siehe Kapitel 3.3.3	<i>Geobacillus pallidus</i> (Z26930)	99,7
16-2-A	siehe Kapitel 3.3.3	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (CP000557)	99
24-1-4		<i>Staphylococcus warneri</i> (L37603)	100
14-5-C		<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> (AF138739)	99,7
26-1-6		<i>Ureibacillus terrenus</i> (AJ276403)	99,9
<i>Proteobacteria:</i>			
17-1-5	170 /74	<i>Pseudomonas thermotolerans</i> (AJ311980)	100
16-2-VM-2	siehe Kapitel 3.3.3	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> (AF427039)	99,8
16-2-VM-3	siehe Kapitel 3.2.2		
16-2-VM-5		<i>Brucella pinnipedialis</i> (AM158981)	100

b) bei 30 °C isolierte Stämme

Stamm	Größe der t-RFs (bp) MspI/AluI	Phylogenetischer Verwandter ¹ (Accession number)	16S rRNA-Gen-Sequenz-Identität [%]
<i>Firmicutes:</i>			
8-4-E12	siehe Kapitel 3.2.2		
8-4-E13	siehe Kapitel 3.2.2		
8-4-E9	145/70	<i>Rummeliibacillus pycnus</i> (AB271739)	99
8-4-E11	140/70	<i>Bacillus massiliensis</i> (AY677116)	98
28-4-1; 28-4-2		<i>Sporosarcina psychrophila</i> (D16277)	99,8

Fortsetzung Tabelle 21

Stamm	Größe der t-RFs (bp) MspI/AluI	Phylogenetischer Verwandter ¹ (Accession number)	16S rRNA-Gen-Sequenz-Identität [%]
KW-14-10		<i>Bacillus subtilis</i> (AJ276351)	100
24-4-3		<i>Enterococcus faecalis</i> (AB012212)	99
24-4-4		<i>Enterococcus cecorum</i> (AF061009)	99
Actinobacteria:			
9-4-E3; 9-4-13	488/70	<i>Arthrobacter arilaitensis</i> (AJ609628)	99,7
9-4-E2	139/237	<i>Arthrobacter mysorens</i> (AJ617482)	99,7
24-4-1; 24-4-2		<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> (AJ698726)	100
6-4-1		<i>Microbacterium xylanilyticum</i> (AJ853908)	100
6-4-2		<i>Rhodococcus gordoniae</i> (AY233201)	98
Proteobacteria:			
9-4-E1	490/82	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (X81665)	98
6-4-3		<i>Castellaniella denitrificans</i> (U82826)	96
Bacterioidetes:			
28-4-3	siehe Kapitel 3.2.2		

¹Die analysierten Sequenzen betragen mindestens 700 bp

Alle isolierten Kolonien wurden auf NAI-Platten ausplattiert, um dort ihr Wachstumsverhalten zu beobachten. Da alle Kolonien ein gutes Wachstum auf NAI-Platten zeigten, wurde dieses Medium für die weitere Kultivierung beibehalten.

Insgesamt wurden 44 Isolate gewonnen, davon 19 bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C und 25 Organismen bei 55 °C (Tabelle 21). Durch Sequenzierung des PCR-amplifizierten 16S rRNA-Gens wurden sie taxonomisch eingeordnet (Kap. 2.8.9). Der Vergleich der Nukleotidsequenzen der Isolate mit bekannten Gensequenzen in 16S rRNA-Gendatenbanken führte zu denen in Tabelle 21 aufgelisteten Typstämmen von verwandten Bakterien. Dabei zeigt Tabelle 21 deutlich, dass von manchen Bakterienarten mehrfach Stämme isoliert werden konnten. Insbesondere Vertreter von *Ureibacillus thermosphaericus* und *Ureibacillus suwonensis* konnten auf unterschiedlichen Nährmedien isoliert werden. Zur Aufreinigung der Stämme wurden diese mehrmals auf NAI überimpft und als Glycerinkulturen (Kap. 2.6.1) bei -80 °C in die Stammsammlung aufgenommen. Unter thermophilen Bedingungen wurden vor allem Vertreter der *Firmicutes* isoliert. Durch Zusatz von Vancomycin gelang es außerdem einige Vertreter der *Proteobacteria* zu isolieren. Bei den mesophil isolierten Bakterien konnten auch einige Vertreter der *Actinobacteria* isoliert werden. Unter den isolierten Bakterien befand sich jedoch nur ein Vertreter der *Bacterioidetes*.

3.2.2 Charakterisierung ausgewählter Isolate

Einige Bakterien (siehe Tabelle 21) waren mit ihren 16S rRNA-Genen nur entfernt verwandt mit den bisher beschriebenen Typstämmen der Bakterienarten, z. B. Stamm 8-4-E13 (94,5 %), 8-4-E12 (96,5 %), Stamm 28-4-3 (93 %) und 16-2-VM-3 (95,3 %). Diese Stämme sollten wie in Kap. 2.7.3 und 2.7.4 beschrieben morphologisch und physiologisch untersucht werden.

3.2.2.1 16S rRNA-Gen-Analyse

Nach Anzucht und Zellextraktion (Kap. 2.8.1) erfolgte eine PCR und anschließende Klonierung der fast vollständigen 16S rRNA-Genen der Isolate und Ausplattierung auf Agarplatten (Kap. 2.8.4-2.8.7). Nach Auswahl der Klone wurden die Plasmide isoliert und es erfolgte eine Sequenzierung (Kap. 2.8.8 bis 2.8.9).

Für Stamm 8-4-E12 wurden 16 Klone auf das Agarosegel aufgetragen (Kap. 2.8.4), wobei drei unterschiedliche Gene gefunden wurden. Davon war das Muster von Klon 37 8× vorhanden, daher wurde diese Sequenz ausgewählt und für den Stammbaum (Abbildung 24) verwendet. Von Stamm 8-4-E13 wurde ein gereinigtes PCR-Produkt sequenziert und die erhaltene 16S rRNA-Gensequenz für den Stammbaum verwendet (Abbildung 24). Bei Stamm 28-4-3 ergaben sich bei neun untersuchten Klonen zwei unterschiedliche Gene. Das Muster von Klon 2 war 5× vorhanden, wurde sequenziert und für den Stammbaum in Anhang 19 verwendet.

Für Stamm 16-2-VM-3 konnten von fünf Klonen zwei gleiche Muster identifiziert und die Klone sequenziert werden. Tabelle 22 zeigt eine Übersicht der nächstverwandten Stämme zu den ausgewählten Isolaten.

Tabelle 22: Prozentuale Ähnlichkeit der 16S rRNA-Gensequenzen¹ der Stämme 8-4-E12, 8-4-E13 und 28-4-3 mit denen des nächsten, kultivierten Bakterium und nächstverwandten Typstammes einer Art.

Stamm	Phylogenetischer Verwandter und Typstamm (T) (Accession number)	16S rRNA-Gen-Sequenz-Identität [%]
8-4-E12	<i>Bacillus</i> sp. CCBAU 10711 (EU621912)	98,1
	<i>Bacillus shackletonii</i> Stamm LMG 18435 ^T (AJ250318) ²	96,5
8-4-E13	<i>Bacillus oceanisediminis</i> Stamm F71003 (HQ908726)	96,1
	<i>Bacillus circulans</i> ^T (AY043084)	94,4
	<i>Bacillus siralis</i> Stamm 171544 ^T (AF071856)	94,4
16-2-VM-3	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (D12789)	95,3
28-4-3	<i>Sphingobacteriaceae</i> Bakterium 37LGx-1 (AB375750)	99,7
	<i>Sphingobacterium composti</i> Stamm T5-12 ^T (AB244764)	93

¹Die analysierten Sequenzen waren über 1400 bp lang. ²Logan *et al.* (2004)

3.2.2.2 Morphologische und physiologisch-biochemische Charakterisierung der Bakterienstämme 8-4-E12 und 8-4-E13

Eine Besonderheit von Stamm 8-4-E12 war sein schwärmendes Wachstum bei Temperaturen zwischen 37-45 °C. Nach Schmidt (2009) betrug die Wachstumsrate 1,48 h⁻¹ und die Verdopplungszeit war 0,5 h. Die Kolonien beider Stämme zeigten eine weiß-gelbliche Färbung und eine glänzende, fädige Oberflächenstruktur. Durch Zugabe von MnSO₄ (5 mg/l) zu NAI (siehe Kap. 2.7.2.1) konnte eine Sporulation sichtbar gemacht werden (Abbildung 7).

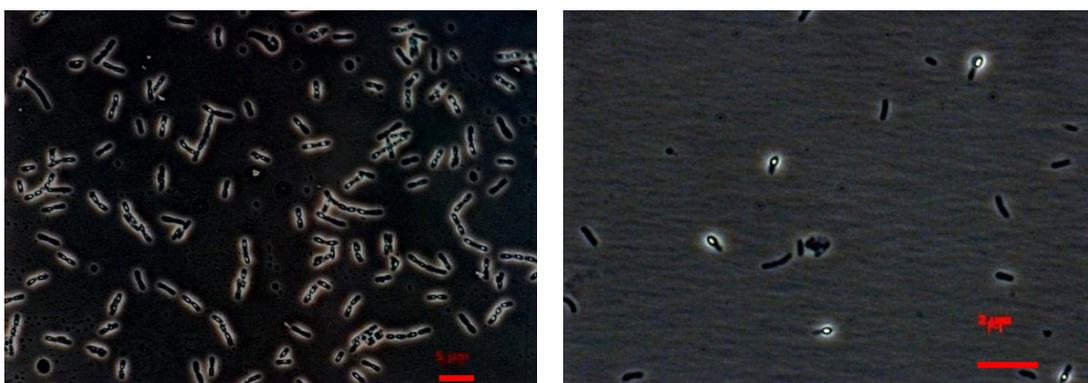


Abbildung 7: Sporulation von a) Stamm 8-4-E12 und b) Stamm 8-4-E13. Objektiv: 100x/1,3 Öl, im Phasenkontrast. Wachstumstemperatur 37 °C, Balken a) 5 µm, Balken b) 10 µm.

Die Sporenform war bei beiden Stämmen ellipsenförmig. Die Positionen der Sporen von Stamm 8-4-E12 waren zentral oder subterminal und von Stamm 8-4-E13 terminal. Um eine elektronenmikroskopische Untersuchung vorzunehmen, wurden beide Stämme in NB-Medium bei 37 °C bis zur exponentiellen Phase angezogen (Kap. 2.4.1). Anschließend wurden sie von Dr. Hause (MLU Halle) elektronenmikroskopisch untersucht und fotografiert. In Abbildung 8 sind beide Stämme dargestellt.

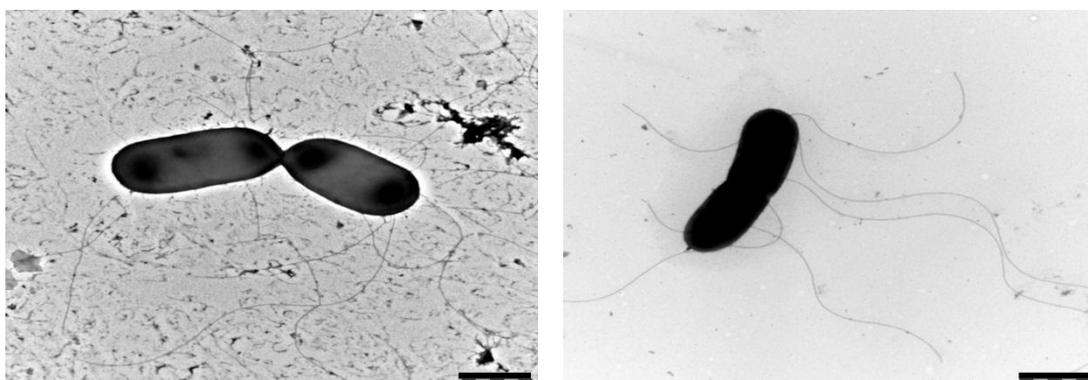


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Stämme a) 8-4-E12 und b) 8-4-E13. Balken: 1 µm (Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Dr. Gerd Hause, MLU Halle)

Es wurden gerade, längliche Zellen mit abgerundeten Enden beobachtet. Sie lagen als Einzelzellen, Paare und kettenbildende Zellen vor. Deutlich zu sehen waren sowohl ihre stäbchenförmige Zellform und ihre Flagellen.

Obwohl beide Stämme bei 30 °C isoliert wurden, zeigte sich bei der Untersuchung des Temperaturbereichs des Wachstums, dass sie bei 37-45 °C optimal und bis 50 °C wachsen konnten. Damit kann man sie als thermotolerante Bakterien bezeichnen. Für den G+C-Gehalt von Stamm 8-4-E12 wurden 36,1 mol-% und für Stamm 8-4-E13 39 mol-% erhalten (Kap. 2.7.4). Als Hauptchinonkomponente konnte das Menachinon 7 bei beiden Bakterien bestimmt werden (Kap. 2.7.4). Beide Stämme wurden auch auf ihr Enzym- und Substratverwertungsspektrum untersucht (Kap. 2.7.3.2 und 2.7.3.3). Mit dem Api[®]ZYM-Test konnten nur geringe Aktivitäten festgestellt werden. Zur Untersuchung des Substratverwertungsspektrums wurden verschiedene C-Quellen eingesetzt. Die Stämme konnten ein breites Spektrum an Zuckern und organischen Säuren verwerten (Anhang 9). Beide Stämme waren negativ für Säurebildung aus Glukose, L-Rhamnose, L-Arabinose, Saccharose, D-Mannit, Galaktose, Mannose, Xylose und anaerobes Wachstum. Des Weiteren waren sie negativ für die getesteten Enzymaktivitäten: β -Glukosidase, Arginindihydrolase, Urease, Gelatinase und Acetoin- und Indolbildung. Beide Stämme waren nicht in der Lage, Stärke und Casein zu verwerten. Sie zeigten kein Wachstum auf Saccharose und L-Arabinose, Caprinsäure, Phenylsäure und Huminsäure. Morphologische und physiologisch-biochemische Eigenschaften der Stämme 8-4-E12 und 8-4-E13 sind in Anhang 9 dargestellt

3.2.2.3 Ein Vertreter der *Proteobacteria*: Stamm 16-2-VM-3

Um auch Stamm 16-2-VM-3 elektronenmikroskopisch zu untersuchen, wurde 16-2-VM-3 in NB-Medium bei 45 °C angezogen (Kap. 2.4). Eine Besonderheit dieses Stammes war eine weiße Flockenbildung, durch die eine Verfolgung des Wachstumsverhaltens mit einer OD₆₀₀-Messung nicht erfolgen konnte. Aufgrund der Flockung war es auch nicht möglich ein elektronenmikroskopisches Bild aufzunehmen. Durch eine Immobilisierung der Zellen auf einem mit 2 %-iger Agarose beschichteten Objektträgers konnte ein mikroskopisches Bild im Phasenkontrast aufgenommen werden, was in Abbildung 9 dargestellt ist. Der G+C-Gehalt des Stammes betrug 61,8 % und das Hauptchinon war UQ-10 (Kap. 2.7.4). Der Stamm zeigte ein gutes Wachstumsverhalten bei Temperaturen zwischen 30-55 °C und kein Wachstum bei Temperaturen unter 30 und über 55 °C. Die optimale Wachstumstemperatur lag zwischen 40 und 50 °C, wodurch das Bakterium als thermotolerant bis moderat thermophil eingeschätzt werden konnte.

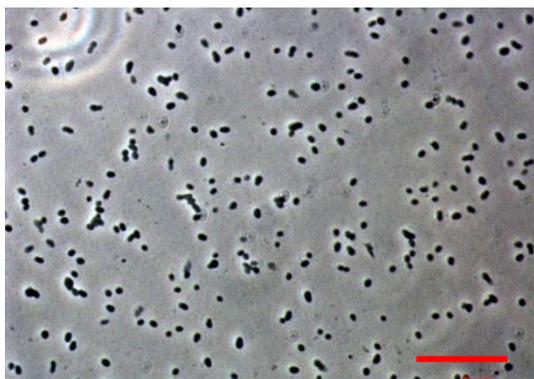


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahme von Stamm 16-2-VM-3 auf einem mit Agarose (2 %) beschichtetem Objektträger. Objektiv: 100x/1,3 Öl, im Phasenkontrast. Balken: 10 µm, Anzucht bei 45 °C

Weiterhin zeigte Stamm 16-2-VM-3 Aktivitäten verschiedener extrazellulärer Enzyme und Substratverwertungsspektren im Api[®]ZYM-Test, Api[®]20NE-Test und durch Untersuchungen der Säurebildung (Kap. 2.7.3). Die Ergebnisse der positiven physiologischen Tests sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Der Stamm wurde negativ auf die Substratverwertung von L-Rhamnose, L-Arabinose, D-Mannit, Mannose und Xylose getestet. Die t-RFs des Stammes wurden wie in Kap. 2.8.10 beschrieben ermittelt und betragen für die Enzyme MspI/RsaI (bp) 148/208.

Somit kann das Bakterium in die Klasse: *α-Proteobacteria*, Ordnung: *Rhizobiales* und Familie: *Phyllobacteriaceae* eingeordnet werden und ist wahrscheinlich einer neuen Gattung zuzuordnen.

Tabelle 23: Morphologische und physiologisch-biochemische Eigenschaften von Stamm 16-2-VM-3

Eigenschaften			
Cytologische Merkmale		Chemotaxonomische Merkmale	
Zelllänge und -breite (µm)	1,7×0,9	Hauptchinon	UQ-10
Zell- und Kolonieform	Kurzes Stäbchen	G+C-Gehalt (mol%)	61,8 %
Gram-Färbung	negativ	Temperatur (°C) Minimum	30
		Maximum	55
		Optimum	40–50 °C
Enzymaktivitäten		Substratverwertung	
Esterase Lipase (C8)	+	Glukose	+
Leucin Arylamidase	+	Saccharose	+
Trypsin	+	Glukose	+
α-Chymotrypsin	+	Galaktose	+
Saure Phosphatase	+	Gelatine	+
		Arabinose	v
		Caprinsäure	v

+: positiv, v: variabel

3.2.2.4 Ein Vertreter der *Bacterioidetes*: Stamm 28-4-3

Um eine elektronenmikroskopische Untersuchung vorzunehmen, wurde Stamm 28-4-3 in NB-Medium bei 37 °C bis zur exponentiellen Phase angezogen (Kap. 2.7.2). In Abbildung 10 ist die elektronenmikroskopische Aufnahme von Stamm 28-4-3 dargestellt.

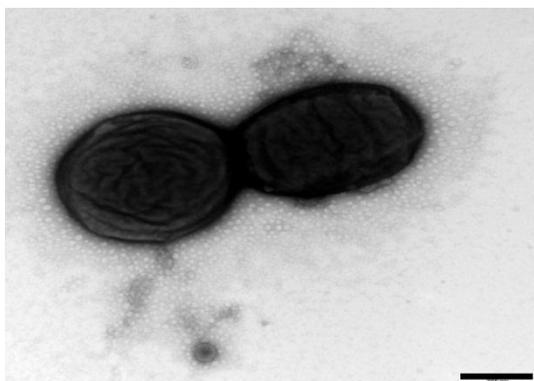


Abbildung 10: Elektronenmikroskopisches Bild von Stamm 28-4-3. Anzucht bei 37 °C bis zu exponentieller Phase. Balken: 200 nm, (Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Dr. Gerd Hause, MLU Halle)

Deutlich erkennbar ist dabei eine Schicht um die Zelle. Bei der Aufarbeitung des Stammes zeigten sich durch Schleimbildung des Stammes Extraktionsprobleme, es wird daher vermutet, dass der Stamm 28-4-3 eine Schleimschicht um seine Zellwand bildet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Anhang zusammengefasst. Der G+C-Gehalt des Stammes 28-4-3 betrug 39,9 % und das Hauptchinon war MK-7 (Kap. 2.7.4). Der Stamm zeigte Wachstum bei Temperaturen zwischen 20-55 °C und kein Wachstum bei Temperaturen unter 16 °C und über 55 °C. Die optimale Wachstumstemperatur lag zwischen 37 und 50 °C (Kap. 2.7.3.1). Deswegen kann das Bakterium als thermotolerant bis moderat thermophil eingeschätzt werden. Weiterhin zeigte Stamm 28-4-3 hohe Aktivitäten verschiedener extrazellulärer Enzyme wie der Esterase (C4), Lipase (C14), Leucin-, Valin- und Cystin Arylamidase, Trypsin, α -Chymotrypsin, saure Phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α - und β -Galactosidase, β -Glucosidase, N-Acetyl- β -Glucosaminidase und α -Mannosidase im Api[®]ZYM-Test (Kap. 2.7.3.3). Bei Untersuchungen auf Säurebildung wurden Glukose, L-Rhamnose, L-Arabinose, Galaktose und Mannose positiv getestet (Kap. 2.7.3.5). Es wird daher vermutet, dass der Stamm einen wichtigen Beitrag zum Aufschluss der polymeren Substrate im Kompostmaterial leistet. Morphologische und physiologisch-biochemische Eigenschaften von Stamm 28-4-3 im Vergleich zu seinen nächstverwandten Typstämmen sind in Anhang 10 dargestellt. Die Sequenzen von Stamm 28-4-3 wurden in der EMBL-Datenbank unter der *Accession Number* HE647691 hinterlegt.

3.3 Etablierung molekularer Fingerprint-Analysen zur kultivierungsunabhängigen Erfassung der typischen meso- und thermophilen Populationen

Da klassische Kultivierungsverfahren nur einen Bruchteil der vorhandenen Bakterien erfassen, sollten molekularbiologische Methoden näheren Aufschluss über die Populationszusammensetzung und Veränderungen im Kompostierungszeitraum geben. Um ein umfassendes Bild über die Populationszusammensetzung zu erhalten, wurden Klonbibliotheken von PCR-amplifizierten 16S rRNA-Genen angelegt und durch Restriktionsverdau (ARDRA) charakterisiert (Kap. 2.8.7). Es wurden sieben Klonbibliotheken von Proben aus der meso- und thermophilen Phase der Kompostchargen 1, 2 und 17 nach Amplifikation mit dem Primerpaar fD1/Eub534r (Tabelle 11) gewonnen. Die Häufigkeit der Gene wurde durch ARDRA ermittelt und ihre Zuordnung zu bestimmten Bakterien erfolgte durch Sequenzauswertung (Kap. 2.8.9). Außerdem sollte zur Ermittlung und Verfolgung dominanter Bakterien die Analyse des terminalen Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (t-RFLP) genutzt werden. Die t-RFLP-Analyse wird als verlässliche, hoch auflösende Hochdurchsatz-Methode angesehen, um Veränderungen von Mikrobengemeinschaften zu verfolgen (Hartmann & Widmer, 2008) und wurde bereits vereinzelt zur Analyse von Kompostproben verwendet (Tiquia, 2005b).

3.3.1 Restriktionsanalyse amplifizierter ribosomaler DNA (ARDRA) von Kompostproben aus Reaktor A

Für die Untersuchung von Kompostproben aus Reaktor A wurden für die Amplifikation und Klonierung der 16S rRNA Kompostproben von K1 und K2 ausgewählt. Um ein umfassendes Bild über die Zusammensetzung der Population zu erhalten, wurden jeweils Proben aus der mesophilen und der thermophilen Phase untersucht. Die Untersuchung der mesophilen Phase von K1 erfolgte nach zwei Zusatzbefüllungen. Bei K2 wurde eine Probe aus der mesophilen Anlaufphase, der thermophilen Phase und der mesophilen Abklingphase untersucht. Die DNA wurde wie in Kap. 2.8.1.1 beschrieben mit dem „PowerSoil™ DNA Isolation Kit“ extrahiert, dem Primerpaar fD1/Eub534r amplifiziert und wie unter Kap. 2.8.6 beschrieben in den pJET1.2/*blunt cloning vector* ligiert und in *E. coli* XL1-Blue MRF⁻-Zellen transformiert. Anschließend wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (Kap. 2.8.3.). Die erhaltenen, positiven PCR-Produkte wurden gereinigt und für einen Restriktionsverdau verwendet. Der Restriktionsverdau wurde wie in Kap. 2.8.7 beschrieben durchgeführt. Zuerst wurden die

Enzyme MspI/RsaI verwendet. Wenn das PCR-Produkt nicht geschnitten wurde, wurde anschließend mit BsuRI/AluI verdaut, so dass alle untersuchten Sequenzen der Klonbibliothek einem ARDRA-Muster zugeordnet werden konnten. Von Mustern, die durch mehr als einen Klon repräsentiert waren, wurde ein Insert sequenziert (Kap. 2.8.9). Die phylogenetische Zuordnung der aus verschiedenen Proben der Kompostierungsprozesse gewonnenen 16S rRNA-Gensequenzen sind in Tabelle 24 und im Anhang 2 dargestellt. Bei K2 zeigten sich in der mesophilen Anfangsphase (Tag 2, 13 °C) vor allem *Lactobacilli* (Aa1, Ab2, A3), mit einem Anteil von über 15 % als dominante Gattung. Aber auch *Bacterioidetes* wie *Sphingobacterium composti* (A10) konnten mit ca. 9 % detektiert werden. In der thermophilen Probe war *Ureibacillus thermosphaericus* (A28) mit einem Anteil von über 18 % einer der dominantesten Organismen, welcher auch in der mesophilen Abklingphase noch hoch war, jedoch mit einem geringeren Anteil von 10 %. Ein anderer Vertreter der *Ureibacillus* sp., *Ureibacillus suwonensis* (A16), wurde in dieser Phase mit einem Anteil von über 10 % detektiert. Interessant war auch der Nachweis eines hohen Anteils von γ -*Proteobacteria* wie *Pseudoxanthomonas*- und *Pseudomonas*-Arten (A21, A20) in der Probe aus der thermophilen Phase. Weiterhin wurde beobachtet, dass Vertreter der *Bacterioidetes* über den gesamten Kompostierungsverlauf nachweisbar waren.

Für K1 (Anhang 2) konnte festgestellt werden, dass in der thermophilen Probe ebenfalls ein hoher Anteil an γ -*Proteobacteria* vorhanden war, insbesondere ein Bakterium mit entfernter Verwandtschaft zu *Pseudidiomarina* sp. (C11) mit 11 % und zu *Acinetobacter calcoaceticus* (C16, 9 %). Aber auch ein hoher Anteil von *Bacterioidetes* wurde nachgewiesen. In der mesophilen Abklingphase (Tag 19, 18 °C) wurden hauptsächlich *Bacterioidetes* mit entfernter Verwandtschaft zu *Empedobacter*, *Ornithobacteria* und *Sphingobacteria* sp. (C2, C1, C8) nachgewiesen. *Firmicutes* waren in diesem Prozess nur in geringem Anteil nachweisbar. *Actinobacteria* wurden im Gegensatz zu K2 gar nicht detektiert. Für beide Kompostierungsprozesse konnten gleiche ARDRA-Muster sowohl in den thermophilen als auch in den mesophilen Proben beobachtet werden. Die Sequenzen der 16S rRNA-Gene wurden mit dem Programm „ClustalW“ geprüft und die Übereinstimmung ergab, dass die gleichen *Bacteria* in verschiedenen Kompostproben vorhanden waren. Da jedoch die ermittelten *Bacteria* bei unterschiedlichen Temperaturbereichen wachsen, ist außerdem davon auszugehen, dass besonders thermophile MO in der mesophilen Probe nicht mehr oder nur geringfügig gefunden wurden. Wiederum andere, mesophile MO etablierten sich und konnten damit vermutlich nur bei den mesophilen Proben detektiert werden.

Tabelle 24: Sequenzvergleich der 16S rRNA-Gene mit spezifischen ARDRA-Mustern von Kompostierungsprozess K2 mit den 16S rRNA-Genen aus der RDP-Gendatenbank

ARDRA-Muster	Tag 1 (13 °C)	Tag 4 (63 °C)	Tag 6 (34 °C)	Größe der t-RFs ² erhalten mit MspI/RsaI (bp)	Phylogenetischer Verwandter ³ (Accession number)	Phylogenetische Gruppe	Identität (%)
	Prozentualer Anteil (%) ¹ der Klone						
Aa1	4,1	0	0	487/520	<i>Lactobacillus hammesii</i> DSM 16381 ^T (AJ632219)	<i>Firmicutes</i>	94
Ab2	4,9	0	0		<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 220017 ^T (AM113784)	<i>Firmicutes</i>	99,8
A3	6,2	2,3	0		<i>Lactobacillus</i> sp. CWBI/B-659/(E912) (EF370992)	<i>Firmicutes</i>	99
A28	0	18,6	10,2	165/476	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> (DSM10633T; AB101594)	<i>Firmicutes</i>	99,8
A16	1,2	4,7	10,5	138/487	<i>Ureibacillus suwonensis</i> 6T19 (AY850379)	<i>Firmicutes</i>	99,2
A30	6,2	2,3	0	132/552	unkultiviertes Kompost Bakterium 4-29 (AB034711)	<i>Firmicutes</i>	98
					<i>Bacillus</i> sp. TAT105 (AB066342)		93
A17	2,5	5,6	2,3		<i>Bacillus</i> sp. B10EXG (AF537293)	<i>Firmicutes</i>	100
A29	1,4	7,1	4,3	126/432	<i>Paracoccus kondratievae</i> GB ^T (AF250332)	<i>α-Proteobacteria</i>	96
Ac2	0	0	2,3	393/460	<i>Aminobacter</i> sp. KC-EP-S4 (FJ711220)	<i>α-Proteobacteria</i>	99,8
A6	1,4	2,8	3,4		<i>Marinobacter</i> sp. Trimyema-1 (AJ292527)	<i>γ-Proteobacteria</i>	99,8
Aa2	0	0	2,4		<i>Acinetobacter</i> sp. P2-2 (EU276092)	<i>γ-Proteobacteria</i>	95
A21	0	5,8	0	145/487	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> CB-226 ^T (AF427039)	<i>γ-Proteobacteria</i>	97,6
A20	0	5,3	5,3		unkultiviertes Bakterium F44 (AM500829)	<i>γ-Proteobacteria</i>	99
					<i>Pseudomonas pertucinogena</i> IFO 14163 (EF673695)		96
Ac1	5,0	0	0	488/420	<i>Hafnia alvei</i> IC3211 (AB244474)	<i>γ-Proteobacteria</i>	100
A25	0	2,8	7,0	147/316	<i>Sphingobacteriaceae</i> Bakterium 37LGx-1 (AB375750)	<i>Bacterioidetes</i>	99,8
A4	6,8	2,8	2,3		<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 39352 (AJ854059)	<i>Bacterioidetes</i>	92
A10	8,6	2,3	2,3	126/77	<i>Sphingobacterium composti</i> 4M36 (GQ292756)	<i>Bacterioidetes</i>	99,2
A26	0	4,2	4,7	142/420	unkultiviertes Bakterium nbt36f11 (FJ893867)	<i>Actinobacteria</i>	100
					<i>Microbacterium</i> sp. cp-h5 (EU558969)		99,2
Sum ⁴	51,7	33,4	43				

¹ Anzahl der mit ARDRA untersuchten Klone: 81 (Tag 1), 86 (Tag 4), 88 (Tag 6), ² t-RF: terminales Restriktionsfragment, ³ wenn die nächstverwandte Sequenz zu einem nicht kultivierten Bakterium gehörte, wurde zusätzlich das nächstverwandte kultivierte Bakterium angegeben, ⁴ Summe (in %) der Klone mit nur einem ARDRA-Muster

3.3.2 ARDRA von Kompostproben aus Reaktor B

Nach der Untersuchung von Reaktor A wurden die Ergebnisse mit denen des Kompostprozesses 17 von Reaktor B1 verglichen. Für die Untersuchung wurden eine Probe aus der thermophilen Phase (Tag 4, 61 °C) und eine Probe aus der mesophilen Abklingphase (Tag 9, 49 °C) untersucht, die Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. 2.8.1 beschrieben. Die Tabelle 25 zeigt alle untersuchten 16S rRNA-Gensequenzen der Plasmide von Klonen von K17. In der thermophilen Probe konnten ein entfernt mit *Anoxybacillus amylolyticus* (B13) und ein mit *Bacillus* sp. MSP06G (Bm) verwandtes Bakterium mit jeweils einem Anteil von 16 % detektiert werden. Ein Vertreter von *Pseudomonas* sp. (B16) wurde mit 7,4 % detektiert, ein *Bacterioidetes* sp. und ein *Piscibacillus* sp. konnten mit 6,4 % nachgewiesen werden. Die Gruppe der *Firmicutes* dominierten in der heißen Phase. In der mesophilen Abklingphase wurden dafür γ -*Proteobacteria* und *Bacterioidetes* Stämme mit einem hohen Anteil detektiert. Erfolgt ein Summenvergleich aller *Bacterioidetes* Stämme, so stieg ihr Anteil in der mesophilen Abklingphase auf den 3-fachen Wert. *Firmicutes* nahmen dagegen um 40 % ab und waren in dieser Phase scheinbar nicht mehr die vorherrschende Mikroorganismengruppe. Den höchsten Anteil hatten *Bacterioidetes* sp. (B1) mit 10,3 % und *Pseudomonas* sp. (B16) mit 9,3 %.

Die bereits in K2 (Reaktor A) beobachteten Tendenzen traten bei diesem Versuch wesentlich stärker auf. Als Hauptanteil konnte auch hier die Gruppe der *Firmicutes* in der thermophilen Phase ermittelt werden, während eine Zunahme der *Bacterioidetes* in der mesophilen Abklingphase festzustellen war.

Für alle untersuchten Kompostprozesse konnte gezeigt werden, dass die sequenzierten Gene zu den Vertretern der phylogenetischen Gruppen *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacterioidetes* und *Actinobacteria* gehörten. Es ergab sich für die thermophilen Phasen (außer in K1) erwartungsgemäß ein hoher Anteil von grampositiven, endosporenbildenden Bakterien (*Firmicutes*), aber es wurden auch Vertreter gramnegativer, thermophiler Bakterien (z. B. *Bacterioidetes*: *Sphingobacterium composta*; *Proteobacteria*: *Pseudoxanthomonas taiwanensis*) identifiziert.

Weiterhin wurde untersucht, ob eventuell gleiche oder ähnliche Bakterien in den drei verschiedenen Kompostierungsprozessen K1, K2 und K17 nachweisbar waren. Dazu wurden die Sequenzen verglichen, die Ähnlichkeiten zu den 16S rRNA-Genen der gleichen Bakterien aufwiesen. Es konnten bei K1 und K17 mehr Übereinstimmungen gefunden werden, als beim Vergleich mit K2. Dabei zeigten Muster von K1 mit den Mustern von K17 drei

Tabelle 25: Sequenzvergleich der 16S rRNA-Gene mit spezifischen ARDRA-Mustern von Kompostierungsprozess K17 mit den 16S rRNA-Genen aus der RDP-Gendatenbank.

ARDRA-Muster	Tag 7 (61 °C) Prozente der Klone (%) ^{1,4}	Tag 9 (49 °C) Prozente der Klone (%) ^{1,4}	Größe der t-RFs ² (bp) erhalten mit MspI/RsaI	Phylogenetischer Verwandter ³ (Accession number)	Phylogenetische Gruppe	Identität (%)
B13	16	5,7	135/476	unkultiviertes Kompost Bakterium 5-18 (AB034711)	<i>Firmicutes</i>	96,2
				<i>Anoxybacillus amylolyticus</i> MR3C ^T (AJ618979)		89,6
Bm	16	2,3	456/455	<i>Bacillus</i> sp. MSP06G (AB084065)	<i>Firmicutes</i>	100
B2	4,3	3,4		unkultiviertes Bakterium pPD13 (AF252324)	<i>Firmicutes</i>	99,2
				<i>Bacillus thermocloaceae</i> (Z26939)		89,3
B23	3,2	0		unkultiviertes Kompost Bakterium 5-18 (AB034711)	<i>Firmicutes</i>	97
				<i>Bacillus</i> sp. TAT105 (AB066342)		87
B3	6,4	3,4	160/193	unkultiviertes Bakterium; 23s-5; (HM036050)	<i>Firmicutes</i>	100
				<i>Piscibacillus</i> sp. JSM 071073 (EU925621)		93,4
B22	3,2	0		<i>Bacillales</i> bacterium YT0311 (AB362830)	<i>Firmicutes</i>	98,6
B37	3,2	0		<i>Bacillus</i> sp. GB02-46B (DQ079009)	<i>Firmicutes</i>	96,9
B16	7,4	9,2	227/166	unkultivierter Bakterienklon 17s-60 (HM036019)	<i>γ-Proteobacteria</i>	95
				<i>Pseudomonas pertucinogena</i> IFO14163 (EF673695)		94,1
Bd	0	5,7		unkultiviertes Bakterium; 17s-60 (HM036019)	<i>γ-Proteobacteria</i>	99,8
				<i>Pseudidiomarina</i> sp 2PR54-15 (EU440967)		95
B1	6,4	10,3	147/316	<i>Sphingobacteriaceae</i> Bakterium 37LGx-1(AB375750)	<i>Bacteriodetes</i>	99,6
B8	2,1	6,9	82/122	unkultiviertes Bakterium L1142-1N7 (FJ671749)	<i>Bacteriodetes</i>	99
				<i>Flavobacterium</i> sp. W6-14 (DQ659445)		91
B7	1,1	5,7		<i>Flavobacterium</i> sp. W6-14 (DQ659445)	<i>Bacteriodetes</i>	90,3
B10	1,1	3,4		unkultiviertes Kompost Bakterium 2B12 (DQ346496)	<i>Bacteriodetes</i>	98
				<i>Empedobacter</i> sp. B202 (GQ232741)		85
Bb	1,1	2,3		unkultiviertes Bakterium SMG12 (AM930277)	<i>Bacteriodetes</i>	94
				<i>Olivibacter ginsengisoli</i> Gsoil 060 (AB267716)		84,4
B18	0	1,1		<i>Bacteroides</i> sp. 22C (AY554420)	<i>Bacteriodetes</i>	99,9
B11	0	3,4		<i>Flavobacterium</i> sp. LQY-7 (GQ988780)	<i>Bacteriodetes</i>	93

¹Anzahl der mit ARDRA untersuchten Klone: 93 (Tag 7), 87 (Tag 9), ²t-RF: terminales Restriktionsfragment, ³wenn die nächstverwandte Sequenz zu einem nicht kultivierten Bakterium gehörte, wurde zusätzlich das nächstverwandte kultivierte Bakterium angegeben, ⁴Summe der Klone mit nur einem ARDRA-Muster: Tag 7 u. 9 mit 28,5 u. 37,2 %.

Übereinstimmungen: C11-Bd, C39-B3 und C5-B8. Es wurden zwei ähnliche Sequenzen von K2 im Vergleich mit Sequenzen von K17 gefunden: A30-B13 und A25-B1 und im Vergleich von K1 und K17 fanden sich ebenfalls zwei bei C28-A25 und C23-A21. Ein Klon trat in allen drei untersuchten Kompostierungsprozessen (C28, A25 und B1) auf und wies nach dem Vergleich der Sequenzen mit dem Programm *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) eine hohe Sequenzhomologie auf (Anhang 16). Die Unterschiede betragen zwischen einem und 15 bp, die Restriktionsschnittstellen (*MspI/RsaI*) der untersuchten 16S rRNA-Gensequenzen waren gleich (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus zur Verfolgung der Populationsdynamik

Zur Vorbereitung der t-RFLP-Analysen der Kompostproben wurden die terminalen Restriktionsfragmente (t-RF) von ausgewählten Isolaten bestimmt. Außerdem wurden die t-RFs von Klonen, die mit häufigen ARDRA-Mustern in den Klonbibliotheken vorkamen, ebenfalls auf ihre t-RFs analysiert.

3.3.3.1 Detektion ausgewählter Bakterien durch t-RFLP

Nach Anzucht der Bakterien in NB wurde die DNA, wie unter Kap. 2.8.1 beschrieben, extrahiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation mit den Primern fD1-6-Fam und Eub534r (Tabelle 9, Kap. 2.8.3). Das gereinigte Produkt wurde jeweils einzeln mit den Enzymen *MspI*, *RsaI*, *AluI* und *BsuRI* verdaut und mittels Kapillarelektrophorese im Vergleich mit einem internen Nukleinsäurelängenstandard (ROX 500) aufgetrennt und analysiert (Kap. 2.8.10). Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu bestätigen, wurde von einer Kompostprobe (K17, Tag 10) 3× die DNA wie in Kap. 2.8.1.2 extrahiert und die Populationsdynamik mit t-RFLP untersucht (Kap. 2.8.10). Die t-RFLP-Profile sind im Anhang 18 dargestellt. Der Vergleich zeigte, dass mit allen vier Enzymen eine Reproduzierbarkeit möglich ist. Die Populationsuntersuchungen ergaben ähnliche t-RFLP-Profile und es kann somit davon ausgegangen werden, dass eine hohe Vergleichbarkeit der Proben bestand.

Da *MspI* und *RsaI* ein breites Spektrum von t-RFs im Größenbereich zwischen 50 und 550 bp lieferten, wurden sie für die t-RFLP-Analysen der Kompostprozesse verwendet. Die ermittelten t-RFs nach Restriktion mit *MspI*, *RsaI*, *AluI* und *BsuRI* für die in dieser Arbeit für weitere Untersuchungen ausgewählten Isolate sind in Tabelle 26 dargestellt. Die von anderen

Isolaten bestimmten t-RFs sind in Tabelle 21 ersichtlich. Die t-RFs der untersuchten Klone sind in Tabelle 24, 25 und im Anhang 2 ersichtlich.

Tabelle 26: Experimentell ermittelte terminale Restriktionsfragmente (t-RFs) von ausgewählten Bakterienstämmen.

