

Schlussbericht

zum Verbundvorhaben

Thema:

Biogas-Messprogramm III - Teil 2 „Systemmikrobiologie“

Zuwendungsempfänger:

**Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V.
Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg**

Förderkennzeichen:

22403915, 22404015, 22404115

Laufzeit:

01.12.2015 bis 30.11.2019

Monat der Erstellung:

03/2020

Monat der Veröffentlichung:

07/2020

Gefördert durch:



**Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft**

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

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

bearbeitet durch:

Dr. Susanne Theuerl (Verbundkoordination), Dipl.-Ing. Johanna Klang

Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB)
Abt. Bioverfahrenstechnik
Max-Eyth-Allee 100
14469 Potsdam
Tel.: +049 (0)331-5699-900
Email: stheuerl@atb-potsdam.de

M. Sc. Julia Hassa, M. Sc. Johanna Nelkner, Dr. Andreas Schlüter, Prof. Dr. Alfred Pühler

Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie (CeBiTec)
Genomforschung Industrieller Mikroorganismen
Universitätsstraße 27
33615 Bielefeld
Tel.: +49 (0)521-106-8758
Email: aschluet@cebitec.uni-bielefeld.de

Dr. Robert Heyer, Dr. Dirk Benndorf, Prof. Dr. Udo Reichl

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (OvGU)
Institut für Verfahrenstechnik, Lehrstuhl für Bioprozesstechnik
Universitätsplatz 2
39106 Magdeburg
Tel: +49 (0)391-67-52-160
Email: benndorf@mpi-magdeburg.mpg.de

Inhalt

I.	Ziele	4
I.1	Aufgabenstellung	4
I.1.1	Wissenschaftliche Zielstellung	4
I.1.2	Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	4
I.1.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	6
I.2	Stand der Technik	6
I.2.1	Forschungsbedarf und Prozessgrundlagen	6
I.2.2	Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität	9
I.3	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	11
II.	Ergebnisse	12
II.1	Erzielte Ergebnisse	12
II.1.1	Projektstruktur	12
II.1.2	Projektteil 1 „Inventarisierung“	12
II.1.2.1	Auswahl und Beprobung der untersuchten Biogasanlagen	12
II.1.2.2	Verfahrensspezifischen Anlagendaten und chemischen Analysedaten	14
II.1.2.3	Hochdurchsatzsequenzierung des Gens der 16S rRNA	16
II.1.2.4	Analyse des mikrobiellen Metaproteoms	21
II.1.2.5	Vergleichende Datenauswertung	28
II.1.3	Projektteil 2 „Detailanalyse“	32
II.1.3.1	Auswahl, Beprobung und Analyse von zehn ausgewählten Biogasanlagen	32
II.1.3.2	Ermittlung lokaler Strukturen innerhalb eines Fermenters	32
II.1.3.3	Ermittlung der zeitlich-räumlichen Variationen im jahreszeitlichen Verlauf und/oder über alle Prozessstufen einer Anlage	34
II.1.3.4	Überraschende Einblicke in eine zweistufige Anlage	46
II.1.3.5	Metagenom- und Metaproteomanalysen	50
II.1.3.6	Isolierung, Kultivierung, Charakterisierung von anaeroben Mikroorganismen	61
II.2	Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	63
II.3	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	63
II.4	Verwertung	64
II.5	Erkenntnisse von Dritten	64
II.6	Veröffentlichungen	65
II.6.1	Publikationen	65
II.6.2	Tagungsbeiträge	66
Referenzen		67
ANHANG I		75
Steckbrief - Teilvorhaben 1 (ATB)		75
Steckbrief - Teilvorhaben 2 (CeBiTec)		76
Steckbrief - Teilvorhaben 3 (OvGU)		77
ANHANG II		78

SCHLUSSBERICHT

I. Ziele

I.1 Aufgabenstellung

I.1.1 Wissenschaftliche Zielstellung

Eine repräsentative Anzahl der in Deutschland betriebenen landwirtschaftlichen Biogasanlagen wurde bereits im Rahmen der ersten beiden Biogas-Messprogramme systematisch untersucht, um Faktoren für einen effizienten Anlagenbetrieb zu erfassen (FNR 2005¹, 2009²). Schwerpunkte lagen dabei auf der Ermittlung der Energieeffizienz, des Leistungsvermögens sowie der Wirtschaftlichkeit der untersuchten Biogasanlagen. Im Rahmen des dritten Biogas-Messprogramms (BMP III) wurden diese Bewertungsaspekte (bearbeitet durch die Verbundpartner von BMP III – Teil 1, siehe Schlussbericht) durch eine systematische Erfassung der in Biogasanlagen vorkommenden Mikrobiome erweitert (bearbeitet durch die Verbundprojektpartner BMP III – Teil 2).

Biogasanlagen sind ein sensibles technisch-biologisches System, in dem eine komplex interagierende Gemeinschaft verschiedenster Mikroorganismen anaerob abbaubare Biomasse zu methanhaltigem Biogas umsetzt. Das Biogas-Mikrobiom besteht aus hydrolytischen und fermentativen Bakterien, methanogenen Archaeen, Viren, Pilzen und Protisten (Calusinska et al. 2016, Castellano-Hinojosa et al. 2018, Dollhofer et al. 2017, Heyer et al. 2019a, Schnürer et al. 2016, Zhang et al. 2017). Nach aktuellem Kenntnisstand sind ungefähr 2.100 ± 650 verschiedene Bakterien- und Archaeenarten an der Produktion von Biogas beteiligt. Weniger als 3 % der erfassten Arten sind Generalisten, die unter den verschiedensten Bedingungen existieren können, daher in den meisten Biogasanlagen vorkommen und dort hinsichtlich ihrer relativen Individuenanzahl (Abundanz) mit 70-80 % den größten Teil der Gemeinschaft ausmachen (Calusinska et al. 2018, Theuerl et al. 2018). Mehr als 80 % der erfassten Arten hingegen sind Spezialisten, die bestimmte ökologische Nischen besetzen, daher nur mit geringer Häufigkeit (3-8 %) vorkommen und oft fermenter-/anlagenspezifisch sind. Demzufolge bildet jeder Biogasfermenter sein eigenes Mikrobiom aus (Calusinska et al. 2018, Mei et al. 2017, Theuerl et al. 2018), das durch seine taxonomische, funktionelle und ökologische Diversität charakterisiert ist. Da vermutlich jedes Biogas-Mikrobiom, also jede Biogasanlage, unterschiedlich auf Managementmaßnahmen der Anlagenbetreiber (z.B. Variationen in der Einsatzstoffzufuhr oder der Prozessführung) reagiert, ist es von großer Bedeutung, das Verständnis, wie sich diese Reaktionen auf die Stabilität und Effizienz des Prozesses auswirken, zu vertiefen. Für ein wissenschaftliches Mikrobiom-Management müssen die am Prozess beteiligten Mikroorganismen identifiziert und ihre Stoffwechselfunktionen und tatsächlich realisierten Funktionen und Prozesse sowie die regulierenden ökologischen Mechanismen aufgeklärt werden (Bouchez et al. 2016, Castellano-Hinojosa et al. 2018, Schnürer 2016, Theuerl et al. 2019a, Zhang et al. 2019).

Ziel des Verbundprojektes „Biogas-Messprogramms III - Teil 2 Systemmikrobiologie“ war daher die Erfassung der mikrobiellen Diversität in Biogasanlagen. Dabei sollte der Einfluss von Anlagen- und Prozessparametern auf die strukturelle und funktionelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften aufgeklärt und der Einfluss der mikrobiellen Gemeinschaften auf die Prozesseffizienz ermittelt werden. Dies ermöglicht eine optimierte Gestaltung des Prozesses unter Berücksichtigung der Potenziale und vor allem der Grenzen der Leistungsfähigkeit der vorkommenden Mikrobiome.

I.1.2 Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Forschungsprojekt wurde als Verbundvorhaben am Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB) in der Abteilung Bioverfahrenstechnik, dem Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld sowie dem Institut für Verfahrenstechnik (Lehrstuhl für Bioprozesstechnik) der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt.

Die Kernkompetenz der Abteilung Bioverfahrenstechnik (ATB) ist im Bereich der anwendungsorientierten Grundlagenforschung zu Biokonversionsprozessen angesiedelt. Die Forschung zielt auf die Entwicklung von neuen Technologien und Managementstrategien für bioökonomische Produktionssysteme zur stofflichen und energetischen Nutzung von Biomassen, insbesondere von

¹ Ergebnisse des Biogas-Messprogramms. Hrsg. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Hofplatz 1, 18276 Gülzow, mit Förderung des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (FKZ 22017900).

² Biogas-Messprogramm II – 61 Biogasanlagen im Vergleich. Hrsg. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Hofplatz 1, 18276 Gülzow, mit Förderung des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (FKZ 22003405).

Reststoffen. Die Abteilung Bioverfahrenstechnik verfügt über langjährige Erfahrungen im Bereich der Biogasforschung, speziell auch zur Aufklärung der mikrobiellen Diversität. In einem eigenen Technikum können in etablierten und neu entwickelten Anlagenkonzepten Modellfermentations-experimente durchgeführt werden. Darüber hinaus verfügt die Abteilung über moderne mikro- und molekularbiologische Labore. Das Methodenspektrum reicht von der Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von (an-)aeroben Mikroorganismen, über die Erfassung komplexer mikrobieller Gemeinschaften mittels qPCR (quantitative PCR), TRFLP (Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus), DGGE (Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese) und Sequenzierung bis hin zur Anwendung multivariater Statistik mit dem Ziel, neue Erkenntnisse über die Fähigkeiten, die Stoffwechselleistungen sowie die Ökosystemfunktionen einzelner Mikroorganismen, Gruppen von Mikroorganismen oder ganzer Mikrobiome zu generieren.

Das Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) ist eine fakultätsübergreifende zentrale wissenschaftliche Einrichtung der Universität Bielefeld. Sein internationales Renommee fußt auf der interdisziplinären Zusammenarbeit von Wissenschaftler*innen aus den Gebieten Bioinformatik, Synthetische Biologie, Biokatalyse, Green Chemistry, Systembiologie, Metabolic Engineering und Fermentationstechnik. Das CeBiTec bündelt die biotechnologischen Aktivitäten und Forschungsprojekte der Universität, fördert die Vernetzung von Forschungsansätzen und -technologien und trägt zur Entwicklung innovativer Projekte in zwei eng miteinander verknüpften Hauptforschungsbereichen bei. Im Forschungsfeld 1 `Large Scale Genomics and Big Data Bioinformatics´ werden durch die Durchführung von Genomsequenzierungsprojekten verschiedenster biologischer Systeme, sowie durch die daraus resultierende strukturelle und funktionelle Entschlüsselung von (Meta-)Genomen/(Meta-)Transkriptomen sowie durch die Entwicklung, Optimierung und Anwendung bioinformatischer Algorithmen und Analysemethoden die Grundlagen für ein vertieftes Wissen biologisch-technologischer Prozesse geschaffen, woraus sich Optimierungsstrategien ableiten lassen. Im Forschungsfeld 2 `Metabolic Engineering of Unicellular Systems and Bioproduction´ werden Strategien für die Konstruktion maßgeschneiderter Zellfabriken erarbeitet. Diese Arbeiten beinhalten die Etablierung gentechnologischer Werkzeuge im Zielorganismus, das Metabolic Engineering von Bioproduktionsstämmen, sowie die Etablierung biokatalytischer Synthesewege und ihre Umsetzung für die Bioproduktion bis zum Proof of concept (Fermentationen im Labormaßstab, Biokatalysen, Substrat- und Produktanalytik). Für die Forschungsprojekte der CeBiTec-Mitglieder spielen die drei Technologieplattformen Bioinformatik, Genomik sowie Fermentation & Bioenergie, die mit modernster instrumenteller Infrastruktur und entsprechendem Know-How ausgestattet sind, eine wesentliche / unverzichtbare Rolle. Momentan gehören dem CeBiTec 15 Arbeitsgruppen aus 3 Fakultäten an, die insgesamt ca. 160 Mitarbeiter*innen umfassen. Darüber hinaus ist die Geschäftsstelle, sowie ein Teil der Cloud-Infrastruktur des „Deutschen Netzwerks für Bioinformatik Infrastruktur“ (de.NBI) am CeBiTec angesiedelt.

Am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg spielt die Gestaltung, Prozessführung sowie der Modellierung biologisch-technologischer Verfahren auf Basis einer ganzheitlichen und systemorientierten Betrachtung der biologischen Grundlagen und der Dynamik der jeweiligen Mikro- und Makroprozesse eine große Rolle. Mit Hilfe der Metaproteomanalyse wird z.B. die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften aus Biogasanlagen auf struktureller und insbesondere auf funktioneller Ebene erfasst. Neben der Etablierung leistungsfähiger Methoden (u.a. hoch-auflösende Massenspektrometer (timsToF™, Orbitrap Elite), wird am Lehrstuhl im Rahmen des deutschen Netzwerkes Bioinformatik de.NBI der `MetaProteomAnalyzer´, eine spezifische Software für Metaproteomanalyse, als Service für Wissenschaftler*innen bereitgestellt und kontinuierlich weiterentwickelt. Die gewonnenen Informationen werden genutzt, um die Reaktion von Biogas-Mikrobiomen auf Managementmaßnahmen der Anlagenbetreiber besser zu verstehen und somit die Ausbeute sowie die Produktivität der Prozesse zu optimieren.

Im Rahmen zweier Forschungsvorhaben, die dem Biogas-Messprogramm III – Teil 2 „Systemmikrobiologie“ vorausgingen, wurden jeweils zehn landwirtschaftliche Biogasanlagen hinsichtlich der Struktur und Funktion der vorkommenden mikrobiellen Lebensgemeinschaften untersucht (FKZ: 22011804³, FKZ: 22010711⁴). In diesen Projekten konnten in erster Linie grundlegende methodische Erfahrungen zur Erfassung der mikrobiellen Diversität gesammelt werden. Aufgrund der begrenzten Anzahl untersuchter Biogasanlage konnten jedoch nur begrenzt Erkenntnisse zum Zusammenhang zwischen der Prozessführung und der mikrobiellen Diversität gewonnen werden. Diese beiden Projekte lieferten

³ Monitoring der methanbildenden Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen im ländlichen Raum: Analyse des Ist-Zustandes und Entwicklung eines quantitativen Nachweissystems. Bornimer Agrartechnische Berichte, Heft 67, 2009.

⁴ Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen – Ermittlung der mikrobiellen Diversität sowie von hauptsächlichen verfahrenstechnischen Einflussfaktoren auf die Mikroflora. Bornimer Agrartechnische Berichte, Heft 84, 2014.

jedoch wichtige Informationen, um zukünftig, also im Rahmen des hier vorgestellten Projektes, nach wiederkehrenden Mustern in den mikrobiellen Lebensgemeinschaften zu suchen und diese mit den erfassten Prozessparametern erkenntnisorientiert abzugleichen.

I.1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des dritten bundesweiten Biogas-Messprogramms wurden insgesamt 61 landwirtschaftliche Biogasanlagen (siehe Schlussbericht BMP III – Teil 1) untersucht, davon 46 Biogasanlagen im Rahmen von BMP III – Teil 2 „Systemmikrobiologie“. Grundsätzlich galt für beide Verbundvorhaben, dass eine repräsentative Breite der in Deutschland betriebenen Biogasanlagen untersucht werden sollte. Darüber hinaus sollten (soweit möglich) stabil laufende und wirtschaftlich effiziente Anlagen mit einer möglichst konstanten Zusammensetzung der Einsatzstoffe betrachtet werden. Die Beprobung der Biogasanlagen erfolgte durch die Partner von BMP III – Teil 1. Die Proben wurden nach Rücksprache gesammelt ans ATB versandt, wo sie zunächst aliquotiert (jeweils 50 ml für die DNA-Analytik, Proteinanalytik, chemische Analytik und Rückstellprobe) und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert wurden. Probennahmen, die für die „Isolierung/Kultivierung“ vorgesehen waren, fanden mit Eigenbeteiligung von Mitarbeiter*innen des ATB statt und wurden möglichst zeitnah nach der Probennahme für alle weiteren Analysen im Labor aufbereitet.

Zusätzlich zu den Biogasanlagen, die zusammen mit BMP III – Teil 1 betrachtet wurden, wurden alle Biogasanlagen, die im Rahmen des BMEL/FNR-Forschungsvorhabens BIOGAS-LIVE (FKZ: 22013913) unter Beobachtung standen, ebenfalls einer Inventarisierung der mikrobiellen Diversität unterzogen.

Das Verbundvorhaben BMP III – Teil 2 gliederte sich in zwei Projektteile: Im ersten Projektteil erfolgte eine Inventarisierung der mikrobiellen Diversität von insgesamt 95 Fermentern von 60 Biogasanlagen. Im zweiten Projektteil erfolgte eine detaillierte Analyse von zwölf ausgewählten Biogasanlagen zur zeitlich-räumlichen Variation im jahreszeitlichen Verlauf bzw. zur lokalen Zonierung im Fermenter oder über alle Prozessstufen einer Biogasanlage. Darüber hinaus wurden interessante Anlagen einer tiefen metagenomischen und tiefen metaproteomischen Auswertung unterzogen.

I.2 Stand der Technik

I.2.1 Forschungsbedarf und Prozessgrundlagen

Seit der Einführung des Gesetzes für den Ausbau erneuerbarer Energien (Erneuerbare-Energien-Gesetz, EEG) im Jahr 2000 stieg die Anzahl an Biogasanlagen von 1050 um mehr als das 9-fache auf heute fast 9500 Anlagen an (Daniel-Gromke et al. 2018). Bezogen auf die gesamte Bruttostromerzeugung stieg der Anteil aus erneuerbaren Energien von 6,3 % im Jahr 2000 auf heute fast 35 %, speziell aus Biogas von 0,1 % (2000) auf 4,5 % (heute) (BMWE 2019⁵). Die heute in Deutschland betriebenen Biogasanlagen, wurden in den letzten zwei Jahrzehnten überwiegend mit Energiepflanzen (48,9 %) und Wirtschaftsdüngern (44,5 %) betrieben (Abbildung 1A; Daniel-Gromke et al. 2018). Am häufigsten werden Silagen aus nachwachsenden Rohstoffen wie beispielsweise Maissilage (69 %, Abbildung 1B) und Wirtschaftsdünger wie Rindergülle/-mist (81 %, Abbildung 1C) eingesetzt. Landwirtschaftliche Reststoffe (z.B. Festmist, Stroh, Blühstreifen, Zwischenfrüchte), Landschaftspflegegut (Grünschnitt, Laub) sowie biogene Siedlungs- und Industrieabfälle werden derzeit nur in geringen Mengen für die Produktion von Biogas verwendet (Abbildung 1).

Aufgrund von aktuellen politischen, wirtschaftlichen und gesellschaftlichen Veränderungen steht die Biogas-Branche an einem Wendepunkt, der mit vielen Herausforderungen verbunden ist (Theuerl et al. 2019a). Zukünftig müssen Biogasanlagen in der Lage sein, aus einem viel breiteren Spektrum an Einsatzstoffen flexibel Strom und Wärme sowie hochwertige Dünger zu erzeugen, wobei landwirtschaftlichen Reststoffen, Landschaftspflegegut sowie biogenen Siedlungs- und Industrieabfällen eine besondere Bedeutung zukommen wird (Theuerl et al. 2019a). Diese sind jedoch chemisch sehr heterogen, zeitlich variabel verfügbar und fallen dezentral oft nur in kleinen Mengen an. Der Übergang zu einer reststoffbasierten Biogasproduktion als integraler Bestandteil einer biobasierten Kreislaufwirtschaft (Bioökonomie) ist mit hohen Anforderungen an die Anlagentechnik und vor allem die Steuerung des komplexen Prozesses verbunden (Theuerl et al. 2019a).

⁵ Bundesamt für Wirtschaft und Energie (2019): Zeitreihen zur Entwicklung der erneuerbaren Energien in Deutschland. Umweltbundesamt, Fachgebiet V 1.5 Energiedaten, Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien Statistik (AGEE Stat).



Abbildung 1: Verwendete Einsatzstoffe (massebezogen) zur Produktion von Biogas in Deutschland (A), davon anteilig nachwachsende Rohstoffe (B) und Wirtschaftsdünger (C). (Quelle: Mediathek der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR), <https://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten.html>).

Unabhängig von den zukünftigen Entwicklungen sind die mikrobiellen Gemeinschaften schon heute häufig variierenden Prozessbedingungen ausgesetzt, während ein insgesamt stabiler Abbauprozess mit geringer Störanfälligkeit gewährleistet sein muss (Theuerl et al. 2019b). Biogasfermenter/-anlagen sind ein sensibles technisch-biologisches System, in dem eine komplexe interagierende mikrobielle Lebensgemeinschaft anaerob abbaubare Biomasse zu methanhaltigem Biogas umsetzt (Abbildung 2; Angelidaki et al. 2011, Schnürer 2016, Stolze et al. 2015, Theuerl et al. 2019b, Weiland 2010). Die mikrobielle Diversität wird durch die Managementmaßnahmen des Anlagenbetreibers wesentlich beeinflusst, da diese die Lebensbedingungen für die Mikroorganismen bestimmen (Theuerl et al. 2019b).

Die Nährstoffbasis für die Mikroorganismen bilden die Einsatzstoffe, deren chemische Zusammensetzung und physikalischen Eigenschaften (je nach Art, Menge und ggf. Vorbehandlung) die verfügbare Menge an Makro- und Mikronährstoffen festlegen. Die in der Biomasse gespeicherten Polymere (Zellulose, Eiweiße und Fette) werden während der Hydrolyse zunächst in Oligo-, Di- und Monomere gespalten, die während der Acido-/Acetogenese vor allem in organische Säuren sowie Kohlendioxid (CO_2) und Wasserstoff (H_2) umgewandelt werden (Abbildung 2). Im letzten Schritt, der Methanogenese, wird das energiereiche Methan (CH_4) entweder über den acetoklastischen oder den hydro-genotrophen Stoffwechselweg gebildet (Abbildung 2).

Die abiotische Umgebung der Mikroorganismen wird durch die Fermentertechnologie (Rührkessel-, Pfpfenstrom- oder Garagenfermenter, ein- oder mehrphasige Systeme) und den Fermenterbetrieb (Raumbelastung, Verweilzeit oder Temperatur) gebildet. Bei der Gestaltung der abiotischen Umgebung für das Biogas-Mikrobiom ist zu berücksichtigen, dass jede Population (Summe aller Individuen einer Art in einem spezifischen Lebensraum) nicht nur unterschiedliche Optima hinsichtlich ihrer Lebensanforderungen, sondern auch unterschiedliche Toleranzbereiche gegenüber wirkenden Umweltfaktoren aufweisen. Wenn diese Umweltfaktoren bestimmte Schwellenwerte über- oder unterschreiten, können Prozessstörungen auftreten (Theuerl et al. 2019b).

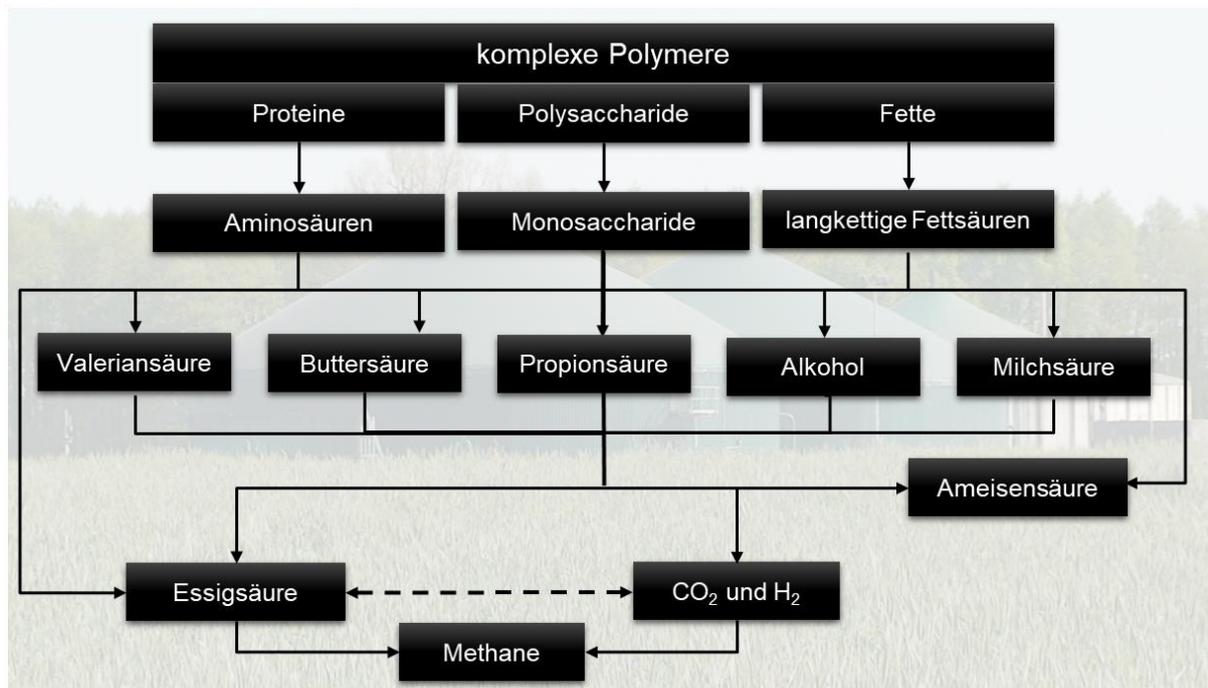


Abbildung 2: Biochemische Prozesskette der Biogasproduktion von der Hydrolyse komplexer Polymere über die Acid-/Acetogenese bis hin zur Methanbildung. Hintergrund Bild der Biogasanlage: A. Prochnow.

Das Biogas-Mikrobiom besteht aus hydrolytischen und fermentativen Bakterien, methanogenen Archaeen, Viren, Pilzen und Protisten (Calusinska et al. 2016, Castellano-Hinojosa et al. 2018, Dollhofer et al. 2017, Heyer et al. 2019a, Schnürer et al. 2016, Zhang et al. 2017). In den vergangenen Jahren gab es mehrere Studien, die sich mit einer vergleichenden Analyse der Mikrobiom-Struktur in stabil-laufenden und wirtschaftlich-effizienten Biogasanlagen im Praxismaßstab befassten (Bremges et al. 2015, Calusinska et al. 2018, De Vrieze et al. 2015, Maus et al. 2016, Sundberg et al. 2013, Stolze et al. 2016, Theuerl et al. 2018, Ziels et al. 2017). In diesen Studien wurden die Mikrobiomstrukturen mit den erfassten verfahrensspezifischen Anlagen- und chemischen Prozessparametern korreliert, wobei sich zeigte, dass die verwendeten Einsatzstoffe, die Prozesstemperatur sowie die Ammonium-/Ammoniakkonzentration wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung einer spezifischen mikrobiellen Gemeinschaft haben. Interessant an der Studie von Calusinska et al. (2018) ist, dass die meisten Individuen des Biogas-Mikrobioms Generalisten sind, die unter verschiedenen Bedingungen existieren können, weshalb sie in den meisten Biogasanlagen vorkommen und hinsichtlich ihres Vorkommens den größten Teil der Gemeinschaft ausmachen. Im Gegensatz dazu sind die meisten Arten Spezialisten, die bestimmte ökologische Nischen besetzen, nur in wenigen Proben nachgewiesen werden und häufig spezifisch für den Fermenter sind. In 20 Biogasanlagen wurde eine Gesamtzahl von ca. 6000 OTUs (engl. operational taxonomic units, vorläufige taxonomische Einheiten) nachgewiesen (Calusinska et al. 2018). Dem sog. Core-Mikrobiom wurden davon nur 2,5 % (etwa 150 OTUs) mit einer mittleren relativen Häufigkeit (Abundanz) von $70,3\% \pm 12,5\%$ (die Generalisten) zugeordnet. Im Gegensatz dazu wurden 84,0 % (etwa 5000 OTUs) nur in einer bestimmten Anzahl von Biogasanlagen gefunden, die $3,5\% \pm 3,8\%$ der relativen Häufigkeit ausmachten (die Spezialisten) (Calusinska et al. 2018). Darüber hinaus finden sich in der Literatur Hinweise, dass spezielle Kombinationen von Mikroorganismen (z. B. Vertreter der bakteriellen Abteilungen *Bacteroidetes* und *Cloacimonetes* in Kombination mit Vertretern der archaeellen Gattung *Methanotherix/Methanosaeta*) einen vermeintlich stabil-laufenden Prozess anzeigen (Theuerl et al. 2018). Trotz intensiver Forschung ist von einem Großteil der beteiligten Mikroorganismen die genaue Funktion im Ökosystem und demzufolge ihr Einfluss auf die Abbaueffizienz und die Reaktorleistung jedoch noch unbekannt (Calusinska et al. 2018, Campanaro et al. 2020, Hassa et al. 2018, Kundu et al. 2017, Maus et al. 2018, Theuerl et al. 2018, Treu et al. 2016, Zhang et al. 2019).

Da jede/r Biogasfermenter/-anlage sein eigenes Mikrobiom ausbildet (Calusinska et al. 2018, Mei et al. 2017, Theuerl et al. 2018), das durch seine taxonomische, funktionelle und ökologische Diversität charakterisiert ist, ist ein vertieftes systemökologisches Verständnis wie Biogas-Mikrobiome auf Managementmaßnahmen (z.B. Einsatzstoffzufuhr, Anlagentechnologie, Prozessführung) reagieren und wie sich diese Reaktionen auf die Stabilität und Effizienz des Prozesses auswirken von großer

Bedeutung. Dies ist eine Voraussetzung für die weitere Prozessoptimierung oder der Entwicklung von Prozessvorhersagemodellen für eine nachhaltige Prozesssteuerung.

1.2.2 Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität

Zur Erfassung der mikrobiellen Diversität (taxonomisch, funktionell und ökologisch) steht ein breites Methodenspektrum zur Verfügung (Abbildung 3).

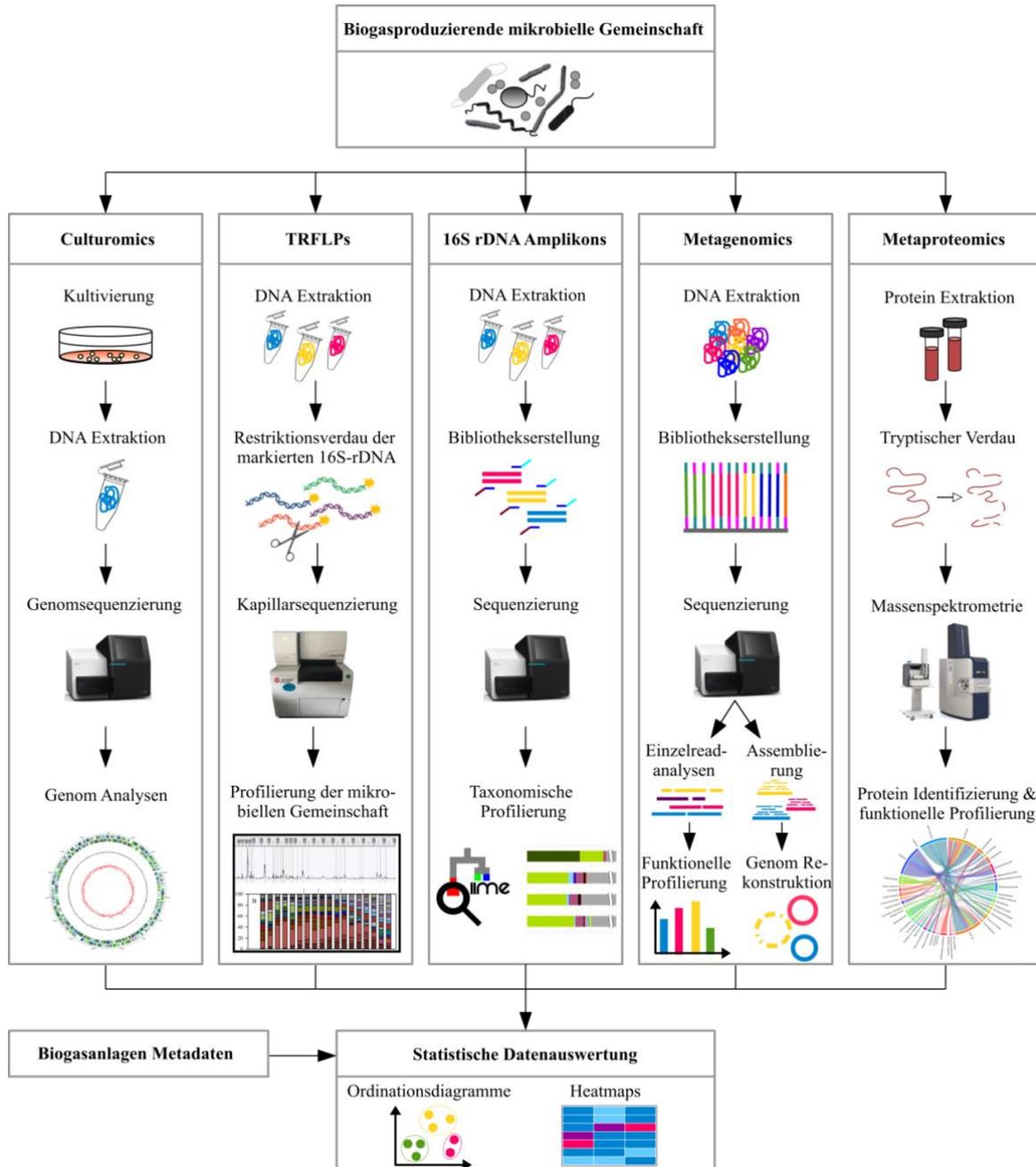


Abbildung 3: Im Rahmen des Verbundprojektes Biogas-Messprogramm III – Teil 2 „Systemmikrobiologie“ angewandte Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität in Biogasanlagen. (TRFLP = terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) (modifiziert nach Theuerl et al. 2019c, Hassa et al. 2018, Heyer et al. 2019b).

Die meisten in Biogasanlagen vorkommenden Mikroorganismenarten sind nur durch ihre 16S rRNA Gensequenzen (oder durch rekonstruierte Genomsequenzen) bekannt; sie sind jedoch größtenteils (noch) nicht kultivierbar (Calusinska et al. 2018, Campanaro et al. 2020, De Vrieze et al. 2015, Hassa et al. 2018, Mei et al. 2017, Ziels et al. 2018). Daher können ihre physiologischen Eigenschaften und realisierten ökologischen Funktionen nicht umfassend beschrieben bzw. nur abgeschätzt werden. Methoden der klassischen Mikrobiologie (Isolierung, Kultivierung sowie physiologische und genetische

Charakterisierung von einzelnen Arten oder Anreicherungskulturen) sind nach wie vor zentraler Bestandteil in der Mikrobiomforschung, da sie essentielle Informationen über spezifische Wachstumsbedingungen (-kinetiken), Substratverwertungspotenziale oder die Reaktion auf variierende Umweltbedingungen durch z.B. Änderung der Nährstoffverfügbarkeit, insbesondere von neuen Arten liefern (Gutleben et al. 2018, Lloyd et al. 2018).

Um die taxonomische Diversität eines Mikrobioms zu erfassen, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei die 16S rRNA Gen-Amplikonsequenzierung die am weitesten verbreitete Methode ist (z. B. Bouchez et al. 2016, Cabezas et al. 2015, De Vrieze et al. 2018, Fricker et al. 2019, Hassa et al. 2018, Maus et al. 2017, Vanwonterghem et al. 2014, Zakrzewski et al. 2012, Zhang et al. 2019). Obwohl diese Methode die Möglichkeit bietet, eine große Anzahl von Proben in Zeitreihen zu untersuchen, verwenden die meisten Studien diese Methode, um verschiedene Lebensräume z.B. verschiedene Biogasfermenter/-anlagen zu vergleichen (De Vrieze et al. 2015, Mei et al. 2017, Ziels et al. 2017). Langzeitstudien sind jedoch in einem dynamischen System wie Biogasanlagen von großer Bedeutung, da sie insbesondere Informationen über die Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen also die Managementmaßnahmen der Anlagenbetreiber liefern (z. B. Calusinska et al. 2018, Faust et al. 2015, Scheffer et al. 2012, Shade et al. 2013, Werner et al. 2011). Einige Studien zeigen, dass Veränderungen nicht zwingend in der relativen Häufigkeit von Vertretern des sog. Core-Mikrobiomes ersichtlich sind, sondern eher in der Variabilität selten vorkommender Taxa (Calusinska et al. 2018, Jousset et al. 2017, Werner et al. 2011). Für Untersuchungen zur zeitlichen Variabilität sind etablierte Methoden wie die TRFLP immer noch von großem Wert, insbesondere in Bezug auf die Auswirkungen sich ändernder abiotischer und biotischer Umweltbedingungen oder hinsichtlich einer Vorhersage, wie mikrobielle Gemeinschaften auf Störungen reagieren könnten (z. B. Alsouleman et al. 2016, Bonk et al. 2018, De Vrieze et al. 2018, Klang 2019, 2020). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die relative Häufigkeit von Vertretern der Abteilung *Cloacimonetes* mehr als 50 Tage vor einer Prozessstörung, bedingt durch zu hohe Ammoniumkonzentrationen, signifikant sinkt (Klang et al. 2019).

Die 16S rRNA Gen-Amplikonsequenzierung ermöglicht eine hochauflösende taxonomische Inventarisierung von Biogas-Mikrobiomen. Um jedoch Einblicke in die genetisch-festgelegten Funktionen eines Mikrobioms zu erhalten, ist die Sequenzierung des gesamten Metagenoms unerlässlich. Die Analyse von Metagenomdatensätzen kann auf zwei Arten erfolgen. Bei der sog. Einzelread-Analyse werden ganze Biogas-Mikrobiome anhand der genetisch-festgelegten Stoffwechsellpotenziale charakterisiert, d.h. einzelnen Sequenzen werden spezifische Funktionen zugeordnet, die dann mit Hilfe der KEGG-Datenbank (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa et al. 1996) zur Rekonstruktion vorkommender Stoffwechselwege genutzt wird. Die Assemblierungs-/Binning-Strategie wird verwendet, um Genome einzelner, insbesondere bisher nichtkultivierbaren Mikroorganismen zu rekonstruieren und anschließend genetisch zu charakterisieren (Hassa et al. 2018). In einer der ersten Studien, die Assemblierungs-/Binning-Strategien verwendeten, um Genome einzelner Mikroorganismen zu rekonstruieren, zeigte sich, dass ein Großteil der am Prozess der Produktion von Biogas beteiligten Mikroorganismen nach wie vor unbekannt ist (Campanaro et al. 2016). Insgesamt wurden in dieser Studie 51 qualitativ-hochwertige Genome (sog. MAGs, metagenom-assembled genomes) identifiziert, von denen kein einziges einer bekannten Art und nur 10 % einer bekannten Gattung zugeordnet werden konnten. In einer der neusten Studien verglichen Campanaro et al. (2020) 134 Metagenom-Datensätze und ermittelten 1635 MAGs, von denen nur 69 einer bekannten Art zugeordnet werden konnten. Diese Studie zeigt, dass bisher nicht kultivierbare und daher nicht charakterisierte Taxa in hohem Maße in Biogasanlagen zu finden sind. Ziel aktueller Studien ist es daher, weitere Metagenomdatensätze auszuwerten, um insbesondere die ökosystemare Bedeutung von bisher nicht oder nur geringfügig charakterisierten Taxa zu erfassen, da diese wichtige Funktionen im Gesamtsystem erfüllen.

Die im vorherigen Abschnitt dargestellte Metagenomsequenzierung liefert wichtige Informationen zum genetisch-festgelegten Potential der vorhandenen mikrobiellen Gemeinschaft; kann jedoch nicht die Frage beantworten, welche Funktionen/Prozesse tatsächlich realisiert sind. Diese Informationen können mit Hilfe von Metaproteomanalysen gewonnen werden. Die Metaproteomanalyse basiert auf der massenspektrometrischen Erfassung von Proteinen (z.B. Enzyme, Strukturproteine) (Heyer et al. 2019b). Die bioinformatische Auswertung erfolgt idealerweise im Abgleich mit Metagenomdatensätzen der gleichen (oder zumindest ähnlicher) Proben, was eine korrekte Zuordnung der erfassten Proteine gewährleistet. Hierfür steht die Software `MetaProteomeAnalyzer` zur Verfügung, die im Rahmen des de.NBI-Netzwerkes kontinuierlich weiterentwickelt wird und durch eine große Leistungsfähigkeit und Nutzerfreundlichkeit gekennzeichnet ist (Muth et al. 2015). Der Mehrwert einer kombinierten Analyse basierend auf genomischen und proteomischen Daten konnte bereits mehrfach gezeigt werden (Ortseifen et al. 2016, Ram et al. 2005, Tanca et al. 2017, Theuerl et al. 2015). So zeigte sich in der Studie von Theuerl et al. (2015), dass Vertreter der Gattung *Methanosarcina*, je nach vorherrschenden Prozessbedingungen (hier schwankenden Ammonium-/Ammoniak-Konzentrationen) zwischen dem

acetoklastischen und hydrogenotrophen Weg der Methanogenese wechseln können. Dies wurde über die Metaproteom-Analysen nachgewiesen. Darüber hinaus wurden in Biogasanlagen Proteine von Bakteriophagen nachgewiesen, über deren Funktion im Gesamtgefüge des Mikrobioms bisher nur spekuliert werden kann (Calusinska et al. 2016, Zhang et al. 2017, Heyer et al. 2019a).

Hauptziel systemökologischer Studien ist es, die Beziehungen zwischen (Gruppen von) biologischen Einheiten (z.B. Taxa (OTUs/MAGs/TRFs) oder Proteinen) und deren Umweltparameter zu validieren, um signifikante Muster zu identifizieren. Schwerpunkte hierbei liegen auf (1) der Ermittlung von grundsätzlichen Gemeinsamkeiten und Unterschieden innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften, (2) der Ermittlung des Einflusses von Anlagen- und Prozessdaten auf die strukturelle und funktionelle Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften, sowie (3) der Ermittlung des Einflusses mikrobieller Gemeinschaften auf die Prozesseffizienz. Für die Aufklärung der ökologischen Diversität werden verschiedene Verfahren der multivariaten Statistik (z.B. PCoA, principal coordinate analysis; NMDS, nonmetric multidimensional scaling oder CCA, canonical correspondence analysis) angewandt (Ramette 2007, Paliy and Shankar 2016, Zhang et al. 2019). Mit Hilfe solcher Verfahren lassen sich repräsentative Mikroorganismen oder Gruppen von Mikroorganismen für spezifische Prozesszustände identifizieren. So konnte beispielsweise in einem Vergleich von 36 Mikrobiomen aus 22 verschiedenen Biogasanlagen mit Hilfe der NMDS-Analyse gezeigt werden, dass Vertreter der bakteriellen Ordnungen *Bacteroidales* und *Cloacimonetes* in Kombination mit Vertretern der archaealen Gattung *Methanothrix* ein stabil laufendes System charakterisieren (Theuerl et al. 2018).

I.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das dritte bundesweite Biogas-Messprogramm (BMP III) wurde von zwei Verbundvorhaben umgesetzt. Während sich das Verbundvorhaben BMP III – Teil 1 in vier aufeinander abgestimmten Teilvorhaben mit Faktoren für einen effizienten Betrieb von Biogasanlagen befasste, lag der Fokus der drei Verbundprojektpartner von BMP III – Teil 2 auf der systematischen Erfassung der in Biogasanlagen vorkommenden Mikrobiome. Hierbei sollte einerseits der Einfluss von Anlagen- und Prozessparametern auf die strukturelle und funktionelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften aufgeklärt und andererseits der Einfluss mikrobieller Gemeinschaften auf die Prozesseffizienz ermittelt werden.

Im Rahmen von BMP III – Teil 1 wurde unter Anwendung innovativer Methoden der Anlagenzustand von 61 Biogasanlagen erfasst und bewertet. Das Methodenspektrum umfasste Vorschriften zur Probenahme und -behandlung, die Prozessbewertung über Massen- und Energiebilanzen, die Bewertung der Effizienz des Vergärungsprozesses sowie die Bewertung des Gärprozesses mit Hilfe des Heiz-/Brennwertes, chemometrische und spektrometrische Analysen. Auf Basis der Betrachtung der Energieeffizienz wurde abschließend eine Bewertung der ökonomischen Bedingungen durchgeführt, um Optionen für die Weiterentwicklung der Technologie und Perspektiven für die Branche aufzuzeigen.

Zu den Verbundprojektpartnern von BMP III – Teil 1 zählten:

- DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH (FKZ: 22403515)
- Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung (FKZ: 22403615)
- Universität Hohenheim, Landesanstalt für Agrartechnik und Bioenergie (FKZ: 22403715)
- Forschungs- und Entwicklungszentrum Fachhochschule Kiel GmbH (FKZ: 22403815)

Zudem erfolgte eine Zusammenarbeit mit dem BMEL/FNR-Forschungsvorhabens BIOGAS-LIVE (FKZ 22013913), das sich explizit mit der Ursachenaufklärung von Prozessinstabilitäten/-störungen unter besonderer Berücksichtigung der Systemmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen befasste.

II. Ergebnisse

II.1 Erzielte Ergebnisse

II.1.1 Projektstruktur

Im Rahmen des dritten bundesweiten Biogas-Messprogramms (BMP III) wurde eine repräsentative Anzahl der in Deutschland betriebenen landwirtschaftlichen Biogasanlagen untersucht. Während sich die Verbundprojektpartner von BMP III – Teil 1 mit Faktoren für einen effizienten Anlagenbetrieb befassten, lag der Schwerpunkt der Verbundprojektpartner von BMP III – Teil 2 auf der systematischen Erfassung der in Biogasanlagen vorkommenden Mikrobiome, ihrer Beeinflussung durch Anlagen- und Prozessparameter sowie der Ermittlung des Einflusses der mikrobiellen Gemeinschaften auf die Prozesseffizienz. Das Verbundvorhaben verfolgte dabei folgende Ziele:

- Inventarisierung der vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaften hinsichtlich ihrer strukturellen und funktionellen Zusammensetzung
- mikrobiologische Charakterisierung von zehn ausgewählten Biogasanlagen
 - a) Erfassung des genetisch-festgelegten und tatsächlich realisierten metabolischen Potenzials ganzer Mikrobiome (Metagenom-/Metaproteomanalysen)
 - b) Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung neuer, bisher unbekannter Arten/Gattungen
 - c) Ermittlung lokaler Strukturen innerhalb eines Fermenters bzw. einer Biogasanlage und Erfassung der zeitlichen Entwicklung mikrobieller Gemeinschaften im Langzeit-Monitoring
- Korrelationsanalysen zur Erfassung der mikrobiellen Diversität mittels multivariater Statistik zur Aufklärung der biotischen und abiotischen Interaktionen
 - a. Ermittlung von grundsätzlichen Gemeinsamkeiten und Unterschieden innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften
 - b. Ermittlung des Einflusses von Anlagen- und Prozessdaten auf die strukturelle und funktionelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften
 - c. Ermittlung des Einflusses der mikrobiellen Gemeinschaften auf die Prozesseffizienz

In den folgenden Kapiteln werden die wesentlichen wissenschaftlich-technischen Ergebnisse des Verbundvorhabens, die erreichten Nebenergebnisse sowie die gesammelten wesentlichen Erfahrungen aufgeführt.

II.1.2 Projektteil 1 „Inventarisierung“

II.1.2.1 Auswahl und Beprobung der untersuchten Biogasanlagen

Im Rahmen von BMP III – Teil 1 wurden insgesamt 61 landwirtschaftliche Biogasanlagen, jeweils über einen Zeitraum von zwölf Monaten untersucht. Das Anlagen-Monitoring teilte sich hierbei in zwei Zeiträume auf (2016/2017 und 2017/2018), in denen 30/31 Biogasanlagen betrachtet wurden. Die Auswahl der zu untersuchenden Anlagen erfolgte in erster Linie durch die Partner von BMP III - Teil 1, wobei Kriterien zur Anlagenauswahl zwischen beiden Verbundvorhaben abgestimmt wurden.

Für den Projektteil 1 „Inventarisierung“ von BMP III – Teil 2 wurde eine möglichst große Breite an unterschiedlichen Biogasanlagen untersucht, wobei darauf geachtet wurde, dass gewisse Anlagenkategorien vertreten waren. Es wurde z. B. eine repräsentative Anzahl an mesophil- und thermophil-betriebenen Anlagen ausgewählt, die sich jedoch bezüglich der Einsatzstoffe ähnelten oder eine repräsentative Anzahl an Anlagen, die durch hohe Stickstoff-Gehalte gekennzeichnet waren, d.h. in denen beispielsweise Grassilage, Geflügelmist und/oder Hühnertrockenkot verwertet wurde. Weitere Kriterien waren: komplex vs. einfach zu vergärende Einsatzstoffe (z. B. Mais- vs. Rübensilage), reine NaWaRo-Anlagen vs. reine Gülleanlagen, Nass- vs. Trockenfermentation oder verschiedene Fermentationssysteme (z. B. Rührkessel vs. Pfropfenstrom vs. Garagenfermenter). Aus dem Anlagenset von BMP III - Teil 1 wurden 46 Biogasanlagen einer mikrobiologischen Untersuchung unterzogen.

