

Entwicklung von pilzlichen und bakteriellen Lebensgemeinschaften in Kiefernholzhalden

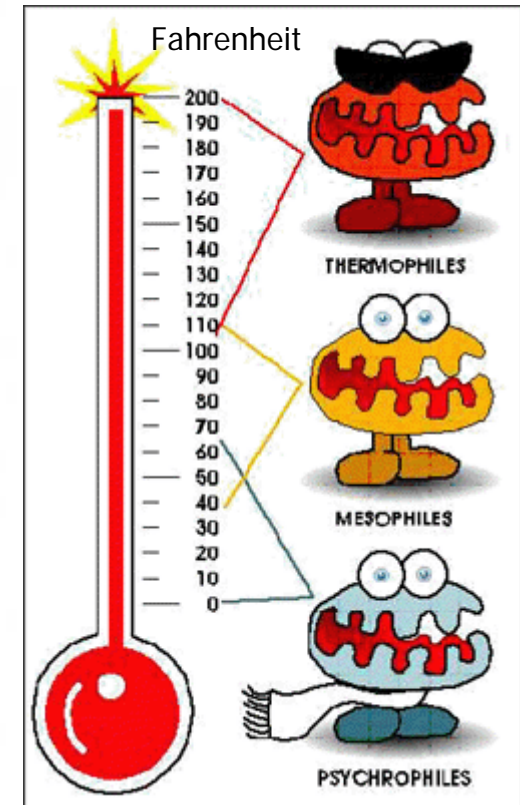
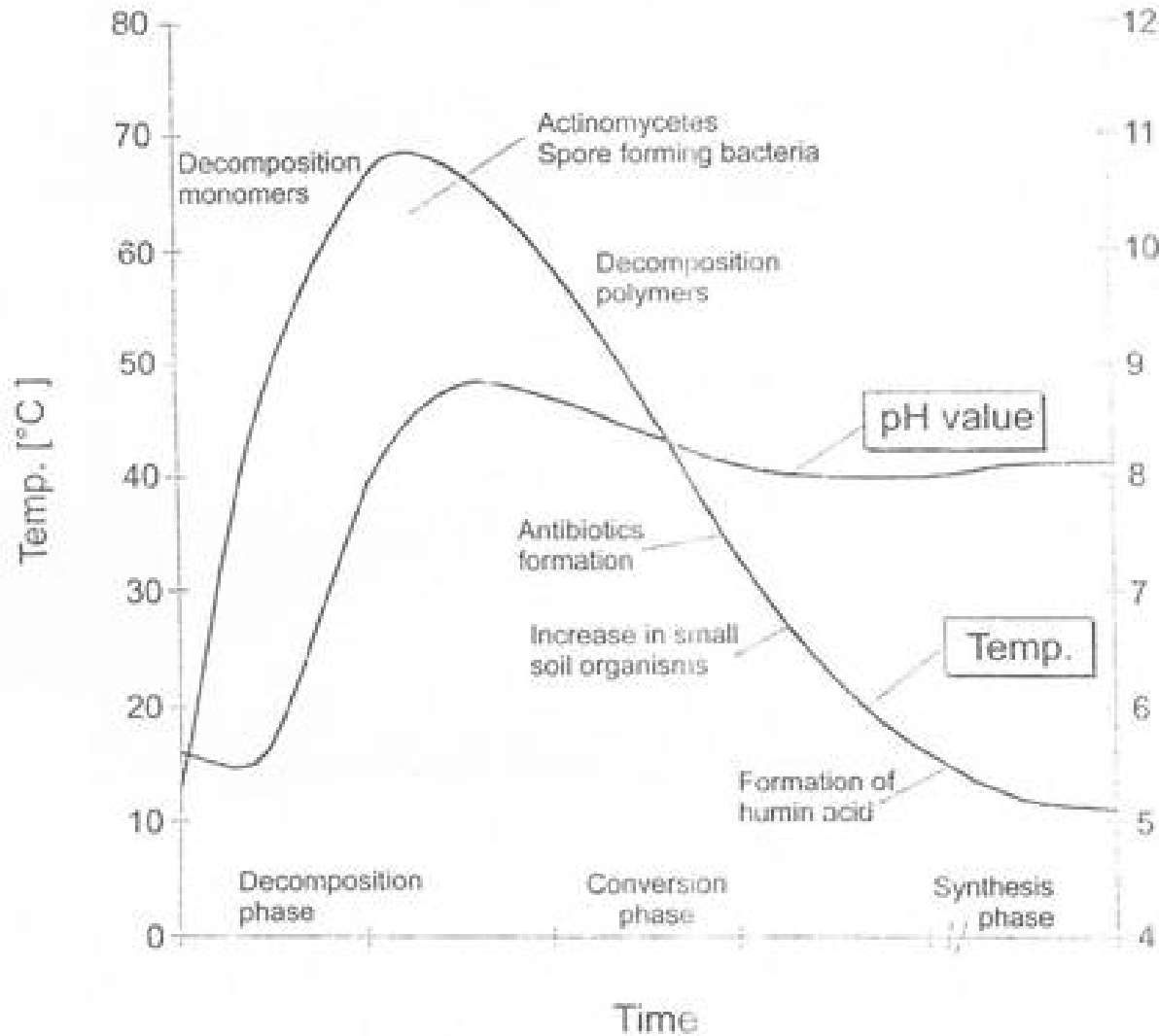


Matthias Noll Fachgruppe IV.1
"Biologie im Umwelt- und Materialschutz"

