

Open Access

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 129,
408–416 (2016)
DOI 10.2376/0005-9366-15105

© 2016 Schlütersche
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
christoph.tebbe@thuenen.de

Eingegangen: 03.09.2015
Angenommen: 04.01.2016

Online: 16.09.2016
[http://vetline.de/open-access/
158/3216/](http://vetline.de/open-access/158/3216/)

Zusammenfassung

Summary

U.S. Copyright Clearance Center
Code Statement:
0005-9366/2016/15105 \$ 15.00/0

Thünen Institut für Biodiversität, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei, Braunschweig

Bakterienvielfalt und Nachweis potenziell pathogener Arten in einer landwirtschaftlichen Biogasanlage – neue Erkenntnisse dank Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung von rRNA-Gen-Amplikons

Bacterial diversity and detection of potentially pathogenic species in an agricultural biogas plant – new insights gained by high-throughput DNA sequencing of rRNA gene amplicons

Anja B. Dohrmann, Christoph C. Tebbe

Die meisten Umweltbakterien lassen sich nicht im Labor kultivieren, aber sie können direkt, ohne Kultivierung, durch Analysen ihrer 16S rRNA-Gene detektiert und differenziert werden. Dabei werden 16S rRNA-Gene mit $\geq 97\%$ Sequenzidentität spezifischen OTUs (operational taxonomic units) zugeordnet, was grob dem Arten-Niveau entspricht. Hier wurde kultivierungsunabhängig die Bakterienvielfalt und das mögliche Vorkommen von pathogenen Arten in einer landwirtschaftlichen Biogasanlage untersucht. Die Anlage bestand aus zwei Linien, eine erhielt Silage, die andere Silage plus Rindergülle. Jede Linie bestand aus einem Haupt- und Nachgärer. Insgesamt wurden 3,5 Millionen 16S rRNA-Genabschnitte analysiert. Bioinformatische und phylogenetische Analysen ergaben, dass in jedem Gärer etwa 2150 OTUs, die sich auf insgesamt 53 Klassen verteilen, vorkamen. *Clostridia* (49–56 % aller Sequenzen), *Bacilli* (8–12 %) und *Bacteroidia* (7–10 %) waren besonders stark vertreten. Nur 5,1 % der OTUs reagierten auf den Zusatz von Rindergülle. Eine dominante OTU (6,5–10,9 %) ließ sich dem Komplex *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* zuordnen. Die 16S rRNA-Gene anderer potenziell pathogener Arten wurde nur in sehr niedriger Abundanz nachgewiesen ($\leq 0,01\%$), darunter *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* oder *Mycobacterium tuberculosis*. Keine dieser OTUs nahm in ihrer Abundanz in Vergleich von Haupt- zu Nachgärern zu oder wurde durch die Zugabe von Rindergülle signifikant verändert. Ob die identifizierten Sequenzen tatsächlich von pathogenen Bakterien stammen, kann über die 16S rRNA-Gen-Analysen nicht bewiesen werden. Mit der Methode lassen sich jedoch mit sehr hoher Empfindlichkeit potenziell risikoreiche Umweltproben für ggf. weitere diagnostische Verfahren identifizieren.

Schlüsselwörter: Biogasanlagen, Gärsubstrat, mikrobielle Gemeinschaft, PCR, phylogenetische Analyse, *Clostridium botulinum*

Most environmental bacteria cannot be cultivated in the laboratory, but they can be detected and differentiated, independent of cultivation, by analyses of their 16S rRNA genes. DNA-sequences of $\geq 97\%$ identity are grouped together as OTUs (operational taxonomic units), which correspond roughly the species-level. In this study, an agricultural biogas plant was analysed for the diversity of bacterial communities and the potential occurrence of bacterial pathogens during fermentation. The plant consisted of two subsequent fermentation chambers, and two independent lines, both receiving silage, and one, in addition, cattle manure. A total of 3.5 million 16S rRNA gene fragment sequences were analysed. Bioinformatic and phylogenetic analyses indicated that each chamber contained about 2150 OTUs, which could be assigned to 53 different bacterial classes. *Clostridia* (49–56% of all sequences), *Bacilli* (8–12%), and *Bacteroidia* (7–10%) were the most dominant. Only 5.1% of the OTUs responded to the presence of cattle manure. One dominant OTU (6.5–10.9%) belonged to the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex. The 16S rRNA genes of other potential pathogens occurred

only in very low abundances (< 0.01%), including *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, or *Mycobacterium tuberculosis*. None of these OTUs increased between the first and second fermentation chambers. The addition of cattle manure had no significant effect. Clearly 16S rRNA gene sequencing, as applied here, cannot conclusively demonstrate the presence of pathogens, but this approach allows a highly sensitive identification of potentially risky environmental samples which would be relevant for further diagnostic analyses.

Keywords: biogas plants, fermentation substrate, microbial community, PCR, phylogenetic analysis, *Clostridium botulinum*

Einleitung

Die Gewinnung von Biogas aus organischen landwirtschaftlichen Produkten und Abfällen hat in den vergangenen Jahrzehnten in vielen Ländern, darunter auch in Deutschland, an Bedeutung gewonnen (Guo et al., 2015; Holm-Nielsen et al., 2009). Die Umwandlung der organischen Substrate zum Hauptenergieträger Methan erfolgt durch die Aktivität komplex zusammengesetzter mikrobieller Gemeinschaften, die vorwiegend aus Prokaryonten, also Bakterien und Archaeen, bestehen und in anaeroben Biogasanlagen angereichert werden. Bei der Zersetzung der organischen Substrate werden zunächst die polymeren Moleküle, wie z. B. Zellulose, Pektine oder Proteine, hydrolytisch gespalten und durch fermentative Bakterien vor allem zu Propionsäure, Buttersäure, aber auch zu Alkoholen vergoren (Weiland, 2010). Diese Produkte werden von acetogenen Bakterien zu Essigsäure, Wasserstoff (H₂) und CO₂ umgesetzt, die wiederum als Ausgangsubstrate für die strikt anaeroben Methan-produzierenden Archaeen dienen (Christy et al., 2014). Während die mikrobielle Beteiligung an den Stoffumsetzungen damit gut charakterisiert ist, ist die Identität der Prozess-vermittelnden Mikroorganismen auf einer feineren taxonomischen Skala und damit die Vielfalt der mikrobiellen Gemeinschaften sowie ihre Variabilität in Abhängigkeit von Substraten, Prozessbedingungen oder anderer Faktoren kaum bekannt.