Zusätzlich zu den Biogasanlagen, die zusammen mit BMP III – Teil 1 betrachtet wurden, wurden alle Biogasanlagen, die im Rahmen des BMEL/FNR-Forschungsvorhabens BIOGAS-LIVE (FKZ: 22013913) unter Beobachtung standen, ebenfalls einer Inventarisierung der mikrobiellen Diversität unterzogen. Dies ermöglichte eine umfangreiche Erhöhung der zu untersuchenden Anlagen und damit verbunden einen signifikanten Mehrwert der statistischen Güte der Korrelationsanalysen. Die im Rahmen von BMP III – Teil 2 durchgeführten mikrobiologischen Analysen waren nicht redundant zu den im Forschungsvorhaben BIOGAS-LIVE durchgeführten Arbeiten, sondern stellten eine sinnvolle Ergänzung dar, so dass durch die Verknüpfung der beiden Vorhaben ein großer Synergie-Effekt erzielt wurde.

Ursprünglich war geplant, die Hauptfermenter von 100 Biogasanlagen zu untersuchen. Dieses war jedoch nicht möglich, da einige Anlagen aus z.B. zwei, drei oder auch mal vier parallel-betriebenen Hauptfermentern bestanden oder aus einer Hydrolysestufe mit nachgeschaltetem Hauptfermenter (Abbildung 4). Aus diesem Grund hätte eine Untersuchung von 100 Biogasanlagen den Rahmen der geplanten 100 Proben deutlich überschritten. Deswegen wurde entschieden, nicht 100 Biogasanlagen, sondern 100 Fermenter zu untersuchen, wobei die Hauptfermenter aller Anlagen einmalig beprobt wurden. In der 1. Messphase von BMP III (2016/2017) wurden 25 Anlagen mit insgesamt 34 Fermentern und in der 2. Messphase (2017/2018) 21 Anlagen mit 28 Fermentern beprobt. Aus dem BMEL/FNR-Forschungsvorhaben BIOGAS-LIVE wurden 33 Fermenterproben von 14 Biogasanlagen bereitgestellt. Verfahrensspezifische Anlagendaten und chemische Analysedaten, die im Verbundprojekt BMP III – Teil 1 erhoben wurden, wurden für eine vergleichende systemökologische Datenauswertung zur Verfügung gestellt.

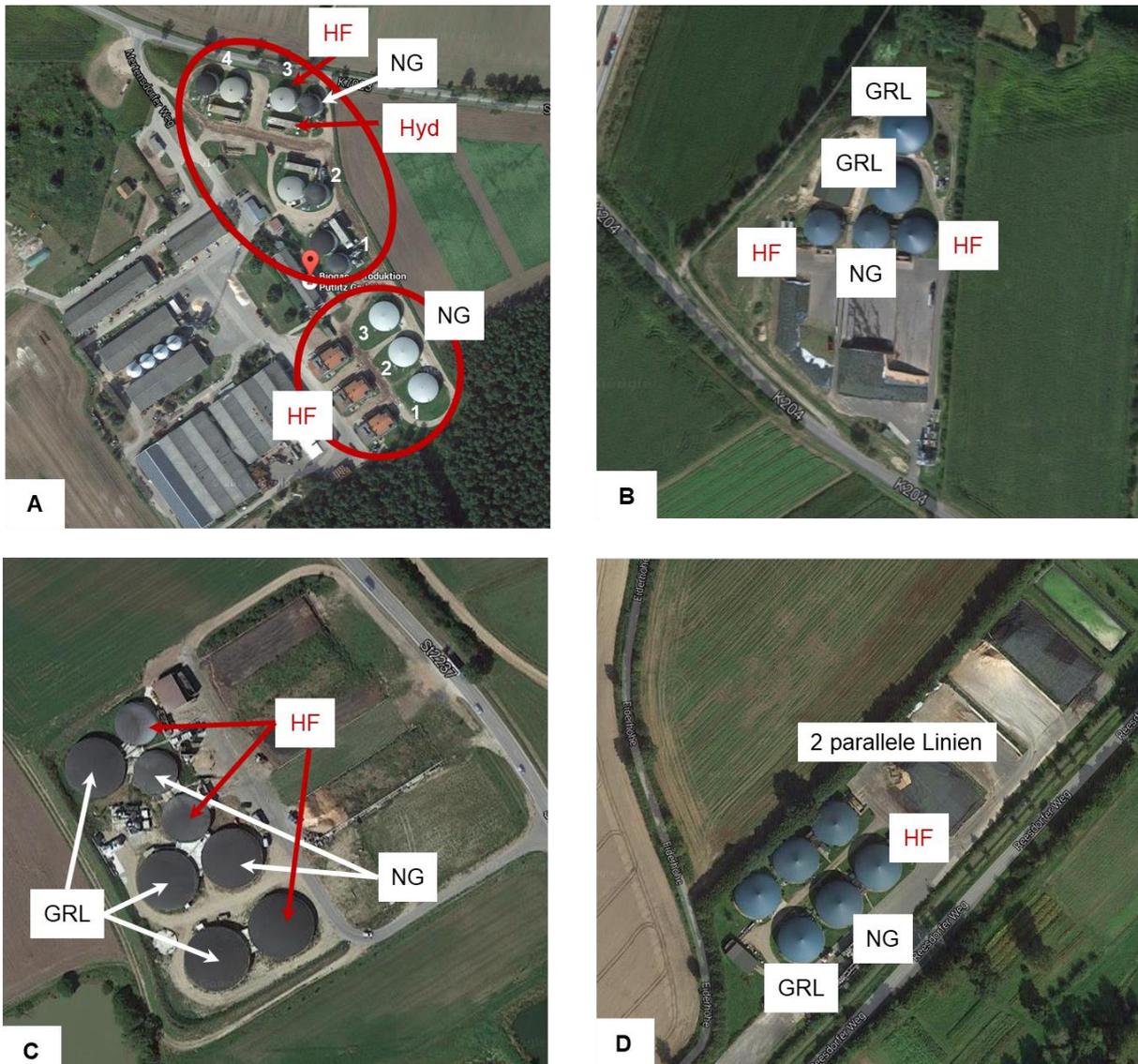


Abbildung 4: Aufbau ausgewählter Biogasanlagen, die im Rahmen von BMP III – Teil 2 „Systemmikrobiologie“, Projektteil 1 „Inventarisierung“ untersucht wurden (Quelle: Google Maps). A = Standort eines Biogasanlagenkomplexes mit zwei Fermentationssystemen: vier baugleiche Anlagen jeweils bestehend aus einer Hydrolysestufe (Hyd, Propfenstromreaktor), einem Hauptfermenter (HF, Rührkesselreaktor, RK) und einem Nachgärer (NG, RK) und drei baugleiche Anlagen jeweils bestehend aus einem HF (Garagenfermenter) und einem NG (RK). B = Biogasanlage (BGA) bestehend aus zwei parallel-betriebenen HF, einem NG und zwei Gärrestlagern (GRL) (alles RK). C = BGA bestehend aus drei HF, zwei NG und drei GRL (alles RK). D = zwei parallel-betriebene BGA mit jeweils einem HF, einem NG und einem GRL (alles RK).

II.1.2.2 Verfahrensspezifischen Anlagendaten und chemischen Analysedaten

Die 46 Anlagen, die zusammen mit BMP III – Teil 1 betrachtet wurden, unterschieden sich in ihrer Anlagenkonfiguration (Reaktortyp, Reaktorvolumen), in den zugeführten Einsatzstoffen (Variationen von Energiepflanzen und Reststoffen aus der Tierhaltung), in ihrer allgemeinen Prozessführung (z. B. Raumbelastung, hydraulische Verweilzeit und Prozesstemperatur) und folglich in den chemischen Prozessparametern (Abbildung 5, Tabelle AII-02 und AII-03).

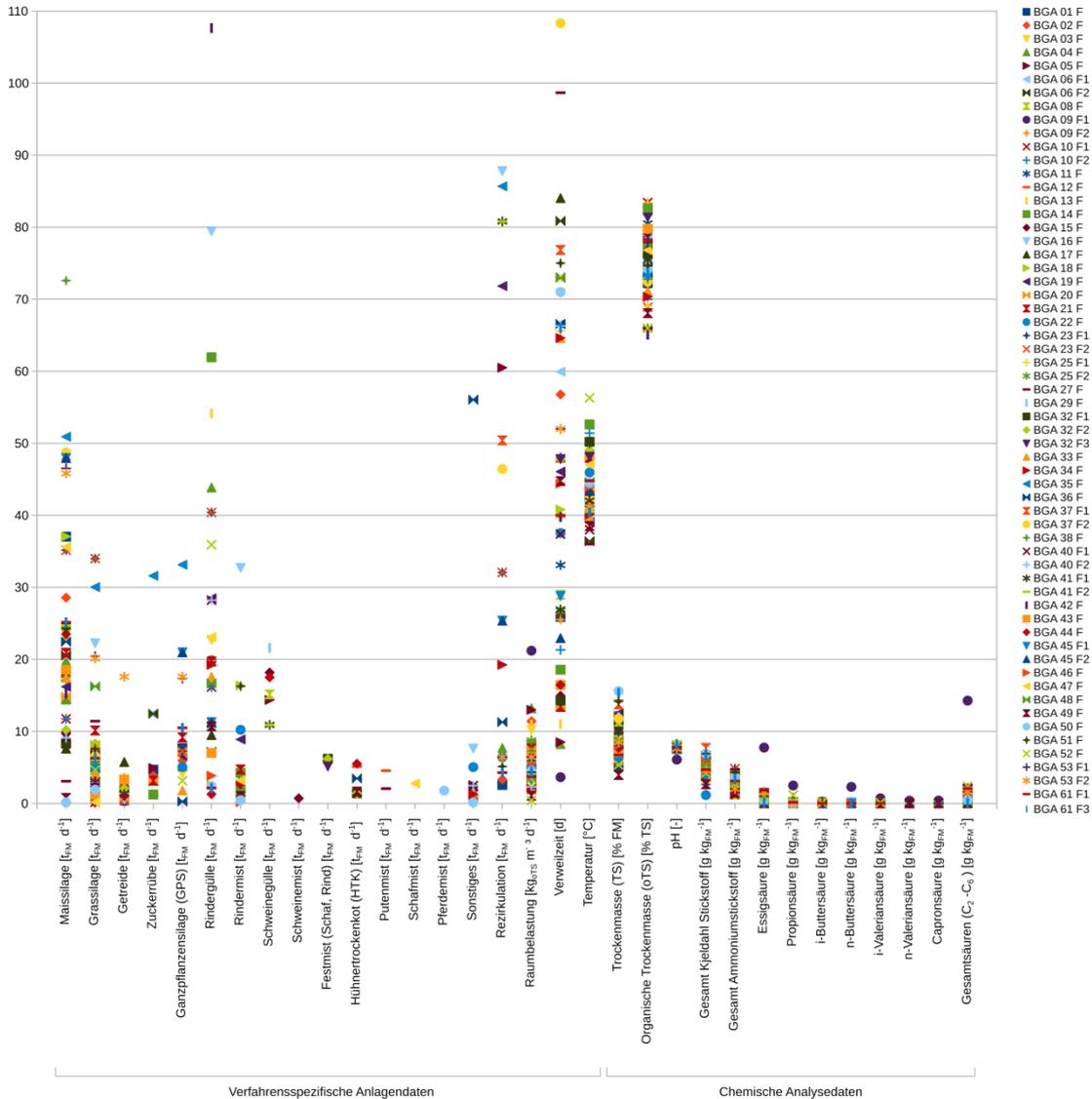


Abbildung 5: Variabilität in den verfahrensspezifischen Anlagendaten und chemischen Analysedaten der 46 zusammen mit BMP III - Teil 1 untersuchten Biogasanlagen. FM = Frischmasse.

Die Haupteinsatzstoffe zum Zeitpunkt der Probenahmen für die mikrobiologische Inventarisierung in den untersuchten Biogasanlagen waren Maissilage (40 BGA; $0,1 - 56,6 t_{\text{Fischmasse (FM)}} d^{-1}$) und Grassilage (33 BGA, $0,1 - 26,5 t_{\text{FM}} d^{-1}$) sowie Rindergülle/-mist (30 BGA, $1,0 - 83,9 m^3 / t_{\text{FM}} d^{-1}$). Weitere Einsatzstoffe, die jedoch eher selten oder vereinzelt verwendet wurden, waren Zuckerrübensilage (8 BGA, $1,0 - 24,6 t_{\text{FM}} d^{-1}$), Ganzpflanzensilage (15 BGA, $0,2 - 25,8 t_{\text{FM}} d^{-1}$), Getreide (20 BGA, $0,2 - 13,7 t_{\text{FM}} d^{-1}$), Schweinegülle/-mist (6 BGA, $0,6 - 16,8 m^3 / t_{\text{FM}} d^{-1}$), Hühnertrockenkot/Putenmist (5 BGA, $1,1 - 4,3 t_{\text{FM}} d^{-1}$), Schafmist (1 BGA, $2,1 t_{\text{FM}} d^{-1}$) und Pferdemit (1 BGA, $1,4 t_{\text{FM}} d^{-1}$). Die mittlere Raumbelastung lag bei $5,4 \pm 3,5 kg_{\text{OTS}} m^{-3} d^{-1}$ mit einer mittleren Verweilzeit von $43,9 \pm 24,7$ Tagen. Die Prozesstemperaturen lagen zwischen $36^{\circ}C$ und $56^{\circ}C$, wobei die meisten Anlagen (28) unter mesophilen Bedingungen im Bereich zwischen $36^{\circ}C$ und $45^{\circ}C$ betrieben wurden. Zehn Biogasanlagen wurden zwischen $45^{\circ}C$ und $50^{\circ}C$ betrieben, einem Temperaturbereich zwischen den optimalen Bedingungen

für einen meso- bzw. thermophilen Prozessbetrieb (Kim & Lee 2016, Westerholm et al. 2018). Fünf Biogasanlagen wurden unter thermophilen Bedingungen ($>50^{\circ}\text{C}$) betrieben. Die Variabilität in den Anlagendaten spiegelt sich folglich auch in den chemischen Prozessparametern wider (Abbildung 5, Tabelle AII-02 und AII-03)

Eine Ähnlichkeitsanalyse (NMDS) zeigt deutlich (Abbildung 6), dass es sich bei den meisten der untersuchten Biogasanlagen, wie geplant, um stabil laufende Anlagen mit einer konstanten Zusammensetzung der Einsatzstoffe handelte. Dieser Analyse zugrunde liegen die verfahrenstechnischen Anlagendaten und chemischen Prozessparametern zum Zeitpunkt der Probenahme für die mikrobiologische Inventarisierung sowie einer dreimonatigen Vor- und Nachlaufzeit. Farbliche Ellipsen kennzeichnen die untersuchten Biogasanlagen und verweisen auf die Datenvariabilität innerhalb des siebenmonatigen Betrachtungszeitraumes (je komprimierter die Ellipsen sind, desto ähnlicher sind sich die zugrundeliegenden Datensätze). Deutlich zu erkennen ist, dass Anlagen, die mit Reststoffen aus der Tierhaltung betrieben wurden, sich etwas von den Anlagen abgrenzen, die entweder nur mit nachwachsenden Rohstoffen (NaWaRo) oder in Ko-Fermentation betrieben wurden (diese liegen in Abbildung 6 alle sehr eng beieinander). Auffällig in dieser Analyse ist, dass es eine Anlage gibt, die durch ein diverses Säurespektrum und dementsprechend hohen Säurekonzentrationen gekennzeichnet ist. Hierbei handelt es sich um eine 75 kW-Güllekleinanlage, die im Projektteil 2 einer detaillierteren Analyse unterzogen wurde.

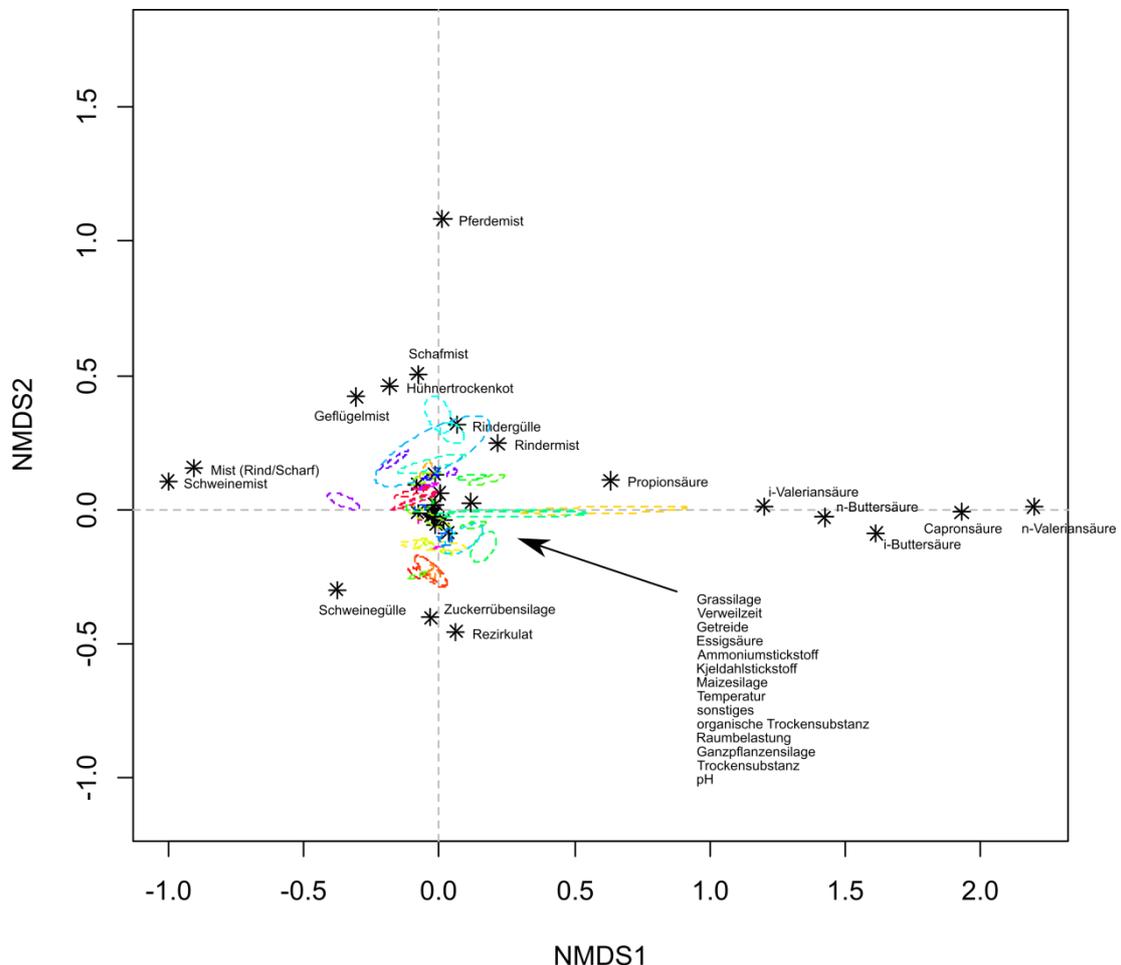


Abbildung 6: Ähnlichkeitsanalyse (engl. non-metric multidimensional scaling, NMDS) der untersuchten Biogasanlagen basierend auf ihren verfahrenstechnischen Anlagendaten und chemischen Prozessparametern. Dieser Analyse zugrunde liegen die verfahrenstechnischen Anlagendaten und chemischen Prozessparametern zum Zeitpunkt der Probenahme für die mikrobiologische Inventarisierung sowie einer dreimonatigen Vor- und Nachlaufzeit. Farbliche Ellipsen kennzeichnen die untersuchten Biogasanlagen und verweisen auf die Datenvariabilität innerhalb des siebenmonatigen Betrachtungszeitraumes (je komprimierter die Ellipsen sind, desto ähnlicher sind sich die zugrundeliegenden Datensätze).

II.1.2.3 Hochdurchsatzsequenzierung des Gens der 16S rRNA

Im Rahmen von Projektteil 1 „Inventarisierung“ wurden die Biogas-Mikrobiome von 95 Fermentern (60 Anlagen) mittels 16S rRNA-Gen-Amplikonsequenzierung taxonomisch profiliert (Abbildung 3).

Zu Beginn des Forschungsvorhabens waren für die Isolierung der mikrobiellen DNA bei den Projektpartnern (ATB/CeBiTec) unterschiedliche Methoden etabliert (Kröber et al. 2009, Rademacher et al. 2012, Theuerl et al. 2015). Entsprechend der Beschaffenheit des Probenmaterials können sich verschiedene Extraktionsmethoden auf die Erfassung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft auswirken, da diese sich hinsichtlich des mechanisch-chemischen Zellaufschlusses und der Abtrennung der Nukleinsäuren von der Umweltmatrix sowie nicht erwünschten Zellbestandteilen unterscheiden (Bergmann et al. 2010; Lebuhn et al. 2016). Dementsprechend wurden die beiden standardisiert verwendeten Methoden (PowerSoil® DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, USA und FastDNA® Spin Kit for Soil, MP Biomedicals GmbH, Germany in Kombination mit dem Genomic DNA Clean & Concentrator™, Zymo Research, USA) hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die erfassbare mikrobielle Diversität gegenübergestellt. Da die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften kaum Unterschiede zwischen den getesteten Protokollen zeigte, waren folglich die Quantität der extrahierten DNA sowie ein effizientes Preis-Leistungsverhältnis der zu verwendenden kommerziell erhältlichen Kitsysteme die entscheidenden Kriterien. Dadurch fiel die Entscheidung auf das FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals GmbH, Germany) in Kombination mit dem Genomic DNA Clean & Concentrator™ Aufreinigungskit (Zymo Research, USA).

Die Amplikonsequenzbibliotheken wurden nach dem Protokoll „16S Metagenomic Sequencing Library Preparation“ (Illumina Inc., USA) erstellt. Nach der DNA-Extraktion wurden die V3-V4-Regionen des 16S rRNA-Gens unter Verwendung des universellen Primerpaars Pro341F/Pro806R (Takahashi et al. 2014) amplifiziert. Nach Aufreinigung der generierten Amplikons (Agencourt AMPureXP, Beckman Coulter Genomics Inc.) erfolgte das Anhängen von Indizes und Sequenzieradaptoren (Nextera XT Index Kit, Illumina Inc., USA). Die Sequenzierung der Amplikonbibliotheken erfolgte auf der Illumina MiSeq Plattform mittels 2x300 bp *paired-end* Sequenzierung.

Die nachfolgende Qualitätskontrolle und bioinformatische Verarbeitung der Sequenzdaten erfolgte mit einer im Rahmen von BMP III etablierten Pipeline. Diese Pipeline umfasst zunächst eine Qualitätskontrolle der Sequenzdaten mittels `FastQC` (Andrews 2010), gefolgt von der Zusammenführung der Vorwärts- und Rückwärts-Reads mit dem Programm `FLASH` (Magoč & Salzberg 2011) und der anschließenden Entfernung der Primersequenzen mit `cutadapt` (Martin 2011). Das Programm `sickle` (Joshi & Fass 2011) wurde zum Qualitätstrimmen der zusammengeführten Sequenzen anhand eines Qualitätswertes von 20 (Q20) verwendet, der einer Genauigkeit von 99% entspricht. Die resultierenden hochwertigen Sequenzen wurden unter Verwendung des Programms `seqtk` (Li 2012) auf 50.000 Sequenzen pro analysierte Probe reduziert, um die Ergebnisse zwischen den Proben vergleichen zu können.

Alle nachfolgenden bioinformatischen Verarbeitungen wurden innerhalb der QIIME-Plattform durchgeführt, welche eine breite Analyse von Sequenzdaten ermöglicht (Caporaso et al. 2010, Bolyen et al. 2019, Zhang et al. 2019). Für die abundanz- und referenz-basierte Identifikation und Entfernung von Chimären-Sequenzen wurde das Programm `usearch61` (Edgar 2010) verwendet. Nach diesem Schritt wurde ein offenes und referenz-basiertes clustern der OTUs (engl.: operational taxonomic units; vorläufigen taxonomischen Einheiten) durchgeführt. Die taxonomische Zuordnung (Klassifikation) der ermittelten OTUs erfolgte über die 16S rDNA SILVA-Datenbank (Release 132, April 2018). Zur Abschätzung der α -Diversität der analysierten mikrobiellen Gemeinschaften wurden der Chao1-, der Shannon- sowie der Simpson-Index berechnet.

Insgesamt wurden 312 16S rRNA-Gen-Amplikonsequenzbibliotheken (95 Fermenter mit jeweils drei Replikaten und für drei Anlagen zusätzlich jeweils drei Zeitpunkte mit drei Replikaten) erstellt, sequenziert und bioinformatisch ausgewertet (Tabelle AII-01). Taxonomische Profile der entsprechenden Mikrobiome wurden anhand der Mediane der Triplikate auf Abteilungs- und Gattungsebene erstellt (Abbildung 7 und 8).

In den analysierten Biogasfermentern wurden insgesamt 21.408 verschiedene OTUs identifiziert. Die durchschnittliche Anzahl an OTUs in den Biogasfermentern liegt bei 2.066 ± 646 (Tabelle 1). Die taxonomischen Profile weisen insgesamt einen Anteil von durchschnittlich $89,8 \% \pm 6,3 \%$ Bakterien, $9,2 \% \pm 6,2 \%$ Archaeen und $1,1 \% \pm 0,7 \%$ weiterer bisher nicht-klassifizierbarer Organismen auf.

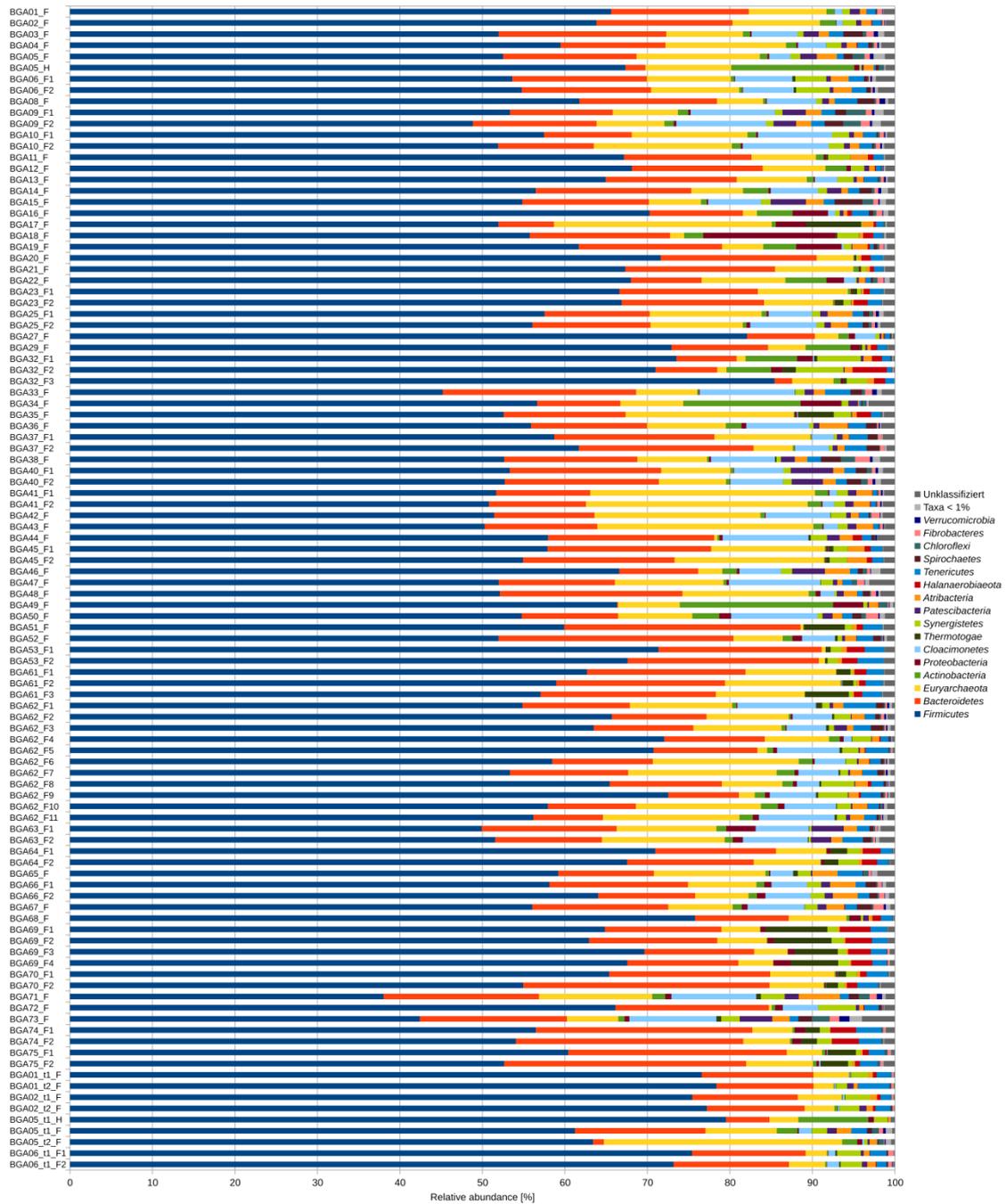


Abbildung 7: Taxonomisches Profil auf Abteilungsebene von 95 Biogasfermentern basierend auf der 16S rRNA-Gen-Amplikonsequenzierung.

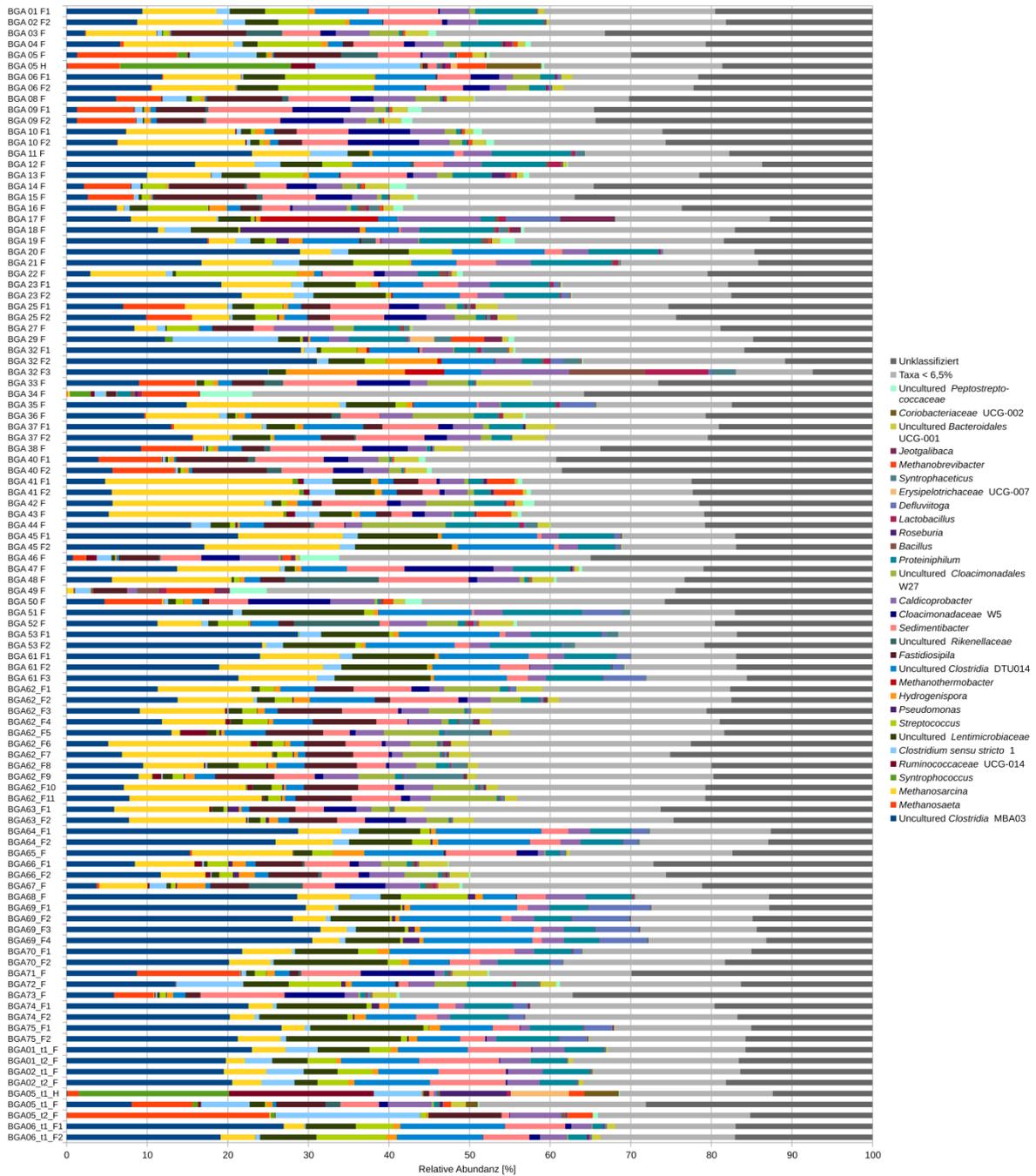


Abbildung 8: Taxonomisches Profil auf Gattungsebene von 95 Biogasfermentern basierend auf der 16S rRNA-Gen-Amplikonsequenzierung.

Der Anteil an Bakterien variiert zwischen 70,6 % und 98,7 %, wobei die Abteilung *Firmicutes* mit einer relativen Häufigkeit von $61,3\% \pm 9,0\%$ dominierte, gefolgt von den Abteilungen *Bacteroidetes* mit $15,1\% \pm 5,6\%$, *Cloacimonetes* mit $3,2\% \pm 3,6\%$, *Tenericutes* mit $1,6\% \pm 0,8\%$ und *Actinobacteria* mit einer relativen Häufigkeit von $1,5\% \pm 2,9\%$ (Abbildung 7). Auf Ordnungsebene dominieren die Ordnungen *Clostridiales* mit $33,6\% \pm 11,2\%$, gefolgt von *uncultured Clostridia MBA03* mit $13,6\% \pm 8,6\%$, *Bacteroidales* mit $10,6\% \pm 4,1\%$, *uncultured Clostridia DTU014* mit $5,1\% \pm 4,3\%$, *Sphingobacteriales* mit $4,4\% \pm 3,7\%$, *Cloacimonadales* mit $3,2\% \pm 3,6\%$ und *Lactobacillales* mit $3,1\% \pm 3,4\%$. Dies entspricht der zu erwartenden taxonomischen Zusammensetzung von Biogas-Mikrobiomen (Calusinska et al. 2018, De Vrieze et al. 2015, Maus et al. 2017, Sundberg et al. 2013). Auf Gattungsebene dominiert eine Gruppe von bisher nicht-kultivierbaren und dementsprechend nicht physiologisch beschriebenen Clostridien (*uncultured Clostridia MBA03*) die bakterielle Gemeinschaft mit einer relativen Häufigkeit von $13,2\% \pm 8,8\%$ (Abbildung 8). Diese Gruppe wurde in allen untersuchten Biogasfermentern/-anlagen nachgewiesen. Weitere abundante bakterielle Gattungen sind *Sedimentibacter* mit einer durchschnittlichen relativen Häufigkeit von $4,4\% \pm 3,0\%$, *Proteiniphilum* mit $3,4\% \pm 3,1\%$, *Caldicoprobacter* mit $3,3\% \pm 1,6\%$ und *Fastidiosipila* mit einer durchschnittlichen relativen Häufigkeit von $2,6\% \pm 3,2\%$ (Abbildung 8). Mitglieder der Gattung *Sedimentibacter* sind beschrieben als fermentative Bakterien, welche Pyruvat und Aminosäuren für die Essig- und Buttersäureproduktion verwenden (Breitenstein et al. 2002). Vertreter der Gattung *Caldicoprobacter* werden als thermophile, xylanolytische Bakterien beschrieben, die auf proteinreichen, zucker- und zuckerderivat-enthaltenden Nährmedien angereichert werden können (Müller et al. 2016). Mitglieder der Gattung *Proteiniphilum* sind bekanntlich am Abbau von Proteinen, Aminosäuren und Polysacchariden beteiligt (Chen & Dong 2005, Hahnke et al. 2016, Tomazetto et al. 2018). Aus der Gattung *Fastidiosipila* ist bisher nur eine Art, *Fastidiosipila sanguinis*, bekannt, die Monosaccharide und Aminosäuren u.a. zu Essig- und Buttersäure umsetzt (Falsen et al. 2005).

Der Anteil an Archaeen variiert zwischen 0,3 % und 28,9 % mit *Euryarcheota* als dominanteste Abteilung, die in allen analysierten Biogasfermentern vertreten ist (Abbildung 8). Andere archaeelle Abteilungen, wie *Nanoarcheota*, *Crenarchaeota* und *Diapherotrites*, haben maximale relative Häufigkeiten von 0,3 %, 0,2 % und 0,03 %. Die Abteilung *Nanoarcheota* ist in sechs der analysierten Biogasfermenter vertreten, die Abteilung *Crenarchaeota* in 38 und die Abteilung *Diapherotrites* in zwölf der analysierten Biogasfermenter. Die Abteilungen *Diapherotrites* und *Nanoarcheota* gehören zum relativ neuen archaeellen Superphylum DPANN (Akronym für: *Diapherotrites*, *Parvarchaeota*, *Aenigmarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Nanohaloarchaea*). Archaeen dieses Superphylums zeichnen sich durch eine kleine Genomgröße aus, was mit einer begrenzten metabolischen Kapazität einhergeht. Darüber hinaus scheinen viele dieser Archaeen eine fermentative und/oder symbiontische Lebensweise zu haben, d.h. diese Archaeen sind von anderen Mikroorganismen für grundlegende metabolische Prozesse abhängig (Dombrowski et al. 2019). Auf Ordnungsebene dominieren *Methanosarcinales* $7,9\% \pm 5,7\%$ und *Methanobacteriales* $1,2\% \pm 1,9\%$ die archaeelle Gemeinschaft. Die archaeelle Gattung *Methanosarcina* wurde mit einer relativen Häufigkeit von $6,4\% \pm 6,1\%$ nachgewiesen. Darüber hinaus konnte diese Gattung in allen analysierten Biogasfermentern identifiziert werden. Arten der Gattung *Methanosarcina* sind je nach vorherrschenden Umweltbedingungen in der Lage, Methan sowohl über den acetoklastischen als auch über den hydrogenotrophen Stoffwechselweg zu produzieren (De Vrieze et al. 2012). Darüber hinaus haben Arten der Gattung *Methanosarcina* eine hohe Toleranz gegenüber erhöhten Essigsäurekonzentrationen (bis zu 15.000 mg L^{-1}), sowie gegenüber Veränderungen in der Salzkonzentration und des pH-Wertes (De Vrieze et al. 2012). Weitere abundante archaeelle Gattungen sind *Methanosaeta* mit einer relativen Häufigkeit von $1,5\% \pm 3,7\%$, *Methanobacterium* mit $0,5\% \pm 0,5\%$, *Methanobrevibacter* mit $0,5\% \pm 1,2\%$ und *Methanothermobacter* mit $0,2\% \pm 1,5\%$. Arten der Gattung *Methanosaeta* produzieren Methan ausschließlich (obligat) über den acetoklastischen Weg und weisen eine höhere Affinität für Essigsäure auf als Vertreter der Gattung *Methanosarcina* (De Vrieze et al. 2012, Smith & Ingram-Smith 2007, Griffin et al. 1998). *Methanobacterium* sp., *Methanobrevibacter* sp. und *Methanothermobacter* sp. erzeugen Methan über den hydrogenotrophen Stoffwechselweg. Einige Mitglieder der Gattungen *Methanobacterium* und *Methanothermobacter* können zusätzlich Ameisensäure verwerten (Wasserfallen et al. 2000). Die Gattungen *Methanosphaera* und *Methanoculleus* sind in den analysierten Biogasfermentern weniger häufig vertreten und zeigten maximale relative Abundanzen von 0,3 %.

Für die Bestimmung der taxonomischen Diversität wurde die Artenanzahl (OTU-Anzahl) sowie verschiedene α -Diversitätsindizes berechnet. Der Chao 1-Index ist eine nicht-parametrische Abschätzung des gesamten Artenreichtums einer Probe, der sowohl die OTU-Anzahl als auch die OTU-Abundanz berücksichtigt, wobei davon ausgegangen wird, dass nicht alle Organismen einer Gemeinschaft identifiziert werden können (Chao 1984). Der Shannon-Index beschreibt die Vielfalt (Entropie, mittlerer Informationsgehalt) eines Mikrobioms unter Berücksichtigung der Anzahl erfasster Taxa und der (Un-)Gleichverteilung der relativen Häufigkeit ihres Vorkommens (Evenness), wobei die erfasste

Artenanzahl eine höhere Gewichtung erhält (Shannon & Weaver 1949, Kim et al. 2017). Der Simpson-Index beschreibt die Evenness eines Mikrobioms, indem die Wahrscheinlichkeit bestimmt wird, dass zwei zufällig ausgewählte Individuen nicht zur selben Art gehören. Der Simpson-Index nimmt Werte zwischen 0 und 1 an, wobei 0 bedeutet, dass alle Individuen einer Art angehören (niedrige Diversität) und Werte nahe 1, dass Individuen verschiedenen Arten angehören (hohe Diversität) (Simpson 1949, Kim et al. 2017). Für die analysierten 95 Biogasfermenter variierte die Anzahl erfasster OTUs zwischen 455 und 3527, der Chao 1-Index zwischen 644,02 und 6530,66, die Shannon-Entropie zwischen 5,14 und 8,44 und die Simpson-Evenness zwischen 0,92 und 0,99 (Tabelle 1).

Tabelle 1: Anzahl der erfassten OTUs (engl. operational taxonomic units, vorläufige taxonomische Einheiten) sowie der berechneten α -Diversitätsindizes Chao 1, Shannon und Simpson für die erfassten Mikrobiome in den analysierten Biogasfermentern.

BGA	OTUs	Chao1	Shannon	Simpson	BGA	OTUs	Chao1	Shannon	Simpson
BGA01_F	2491	4944,39	7,05	0,97	BGA48_F	2715	5451,03	7,04	0,96
BGA02_F	2245	4569,03	6,82	0,97	BGA49_F	2644	3766,75	8,19	0,99
BGA03_F	2445	4986,04	7,55	0,98	BGA50_F	3447	6530,66	7,84	0,98
BGA04_F	3061	6523,08	7,51	0,98	BGA51_F	2147	3981,17	6,44	0,95
BGA05_F	2359	4269,83	7,29	0,97	BGA52_F	2979	5705,98	7,70	0,98
BGA05_H	1425	2225,63	6,07	0,94	BGA53_F1	2242	4013,80	6,47	0,95
BGA06_F1	2362	4327,91	6,97	0,97	BGA53_F2	2222	3898,78	6,50	0,95
BGA06_F2	2242	4343,80	6,90	0,97	BGA61_F1	2207	4318,83	6,49	0,96
BGA08_F	1253	2236,93	6,97	0,98	BGA61_F2	2444	4884,42	6,65	0,96
BGA09_F1	2432	4772,70	7,38	0,98	BGA61_F3	2163	4253,32	6,44	0,96
BGA09_F2	2564	5287,63	7,44	0,98	BGA62_F1	1155	1852,95	6,47	0,97
BGA10_F1	2498	4999,87	7,27	0,97	BGA62_F2	1553	3198,40	6,67	0,97
BGA10_F2	2835	5611,14	7,38	0,97	BGA62_F3	1443	2639,44	6,76	0,97
BGA11_F	2349	4149,00	6,61	0,96	BGA62_F4	1163	1823,04	6,73	0,98
BGA12_F	2687	4998,68	7,13	0,97	BGA62_F5	1230	2034,04	6,77	0,98
BGA13_F	2727	5214,41	7,46	0,98	BGA62_F6	1654	3022,84	6,99	0,97
BGA14_F	2488	4388,77	7,52	0,98	BGA62_F7	1412	2469,88	6,68	0,96
BGA15_F	2280	4175,40	7,45	0,98	BGA62_F8	1624	2966,56	7,00	0,98
BGA16_F	3527	6303,36	8,44	0,99	BGA62_F9	1579	2901,31	7,07	0,98
BGA17_F	1494	2601,42	6,13	0,96	BGA62_F10	1870	3768,49	7,03	0,97
BGA18_F	2446	4274,56	7,13	0,97	BGA62_F11	1924	3707,15	6,77	0,96
BGA19_F	3159	5842,9	7,90	0,98	BGA63_F1	1419	2493,98	6,89	0,97
BGA20_F	2085	4339,32	6,11	0,94	BGA63_F2	1948	3643,88	7,29	0,98
BGA21_F	2455	4788,23	6,70	0,96	BGA64_F1	1007	1813,96	5,54	0,94
BGA22_F	2850	5075,26	7,67	0,98	BGA64_F2	1519	3245,79	5,99	0,95
BGA23_F1	2494	5027,74	6,91	0,97	BGA65_F	1360	2566,72	6,28	0,96
BGA23_F2	2525	4892,00	6,88	0,97	BGA66_F1	2123	4289,13	7,52	0,98
BGA25_F1	2640	5138,82	7,50	0,98	BGA66_F2	1836	3493,03	7,41	0,98
BGA25_F2	2755	5535,02	7,52	0,98	BGA67_F	1997	3391,39	7,59	0,98
BGA27_F	1565	2713,29	6,72	0,98	BGA68_F	1215	2216,98	5,95	0,95
BGA29_F	2075	3390,46	7,05	0,97	BGA69_F1	1342	2458,09	5,56	0,93
BGA32_F1	2082	3764,85	6,57	0,95	BGA69_F2	1271	2637,27	5,68	0,94
BGA32_F2	1770	3226,12	6,07	0,94	BGA69_F3	1280	2413,12	5,66	0,93
BGA32_F3	758	1398,53	5,20	0,94	BGA69_F4	1227	2277,88	5,68	0,93
BGA33_F	2426	4810,84	7,27	0,98	BGA70_F1	1470	2828,93	6,09	0,96
BGA34_F	2306	3334,64	7,97	0,99	BGA70_F2	2062	3904,87	6,60	0,96
BGA35_F	2397	4586,69	6,57	0,96	BGA71_F	2347	4592,90	7,07	0,97
BGA36_F	2584	5211,65	7,01	0,97	BGA72_F	2573	4887,08	7,38	0,98
BGA37_F1	2701	5411,91	7,16	0,97	BGA73_F	2139	3785,12	7,58	0,98
BGA37_F2	1819	3556,02	6,79	0,97	BGA74_F1	1866	3259,18	6,60	0,96
BGA38_F	2564	4795,93	7,51	0,98	BGA74_F2	1923	3577,80	6,58	0,97
BGA40_F1	2721	5305,88	7,57	0,98	BGA75_F1	1457	2686,79	6,13	0,95
BGA40_F2	2589	5173,76	7,53	0,98	BGA75_F2	2144	4121,60	6,62	0,96
BGA41_F1	2715	5460,38	7,16	0,96	BGA01_t1_F	1024	1954,97	5,86	0,95
BGA41_F2	2856	5591,28	7,22	0,96	BGA01_t2_F	1002	1882,54	5,96	0,96
BGA42_F	3031	6427,05	7,23	0,96	BGA02_t1_F	966	2088,43	5,92	0,96
BGA43_F	2936	5619,13	7,33	0,96	BGA02_t2_F	908	1573,93	5,98	0,96
BGA44_F	2778	5151,44	7,21	0,97	BGA05_t1_H	1340	2468,35	6,98	0,98
BGA45_F1	2232	4055,28	6,37	0,95	BGA05_t1_F	455	644,02	5,14	0,93
BGA45_F2	2248	4098,98	6,30	0,94	BGA05_t2_F	2238	3730,05	6,16	0,92
BGA46_F	2714	4430,82	7,76	0,98	BGA06_t1_F1	878	1624,16	5,69	0,94
BGA47_F	2532	5095,09	6,80	0,96	BGA06_t1_F2	1167	2289,81	6,03	0,96

II.1.2.4 Analyse des mikrobiellen Metaproteoms

Neben der taxonomischen Profilierung wurden im Rahmen von Projektteil 1 „Inventarisierung“ die Biogas-Mikrobiome von 95 Fermentern (60 Anlagen) zudem mittels Metaproteomanalyse funktionell profiliert (Abbildung 3).

Zu Beginn des Projektes wurde die methodische Herangehensweise leicht modifiziert: Dies betraf u.a. die Anpassung/Optimierung des Arbeitsablaufes (Workflows) zur Proteinextraktion (Heyer et al. 2019b, Abbildung 9), die Erhöhung der Anzahl gemessener Proteinspektren durch Anschaffung und Inbetriebnahme eines timsTof™ Massenspektrometers (finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), MW.nr 16.46, GZ INST 272/252-1 FUGG) sowie die Überführung des `MetaProteomeAnalyzers´ (Muth et al. 2015) in eine Cloud-basierte Umgebung (de.NBI-Cloud; BMBF 031L0103) und die Implementierung einer automatisierten BLAST-Suchfunktion unter Verwendung spezifischer Biogas-Metagenomdaten sowie der UniProtKB Datenbank (Heyer et al. 2019b).

