

**Charakterisierung der anaeroben Gärung verschiedener
Ausgangssubstrate mittels 16S rRNA Gen
Amplikonsequenzierung und Metaproteomanalytik**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) in der Bayreuther
Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften
(BayNAT) der Universität Bayreuth

vorgelegt von

M. Sc. Bioanalytik

Christian Büttner

aus Lichtenfels

Bayreuth, 2020

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2016 bis August 2020 an der Fakultät für angewandte Naturwissenschaften der Hochschule für angewandte Wissenschaften Coburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Matthias Noll angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 17.08.2020

Zulassung durch das Leitungsgremium: 20.08.2020

Wissenschaftliches Kolloquium: 27.04.2021

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Markus Lippitz

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Matthias Noll (Gutachter)

Prof. Dr. Dirk Schüler (Gutachter)

PD. Dr. Alfons Weig (Vorsitz)

Prof. Dr. Andreas Römpf

(Weiterer Gutachter: Prof. Dr. Tillmann Lüders)

*Was wir wissen, ist ein Tropfen;
was wir nicht wissen, ein Ozean.*

- Sir Isaac Newton -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	V
Abstract.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	XI
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis.....	XV
1 Einleitung und Theorie	1
1.1 Biogas als Energieträger	1
1.1.1 Nutzung von Biogas in Deutschland	1
1.1.2 Aufbau und Funktionsweise von anaeroben Fermentern	3
1.2 Die vier Phasen des anaeroben Abbaus organischen Materials	5
1.2.1 Hydrolyse	6
1.2.2 Acidogenese	6
1.2.3 Acetogenese	7
1.2.4 Methanogenese	9
1.3 Relevante Prozessparameter beim anaeroben Abbau.....	10
1.3.1 Substratbasis	10
1.3.2 Temperatur.....	11
1.3.3 pH-Wert.....	12
1.3.4 Flüchtige organische Säuren und totale Alkalinität.....	12
1.4 Die Bedeutung mikrobieller Gemeinschaften für die Umwelt	14
1.4.1 Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften	14
1.4.2 OMICS-Technologien im Kontext der Mikrobiomforschung.....	16
1.5 Berechnung mikrobieller Netzwerke auf Basis von OMICS- Datensätzen	19
1.5.1 Einordnung von Netzwerken in den ökologischen Kontext	19
1.5.2 Aufbau und Eigenschaften von mikrobiellen Netzwerken	20
1.5.3 Die Berechnung mikrobieller Netzwerke	21
1.5.4 Die topologische Rolle von Knoten	24
1.6 Motivation und Hypothesen	26

2	Material und Methoden	29
2.1	Geräte und Materialien	29
2.2	Verwendete Chemikalien	30
2.3	Probennahme	33
2.4	Ermittlung der Anlagenparameter	34
2.4.1	Prozessparameter der Biogasanlagen	34
2.4.2	Prozessparameter von Kläranlagen.....	37
2.5	16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung.....	38
2.5.1	Nukleinsäureextraktion	38
2.5.2	Quantitative und qualitative Überprüfung der Extrakte	39
2.5.3	Primerwahl und Überprüfung der Amplifizierbarkeit	40
2.5.4	Sequenzierung	41
2.5.5	Auswertung der Sequenzierung des 16S rRNA Gens	42
2.6	Metaproteomuntersuchungen.....	46
2.6.1	Proteinextraktion.....	46
2.6.2	Proteinquantifizierung	47
2.6.3	SDS-Page und tryptischer Proteinverdau.....	47
2.6.4	NanoLC-MS/MS-Messungen	49
2.6.5	Auswertung der Metaproteomdatensätze	50
2.7	Verfügbarkeit der generierten Datensätze.....	53
3	Ergebnisse	54
3.1	Prozessparameter der beprobten Anlagen	54
3.1.1	Biogasanlagenparameter	54
3.1.2	Kläranlagenparameter	56
3.2	Mikrobielle Gemeinschaften in Biogas- und Kläranlagen.....	57
3.2.1	Beschreibung der Biodiversität	57
3.2.2	Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogas- und Kläranlagen	58
3.2.3	Kernmikrobiome von Biogas- und Kläranlagen.....	59
3.2.4	Die Varianz in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in BPs und STPs	64
3.2.5	Einfluss von Prozessparametern auf die mikrobielle Gemeinschaft...70	
3.2.6	Mikrobielle Interaktionsmuster	72

3.3 Funktionelle Charakterisierung der Biogasanlagen	78
3.3.1 Taxonomische und funktionelle Proteinzusammensetzung	78
3.3.2 Einteilung der Anlagen auf Basis des vorherrschenden Methanogenesewegs.....	81
3.3.3 Anlagencluster auf verschiedenen taxonomischen und funktionellen Ebenen.....	82
3.3.4 Funktionelle Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften	87
3.3.5 Zusammenhang zwischen relativer Abundanz und funktioneller Redundanz auf KO-Ebene	91
3.3.6 Einfluss von Prozessparametern auf verschiedene taxonomische und funktionelle Ebenen	92
3.3.7 Mikrobielle Interaktionsmuster in Abhängigkeit des Methanogenesewegs.....	96
4 Diskussion der Ergebnisse	103
4.1 Mikrobielle Gemeinschaften der anaeroben Gärung.....	103
4.1.1 Unterschiede in der Diversität zwischen den Anlagentypen.....	103
4.1.2 Unterschiedliche Kernmikrobiome in BPs und STPs	105
4.1.3 Einfluss der Umweltparameter auf die mikrobielle Zusammensetzung.....	108
4.1.4 Identifikation mikrobieller Interaktionsmuster mittels Netzwerkanalysen	111
4.2 Metaproteomuntersuchungen.....	116
4.2.1 Anzahl detektierter Proteine	116
4.2.2 Trennung der Anlagen auf Basis der Proteinprofile.....	117
4.2.3 Bestimmung des dominanten Methanogenesewegs.....	118
4.2.4 Mikrobielle Gemeinschaften und deren Funktion	119
4.2.5 Bedeutung der funktionellen Redundanz für die mikrobielle Gemeinschaft	124
4.2.6 Identifikation geeigneter Biomarker	125
4.2.7 Abhängigkeit der mikrobiellen Interaktionsmuster vom Methanogeneseweg	126
4.3 Vergleich ausgewählter Ergebnisse auf beiden Ebenen für Biogasanlagen	130
4.3.1 Unterschiede in der relativen Abundanz von Archaeen und Bakterien zwischen beiden Ebenen	130

4.3.2 Unterschiede hinsichtlich der Aussagekraft auf DNA- und Proteinebene am Beispiel des wahrscheinlichen Hauptmethanogenesewegs	131
4.4 Fazit.....	133
4.4.1 Unterschiede in Diversität und Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in BPs und STPs	133
4.4.2 Funktionelle Charakterisierung der anaeroben Gärung in Abhängigkeit des dominanten Methanogenesewegs	134
4.4.3 Spezifische Interaktionsmuster für jeden Methanogeneseweg	135
5 Ausblick.....	136
6 Literaturverzeichnis	139
7 Danksagung.....	171
8 Anhang.....	173
8.1 Abbildungen	173
8.2 Tabellen.....	175
8.3 Elektronische Tabellen.....	180
9 Publikationen, Vorträge und Poster	181
10 (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen	183

Zusammenfassung

Biogas wird beim mikrobiellen, anaeroben Abbau von organischem Material gebildet. Der Einsatz von Biogas als Energieträger kann wesentlich zur reduzierten Nutzung von fossilen Energieträgern beitragen. Für die in Zukunft angestrebte Prozessflexibilisierung und -optimierung in Biogas- und Kläranlagen ist ein tiefes Verständnis der mikrobiellen Zusammensetzung und der mikrobiellen Interaktionsmuster während der anaeroben Gärung (AD) von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften von 16 Biogas- (BPs) und zehn Kläranlagen (STPs) mittels 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung untersucht. Mittels Metaproteomanalysen wurden zusätzlich die 16 BPs taxonomisch und funktionell charakterisiert.

Die mikrobiellen Gemeinschaften in STPs waren durch eine im Vergleich zu den BPs signifikant höhere Diversität und Evenness charakterisiert. Für beide Anlagentypen wurden bakterielle und archaelle Kernmikrobiome gebildet, welche die operativen taxonomischen Einheiten (OTUs) beinhalteten, die in allen Anlagen des jeweiligen Anlagentyps präsent waren. Das bakterielle Kernmikrobiom von BPs umfasste knapp 20 % aller OTUs, die einen Anteil von ca. 94 % an der mittleren Gesamtabundanz hatten. Hohe Abundanzen wurden dabei v.a. für Mitglieder der bisher unkultivierten Ordnungen *MBA08*, *SHA-98* und die Familie *Thermotogaceae* beobachtet. In STPs waren ca. 33 % der OTUs Teil des Kernmikrobioms, das knapp 70 % der mittleren relativen Abundanz erklärte und von Mitgliedern der Familien *Cloacamonaceae*, *Anaerolinaceae* und der Ordnung *Burkholderiales* dominiert wurde. Die archaellen Kernmikrobiome bildeten in BPs sechs OTUs und in STPs zehn OTUs, die einen Anteil an der archaellen Gesamtabundanz von jeweils knapp 50 % abdeckten. Während in BPs die Familie *Methanomicrobiaceae* das archaelle Kernmikrobiom dominierte, wurden in STPs hohe Abundanzen für *Methanobacteriaceae* und die bisher unkultivierte Familie *WSA2* beobachtet. Korrespondenzanalysen bestätigten eine höhere Diversität und Varianz innerhalb der bakteriellen und archaellen Gemeinschaften in STPs. Mittels kanonischer Korrespondenzanalyse wurde gezeigt, dass in BPs die Parameter pH und Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der bakteriellen

Gemeinschaft hatten, wohingegen in STPs für keinen Parameter ein signifikanter Einfluss nachgewiesen werden konnte. Die Zusammensetzung der archaellen Gemeinschaft wurde in BPs signifikant durch die Substratanteile von Rindergülle und Getreide beeinflusst, in STPs hingegen durch den pH-Wert. Auf Basis der relativen Abundanzen wurden mit dem Algorithmus MENA für beide Anlagentypen mikrobielle Netzwerke berechnet, wobei das STP-Netzwerk eine komplexere Netzwerkstruktur hatte. Die überwiegende Mehrheit der mikrobiellen Interaktionsmuster war für einen Anlagentyp spezifisch. Anhand ihrer Topologie konnten in BPs knapp 20 % der OTUs den Generalisten zugeordnet werden, wohingegen dies in STPs für 4 % der Fall war. Auffällig war weiterhin die hohe Zahl an archaellen OTUs innerhalb der Generalisten im BP-Netzwerk.