Für eine umfassende Charakterisierung der mikrobiellen Vielfalt eignen sich direkte Nukleinsäure-basierende Nachweismethoden, denn über herkömmliche Kultivierung lässt sich nur ein Bruchteil der mikrobiellen Gemeinschaft anreichern. Hierfür haben sich besonders die phylogenetisch stark konservierten und ubiquitär vorkommenden 16S rRNA-Gene bewährt (Jansen, 2006). Mithilfe der PCR lassen sie sich aus einem Gemisch genomischer DNA, wie sie ohne Kultivierungsschritt aus Umweltproben extrahiert werden kann, gewinnen. Die gemischten PCR-Produkte (Amplikons) können anschließend entweder über genetisches Fingerprinting differenziert (Smalla et al., 2007) oder durch DNA-Sequenzierung mithilfe phylogenetischer Analysen genauer charakterisiert werden (Tringe and Hugenholtz, 2008). Mithilfe von genetischem Fingerprinting konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass unterschiedliche Substrate in Biogasprozessen zunächst einen starken Einfluss auf die Vielfalt der mikrobiellen Gemeinschaften haben, der jedoch im Laufe der Fermentation zunehmend verschwindet (Dohrmann et al., 2011).

In den vergangenen Jahren wurde mithilfe von 16S rRNA-Gen-Sequenzierungen und anderen Nukleinsäure Analysen verschiedene Biogasanlagen im experimentellen und Praxis-Maßstab untersucht. Dabei

zeigten sich ähnliche dominante Bakteriengruppen: Besonders häufig sind die sporenbildenden, anaeroben gram-positiven Clostridien, deren Vertreter sowohl an der Hydrolyse und Säurebildung, als auch an der Acetogenese beteiligt sein können. In Biogasanlagen können sie durchaus 50 % der gesamten Prokaryonten ausmachen (Krober et al., 2009; Li et al., 2013; Sundberg et al., 2013; Ziganshin et al., 2013). Die Gruppe der Clostridien umfasst jedoch viele unterschiedliche Bakterien, die sich auf verschiedene phylogenetische Cluster verteilen, wobei das Cluster I die *Clostridium sensu stricto* bezeichnet (Collins et al., 1994). In dieses Cluster gehören viele Arten und Art-Komplexe, darunter auch solche, mit medizinischer Relevanz, wie *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium chauvoei* und *Clostridium botulinum* (Stackebrandt et al., 1999). *C. botulinum* bildet dabei einen Komplex aus mindestens vier Arten, der Clostridien mit der Fähigkeit Botulinum Neurotoxine zu bilden, zusammenfasst (Peck et al., 2011).

Während Cluster I Clostridien durchaus in Biogasanlagen vorkommen können, gibt es keine Hinweise, dass die medizinisch relevanten Vertreter hierbei einen größeren Beitrag leisten oder sich gar in einer Biogasanlage vermehren können und damit ein Risiko darstellen (Dohrmann et al., 2015). Im Allgemeinen kann man jedoch erwarten, dass Bakterien mit einem Krankheitspotenzial bei der Beschickung von Biogasanlagen mit organischen Substraten vorkommen können, da auch Tierextremite eingebracht werden. Das Risiko solcher Einträge wäre jedoch nur dann für den Betrieb einer Anlage relevant, wenn es zu einer Konservierung oder Vermehrung derartiger Bakterien kommen würde.

Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war es, mithilfe der neuen Möglichkeiten der DNA-Hochdurchsatzsequenzierung von PCR-amplifizierten 16S rRNA-Genabschnitten, die Bakterienvielfalt in Haupt- und Nachgärern einer landwirtschaftlichen Biogasanlage möglichst vollständig zu erfassen. Dabei sollten Hinweise auf das Vorkommen von medizinisch relevanten Bakterien gewonnen werden. DNA-Sequenzen mit einer Identität von ≥ 97 % wurden in sogenannte OTUs (operational taxonomic units) zusammengefasst und ihre Identität und Verwandtschaft zu bekannten, kultivierbaren Bakterien wurde mithilfe bioinformatischer und phylogenetischer Methoden analysiert.

Material und Methoden

Die untersuchte landwirtschaftliche Biogasanlage war in normalem Praxisbetrieb und hatte zum Untersuchungszeitraum eine Leistung von 2,4 MW. Sie bestand aus zwei unabhängigen Fermenterlinien („I“ und „II“) mit

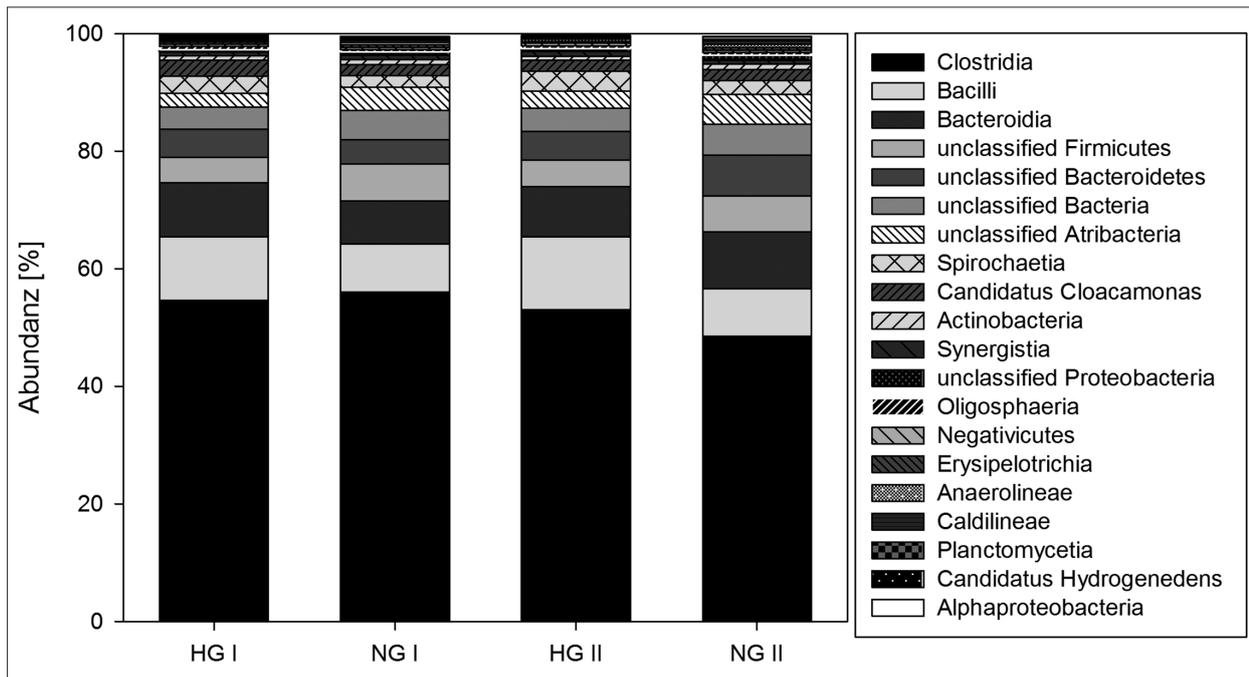


ABBILDUNG 1: Relative Abundanz der 20 häufigsten Bakterien Klassen (von insgesamt 53 identifizierten) in den Haupt- und Nachgärern (HG, NG) der Fermenter-Linien I (mit Rindergülle) und II (ohne Rindergülle).