Stamm	Größe der t-RFs [bp]			
	MspI	RsaI	AluI	BsuRI
<i>Geobacillus pallidus</i> Stamm 29-10-PAA & MS-X1	149	446 + 464	66	233
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> Stamm 16-2A	132	473	75	233
<i>Bacillus thermoamylovorans</i> Stamm 8-4-7	133+145	465	69	235
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i> Stamm 17-1-2	165	476	74	235
<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> Stamm 16-2-VM-2	86	473	72	31
<i>Bacillus</i> sp. Stamm 8-4-E12	145	453 + 471	75	311
<i>Arthrobacter arilaitensis</i> Stamm 9-4-E3	280	451	236	227
<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> Stamm 24-4-1	136	448	67	230
<i>Sphingobacteriaceae</i> sp. Stamm 28-4-3	147	316	71	28

3.3.3.2 Untersuchungen der Populationsdynamik in Reaktor A

Durch Untersuchungen mittels ARDRA (Kap. 3.3.2) konnte gezeigt werden, dass sich die Populationszusammensetzung in Abhängigkeit von der Temperatur deutlich veränderte, wobei nur ausgewählte Zeitpunkte beobachtet werden konnten. Durch t-RFLP sollte nun die Dynamik der Populationszusammensetzung genauer untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Punkt war dabei auch die Untersuchung des Einflusses der Hygienisierung auf die Populationszusammensetzung. Die t-RFLP wurde ebenfalls hinsichtlich der Primer optimiert (Daten nicht gezeigt), wobei die PCR unter Verwendung des reversen Primers Eub534r größere Produktmengen ergab als die PCR mit dem reversen Primer rP2 und daher routinemäßig für alle t-RFLP-Analysen eingesetzt wurde. Mit diesem Verfahren (Kap. 2.8.10) wurden von Reaktor A der Kompostierungsprozess 2 und von Reaktor B1 die Kompostierungsprozesse 14 und 17 im zeitlichen Verlauf untersucht. In Abbildung 11 ist am Beispiel von K2 (Reaktor A) die Populationsdynamik eines Kompostierungsprozesses mit Selbsterhitzung (ohne Hygienisierungsphase) gezeigt. Die Zuordnung zu einem bestimmten Organismus konnte nur dann erfolgen, wenn mit mindestens zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen übereinstimmende t-RFs ermittelt werden konnten, dabei wurde immer der relative Peakflächenanteil betrachtet. In der mesophilen Anlaufphase wurden vor allem t-RFs im Bereich von 50-200 bp beobachtet (Input & Tag 1). An Tag 1 war noch keine signifikante Veränderung der Populationsdynamik sichtbar. Mit steigender Temperatur etablierten sich dann neue Populationen mit t-RFs im Bereich von 400-500 bp. Ausgewählte

t-RFs zeigten jedoch eine deutliche, zeitliche Veränderung ihres relativen Anteils an der Gesamtfläche aller Peaks (Tabelle 24). Fragment A25 trat zuerst an Tag 1 (13 °C) auf, blieb am Tag 2 konstant im Vergleich zu den relativen Anteilen der anderen Fragmente und erreichte am Tag 4 sein Maximum. Der relative Anteil blieb über den ganzen Prozessverlauf hoch, was mit den ARDRA-Ergebnissen korreliert. Das t-RF A28 blieb über den gesamten Prozessverlauf relativ konstant, fiel jedoch am Tag 6 (38 °C) rapide ab. Da der entsprechende Klon das 16S rRNA-Gen von *Ureibacillus thermosphaericus* repräsentierte (Tabelle 26) und das Wachstumsoptimum dieser Bakterien eher bei hohen Temperaturen liegt (Anhang 21), deutet die beobachtete Abnahme der Peakfläche auf einen Rückgang der Bakterien bei sinkenden Temperaturen hin.

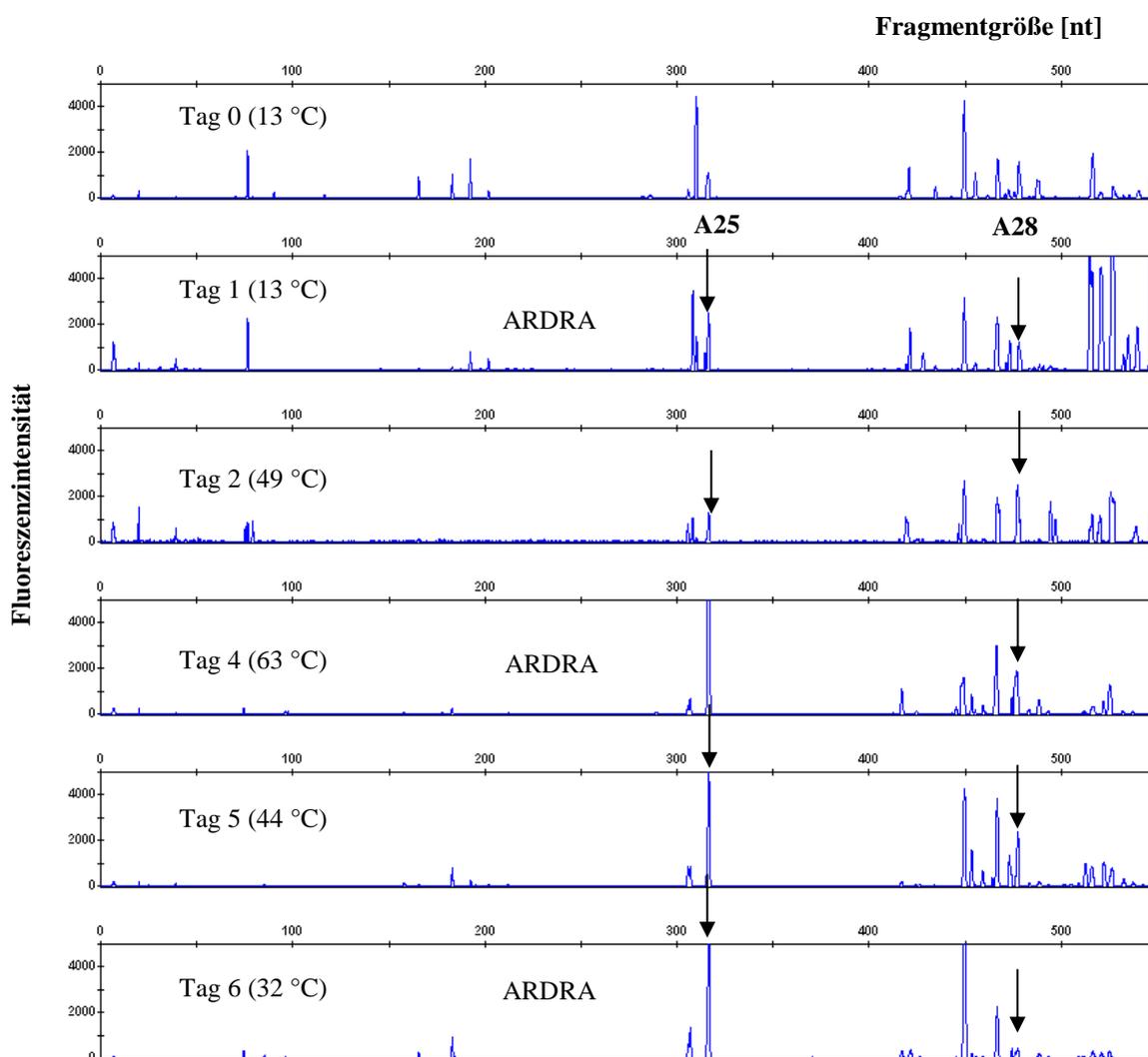


Abbildung 11: Verfolgung der Populationsdynamik im Kompostierungsprozess 2 (Reaktor A) durch t-RFLP-Profil. Als Restriktionsenzym diente RsaI (MspI siehe Anhang). Die Pfeile zeigen t-RFs, welche durch t-RFLP von 16S rRNA-Genen häufiger ARDRA-Muster identifiziert wurden (siehe auch Klonbibliothek K2 in Tabelle 24). A25 und A28 repräsentieren das *Sphingobacteriaceae*-Bakterium 37LGx-1 und *Ureibacillus thermosphaericus*. Der für die t-RFLP-Analyse genutzte DNA-Extrakt wurde auch für ARDRA genutzt (Tabelle 24, Kap. 3.3.2, Kap. 2.8.7) Die Temperatur der untersuchten Kompostproben ist mit angegeben.

3.3.3.3 Untersuchungen der Populationsdynamik von Reaktor B1

Die Untersuchung von Reaktor B1 erfolgte analog der Proben von Reaktor A (Kap 2.8.10). Die t-RFs von ausgewählten Klonen von K17 sind in Tabelle 25 dargestellt. Sie wurden zur Zuordnung von entsprechenden t-RFs im t-RFLP-Profil von K17 genutzt. In Abbildung 12 (und Anhang 4) sind die untersuchten t-RFLP-Profile der Proben von K17 gezeigt. Anhand der Peaks wird deutlich, dass die Populationszusammensetzung über den Gesamtzeitraum zum Teil reversiblen Änderungen unterlag. Zu beobachten war dies besonders während der natürlichen Selbsterhitzung (Übergang von 48 auf 61 °C), wo zum Teil Peaks im Bereich zwischen 300-325 bp abnahmen. Bei der anschließenden Abkühlung (Übergang von 55-49 °C), erfolgte die Etablierung der Populationen vom Anfang (300-325 bp) und Abnahme der Populationen im Bereich um 450-550 bp. Unter dem direkten Einfluss der Hygienisierung (Probe nach 6 h, 72 °C) erfolgte keine Veränderung, jedoch nach der Hygienisierung und der anschließenden Abkühlung (57 °C) verschwanden die Peaks im Bereich bis 400 bp, was auf Bakterien schließen lässt, die nicht an hohe Temperaturen angepasst sind. Im weiteren Verlauf der mesophilen Abklingphase (Tag 14 und 15) konnten sich diese Populationen dann wieder teilweise erholen. Die Zuordnung der t-RFs, die von den 16S rRNA-Gensequenzen der Klone bestimmt wurden (Tabelle 25), konnten auch in den t-RFLP-Profilen gefunden werden. Das zu ARDRA-Muster B8 (*Flavobacteria* sp.) gehörende t-RF wurde insbesondere an Tag 4, 9 und 10 beobachtet. B16, zu einem *Pseudomonas* Stamm gehörend, wurde mit hohem Anteil an Tag 9 gefunden, wo auch durch ARDRA eine Häufigkeit von etwa 9 % detektiert wurde. B1 (*Sphingobacteriaceae*-Bakterium) wurde insbesondere in der Anfangsphase (Tag 4, 48 °C) detektiert, war dann bei der höchsten Temperatur (61 °C) in der Selbsterhitzungsphase kaum vorhanden, wurde aber anschließend wieder an Tag 9 (49 °C) beobachtet. Es zeigte sich, dass das zu B1 zugeordnete t-RF hauptsächlich bei Temperaturen unter 50 °C sein scheinbares Maximum erreicht hatte, was mit der hohen prozentualen Häufigkeit in der Klonbibliothek von Tag 9 korreliert. Das t-RF von Bm (*Bacillus* sp.) wurde durchgängig gefunden, mit einem hohen Anteil am 7. Kompostierungstag, was wiederum mit der prozentualen Häufigkeit bei ARDRA korrelierte. Der Peakflächenanteil von Bm war während und nach der Hygienisierung hoch, was vermutlich auf den thermophilen Charakter des entsprechenden Bakteriums hindeutete (Pedro *et al.*, 2003). Von besonderem Interesse war der Einfluss der Hygienisierung auf die Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft. Es wurde beobachtet, dass sich nach 6 h Hygienisierungszeit (72 °C) hinsichtlich der dominanten t-RFs

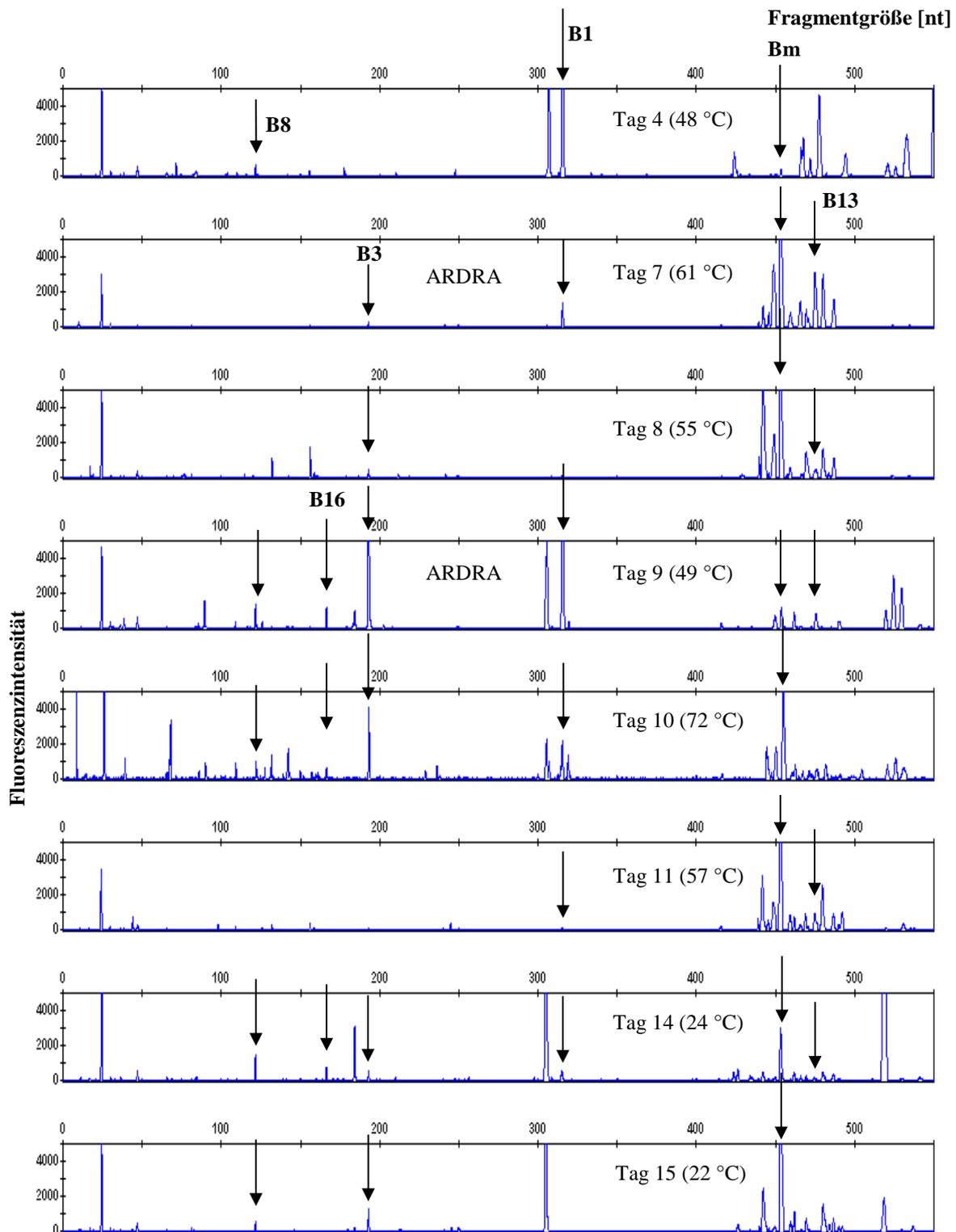


Abbildung 12: Verfolgung der Populationsdynamik im Kompostierungsprozess 17 (Reaktor B1) mit Hygienisierung durch t-RFLP. Die Profile aus der Hygienisierung (Tag 10, 72 °C) und nach der Hygienisierung (Tag 11, 57 °C) stammen von Proben, die sechs Stunden nach Beginn der Hygienisierung bzw. nach Ende der insgesamt 11-stündigen Hygienisierung und einer anschließenden 12,5-stündigen Abkühlung entnommen wurden. Als Restriktionsenzym diente RsaI. Die Pfeile zeigen t-RFs, welche durch t-RFLP von 16S rRNA-Genen häufiger ARDRA-Muster identifiziert wurden (siehe auch Klonbibliothek K17 in Tabelle 25). Die t-RFs sind den *Bacteria: Sphingobacteriaceae* Bakterium 37LGx-1 (B1), *Piscibacillus* sp. (B3), *Flavobacterium* sp. (B8), *Bacillus* sp. (B13), *Pseudomonas pertucinogena* (B16) und *Bacillus* sp. MSP06G (Bm) zuzuordnen. ARDRA: Der für die t-RFLP verwendete DNA-Extrakt wurde auch für ARDRA genutzt. Die Temperatur der einzelnen Kompostierungstage ist mit angegeben. MspI-Profil siehe Anhang 4.

eine fast komplett andere Populationszusammensetzung, verglichen mit dem Vortag, zeigte. Während sich die Populationen in der vorherigen Abkühlphase scheinbar wieder der beginnenden Selbsterhitzung (Tag 4) annäherten, nahm während und nach der Hygienisierung z. B. das t-RF B1 stark in seiner Fläche ab, und es entwickelten sich wieder Populationen, die in der Selbsterhitzungsphase dominant waren (z. B. B13) und auf Endosporenbildenden schließen ließen.

Bei Reaktor B1 zeigten sich ähnliche Tendenzen wie bei Reaktor A. Es konnten deutlich die Veränderungen in der Populationszusammensetzung anhand der Veränderung der t-RFLP Profile beobachtet werden. Es wurde außerdem versucht, die t-RFs von isolierten Bakterien in den t-RFLP-Profilen nachzuweisen (Tabelle 26, Daten nicht gezeigt, Schmidt, 2009). So wurden Hinweise auf die Existenz der isolierten Stämme *G. pallidus* und *B. thermoamylovorans* erhalten. Der Stamm *G. pallidus* war scheinbar nur in der Selbsterhitzungsphase (bei 61 und 55 °C) nachweisbar, dagegen konnten t-RFs, die denen von *B. thermoamylovorans* entsprachen, über den gesamten Kompostierungsverlauf detektiert werden. Auch *U. thermosphaericus* und *P. taiwanensis* waren bei hohen Temperaturen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Um zu untersuchen, ob in einem anderen Kompostierungsprozess im Reaktor B1 ähnliche Organismen durch t-RFLP nachweisbar waren, wurde der Kompostprozess 14 herangezogen. Bei K14 erfolgte eine Zusatzbefüllung an Tag 29 und zwei Hygienisierungsphasen (Tag 22 und 36). Die Untersuchungen der Populationsdynamik begannen mit Tag 21, der mesophilen Abklingphase nach einer Selbsterhitzung und sind im Anhang 7 dargestellt. Es konnten t-RFs, welche ebenfalls in K17 nachgewiesen wurden, auch in den t-RFLP-Profilen von K14 detektiert werden. Ein B16 entsprechendes t-RF (*Gammaproteobacterium*) wurde an den Tagen 21 und 22 nachgewiesen. Das t-RF B3 repräsentiert einen Vertreter der *Firmicutes* und war fast über den gesamten Prozess nachweisbar, wobei es besonders während der Selbsterhitzungsphase (Tag 31-32, 48-61 °C) zunahm. Auch in K17 konnte dieses t-RF bei hohen Temperaturen beobachtet werden. Am Tag 30 trat zum ersten Mal ein t-RF von 316 bp auf, das dem Muster B1 entspricht. Es blieb konstant hoch und erreichte seine maximale Peakfläche an Tag 32 (61 °C).

Damit konnte gezeigt werden, dass Sequenzinformationen aus vorhergehenden und nachfolgenden Kompostierungsversuchen für die Analyse der Populationsdynamik in anderen Prozessen genutzt werden können und sich t-RFs von Klonen anderer Kompostierungsprozesse wiederfinden lassen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die t-RFLP-Methode eine gute Methode darstellt, um die Veränderungen der Populationen im Kompost zu beobachten.

3.3.4 Verfolgung von ausgewählten Mikroorganismen mittels quantitativer PCR (q-PCR)

Jeweils ein Kompostierungsprozess aus Reaktor A (K2) und einer aus Reaktor B1 (K17) wurde ausgewählt, um bestimmte Mikroorganismen mittels q-PCR im Prozess zu verfolgen. Mit der Software *Arb* (Ludwig *et al.*, 2004) wurden artspezifische, gegen die 16S rRNA-Gene gerichtete Primer ausgewählt. Um einen Überblick über die Gesamtzahl aller bakteriellen 16S rRNA-Gene zu erhalten, wurde ein universelles Primerpaar Eub341f und Eub534r (Muyzer *et al.*, 1993, Tabelle 9) eingesetzt. Alle weiteren ausgewählten Primer sind in Tabelle 12 gezeigt. Als Standard wurden Plasmide, die das jeweilige 16S rRNA-Gen der Zielorganismen enthielten, mitgeführt (siehe Tabelle 5, 14). Die Durchführung erfolgte wie unter Kap. 2.8.3.3 beschrieben. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, als Negativkontrolle wurde ddH₂O eingesetzt. Durch die q-PCR wurde die Gen-Kopienzahl der entsprechenden 16S rRNA-Gene in der aus einer Kompostprobe extrahierten DNA bestimmt und auf 1 g Kompostfrischgewicht (FG) bezogen. So konnten die Änderungen der 16S rRNA-Genkopienzahlen in den Proben verfolgt werden. Als *template* diente die mit dem „PowerSoil™ DNA Isolation Kit“ extrahierte Kompost-DNA (Kap. 2.8.1.1).

Zur Quantifizierung wurden vorrangig thermophile Bakterien ausgewählt. Dazu zählten *U. thermosphaericus* und *P. taiwanensis*, welche aus Kompostproben von K2 isoliert und auch durch ARDRA in K2 nachgewiesen worden (Tabelle 24 und 26). *Geobacillus pallidus* wurde aus Kompost 2 und 10 isoliert und durch ARDRA (mit fD1/rP2) in Kompost 2 nachgewiesen (ARDRA Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden *Bacillus thermoamylovorans* und das thermotolerante Bakterium *Bacillus* sp. 8-4-E12 ausgewählt, die aus Kompost 14 isoliert worden waren. Diese Bakterien wurden mittels q-PCR von K2 und K17 in der Arbeit von M. Schmidt (2009) untersucht.

Von einer Kompostprobe von K17 wurden mit dem „PowerSoil™ DNA Isolation Kit“ (Kap. 3.3.3.1) 2× DNA extrahiert. Beide DNA-Extrakte wurden, um die Vergleichbarkeit der q-PCR bei der Analyse von Kompostproben zu überprüfen, für die q-PCR eingesetzt. Es wurden die 16S rRNA-Genkopienzahlen von der Gesamtbakterienzahl (*Bacteria*), *B. thermoamylovorans* und *Bacillus* sp. 8-4-E12 wie in (Kap. 2.8.3.3) bestimmt. Es konnte bei beiden Extrakten ein vergleichbar hoher Anteil an 16S rRNA-Genkopienzahlen beobachtet werden (siehe Anhang 6). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Extrakte, trotz der Heterogenität des Materials, einen entsprechenden Anteil an den untersuchten Bakterien besaßen.

In Abbildung 13 ist die Populationsdynamik ausgewählter Bakterien in Kompostierungsprozess 2 mittels q-PCR gezeigt. Die Untersuchungen von K2 zeigten einen durchschnittlichen Anteil an *Bacteria* von ca. $1,6 \times 10^{10}$ Genkopienzahl/g FG, der geringfügig in der Selbsterhitzungsphase anstieg, jedoch an Tag 5 (44 °C) unter eine Genkopienzahl von 1×10^{10} abfiel, sich aber schnell erholte und schon an Tag 6 wieder das Ausgangsniveau erreichte.

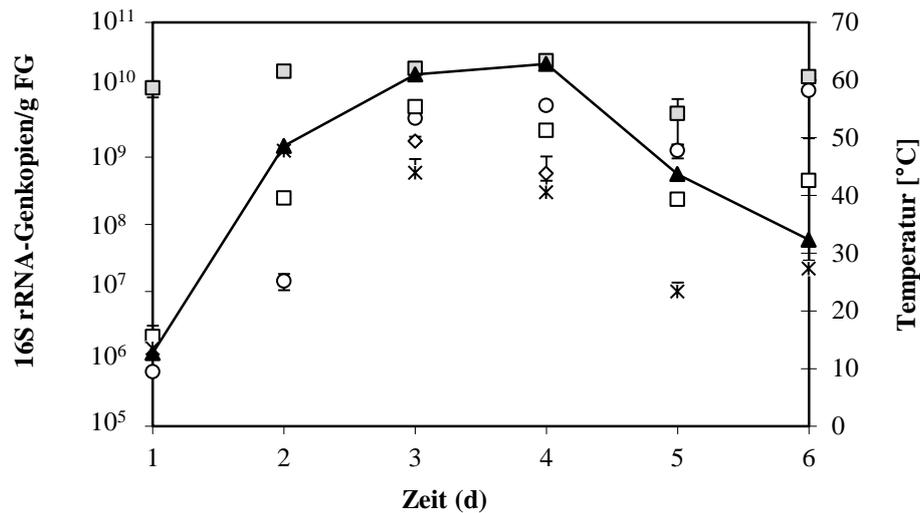


Abbildung 13: Populationsdynamik ausgewählter Bakterien in Kompostierungsprozess 2, erfasst durch die Kopienzahl der 16S rRNA-Gene mittels q-PCR und mit spezifischen Primern pro g FG. Als Vergleich wurden die Kopienzahlen aller bakterieller 16S rRNA-Gene angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei q-PCR-Versuchen von *G. pallidus* (◇), *B. thermoamylovorans* (X), *P. taiwanensis* (○), *U. thermosphaericus* (□), gesamt *Bacteria* (□), Temperatur (▲).

Die ermittelte Genkopienzahl/g FG von *U. thermosphaericus* zeigte in der Selbsterhitzungsphase einen starken Anstieg, was auch mit seinem hohen Temperaturoptimum (55 °C; Anhang 21) korreliert. Auch *P. taiwanensis* folgte scheinbar dem Temperaturverlauf in der Selbsterhitzungsphase. *P. taiwanensis* zeigte nach der Selbsterhitzung einen weiteren Anstieg auf $9,7 \times 10^9$ Genkopienzahlen/g FG. Obwohl dieser Stamm seine optimale Wachstumstemperatur zwischen 40-50 °C zeigte (Anhang 21), wurde er mit einer hohen Genkopienzahl auch bei Temperaturen von über 60 °C detektiert. Der untersuchte Stamm *B. thermoamylovorans* wurde an allen Untersuchungstagen nachgewiesen und hatte die höchste Genkopienzahl/g FG mit $1,2 \times 10^9$ Tag 2 (49 °C), nahm jedoch anschließend kontinuierlich ab. *G. pallidus* wurde in Wachstumsuntersuchungen als thermophiles Bakterium eingestuft, das insbesondere bei Temperaturen bis 70 °C optimal wuchs (Anhang 21). So war es nicht verwunderlich, dass er nur in der Phase mit den höchsten

Temperaturen (Tag 5 und Tag 6: 61, 63 °C) nachgewiesen wurde. Die 16S rRNA-Genkopienzahl von $1,7 \times 10^9$ und $5,7 \times 10^8$ /g FG waren dennoch niedriger als die von *U. thermosphaericus* und *P. taiwanensis*. Deutlich wurde, dass häufig die Genkopienzahlen der 16S rRNA-Gene der untersuchten Bakterien mit dem Temperaturanstieg des Prozesses korrelierten. Da die Organismen jedoch unterschiedliche Optima bei ihren Wachstumstemperaturen (Kap. 3.6.1) hatten, ist es erklärlich, dass die maximalen Genkopienzahlen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wurden.

Für Reaktor B1 wurde Kompostprozess 17 untersucht. In Abbildung 14 ist die 16S rRNA-Genkopienzahl/g FG der untersuchten Bakterien im Verlauf der Kompostierung gezeigt. Der schwarze Pfeil demonstriert hier die Hygienisierungsphase. Es wurden alle untersuchten Organismen nachgewiesen und die maximalen Genkopienzahlen wurden im selben Temperaturbereich wie bei K2 detektiert. Die bakterielle Gesamtzellzahl war relativ konstant mit durchschnittlich $3,4 \times 10^9$ 16S rRNA-Genkopien/g FG. Für *B. thermoamylovorans* wurde auch bei K17 die höchste Genkopienzahl/g FG bei 48 °C (Tag 4) detektiert und nahm während der weiteren Selbsterhitzung und auch während der anschließenden Hygienisierung wieder ab. *P. taiwanensis* erreichte seine höchste Genkopienzahl/g FG in der Abkühlphase nach der Selbsterhitzung bei 49 °C (Tag 9) mit $3,7 \times 10^8$, fiel jedoch während der Hygienisierung (Tag 10, 72 °C) auf $3,1 \times 10^7$ ab und nahm, anders als bei K2, während der Abkühlungsphase auch nicht wieder zu. *U. thermosphaericus* erreichte seine maximale Genkopienzahl/g FG an Tag 7 bei 61 °C, so wie in K2 (Tag 5, 61 °C).

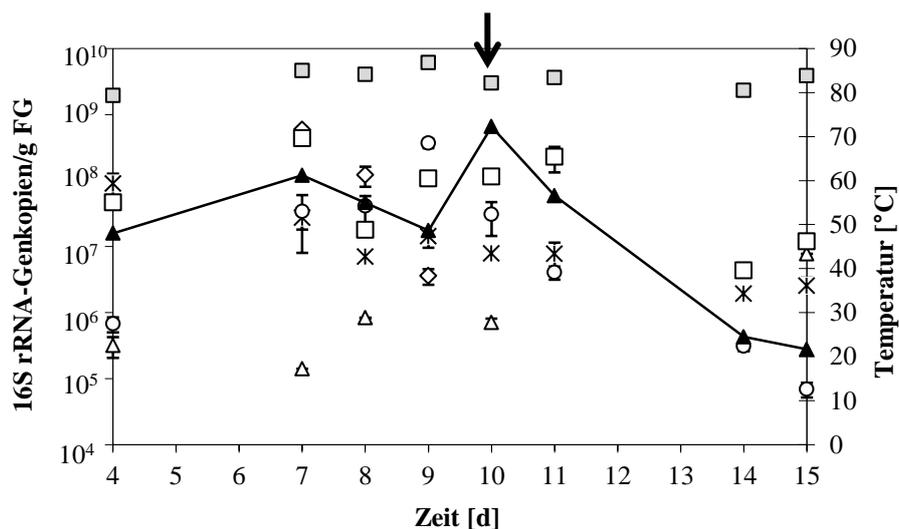


Abbildung 14: Populationsdynamik ausgewählter Bakterien in Kompostierungsprozess 17, erfasst durch die Kopienzahl der 16S rRNA-Gene mittels q-PCR und mit spezifischen Primern pro g FG. Als Vergleich wurden die Kopienzahlen aller bakterieller 16S rRNA-Gene angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei q-PCR-Versuchen von *G. pallidus* (◇), *B. thermoamylovorans* (X), *P. taiwanensis* (○), *U. thermosphaericus* (□), gesamt *Bacteria* (□), Temperatur (▲), *Bacillus* sp. Stamm 8-4-E12 (△), Hygienisierung (Pfeil).

Die Genkopienzahl blieb auch während und nach der Hygienisierungsphase konstant bei hohen Werten von ca. $1,1 \times 10^8$ /g FG, fiel jedoch zum Ende der Kompostierung rapide ab. Wie auch schon bei K2 beobachtet, wurde *G. pallidus* nur 3× detektiert und zwar wieder in der Selbsterhitzungsphase (Tag 7, 61 °C) mit $5,9 \times 10^8$ /g FG und kurz danach. In der Hygienisierungsphase wurde er nicht mehr detektiert. Diesmal wurde auch *Bacillus* sp. 8-4-E12 mittels q-PCR untersucht. Obwohl das Isolat ein optimales Wachstum zwischen 30 und 45 °C zeigte, waren seine Genkopienzahlen im Kompost um mehrere Größenordnungen geringer, als die der anderen untersuchten Bakterien. Es konnte beobachtet werden, dass gerade in der Selbsterhitzungsphase eine Abnahme der Genkopienzahl erfolgte. Nach der Hygienisierungsphase wurde *Bacillus* sp. 8-4-E12 nicht mehr bzw. erst am Ende der Abkühlphase nachgewiesen. Die Hygienisierungsphase, mit Temperaturen um 70 °C, zeigte scheinbar nur einen Einfluss auf *P. taiwanensis* und *Bacillus* sp. 8-4-E12.

3.4 Untersuchungen mittels Chinonanalyse

Eine weitere Möglichkeit zur kultivierungsunabhängigen Untersuchung der Populationsstruktur während der Kompostierung stellt die Untersuchung der Chinone dar. Es wurden von Reaktor A Kompostierungsprozess 2 und von Reaktor B1 Kompostierungsprozess 14 und 17 untersucht. Für die Analyse wurden je 2 g Kompostmaterial wie unter Kap 2.9.2 beschrieben aufgearbeitet. Anschließend wurden die Chinone mittels HPLC wie bei Hiraishi *et al.* (1999, 2000) analysiert und als molarer Anteil an der Summe aller Chinone (mol-%) ausgedrückt. Ubichinone (UQ) sind dabei ein Indiz für das Vorkommen von *Proteobacteria*, gesättigte Menachinone (MK) sind dagegen eher in *Firmicutes* und *Bacteroidetes* vorhanden (Hiraishi *et al.*, 1999).

In Abbildung 15 a ist die Verteilung der Chinone von K2 dargestellt. Deutlich zeigt sich gleich zu Beginn der Kompostierung mit 16 mol-% ein hoher Anteil an UQ-9, was für γ -*Proteobacteria* sprechen würde. Weiterhin wurde MK-7 mit 27 mol-% als dominantestes Chinon detektiert. An Tag 1 (13 °C), nahm UQ-9 nochmals zu und auch UQ-10 stieg an (25 mol-%), während MK-7 und MK-8 beide um 50 % abnahmen. Im Kompostierungsprozess und mit steigender Temperatur wurden eine Abnahme von UQ-10 und eine Zunahme von MK-7 beobachtet. Dabei zeigte sich, dass MK-7 ab Tag 3 (61 °C) das am häufigsten vertretene Chinon in der Untersuchung war und auch im weiteren Verlauf konstant hoch blieb. Mit einem Anteil von über 30 mol-% in der Selbsterhitzungsphase und anschließenden Abkühlphase wurden die Ubichinone nur schwach detektiert, während auch die Menachinone MK-8 und MK-9, zwar in geringem Anteil aber konstant vorhanden waren.

Über den gesamten Prozess wurde UQ-7 nachgewiesen. Die Analyse des Spektrums im Diodenarraydetektor wies die Verbindung eindeutig als Ubichinon aus und die Retentionszeit wies im Vergleich mit authentischen Standards auf einen Seitenkettenrest von sieben Isopreneinheiten hin. Dieses Chinon wurde bisher in einigen Hefen und nur ausnahmsweise in Bakterien nachgewiesen (Suzuki & Nakase, 1998), konnte jedoch nicht eindeutig einer Organismusgruppe in dieser Arbeit zugeordnet werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass kaum Menachinone mit ungesättigten Isopren-Seitenketten, welche auf *Actinobacteria* hinweisen würden, detektiert wurden. Das bestätigte auch die Untersuchungen mittels ARDRA, wo ebenfalls nur eine niedrige Anzahl an *Actinobacteria* nachweisbar war.

Die Chinonzusammensetzung der Kompostierungsprozesse 14 und 17 wurde untersucht, um weitere Hinweise für die Veränderungen der Populationsstruktur durch Selbsterhitzung und Hygienisierung zu erhalten. In Abbildung 15 c ist der molare Anteil der untersuchten Chinone von K14 gezeigt. Es wurde wiederum nur der Zeitraum von 21-37 Tagen untersucht. An Tag 21 (33 °C) und während der am Tag darauf durchgeführten ersten Hygienisierung (Probenahme 2 h nach Beginn) wurden UQ-8 und UQ-9 in hohem Anteil nachgewiesen. Das ebenfalls dominante MK-7 nahm während der Hygienisierung geringfügig ab, was für eine Schädigung der *Firmicutes* und *Bacterioidetes* sprechen könnte. Am Tag nach der Hygienisierung zeigte sich dann ein komplett anderes Bild. Die Chinone UQ-8 und UQ-9 waren auf unter 4 mol-% abgesunken, was eine starke Unterdrückung der *Proteobacteria* vermuten ließ. Dagegen wurde MK-7 mit 42 mol-% detektiert und auch MK-8 stieg um das Doppelte an. Weiterhin wurden Menachinone mit partiell gesättigten Seitenketten (MK-8-(H₂)) und MK-9-(H₂)) vermehrt detektiert (im Diagramm unter partiell gesättigte Menachinone zusammengefasst), was auf eine Zunahme von *Actinobacteria* schließen ließ (Hiraishi *et al.*, 2003b). Tatsächlich konnten aus diesem Kompostierungsprozess drei Vertreter der *Actinobacteria* isoliert werden (*Arthrobacter arilaitensis* Stamm 9-4-E3, Stamm 9-4-13 und *Arthrobacter mysorens* Stamm 9-4-E2, Tabelle 21). Über die folgenden Tage der Abkühlung zeigte sich eine kaum veränderte Zusammensetzung mit UQ-8, UQ-9, MK-7 und partiell-gesättigten MKs als Hauptkomponenten. In der nach der Zusatzbefüllung (Tag 28) einsetzenden Selbsterhitzung (Tag 32, 61 °C) nahmen letztere MKs wieder stark ab. Anders als nach der ersten Hygienisierung (Tag 22) konnten nach der zweiten Hygienisierung (Tag 36, 72 °C) keine großen Änderungen der Chinonzusammensetzung beobachtet werden. Es kann vermutet werden, dass dies an der höheren Ausgangstemperatur lag, die der Kompost vor der Hygienisierung besaß (40 statt 33 °C). Die Verteilung der Chinone in K17 (Abbildung 15 b) ähnelte stärker der in K2 beobachteten Zusammensetzung (Abbildung 15 a) mit einem

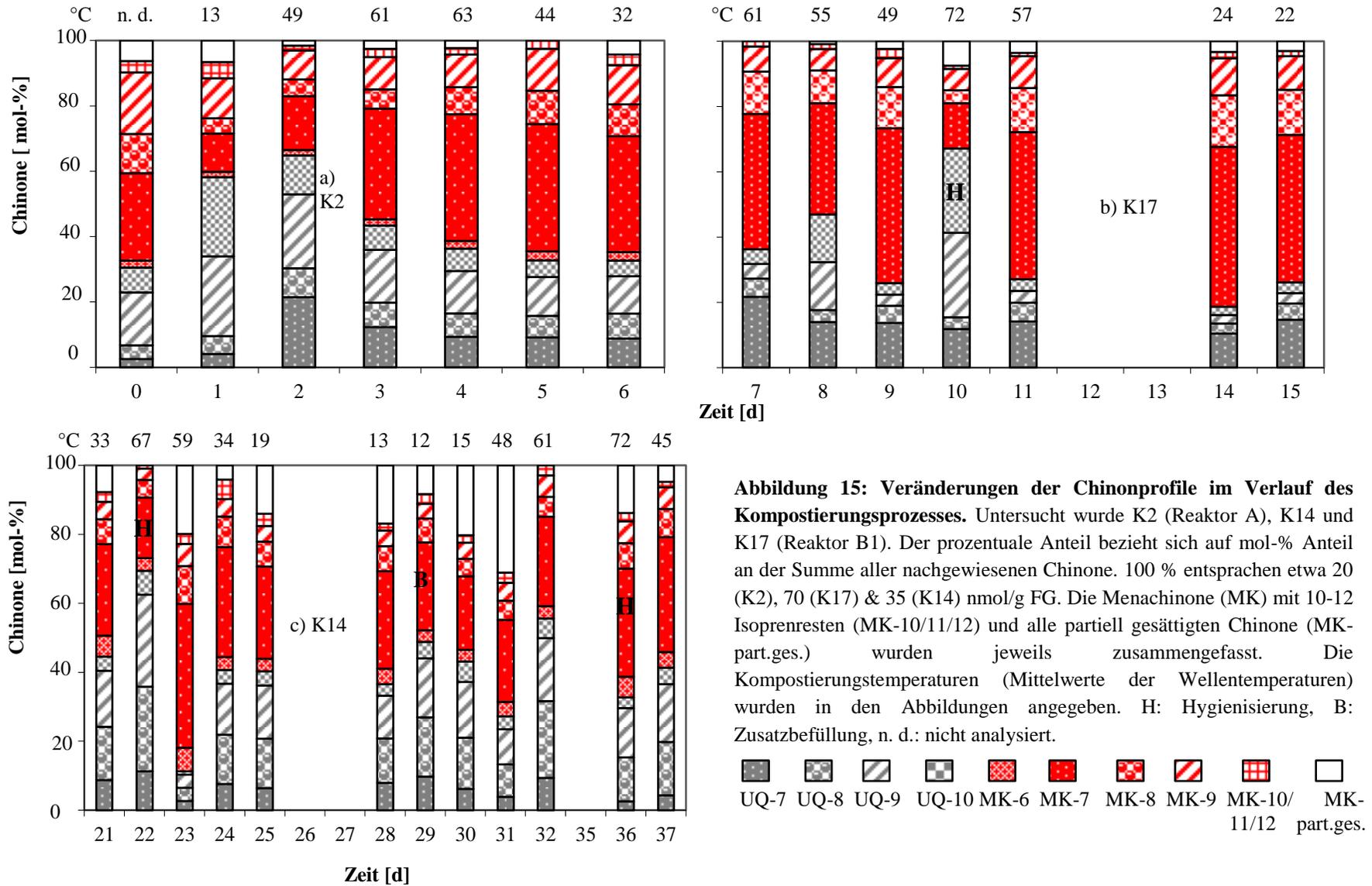


Abbildung 15: Veränderungen der Chinonprofile im Verlauf des Kompostierungsprozesses. Untersucht wurde K2 (Reaktor A), K14 und K17 (Reaktor B1). Der prozentuale Anteil bezieht sich auf mol-% Anteil an der Summe aller nachgewiesenen Chinone. 100 % entsprachen etwa 20 (K2), 70 (K17) & 35 (K14) nmol/g FG. Die Menachinone (MK mit 10-12 Isoprenresten (MK-10/11/12) und alle partiell gesättigten Chinone (MK-part.ges.) wurden jeweils zusammengefasst. Die Kompostierungstemperaturen (Mittelwerte der Wellentemperaturen) wurden in den Abbildungen angegeben. H: Hygienisierung, B: Zusatzbefüllung, n. d.: nicht analysiert.

relativ hohen Anteil an Ubichinonen und MK-7 als dominantes Chinon. Letzteres lässt auf einen hohen Anteil an *Firmicutes* oder *Bacteroidetes* im Prozess schließen. In der Hygienisierungsphase (Tag 10, 6 h nach Hygienisierungsbeginn, 72 °C) kam es zu einem relativ hohen Anstieg von UQ-10 auf über 30 mol-% bei gleichzeitigem rapiden Abfall von MK-7. Die Abnahme von MK-7 stimmt auch mit den Beobachtungen eines starken Rückgangs des t-RFs B1 überein, das einem *Sphingobacteriaceae* Bakterium zugeordnet werden konnte (Abbildung 14, Tabelle 25). Dagegen gab es aus den Sequenzen der 16S rRNA-Genbanken keine Hinweise auf das Vorkommen von UQ-10-enthaltenden α -*Proteobacteria* in K17. Nach der Hygienisierung an Tag 11 (57 °C) wurde dann wieder eine ähnliche Chinonverteilung wie vor der Hygienisierung beobachtet. Durch die Untersuchung der Chinone im Kompostierungsprozess konnte gezeigt werden, dass die Hygienisierung, wenn auch nur kurzfristig, zu einer Veränderung der Mikroorganismengemeinschaft zu führen scheint.