Bei den Metaproteomanalysen wurden Proteine für alle wichtigen Stoffwechselprozesse der AD detektiert. Dabei waren Proteine der Methanogenese, Glykolyse und des Substratumsatzes sowohl bei der absoluten Häufigkeit, als auch bei den relativen Abundanzen dominant. Diese Proteine wurden taxonomisch überwiegend den Phyla *Euryarcheota*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* zugeordnet. Die funktionelle Zuordnung der Proteine zu den verschiedenen Methanogenesewegen erlaubte eine Einteilung der Anlagen hinsichtlich ihres wahrscheinlich dominierenden Methanogenesewegs in acetoklastische (AcMe) und hydrogenotrophe Methanogenese (HyMe) bzw. einer Mischung aus beiden Methanogenesewegen (BoMe). Diese Trennung konnte auch durch Hauptkomponentenanalysen auf verschiedenen taxonomischen und funktionellen Ebenen bestätigt werden. Für einige Prozesse, wie der Glykolyse, wurde eine hohe funktionelle Redundanz beobachtet, wobei keine einzelnen Mikroorganismen dominant waren. Bei Prozessen die als limitierender Schritt bzw. Flaschenhals in der AD beschrieben wurden, wie die Hydrolyse und/oder die syntrophe Acetatoxidation, war hingegen eine geringe funktionelle Redundanz, bei gleichzeitiger Dominanz weniger Mikroorganismen vorhanden. In hydrogenotrophen Anlagen wurde Acetat überwiegend durch die syntroph Actetat-oxidierenden Bakterien *Thermacetogenium phaeum* und *Syntrophaceticus schinkii* zu H_2 und CO_2 oxidiert und von *Methanoculleus bourgensis* und *Methanoculleus marisnigri* zu Methan umgesetzt. In den acetoklastischen

Anlagen wurde Acetat durch Mitglieder der Familie *Erysipelotrichaceae* gebildet und von *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* und *Methanotheroxiphosium soehngenii* zu Methan umgesetzt. In Anlagen von BoMe wurde eine Koexistenz der genannten Organismen beobachtet und Methan über beide Methanogenesewege gebildet. Durch Korrelationsanalysen konnte das 60kDa Chaperonin groEL als geeigneter Biomarker für den Temperaturstress und die Abundanz der Methyl-Coenzym-M-Reduktase als Marker für eine bevorstehende Übersäuerung identifiziert werden.

Aufgrund der hohen Komplexität der Proteindaten wurden die mikrobiellen Netzwerke mit dem Algorithmus CoNet auf Basis der auf Speziesebene zusammengefassten, relativen Proteinabundanzen berechnet. Die Netzwerke zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich Komplexität und der Art der mikrobiellen Interaktionsmuster, wobei das Netzwerk für HyMe komplexer als AcMe und BoMe war. In HyMe und BoMe wurden außerdem deutlich mehr Interaktionen beobachtet, die auf Co-Präsenz der OTUs beruhten, als in AcMe. Anhand ihrer topologischen Indizes konnten *D. tunisiensis* und *Peptococcaceae bacterium 1109* als Schlüsselorganismen identifiziert werden, die beide überwiegend an der Hydrolyse von Kohlenhydraten beteiligt waren. Eine weitere Sonderrolle nahmen 15 *Pseudomonas spp.* ein, deren Interaktionsmuster und Proteinexpression größtenteils über alle Netzwerke konserviert waren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind auch von praktischer Bedeutung. Die Identifikation der genannten Biomarker ermöglicht es zukünftig Prozessstörungen frühzeitig zu erkennen und zu beheben, wodurch wirtschaftliche Schäden vermieden werden können. Das Vorhandensein von Kernmikrobiomen in BPs und STPs spricht dafür, dass sich die angestrebte Substratflexibilisierung in beiden Anlagentypen problemlos realisieren lässt. Bei dieser Substratflexibilisierung sollte darauf geachtet werden, eine hohe Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft zu erreichen, um dieser eine gezielte Adaption an die geänderten Prozessbedingungen zu ermöglichen und Flaschenhälse im Abbauprozess zu vermeiden. Eine Möglichkeit stellt die Beimischung von Klärschlamm zum Substrat dar.

Abstract

Biogas, which is generated during microbial degradation of organic waste under anoxic conditions, has the potential to contribute greatly to the intended energy transition. Future feeding of biogas (BPs) and sewage treatment plants (STPs) should get more flexible to meet feedstock and process conditions for a more economic operation. Therefore, a detailed understanding of the participating microorganisms as well as their microbial interaction patterns are essential. Therefore, the microbial communities of 16 BPs and 10 STPs were characterized using 16S rRNA gene amplicon sequencing. In addition, a metaproteomic approach enabled further taxonomic and functional characterization of BPs.

Microbial communities in STPs were characterized by a significantly higher diversity and evenness compared to BPs. The bacterial core microbiome of BPs, defined as operational taxonomic units (OTUs) present in all plants, was composed of about 20 % of all bacterial OTUs and was responsible for a mean relative abundance of 94 %. It was mainly dominated by members of the family *Thermotogaceae* and the uncultured orders *MBA08* and *SHA-98*. In STPs, about 33 % of the OTUs were part of the bacterial core microbiome, which accounted for roughly 70 % of the mean relative abundance. These dominating microorganisms were mainly assigned to the families *Cloacamonaceae*, *Anaerolinaceae* and the order *Burkholderiales*. Archaeal core microbiomes in BPs and STPs consisted of 16 and 10 OTUs, respectively. While members of *Methanomicrobiaceae* dominated in BPs, high abundances for members of *Methanobacteriaceae* and the uncultured family *WSA2* were present in STPs. Correspondence analyses confirmed the observation of higher bacterial and archaeal diversity and variance in STPs. Canonical correspondence analysis indicated that bacterial communities in BPs were significantly affected by pH and temperature, while no significant effect for any process parameter was observed for STPs. In contrast, archaeal community compositions were significantly linked to proportions of cattle manure and corn in BPs and to pH in STPs. Based on relative abundances, microbial networks were calculated separately for BPs and STPs by using MENA algorithm, whereby STP network had a more complex network structure. The vast majority of

microbial interactions was plant-specific. Based on their topology, a high proportion of nodes (20 %) were characterized as generalists in BP network, whereof many nodes were taxonomically assigned to *Archaea*. In contrast, only 4 % of nodes were assigned to generalists in STP network.

Proteins for most of the important pathways of anaerobic degradation (AD) were identified by a metaproteomic approach using nanoLC-MS/MS. Proteins for methanogenesis, glycolysis and substrate uptake were dominating the absolute and relative abundances. Most of these proteins derived from the phyla *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*. Functional assignment of proteins to different methanogenic pathways enabled classification of BPs into acetoclastic (AcMe) and hydrogenotrophic methanogenesis (HyMe), as well as a mixture of both pathways (BoMe). This classification was also observed by principal component analysis on different functional and taxonomical levels. Some processes, such as glycolysis were characterized by high functional redundancy without dominance of single microorganisms. Other well-known bottleneck processes of AD, such as hydrolysis and/or syntrophic acetate oxidation, showed a low functional redundancy in combination with few dominant microorganisms. During HyMe, acetate oxidized to H₂ and CO₂ by syntrophic acetate-oxidizing *Thermacetogenium phaeum* and *Syntrophaceticus schinkii*, was converted to methane by *Methanoculleus bourgensis* and *Methanoculleus marisnigri*. Acetate formed by *Erysipelotrichaceae* was converted to methane by *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* and *Methanotherix soehngeni* in plants with AcMe. In plants assigned to BoMe, all mentioned microorganisms participated in methanogenesis. Correlation analyses identified 60kDa chaperonin groEL as a biomarker for temperature stress, while measuring abundance of methyl-coenzyme M reductase seems to be promising for detecting upcoming acidification.

Microbial networks were calculated based on relative protein abundances, which were summarized to species level. Due to the high data complexity algorithm, CoNet was chosen for this purpose. Network analyses displayed clear differences in complexity, as well as microbial interactions patterns for the different methanogenesis pathways, whereby microbial network of HyMe was more complex than AcMe and BoMe. In addition, more positive interactions were observed in HyMe and BoMe compared to

AcMe. Calculation of topological indices identified *Deftuviitoga tunisiensis* and *Peptococcaceae bacterium 1109* as key players of AD, which were mainly active during hydrolysis of carbohydrates. Although the vast majority of interactions were specific for corresponding methanogenesis pathway, interactions patterns, as well as protein expression for 15 *Pseudomonas spp.* were highly conserved among all networks.