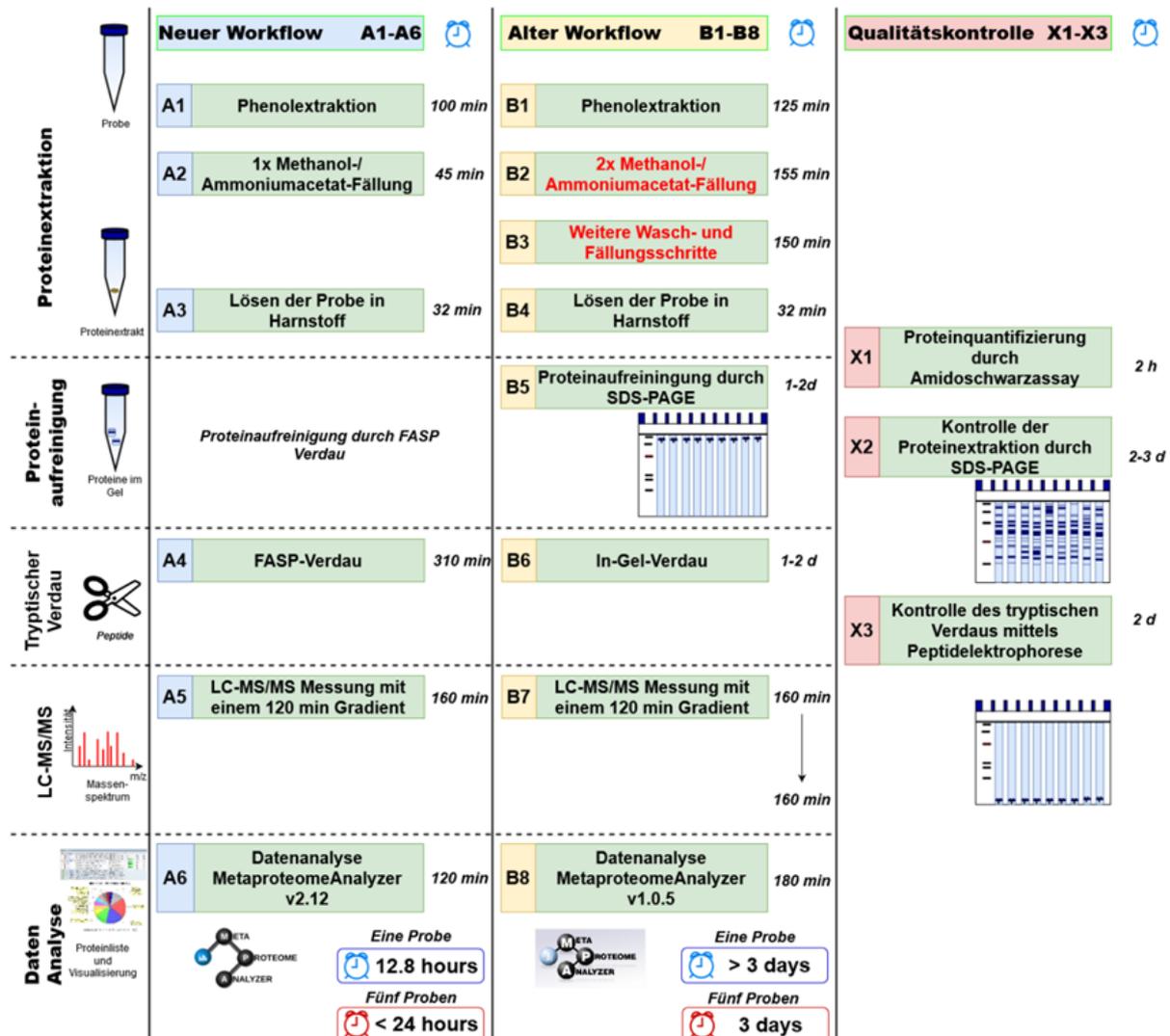


Abbildung 9: Vergleich des neuen (A1–A6) und des alten (B1–B8) Workflows für Metaproteomanalysen nach Heyer et al. (2019a). Zusätzlich sind mögliche Schritte für die Qualitätskontrolle gezeigt (X1–X3). Die entsprechenden Zeitangaben entsprechen den schnellstmöglichen Zeiten für die Bearbeitung der Proben.

Insgesamt konnten durch die Metaproteomanalysen der 95 Biogasfermenter 1.732.910 Massenspektren und 32.601 Metaproteine identifiziert werden. Die taxonomische Zuordnung ergab, dass 51,5 % ± 6,3 % der identifizierten Spektren zur Domäne `Bacteria`, 17,2 % ± 2,5 % zur Domäne `Archaea`, 5,3 % ± 4,5 % zur Domäne `Eukaryota` und 0,3 % ± 0,4 % zur Domäne `Viren` gehören. 26,1 % ± 2,9 % der Spektren konnten keiner taxonomischen Gruppe zugeordnet werden. Die Ursache

sind Proteinsequenzhomologien, die eine peptidbasierte Zuordnung der Taxonomie erschweren (Heyer et al., 2017). Die Menge der nicht zugeordneten Metaproteine ist mit 35 % etwas niedriger als in Heyer et al. (2019a) beschrieben. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass in Heyer et al. (2019a) eine hochauflösende Metaproteomanalyse durchgeführt wurde, bei der auch weniger abundante Proteine erfasst wurden, die sich bei der Ähnlichkeitssuche mit BLAST schwerer zuordnen ließen.

Die taxonomische Auswertung der Metaproteomdaten erfolgte auf Ordnungsebene (Abbildungen 10 und 11). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft Vertreter der Ordnungen *Bacillales* (22,0 % ± 3,2 %), *Clostridiales* (8,5 % ± 3,0 %), *Enterobacteriales* (7,9 % ± 1,3 %) sowie *Bacteroidales* (7,0 % ± 3,9 %) physiologisch aktiv waren. Die abundantesten und dementsprechend physiologisch aktivsten Ordnungen der archaeellen Gemeinschaft waren *Methanosarcinales* (32,6 % ± 10,0 %), *Methanobacteriales* (16,2 % ± 5,5 %), *Methanococcales* (16,4 % ± 3,9 %) und *Thermococcales* (9,0 % ± 4,8 %). Da ein hoher Anteil der erfassten Metaproteine schon auf Ordnungsebene nicht zugeordnet werden konnte (Bakterien 12,1 % ± 2,0 %, Archaeen: 14,0 % ± 3,0 %), wurde auf eine tiefere taxonomische Auswertung verzichtet. Insgesamt repräsentieren die am häufigsten erfassten Ordnungen die metabolischen Schritte Hydrolyse, primäre Fermentation sowie den acetoklastischen bzw. hydrogenotrophen Weg der Methanogenese. Details hierzu werden bei der funktionellen Auswertung diskutiert.

Ein sehr interessantes Ergebnis der Metaproteomanalysen ist das Auffinden von Phagen/Viren-Proteinen, deren Funktion innerhalb des Biogas-Mikrobioms noch unerforscht ist (Calusinska et al. 2016, Zhang et al. 2017, Heyer et al. 2019a). Der erfasste Anteil an Phagen/Viren-Proteinen war mit knapp 0,3 % gering. Allerdings wurden in den untersuchten Biogasfermentern/-anlagen erhebliche Unterschiede in den relativen Häufigkeiten der erfassten Phagen/Viren-Proteinen aufgezeigt. Während die Mehrzahl der untersuchten Fermenter sehr geringe Abundanzen zeigten, wurden in einigen Biogasfermentern (z.B. BGA34_F) bis zu 3,4 % aller Metaproteine Phagen zugeordnet. Da Phagen/Viren deutlich kleiner sind als ihre pro- und eukaryotischen Wirte, sind sie vermutlich den Mikroorganismen in ihrer Anzahl um ein Vielfaches überlegen und könnten somit einen maßgeblichen Einfluss auf den Biogasprozess haben (Heyer et al. 2019a). Die abundantesten Phagen sind *His Virus 1* und *Bacillus phage*. Bacillusphagen wurden bereits bei Heyer et al. (2019a) nachgewiesen. *His Virus 1*, eigentlich Salterprovirus, kann halophile Archaeen aus der Abteilung der Euryarchaeota infizieren (Bath et al., 2006). Die hier nachgewiesenen Viren könnten potenziell eine neue Gruppe von Viren darstellen, die methanogene Archaeen infizieren können. Die Phagen induzierte Zellyse der Mikroorganismen könnte durch das Abtöten der Mikroorganismen den Abbau der Biomasse für Methan verlangsamen. Auf der anderen Seite könnte die Lyse der Mikroorganismen für auxotrophe Mikroorganismen, also Mikroorganismen, die bestimmte essenzielle Substanzen nicht selbständig synthetisieren können und somit darauf angewiesen sind, diese Stoffe aus der Umwelt aufzunehmen, eine wichtige Quelle für Vitamine, Co-Faktoren und Aminosäuren sein (Heyer et al. 2019a). Zur Erfassung der Bedeutung von Phagen/Viren im Gesamtgefüge des Biogas-Mikrobioms und damit verbunden ihrer Bedeutung für die Stabilität und Effizienz des Prozesses der Biogasproduktion ist weitere Forschung erforderlich.

Unabhängig von der potenziell regulatorischen Funktion von Phagen/Viren lag der Schwerpunkt zur funktionellen Diversität im Rahmen des Projektes auf der Erfassung von Metaproteinen, die die biochemische Prozesskette abdecken. Die am häufigsten erfassten biologischen Prozesse waren `Transport von Zuckern, Peptiden, Ionen, Vitaminen und Co-Faktoren` (26,1 % ± 13,4 %), `Methanogenese` (13,3 % ± 6,1 %) und `Kohlenstoffmetabolismus` (5,0 % ± 3,4 %). Metaproteine, die der Funktion `Transport` zugeordnet werden konnten, zeigen bei Proteomstudien häufig eine besonders hohe Abundanz. Neben der Bedeutung des Transportes für die Zelle ist hier aber besonders die starke Konservierung der Proteinsequenzen zu nennen, die zu einem überproportionalen Nachweis dieser Funktionen führt. Für die weitere Interpretation der mikrobiellen Funktionen wurden die identifizierten Metaproteine den Schritten des `Anaerobic Digestion Modell 1` (Heyer et al. 2019a) zugeordnet (Abbildung 12-14). Die wichtigsten Schritte sind die Hydrolyse (3,0 % ± 1,3 %), die Fermentationen inklusive Glykolyse als zentralem Stoffwechselweg (7,5 % ± 2,2 %) und die Methanogenese (17,1 % ± 8,9 %).

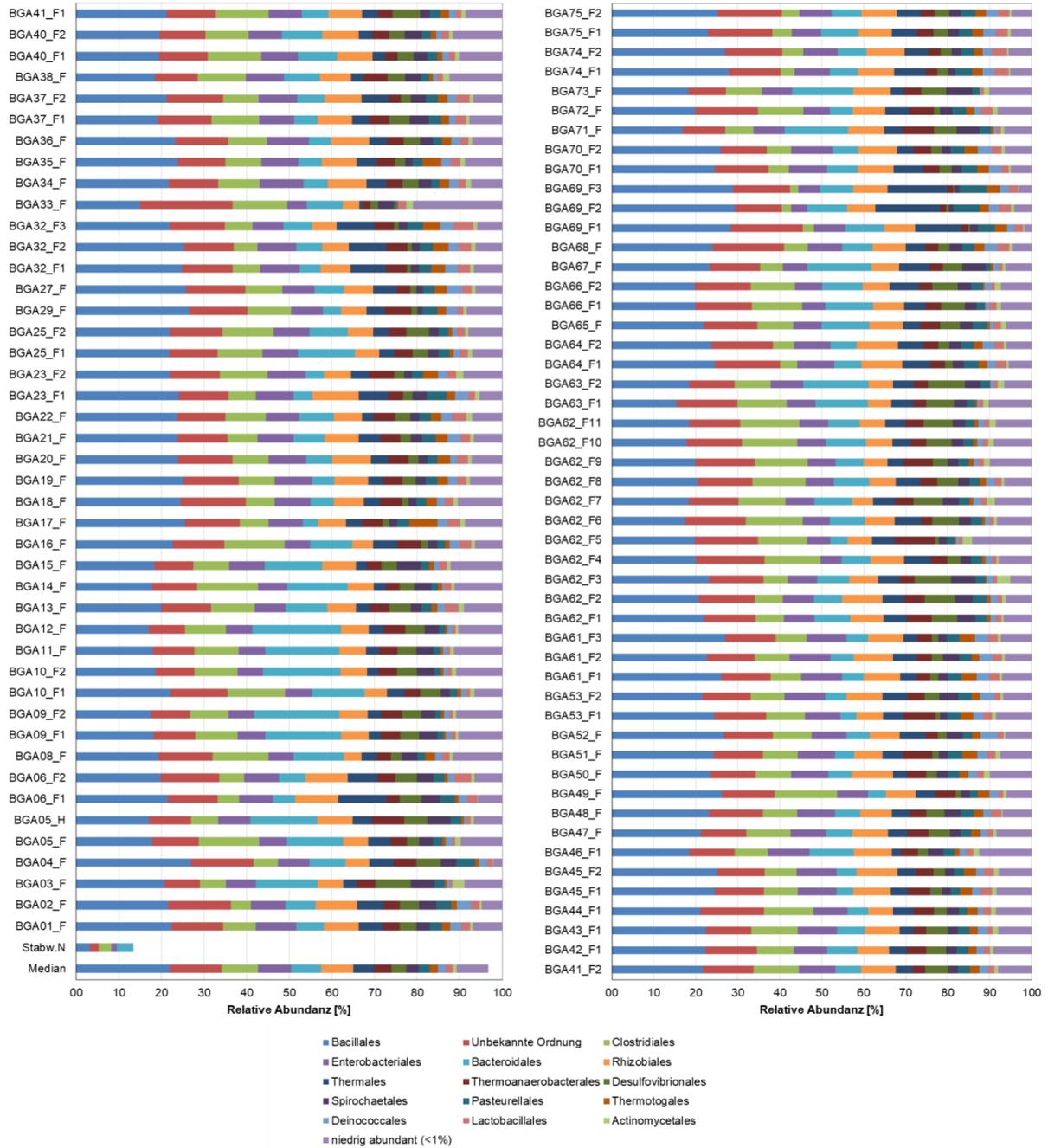


Abbildung 10: Profile der 'tatsächlich' aktiven bakteriellen Taxa auf Ordnungsebene von 95 untersuchten Biogasfermentern basierend auf der Metaproteomanalyse (Angaben in Prozent bezogen auf die Gesamtabundanz von Metaproteinen der Bakterien).

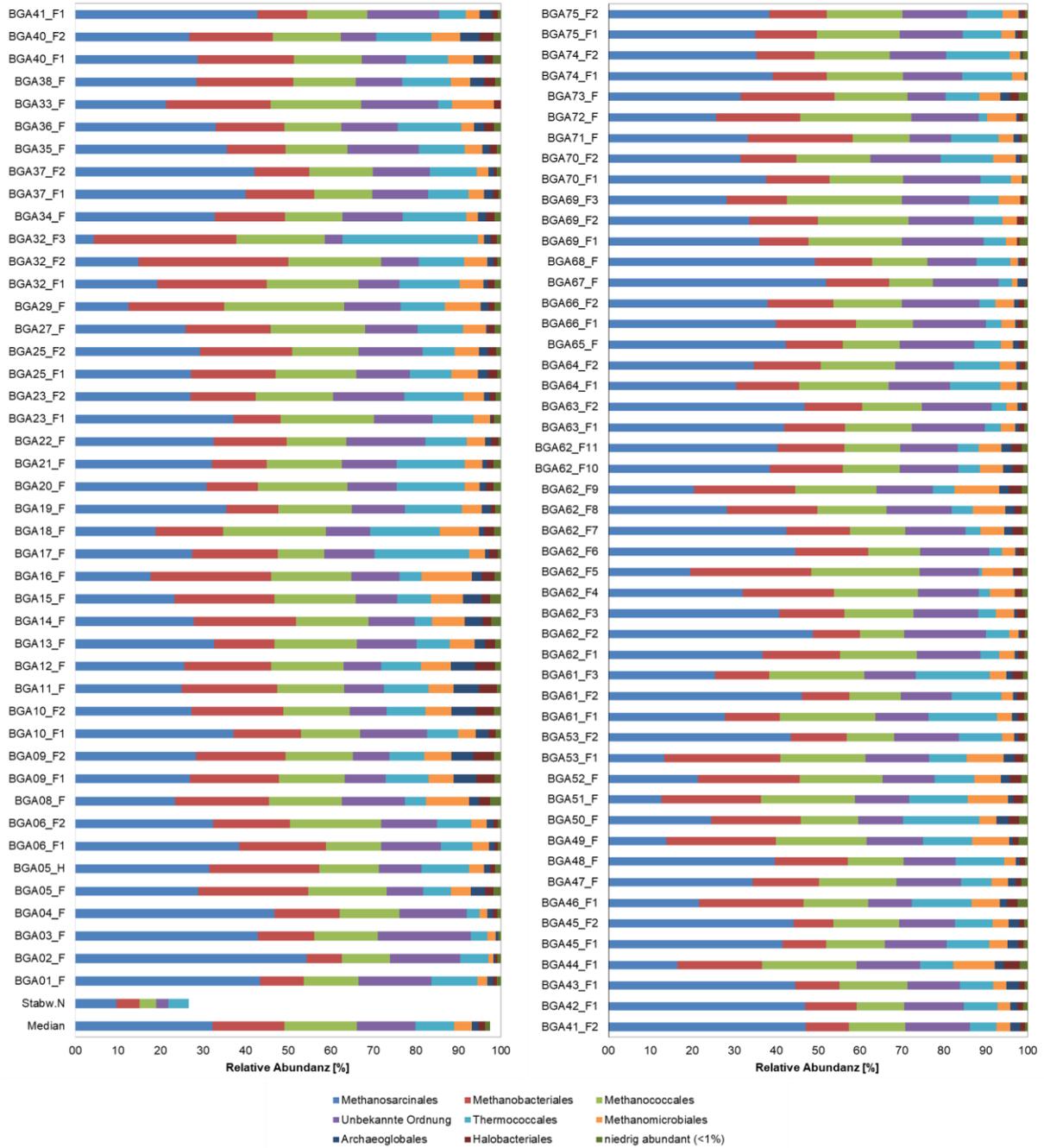


Abbildung 11: Profile der `tatsächlich` aktiven archaeellen Taxa auf Ordnungsebene von 95 untersuchten Biogasfermentern basierend auf der Metaproteomanalyse (Angaben in Prozent bezogen auf die Gesamtabundanz von Metaproteinen der Archaeen).

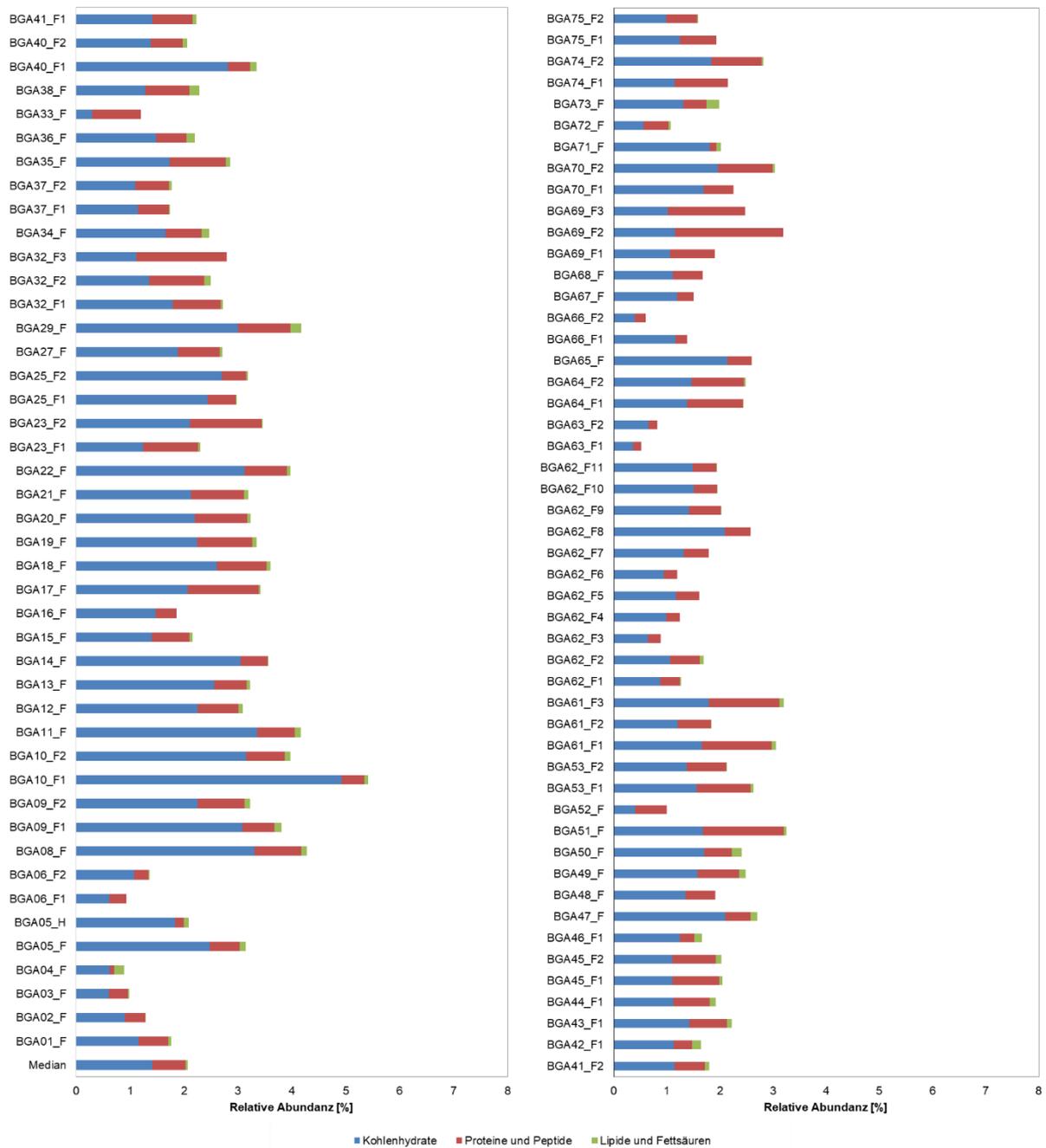


Abbildung 12: Hydrolytisch wirksame Enzyme der mikrobiellen Gemeinschaft in den 95 untersuchten Biogasfermentern/-anlagen basierend auf der Zuordnung der erfassten Metaproteine zu den Schritten des `Anaerobic Digestion Modells 1`. Prozentuale Angaben beziehen sich auf die Gesamtabundanz aller erfassten Metaproteine.

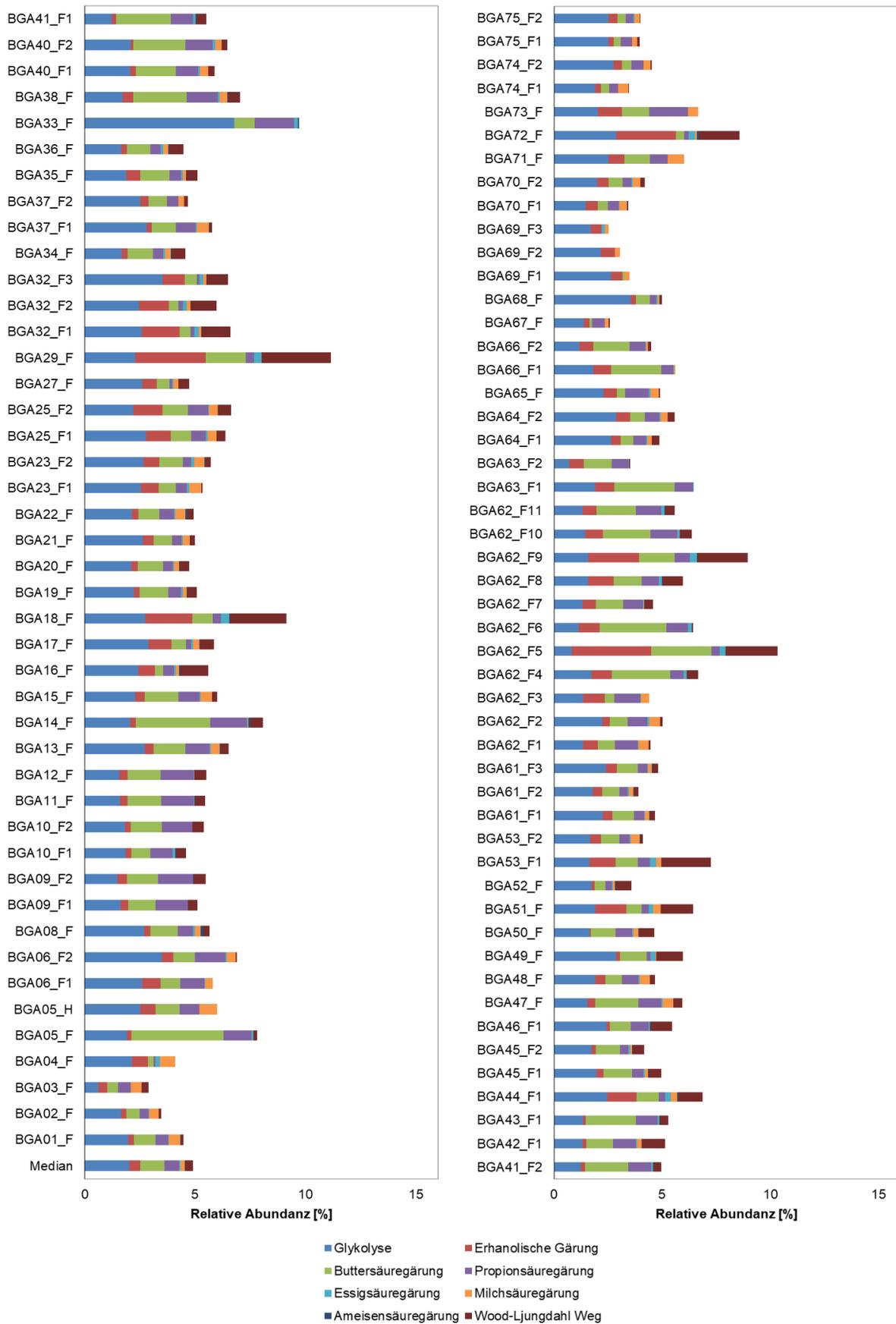


Abbildung 13: Fermentativen Stoffwechselwege der mikrobiellen Gemeinschaft in den 95 untersuchten Biogasfermentern/-anlagen basierend auf der Zuordnung der erfassten Metaproteine zu den Schritten des `Anaerobic Digestion Modells 1`. Prozentuale Angaben beziehen sich auf die Gesamtabundanz aller erfassten Metaproteine.

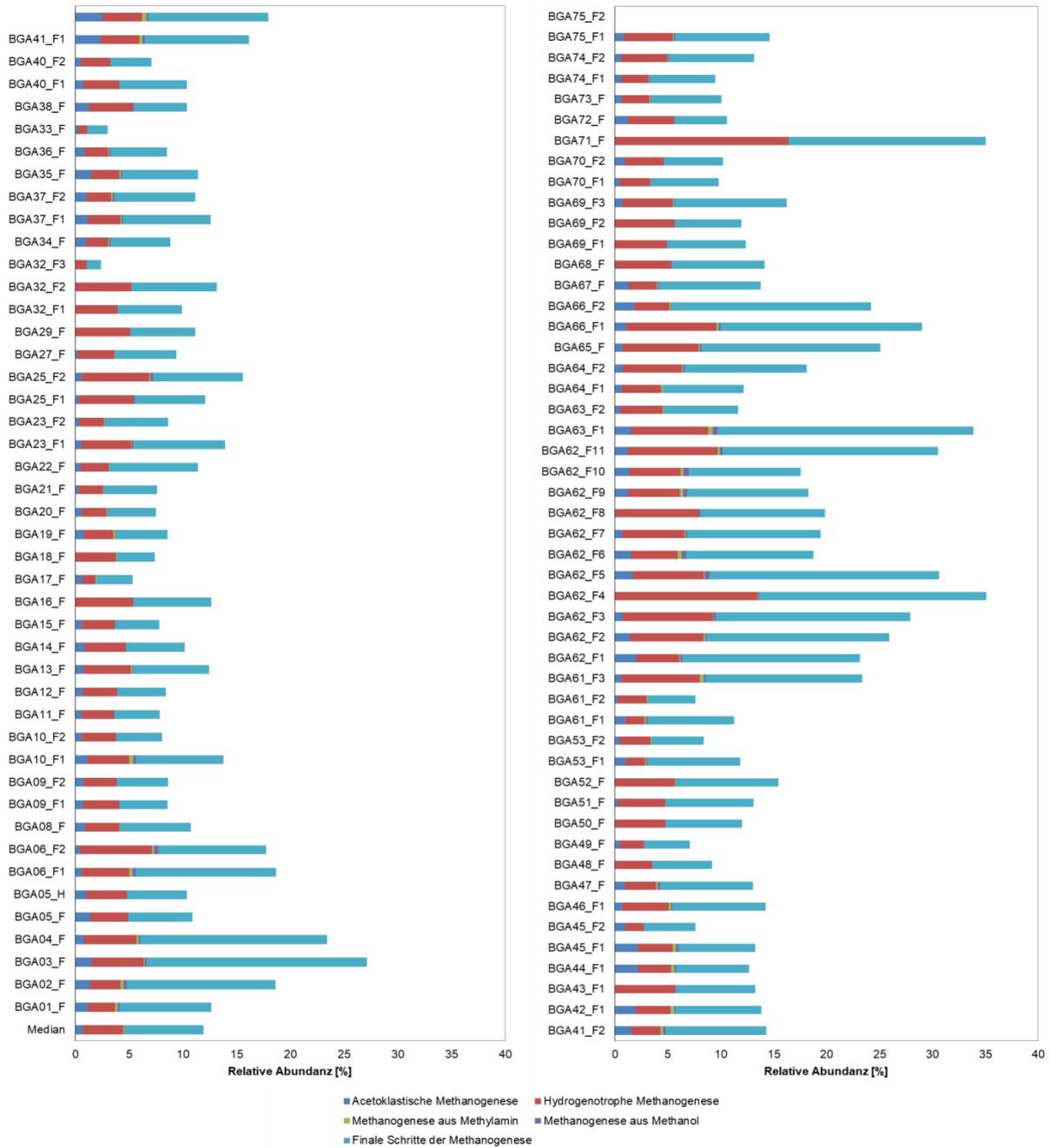


Abbildung 14: Methanogene Stoffwechselwege der mikrobiellen Gemeinschaft in den 95 untersuchten Biogasfermentern/-anlagen basierend auf der Zuordnung der erfassten Metaproteine zu den Schritten des 'Anaerobic Digestion Modells 1'. Prozentuale Angaben beziehen sich auf die Gesamtabundanz aller erfassten Metaproteine.

Ein Abgleich der erfassten metabolischen Funktionen mit den Schritten des `Anaerobic Digestion Modells 1´ (ADM 1) zeigte, dass Metaproteine, die der Hydrolyse von Kohlenhydraten ($1,9\% \pm 1,1\%$) und Proteinen ($0,8\% \pm 0,5\%$) zugeordnet werden konnten, am häufigsten gefunden wurden (Abbildung 12). Der Abbau von Lipiden (Fetten) war nur schwach nachweisbar ($0,1\% \pm 0,1\%$). Diese Beobachtungen können mit der Zusammensetzung der Einsatzstoffe in den untersuchten Biogasanlagen in Zusammenhang gebracht werden, in denen überwiegende pflanzliche Biomassen mit hohen Anteilen polymerer Kohlenhydrate (z.B. Zellulose) und Proteine verwertet wurden.

Der wichtigste fermentative Stoffwechselweg in den 95 Biogasfermentern war die Glykolyse mit $2,8\% \pm 1,2\%$ (Abbildung 13). Da die Glykolyse ein zentraler Prozess im Energiestoffwechsel fast aller Organismen ist, war eine hohe Abundanz der prozessbezogenen Metaproteine zu erwarten. Darüber hinaus konnten alle im ADM 1 abgebildeten fermentativen Stoffwechselwege erfasst werden, wobei Metaproteine, die der Buttersäuregärung und der Propionsäuregärung zugeordnet wurden mit $1,4\% \pm 1,0\%$ bzw. $0,8\% \pm 0,6\%$ am häufigsten erfasst wurden (Abbildung 13). Interessanterweise wurden zudem Metaproteine erfasst, die der ethanolischen Gärung ($0,8\% \pm 0,7\%$), der Milchsäuregärung ($0,3\% \pm 0,3\%$) sowie der Ameisensäuregärung ($0,03\% \pm 0,01\%$) zugeordnet wurden (Abbildung 13); Prozesse, die im ADM 1 nicht berücksichtigt werden. Die Zuordnung zu den fermentativen Stoffwechselwegen erlaubt keine Beurteilung, in welcher Richtung diese Wege benutzt werden, also ob organische Säuren produziert oder verbraucht werden, denn für beide Wege werden die gleichen Enzyme gebraucht (Sikora et al. 2019). Es ist davon auszugehen, dass sowohl Säuren produziert werden als auch, dass organische Säuren und Alkohole (Buttersäure, Propionsäure, Valeriansäure und Ethanol) zu Essigsäure und/oder Kohlendioxid (CO_2) und Wasserstoff (H_2) umgesetzt werden. Der bisher noch nicht erwähnte Wood-Ljungdahl-Weg ($0,5\% \pm 0,8\%$) ist ein sehr bekanntes Beispiel dafür, dass einige Enzyme zwei entgegengesetzte Stoffwechselwege katalysieren können; in diesem Fall entweder die Homoacetogenese oder die syntrophe Acetatoxidation (Manzoor et al. 2018). In welche Richtung der Wood-Ljungdahl-Weg benutzt wird, lässt sich am besten mit einem Blick auf die Zusammensetzung der archaeellen Gemeinschaft (Abbildung 11) und der damit verbundenen Wege der Methanogenese (Abbildung 14) klären.

Die finalen Schritte der biochemischen Prozesskette, also Metaproteine, die der Methanogenese zugeordnet wurden, wurden mit der höchsten Abundanz nachgewiesen ($10,3\% \pm 6,4\%$, Abbildung 14). Da die finalen Enzyme der acetoklastischen und der hydrogenotrophen Methanogenese identisch sind, sind sie nicht für eine Differenzierung zwischen den beiden Wegen geeignet. Der Nachweis von spezifischen Enzymen für den jeweiligen Weg (acetoklastisch $1,0\% \pm 0,8\%$, hydrogenotroph $5,3\% \pm 2,9\%$) zeigt zwei grundlegende Muster: (i) Biogasfermenter mit fast ausschließlich hydrogenotropher Methanogenese sowie (ii) Biogasfermenter mit acetoklastischer und hydrogenotropher Methanogenese, die auch schon in früheren Studien beobachtet wurden (z.B. Heyer et al. 2019a, Büttner et al. 2019). Prägnante Beispiele für eine ausschließlich hydrogenotrophe Methanogenese sind die Biogasanlagen BGA32 und BGA51. Gleichzeitig wurde in diesen Fermentern eine erhöhte Menge an Proteinen erfasst, die dem Wood-Ljungdahl-Weg zugeordnet wurden. Da keine acetoklastische Methanogenese stattfindet, wird die von den sekundären Gärern gebildete Essigsäure über den Wood-Ljungdahl-Weg in Richtung der syntrophen Acetatoxidation abgebaut. Der dabei entstehende Wasserstoff wird dann von hydrogenotrophen Archaeen, die in Syntrophie mit den Bakterien leben, abgebaut (Hattori et al. 2008, Westerholm 2016).

II.1.2.5 Vergleichende Datenauswertung

Im Rahmen von Projektteil 1 „Inventarisierung“ wurden die mikrobiellen Gemeinschaften von 95 Fermentern von 60 Biogasanlagen mittels 16S rRNA-Gen-Amplikonsequenzierung taxonomisch und mittels Metaproteomanalysen funktionell profiliert. Aus diesem Datensatz wurden 59 Fermenter von 46 Biogasanlagen ausgewählt, um eine vergleichende systemökologische Auswertung mit verfügbaren Anlagen- und Prozessdaten durchzuführen. Ziele dieser Auswertung waren (1) die Ermittlung von grundsätzlichen Gemeinsamkeiten und Unterschieden innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften, (2) die Ermittlung des Einflusses von Anlagen- und Prozessdaten auf die strukturelle und funktionelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften, sowie (3) die Ermittlung des Einflusses der mikrobiellen Gemeinschaften auf die Prozesseffizienz.

In einem ersten Schritt wurden die taxonomischen Profile basierend auf 16S rRNA-Gen-Amplikonsequenzen und der `tatsächlich´ aktiven Taxa basierend auf Metaproteinanalysen gegenübergestellt (Abbildung 15 und 16).

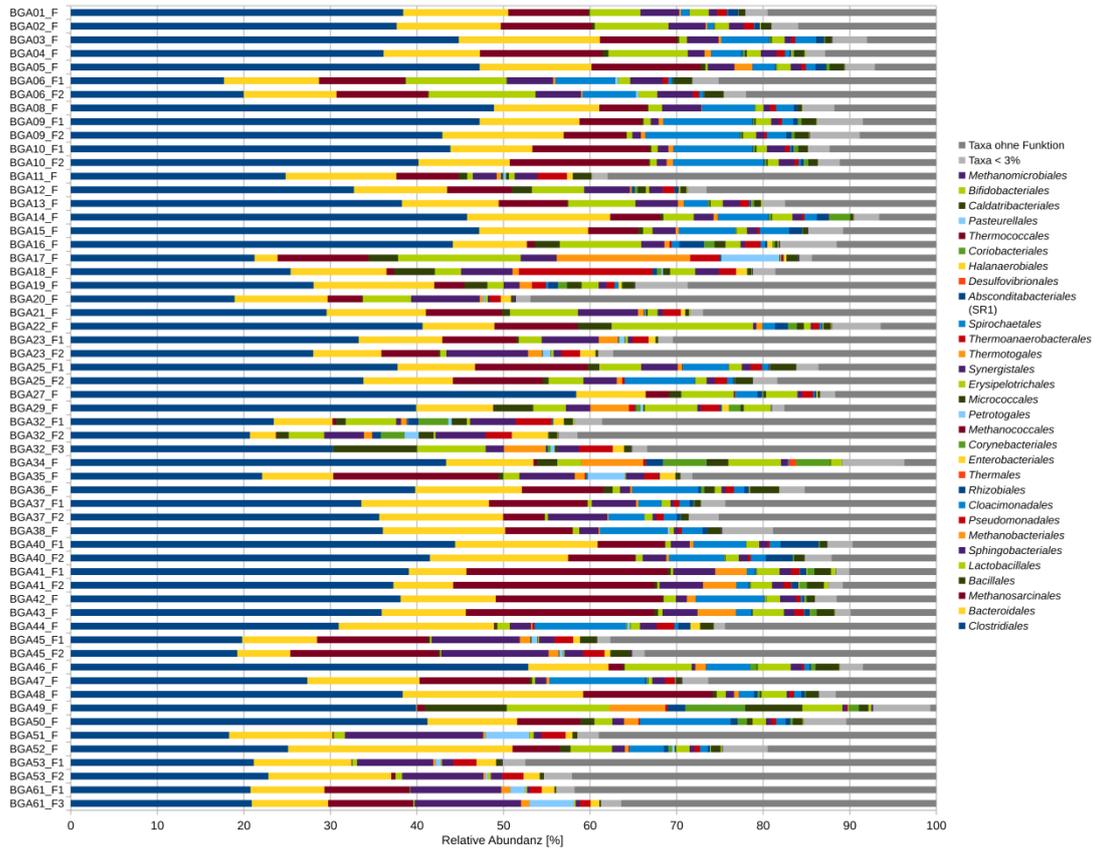


Abbildung 15: Taxonomische Profile auf Ordnungsebene von 46 untersuchten Biogasanlagen basierend auf der 16S rRNA-Gen-Ampliconsequenzierung.

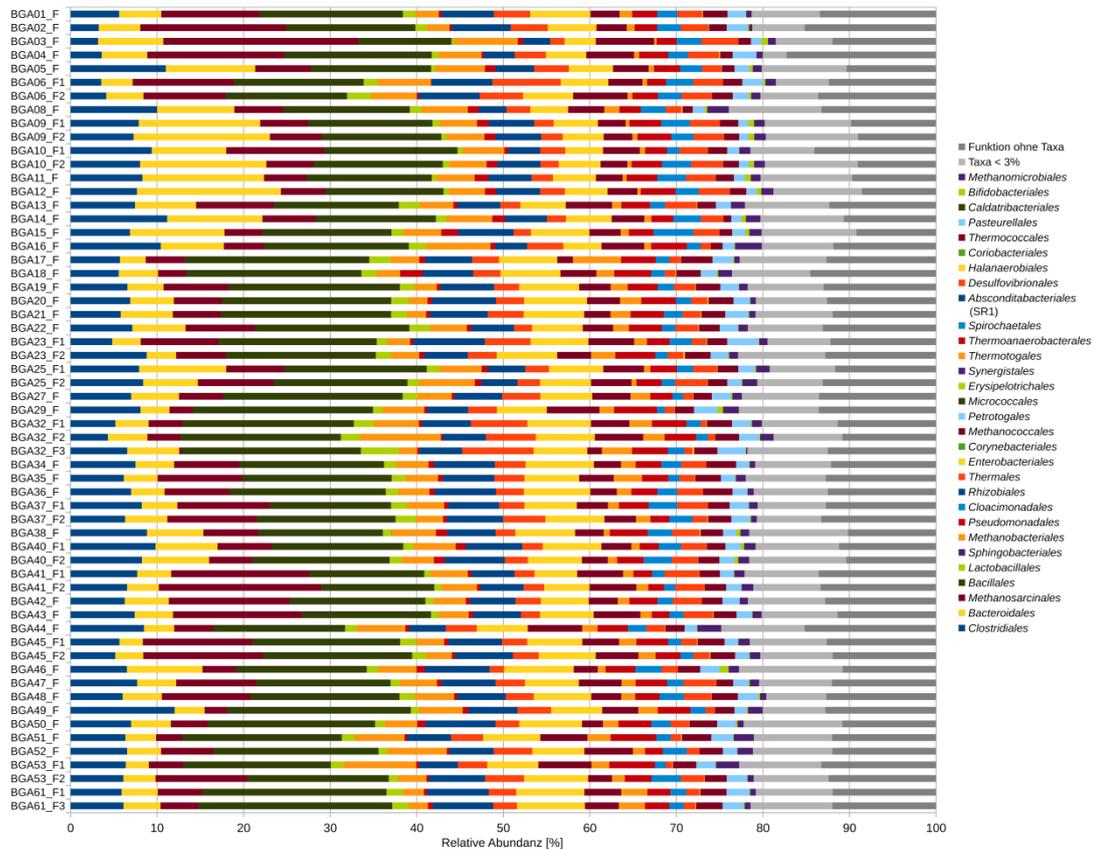


Abbildung 16: Profile der 'tatsächlich' aktiven Taxa auf Ordnungsebene von 46 untersuchten Biogasanlagen basierend auf der Metaproteomanalyse.

Grundsätzlich zeigt dieser Vergleich, dass die erfassten Taxa (hier dargestellt auf Ordnungsebene) auch physiologisch aktiv waren. Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch in der relativen Häufigkeit der erfassten Taxa im Vergleich zur erfassten relativen Häufigkeit der `tatsächlich` aktiven Taxa. Während in den 16S rRNA-Gen-Amplikonaten beispielsweise Vertreter der Ordnung *Clostridiales* deutlich dominierten, waren es in den Metaproteomdaten Vertreter der Ordnung *Bacillales*. Ursachen für diese Diskrepanzen können sehr vielfältig sein: (i) Vertreter der mikrobiellen Gemeinschaft können zwar in einer hoher Individuenanzahl vorliegen, aber keine oder nur eine geringe physiologische Aktivität aufweisen (Oliver 2010, van Viet 2015), (ii) unterschiedliche Mikroorganismen weisen unterschiedliche Zellgrößen (Portillo et al. 2013) und damit unterschiedliche Mengen an Proteinen auf, (iii) die Effizienz der verschiedenen Aufschlussmethoden für die DNA- und Proteinextraktion wirkt sich auf die erfassten biologischen Einheiten aus (Heyer et al. 2015, Frau et al. 2019), (iv) die relativen Häufigkeiten der erfassten Taxa könnten aufgrund unterschiedlicher Kopienzahl der 16S rRNA Gene unter- oder überrepräsentiert sein (Angly et al. 2014) und (v) es könnte eine inkorrekte Zuordnung der Metaproteine zu taxonomischen Einheiten insbesondere aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von Vergleichsdaten für die Auswertung von Metaproteindatensätzen vorliegen (Heyer et al. 2017).

Zur Aufklärung der ökologischen Diversität können verschiedene Verfahren der multivariaten Statistik angewandt werden, mit deren Hilfe sich ökologische Kennzahlen für repräsentative Mikroorganismen, Gruppen von Mikroorganismen oder ganze Mikrobiome für spezifische Prozesszustände identifizieren lassen (Paliy and Shankar 2016). Darüber hinaus können Aussagen über Interaktionen zwischen verschiedenen Gruppen abgeleitet werden, z.B. ähnliche Nischenanpassungen gemeinsam vorkommender Arten, potenzielle biotische Interaktionen, Habitataffinitäten oder Differenzierung zwischen Generalisten und Spezialisten. Zur Anwendung kam u.a. die Ähnlichkeitsanalyse (NMDS, Clark et al. 1993), deren formales Ziel es ist, Objekte (z.B. taxonomische oder funktionelle Mikrobiom-Profile verschiedener Biogasfermenter/-anlagen) räumlich so anzuordnen, dass die Abstände zwischen den Objekten im Raum möglichst den erhobenen Un-/Ähnlichkeiten entsprechen. Je ähnlicher die mikrobielle Diversität in den untersuchten Biogasfermenter/-anlagen ist, desto näher liegen die Objekte beieinander. Unterstützend zur Ähnlichkeitsanalyse wurden sog. `Indikatorwerte` bestimmt (Dufréne & Legendre 1997), die die relative Häufigkeit einer bestimmten biologischen Einheit (Taxon oder Protein) im Vergleich zu ihrer relativen Häufigkeit in verschiedenen Gruppen von z.B. Biogasfermentern/-anlagen setzt.

Anhand der Ähnlichkeitsanalyse lassen sich die untersuchten Anlagen auf Basis ihrer taxonomischen und funktionellen Diversität in vier Gruppen unterteilen, wobei die Clusterbildung auf Basis der taxonomischen Diversität leicht stringenter ist als für die funktionelle Diversität (Abbildung 17A und 17B). Wie zu erwarten, hat die Prozesstemperatur einen erheblichen Einfluss sowohl auf die Ausbildung der Mikrobiomstruktur als auch auf die Funktion des Mikrobioms (grünes Cluster in Abbildung 17A und 17B), wobei sich hier die Mikrobiome von thermophil-betriebenen Anlagen (>50°C) noch von denen differenzieren lassen, die einer Prozesstemperatur zwischen 45-50°C unterlagen. Überraschenderweise ist die Temperatur im untersuchten Datensatz der einzige signifikant-korrelierende Parameter ($R^2 = 0,73$, $p = 0,001$). Alle anderen erhobenen Anlagen- und Prozessdaten können aufgrund ihrer geringen Korrelationswerte ($R^2 < 0,6$) genau genommen nicht zur Ermittlung des Einflusses von Anlagen- und Prozessdaten auf die strukturelle und funktionelle Zusammensetzung herangezogen werden. Selbst wenn eine Korrelationstendenz (R^2 zwischen 0,15 und 0,6, $p < 0,05$) berücksichtigt wird (z.B. die Vektoren der gemessenen organischen Säuren in Richtung BGA34 und BGA49, Abbildung 17A), so muss festgehalten werden, dass weder die taxonomische noch die funktionelle Diversität mit den verfahrenstechnischen Anlagen- oder den regulär zur Bewertung des Prozesszustandes erhobenen Prozessdaten erklärt werden kann.