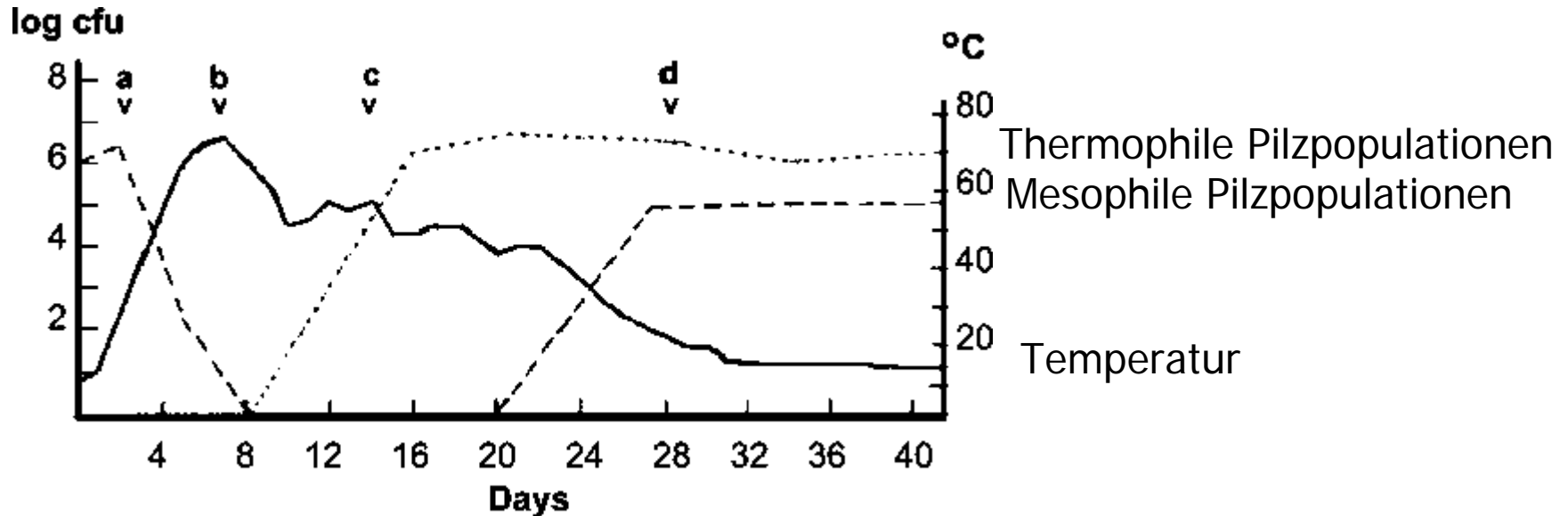
- Das Interesse für erneuerbare Energieträger ist in den letzten Jahren stark angestiegen.
- Wärme- und Elektrizitätsenergie aus Biomasse haben sich in den letzten 10 Jahren von 70 auf 110 TWH/a nahezu verdoppelt.
- Energie aus Biomasse wird sich in den nächsten 10 Jahren voraussichtlich nochmals verdoppeln und in 20 Jahren verdreifachen. (Leitstudie vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, 2007)
- Lagerung von Biomasselagerung im Großmaßstab hat noch keine lange Tradition in Europa.
- Die Gefahr von Schwelbränden durch Selbstentzündung der Halden ist groß.
- Zur Selbstentzündung kommt es, sobald die Wärmeproduktionsrate (durch mikrobiologische oder chemisch-physikalische Reaktionen) innerhalb der Halde größer als die Wärmeabfuhrate aus der Schüttung wird.

Einleitung

Bekannte Eigenschaften bei der Kompostierung von Biomasse:



Bekannte Kompostierungssysteme von Biomasse:

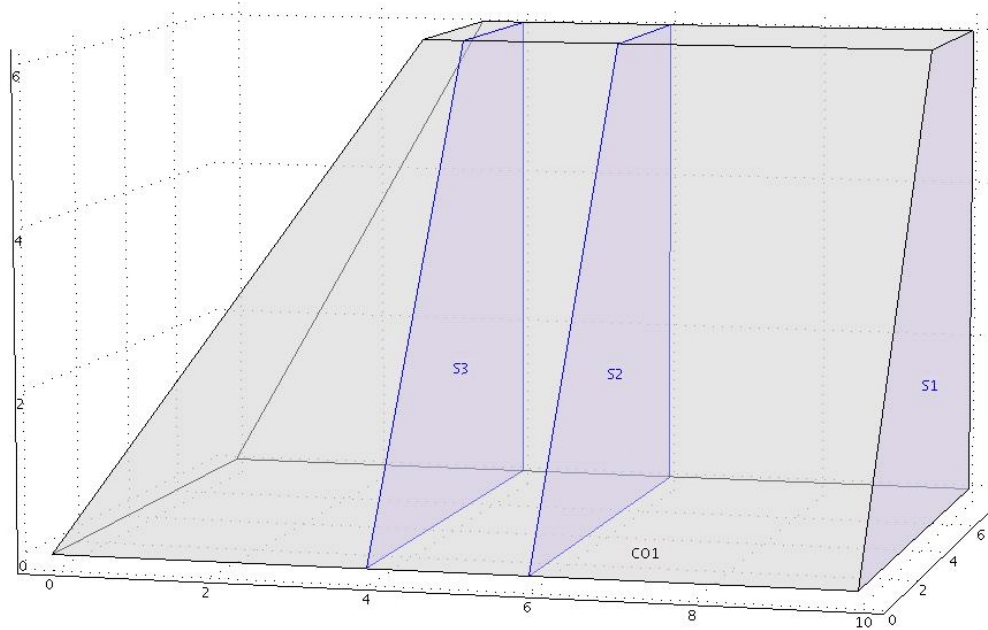


Temperaturänderung und Dynamik der pilzlichen Populationen bei der Weizenstroh-Kompostierung.