The results of this work are also of practical significance. Identified biomarkers can enable an early detection and prevention of process disturbances in the future and therefore avoid economic losses. The presence of stable core microbiomes suggest that intended flexibilisation of substrate input is feasible for both plant types. Care should be taken to ensure a high diversity of the microbial community, which is necessary for a targeted adaption of the microbial community and could also avoid the emergence of bottlenecks. This can be accomplished by addition of sewage sludge to the substrate.

Abkürzungsverzeichnis

ACDS	Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplex
AcMe	Acetoklastische Methanogenese
AD	Anaerobe Gärung (Anaerobic Degradation)
ADM1	Anaerobic Digestion Model 1
Ambic	Ammoniumbicarbonat
BoMe	Mischung aus hydrogenotropher und acetoklastischer Methanogenese
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf
CA	Korrespondenzanalyse (Correspondence Analysis)
CCA	Kanonische Korrespondenzanalyse (Canonical Correspondence Analysis)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DGGE	Dichtegradientengelelektrophorese
ED	Entner-Doudoroff-Weg
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
EGW	Einwohnergleichwert
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOS	Flüchtige organische Säuren
gDNA	Genomische DNA
HRT	Durchschnittliche Verweilzeit (Hydraulic Retention Time)
HyMe	Hydrogenotrophe Methanogenese

IAA	Iodacetamid
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MCMR	Methyl Coenzym M Reduktase
MENA	Molecular Ecological Network Analysis
NGS	Next-Generation-Sequencing
OLR	Raumbelastung (Organic Loading Rate)
oTS	Organische Trockensubstanz
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
P _i	Intermodul-Konnektivität
PLFA	Phospholipid-Fettsäuren (Phospholipid-Derived Fatty Acids)
PPW	Pentosephosphat-Weg
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RDP	Ribosomal Database Project
SAC	Spezies-Akkumulations-Kurve (Species Accumulation Curve)
SAOB	Syntroph Acetat-oxidierende Bakterien
SIP	Stabile Isotopenmarkierung (Stable Isotope Probing)
SRT	Feststoffverweilzeit (Solid Retention Time)
STY	Raum-Zeit-Ausbeute (Space-Time-Yield)
TAC	Totales Anorganisches Carbonat (Total Alkalinity)
T-RFLP	Terminaler-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
VIF	Varianz-Inflations-Faktor (Variance Inflation Factor)
WLP	Wood-Ljungdahl-Weg
Z _i	Intramodul-Konnektivität

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01: Schematischer Aufbau einer Biogasanlage	4
Abbildung 02: Die vier Phasen des anaeroben Abbaus organischer Substrate	5
Abbildung 03: Übersicht verschiedener OMICS-Ansätze zur näheren Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften	16
Abbildung 04: Netzwerkberechnungsschema für MENA	22
Abbildung 05: Berechnung mikrobieller Netzwerke mittels CoNet	23
Abbildung 06: Einteilung von Knoten anhand ihrer topologischen Indizes Z_i und P_i	25
Abbildung 07: Vergleich ökologischer Indizes für BPs und STPs	58
Abbildung 08: Heatmap der Bray-Curtis-Similarity für BPs und STPs	59
Abbildung 09: Kernmikrobiom von Biogasanlagen.....	60
Abbildung 10: Kernmikrobiom von Kläranlagen.....	62
Abbildung 11: Analyse der Zusammensetzung des gemeinsamen Kernmikrobioms für BPs und STPs.....	64
Abbildung 12: Korrespondenzanalyse der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen.....	65
Abbildung 13: Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen	66
Abbildung 14: Korrespondenzanalyse der mikrobiellen Gemeinschaften in Kläranlagen.....	67
Abbildung 15: Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in Kläranlagen	69
Abbildung 16: Einteilung der OTUs in den Biogasanlagen anhand ihrer topologischen Rollen im Netzwerk.....	74
Abbildung 17: Einteilung der OTUs in den Kläranlagen anhand ihrer topologischen Rollen im Netzwerk.....	76
Abbildung 18: Taxonomische Affiliation der Proteine in den Biogasanlagen	79
Abbildung 19: Übersicht der Abundanzen für die TOP20 der KEGG- Stoffwechselwege.....	80

Abbildung 20: Vergleich der Proteindiversität der 16 Biogasanlagen auf verschiedenen taxonomischen und funktionellen Ebenen.....	83
Abbildung 21: Taxonomische Zusammensetzung der Proteinprofile der Biogasanlagen.....	84
Abbildung 22: Dominante Methanogeneseschritte in Biogasanlagen.....	86
Abbildung 23: Beteiligung verschiedener Bakteriengruppen an den Prozessen der anaeroben Gärung	87
Abbildung 24: Taxonomische Zuordnung der an der Acetogenese und Methanogenese beteiligten Mikroorganismengruppen.....	89
Abbildung 25: Relative Abundanzen des Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase- Komplexes für Bakterien und Archaeen	90
Abbildung 26: Zusammenhang zwischen mittlerer relativer Abundanz und der mittleren Anzahl der Beobachtungen auf KO-Ebene	91
Abbildung 27: Mikrobielle Netzwerke und zugehörige topologische Rollen aller Knoten	99
Abbildung 28: Konservierte Interaktionen in allen Netzwerken	101
Abbildung 29: Expression aller für die 15 <i>Pseudomonas spp.</i> gefundenen Proteine in Abhängigkeit des dominanten Methanogenesewegs.....	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 01: Dominante Reaktionen während der acetogenen Phase der anaeroben Gärung.....	8
Tabelle 02: Reaktionsgleichungen der hydrogenotrophen und acetoklastischen Methanogenese.....	9
Tabelle 03: Theoretische Methanausbeute für ausgewählte Substratkomponenten	10
Tabelle 04: Übersicht der verwendeten Geräte und Materialien.....	29
Tabelle 05: Verwendete Chemikalien	30
Tabelle 06: Verwendete Puffer und Lösungen	32
Tabelle 07: Erfasste Prozessparameter für Biogasanlagen.....	34
Tabelle 08: Erfasste Prozessparameter für Kläranlagen.....	37
Tabelle 09: Coverage der getesteten Primerpaare.....	40
Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele.....	48
Tabelle 11: Detaillierte Übersicht der Prozessparameter in den Biogasanlagen ...	55
Tabelle 12: Detaillierte Aufschlüsselung der Prozessparameter in den Kläranlagen.....	56
Tabelle 13: Taxonomische Zusammenfassung der Schlüsselmikroorganismen der Kernmikrobiome von Biogas- und Kläranlagen	63
Tabelle 14: Effekt der Einflussfaktoren auf die taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften	70
Tabelle 15: Übersicht der Netzwerkparameter für die berechneten Netzwerke in Biogas- und Kläranlagen.....	73
Tabelle 16: Anzahl der Interaktionen zwischen generalistischen OTUs im BP-Netzwerk.....	75
Tabelle 17: Anzahl der Interaktionen zwischen generalistischen OTUs im STP-Netzwerk.....	77
Tabelle 18: Zuordnung der Biogasanlagen zum vorherrschenden Methanogeneseweg	81

Tabelle 19: Abhängigkeit der Dominanz einzelner Spezies vom Grad der funktionellen Redundanz	91
Tabelle 20: Einfluss der Prozessparameter auf die Metaproteomprofile der Biogasanlagen.....	92
Tabelle 21: Übersicht wichtiger Korrelationen mit der Konzentration an FOS.....	95
Tabelle 22: Übersicht der Netzwerkparameter für die drei auf Speziesebene berechneten Netzwerke	96
Tabelle 23: Knoten mit generalistischer Rolle im jeweiligen Netzwerk	100

1 Einleitung und Theorie

Biogasanlagen leisten neben Wind-, Solar- und Wasserenergie einen wesentlichen Beitrag zur Energiegewinnung aus erneuerbaren Quellen. Bei der Erzeugung von Biogas ist eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft beteiligt, deren Mitglieder organische Substrate gemeinsam abbauen.

1.1 Biogas als Energieträger

Der anaeroben Gärung (Anaerobic degradation, AD), im Zuge derer organische Substrate unter Ausschluss von Sauerstoff abgebaut werden, kommt eine zentrale Rolle in Biogasanlagen und in den Faultürmen von Kläranlagen zu. Das dabei entstehende Biogas besteht zum größten Teil (ca. 50-70%) aus Methan, Kohlendioxid (20-40%) und Stickstoff (0-10%). Zusätzlich sind auch geringere Mengen an Wasserstoff (0-1%) und Schwefelwasserstoff (0-3%) möglich. Wegen des hohen Methananteils im Biogas eignet sich dieser hervorragend als Brennstoff, der auch im industriellen Maßstab genutzt werden kann. Dabei wird das Biogas in Blockheizkraftwerken verbrannt und die entstehende Energie in Strom umgesetzt. Die anfallende Wärme wird über Kraft-Wärme-Kopplung genutzt. Bei ausreichender Erhöhung des Methananteils und Senkung des Schwefelwasserstoffgehaltes durch Aufreinigungsprozesse, wie der Zugabe von Eisenhydroxid oder Laugenwäsche, kann das Biogas auch direkt ins Erdgasnetz eingespeist werden. Die Eigenschaften von Biogas ermöglichen zudem die Speicherung und damit einen zeitlich und räumlich flexiblen Einsatz als Energieträger (Hahn et al. 2014).