3.5 Untersuchungen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Durchführung der Chinonanalyse zeigte, dass insbesondere MK-7 dominant vertreten war. MK-7 ist das Hauptchinon in vielen Vertretern der *Firmicutes*, aber auch der *Bacteroidetes* (Hiraishi *et al.*, 1999) Mittels ARDRA konnten neben *Bacilli* auch *Bacteroidetes* nachgewiesen werden. Nun sollte durch FISH der Anteil stoffwechselaktiver *Firmicutes* und *Bacteroidetes* bestimmt werden, um die Häufigkeit dieser Gruppen nachzuweisen. Weiterhin sollte der Anteil der γ -*Proteobacteria* und *Actinobacteria* im Prozess mit dieser Methode weiter untersucht werden.

3.5.1 FISH von Kompostproben

Für die Untersuchungen wurden die Kompostprozesse 1, 2, 14 und 17 ausgewählt. Die Durchführung der Experimente erfolgte an der Universität Toyohashi in Japan nach der Methode von Hiraishi *et al.* (2003b), siehe auch Kap. 2.9.1. Die für die einzelnen Bakteriengruppen verwendeten FISH-Sonden wurden mittels der „Probabase-Software“ (Loy *et al.*, 2007) ausgewählt und sind in Tabelle 17 angegeben. Zur Erfassung der Gesamtbakterienzahl wurde ein Gemisch aus universellen Bakteriensonden (EUB 1, 2 und 3) eingesetzt (Hiraishi *et al.*, 2003b). Weiterhin wurde die Gesamtzellzahl mit DAPI (Kap. 2.7.2.3) verfolgt. In Abbildung 16 ist der prozentuale Anteil der einzelnen mit spezifischen FISH-Sonden detektierten Bakteriengruppen an der mit den EUB-Sonden ermittelten

Gesamtzellzahl in Reaktor A von K2 dargestellt. Es wird deutlich, dass *Firmicutes* mit einem Anteil zwischen 28,6 % (Tag 6) - 55,7 % (Tag 3) am häufigsten nachweisbar waren und an Tag 3 (55,7 %) und Tag 4 (53,8 %) ihr Maximum erreichten. Die Gruppe der *Bacterioidetes* stellte bis zum Tag 3 den zweithäufigsten Anteil dar, nur an den Tagen 4-6 waren γ -*Proteobacteria* geringfügig höher. Insbesondere am Inputtag, aber auch am Tag 3 (in der thermophilen Phase) konnte ein Anteil an *Bacterioidetes* von ca. 20 % nachgewiesen werden. Die Untersuchungen der γ -*Proteobacteria* ergab, dass sie über den gesamten Prozess nachweisbar waren, mit einem Anteil < 7 %. Nur an Tag 1 (13 °C) wurde der höchste Anteil mit 11,6 % detektiert.

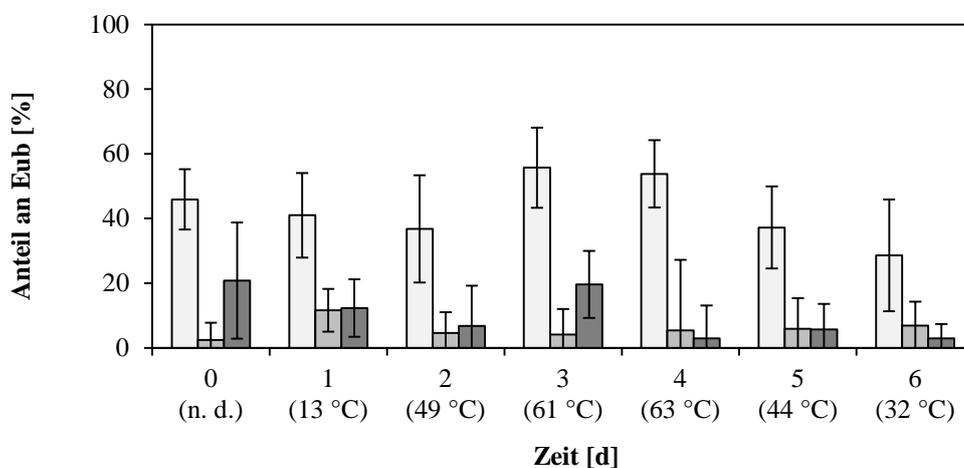


Abbildung 16: Übersicht der in K2 ermittelten FISH-Signale von Firmicutes, γ -Proteobacteria und Bacterioidetes bezogen auf die Gesamtzellzahl in %. Die einzelnen Mikroorganismengruppen wurden dabei auf die ermittelten EUB-Signale bezogen. Die Signale und die Standardabweichungen wurden von mindestens sechs Aufnahmen ermittelt. Verwendete Sonden sind EUB1-3 (Amann *et al.*, 1990, Daims *et al.*, 1999); CFB319a (Manz *et al.*, 1992); HGC236 (Erhart *et al.*, 1997); GAM42a mit GAM42a_competitor (Manz *et al.*, 1992). *Firmicutes* (□), γ -*Proteobacteria* (■), *Bacterioidetes* (■)

Bei K17 (Anhang 12) zeigte sich eine ähnliche Tendenz wie bei K2, auch hier wurden *Firmicutes* als häufigste Organismen (51,1-96,8 %), gefolgt von *Bacterioidetes* als zweitstärkste Gruppe (außer an Tag 4 und Tag 7, wo γ -*Proteobacteria* mit 17,4 % und mit 20,1 % geringfügig höher waren) nachgewiesen. Insbesondere an Tag 8 (55 °C) wurde mit 51,7 % der höchste Anteil an *Bacterioidetes*-Signalen detektiert. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutungen der Chinonanalytik durch den Nachweis eines hohen Anteils von MK-7, welcher in *Firmicutes* und *Bacterioidetes* enthalten ist. Durch FISH wurden *Firmicutes* gefolgt von *Bacterioidetes* als die häufigsten Vertreter in den untersuchten Kompostierungsprozessen nachgewiesen.

3.5.2 Detektion von *Sphingobacteriaceae* Bakterium 28-4-3 in Kompostproben

Die mittels molekularbiologischer Methoden identifizierte *Sphingobacteriaceae* und ihre Verfolgung in den t-RFLP-Profilen ließ vermuten (siehe Kap. 3.3), dass gerade diese eine dominante Rolle in den untersuchten Kompostierungsprozessen spielt. Es konnte jedoch nur Stamm 28-4-3, der zu den *Sphingobacteriaceae* sp. gehörte, isoliert und kultiviert werden (Kap. 3.2.2.4). Seine t-RFs hatten die gleichen Schnittstellen wie die untersuchten Klone (Kap. 3.2.2.4). Durch FISH sollte nun weiter untersucht werden, ob dieser Stamm im Kompostprozess mit einer spezifisch abgeleiteten Sonde nachweisbar war. Für den Stamm 28-4-3 wurde die Oligonukleotidsonde „Sphingo398“ abgeleitet (siehe Tabelle 17). Die Hybridisierung mit dieser Sonde wurde hinsichtlich ihrer Stringenz (0-45 %) angepasst, indem die höchste Formamidkonzentration (15 %) bestimmt wurde, bei der noch eine starke Fluoreszenz zu beobachten war.

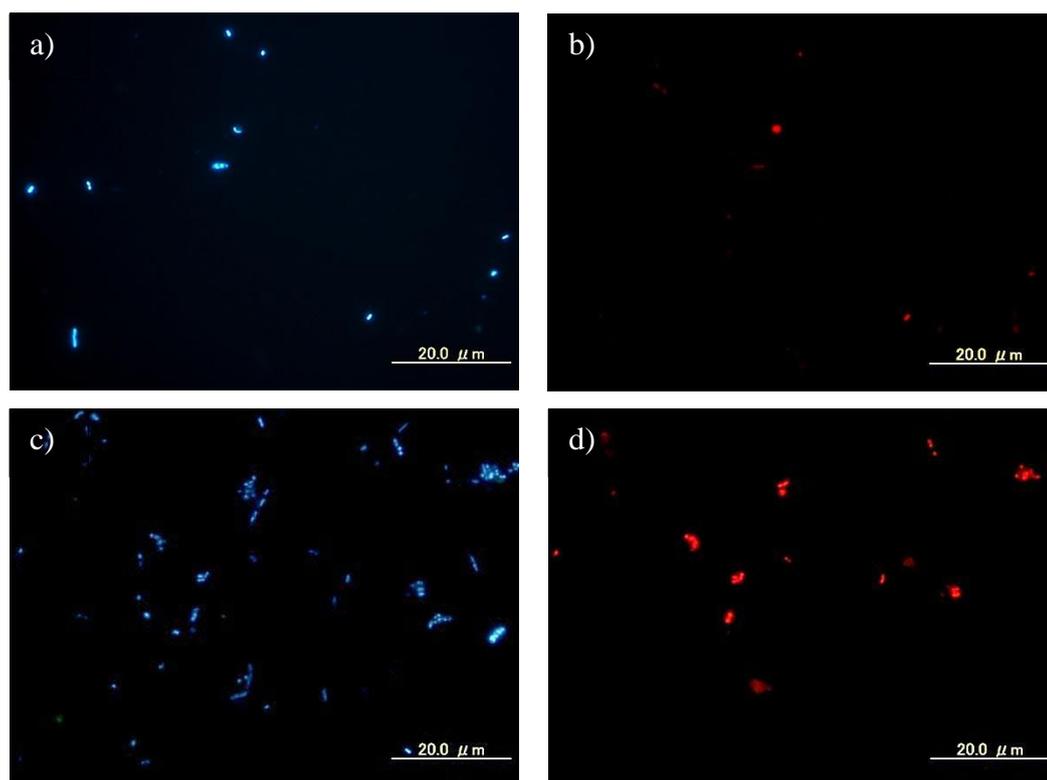


Abbildung 17: Fluoreszenzbilder von einer Kompostprobe (K2, Tag 3, 61 °C) nach Hybridisierung mit der Sonde Sphingo398 (a und b) und der Sonde CFB319a (c und d). a, c: DAPI-Färbung Filtersatz 4879-01, b, d: Sondenfärbung: Filtersatz 4879-15 (Anregung bei 546 nm). Die Fotos a und b, bzw. c und d zeigen den gleichen mikroskopischen Ausschnitt. Balken 20 µm.

In den Kompostproben von K2, K14 und K17 konnten vereinzelt Signale beobachtet werden, es war jedoch durch die komplexe Matrix schwierig, diese zu detektieren. In Abbildung 17 ist

beispielhaft für K2 eine DAPI-Fluoreszenz-Aufnahme und die dazugehörige FISH-Aufnahme mit der Sonde „Sphingo398“ gezeigt. Es wurden nur sehr wenige und relativ schwache Signale in den Proben detektiert, jedoch konnten an Tag 3 ein paar Fluoreszenzsignale beobachtet werden. Vergleichsweise ist in Abbildung 17d eine FISH-Aufnahme mit der *Bacterioidetes*-Sonde CFB319a dargestellt, in der deutlich zu erkennen ist, dass ein relativ hoher Anteil an *Bacterioidetes* an der Gesamtkeimzahl vorhanden war.

3.6 Einsatz von Starterkulturen

Da die Selbsterhitzung auf Wärmeerzeugung durch den Metabolismus der Bakterien zurückzuführen ist (Helfer & Merrettig-Bruns, 2001), sollte eine hohe Aktivität thermophiler Bakterien erstens zu einer höheren Temperatur und zweitens zu einer längeren Dauer der Selbsterhitzung führen. Im Interesse der Hygienisierung und Möglichkeiten der Energieeinsparung erschien also die Fokussierung auf thermophile Organismen als mögliche Starterkulturen sinnvoll. Aber auch der Einsatz mesophiler Mikroorganismen, um die Startphase der Kompostierung zu verbessern, könnte ihren Beitrag zur Kompostierung leisten. Um die Eignung bestimmter Bakterien als Starterkulturen zu überprüfen und geeignete Anzuchtbedingungen zu ermitteln, sollten kompostierungsrelevante Eigenschaften der Mikroorganismen ermittelt werden. Das umfasste ihr Wachstumstemperaturspektrum sowie das Arsenal an extrazellulären Enzymen, die an Aufschluss und Verwertung des Input-Materials beteiligt sein könnten. Es wurden sechs, als thermophil eingeschätzte Bakterien-Isolate ausgesucht, deren Existenz zum größten Teil im Kompost durch ARDRA und t-RFLP-Analysen nachgewiesen wurden. Dazu gehörten *U. thermosphaericus* Stamm 17-1-2, *B. thermoamylovorans* Stamm 8-4-7, *P. taiwanensis* Stamm 16-2-VM-2 und drei *Geobacillus*-Stämme (MS-X1, 29-10-PAA, 16-2-A). Mit *Sphingobacteriaceae* Stamm 28-4-3 wurde ein thermotolerantes bis moderat thermophiles Bakterium und mit *Bacillus* sp. Stamm 8-4-E12 ein thermotolerantes Bakterium ausgewählt. Als mesophile Bakterien wurden *Microbacterium hydrocarbonoxydans* Stamm 24-4-1 und *Arthrobacter arilaitensis* Stamm 9-4-E3 ausgesucht. Es wurde vermutet, dass sie ihre Hauptaktivität in der Anfangsphase der Kompostierung besitzen könnten. Sollten sie die Hygienisierungsphase überleben, könnten sie für die Impfmateriengewinnung aus Kompostrückstellproben Bedeutung haben.

3.6.1 Untersuchungen der Wachstumstemperaturen ausgewählter Isolate

Zur Bestimmung des Wachstums-Temperaturbereiches und der optimalen Wachstumstemperatur wurden die Mikroorganismen bei verschiedenen Inkubationstemperaturen in einem Bereich von 5-75 °C auf NAI_{OG} und NAI-Platten (z. T. mit Gelrite[®] verfestigt) für mehrere Tage inkubiert (Kap. 2.7.3.3). Die Wachstumstemperaturen der ausgesuchten Stämme sind in Anhang 21 gezeigt und für die Stämme 28-4-3 und *Bacillus* sp. Stamm 8-4-E12 in Kap. 3.2.2 näher beschrieben. Entsprechend der Temperaturbereiche des Wachstums konnten die Stämme MS-X1, 29-10-PAA, 16-2-A und 17-1-2 als thermophil, Stamm 8-4-E12 als thermotolerant, Stamm 28-4-3 als thermotolerant bis moderat thermophil, Stamm 16-2-VM-2 als moderat thermophil, Stamm 24-4-1 und 9-4-E3 als mesophil eingeordnet werden. Dabei zeigte sich, dass die Stämme 17-1-2, MS-X1 und 16-2-A auch bei Temperaturen von 65 und sogar 70 °C wachsen konnten und somit gerade in der thermophilen Phase vermutlich einen entscheidenden Beitrag als Starterkulturen leisten könnten.

3.6.2 Wachstumsversuche mit Kompostextrakt

Um zu testen, ob die ausgewählten Mikroorganismen ohne Zusatz weiterer Substrate nur mit Inhaltsstoffen einer Kompostprobe aus der thermophilen Phase (K2, Tag 4, 63 °C) wachsen können, wurden die Bakterienisolate Stamm 17-1-2, Stamm 16-2-VM-2 und Stamm 8-4-7 ausgewählt. Es wurde Kompostextraktmedium wie in Kap. 2.4.1.1 angegeben hergestellt. Die Organismen wurden vorher in NB_{OG} bis zur exponentiellen Phase angezogen (Kap. 2.4.1) und dann mit einer OD von 0.1 zum fertigen Kompostextraktmedium gegeben. Die Kulturen wurden für 5 Tage bei 50 °C schüttelnd inkubiert. Als Negativkontrolle diente Kompostextrakt ohne Zusatz von Zellen. Da das Medium dunkel war, erfolgte die Untersuchung mikroskopisch mittels DAPI-Färbung (Kap. 2.7.2.3).

Bei allen Stämmen zeigte sich nach spätestens drei Tagen ein starkes Wachstum im Kompostextraktmedium. Da die Negativkontrolle kein Wachstum zeigte, konnte eine Kontamination ausgeschlossen werden. In Anhang 22 sind beispielhaft die Startprobe und die Probe nach drei Tagen von Stamm 17-1-2 gezeigt. Die Animpfkonzentration der Bakterien betrug zwischen $1,2-8 \times 10^7$ KBE/ml und stieg nach 3 Tagen auf durchschnittlich $1,5 \times 10^9$ KBE/ml. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass im Kompostextrakt vorhandene Nährstoffe zum Wachstum genutzt werden konnten. Weiterhin war dies ein Indiz dafür, dass diese Stämme auch am Prozess beteiligt sein könnten und somit als potentielle Starterkulturen einsetzbar wären.

3.6.3 Verwertungsspektrum und Enzymaktivitäten ausgewählter Isolate

Um das Spektrum an extrazellulären Enzymen der Stämme zu ermitteln, wurden von ausgewählten Organismen die Enzymaktivität durch Mineralmedium mit einer bestimmten C-Quelle (Milchpulver, Glukose, Xylose, Cellulose, Xylan, Tributyrin, Stärke, nur Aminosäuren) untersucht. Die Herstellung der Platten wurde wie in Kap. 2.7.3.3 beschrieben durchgeführt. Als Verfestigungsmittel diente Gelrite[®], da dieser auch bei hohen Temperaturen die Festigkeit und den Schutz vor zu schnellem Austrocknen gewährleistete. Die Inkubation erfolgte über mehrere Tage (3-10 Tage) bei 45 °C für thermophile Organismen und bei 37 °C für mesophile Organismen. Es wurde immer eine Doppelbestimmung durchgeführt. Danach erfolgte die Auswertung visuell (Aufklärung der Platten) oder durch Überschichten mit verschiedenen Medien wie in Kap. 2.7.3.3 beschrieben. In Anhang 17 ist der Nachweis für Milchpulver, Glukose und Aminosäureaktivitäten für verschiedene Isolate gezeigt. Für die C-Quellen: Xylose, Cellulose, Xylan, Tributyrin, und Stärke konnte kein Wachstum für die Isolate und für die für weitere Untersuchungen ausgewählten Stämme festgestellt werden. Die *Geobacillus* Stämme MS-X1 und 29-10-PAA sowie der mesophile Stamm 24-4-1 zeigten ein positives Wachstum auf Glukose und Aminosäuren. Die Stämme 16-2-A und 8-4-7 konnten nur auf Glukose wachsen. Der mesophile Stamm 9-4-E3 zeigte Wachstum auf Milchpulver, Glukose und Aminosäuren. Für die Stämme 16-2-VM-2 und 17-1-2 konnte keine positive Reaktion ermittelt werden. Da diese Art der Untersuchung sehr aufwändig war und auch um weitere Enzymaktivitäten der Stämme zu prüfen, wurde für weitere Untersuchungen der Api[®]ZYM-Test (Biomérieux, Nürtingen) verwendet (Kap. 2.7.3.3). In Anhang 14 ist der Nachweis der Enzymaktivitäten für die untersuchten Stämme angegeben.

Die speziell für die Beimpfung als Starterkulturen ausgewählten Isolate besaßen zum Teil ausgeprägte Aktivitäten zur Hydrolyse von Estern/Fetten, Proteinen oder Polysacchariden. Nur der thermophile Stamm 17-1-2 zeigte keine nennenswerten Aktivitäten. Jedoch beschrieb Fortina *et al.* (2001), dass *Ureibacillus*-Stämme eine Urease-Aktivität besitzen, was einen Beitrag zur Verwertung von Stickstoffverbindungen erwarten lässt. Es konnten für die meisten Stämme Hydrolasen (Esterasen, C4), die Ester niederer Carbonsäuren hydrolytisch in Alkohole und Säuren spalten, detektiert werden. Alle Stämme zeigten außerdem die Fähigkeit zur Lipaseaktivität (Lipase, C8). Zudem konnten saure Phosphatasen, Phosphohydrolasen und α -Glucosidasen für die Stämme nachgewiesen werden. Für die Stämme 8-4-7, MS-X1 und 9-4-E3 wurden zusätzlich Serinproteasen (α -Chymotrypsin) festgestellt. Für die Stämme 8-4-7 und 16-2-A konnten die Aminopeptidase Leucin-Arylamidase und die Glukosidase α -Galactosidase detektiert werden, wobei für Stamm 8-4-7 zusätzlich eine β -Glucosidase-

Aktivität bestimmt werden konnte. Die mesophilen Stämme 24-4-1 und 9-4-E3 besaßen beide die Aminopeptidase Valin-Arylamidase. Der Stamm 16-2-A besaß als einziger von den untersuchten Organismen eine alkalische Phosphatase und 24-4-1 wies einen hohen Anteil an Glycosylhydrolasen auf. Mit dem Stamm 28-4-3 (Anhang 10) wies ein thermotoleranter-moderat thermophiler Mikroorganismus ein breitgefächertes Spektrum an Enzymaktivitäten auf.

Die Stoffwechseleigenschaften wurden mittels Api[®]20 NE-Test bestimmt. Dafür wurden die Stämme in NB_{OG} angezogen (siehe 2.7.3.4). Thermophile Stämme wurden bei 45 °C und mesophil eingestufte Stämme bei 37 °C inkubiert. Die Eigenschaften sind im Anhang 15 dokumentiert. Die *Geobacillus pallidus* Stämme 29-10-PAA und MS-X1 konnten D-Glukose, D-Mannose, D-Mannitol und D-Maltose verstoffwechseln. Der Stamm 8-4-7 assimilierte N-Acetylglucosamin und konnte Esculin und Gelatine hydrolysieren. Eine Esculin-Hydrolyse konnte auch für die Stämme 16-2-A und 16-2-VM-2 festgestellt werden. Weiterhin konnte Stamm 16-2-VM-2 auch Gelatine hydrolysieren. Einzig die Stämme 16-2-A und 8-4-7 zeigten eine Nitratreduktion zu Nitrit. Dagegen konnte Stamm 17-1-2 als einziger Stamm Malat assimilieren. Für die Stämme 28-4-3 und *Bacillus* sp. Stamm 8-4-E12 sind diese Untersuchungen in Kap. 3.2.2 näher beschrieben.

3.6.4 Ermittlung geeigneter Applikationsmöglichkeiten von Impfmateriail zur Beschleunigung des Kompostierungsprozesses

Zur Verfolgung der Starterkulturen wurde in Reaktor B1 eine Trennwand eingebaut (im weiteren Reaktor B2 genannt), wobei später jeweils in die rechte Kammer Starterkulturen oder eine Kompostrückstellprobe zugesetzt wurden und die linke Kammer als Kontrollkammer diente.

Zur Bereitstellung von Impfmateriail für die Kompostierungsversuche wurden die ausgewählten Kulturen angezogen und konserviert. Die Anzucht erfolgte in NB_{OG} (Kap. 2.4.1, 2.6.2) bei 50 °C (thermophile Stämme) und bei 37 °C für die übrigen Stämme. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Stämme geerntet, bei -80 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert (siehe Kap. 2.6.3). Besonders wichtig bei der Gefriertrocknung war die Gewährleistung einer hohen Überlebensrate, deswegen wurden Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen durchgeführt (Kap. 2.7.2.2). Die Durchführung erfolgte mit dem LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial-Viability-Kit (Molecular Probes,

Poortgebouw, Niederlande). Die Auszählung der lebenden und toten Bakterien erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Tabelle 6).

Die Überlebensfähigkeit betrug zwischen 25 % und 90 % und ist für die einzelnen Kompostierungsprozesse in Anhang 5 angegeben. Die Lebendzellzahlen betragen zwischen 5×10^{10} KBE/ml bis $3,5 \times 10^{11}$ KBE/ml

3.6.4.1 Beimpfung des Reaktors B2

Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten, mussten diese möglichst großflächig in den Reaktor B2, rechte Kammer, inokuliert werden. Dafür wurden die lyophilisierten Starterkulturen in 900 ml Saline (0,9 %-iger NaCl-Lösung) resuspendiert und dann nochmals mit 1 l Leitungswasser gemischt. Das gesamte Volumen wurde mittels einer Gießkanne (Baumarkt) gleichmäßig in die rechte Kammer des Reaktors überführt und dort durch die Bewegung der Wellen eingemischt. In die unbeimpfte Kammer wurde das gleiche Volumen an Saline und Wasser gegeben, um den Feuchtegehalt der Kammer konstant zu halten. Das Füllgewicht pro Kammer betrug etwa 250 kg. Die geschätzte Summe der Lebendzellzahlen nach Zugabe zum Kompostmaterial je Gramm Inputmaterial betrug ca. 2×10^6 lebende Zellen/g FG.

3.6.4.2 Verfolgung der Starterkulturen in Reaktor B2

Der Kompostierungsprozess 19 war der erste mit Starterkulturen durchgeführte Prozess. Die Beimpfung erfolgte am Inputtag nach der in Kap. 3.6.4.1 beschriebenen Methode. Zugesezt wurden die Stämme MS-X1, 29-10-PAA, 8-4-7, 16-2-A, 16-2-VM-2, 17-1-2 und 8-4-E12. Die Lebendzellzahl ist Anhang 5 zu entnehmen. Die Kompostierungsdauer betrug 14 Tage mit einer Hygienisierungsphase. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3 dargestellt. Von der beimpften und unbeimpften Kammer wurden sieben Proben näher untersucht.

Nach Extraktion der DNA aus den Kompostproben (Kap. 2.8.1.1) erfolgte die Quantifizierung der zugesetzten Kulturen mittels q-PCR (Kap. 2.8.3.3). Die Gesamtheit der 16S rRNA-Gene aller enthaltenen Bakterien wurde unter Verwendung universeller *Bacteria*-Primer (Tabelle 12) quantifiziert. Für die Amplifikation und Quantifizierung der ribosomalen Gene der Organismen *Geobacillus pallidus*, *Bacillus thermoamylovorans* und *Bacillus* sp. Stamm 8-4-E12, *Ureibacillus thermosphaericus* und *Pseudoxanthomonas taiwanensis* wurden die in Tabelle 12 angegebenen Primer und die in Tabelle 14 angegebenen Plasmide als Standards

verwendet. Für den Stamm 16-2-A wurden keine Primer abgeleitet, da er sich nur schlecht von den anderen Bakterien abgrenzen ließ.

In Abbildung 18 ist der Temperaturverlauf des Kompostierungsprozesses in der beimpften Kammer und der Kontrollkammer dargestellt. Es konnte eine leichte Erhöhung der Temperatur in der beimpften Kammer beobachtet werden, welche in der mesophilen Anlaufphase (20-120 h) ca. 5 °C höher als in der Kontrollkammer war. In der Selbsterhitzungsphase (nach 120 h) stiegen die Temperaturen in beiden Kammern kontinuierlich an, wobei die Temperatur an allen Tagen in der Starterkammer bis zu 3 °C höher war. Nach Beginn der Hygienisierung (240 h) wurde ein plötzlich größer werdender Temperaturanstieg in der Starterkammer festgestellt. Die Temperatur war um 11-18 °C höher (241 und 242 h) als die Temperatur der Kontrollkammer.

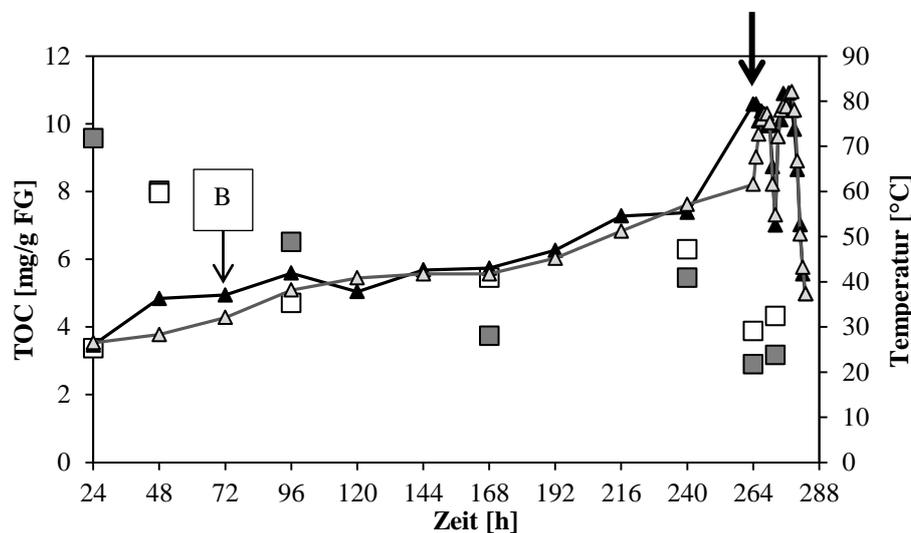


Abbildung 18: Temperaturverlauf des Kompostierungsprozesses 19. Mit und ohne Zusatz von Starterkulturen im Vergleich zu den ermittelten TOC-Werten in der beimpften (■) und in der Kontrollkammer (□) aus Kompostextrakten der ausgewählten Proben. Es sind die Mittelwerte der „Wellen“-Temperaturen aufgetragen: beimpfte Kammer (▲), Kontrollkammer (△), Hygienisierung (Pfeil), Zusatzbefüllung (B+Pfeil)

Hohe Temperaturen wurden auch zum Zeitpunkt der Hygienisierung in der Kontrollkammer festgestellt, aber erst nach 244 h und mit einer Temperaturdifferenz von 3 °C im Vergleich zur Starterkammer. Es konnte somit eine höhere Temperatur in einer kürzeren Zeit in der beimpften Kammer beobachtet werden. Der TOC wurde wie in Kap. 2.3.1 beschrieben bestimmt. Deutlich ist der um das 3-fache erhöhte TOC-Wert nach 24 h in der beimpften Kammer erkennbar. Nach weiteren 24 h stieg der TOC-Wert der unbeimpften Kammer an und der TOC-Wert der beimpften Kammer fiel etwas ab, so dass beide einen ähnlichen TOC-Gehalt von ca. 8 mg/l hatten. Im weiteren Verlauf nahm der TOC-Gehalt der beimpften Kammer ab und blieb während des Kompostierungsprozesses unter dem TOC-Gehalt der

unbeimpften Kammer. Der Feuchtegehalt des Materials (Anhang 11) lag bei beiden Kammern zwischen 27-35 Gew.-% noch im unkritischen Bereich (Hupe *et al.*, 1996), denn bei zu trockenem Material (< 25 Gew.-%) könnte die Stoffwechselleistung beeinträchtigt werden (Kutzner & Jäger (2004).

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der q-PCR für die eingesetzten Starterkulturen und die Gesamtkopienzahl der 16S rRNA-Gene/g FG aller Bakterien von Kompostierungsprozess 19 dargestellt. Die Gesamtbakterienzahl war in beiden Kammern mit einer Genkopienzahl von ca. $2,7 \times 10^9$ bis 2×10^{10} ähnlich, jedoch lag die Genkopienzahl in der beimpften Kammer leicht unter denen der Kontrollkammer. Die Temperatur im Prozess stieg nur sehr langsam und erreichte erst nach 8 Tagen (192 h) ca. 45 °C. Die Anfangskonzentrationen der 16S rRNA-Genkopien der untersuchten Starterkulturen (außer *Geobacillus pallidus*) lagen in der beimpften Kammer bis zu einer Zehnerpotenz über der in der Kontrollkammer, in einer Konzentration, die etwa der zugesetzten Zellzahl entsprach (1 g Inputmaterial entsprach ca. 7×10^6 ml⁻¹ Zellen).

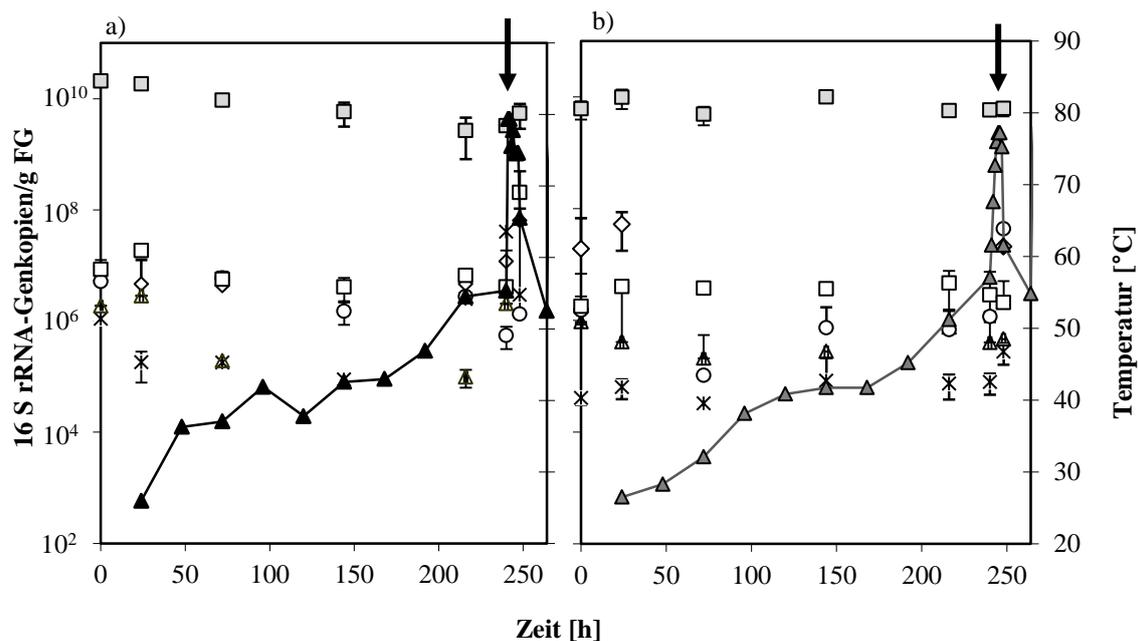


Abbildung 19: Temperaturverlauf und 16S rRNA-Genkopienzahlen/g FG aller zugesetzten Stämme im Kompostierungsprozess K19. (a) mit Starterkulturen beimpfte Kammer (T: ▲); b) Kontrollkammer (T: △), Pfeile zeigen Hygienisierungsstart nach 248 h. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei q-PCR-Versuchen von *G. pallidus* (◇), *B. thermoamylovorans* (X), *P. taiwanensis* (●), *U. thermosphaericus* (○), gesamt *Bacteria* (□), *Bacillus* sp. Stamm 8-4-E12 (△), Hygienisierung (Pfeil), nach 72 h erfolgte eine Zusatzbefüllung.

Für *B. thermoamylovorans* konnte in der angeimpften Kammer nach anfänglicher Abnahme der Zellzahl auf 9×10^4 Genkopienzahlen/g FG eine Vermehrung nach 216 h von über zwei

Zehnerpotenzen auf $2,5 \times 10^6$ Genkopienzahlen/g FG vor Beginn der Hygienisierung beobachtet werden. In der Kontrollkammer blieben die Genkopienzahlen tendenziell unter 1×10^5 Genkopienzahlen /g FG. Die Untersuchungen von *Bacillus* sp. 8-4-E12 zeigte eine um eine Zehnerpotenz höhere Gesamtkeimzahl/g FG in der beimpften Kammer im Vergleich zur Kontrollkammer. *G. pallidus* war kurz nach dem Beimpfen messbar (in diesem Zeitraum ebenfalls in der nicht beimpften Kontrollkammer) und dann erst wieder bei höheren Temperaturen. Dieses korreliert mit den bisherigen Beobachtungen der untersuchten Prozesse K2 und K17 (Kap. 3.3.4). *U. thermosphaericus* wurde tendenziell in der beimpften Kammer mit bis zu 2-fach höheren Werten detektiert als in der Kontrollkammer. In der beimpften Kammer wurde eine um zwei Zehnerpotenzen höhere 16S rRNA-Genkopienzahl in der Hygienisierungszeit (248 h) im Vergleich zur Kontrollkammer detektiert. *P. taiwanensis* zeigte durchschnittlich in der beimpften Kammer höhere Genkopienzahlen als in der Kontrollkammer. In der Hygienisierungszeit wurde, im Gegensatz zur beimpften Kammer, in der Kontrollkammer eine Abnahme der Genkopienzahlen beobachtet.

Tendenziell wurden in der beimpften Kammer bis zu einer Zehnerpotenz höhere Genkopienzahlen detektiert. Jedoch blieben diese kaum über der Animpfkonzentration. Es konnten keine gravierenden Änderungen der bakteriellen Gesamtkopienzahlen im Kompostierungsprozess zwischen beiden Kammern bemerkt werden. Erst in der thermophilen Phase und anschließenden Hygienisierungsphase (Temperaturen ab 55 °C) zeigten sich deutliche Unterschiede im Vergleich von beimpfter Kammer zur Kontrollkammer. Es wird daher vermutet, dass sich in dieser langen Zeitspanne bei niedrigen Temperaturen die Starterkulturen noch nicht ausreichend vermehren konnten und eventuell ein späterer Zusatz der Starterkulturen zum Prozess einen positiveren Effekt auslösen könnte.

Um den Einfluss und die Dynamik der Starterkulturen erneut zu beobachten, wurde im Kompostierungsversuch 21 (Abbildung 20) eine erneute Beimpfung von Reaktor B2 durchgeführt. Die Stämme 16-2-A und 29-10-PAA wurden diesmal nicht eingesetzt. Der Prozess K21 betrug neun Tage (Tabelle 3). Die Beimpfung erfolgte erst an Tag 3 (ca. 45 °C) bei einer höheren Temperatur in den Kammern, um damit eventuell bessere Wachstumsbedingungen für die thermophilen Organismen zu erreichen. Die Hygienisierung erfolgte am Tag 6 (nach der Probenahme).

Nach der Beimpfung stieg die Temperatur in der beimpften Kammer um 15 °C über die Temperatur in der unbeimpften Kammer. Danach erfolgte die Hygienisierungsphase. Es wurden jeweils vier Kompostproben ausgewählt und wie in Kap. 2.8.1.1 aufgearbeitet. Die Verläufe von *U. thermosphaericus* und *P. taiwanensis* sollten dann durch q-PCR verfolgt

werden (Kap. 2.8.3.3). Wie in Abbildung 20 gezeigt, waren anfänglich die 16S rRNA-Genkopienzahlen beider Bakterien in den Kammern sehr unterschiedlich, was an einer ungleichmäßigen Verteilung liegen könnte. Nach der Starterkulturenzugabe wurden für *U. thermosphaericus* tendenziell ähnliche Zellzahlen ($1,5 \times 10^8$) in beiden Kammern detektiert. Für *P. taiwanensis* konnte nach der Hygienisierung eine höhere Zellzahl in der beimpften Kammer festgestellt ($3,19 \times 10^9$) werden. Es wird vermutet, dass der Zusatz von nur etwa 1×10^6 Zellen/g FG vor dem Hintergrund der natürlich vorhandenen Zellzahlen der entsprechenden Stämme (siehe unbeimpfte Kammer) zu keinen messbaren Unterschieden in der q-PCR führte. Jedoch wurde eindeutig eine höhere Temperatur in der beimpften Kammer gemessen, was darauf hinweisen könnte, dass die Starterkulturen die Temperatur positiv beeinflussen. Es kann vermutet werden, dass ein Zusatz von Starterkulturen zu einer Temperaturerhöhung im Prozess führen kann und somit einen positiven Effekt auf den Prozessverlauf ausübt.

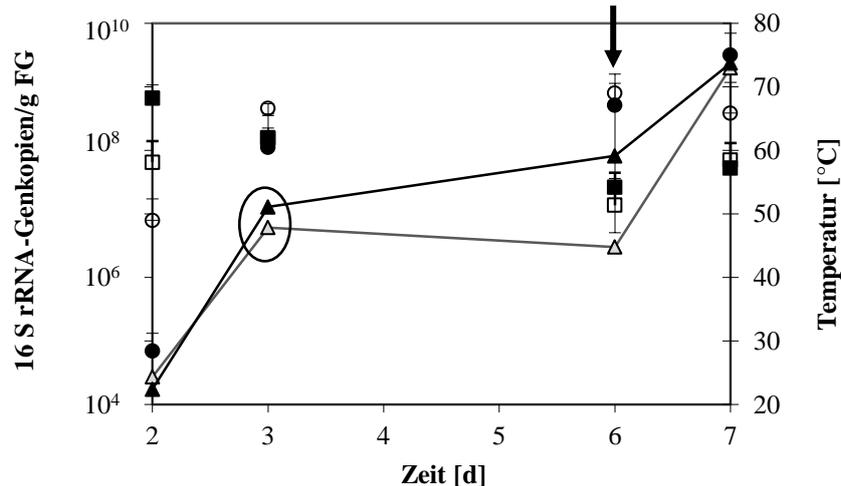


Abbildung 20: Temperaturverlauf und Verfolgung der 16S rRNA-Genkopienzahlen durch q-PCR mit spezifischen Primern von *P. taiwanensis* und *U. thermosphaericus* im Kompostierungsprozess 21. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei q-PCRs von *P. taiwanensis* (beimpfte Kammer: ●, Kontrollkammer: ○) und *U. thermosphaericus* (beimpfte Kammer: ■, Kontrollkammer: □), Es sind die Mittelwerte der „Wellen“-Temperaturen aufgetragen. Temperaturen: Kontrollkammer △, beimpfte Kammer ▲, Zugabe der Starterkulturen erfolgte nach 3 Tagen bei 45 °C (Kreis), Probenahme erfolgte danach, schwarzer Pfeil zeigt Hygienisierung, Probeentnahme am Tag 6 erfolgte vor der Hygienisierung, Probeentnahme am Tag 7 erfolgte nach der Hygienisierung.