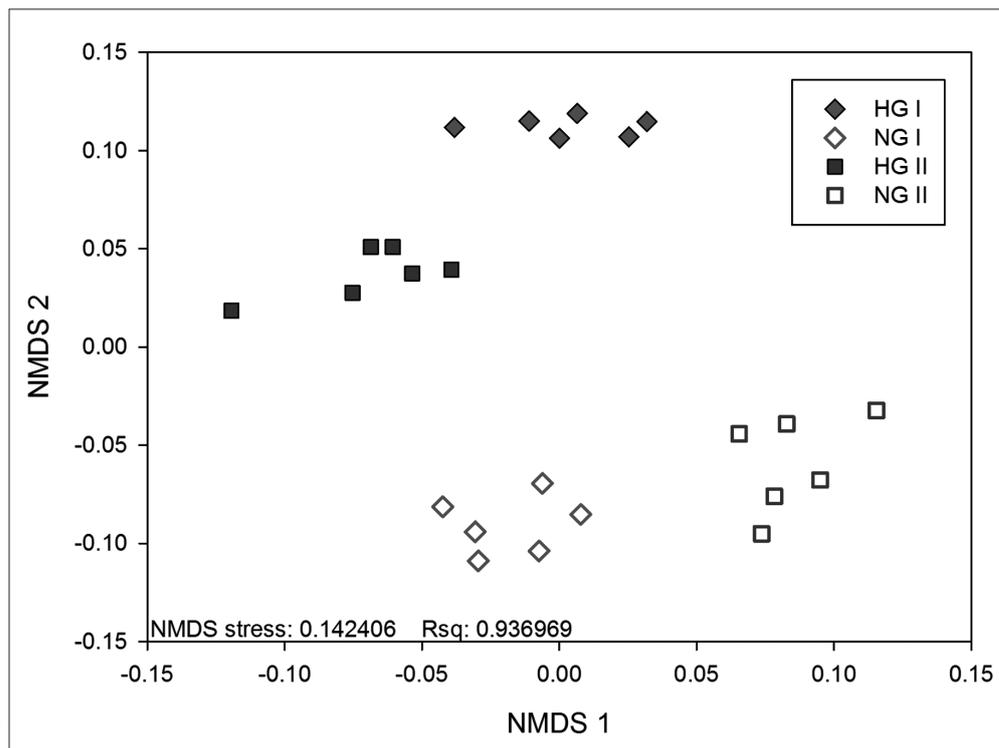
je einem Haupt- (HG) und einem Nachgärer (NG). Das Fassungsvermögen der Gärer lag jeweils bei 4250 m³. Die Anlage wurde bei 40 °C betrieben. Beide Hauptgärer erhielten täglich 39 t Maissilage und 15 t Roggen-Ganzpflanzensilage. Linie I erhielt täglich zusätzlich 43 m³ Rindergülle. Die Entnahme der Proben erfolgte bei stabilen Betriebsbedingungen im Juni 2012.

Aus den Proben wurden bereits in früheren Untersuchungen der pH-Wert, die flüchtigen organischen Säuren, die Carbonat-Pufferkapazität, das Säurespektrum und die Ammonium-Gehalte bestimmt (Dohrmann et al., 2015). Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Zellen der Mikroorganismen im sogenannten Fast-Prep-Instrument (MP Biomedicals, Fisher Scientific) aufgeschlossen, und anschließend die Gesamt-DNA mit der Phenol-Chloroform Methode extrahiert. Genauere Angaben, auch zur Effizienz des Zellaufschlusses einschließlich Sporen sind bei Dohrmann et al. (2011) dargestellt. Zur Charakterisierung der Bakterien-Gemeinschaft wurde ein ca. 410 Basenpaar (bp) langes Segment des 16S rRNA-Genes (Region inklusive der variablen Regionen V4 und V5) durch PCR amplifiziert (Li et al., 2014), dies entspricht etwa 27 % des gesamten Gens. Die Primer (515F 5'-GTGYCAG-CMGCCGCGGT-3'; 909R 5'-CCCCGYCAATTCMTT-TRAGT-3'; Wang and Qian, 2009) wurden mit Adapter und Barcode-Sequenzen ergänzt, sodass eine paired-end Sequenzierung mit der Illumina MiSeq Technologie über 300 Zyklen erfolgen konnte. Die Sequenzierung und die hierfür vorbereitende PCR erfolgten durch die Firma StarSEQ® GmbH (Mainz, Deutschland). Von allen Proben wurden zwei DNA-Extrakte erstellt, die jeweils in dreifacher Wiederholung sequenziert wurden, sodass für jede Probe sechs Bibliotheken mit 16S rRNA-Gen-Sequenzen erstellt wurden. Zur Datenauswertung wurde die Software mothur (Schloss et al., 2009) entsprechend des Protokolls vom September 2014 eingesetzt. Ausgehend von fastq-Dateien wurden Sequenzen

aus beiden paired end-Sequenzierungen zusammengeführt und nur Sequenzen einer Länge von 372–382 Basenpaaren (bp) und ohne weitere Ambiguitäten weiter betrachtet. Chimäre Sequenzen (1,4 %) wurden mit chimera.uchime (<http://drive5.com./uchime>) identifiziert und eliminiert. Sequenzen mit einer Identität von ≥ 97 % wurden in OTUs zusammengefasst und die taxonomische Zuordnung der Sequenzen erfolgte entsprechend der RDP (Ribosomal database project) Ausgabe 10. Unterschiede in der Abundanz auf allen taxonomischen Ebenen wurden mit metastats (White et al., 2009) bewertet. Hierfür wurde der Datensatz auf 101 522 Sequenzen je Bibliothek normalisiert. Phylogenetische Vergleiche der Bakteriengemeinschaften basierten auf einer FastTree Analyse (Price et al., 2010), aus der die weighted UniFrac Distanzen (Lozupone and Knight, 2005) berechnet wurden. Unterschiede wurden mit NMDS (Nicht-metrische, multidimensionale Skalierung) grafisch dargestellt und mit einem Permutatationstest (Kropf et al., 2004) bewertet.

Die Suche nach Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit (≥ 97 %) zu Sequenzen von bekannten *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* und *Clostridium chauvoei* Stämmen erfolgte analog der bei Dohrmann et al. (2015) beschriebenen Prozedur. Dabei wurde für jede OTU eine Consensussequenz erstellt und deren Ähnlichkeit zu repräsentativen Sequenzen aus Clostridien berechnet. Entsprechend der Empfehlung der Europäischen Agentur für Sicherheit und Gesundheitsschutz am Arbeitsplatz (EU-OSHA; <https://osha.europa.eu/de>) für Biologische Arbeitsstoffe in der Landwirtschaft wurde auch nach Gattungen gesucht, die möglicherweise Zoonosen verursachende Arten beinhalten. Dies waren: *Escherichia/Shigella*, *Leptospira*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Chlamydia* und *Coxiella*. Für jede analysierte rRNA-Gen-Bibliothek wurde das niedrigste verfügbare Detektionslimit bemüht und Veränderungen in der relativen Abundanz dieser

ABBILDUNG 2: Vergleich der Struktur der Bakteriengemeinschaften in den beiden Hauptgärern (HG I und HG II) und Nachgärern (NG I und NG II). Zur Darstellung der phylogenetischen Unterschiede in den Bakteriengemeinschaften wurde eine nicht-metrische multidimensionale Skalierung (NMDS) der UniFrac-Distanzen gewählt. Dabei erfolgte der Vergleich der Bakteriengemeinschaften anhand der vorhandenen DNA-Sequenzen und ihrer jeweiligen Abundanz. Die Unterschiede in der phylogenetischen Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften wurden mit einer FastTree-Analyse ermittelt, aus der die gewichteten (weighted) UniFrac-Distanzen berechnet wurden.