1.1.1 Nutzung von Biogas in Deutschland

In Deutschland wird traditionell ein großer Teil der Energie (Jahr 2018: 40 %) noch immer aus fossilen Energieträgern wie Braun- oder Steinkohle gewonnen (Statistisches Bundesamt 2019). Im Jahr 2000 wurden in Deutschland laut der Arbeitsgemeinschaft Energiebilanzen nur 6,6% des Bruttostroms aus erneuerbaren Energien erzeugt. Deshalb wurde durch Verabschiedung verschiedener Auflagen des

„Erneuerbaren-Energie-Gesetzes“ eine Erhöhung dieses Anteils auf 30% bis 2020 angestrebt (EEG 2000; EEG 2004; EEG 2009; EEG 2012; EEG 2014; EEG 2017). Die beinhalteten Boni führten in Deutschland zu einem Anstieg der Anzahl der Biogasanlagen von 2.000 (Jahr 2004) über knapp 5.000 (2009) bis hin zu 9.500 (2018) (FNR 2012, 2019). Restriktionen bei der Subventionierung führen seit 2012 allerdings zu einem abflachenden Anstieg bei der Anzahl der Biogasanlagen und zu wirtschaftlichen Problemen vieler Anlagenbetreiber. Nach Einführung der EEG-Novelle von 2012 wurden bis 2018 nur noch 1.500 zusätzliche Anlagen gebaut (FNR 2019). Dabei hat Biogas großes Potential auch weiterhin einen entscheidenden Beitrag zur angestrebten Energiewende zu leisten. Um dieses Potential voll ausnutzen zu können, müssen die Anlagen in Zukunft deutlich flexibler hinsichtlich der möglichen Ausgangssubstrate und der daran gekoppelten Prozessbedingungen werden. Eine tragende Rolle spielen dabei landwirtschaftliche Biogasanlagen, die über 90 % der Biogasanlagen in Deutschland ausmachen (DBFZ 2017). Ein tieferes Verständnis des mikrobiellen Abbaus dieser landwirtschaftlichen Substrate, wie Gülle oder Maissilage, leistet einen wichtigen Beitrag zur Erreichung der angestrebten Optimierung und Flexibilisierung des Biogasprozesses. Möglicherweise lassen sich die Erkenntnisse nutzen, um auch bisher kaum oder nur wenig genutzte Substrate wie Speisereste oder Grünschnitt in Zukunft effektiver vergären zu können.

Kommunale Kläranlagen sehen sich ebenfalls mit Problemen konfrontiert. Traditionell ist die Landwirtschaft der größte Abnehmer von Klär- bzw. Faulschlamm, welche die anfallenden Klär- und Faulschlämme aufgrund des hohen Stickstoff- und Phosphorgehaltes als Dünger auf Ackerböden ausbringt. Dabei werden die Verwertungsvorschriften immer strenger und der nötige Untersuchungsaufwand immer umfangreicher. Als Alternativen stehen den Kommunen oftmals nur die thermische Entsorgung des anfallenden Klär- und Faulschlammes oder die Lagerung in speziellen Deponien zur Verfügung. Dabei fallen für die Kommunen allerdings je nach Menge zum Teil erhebliche Kosten an. Neben der Entwässerung durch Auspressen und Trocknung der Schlämme ist die effizientere Vergärung eine weitere Möglichkeit zur Kosteneinsparung. Deshalb sind Betreiber von Kläranlagen ebenfalls an einer Prozessoptimierung der AD interessiert.

Die nötige Flexibilisierung und Optimierung des Biogasprozesses lässt sich durch verschiedene Ansätze erreichen. Einerseits ist es denkbar, die Biogausausbeute bestimmter Substrate durch Optimierung technischer Prozesse, wie z.B. der Erhöhung der Aufschlussrate bzw. -geschwindigkeit von faserigen Substraten durch Vorbehandlung, zu verbessern. Andererseits besteht die Möglichkeit, die mikrobielle Vergärung durch gezielte Beeinflussung des Mikrobioms zu optimieren (Mikrobiom-Management). Bei allen Ansätzen ist ein tiefes Verständnis der ablaufenden mikrobiellen Prozesse von grundlegender Bedeutung. Dieses sollte sowohl die taxonomische, als auch die funktionelle und ökologische Diversität erfassen (Theuerl et al. 2019a).

1.1.2 Aufbau und Funktionsweise von anaeroben Fermentern

Der spezifische Aufbau von Biogasanlagen ist von Faktoren wie Anlagengröße, Investitionskosten, den verfügbaren Substraten und der genutzten Fermentationstechnik abhängig. Bei der Prozessführung wird zwischen ein- und zweistufigen Anlagen unterschieden. Bei einstufigen Anlagen (**Abbildung 01**) finden alle Abbauprozesse innerhalb eines Fermenters statt, wohingegen in zweistufigen Anlagen die Hydrolyse und restlichen Schritte des anaeroben Abbaus aufgrund der unterschiedlichen pH-Optima der beteiligten Mikroorganismen (vgl. 1.3.3) räumlich voneinander getrennt werden. An den Hauptfermenter schließt sich oftmals ein Nachgärer an, in dem der Gärrest aus dem Hauptfermenter weiter vergoren wird, um das verbliebene Methanpotential möglichst vollständig zu nutzen. In Abhängigkeit vom Feststoffgehalt des Substrates, findet die AD mittels Trocken- oder Nassfermentation statt. Trockenfermenter arbeiten mit Feststoffgehalten zwischen 15 und 35 %, wohingegen bei der Nassfermentation der Feststoffgehalt unter 10 % liegt (Weiland 2010). Bei den meisten landwirtschaftlichen Biogasanlagen kommen (semi-)kontinuierlich beschickte Reaktoren zum Einsatz, die stetig durchmischt werden (Gemmecke 2009). Dadurch sollen mögliche Prozessstörungen, wie eine Sedimentierung des Substrates oder die Ausbildung von Schwimmschichten, verhindert werden (Lienen et al. 2013). Das entstehende Biogas wird dabei sowohl im Haupt-, als auch im Nachgärer am oberen Ende des Fermenters in einer gasdichten

Plane gesammelt. Von dort wird das Biogas über Rohrleitungen in ein angeschlossenes Blockheizkraftwerk geleitet, wo es verbrannt wird. Die dabei anfallende mechanische Energie wird in Strom umgesetzt, während die anfallende Wärme beispielsweise zur Temperierung des Fermenters oder der Wärmeversorgung von Haushalten genutzt wird (Kraft-Wärme-Kopplung). Durch Installation einer Gasaufbereitungsanlage kann das Biogas bis hin zu Erdgasqualität (Low-Gas: ca. 80-87 % Methangehalt High-Gas: 87-99 % Methangehalt) aufgereinigt und direkt in das Erdgasnetz eingespeist werden.

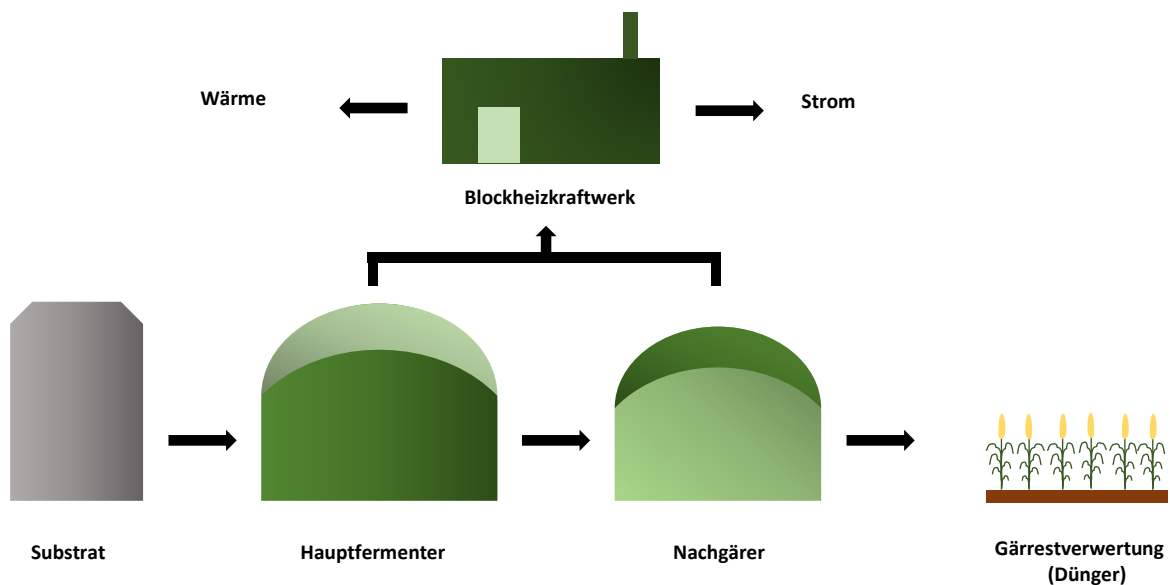


Abbildung 01: Schematischer Aufbau einer Biogasanlage

Dargestellt ist die Funktionsweise einer einstufigen, landwirtschaftlichen Biogasanlage.

Im Gegensatz zu Biogasanlagen nutzen Faultürme von Kläranlagen aerob behandelten Klärschlamm als Substrat. Der bei der aeroben Behandlung anfallende Klärschlamm wird dazu kontinuierlich in den Faulturm gepumpt, wo die organischen Stoffe mittels AD abgebaut werden. Im Gegensatz zu Biogasanlagenfermentern sind die Faultürme von Kläranlagen zumeist eiförmig aufgebaut, um eine Durchmischung zu erleichtern. Da die einzelnen Abbauschritte während der AD in beiden Anlagentypen identisch sind, wird an dieser Stelle auf eine explizite Darstellung der Funktionsweise von Kläranlagen verzichtet.