3.6.4.3 Untersuchung einer zurückgestellten Kompostprobe auf Eignung als Impfmateri

Für den routinemäßigen Kompostierungsbetrieb wäre der Einsatz von Kompostierungsmaterial als Startermaterial eine kostengünstigere Variante als Starterkulturen.

Es sollte somit das Animpfen mit Kompostierungsmaterial auf Eignung als Material für die Erhöhung der Kompostierungstemperatur geprüft werden. Im Versuch 21 wurde die rechte Kammer mit 10 l des reifen Komposts aus der vorhergehenden, unbeimpften Kontrollkammer (von K19) versetzt, was auch schon Sundberg & Jönsson (2005) erfolgreich als Startermaterial für die Kompostierung untersucht hatten. Die Zusammensetzung des Kompostmaterials ist in Tabelle 3 ersichtlich. Die Aufarbeitung des Materials erfolgte wieder wie unter Kap. 2.8.1.1 und die der q-PCR wie in Kap. 2.8.3.3 beschrieben.

In Abbildung 21 ist der Verlauf des Kompostierungsprozesses beider Kammern dargestellt. Deutlich ist die stärkere Selbsterhitzungsphase mit höheren Temperaturen in der beimpften Kammer sichtbar. Allerdings erfolgte die Selbsterhitzung langsamer als in den Versuchen mit Zugabe von Starterkulturen.

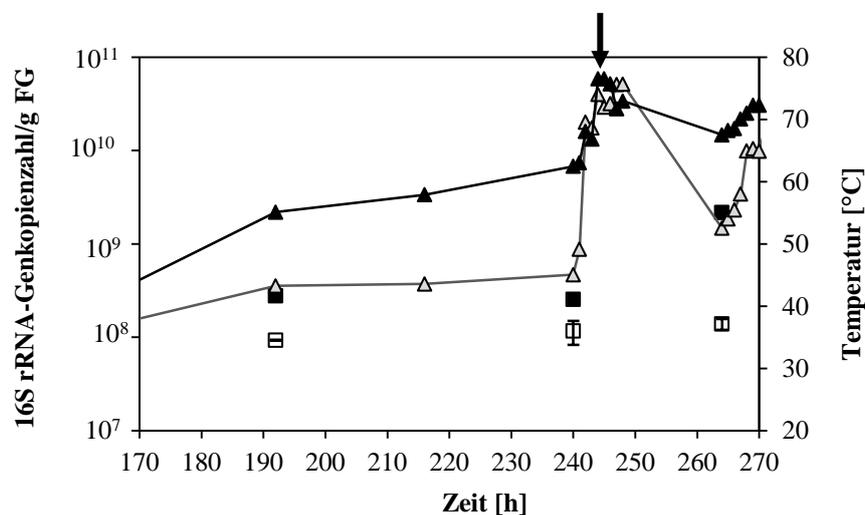


Abbildung 21: Temperaturverlauf und Verfolgung der 16S rRNA-Genkopienzahlen durch q-PCR mit spezifischen Primern von *U. thermosphaericus* im Kompostierungsprozess K20. Es sind die Mittelwerte der „Wellen“-Temperaturen aufgetragen. Temperaturen Kontrollkammer (Δ), mit Kompostrückstellprobe beimpfte Kammer (\blacktriangle), Pfeil zeigt Beginn der Hygienisierung nach 240 h. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei q-PCR-Reaktionen. *U. thermosphaericus*: beimpfte Kammer (\blacksquare), Kontrollkammer (\square).

In diesem Versuch wurde an drei Kompostierungstagen die 16S rRNA-Genkopienzahl mit q-PCR von *U. thermosphaericus* bestimmt. Der Anfangswert war mit über 1×10^8 Genkopienzahlen/g FG in beiden Kammern relativ hoch. Interessant war, dass die 16S rRNA Genkopienzahl von *U. thermosphaericus* in der mit der Kompostrückstellprobe beimpften Kammer bis zu einer Zehnerpotenz höher war als in der Kontrollkammer. Nach der Hygienisierung an Tag 11 (264 h) konnte eine nochmalige Erhöhung der 16S rRNA-Genkopienzahl/g FG von *U. thermosphaericus* ($2,5 \times 10^8$ auf $2,2 \times 10^9$) in der beimpften Kammer im Vergleich zur unbeimpften Kammer beobachtet werden. Auch die Temperatur

der beimpften Kammer blieb mit +15 °C über der der unbeimpften Kammer. Der Feuchtegehalt der Kammern lag zwischen 46-76 Gew.-% und lag in der beimpften Kammer am Anfang der Kompostierung bis zur Hygienisierung etwas höher als in der Kontrollkammer (Anhang 11). Ein negativer Einfluss der Hygienisierungsphase auf die untersuchten Mikroorganismen wurde auch bei diesem Versuch nicht beobachtet, es kann sogar vermutet werden, dass teilweise ein positiver Effekt auf die thermophilen Organismen ausgeübt wurde.

3.6.4.4 Untersuchungen des Kompostierungsprozesses mit mesophilen Starterkulturen

In einem neuen Kompostierungsversuch sollten mesophile bis moderat thermophile Mikroorganismen zugesetzt werden, um ihren Einfluss auf die Temperaturentwicklung zu beobachten. Die ausgewählten Stämme waren *Microbacterium hydrocarbonoxydans* 24-4-1, *Arthrobacter arilaitensis* 9-4-E3 und *Sphingobacteriaceae* Stamm 28-4-3, für die gute Aktivitäten der alkalischen Phosphatase, Esterase (C4), Esterase Lipase (C8) und von Trypsin festgestellt wurden (Anhang 10, Anhang 14), was auf eine gute Verwertung des Abfalls hoffen ließ. Eine Beimpfung des Reaktors B2 mit den Starterkulturen wurde gleich zu Anfang mit einer Animpfkonzentration von durchschnittlich 5×10^6 g/FG wie in Kap. 3.6.4.1 beschrieben durchgeführt. Die Zusammensetzung des Materials ist Tabelle 3 zu entnehmen. Es wurden drei Tage des Kompostierungsprozesses mittels t-RFLP-Analyse untersucht. Die t-RFs (MspI/RsaI) von Stamm 24-4-1 (280/451), Stamm 9-4-E3 (133/475) und Stamm 28-4-3 (147/316) wurden zuvor ermittelt (Kap. 3.3.3, Tabelle 26). In Abbildung 22 sind der Temperaturverlauf beider Kammern und der Anteil von dem untersuchten t-RFs von Stamm 28-4-3 im Kompostierungsverlauf dargestellt. Dabei wurde deutlich, dass die Temperaturen in der beimpften Kammer über den gesamten Prozess höher waren als in der unbeimpften Kammer. Erst ab Temperaturen über 60 °C, sowie in der Hygienisierungszeit, konnte kein Unterschied mehr beobachtet werden. Dies würde auch mit den zugesetzten Stämmen übereinstimmen, da sie nur bis 55 °C (Stamm 28-4-3) wachsen konnten. Es wurden von drei Kompostierungstagen die t-RFLP-Profile bestimmt (Kap. 2.8.10). Die t-RFs der Stämme 24-4-1 und 9-4-E3 waren nur sehr gering im t-RFLP-Profil nachweisbar, welche im Anhang 13 dargestellt sind. Jedoch waren die t-RFs von Stamm 28-4-3 bzw. eng verwandten Mitgliedern der *Sphingobacteriaceae* (siehe auch B1, A25 und C28) teilweise durch große Peaks repräsentiert. Die Peakflächenanteile von Stamm 28-4-3 zeigten, dass nach zwei Tagen (39,4 °C) in der beimpften Kammer ein um bis zu 5-fach höherer Anteil vorhanden war als das t-RF in der Kontrollkammer (35,5 °C). Nach 120 h wurde ein starker Anstieg der

Peakflächenanteile auf etwa 11-13 % ermittelt; der Anteil an der Gesamtpopulation war in der beimpften Kammer höher als in der Kontrollkammer. Danach wurde für beide Kammern eine starke Abnahme auf Werte unter 8 % beobachtet, mit einem geringeren Peakflächenanteil in der beimpften Kammer (54,6 °C) im Vergleich zur Kontrollkammer (52,1 °C).

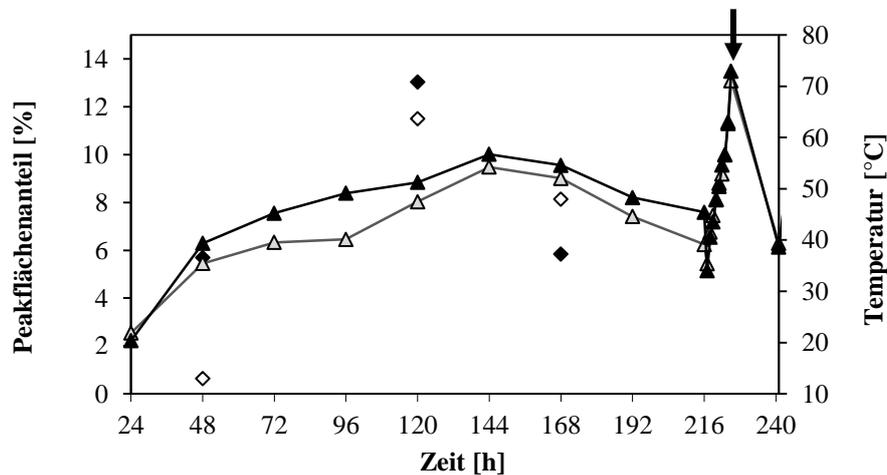


Abbildung 22: Temperaturverlauf im Kompostierungsprozess 23 und Vergleich mit dem relativen Peakflächenanteil des t-RFs von *Sphingobacteriaceae* Stamm 28-4-3 und verwandten Bakterien ermittelt aus dem t-RFLP-Profil (Enzym RsaI). Es sind die Mittelwerte der „Wellen“-Temperaturen aufgetragen. Temperaturen Kontrollkammer (▲), beimpfte Kammer (△). Peakflächenanteile von *Sphingobacteriaceae* Stamm 28-4-3: beimpfte Kammer (◆), Kontrollkammer (◇), Pfeil zeigt Hygienisierungsstart.

4. Diskussion

Eine Neuregelung der EU-Verordnung Nr. 1774/2002 für die Anforderungen an eine Kompostierung von tierstämmigen Materials der Kategorie III (EU-Verordnung Nr. 1877/2006) war Grundlage dieser Arbeit. Im Jahr 2009 erfolgte eine Aufhebung der EU-Verordnung 1774/2002 sowie der EU-Verordnung (EG) Nr. 1877/2006. Die EU-Verordnung 1774/2002 wurde durch die Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 21. Oktober 2009 ersetzt. Durch die neuen Verordnungen sollten die Vorschriften der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 verbessert und Risiken für die Gesundheit von Mensch und Tier minimiert werden. Vorher geltende Gemeinschaftshygienevorschriften wurden spezifiziert und angepasst. Durch die Verordnung (EG) Nr. 142/2011 der Kommission vom 25. Februar 2011 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte wurde die EU-Verordnung Nr. 1877/2006 neu überarbeitet und angepasst. Die inhaltlichen Schwerpunkte für die Kompostierung von Material III (wie z. B. Hygienisierungsschritt 70 °C für 1 h) sind in der Verordnung in Anhang V beschrieben und wurden nicht verändert.

4.1 Bioabfallkompostierung in Modellreaktoren

Um näheren Aufschluss über die Umsetzung organischer Substanzen zu erhalten, wurde der TOC-Gehalt der Kompostproben im Wasserextrakt bestimmt (Tabelle 19 und 20). Said-Pullicino *et al.* (2007) beobachteten, dass während der Kompostierung der Gehalt an niedermolekularen, gelösten Stoffen abnimmt und der Gehalt an polymeren Humusbestandteilen zunimmt. Die TOC-Werte der Kompostierungsprozesse 1 und 2 (Reaktor A) zeigten eine Abnahme während der Kompostierung, was auf eine gute Umsetzung des organischen Materials hindeutete. Auch die Stickstoffwerte zeigten anhand der Zunahme von Ammonium-N den Stoffumsatz an. Da bei der Analyse von Nitrat und Nitrit nur wenig Nitrit gefunden wurde und die Nitrat-Werte weit unter den Ammonium-N-Werten blieben (Tabelle 19 und 20), gab es keine eindeutigen Hinweise auf eine Nitrifikation. Um den biologischen Reifegrad des Kompostes zu ermitteln, kann das Nitrat/Ammoniumverhältnis bestimmt werden (Das & Keener, 1997), welches im Verlaufe der Kompostierung ansteigen sollte. So beschreibt Fuchs (2004), dass ein frischer Kompost ein Verhältnis von unter zwei, jedoch ein ausgereifter Kompost Werte um 20 aufweisen sollte. Solche hohen Werte wurden im

Untersuchungszeitraum nicht erreicht, eventuell wurde kein ausgereifter Kompost in den Kompostierungsprozessen produziert. Auch der pH-Wert kann Informationen über den Kompostierungsverlauf geben. Ein zu niedriger pH-Wert (pH-Bereich 3-5) könnte beim Start der Kompostierung inhibierend wirken, so dass möglicherweise die Umsetzung des Abfalls zu Kompost nur unvollständig erfolgen kann (Sundberg *et al.*, 2004). Sundberg & Jönsson (2005) beobachteten, dass die Zugabe von chemischen (basischen) pH-Puffern einen schnelleren Start der Kompostierung ermöglichen und inhibierende Effekte so reduziert werden konnten. Forster *et al.* (1993) beschreibt, dass Küchenabfall mit einem Gemüseanteil häufig einen pH-Wert zwischen 4,5–5 aufweist. Weiterhin sollen diese niedrigen pH-Werte das Pilzwachstum verstärken (Choi & Park, 1998; Ryckeboer *et al.*, 2003) und zu einer Inhibierung der Mikroorganismenzahl führen (Finstein & Morris, 1975; Beffa *et al.*, 1996). Jedoch konnten diese Phänomene bei dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Kompostierungsprozessen wurde zu Beginn der Kompostierung ein saurer pH-Wert von 4-5 gemessen. Die Zugabe von Hühnermist bei K1 (Tabelle 3) lässt vermuten, dass gerade dies vermieden werden sollte und zur pH-Wert-Erhöhung am Anfang des Prozesses beigetragen hat. Im weiteren Kompostierungsverlauf wurden pH-Werte im Bereich um 8 erreicht (Tabelle 19 und 20). Bei den untersuchten Kompostprozessen 1 und 2 (Reaktor A) konnte nach drei Kompostierungstagen der Anstieg des pH-Wertes auf 8 beobachtet werden. Bei den untersuchten Kompostierungsprozessen (K14, K17) von Reaktor B1, wurden die pH-Werte erst im Laufe des Prozesses gemessen. Auch dort konnte bei Zunahme der Temperatur ein pH-Wert von ca. 8 beobachtet werden. Die Umsetzung des Abfalls zu Kompost war vermutlich nicht durch pH-Einflüsse beeinträchtigt.

Choi & Park (1998) und Ryckeboer *et al.* (2003b) beschrieben Pilzwachstum in ihren untersuchten Kompostierungsprozessen. In dieser Arbeit wurden in den untersuchten Kompostproben Hefepilze generell nicht beobachtet. Auch durch Wachstumsversuche auf Malzagar (Kap. 2.4.1.2) konnten keine Pilze isoliert werden. Ishii *et al.* (2000) untersuchte Haushaltsabfall (Inputmaterial 20 kg) in einem Laborreaktor und konnte ebenfalls keine Pilze nachweisen, was auf eine zu hohe Trockenheit des Materials hinweisen könnte. Die in dieser Arbeit untersuchten Kompostprozesse hatten einen Feuchtegehalt zwischen 40 und 65 Gew-% und wiesen somit einen ausreichenden bis optimalen Feuchtegehalt für einen Kompostierungsprozess auf (Hupe *et al.*, 1996). Eine weitere Vermutung wäre ein zu niedriger C:N-Wert (dieser wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht), ein zu langsames Wachstum der Pilze und ein Überwuchern durch schnell wachsende Bakterien. Die untersuchte Gesamtkeimzahl der mesophilen und thermophilen Population (Kap. 3.1.2,

Abbildung 6, Kap. 3.1.2) lässt vermuten, dass sich Pilze durch die Häufigkeit und der Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien nicht etablieren konnten. Die in der Literatur (durch z. B. Kutzner & Kempf, 1996; Ishii *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001) bei einer aeroben Kompostierung beschriebenen Temperaturverläufe (mesophile Anlaufphase, Selbsterhitzung und mesophile Abklingphase,) wurden in beiden Reaktorsystemen (Abbildung 6) beobachtet. Unbehandelte biologische Abfälle, die der Wiederverwertung zugeführt werden, können unterschiedliche human-, tier- und phytopathogene Erreger enthalten (Philipp *et al.*, 1998). Untersuchungen von Roth (1994) und Knop *et al.* (1996) belegten das Vorhandensein von Salmonellen in 74 % der untersuchten Bioabfälle. In einer Studie mit getrocknetem Hühnerkot wurde *E. coli* nach 85 Kompostierungstagen isoliert, *Salmonella* sp. wurden dagegen nach 25 Tagen nicht mehr gefunden (Dorn & Schleiff, 1997). Ryckeboer *et al.* (2002a) beschreibt dass, um ein seuchenhygienisch unbedenkliches Produkt erhalten zu können, diese Erreger bei hohen Temperaturen inaktiviert werden müssen. Entsprechend besagt die Neuregelung der EU-Verordnung 2002 (EU, 1877/2006; EU, 2002), dass Abfälle der Kategorie III nur kompostiert werden dürfen, wenn die pathogenen Mikroorganismen bei 70 °C für 1 h abgetötet werden. Die Selbsterhitzungsphase der in dieser Arbeit untersuchten Kompostierungsprozesse reichte jedoch oft nicht aus, um die geforderte Temperatur zu gewährleisten. Deswegen wurde eine wie unter Kap. 2.2.1 beschriebene Zusatzheizung in den Mantel des Reaktors B1 integriert. Im Reaktor B1 konnte somit eine Hygienisierung zur Reduzierung des Gehalts an pathogenen Mikroorganismen durchgeführt werden. Die Untersuchung der überlebenden pathogenen MO wurde jeweils zum Ende der Kompostierung von der FU Berlin (Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Tier- und Umwelthygiene) durchgeführt. Als Maß für die Umsetzung der Hygienisierung wurde der Indikatororganismus *Salmonella Senftenberg* W 775 eingesetzt (BioAbfV, 1998). Ceustermans *et al.* (2007) beschrieb für *Salmonella Senftenberg* W 775, dass bei einer Kompostierungstemperatur zwischen 60-65 °C die Organismen nach 10 h abgetötet werden. Germer *et al.* (2010) untersuchte Kompostierungsprozesse (Toiletteninhalt, geschreddertes Pflanzenmaterial und Küchenabfälle) und stellte fest, dass niedrige Temperaturen (< 55 °C) keinen Effekt auf pathogene Mikroorganismen zeigten. Erst Temperaturen über 70 °C zeigten einen Rückgang von Enterokokken (*E. coli*) und *Salmonella Senftenberg* W 775. Singh *et al.* (2011 und 2012) beimpfte Kompostmaterial von unterschiedlichem Feuchtegehalt mit *Salmonella* und *E. coli*-Zellen und untersuchte nach welcher Zeit diese inaktiv wurden. Es zeigte sich, dass ein höherer Feuchtegehalt (50 %) und eine schnellere Erhitzung des Komposts zu einer besseren Inaktivierung führten. Idelmann (2005) untersuchte die Wirksamkeit des Hygieneprüfsystems

der BioAbfV (1998) und zeigte, dass die Indikatororganismen weit höhere Temperaturen überleben konnten als zuvor angenommen. Die in dieser Arbeit untersuchten Kompostierungsprozesse zeigten nach der Hygienisierungsphase kaum bis keine Detektion von Salmonellen, jedoch wurden Enterokokken mit 10^2 - 10^6 KBE/g TG beobachtet (pers. Mitteilung Claudia Hilbert, FU Berlin). Weiterhin wurden zwei *Enterococcus*-Stämme aus der mesophilen Abklingphase isoliert (Tabelle 21b, Kap. 3.2), was die Überlebensfähigkeit dieser Bakterien noch einmal verdeutlicht. Die Durchmischung des Kompostmaterials erfolgte durch eine eingebaute Welle, möglicherweise bildeten sich dennoch Randgebiete und die Temperaturen waren dort nicht ausreichend hoch genug, um die pathogenen Mikroorganismen vollständig abzutöten. Die Hygienisierungstemperatur und Hygienisierungszeit hat jedoch nicht nur einen positiven Einfluss auf pathogene Mikroorganismen, sondern könnte auch die für den Kompostierungsprozess wichtigen Mikroorganismen nachhaltig beeinflussen. Einen Hinweis darauf ergaben die Glukosemessungen von K17 (Abbildung 5, Kap. 3.1.1), in denen sich ein hoher Glukosewert in der Hygienisierungszeit (Tag 10, bei 72 °C) zeigte. Dies könnte ein Hinweis auf eine verringerte Glukoseumsetzung und auf eine Inhibierung der Population hindeuten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in beiden Reaktortypen ein schneller Stoffumsatz (Freisetzung von Ammonium, Abnahme TOC, Glukosefreisetzung und -verwertung) erfolgte und davon ausgegangen werden kann, dass beide Reaktoren geeignete Modelle für die weiteren mikrobiologischen Untersuchungen der Kompostprozesse darstellten.

4.2 Mikrobiologie der Bioabfall-Kompostierung

Die häufigsten kultivierbaren Mikroorganismen in der Welt gehören nach Ottow (2011) zu den *Proteobacteria* (54 %), gefolgt von den *Actinobacteria* (23 %), *Firmicutes* (14 %) und *Bacterioidetes* mit 6 %. Vergleicht man Boden und Kompost, so kann davon ausgegangen werden, dass Mikroorganismen im Kompostierungsprozess ähnliche Prozesse wie Mikroorganismen im Boden durchführen und als Destruenten organisches Material umsetzen. Auch Boden ist ein Lebensraum der Temperaturschwankungen unterliegt, somit sollten ähnliche Mikroorganismengruppen in beiden Habitaten vorkommen. Nach der taxonomischen Zugehörigkeit der kultivierbaren *Bacteria* in Böden (sie stellen etwa 0,1 % bis 20 % der mikroskopisch sichtbaren Zellen dar) ist bekannt, dass die überwiegende Anzahl der Phyla auf *Actinobacteria* > *Firmicutes* > *Proteobacteria* > *Bacterioidetes* entfällt (Ottow, 2011). Somit unterscheiden sich die häufig isolierbaren *Bacteria* aus Böden in ihrer Reihenfolge von der allgemeinen Häufigkeit der kultivierbaren *Bacteria*. Im Gegensatz dazu fällt die hohe

Diversität der mittels molekularbiologischer Methoden ermittelten Mikroorganismen auf. Janssen (2006) untersuchte 32 publizierte 16S rRNA-Genbibliotheken mit 3398 Klonen, die aus verschiedenen Böden gewonnen wurden. Dabei zeigte sich, dass 92 % der 16S rRNA-Gene zu den Phyla der *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* und *Firmicutes* gehörten. Allerdings war nur ein kleiner Teil der Sequenzen aufgrund von Sequenzhomologien bestimmten, kultivierbaren Arten zuzuordnen. Das zeigt, dass im Boden eine große Diversität von bisher nicht kultivierbaren *Bacteria* herrscht. Durch Pyrosequenzierung von vier Boden-Klonbibliotheken (16S rRNA-Gene) konnte Roesch *et al.* (2007) *Proteobacteria* als häufigste Organismen ermitteln, dicht gefolgt von *Bacteroidetes*. Des Weiteren wurden *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira* und *Verrucomicrobia* detektiert. Somit wurde durch die molekularbiologischen Methoden die weite Verbreitung von *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* und *Bacteroidetes* bestätigt. Nairo *et al.* (2003) zeigte einen kultivierbaren Anteil der Kompostbakterien von ca. 54 %, somit kann davon ausgegangen werden, dass eine gute Kultivierbarkeit der Bakterien aus Kompostmaterial vorliegt. Ryckeboer *et al.* (2003a) fasste die in der Literatur beschriebenen, aus Kompost isolierten Bakterien zusammen (Tabelle 27). Im Vergleich zum Boden (*Actinobacteria*) gehörten die *Proteobacteria* zu den am häufigsten aus Kompost isolierten Mikroorganismen, dicht gefolgt von *Firmicutes* und *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* wurden dagegen 3-fach weniger detektiert.

Tabelle 27: Phylogenetische Zuordnung der aus Kompost isolierten Bakterien, zusammengefasst aus Literaturdaten nach Ryckeboer *et al.* (2003a).

Anzahl der Isolate	Phyla
53	<i>Proteobacteria</i>
42	<i>Firmicutes</i>
39	<i>Actinobacteria</i>
12	<i>Bacteroidetes</i>
2	<i>Thermotogales</i>
1	<i>Aquificiae</i>
1	<i>Archaea</i>

4.2.1 Nachweis von Kompostbakterien durch Kultivierung

Durch die Inkubation der Agarplatten für zwei Tage bei 30 °C für mesophile Mikroorganismen und bei 55 °C für thermophile Mikroorganismen, konnte nach dem Auszählen der Platten eine jeweilige Gesamtzellzahl von bis zu $6,4 \times 10^{12}$ KBE/g TG ermittelt werden. Die maximalen Zellzahlen thermophiler Bakterien wurden bei beiden Reaktoren nach ca. 4-5 Tagen erreicht und blieben auch in der Abklingphase entsprechend hoch, was auf eine gute Sauerstoffversorgung schließen lässt. Die mesophilen Populationen folgten der Temperatur des Kompostierungsprozesses. Mit sinkender Temperatur stieg die Zahl der Mesophilen und übertraf nach kurzer Zeit die der Thermophilen um ein Mehrfaches, was auf eine intensive bakterielle Aktivität in der Nachrotte hinweist (Abbildung 6, Kap. 3.2.1).

Es konnten in dieser Arbeit 44 verschiedene Mikroorganismen isoliert werden. Die meisten Isolate, die von NAI isoliert wurden, waren aufgrund ihrer 16S rRNA-Ähnlichkeit von >97 % einer bekannten Art zuzuordnen (mit vier Ausnahmen, siehe Tabelle 22). Abbildung 23 fasst ihre Zuordnung zu den phylogenetischen Gruppen zusammen.

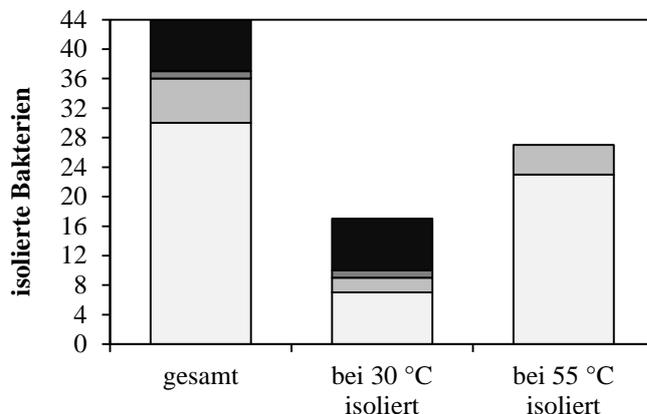


Abbildung 23: Anzahl der isolierten Mikroorganismen bezogen auf die einzelnen phylogenetischen Gruppen. Dargestellt sind die gesamten isolierten Bakterien und die bei 30 °C und bei 55 °C isolierten Bakterien.

Firmicutes (□), *Proteobacteria* (▒), *Bacterioidetes* (■), *Actinobacteria* (■).

Davon wurden mit 68 %, dem höchstem Anteil, Vertreter der *Firmicutes*, gefolgt von *Actinobacteria* (16 %) und *Proteobacteria* (14 %) isoliert. Es konnte jedoch nur ein Vertreter der *Bacterioidetes* isoliert werden. Untersuchungen von Tang *et al.* (2005) zeigten, dass *Actinobacteria*, welche vorrangig in der mesophilen Phase auftreten, auch die thermophile Phase überleben können und danach wieder in der mesophilen Abklingphase aktiv wurden. Auch in dieser Arbeit wurden *Actinobacteria* nur aus der mesophilen Abklingphase und bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C isoliert (Tabelle 21). In Kompostierungsprozessen

spielen auch *Pseudomonaden* eine Rolle, da sie am Umsatz von Stickstoffverbindungen, wie z. B. an der Denitrifikation und Stickstoff-Fixierung sowie am Umsatz verschiedener organischer Verbindungen beteiligt sein können (Lalucat *et al.*, 2006, Danon *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnte ein Vertreter (*Pseudomonas* sp.) aus der mesophilen Abklingphase bei 55 °C isoliert werden (Tabelle 21).

Vergleicht man die phylogenetische Zuordnung der nach Ryckeboer *et al.* (2003a) beschriebenen Kompostisolate mit denen in dieser Arbeit isolierter Bakterien, dann ist ein deutlicher Unterschied sichtbar, denn der Anteil von isolierten *Proteobacteria* war hier wesentlich geringer. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass insbesondere bei der Kultivierung bei 55 °C die schnell wachsenden *Bacilli* gramnegative Organismen überwuchsen und diese somit nicht oder nur schwer isoliert werden konnten. Durch die Verwendung von häufig genutzten Komplexmedien (z. B. NAI) wurden hauptsächlich bekannte Mikroorganismen isoliert. Schon Janssen (2006) beschreibt, dass nur ausdauernde Kultivierungsanstrengungen zum Erfolg führen, um bisher unbekannte Bakterien als Reinkultur zu gewinnen. Tatsächlich gelang es, durch Erproben von verschiedenen selektiven Medien, wie Kompostextraktmedium und durch gezielte Zugabe von Vancomycin zum Komplexmedium, weitere Bakterien zu isolieren (Kap. 3.2.). Dabei wurden z. B. Stamm 9-4-E3, 8-4-E12 und 8-4-E13 von Kompostextrakt-Medium isoliert und durch Zugabe von Vancomycin zu NAI konnten verschiedene Stämme wie z. B. Stamm 16-2-VM-2 und 16-2-VM-3 isoliert werden. Es wurde aufgrund von molekularbiologischen Analysen (Kap. 3.3.2.) angenommen, dass auch im thermophilen Bereich Vertreter der *Bacterioidetes* vorhanden waren. Ryckeboer *et al.* (2003 a, b) beschrieben die Isolierung von *Bacterioidetes*-Stämmen aus Kompostmaterial. Jedoch gelang es nur bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C einen Stamm zu isolieren, der nach der Sequenzanalyse der Gruppe der *Bacterioidetes* zuzuordnen war - der *Sphingobacteriaceae* Stamm 28-4-3. Dieser stammte jedoch aus einer thermophilen Kompostprobe und nach Untersuchung seiner Wachstumstemperaturen gehört er zu den thermotoleranten bis moderat-thermophilen Bakterien (Kap. 3.2.2.4). Die obere Temperaturgrenze seines Wachstums betrug 55 °C. Es kann daher vermutet werden, dass er bei Inkubation der Proben bei 55 °C durch thermophile Mikroorganismen, die bei 55 °C besser wachsen können (so wie *U. thermosphaericus* oder *G. pallidus*, Anhang 21) überwachsen wurde.

Die Stämme 8-4-E12 und 8-4-E13 wurden im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert und die Eigenschaften im Ergebnisteil dargestellt (Kap. 3.2.2.2) Die phylogenetischen Positionen von Stamm 8-4-E12 und 8-4-E13 sind im Stammbaum in Abbildung 24 dargestellt. In

Anhang 9 ist der Vergleich der nächstverwandten Arten mit den Stämmen 8-4-E12 und 8-4-E13 gezeigt.

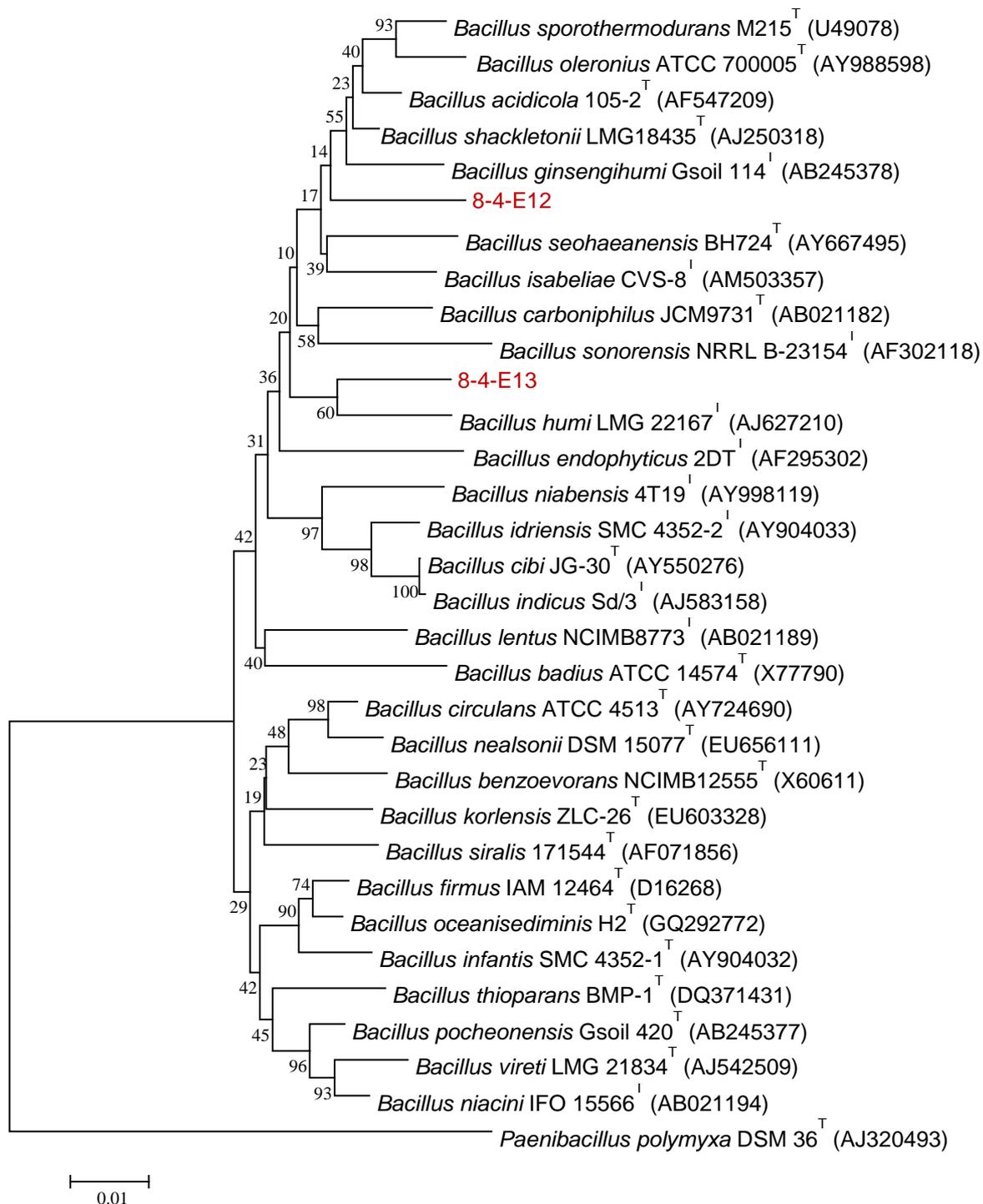


Abbildung 24: Stammbaum basierend auf den 16 S rRNA-Gensequenzen der *Bacillus* sp. Stämme 8-4-E12 und 8-4-E13 und von Typstämmen verwandter *Bacillus*-Arten. Die Länge des Balkens stellt einen Sequenzunterschied von 0,01 dar. Der Stammbaum wurde mit der Neighbor-Joining-Methode in MEGA5 erstellt. Die Distanzen zwischen den Bakterien wurden mittels p-distance Methode erstellt und sind als Basendifferenz pro Sequenzposition angegeben (Maßstab).

Durch Sequenzanalyse der 16S rRNA-Gene konnten die Stämme 8-4-E12 und 8-4-E13 in die Gattung *Bacillus* eingeordnet werden und es wird angenommen, dass sie wahrscheinlich zu zwei neuen moderat-thermophilen *Bacillus*-Arten gehören.

Der Stamm 28-4-3 konnte in die Familie *Sphingobacteriaceae* eingeordnet werden und hatte nur eine geringe Übereinstimmung mit der 16S rRNA-Gensequenz des nächst verwandten Typstammes *Sphingobacterium composti* T5-12^T (93 %). Der Stammbaum ist in Anhang 19 dargestellt. Sowohl die entfernte Ähnlichkeit des 16S rRNA-Gens zu denen der Gattung *Sphingobacterium* als auch weitere unterschiedliche Merkmale (Anhang 10) weisen darauf hin, dass es sich bei Stamm 28-4-3 um einen Vertreter einer neuen Gattung (gen. nov.) und neuen Art (sp. nov.) handeln könnte.

Nur Stamm 16-2-VM-3 wurde bei 55 °C isoliert, ist jedoch auch als moderat thermophil einzuschätzen (Wachstum von 30-55 °C). Als nächstverwandtes Bakterium wurde aufgrund der 16S rRNA-Gensequenz *Phyllobacterium myrsinacearum* bestimmt, welches jedoch als nicht thermophil beschrieben wurde und eine Wachstumstemperatur zwischen 28 und 34 °C besitzt (Bergey & Hold, 2000). Es wird vermutet, dass 16-2-VM-3 aufgrund der geringen 16S rRNA Sequenzähnlichkeit zu *Phyllobacterium myrsinacearum* einer neuen Gattung innerhalb der *Phyllobacteriaceae* (Lee *et al.*, 2005) angehört.

Kürzlich wurden von Yabe *et al.* (2012a, b) zwei neue Bakterien-Arten beschrieben. Nach ersten Untersuchungen mit RDP wiesen die Stämme eine hohe Sequenzidentität mit denen hier in der Arbeit beschriebenen Stamm 28-4-3 und dem Stamm 16-2-VM-3 auf. Ob beide Stämme zur gleichen Art der neuen beschriebenen Stämme gehören, konnte in dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden und sollte durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

4.2.2 Molekularbiologische Analyse der Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft während der Bioabfall-Kompostierung

Um Aussagen über die mikrobielle Populationszusammensetzung zu erhalten, wurden Untersuchungen mittels molekularbiologischer Methoden wie ARDRA durchgeführt. ARDRA-Analysen können einen tieferen Einblick über die mikrobielle Zusammensetzung der an der Kompostierung beteiligten Bakterien geben (Dees, 2001; Guo, 2007; Cho, 2008). Bei der Aufarbeitung der Proben spielte der Zellaufschluss eine wichtige Rolle (LaMontagne *et al.*, 2002). So kann er für die Unter- oder Überrepräsentation von gramnegativen Bakterien verantwortlich sein, sowie auch die Scherung der DNA begünstigen (Kirk *et al.*, 2004). Für Boden konnte Stach *et al.* (2001) mittels dem „UltraClean Soil™ DNA Isolation-Kit“ (MoBio Inc., Solana, CA, USA), der auf dem gleichen Prinzip wie der „PowerSoil™ DNA Isolation

Kit“ beruht, nachweisen, dass dieser zu einer hohen Ausbeute von nicht gescherter DNA führt, die ausreichend PCR-Produkte lieferte, was darauf schließen lässt, dass PCR-hemmende Huminstoffe gut abgetrennt wurden (Tsai & Olson, 1991; Porteous *et al.*, 1997, LaMontagne *et al.*, 2002). Liesebach & Ewald (2008) überprüften in einer Pilotstudie sechs Extraktionsmethoden für Bakterien aus Waldböden. Dabei wurde auch der „PowerSoil™ DNA Isolation Kit“ verwendet. Dieses Kit zeigte als Einziger eine konstant gute Extraktion der DNA und Entfernung von Huminsäuren für die anschließende Gewinnung von PCR-Produkten. Nach Vergleich beider Extraktionskits für die Extraktion von Kompost-DNA (Daten nicht gezeigt), wurde für diese Arbeit, aufgrund der erhaltenen noch höheren Ausbeute an extrahierter DNA und mehr PCR-Produkt, der „PowerSoil™ DNA Isolation Kit“ gewählt. Es wurden verschiedene Phasen von den Kompostierungsprozessen 1, 2 und 17 untersucht und 12 16S rRNA-Klondatenbanken erstellt, davon fünf mit dem Primerpaar fD1 & rP2 (nur Reaktor A, Daten nicht gezeigt) und sieben mit dem Primerpaar fD1 & Eub534r. Durch bessere Einklonierbarkeit der PCR-Produkte, was vermutlich an der kürzeren 16S rRNA-Sequenz lag, wurden die Primer fD1 & Eub534r auch für Untersuchungen von Reaktor B1 weiter verwendet. Klone mit den am häufigsten vorkommenden Inserts wurden analysiert (Tabelle 24, 25 und Anhang 2). Nach der Sequenzierung der 16S rRNA-Gensequenzen von 15-20 Klonen erfolgte deren Zuordnung zu Phyla, deren Anteile an der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft in Anhang 20 dargestellt sind. Obwohl es sich um drei individuelle Kompostierungsprozesse handelte, wurden bei den untersuchten Kompostierungsprozessen vor allem Vertreter der *Firmicutes*, *Proteobacteria* und *Bacterioidetes* gefunden. Während in K1 der Anteil der *Firmicutes* generell relativ gering war, stellten sie in K2 und K17 in der thermophilen Phase die meisten Vertreter, nahmen jedoch während der anschließenden Abkühlung ab. Es zeigte sich, dass bei abnehmender Temperatur der Anteil der *Bacterioidetes* zunahm, so wie auch schon bei K1 beobachtet wurde. In K2 wurde sowohl in der thermophilen Phase (Tag 4, 63 °C), als auch in der mesophilen Abklingphase (Tag 6, 32 °C) ein geringer Anteil an *Actinobacteria* detektiert, im Gegensatz zu der sonst in der Literatur beschriebenen hohen Anzahl an *Actinobacteria* (Partanen *et al.*, 2010) konnte dies mit molekularbiologischen Methoden nicht bestätigt werden. Palmisano & Barlaz (1996) beschrieben die Häufigkeit von *Actinobacteria* im Kompost als Indikator für den Reifegrad des Komposts. Danon *et al.* (2008) untersuchten zwei Proben eines bereits ausgereiften Komposts, der für ein weiteres Jahr gelagert wurde, und bestätigten eine hohe Anzahl an *Actinomyceten*. Ebenso berichteten Hiraishi *et al.* (2003b) über die zunehmende Zahl von *Actinobacteria* während langer Inkubationszeiten in Kompost. Somit lässt sich vermuten, dass

sich durch die kurze Dauer der Kompostierung *Actinobacteria* nicht schnell genug etablieren konnten und somit nur unterrepräsentativ gefunden wurden. Mesophile Vertreter der *Actinobacteria* wie *Arthrobacter*, *Microbacterium* oder *Rhodococcus* wurden zwar aus der mesophilen Phase von Kompostierungsprozess 14 und 15 aus Reaktor B1 isoliert (Tabelle 21, Anhang 17), waren aber nicht in den untersuchten 16S rRNA-Gendatenbanken nachweisbar (siehe Tabelle 24, 25, Anhang 2). Dies stimmt mit der Beobachtung von Green *et al.* (2004) überein, die *Actinobacteria* zwar im Kompost fanden, diese aber nicht numerisch dominant auftraten. Ein Vergleich mit Klonbibliotheken aus einem Reaktor für die Kompostierung von Schweinen- und Pilzkulturabfällen von Cho *et al.* (2008) zeigt, dass ähnliche Tendenzen bei der Verteilung der Phyla wie in der vorliegenden Arbeit auftraten. So wurden in der mesophilen Phase und anfänglichen thermophilen Phase (bis 48 °C) *Bacteroidetes* (52,5 %) und *Proteobacteria* (40 %) als dominanteste Phyla detektiert, wobei diese dann in der thermophilen Phase (57-62 °C) auf 22,5 % abnahmen, während *Firmicutes* auf 65 % anstiegen und in der fortgeschrittenen thermophilen Phase (70-78 °C) sogar 97,5 % erreichten.