Voraussetzung des Holzabbaus:

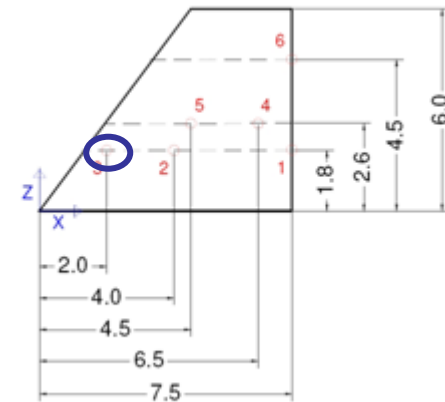
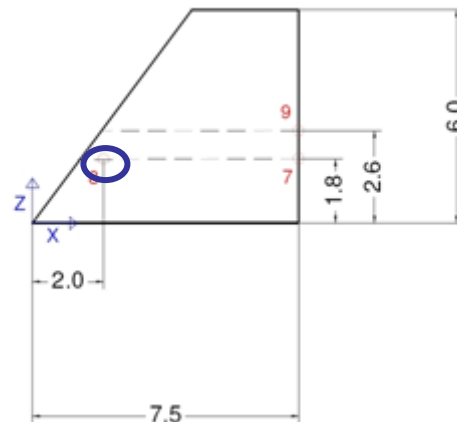
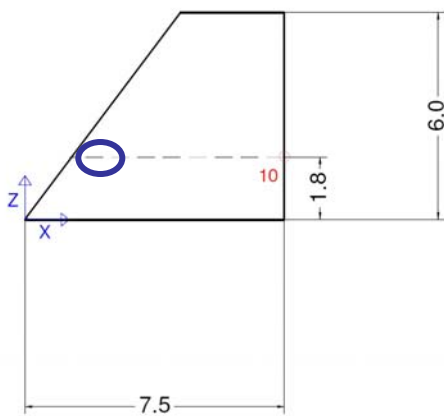
- Feuchtigkeit
- Nährstoffe
- Temperatur
- Sauerstoffgehalt

Haldenaufbau



Probennahme für molekularbiologische Messungen

- 5 Positionen
- 0.5 m und 2 m Haldentiefe
- Messung die ersten 4 Wochen wöchentlich danach alle 4 Wochen



Experimenteller Aufbau



Probenentnahme 0.5 und 2.0 m in der Holzhalde
(Haldenaufbau → 12 Monate)



Messungen in der Halde

N₂

Mahlen der Holzhack-schnitzelproben

Extraktion

Nukleinsäure-extrakte

Bestimmung des Wassergehaltes, Gesamt-N, -C, -S und -H; pHs; Ligningehaltes

PCR

Bakterielle 16S rRNA Gene und pilzlichen ITS

Klonbibliotheken der 16S rRNA Gene und ITS

Sequenzierung
Klonierung

Phylogenetische Zuordnung

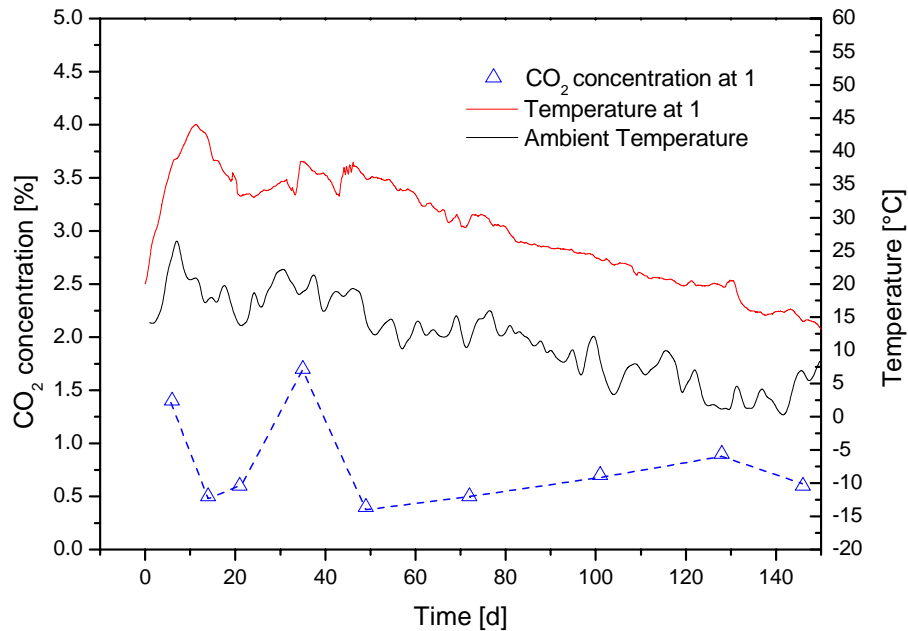
Restriktionsspaltung

Elektrophorese

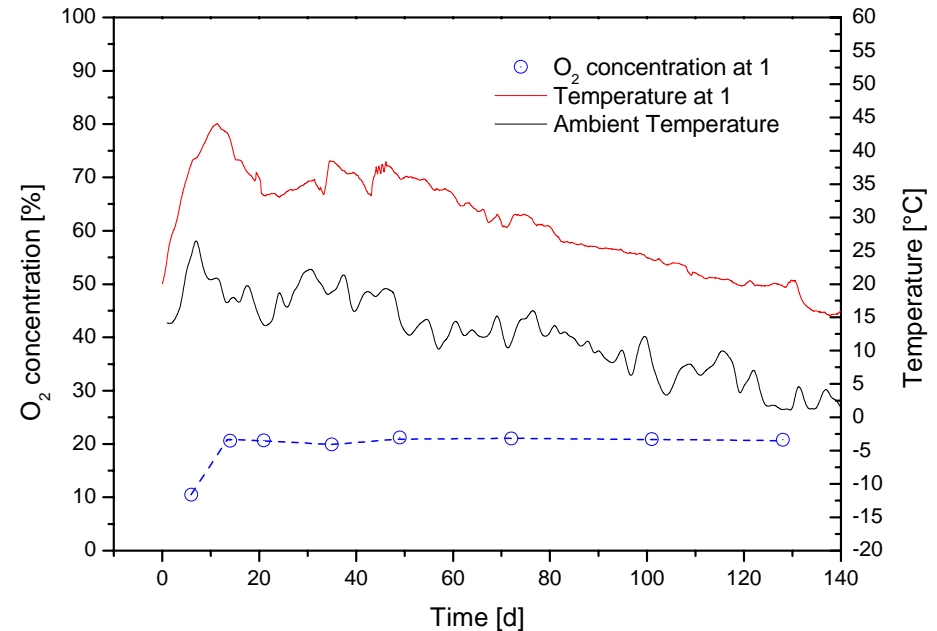
Multivariate Analyse

T-RFLP-Analyse

Ergebnisse Gas- und Temperaturmessung



CO₂-Konzentration und Temperatur
in Abhängigkeit zur Haldentiefe
und Zeit.