Taxa wurden mithilfe einer Varianzanalyse (ANOVA) bewertet.

Ergebnisse

Bakterienvielfalt

Insgesamt wurden in dieser Studie 5,6 Millionen DNA-Rohsequenzen der PCR-amplifizierten 16S rRNA-Gene erhalten, davon 3,5 Millionen, die mit hoher Sequenzqualität der Domäne *Bacteria* und 280 000 der Domäne *Archaea* zugeordnet werden konnten. In den vier Fermentern dominierten Archaeen der Gattung *Methanobacterium* mit einer Abundanz von bis zu 80 %. Der Anteil der Chimera, Sequenzen die aufgrund von PCR-Fehlern unvermeidbar gebildet werden, betrug 1,4 %. Die mittlere Länge der Sequenzen war 375 bp. Die 3,5 Millionen *Bacteria*-Sequenzen verteilten sich auf die 24 Bibliotheken (vgl. Material und Methoden), wobei die kleinste Bibliothek 101 522 und die größte 230 667 Sequenzen enthielt. Berechnungen der Verteilung der Sequenzen innerhalb jeder Bibliothek ergaben, dass jeweils $99,0 \pm 0,1$ % (library coverage) der vorhandenen Vielfalt erfasst wurden. Insgesamt wurden 16 723 unterschiedliche OTUs identifiziert. Die Bibliotheken aus den beiden Hauptgärern (HG) enthielten im Durchschnitt 2141 ± 108 OTUs, die aus den Nachgärern (NG) 2147 ± 90 OTUs. Es bestanden damit keine Unterschiede im „Arten“-Reichtum (OTU richness) zwischen den Hauptgärern und Nachgärern. Ebenso veränderte sich dieser Wert nicht signifikant durch die tägliche Zugabe von 43 m^3 Rindergülle bei Linie I.

Die Anzahl der DNA-Sequenzen, die den einzelnen OTUs zugerechnet wurden, war sehr unterschiedlich: Insgesamt repräsentierten nur 20 OTUs jeweils mehr als 1 % der Sequenzen, während mehr als 16 000 OTUs mit weniger als jeweils 0,01 % der Sequenzen sehr sel-

ten waren. In der Summe trugen die 10 OTUs mit den meisten DNA-Sequenzen („Top 10“) zu etwa 40 % aller Sequenzen bei, die „Top 20“ zu etwa 56 % und die „Top 50“ zu etwa 73 %.

Die Bakteriengemeinschaften in allen vier Fermentern bestanden im Wesentlichen aus den selben taxonomischen Klassen (Abb. 1). Es traten jedoch Unterschiede in den jeweiligen Abundanz verschiedenen phylogenetischen Gruppen auf (Abb. 2). Insgesamt wurden 53 unterschiedliche Klassen von Bakterien nachgewiesen: *Clostridia* waren mit 49–56 % aller *Bacteria*-Sequenzen am stärksten vertreten, gefolgt von *Bacilli* (8–12 %) und *Bacteroidia* (7–10 %). Auch mehrere bislang unbekannten Klassen innerhalb der *Firmicutes* (4–6 %), der *Bacteroidetes* (4–7 %), der *Atribacteria* (2–5 %), sowie bis heute nicht weiter klassifizierte *Bacteria* (4–5 %), gehörten zu den dominanten Vertretern.

Innerhalb der Klasse *Clostridia* dominierte die Familie *Ruminococcaceae* (17–25 %), nicht weiter klassifizierte *Clostridia* (8–12 %), *Clostridiales incertae sedis* XI (6–10 %), *Syntrophomonadaceae* (4–5 %), *Lachnospiraceae* (3–5 %) und *Clostridiaceae* 1 (1–8 %). Alle weiteren 20 Familien innerhalb der Klasse *Clostridia* machten jeweils weniger als 1 % der gesamten *Bacteria*-Sequenzen aus.

Von den verschiedenen phylogenetischen Clustern von *Clostridium* war das Cluster III (aus der Familie der *Ruminococcaceae*) mit 7–9 % am stärksten vertreten. Die Cluster IV (*Ruminococcaceae*) und Cluster I (*Clostridium sensu stricto*) machten 0,5–9,7 % bzw. 1,1–7,7 % der *Bacteria* aus. Beide Cluster reagierten signifikant auf die Zugabe von Rindergülle, was zu einem Anstieg von Cluster IV, aber zu einer Reduktion von Cluster I führte. Während der Fermentation kam es in beiden Linien zu einer signifikanten Reduktion dieser beiden *Clostridium*-Cluster. Außerdem wurden 2 % Cluster XIVa (Familie der *Lachnospiraceae*), 0,8 % Cluster XI (*Peptostreptococcaceae*) und 0,03 % Cluster XIVb (*Lachnospiraceae*) detektiert. Die Abundanz der Cluster XII (*Clostridiales incertae sedis*