Besonders auffällig und bisher wenig beschrieben war der relativ hohe Anteil von *Bacteroidetes* in allen untersuchten Phasen der Kompostierung. *Bacteroidetes* können Makromoleküle wie Proteine, Stärke, Cellulose und Chitin abbauen, die auch Bestandteile des Kompostes sind (Manz *et al.*, 1996, Roesch *et al.*, 2007). Die Gruppe der *Bacteroidetes* umfasst vier Klassen: *Bacteroidia*, *Flavobacteria*, *Sphingobacteria* sowie *Cytophagia* und umfasst anaerob (z. B. *Bacteroidia*) und aerob (z. B. *Flavobacteria*) lebende Spezies (Garitty *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2011). Bis 2010 waren über 7000 verschiedene Arten bekannt welche zusammenfassend in Tabelle 28 dargestellt sind.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Anzahl der phylogenetischen Aufteilung in der Gruppe der *Bacteroidetes* bezogen auf den Stand im NCBI 2010 (Thomas *et al.*, 2011)

Klasse	Anzahl		
	Familien	Gattungen	Arten
<i>Bacteroidia</i>	5	28	858
<i>Flavobacteria</i>	3	110	3583
<i>Sphingobacteria</i>	3	29	787
<i>Cytophagia</i>	3	47	765
unklassifizierte Stämme	-	-	996

In Abbildung 25 ist der Anteil der Klassen der in dieser Arbeit untersuchten Klone, welche zur Gruppe der *Bacteroidetes* gehören, gezeigt. Der hohe Anteil an *Flavobacteria*, welche

dominant in der mesophilen Phase zu finden waren, sowie der *Sphingobacteria* beweist, dass eine gute Sauerstoffversorgung bei der Kompostierung vorlag, da fast ausschließlich aerob lebende Spezies gefunden wurden. *Cytophagia* und *Bacteroidia* waren hier eher unterrepräsentiert. Die meisten der in dieser Arbeit zur Gruppe der *Bacterioidetes* gehörenden Bakterien wurden in der mesophilen Phase (ca. 75 % K1, ca. 50 % K2, ca. 30 % K17) gefunden. Es konnte auch ein hoher Anteil von 10 (K17) bis zu 38 % (K1) in der thermophilen Phase detektiert werden, was auch Untersuchungen von Cho *et al.* (2008) zeigten, der auch *Bacterioidetes* in der thermophilen Kompostierungsphase detektieren konnte. Es kann vermutet werden, dass *Bacterioidetes* eine weitaus größere Rolle bei der Kompostierung spielen als bisher angenommen.

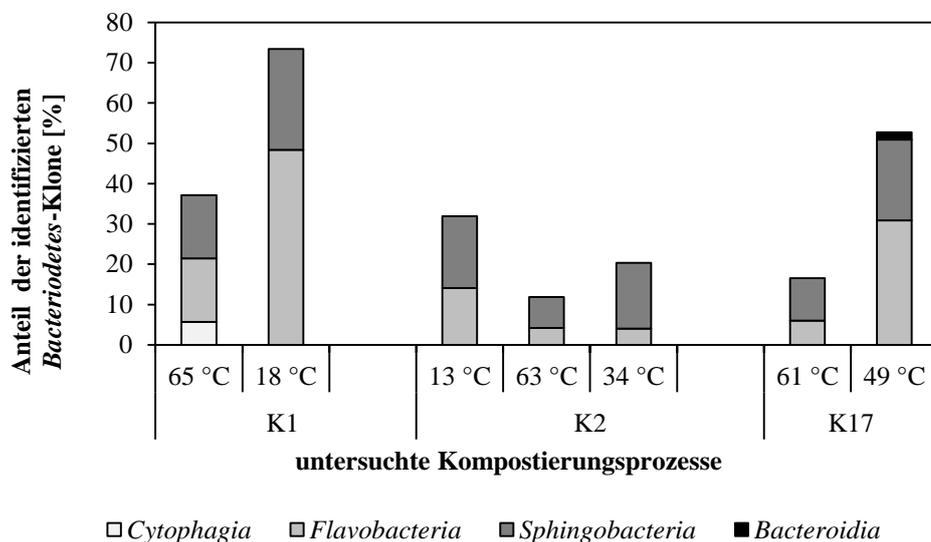


Abbildung 25: Durch ARDRA untersuchte Kompostierungsprozesse (K1, K2, K17) und der Anteil an verschiedenen Klassen der zu *Bacterioidetes* gehörenden Bakterien am Gesamtanteil der sequenzierten ARDRA-Klone. Der Anteil ist auf die Summe der untersuchten Klone bezogen und entspricht 100 %.

Durch die Untersuchungen mit ARDRA konnte nur ein geringer Anteil an Organismen nachgewiesen werden, der schon bekannten Arten zugeordnet werden konnte und Sequenzidentitäten von > 98 % aufwies. Janssen (2006) beschrieb dieses Phänomen für Bodenorganismen, denn auch dort waren nur wenige untersuchte 16S rRNA-Sequenzen schon bekannten Organismen zuzuordnen. Der hohe Anteil an Bakterien ohne Zuordnung zu bekannten Arten weist darauf hin, dass der größte Anteil der Organismen und damit auch ihre physiologische Aktivität, noch unbekannt sind. Da nur ein geringer Anteil an Klonen (90 Klone/Bibliothek) untersucht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass nur ein geringer Anteil an der Gesamtpopulation wirklich nachgewiesen wurde. Trotzdem konnten durch

ARDRA erste Hinweise auf Veränderungen in den verschiedenen Phasen der Kompostierung gewonnen werden (Zusammenfassung in Anhang 20).

4.3 Dynamik der Mikroorganismenzusammensetzung im Kompostierungsprozess

4.3.1 Die t-RFLP-Analyse als ein schnelles Werkzeug für die Analyse von Veränderungen in der mikrobiellen Community

In dieser Arbeit erfolgte die Analyse der Populationsdynamik mittels t-RFLP Analysen von 16S rRNA-Genen. Kirk *et al.* (2004) und Wagner *et al.* (2009 a, b) konnten zeigen, dass diese Methode gut geeignet ist, um einen schnellen Überblick über die Populationszusammensetzung zu erhalten. Die t-RFLP ist eine Methode, die bestimmten Faktoren unterliegt, welche das Ergebnis beeinflussen könnten. Es ist bekannt, dass die Primerauswahl einen großen Einfluss auf die mit molekularbiologischen Methoden nachweisbaren Mikroorganismen hat (Yang *et al.*, 2005). Wagner (2004) zeigte jedoch, dass mit Verwendung der Primer fD1 und Eub534r zur Amplifikation der 16S rRNA-Gene aus einer Mischkultur, die Ergebnisse von t-RFLP Analysen weitgehend mit denen mikroskopischer Analysen übereinstimmten. Eigene Erfahrungen zeigten, dass diese Primer zuverlässiger zu einem PCR-Produkt aus Kompost-DNA führten als die Primer fD1 und rP2 (Weisburg *et al.*, 1991; Daten nicht gezeigt). Aus den unterschiedlichen Proben der Kompostierung wurde in der Regel zwischen 5 und 20 ng DNA extrahiert, die der PCR gut zugänglich waren. Dies war die Grundlage für die Verfolgung der Populationsdynamik der in dieser Arbeit untersuchten Kompostierungsprozesse 2, 14 und 17. Auch ohne die phylogenetische Zuordnung einzelner t-RFs waren aus den t-RFLP-Profilen Aussagen zu Änderungen der Organismenstruktur ersichtlich, wie z. B. beim Übergang von der mesophilen zur thermophilen Phase und nach der Hygienisierungszeit (Abbildung 11 und 12, Anhang 3, 4, 7). Die t-RFLP-Analysen sollten die Populationsdynamik in Abhängigkeit von der Temperaturänderung im Kompost erfassen. Deutlich wurde die Populationsänderung bei zunehmender Temperatur (60-70 °C) und sich anschließender Abkühlung. Wie auch schon Tiquia *et al.* (2005b) beobachteten, konnte mittels t-RFLP eindeutig ein Einfluss der hohen Temperaturen und eine Zunahme der Diversität beobachtet werden.

In Reaktor B1 konnten durch den Einbau des Heizmantels Hygienisierungen durchgeführt werden (K14, zwei Hygienisierungen; K17 eine Hygienisierung). Bei Temperaturen nahe 70 °C wurde besonders bei K14 während der 1. Hygienisierungsphase (67 °C) eine

Veränderung der Populationszusammensetzung beobachtet (Anhang 7). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass viele der in der Selbsterhitzung dominierenden Mikroorganismen eine längere Hygienisierungszeit und Temperatur von über 70 °C nur schwer verkraften und dies dazu führt, dass sich andere Bakterien etablieren können. Im Prozess K17 konnte bei der Hygienisierungsphase ebenfalls eine Änderung der Populationsdynamik während der Hygienisierung beobachtet werden, nach Beginn der Hygienisierung (72 °C) wurden dominante t-RFs kleiner und waren nach 24 h teilweise nicht mehr detektierbar. Die Populationen, die in der Selbsterhitzung dominierten, konnten sich nun wieder etablieren. Es wird vermutet, dass die Hygienisierung trotz der etwa 10 °C höheren Temperaturen mit dem natürlichen Selbsterhitzungsprozess vergleichbare Populationsstrukturen hervorgebracht hat. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die metabolische Aktivität der thermophilen Bakterien während der Hygienisierung zurückkehrt und einen positiven Einfluss auf die weitere Umsetzung des Kompostmaterials ausüben kann, wenn die Temperatur 70 °C nicht übersteigt und die Hygienisierungsphase an die Selbsterhitzungsphase gekoppelt ist.

Die Sequenzen, die in dieser Arbeit neu generierten Klonbibliotheken (Tabelle 24 und 25, Anhang 2), stellten für die Verfolgung der Populationsdynamik eine wichtige Voraussetzung dar, da von ausgewählten Klonen die t-RFs bestimmt wurden (Kap. 3.3.3, Tabelle 24, 25, Anhang 2) und diese dann in den t-RFLP-Profilen gezielt verfolgt werden konnten. Der theoretische Verdau basiert auf den Sequenzen der ausgewählten klonierten 16S rRNA-Gene oder Isolate und wurde mittels Clone Manager 5.0 und der Erkennungssequenzen der Enzyme MspI, RsaI, AluI und BsuRI gewonnen (Daten nicht gezeigt). Die praktischen t-RFs wurden wie bei Kap. 2.8.10 beschrieben ermittelt und mit den theoretisch erhaltenen Schnittstellen verglichen. Wie schon von Schmidt (2009) und Wagner *et al.* (2009b) beobachtet, zeigten sich im t-RFLP-Profil Unterschiede zwischen theoretischen und praktischen verdauten Schnittstellen von kleiner zwei bis fünf, selten auch 10 bp (Daten nicht gezeigt). Durch den theoretischen Verdau kommt es weiterhin öfter zu gleichen t-RFs für unterschiedliche Bakterien, welche dann zu Problemen bei der Zuordnung in t-RFLP-Profilen führten (Tiquia *et al.*, 2005a). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Unterschiede zwischen theoretischen und praktischen t-RFs auf den ROX-Standard oder GC-Gehalt der Mikroorganismen zurückzuführen waren (Lueders & Friedrich, 2003, Hartmann & Widmer, 2008). Der bei Restriktionsanalysen gelegentlich auftretende Verdau von einzelsträngigen PCR-Produkten kann zu zusätzlichen t-RFs führen, diese wurden als Pseudopeaks bezeichnet (Egert & Friedrich, 2003). Daher ermöglichen praktisch ermittelte t-RFs eine realistischere Zuordnung als theoretische t-RFs im t-RFLP-Profil (Székely *et al.*, 2009).

Székely *et al.* (2009) untersuchte von einer Pilzkompostierungsanlage eine Mischung aus Hühner- und Pferdeabfall, Weizenstroh und Gips in einem großtechnischen Ansatz (2170 kg). Nach einer 15-tägigen Kompostierung (Phase 1) wurde der Ansatz dann für ca. 4 Tage künstlich (Phase 2) bei Temperaturen zwischen 48-58 °C erhitzt. Székely *et al.* (2009) führten Untersuchungen mittels DGGE und t-RFLP durch. Dabei konnten 82 % der t-RFs in den t-RFLP-Analysen von Phase 1 zugeordnet werden und 40 % davon zur Gruppe der *Proteobacteria*. Ein häufig vorkommendes Bakterium war *Pseudoxanthomonas taiwanensis* (Chen *et al.*, 2002) jedoch wurde auch *U. suwonensis* (Kim *et al.*, 2006) detektiert. In Phase 2 (nach der Erhitzung) zeigten sich eher *Actinobacteria*, es konnten in dieser Phase aber auch *Sphingobacteria* spp. und *U. thermosphaericus* gefunden werden. Diese Organismen wurden auch in dieser Arbeit sowohl isoliert, als auch mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen (Tabellen 24, 25, Abbildungen 13, 14, Kap. 3.3). Die Untersuchung der Dynamik ausgewählter Populationen im Prozess basierte auf praktisch ermittelten t-RFs. Es stellte sich jedoch heraus, dass die praktisch ermittelten t-RFs von verschiedenen 16S rRNA-Genen aus Klonen und Isolaten nicht immer im t-RFLP-Profil von Kompostproben identifiziert werden konnten. Die t-RFs von klonierten 16S rRNA-Genen konnten dabei häufiger identifiziert werden als die t-RFs der untersuchten Isolate, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass nur solche Bakterien, die in hoher Zahl im Kompostierungsprozess vorhanden waren, auch in den Klonbibliotheken und entsprechend in den t-RFLP-Profilen repräsentiert sind (Kap. 3.3.3, Abbildungen 11, 12). Somit kann vermutet werden, dass ein Teil der isolierten Stämme nicht zu den dominantesten Mikroorganismen in den durch t-RFLP untersuchten Kompostierungsprozessen gehörten. Nur von den häufigsten 16S rRNA-Genen in den angelegten Klonbibliotheken wurden die t-RFs bestimmt. Obwohl dies nur einen kleinen Anteil aller Gene ausmacht, konnten damit einige dominante t-RFs zugeordnet werden (siehe Abbildung 11 und 12, Kap. 3.3.3). Lüders und Friedrich (2003) berichteten, dass sich Peakflächen von t-RFs zur Quantifizierung von ausgewählten Organismen eignen. Auch in dieser Arbeit wurde der relative Anteil verschiedener dominanter t-RFs am Gesamtanteil einer Probe bestimmt (Kap. 3.3.3, Anhang 8). Jedoch zeigte sich, wie auch schon Schmidt (2009) beschrieb, dass je nach verwendetem Restriktionsenzym der Peakflächenanteil eines t-RF eines bestimmten Bakteriums variierte. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass nicht alle Restriktionsenzyme eine Schnittstelle innerhalb der untersuchten 550 bp-Sequenz des Zielorganismus bzw. mehrere Organismen dieselbe Schnittstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym besaßen und es so zu unterschiedlichen prozentualen Zuordnungen kommen konnte. Wenn auch PCR-basierte

Methoden in der Regel keine quantitative Aussage über die Häufigkeit einzelner Bakterien in Mischkulturen zulassen (Richardson *et al.*, 2002), konnte durch die Analyse der relativen Peakflächen von bestimmten t-RFs gezeigt werden, wie sich bestimmte Populationen über einen Kompostierungszeitraum verhalten. Es konnten eindeutige Korrelationen zwischen den bakteriellen Vertretern und ihren t-RFs mit den für sie typischen Wachstumstemperaturen ermittelt werden (siehe Kap. 3.3 und 3.6). Die in dieser Arbeit durchgeführten t-RFLP Analysen zeigten, dass es möglich ist, den Populationsverlauf eines Kompostprozesses zu verfolgen und diese Methode gut geeignet ist, einen schnellen Überblick über Populationsveränderungen zu erhalten.

4.3.2 Dynamik von Vertretern der *Sphingobacteriaceae* während der Kompostierung

Wie schon in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, wurden durch ARDRA eine Reihe von Vertretern der *Bacterioidetes* in den untersuchten Kompostierungsprozessen gefunden. Ihre Häufigkeit war in der Regel in der mesophilen Abklingphase tendenziell höher als in der thermophilen Phase (Tabelle 24, Tabelle 25, Anhang 2). Interessant war das Auftreten einer 16S rRNA-Gensequenz mit höchster Ähnlichkeit zu einem *Sphingobacteriaceae* Bakterium 37LGx-1 (99,3 %) in allen drei untersuchten Kompostierungsprozessen (Klon A25/B1/C28), was zeigt, dass Vertreter dieser Bakterien in den Kompostprozessen verbreitet zu sein schienen.

Sphingobacteriales wurden schon aus verschiedenen Kompostierungsprozessen isoliert, meistens jedoch aus der Rottephase und bei Temperaturen unter 60 °C (Ishii *et al.* 2000; Narihito *et al.* 2004; Cho *et al.* 2008; Yamada *et al.* 2008) dazu gehörten Vertreter aus der Familie der *Sphingobacteriaceae*, wie z. B. *Sphingobacterium composti* (Yoo, 2007), *Pseudosphingobacterium domesticum* (Vaz-Moreira, 2007), *Pedobacter composti* (Lee *et al.*, 2009) und *Olivibacter terrae* (Wang, 2008). In dieser Arbeit gelang es den *Bacterioidetes* sp. Stamm 28-4-3 aus Kompostierungsprozess 15 zu isolieren, der nach Überprüfung der Sequenz und seiner nahen Verwandtschaft zu dem unbeschriebenen *Sphingobacteriaceae* Bakterium 37LGx-1, der Familie der *Sphingobacteriaceae* zugeordnet werden konnte (Kap. 3.2.2.4). Dieses Bakterium war entfernt verwandt zu den bereits beschriebenen *Sphingobacteriaceae*-Isolaten aus Kompost. Eine Besonderheit dieses Stammes war, dass er auch noch bei Temperaturen von 50 °C ein gutes Wachstumsverhalten zeigte, wie *S. composti* der bis zu einer Temperatur von 45 °C wachsen konnte (Ten *et al.*, 2006), wogegen die in der Literatur beschriebenen anderen Stämme ein stärker an mesophile Bedingungen angepasstes Verhalten aufwiesen. Durch Restriktion mit RsaI und MspI zeigte sich, dass die t-RFs des 16S

rRNA-Gens des Isolates 28-4-3 identisch mit denen der untersuchten Klone A25, B1 und C28 waren (Kap. 3.3.2). Anhand der t-RFs (bp) 147 (MspI) und 316 (RsaI) wurde die Dynamik des Isolates bzw. der Klone in den Kompostierungsprozessen untersucht. So wurden in den untersuchten Kompostierungsprozessen 2, 14, 17 und 23 (siehe Kap. 3.3.3, 3.6.4.4, Abbildungen 11, 12, Anhang 3, 4, 7, 8) die t-RFs detektiert. Während die t-RFs in den Kompostierungsprozessen K2 und K14 ihre maximale relative Peakfläche bei 61 °C in der thermophilen Phase erreichten (Abbildung 11, Anhang 7) und in K2 über die Höchsttemperatur von 63 °C hinaus bis zur Abkühlung ihr Maximum beibehielten, traten im Prozess K17 die maximalen Peakflächen bei 48 °C vor der höchsten Temperatur in der Selbsterhitzung und bei 49 °C während der anschließenden Abkühlung auf (Abbildung 12). Nach der Hygienisierung bei über 70 °C konnten die t-RFs nicht wieder beobachtet werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass während der Hygienisierungsphase diese Bakterien stark gehemmt wurden. In jedem Fall war eine starke Vermehrung im Bereich der natürlichen thermophilen Phase zu beobachten. Die leichten Unterschiede in der Temperaturabhängigkeit in den einzelnen Kompostprozessen lassen sich möglicherweise auf verschiedene Stämme (die 16S rRNA-Gensequenzen der Muster A25, B1 und C28 waren nicht identisch) mit leicht unterschiedlichen Temperaturgrenzen oder auf den Einfluss verschiedener konkurrierender Bakterien in den untersuchten Prozessen zurückführen. Auch Cho *et al.* (2008) beobachtete eine steigende Anzahl an *Bacterioides* bei Temperaturen zwischen 43 bis 57 °C während der Kompostierung von Schweinegülle, was die große Bedeutung dieser Bakterien im Kompostierungsprozess unterstreicht. Die beschriebenen *Sphingobacteria* spp. waren ebenfalls größtenteils aus Kompost isoliert worden (Kim *et al.*, 2006b; Ten *et al.*, 2006), somit scheinen *Sphingobacteria* im Kompost eine entscheidende Rolle zu spielen.

Durch FISH-Experimente sollte die Dominanz von Stamm 28-4-3 im Kompost bestätigt werden (Kap. 3.5.1). Es konnten Signale im Kompost detektiert werden, jedoch waren weitaus mehr Signale mit der für die Gruppe der *Bacterioides* eingesetzten Sonde CFB319a zu beobachten (Abbildung 17). Da durch FISH nur lebende, aktive Bakterien detektiert werden können, könnte die niedrige Detektion der Signale auf die Inaktivität des Stammes hinweisen.

4.3.3 Quantifizierung ausgewählter Bakterien im Kompostierungsprozess

Für die absolute Quantifizierung im Kompostierungsprozess der ausgewählten Bakterien wurde die q-PCR verwendet, welche schon erfolgreich durch Zhang & Fang (2006) bei Umweltproben und von Wéry *et al.* (2008) an Klärschlammkompost angewendet wurde. Bei

Umweltproben zeigte sich, dass die q-PCR eine höhere Sensitivität und Reproduzierbarkeit im Vergleich zu DNA-Hybridisierungs- und PCR-basierenden Methoden hatte und auch unter 1×10^5 16S rRNA-Genkopien pro ml nachweisbar waren (Zhang & Fang, 2006). Somit kann davon ausgegangen werden, dass dies eine gute Methode darstellt, um Mikroorganismen auch in den untersuchten Kompostierungsprozessen zu detektieren. Die zu detektierenden Bakterien wurden nach ihrer Häufigkeit in den untersuchten Kompostierungsprozessen und ihren kompostrelevanten Eigenschaften, wie dem Temperatur- und Substratverwertungsspektrum und dem Besitz extrazellulärer Enzyme (Anhang 14 und 15) ausgewählt. Die Zellzahl wird durch die 16S rRNA-Genkopienzahl reflektiert. Da aber mehrere Kopien des 16S rRNA-Gens im Genom der Bakterien vorkommen können, kann die Genkopienzahl zu einer Überschätzung der Zellzahlen führen (Schmidt, 2009). Für die Genkopienzahlen der *Bacteria* bei K2 und K17 wurden ca. 1×10^9 bis 10^{10} Genkopienzahlen/g FG ermittelt. Bezogen auf das Trockengewicht wären die Werte etwa doppelt so hoch. Vergleicht man die Keimzahlbestimmungen der mesophilen und thermophilen *Bacteria* (Abbildung 6, Kap. 3.1.2) von Reaktor A und Reaktor B1 so wird deutlich, dass für K2 (Reaktor A) die Gesamtbakterienzahl für mesophile 2×10^7 bis 3×10^{11} KBE/g TG und für thermophile Mikroorganismen 4×10^4 bis 1×10^{12} KBE/g TG betragen. Für K17 (Reaktor B1) schwankten die Werte für mesophile Organismen zwischen 4×10^6 bis 2×10^9 KBE/g TG und für thermophile Organismen von 8×10^3 bis 2×10^9 KBE/g TG. Wéry *et al.* (2008) führte vergleichende Untersuchungen in Kompostmaterial an *E. coli* mittels q-PCR und Gesamtkeimzahlbestimmung durch. Dabei konnten sie zeigen, dass die Genkopienzahlen bis zu drei Größenordnungen höher lagen als die KBE-Zahlen der Gesamtkeimzahlbestimmung. Eventuell trugen Verluste bei der DNA-Extraktion zu einer geringeren Zahl detektierter 16S rRNA-Genkopienzahl bei.

Wie zu erwarten war, nahmen die Kopienzahlen der 16S rRNA-Gene der thermophilen Mikroorganismen mit steigender Temperatur zu. In K2 und K17 zeigten sich ähnliche Tendenzen, die 16S rRNA-Genkopienzahlen der untersuchten Bakterien folgten dem Verlauf der Kompostierungstemperatur, wobei sie artspezifische Populationsmaxima besaßen, die gut mit den Temperatur-Optima der entsprechenden Isolate übereinstimmten (Tabelle 28).

Der Anteil der Genkopienzahl der untersuchten Organismen an der Gesamt-Genkopienzahl (*Bacteria*) betrug in der mesophilen Phase von K2 und K17 größtenteils weniger als 1 %. In K2 änderte sich das bei Eintritt in die thermophile Phase. An Tag 3 bzw. Tag 4 (61 °C, 65 °C) wurden *P. taiwanensis* und *U. thermosphaericus* mit der höchsten Genkopienzahl im Vergleich zur Gesamtbakterienzahl (4-20 % in K2) nachgewiesen. Dieser hohe Anteil war

wahrscheinlich der Grund, warum es gelang, Vertreter dieser beiden Bakterien aus Proben von Tag 3 (61 °C) bzw. 4 (65 °C) zu isolieren. Auch in den Klonbibliotheken und zum Teil in den t-RFLP-Profilen waren sie neben anderen thermophilen Vertretern in dieser Phase nachweisbar. Die Quantifizierung durch q-PCR verdeutlichte den hohen Anteil der thermophilen Bakterien in der Selbsterhitzung und die Stabilität einiger Vertreter in der Hygienisierung.

4.3.4 Bestätigung der Zusammensetzung und Dynamik der Mikroorganismengemeinschaft durch Chinon- und FISH-Analyse

Um auszuschließen, dass die in dieser Arbeit mittels molekularbiologischen Methoden erhaltenen Ergebnisse aufgrund von unterschiedlicher DNA-Extraktionseffizienz oder Primerselektivität fehlerbelastet sind, sollte die Analyse der Chinon-Zusammensetzung erfolgen. Chinone galten schon längere Zeit als mögliche Biomarker für die qualitative und quantitative Analyse von mikrobiellen Populationen in der Umwelt und wurden auch schon für Kompostanalysen eingesetzt (Kurisu *et al.*, 2002, Hiraishi *et al.*, 2003b; Tang *et al.*, 2004; Fracchia *et al.*, 2006). Chinone sind lipidartige Moleküle und in allen Mikroorganismen vorhanden. Im Kompost vorrangig vorhanden sind Ubichinone und Menachinone (Hiraishi, 1999; Hiraishi *et al.*, 1996; 2003b). Ubichinone sind ein Indiz für die Anwesenheit von *Proteobacteria*, Menachinone dagegen für grampositive, Niedrig-GC-Bakterien. Menachinon 7 ist das Hauptchinon vieler *Firmicutes* aber auch einiger Vertreter der *Bacteroidetes*, wie *Sphingobacteria* und *Cytophagia* (Hiraishi *et al.*, 1999, Krieg *et al.*, 2011). Partiiell gesättigte Menachinone sind ein Zeichen für *Actinobacteria* (Hiraishi *et al.*, 2003b; Yu *et al.*, 2007). Hiraishi *et al.* (2003b) beschrieben *Actinobacteria* als dominante Gruppe im Kompostmaterial. Wie schon in Kapitel 4.2 beschrieben, konnten in dieser Arbeit nur sehr wenig *Actinobacteria* isoliert und auch mittels molekularbiologischer Methoden (ARDRA) nur im geringen Umfang detektiert werden. Ein weiterer Indikator war der geringe Anteil an partiiell gesättigten Menachinonen in den untersuchten Kompostierungsprozessen. Nur in K14, in dem über zwei Zyklen kompostiert wurde, stieg der Anteil der partiiell gesättigten Menachinone, fiel jedoch in den Hygienisierungsphasen (Tag 22 und 36, Abbildung 15) und blieb danach unterrepräsentiert. Dies bestätigt die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen, dass sich in den hier durchgeführten Kompostierungsversuchen *Actinobacteria* vermutlich nur schlecht durchsetzen konnten. Hiraishi *et al.* (2003b) konnte einen direkten Zusammenhang zwischen der Zu- bzw. Abnahme der Ubichinone zu der Ab-

bzw. Zunahme der partiell gesättigten Menachinone beobachten. Für die Kompostprozesse 2 und 17 zeigte sich eine Korrelation, jedoch in K14 konnte dieser Zusammenhang nicht beobachtet werden (Abbildung 15, Kap. 3.4). Die gefundene Chinon-Zusammensetzung spiegelte im Wesentlichen die Aussagen zur Zusammensetzung der ARDRA-Profile (Tabelle 24 und 25, Kap. 3.3.2) wider. Es zeigte sich ein dominanter Anteil an MK-7, was vermuten ließ, dass eine Dominanz von *Firmicutes* und *Bacteroidetes* vorlag. Die Beobachtung, dass der Anteil von UQ-9 und UQ-10 in der thermophilen Phase hoch war, könnte darauf hinweisen, dass eine relativ hohe Anzahl an γ - und α -*Proteobacteria* vorhanden waren, jedoch besitzen auch Pilze diese Hauptchinone (Kuraishi, 2000). Ihr Beitrag zu den Chinonen ist jedoch wahrscheinlich gering, da, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, keine Pilze beobachtet wurden. Auch in der Hygienisierungsphase (Tag 10, 72 °C) von K17 wurde ein hoher Anteil an *Proteobacteria* anhand des hohen UQ-9- und UQ-10-Anteils vermutet. MK-7 wurde wieder als dominantes Chinon beobachtet. In K2 konnte gezeigt werden, dass der Anstieg von MK-7 mit den steigenden Temperaturen korrelierte, was sehr gut zur Zunahme des Anteils der *Firmicutes* passen würde, welcher schon mit ARDRA gezeigt werden konnte (Kap. 3.3.2). In K14 und K17 wurden hohe MK-7 Werte auch während der Selbsterhitzungsphase bis 61 °C detektiert, übereinstimmend mit dem hohen Anteil von *Firmicutes*, die mittels ARDRA und t-RFLP (Abbildung 11, 12 Anhang 3, 4, 7) gezeigt werden konnte. In der folgenden Abkühlungsphase von K17 blieb der MK-7-Anteil hoch. Die molekularbiologischen Untersuchungen hatten hier jedoch eine starke Veränderung der Population hin zu *Bacteroidetes*, speziell zu *Sphingobacteriaceae* gezeigt. Das könnte erklären, warum in der nachgeschalteten Hygienisierungsphase der MK-7-Anteil kurzfristig zusammen mit dem typischen *Sphingobacteriaceae* t-RF (147/316) dramatisch sank. Der anschließende Wiederanstieg des MK-7 kann darauf hindeuten, dass sich endosporenbildende *Firmicutes* nach der Hygienisierungsphase wieder erholen konnten. Hiraishi *et al.* (2003b) untersuchte die Chinonzusammensetzung von Kompostproben aus drei Minireaktoren, welche mit Küchenabfall (9,5 kg), befüllt waren. Im Gegensatz zu dieser Arbeit beobachtete Hiraishi *et al.* (2003b), dass Ubichinone eher in der mesophilen Anfangsphase dominant waren und sich erst in der thermophilen Phase Menachinone etablieren konnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass möglicherweise die Chinon-Analyse ein noch umfassenderes Bild der Populationszusammensetzung in den Phasen der Kompostierung vermitteln kann.

Durch FISH-Experimente sollte dann das Verhältnis von *Firmicutes* zu *Bacteroidetes* näher untersucht werden. FISH hat zudem den Vorteil, nur lebende, aktive Bakterien zu erfassen

(Haruta *et al.*, 2002, Hiraishi *et al.*, 2003b, Maynard *et al.*, 2005). Die geringe Anzahl an Publikationen über FISH in Kompostproben (wie z. B. von Kurisu *et al.*, 2002; Hiraishi *et al.*, 2003b) lässt vermuten, da durch die komplexe Kompostmatrix das mikroskopische Zählen oft schwierig ist, dass diese Methode deshalb nur selten durchgeführt wird. Um verschiedene Phyla im Kompostierungsprozess zu untersuchen, wurden fluoreszenzmarkierte Sonden für *Bacteroidetes*, *Firmicutes* sowie γ -*Proteobacteria* und *Actinobacteria* eingesetzt. Beim Vergleich der Ergebnisse von Chinonanalysen und FISH in K2 und K17 (Kap. 3.5.1, Abbildung 16 und Anhang 12) zeigte sich bei allen untersuchten Proben, dass durch FISH stets höhere Anteile von *Firmicutes* gegenüber *Bacteroidetes* detektiert wurden. Das stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen der ARDRA-Analysen überein (Tabelle 24, 25, Anhang 2). Interessant war, dass auch bei hohen Temperaturen in der thermophilen Phase relativ viele *Bacteroidetes*-Zellen beobachtet wurden (Abbildung 16, 17). Allerdings schienen andauernde, sehr hohe Temperaturen die Stoffwechselaktivität der *Bacteroidetes* zu verringern, was sich in der starken Abnahme der spezifischen Fluoreszenzsignale am Tag 4 (K2) oder Tag 10 (K17) (Abbildung 16, Anhang 12) äußerte, während der Anteil an *Firmicutes* gleich blieb.

Die plötzliche Abnahme von MK-7 während der Hygienisierungsphase im untersuchten Reaktor B1 (K14 und K17, Abbildung 15) könnte also mit der Beeinträchtigung der *Bacteroidetes* erklärt werden. Der Anteil der durch FISH detektierten γ -*Proteobacteria* war relativ gering, was eventuell die Aussagen zur schlechten FISH-Detektierbarkeit gramnegativer Bakterien von Neef *et al.* (2003) bestätigen würde. Jedoch waren auch in der Chinonanalyse die Chinone UQ-8, -9 und -10 eher unterrepräsentiert, was insgesamt für eine geringe Anzahl von *Proteobacteria* sprechen würde. Weiterhin wurden keine *Actinobacteria* nachgewiesen, was das geringe Vorkommen dieser Bakterien in den untersuchten Kompostierungsprozessen nochmals bestätigte.

Übereinstimmend mit den molekularbiologischen Analysen wurden durch FISH die *Firmicutes* eindeutig als häufigste Mikroorganismengruppe bestätigt. Im Gegensatz zu den durch Hiraishi *et al.* (2003b) untersuchten Kompostierungsprozessen waren γ -*Proteobacteria* und *Actinobacteria* nicht dominierend in den Kompostierungsprozessen. Dagegen konnten *Bacteroidetes* als zweithäufigste Gruppe detektiert werden und es konnte auch mittels dieser Methoden die vermutlich bedeutende Rolle der *Bacteroidetes* im Kompostierungsprozess, bestätigt werden.

4.4 Einfluss von Starterkulturen auf die Kompostierung

Die Hauptkomponenten von organischem Material sind Polysaccharide (z. B. Cellulose), Proteine, Lipide und Lignin. Um diese zu verwerten, müssen die Mikroorganismen extrazelluläre Enzyme produzieren (Golueke, 1991; Davis *et al.*, 1992; Tuomela *et al.*, 2000; Ryckeboer *et al.*, 2003a). Thermophile Bakterien sind oft nicht nur an hohe Temperaturen angepasst, sondern können auch die bereits in der mesophilen Phase gespaltenen Polysaccharide oder durch eigene extrazelluläre Enzyme bereitgestellte Mono- und Disaccharide verwerten (Rüprich *et al.*, 1990). Viele Bakterien können Stärke mit Hilfe des Enzyms Amylase oder α -Glukosidase spalten, was für die mesophile Anfangsphase wichtig ist (Diaz-Ravina *et al.*, 1989; Atkinson *et al.*, 1996, Ryckeboer *et al.*, 2003a). Tiquia *et al.* (2001) zeigten für die mesophile Anfangsphase der aeroben Kompostierung von Geflügelkot und Rasenverschnitt, dass vor allem die Phosphatasen (z. B. saure und alkalische Phosphatase), die Leucin-Aminopeptidase und die β -Glukosidasen als extrazelluläre Enzyme aktiv sind. Küchenabfälle und Hausmüll besitzen einen hohen Celluloseanteil, β -Glukosidasen scheinen daher eine große Bedeutung für die Kompostierung zu spielen (Fischer *et al.*, 2001). Für den Einsatz als Starterkulturen wurden sechs Bakterien-Stämme, *U. thermosphaericus* Stamm 17-1-2, *B. thermoamylovorans* Stamm 8-4-7, *P. taiwanensis* Stamm 16-2-VM-2 und drei *Geobacillus*-Stämme (MS-X1, 29-10-PAA und 16-2-A) ausgesucht. Diese Stämme wuchsen gut bei Temperaturen über 50 °C und wurden als thermophil bis moderat-thermophil eingeschätzt (Kap. 3.6.1). Die Stämme zeigten zumeist Phosphatase-Aktivität sowie ein breites Spektrum weiterer extrazellulärer Enzymaktivitäten (Anhang 14) und ließen vermuten, dass sie somit eine aktive Rolle bei der Kompostierung spielen könnten. Mit dem *Bacillus* sp. Stamm 8-4-E12 wurde zudem ein thermotolerantes Bakterium ausgewählt (Tabelle 22). Vertreter der ausgewählten Isolate wurden teilweise auch bei anderen Kompostierungsprozessen nachgewiesen (Cho *et al.*, 2008) und schon erfolgreich als Starterkulturen getestet (Wang *et al.*, 2003; Vargas-Garcia *et al.*, 2007). Um den Lignin-Cellulose-Abbau in vier verschiedenen Kompostierungsansätzen zu verbessern, setzten Vargas-Garcia *et al.* (2007) *Bacillus shackletonii*, *Streptomyces thermovulgaris* und *U. thermosphaericus* in einer Konzentration von 10^6 - 10^7 KBE/g Kompostmaterial als Starterkulturen ein. Vargas-Garcia *et al.* (2007) beobachteten, dass die zugesetzten Starterkulturen die Reduktionsrate vom Ligningehalt erhöhten, wobei durch Zusatz von *U. thermosphaericus* die größte Lignin-Abbaurrate erreicht wurde.

Combet-Blanc *et al.* (1995) beschrieben *B. thermoamylovorans* als ein moderat-thermophiles, Amylose-hydrolysierendes Bakterium. Der Stamm 8-4-7 zeigte bei Wachstumsversuchen auf

NAI bis Temperaturen von 65 °C ein gutes Wachstumsverhalten und konnte somit als thermophil eingeordnet werden (Kap. 3.6.1, Anhang 21). Untersuchungen zu Enzymaktivitäten zeigten eine α -Glukosidaseaktivität, somit war davon auszugehen, dass dieser isolierte Stamm Amylose spalten konnte (Anhang 10, Kap. 3.6, Schmidt, 2009). Wang *et al.* (2003) untersuchten den Zusatz von *B. thermoamylovorans* SW25 als Starterkultur zu einem Klärschlamm-Gemüseabfallgemisch, welches nach der Kompostierung als Pflanzendüngemittel dienen sollte. Dabei zeigte sich ein Anstieg der Bakterien im Kompostierungsverlauf von $1,4 \times 10^7$ KBE/g TG auf $5,6 \times 10^8$ KBE/g TG. Es wurden Temperaturen von bis zu 60 °C erreicht und die Zugabe von 10-15 g des fertigen Komposts auf 1 kg Boden erhöhte das Wachstum der gedüngten Pflanzen um 113-164 %.