Unabhängig davon, steht die Frage im Raum, ob sich Mikrobiom-Cluster für spezifische Prozesszustände ableiten lassen. Beispielsweise findet sich im Datensatz ein Cluster, das Ko-Fermentationsanlagen (BGA03, BGA05, BGA08, BGA09, BGA14, BGA15, BGA33, BGA40, BGA46, BGA50) beinhaltet (rotes Cluster, Abbildung 17). Diese Anlagen werden mit einer ausgeglichenen Mischung aus Energiepflanzen (hauptsächlich Mais- und Grassilage) sowie Reststoffen aus der Tierhaltung (Rindermist/-gülle oder Schweinegülle) unter mesophilen Bedingungen (36-43°C) betrieben (Tabelle AII-02). Da diese Anlagen in ihren chemischen Parametern keine Auffälligkeiten zeigen (Tabelle AII-3), kann an dieser Stelle vermutet werden, dass die erfasste taxonomische und funktionelle Diversität ein `Marker-Mikrobiom` für stabil-laufende Anlagen darstellen könnte, die mit einer Kombination von Mikroorganismen aus den bakteriellen Abteilungen *Bacteroidetes* und *Cloacimonetes* sowie der archaeellen Gattung *Methanotherix* (syn. *Methanoseta*) korreliert sind (Theuerl et al. (2018).

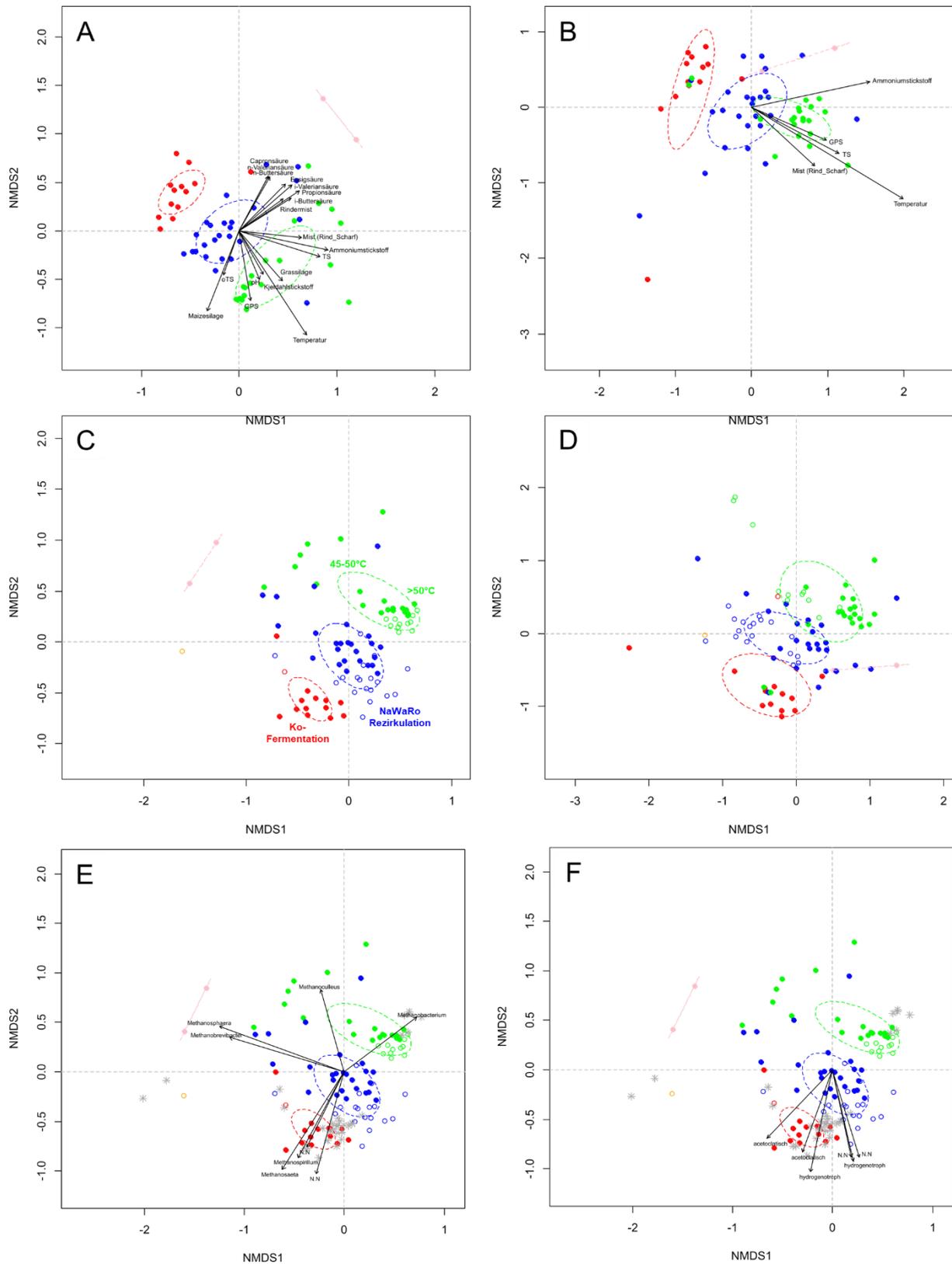


Abbildung 17: Ähnlichkeitsanalyse der Mikrobiome in den mit BMP III – Teil 1 zusammen untersuchten Biogasanlagen basierend auf der erfassten taxonomischen Diversität (A) und der erfassten funktionellen Diversität (B) im Abgleich mit den verfahrensspezifischen Anlagendaten und chemischen Analysedaten sowie der Mikrobiome erweitert um das Datenset aus dem BMEL/FNR-Forschungsvorhabens BIOGAS-LIVE basierend auf der erfassten taxonomischen Diversität (C), der erfassten funktionellen Diversität (D) und der erfassten bakteriellen Diversität im Abgleich mit der archaeellen Diversität (E) und den Stoffwechselwegen der Methanogenese (R). Die Farbcodierung der Biogasanlagen basiert auf einer Clusteranalyse. Ausgefüllte Punkte = BMP III - Anlagen, nicht-ausgefüllte Punkte = Anlagen aus dem BMEL/FNR-Forschungsvorhabens BIOGAS-LIVE.

Zur Verifizierung der oben benannten Vermutung wurde das Datenset aus dem BMEL/FNR-Forschungsvorhabens BIOGAS-LIVE, für das nur die mikrobielle Inventarisierung vorliegt, jedoch keine Anlagen- und Prozessdaten zur Verfügung stehen, einer Ähnlichkeitsanalysen zusammen mit dem Datenset der BMP III - Anlagen unterzogen. Entsprechend der Lage der Proben aus dem BMEL/FNR-Forschungsvorhabens BIOGAS-LIVE im Ordinationsdiagramm kann davon ausgegangen werden, dass die entsprechenden Mikrobiome gleichen Prozessbedingungen ausgesetzt waren (Abbildung 17C, 17D). Eine Indikatorartenanalyse identifizierte Vertreter der bakteriellen Abteilungen *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Atribacter*, *Bacterioidetes*, *Cloacimonetes* und *Chloroflexi* in Kombination mit Vertretern der archaeellen Gattungen *Methanothrix* (syn. *Methanosaeta*) und *Methanospirillum* als Indikatoren für diese Mikrobiomstruktur (Indikatorwert > 0,9, $p > 0,02$) (Abbildung 17E), was die Vermutungen von Theuerl et al. (2018) bestätigt. Darüber hinaus zeigt ein Abgleich mit den erfassten Metaproteinen, dass in diesen Anlagen sowohl hydrogenotrophe Methanogenese (umgesetzt durch Vertreter der Gattung *Methanospirillum*), als auch acetoklastische Methanogenese (umgesetzt durch Vertreter der Gattung *Methanothrix*) stattfindet (Abbildung 17F).

Im Vergleich dazu sind die beiden Cluster 'Temperatur' (grünes Cluster) und 'Säuren' (rosa Cluster) durch Vertreter der archaeellen Gattungen *Methanobacterium* (>50°C-Cluster), *Methanoculleus* (45-50°C-Cluster) sowie *Methanobrevibacter/Methanosphaera* ('Säure'-Cluster, BGA15 und BGA49) und demzufolge durch die hydrogenotrophe Methanogenese gekennzeichnet (Abbildung 17E).

II.1.3 Projektteil 2 „Detailanalyse“

II.1.3.1 Auswahl, Beprobung und Analyse von zehn ausgewählten Biogasanlagen

Für den Projektteil 2 „Detailanalyse“ wurden zwölf Biogasanlagen ausgewählt. In Kooperation mit der Universität Hohenheim wurde ein Versuch zur Fermenter-internen Zonierung an der Versuchsanlage „Unterer Lindenhof“ durchgeführt. Darüber hinaus wurden aus dem Pool der Biogasanlagen, die zusammen mit BMP III – Teil 1 betrachtet wurden, zwölf Anlagen ausgewählt (BGA01, BGA02, BGA05, BGA06, BGA23, BGA32, BGA34, BGA36, BGA37, BGA47, BGA49, BGA50), die sich in verschiedene Anlagenkategorien einordnen lassen: z.B. Anlagen mit saisonaler Zugabe von Zuckerrübensilage, Anlagen, die nur nachwachsende Rohstoffe verwerten, 75 kW-Güllekleinanlagen oder Trockenfermentationsanlagen. Die Probenahmen erfolgten durch die Partner von BMP III – Teil 1, wobei einmal monatlich alle Prozessstufen (Hauptfermenter, Nachgärer, Gärrestlager) der ausgewählten Biogasanlagen beprobt wurden. Die Proben wurden nach Rücksprache gesammelt ans ATB versandt, wo sie zunächst aliquotiert (jeweils 50 ml für die DNA-Analytik, Proteinanalytik, chemische Analytik und Rückstellprobe) und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert wurden.

Für den Projektteil 2 gab es zwei wesentliche Arbeitsschwerpunkte: (i) zeitlich-räumliche Variationen im Fermenter bzw. über alle Prozessstufen einer Anlage und/oder im jahreszeitlichen Verlauf und (ii) Metagenom-/Metaproteomanalysen in Kombination mit einem Isolierungs-/Kultivierungsansatz.

II.1.3.2 Ermittlung lokaler Strukturen innerhalb eines Fermenters

In Kooperation mit der Universität Hohenheim wurde ein Versuch zur Fermenter-internen Zonierung durchgeführt, wobei sowohl das Fütterungs- als auch das Durchmischungsregime variiert wurden. Insgesamt wurden drei experimentelle Phasen definiert:

- | | |
|---------|---|
| Phase 1 | Normalbetrieb: Fütterung 12x pro Tag, Durchmischungsintervalle 20 min h ⁻¹ |
| Phase 2 | Flex-Fütterung: Fütterung 1x pro Tag, Durchmischungsintervalle 16 min h ⁻¹ |
| Phase 3 | reduzierte Durchmischung: Fütterung 12x pro Tag, Durchmischungsintervalle 6 min h ⁻¹ |

Zu vier Zeitpunkten wurde an vier Stellen im Fermenter jeweils oben und unten sowie innen und außen Proben für mikrobiologische Untersuchungen genommen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, dass es keine signifikanten Unterschiede in der strukturellen und funktionellen Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft gab, weder zonal noch im zeitlichen Verlauf (Abbildung 18). Das Mikrobiom der untersuchten Anlage scheint sich sehr homogen im Fermenterraum zu verteilen. Zudem deuten die Ergebnisse auf ein sehr anpassungsfähiges Mikrobiom hin, so dass die durchgeführten Prozessveränderungen keine Auswirkungen auf die Struktur und Funktion des Mikrobioms hatten.

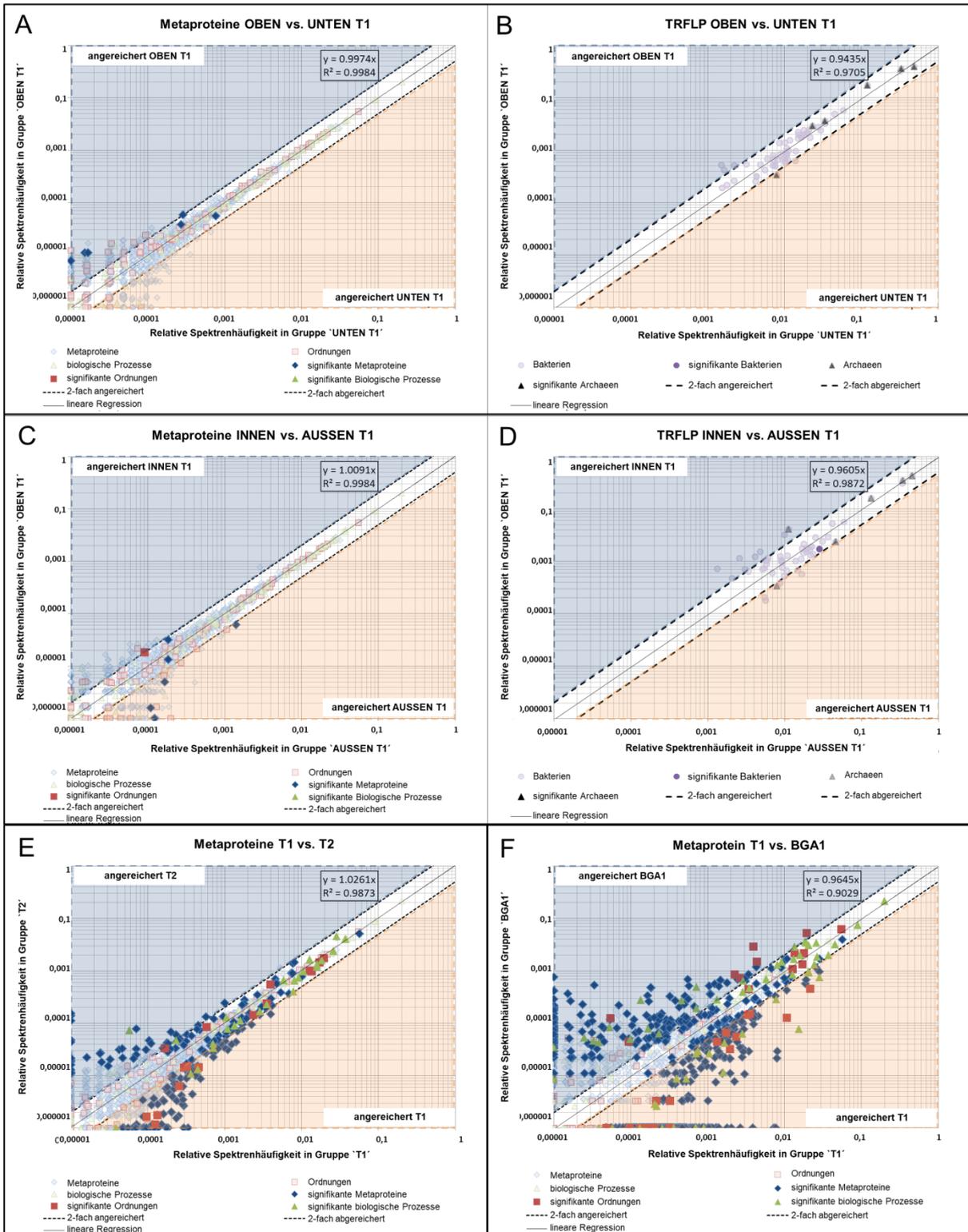


Abbildung 18: Vergleich (Streudiagramm) der lokalen Zonierung der mikrobiellen Gemeinschaften oben und unten im Fermenterraum (A, B) sowie innen und außen im Fermenterraum (C, D) basierend auf den erfassten Metaproteinen (A, C) sowie den erfassten terminalen Restriktionsfragmenten (B, D) zum Zeitpunkt T1 (A-D) sowie im Vergleich T1 und T2 (E) bzw. im Abgleich mit einer anderen Biogasanlage (F). „Blau“: nicht signifikant ($p > 0,05$), „rot“: signifikant ($p < 0,05$)

II.1.3.3 Ermittlung der zeitlich-räumlichen Variationen im jahreszeitlichen Verlauf und/oder über alle Prozessstufen einer Anlage

Für die Ermittlung der zeitlich-räumlichen Variationen im jahreszeitlichen Verlauf und/oder über alle Prozessstufen einer Anlage wurden elf Anlagen untersucht (BGA01, BGA02, BGA05, BGA06, BGA23, BGA34, BGA36, BGA37, BGA47, BGA49, BGA50). Die ausgewählten Biogasanlagen unterschieden sich hinsichtlich ihrer verfahrenstechnischen Betriebsweise (u. a. Reaktortyp, Einsatzstoffzusammensetzung, Raumbelastung/Verweilzeit, Temperatur) und damit auch hinsichtlich ihrer chemischen Prozessdaten (Abbildung 19-22). Wie bereits erwähnt, lassen sich diese Anlagen in verschiedene Kategorien unterteilen (i) Anlagen mit saisonaler Zugabe von Zuckerrübensilage (BGA01, BGA02, BGA05, BGA06 und BGA23), (ii) Anlagen, die nur nachwachsende Rohstoffe verwerteten (BGA05, BGA06, BGA23), (iii) 75 kW-Güllekleinanlagen (BGA34, BGA49, BGA50) oder (iv) Trockenfermentationsanlagen (BGA37, BGA36). Insbesondere in den Anlagen mit saisonaler Zugabe von Zuckerrübensilage (BGA01, BGA02, BGA05, BGA06, BGA37) fiel auf, dass verhältnismäßig große Mengen Fermenterinhalt aus den Nachgärern und/oder Gärrestlagern in die jeweiligen Hauptfermenter rezirkuliert wurden (Abbildung 19). Unabhängig davon, zeigten acht der ausgewählten Biogasanlagen über die gesamte Messphase einen stabilen Prozessverlauf (Abbildung 20-22). Im Vergleich dazu waren die BGA34 (75 kW-Güllekleinanlage) und BGA23 (thermophile Biogasanlage) durch einen sehr instabilen Prozessverlauf gekennzeichnet (Abbildung 22).

Bis auf die 75 kW-Güllekleinanlagen (BGA34, BGA49 und BGA50), bei denen nur der Hauptfermenter im jahreszeitlichen Verlauf mikrobiologisch betrachtet wurde, wurden bei allen anderen Anlagen alle Prozessstufen, d.h. Hauptfermenter, Nachgärer, Gärrestlager, analysiert. Die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften wurde für diesen Arbeitsschwerpunkt in erster Linie mittels TRFLP-Analyse auf Basis der Untersuchung des Gens der 16S rRNA separat für Bakterien und Archaeen erfasst (Protokoll gemäß Rademacher et al. 2012, modifiziert durch Klang et al. 2015, 2019). Die Auswertung der erhobenen mikrobiologischen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms BioNumerics Version 7.6 (Applied Math, Belgien). Unter Anwendung multivariater Statistik wurden die Prozesszustände charakterisiert und die Anpassungsfähigkeit des Mikrobioms an die spezifischen Bedingungen bewertet.

Auffällig in allen Anlagen war, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften der Hauptfermenter sowie der nachgeschalteten Nachgärer bzw. Gärrestlager sehr ähnlich sind (Abbildung 23-25). Dies ist u. a. damit zu begründen, dass verhältnismäßig große Mengen an Fermenterinhalt aus den Nachgärern bzw. den Gärrestlagern in den/die jeweiligen Hauptfermenter der entsprechenden Anlage rezirkuliert wurden (Abbildung 19). Eine Rezirkulation von Fermenterinhalt wird insbesondere aus drei Gründen durchgeführt: (1) um die Abbaueffizienz der zugeführten Einsatzstoffe durch „ausgehungerte“ Mikroorganismen zu erhöhen, (2) um (potenziell) kritische Prozesszustände zu stabilisieren (z.B. BGA23 und BGA34) oder (3) bei Anlagen, die nur nachwachsende Rohstoffe (NaWaRo) oder sehr faserreiche Einsatzstoffe verwerten, um zusätzlich zuzuführende Wassermengen (und damit verbunden zusätzliche Kosten) zu minimieren (z.B. BGA01, BGA02, BGA06, BGA37) (Li et al. 2018, FNR 2016, Zamanzadeh et al. 2016). Aus der Studie von Li et al. (2018) geht hervor, dass die mikrobielle Diversität durch die Rezirkulation insgesamt verringert wurde und sich eine deutliche Dominanz von Vertretern der bakteriellen Abteilungen *Firmicutes* und *Bacteroidetes* in Kombination mit Vertretern der archaeellen Gattung *Methanobacterium* über die Prozessstufen etablierte. Ähnliche Tendenzen finden sich auch in den hier aufgezeigten Ergebnissen (Abbildung 23-24). Die Biogasanlagen BGA01, BGA02, BGA06 und BGA37 zeigten insgesamt sehr ähnliche Zusammensetzungen der mikrobiellen Gemeinschaften (Abbildung 26A und 26C) mit vergleichsweise hohen relativen Häufigkeiten von Vertretern der Abteilungen *Firmicutes* (TRF150) und *Bacteroidetes* (TRF86-98) sowie der archaeellen Gattungen *Methanosarcina* (TRF625) und *Methanobacterium* (TRF338) (Abbildung 23-24).

Betrachtet man die Anlagen, die aus Hauptfermenter, Nachgärer und Gärrestlager bestanden, so kann bei einigen Anlagen festgestellt werden, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften in den Gärrestlagern von denen in den Hauptfermentern und Nachgärer unterschieden (BGA01, BGA02 und BGA06 in Abbildung 23-24). Dieser Unterschied ist insbesondere darauf zurück zu führen, dass die Gärrestlager dieser Anlagen nur geringfügig beheizt wurden. Da die Temperatur einer der entscheidenden Einflussfaktoren auf die Aktivität von Mikroorganismen ist (De Vrieze et al. 2015, Kim & Lee 2016, Theuerl et al. 2018), wirken sich die deutlich niedrigeren Temperaturen von ca. 30°C in den Gärrestlagern auf die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften aus. Darüber hinaus ist aufgrund des fortgeschrittenen Abbauprozesses die Verfügbarkeit von Makro- und Mikronährstoffen in den Gärrestlagern stark eingeschränkt im Vergleich z. B. zum Hauptfermenter, in dem die Mikroorganismen täglich mit frischen Substraten versorgt werden.

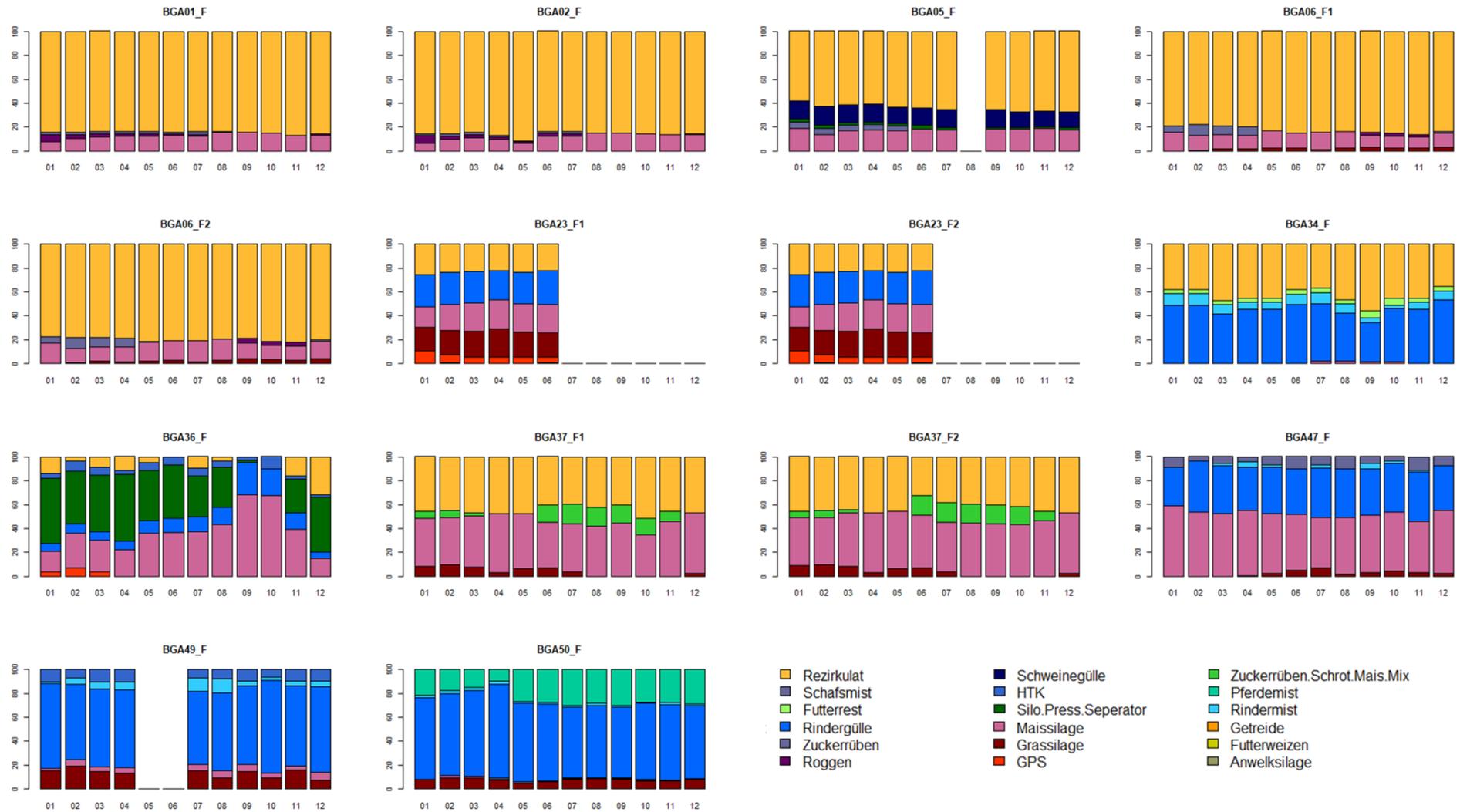


Abbildung 19: Einsatzstoffzusammensetzung in den zehn im Projektteil 2 untersuchten Biogasanlagen.

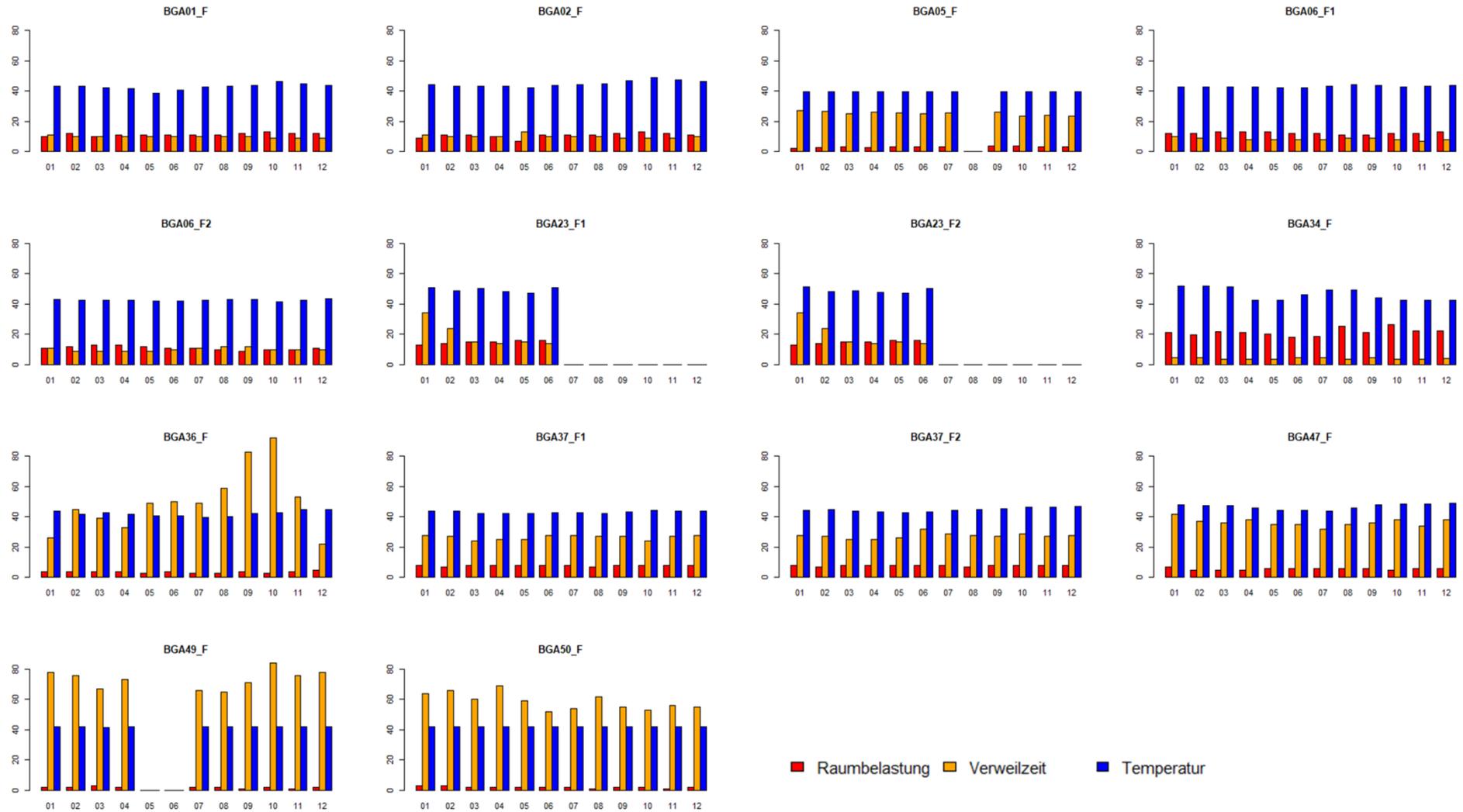


Abbildung 20: Raumbelastungen, Verweilzeiten und Prozesstemperaturen in den zehn im Projektteil 2 untersuchten Biogasanlagen.

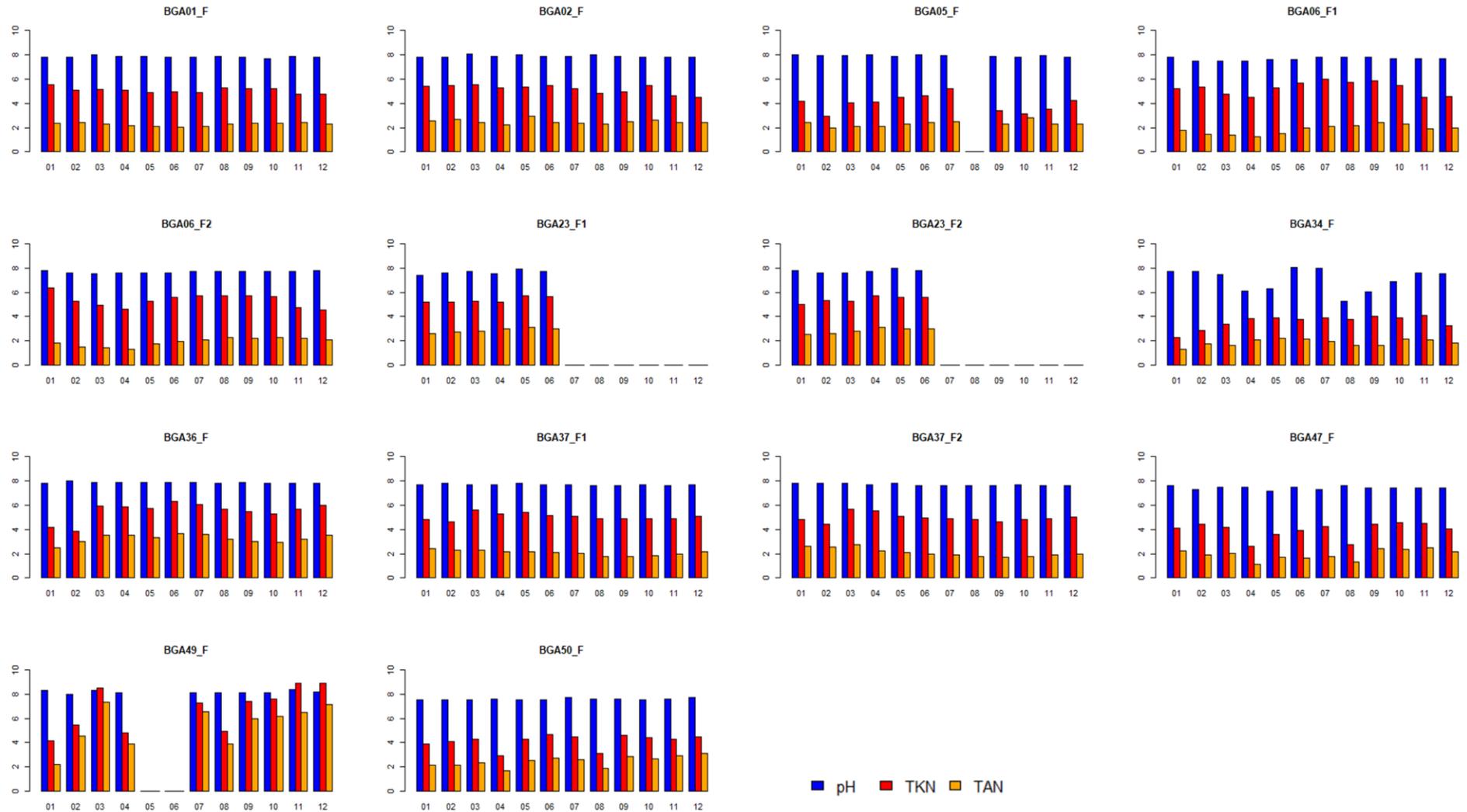


Abbildung 21: pH-Wert, Kjeldahl-Stickstoff (TKN), und Ammonium-Stickstoff (TAN, engl. total ammonium nitrogen) in den zehn im Projektteil 2 untersuchten Biogasanlagen.

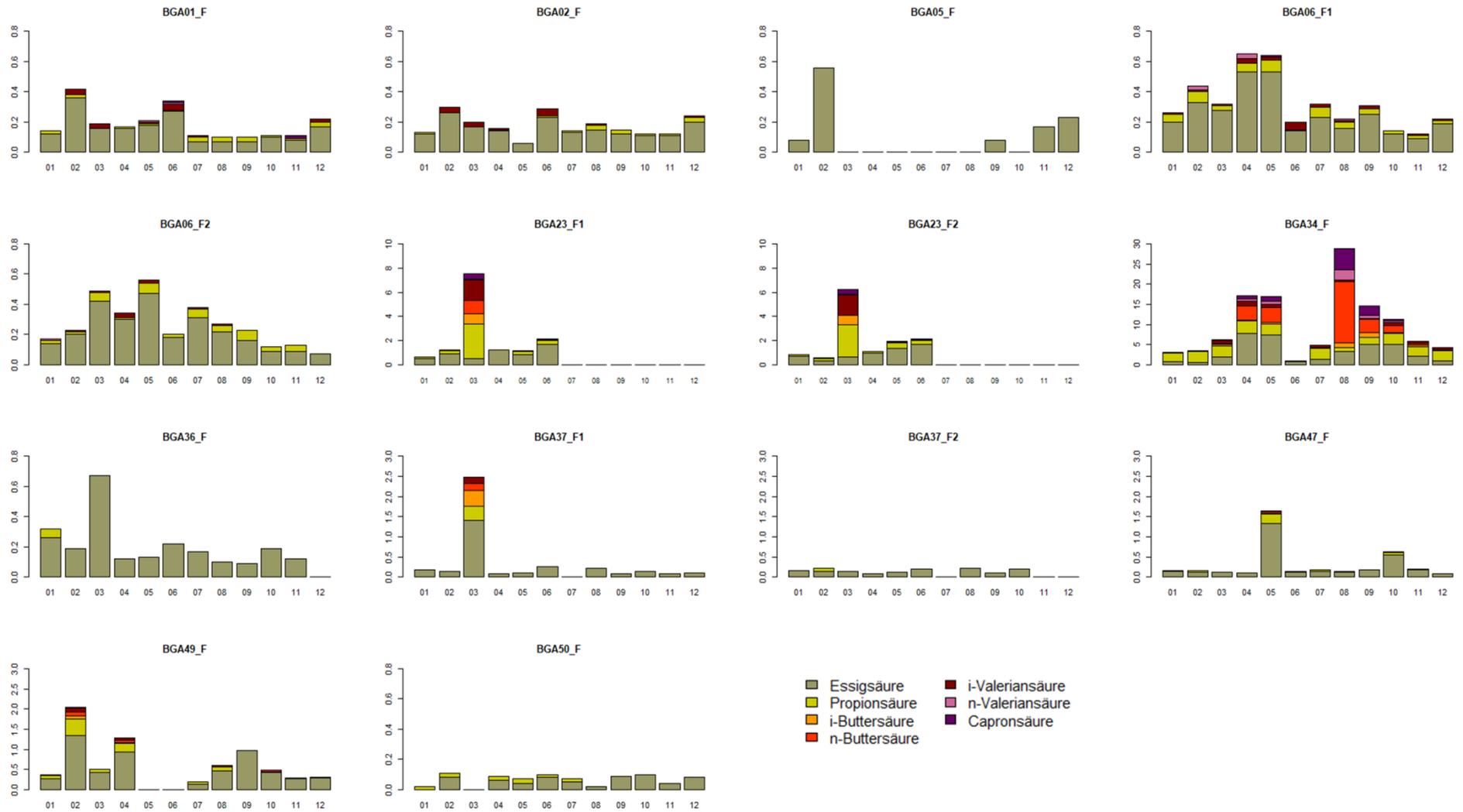


Abbildung 22: Erfasste Säurespektren in den zehn im Projektteil 2 untersuchten Biogasanlagen. Zu berücksichtigen sind die unterschiedlichen Skalierungen der erfassten Säurespektren

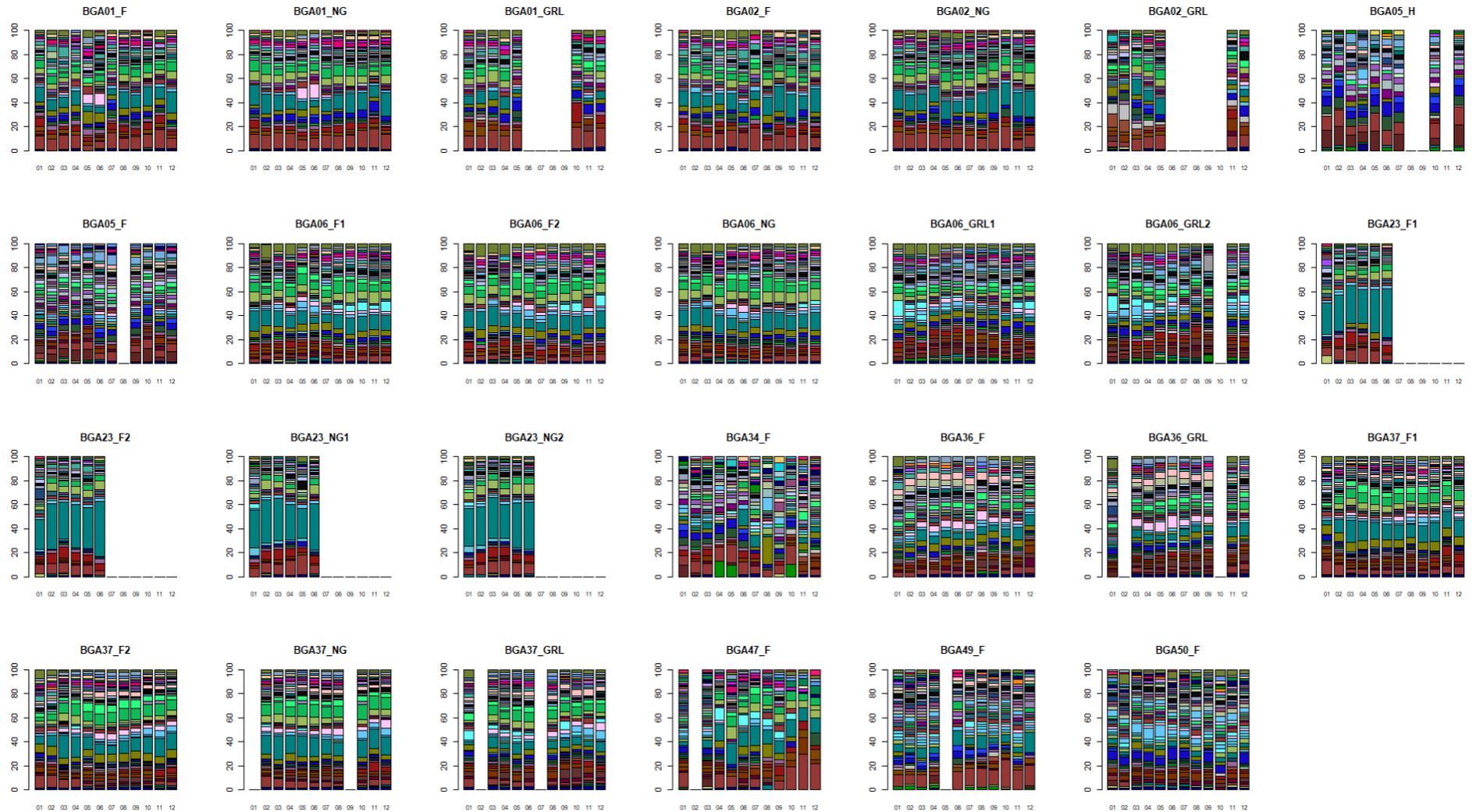


Abbildung 23: Strukturelle Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaften in den zehn im Projektteil 2 untersuchten Biogasanlagen basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken). H = Hydrolyse, F = Fermenter, NG = Nachgärer, GRL = Gärrestlager.

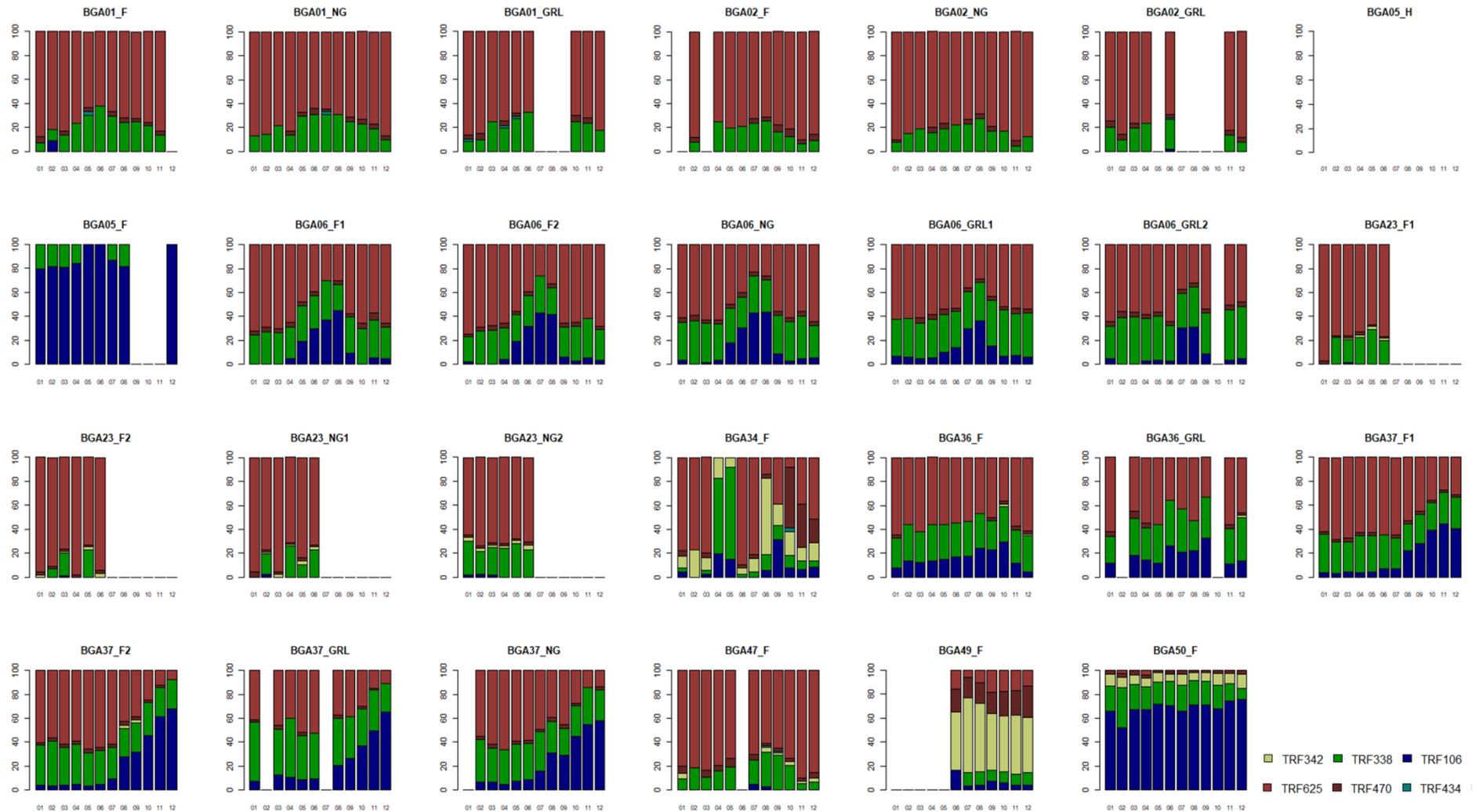


Abbildung 24: Strukturelle Zusammensetzung der archaeellen Lebensgemeinschaften in den zehn im Projektteil 2 untersuchten Biogasanlagen basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken). H = Hydrolyse, F = Fermenter, NG = Nachgärer, GRL = Gärrestlager.

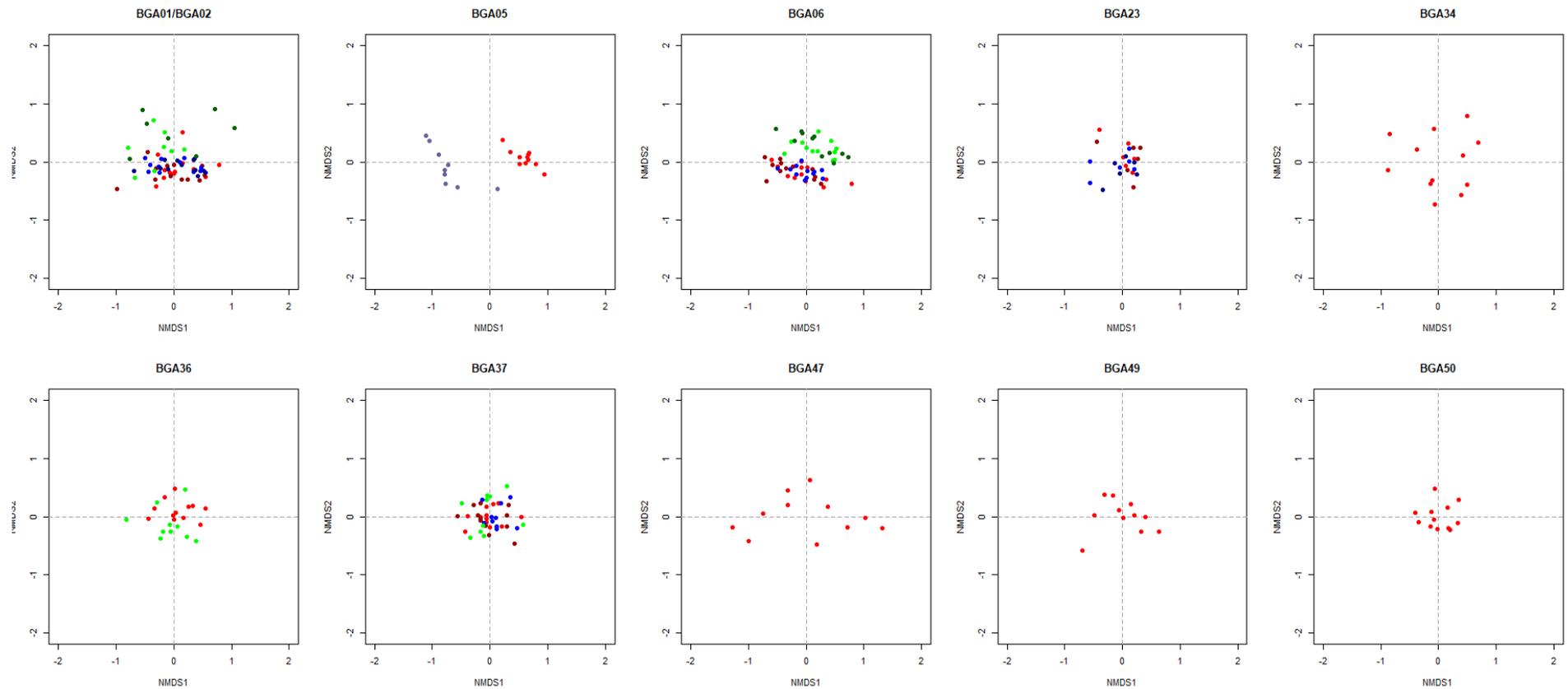


Abbildung 25: Ähnlichkeitsanalyse (engl. non-metric multidimensional scaling, NMDS) der bakteriellen Lebensgemeinschaften aller Prozessstufen einer Anlage im jahreszeitlichen Verlauf. Dargestellt sind die (Un-)Ähnlichkeiten der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (TRFs) bzw. der durch sie symbolisierten bakteriellen Vertreter des Mikrobioms. In Rottönen dargestellt sind die Hauptfermenter der untersuchten Biogasanlagen; in Blautönen die Nachgärer und in Grüntönen die Gärrestlager.