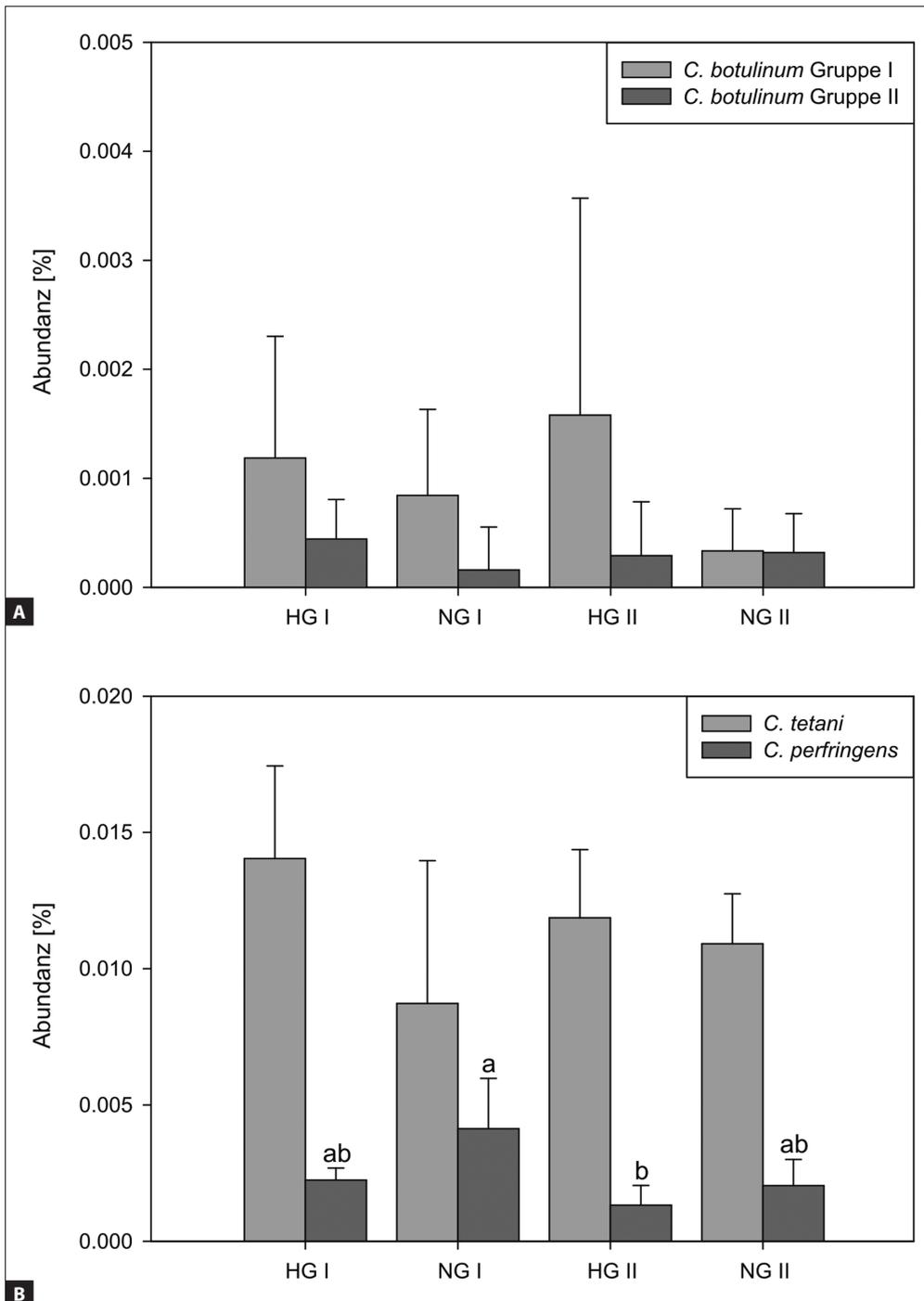


ABBILDUNG 3: Abundanzen von partialen 16S rRNA-Gen-DNA-Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit (≥ 97 % Identität) aus den Haupt- (HG) und Nachgärern (NG) der Linien I und II zu entsprechenden Sequenzen aus *Clostridium botulinum* (A), sowie aus *Clostridium tetani* und *Clostridium perfringens* (beide in B).

XI) und Cluster XVIII (*Erysipelotrichaceae*) lag knapp über der Nachweisgrenze.

Die Bakteriengemeinschaften aus den beiden Hauptgärern und Nächgärern sowie aus den beiden Fermenterlinien unterschieden sich jeweils signifikant voneinander. Bei einer Ähnlichkeit aller Bakteriengemeinschaften von 84 ± 3 % zueinander blieb jedoch eine starke Änderung der Bakterienvielfalt als Folge der Zugabe von Rindergülle (Vergleich Linie I und Linie II) aus. Die Ähnlichkeiten zwischen den Linien war größer (je 88 ± 1 %) als die Ähnlichkeiten innerhalb einer Linie (HG I zu NG I: 81 ± 1 %, HG II zu NG II: $83 \pm$

1 %) (Abb. 2). Das heißt, dass der Einfluss durch die fortschreitende Fermentation größer war als der durch die Zugabe von Rindergülle.

Auf allen taxonomischen Ebenen konnten Vertreter identifiziert werden, die mit ihrer Abundanz signifikant auf die Unterschiede in den Fermentern reagierten. Insgesamt waren 8,1 % der OTUs sensitiv, darunter 49 der Top 50 OTUs. Besonders empfindlich waren 82 OTUs, die sowohl in HG und NG auf den Zusatz von Rindergülle, als auch innerhalb beider Linien reagierten. Der Zusatz von Rindergülle führte in HG und/oder NG zu einer Reaktion von 5,1 % (855 OTUs). Auf die sich ändernden Bedingungen während der Fermentation reagierten 6,5 % (1090 OTUs) in mindestens einer der beiden Linien. An den 1359 sensitiven OTUs wurden insgesamt 2464 Reaktionen erfasst, deren Unterschied in der Abundanz in 92 % der Fälle kleiner als 0,1 % war. Nur 27 Reaktionen führten zu Abundanzunterschieden, die mehr als 1 % betragen. Allgemein kam es durch die Zugabe von Rindergülle oder den Transfer von HG zu NG in 60 % der Reaktionen zu einer Abnahme der Abundanz.

Hinweise auf das Vorkommen von *Clostridium botulinum* und anderen pathogenen Clostridien

In allen vier Fermentern ließen sich 16S rRNA-Gen-Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *Clostridium* (*C.*) *botulinum* nachweisen (Abb. 3A). Eine differenzierte Betrachtung der vier phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen von *C. botulinum* ergab, dass nur die Gruppen I und II in den Bakteriengemeinschaften vertreten waren, wobei Gruppe I mit insgesamt 33 Sequenzen (0,0003 %) etwas stärker repräsentiert war als Gruppe II mit 11 Sequenzen. Das Vorkommen beider Gruppen war in beiden Fermenter-Linien nicht signifikant unterschiedlich, der Zusatz von Rindergülle hatte keinen Einfluss. Ebenso ergab sich kein

Hinweis, dass es im Verlauf der Fermentation (Vergleich HG mit NG) zu einer Vermehrung von Bakterien mit enger Verwandtschaft zu *C. botulinum* kam.

DNA-Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu 16S rRNA-Genen von *Clostridium chauvoei* konnten nicht nachgewiesen werden. Jedoch kamen Sequenzen mit hohen Ähnlichkeiten zu *Clostridium tetani* (0,01 %; 411 Sequenzen) und *Clostridium perfringens* (0,002 %; 82 Sequenzen) in allen Fermentern vor (Abb. 3B). Für beide Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede als Reaktion auf Rindergülle. Ebenso bestanden keine signifikanten Abweichungen

zwischen HG und NG, das heißt, im Zuge der Fermentation kam es weder zu einer deutlichen Vermehrung noch zu einer Abnahme beider Gruppen.

Hinweise auf das Vorkommen möglicher Zoonose-Erreger

Die phylogenetische Auswertung der 16S rRNA-Gen-Sequenzen ergab keine Hinweise auf ein Vorkommen von Bakterien mit enger Verwandtschaft zu *Leptospira*, *Salmonella*, *Chlamydia* oder *Coxiella*.

In Gegensatz dazu gehörten Sequenzen mit enger Verwandtschaft zur Gattung *Streptococcus* zu den dominanten; sie repräsentierten 6,5 bis 10,9 % aller rRNA-Gen-Sequenzen (Abb. 4A). Innerhalb der Gattung war die Diversität jedoch sehr gering: mehr als 99,8 % aller Sequenzen gehörten zur selben OTU. Die Identifizierung der Art war über das sequenzierte Segment des 16S rRNA-Gens nicht möglich. Jedoch ließ sich die OTU dem *Streptococcus bovis*-/*Streptococcus equinus*-Komplex zuordnen (Schlegel et al., 2003). Im Verlauf der Fermentation kam es in beiden Linien zu einer signifikanten Reduktion der Abundanz dieser OTU. Die Zugabe von Rindergülle in Linie I führte im Hauptgärer im Vergleich zur anderen Linie ebenfalls zu einer signifikant geringeren Abundanz.