Strom (1985 a, b) isolierte über 750 sporenbildende Bakterien aus Kompost, wovon nur wenige bei Temperaturen über 60 °C wachsen konnten (z. B. *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*). Die als Starterkulturen ausgewählten *Geobacillus pallidus*-Stämme zeigten optimales Wachstum bis 65 °C und Stamm 16-2-A (*G. thermodenitrificans*) sogar bis 70 °C. Blanc *et al.*, (1997) isolierte *G. pallidus* und *G. thermodenitrificans* als dominante thermophile Bakterien aus der Rottephase bei einer Komposttemperatur zwischen 57-78 °C. Untersuchungen von Bustard *et al.* (2002) zeigten bei *Geobacillus pallidus* hitzestabile Enzyme und die Fähigkeit zum Abbau von 2-Propanol. Untersuchungen mit ApiZym[®]-Test zeigten ein positives Ergebnis bei der Fähigkeit zur Hydrolyse (Anhang 15) wodurch z. B. Stärke in der Rottephase abgebaut werden könnte. Die Verfolgung der Dynamik im Kompostierungsverlauf erfolgte mittels q-PCR (Punkt 3.6). Das Impfmateriale wurde mit einer Zellzahl von durchschnittlich $6,6 \times 10^6$ Zellen/g Inputmaterial pro Stamm inokuliert, eine Animpfdichte, welche auch von Vargas-Garcia *et al.* (2007) in dieser Größenordnung verwendet wurde. Es wurden die *Geobacillus* sp. Stämme MS-X1, 29-10-PAA und 16-2-A, *Ureibacillus thermosphaericus* Stamm 17-1-2, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* Stamm 16-2-VM-2, *Bacillus thermoamylovorans* Stamm 8-4-7 und *Bacillus* sp. Stamm 8-4-E12 zu Beginn der Kompostierung zugesetzt (Kap. 3.6.). Im Vergleich zur Kontrollkammer zeigte sich schon nach der Zugabe eine leicht erhöhte Zellzahl um 30 % und um 5-10 °C höhere Temperaturen (Abbildung 18, 19, Kap. 3.6.4). Die Organismen waren alle mittels q-PCR nachweisbar. Es erfolgte keine Zunahme in der mesophilen Phase, zum Teil kam es sogar zu einer Abnahme wie der von *B. thermoamylovorans*. In den meisten Fällen wurden die untersuchten Bakterien in der beimpften Kammer mit einer etwas höheren Genkopienzahl detektiert als in der Kontrollkammer. Während der Hygienisierungsphase fiel die starke Zunahme von *G. pallidus* und *U. thermosphaericus* in der beimpften Kammer auf. Dies korrelierte gut mit ihren

Wachstumsoptima (Anhang 21). Die schnellere Temperaturzunahme während der Hygienisierungszeit in der beimpften Kammer könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass die Bakterien an der Temperaturerhöhung beteiligt sein könnten.

In Versuch 21 wurden die Starterkulturen erst in der thermophilen Phase zugegeben, damit schon optimale Temperaturen im Reaktor vorlagen. Dabei konnte ein deutlicher Temperaturanstieg um mehr als 15 °C im Vergleich zur unbeimpften Kammer beobachtet werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Zugabe der Starterkulturen tatsächlich einen positiven Effekt haben könnten obwohl die mittels q-PCR untersuchten Genkopienzahlen von *U. thermosphaericus* und *P. taiwanensis* keine Hinweise auf einen höheren Populationsanteil in der beimpften Kammer lieferten. Somit ist davon auszugehen, dass der Zusatz thermophiler Starterkulturen zu einer Temperaturerhöhung führen kann, die für die Einsparungen von Heizenergie nutzbar gemacht werden könnte. Jedoch ist es dafür notwendig, den Zusatz der Starterkulturen und den Beginn der Hygienisierungsphase optimal aufeinander abzustimmen und eventuell einzelne Starterkulturen, wie z. B. *U. thermosphaericus* und *G. pallidus* zuzusetzen, denn die detektierte 16S rRNA Genkopienzahlen dieser Bakterien erreicht im Vergleich zur Gesamtzellzahl während der Hygienisierungsphase einen Anteil von bis zu 5 %. (Abbildung 20).

Für Versuch 23 wurden drei mesophile Stämme, *Arthrobacter arilaitensis* Stamm 9-4-E3, *Microbacterium hydrocarbonoxydans* Stamm 24-4-1 und der *Sphingobacteriaceae* Stamm 28-4-3 als Starterkulturen ausgewählt. Alle ausgewählten Stämme hatten gute Resultate bei der Untersuchung kompostrelevanter Eigenschaften, wie dem Temperatur- und Substratverwertungsspektrum und dem Besitz extrazellulärer Enzyme gezeigt (Punkt 3.6, Anhang 14 und 15). Auffällig war die größere Vielfalt von Exoenzymen für den Umsatz der untersuchten Substratgruppen bei diesen Stämmen im Vergleich zu den thermophilen Vertretern. Insbesondere Stamm 28-4-3 zeigte für die mesophile Phase die von Tiquia *et al.* (2001) zuvor beschriebenen Enzymaktivitäten. Die Starterkulturen wurden gleich zu Beginn in K23 mit einer Animpfkonzentration von ca. 10^6 KBE/g TG zugesetzt (Anhang 5). Gerade am Anfang des Prozesses konnte ein Temperaturunterschied von +5 °C in der beimpften Kammer festgestellt werden. Auch im weiteren Verlauf blieb die Temperatur in der beimpften Kammer 5-10 °C über der unbeimpften Kammer (Abbildung 22). Die Verfolgung der zugesetzten Mikroorganismen erfolgte mit t-RFLP. Die t-RFs der Stämme 24-4-1 und 9-4-E3 (Tabelle 26) wurden nicht detektiert, was eventuell auf die geringe Animpfkonzentration im Vergleich zur Gesamtzellzahl (siehe auch Anhang 5) zurückzuführen sein könnte. Umso interessanter war, dass wie in Reaktor B1 (Abbildung 12, Anhang 4), die t-RFs des Stammes

28-4-3 bzw. verwandter *Sphingobacteriaceae* gut nachweisbar waren, was auf einen hohen Anteil an der Mikroorganismengemeinschaft schließen lässt. Allerdings war in Versuch 23 nur zu Beginn (Tag 2) eine deutlich höhere Peakfläche dieser t-RFs in der beimpften Kammer im Vergleich zur unbeimpften Kammer nachweisbar. Dies könnte die Vermutung zulassen, dass 28-4-3 auch schon zu Beginn zu den um 5 °C höheren Temperaturen in der beimpften Kammer beigetragen hat. Dies zeigt sowohl den möglicherweise positiven Effekt auf die Temperaturerhöhung im Kompostierungsprozess, als auch wieder die Bedeutung der *Sphingobacteriaceae* im Kompostierungsprozess und ihren generell hohen Anteil (da auch in der Kontrollkammer nachweisbar) an der Kompostgemeinschaft.

Die erfolgreichste Temperaturerhöhung wurde nach Zugabe von einer Kompostrückstellprobe ermittelt. Dabei wurde eine Endprobe (10 l) aus der unbeimpften Kammer von Kompost 19 entnommen und gleich zu Beginn in die rechte Kammer von Kompostierungsprozess 20 zugesetzt. Auch Sundberg & Jönsson (2005) beobachteten nach dem Animpfen mit Kompostrückstellproben (20, 100, 200 und 400 g) besonders bei 200 und 400 g einen positiven Effekt auf die Temperaturentwicklung und den gesteigerten Abbau organischer Materialien. Mit dem Zusatz der Rückstellprobe wurde so möglicherweise die Zahl der mesophilen Organismen in K20 erhöht, vergleichbar mit dem Zusatz der mesophilen Starterkulturen in K23. Korrespondierend mit der in der beimpften Kammer erreichten, um ca. 10 °C höheren Temperatur, wurden in der thermophilen Phase deutlich höhere 16S rRNA-Genkopienzahlen von *U. thermosphaericus* gemessen (Kap. 3.6.4.3, 4).

Obwohl es nicht ganz auszuschließen ist, dass andere als mikrobiologische Parameter, wie z. B. die Belüftungsrate, den Effekt des schnellen Temperaturanstiegs in der Hygienisierung mit bewirkten, so ist doch aufgrund der höheren Zellzahlen und deren Zunahme in der Hygienisierungsphase der beimpften Reaktorkammer von einem Einfluss der mesophilen und thermophilen Starterkulturen auf den Kompostierungs- und Hygienisierungsprozess auszugehen. Eventuell sollten diese Versuche mit einer Mischung von mesophilen und thermophilen Organismen erfolgen, dies konnte jedoch nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Diversität der Bakteriengemeinschaften von verschiedenen Kompostierungsprozessen in zwei Kompost-Reaktoren mit 400 l (Reaktor A) und 700 l (Reaktor B1) Fassungsvermögen näher charakterisiert sowie Versuche mit Starterkulturen zur möglichen Erhöhung der Kompostierungstemperaturen durchgeführt.

Es wurden sieben Klonbibliotheken von 16S rRNA Genen angelegt und durch Restriktionsanalyse amplifizierter ribosomaler DNA (ARDRA) und Sequenzierung charakterisiert. Dies führte zur Identifikation von 53 16S rRNA-Gensequenzen, wovon 31 eine Sequenzidentität von weniger als 97 % zu Sequenzen von beschriebenen Arten aufwiesen.

Es wurden 44 Bakterienstämme isoliert; von fünf Stämmen betrug die Sequenzidentität der 16S rRNA-Gene zum nächstverwandten Typstamm < 97 %. Morphologische und physiologisch-biochemische Eigenschaften der ausgewählten Mikroorganismen *Bacillus* sp. 8-4-E12 und 8-4-E13, *Sphingobacteriaceae* Stamm 28-4-3 und *Phyllobacterium* sp. 16-2-VM-3 wurden näher charakterisiert und die Beschreibung als neue Arten vorbereitet.

Die Veränderung der Mikroorganismengemeinschaft während des Kompostierungsprozesses und insbesondere in Folge einer Hygienisierungsphase bei Temperaturen von ca. 70 °C wurde unter anderem mit Hilfe von terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (t-RFLP)-Analysen der 16S rRNA-Gene in drei ausgewählten Kompostierungsprozessen untersucht. Durch vorherige experimentelle Bestimmung der Restriktionsfragmente (t-RFs) von isolierten Stämmen und klonierten 16S rRNA-Genen konnten einzelne Bakterien im Kompostmaterial nachgewiesen und ihre Populationsdynamik über den Kompostierungsprozess verfolgt werden. Es wurde festgestellt, dass die Hygienisierungsphase keinen gravierenden Einfluss auf die Populationsdynamik ausübte.

Durch ARDRA wurde ein hoher Anteil an *Bacterioidetes* in den Kompostproben nachgewiesen. In den ARDRA-Klonbibliotheken von den Kompostierungsprozessen 1, 2 und 17 trat mit einer hohen Häufigkeit eine 16S rRNA-Gensequenz auf, die eine Sequenzidentität von 97-99,4 % zu dem in dieser Arbeit isolierten *Sphingobacteriaceae* Stamm 28-4-3 besaß. Die terminalen Restriktionsfragmente (t-RFs) dieses Stammes und der untersuchten Klone aus den Kompostierungsprozessen 1, 2, und 17 stimmten überein (Enzym: MspI: 147 bp, RsaI:

316 bp). Die Untersuchung der Populationsdynamik dieser Stämme zeigte, dass sie bei Temperaturen zwischen 49 und 60 °C ein Maximum erreichten und gegenüber den während der Hygienisierung herrschenden höheren Temperaturen empfindlich waren.

Vergleichende Untersuchungen mittels Chinonanalytik und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zeigten, dass *Firmicutes* die am häufigsten vertretende Gruppe war. Mittels dieser Methoden bestätigten sich die Erkenntnisse aus den molekularbiologischen Untersuchungen, dass Vertreter der *Firmicutes*, *Bacteroidetes* sowie *Alpha-* und *Gamma-Proteobacteria* den größten Anteil an der Mikroorganismengemeinschaft besaßen, während *Actinobacteria* nur in geringem Maße nachweisbar waren.

Die thermophilen Isolate *Ureibacillus thermosphaericus* Stamm 17-1-2, *Pseudoxanthomonas taiwanensis* Stamm 16-2-VM-2, *Geobacillus pallidus* Stamm MS-X1 und *Bacillus thermoamylovorans* Stamm 8-4-7 sowie die mesophilen Organismen *Microbacterium hydrocarbonoxydans* Stamm 24-4-1, *Arthrobacter arilaitensis* Stamm 9-4-E3, *Bacillus* sp. Stamm 8-4-E12 und *Sphingobacteriaceae* sp. Stamm 28-4-3 wurden hinsichtlich ihrer Eigenschaften als mögliche Starterkulturen charakterisiert.

Durch den Einbau einer Metallwand in den Reaktor B1, konnte die Kompostierung mit und ohne Starterkulturen gleichzeitig, aber voneinander getrennt durchgeführt werden (Reaktor B2). Die Starterkulturen wurden in unterschiedlichen Zusammensetzungen den Kompostierungsprozessen 19, 21, 22 und 23 zugegeben. Im Kompostierungsprozess 20 wurde außerdem eine Rückstellprobe von einer unbeimpften Kompostierungsprobe (10 l) zugesetzt. Mit Hilfe spezifischer Primer wurden quantitative Real Time PCR-Analysen (q-PCRs) durchgeführt, um die Populationsdynamik der ausgewählten Isolate *U. thermosphaericus*, *P. taiwanensis*, *G. pallidus*, *B. thermoamylovorans*, *Bacillus* sp. Stamm 8-4-E12 und die Gesamt-Bakterienzahl im Kompostierungsprozess zu verfolgen. Dabei zeigten sich Korrelationen zwischen den Wachstumsoptima der Bakterien und ihrer Häufigkeit im Kompostierungsprozess. Deutlich konnte dabei beobachtet werden, dass bei Zusatz von Starterkulturen die Kompostierungstemperatur etwas erhöht war gegenüber der Kammer ohne Zusatz. Beim Vergleich der Versuche mit Starterkulturen bewirkte der Zusatz einer Rückstellprobe die stärkste Temperaturerhöhung.

6. Literatur

- Albert, R. A., Archambault, J., Rossello-Mora, R., Tindall, B. J., Matheny, M.** (2005) *Bacillus acidicola* sp. nov., a novel mesophilic, acidophilic species isolated from acidic Sphagnum peat bogs in Wisconsin. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2125–2130.
- Amann, R. I., Krumholz L., Stahl D. A.** (1990) Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762–770.
- Amann, R. I, Ludwig, W., Schleifer, K. H.** (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**:143-169.
- Atkinson, C.F., Jones, D. D., Gauthier, J. J.** (1996) Biodegradabilities and microbialactivities during composting of oxidation ditch sludge. *Compost Sci. Util.*, **4**(1): 84-96.
- Bahadır, M., Parlar. H., Spitteller, M.** (2000) Springer Umweltlexikon. Springer Verlag, Berlin.
- Baldauf, S., Bergmeister S.** (2006) Abbauverhalten von ausgewählten organischen Schadstoffen in Klärschlammkomposten bei veränderten Rotteparametern. Diplomarbeit, HTL Dornbirn.
- Barton, L. L.** (2005) Structural and functional relationships in prokaryotes. Springer Science and Business Media, Inc., New York, N.Y.
- Barrena, R., D’Imporzano, G., Ponsá, S., Gea, T., Artola, A., Vázquez, F., Sánchez, A., Adani, F.** (2009). *Journal of Hazardous Materials* **162** (2-3), pp 1065-1072.
- Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P. F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J. L., Aragno, M.** (1996) Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 degrees C). *Appl Environ Microbiol* **62**:1723-1727.
- Bergey, D. H. and Holt, J. G.** (2000) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, **9**. Edt. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Biddlestone, A. J., Gray, K. R., Day, C. A.** (1987) Composting and straw decomposition. in: Forster C. F. and Wase D. A. J(eds.). *Environmental Biotechnology*. Ellis Horwood Ltd, Chichester, UK, pp **135-175**, zitiert in Kämpfer & Weißenfels (2001)

- Bioabfallverordnung-BioAfV** (21. September 1998) BGBl. I S. 2955, Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden – Bioabfallverordnung – zuletzt geändert durch Artikel 1 u. Artikel 4 der Verordnung vom 23. April 2012 (BGBl. I S. 611)
- Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T., Aragno, M.** (1997) Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. *Int J Syst Bacteriol* **47**:1246-1248.
- Brock, T. D. and Freeze, H.** (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a non-sporulating extreme thermophile, *Journal of Bacteriology*, **98**:289-297.
- Bustard, M. T., Whiting, S., Cowan, D. A. Wright, P. C.** (2002) Biodegradation of high concentration isopropanol by solvent-tolerant thermophile, *Bacillus pallidus*. *Extremophiles* **6**: 319-323.
- Cataldo, D. A., Maroon, M., Schrader, L. E., Youngs, V. L.** (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Science and Plant Analysis* **6**:71-80.
- Ceustermans, A., De Clercq, D., Aertsen, A., Michiels, C., Coosemans, J., Ryckeboer, J.** (2007) Inactivation of *Salmonella Senftenberg* strain W 775 during composting of biowastes and garden wastes. *J. Appl. Microbiol.* **103**:53–64.
- Chen, M. Y., Tsay, S. S., Chen, K. Y., Shi, Y., C., Lin, Y. T., Lin, G. H.** (2002) *Pseudoxanthomonas taiwanensis* sp. nov., a novel thermophilic, N₂O-producing species isolated from hot springs. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:2155-2161.
- Cho, K. M., Lee, S. M., Math, R. K., Islam, S. M., Kambiranda, D. M., Kim, J. M., Yun, M. G., Cho, J. J., Kim, J. O., Lee, Y. H., Kim, H., Yun, H. D.** (2008) Culture-independent analysis of microbial succession during composting of swine slurry and mushroom cultural wastes. *J Microbiol Biotechnol* **18**:1874-1883.
- Choi, M. H., Park, Y.-H.** (1998). The influence of yeast on thermophilic composting of food waste. *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**: 175-178.
- Cole, J. R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R. J., Kulam-Syed-Mohideen A. S., McGarrell D. M., Marsh T., Garrity G. M., Tiedje J. M.** (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**: D141-145; doi: 10.1093/nar/gkn879.
- Combet-Blanc, Y., Ollivier, B., Streicher, C., Patel, B. K. C., Dwivedi, P. P., Pot, B., Prensier, G., Gracia, J.-L.** (1995) *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a moderately thermophilic and amyolytic Bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 9-16.

- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., Wagner, M.** (1999) The domain specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**:434-444.
- Danon, M., Franke-Whittle, I. H., Insam, H., Chen, Y., Hadar, Y.** (2008) Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing. *FEMS Microbiol Ecol* **65**: 133–144.
- Das, K., and Keener, H.** (1997) Moisture effect on compaction and permeability in composts. *J. Environ. Eng.* **123**: 275–281.
- Davis, C. L., Donkin, C. J., Hinch, S. A., Germishuizen, P.** (1992) The microbiology of pine bark composting: an electron-microscope and physiological study. *Bioresour. Technol.*, **40**:195-204 zitiert in Ryckeboer *et al.* (2003).
- De Bertoldi, M., Vallini, G., Pera, A.** (1983) The biology of composting: a review. *Waste managment & research* **1**:157-176.
- Dees, P. M. and Ghiorse, W. C.** (2001) Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiol Ecol* **35**:207-216.
- Diaz-Ravina, M., Acea, M. J., Carballas, T.** (1989) Microbiological characterisation of four composted urban refuses. *Biol. Wastes*, **30**:89-100 zitiert in Ryckeboer *et al.* (2006).
- Dorn, W. and Schleiff, G.** (1997) Veterinary-hygenic aspects of assessment on processes of handling poultry faeces. *J. Vet. Med. B* **44**:105–118. zitiert in Maciorowski *et al.* (2007).
- Düngemittelverordnung-DüMV** (2008) BGBl. I S. 2524, Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln (Nr. 60); aufgehoben durch § 11 V. v. 05.12.2012 BGBl. I S. 2482.
- Egert, M. and Friedrich, M. W.** (2003) Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* **69**:2555-2562
- Epstein, E.** (1997) *The science of composting*. Technomic Publishing Co., Lancaster, USA.
- EU-VERORDNUNG (EG) Nr. 1774/2002** DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES (3 Oktober 2002) mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte.

EU-VERORDNUNG (EG) Nr. 1877/2006 DER KOMMISSION (18. Dezember 2006), Amtsblatt der Europäischen Union (zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 878/2004 mit Übergangsregelungen gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 hinsichtlich bestimmter tierischer Nebenprodukte, die als Material der Kategorien 1 und 2 eingestuft werden und für technische Verwendungszwecke bestimmt sind).

EU-VERORDNUNG (EG) Nr. 1069/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES (21. Oktober 2009) mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 (Verordnung über tierische Nebenprodukte).

EU-VERORDNUNG (EG) Nr. 142/2011 DER KOMMISSION (25. Februar 2011) zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte sowie zur Durchführung der Richtlinie 97/78/EG des Rates hinsichtlich bestimmter gemäß der genannten Richtlinie von Veterinärkontrollen an der Grenze befreiter Proben und Waren.

Finstein, M. S. and Morris, M. L. (1975) Microbiology of municipal solid waste composting. *Adv. Appl. Microbiol.*, **19**:113-151.

Finstein, M. S., Cirello, J., MacGregor, S. T., Miller, F. C. (1980) "Engineering principles of sludge composting", *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **52**, 2037-2042.

Fischer, J. L., Albrecht, A., Kämpfer, P. (2001) Mikrobiologie der Kompostierung von Abfällen. in: Kämpfer P. & Weixenfeld W.D (Eds.) *Biologische Behandlung organischer Abfälle.*, Springer, Berlin, pp: 6-38

Forster, J. C., Zech, W., Würdinger, E. (1993) Comparison of chemical and microbiological methods for the characterization of the maturity of composts from contrasting sources. *Biol Fertil Soils* **16**:93-99.

Fortina, M. G., Pukall, R., Schumann, P., Mora, D., Parini, C., Manachini, P. L., Stackebrandt, E. (2001) *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson *et al.* 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:447-455

Fracchia, L., Dohrmann, A. B., Martinotti, M. G., Tebbe, C. C. (2006) Bacterial diversity in finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**:942–952.

- Fuchs, J. G.** (2004) Healthier fruit trees through compost; In: Häseli, Andreas (Ed.) Tagungsband zur FiBL Bioobstbautagung (2004) in Frick. Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Frick, pp. 13-15.
- Germer, J., Boh, M. Y., Schoeffler, M., Amoah, P.** (2010) Temperature and deactivation of microbial faecal indicators during small scale co-composting of faecal matter. *Waste Management* **30**:185-191.
- Gisi, U., Schenker, R., Schulin, R., Stadelmann, F. X., Sticher, H.** (1997) *Bodenökologie*. Thieme, Stuttgart.
- Golueke, C.G.** (1991) Principles of composting. In: The Staff of Biocycle Journal of Waste Recycling. The Art and Science of Composting. The JG Press Inc., Pennsylvania, USA, pp. 14-27 zitiert in Ryckeboer *et al.* (2003)
- Grabbe, K. and Schuchardt, F.** (1993) Grundlagen der Kompostierung. - In: KTBL (Hrsg.): Kompostierung und landwirtschaftliche Kompostverwertung; KTBL-Arbeitspapier **191**:49-64, Landwirtschaftsverlag Münster.
- Green, S. J., Michel, F. C. Jr., Hadar, Y., Minz, D.** (2004) Similarity of bacterial communities in sawdust- and straw-amended cow manure composts. *FEMS Microbiol Lett* **233**:115-123.
- Guo, Y., Zhu, N., Zhu, S., Deng, C.** (2007) Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts. *J Appl Microbiol* **103**:1344-1354
- Halet, D., Boon, N., Verstraete, W.** (2006) Community dynamics of methanotrophic bacteria during composting of organic matter. *J Biosci Bioeng* **101**:297-302.
- Hallberg, K. B., Coupland, K., Kimura, S., Johnson, D. B.** (2006) Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in north wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* **72**:2022-2030.
- Hanif, M., Atsuta, Y., Fujie, K., Daimon, H.** (2012) Supercritical Fluid Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography of Respiratory Quinones for Microbial Community Analysis in Environmental and Biological Samples. *Molecules* **17**:2628-2642.
- Hartmann, M. and Widmer, F.** (2008) Reliability for detecting composition and changes of microbial communities by T-RFLP genetic profiling. *FEMS Microbiol Ecol* **63**:249-260.
- Haruta, S., Kondo, M., Nakamura, K., Aiba, H., Ueno, S., Ishii, M., Igarashi, Y.** (2002) Microbial community changes during organic solid waste treatment analysed by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**:224-231.

- Haug, R. T.** (1993) The practical handbook of compost engineering. Lewis Boca Raton, Florida, U.S.A. (zitiert in Fischer *et al.*, 2001)
- Helfer, A., Merrettig-Bruns, U.** (2001) Testverfahren zur aeroben, biologischen Abbaubarkeit von Feststoffen. In Kämpfer P. & Weißenfels W.D (Eds.) Biologische Behandlung organischer Abfälle., Springer, Berlin, **pp**: 123-148).
- Hempfen, S.** (2006) Auswirkungen der neuen Veterinärrechtsvorschriften auf der Entsorgung biogener Abfälle und tierischer Nebenprodukte im **19.** Aachener Kolloquium Abfallwirtschaft, Aachen.
- Herrmann, R. F. and Shann, J. F.** (1997) Microbial Community Changes During the Composting of Municipal Solid Waste. *Microb Ecol* **33**:78-85.
- Heyrman, J., Vanparys, B., Logan, N. A., Balcaen, A., Rodriguez-Diaz, M., Felske, A., De Vos, P.** (2004). *Bacillus novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drentensis* sp. nov., from the Drentse A grasslands. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 47–57.
- Hiraishi, A., Ueda, Y., Jishighara, J., Mori, T.** (1996) Comparative lipoquinone analysis of influent sewage and activated sludge by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *J Gen Appl Microbiol* **42**:457-469.
- Hiraishi, A.** (1999) Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. *J Biosci Bioeng* **88**:449-460.
- Hiraishi, A., Iwasaki, M., Kawagishi, T., Yoshida, N., Narihiro, T., Kato, K.** (2003a) Significance of lipoquinones as quantitative biomarkers of bacterial populations in the environment. *Microbes Environ* **18**:89-93.
- Hiraishi, A., Narihiro, T., Yamanaka, Y.** (2003b) Microbial community dynamics during start-up operation of flowerpot-using fed-batch reactors for composting of household biowaste. *Environ Microbiol* **5**:765-776.
- Hiraishi, A. H., Yamanaka, Y. Y., Narihiro, T.** (2000) Seasonal microbial community dynamics in a flowerpot-using personal composting system for disposal of household biowaste. *J Gen Appl Microbiol* **46**:133-146
- Holmes, B., Owen, R. J., Weaver, R. E.** (1981) *Flavobacterium multivorum*, a new species isolated from human clinical specimens and previously known as Group IIk, Biotype 2. *Int.J.Syst.Bacteriol.***31**:21-34.

- Holmes, B., Hollis, D.G., Steigerwalt, A. G., Pickett, M. J., Brenner, D. J.** (1983) *Flavobacterium thalpophilum*, a new species recovered from human clinical material. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **33**:677-682.
- Holmes, B., Weaver, R. E., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J.** (1988) A taxonomic study of *Flavobacterium spiritivorum* and *Sphingobacterium mizutae*: proposal of *Flavobacterium yabuuchiae* sp. nov. and *Flavobacterium mizutaii* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:348-353.
- Hormann, K., and Andreesen J. R.** (1989) Reductive cleavage of sarcosine and betaine by *EuBacterium acidaminophilum* via enzyme systems different from glycine reductase. *Arch. Microbiol.* **153**: 50-59.
- Huang H., Spencer J. L., Soutyrine A., Guan J., Rendulich J., Balachandran A.** (2007) Evidence for degradation of abnormal prion protein in tissues from sheep with scrapie during composting. *Can J Vet Res* **71**:34–40.
- Hupe, K., Heyer, K. U., Stegmann, R. (1997) Biologische Bioabfallverwertung: Kompostierung kontra Vergärung. Forschungsbericht, Ingenieurbüro für Abfallwirtschaft IFAS; Hamburg -Harburg.
- Idelmann, M.** (2005) Hygienisierung von Kompost. Schriftenreihe des Fachgebietes Abfalltechnik, Dissertationen Band 6. Hrsg.: A.I.Urban, Kassel.
- Ishii, K., Fukui, M., Takii, S.** (2000) Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *J Appl Microbiol* **89**:768-777.
- Janssen, P. H.** (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1719-1728.
- Juteau, P., Tremblay, D., Villemur, R., Bisailon, J. G., Beudet, R.** (2005) Analysis of the bacterial community inhabiting an aerobic thermophilic sequencing batch reactor (AT-SBR) treating swine waste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**:115–122.
- Kämpfer, P., Steiof, M., Dott, W.** (1991) Microbial characterization of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria. *Microb. Ecol.* **21**: 227-51.
- Kämpfer, P. and Weißenfels, W. D.** (2001) Biologische Behandlung organischer Abfälle. Springer, Berlin.
- Kehres, B.** (2006) Stoffliche Nutzung von Bioabfällen am Beispiel von Komposten und Gärprodukten. **19.** Aachener Kolloquium Abfallwirtschaft, Aachen.

- Kim, B., Y, Lee S. Y, Weon H. Y., Kwon S. W., Go S. J., Park Y. K., Schumann P., Fritze D.** (2006a) *Ureibacillus suwonensis* sp. nov., isolated from cotton waste composts. Int J Syst Evol Microbiol **56**:663-666.
- Kim, K. H., Ten, L. N., Liu, Q. M., Im, W. T., Lee, S. T.** (2006b) *Sphingobacterium daejeonense* sp. nov., isolated from a compost sample. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**:2031-2036.
- Kirk, J. L., Beaudette L. A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J. N., Lee H., Trevors J. T.** (2004) Methods of studying soil microbial diversity. J. Microbiol. Methods. **58**:169-188.
- Kleeberg, I.** (2000) Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von aliphatisch-aromatischen Copolyestern sowie Isolierung und Charakterisierung eines polyesterspaltenden Enzyms. Dissertation, TU Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Knop, M., Pöhle, H., Bergmann, A.** (1996) Sanitation of biowaste compost by using *Salmonella enteritidis* as a pathogen indicator and survival of *Salmonella* in seepage water. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. **109**:451-6.
- Kohl, U.** (2006) Aufkommen, Behandlung und Verbleib von tierischen Nebenprodukten und Speiseabfällen aus Sicht des BNS e. V. im 19. Aachener Kolloquium Abfallwirtschaft, Aachen.
- Krieg, N. R., Staley, J. T., Brown, D. R., Hedlund, B. P., Paster, B. J., Ward, N. L., Ludwig, W., Whitman, W. B.** (2011) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 4. The *Bacterioidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. Springer, New York.
- Kristjansson, J. K. and Stetter, K. O.** (1992) Thermophilic bacteria. In Kristjansson, JK (ed) Thermophilic bacteria. CRC Press, Boca Raton, FL, USA pp. 1-18. zitiert in Fischer *et al.* (2001).
- Kuhnigk, T., Borst, E.-M., Breunig, A., König, H., Collins, M. D., Hutson, R. A., Kämpfer, P.** (1995) *Bacillus oleronius* sp. nov., a member of the hindgut flora of the termite *Reticulitermes santonensis* (Feytaud). Can J Microbiol **41**:699-706.
- Kuraishi, H., Itoh, M., Katayama, Y., Ito, T., Hasegawa, A., Sugiyama, J.** (2000) Ubiquinone systems in fungi. V. Distribution and taxonomic implications of ubiquinones in *Eurotiales*, *Onygenales* and the related plectomycete genera, except for *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, and their related teleomorphs. Antonie Van Leeuwenhoek **77**:179-186.

- Kurusu, F., Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T.** (2002) Microbial community analysis of thermophilic contact oxidation process by using ribosomal RNA approaches and the quinone profile method. *Water Res* **36**:429-438.
- Kuske, C. R., Banton, K. L., Adorada, D. L., Stark, P. C., Hill, K. K., Jackson, P. J.** (1998) Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl Environ Microbiol* **64**:2463-2472.
- Kutzner, H. J.** (2000) Microbiology of composting. In: Klein J, Winter J (ed) *Biotechnology Vol 11c*:35-100, Environmental processes. Wiley-VCH, Weinheim.
- Kutzner, H. J. and Jäger, T.** (1994) Kompostierung aus mikrobiologischer Sicht - ein Essay. *Hohenheimer Seminars* **5**: 281-303, Gießen.
- Kutzner H.-J., Kempf A.** (1996) Vorkommen von Actinomyceten in der Luft von Abfallbehandlungsanlagen. *Hygiene in der Abfallwirtschaft. Darmstädter Seminar*, 50. Schriftenreihe WAR 92. zitiert in Fischer *et al.* (2001).
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E. & Palleroni, N. J.** (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:510–547.
- LaMontagne, M. G., Michel, F. C. Jr., Holden, P. A., Reddy, C. A.** (2002) Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *J Microbiol Methods*. **49**:255-64.
- Lechner, U., Baumbach, R., Becker, D., Kitunen, V., Auling, G., Salkinoja-Salonen, M.** (1995) Degradation of 4-chloro-2-methylphenol by an activated sludge isolate and its taxonomic description. *Biodegradation* **6**:83-92.
- Lee, K. B., Liu, C. T., Anzai, Y., Kim, H., Aono, T., Oyaizu, H.** (2005) The hierarchical system of the 'Alphaproteobacteria': description of Hyphomonadaceae fam. nov., Xanthobacteraceae fam. nov. and Erythrobacteraceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1907– 1919.
- Lee, H. G., Kim, S. G., Im, W. T., Oh, H. M., Lee, S. T.** (2009) *Pedobacter composti* sp. nov., isolated from compost. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:345-349.
- Liesebach, H. and Ewald, E.** (2008) Biodiversität von Mikroorganismen im Waldboden: Kleine Pilotstudie für eine Begleituntersuchung zur BZE II, vTI - Institut für Forstgenetik, Waldsieversdorf.
- Logan, N. A., Lebbe, L., Verhelst, A., Goris, J., Forsyth, G., Rodríguez-Díaz, M., Heyndrickx, M., De Vos, P.** (2004) *Bacillus shackletonii* sp. nov., from volcanic soil on Candleman Island, South Sandwich archipelago. *Int. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 373-376.

- Loy, A., Maixner, F., Wagner, M., Horn, M. (2007) probeBase an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res* **35**: D800-D804.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1363-1371.
- Lueders, T. and Friedrich, M. W. (2003) Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol* **69**:320-326.
- Lytle, C. A., Gan, Y. D., Salone, K., White, D. C. (2001) Sensitive characterization of microbial ubiquinones from biofilms by electrospray/mass spectrometry. *Environ Microbiol* **3**: 265–272.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Schleifer, K. H. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* **142**:1097-1106.
- Maciorowski, K. G., Herrera, P., Jones, F. T., Pillai, S. D., Ricke, S. C. (2007) Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Feed Sci. Technol.* **133**:109–136.
- Mäder, P., Fließbach, A., Dubois, D., Gunst, L., Fried, P. und Niggli, U. (2002). Soil fertility and biodiversity in organicfarming. *Science* **296**:1694-1697.
- Miyatake, F. and Iwabuchi, K. (2005) Effect of high compost temperature on enzymatic activity and species diversity of culturable bacteria in cattle manure compost. *Bioresour Technol.* **96**:1821-5.
- Montanari, G., Borsari, A., Chiavari, C., Ferri, G., Zambonelli, C., Grazia, L. (2004). Morphological and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans*. *J. Appl. Microbiol.* **9**:802-809.
- Muyzer, G., de Waal E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**:695-700.

- Muyzer, G. and Smalla, K.** (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**:127–141.
- Nakasaki, K., Yaguchi, H., Sasaki, Y., Kubota, H.** (1993) Effects of pH control on composting of garbage. *Waste Management and Research* **11**:117–125. zitiert in Sundberg *et al.* (2004)
- Nakasaki, K.** (2005) Microbial succession associated with organic matter decomposition during thermophilic composting of organic waste. *Waste Manag Res.* **23**: 48-56.
- Narihiro, T., Abe, T., Yamanaka, Y., Hiraishi, A.** (2004) Microbial population dynamics during fed-batch operation of commercially available garbage composters. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**:488-495.
- Narihiro, T., Yamanaka, Y., Hiraishi, A.** (2003) High culturability of bacteria in commercially available personal composters for fedbatch treatment of household biowaste. *Microbes Environ* **18**:94–99.
- Neef, A., Schäfer, R., Beimfohr, C. and Kämpfer, P.** (2003) Fluorescence based rRNA sensor systems for detection of whole cells of *Saccharomonospora* spp. and *Thermoactinomyces* spp. *Biosensors and Bioelectronics* **18**:565-569.
- Oechtering, A.** (2009). Sekundärrohstoffmärkte - Kompostprodukte. Perspektiven, Bedarf, Qualitätsanforderungen, Erlöse. Schriftenreihe des ANS, Arbeitskreis für die Nutzbarmachung von Siedlungsabfällen e.V.
- Ottow, J.** (2011), *Mikrobiologie von Böden*, Springer Verlag, Berlin.
- Palmisano, A. C. and Barlaz, M. A.** (1996) *Microbiology of solid waste*. CRC Press, Boca Raton, Fla. (USA) zitiert in Danon *et al.* (2008).
- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., Romantschuk, M.** (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiol* **10**:94.
- Patzel, N., Sticher, H., Karen, D.** (2000). Soil fertility - phenomenon and concept. *Soil Sci. Plant Nutr.* **163**: 129-142.
- Pedro, M. S., Haruta, S., Hazaka, M., Shimada, R., Yoshida, C., Hiura, K., Ishii, M., Igarishi Y.** (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter. *J. Biosci. Bioeng.* **91**: 159-165.

- Pedro, M. S., Haruta, S., Nakamura, K., Hazaka, M., Ishii, M., Igarashi, Y.** (2003). Isolation and characterization of predominant microorganisms during decomposition of waste materials in a field-scale composter. *J Biosci Bioeng* **95**:368-373.
- Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, F., Tebbe, C. C.** (2000). Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **66**:930-936.
- Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, E., Priest, F. G.** (1996). *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *Int J Syst Bacteriol* **46**:759–764.
- Philipp, W.; Frank-Fink, A.; Martens, W.; Weber, A.; Winter, D.; Boehm, R.** (1998). Environmentally acceptable and epidemic hygienic unrisky treatment and utilization of farmyard manure and biological waste. VDLUFA-Kongress, AMS Giessen (Germany), VDLUFA-Schriftenreihe **110**:49: 625-628.
- Porteous, L. A., Seidler, R. J., Watrud, L. S.** (1997). An Improved Method for Purifying DNA from Soil for Polymerase Chain Reaction Amplification and Molecular Ecology Applications. *Mol. Ecol.* **6**: 787-791.
- Pindyck, R. S. and Rubinfeld, D. S.** (2005). *Mikroökonomie*. 6. Auflage, Pearson Studium
- Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S.** (2000) Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res Microbiol* **151**:167–177.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., Daroub, S. H., Camargo, F. A., Farmerie, W. G., Triplett, E. W.** (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *Isme J* **1**:283-290.
- Roth, S.** (1994) Mikrobiologisch-hygienische Untersuchungen zur Bioabfallkompostierung in Mieten und in Kleinkompostern, Dissertation
- Rüprich, A.** (1990) Rotteführung und Mikroorganismen. ABFALL NOW, Stuttgart. zitiert in Fischer *et al.* (2001)
- Ryckeboer, J., Mergaerts, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., Swings, J.** (2003a) A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann Microbiol* **53**:349-410.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., Swings, J.** (2003b). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J of Appl. Microbiol.* **94**, 127–137.

- Said-Pullicino, D., Kaiser, K., Guggenberger, G., Gigliotti, G.** (2007) Changes in the chemical composition of water-extractable organic matter during composting: distribution between stable and labile organic matter pools. *Chemosphere* **66**:2166-2176.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schloss, P. D., Hay, A. G., Wilson, D. B., Walker, L. P.** (2003a) Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**: 1-9.
- Schloss, P. D., Hay, A. G., Wilson, D. B., Walker, L. P.** (2003b) Molecular assessment of inoculum efficacy and process reproducibility in composting using ARISA. *Trans ASAE.* **46**: 919-927.
- Schloss, P. D., Hay, A.G., Wilson, D. B., Gossett, J. M., Walker, L. P.** (2005) Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 457-463.
- Schmidt M.** (2009) Charakterisierung von Bacillus- und Geobacillus-Isolaten und ihre Detektion und Anwendung in der Kompostierung. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle.
- Seibold A.** (2002) Strukturelle und funktionelle Analysen von Bakterienpopulationen mit Hilfe der PCR-SSCP in sechs unterschiedlichen Modellböden. Dissertation, Rheinisch-Westfälische-Technische Hochschule Aachen.
- Singh, R., Kim, J., Shepherd, M. W. J., Luo, F., Xiuping, J.** (2011) Determining Thermal Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in Fresh Compost by Simulating Early Phases of the Composting Process. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:4126-4135.
- Singh, R., Kim, J., Jiang, X.** (2012) Heat inactivation of Salmonella spp. in fresh poultry compost by simulating early phase of composting process. *Appl. Microbiol.* DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05268.x.
- Stach, J. E. M., Bathe, S., Clapp, J. P., Burns, R. G.** (2001) PCRSSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**:139–151.
- Stanek M.** (1981) Mikrobiologische Vorgänge während der Fermentation des Champignonsubstrates und deren Einfluss auf die Substratqualität. *Der Champignon* **21**:23-35, zitiert in Fischer *et al.* (2001)

- Steinbüchel, A. and Oppermann-Sanio, F. B.** (2003) Mikrobiologisches Praktikum, Theorie und Praxis. Springer Verlag, Berlin.
- Steyn, P. L., Segers, P., Vancanneyt, M., Sandra, P., Kersters, K., Joubert, J. J.** (1998). Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. Proposal of the family Sphingobacteriaceae fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**:165–177.
- Strom, P.** (1985a) Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid waste composting. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:889-905.
- Strom, P.** (1985b) Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Appl Environ Microbiol* **50**:906-913.
- Sundberg, C., Smårs, S., Jönsson, H.** (2004) Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic to thermophilic phase in composting. *Bioresource technol.* **95**:145-150.
- Sundberg, C. and Jönsson, H.** (2005) Process inhibition due to organic acids in fed-batch composting of food waste-influence of starting culture. *Biodegradation* **16**: 205-213.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W.** (1987) Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum. Thieme, Stuttgart.
- Suzuki, M. and Nakase, T.** (1998) Cellular neutral sugar compositions and ubiquinone systems of the genus *Candida*. *Microbiol. Cult. Coll.* **14**:49-62.
- Székely, A. J., Sipos, R., Berta, B., Vajna, B., Hajdu, C., Marialigeti, K.** (2009) DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. *Microb Ecol* **57**:522-533.
- Takeuchi, M. and Yokota, A.** (1992). Proposals of *Sphingobacterium faecium* sp. nov., *Sphingobacterium piscium* sp. nov., *Sphingobacterium heparinum* comb. nov., *Sphingobacterium thalophilum* comb. nov. and two genospecies of the genus *Sphingobacterium*, and synonymy of *Flavobacterium yabuuchiae* and *Sphingobacterium spiritivorum*. *J Gen Appl Microbiol* **38**:465–482.
- Tamaoka, J. and Komagata K.** (1984) Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**:125-128
- Tang, J.C., Kanamori, T., Inoue, Y., Yasuta, T., Yoshida, S., Katayama, A.** (2005) Changes in microbial community structure in thermophilic composting process of manure as detected by the quinone profile method. *Process Biochemistry* **39**:1999–2006.