O₂-Konzentration und Temperatur
in Abhängigkeit zur Haldentiefe
und Zeit.

Ergebnisse der Probennahme

Tabelle: Wassergehalt, Gesamtstickstoff, -kohlenstoff, -schwefel und wasserstoffkonzentrationen in Massenprozent von Holzhackschnitzeln aus zwei Haldenpositionen über die Lagerungszeit

Zeit	0.5 m innerhalb der Holzhalde						2.0 m innerhalb der Holzhalde					
	Temperatur (° C)	Wassergehalt (in Prozent)	N (in Prozent zur Gesamtmasse)	C (in Prozent zur Gesamtmasse)	S (in Prozent zur Gesamtmasse)	H (in Prozent zur Gesamtmasse)	Temperatur (° C)	Wassergehalt (in Prozent)	N (in Prozent zur Gesamtmasse)	C (in Prozent zur Gesamtmasse)	S (in Prozent zur Gesamtmasse)	H (in Prozent zur Gesamtmasse)
Haldenaufbau		37.2 ± 3.1	0.191 ± 0.01	50.27 ± 0.159	0.089 ± 0.107	5.98 ± 0.012		37.2 ± 3.1	0.191 ± 0.01	50.27 ± 0.159	0.089 ± 0.107	5.98 ± 0.001
105 Tage nach Aufbau	11.7	60.2 ± 2.8	0.229 ± 0.02	49.11 ± 0.860	0.107 ± 0.01	5.92 ± 0.126	13.8	22.96 ± 3.1	0.184 ± 0.021	51.03 ± 0.159	0.259 ± 0.114	5.60 ± 0.126
140 Tage nach Aufbau	4.8	59.4 ± 3.3	0.420 ± 0.05	49.8 ± 2.046	0.102 ± 0.01	5.30 ± 0.234	6.1	24.46 ± 3.7	0.324 ± 0.054	51.08 ± 0.260	0.069 ± 0.008	6.00 ± 0.066
154 Tage nach Aufbau	6.7	53.9 ± 2.3	0.477 ± 0.03	48.75 ± 0.319	0.954 ± 0.01	5.46 ± 0.437	9.4	28.26 ± 6.0	0.369 ± 0.007	51.63 ± 0.490	0.084 ± 0.005	6.02 ± 0.093
330 Tage nach Aufbau	20.5	52.1 ± 5.3	0.422 ± 0.05	50.68 ± 1.612	0.1 ± 0.210	6.00 ± 0.152	23.3	23.95 ± 3.6	0.393 ± 0.03	51.30 ± 0.721	0.138 ± 0.06	6.00 ± 0.109

- Entnahmetemperatur war bei 2.0 m stets erhöht.
- Wassergehalt der Holzhackschnitzel war bei 0.5 m stets erhöht.
- Gesamtstickstoff der Holzhackschnitzel war bei 0.5 m stets erhöht.