Sequenzen aus der Gattung *Mycobacterium* wurde in allen Fermentern mit geringer Abundanz von insgesamt 89 Sequenzen nachgewiesen (Abb. 4B). Der direkte Vergleich zu *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (CP003248) konnte eine Identität zu dieser Art nicht ausschließen. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab keinen Einfluss durch Rindergülle. Die Indikation der Anwesenheit der Gattung *Escherichia/Shigella* erfolgte am unteren Ende der Nachweisgrenze, da nur eine einzelne Sequenz (aus NG II) im gesamten Datensatz diesem Taxon zugeordnet werden konnte.

Diskussion

In diesen Untersuchungen wurden statt klassischer mikrobiologischer Verfahren Analysen von 16S rRNA-Genen auf Ebene von OTUs durchgeführt. Hierzu wurden DNA-Sequenzen mit einer Identität von $\geq 97\%$ zusammengefasst. Setzt man voraus, dass der ausgewählte Abschnitt des 16S rRNA-Gens, der etwa einem Viertel der Länge des gesamten Gens entsprach, repräsentativ für das gesamte Gen ist, so entspricht ein Level von $\geq 97\%$ grob dem

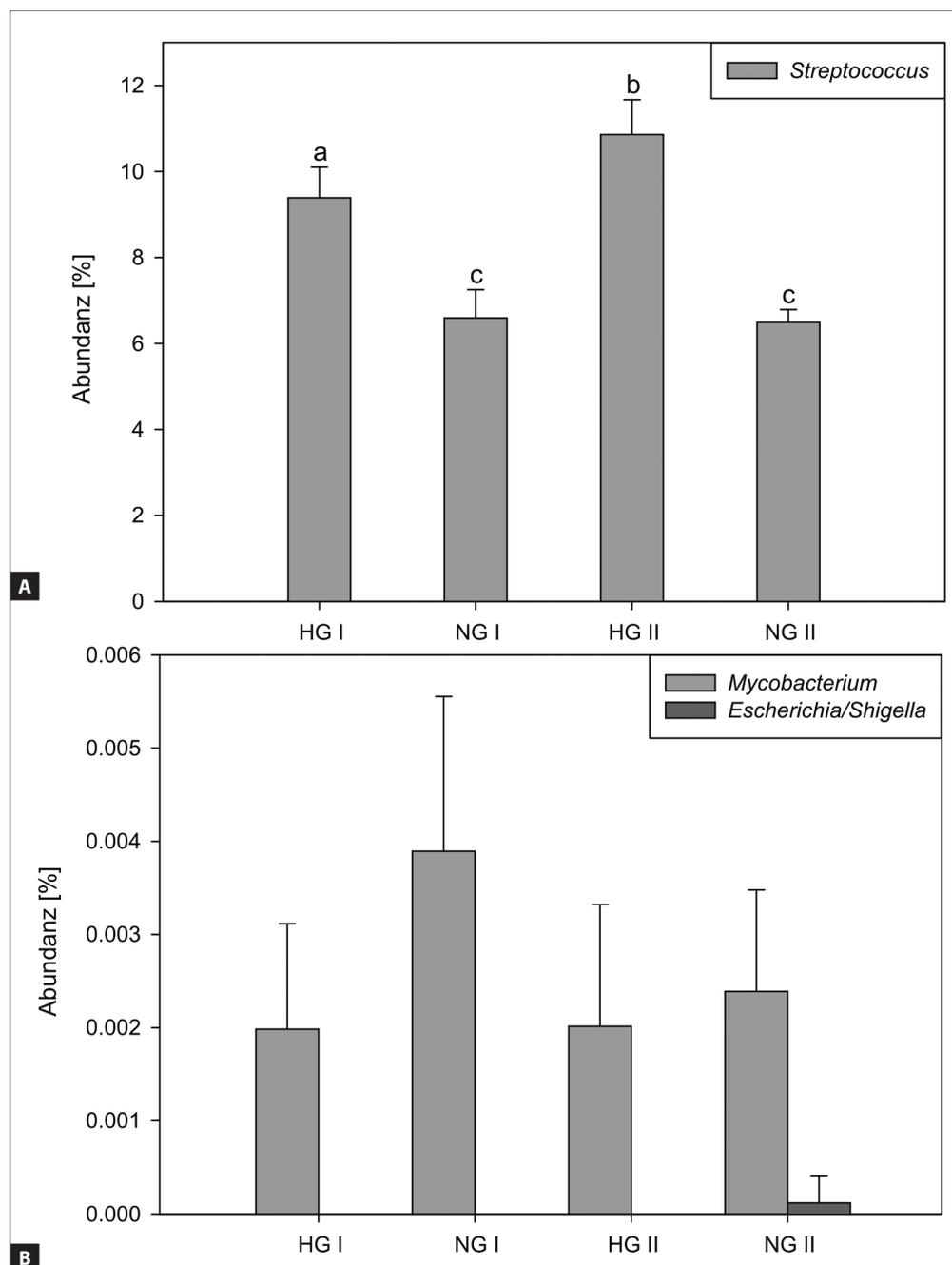


ABBILDUNG 4: Hinweis auf das mögliche Vorkommen von Zoonose-Erregern in den Haupt- (HG) und Nachgärern (NG) der Linien I und II. Abundanzen von partiellen 16S rRNA-Gen-Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit ($\geq 97\%$ Identität) zu entsprechenden Sequenzen aus *Streptococcus* spp. (A), bzw. *Mycobacterium* spp. sowie *Escherichia/Shigella* spp. (B).

Niveau der „Art“ (Stackebrandt and Goebel, 1994). Die phylogenetische Analyse der DNA-Sequenzen und Zuordnung zu OTUs erlaubten es, Bakterien nach ihrem Verwandtschaftsgrad zu gruppieren (Schloss and Westcott, 2011). Verschiedene OTUs repräsentieren aber nicht immer verschiedene Bakterien-Arten. Einige Bakteriengenome enthalten mehrere 16S rRNA-Gene, die stärker als 3 % in ihrer Sequenzidentität divergieren (von Wintzingerode et al., 1997). Andererseits können taxonomisch unterschiedliche Bakterien aber zur selben OTU gehören, wie z. B. von *Escherichia coli* und *Shigella flexneri*, die (fast) identische 16S rRNA-Gene besitzen (Case et al., 2007; Clarridge, 2004).