- Ten, L. N., Liu, Q. M., Im, W. T., Aslam, Z., Lee, S. T.** (2006). *Sphingobacterium composti* sp. nov., a novel DNase-producing bacterium isolated from compost. *J Microbiol Biotechnol* **16**, 1728–1733.
- Thambirajah, J. J., Zulkali, M. D., Hashim, M. D.** (1995). Microbiological and biochemical changes during the composting of oil palm empty-fruit-bunches. Effect of nitrogen supplementation on the substrate. *Bioresour. Technol.*, **52**:133-144.
- Thelen-Jüngling, M.** (2011) BGK-Statistik 2010: Kompost und Gärprodukte. H&K aktuell (BGK e.V.) **5**:1-3.
- Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czjzek, M., Michel, G.** (2011) Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. *Front Microbiol* **2**:93. doi: 10.3389/fmicb.2011.00093
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Tiquia, S. M., Wan, J. H. C., Tam, N. F. Y.** (2001) Extracellular enzyme profiles during co-composting of poultry manure and yard trimmings. *Process Biochemistry* **36**:813-820.
- Tiquia, S. M.** (2002) Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *J Appl Microbiol* **92**:764-775.
- Tiquia, S. M.** (2005a) Microbiological parameters as indicators of compost maturity. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 816-828
- Tiquia, S. M.** (2005b). Microbial community dynamics in manure composts based on 16S and 18S rDNA T-RFLP profiles. *Environ. Technol.* **26**:1101–1113.
- Tsai Y.-L. and Olson B.H.** (1991) Rapid Method for Direct Extraction of DNA from Soil and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1070-1074 zitiert in Seibold (2002).
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M.** (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresour. Technol.*, **72**(2): 169-183 zitiert in Ryckeboer *et al.* (2003)
- Vaz-Moreira, I., Nobre, M. F., Nunes, O. C., Manaia, C. M.** (2007) *Pseudosphingo* *Bacterium domesticum* gen. nov., sp. nov., isolated from home-made compost. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**:1535-8.

- Wagner, A.** (2004) Untersuchung der Struktur dioxindechlorierender Mischkulturen durch terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (t-RFLP) und Real-Time-PCR. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle.
- Wagner, A.** (2009a) Untersuchungen zur Identifikation, Transkription und Regulation der reduktiven Dehalogenasegene von *Dehalococcoides* sp. Dissertation, Martin-Luther Universität Halle.
- Wagner, A., Adrian, L., Kleinsteuber, S., Andreesen, J. R., Lechner, U.** (2009b) Transcription analysis of genes encoding homologues of reductive dehalogenases in "*Dehalococcoides*" sp. strain CBDB1 by using terminal restriction fragment length polymorphism and quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol* **75**:1876-1884.
- Wang, J.-Y., Stabnikova, O., Tay, S. T.- L., Tay, J.-H.** (2003) Intensive aerobic bioconversion of sewage sludge and food waste into fertiliser. *Waste Manage. Res.* **21**:405-415.
- Wang, C. M., Shyu, C. L., Ho, S. P., Chiou, S. H.** (2007) Species diversity and substrate utilization patterns of thermophilic bacterial communities in hot aerobic poultry and cattle manure composts. *Microb Ecol* **54**:1-9.
- Wang, L., Ten, L. N., Lee, H. G., Im, W. T., Lee, S. T.** (2008) *Olivibacter soli* sp. nov., *Olivibacter ginsengisoli* sp. nov. and *Olivibacter terrae* sp. nov., from soil of a ginseng field and compost in South Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:1123-1127
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J.** (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**:697-703.
- Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenes, J. P., Godon, J. J.** (2008) Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Res* **42**:53-62.
- Wiegel, J. (1992) The obligately anaerobic phylogenetic bacteria. In Kristjansson, JK (ed) *Thermophilic bacteria*. CRC Press, Boca Raton, Fl., USA pp. 105-184. zitiert in Fischer *et al.* (2001).
- Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., Kawahara, K., Yokota, A.** (2012 a) *Thermovum composti* gen. nov., sp. nov. a novel alphaproteobacterium from compost. *Int J Syst Evol Microbiol.* doi 10.1099/ijs.0.037812-0.
- Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M., Kawahara, K., Yokota, A.** (2012 b) *Sphingobacterium thermophilum* sp. nov., within the phylum Bacteroidetes isolated from compost. *Int J Syst Evol Microbiol.* doi: 10.1099/ijs.0.042481-0.

- Yabuuchi, E., Kaneko, T., Yano, I., Moss, C. W., Miyoshi, N.** (1983) *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucose nonfermenting Gram-negative rods in CDC groups IIK-2 and IIB. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **33**:580-598.
- Yamada, T., Suzuki, A., Ueda, H., Ueda, Y., Miyauchi, K., Endo, G.** (2008) Successions of bacterial community in composting cow dung wastes with or without hyperthermophilic pretreatment. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**:771-781.
- Vargas-García, M. C., Suárez-Estrella, F., López, M. J. Moreno, J.** (2007) Effect of inoculation in composting process: Modifications in lignocellulosic fraction. *Waste Manage. Res.* **27**:1099-1107.
- Yoo, S. H., Weon, H. Y., Jang, H. B., Kim, B. Y., Kwon, S. W., Go, S. J., Stackebrandt, E.** (2007) *Sphingobacterium composti* sp. nov., isolated from cotton-waste composts. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:1590-1593.
- Yu, H., Zeng, G., Huang, H., Xi, X., Wang R., Huang D., Huang G., Li J** (2007) Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation* **18**:793-802.
- Zhang, T. and Fang, H. H. P.** (2006). Application of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**: 81-289.

7. Anhang

Anhang 1: VERORDNUNG (EG) Nr. 1774/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES (vom 3. Oktober 2002). Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften (mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte)

KAPITEL II

Spezielle Vorschriften für die Zulassung von Biogas- und Kompostieranlagen

Anlagen

13. Material der Kategorie 3, das in Kompostieranlagen als Rohmaterial verwendet wird, muss folgende Mindestnormen erfüllen:

- a) Höchstteilchengröße vor Eingang in den Kompostierreaktor: 12 mm
- b) Mindesttemperatur des gesamten Materials im Reaktor: 70 °C und
- c) Mindestzeit im Reaktor bei 70 °C (gesamtes Material): 60 Minuten.

D. Fermentationsrückstände und Kompost

15. Proben von Fermentationsrückständen oder Kompost, die während oder unmittelbar nach der Auslagerung aus der Biogas- oder Kompostieranlage entnommen werden, müssen folgende Normen erfüllen:

Salmonella: kein Befund in 25 g: n = 5, c = 0, m = 0, M = 0

Enterobacteriaceae: n = 5, c = 2, m = 10, M = 300 in 1 g

wobei

n = Anzahl der zu untersuchenden Proben;

m = Schwellenwert für die Keimzahl; das Ergebnis gilt als zufrieden stellend, wenn die Keimzahl in allen Proben m nicht überschreitet;

M = Höchstwert für die Keimzahl; das Ergebnis gilt als nicht zufrieden stellend, wenn die Keimzahl in einer oder mehreren Proben größer oder gleich M ist;

c = Anzahl der Proben, bei denen die Keimzahl zwischen m und M liegen kann, wobei die Probe noch als zulässig gilt, wenn die Keimzahl in den anderen Proben m oder weniger beträgt.

VERORDNUNG (EG) Nr. 1877/2006 DER KOMMISSION (vom 18. Dezember 2006), Amtsblatt der Europäischen Union

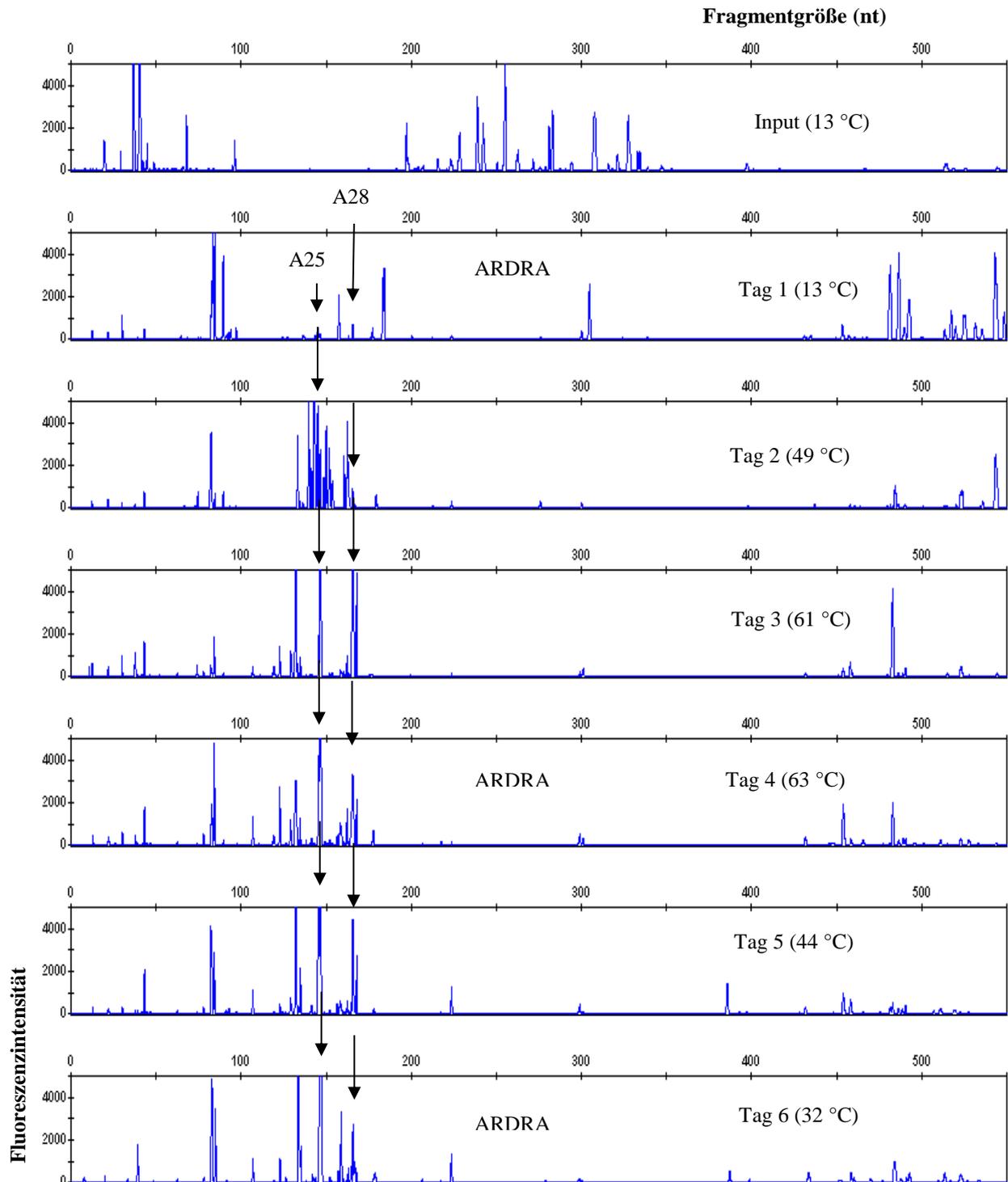
(zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 878/2004 mit Übergangsregelungen gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 hinsichtlich bestimmter tierischer Nebenprodukte, die als Material der Kategorien 1 und 2 eingestuft werden und für technische Verwendungszwecke bestimmt sind)

Anhang 2: Sequenzvergleich der 16S rRNA-Gene mit spezifischen ARDRA-Mustern von Kompostierungsprozess 1 mit den 16S rRNA-Genen aus der RDP-Gendatenbank

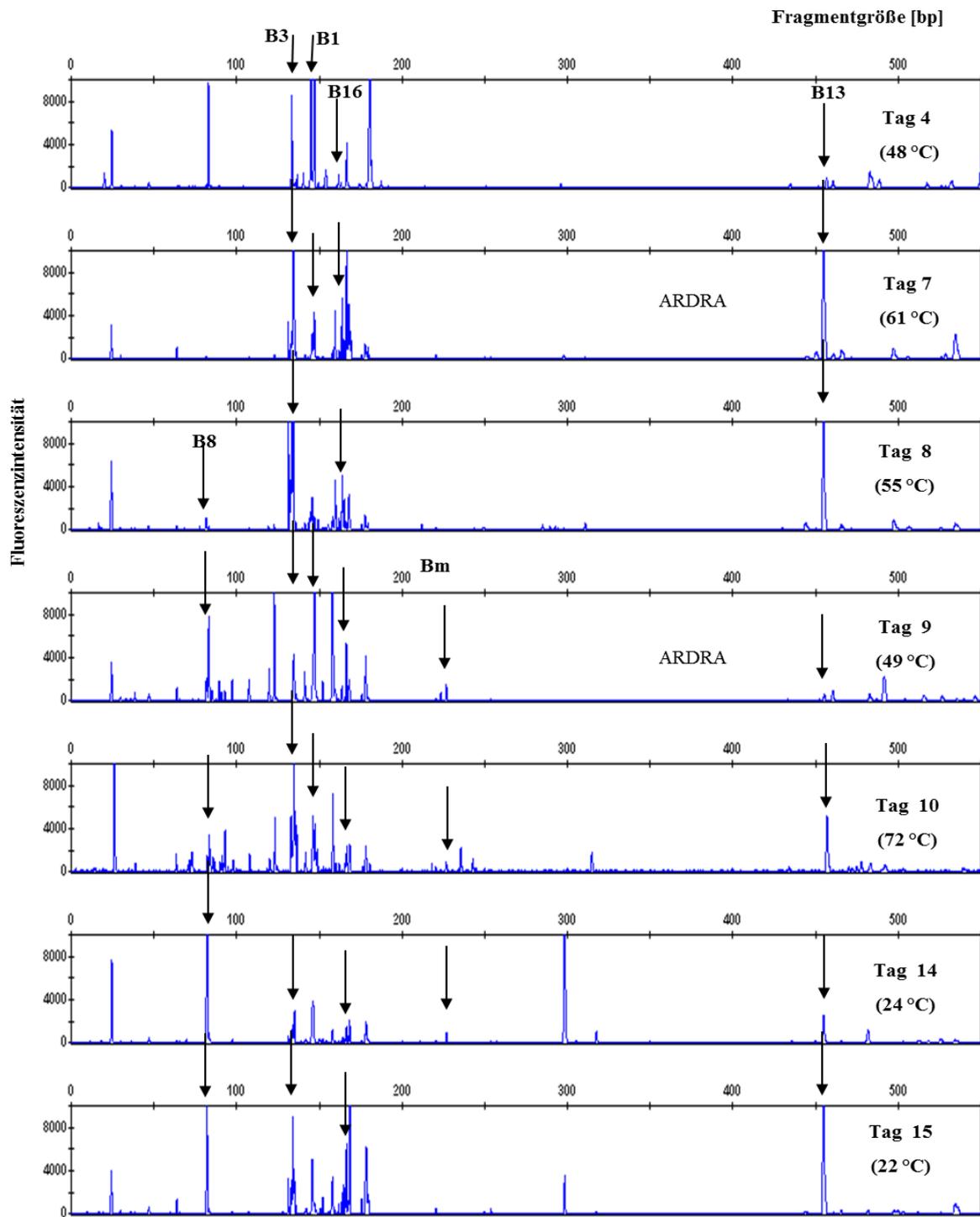
ARDRA-Muster	Prozentualer Anteil der Klone (%) ^a		Phylogenetischer Verwandter ^b (Accessionnummer)	Phylogenetische Gruppe	Identität (%)
	Tag 5 (65 °C)	Tag 19 (18 °C)			
C15	2,2	1,1	<i>Bacillus</i> sp. PU1 (FN555708)	<i>Firmicutes</i>	90,0
C39	2,2	4,4	uncultured bacterium, clone 23s-5 (HM036050) <i>Piscibacillus</i> sp. HS224 (FM864227)	<i>Firmicutes</i>	99,8 88,3
C26	2,2	0	Unkultivierter Kompost- Bakterium Klon 2B04 (DQ346476) <i>Bacillus</i> sp. MSP06G (AB084065)	<i>Firmicutes</i>	92,5 92,4
C7	2,2	1,1	Unkultivierter Bakterium Klon SMG9 (AM930275) <i>Bordetella petrii</i> DSM12804 ^T (AM902716)	β - <i>Proteobacteria</i>	99,4 94,3
C24	2,2	0	Unkultivierter Bakterium Klon HAW-R60-B-924d-AK (FN436151) <i>Alcaligenes</i> sp. BBTR16 (EF471233)	β - <i>Proteobacteria</i>	95,4 95,2
C11	11,0	1,1	Unkultivierter Bakterium Klon 17s-60 (HM036019) <i>Pseudidiomarina</i> sp. 2PR54-15; EU440967	γ - <i>Proteobacteria</i>	99,5 91,0
C16	9,9	5,6	Unkultivierter Bakterium Klon 12-9BM (HQ143283) <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PVAS6 (GU130530)		94,0 91,8
C3	0	4,4	Unkultivierter Bakterium Klon 1103200820288 (EU844874) <i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1 (CP000713)	γ - <i>Proteobacteria</i>	99,3 98,9
C27	6,6	0	<i>Pseudomonas</i> sp. CC-CY503 (JF432053)	γ - <i>Proteobacteria</i>	99,3
C29	5,5	0	<i>Pseudomonas</i> sp. A84 (HQ433472)	γ - <i>Proteobacteria</i>	99,3
C23	2,2	0	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> CB-226 ^T (AF427039)	γ - <i>Proteobacteria</i>	95,6
C1	5,5	10	Unkultivierter Kompost- Bakterium Klon 1B21 (DQ346453) <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> LMG 15870 (U87104)	<i>Bacterioidetes</i>	90,5 82,5
C2	0	12,2	Unkultivierter Kompost- Bakterium Klon 1B05 (DQ346484) <i>Empedobacter</i> sp. B202 (GQ232741)	<i>Bacterioidetes</i>	98,4 86,6
C8	9,9	10	Unkultivierter Bakterium Klon EV818CFSSAHH37 (DQ336988) <i>Sphingobacterium</i> sp. MOL-1 (FJ156081)	<i>Bacterioidetes</i>	96,9 92,4
C28	2,2	6,7	<i>Sphingobacteriaceae</i> Bakterium 37LGx-1 (AB375750)	<i>Bacterioidetes</i>	98,3
C5	4,4	8,9	Unkultivierter Bakterium Klon E130 (AM500800) <i>Flavobacterium</i> sp. W6-14 (DQ659445)	<i>Bacterioidetes</i>	98,9 94,1

Fortsetzung Anhang 2 ARDR-Muster	Prozentualer Anteil der Klone (%) ¹		Phylogenetischer Verwandter (Accessionnumber) ²	Phylogenetische Gruppe	Identität (%)
	Tag 5 (65°C)	Tag 19 (18°)			
C30	2,2	1,1	Unkultivierter Bakterium Klon E130 (AM500800) <i>Flavobacterium</i> sp. W6-14 (DQ659445)	<i>Bacteriodetes</i>	99,4 90,5
C34	4,4	0	<i>Cytophaga</i> sp.type 0092 (X85210)	<i>Bacteriodetes</i>	94,1
C32	2,2	0	Antarctic bacterium R-9033 (AJ441001)	<i>Bacteriodetes</i>	94,9
Sum	77	66,6			

¹Anzahl der untersuchten Klone: 90 , ²Wenn der nächstverwandte Organismus ein "unkultiviertes" Bakterium war, wurde das nächstverwandte kultivierte mit angegeben.



Anhang 3: Verfolgung der Populationsdynamik im Kompostierungsprozess 2 (Reaktor A) mittels t-RFLP-Profilen. Als Restriktionsenzym diente MspI. Die Pfeile zeigen t-RFLPs, welche durch t-RFLP von 16S rRNA-Genen häufiger ARDRA-Muster identifiziert wurden (siehe auch Klonbibliothek K2 in Tabelle 25). A25 und A28 repräsentieren das *Sphingobacteriaceae* Bakterium 37LGx-1 und *Ureibacillus thermosphaericus* der durch ARDRA: (Tabelle 24) analysierten Klone. Der für die t-RFLP-Analyse genutzte DNA-Extrakt wurde auch für ARDRA genutzt. Die Temperatur der untersuchten Kompostproben ist mit angegeben.

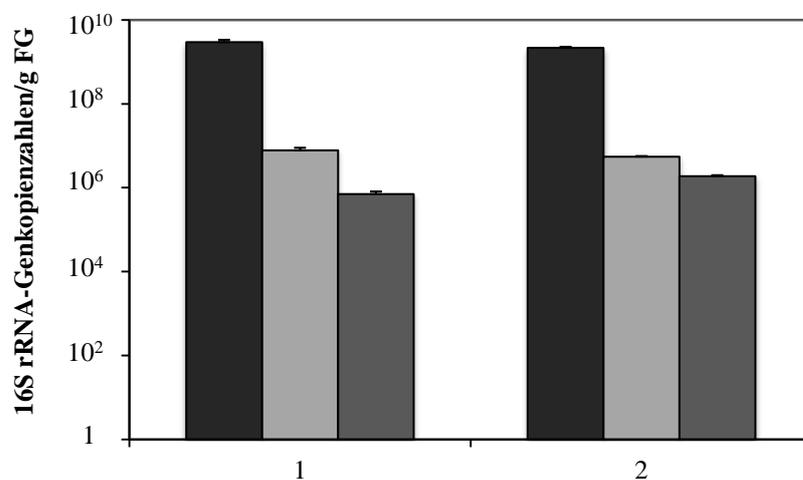


Anhang 4: Verfolgung der Populationsdynamik im Kompostierungsprozess 17 (Reaktor B) durch t-RFLP. Die Profile aus der Hygienisierung (Tag 10, 72 °C) und nach der Hygienisierung (Tag 11, 57 °C) stammen von Proben, die sechs Stunden nach Beginn der Hygienisierung bzw. nach Ende der insgesamt 11-stündigen Hygienisierung und einer anschließenden 12,5-stündigen Abkühlung entnommen wurden. Als Restriktionsenzym diente MspI. Die Pfeile zeigen t-RFs, welche durch t-RFLP von 16S rRNA-Genen häufiger ARDRA-Muster identifiziert wurden (siehe auch Klonbibliothek K17 in Tabelle 25). Die t-RFs sind *Sphingobacteriaceae* Bakterium 37LGx-1 (B1), *Piscibacillus* sp. (B3), *Flavobacterium* sp. (B8), *Bacillus* sp. (B13), *Pseudomonas* sp. (B16) und *Bacillus* sp. MSP06G (Bm) zugeordnet. Der für die t-RFLP verwendete DNA-Extrakt wurde auch für ARDRA genutzt. Die Temperatur der einzelnen Kompostierungstage ist mit angegeben.

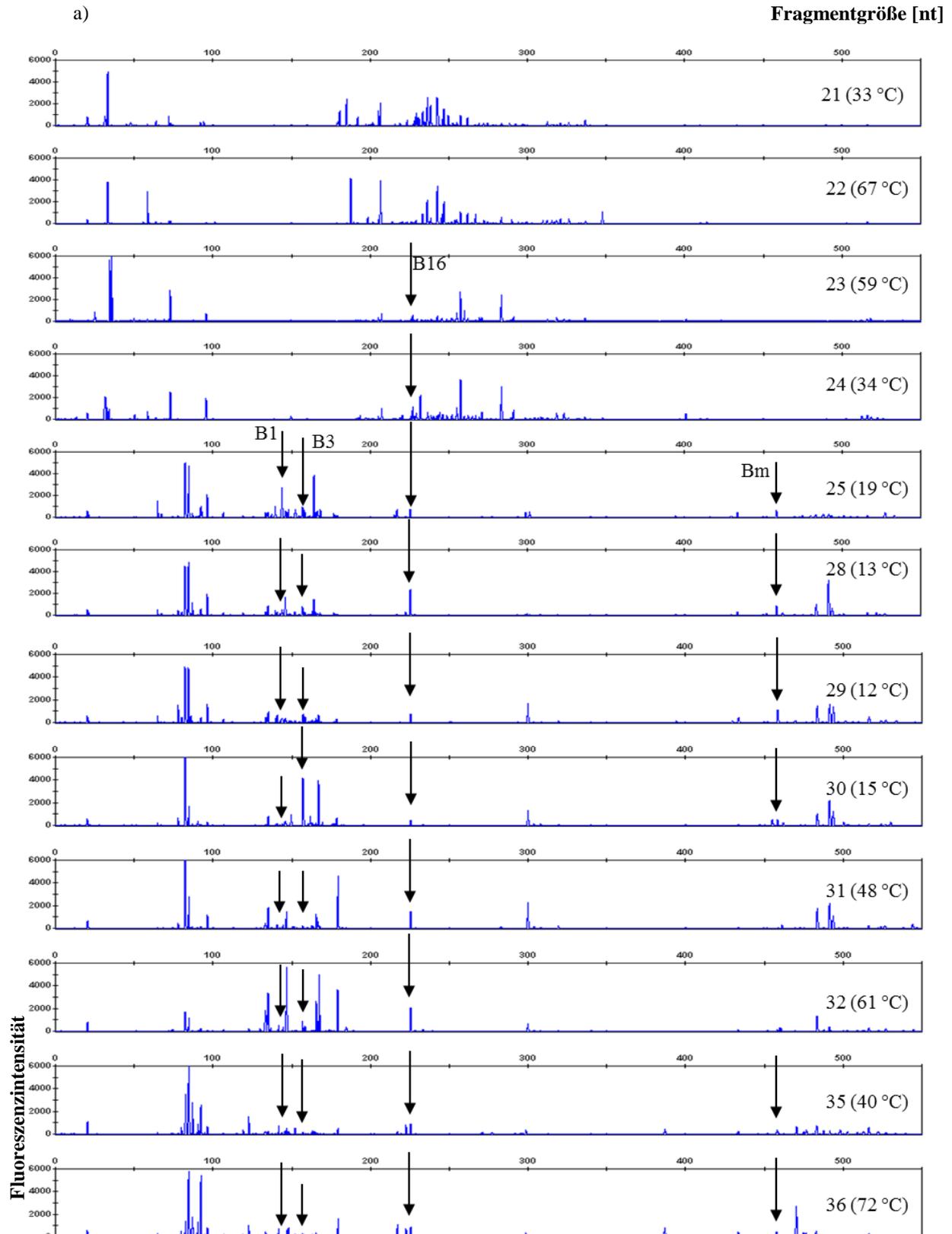
Anhang 5: Zellzahlen der eingesetzten Starterkulturen. Die Bestimmung der Lebendzellzahlen erfolgte mit dem „LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit“ (Molecular Probes, Poortgebouw, Niederlande), mit dem lebende und tote Zellen mikroskopisch ermittelt werden konnten.

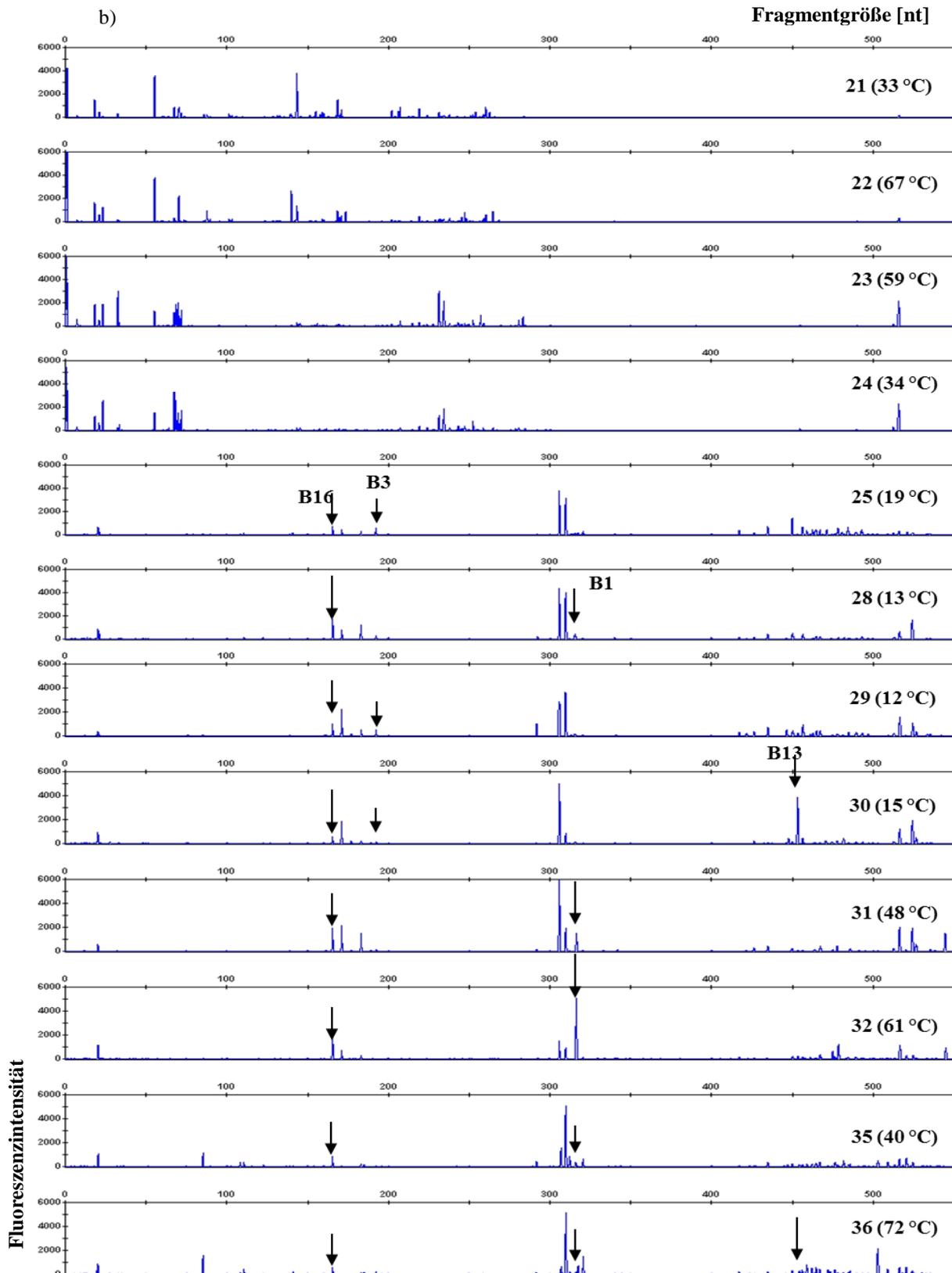
Starterkulturen/Stamm	Eingesetzte Zellzahl in den Kompostierungsprozessen (Anteil lebende Zellen in %)¹			
	19	21	22	23
MS-X1²	$4,9 \times 10^{11}$ (69)²	$7,7 \times 10^{12}$ (34)	$3,8 \times 10^{12}$ (40)	-
29-10-PAA²	$4,4 \times 10^{11}$ (59,2)²	-	-	-
8-4-7²	$4,4 \times 10^{11}$ (41)²	$6,8 \times 10^{11}$ (24)	$8,3 \times 10^{11}$ (25)	-
16-2A²	$2,6 \times 10^{11}$ (54)²	-	-	-
16-2-VM-2	2×10^{12} (33)	$3,9 \times 10^{11}$ (35)	$3,4 \times 10^{11}$ (28)	-
17-1-2	7×10^{11} (66)	$5,4 \times 10^{11}$ (78)	$4,8 \times 10^{11}$ (70)	-
8-4-E12²	2×10^{11} (26)²	2×10^{11} (30)	9×10^{11} (36)	-
24-4-1	-	-	-	$3,7 \times 10^{12}$ (54)
28-4-3	-	-	-	$7,4 \times 10^{12}$ (76)
9-4-E3	-	-	-	$6,4 \times 10^{12}$ (21)
Summe der Lebendzellzahlen/g FG	$7,8 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6$	$4,5 \times 10^7$

¹berechnet aus der Annahme von 350 kg FG in den entsprechenden Kammern, ²Schmidt (2009)



Anhang 6: Ermittlung der 16S rRNA-Genkopienzahlen/g FG aus 2 verschiedenen DNA-Extraktionen aus einer Kompostprobe. Detektiert wurde die Gesamtbakterienzahl (■), *B. thermoamylovorans* (□) und *Bacillus* sp. 8-4-E12 (▒). Probe 1 und Probe 2 wurde aus einer Kompostprobe mit dem „PowerSoil™ DNA Isolation Kit“ (MO BIO Laboratories, Carlsbad) extrahiert und wie in Kap. 2.8.3.3 beschrieben analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei q-PCR-Reaktionen.





Anhang 7: Verfolgung der Populationsdynamik beim Kompostierungsprozess 14 (Reaktor B) mit 2 Hygienisierungsphasen. Als Restriktionsenzym diente RsaI (a) und MspI (b). Die Pfeile zeigen t-RFs von 16S rRNA-Genen häufiger ARDRA-Muster von der Klonbibliothek K17 (siehe Tabelle 25). t-RFs: *Sphingobacteriaceae* Bakterium 37LGx-1 (B1), *Piscibacillus* sp. (B3), *Bacillus* sp. (B13), *Pseudomonas* sp. (B16) und *Bacillus* sp. MSP06G (Bm). Die Temperatur der einzelnen Kompostierungstage ist mit angegeben.

Anhang 8: Anteil der Peakflächen an der Gesamtpeakfläche in % für die untersuchten Stämme und Plasmide von K2 und K17 mit den Enzymen MspI und RsaI¹

a) Kompostprozess 2 mit t-RFs der Plasmide

Reaktor A - K2			Anteil der Peakflächen (t-RF) an der Gesamtpeakfläche in %													
			A21		A28		A25		A16		Aa1		A10		A30	
Tag	t (h)	T (°C)	MspI	RsaI	MspI	RsaI	MspI ²	RsaI	MspI	RsaI	MspI ²	RsaI	MspI	RsaI	MspI	RsaI
Input	0	n. a.	0,1	5,6		1,8		4,6		5,6		1,0	0,1	0,0		3,3
1	25	13	0,6	2,3	0,8		0,4	3,4	0,0	2,3	7,9			2,1	0,0	4,4
2	49	49	7,3	9,9	1,1	0,2	2,9	3,4		9,9		3,7		1,5		
3	79	61	2,3		18,6	44,8	20,6		0,1				0,1		14,5	
4	99	63	6,8	11,6	10,2		15,4	30,9	0,3	11,6			0,2		9,7	
5	123	44	10,6	8,6	7,2		15,0	16,5		8,6			0,1		7,3	0,0
6	147	32		2,2	4,1		24,8	22,2	0,1	2,2	0,5	0,9	0,5			

b) Kompostprozess 17 mit t-RFs der Plasmide

Reaktor B - K17			Anteil der Peakflächen (t-RF) an der Gesamtpeakfläche (%)													
			B13		B3		B1		B16		B8		Bm			
Tag	t (h)	T (°C)	MspI	RsaI	MspI	RsaI	MspI ²	RsaI	MspI	RsaI	MspI ²	RsaI	MspI	RsaI		
4	96	48	0,6		0,1		9,5	16,2			5,4	0,4	1,4			
7	120	61				0,4	3,2	2,4	0,02		0,1					
8	144	55			3,5	0,7	0,8				2,1					
9	198	49			1,2	20,3	21,9	26,8	1,2	1,2	1,4	1,3	0,9	0,1		
10	217	72	3,9	1,8	0,6	5,2	4,1	4,1	0,9	0,9	17,7	1,3	9,1	21,4		
11	280	57			0,1	0,2		0,3		0,1		0,1				
14	304	22	2,0	0,1	0,2	0,5			0,8	0,6		1,0				
15	304	24		2,4	0,1	1,70,8	0,1	0,1	9,0	0,5						

Anhang 9: Vergleich der Eigenschaften von den Kompostisolaten Stamm 8-4-E12 und Stamm 8-4-E13 mit ihren nächsten Verwandten Arten (96 % Identität der 16S rRNA Gen-Sequenzen)

Charakteristik	<i>Bacillus</i> sp. Stamm 8-4-E12	¹ <i>B. shackletonii</i> LMG 18435 ^T	² <i>B. acidicola</i> 105-2 ^T	³ <i>B. oleronius</i> Rt 10 ^T	⁴ <i>B. sporothermodurans</i> M215 ^T	⁵ <i>B. humi</i> LMG 22167 ^T	<i>Bacillus</i> sp. Stamm 8-4-E13
Gram-Reaktion	positiv	variabel	positiv	negativ	uneindeutig gefärbt	positiv	positiv
Zelllänge × Breite (µm)	2-3.4×0.8-1.3	2.5-4.5×0.7-0.9	3.1-5.9×1-1.6	3-10×0.6-0.8	3.4-8×0.7, Filamente > 30 µm	4-7×0.7-0.9	1.5-3.6×0.5-0.9
Zellwand	Meso-diaminopimelic säure	n. d.	Meso-diaminopimelic säure	A γ mit Meso-diaminopimelic säure	Meso-diaminopimelic säure	Meso-diaminopimelic säure	Meso-diaminopimelic säure
Bewegung	Peritriche Flagellen	beweglich	beweglich	beweglich	Peritriche Flagellen	beweglich	Peritriche Flagellen
Endosporen							
Gestalt	ellipsenförmig	ellipsenförmig	ellipsenförmig	oval	ellipsenförmig	ellipsenförmig bis kugelförmig	ellipsenförmig, oval
Position	Zentral oder ubterminal	Subterminal	Zentral	Subterminal	Terminal		geschwollen
Sporangium	nicht geschwollen	geschwollen	geschwollen	geschwollen	geschwollen	subterminal oder terminal	ellipsenförmig, terminal
Polare Lipide	n. d.	n. d.	PG, DPG, PE	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Wachstumsbedingungen							
NaCl-Bedürfnis	-	-	-	-	n. d.	n. d.	2 % für optimales Wachstum
NaCl-Toleranz							
7 %	+	+	> 5 % negativ	+	≥ 5 % negativ	+	+
10 %	-	-		-		n. d.	+
pH	5-9	4.5-9	3.5-7	5.2-9.3	5-9	7-9	5.5-8.5
Wachstumstemperatur (°C)							
15	-	+	+	-	+	-	-
25	+	+	+	-	+	+	+
45	+	+	+	+	+	-	+
50	+	+	-	-	+	-	+
55	-	+	-	-	-	-	-

Fortsetzung Anhang 9 Charakteristik	<i>Bacillus</i> sp. Stamm 8-4-E12	¹ <i>B. shackletonii</i> LMG 18435 ^T	² <i>B. acidicola</i> 105-2 ^T	³ <i>B. oleronius</i> Rt 10 ^T	⁴ <i>B. sporothermodurans</i> M215 ^T	⁵ <i>B. humi</i> LMG 22167 ^T	<i>Bacillus</i> sp. Stamm 8-4-E13
Wachstumsversuche							
Anaerobes Wachstum	-	-	-	-	-	w	-
Catalase	-	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	-	-	+	+	-
Nitratreduktion	+	-	-	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	+	-	-	-
Hydrolyse							
Stärke	-	-	n. d.	+	-	-	-
Casein	-	w	-	-	-	-	-
Gelatine	-	-	-	+	+	-	-
Esculin	w	+	n. d.	w	+	+	w
Assimilation von							
N-Acetyl-glucosamin	- ^{6*}	-	n. d.	-	-	- ^{9*}	+ ^{6*}
D-Maltose	- ^{6*}	(+)	n. d.	+	-	- ^{9**}	+ ^{6*}
Citrat	- ^{6*}	-	+	+	-	- ^{9*}	- ^{6*}
D-Glucose	- ^{7*}	-	n. d.	+	-	- ^{9**}	+ ^{7*}
Glycerol	+ ⁷	-	n. d.	n. d.	-	- ^{9*}	+ ⁷
Sucrose	- ^{7*}	(+)	n. d.	-	-	- ^{9*}	- ^{7*}
Cellobiose	- ^{7*}	-	n. d.	-	-	- ^{9*}	+ ^{7*}
Ribose	- ^{7*}	-	n. d.	-	-		+ ^{7*}
Fructose	- ^{7*}	-	n. d.	-	-	- ⁹	+ ^{7*}
Mix von 20 Aminosäuren, jede 4 mg	+ ^{7*}	-	-	-	-	-	+ ^{7*}
D-Glucose	- ^{8*}	-	+	-	-	- ^{10*}	- ^{8*}
D-Xylose	- ^{8*}	-	+	-	-	- ^{10*}	- ^{8*}
D-Mannitol	- ^{8*}	-	+	-	-	- ^{10*}	- ⁸

Fortsetzung Anhang 9 Charakteristik	<i>Bacillus sp.</i> Stamm 8-4-E12	¹ <i>B. shackletonii</i> LMG 18435 ^T	² <i>B. acidicola</i> 105-2 ^T	³ <i>B. oleronius</i> Rt 10 ^T	⁴ <i>B. sporothermodurans</i> M215 ^T	⁵ <i>B. humi</i> LMG 22167 ^T	<i>Bacillus sp.</i> Stamm 8-4-E13
Sucrose	+ ⁸ (-)*	-	+	-	-	- ^{10*}	- ⁸
Cellobiose	- ^{8*}	-	+	-	-	- ^{10*}	- ⁸
Galaktose	- ^{8*}	-	+	-	-	- ^{10*}	- ⁸
Mannose	- ^{8*}	-	+	-	-	- ^{10*}	- ⁸
D-Glucose	- ^{8*}	-	+	-	-	- ^{10*}	- ⁸
D-Xylose	- ^{8*}	-	+	-	-	- ^{10*}	- ⁸
Dominante Fettsäuren (%)	14:0 iso (3) ¹¹ 14:0 (2) 15:0 iso (36) 15:0 anteiso (25.5) 16:0 (5.5) 16:0 iso (10) 17:0 iso (5) 17:0 anteiso (12)	14:0 iso (1) 15:0 iso (31) 15:0 anteiso (37) 16:0 iso (6) 17:0 anteiso (18) Iso 17:1 ω10c (1.5)	15:0 iso (58) 15:0 anteiso (24) 17:0 iso (3) 17:0 anteiso (8.5)	14:0 iso (1) 15:0 iso (47) 15:0 anteiso (25) 16:0 iso (3) 17:0 (2) 17:0 anteiso (16)	(auf BHI-Medium) 15:0 iso (32) 15:0 anteiso (25) 16:0 (5) 16:0 iso (3) 17:0 iso (8) 17:0 anteiso (25)	14:0 iso (15) 15:0 iso (33) 15:0 anteiso (39) 16:0 iso (2) 17:0 anteiso (1.4) Iso 17:1 ω10c (5)	14:0 iso (7) ¹¹ 15:0 iso (65) 15:0 anteiso (2) 16:0 iso (11) 17:0 iso (2) 17:0 anteiso (0.6) Iso 17:1 ω10c (2)
Hauptchinon	MK-7	n. d.	MK-7	n. d.	n. d.	n. d.	MK-7
G+C-Gehalt (mol-%)	36,1	35,4	43,2	35	36	37,5	39

n. d. Keine Daten; Reaktionen: w: schwach; v: variabel, + positiv, - negativ, ¹Logan *et al.* 2004, ²Albert *et al.* 2005, ³Kuhnigk *et al.* 1995, ⁴Petterson *et al.* (1996) und Montanari *et al.* (2004), ⁵Heyrman *et al.* 2005, Überprüft mit ⁶API 20NE^{cc} und ⁷Wachstum in Mineralmedium mit 1g/l Substrat und 0.1 % Hefeextrakt. ⁸Überprüft mit Farbreaktion von Phenolrot in Pepton mit 2 % C-Quelle ⁹Überprüft mit dem „Biotype100 kit“. ¹⁰Überprüft mit dem API 50CHB. * Überprüfung erfolgte nochmals mit Methode wie bei Kämpfer *et al.* (1991) beschrieben; G+C-Gehalt-Bestimmung und Chinonanalyse von 8-4-E12 und 8-4-E13 Kap. 2.7.4.