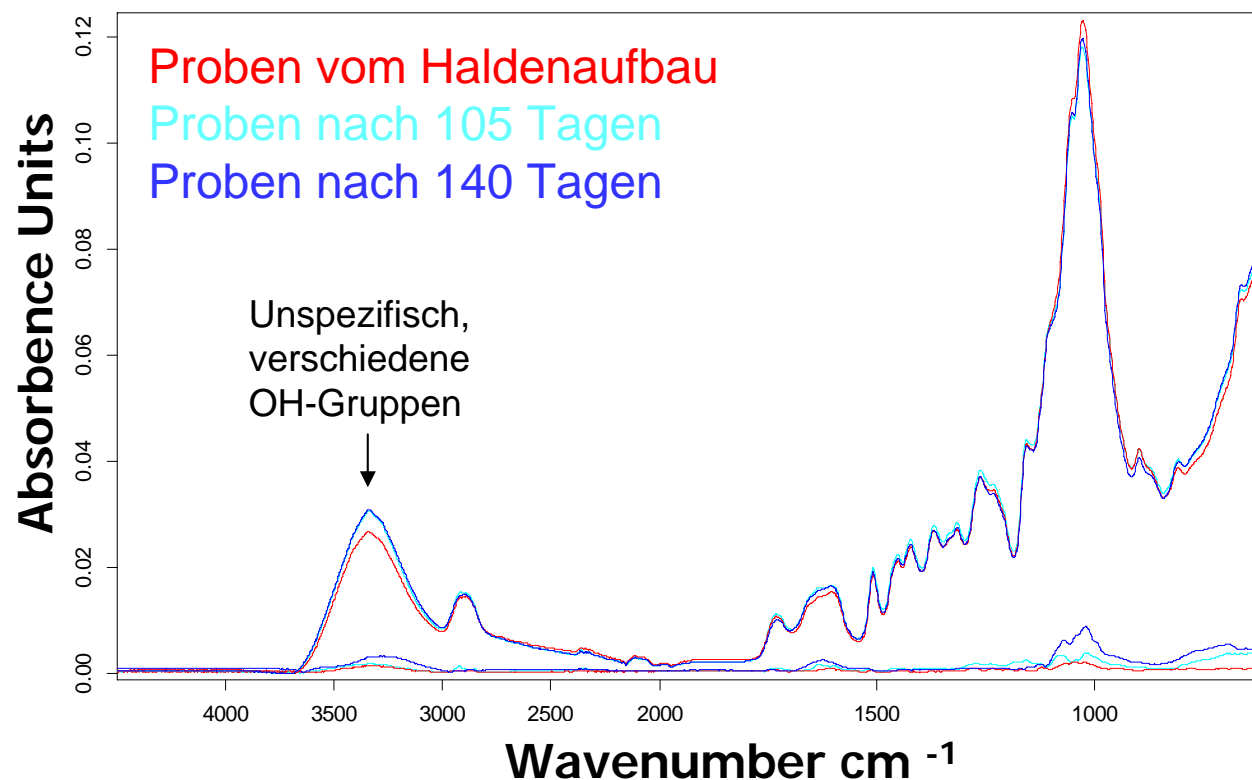
Ergebnisse der Probennahme

Tabelle: Wassergehalt, Gesamtstickstoff, -kohlenstoff, -schwefel und wasserstoffkonzentrationen in Massenprozent von Holzhackschnitzeln aus zwei Haldenpositionen über die Lagerungszeit

Zeit	0.5 m innerhalb der Holzhalde						2.0 m innerhalb der Holzhalde					
	Temperatur (° C)	Wassergehalt (in Prozent)	N (in Prozent zur Gesamtmasse)	C (in Prozent zur Gesamtmasse)	S (in Prozent zur Gesamtmasse)	H (in Prozent zur Gesamtmasse)	Temperatur (° C)	Wassergehalt (in Prozent)	N (in Prozent zur Gesamtmasse)	C (in Prozent zur Gesamtmasse)	S (in Prozent zur Gesamtmasse)	H (in Prozent zur Gesamtmasse)
Haldenaufbau		37.2 ± 3.1	0.191 ± 0.01	50.27 ± 0.159	0.089 ± 0.107	5.98 ± 0.012		37.2 ± 3.1	0.191 ± 0.01	50.27 ± 0.159	0.089 ± 0.107	5.98 ± 0.001
105 Tage nach Aufbau	11.7	60.2 ± 2.8	0.229 ± 0.02	49.11 ± 0.860	0.107 ± 0.01	5.92 ± 0.126	13.8	22.96 ± 3.1	0.184 ± 0.021	51.03 ± 0.159	0.259 ± 0.114	5.60 ± 0.126
140 Tage nach Aufbau	4.8	59.4 ± 3.3	0.420 ± 0.05	49.8 ± 2.046	0.102 ± 0.01	5.30 ± 0.234	6.1	24.46 ± 3.7	0.324 ± 0.054	51.08 ± 0.260	0.069 ± 0.008	6.00 ± 0.066
154 Tage nach Aufbau	6.7	53.9 ± 2.3	0.477 ± 0.03	48.75 ± 0.319	0.954 ± 0.01	5.46 ± 0.437	9.4	28.26 ± 6.0	0.369 ± 0.007	51.63 ± 0.490	0.084 ± 0.005	6.02 ± 0.093
330 Tage nach Aufbau	20.5	52.1 ± 5.3	0.422 ± 0.05	50.68 ± 1.612	0.1 ± 0.210	6.00 ± 0.152	23.3	23.95 ± 3.6	0.393 ± 0.03	51.30 ± 0.721	0.138 ± 0.06	6.00 ± 0.109

- Entnahmetemperatur war bei 2.0 m stets erhöht.
- Wassergehalt der Holzhackschnitzel war bei 0.5 m stets erhöht.
- Gesamtstickstoff der Holzhackschnitzel war bei 0.5 m stets erhöht.
- Gesamtkohlenstoff und –wasserstoff nahmen bei den Holzhackschnitzeln bei 0.5 m ab, während diese bei 2.0 m konstant blieben.
- pH-Wert Änderung:
 - 5.2 - Haldenaufbau
 - 5.3 - 0.5 m (330 Tage nach Aufbau)
 - 4.5 - 2.0 m (330 Tage nach Aufbau)



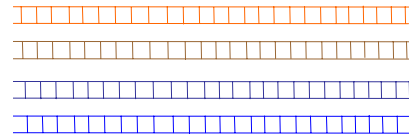
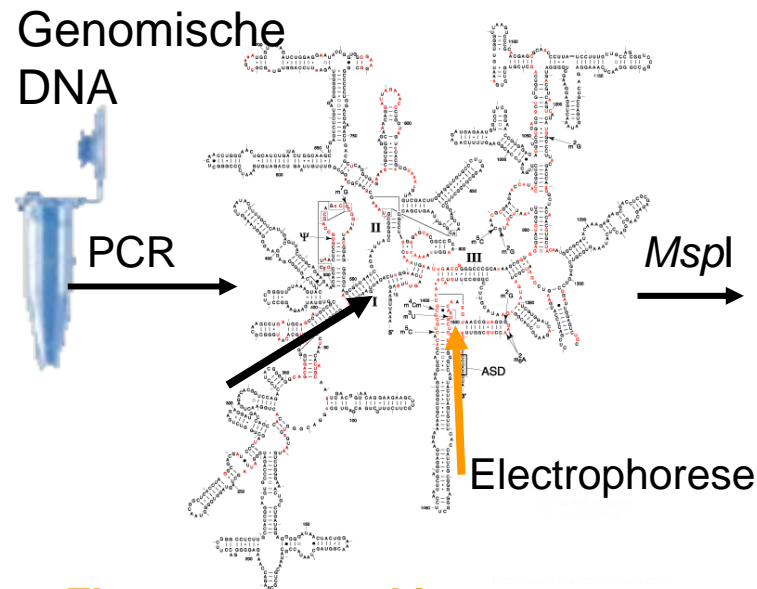


Vektornormierte Spektren

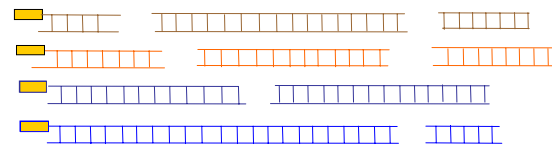
Mittelwert (mit Offsetkorrektur) und Standardabweichung

- Bei vektornormierten Spektren waren Unterschiede zwischen Holzhackschnitzelproben vom Haldenaufbau und nach 4-5 Monaten Lagerung nur bei 3338 cm^{-1} (OH-Gruppen: relativ unspezifisch) erkennbar.
- Ligninabbau (1509 cm^{-1}) war nicht erkennbar.