Darüber hinaus zeigt ein Vergleich der Mikrobiom-Strukturen der untersuchten Hauptfermenter, dass sich die Mikrobiome von Anlagen, in denen überwiegend/ausschließlich NaWaRo verwertet wurden von denen unterscheiden, die in der Einsatzstoffzusammensetzung landwirtschaftliche Reststoffe aus der Tierhaltung (z. B. Rindermist/gülle, Schweinegülle, Hühnertrockenkot oder Pferdemist) beinhalten (Abbildung 26). In Biogasanlagen, die pflanzliche Biomassen verwerten, ist die mikrobielle Diversität durch ein hohes Maß an Ähnlichkeiten gekennzeichnet, was sich in der NMDS-Analyse durch eine sehr enge räumliche Nähe der untersuchten Proben zeigt (Abbildung 26). Vertreter des Mikrobioms (symbolisiert durch TRF63, TRF187, TRF180, TRF502), die charakteristisch für die zu grundlegenden Prozessbedingungen sind, können den bakteriellen Abteilungen *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* und *Cloacimontes* zugeordnet werden (Abbildung 26B), wohin gegen sich auf Ebene der Archaeen ein eher inkonsistentes Bild mit einer Präferenz für die Ausbildung einer *Methanosarcinen*-dominierten Gemeinschaft ergibt (Abbildung 24 und 26D). Im Gegensatz dazu zeigen Anlagen mit Reststoffen aus der Tierhaltung eine höhere zeitliche Variabilität/Dynamik innerhalb der mikrobiellen Diversität (Abbildung 26). Zudem lassen sich die Mikrobiome der Anlagen mit Reststoffen aus der Tierhaltung zusätzlich entsprechend der eingesetzten Reststoffe deutlich voneinander differenzieren (Abbildung 26), worauf im Folgenden eingegangen wird.

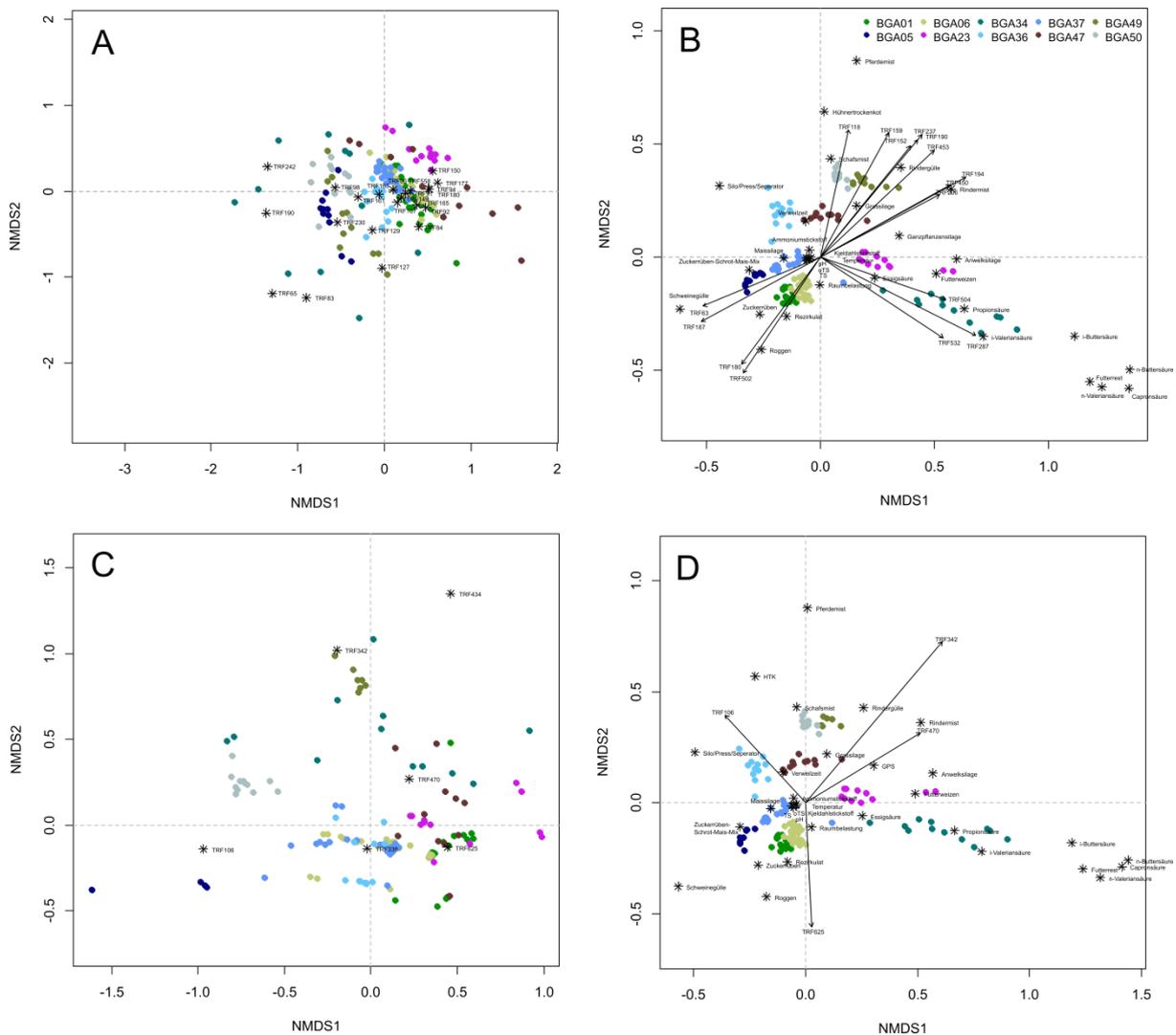


Abbildung 26: Anlagencustering entsprechend einer Ähnlichkeitsanalyse (engl. non-metric multidimensional scaling, NMDS) basierend auf den (Un-)Ähnlichkeiten der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (TRFs) bzw. der durch sie symbolisierten bakteriellen (A) und archaellen (C) Vertreter des Mikrobioms sowie basierend auf den verfahrenstechnischen Anlagendaten und chemischen Prozessparametern der untersuchten Biogasanlagen (B und D) inklusive der für das Anlagencustering charakteristischen bakteriellen (B) und archaellen (D) Vertreter des Mikrobioms dargestellt als Vektoren ($R^2 > 0,25$, $p = 0.001$).

Anlagen, die überwiegend mit Reststoffen aus der Tierhaltung betrieben werden, sind insbesondere Güllekleinanlagen (Stinner et al. 2015), von denen im Rahmen des Projektes wurden drei Anlagen (BGA34, BGA49 und BGA50) im jahreszeitlichen Verlauf untersucht wurden (Abbildung 19-22). Die beiden Anlagen BGA49 und BGA50 (beides Rührkesselfermenter) wurden bei 42°C betrieben, unterscheiden sich jedoch in der Einsatzstoffzusammensetzung: Während in der BGA49, neben den Haupteinsatzstoffen Rindermist/-gülle, Mais- und Grassilage, Hühnertrockenkot (ca. 9 %) verwendet wurde, war in der BGA50 Pferdemit im Einsatzstoffmix (ca. 24%) enthalten (Abbildung 19). Diese beiden Einsatzstoffe scheinen sich maßgeblich auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft auszuwirken (Abbildung 27), wobei beide Anlagen (insbesondere BGA49 mit vermeintlichen hohen Ammonium-Konzentrationen) über den betrachteten Zeitraum einen stabilen Prozessverlauf zeigten (Abbildung 21-22 und Abbildung 28). Wesentliche Unterschiede in der Mikrobiomstruktur finden sich insbesondere auf Ebene der Archaeen: Während die BGA49 eine vermeintlich diverse Archaeengemeinschaft (Vertreter der Gattungen *Methanobacterium*/*Methanobrevibacter* (TRF342), *Methanomassiliicoccus* (TRF470), *Methanosarcina* (TRF625)) aufwies, zeigte die BGA50 eine deutliche Dominanz der Gattung *Methanotherx* (syn. *Methanosaeta*) (TRF106). Im Vergleich zu diesen beiden Anlagen zeigte die BGA34 (Pfropfenströmer, Haupteinsatzstoff Rindermist/-gülle) über die Zeit einen sehr instabilen Prozessverlauf, der sich in einer hohen Variabilität (Streuung) innerhalb des Mikrobioms widerspiegelt (Abbildungen 27-28).

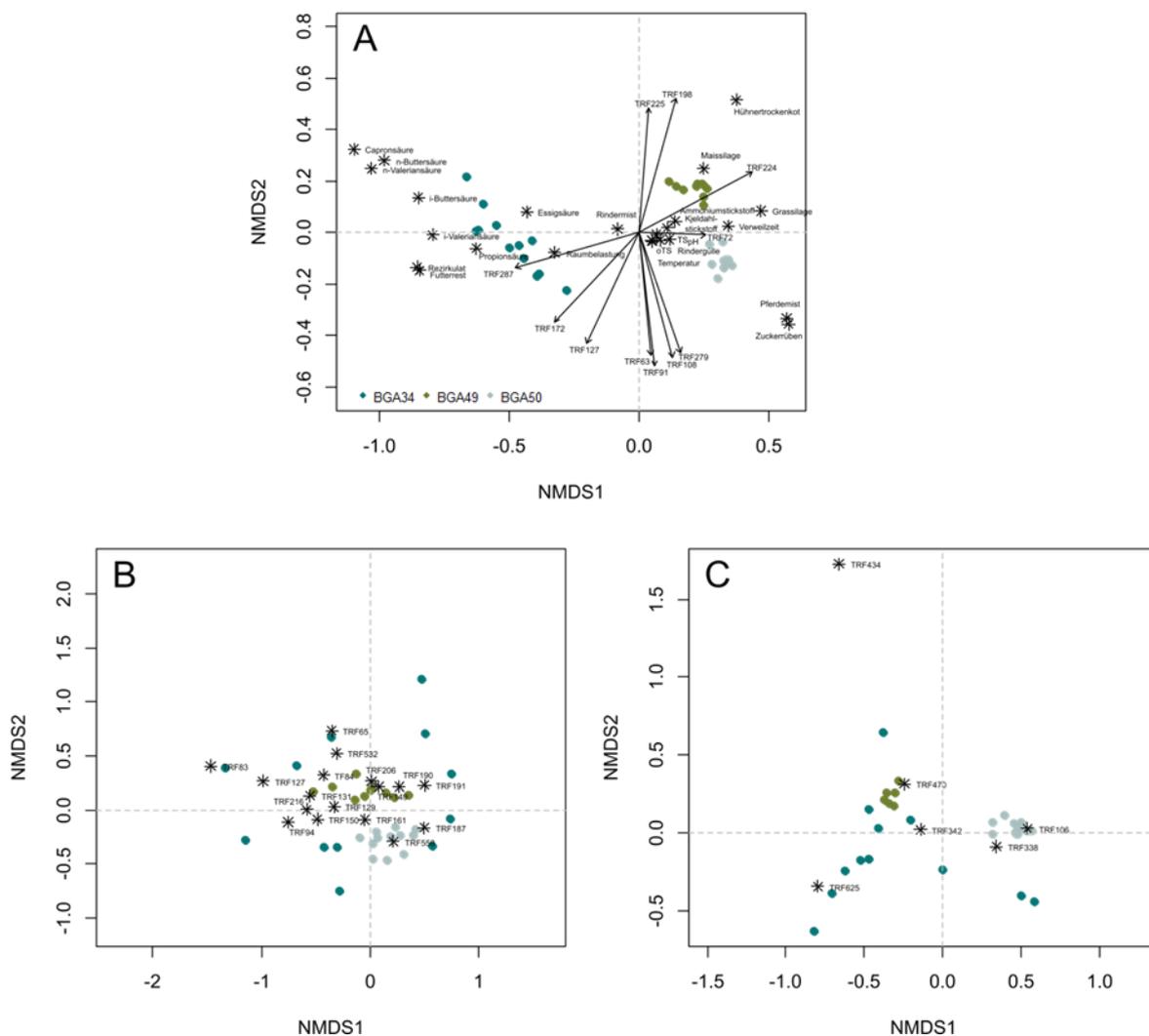


Abbildung 27: Ähnlichkeitsanalyse (engl. non-metric multidimensional scaling, NMDS) der bakteriellen Lebensgemeinschaft im Vergleich der im jahreszeitlichen Verlauf untersuchten Fermenter der 75 KW-Güllekleinanlagen. Dargestellt sind die (Un-)Ähnlichkeiten der Anlagen basierend auf den Prozessdaten im Abgleich mit den erfassten terminalen Restriktionsfragmenten (TRFs) bzw. der durch sie symbolisierten bakteriellen Vertreter des Mikrobioms (A) sowie basierend auf den erfassten terminalen Restriktionsfragmente (TRFs) bzw. der durch sie symbolisierten bakteriellen (B) und archaeellen (C) Vertreter des Mikrobioms. Vektoren der als signifikant erfassten TRFs (schwarz): $R^2 = 0,50$, $p = 0,001$.

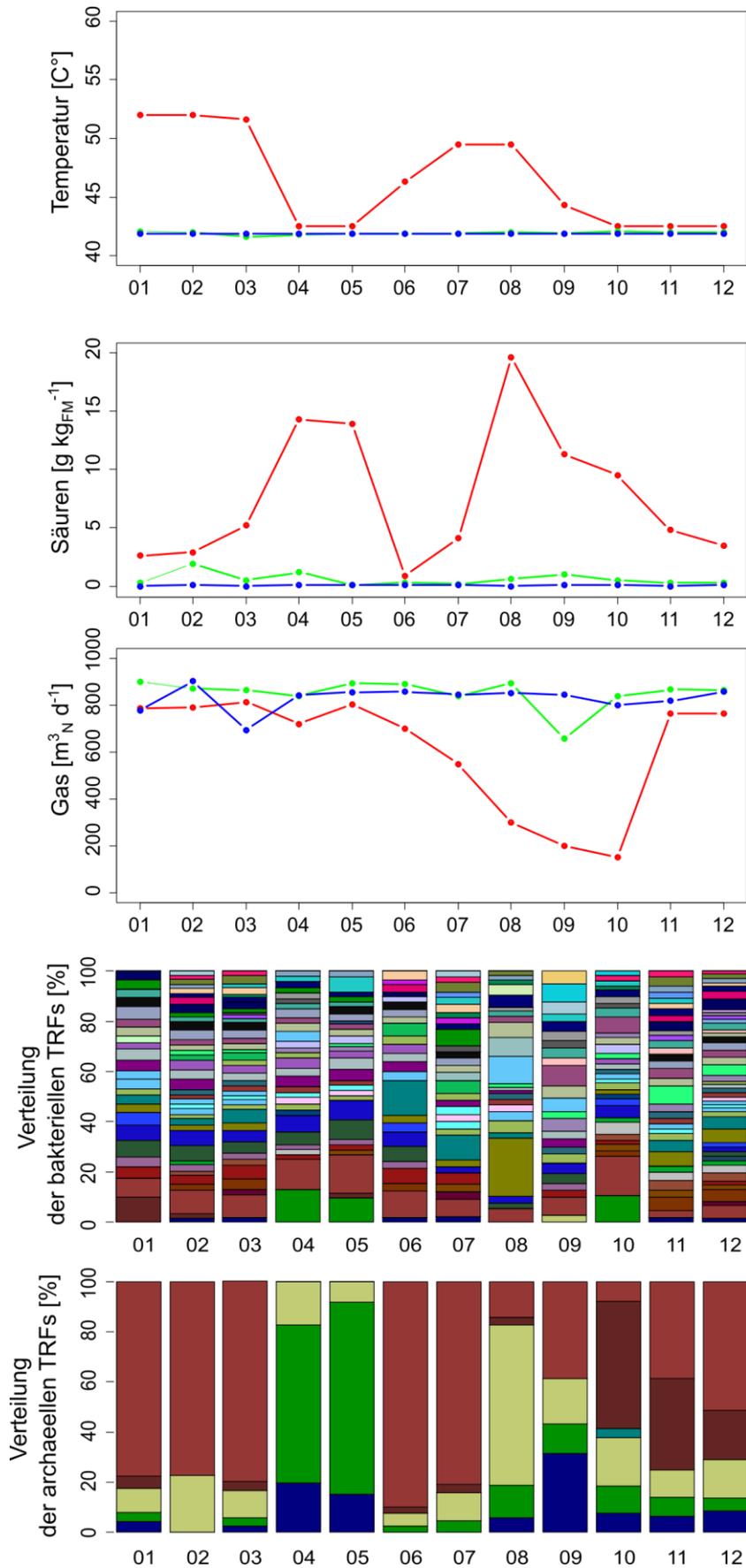


Abbildung 28: Prozesstemperatur (A), Gesamtsäurekonzentration (B), Biogasmenge (C) im Vergleich der drei untersuchten 75 kW-Güllekleinanlagen BGA34 (rot), BGA49 (grün) und BGA50 (blau) sowie die strukturelle Zusammensetzung der bakteriellen (D) und archaeellen (E) Lebensgemeinschaften basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken) der BGA34.

Die BGA34 gilt eigentlich als eine thermophil-betriebene Anlage (52°C). Grundsätzlich gilt, dass höhere Prozesstemperaturen zu einer erhöhten Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen führt und so pro Zeiteinheit mehr Biomasse in Biogas umgewandelt werden kann (Kim & Lee 2016, Luo et al. 2015, Maus et al. 2020, Weiland 2010, Westerholm et al. 2018). Mit einer erhöhten Stoffwechselaktivität stehen auch höhere Abbauraten mit einer beschleunigten Freisetzung von organischen Säuren und anderen potenziell prozesshemmenden Metaboliten wie Ammonium/Ammoniak oder Schwefelwasserstoff in Verbindung, wodurch ein erhöhtes Risiko für instabile Prozessbedingungen besteht (Theuerl et al. 2019b). Genau diese Zusammenhänge finden sich bei der BGA34 (Abbildung 28). Auf einen Säureanstieg (Abbildung 28), der mit einer Veränderung in der strukturellen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften einherging (Abbildung 28D und 28E), reagierte der Anlagenbetreiber zum einem mit einer Absenkung der Prozesstemperatur von 52°C auf 43°C, zum anderen mit einer Erhöhung der zugeführten Rezyklatmenge von 10 m³ d⁻¹ auf 15 m³ d⁻¹. Beide Modifizierungen führten über einen Zeitraum von zwei Monaten offensichtlich zu einer Prozessstabilisierung, wobei die mikrobielle Gemeinschaft sich als resilient, also widerstandsfähig erwies und nach der Störung in ihren Ursprungszustand zurückkehrte (Allison & Martiny 2008). Aufgrund der vermeintlichen Prozessstabilisierung erhöhte der Anlagenbetreiber die Prozesstemperatur wieder, was jedoch erneut zu einer Prozessstörung führte, in diesem Fall einhergehend mit einem massiven Einbruch in der produzierten Biogasmenge (Abbildung 28C). Berücksichtigt man die Mikrobiomstruktur zum Zeitpunkt der vermeintlich stabilen Prozessphase so fällt insbesondere auf Ebene der Bakterien auf, dass diese sich noch nicht vollumfänglich wieder restabilisiert hatte (Vergleich der Zeitpunkte 01-03 mit den Zeitpunkten 06 und 07 in Abbildung 28D und 28E). Dieses Beispiel zeigt, dass Veränderungen im Temperaturregime langsam erfolgen sollten, damit sich die mikrobielle Gemeinschaft an die neuen Umweltbedingungen anpassen kann. Eine zu schnelle Erhöhung oder ein zu schnelles Absenken der Prozesstemperatur birgt ein nicht zu unterschätzendes Risiko von Prozessinstabilitäten/-störungen (Theuerl et al. 2019b). Diese Beobachtung werden durch verschiedene Studien bestätigt, in denen untersucht wurde, wie eine Änderung des Temperaturregimes die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft und damit verbunden die Prozessstabilität beeinflusst (z.B. Kim & Lee 2016, Westerholm et al. 2018). Insbesondere im Temperaturbereich zwischen 44°C und 50°C muss mit instabilen Prozesszuständen gerechnet werden, so wie es sich auch im Fall der BGA34 zeigte. Das Risiko einer Prozessstörung wurde in der BGA34 noch erhöht, da der Anlagenbetreiber der mikrobiellen Gemeinschaft nach der ersten Störung nicht ausreichend Zeit zur Regeneration gegeben hat. Erst eine erneute Temperaturabsenkung auf 43°C gekoppelt mit einer Erhöhung der zugeführten Rezyklatmenge auf 15 m³ d⁻¹, führte über einen Zeitraum von vier Monaten zu einer angemessenen Stabilisierung des Prozesses, wobei die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft auch am Ende des Beobachtungszeitraumes noch durch eine hohe Variabilität gekennzeichnet war. Ähnliches wurde auch für die thermophil-betriebene Anlage BGA23 beobachtet. Hier kam es sogar zu einer so gravierenden Prozessstörung, dass die Anlage entleert und neu angefahren werden musste. Eine detaillierte Untersuchung dieser Anlage, insbesondere unter Berücksichtigung der Systemmikrobiologie, war daher leider nicht möglich. Bezogen auf die Prozessstabilität zeigt der Vergleich der drei 75 kW-Güllekleinanlagen deutlich, dass ein Anlagenbetrieb unter mesophilen Bedingungen zu bevorzugen ist, insbesondere auch dann, wenn Einsatzstoffe verwendet werden, die zur Anreicherung von potenziell prozesshemmenden Metaboliten wie organischen Säuren oder Ammonium/Ammoniak führen können ohne dass verhältnismäßig große Mengen an Fermenterinhalt aus den Nachgärern bzw. den Gärrestlagern in den/die jeweiligen Hauptfermenter der entsprechende Anlage rezykliert werden müssen.

Grundsätzlich lässt sich vermuten, dass Biogasanlagen, in denen große Mengen Fermenterinhalt rezykliert werden, einen stabileren Prozess aufweisen bzw. auch weniger anfällig für Prozessinstabilitäten/-störungen sind (Abbildung 19-22). Dies lässt sich anhand der Untersuchungen der Anlagen BGA01, BGA02, BGA05, BGA06 und BGA37 zeigen. Diese fünf Anlagen wurden mit saisonaler Zugabe von Zuckerrübensilage betrieben, einem Einsatzstoff, der größere Mengen leicht verwertbarer Verbindungen wie Zucker und Alkohole enthält, die vergleichsweise schnell in Säuren und anschließend in Biogas umgesetzt werden (Klang et al. 2015). Eine Umstellung in der Nährstoffverfügbarkeit, z.B. ein erhöhter Anteil sehr leicht verwertbarer Substrate (eingetragen durch die Zuckerrübensilage) möglicherweise in Kombination mit einer erhöhten mikrobiellen Stoffwechselaktivität kann zu Prozessstörungen führen (siehe Schlussbericht FKZ 22013913, Theuerl et al. 2019b). Alle hier betrachteten Anlagen zeigten jedoch über die gesamte Messphase einen stabilen Prozessverlauf (Abbildung 19-22). Dieser spiegelt sich ebenfalls in einer stabilen strukturellen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft über die Zeit wider (Abbildung 23-25). Insbesondere die Anlagen BGA01, BGA02, BGA06 und BGA37 waren durch sehr hohe Rezyklatmengen gekennzeichnet (Abbildung 19), so dass sich der Einfluss der Zuckerrübensilage kaum bemerkbar machte. Bei genauerer Betrachtung der Mikrobiomstruktur insbesondere auf Ebene der Archaeen konnten jedoch Veränderungen beobachtet werden (Abbildung 24). Zu Zeitpunkten der Zugabe von Zuckerrübensilage war die

Archaeengemeinschaft dominiert durch Vertreter der Gattungen *Methanosarcina* (TRF625) und *Methanobacterium* (TRF338), während in der Prozessphasen ohne Zuckerrübensilage der relative Anteil an Vertretern der Gattung *Methanosaeta* (TRF106) deutlich erhöht war (Vergleich Abbildung 19 und 24). Ähnliches wurde für die BGA37 beobachtet, hier jedoch im Zusammenhang mit dem Vorhandensein/Wegfall von Grassilage im Einsatzstoffmix (Vergleich Abbildung 19 und 24). Da es sich bei den vier benannten Anlagen BGA01, BGA02, BGA06 und BGA37 um reine NaWaRo-Anlagen handelte, die mit Mais-, Gras- oder Roggenganzpflanzensilage sowie der saisonalen Zugabe von Zuckerrübensilage unter mesophilen Bedingungen betrieben wurden, ist eine Rezirkulation von Fermenterinhalt aus den Nachgärern und Gärrestlagern in die jeweiligen Hauptfermenter gängige Praxis. Dies erhöht zum einen die Abbaueffizienz der zugeführten Einsatzstoffe durch „ausgehungerte“ Mikroorganismen und zum anderen minimiert es zusätzlich zuzuführende Wassermengen und damit verbunden zusätzliche Kosten (Li et al. 2018, FNR 2016, Zamanzadeh et al. 2016). Dies führt insgesamt zur Ausbildung einer sehr konstanten und widerstandsfähigen Mikrobiomstruktur, so dass Änderungen in der Prozessführung, z.B. wie hier dargestellt ein Einsatzstoffwechsel, keine Auswirkungen auf die Prozessstabilität haben, da diese permant `abgepuffert` werden.

II.1.3.4 Überraschende Einblicke in eine zweistufige Anlage

Im Vergleich zu den NaWaRo-Anlagen BGA01, BGA02, BGA06 und BGA37, die jeweils aus zwei parallelen Hauptfermentern bestanden, bestand die Anlage BGA05 aus einer offenen Hydrolysestufe und einem Hauptfermenter. Diese Anlage wurde unter mesophilen Prozessbedingungen mit Maissilage und Schweinegülle sowie saisonaler Zugabe von Zuckerrübensilage betrieben. Allein die unterschiedliche Betriebsweise der BGA05 ließ Unterschiede in der Mikrobiomstruktur und der potenziellen Reaktion des Mikrobiomes auf variierende Managementmaßnahmen des Anlagenbetreibers erwarten. Eine vergleichende Analyse zeigt deutlich, dass sich zum einen die Schweinegülle auf die Mikrobiomstruktur auswirkt, zum anderen, dass sich die Mikrobiomstruktur der Hydrolyse von der Mikrobiomstruktur im Hauptfermenter unterscheidet (Abbildungen 23-26). Unabhängig vom Einfluss der Schweinegülle, war aufgrund der Anlagenstruktur zu erwarten, dass sich in der Hydrolysestufe höhere Anteile von Bakterien befinden, die am Abbau von komplexen Polymeren beteiligt sind. Um einen tieferen Einblick in die taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft zu erhalten, wurden sowohl die Hydrolyse als auch der Hauptfermenter zu drei repräsentativen Zeitpunkten der einjährigen Beobachtungsphase auf Basis der 16S rRNA-Gen-Amplikonsequenzierung charakterisiert. Auf Basis dieser taxonomischen Profilierung konnten in der offenen Hydrolysestufe (H) 88,5 % der erfassten OTUs der Domäne `Bacteria` und 10,4 % der Domäne `Archaea` zugeordnet werden. Im Vergleich dazu konnten im Hauptfermenter (F) 83,8 % der erfassten OTUs der Domäne `Bacteria` und 14,9 % der Dömäne `Archaea` zugeordnet werden. Die abundantesten Abteilungen dieser Biogasanlage sind *Firmicutes* (H: 67,3 %, F: 52,5 %), *Bacteroidetes* (H: 2,4 %, F: 16,2 %), *Actinobacteria* (H: 14,9 %, F: 0,9 %), *Cloacimonetes* (H: 0,1 %, F: 2,6 %) und *Euryarchaeota* (H: 10,4 %, F: 14,9 %) (Abbildung 29). Bereits auf Abteilungsebene zeigen sich deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft für die Hydrolyse und den Hauptfermenter. Auf Gattungsebene lassen sich diese Fermenter-spezifischen Unterschiede noch deutlicher erkennen. Während in der Hydrolyse die Gattung *Syntrophococcus* mit einer relativen Abundanz von 21,2 % nachgewiesen wurde, konnte sie im Hauptfermenter mit nur 1,3 % identifiziert werden. Bisher findet sich in der Literatur nur eine beschriebene Art, *Syntrophococcus sucromutans*, die verschiedene Kohlenhydrate zu Essigsäure umsetzt, wobei exogene biotische oder chemische Elektronenakzeptorsysteme (z.B. hydrogenotrophe Archaeen wie *Methanobrevibacter smithii* sowie Ameisen- oder Vanillinsäure) benötigt werden (Krumholz & Bryant 1986). Dies deckt sich mit der Erfassung relativ hoher Abundanzen (3,5 %) von Vertretern der archaeellen Gattung *Methanobrevibacter* in der Hydrolysestufe. Darüber hinaus finden sich in der Hydrolysestufe relative hohe Abundanzen von Mikroorganismen (Vertreter der Gattungen *Coriobacteriaceae* UCG-002 mit 6,8 %, *Pseudocardovia* mit 4,0 %, *Clostridium sensu stricto* mit 13 %), die aus dem Verdauungstrakt verschiedener Säugetieren (u.a. Wildschweinen) isoliert wurden (Alou et al. 2018, Killer et al. 2013, Killer et al. 2014, Li et al. 2019, Song et al. 2018, Sun et al. 2019, Vos et al. 2011); ein Hinweis darauf, dass diese Mikroorganismen über die Schweinegülle in den Fermenter eingetragen werden, sich unter den im Fermenter gegebenen Bedingungen etablieren können und somit Teil des Biogas-Mikrobioms werden. Auffällig war, dass in der Hydrolysestufe viele Mikroorganismen nachgewiesen wurden, die aus verschiedenen kurzkettigen Kohlenhydraten, Aminosäuren oder Alkoholen, organische Säure produzieren, was sich mit den TRFLP-Analysen deckt.

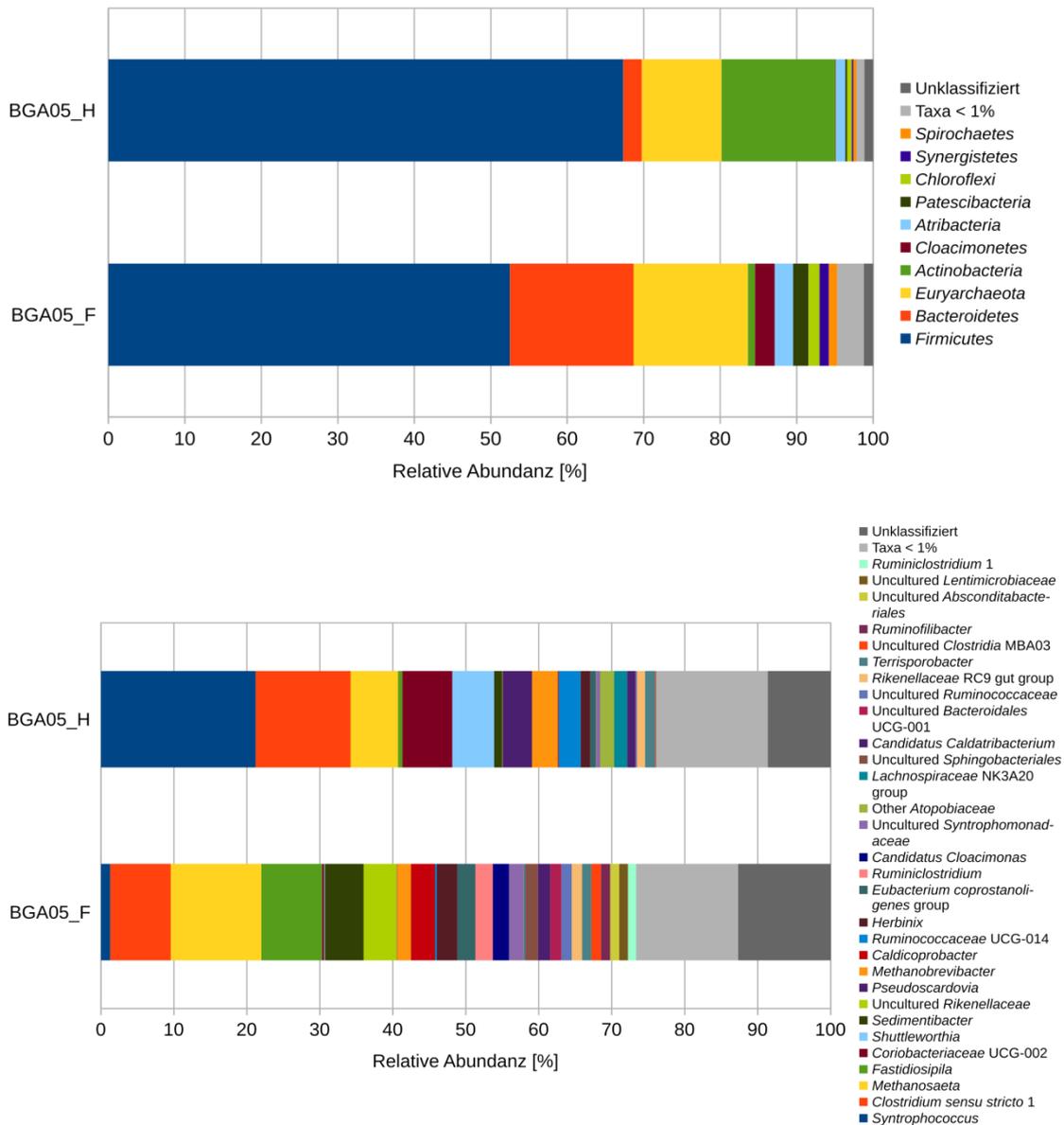


Abbildung 29: Taxonomische Profile der Hydrolysestufe (BGA05_H) und des Hauptfermenter (BGA05_F) von BGA05 auf Abteilungs- und Gattungsebene basierend auf 16S rRNA-Gen-Amplikondaten.

Metaproteomanalysen, die für diese Anlage ebenfalls im jahreszeitlichen Verlauf für die Hydrolyse und den Hauptfermenter durchgeführt wurden, bestätigen diese Ergebnisse. In der Hydrolyse wurden verhältnismäßig wenig hydrolytisch-wirksame Enzyme erfasst, insbesondere solche, die für den Abbau polymerer Kohlenhydrate verantwortlich sind; jedoch fanden sich vermehrt Proteine der Glykolyse sowie der Aminosäuresynthese und der Transkription (Abbildung 30), was auf schnelles Wachstum der Mikroorganismen hindeutet und mit großer Wahrscheinlichkeit den primären Gärern zugeordnet werden kann. Etwas überraschend ist in der Hydrolyse die geringe Abundanz von Proteinen, die dem Transport von Zuckern, Peptiden, Ionen, Vitaminen und Co-Faktoren zugeordnet werden (Abbildung 30). Transportproteine werden jedoch immer dann verstärkt gebildet, wenn ein Mangel an Substraten besteht, sodass in der Hydrolyse von einer hohen Verfügbarkeit leicht verwertbarer Substrate ausgegangen werden kann, die durch die Maissilage (und Zuckerrübensilage) eingetragen werden. Im Vergleich dazu wurden im Hauptfermenter hohe Anteile an Proteinen des C1-Stoffwechsels sowie der Methanogenese erfasst (Abbildung 30). Dies lässt sich sehr gut mit der höheren Verweilzeit im Fermenter von mehreren Wochen anstatt weniger Tage in der Hydrolyse erklären. Der trotzdem recht hohe Anteil von Methanogeneseproteinen in der Hydrolyse lässt sich durch das Eintragen der entsprechenden Organismen durch die Rezirkulation aus dem Hauptfermenter, dem Nachgärer und dem Gärrestlager in die Hydrolyse erklären. Die Ergebnisse der Metaproteomanalysen (hier dargestellt

am Beispiel der zentralen Stoffwechselwege in KEGG-Karten) zeigen deutlich, dass in der Hydrolysestufe vermehrt der Abbau der in den Einsatzstoffen enthaltenen kurzkettigen Zucker und im Hauptfermenter der Abbau langkettiger Kohlenhydrate wie Zellulose und Xylan stattfand (Abbildung 31). Die Auswertung auf Basis von KEGG-Karten erlaubt die Quantifizierung einzelner hydrolytischer Funktionen. Interessanterweise finden sich mehr hydrolytisch-wirksame Enzyme für schwerer abbaubare polymere Kohlenhydrate wie Endoglucanase (EC:3.2.1.4), Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase (EC:3.2.1.176) und Endo-1,4-beta-xylanase (EC:3.2.1.8) im Hauptfermenter, während Enzyme für die leicht abbaubaren Kohlenhydrate wie alpha-Amylase (EC:3.2.1.1) häufiger in der Hydrolyse vorkommen. Offensichtlich wird der eigentliche Zweck eine Hydrolysestufe, nämlich der verstärkte Abbau schwer abbaubarer Kohlenhydrate wie Zellulose, nicht in der Hydrolyse erreicht. Dagegen wird Stärke bereits in der Hydrolyse aufgeschlossen und die freigesetzten Monomere auch sehr effizient aufgenommen.

Wie schon in den NaWaRo-Anlagen BGA01, BGA02, BGA06 und BGA37, hat die Zugabe von Zuckerrübensilage auch in der BGA05 wenig Einfluss auf die Zusammensetzung und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaft (Abbildungen 24, 25, 30, 31).

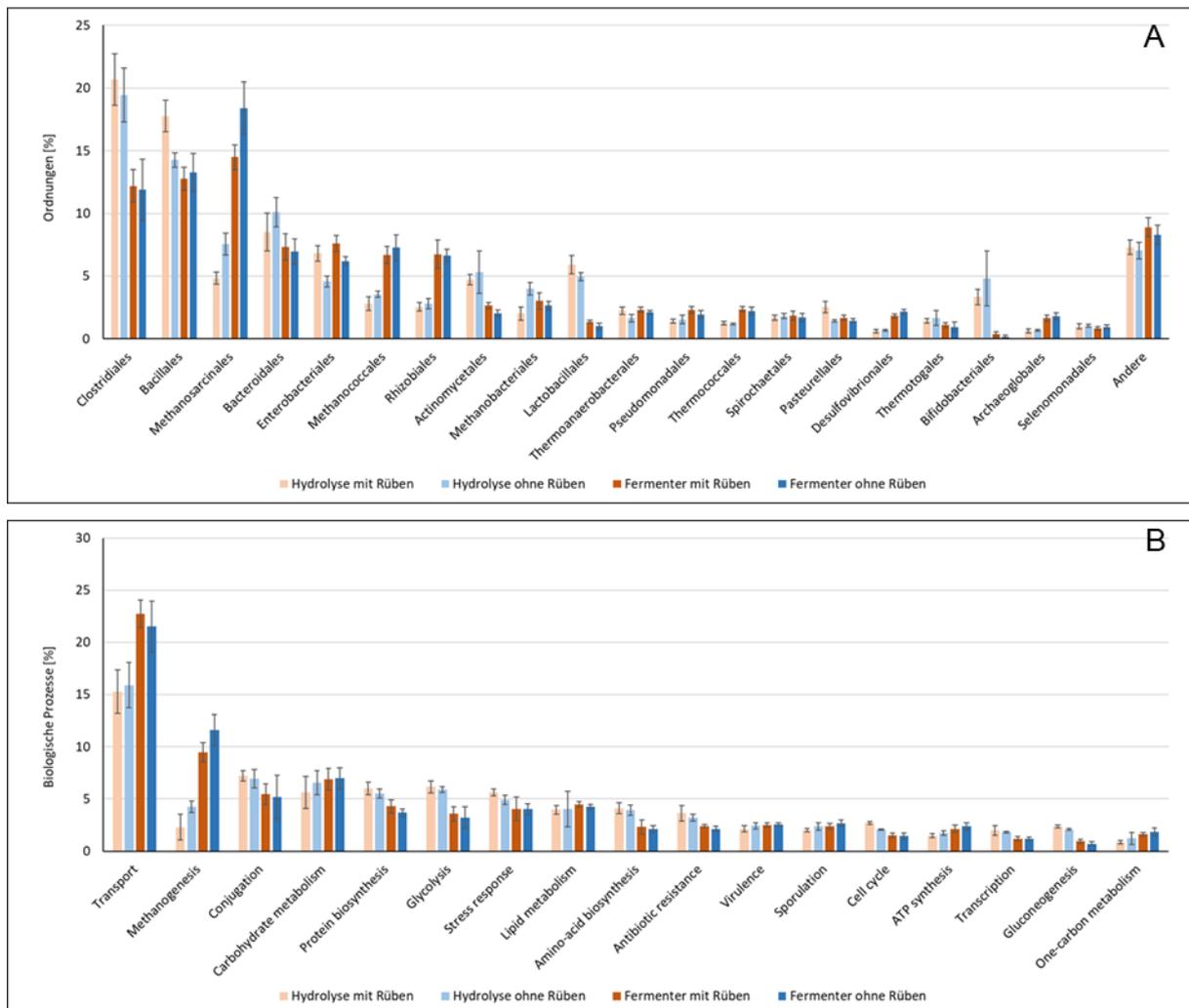


Abbildung 30: Profile der tatsächlich aktiven Taxa auf Ordnungsebene (A) und biologische Funktionen (B) der BGA05 in der Hydrolysestufe und im Hauptfermenter mit und ohne Zugabe von Zuckerrübensilage.

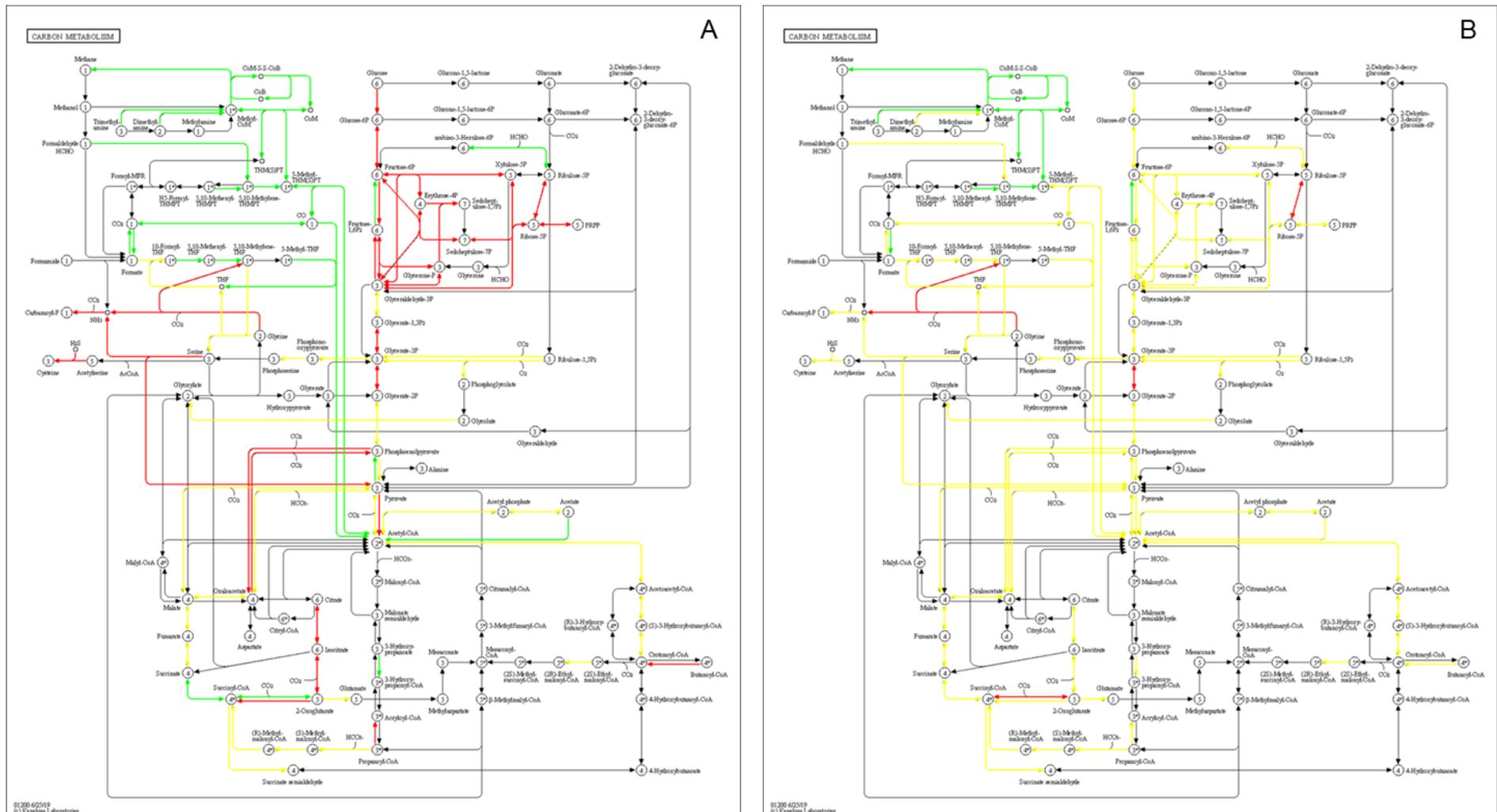


Abbildung 31: Vergleichende KEGG-Karten der Hydrolysestufe und des Hauptfermenters der BGA05 (A) sowie der Hydrolysestufe von BGA05 während und nach der Zugabe von Zuckerrübensilage (B). (grün: verringert, gelb: unverändert, rot: verstärkt).

Aus dem Pool der Biogasanlagen, die hinsichtlich der zeitlich-räumlichen Variationen im jahreszeitlichen Verlauf und/oder über alle Prozessstufen einer Anlage betrachtet wurden, erfolgten für eine Auswahl an interessanten Anlagen (BGA01, BGA02, BGA05, BGA06, BGA49, BGA32) Metagenom- und hochauflösende Metaproteomanalysen in Kombination mit einem Isolierungs-/Kultivierungsansatz.

II.1.3.5 Metagenom- und Metaproteomanalysen

Im Bereich der Mikrobiomforschung werden zunehmend 'meta-omics'-Analysen eingesetzt, da sie einen tiefgreifenden Einblick in die gesamte mikrobielle Gemeinschaft ermöglichen, insbesondere in die genetisch-festgelegten, d.h. potenziellen Funktionen (Metagenom) sowie die tatsächlich realisierten Prozesse (Metatranskriptom und Metaproteom) (Campanaro et al. 2020, Hassa et al. 2018, Heyer et al. 2015, 2019, Parks et al. 2018, Stewart et al. 2018, Zhang et al., 2019). Einer der entscheidenden Mehrwerte von Metagenomanalysen liegt in der Erfassung von qualitativ-hochwertigen metagenom-assemblierten Genomen (MAGs) (z. B. Campanaro et al. 2020, Parks et al. 2018, Stewart et al. 2017). Campanaro et al. (2020), beispielsweise, verglichen 134 Metagenom-Datensätze und ermittelten 1635 MAGs, von denen nur 69 einer bekannten Art zugeordnet werden konnten. Diese Studie zeigt, dass bisher nicht kultivierbare und daher nicht charakterisierte Taxa in hohem Maße in Biogasanlagen zu finden sind. Ein hochauflösendes Metaproteom ermöglicht einen vertieften Einblick in die Funktionen einer mikrobiellen Gemeinschaft, insbesondere von weniger abundanten Mikroorganismen. Allerdings vervielfacht sich durch die notwendige Fraktionierung auch der experimentelle Aufwand (Wenzel et al. 2018).

Zunächst erfolgte eine taxonomische Charakterisierung der Hauptfermenter der ausgewählten Biogasanlagen auf Basis der 16S rRNA-Gen-Amplikonsequenzierung. Schon auf den ersten Blick lassen sich die Anlagen, die Reststoffe aus der Tierhaltung verwerten (BGA05, BGA32, BGA49) von Anlagen unterscheiden, die ausschließlich pflanzliche Biomassen verwenden (BGA01, BGA02, BGA06) (Abbildung 32).