1.2 Die vier Phasen des anaeroben Abbaus organischen Materials

Der anaerobe Abbau von organischen Stoffen ist ein natürlicher Prozess, der in einer Vielzahl von Habitaten stattfindet. Solche anaeroben Habitats sind in Gewässern, nicht durchlüfteten Bodenbereichen, den Mägen von Wiederkäuern und in den Biogasanlagen bzw. Faultürmen von Kläranlagen zu finden.

Die organischen Verbindungen werden dabei von einer diversen, interagierenden mikrobiellen Gemeinschaft abgebaut. Beim anaeroben Abbau können die vier wesentlichen Schritte Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese unterschieden werden (Conrad 1999; Demirel und Scherer 2008) (**Abbildung 02**).

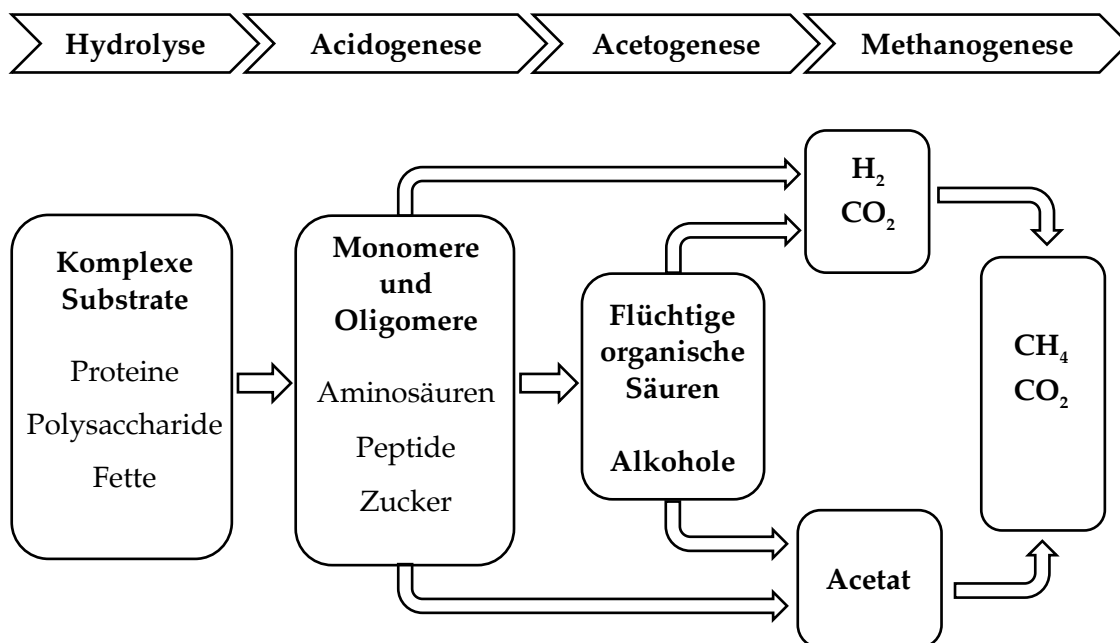


Abbildung 02: Die vier Phasen des anaeroben Abbaus organischer Substrate

Bei der Methanogenese wurden hier lediglich die Methanbildung aus Acetat sowie aus Kohlendioxid und Wasserstoff berücksichtigt.

Im Folgenden soll genauer auf die einzelnen Schritte der anaeroben Gärung eingegangen werden.

1.2.1 Hydrolyse

Während der Hydrolyse werden die in den Ausgangssubstraten enthaltenen komplexen Biopolymere (Proteine, Polysaccharide, Fette) partiell zu ihren Mono- und Oligomeren abgebaut. Proteine werden durch Proteasen zu Aminosäuren, Fette durch Lipasen zu Fettsäuren und Glycerin und Polysaccharide durch Amylasen beziehungsweise (bzw.) Cellulasen zu Monosacchariden gespalten. Diese Enzymklassen sind überwiegend extrazelluläre Hydrolasen, die von verschiedenen bakteriellen Phyla, wie z.B. *Bacteroidetes* und *Firmicutes* exprimiert werden. Substrate mit einem hohen Anteil an pflanzlichem Material stellen eine Besonderheit dar. Die in diesen Substraten enthaltenen faserigen Moleküle wie Cellulose, Hemicellulose und Lignin, sind nur schwer mikrobiell zugänglich und können deshalb nur sehr schwer und langsam abgebaut werden (Noike et al. 1985; Lin et al. 2010). Dennoch gibt es einige Bakterien wie *Clostridium thermocellum* (Freier et al. 1988) oder *Clostridium cellulolyticum* (Petitdemange et al. 1984), die in der Lage sind, Cellulose effektiv abzubauen (Wirth et al. 2012). Dafür nutzen sie einen extrazellulären Cellulosomkomplex, welcher alle für den Abbau von Cellulose nötigen Proteine enthält (Shoham et al. 1999; Bayer et al. 2004; Tsavkelova und Netrusov 2012; Wagner et al. 2018). Die Hydrolyse gilt als der langsamste und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt der AD, weshalb dieser als ein Flaschenhals der AD gilt (Pavlostathis und Giraldo-Gomez 1991; Vavilin et al. 2008).

1.2.2 Acidogenese

Während der Acidogenese werden die Stoffwechselintermediate der Hydrolyse überwiegend zu kurzkettigen Fettsäuren (FOS) (v.a. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure) und Alkoholen (z.B. Methanol und Ethanol) oxidiert. Hexosen und Pentosen werden von den Mikroorganismen durch Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas Weg, EMP) oder über den Pentosephosphat-Weg (PPW) verstoffwechselt und zunächst zu Pyruvat und Acetyl-CoA abgebaut. Eine weitere Alternative ist der Abbau von Kohlenhydraten über den Entner-Doudoroff-Weg (ED). Die beiden Stoffwechselintermediate Pyruvat und Acetyl-CoA werden anschließend

weiter fermentiert. Mikroorganismen wie *Zymomonas mobilis* (Swings und Ley 1977) betreiben Ethanolgärung, *Clostridium acetobutylicum* Acetatgärung (Winzer et al. 1997), *Lactobacillus plantarum* Laktatgärung (Lindgren et al. 1990), Mikroorganismen der Gattung *Roseburia* Butyratgärung (Gabris et al. 2015) und *Pelotomaculum thermopropionicum* Propionatgärung (Imachi et al. 2002). Aminosäuren hingegen werden über die Stickland-Reaktion abgebaut. Bei dieser Art von Gärung werden die Aminosäuren paarweise zu FOS abgebaut. Eine Aminosäure wird dabei oxidiert, die andere reduziert (Stickland 1934; Nisman 1954; Angelidaki et al. 2011). Langkettige Fettsäuren werden über eine β -Oxidation schrittweise abgebaut, wobei NAD^+ als Oxidationsmittel dient. Bei einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen entsteht dabei Acetyl-CoA, bei einer ungeraden Anzahl hingegen Propionyl-CoA. Ein typischer Vertreter dieses Stoffwechselweges ist *Syntrophomonas wolfei* (Wofford et al. 1986). Für die β -Oxidation sind die Mikroorganismen allerdings auf einen syntrophen Interaktionspartner angewiesen, der den bei der Regeneration von NAD^+ freiwerdenden Wasserstoff verbraucht.

1.2.3 Acetogenese

Während der primären Gärung gebildetes Acetat kann direkt von acetoklastischen Mikroorganismen genutzt werden. Im Gegensatz dazu, müssen andere kurzkettige Fettsäuren erst für methanogene Mikroorganismen zugänglich gemacht werden. Heterotroph acetogene Bakterien verwerten die in der Acidogenese gebildeten Substrate wie Butyrat, Propionat oder Ethanol und bilden dabei überwiegend Acetat (**Tabelle 01**). Da die Verwertung einiger dieser Substrate unter Standardbedingungen endergon ist (Thauer et al. 1977), wird unter realen Bedingungen der Wasserstoffpartialdruck durch wasserstoffverwertende Mikroorganismen zumeist niedrig gehalten. Über Interspezies-Wasserstofftransfer wird der Wasserstoff deshalb von wasserstoffverwertenden Mikroorganismen (z.B. hydrogenotrophe Methanogene oder Sulfatreduzierer) verstoffwechselt (Hattori 2008; Stams und Plugge 2009). Neben den heterotroph acetogenen Mikroorganismen sind auch die autotroph acetogenen Mikroorganismen, die sog. Homoacetogenen, von Bedeutung. Diese Mikroorganismengruppe nutzt Wasserstoff und Kohlendioxid um Acetat über den

reduktiven Acetyl-CoA-Stoffwechselweg (Wood-Ljungdahl-Weg; WLP) zu generieren. Da diese Reaktion exergon ist (**Tabelle 01**), sind Homoacetogene im Gegensatz zu den heterotrophen Acetogenen nicht auf syntrophe Interaktionspartner angewiesen. Vielmehr konkurrieren Homoacetogene mit hydrogenotrophen Methanogenen um die Substrate Wasserstoff und Kohlendioxid. Andere Mikroorganismen wie beispielsweise *Syntrophaceticus schinkii* (Westerholm et al. 2010) oder *Thermacetogenium phaeum* (Hattori et al. 2000) sind dagegen in der Lage das generierte Acetat zu Wasserstoff und Kohlendioxid zu oxidieren, indem sie den WLP umkehren. Da diese Reaktion endergon ist (+104,6 kJ/Reaktion), sind acetatoxidierende Mikroorganismen ebenso wie heterotroph Acetogene auf syntrophe Interaktionspartner angewiesen.