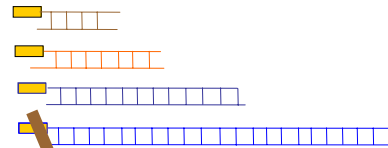
Genomische DNA



PCR Produkte

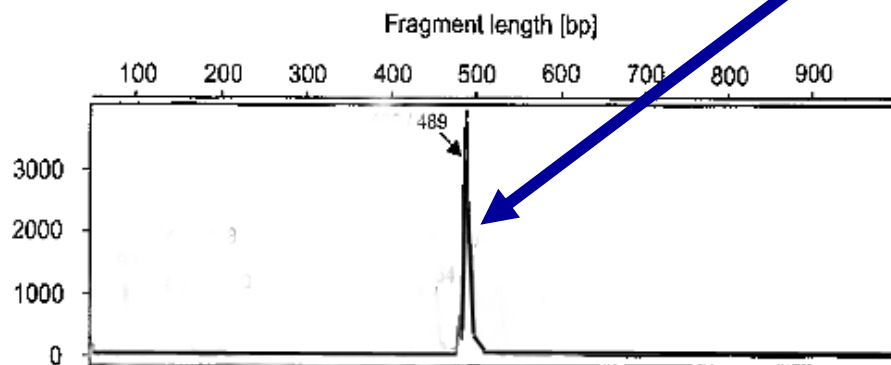


Spaltung der PCR Produkte mit einem Restriktionsenzym

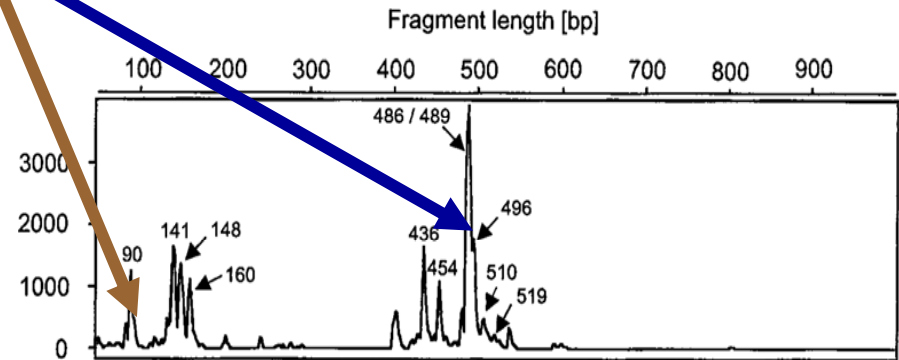


Detektion der Fluoreszenzmarkierten Restriktionsfragmente durch einen automatisierten Sequenzierer