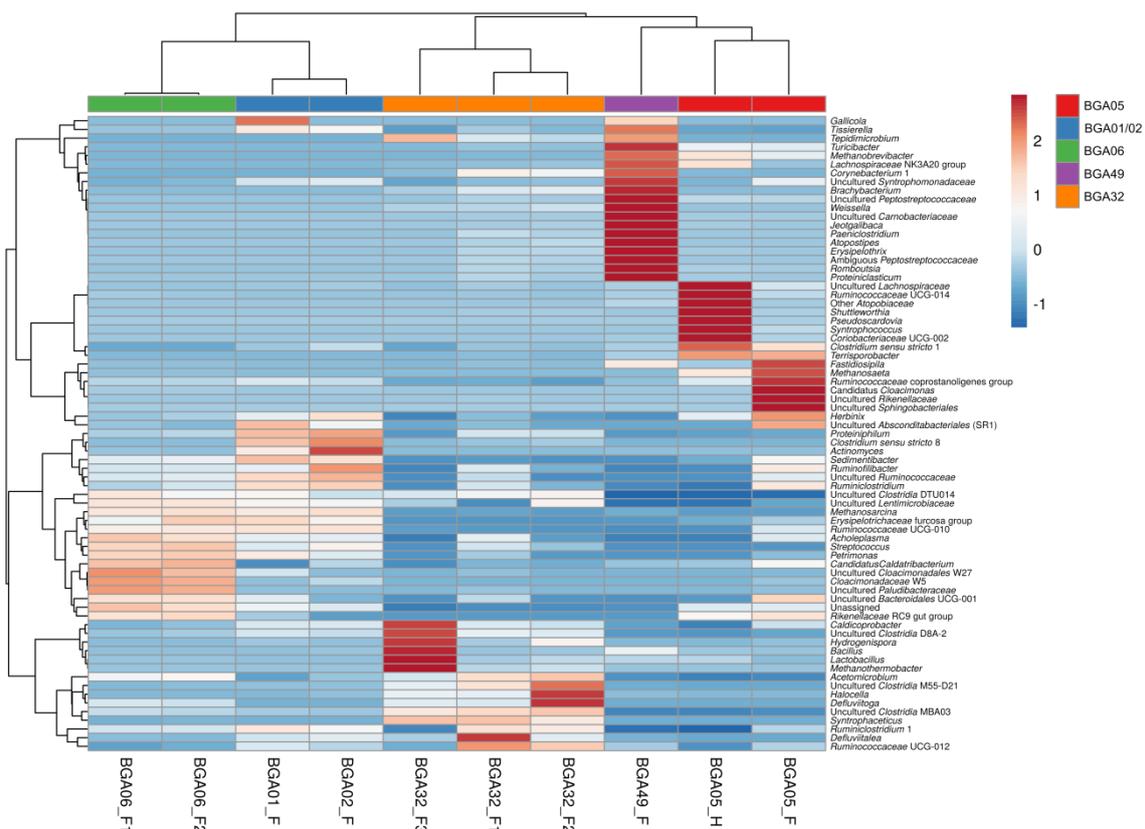


Abbildung 32: 'Clustered Heatmap' der 73 abundantesten Gattungen der untersuchten Biogasanlagen BGA05 (H und F), BGA01 (F), BGA02 (F), BGA06 (F1 und F2), BGA49 (F) und BGA32 (F1, F2 und F3). Farbcodierung: Je blauer, desto weniger abundant sind die erfassten Gattungen; je röter, desto häufiger wurden die Gattungen in den entsprechenden Biogasanlagen/-fermentern gefunden.

Im Vergleich zur BGA05, die in Ko-Fermentation von Energiepflanzen mit Reststoffen aus der Tierhaltung betrieben wurden (Kapitel II.3.1.4), sind die Biogasanlagen BGA01, BGA02 und BGA06 reine NaWaRo-Anlagen, die mit Mais-, Gras- oder Roggenganzpflanzensilage sowie der saisonalen Zugabe von Zuckerrübensilage betrieben wurden (Abbildung 20). Während die BGA01 und BGA02 jeweils aus Hauptfermenter, Nachgärer und Gärrestlager aufgebaut waren (Abbildung 4D), bestand die BGA06 aus zwei parallelen Hauptfermentern, einem Nachgärer, zwei Gärrestlagern (Abbildung 4B). Beide Anlagen wurden unter mesophilen Bedingungen (ca. 43°C) betrieben (Abbildung 21). In den Hauptfermentern der drei untersuchten Anlagen BGA01, BGA02 und BGA06 wurden ähnliche Anteile an Bakterien (88,1 % ± 0,8 %) und Archaeen (10,2 % ± 0,5 %) nachgewiesen. Die abundantesten Abteilungen waren *Firmicutes* (59,5 % ± 5,7 %), *Bacteroidetes* (16,3 % ± 0,4 %), *Synergistetes* (2,7 % ± 1,7 %) und *Euryarchaeota* (10,2 % ± 0,5 %) (Abbildung 33 und 34). Im Unterschied zu BGA01 und BGA02, wurden in der BGA06 zudem Vertreter der Abteilung *Cloacimonetes* mit 7,0 % (F1) bzw. 6,2 % (F2) als häufig vorkommende Mikrobiom-Mitglieder nachgewiesen. Auf Gattungsebene zeigen sich nicht nur Gemeinsamkeiten (*Methanosarcina*: 10,0 % ± 0,6 %, *Sedimentibacter*: 6,2 % ± 2,0 %, *Streptococcus*: 9,1 % ± 2,7 %, *uncultured Clostridia MBA03*: 10,1 % ± 1,3 %, *uncultured Clostridia DTU014*: 6,1 % ± 1,3 %, *uncultured Lentimicrobiaceae*: 4,7 % ± 0,5 %), sondern auch Unterschiede zwischen den Anlagen: Während in der BGA01 und BGA02 Vertreter der Gattungen *Proteiniphilum* (BGA01: 7,5 %, BGA02: 8,2 %), *Caldicoprobacter* (BGA01: 3,7 %, BGA02: 3,7 %) und *Ruminiclostridium* (BGA01: 2,7 %, BGA02: 2,8 %), und *uncultured Ruminococcaceae* (BGA01: 2,6 %, BGA02: 2,9 %) zu den häufig erfassten Taxa zählten, wurden in der BGA06 die Gattungen *Acetomicrobium* (F1: 3,6 %, F2: 3,9 %), *Cloacimonadaceae W5* (F1: 3,5 %, F2: 3,3 %), *Candidatus Caldatribacterium* (F1: 2,2 %, F2: 2,2 %) und *uncultured Cloacimonadales W27* (F1: 3,4 %, F2: 2,8 %) mit hohen relativen Häufigkeiten erfasst. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel „Ermittlung der zeitlich-räumlichen Variationen im jahreszeitlichen Verlauf und/oder über alle Prozessstufen einer Anlage“ beschrieben, weisen NaWaRo-Anlagen wie die BGA01, BGA02 und BGA06 vermutlich aufgrund der sehr hohen Rezirkulatmengen sehr ähnliche Mikrobiomstrukturen auf, was durch die taxonomische Profilierung bestätigt werden kann. In wie weit sich die feinen Unterschiede in der Taxonomie im funktionellen Potenzial widerspiegeln wird eine detaillierte Auswertung der erstellten Metagenomdaten zeigen.

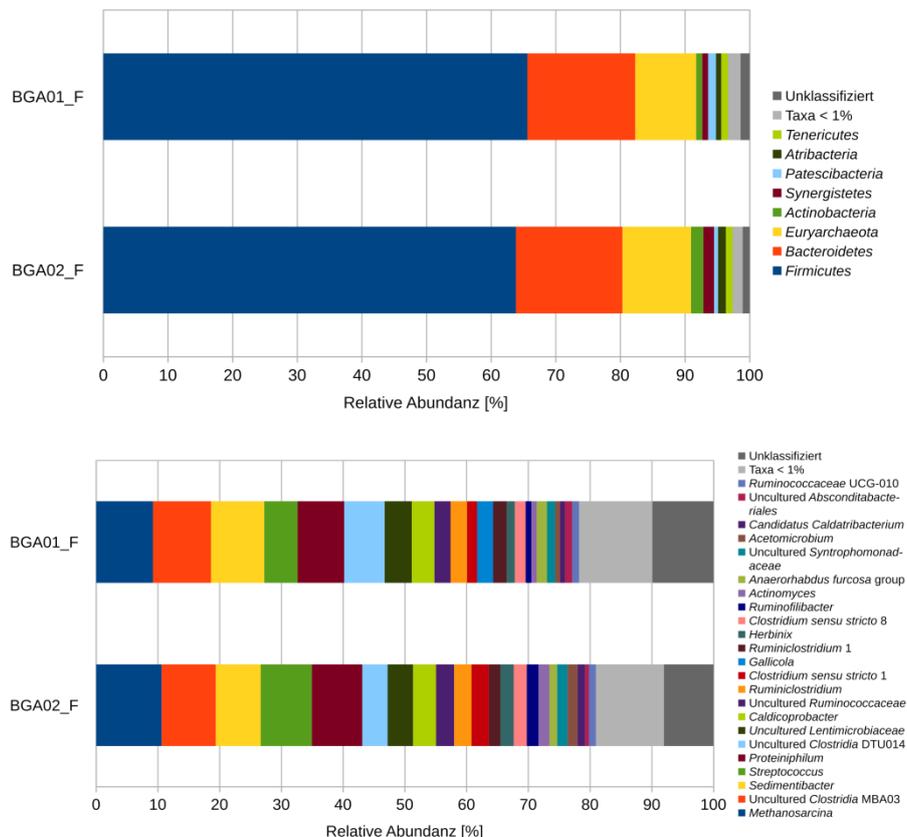


Abbildung 33: Taxonomische Profile der beiden Hauptfermenter von BGA01 und BGA02 auf Abteilungs- und Gattungsebene basierend auf den 16S rRNA-Gen-Amplikondaten.

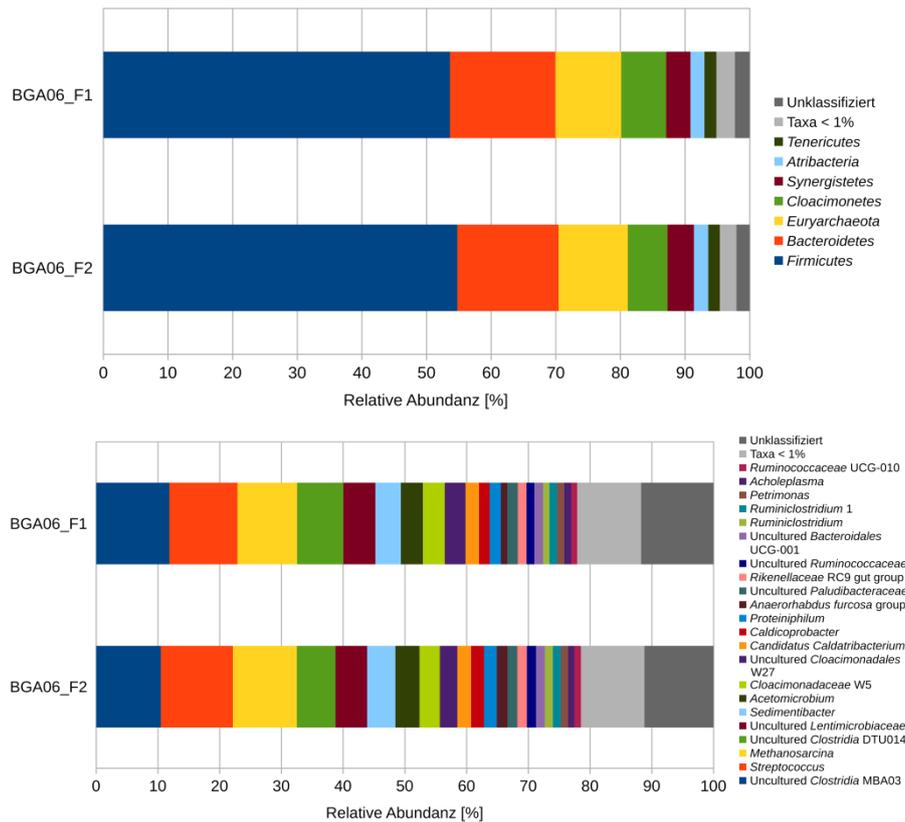


Abbildung 34: Taxonomische Profile der beiden Hauptfermenter von BGA06 (BGA06_F1 und BGA06_F2) auf Abteilungsebene- und Gattungsebene basierend auf den 16S rRNA-Gen-Amplikondaten.

Aus dem Anlagenset, das für den Projektteil 2 zur Verfügung stand, wurden neben den vier bereits beschriebenen Anlagen BGA05 (Ko-Fermentation Energiepflanzen und Schweinegülle) sowie BGA01, BGA02 und BGA06 (NaWaRo-Anlagen), die zudem alle vier saisonal Zuckerrübensilage verwerten, auch eine 75 kW-Güllekleinanlage für Metagenomstudien ausgewählt. Die Wahl fiel auf die BGA49, da diese neben den Haupteinsatzstoffen Rindermist/-gülle, Mais- und Grassilage, Hühnerkot (9%) verwertete (Abbildung 19), einem Einsatzstoff, der zu Prozessinstabilitäten/-störungen führen kann (Alsouleman et al. 2016, Klang et al. 2019, Theuerl et al. 2019b). Diese Anlage zeigte, trotz hohen Ammonium-Konzentrationen, über den betrachteten Untersuchungszeitraum einen stabilen Prozessverlauf (Abbildung 28). In diesem Fermenter wurden auf Basis der taxonomischen Profilierung 92,3% der erfassten OTUs der Domäne `Bacteria` und 7,5% der Domäne `Archaea` zugeordnet. Die abundantesten Abteilungen sind *Firmicutes* (66,3%), *Actinobacteria* (18,6%), *Proteobacteria* (3,7%), *Atribacteria* (1,11%) sowie *Euryarchaeota* (7,5%) (Abbildung 35A). Das taxonomische Profil dieser Biogasanlage weist schon auf Abteilungsebene deutliche Unterschiede zu den bereits beschriebenen Biogasanlagen, BGA01, BGA02, BGA05 und BGA06 auf. Am auffälligsten ist das Vorkommen von Vertretern der Abteilung *Proteobacteria* und insbesondere der Abteilung *Atribacteria*. Von Vertretern der Abteilung *Atribacter* gibt es bislang kein beschriebenes Isolat, jedoch zeigen Metagenom- und Einzelzellgenomstudien, dass Vertreter dieser Abteilung in Lebensräumen vorkommen, die zwar beträchtliche Mengen an organischem Kohlenstoff enthalten, jedoch eine relativ geringe Verfügbarkeit anorganischer Verbindungen aufweisen (Nubo et al. 2016). Diese sind jedoch für ein Leben unter strikt anaeroben Bedingungen zwingend erforderlich, wodurch die fermentativen und/oder syntrophen Stoffwechselstrategien der *Atribacteria* zum Überleben von entscheidender Bedeutung sind (Nubo et al. 2016). Ebenso deutet der relativ hohe Anteil von Vertretern der Abteilung *Proteobacteria* darauf hin, dass in dieser Anlage syntrophe Lebensweisen eine wichtige Rolle spielen, da zu dieser Abteilung Gattungen wie *Syntrophobacter*, *Syntrophus*, *Smithella* gehören, von denen bekannt ist, dass sie C3-C6-Fettsäuren (z.B. Propionsäure, Buttersäure) zunächst in Verbindungen (u.a. CH₂ und H₂) umwandeln, die dann von hydrogenotrophen Archaeen in Methan umgesetzt werden (Leng et al. 2018, Morris et al. 2013, Theuerl et al. 2019b). Dies deckt sich mit der für diese Anlage erfassten hohen relativen Abundanz von Vertretern der archaellen Gattung *Methanobrevibacter* (5,9%). Weitere (und vermutlich anlagen-spezifische) Gattungen waren: *Corynebacterium* (5,4%), *Fastidiosipila* (4,2%), *Turcibacter* (3,4%), *Paeniclostridium* (3,4%), *Brachybacterium* (3,0%) sowie `uncultured`.

Syntrophomonadaceae (5,4%), *uncultured Peptostreptococcaceae* (3,1%) und *Lachnospiraceae* NK3A20 (3,1%) (Abbildung 35B). Zu den systemökologischen Funktionen dieser Mikroorganismen finden sich in der Literatur nur sehr wenige Hinweise. Ein Vergleich der Metagenomdatensätze bzw. der identifizierten MAGs und deren Charakterisierung der genetisch-festgelegten funktionellen Eigenschaften wird weitere Aufschlüsse liefern.

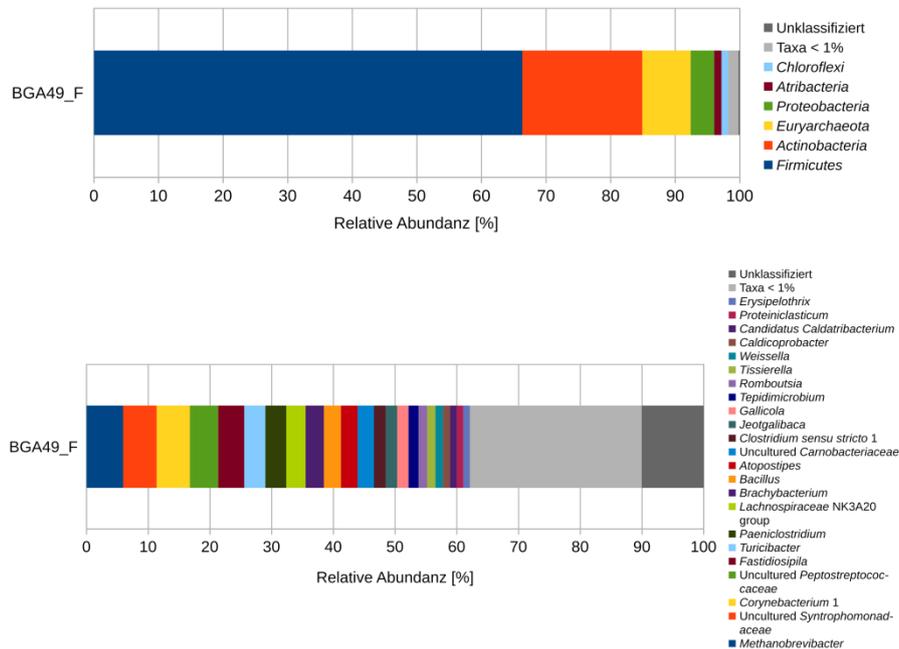


Abbildung 35: Taxonomische Profile des Hauptfermenters von BGA49 (BGA49_F) auf Abteilungs- und Gattungsebene basierend auf den 16S rRNA-Gen-Amplikondaten.

Die letzte Biogasanlage, die für diesen Arbeitsschwerpunkt ausgewählt wurde, war BGA32. Diese besteht aus drei Hauptfermentern, zwei Nachgärern und drei Gärrestlagern (Abbildung 4C). Die drei Hauptfermenter wurden nicht nur bei unterschiedlichen Temperaturen (F1: 44,5°C, F2: 50,0°C, F3: 56,3°C) betrieben, sondern unterschieden sich auch in der Einsatzstoffzusammensetzung. Während die beiden Fermenter F1 und F2 mit Mais- und Grassilage, Getreide sowie Festmist (Rind/Schaf) und Hühnertrockenkot beschickt wurden, wurde in Fermenter F3 Grassilage in Kombination mit Festmist (Rind/Schaf) und Kartoffelschalen sowie gelegentlich Pferdemit verwendet. Zudem zeigen die drei Fermenter auch deutliche Unterschiede in der grundsätzlichen Betriebsweise. Die beiden Fermenter F1 und F2 wurden mit ca. 20,5 t_{FM} m⁻³ d⁻¹ sowie einer Raumbelastung von 4,4 kg_{OTS} m⁻³ d⁻¹ und einer Verweilzeit von 73 Tagen betrieben. Im Vergleich dazu lag die Gesamteinsatzstoffmenge für den Fermenter F3 bei 6,3 t_{FM} m⁻³ d⁻¹ sowie einer Raumbelastung von 0,4 kg_{OTS} m⁻³ d⁻¹ und einer Verweilzeit von 475 Tagen. Aufgrund dieser Variationen war mit Unterschieden in der mikrobiellen Diversität insbesondere im Vergleich der Fermenter F1 und F2 mit Fermenter F3 zu rechnen. Auf Basis der taxonomischen Profile wurde in Fermenter F1 und Fermenter F2 eine gleiche Verteilung von Bakterien und Archaeen von 98,7% zu 1,1% identifiziert. In Fermenter F3 hingegen war der Anteil an Bakterien mit 94,9% deutlich geringer, während der Anteil an Archaeen mit 5,0% höher war. Die abundantesten Abteilungen dieser Biogasanlage sind *Firmicutes* (F1: 73,5%, F2: 71,0%, F3: 85,4%), *Bacteroidetes* (F1: 7,3%, F2: 7,5%, F3: 2,1%), *Actinobacteria* (F1: 6,3%, F2: 5,4%, F3: 0,9%), *Synergistetes* (F1: 5,3%, F2: 5,8%, F3: 2,5%) sowie *Euryarchaeota* (F1: 1,1%, F2: 1,1%, F3: 5,0%) (Abbildung 36A). Bereits auf Abteilungsebene zeigte sich, dass das taxonomische Profil von Fermenter 3 deutliche Unterschiede im Vergleich zu den taxonomischen Profilen der Fermenter 1 und 2 aufweist. Ebenfalls zeigen sich auf Gattungsebene diese Unterschiede deutlich (Abbildung 35B): Während in den Fermentern F1 und F2 Vertreter der Gattungen *Acetomicrobium* (F1: 5,2 %, F2: 5,7 %), *Streptococcus* (F1: 4,5 %, F2: 2,6 %) und *Proteiniphilum* (F1: 2,7 %, F2: 2,5 %) am häufigsten gefunden wurden, zeigten in Fermenter F3 die Gattungen *Hydrogenispora* (14,7%), *Caldicoprobacter* (10,9%), *Bacillus* (9,5%), *Lactobacillus* (7,8%) und *Methanothermobacter* (4,9%) hohe Abundanzen. Arten der Gattungen *Hydrogenispora* und *Caldicoprobacter* weisen einen hydrolytisch/fermentativen Stoffwechsel auf, wobei verschiedene Kohlenhydrate (u.a. Glukose, Pektin und Stärke) zu Essigsäure, Milchsäure, Ethanol sowie CO₂ und H₂ umgesetzt werden (Bouanane-Darenfed et al. 2011 2013, Liu et al. 2014, Sun et al. 2015, Yokoyama et

al. 2010). Neben diesen taxonomischen Unterschieden im Vergleich der drei Fermenter von BGA32, wurde auch eine sehr interessante Gemeinsamkeit gefunden. In den taxonomischen Profilen dieser Biogasanlage zeigte sich, dass Vertreter der bisher nicht-kultivierbaren und dementsprechend nicht physiologisch beschriebenen Gattung *uncultured Clostridia MBA03* eine sehr hohe relative Häufigkeit in allen drei Fermentern aufwies (F1: 29,1 %, F2: 31,0 %, F3: 25,0 %). Aufgrund der hohen Abundanz dieser Gattung besteht eine gute Chance, dass es möglich sein wird, aus den Metagenomdatensätzen ein qualitativ-hochwertiges MAG eines Vertreters dieser Gruppe zu rekonstruieren und bezüglich der genetisch-festgelegten Funktionen zu beschreiben. Dies ermöglicht potenziell das Ableiten von Isolierungs-/Kultivierungsbedingungen (Gutleben et al. 2018), denn trotz der nachgewiesenen hohen Abundanz konnte kein Vertreter dieser Gruppe im Rahmen des Arbeitsschwerpunktes „Isolierung, Kultivierung, Charakterisierung“ erfasst werden.

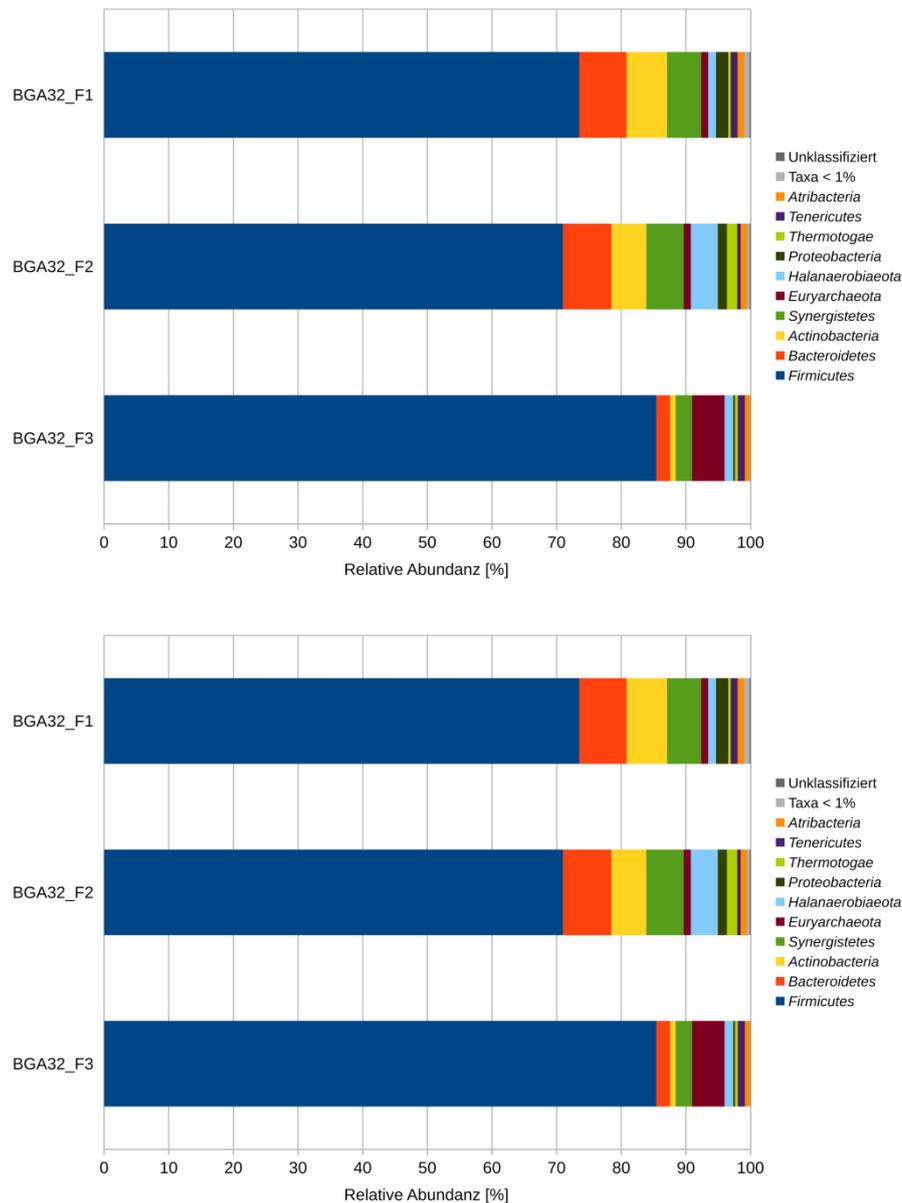


Abbildung 36: Taxonomische Profile der untersuchten Biogasanlage BGA32 im Vergleich der Fermenter F1, F2 und F3 auf Abteilungs- und Gattungsebene basierend auf den 16S rRNA-Gen-Amplikondaten.

Wie zu erwarten zeigen alle für den Projektteil 2 „Metagenom-/Metaproteomanalysen“ ausgewählten Biogasanlagen sehr interessante taxonomische Profile, wobei die Frage nach der systemökologischen Funktion einzelner Mikroorganismen (hier einzelnen OTUs) oder Gruppen von Mikroorganismen (z.B. Gattungen) oder sogar ganzer Mikrobiomen offen bleibt. Aus diesem Grund wurden nach Abschluss

der Voruntersuchungen (basierend auf den 16S rRNA-Gen-Amplikondaten) Metagenom- und Meta-proteomanalysen durchgeführt.

Für die Erstellung der Metagenome erfolgte die DNA-Extraktion unter Verwendung des FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals GmbH, Deutschland) in Kombination mit dem Genomic DNA Clean & Concentrator™ Aufreinigungskit (Zymo Research, USA). Im Anschluss wurden PCR-unabhängige Sequenzbibliotheken erstellt, die auf der Illumina-HiSeq-Plattform (2x250 bp paired-end) sequenziert wurden (Abbildung 3). Für die erstellten Metagenome erfolgte nach einer Qualitätskontrolle (Trimmomatic; Bolger et al., 2014) und einer Reduzierung des Datensatzes auf eine Million Reads (seqtk, Li 2012), sowohl eine Einzelread-Analyse mittels MEGAN (*MEtaGenome Analyzer*, Huson et al. 2007) als auch eine Genomrekonstruktion unter Verwendung der Plattform EMGB (*Elastic MetaGenome Browser*, Jünemann et al. 2017).

Für die Einzelread-Analyse wurden die erfassten Sequenzen mit einer Referenzdatenbank (NCBI-NR Datenbank, O'Leary et al. 2016) abgeglichen, um sie funktionell und taxonomisch zu klassifizieren (Buchfink et al. 2015). Die funktionellen Profile der untersuchten Biogasfermenter der BGA01, BGA02, BGA05, BGA06, BGA32 und BGA49 wurden auf Basis von SEED-Kategorien verglichen (Overbeek et al. 2005, 2014). Bei der Betrachtung der funktionellen Kategorien zeigt sich, dass alle wesentlichen Funktionen, die für den Prozess der Produktion von Biogas von Bedeutung sind, im Mikrobiom genetisch festgelegt sind (Abbildung 37), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die in den untersuchten Biogasanlagen vorkommenden Mikrobiome grundsätzlich in der Lage sind, die zugeführten Einsatzstoffe in Biogas umzusetzen. Wie schon aus den Ergebnissen der taxonomischen Profilierung hervorgeht, zeigen sich auch bei der Einzelread-Analyse Unterschiede z.B. zwischen den Fermentern einer Anlage (BGA05 und BGA32) oder aber Ähnlichkeiten z.B. im Vergleich der beiden NaWaRo-Anlagen (BGA01, BGA02, BGA06). Auffällig ist das genetisch-festgelegte funktionelle Profil der BGA49, hier insbesondere die erhöhten Anteile an Genen, die im Fettstoffwechsel eine Rolle spielen sowie das erhöhte Vorkommen von Genen aus der Kategorie 'Cofaktoren, Vitamine & Co' (Abbildung 37). Die Identifizierung qualitativ-hochwertiger MAGs sowie deren Charakterisierung bezüglich ihrer genetisch-festgelegten funktionellen Eigenschaften und darüber hinaus die Ermittlung aller genetisch-festgelegten, funktionellen Eigenschaften, die keinem MAG zugeordnet werden können, jedoch für die Funktionalität des Gesamtmikrobioms von Bedeutung sind, werden detaillierte Einblicke in die theoretisch möglichen funktionellen Mikrobiomprofile geben.

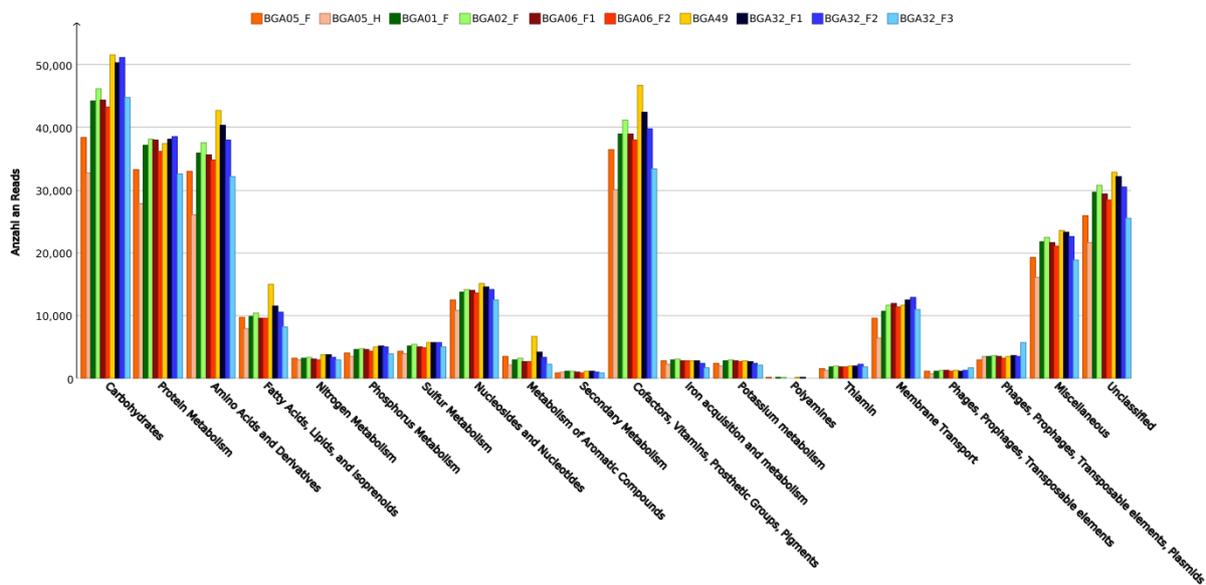


Abbildung 37: Funktionelles Profil basierend auf SEED Kategorien (Overbeek et al. 2005, 2014) für die untersuchten Biogasfermenter der Biogasanlagen, BGA01, BGA02, BGA05, BGA06, BGA32 und BGA49.

Für die Erfassung von qualitativ-hochwertigen metagenom-assemblierten Genomen (MAGs) wurde die Plattform EMGB verwendet. Die in EMGB integrierte Pipeline umfasst die Assemblierung der Reads zu Contigs (MEGAHIT; Li et al. 2015), eine Genvorhersage und Genannotation (Prodigal; Hyatt et al. 2010) sowie die Rekonstruktion von Genomen (MetaBAT; Kang et al. 2015) und ihrer taxonomischen Einordnung (GTDB-Tk; Parks et al. 2018). Des Weiteren ermöglicht eine Web-Applikation der EMGB-

Plattform die Exploration metagenomischer Datensätze. Mit Hilfe dieser Web-Applikation werden Gene taxonomisch klassifiziert, GO-Term-Statistiken (GO = Gene Ontology) erstellt und kodierende Gene werden KEGG-Stoffwechselwege (KEEG = Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa 1996) zugewiesen. Mit Hilfe verschiedener Filteroptionen können so z.B. interessante (prozess-relevante) funktionelle Gene, spezifische Gengruppen oder rekonstruierte Genome (MAGs) detailliert exploriert werden.

In den bereits bioinformatisch ausgewerteten Metagenomdatensätzen der BGA05 und BGA32 konnten insgesamt 561 Genome rekonstruiert werden, von denen 128 als qualitativ hochwertig (> 90 % Vollständigkeit, ≤ 5 % Kontamination) eingestuft wurden. Von diesen konnten lediglich sieben (ca. 5.5 %) einer bekannten Art, 32 einer bekannten Gattung, 80 einer Familie, 98 einer Ordnung, 128 einer Abteilung zugeordnet werden. Um möglichst interessante MAGs in den Metagenomdaten der untersuchten Biogasfermenter/-anlagen zu identifizieren, wurden sog. geclusterte Heatmaps erstellt, wobei für die BGA05 158 signifikante MAGs und für BGA32 192 signifikante MAGs betrachtet wurden (Abbildung 38 und 39).

Für die BGA05 wurden anhand der geclusterten Heatmap (Abbildung 38) exemplarisch fünf MAGs (MAG_2, MAG_66, MAG_199, MAG_17, MAG_223) ausgewählt, die entweder in erhöhter Abundanz in der Hydrolyse bzw. im Hauptfermenter oder in vergleichbarer Abundanz in beiden Fermentern nachgewiesen wurden. MAG_2 (96,4 % Vollständigkeit, keine Kontamination), der in der Hydrolyse und im Hauptfermenter mit vergleichbarer Abundanz nachgewiesen wurde, wird taxonomisch zur archaeellen Gattung *Methanotherix* (syn. *Methanosaeta*) zugeordnet. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse (siehe Kapitel II.1.2.5) war der Nachweis von Vertretern der Gattung *Methanotherix* in dieser Anlage zu erwarten. Eine KEGG-basierte Analyse des funktionellen Potentials von MAG_2 ermöglichte die Identifizierung aller notwendigen Gene für die acetoclastische Methanogenese. MAG_66 (95,6 % Vollständigkeit, keine Kontamination) wurde der Familie *Cloacimonadaceae* zugeordnet. Dieses MAG wurde häufiger im Hauptfermenter als in der Hydrolyse identifiziert, was aufgrund der taxonomischen Profilierung dieser Biogasanlage zu erwarten war (siehe Kapitel II.1.3.4). Eine funktionelle Betrachtung eines MAGs aus der Abteilung *Cloacimonetes* ist von besonderem Interesse, da es sehr schwierig ist, Vertreter dieser Gruppe zu kultivieren (Campanaro et al. 2020, Chourari et al. 2005, Dyksma & Gallert 2019, Pelletier et al. 2008). Es wird vermutet, dass Vertreter dieser Abteilung Essig- und/oder Propionsäure oxidieren, wobei u.a. Wasserstoff entsteht, der durch einen Syntrophiepartner verwertet werden muss, da es sonst zu einer sog. Endproduktthemmung kommen kann (Dyksma & Gallert 2019, Pelletier et al. 2008, Theuerl et al. 2019b). Die genetische Ausstattung von MAG_66 weist auf einen fermentativen Stoffwechsel hin, da Gene für die Verwertung verschiedener Zucker, Amino- und Carbonsäuren identifiziert werden konnten, so dass hier eine syntrophe Lebensweise vermutet wird. Ein weiteres Beispiel für einen potenziell in Syntrophie lebenden Mikroorganismus ist MAG_199 (98,3 % Vollständigkeit, 1,7 % Kontamination), der der Abteilung *Candidatus Atribacteria* zugeordnet wurde. Dieses MAG wurde in der Hydrolyse und dem Hauptfermenter mit einer vergleichbaren Abundanz identifiziert. Da auch für die Abteilung *Atribacteria* bisher keine kultivierten Isolate vorliegen (Nobu et al. 2016), ist auch hier eine Genom-Rekonstruktion inklusive der Beschreibung des genetisch-festgelegten funktionellen Potentials von besonderem Interesse. Ähnlich wie MAG_66 kann für MAG_199 anhand der identifizierten Gene eine syntrophe Lebensweise vermutet werden, wobei die Funktion der syntrophen Essigsäureoxidation eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Da Vertreter dieser Abteilung insbesondere in der BGA49 mit einer hohen relativen Häufigkeit erfasst wurden (siehe Abbildung 35), besteht die Hoffnung weitere Vertreter dieser Abteilung in dem entsprechenden Metagenom zu identifizieren. MAG_17 (95,3 % Vollständigkeit, 1,8 % Kontamination) gehört zur Gattung *Prevotella* aus der Familie *Bacteroidaceae*. Dieses MAG wurde in der Hydrolyse häufiger identifiziert als im Hauptfermenter. Erste Einblicke in das funktionelle Potential lassen eine mögliche Ökosystemfunktion als Säureproduzent vermuten, da primär Gene identifiziert wurden, die der Acido- und Acetogenese zugewiesen werden können. Interessanterweise wurden aus der Hydrolysestufe zwei Isolate gewonnen, deren nächste Verwandte ebenfalls zur Gattung *Prevotella* gehören (siehe Kapitel II.1.3.6). Eine Genomsequenzierung dieser Isolate (idealerweise in Kombination mit einer eingehenden physiologischen Beschreibung der Isolate) wird eine komparative Analyse mit MAG_17 ermöglichen, wodurch der Grad der Verwandtschaft, die Unterschiede in der genetischen Ausstattung sowie die potenzielle ökosystemare Funktion im Gesamtgefüge des Mikrobioms ermittelt werden können. In der Isolatsammlung befindet sich ebenfalls ein Vertreter der Gattung *Olsenella* (siehe Kapitel II.1.3.6), von der im entsprechenden Metagenomdatensatz der Hydrolysestufe MAG_223 (99,0 % Vollständigkeit, 2,4 % Kontamination) identifiziert wurde. Die genetische Ausstattung dieser MAGs weist, wie bei MAG_17, auf eine mögliche Rolle als Säureproduzent hin.

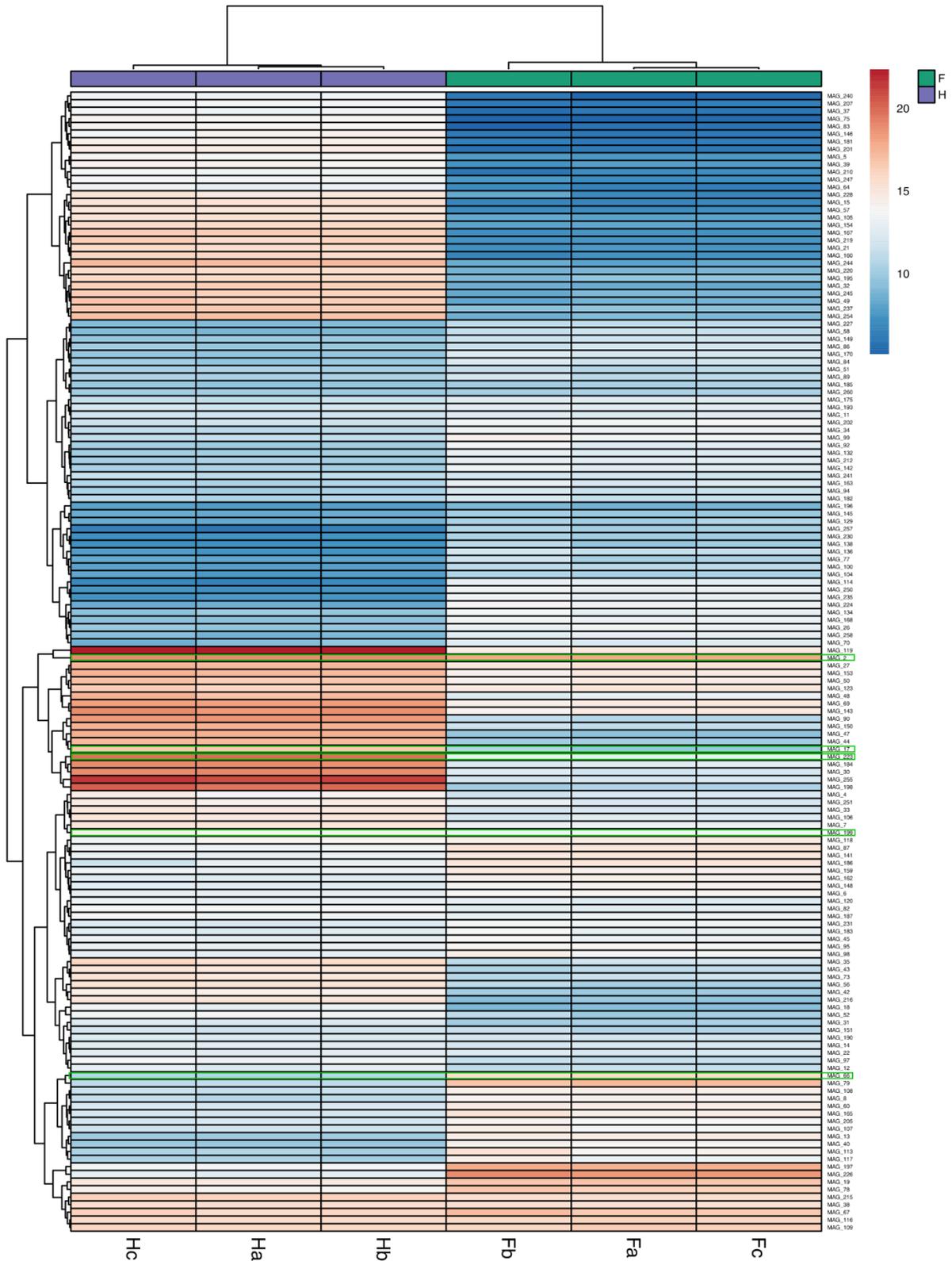


Abbildung 38: ‘Clustered Heatmap’ der in der BGA05 identifizierten metagenom-assemblierten Genome (MAGs). Farblich hervorgehoben sind: MAG_2 = *Methanotherix* spp, MAG_17 = *Prevotella* spp., MAG_66 = *Cloacimonadaceae* spp., MAG_199 = *Candidatus Atribacter*, MAG_233 = *Olsenella* spp. Farbcodierung: Je blauer, desto weniger abundant sind die erfassten Gattungen; je röter, desto häufiger wurden die Gattungen in den entsprechenden Biogasanlagen/-fermentern gefunden.

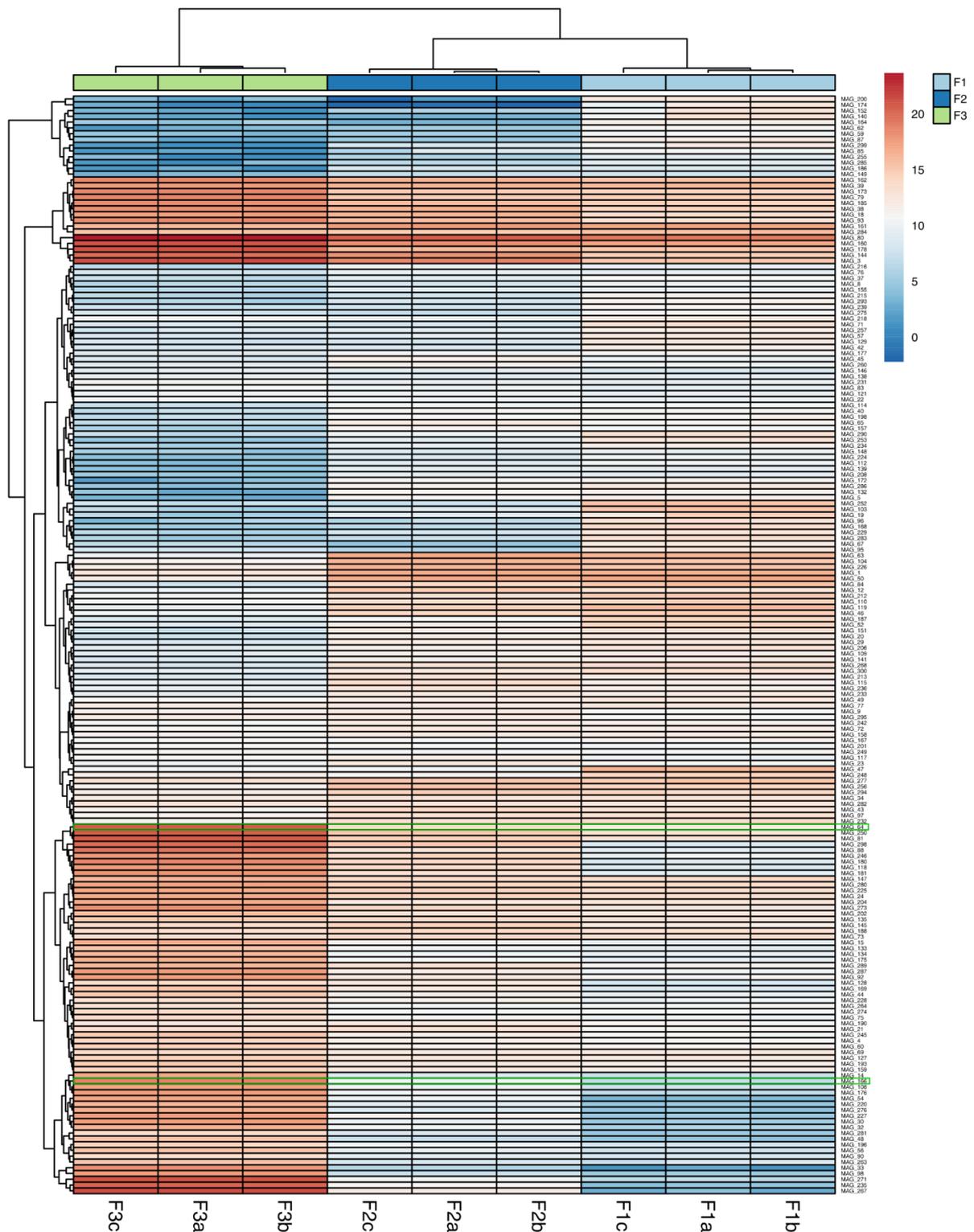


Abbildung 39: `Clustered Heatmap` der in der BGA32 identifizierten metagenom-assemblierten Genome (MAGs). Farblich hervorgehoben sind: MAG_64 = *Methanothermobacter wolfeii*, MAG_166 = *Bacillaceae* spp. Farbcodierung: Je blauer, desto weniger abundant sind die erfassten Gattungen; je röter, desto häufiger wurden die Gattungen in den entsprechenden Biogasanlagen/-fermentern gefunden.

Für die BGA32 wurden anhand der geclusterten Heatmap exemplarisch zwei MAGs (MAG_64 und MAG_166) ausgewählt, die in den drei untersuchten Biogasfermentern unterschiedliche Abundanzen

aufwiesen (Abbildung 39). MAG_64 (97,0 % Vollständigkeit, 1,6 % Kontamination) wurde als *Methanothermobacter wolfeii* identifiziert, mit einer 99,5 %igen Ähnlichkeit zum nächsten Verwandten *Methanothermobacter wolfeii* SIV6 (Hassa et al., 2020). Dieser MAG zeigt die höchste Abundanz in Fermenter 3. Für MAG_64 konnten alle notwendigen Gene für die hydrogenotrophe Methanogenese identifiziert werden. MAG_166 (90,6 % Vollständigkeit, 0,5 % Kontamination) konnte der Familie *Bacillaceae* (Abteilung *Firmicutes*) zugeordnet werden. MAG_166 wurde ebenfalls mit der höchsten relativen Abundanz in Fermenter 3 identifiziert. Ein erster Einblick in das funktionelle Potential zeigt das Vorhandensein vieler verschiedener Stoffwechselwege, insbesondere jedoch Gene des Pyruvat-Metabolismus sowie des Propionsäure- und Buttersäure-Stoffwechsels, was auf eine syntrophe Lebensweise hindeutet, die in Biogasanlagen, in denen Methan hauptsächlich über den hydrogenotrophen Stoffwechsel entsteht, zu erwarten ist.