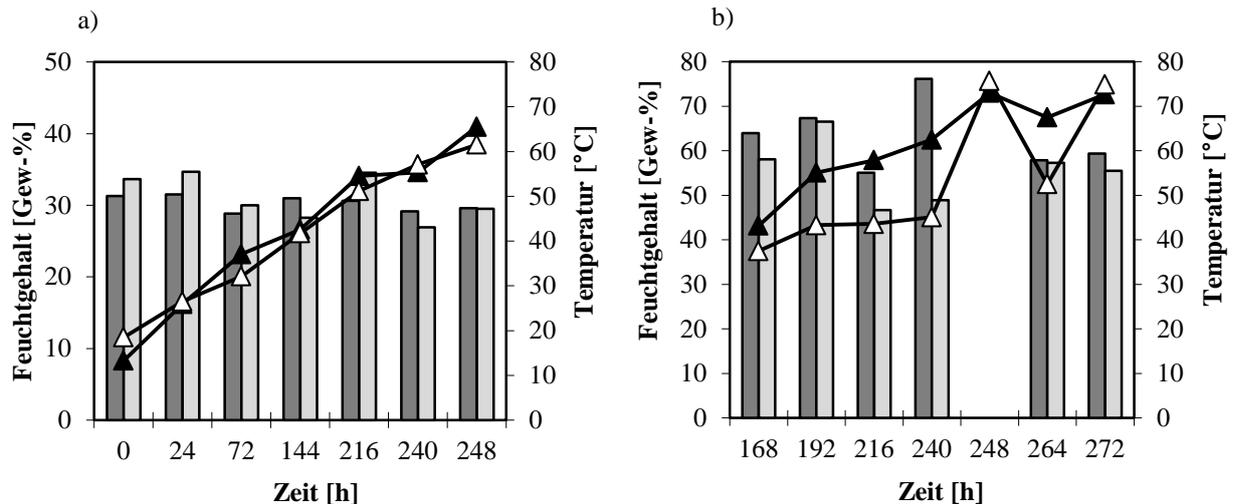
Anhang 10: Charakteristische Eigenschaften von *Sphingobacteriaceae*- Stamm 28-4-3 und der phylogenetisch nächstverwandten Arten.

Eigenschaften	<i>Sphingobacteriacae</i> Stamm 28-4-3 ¹	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. composti</i> T5- 12 ^{T2}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. daejeonense</i> TR6-04 ^{T3}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. spiritivorum</i> NBRC 14948 ^{T4,8}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. multivorum</i> NBRC 14947 ^{T6,8}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. mizutaii</i> NBRC 14946 ^{T7,8}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. thalpophilum</i> NBRC 14963 ^{T5,8}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. faecium</i> NBRC 15299 ^{T5,8}
Wachstumstemperaturen (°C)⁹								
5	-	-	-	-	-	-	-	+
42	+	+	+	-	-	-	+	-
50	+	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse⁹								
DNA	-	+	-	+	+	+	-	+
Stärke	-	-	-	+	+	+	+	+
Enzymaktivitäten⁸								
Esterase (C4)	-		-	+	+	+	+	+
Lipase (C14)	+			+	v	+	-	+
Valin Arylamidase	+		+	+	+	+	+	+
Cystin Arylamidase	+		-	+	+	+	+	+
Trypsin	+		-	+	+	+	+	-
α-Chymotrypsin	+		-	+	+	+	+	+
α-Galactosidase	+		+	+	+	-	+	+
β-Glucuronidase	-		-	+	v	-	+	v
β-Glucosidase	+		-	+	+	+	+	+
α-Mannosidase	+		-	+	+	+	+	+
α-Frucosidase	-		-	+	+	-	v	v
Assimilation von								
L-Glutamat	+	-	-	-	+	+	-	+
Säureproduktion⁹								
L-Rhamnose	-	-	-	-	v	-	+	-

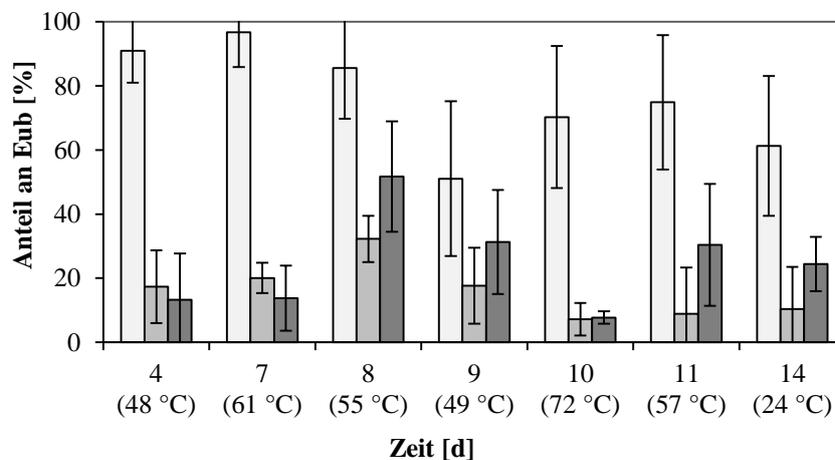
Fortsetzung Anhang 10

Eigenschaften	<i>Sphingobacteriacae</i> Stamm 28-4-3 ¹	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. composti</i> T5-12 ^{1,2}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. daejeonense</i> TR6-04 ^{1,3}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. spiritivorum</i> NBRC 14948 ^{1,4,8}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. multivorum</i> NBRC 14947 ^{1,6,8}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. mizutaii</i> NBRC 14946 ^{1,7,8}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. thalpophilum</i> NBRC 14963 ^{1,5,8}	<i>Sphingobacterium</i> <i>m. faecium</i> NBRC 15299 ^{1,5,8}
L-Arabinose	+	-	-	-	+	+	+	+
Saccharose	-	+	-	+	+	+	+	+
Glukose	+		n. d.	+	+	+	+	+
D-Mannit	-		n. d.	+	-	-	-	-
G+C-Gehalt (mol-%)¹⁰	39,9	36	38,7	39	39,9-40,5	39,3-40	44-44,2	37,3
Hauptchinon¹⁰	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7

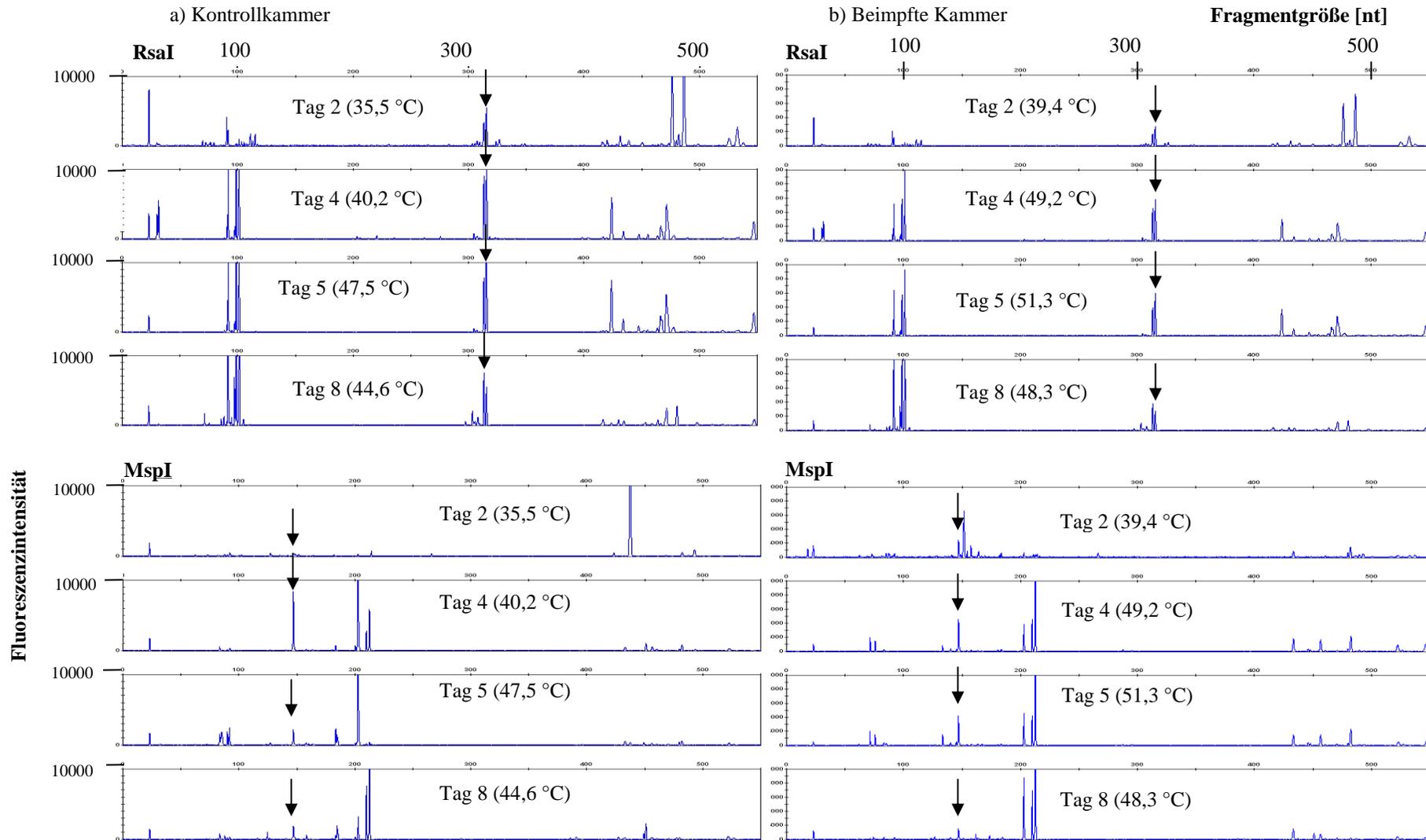
Reaktion: + positive; - negative; v: variabel; ¹diese Arbeit; ²Ten *et al.* (2006), ³Kim *et al.* (2006), ⁴Yabuuchi *et al.* (1983), ⁵Takeuchi & Yokota (1992) und Holmes *et al.* (1988) ⁶Yabuuchi *et al.* (1983) und Holmes *et al.* (1981), ⁷Yabuuchi *et al.* (1983) und Holmes *et al.* (1983), ⁸Steyn *et al.* (1998); ⁸Überprüft mit APIZym[®]-Test, ⁹Untersuchung der physiologischen Eigenschaften (Kap. 2.7.3), ¹⁰G+C-Gehalt-Bestimmung und Chinonanalyse Kap. 2.7.4.



Anhang 11: Feuchtegehalt des Kompostierungsprozesses 19 (a) und 20 (b) im Vergleich von beimpfter Kammer und Kontrollkammer zur Temperatur. Mittelwerte der Wellentemperaturmessung der beimpften Kammer (\blacktriangle) und Kontrollkammer (\triangle) im Vergleich mit dem ermittelten Feuchtegehalt in der beimpften Kammer (\blacksquare) und in der Kontrollkammer (\square). Es sind die Mittelwerte der „Wellen“-Temperaturen aufgetragen. Zur Verdeutlichung der Temperaturunterschiede wurde die Zeit auf der X-Achse nicht-linear aufgetragen. Die Bestimmung des Feuchtegehalts erfolgte als Dreifachbestimmung durch Trocknung von 5 g Probe bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz (Kap. 2.3.3).



Anhang 12: Übersicht der in K17 ermittelten FISH-Signale von Firmicutes, γ -Proteobacteria und Bacteroidetes bezogen auf die Gesamtzellzahl in %. Die einzelnen Mikroorganismengruppen wurden dabei auf die ermittelten EUB-Signale bezogen. Die Signale und die Standardabweichungen wurden von mindestens sechs Aufnahmen ermittelt. Verwendete Sonden sind EUB1-3 (Amann *et al.*, 1990, Daims *et al.*, 1999); CFB319a (Manz *et al.*, 1996); HGC236 (Erhart *et al.*, 1997); GAM42a mit GAM42a_competitor (Manz *et al.*, 1996). Firmicutes (\square), γ -Proteobacteria (\square), Bacteroidetes (\blacksquare)



Anhang 13: T-RFLP-Profil der Populationsdynamik im Kompostierungsprozess 23 (Reaktor B2) mit Zusatz von mesophilen Starterkulturen. Gezeigt ist das Profil nach RsaI (a) und MspI (b) Verdau. Es wurden 16S rRNA-Gene von Bakterien aus Kompostproben von K23 mit den Primern fD1-6Fam und 534r amplifiziert. I) beimpfte Kammer, II) unbeimpfte Kammer, die Pfeile markieren das t-RF B1 (MspI 147/RsaI 316) was dem Stamm 28-4-3 und verwandten *Shingobacteriaceae* zugeordnet werden konnte (Kap. 3.3.3). Temperaturen sind die Mittelwerte der an den Wellen gemessenen Temperaturen.

Anhang 14: Extrazelluläre Enzymaktivitäten ermittelt mit Hilfe des Api[®]ZYM-Test der Starterkulturen

Enzyme ²	Isolierte Stämme								
	MS-X1 ¹	29-10-PAA ¹	16-2-A ¹	8-4-7 ¹	16-2-VM-2	8-4-E12 ¹	17-1-2	24-4-1	9-4-E3
Phosphatasen									
Alkalische Phosphatase	w	w	+	w	-	-	-	-	-
Saure Phosphatase	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase	+	w	+	+	+	+	-	-	++
Esterasen									
Esterase (C4)	++	++	++	++	++	-	+	-	++
Esterase Lipase (C8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Amino-Peptidasen									
Leucine Amino-Peptidase	w	w	+	+	-	-	-	-	-
Valine Amino-Peptidase	w	w	w	w	-	-	-	++	+
Cystine Amino-Peptidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteasen									
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Chymotrypsin	+	w	-	+	-	-	-	-	++
Glycosylhydrolasen									
α -Galactosidase	-	-	++	+	-	-	-	-	+
β -Galactosidase	-	-	-	w	-	-	-	-	-
β -Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Glucosidase	++	++	+	++	-	-	-	++	-
β -Glucosidase	w	w	w	+	-	-	-	++	-
<i>N</i> -Acetyl- β -Glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	+
α -Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	+	-
α -Fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ Schmidt (2009), ² Die Intensität des Farbumschlags wurde von 1-5 bewertet und entsprach der Freisetzung von 5 nM (w, schwach), 10 nM (+) und 20 nM (++) Reaktionsprodukt.

Anhang 15: Substratverwertungsspektrum der thermophilen Starterkulturen ermittelt durch den Api® 20 NE-Test

Reaktionen ²	Thermophile Stämme					
	MSX1 ¹	29-10PAA ¹	16-2-A ¹	8-4-7 ¹	16-2-VM-2	17-1-2
Nitratreduktion zu Nitrit	-	-	+	+	-	-
Indolbildung aus Tryptophan	-	-	-	-	-	-
Fermentation von D-Glukose	-	-	-	-	-	-
Arginindihydrolase	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-
Esculin-Hydrolyse	+	-	+	+	+	-
Gelatine-Hydrolyse	-	-	-	-	+	-
Assimilation von						
D-Glukose	+	+	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	-	-	-	-
N-Acetyl-Glukoseamin	-	-	-	+	-	-
D-Maltose	+	+	-	-	-	-
Kaliumglukonat	-	-	-	-	-	-
Caprinsäure	-	-	-	-	-	-
Adipinsäure	-	-	-	-	-	-
Malat	-	-	-	-	-	+
Trinatriumcitrat	-	-	-	-	-	-
Phenylacetat	-	-	-	-	-	-

¹Schmidt (2009) , ²Reaktionen: negativ (-), positiv (+)

```

28-4-3      AATACATGCAAGTCGAACGGGATCCAGATCAAAGCTTGCTTTGGTTTGGTGAGAGTGGCG 60
A25        AATACATGCAAGTCGAACGGGATCCAGATCAAAGCTTGCTTTGGTTTGGTGAGAGTGGCG 60
B1         AATACATGCAAGTCGAACGGGATCCAGATCAAAGCTTGCTTTGGTTTGGTGAGAGTGGCG 60
C28        AATACATGCAAGTCGAACGGGATCCAGATCAAAGCTTGCTTTGGTTTGGTGAGAGTGGCG 60
*****

28-4-3      CACGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACCTACCCTTGT CAGGGGGATAGCCCGGCGAAAGTCG 120
A25        CACGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACCTACCCTTGT CAGGGGGATAGCCCGGCGAAAGTCG 120
B1         CACGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACCTACCCTTGT CAGGGGGATAGCCCGGCGAAAGTCG 120
C28        CACGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACCTACCCTTGT CAGGGGGATAGCCCGGCGAAAGTCG 120
*****

28-4-3      GATTAATACCGCATGACATCATTTGAGAGGCATCTTTCTATGATCAAAGATTATCGGACA 180
A25        GATTAATACCGCATGACATCATTTGAGAGGCATCTTTCTATGATCAAAGATTATCGGACA 180
B1         GATTAATACCGCATGACATCATTTGAGAGGCATCTTTCTATGATCAAAGATTATCGGACA 180
C28        GATTAATACCGCATGACATCATTTGAGAGGCATCTTTCTATGATCAAAGATTATCGGACA 180
*****

28-4-3      AGGATGGGCTCGCGTGACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTACGATG 240
A25        AGGATGGGCTCGCGTGACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTACGATG 240
B1         AGGATGGGCTCGCGTGACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTACGATG 240
C28        AGGATGGGCTCGCGTGACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTACGATG 240
*****

28-4-3      TCTAGGGGCTCTGAGAGGAGAATCCCCCACA CTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTA 300
A25        TCTAGGGGCTCTGAGAGGAGAATCCCCCACA CTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTA 300
B1         TCTAGGGGCTCTGAGAGGAGAATCCCCCACA CTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTA 300
C28        TCTAGGGGCTCTGAGAGGAGAATCCCCCACA CTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTA 300
*****

28-4-3      CGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCG 360
A25        CGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCG 360
B1         CGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCG 360
C28        CGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCG 360
*****

28-4-3      TGCAGGAGGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATACGGGAAACAAACGTCGGTACG 420
A25        TGCAGGAGGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATACGGGAAACAAACGTCGGTACG 420
B1         TGCAGGAGGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATACGGGAAACAAACGTCGGTACG 420
C28        TGCAGGAGGACGGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGGAAACAAACGTCGGTACG 414
*****

28-4-3      TGTACCGGTCTGAGTGTACCGTAAGAAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG 480
A25        TGTACCGGTCTGAGTGTACCGT----- 442
B1         TGTACCGGTCTGAGTGTACCGT----- 442
C28        -----

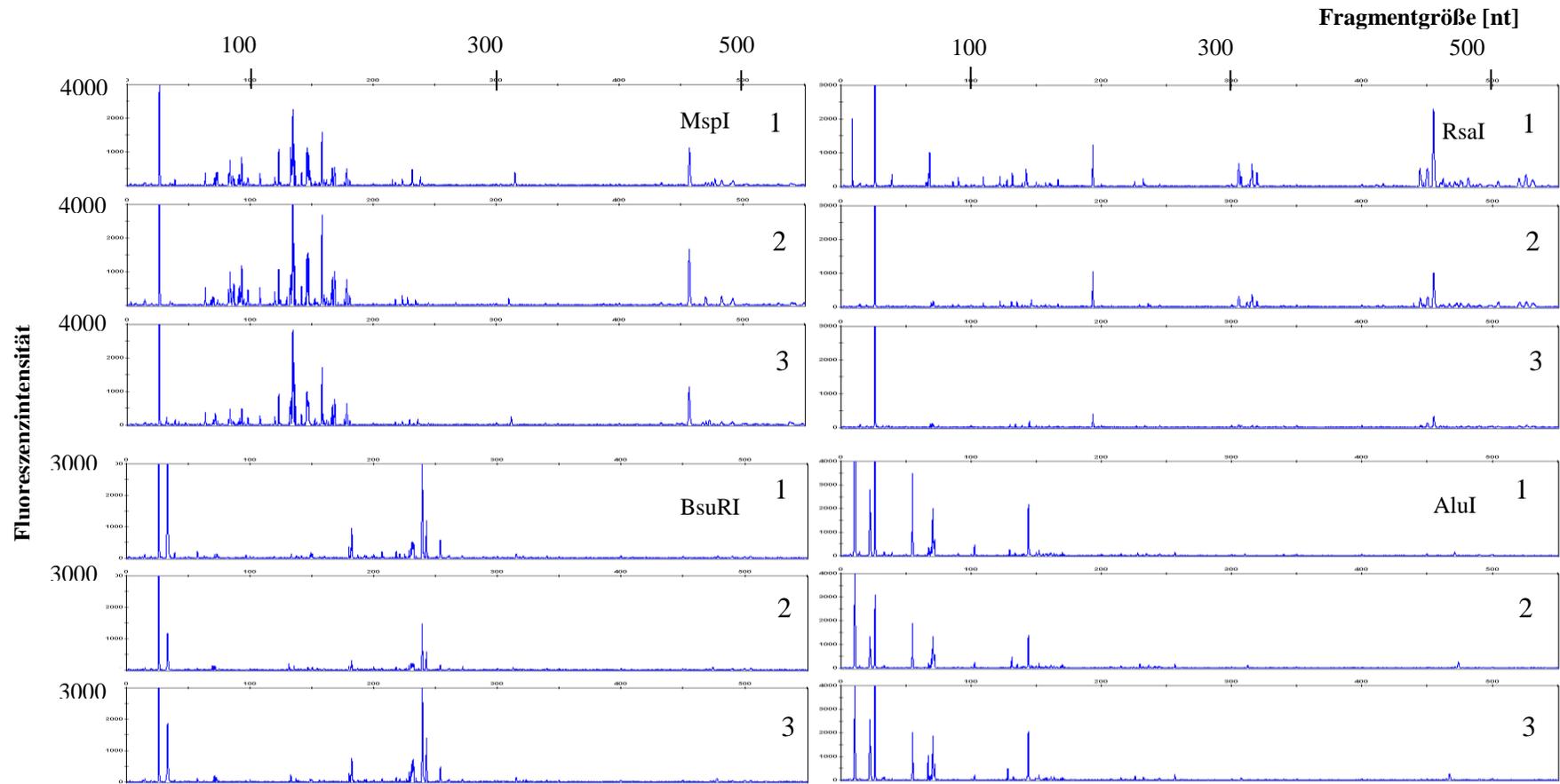
```

Anhang 16: Vergleich der 16S rRNA-Gensequenzen der durch ARDRA in den Kompostierungsprozessen 1, 2 und 17 gefundenen ähnlichen Klone mit dem Isolat Stamm 28-4-3. Programm „ClustW“, für K1: Klon C28, K2: Klon A25, K17: Klon B1. Die Rahmen zeigen die Unterschiede der Sequenzen.

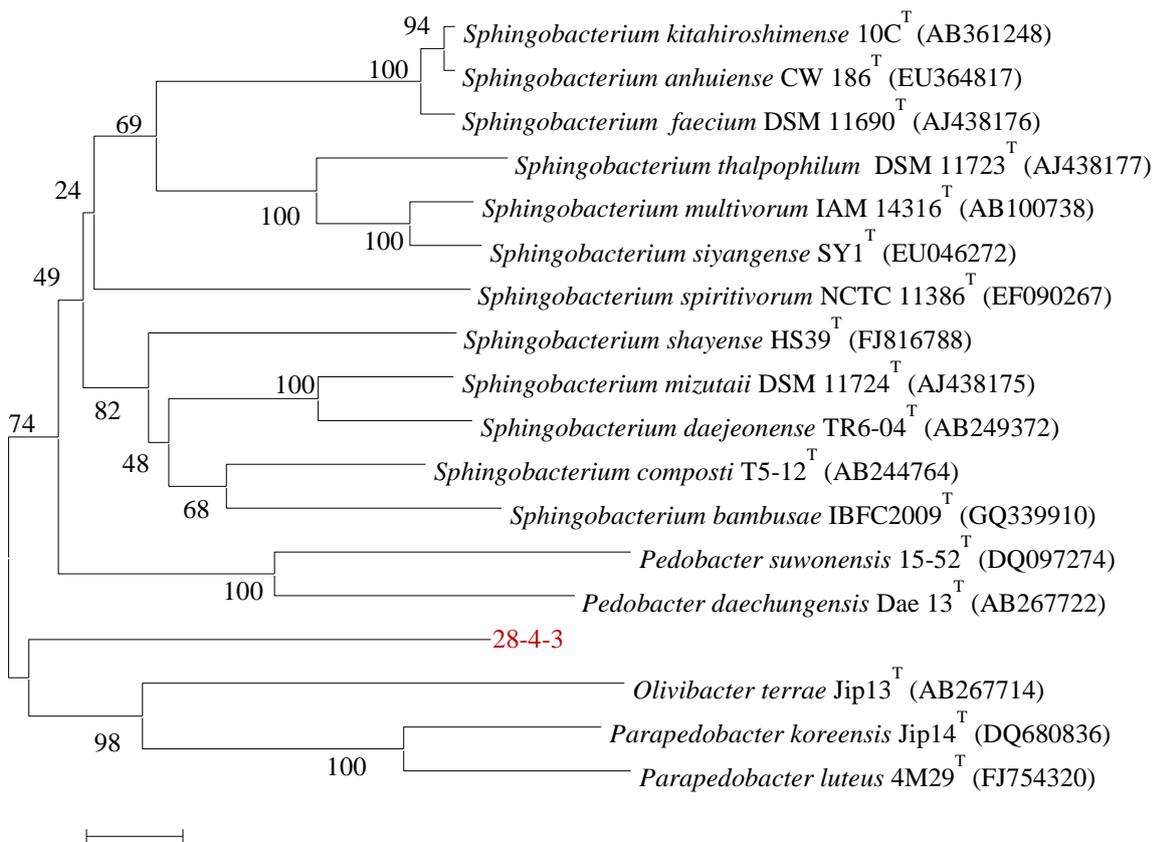
Anhang 17: Untersuchung der Enzymaktivitäten der Isolate. Die Zusammensetzung des Mediums und die Durchführung sind Kap. 2.7.3.3 und Tabelle 7 zu entnehmen. Als Verfestiger diente Gelrite® (Roth, Karlsruhe).

Nr.	Kompostprozess		Isolierter Stamm	C-Quelle		
	Temperatur (°C) ¹	Phase		Milchpulver	Glukose	Nur Aminosäuren
14	12,3	meso ab	8-4-5, 8-4-7.		x	
14	12,3	meso ab	8-4-3, 8-4-1.	x	x	x
2	63	thermo	16-2-VM-4			
14	12,3	meso ab	8-4-4.			
13	17,4	meso ab	17-1-2, 17-1-3			
13	9,5	meso ab	15-1-2			
2	63	thermo	16-2-VM-1			
2	63	thermo	16-VM-5.			
10	65	thermo	29-10-PAA		x	x
2	63	thermo	MS-X1, MS-X3		x	x
1	65	thermo	24-1-4			
10	65	thermo	29-10-PAB	x	x	x
13	17,4	meso ab	17-1-4			
1	54	thermo	23-10-A			
14	58	thermo	2-4-3			
2	63	thermo	16-2-A		x	
4	60	thermo	14-5-c			
1	53	meso ab	26-1-6			
2	63	thermo	16-2-VM-3			
2	63	thermo	16-2-VM-2			
13	17,4	meso ab	17-1-5			
14	12,3	meso ab	8-4-E9.			
14	15,4	meso ab	9-4-E3, 9-4-13	x	x	x
14	15,4	meso ab	9-4-E2	x	x	x
14	15,4	meso ab	9-4-E1.			
14	12,3	meso ab	8-4-E11.			x
14	12,3	meso ab	8-4-E12.			x
14	12,3	meso ab	8-4-E13.			
15	29,4	meso anf	24-4-1, 24-4-2		x	x
15	29,4	meso anf	24-4-3	x		
15	29,4	meso anf	24-4-4			
15	62,4	thermo	28-4-1, 28-4-2			x
15	37,7	meso ab	6-4-1		x	
15	37,7	meso ab	6-4-2		x	x
15	37,7	meso ab	6-4-3			
17	24,4	meso ab	KW-14-10		x	x

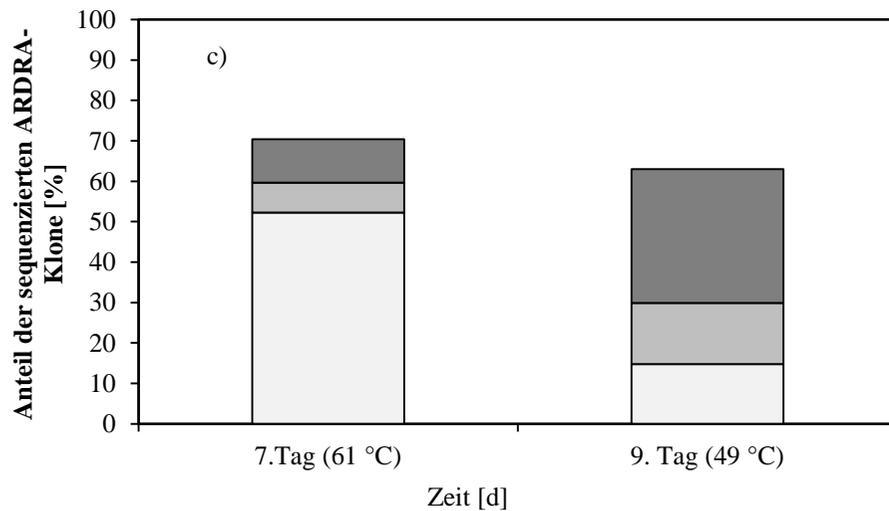
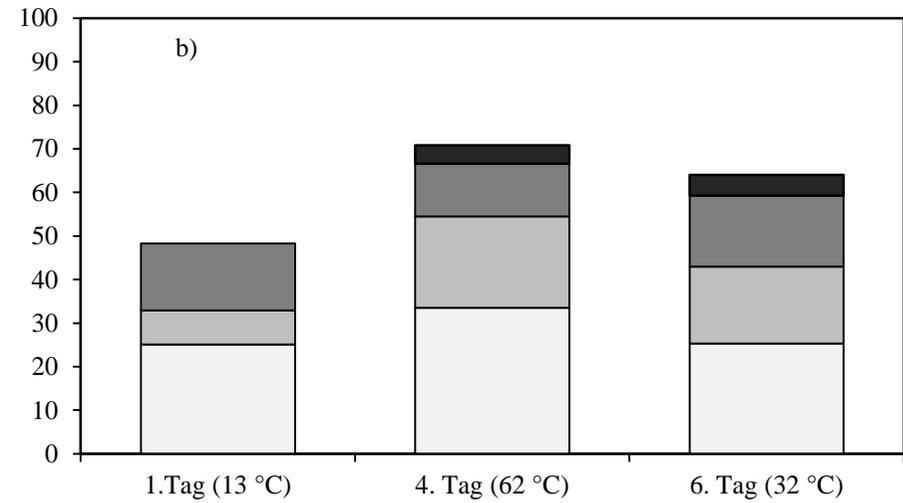
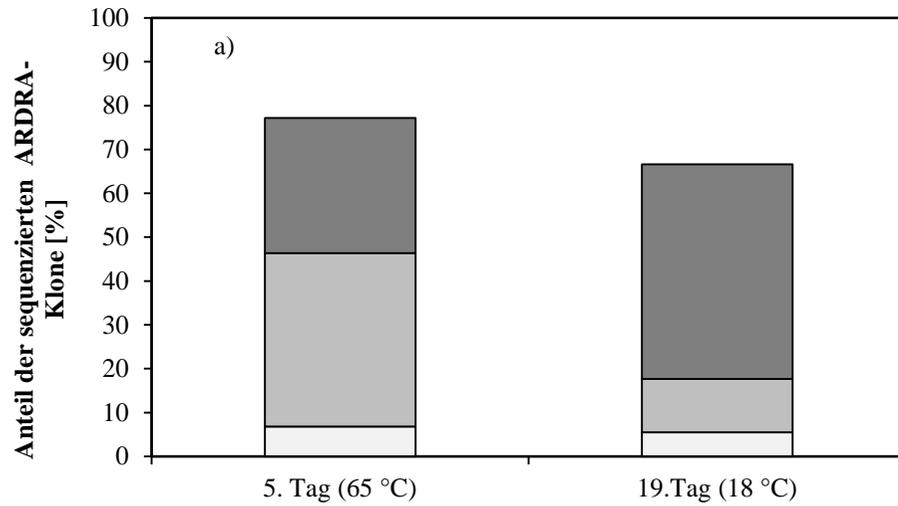
¹Temperatur im Kompostierungsprozess als der Stamm isoliert wurde. meso anf.: mesophile Anfangsphase, thermo: thermophile Phase, meso ab: mesophile Abklingphase;



Anhang 18: Vergleich von drei extrahierten Proben einer Kompostprobe (Tag 10) aus K17 und anschließende t-RFLP-Analyse mit den Enzymen MspI, RsaI, BsuI und AluI. DNA-Extraktion mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit.



Anhang 19: Stammbaum basierend auf den 16S rRNA-Gensequenzen von Stamm 28-4-3 und Typstämmen verwandter Bakterienarten. Die Länge des Balkens stellt einen Sequenzunterschied von 0,01 dar. Der Stammbaum wurde mit der Neighbor-Joining-Methode in MEGA5 erstellt. Die Distanzen zwischen den Bakterien wurden mittels p-distance Methode erstellt und sind als Basendifferenz pro Sequenzposition angegeben (Maßstab entspricht 0,01).



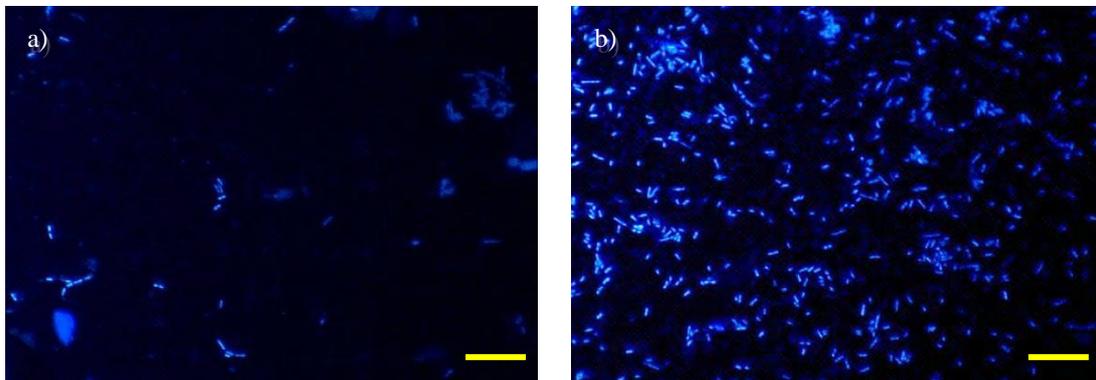
Anhang 20: Prozentuale Verteilung der ARDRA-Klone von Reaktor A und B auf die einzelnen phylogenetischen Gruppen. Dargestellt ist a) K1 mit den Kompostierungstagen 5 und 19 b) K2 mit den Kompostierungstagen 1, 4 sowie c) K17 mit den Tagen 7 und 9. Untersucht wurden Proben aus der thermophilen und mesophilen Phase. Die Temperaturen sind in der Abbildung angegeben.

□ Firmicutes □ Proteobacteria ■ Bacteroidetes ■ Actinobacteria

Anhang 21: Wachstumsverhalten ausgewählter Isolate auf NAI_{OG}-Medium in Abhängigkeit von der Temperatur

Wachstums- temperatur (°C)	Wachstumsverhalten der Isolate						
	MS-X1 ¹ / 29-10-PAA	16-2-A ¹	8-4-7 ¹	16-2-VM- 2 ²	17-1-2 ¹	24-4-1 ³	9-4-E3 ³
5	-	-	-	-	-	-	+
20	-	-	-	-	-	+	+
25	-	-	+	+	-	+	++
30	+	-	+	+	+	+	++
37	+		++	+	+	++	+
40	+	+	++	+	+	+	+
45	+	++	++	+	+	+	-
50	++	++	++	++	+	-	-
55	++	++	++	+	++	-	-
60	++	++	++	-	++	-	-
65	+	++	+	-	+	-	-
70	-	++	-	-	+	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-

¹ thermophil, ² moderat thermophil, ³ mesophil, + gutes Wachstum; ++ Optimum; - kein Wachstum



Anhang 22: Wachstumsversuch von *Ureibacillus thermosphaericus* Stamm 17-1-2 in Kompostextraktmedium. Versuchsdauer 5 Tage bei 50 °C, 1. Tag (a) und 3. Tag (b), Färbung mit DAPI, Filtersatz 4879-01. Balken: 20 µm

Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Dr. habil. Ute Lechner für die Vergabe des interessanten Themas, die stets vorhandene Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie dem unerschütterlichen Optimismus zur Bearbeitung dieses Themas.

Prof. G. Sawers danke ich für die guten Tipps und für sein Interesse an dieser Arbeit.

Ich danke weiterhin der AIF zur Förderung dieses Projektes. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank insbesondere Herrn Sattler (BioSal GmbH) und Claudia Hilbert (FU Berlin) für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke Frau Barbara Zessin und Marie Schmidt für die Hilfe im Labor und ihr Interesse im Zusammenhang mit den Bakterien im Kompost.

Ich bedanke mich weiterhin bei allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie für die Hilfe, die Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre. Ich freue mich, dass Freundschaften aus dieser Zeit weiter bestehen und danke insbesondere Marlén für ihre Hilfe und ihr offenes Ohr.

Ein großer Dank geht an die JSPS, die es mir ermöglicht hat nach Japan zu gehen, um an der University of Toyohashi bei Prof. Akira Hiraishi eine Zeitlang mit seiner und der Unterstützung seiner Mitarbeiter meine Forschungsarbeiten zu diesem Projekt weiterzuführen.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Dr. Gerd Hause für die Hilfe bei der Erstellung der elektronenmikroskopischen Bilder. Außerdem danke ich Herrn Prof. P. Kämpfer (Uni Giessen) für weiterführende Untersuchungen im Zusammenhang mit den Stämmen 8-4-E12 und 8-4-E13.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, besonders meiner Mutti, die mich immer unterstützt hat. Am meisten aber danke ich meinem Mann Sven, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Er hat mich nicht nur unterstützt, sondern ist immer für mich da, baut mich auf und gibt mir die Kraft, alles was ich mir vornehme, auch zu schaffen.

Lebenslauf

06.11.1981 Geburt in Halle

Schulbildung:

09/1988-07/1992 Grundschule „Gustaf-Friedrich-Herzberg“ in Halle

09/1992-07/2000 Gymnasium „Adolf-Reichwein“ in Halle

07/2000 Abitur

Studium:

10/2000-11/2006 Studium des Bioingenieurwesens an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

10/2005-11/2006 Praktikum mit anschließender Diplomarbeit bei der Scanbec GmbH Halle in Zusammenarbeit mit der Stadtwerke GmbH. Thema: „Entwicklung eines Schnelltests zum kultivierungsunabhängigen Nachweis von *Microthrix parvicella* in Kläranlagen“ unter der Betreuung von Prof. Dr. Rainer Rudolph und Dr. Antje Breitenstein mit Abschluss als Dipl.-Ing.

seit 02/2007 Doktorandin am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter der Betreuung von Dr. habil. U. Lechner

06/2010-11/2010 Stipendium der Japan Society for the Promotion of Science (JSPS); für einen Forschungsaufenthalt an der University of Toyohashi, Institut für Life Science, Japan, bei Prof. Dr. Akira Hiraishi

seit 11/2011 Mitarbeiterin bei der TOTAL Raffinerie Mitteldeutschland GmbH, Leuna im Bereich Umweltschutz

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich anderen Werken entnommen sind, als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit wurde keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Halle, 07.01.2012

Kornelia Kosowski