Fluoreszenzmarkierter Vorwärtsprimer

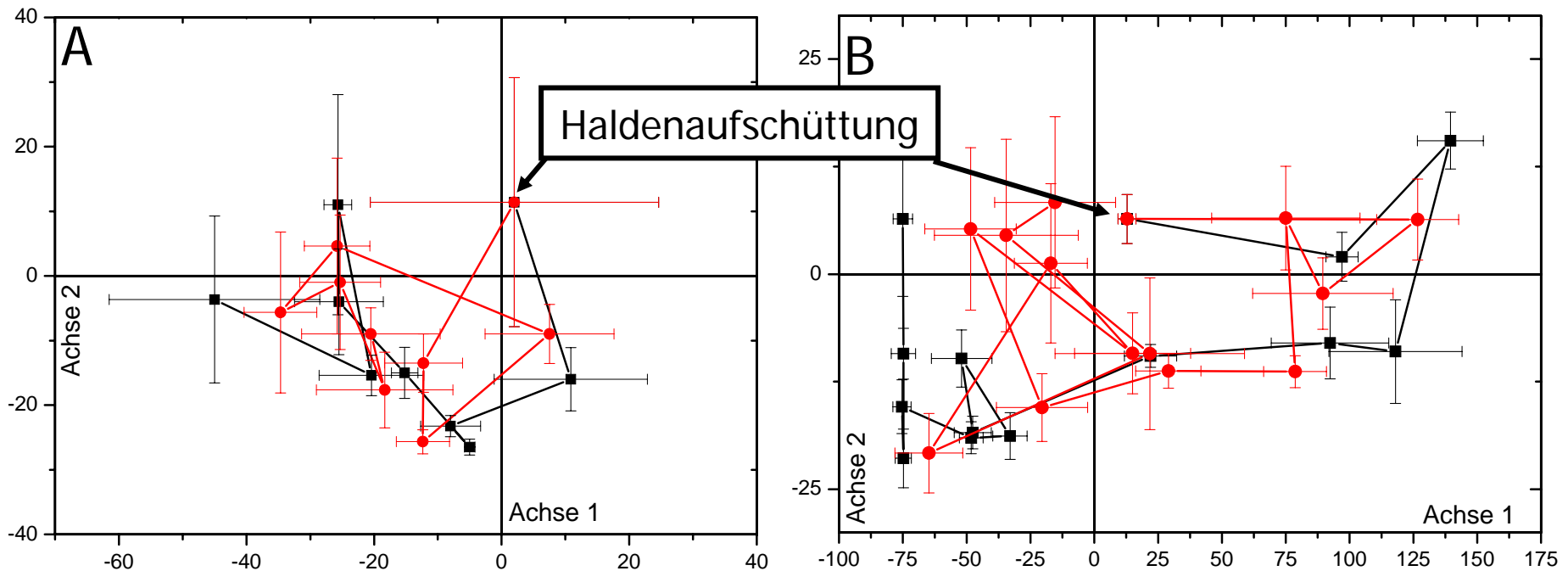


T-RFLP Profil einer Reinkultur



und einer Umweltprobe

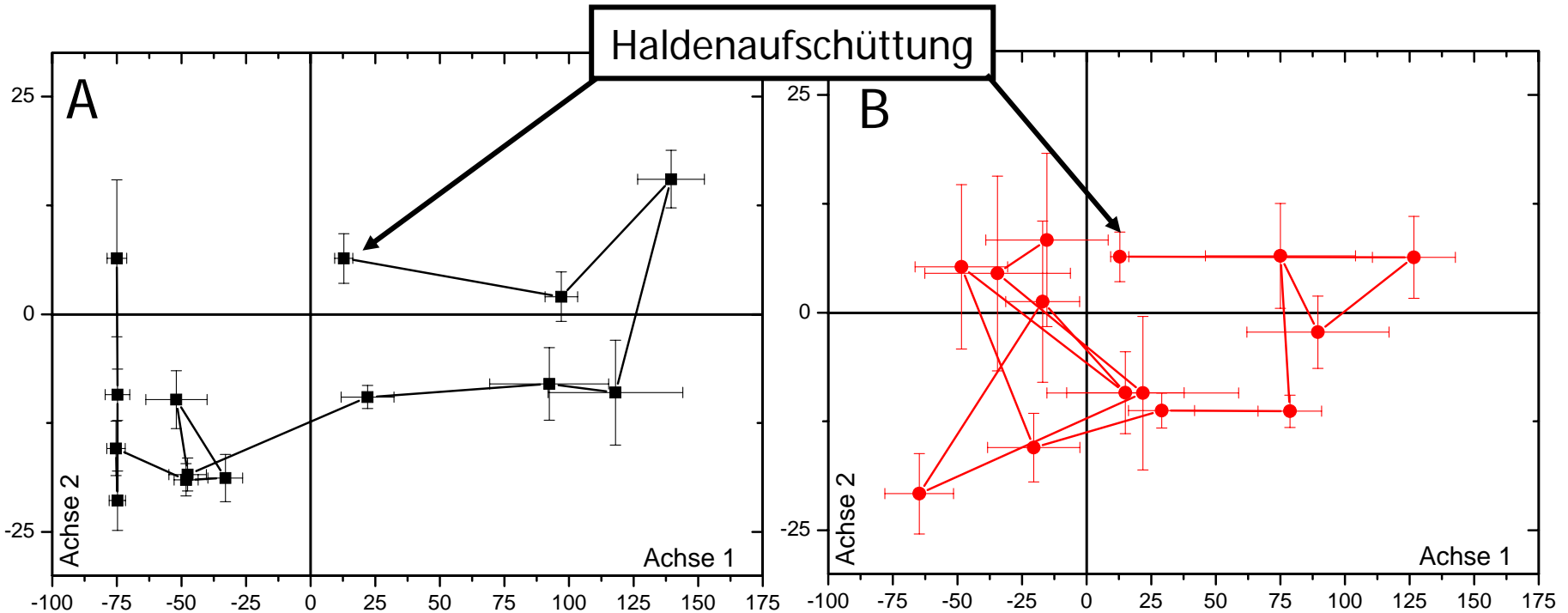
Untersuchung der pilzlichen und bakteriellen Lebensgemeinschaften



Korrespondenzanalyse der T-RFLP Profile der pilzlichen (A) und bakteriellen Lebensgemeinschaften (B) von zwei Tiefen (0.5m-schwarz und 2.0 m-rot) über die Haldenlagerungsdauer.