Parallel zu den Metagenomanalysen wurden von den ausgewählten Biogasanlagen hochauflösende Metaproteomanalysen durchgeführt. Für diese werden im Folgenden beispielhaft die Ergebnisse der BGA32 dargestellt. Durch die Nutzung des für die BGA32 spezifischen Metagenoms (siehe oben) und dessen Kombination mit der UniProtKB / SwissProt-Datenbank konnte die Anzahl an Proteinidentifikationen deutlich erhöht werden: Der Grund für die Kombination des für diese Anlage spezifischen Metagenoms mit der UniProtKB / SwissProt Datenbank, war die Absicht zusätzliche Proteine, die in den Einsatzstoffen enthalten sind und mit diesen in die Biogasanlage eingebracht wurden, zu identifizieren und diese eindeutig von den mikrobiellen Proteinen zu unterscheiden. Im Vergleich zum Einsatz früher publizierter Biogasmetagenome als Datenbank wurde die Anzahl an identifizierten Spektren von 21.059 auf 23.704, die Anzahl an identifizierten Peptiden von 8.389 auf 9.173, die Anzahl an identifizierten Proteinen von 22.374 auf 32.686 und die Anzahl an identifizierten Metaproteine von 2,865 auf 3,010 gesteigert.

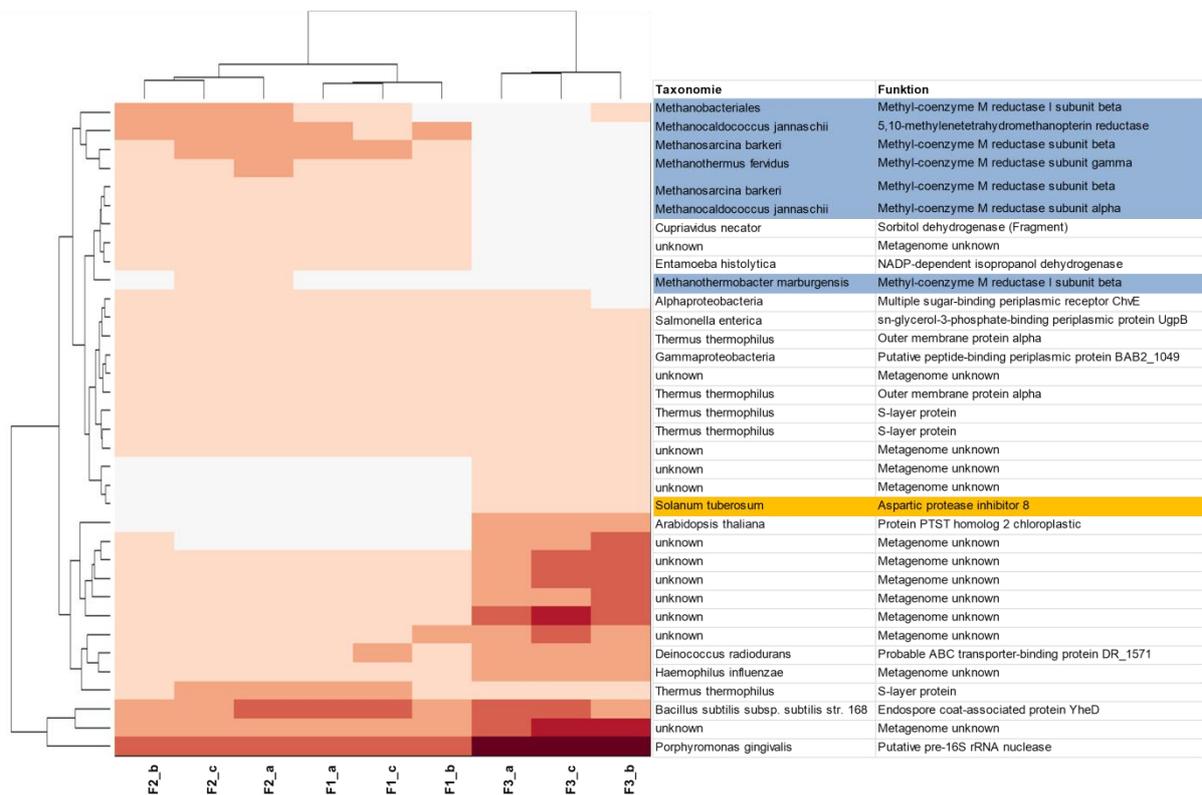


Abbildung 40: „Clustered Heatmap“ der Triplikattmessungen für die drei Fermenter der BGA32 basierend auf Metaproteinen, welche in mindestens einer Messung 0,5 % der Spektren repräsentierten. Tabelle rechts enthält die bestmögliche taxonomische Zuordnung sowie die Funktion der Metaproteine. (Blau hervorgehoben: Enzyme der Methanogenese; gelb hervorgehoben: Proteine aus der Kartoffel).

Insgesamt konnten für die drei Fermenter der BGA32 6.726 Metaproteine identifiziert werden. Ähnlich wie die Ergebnisse der Metagenomanalyse zeigte die Metaproteomanalyse mittels „Clustered Heatmap“ (Abbildung 40), dass die tatsächlich realisierten mikrobiellen Funktionen / Prozesse für den ersten und zweiten Fermenter sehr ähnlich waren, aber im Vergleich zum dritten Fermenter signifikante Unterschiede aufwiesen: Während der Vergleich zwischen BGA32_F1 und BGA32_F2 nur 52 signifikant

($p < 0.01$) unterschiedliche Metaproteine zeigte, waren zwischen BGA32_F1 und BGA32_F3 249 Metaproteine signifikant unterschiedlich. Dabei konnte insbesondere für den Vergleich zwischen dem ersten und dem dritten Fermenter eine deutliche Abnahme der Methanogenese (Abbildung 40, blau hervorgehoben auf der rechten Seite) und eine deutliche Zunahme der Abundanz von Pflanzenproteinen, die von den Einsatzstoffen stammen, beobachtet werden. Zu den am häufigsten gefundenen pflanzlichen Proteinen gehören Proteine der Kartoffel (Abbildung 40, gelb hervorgehoben auf der rechten Seite), was darauf zurück zu führen ist, dass Kartoffelschalen in diesem Fermenter (BGA32_F3) verwertet wurden. Die meisten gefundenen Proteine aus der Kartoffel sind Proteaseinhibitoren oder Patatin (Phospholipaseaktivität); pflanzliche Proteine, die im Rahmen der Pathogenabwehr antimikrobiell wirken (Anderson et al. 2000, Bartova et al. 2019). Es ist zu vermuten, dass diese antimikrobielle Wirkung auch im Biogasfermenter weiter anhält, was negative Auswirkungen auf die Abbauleistung des Mikrobioms und dementsprechend auf die Biogasausbeute haben könnte. Interessanterweise wurde im dritten Fermenter außerdem eine deutliche höhere Menge des Phagenproteins „major capsid protein“ beobachtet. Als Wirt des auf Basis von Proteinen nachgewiesenen Phagen wird *Staphylococcus aureus* angegeben, wobei die Wirtsspezifität hier nur auf Grund der Sequenzhomologie abgeleitet wurde und deshalb nicht sehr verlässlich ist.

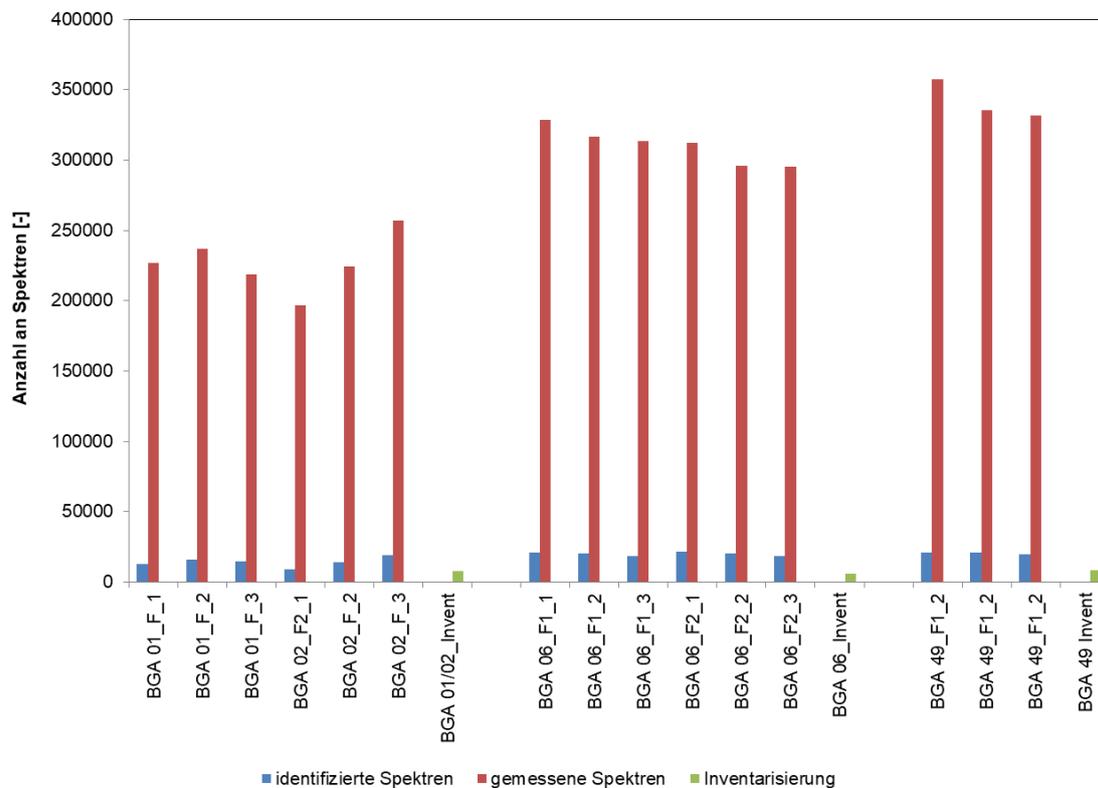


Abbildung 41: Gemessene und identifizierte Spektren der weiteren ausgewählten Biogasanlagen BGA01, BGA06 und BGA49 nach Vorfraktionierung der Proben mit SDS-PAGE gemessen mit nanoHPLC-MS/MS (Orbitrap Elite).

Neben der BGA32, wurden auch die BGA01, BGA02, BGA06 und BGA49 für eine detaillierte Metaproteomanalyse ausgewählt. Die Zahl der gemessenen und identifizierten Spektren zeigt die hohe Qualität der hochauflösenden Messungen (Abbildung 41). So wurden zum Teil deutlich mehr als ein Viertel Millionen Spektren in den durch SDS-PAGE vorfraktionierten Proben gemessen. Im Vergleich zu den Metaproteomdaten/-ergebnissen aus dem Projektteil 1 „Inventarisierung“ konnte die Zahl der identifizierten Spektren mindestens verdoppelt werden. Bei einem Abgleich der Metaproteomdaten gegen die parallel erzeugten, anlagen-spezifischen Metagenomdatensätze sollte die Zahl der Identifizierungen nochmals steigen. Eine Zuordnung der identifizierten Spektren zu den erfassten MAGs und ihren annotierten potentiellen Funktionen wird die Qualität der Ergebnisse/Aussagekraft durch eine verbesserte taxonomische Zuordnung nochmals erhöhen. Da die annotierten Metagenome der BGA01, BGA02, BGA06 und BGA49 aufgrund von Verzögerungen erst zum Projektende vorlagen, konnte die Metaproteomauswertung aufgrund der langen Zeiten für die Datenbanksuchen nicht bis zum Projektende durchgeführt werden.

II.1.3.6 Isolierung, Kultivierung, Charakterisierung von anaeroben Mikroorganismen

Da die Mehrzahl der an der Bildung von Biogas beteiligten Mikroorganismen nach wie vor unbekannt ist (Campanaro et al. 2020, Gutleben et al. 2018, Lloyd et al. 2018), ist die Isolierung, Kultivierung und Beschreibung bisher unbekannter Arten ein Arbeitsschwerpunkt im Rahmen von BMP III – Teil 2 gewesen. Insgesamt wurden vier landwirtschaftliche Biogasanlagen mit insgesamt neun Fermentern beprobt und analysiert (BGA01/BGA02, BGA05, BGA06 und BGA32). Die Isolierung erfolgte aus frischem Probenmaterial der jeweiligen Hauptfermenter auf zwei Voll- und in drei Anreicherungsmedien, jeweils in zwei Verdünnungsstufen (siehe auch Schlussbericht BMEL/FNR-Verbundvorhabens BIOGAS-CORE, FKZ 22017111). Insgesamt konnten 691 Isolate gewonnen werden. Alle Isolate wurden über das Gen der 16S rRNA identifiziert. Die gewonnenen Isolate konnten fünf verschiedenen bakteriellen Abteilungen, 13 verschiedenen Ordnungen (Tabelle 2) bzw. 43 verschiedenen Arten zugeordnet werden, wobei 13 Isolate als potenziell neue Arten/Gattungen eingestuft wurden (Tabelle 3).

Tabelle 2: Über die Isolierung erfasste bakterielle Abteilungen und Ordnungen sowie ihre prozentuale Erfassung in den untersuchten Biogasanlagen.

Abteilung	Ordnung	BGA01/BGA02	BGA05	BGA06	BGA32
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	1,1 %	5,5 %	0,2 %	0,7 %
	<i>Bifidobacteriales</i>	---	4,4 %	0,2 %	---
	<i>Coriobacteriales</i>	---	0,4 %	---	---
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidales</i>	2,6 %	3,3 %	12,0 %	5,2 %
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillales</i>	4,6 %	5,0 %	2,0 %	1,7 %
	<i>Clostridiales</i>	---	0,4 %	5,3 %	2,0 %
	<i>Erysipelotrichales</i>	---	0,2 %	---	---
	<i>Lactobacillales</i>	1,8 %	5,2 %	6,1 %	2,2 %
	<i>Selenomonadales</i>	---	0,9 %	---	---
<i>Proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	---	0,2 %	---	---
	<i>Desulfovibrionales</i>	3,7 %	1,1 %	---	3,7 %
	<i>Enterobacteriales</i>	4,6 %	6,4 %	3,5 %	3,3 %
<i>Synergistetes</i>	<i>Synergistales</i>	---	---	0,6 %	---

Die 16S rRNA-Gensequenzen der Isolate wurden mit der erstellten 16S rRNA-Gen-Amplikondatenbank (> 15 Mio Sequenzen) abgeglichen. Die Wiederfindungsrate der 16S rRNA-Gensequenzen der Isolate war mit bis zu 2 % überraschend hoch (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen des BMEL/FNR-Verbundvorhabens Biogas-Core (FKZ 22017111) wurden u. a. drei neue Arten beschrieben: *Proteiniphilum saccharofermentans*, *Petrimonas mucosa*, und *Fermentimonas caenicola* (Hahnke et al. 2016). Die beiden erst genannten wurden auch im Rahmen dieses Projektes isoliert und zeigten eine Wiederfindungsrate von 0,45 % bzw. 0,64 % (Daten nicht gezeigt); ein Indiz dafür, dass sie zu den Generalisten des Biogas-Mikrobiomes gehören. Von den Gattungen *Fermentimonas* und *Proteiniphilum* wurden darüber hinaus neue Arten isoliert, wobei der Vertreter der Gattung *Proteiniphilum* aufgrund der sehr geringen Wiederfindungsrate (in nur drei Biogasanlagen mit 0,00002 %, Tabelle 3) als Spezialist des Biogas-Mikrobioms anzusehen ist. Vermeintlich selten vorkommende Arten können jedoch wichtige systemökologische Funktionen im Mikrobiom übernehmen, die sie vermutlich zur Aufrechterhaltung der Prozessstabilität beitragen (Theuerl et al. 2018). Ein weiteres interessantes Beispiel ist das Isolat Ni1-C5N, das nach aktuellem Kenntnisstand einer neuen Gattung zugeordnet werden kann, da es zu seinem nächsten Verwandten nur eine 92%-Sequenzidentität aufweist (Tabelle 3). Dieses Isolat zeigte im Abgleich mit den 16S rRNA-Genamplikondaten der Anlage aus der dieses Isolat gewonnen wurde (BGA05) eine Wiederfindungsrate von 2,2 % in der Hydrolysestufe bzw. von 0,07 % im Hauptfermenter; ein Indiz dafür, dass dieses Isolat entweder während der Hydrolyse oder der Acido-/Acetogenese eine wichtige Rolle im Biogas-Mikrobiom einnimmt. Im Rahmen des Projektes war geplant aus dem Pool der potenziell neuen Arten/Gattungen Isolate auszuwählen, die einer eingehenden Charakterisierung unterzogen werden sollten. Die Isolate sollten hinsichtlich ihrer genetisch-festgelegten Funktionen (Genomsequenzierung) sowie ihres Substratverwertungspotentials und ihrer substrat-spezifischen Wachstumskinetiken beschrieben werden, was für die Zuordnung einer systemökologischen Funktion von essenzieller Bedeutung ist. Leider konnten diese Arbeiten im Rahmen des Projektes nicht umgesetzt werden.

Tabelle 3: Übersicht der gewonnenen Isolate aus der Domäne der Bakterien, die einer neuen Art bzw. Gattung entsprechen, ihre phylogenetische Zuordnung sowie ihrer Wiederfindungsrate in den erhobenen Amplikondatensätzen aller untersuchten Biogasanlagen (BGA).

Isolat	Übereinstimmung 16S rRNA Gen mit der nächsten verwandten Art (inkl. GenBank Accession-No.)	Phylum, Ordnung, Familie	Wiederfindungsrate in 16S rRNA Gen-Amplikondaten
Ni2-A1L	94,3% <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> AB036759	Firmicutes, Clostridiales, Eubacteriaceae	35 BGA 0,057 %
NM1-N1B	98,2% <i>Enterococcus saccharolyticus</i> AB681191	Firmicutes, Lactobacillales, Enterococcaceae	60 BGA 0,127 %
Ni2-C1J	96,7% <i>Acidaminococcus intestini</i> AF473835	Firmicutes, Acidaminococcales, Acidaminococcaceae	11 BGA 0,024 %
NM1-N1E	94,0% <i>Anaerococcus hydrogenalis</i> AB538433	Firmicutes, Tissierellales, Peptoniphilaceae	13 BGA 0,002 %
Ni2-C1I	96,0% <i>Sutterella massiliensis</i> LT223579	Proteobacteria, Burkholderiales, Sutterellaceae	11 BGA 0,001 %
BRG2-O59AC	97,8% <i>Actinomyces europaeus</i> AM084230	Actinobacteria, Actinomycetales, Actinomycetaceae	44 BGA 0,110 %
Ni1-A1G	97,9% <i>Pseudoscardovia suis</i> HQ842701	Actinobacteria, Bifidobacteriales, Bifidobacteriaceae	12 BGA 0,069 %
Ni1-A5K	97,0% <i>Olsenella uli</i> CP002106	Actinobacteria, Coriobacteriales, Atopobiaceae	24 BGA 0,028 %
NM1-Q1CC	97,0% <i>Proteiniphilum acetatigenes</i> AY742226	Bacteroidetes, Bacteroidales, Dysgonamonadaceae	3 BGA 0,00002 %
	96,0% <i>Proteiniphilum saccharofermentans</i> KP233809	Bacteroidetes, Bacteroidales, Dysgonamonadaceae	
HB2-P5CE	97,0% <i>Fermentimonas caenicola</i> KP233810	Bacteroidetes, Bacteroidales, Porphyromonadaceae	54 BGA 0,048 %
Ni1-C5J	93,0% <i>Prevotella veroralis</i> AB547707	Bacteroidetes, Bacteroidales, Prevotellaceae	10 BGA 0,001 %
Ni1-C5N	92,0% <i>Prevotella dentalis</i> CP003368	Bacteroidetes, Bacteroidales, Prevotellaceae	6 BGA 0,026 %
HB1-Q1CH	96,0% <i>Aminobacterium colombiense</i> CP001997	Synergistetes, Synergistales, Synergistaceae	39 BGA 0,017 %

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Alle Aufgaben wurden entsprechend der Vorhabenbeschreibung durchgeführt. Die wichtigste Position des zahlenmäßigen Nachweises sind die Personalkosten, gefolgt von den Sachausgaben. Änderungen in der Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung wurden in den jährlichen Zwischenberichten dargestellt und dem Zuwendungsgeber mit rechnerisch nachvollziehbaren personen- und/oder sachmittelbezogenen Kalkulationen schriftlich mitgeteilt.

Eine detaillierte Auflistung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises erfolgt in einem gesonderten Verwendungsnachweis.

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Für den Aufbau einer nachhaltigen Bioökonomie sind das Verständnis über die systemökologische Funktionalität und die wissenschaftliche Steuerung von Mikrobiomen unerlässlich. Ziel des hier dargestellten Verbundvorhabens war es, den Einfluss von Anlagen- und Prozessparametern auf die mikrobiellen Gemeinschaften zu ermitteln und retrospektive Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen Mikrobiomstruktur und Prozesseffizienz zu ziehen. Im Rahmen des dritten bundesweiten Biogasmessprogramms wurden stabil-laufende Anlagen mit einer konstanten Einsatzstoffzusammensetzung aus pflanzlichen Biomassen und Reststoffen aus der Tierhaltung mikrobiologisch untersucht. Das Verbundvorhaben verfolgte dabei folgende Ziele:

- Inventarisierung der vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaften hinsichtlich ihrer strukturellen und funktionellen Zusammensetzung
- mikrobiologische Charakterisierung von zehn ausgewählten Biogasanlagen
 - a) Erfassung des genetisch-festgelegten und tatsächlich realisierten metabolischen Potentials ganzer Mikrobiome (Metagenom-/Metaproteomanalysen)
 - b) Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung neuer, bisher unbekannter Arten/Gattungen
 - c) Ermittlung lokaler Strukturen innerhalb eines Fermenters bzw. einer Biogasanlage und Erfassung der zeitlichen Entwicklung mikrobieller Gemeinschaften im Langzeit-Monitoring
- Korrelationsanalysen zur Erfassung der mikrobiellen Diversität mittels multivariater Statistik zur Aufklärung der biotischen und abiotischen Interaktionen
 - a) Ermittlung von grundsätzlichen Gemeinsamkeiten und Unterschieden innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften
 - b) Ermittlung des Einflusses von Anlagen- und Prozessdaten auf die strukturelle und funktionelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften
 - c) Ermittlung des Einflusses der mikrobiellen Gemeinschaften auf die Prozesseffizienz

Zentrale Arbeiten in diesem Projekt waren:

- wissenschaftliche Leitung und Koordination des Verbundvorhabens zur mikrobiologischen Inventarisierung einer repräsentativen Anzahl der in Deutschland betriebenen Biogasanlagen
- Erfassung der strukturellen und funktionellen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften mittels 16S rRNA-Genamplikonsequenzierung, Metagenom-, Metaproteom- und TRFLP-Analysen sowie die Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von bisher unbekanntem Mikroorganismen
- Verifizierung der zur Verfügung gestellten Anlagen- und Prozessdaten: Sichtung und Kontrolle der Daten, ggf. Rückfragen an den jeweiligen Verbundpartner von BMP III – Teil 1, Extraktion relevanter Daten und Visualisierung der Daten
- vergleichende systemökologische Auswertung der erhobenen mikrobiologischen Daten mittels multivariater Statistik im Abgleich mit den durch BMP III – Teil 1 erhobenen Anlagen- und Prozessdaten zur Charakterisierung spezifischer Prozesszustände

Die Ergebnisse zeigen, dass sich spezifische Prozesszustände mit indikativen Mikrobiomstrukturen in Verbindung bringen lassen. Unklar bleibt jedoch, wie „stressresistent“ die vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaften sind. Der Übergang zu einer reststoffbasierten Biogasproduktion als integraler Bestandteil der Bioökonomie ist mit hohen Anforderungen an die Anlagentechnik und vor allem die Steuerung des komplexen Prozesses verbunden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass viele Vertreter des Biogasmikrobioms sehr sensibel auf variierende Umweltbedingungen (z.B. eine Erhöhung der Prozesstemperatur oder der Ammonium-Stickstoff-Konzentration) reagieren. Eine stabile und effiziente Biogasproduktion gelingt jedoch nur, wenn die Prozesssteuerung die Anforderungen der mikrobiellen Gemeinschaften berücksichtigt. Hierfür gilt es, die Potenziale und vor allem die Grenzen der Leistungsfähigkeit des Biogas-Mikrobioms zu definieren. Die Definition von ökologischen Schwellenwerten, also Punkten, an denen sich relevante Systemeigenschaften plötzlich ändern und die auf vermeintlich kleine Änderungen in bestimmten Umweltfaktoren, z.B. Indikatorarten zurückzuführen sind,

wird zukünftig an Bedeutung gewinnen. Es reicht nicht „einfach“ nur physikalische-chemischer Prozessparameter zu definieren, anhand derer sich der Prozesszustand beurteilen oder eine bevorstehende Instabilität/Störung ableiten lässt, sondern die Mikrobiomstruktur und die Reaktion spezifischer Indikatorarten sowie die metabolische Aktivität müssen als Entscheidungsgrundlagen berücksichtigt werden.

Die geleistete Arbeit war notwendig, um die benannten Ziele des Projektes erfolgreich umzusetzen. Die getätigten Aufwendungen entsprechen der Projektplanung.

II.4 Verwertung

Das Verbundvorhaben war im Bereich der anwendungsorientierten Grundlagenforschung angesiedelt. Die erarbeiteten Ergebnisse werden daher primär als wissenschaftliche Beiträge auf (inter-)nationalen Konferenzen oder in Form von Fachartikeln der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden. Derzeit befinden sich zwei Publikationen in Bearbeitung; fünf weitere Publikationen sind geplant (siehe Punkt II.4)

Mittel- bis langfristige wissenschaftliche Erfolgsaussichten (Zeithorizont 3-5 Jahre) betreffen u. a. ein tiefergehendes Verständnis für mikrobiologische Aspekte beim Betrieb von Biogasanlagen. Hier steht vor allem die Aufklärung, wie Biogas-Mikrobiome auf Managementmaßnahmen der Anlagenbetreiber (z.B. Variationen in der Einsatzstoffzufuhr oder der Prozessführung) reagieren und wie sich diese auf die Stabilität und Effizienz des Prozesses auswirken im Mittelpunkt des Interesses (kausale Interaktionsökologie von Einzelorganismen, Organismengruppen und ganzen Gemeinschaften). So konnten Aussagen zum Einfluss von Anlagen- und Prozessparametern auf die strukturelle und funktionelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften aufgeklärt werden. Daraus ergibt sich ein hohes Potential zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit von Biogasanlagen bzw. ermöglicht es die Potenziale, vor allem aber die Grenzen der Leistungsfähigkeit des Ökosystems `Biogasfermenter´ bzw. des Biogas-Mikrobioms besser zu verstehen, um mittel- bis langfristig neue Kontroll- und Managementstrategien zu entwickeln. Hierzu bedarf es der Etablierung einer weiterführenden mikrobiologischen Analytik (im Idealfall laborunabhängige Schnelltests) zur Beurteilung des Prozesszustandes. Da im vorliegenden Forschungsvorhaben möglichst stabil-laufenden und wirtschaftlich-effiziente Biogasanlagen untersucht wurden, besteht dringender Handlungsbedarf, die gewonnenen Ergebnisse in weiterführenden Projekten (z.B. mit Biogasanlagen, die im Rahmen der Flexibilisierung häufig variierenden Bedingungen entsprechend des erforderlichen Strom- und Wärmebedarfs oder aber gewünschter Gärrestqualitäten ausgesetzt sind) zu reproduzieren bzw. zu verifizieren, um möglichst einfache Kontrollstrategien/-methoden zu entwickeln bzw. um die Ergebnisse in die Praxis zu überführen.

Die erhobenen Daten könnten darüber hinaus zur Entwicklung von neuen Ansätzen zur Modellierung und Optimierung des Biogasprozesses unter Berücksichtigung der Anforderung der Mikroorganismen an ihren Lebensraum genutzt werden. Die Tatsache, dass in einigen Biogasanlagen die hydrogenotrophe Methanogenese in Kombination mit der syntrophen Acetatoxidation dominiert, macht die Anpassung des häufig genutzten ADM1-Modells notwendig, da dieses Modell zum jetzigen Zeitpunkt den Prozess der syntrophen Acetatoxidation nicht berücksichtigt.

Alle erhobenen genomischen und proteomischen Daten werden im Zuge wissenschaftlicher Veröffentlichungen in öffentlichen Datenbanken (z. B. den National Center for Biotechnology Information, PRIDE - Proteomics Identification Database / EMBL-EBI) hinterlegt.

II.5 Erkenntnisse von Dritten

In der Literatur finden sich viele Studien, die sich mit der Auswirkung von Umweltveränderungen auf mikrobielle Lebensgemeinschaften befassen. Jedoch werden fast alle im Labormaßstab unter semi-natürlichen, streng kontrollierten Bedingungen durchgeführt, wobei oft nur einzelne Prozessparameter variiert und deren Auswirkungen betrachtet werden.

Am ATB wurde eine Studie veröffentlicht, die sich mit einer vergleichenden systemökologischen Analyse von Mikrobiomen aus 36 Fermentern von 22 Biogasanlagen aus Belgien und Deutschland mittels TRFLP befasste (Theuerl et al. 2018). Zentrale Ergebnisse sind: Jede Biogasanlage bildet ihr eigenes Mikrobiom aus. Marker-Mikrobiom-Cluster werden durch operative Parameter und darüber hinaus durch spezifische Kombinationen von bakteriellen und archaeellen Mitgliedern des Mikrobioms bestimmt. Zudem zeigte sich, dass vermeintlich selten vorkommende Arten oder Gruppen von Mikroorganismen wichtige systemökologische Funktionen im Mikrobiom übernehmen, die vermutlich zur Aufrechterhaltung der Prozessstabilität beitragen. Neben der Studie von Theuerl et al. (2018),

wurden zwei weitere Studien (Calusinska et al. 2018; Ziels et al. 2018) mit einer vergleichenden systemökologischen Analyse von Mikrobiomen in Biogasanlagen veröffentlicht. Diesen Studien ist zu entnehmen, dass trotz intensiver Forschung und einem stetigen Erkenntnisgewinn über das Mikrobiom, die meisten am Prozess beteiligten Taxa und damit ihre ökologischen Funktionen nach wie vor noch unbekannt sind. Interessant an der Studie von Calusinska et al. (2018) ist, dass die meisten Individuen des Biogas-Mikrobioms Generalisten sind, die unter verschiedenen Bedingungen existieren können, weshalb sie in den meisten Biogasanlagen vorkommen und hinsichtlich ihres Vorkommens den größten Teil der Gemeinschaft ausmachen. Im Gegensatz dazu sind die meisten Arten Spezialisten, die bestimmte ökologische Nischen besetzen, nur in wenigen Proben nachgewiesen werden und häufig spezifisch für den Fermenter sind. In 20 Biogasanlagen wurde eine Gesamtzahl von 5.938 Bakterienarten nachgewiesen. Dem sog. Core-Mikrobiom wurden nur 2,5 % (etwa 150 OTUs) mit einer mittleren relativen Häufigkeit von $70,3 \% \pm 12,5 \%$ (die Generalisten) zugeordnet. Im Gegensatz dazu wurden 84,0 % (etwa 5000 OTUs) nur in einer bestimmten Anzahl von Proben gefunden, die $3,5 \% \pm 3,8 \%$ der relativen Bakterienhäufigkeit ausmachten (die Spezialisten).

Im Bereich der Mikrobiomforschung werden zunehmend 'meta-omics'-Analysen eingesetzt, da sie einen umfassenden Einblick in die gesamte mikrobielle Gemeinschaft ermöglichen, insbesondere in die genetisch-festgelegten, d.h. potenziellen Funktionen (Metagenom) sowie den tatsächlich realisierten Prozesse (Metatranskriptom und Metaproteom) (Campanaro et al. 2020, Hassa et al. 2018, Heyer et al. 2015, 2019, Parks et al. 2018, Stewart et al. 2017, Zhang et al., 2019). Ein entscheidender Mehrwert dieser Analysen liegt in der Erfassung von qualitativ-hochwertigen metagenom-assemblierten Genomen (MAGs) (z. B. Campanaro et al. 2020, Parks et al. 2018, Stewart et al. 2017). Campanaro et al. (2020) beispielweise verglichen 134 Metagenom-Datensätze und ermittelten 1635 MAGs, von denen nur 69 einer bekannten Art zugeordnet werden konnten. Diese Studie zeigt, dass bisher nicht kultivierbare und daher nicht charakterisierte Taxa in hohem Maße in Biogasanlagen zu finden sind. Derartige Studien liefern für die Interpretation der im Rahmen des Projektes erhobenen Daten essenzielle Informationen und werden vergleichend hinzugezogen.

Langzeitstudien zur mikrobiellen Dynamik in Praxis-Biogasanlagen (Ermittlung der zeitlich-räumlichen Variationen über alle Prozessstufen einer Anlage oder im jahreszeitlichen Verlauf), wie sie im Rahmen von BMP III durchgeführt wurden, finden sich in der Literatur eher nicht. Ausnahmen sind die bereits erwähnten Studien von Calusinska et al. 2018, in der 20 Biogasanlagen über einen Zeitraum von einem Jahr betrachtet wurden sowie die Studie von Kirkegaard et al. (2017), die mikrobiellen Gemeinschaften in mehreren Abwasserbehandlungsanlagen über einen sechsjährigen Erhebungszeitraum untersucht haben.

Im Rahmen der Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von bisher unbekanntem Mikroorganismen aus Biogasanlagen gibt es in den letzten Jahren verstärkte Aktivitäten. Beispielhaft sei hier auf die Ergebnisse des BMEL/FNR-Verbundvorhaben Biogas-CORE verwiesen (z.B. Hahnke et al. 2014a und 2014b, Hahnke et al. 2016) verwiesen. In diesem Zusammenhang veröffentlichte das CeBiTec aktuell einen Artikel, in dem die Interpretation der Genomsequenz eines Isolats der Gattung *Proteinihilum* beschrieben wird (Hahnke et al. 2016, Tomazetto et al. 2018). Entsprechende physiologische und genetische Beschreibungen sollen als Referenz und zu Vergleichszwecken für die Analyse des im Rahmen des Projektes gewonnenen Isolats herangezogen werden.

In der Arbeit von Büttner et al. (2019) wurden mit dem ursprünglichen Protokoll von Heyer et al. (2013) Metaproteomanalysen von 16 Biogasanlagen durchgeführt. Sie bestätigen wie auch die Arbeit von Heyer et al. (2019b) beobachtete Gruppierung entsprechend der Biogasanlagen nach Typen der Methanogenese (strikt hydrogenotroph oder hydrogenotroph und acetoklastisch). Sie konnten außerdem Beispiele für strikt acetoklastische Methanogenese in Biogasanlagen zeigen. Heyer et al. (2019b) zeigte außerdem die Präsenz von Phagen in Biogasanlagen. Zhang et al. (2017) beobachteten wie eine bereits früher publizierte Arbeit von Calusinska et al. (2015) ebenfalls das Vorhandensein von Phagen in Biogasanlagen, allerdings basierend auf Metagenomdaten.

II.6 Veröffentlichungen

II.6.1 Publikationen

Hassa J, Maus I, Off S, Pühler A, Scherer P, Klocke M, Schlüter A (2018): Metagenome, metatranscriptome, and metaproteome approaches unraveled compositions and functional relationships of microbial communities residing in biogas plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 5045-5063.

- Theuerl S, Herrmann C, Heiermann M, Grundmann P, Landwehr N, Kreidenweis U, Prochnow A (2019): The future agricultural biogas plant in Germany: A vision. *Energies* 12(3): 396.
- Heyer R, Schallert K, Büdel A, Zoun R, Dorl S, Kohrs F, Püttker S, Siewert C, Muth T, Saake G, Reichl U, Benndorf D (2019): MPA-WORKFLOW: A robust and universal metaproteomics workflow for research studies and routine diagnostics within 24^h using phenol extraction, FASP digest, and the MetaProteomeAnalyzer. *Frontiers in Microbiology* 10: 1883.
- Heyer R, Klang J, Hellwig P, Schallert K, Kress P, Huelsemann B, Theuerl S, Reichl U, Benndorf D (2020): Impact of feeding and stirring regimes on the internal stratification of microbial communities in the fermenter of anaerobic digestion plants. *Bioresource Technology* 314, 123679.
- Theuerl S, Klang J, Hülsemann B, Mächtig T, Hassa J (eingereicht): Microbiome diversity and community-level change points within manure-based small biogas plants. *Microorganisms* (in Begutachtung)
- Hassa J, Klang J, Heyer R, Benndorf D, BMP III – Teil 1, Reichl U, Pühler A, Schlüter A, Theuerl S (in Bearbeitung): Indicative marker microbiome structures and functions deduced from the taxonomic, functional and ecological inventory of 67 full-scale digesters out of 49 biogas plants. Einreichung geplant bei *Biotechnology for Biofuels*
- Heyer R, Hellwig P, Schallert K, Hassa J, Schlüter A, Sczyrba A, Reichl U, Benndorf D (in Bearbeitung) Seasonal feeding of sugar beet silage to a biogas plant operating with an upstream hydrolysis fermenter. Einreichung geplant bei *Biotechnology for Biofuels*
- Hassa J, Osterholz B, Heyer R, Benndorf D, Reichl U, Pühler A, Henke C, Sczyrba A, Schlüter A (in Bearbeitung): Differentially abundant metagenomically assembled genomes (MAGs) in a full-scale biogas plant consisting of three differently operated fermenter and functional microbiome adaptations as revealed by genome-centered metaproteomics. *Fachzeitschrift wird noch sondiert*

II.6.2 Tagungsbeiträge

- Theuerl S, Klang J, Hassa J, Nelkner J, Schlüter A, Pühler A, Heyer R, Benndorf D (2019): Biogas-Messprogramm III - Systemmikrobiologie. KTBL/FNR Biogaskongress: Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven, 09./10.10.2019, Leipzig. (Vortrag)
- Hassa J, Klang J, Heyer R, Benndorf D, Reichl U, Hellwig P, Püttker S, Pühler A, Schlüter A, Theuerl S (2020): Comprehensive inventory of biogas microbiomes in 46 German full-scale biogas plants. 4th International Conference on Biogas Microbiology, 21.-23. September, Braga, Portugal. (akzeptiert für Vortrag)

Referenzen

- Angly FE, Dennis PG, Skarszewski A, Vanwonterghem I, Hugenholtz P, Tyson, GW (2014): CopyRighter: a rapid tool for improving the accuracy of microbial community profiles through lineage-specific gene copy number correction. *Microbiome* 2: 11.
- Allison SD, Martiny JB (2008): Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 11512-11519.
- Alou M T, Ndongo S, Frégère L, Labas N, Andrieu C, et al. (2018): Taxonogenomic description of four new *Clostridium* species isolated from human gut: '*Clostridium amazonitimonense*', '*Clostridium merdae*', '*Clostridium massilielmoense*' and '*Clostridium nigeriense*'. *New Microbes and New Infections* 21: 128-139.
- Alsouleman K, Linke B, Klang J, Klocke M, Krakat N, Theuerl S (2016): Reorganisation of a mesophilic biogas microbiome as response to a stepwise increase of ammonium nitrogen induced by poultry manure supply. *Bioresource Technology* 208: 200-204.
- Andrews S (2010): FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. URL <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Angelidaki I, Karakashev D, Batstone DJ, Plugge CM, Stams AJM (2011) Biomethanation and its potential. *Methods in Enzymology* 494: 327-351.
- Bath C, Cukalac T, Porter K, Dyall-Smith ML (2006): His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, Salterprovirus. In *Virology* 350(1): 228-239.
- Bártová V, Bárta J, Jarošová M (2019): Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(14): 5533-5547.
- Bergmann I, Mundt K, Sontag M, Baumstark I, Nettmann E, Klocke M (2010): Influence of DNA isolation on Q-PCR based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 78-84.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, et al. (2019): Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37(8): 852-857.
- Bonk F, Popp D, Weinrich S, Sträuber H, Kleinstauber S, Harms H, Centler F (2018): Intermittent fasting for microbes: How discontinuous feeding increases functional stability in anaerobic digestion. *Biotechnology for Biofuels* 11: 274.
- Bouanane-Darenfed A, Fardeau ML, Grégoire P, Joseph M, Kebbouche-Gana S, et al. (2011): *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. A new thermophilic anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from an Algerian hot spring. *Current Microbiology* 62(3): 826-832.
- Bouanane-Darenfed A, Hania WB, Hacene H, et al. (2013): *Caldicoprobacter guelmensis* sp. nov., a thermophilic, anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(6): 2049-53.
- Bouchez T, Bliex AL, Dequiedt S, Domaizon I, Dufresne A, Ferreira S, Godon JJ, Hellal J, Joulain C, Quaiser A, Martin-Laurent F, Mauffret A, Monier JM, Peyret P, Schmitt-Koplin P, Sibourg O, D'oiron E, Bispo A, Deportes I, Grand C, Cuny P, Maron PA, Ranjard L (2016): Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. *Environmental Chemistry Letters* 14: 423-441.
- Breitenstein A, Wiegel J, Haertig C, Weiss N, Andreesen JR, Lechner U (2002): Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(3): 801-807.
- Bremges A, Maus I, Belmann P, Eikmeyer F, Winkler A, et al.. (2015): Deeply sequenced metagenome and metatranscriptome of a biogas-producing microbial community from an agricultural production-scale biogas plant. *Gigascience* 4(1): s13742-015.
- Buchfink B, Xie C, Huson DH (2015): Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods* 12(1): 59.

- Buettner C, von Bergen M, Jehmlich N, Noll M (2019): *Pseudomonas* spp are key players in agricultural biogas substrate degradation. Scientific Reports 9, 12871.
- Cabezas A, Calabria de Araujo J, Callejas C, Galés A, Hamelin J, Marone A, Sousa DZ, Trably E, Etchebehere C (2015): How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process? Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 14: 555-593.
- Calusinska M, Marynowska M, Goux X, Lentzen E, Delfosse P (2016): Analysis of dsDNA and RNA viromes in methanogenic digesters reveals novel viral genetic diversity. Environmental Microbiology 18: 1162-1175.
- Calusinska, M.; Goux, X.; Fossépré, M.; Muller, E.E.L.; Wilmes, P.; Delfosse, P. (2018): A year of monitoring 20 mesophilic full-scale bioreactors reveals the existence of stable but different core microbiomes in bio-waste and wastewater anaerobic digestion systems. Biotechnology for Biofuels 11, pp. 196.
- Campanaro S, Treu L, Kougias PG, De Francisci D, Valle G, Angelidaki I (2016): Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy. Biotechnology for Biofuels 9(1): 26.
- Campanaro S, Treu L, Rodriguez-R LM, Kovalovszki A, Ziels RM, Maus I, Zhu X, Kougias PG, Basile A, Luo G, Schlüter A, Konstantinidis KT, Angelidaki I (2020): New insights from the biogas microbiome by comprehensive genome-resolved metagenomics of nearly 1600 species originating from multiple anaerobic digesters. Biotechnology for Biofuels 13: 25.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD et al. (2010): QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods 7(5): 335.
- Castellano-Hinojosa, A.; Amato, C.; Pozo, C.; González-Martínez, A.; González-López, J. (2018): New concepts in anaerobic digestion processes: Recent advances and biological aspects. Applied Microbiology and Biotechnology 102, pp. 5065-5076.
- Chao A (1984): Nonparametric estimation of the number of classes in a population. Scandinavian Journal of Statistics 11(4): 265-270.
- Chen S, Dong X (2005): *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55(6): 2257-2261.
- Chouari R, Le Paslier D, Dauga C, Daegelen P, Weissenbach J, Sghir A (2005): Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester, Applied and Environmental Microbiology 71: 2145-2153.
- Clarke KR (1993): Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Australian Journal of Ecology 18: 117-143.
- Daniel-Gromke J, Rensberg N, Denysenko V, Stinner W, Schmalfuß T, Scheftelowitz M, Nelles M, Liebetrau J (2018): Current developments in production and utilization of biogas and biomethane in Germany. Chemie Ingenieur Technik 90: 17-35.
- Dufréne M, Legendre P (1997): Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. Ecological Monographs 67: 345-366.
- De Vrieze J, Hennebel T, Boon N, Verstraete W (2012): Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. Bioresource Technology 112: 1-9.
- De Vrieze J, Saunders AM, He Y, Fang J, Nielsen PH, Verstraete W, Boon N (2015): Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. Water Research 75: 312-323.
- De Vrieze J, Ijaz UZ, Saunders AM, Theuerl S (2018): Terminal restriction fragment length polymorphism is an “old school” reliable technique for swift microbial community screening in anaerobic digestion. Scientific Reports 8: 16818.
- Dollhofer V, Callaghan TM, Griffith GW, Leubhn M, Bauer J (2017): Presence and transcriptional activity of anaerobic fungi in agricultural biogas plants. Bioresource Technology 235: 131-139.
- Dombrowski N, Lee JH, Williams TA, Offre P, Spang A (2019): Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN archaea. FEMS Microbiology Letters 366(2): fnz008.

- Dyksma S, Gallert C (2019): Candidatus *Syntrophosphaera thermopropionivorans*: a novel player in syntrophic propionate oxidation during anaerobic digestion. *Environmental Microbiology Reports* 11(4): 558-570.
- Edgar RC (2010): Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26(19): 2460-2461.
- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR) (2016): Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung. ISBN 3-00-014333-5.
- Falsen E, Collins MD, Welinder-Olsson C, Song Y, Finegold SM, Lawson PA (2005): *Fastidiosipila sanguinis* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive, coccus-shaped organism from human blood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(2): 853-858.
- Faust K, Lahti L, Gonze D, de Vos WM, Raes J (2015): Metagenomics meets time series analysis: unraveling microbial community dynamics. *Current Opinion in Microbiology* 25: 56-66.
- Frau A, Kenny JG, Lenzi L, Campbell BJ, Ijaz UZ, Duckworth CA, Burkitt MD, Hall N, Anson J, Darby AC, Probert CSJ (2019): DNA extraction and amplicon production strategies deeply influence the outcome of gut microbiome studies. *Scientific Reports* 9: 9328.
- Fricke AM, Podlesny D, Fricke WF (2019): What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *Journal of Advanced Research* 19: 105-112.
- German Biogas Association. Biogas market data in Germany 2018/2019. Online verfügbar unter: <https://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/en-german-biogas-market-data> (letztmalig abgerufen am 28.01.2019).
- Griffin ME, McMahon KD, Mackie RI, Raskin L (1998): Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnology and Bioengineering* 57(3): 342-355.
- Gutleben J, Chaib De Mares M, van Elsas JD, Smidt H, Overmann J, Sipkema D (2018): The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate. *Critical Reviews in Microbiology* 44: 212-229.
- Hahnke S, Langer T, Koeck DE, Klocke M (2016). Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov., isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(3): 1466-1475.
- Hassa J, Maus I, Off S, Pühler A, Scherer P, Klocke M, Schlüter A (2018): Metagenome, metatranscriptome, and metaproteome approaches unraveled compositions and functional relationships of microbial communities residing in biogas plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 5045-5063.
- Hassa J, Wibberg D, Maus I, Pühler A, Schlüter A (2020): Genome Analyses and genome-centered metatranscriptomics of *Methanothermobacter wolfeii* strain SIV6, isolated from a thermophilic production-scale biogas fermenter. *Microorganisms* 8(1): 13.
- Hattori S (2008): Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environments* 23: 118-127.
- Heyer R, Kohrs F, Reichl U, Benndorf D (2015): Metaproteomics of complex microbial communities in biogas plants. *Microbial Biotechnology* 8: 749-763.
- Heyer R, Schallert K, Zoun R, Becher B, Saake G, Benndorf D (2017): Challenges and perspectives of metaproteomic data analysis. *Journal of Biotechnology* 261: 24-36.
- Heyer, R.; Schallert, K.; Siewert, C.; Kohrs, F.; Greve, J.; Maus, I.; Klang, J.; Klocke, M.; Heiermann, M.; Hoffmann, M.; Püttker, S.; Calusinska, M.; Zoun, R.; Saake, G.; Benndorf, D.; Reichl, U. (2019a): Metaproteome analysis reveals that syntrophy, competition, and phage-host interaction shape microbial communities in biogas plants. *Microbiome* 7, 69.
- Heyer R, Schallert K, Büdel A, Zoun R, Dorl, S, Behne A, Kohrs F, Püttker S, Siewert C, Muth T, Saake G, Reichl U, Benndorf D (2019b): A Robust and Universal Metaproteomics Workflow for Research Studies and Routine Diagnostics Within 24 h Using Phenol Extraction, FASP Digest, and the MetaProteomeAnalyzer. *Frontiers in Microbiology* 10: 1883.

- Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC (2007): Metagenome analysis using MEGAN. In Proceedings of the 5th Asia-Pacific Bioinformatics Conference, pp. 7-16.
- Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ (2010): Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11(1): 119.
- Joshi N A, Fass JN (2011): Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (version 1.33). URL <https://github.com/najoshi/sickle>.
- Jousset A, Bienhold C, Chatzinotas A, Gallien L, Gobet A, Kurm V, Kusel K, Rillig MC, Rivett DW, Salles JF, van der Heijden MGA, Youssef NH, Zhang XW, Wei Z, Hol WHG (2017) Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *Isme Journal* 11: 853-862.
- Jünemann S, Kleinbölting N, Jaenicke S, Henke C, Hassa J, et al. (2017): Bioinformatics for NGS-based metagenomics and the application to biogas research. *Journal of Biotechnology* 261: 10-23.
- Kang DD, Froula J, Egan R, Wang Z (2015): MetaBAT, an efficient tool for accurately reconstructing single genomes from complex microbial communities. *PeerJ*, 3, e1165.
- Kanehisa M (1996): Toward pathway engineering: a new database of genetic and molecular pathways. *Science and Technology Japan* 59: 34-38.
- Killer J, Havlik J, Bunesova V, Vlkova E, Benada O (2014): *Pseudoscardovia radai* sp. nov., another representative of a new genus within the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of a wild pig (*Sus scrofa scrofa*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64(9): 2932-2938.
- Killer J, Mrázek J, Bunešová V, Havlík J, Koppová I, et al.. (2013): *Pseudoscardovia suis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Bifidobacteriaceae* isolated from the digestive tract of wild pigs (*Sus scrofa*). *Systematic and Applied Microbiology* 36(1): 11-16.
- Kim J, Lee C (2016): Response of a continuous anaerobic digester to temperature transitions: a critical range for restructuring the microbial community structure and function. *Water Research* 89: 241-251.
- Kim BR, Shin J, Guevarra RB, Lee JH, Kim DW, et al. (2017): Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(12): 2089-2093.
- Klang J, Theuerl S, Szewzyk U, Huth M, Tölle R, Klocke M (2015): Dynamic variation of the microbial community structure during the long-time mono-fermentation of maize and sugar beet silage. *Microbial Biotechnology* 8: 764-775.
- Klang J, Szewzyk U, Bock D, Theuerl S (2019): Nexus between the microbial diversity level and the stress tolerance within the biogas process. *Anaerobe* 56: 8-16.
- Klang J, Szewzyk U, Bock D, Theuerl S (2020): Effect of a profound feedstock change on the structure and performance of biogas microbiomes. *Microorganisms* 8(2): 169.
- 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. *Journal of Biotechnology* 142: 38-49.
- Krumholz LR, Bryant MP (1986): *Syntrophococcus sucromutans* sp. nov. gen. nov. uses carbohydrates as electron donors and formate, methoxymonobenzenoids or *Methanobrevibacter* as electron acceptor systems. *Archives of Microbiology* 143(4): 313-318.
- Kundu K, Sharma S, Sreekrishnan TR (2017): Influence of process parameters on anaerobic digestion microbiome in bioenergy production: Towards an improved understanding. *Bioenergy Research* 10: 288-303.
- Lebuhn M, Derenkó J, Rademacher A, Helbig S, Munk B, Pechtl A, Stolze Y, Prowe S, Schwarz WH, Schlüter A, Liebl W, Klocke M (2016): DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison. *Bioengineering* 3(1): 7.
- Leng L, Yang P, Singh S, Zhuang H, Xu, L, Chen W-H, Dolfig J, Li D, Zhang Y, Zeng H, et al. (2018): A review on the bioenergetics of anaerobic microbial metabolism close to the thermodynamic limits and its implications for digestion applications. *Bioresource Technology* 247: 1095-1106.

- Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW (2015): MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31(10): 1674-1676.
- Li H (2012): seqtk: Toolkit for processing sequences in FASTA/Q formats. URL <https://github.com/lh3/seqtk>.
- Li S, Qi C, Zhu H, Yu R, Xie C, et al. (2019): *Lactobacillus reuteri* improves gut barrier function and affects diurnal variation of the gut microbiota in mice fed a high-fat diet. *Food & Function* 10(8): 4705-4715.
- Liu Y, Qiao JT, Yuan XZ, Guo RB, Qiu YL (2014): *Hydrogenispora ethanolica* gen. nov., sp nov., an anaerobic carbohydrate-fermenting bacterium from anaerobic sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 1756-1762.
- Li YQ, Liu CM, Wachemo AC, Li XJ (2018): Effects of liquid fraction of digestate recirculation on system performance and microbial community structure during serial anaerobic digestion of completely stirred tank reactors for corn stover. *Energy* 160: 309-317.
- Luo G, De Francisci D, Kougias PG, Treu L, Zhu X, Angelidaki I (2015): New steady-state microbial community compositions and process performances in biogas reactors induced by temperature disturbances. *Biotechnology for Biofuels* 8: 3.
- Lloyd KG, Steen AD, Ladau J, Yin J, Crosby L (2018): Phylogenetically novel uncultured microbial cells dominate Earth microbiomes. *mSystems* 3:e00055-18
- Magoč T, Salzberg SL (2011): FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27(21): 2957-2963.
- Manzoor S, Schnürer A, Bongcam-Rudloff E, Müller B (2018): Genome-Guided Analysis of *Clostridium ultunense* and Comparative Genomics Reveal Different Strategies for Acetate Oxidation and Energy Conservation in Syntrophic Acetate-Oxidising Bacteria. *Genes* 9: 225
- Martin M (2011): Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. Journal* 17(1): 10-12.
- Maus I, Koeck DE, Cibis KG, Hahnke S, Kim YS, et al. (2016): Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnology for Biofuels* 9(1): 171.
- Maus I, Kim YS, Wibberg D, Stolze Y, Off S, et al. (2017): Biphasic study to characterize agricultural biogas plants by high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing and microscopic analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(2): 321-334.
- Maus I, Rummig M, Bergmann I, Heeg K, Pohl M, et al. (2018): Characterization of Bathyarchaeota genomes assembled from metagenomes of biofilms residing in mesophilic and thermophilic biogas reactors. *Biotechnology for Biofuels* 11(1): 167.
- Maus I, Klocke M, Derenkó J, Stolze Y, Beckstette M, et al. (2020): Impact of process temperature and organic loading rate on cellulolytic/hydrolytic biofilm microbiomes during biomethanation of ryegrass silage revealed by genome-centered metagenomics and metatranscriptomics. *Environmental Microbiome* 15(1): 1-21.
- Mei R, Nobu MK, Narihiro T, Kuroda K, Muñoz Sierra J, Wu Z, Ye L, Lee PKH, Lee PH, van Lier JB, et al. (2017): Operation-driven heterogeneity and overlooked feed-associated populations in global anaerobic digester microbiome. *Water Research* 124: 77–84.
- Morris BEL, Henneberger R, Huber H, Moissl-Eichinger C (2013): Microbial syntrophy: Interaction for the common good. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 384-406.
- Muth T, Behne A, Heyer R, Kohrs F, Benndorf D, Hoffmann M, Lehtevä M, Reichl U, Martens L, Rapp E (2015): The MetaProteomeAnalyzer: a powerful open-source software suite for metaproteomics data analysis and interpretation. *Journal of Proteome Research* 14: 1557-1565.
- Müller B, Sun L, Westerholm M, Schnürer A (2016): Bacterial community composition and fhs profiles of low-and high-ammonia biogas digesters reveal novel syntrophic acetate-oxidising bacteria. *Biotechnology for Biofuels* 9(1): 48.

- Nobu MK, Dodsworth JA, Murugapiran SK, Rinke C, Gies EA et al. (2016): Phylogeny and physiology of candidate phylum 'Atribacteria' (OP9/JS1) inferred from cultivation-independent genomics. *The ISME Journal* 10: 273-286.
- O'Leary NA, Wright M W, Brister JR, Ciuffo S, Haddad D, et al. (2016): Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research* 44: D733-D745.
- Oliver JD (2010): Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34(4): 415-425.
- Ortseifen V, Stolze Y, Maus I, Sczyrba A, Bremges A, et al. (2016): An integrated metagenome and-proteome analysis of the microbial community residing in a biogas production plant. *Journal of Biotechnology* 231: 268-279.
- Overbeek R, Begley T, Butler RM, Choudhuri JV, Chuang HY et al (2005) : The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Research* 33(17): 5691-5702.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen J, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R (2014): The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* 42(D1), D206-D214.
- Paliy O, Shankar V (2016): Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular Ecology* 25: 1032-1057.
- Parks DH, Rinke C, Chuvochina M, Chaumeil P-A, Woodcroft BJ, Evans PN, Hugenholtz P, Tyson GW (2018): Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature Microbiology* 2: 1533-1542.
- Pelletier E, Kreimeyer A, Bocs S, Rouy Z, Gyapay G, Chouari R, Riviere D, Ganesan A, Daegelen P, Sghir A, Cohen GN, Medigue C, Weissenbach J, Le Paslier D (2008): "*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*": genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division, *Journal of Bacteriology* 190: 2572-2579.
- Portillo MC, Leff JW, Lauber CL, Fierer N (2013): Cell size distributions of soil bacterial and archaeal taxa. *Applied and Environmental Microbiology* 79(24): 7610-7617.
- Rademacher A, Nolte C, Schönberg M, Klocke M (2012) Temperature increases from 55 to 75 in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within the bacterial and archaeal community structure. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96: 565-576.
- Ram RJ, Verberkmoes NC, Thelen MP, Tyson GW, Baker BJ, Blake RC 2nd, Shah M, Hettich RL, Banfield JF (2005): Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science* 308(5730): 1915–1920.
- Ramette A (2007): Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 142-160.
- Scheffer M, Carpenter SR, Lenton TM, Bascompte J, Brock W, Dakos V, van de Koppel J, van de Leemput IA, Levin SA, van Nes EH, Pascual M, Vandermeer J (2012): Anticipating critical transitions. *Science* 338: 344-348.
- Schnürer A (2016): Biogas Production: Microbiology and Technology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 156: 195-234.
- Shade A, Caporaso JG, Handelsman J, Knight R, Fierer N (2013): A meta-analysis of changes in bacterial and archaeal communities with time. *The ISME Journal* 7, 1493–1506.
- Shannon CE, Weaver W (1949): *The mathematical theory of communication*, 117 pp. Urbana: University of Illinois Press.
- Sikora A, Detman A, Mielecki D, Chojnacka A, Błaszczuk M (2018): Searching for metabolic pathways of anaerobic digestion: A useful list of the key enzymes, In: *Anaerobic Digestion*, J. Rajesh Banu (Ed), IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.81256.
- Simpson EH (1949): Measurement of diversity. *Nature* 163(4148): 688-688.
- Smith KS, Ingram-Smith C (2007): *Methanosaeta*, the forgotten methanogen?. *Trends in Microbiology* 15(4): 150-155.

- Song Y, Malmuthuge N, Steele MA, Guan LL (2018) : Shift of hindgut microbiota and microbial short chain fatty acids profiles in dairy calves from birth to pre-weaning. *FEMS Microbiology Ecology* 94(3): fix179.
- Stewart RD, Auffret MD, Warr A, Wiser AH, Press MO, et al. (2018): Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen. *Nature Communications* 9: 870.
- Stinner, W., Stur, M, Paul N, Riesel D (2015): Gülle-Kleinanlagen. Hrsg.: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR), 15. Auflage.
- Stolze Y, Zakrzewski M, Maus I, Eikmeyer F, Jaenicke S, et al.. (2015): Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. *Biotechnology for Biofuels* 8(1): 14.
- Stolze Y, Bremges A, Ruming M, Henke C, Maus I, et al. (2016): Identification and genome reconstruction of abundant distinct taxa in microbiomes from one thermophilic and three mesophilic production-scale biogas plants. *Biotechnology for Biofuels* 9(1): 156.
- Sun W, Yu G, Louie T, Liu T, Zhu C, Xue G, Gao P (2015): From mesophilic to thermophilic digestion: the transitions of anaerobic bacterial, archaeal, and fungal community structures in sludge and manure samples. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(23):10271-10282.
- Sun Y, Chen Q, Lin P, Xu R, He D, et al. (2019): Characteristics of gut microbiota in patients with rheumatoid arthritis in Shanghai, China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9: 369.
- Sundberg C, Al-Soud WA, Larsson M, Alm E, Yekta SS, Svensson BH, Sørensen SJ, Karlsson A (2013): 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiology Ecology* 85: 612-626.
- Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M (2014): Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS One*, 9(8).
- Tanca A, Fraumene C, Manghina V, Palomba A, Abbondio M, Deligios M, Pagnozz, D, Addis MF, Uzzau S (2017): Diversity and functions of the sheep faecal microbiota: a multi-omic characterization. *Microbial Biotechnology* 10(3): 541-554.
- Theuerl S, Kohrs F, Benndorf D, Maus I, Wibberg D, Schlüter A, Kausmann R, Heiermann M, Rapp E, Reichl U, Pühler A, Klocke M (2015): Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 7791-7803.
- Theuerl S, Klang J, Heiermann M, De Vrieze J (2018): Marker microbiome clusters are determined by operational parameters and specific key taxa combinations in anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 263: 128-135.
- Theuerl S, Herrmann C, Heiermann M, Grundmann P, Landwehr N, Kreidenweis U, Prochnow A (2019a): The Future Agricultural Biogas Plant in Germany: A Vision. *Energies* 12(3): 396.
- Theuerl S, Klang J, Prochnow A (2019b): Process Disturbances in Agricultural Biogas Production— Causes, Mechanisms and Effects on the Biogas Microbiome: A Review. *Energies* 12(3): 365.
- Theuerl S, Klang J, Hassa J, Nelkner J, Schlüter A, Pühler A, Heyer R, Benndorf D (2019c): Biogas-Messprogramm III – Teil 2 „Systemmikrobiologie“. In: *Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven*, Tagungsbandbeitrag des Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL) (Hrsg.), ISBN 978-3-945088-68-5, S. 152.
- Tomazetto G, Hahnke S, Wibberg D, Pühler A, Klocke M, Schlüter A (2018): *Proteiniphilum saccharofermentans* str. M3/6T isolated from a laboratory biogas reactor is versatile in polysaccharide and oligopeptide utilization as deduced from genome-based metabolic reconstructions. *Biotechnology Reports* 18: e00254.
- Treu L, Kougias PG, Campanaro S, Bassani I, Angelidaki I (2016): Deeper insight into the structure of the anaerobic digestion microbial community; the biogas microbiome database is expanded with 157 new genomes. *Bioresource Technology* 216: 260-266.
- Van Wonterghem I, Jensen D, Ho DP, Batstone DJ, Tyson GW (2014): Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 55-64.

- Van Vliet S (2015): Bacterial Dormancy: How to Decide When to Wake Up. *Current Biology* 25(17): 753-755.
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, et al (Eds.) (2011): *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3)*. Springer Science & Business Media.
- Wasserfallen A, Nölling J, Pfister P, Reeve J, De Macario EC (2000): Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(1): 43-53.
- Weiland P (2010): Biogas production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 849-860.
- Wenzel L, Heyer R, Schallert K, Löser L, Wünschiers R, Reichl U, Benndorf D (2018): SDS-PAGE fractionation to increase metaproteomic insight into the taxonomic and functional composition of microbial communities for biogas plant samples. *Engineering in Life Sciences* 18(7): 498-509.
- Werner JJ, Knights D, Garcia ML, Scalfone NB, Smith S, Yarasheski K, Cummings TA, Beers AR, Knight R, Angenent LT (2011): Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *PNAS* 108: 4158-4163.
- Westerholm M, Moestedt J, Schnürer A (2016) Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance. *Applied Energy* 179: 124-135.
- Westerholm M, Isaksson S, Karlsson Lindsjö O, Schnürer A (2018): Microbial community adaptability to altered temperature conditions determines the potential for process optimisation in biogas production. *Appl. Energy* 226: 838-848.
- Yokoyama H, Wagner ID, Wiegel J (2010): *Caldicoprobacter oshimai* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, xylanolytic, extremely thermophilic bacterium isolated from sheep faeces, and proposal of *Caldicoprobacteraceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(1): 67-71.
- Zakrzewski M, Goesmann A, Jaenicke S, Jünemann S, Eikmeyer F, et al. (2012): Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *Journal of Biotechnology* 158(4): 248-258.
- Zamanzadeh M, Hagen LH, Svensson K, Linjordet R, Horn SJ (2016): Anaerobic digestion of food waste e Effect of recirculation and temperature on performance and microbiology. *Water Research* 96: 246-254.
- Zhang J, Gao Q, Zhang Q, Wang T, Yue H, Wu L, Sh J, Qin Z, Zhou J, Zuo J, et al. (2017): Bacteriophage–prokaryote dynamics and interaction within anaerobic digestion processes across time and space. *Microbiome* 5, pp. 57.
- Zhang L, Loh K-C, Lim JW, Zhang J (2019): Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 100: 110-126.
- Ziels RM, Svensson BH, Sundberg C, Larsson M, Karlsson A, Yekta SS (2018): Microbial rRNA gene expression and co-occurrence profiles associate with biokinetics and elemental composition in full-scale anaerobic digesters. *Microbial Biotechnology* 11: 694-709.

ANHANG I

Steckbrief - Teilvorhaben 1 (ATB)

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das übergeordnete Forschungsziel des Teilvorhabens 1, das am Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie umgesetzt wurde, war zum einen die Ermittlung der zeitlich-räumlichen Variabilität der Mikrobiomstruktur im jahreszeitlichen Verlauf und/oder über alle Prozessstufen einer Biogasanlage. Für diesen Arbeitsschwerpunkt wurden aus dem Anlagenset, das zusammen mit BMP III - Teil 1 betrachtet wurde, zehn Biogasanlagen ausgewählt. Die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften wurde mittels TRFLP-Analyse auf Basis der Untersuchung des Gens der 16S rRNA separat für Bakterien und Archaeen erfasst. Unter Anwendung multivariater Statistik wurden die Prozesszustände charakterisiert und die Anpassungsfähigkeit des Mikrobioms an die spezifischen Bedingungen bewertet. Da die Mehrzahl der an der Bildung von Biogas beteiligten Mikroorganismen nach wie vor unbekannt ist, war die Isolierung, Kultivierung und Beschreibung bisher unbekannter Arten ein weiterer Arbeitsschwerpunkt des Teilvorhabens 1.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

Die zu bearbeitenden Arbeitspakete umfassten:

- die Auswahl und Beprobung von Biogasanlagen sowohl zusammen mit den Verbundpartnern von BMP III - Teil 1 als auch mit dem BMEL/FNR-Forschungsvorhaben BIOGAS-LIVE (FKZ: 22013913)
- die Isolierung der mikrobiellen DNA (AP 3), die sowohl für die mikrobiologische Inventarisierung im Rahmen von Projektteil 1 verwendet wurde (Teilvorhaben 2), also auch für die Ermittlung der zeitlich-räumlichen Variabilität der Mikrobiomstruktur im Rahmen von Projektteil 2
- die Ermittlung der zeitlich-räumlichen Variabilität der Mikrobiomstruktur im jahreszeitlichen Verlauf und/oder über alle Prozessstufen einer Biogasanlage
- Korrelationsanalysen zur Erfassung der mikrobiellen Diversität mittels multivariater Statistik zur Aufklärung der biotischen und abiotischen Interaktionen und insbesondere um Prozesszustände zu charakterisieren und die Anpassungsfähigkeit des Mikrobioms an die spezifischen Prozessbedingungen zu bewerten
- Isolierung, Kultivierung und physiologische Charakterisierung von neuen, bislang unbekanntem Mikroorganismen

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Für die Ermittlung der zeitlich-räumlichen Variationen im jahreszeitlichen Verlauf und/oder über alle Prozessstufen einer Anlage wurden zehn Biogasanlagen untersucht. Ein Vergleich der Mikrobiomstrukturen zeigt, dass in Anlagen, die pflanzliche Biomassen verwerten, die mikrobielle Diversität durch ein hohes Maß an Ähnlichkeiten gekennzeichnet ist, während Anlagen mit Reststoffen aus der Tierhaltung eine hohe zeitliche Variabilität/Dynamik innerhalb der mikrobiellen Diversität aufweisen. Bezogen auf die Prozessstabilität zeigt ein Vergleich von drei 75 kW-Güllekleinanlagen deutlich, dass ein Anlagenbetrieb unter mesophilen Bedingungen zu bevorzugen ist, insbesondere auch dann, wenn Einsatzstoffe verwendet werden, die zur Anreicherung von prozesshemmenden Metaboliten wie organischen Säuren oder Ammonium/Ammoniak führen können. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Risiko einer Prozessstörung deutlich erhöht ist, wenn der mikrobiellen Gemeinschaft nach einer Instabilitätsphase nicht ausreichend Zeit zur Regeneration gegeben wird. Grundsätzlich lässt sich vermuten, dass Biogasanlagen, in denen größere Mengen Fermenterinhalt rezirkuliert werden, weniger anfällig für Prozessinstabilitäten/-störungen sind. Bei den untersuchten Anlagen handelte es sich um reine NaWaRo-Anlagen, die mit Mais-, Gras- oder Roggenganzpflanzensilage sowie saisonalen Zugabe von Zuckerrübensilage unter mesophilen Bedingungen betrieben wurden. Eine Rezirkulation von Fermenterinhalt aus den Nachgärern/Gärrestlagern in die jeweiligen Hauptfermenter ist hier gängige Praxis, um insbesondere die Abbaueffizienz der zugeführten Einsatzstoffe durch „ausgehungerte“ Mikroorganismen zu erhöhen. Eine Rezirkulation von Fermenterinhalt führt insgesamt zur Ausbildung einer sehr konstanten und widerstandsfähigen Mikrobiomstruktur, so dass Änderungen in der Prozessführung, z.B. wie hier dargestellt ein Einsatzstoffwechsel, keine Auswirkungen auf die Prozessstabilität haben, da diese permanent `abgepuffert` werden.

Darüber hinaus wurden 691 Isolate (Bakterien) gewonnen, die 43 verschiedenen Arten zugeordnet werden konnten. 13 Isolate wurden als potenziell neue Arten eingestuft, von denen drei Isolate potenzielle neue Gattungen darstellen.

Steckbrief - Teilvorhaben 2 (CeBiTec)

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das Forschungsziel des Teilvorhaben 2, das am Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld umgesetzt wurde, war zum einen die taxonomische Inventarisierung der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen mittels 16S rRNA-Gen Amplikon-Sequenzierung und bioinformatischer und biostatistischer Datenauswertung. Zum anderen wurden für zehn Biogasfermenter Metagenome sequenziert und bioinformatisch ausgewertet, um das genetisch festgelegte funktionelle Potential zu ermitteln und Genome bisher unbeschriebener Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft zu rekonstruieren. Darüber hinaus wurden in Zusammenarbeit mit TV1 und TV3 Methoden der multivariaten Statistik angewandt, um die taxonomischen Profile der mikrobiellen Gemeinschaften mit den Prozesszuständen zu korrelieren.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

Die zu bearbeitenden Arbeitspakete umfassten:

- Bestandsaufnahme/Inventarisierung der Mikroorganismen in 95 Biogasmikrobiomen mittels 16S rRNA-Gen Amplikonsequenzierung und bioinformatische und biostatistische Datenauswertung
- Ermittlung des mikrobiellen Metagenoms zur Erfassung des genetischen Potentials für zehn Biogasfermenter von fünf Biogasanlagen
- In Zusammenarbeit mit Teilvorhaben 1 erfolgte die Auswahl von Isolaten für die Genom-Analysen und Charakterisierung
- Korrelationsanalysen zur Erfassung der mikrobiellen Diversität mittels multivariater Statistik zur Aufklärung der biotischen und abiotischen Interaktionen und insbesondere um Prozesszustände zu charakterisieren und die Anpassungsfähigkeit des Mikrobioms an die spezifischen Prozessbedingungen zu bewerten

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Insgesamt wurden die mikrobiellen Gemeinschaften von 95 Biogasfermentern von 60 Biogasanlagen basierend auf der 16S rRNA-Gen-Amplikonsequenzierung taxonomisch profiliert. Die am häufigsten erfassten Abteilungen waren *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Cloacimonetes*, *Actinobacteria*, *Tenericutes* und *Euryarcheota*. Darüber hinaus wurden die taxonomischen Profile von fünf ausgewählten Biogasanlagen (insgesamt zehn Fermenter) einer detaillierten Betrachtung unterzogen, wobei wesentliche Unterschiede in der Mikrobiomstruktur zu erkennen waren im Vergleich von Biogasanlagen, die ausschließlich/überwiegend pflanzliche Biomasse verwerten und Biogasanlagen, die Reststoffe aus der Tierhaltung verwerten.

Die Analyse des mikrobiellen Metagenoms für diese zehn Biogasfermenter auf Basis einer Einzelread-Analyse ermöglichte es, das genetisch-festgelegte funktionelle Potential der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft zu identifizieren, wobei alle für den Prozess relevanten Stoffwechselwege nachgewiesen wurden. Die Ergebnisse der Einzelread-Analyse zeigte zudem, dass es Unterschiede z.B. zwischen verschiedenen Fermentern einer Biogasanlage oder Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Biogasanlagen gibt, was auf die zugrundeliegenden verfahrensspezifischen Anlagenparameter zurückgeführt werden kann.

Darüber hinaus ermöglichte der Assemblierungs-/Binning-Ansatz die Genom-Rekonstruktion von Mitgliedern der mikrobiellen Gemeinschaft. Die taxonomische Zuordnung der aus den Metagenomen rekonstruierten Genome zeigte, dass eine Vielzahl von Mikroorganismen nach wie vor unbekannt ist. Eine erste Betrachtung des genetisch-festgelegten funktionellen Potentials exemplarischer MAGs ergab, dass diese verschiedene Funktionen, wie z. B. einen fermentativen Stoffwechsel, Methanogenese oder auch syntrophe Essigsäureoxidation, im Biogasprozess übernehmen könnten.

Auf Basis der 16S rRNA-Gen-Amplikondatenbank der 95 Biogasfermenter wurde die Abundanz der von Teilvorhaben 1 gewonnen Isolate in den untersuchten Biogasfermenter ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die Isolate z.T. hohe Abundanzen (2 %) aufwiesen und nicht nur in den Biogasfermentern, aus denen sie isoliert wurden, sondern auch in weiteren Fermentern vorkommen.

Steckbrief - Teilvorhaben 3 (OvGU)

1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Das übergeordnet Forschungsziel des Teilvorhaben 3, das an der Ott-von-Guericke-Universität umgesetzt wurde, war die Inventarisierung der funktionalen Diversität von Mikrobiomen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen mittels einfacher und hochaufgelöster Metaproteomanalyse sowie die Korrelation dieser Daten mit der taxonomischen Diversität (Teilvorhaben 1 und 2) und mit den Anlagenspezifischen Prozesszuständen.

2. Bearbeitete Arbeitspakete

Die zu bearbeitenden Arbeitspakete umfassten:

- Isolierung der mikrobiellen Proteine mit einfacher und erhöhter Auflösung
- Analyse des mikrobiellen Metaproteoms im Rahmen einer Inventarisierung der funktionellen Diversität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen (Projektteil 1)
- Analyse des mikrobiellen Metaproteoms mit hoher Auflösung für die Erfassung der funktionellen Variabilität innerhalb der Bereiche einer Biogasanlage sowie im zeitlichen Verlauf (Projektteil 2)
- Korrelationsanalysen zur Erfassung der mikrobiellen Diversität mittels multivariater Statistik zur Aufklärung der biotischen und abiotischen Interaktionen und insbesondere um Prozesszustände zu charakterisieren und die Anpassungsfähigkeit des Mikrobioms an die spezifischen Prozessbedingungen zu bewerten

3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Für die Inventarisierung wurden 95 Biogasfermenter aus 60 möglichst stabil-laufenden Biogasanlagen untersucht. Die erfassten mikrobiellen Funktionen konnten der Hydrolyse, den Gärungsstoffwechselwegen und der Methanogenese entsprechend des Anaerobic Digestion Model 1 (ADM 1) zugeordnet werden. Die Daten zeigen, dass das ADM 1-Modell um die Gärungswege für Ethanol, Milch- und Ameisensäure ergänzt werden sollte, da diese Funktionen nachgewiesen wurden. Bezüglich der Methanogenese lassen sich zwei Typen von Biogasanlagen unterscheiden: (i) Biogasfermenter mit acetoklastischer und hydrogenotropher Methanogenese und (ii) Biogasfermenter mit ausschließlich hydrogenotropher Methanogenese. Im Falle der ausschließlich hydrogenotrophen Methanogenese werden in den gleichen Fermentern auch mehr Proteine des Wood-Ljungdahl-Weges nachgewiesen, die für die Umwandlung von Essigsäure in Wasserstoff und Kohlendioxid durch syntrophe Acetatoxidation verantwortlich sind. Die aus den Metaproteomdaten resultierenden taxonomischen Profile bestätigen die zuvor benannten Schlussfolgerungen. Allerdings ergeben sich im Vergleich zu den taxonomischen Profilen basierend auf der 16S rRNA-Gen-Amplikonsequenzierung (Teilvorhaben 2) einige Unterschiede, die sich aus der Nutzung von zwei verschiedenen Methoden ergeben. Bei der vergleichenden Beurteilung sollte dieser methodische Fehler berücksichtigt werden.

Ein Vergleich der funktionellen Diversität in einer Anlage mit Hydrolysestufe und Hauptfermenter ergab, dass, entgegen der Erwartung, schwerer abbaubare Substanzen wie Zellulose oder Xylan nicht in der Hydrolysestufe abgebaut wurden, sondern entsprechende Enzyme in erhöhter Konzentration im Hauptfermenter zu finden waren. Die saisonale Zugabe von Zuckerrübensilage hatte in derselben Anlage hauptsächlich Auswirkungen in der Hydrolysestufe.

Die Analyse des mikrobiellen Metaproteoms mit hoher Auflösung an zehn ausgewählten Reaktoren ergab u.a. folgende Erkenntnis: Einsatzstoffe haben Effekte auf das Metaproteom. Im Falle der Zugabe von Resten aus der Kartoffelverarbeitung wurden Proteine mit antimikrobieller Aktivität gegen pflanzenpathogene Mikroorganismen wie Proteaseinhibitoren und Phospholipasen gefunden. Die mögliche Weiterwirkung solcher antimikrobiell-wirksamen Enzyme, die über die Einsatzstoffe in Biogasanlagen eingetragen werden, sollte zukünftig näher betrachtet werden.

Ein interessantes Nebenergebnis dieses Projektes war der Nachweis von Bacteriophagenproteinen. Als mikrobielle Wirte kommen je nach Phagentyp sowohl hydrolytische und fermentative Bakterien als auch methanogene Archaeen in Frage. Aufgrund von derzeit nur geringen Kenntnissen zu einzelnen Wirt-Phagen-Systeme aus Biogasanlagen kann der Effekt auf die Stabilität von Biogasanlagen nur schwer beurteilt werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die mikrobielle Gemeinschaft im Fermenterraum in einer großskaligen Versuchsanlage relativ homogen verteilt ist, sodass Zonierungen bei Modellierungen von Biogasfermentern wahrscheinlich nicht berücksichtigt werden müssen.

ANHANG II

Tabelle AII-01: Übersicht der in BMP-III betrachteten 60 Biogasanlagen, sowie die Projektteile, in denen sie analysiert wurden.

Biogasanlage	Fermenteranzahl	Projektteil 1 Inventarisierung	Projektteil 2a ZRV	Metagenom	Projektteil 2b Metaproteom	Kultivierung
BGA01	1	x	x	x	x	-
BGA02	1	x	x	x	x	-
BGA03	1	x	-	-	-	-
BGA04	1	x	-	-	-	-
BGA05	2	x	x	x	x	-
BGA06	2	x	x	x	x	-
BGA08	1	x	-	-	-	-
BGA09	2	x	-	-	-	-
BGA10	2	x	-	-	-	-
BGA11	1	x	-	-	-	-
BGA12	1	x	-	-	-	-
BGA13	1	x	-	-	-	-
BGA14	1	x	-	-	-	-
BGA15	1	x	-	-	-	-
BGA16	1	x	-	-	-	-
BGA17	1	x	-	-	-	-
BGA18	1	x	-	-	-	-
BGA19	1	x	-	-	-	-
BGA20	1	x	-	-	-	-
BGA21	1	x	-	-	-	-
BGA22	1	x	-	-	-	-
BGA23	2	x	x	-	-	-
BGA25	2	x	-	-	-	-
BGA27	1	x	-	-	-	-
BGA29	1	x	-	-	-	-
BGA32	3	x	-	x	x	x
BGA33	1	x	-	-	-	-
BGA34	1	x	x	-	-	-
BGA35	1	x	-	-	-	-
BGA36	1	x	x	-	-	-
BGA37	2	x	x	-	-	-
BGA38	1	x	-	-	-	-
BGA40	2	x	-	-	-	-
BGA41	2	x	-	-	-	-
BGA42	1	x	-	-	-	-
BGA43	1	x	-	-	-	-
BGA44	1	x	-	-	-	-
BGA45	2	x	-	-	-	-
BGA46	1	x	-	-	-	-
BGA47	1	x	-	-	-	-
BGA48	1	x	-	-	-	-
BGA49	1	x	x	x	x	-
BGA50	1	x	x	-	-	-
BGA51	1	x	-	-	-	-
BGA52	1	x	-	-	-	-
BGA53	2	x	-	-	-	-
BGA61	3	x	-	-	-	-
BGA62	11	x	-	-	-	-
BGA63	2	x	-	-	-	-
BGA64	2	x	-	-	-	-
BGA65	1	x	-	-	-	-
BGA66	2	x	-	-	-	-
BGA67	1	x	-	-	-	-
BGA68	1	x	-	-	-	-
BGA69	4	x	-	-	-	-
BGA70	2	x	-	-	-	-
BGA71	1	x	-	-	-	-
BGA72	1	x	-	-	-	-
BGA73	1	x	-	-	-	-
BGA74	2	x	-	-	-	-
BGA75	2	x	-	-	-	-
BGA01_t1	1	x	x	-	-	-
BGA01_t2	1	x	x	-	-	x
BGA02_t1	1	x	x	-	-	-
BGA02_t2	1	x	x	-	-	x
BGA05_t1	2	x	x	-	x	-
BGA05_t2	1	x	x	-	x	x
BGA06_t1	2	x	x	-	-	-
BGA06_t2	2	-	x	-	-	x

Tabelle AII-02: Variabilität in den verfahrensspezifischen Anlagendaten der 46 zusammen mit BMP III – Teil 1 untersuchten Biogasanlagen (BGA). GPS = Ganzpflanzensilage, HTK = Hühnertrockenkot, OLR = Organic Loading Raten (Raumbelastung).

Biogasfermenter	Maissilage [t _{FM} d ⁻¹]	Grassilage [t _{FM} d ⁻¹]	Getreide [t _{FM} d ⁻¹]	Zuckerrübe [t _{FM} d ⁻¹]	GPS [t _{FM} d ⁻¹]	Rindergülle [t _{FM} d ⁻¹]	Rindermist [t _{FM} d ⁻¹]	Schweinegülle [t _{FM} d ⁻¹]	Schweinemist [t _{FM} d ⁻¹]	Festmist [t _{FM} d ⁻¹]	HTK [t _{FM} d ⁻¹]	Putenmist [t _{FM} d ⁻¹]	Schafmist [t _{FM} d ⁻¹]	Pferdemist [t _{FM} d ⁻¹]	Sonstiges [t _{FM} d ⁻¹]	Rezirkulation [t _{FM} d ⁻¹]	Raumbelastung [kg _{OTS} m ⁻³ d ⁻¹]	Retentions- zeit [d]	Temperatur [°C]
BGA01_F	28,9	0,0	0,0	3,6	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	11,4	56,8	41,8
BGA02_F	22,3	0,0	0,0	3,0	4,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	10,2	70,8	43,4
BGA03_F	13,5	2,7	0,0	0,0	3,2	17,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	80,9	36,4
BGA04_F	15,4	5,0	1,0	0,0	4,0	34,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0	29,0	43,5	43,5
BGA05_F	13,8	0,0	0,0	3,8	0,0	0,0	0,0	11,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	47,2	2,9	25,9	40,0
BGA06_F1	16,0	2,5	0,0	9,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	222,4	13,2	8,2	42,6
BGA06_F2	16,0	2,5	0,0	9,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	213,8	13,0	8,5	42,5
BGA08_F	18,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	59,9	39,5
BGA09_F1	6,5	0,3	0,2	0,0	0,0	15,5	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	2,2	64,6	39,7
BGA09_F2	6,5	0,3	0,2	0,0	0,0	15,5	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	2,2	64,6	40,1
BGA10_F1	9,1	0,1	0,3	0,0	0,0	12,6	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	66,6	42,9
BGA10_F2	9,1	0,1	0,3	0,0	0,0	12,6	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	66,6	42,9
BGA11_F	19,4	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	76,8	43,9
BGA12_F	16,7	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	4,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	3,1	108,3	42,4
BGA13_F	14,2	0,0	2,8	0,0	0,0	42,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,3	26,6	43,8
BGA14_F	11,2	4,5	1,4	1,0	0,0	48,3	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,1	37,4	38,0
BGA15_F	7,7	0,1	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	14,2	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	68,3	40,8
BGA16_F	0,0	17,3	0,0	0,0	0,0	61,9	25,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,9	68,4	4,1	26,9	42,0
BGA17_F	5,9	1,4	4,5	2,5	0,0	7,4	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,2	18,6	52,6
BGA18_F	28,9	0,0	2,2	0,0	0,0	2,0	12,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,8	14,9	49,0
BGA19_F	12,6	3,7	0,7	0,0	5,2	22,2	6,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	56,0	7,3	14,2	47,0
BGA20_F	11,5	6,3	0,6	2,4	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	3,3	84,0	48,0
BGA21_F	16,3	7,9	1,6	2,5	7,1	15,4	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	5,6	40,8	48,0
BGA22_F	0,0	3,8	1,4	0,0	3,9	0,0	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,9	5,0	5,0	46,1	39,0
BGA23_F1	27,4	26,5	0,4	0,0	5,7	31,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	7,6	13,4	48,0
BGA23_F2	27,4	26,5	0,4	0,0	5,7	31,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,0	7,6	13,4	48,0
BGA25_F1	13,5	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,4	52,0	41,2
BGA25_F2	13,5	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,4	52,0	41,1
BGA27_F	2,4	8,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	66,0	40,4
BGA29_F	6,6	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	16,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7	40,0	44,8
BGA32_F1	6,5	5,3	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,8	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5	71,0	44,5
BGA32_F2	8,0	6,5	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,8	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,3	75,0	50,0
BGA32_F3	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,4	475,0	56,3
BGA33_F	13,6	3,0	0,8	0,0	1,4	13,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	4,2	47,5	42,5
BGA34_F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	15,0	21,2	3,6	42,5
BGA35_F	39,7	23,4	0,0	24,6	25,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,8	8,7	21,3	51,4
BGA36_F	17,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7	5,6	0,0	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	43,7	8,8	3,9	33,1	41,8
BGA37_F1	37,7	5,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,3	7,7	25,5	42,3
BGA37_F2	38,0	5,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,2	7,7	26,5	43,0
BGA38_F	56,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	134,0	11,0	11,0	40,9
BGA40_F1	7,1	2,2	0,0	0,0	0,0	22,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	4,1	39,8	40,5
BGA40_F2	7,1	2,2	0,0	0,0	0,0	22,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	4,1	39,8	40,5
BGA41_F1	19,2	0,0	1,0	0,0	0,0	8,5	0,0	8,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	63,0	6,5	16,4	43,6
BGA41_F2	19,2	0,0	1,0	0,0	0,0	8,5	0,0	8,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	63,0	6,5	16,4	43,1
BGA42_F	11,9	2,3	0,0	0,0	0,0	83,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	28,8	43,6
BGA43_F	14,5	0,9	2,6	0,0	0,0	5,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,5	22,9	43,4
BGA44_F	18,3	0,0	0,8	0,0	0,0	1,0	0,0	13,6	0,0	0,0	4,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,1	44,4	44,0
BGA45_F1	37,4	0,0	0,0	0,0	16,4	8,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,8	3,6	73,0	47,0
BGA45_F2	37,4	0,0	0,0	0,0	16,4	8,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,8	3,6	73,0	44,6
BGA46_F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	44,8	38,5
BGA47_F	27,8	0,1	0,0	0,0	0,0	18,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	5,1	37,5	46,0
BGA48_F	0,0	12,7	0,0	0,0	0,0	13,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	48,1	39,3
BGA49_F	0,6	1,7	0,0	0,0	0,0	8,3	0,8	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	73,0	41,8
BGA50_F	0,1	1,5	0,0	0,0	0,0	1,9	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,1	0,0	1,6	65,6	41,9
BGA51_F	18,9	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	12,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	8,7	26,7	50,0
BGA52_F	0,0	3,6	0,0	0,0	2,5	28,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	98,7	36,0
BGA53_F1	36,3	15,9	0,9	0,0	13,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	4,3	14,3	50,1
BGA53_F2	35,7	15,7	13,7	0,0	13,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	4,3	14,3	50,2
BGA61_F1	19,6	4,9	0,0	0,0	8,2	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	1,7	47,8	49,1
BGA61_F3	19,6	4,9	0,0	0,0	8,2	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	1,7	47,8	48,1

Tabelle AII-03: Variabilität in den chemischen Prozessdaten der 46 zusammen mit BMP III – Teil 1 untersuchten Biogasanlagen (BGA).

Biogasfermenter	Trockenmasse (TS) [% FM]	Organische Trockenmasse (oTS) [% TS]	pH [-]	Gesamt Kjeldahl Stickstoff [g kg _{FM} ⁻¹]	Gesamt Ammoniumstickstoff [g kg _{FM} ⁻¹]	Essigsäure [g kg _{FM} ⁻¹]	Propionsäure [g kg _{FM} ⁻¹]	i-Buttersäure [g kg _{FM} ⁻¹]	n-Buttersäure [g kg _{FM} ⁻¹]	i-Valeriansäure [g kg _{FM} ⁻¹]	n-Valeriansäure [g kg _{FM} ⁻¹]	Capronsäure [g kg _{FM} ⁻¹]	Gesamtsäuren (C ₂ -C ₆) [g kg _{FM} ⁻¹]
BGA01_F	8,95	81,74	7,74	5,12	2,14	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16
BGA02_F	9,15	81,99	7,83	5,29	2,24	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14
BGA03_F	8,06	72,28	7,71	4,93	2,32	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33
BGA04_F	8,90	74,37	7,64	4,99	2,15	0,25	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45
BGA05_F	5,08	74,05	8,03	4,09	2,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BGA06_F1	7,39	75,36	7,53	4,52	1,23	0,53	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57
BGA06_F2	8,02	79,11	7,59	4,58	1,28	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30
BGA08_F	8,78	78,87	7,71	5,79	2,28	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28
BGA09_F1	5,95	71,15	7,86	3,80	1,56	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
BGA09_F2	5,97	70,33	7,74	3,82	1,54	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
BGA10_F1	7,70	74,40	7,93	4,68	2,14	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
BGA10_F2	7,51	73,66	7,98	4,75	2,10	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15
BGA11_F	13,75	74,29	7,98	7,69	3,88	0,42	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45
BGA12_F	11,77	72,44	7,95	6,89	3,36	0,36	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39
BGA13_F	8,90	72,82	7,70	4,70	2,24	1,09	0,17	0,03	0,03	0,01	0,01	0,01	1,35
BGA14_F	7,12	75,43	7,77	4,48	2,12	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
BGA15_F	5,73	75,12	7,72	4,42	1,96	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07
BGA16_F	10,04	75,46	7,86	5,70	2,42	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37
BGA17_F	12,15	82,61	7,85	4,38	1,89	0,45	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,51
BGA18_F	11,28	79,17	7,64	6,27	3,88	1,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,10
BGA19_F	11,88	76,31	7,97	4,70	2,57	1,42	0,07	0,03	0,19	0,02	0,00	0,00	1,74
BGA20_F	11,44	76,45	8,10	6,27	3,96	0,32	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33
BGA21_F	11,25	76,86	7,93	6,21	4,06	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35
BGA22_F	12,49	73,65	7,54	4,74	2,76	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14
BGA23_F1	11,36	76,76	7,94	5,20	2,98	1,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,20
BGA23_F2	11,48	75,26	8,01	5,69	3,09	0,96	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,05
BGA25_F1	8,08	77,87	7,59	4,60	2,10	1,57	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	1,61
BGA25_F2	8,48	79,77	7,56	4,60	2,00	1,64	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,68
BGA27_F	15,32	73,63	8,18	6,70	3,40	0,04	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,08
BGA29_F	6,73	78,24	7,84	4,70	3,10	1,84	0,16	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	2,06
BGA32_F1	15,60	74,26	8,01	6,90	3,70	0,49	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50
BGA32_F2	14,16	74,65	8,29	6,90	4,30	0,94	0,79	0,12	0,05	0,10	0,00	0,00	2,00
BGA32_F3	5,35	65,96	8,08	4,20	2,80	1,03	1,15	0,10	0,00	0,10	0,00	0,00	2,37
BGA33_F	6,90	79,28	7,49	3,69	1,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BGA34_F	9,81	77,57	6,08	3,85	2,08	7,75	2,48	0,25	2,30	0,71	0,38	0,40	14,27
BGA35_F	9,72	69,98	7,73	5,10	2,16	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16
BGA36_F	9,11	80,52	7,94	5,85	3,55	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12
BGA37_F1	9,84	83,36	7,76	5,43	2,20	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
BGA37_F2	10,28	83,42	7,77	5,09	2,10	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12
BGA38_F	8,74	82,97	7,43	4,43	1,17	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06
BGA40_F1	7,84	73,90	7,79	5,06	2,04	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
BGA40_F2	8,00	65,09	7,79	5,08	2,16	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07
BGA41_F1	6,82	79,78	8,04	4,52	2,46	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07
BGA41_F2	7,70	77,44	8,14	4,78	2,38	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
BGA42_F	5,78	73,10	7,87	3,62	2,02	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11
BGA43_F	8,48	78,19	7,90	4,96	2,32	1,15	0,16	0,03	0,01	0,01	0,00	0,00	1,37
BGA44_F	8,07	77,91	7,87	6,10	3,62	1,05	0,07	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	1,17
BGA45_F1	8,73	76,82	7,96	5,22	3,24	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21
BGA45_F2	8,68	77,65	7,96	5,34	2,34	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16
BGA46_F	3,94	68,07	7,72	2,65	1,46	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06
BGA47_F	8,23	75,80	7,45	1,16	2,60	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11
BGA48_F	11,40	71,65	7,73	2,62	4,84	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11
BGA49_F	10,26	68,90	8,12	3,89	4,83	0,94	0,16	0,02	0,03	0,03	0,00	0,00	1,19
BGA50_F	9,34	69,07	7,62	2,94	1,70	0,06	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
BGA51_F	6,55	65,96	7,66	6,15	3,12	0,66	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,74
BGA52_F	6,55	65,96	7,86	6,06	4,65	1,96	0,42	0,05	0,05	0,04	0,04	0,00	2,56
BGA53_F1	11,96	76,59	7,81	6,45	3,93	0,63	0,14	0,07	0,10	0,05	0,02	0,00	1,01
BGA53_F2	11,57	76,49	7,76	6,60	3,90	0,34	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38
BGA61_F1	10,69	79,70	7,77	5,18	3,14	0,12	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16
BGA61_F3	9,97	81,34	7,87	5,02	2,76	0,14	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18

Tabelle AII-04: Änderungen der taxonomischen Zusammensetzung in BGA05 auf dem Niveau der Ordnungen (basierend auf Metaproteomdaten, angegeben als Quotienten zwischen zwei Bedingungen, grau hinterlegt: signifikante Veränderungen $p < 0,05$).

	Hydrolyse mit Rübe / Hydrolyse ohne Rübe	Fermenter mit Rübe / Fermenter ohne Rübe	Hydrolyse mit Rübe / Fermenter mit Rübe	Hydrolyse ohne Rübe / Fermenter ohne Rübe
Clostridiales	1,1	1,0	1,7	1,6
Bacillales	1,2	1,0	1,4	1,1
Methanosarcinales	0,6	0,8	0,3	0,4
Bacteroidales	0,8	1,1	1,2	1,4
Enterobacteriales	1,5	1,2	0,9	0,7
Methanococcales	0,8	0,9	0,4	0,5
Rhizobiales	0,9	1,0	0,4	0,4
Actinomycetales	0,9	1,3	1,8	2,6
Methanobacteriales	0,5	1,1	0,7	1,5
Lactobacillales	1,2	1,4	4,4	5,0
Thermoanaerobacterales	1,4	1,1	1,0	0,8
Pseudomonadales	0,9	1,2	0,6	0,8
Thermococcales	1,1	1,1	0,5	0,5
Spirochaetales	0,9	1,1	0,9	1,1
Pasteurellales	1,8	1,2	1,5	1,0
Desulfovibrionales	0,9	0,8	0,3	0,3
Thermotogales	0,9	1,1	1,3	1,7
Bifidobacteriales	0,7	2,2	9,0	28,7
Archaeoglobales	0,9	0,9	0,4	0,4
Selenomonadales	1,0	0,9	1,2	1,1
Andere Ordnungen	1,0	1,1	0,8	0,8