Die 3,5 Millionen rRNA-Gen-DNA-Sequenzen stammten aus insgesamt 24 Bibliotheken. Da von den 4 Gärern keine „echten“ Replikate zur Verfügung standen, wurden je 6 Pseudoreplikate ($n = 6$) erstellt indem je zwei unabhängige DNA-Extrakte gewonnen wurden, die wiederum in dreifacher Wiederholung sequenziert wurden. Dies bedeutet, dass die statistischen Analysen in den vorliegenden Untersuchungen die Analysen-bedingte Variabilität reflektieren (Prosser, 2010). Um die Aussagekraft derartiger Daten und die daraus zu ziehenden Schlussfolgerungen zu verbessern, sollten zukünftig wiederholte Untersuchungen an denselben Anlagen sowie Untersuchungen an weiteren Biogasanlagen vorgenommen werden.

Auf Grundlage der 3,5 Millionen 16S rRNA-Sequenzen konnten insgesamt 16 723 unterschiedliche OTUs identifiziert werden. Jede der 24 Bibliotheken enthielt jedoch nur ca. 2144 OTUs. Diese starke Diskrepanz beruht auf dem großen Anteil von OTUs die nur sehr wenige Sequenzen enthalten, da deren Abundanz wahrscheinlich stochastisch verteilt vorlag. Die stärker vertretenen OTUs kamen tatsächlich in allen Proben vor.

Der Vergleich der phylogenetischen Stammbäume, wie er aus der Berechnung der Verwandtschaft der 16S rRNA-Gene für die Bibliothek aufgestellt wurde, zeigte, dass sich die Bakterienvielfalt in den Biogasreaktoren in Abhängigkeit der Gärstufe (Vergleich HG zu NG) bzw. in Abhängigkeit vom Zusatz von Rindergülle zum Substratgemisch nur um etwa 16 % unterschieden, 84 % der Gemeinschaft waren unabhängig von diesen variablen Bedingungen durch gleiche oder eng verwandte Taxa repräsentiert. Zu diesem konstanten Teil könnten einerseits inaktive Bakterien aus den Substraten beigetragen haben, die in beiden Linien eingesetzt wurden, wie zum Beispiel Vertreter aus der Gruppe der Milchsäurebakterien (Lactobacillales), die aus der Maissilage stammen könnten (Duniere et al., 2013, Rossi and Dellaglio, 2007), zum anderen aber auch Bakterien, die aktiv zum Fermentationsprozess beitragen, wie zum Beispiel cellulolytische oder acetogene Clostridien (Schlüter et al., 2008).

Die Unterschiede zwischen Linie I und Linie II sollten in erster Linie durch den Zusatz von Rindergülle zu Linie I hervorgerufen worden sein. Da jede Linie jedoch ohne physische Wiederholung zur Verfügung stand, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere, z. B. geringfügig architektonische Abweichungen, oder variiierende Substratflüsse in und zwischen den Gärstufen einen gewissen Einfluss auf die Unterschiede zwischen den Bakteriengemeinschaften hatten. Insgesamt hatte der Zusatz von Rindergülle einen niedrigeren Einfluss als der Wechsel zwischen den Gärstufen HG und NG. Nur 5,1 % der OTUs zeigten eine Veränderung. Während die zusätzlichen OTUs von der Gülle selber stammen könnten, könnten die OTUs, die mit einem Rückgang reagierten, auf Hemmstoffe der Rindergülle oder andere antagonistische Wirkungen beeinflusst worden sein. Ein gezielter Eintrag von möglicherweise pathogenen Bakterien durch den Zusatz von Rindergülle konnte in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden.

Besonders dominant war eine OTU vertreten, die dem *Streptococcus bovis*-/*Streptococcus equinus*-Komplex zugeordnet werden konnte. Die hohe Abundanz von *Streptococcus* sp. mit enger Verwandtschaft oder Identität zu dieser OTU ist in Biogasreaktoren jedoch nicht ungewöhnlich (Fernandez et al., 2000; Kampmann et al., 2014; Luo

and Angelidaki, 2014). Die OTU fällt in die Gruppe der Milchsäurebakterien und ihr Eintrag könnte über die Silage oder Gülle erfolgt sein (Lu et al., 2014). Mit fortschreitender Fermentation (Vergleich HG zu NG) nahm die OTU deutlich ab, wobei die Ausgangsmenge in dem Ansatz mit Rindergülle bereits geringer war.

DNA-Sequenzen, die auf die Anwesenheit von anderen potenziell pathogenen Bakterien hinweisen, wie *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. tetani* oder auch *M. tuberculosis* kamen regelmäßig, allerdings nur in sehr niedriger Anzahl vor – durchschnittlich repräsentiert von drei bis 100 Sequenzen im Hintergrund von 1 Million. Keine der Sequenzen zeigte eine erkennbar starke Reaktion auf den Zusatz von Rindergülle. Um zu ermitteln, ob es im Vergleich zu den Gärsubstraten zu einer Vermehrung der hier ausgewählten OTUs gekommen ist, müssten weitere Vergleichsuntersuchungen der Substrate vor dem Eintrag in die Biogasanlage durchgeführt werden.

Der Nachweis von OTUs mit hoher Ähnlichkeit oder Identität zu 16S rRNA-Gen-Sequenzen von pathogenen Arten bedeutet nicht, dass diese Arten tatsächlich vertreten waren. Ein Nachweis von Pathogenität kann nicht über 16S rRNA-Analysen alleine geleistet werden (Claridge, 2004). Häufig finden sich die für Pathogenität verantwortlichen Gene in spezifischen, instabilen chromosomalen Regionen (z. B. Integrons, sogenannte Pathogenitäts-Inseln) oder auf extrachromosomalen Elementen (Plasmide). Pathogenitätsinseln wie auch Plasmide können in besonderem Maße auch an Genübertragungen, das heißt, horizontalem Gentransfer teilnehmen und dadurch den Bezug von Phylogenie der 16S rRNA- und Pathogenitäts-verursachenden Genen verändern (Brüggemann, 2005; Gal-Mor and Finlay, 2006; Hacker and Kaper, 2000).

Tatsächlich wurden von uns in vorhergehenden Untersuchungen mit einer weniger effizienten Sequenzierungstechnik von 16S rRNA-Genen Hinweise auf das Vorkommen von *C. botulinum* in derselben Biogasanlage erhalten. Proben mit der höchsten Sequenzabundanz wurden dann im Mäusetoxizitätstests direkt und nach Anreicherungskultivierung überprüft und in keinem Fall wurde der Verdacht auf Neurotoxin produzierende Bakterien bestätigt (Dohrmann et al., 2015). In anderen Untersuchungen wurde von *C. botulinum* mit stillen, also inaktiven Neurotoxin-Genen berichtet (Dineen et al., 2003; Hutson et al., 1996).

Die Qualität der Hochdurchsatz DNA-Sequenzierung von 16S rRNA-Gen-PCR-Amplikons besteht also nicht darin, pathogene Bakterien direkt nachzuweisen, sondern darin, die gesamte Bakterienvielfalt aus einem komplexen Substrat, wie es aus Biogasanlagen kommt, darzustellen (Ju and Zhang, 2015). Über phylogenetische Analysen lassen sich so Hinweise auf potenziell pathogene Bakterien gewinnen, um damit gegebenenfalls verdächtige Proben für weitere diagnostische Verfahren auswählen zu können. Mit der Vorschaltung der hier beschriebenen DNA-Analysen kann der Einsatz von Tierversuchen zur Untersuchung von Umweltproben auf ein Minimum eingeschränkt werden.