Tabelle 01: Dominante Reaktionen während der acetogenen Phase der anaeroben Gärung (nach Thauer et al. 1977)

Reaktion	ΔG° [kJ/mol] ^a
Heterotroph acetogene Reaktionen	
(1) Butyrat ⁻ + 2 H ₂ O \rightleftharpoons 2 Acetat ⁻ + H ⁺ + 2H ₂	+48,1
(2) Propionat ⁻ + 3 H ₂ O \rightleftharpoons Acetat ⁻ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺ + 3 H ₂	+76,1
(2) Ethanol + H ₂ O \rightleftharpoons Acetat ⁻ + H ⁺ + 2 H ₂	+9,6
Autotroph acetogene (homoacetogene) Reaktion	
4 H ₂ + 2 HCO ₃ ⁻ + H ⁺ \rightleftharpoons Acetat ⁻ + 4H ₂ O	-104,6
Acetatoxidation	
Acetat ⁻ + 4H ₂ O \rightleftharpoons + 4 H ₂ + 2 HCO ₃ ⁻ + H ⁺	+104,6
Freie Reaktionsenthalpie^a	
$\Delta G' = \Delta G^{\circ} + RT \times \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}$	mit [A], [B] Konzentrationen der Substrate [C], [D] Konzentrationen der Produkte

1.2.4 Methanogenese

Während der Methanogenese produzieren methanogene Archaeen Methan und CO₂. Bei der hydrogenotrophen Methanogenese (HyMe) wird das bei der Fermentation gebildete CO₂ mithilfe von Wasserstoff (oder anderen Reduktionsäquivalenten) zu Methan reduziert (**Tabelle 02**). Bei der acetoklastischen Methanogenese (AcMe) hingegen wird das gebildete Acetat zu Methan und CO₂ gespalten. Einige Mikroorganismen wie *Methanlobus zinderi* (Doerfert et al. 2009) betreiben außerdem methylotrophe Methanogenese, wobei methylierte C1-Substrate (z.B. Methanol oder Methylamine) zu Methan verstoffwechselt werden. Auch eine Mischung von HyMe und AcMe ist möglich (BoMe) (Jiang et al. 2018). Die Mehrheit der bekannten Ordnungen der Archaeen sind hydrogenotroph (z.B. *Methanobacteriales* und *Methanomicrobiales*). Acetoklastische Mikroorganismen gehören hingegen zur Ordnung *Methanosarcinales*. Dabei umfasst die Familie *Methanosaetaceae* ausschließlich acetoklastische Spezies wie *Methanosaeta concilii* (Patel und Sprott 1990) oder *Methanotherix soehngenii* (Huser et al. 1982). In der Familie *Methanosarcinaceae* finden sich hingegen Mikroorganismen mit einem breiten Substratspektrum. Der bekannteste Vertreter *Methanosarcina barkeri* kann Methan sowohl aus Acetat, als auch aus CO₂ und H₂ produzieren. Außerdem ist *M. barkeri* auch in der Lage methylierte C1-Substrate zu Methan umzusetzen (Welander und Metcalf 2005). Um eine Akkumulation von FOS während HyMe zu verhindern, werden oftmals syntrophe Interaktionen von hydrogenotrophen Mikroorganismen und Acetat-oxidierenden Bakterien (SAOB) beobachtet (Ziganshin et al. 2016). Eine unzureichende Acetatumsatzung durch SAOBs kann deshalb bei HyMe zu einer Prozessstörung führen und ein weiterer Flaschenhals der AD sein (Fotidis et al. 2013; Labatut et al. 2014).

Tabelle 02: Reaktionsgleichungen der hydrogenotrophen und acetoklastischen Methanogenese (nach Thauer et al. 1977 und Zinder 1993)

Reaktion	ΔG^0 [kJ/mol]
Hydrogenotrophe Methanogenese	
$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightleftharpoons 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{CH}_4$	-131,0
Acetoklastische Methanogenese	
$\text{Acetat} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-31,0

1.3 Relevante Prozessparameter beim anaeroben Abbau

Die Zusammensetzung und Funktionsweise von mikrobiellen Gemeinschaften hängt in Biogas- und Kläranlagen in erster Linie von den Prozessbedingungen wie Ausgangssubstrat, pH-Wert, Temperatur oder der FOS-Zusammensetzung ab (Rosenwinkel et al. 2015). Im Folgenden soll deshalb ein kurzer Überblick über prozessrelevante Parameter, sortiert nach ihrer Bedeutung bei der Biogasbildung, gegeben werden.

1.3.1 Substratbasis

Alle organischen Substrate, die größere Mengen an Kohlenhydraten, Fetten oder Proteinen enthalten, können für die AD genutzt werden. Das theoretische Biogaspotential variiert dabei mit der biochemischen Zusammensetzung des Substrates (**Tabelle 03**). Der reale Methananteil im Biogas bei Vergärung der verschiedenen Substratkomponenten ist in der Regel höher als bei den thermodynamischen Berechnungen, da ein Teil des neben dem Methan gebildeten Kohlendioxids im Gärrest gelöst ist (Weiland 2010). Aufgrund der saisonal gebundenen Substratverfügbarkeit arbeiten nur wenige Anlagen mit einem einzigen Substrat (Mono-Vergärung). Die gemeinsame Vergärung verschiedener Substrate (Co-Vergärung) bringt auch andere Vorteile mit sich. So kann beispielsweise die pH-Pufferkapazität des Substrates gezielt beeinflusst (Zhang et al. 2013) oder die Nährstoffbilanz verbessert werden (Kougias et al. 2014).

Tabelle 03: Theoretische Methanausbeute für ausgewählte Substratkomponenten

Komponente	Theoretisches Biogaspotential ^a	Theoretischer Methananteil ^a
	[mL Methan/g oTS)	[Vol-%]
Kohlenhydrate	417	50
Proteine	497	50
Lipide	1015	70
Ethanol	732	75
Acetat	375	50

^anach Kougias und Angelidaki 2018

Neben der Substratzusammensetzung sind auch die hydraulische Verweilzeit (HRT) und die Raumbelastung (OLR) für die Substratzufuhr von Bedeutung. Die HRT ist definiert als die durchschnittliche Verweilzeit des Substrates im Fermenter, die OLR als die Menge an organischer Trockensubstanz (oTS) die pro Zeiteinheit und Volumeneinheit zum Fermenter gegeben wird. Auch die Konzentrationen an bekannten Inhibitoren im jeweiligen Substrat spielen eine Rolle. Eine hohe inhibitorische Wirkung haben beispielsweise hohe Konzentrationen an Ammonium (Fotidis et al. 2013) oder Schwermetallen (Jin et al. 1998).

1.3.2 Temperatur

Für den Betrieb von Fermentern haben sich verschiedene Temperaturbereiche etabliert. Anlagen können im psychrophilen (<30°C), mesophilen (30-40°C) und thermophilen (50-60°C) Temperaturbereich betrieben werden (Kougias und Angelidaki 2018), wobei psychrophile Anlagen in der großtechnischen Biogasproduktion keine Rolle spielen. In mesophilen Anlagen läuft die AD aufgrund niedrigerer Temperaturen langsamer ab (van-'t-Hoff'sche Regel, RGT-Regel), wodurch eine geringere Methanausbeute erreicht wird. Aufgrund der geringeren Energiekosten und des robusteren Prozesses (Moset et al. 2015) wird diese Prozesstemperatur dennoch vor allem (v.a.) in landwirtschaftlichen Biogasanlagen häufig genutzt (Labatut et al. 2014). Die schnellere Reaktionsgeschwindigkeit in thermophilen Prozessen ermöglicht hingegen höhere OLRs und kürzere HRTs. Zusätzlich können bei der thermophilen AD Hygienisierungseffekte (Reduktion von Pathogenen) beobachtet werden (Fröschle et al. 2015). Nachteilig bei hohen Prozesstemperaturen sind der zur Aufrechterhaltung der Temperatur erhöhte Energiebedarf und die höhere Störanfälligkeit bei Temperaturschwankungen. Zudem wird auch die Löslichkeit verschiedener Gase von der Temperatur beeinflusst, was bei einer möglichen Prozessinhibition von Bedeutung sein kann (Kougias und Angelidaki 2018).

1.3.3 pH-Wert

Der pH-Wert beeinflusst die Biogas- und Methanausbeute der verschiedenen Substrate. Grund dafür sind die verschiedenen pH-Optima der an der AD beteiligten Mikroorganismen. Hydrolytische und acidogene Bakterien erreichen die höchsten Abbauraten bei einem pH- Bereich von ungefähr 5,5 - 6,5, wohingegen Acetogene und Methanogene pH-Werte von 7,0 - 8,0 bevorzugen (Al Seadi et al. 2008; Weiland 2010; Meegoda et al. 2018). In zweistufigen Systemen ermöglicht die räumliche Trennung der Hydrolyse und Acidogenese von der Acetogenese und Methanogenese die Einhaltung der pH-Optima der beteiligten Mikroorganismengruppen, wohingegen dies in einstufigen Systemen durch eine zeitliche Trennung nur begrenzt möglich ist. Da die meisten Methanogenen vergleichsweise hohe Regenerationszeiten besitzen und pH-sensitiv sind, werden in einstufigen Systemen primär die pH-Optima der Methanogenen eingehalten (Deublein und Steinhauser 2008). Normalerweise stellen sich die pH-Werte automatisch durch basen- und säurebildende Stoffwechselfvorgänge ein. Dabei wird der pH-Wert von verschiedenen Puffersystemen, wie dem Ammonium-Puffersystem oder dem Bicarbonat-Puffersystem reguliert (Hecht 2009). Das Puffervermögen wird dabei als totale Alkalinität (TAC) bezeichnet und gibt an, wie viel Säure durch das Puffersystem gebunden werden kann. Eine mögliche Akkumulation von Säuren während der Acidogenese wird zunächst über das Bicarbonat-Puffersystem ausgeglichen. Sobald dieses Puffersystem erschöpft ist, kommt es zu einem schlagartigen Abfall des pH-Wertes und möglicherweise zu einem kompletten Erliegen des Gärprozesses aufgrund der Inaktivierung der pH-sensitiven Methanogenen. Messungen des pH-Wertes sind deshalb nur bedingt als Parameter für die Prozessüberwachung geeignet (Al Seadi et al. 2008).