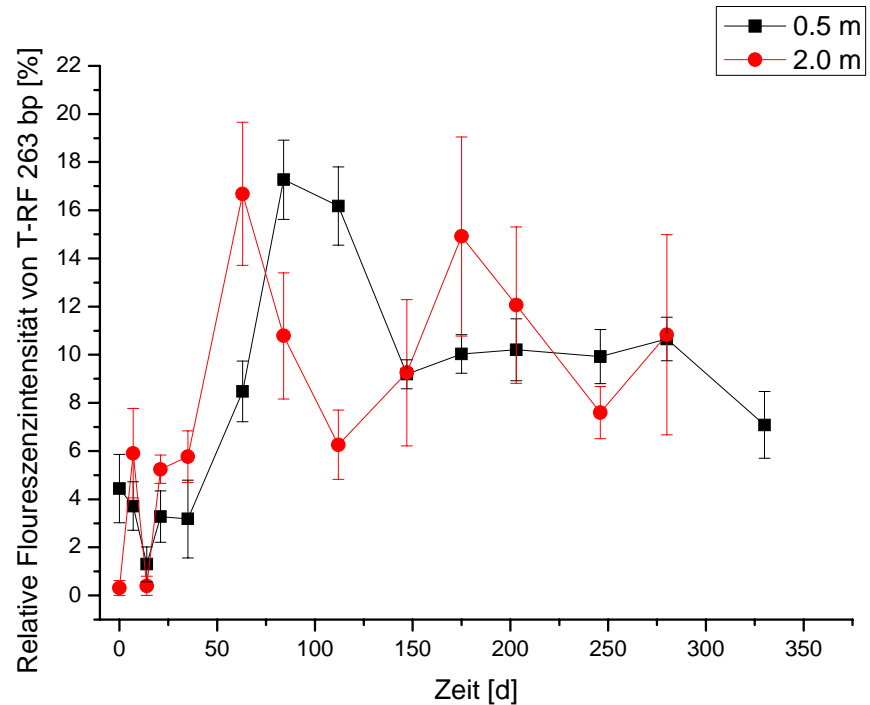
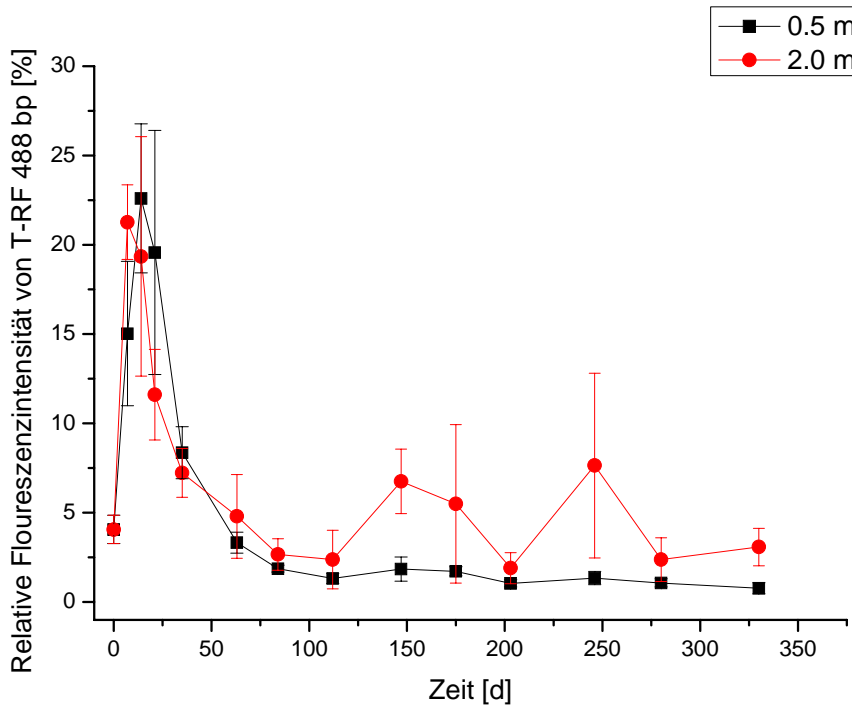
Die zeitliche Abfolge der Gemeinschaftsprofile ist durch die Haldenaufschüttung gekennzeichnet. Die Werte sind Mittelwerte von mind. 3 biologischen Replikaten ± 1 Standardfehler.

Untersuchung der pilzlichen und bakteriellen Lebensgemeinschaften



Korrespondenzanalyse der T-RFLP Profile der bakteriellen Lebensgemeinschaften von zwei Tiefen (A: 0.5m-schwarz und B: 2.0 m-rot) über die Haldenlagerungsdauer.

Die zeitliche Abfolge der Gemeinschaftsprofile ist durch die Haldenaufschüttung gekennzeichnet. Die Werte sind Mittelwerte von mind. 3 biologischen Replikaten ± 1 Standardfehler.



Pseudomonas (Gamma-Proteobacteria)

- Vertreter der Gattung *Pseudomonas* sind bekannt, Holzbestandteile wie Zucker, Aminosäuren und Proteine aber auch Zellulose schnell abbauen zu können.
- Wenige *Pseudomonas*-Stämme sind zudem als Ligninabbauer in Nadelholz-Holz hackschnitzeln bekannt (Yang et al., 2007).
- Thermolabil < 40 °C

Acidobacteria

- Nur wenige Vertreter des Phylums Acidobacteria sind bisher isoliert und charakterisiert worden.
- Acidobacteria sind weltweit in vielen Habitaten verbreitet und einige Vertreter können z. B. Methan unter aeroben Bedingungen als Kohlenstoffquelle verwenden.
- Wahrscheinlich thermolabil

Frühe Phase wurde charakterisiert durch:

Ascomyceten

- Botryosphaeriales - *Sphaeorpsis*
- Helotiales - *Phialophora*
- Sordariomycetes - *Rhodoveronaea*

Basidiomyceten

- Polyporales - *Poria*
- Trechisporales - *Sistotremastrum*

Späte Phase wurde charakterisiert durch:

Ascomyceten

- Chaetothyriomycetes - *Hormonema*
- Capnodiales – *Cladosporium* / *Mycosphaerella*
- Eurotiales – *Aspergillus*

Deuteromyceten

- Hypocreales – *Trichoderma* / *Fusarium*

Basidiomyceten

- Microbotryomycetes - *Rhodotorula*

- Sequenzergebnisse zeigten zwischen früher und später Phase unterschiedliche Vertreter der pilzlichen und bakteriellen Lebensgemeinschaften.
- Die bakteriellen Lebensgemeinschaften waren signifikant ($p < 0.001$) durch die Haldenlagerungsdauer beeinflusst worden.
- Räumliche Unterschiede zwischen 0.5 und 2.0 m in der Halde konnten sowohl für die bakterielle als auch für die pilzlichen Lebensgemeinschaften innerhalb der ersten 5 Wochen der Lagerung aufgelöst werden.
- Mit zunehmender Haldenlagerungsdauer wurden die pilzlichen und bakteriellen Lebensgemeinschaften einander ähnlicher.

Danksagung



Dr. Fabio Ferrero und Dr. Marcus Malow von der BAM-Fachgruppe II.2 „ Reaktionsfähige Stoffe und Stoffsysteme“



Dr. Annette Naumann; Abteilung für Molekulare Holzbiotechnologie (Prof. Dr. U. Kües);
Institut für Forstbotanik, Georg-August-Universität Göttingen

Vielen Dank für die Aufmerksamkeit !