Danksagung

Wir danken Britta Müller, Karin Trescher und Jana Usarek für die exzellente technische Unterstützung. Martin Bolz (Thünen Institut) danken wir für seine Unterstüt-

zung im IT-Bereich. Besonders möchten wir uns bei Meike Walz, Kirsten Loewe und Achim Loewen vom Fachgebiet NEUTec der Hochschule für Angewandte Wissenschaften und Kunst (HAWK), Göttingen, für die vertrauensvolle und konstruktive Zusammenarbeit im Projekt „Abundanz und Vielfalt von Clostridien in landwirtschaftlichen Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium botulinum*“ danken. Die wissenschaftlichen Untersuchungen wurden durch die finanzielle Förderung des Niedersächsischen Ministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Hannover, ermöglicht, wofür wir uns ausdrücklich bedanken möchten.

Conflict of interest

Es bestehen keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und/oder einer Firma, welche die in diesem Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

Literatur

- Brüggemann H (2005):** Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. *Curr Opin Microbiol* 8: 601–605.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmstrom C, Doolittle WF, Kjelleberg S (2007):** Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* 73: 278–288.
- Christy PM, Gopinath LR, Divya D (2014):** A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renew Sust Energ Rev* 34: 167–173.
- Clarridge JE (2004):** Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17: 840–862.
- Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hippe H, Farrow JAE (1994):** The phylogeny of the genus *Clostridium* – proposal for 5 new genera and 11 new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 44: 812–826.
- Dineen SS, Bradshaw M, Johnson EA (2003):** Neurotoxin gene clusters in *Clostridium botulinum* type A strains: Sequence comparison and evolutionary implications. *Curr Microbiol* 46: 345–352.
- Dohrmann AB, Baumert S, Klingebiel L, Weiland P, Tebbe CC (2011):** Bacterial community structure in experimental methanogenic bioreactors and search for pathogenic *clostridia* as community members. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1991–2004.
- Dohrmann AB, Walz M, Loewen A, Tebbe CC (2015):** *Clostridium* cluster I and their pathogenic members in a full-scale operating biogas plant. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 3585–3598.
- Duniere L, Sindou J, Chaucheyras-Durand F, Chevallier I, Thevenot-Sergentet D (2013):** Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Anim Feed Sci Tech* 182: 1–15.
- Fernandez AS, Hashsham SA, Dollhopf SL, Raskin L, Glagoleva O, Dazzo FB, Hickey RF, Criddle CS, Tiedje JM (2000):** Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl Environ Microbiol* 66: 4058–4067.
- Gal-Mor O, Finlay BB (2006):** Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8: 1707–1719.
- Guo M, Song W, Buhain J (2015):** Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renew Sust Energ Rev* 42: 712–725.
- Hacker J, Kaper JB (2000):** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54: 641–679.
- Holm-Nielsen JB, Al Seadi T, Oleskowicz-Popiel P (2009):** The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technol* 100: 5478–5484.
- Hutson RA, Zhou YT, Collins MD, Johnson EA, Hatheway CL, Sugiyama H (1996):** Genetic characterization of *Clostridium botulinum* type A containing silent type B neurotoxin gene sequences. *J Biol Chem* 271: 10786–10792.
- Janssen PH (2006):** Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72: 1719–1728.
- Ju F, Zhang T (2015):** 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 4119–4129.
- Kampmann K, Ratering S, Geissler-Plaum R, Schmidt M, Zerr W, Schnell S (2014):** Changes of the microbial population structure in an overloaded fed-batch biogas reactor digesting maize silage. *Bioresource Technol* 174: 108–117.
- Kröber M, Bekel T, Diaz NN, Goesmann A, Jaenicke S, Krause L, Miller D, Runte KJ, Viehöver P, Pühler A, Schlüter A (2009):** Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *J Biotechnol* 142: 38–49.
- Kropf S, Heuer H, Grüning M, Smalla K (2004):** Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. *J Microbiol Meth* 57: 187–195.
- Li A, Chu YN, Wang XM, Ren LF, Yu J, Liu XL, Yan JB, Zhang L, Wu SX, Li SZ (2013):** A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnol Biofuels* 6: 3.
- Li J, Rui J, Pei Z, Sun X, Zhang S, Yan Z, Wang Y, Liu X, Zheng T, Li X (2014):** Straw- and slurry-associated prokaryotic communities differ during co-fermentation of straw and swine manure. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 4771–4780.
- Lozupone C, Knight R (2005):** UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 71: 8228–8235.
- Lu XM, Lu PZ, Zhang H (2014):** Bacterial communities in manures of piglets and adult pigs bred with different feeds revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 2657–2665.
- Luo G, Angelidaki I (2014):** Analysis of bacterial communities and bacterial pathogens in a biogas plant by the combination of ethidium monoazide, PCR and Ion Torrent sequencing. *Water Res* 60: 156–163.
- Peck MW, Stringer SC, Carter AT (2011):** *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. *Food Microbiol* 28: 183–191.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2010):** FastTree 2-Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE* 5: e9490.

- Prosser JI (2010):** Replicate or lie. *Environ Microbiol* 12: 1806–1810.
- Rossi F, Dellaglio F (2007):** Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. *J Appl Microbiol* 103: 1707–1715.
- Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PAD, Bouvet A (2003):** Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 631–645.
- Schloss PD, Westcott SL (2011):** Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 77: 3219–3226.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009):** Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537–7541.
- Schlüter A, Bekel T, Diaz NN, Dondrup M, Eichenlaub R, Gartemann KH, Krahn I, Krause L, Krömeke H, Kruse O, Mussgnug JH, Neuweger H, Niehaus K, Pühler A, Runte KJ, Szczepanowski R, Tauch A, Tilker A, Viehöver P, Goesmann A (2008):** The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J Biotechnol* 136: 77–90.
- Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, Heuer H, Baumgarte S, Becker R, Neuber G, Kropf S, Ulrich A, Tebbe CC (2007):** Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *J Microbiol Meth* 69: 470–479.
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994):** A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846–849.
- Stackebrandt E, Kramer I, Swiderski J, Hippe H (1999):** Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunol Med Mic* 24: 253–258.
- Sundberg C, Al-Soud WA, Larsson M, Alm E, Yekta SS, Svensson BH, Sorensen SJ, Karlsson A (2013):** 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol Ecol* 85: 612–626.
- Tringe SG, Hugenholtz P (2008):** A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol* 11: 442–446.
- Von Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E (1997):** Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21: 213–229.
- Wang Y, Qian PY (2009) Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies.** *PLoS ONE* 4: e7401.
- Weiland P (2010):** Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 849–860.
- White JR, Nagarajan N, Pop M (2009):** Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Comput Biol* 5:e1000352.
- Ziganshin AM, Liebetrau J, Pröter J, Kleinstaub S (2013):** Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 5161–5174.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Christoph Tebbe
Thünen Institut für Biodiversität
Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume,
Wald und Fischerei
Bundesallee 50
38116 Braunschweig
christoph.tebbe@thuenen.de