1.3.4 Flüchtige organische Säuren und totale Alkalinität

Der pH-Wert in Biogasanlagen wird maßgeblich von den Konzentrationen der FOS bestimmt, die vor allem während der Acidogenese gebildet werden (vgl. 1.2.2). Durch eine unzureichende Metabolisierung der FOS durch acetogene oder methanogene

Mikroorganismen kann es zur Anreicherung von FOS und infolgedessen auch zu einem Abfall des pH-Wertes kommen (Boe et al. 2010). Aufgrund dieser Tatsache wird die FOS-Konzentration häufig als geeigneter Parameter für die Prozessüberwachung herangezogen. Hohe Konzentrationen von Acetat und Butyrat können, müssen aber nicht zwingend, zu einer Prozessstörung führen, wohingegen hohe Propionatkonzentrationen die Prozessstabilität erheblich beeinträchtigen (Wang et al. 2009). Als besonders geeigneter Parameter für die Prozessüberwachung gilt deshalb das Verhältnis von Acetat zu Propionat (Kougiyas et al. 2016). Die FOS-Konzentrationen beeinflussen nicht nur den pH-Wert, sondern auch die Pufferkapazität des Ökosystems. Eine Möglichkeit, Veränderungen der Pufferkapazität zu messen, besteht in der regelmäßigen Messung der TAC. Zur Erkennung möglicher Prozessstörungen hat sich in der Praxis die gemeinsame, titrimetrische Bestimmung von FOS und TAC etabliert (vgl. 2.4.1.2). Zwar gibt es Richtwerte für das FOS/TAC-Verhältnis, die häufig in stabilen Anlagen beobachtet werden (<0.3), jedoch ist das optimale FOS/TAC-Verhältnis reaktorspezifisch, da es von Faktoren, wie dem eingesetzten Substrat oder der Prozesstemperatur abhängt (Rieger und Weiland 2006).

1.4 Die Bedeutung mikrobieller Gemeinschaften für die Umwelt

Mikroorganismen besiedeln bereits seit mehreren Milliarden Jahren Habitate mit verschiedensten Umweltbedingungen auf der Erde. Die Mehrheit dieser Mikroorganismen ist in komplexen mikrobiellen Gemeinschaften organisiert, in denen mikrobielle Interaktionen eine bedeutende Rolle spielen. Essentiell für die Funktion dieser mikrobiellen Gemeinschaften sind die taxonomische und funktionelle Diversität (Salmonová und Bunešová 2017). Seit mehr als 200 Jahren wird versucht Mikroorganismen gezielt zu isolieren, zu kultivieren und näher zu charakterisieren. Allerdings lässt sich nur ein sehr geringer Teil aller bekannten Mikroorganismen kultivieren (Amann et al. 1995), weshalb kultivierungsabhängige Methoden für die komplexer werdenden Fragestellungen in der Forschung alleine nicht mehr ausreichen. Nichtsdestotrotz wurden in der Vergangenheit kulturabhängige Methoden zur Identifikation von Schlüsselorganismen und der näheren Charakterisierung von metabolischen Prozessen während der AD genutzt. Eine genauere Aufschlüsselung komplexer, mikrobieller Gemeinschaften ist mit kulturabhängigen Methoden aufgrund der vielen biotischen und abiotischen Faktoren (noch) nicht möglich (Vanwonterghem et al. 2014). Daher werden vermehrt molekularbiologische Methoden genutzt, um die mikrobiellen Gemeinschaften in Biogas- und Kläranlagen näher zu charakterisieren.

1.4.1 Molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften

Bei der Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften unterscheidet man zwischen qualitativen und quantitativen Methoden. Ziel der qualitativen Methoden ist die Erstellung eines molekularen Fingerabdrucks, welcher eine Analyse der taxonomischen Zusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft erlaubt. Zu diesen Fingerprinting-Methoden gehören die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) (Muyzer et al. 1993) und die Analyse des terminalen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (T-RFLP) (Liu et al. 1997; Clement et al. 1998). Bei beiden Methoden werden DNA-Sequenzen aufgrund ihrer

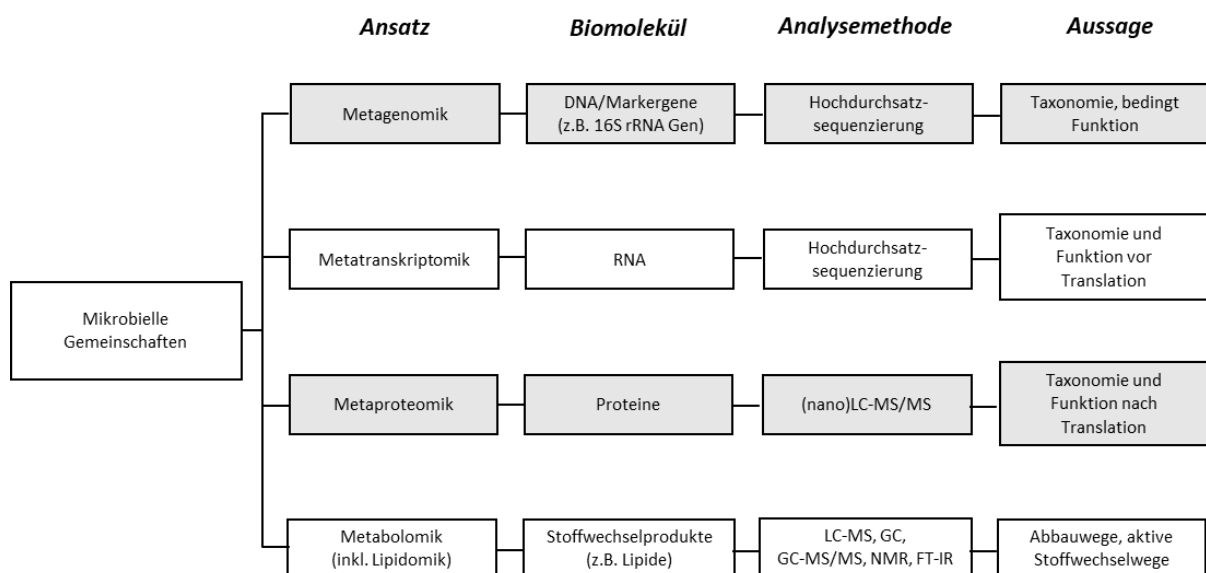
unterschiedlichen Eigenschaften (DGGE: Basenzusammensetzung, Länge; T-RFLP: Länge) aufgetrennt. Durch Vergleich der „Fingerprints“ unterschiedlicher Proben können Aussagen über Unterschiede in der taxonomischen Zusammensetzung der vorliegenden mikrobiellen Gemeinschaften getroffen werden. Einen kritischen Schritt stellt dabei die bei den bisher genannten Methoden notwendige, vorherige Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzbereiche durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al. 1986) dar. Proben aus Umwelthabitaten enthalten Störstoffe, welche die PCR-Amplifikation beeinflussen können. Huminsäuren interagieren mit der DNA-Matrize und der DNA-Polymerase (Sutlovic et al. 2008), (Poly-)Phenole inaktivieren die DNA-Polymerase (Katcher und Schwartz 1994). Hinzu kommt, dass die DNA-Matrizen eine Mischung homologer Moleküle sind, deren Amplifikation von Faktoren wie der Primer-Hybridisierung oder Anzahl an Genkopien auf dem Genom abhängig ist (Wintzingerode et al. 1997). Ein weiterer problematischer Schritt ist die DNA-Extraktionsmethode, da eine gleichmäßige Extraktion von genomischer DNA (gDNA) unabhängig vom Zellwandaufbau (grampositiv und gramnegativ) gewährleistet sein sollte. Eine zu stringente Zellysetechnik führt häufig zu stark fragmentierter gDNA.

Für den Nachweis spezifischer Mikroorganismen eignet sich die Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung (FISH) (Rudkin und Stollar 1977; Bauman et al. 1980). Dieses bildgebende Verfahren kann sowohl für die qualitative als auch quantitative Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften genutzt werden. Die genannten Methoden erlauben allerdings lediglich einen ersten Einblick in die Zusammensetzung bzw. Funktion der mikrobiellen Gemeinschaften und sind nur bedingt in der Lage, die Komplexität von mikrobiellen Gemeinschaften abzubilden. Erst durch Entwicklung von Hochdurchsatzsequenziermethoden (Next-Generation-Sequencing, NGS) wie der 454-Sequenzierung (Margulies et al. 2005) und der Illumina-Sequenzierung (Bentley et al. 2008) ist es inzwischen möglich einen quantitativen Überblick über die taxonomische (DNA) und funktionelle Zusammensetzung (mRNA) mikrobieller Gemeinschaften zu erlangen (vgl. 1.4.2.1). Eine taxonomische und funktionelle Charakterisierung kann ebenfalls über Metaproteomuntersuchungen (vgl. 1.4.2.2) erreicht werden.

1.4.2 OMICS-Technologien im Kontext der Mikrobiomforschung

In den letzten Jahren werden vermehrt verschiedene Hochdurchsatzverfahren genutzt, um mikrobielle Gemeinschaften näher zu charakterisieren. Dabei steht die Analyse der Gesamtheit verschiedener Biomoleküle im Fokus (**Abbildung 03**). Während sich die Metagenomik mit der Gesamtheit der Genome beschäftigt (Handelsman et al. 1998), werden bei der Metatranskriptomik alle zu einem Zeitpunkt vorliegenden RNA-Transkripte analysiert (Poretzky et al. 2005; Parro et al. 2007; Urich et al. 2008; Frias-Lopez et al. 2008). Die Metaproteomik (Rodríguez-Valera 2004) befasst sich mit der Analyse der vorliegenden Proteine, wohingegen bei der Metabolomik (Oliver 1998; Tweeddale et al. 1998) die Gesamtheit der Stoffwechselprodukte im Mittelpunkt steht. Je nach wissenschaftlicher Fragestellung werden entweder einzelne OMICS-Verfahren oder eine Kombination verschiedener OMICS-Technologien genutzt, um ein möglichst umfassendes Verständnis der taxonomischen Zusammensetzung und Funktionsweise von mikrobiellen Gemeinschaften in ihrem jeweiligen Ökosystem zu erlangen.

Abbildung 03: Übersicht verschiedener OMICS-Ansätze zur näheren Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften



In grau sind Ansätze hinterlegt, die in dieser Arbeit genutzt wurden. Bei der Metabolomik wurde lediglich eine Auswahl der wichtigsten Methoden berücksichtigt.

Die Grundlagen, der in dieser Arbeit verwendeten Methoden werden in den beiden folgenden Unterkapiteln näher beschrieben.

1.4.2.1 Metagenomik

Die Metagenomik beschäftigt sich mit der Gesamtheit der gDNA, die in einer komplexen, mikrobiellen Gemeinschaft vorliegt (Handelsman et al. 1998). Durch Nutzung speziell entwickelter Algorithmen wie beispielsweise PICRUSt (Langille et al. 2013) können neben der taxonomischen Zusammensetzung auch Vorhersagen über das funktionelle Potential einer mikrobiellen Gemeinschaft anhand des ermittelten Metagenoms getroffen werden. Zusätzlich werden auch immer mehr methodische Einschränkungen (Durchsatz, Kosten, Readlängen) durch stetige Weiterentwicklungen gelöst (Vanwonterghem et al. 2014).

Ein Teilgebiet der Metagenomik ist das Sequenzieren von Markergenen mittels NGS. Als vielversprechendes Markergen hat sich dabei das Gen für die 16S rRNA etabliert, da es sowohl konservierte als auch variable DNA-Bereiche enthält (Amann et al. 1995; Tringe und Hugenholtz 2008). Die konservierten Bereiche ermöglichen die Nutzung von universellen Primern, wodurch eine Vielzahl von Mikroorganismen gleichzeitig erfasst werden kann. Die Unterschiede in der Basensequenz der variablen Bereiche können hingegen für die taxonomische Zuordnung der entsprechenden Sequenz genutzt werden. Weil sich auch die konservierten Bereiche des 16S rRNA Gens zwischen Spezies leicht unterscheiden können (Basenmutationen im Laufe der Evolution), werden zumeist degenerierte Primer verwendet, um eine möglichst hohe Abdeckung der Sequenzdiversität zu erreichen. Degenerierte Primer bestehen aus einer Mischung von Primern, deren Basensequenz ähnlich ist, sich aber an einer oder mehreren Stellen unterscheiden. Durch Abgleich mit Sequenzdatenbanken können die Sequenzen im Anschluss an die Sequenzierung taxonomisch zugeordnet werden. Da eine Zuordnung auf Speziesebene nicht immer möglich ist, werden alle identischen Sequenzen zu Operational Taxonomic Units (OTUs) zusammengefasst (vgl. 2.5.4).

Bei allen NGS-Methoden mit Ausnahme der Nanoporen-Sequenzierung (Branton et al. 2008) und der Single-Molecule-Real-Time-Sequenzierung (Eid et al. 2009) ist eine vorherige Amplifikation der DNA-Matrizen mittels PCR nötig. Deshalb gelten auch für die 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung die gleichen Einschränkungen wie für die PCR (vgl. 1.4.1).

1.4.2.2 Metaproteomik

Die Metatranskriptomik ermöglicht eine detaillierte Darstellung der Genexpression und Aktivität verschiedener Mikroorganismen. Allerdings bleibt offen, welche Transkripte in die entsprechenden Proteine translatiert werden. Somit gewinnt die Analyse aller vorliegenden Proteine in einer Probe (Metaproteomik), gerade in Umweltproben mit ihren komplexen mikrobiellen Gemeinschaften, immer mehr an Bedeutung. Durch Abgleich mit Metagenom- und Proteindatenbanken können identifizierte Proteine taxonomisch zugeordnet werden. Stoffwechseldatenbanken wie die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kanehisa 2000; Kanehisa et al. 2017) ermöglichen zudem die Verknüpfung der taxonomischen Informationen mit definierten Funktionen. Aufgrund der hohen Probenkomplexität bei der Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften in Biogas- und Kläranlagen gibt es bei Metaproteomik-Ansätzen diverse Herausforderungen. Am Biogasprozess sind mehr als 1000 verschiedene Spezies beteiligt (Schlüter et al. 2008; Buettner und Noll 2018b), weshalb ausgehend von ähnlichen Proteinzahlen wie bei *Escherichia coli*, mit insgesamt mehr als einer Million unterschiedlicher Proteine gerechnet werden muss (Soufi et al. 2015). Ein weiterer kritischer Schritt ist die eigentliche Proteinextraktion, weil eine effektive Zelllyse Voraussetzung für die Co-Extraktion von intra- und extrazellulären Proteine ist, wobei auch die unterschiedliche Löslichkeit von Proteinen berücksichtigt werden muss. Membranproteine, die oftmals wasserunlöslich sind, finden sich größtenteils in den unlöslichen Proteinfractionen (Washburn et al. 2001). Zusätzlich dürfen bekannte Störstoffe wie Huminsäuren nur in geringem Maße co-extrahiert werden (Siggins et al. 2012), um Probleme bei der späteren LC-MS/MS-Messung zu vermeiden. Viele dieser Herausforderungen konnten inzwischen gelöst werden, weshalb sich die Metaproteomik mittlerweile auch zur Analyse der AD etablieren konnte (Hanreich et al. 2013; Theuerl et al. 2015; Heyer et al. 2016; Hagen et al. 2017; Heyer et al. 2019).

1.5 Berechnung mikrobieller Netzwerke auf Basis von OMICS-Datensätzen

Prinzipiell lassen sich alle Datensätze für die Netzwerkberechnung nutzen, die als Ergebnis Abundanzen oder Präsenz-/Absenzdaten (Inzidenzdaten) liefern. Dies ermöglicht die Berechnung von Netzwerken anhand von Datensätzen aus der 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung und Metaproteomdaten.

1.5.1 Einordnung von Netzwerken in den ökologischen Kontext

Die Häufigkeiten verschiedener Spezies werden in der Makroökologie bereits lange Zeit erfasst und genutzt, um mögliche ökologische Zusammenhänge zwischen verschiedenen Spezies zu beschreiben (Diamond 1975; Connor und Simberloff 1979). Diamond stellte die Hypothese auf, dass nicht die Immigration verschiedener Vogelarten, sondern die Konkurrenz untereinander für die Verteilung der Vogelarten auf den Inseln Neu Guineas verantwortlich ist. Er konnte zeigen, dass auf den Inseln Neu Guineas entweder der Trauerhonigfresser oder der Seidennektarvogel lebten. Beide Vögel weisen ähnliche physiologische Eigenschaften auf (z.B. Größe, Schnabelform), wodurch er seine Hypothese des Konkurrenzdrucks bestätigt sah.

Solche in der Makroökologie generalisierbaren Prinzipien lassen sich auf mikrobielle Gemeinschaften übertragen, denn dort interagieren, in einer wesentlich kleiner skalierten Dimension, ebenfalls verschiedene Spezies miteinander, um eine möglichst effiziente Substratverwertung zu gewährleisten. Wegen der hohen Komplexität von mikrobiellen Gemeinschaften können zur Identifikation und Beschreibung der Interaktionsmuster Netzwerke genutzt werden, die auf statistisch validen Korrelationsberechnungen beruhen. Für die Netzwerkberechnung eignen sich sowohl Inzidenzdaten der verschiedenen Spezies, als auch deren Abundanzdaten (Faust und Raes 2016). Netzwerke bestehen dabei aus Knoten (Nodes) und Kanten (Edges), die Interaktionen zwischen den Knoten anzeigen. Bisher wurden solche Netzwerkansätze für eine Vielzahl von mikrobiellen Gemeinschaften in Habitaten wie Boden (Barberán et al. 2014; Zhou et al. 2010), dem Ozean (Steele et al. 2011; Gilbert et al. 2012), dem

Menschen (Arumugam et al. 2011) oder der AD (Rui et al. 2015; Buettner und Noll 2018b; Buettner et al. 2019) genutzt.

1.5.2 Aufbau und Eigenschaften von mikrobiellen Netzwerken

Bei mikrobiellen Netzwerken stellt jeder Knoten eine taxonomische Einheit dar, der über Kanten mit anderen taxonomischen Einheiten verbunden ist. Dabei werden zwei Typen von Kanten hinsichtlich der Art der Interaktion unterschieden: *mutual exclusion* und *copresence*. Kanten des Typs *mutual exclusion* weisen auf negative Interaktionen hin, die beispielsweise durch Substratkonkurrenz entstehen können. Kanten des Typs *copresence* hingegen zeigen positive Interaktionen an, die auf Syntrophie oder Nischenüberlappung hindeuten (Faust und Raes 2012). Die Kanten der meisten Netzwerke sind ungewichtet (Unweighted Edges), d.h. die Länge der Kante erlaubt keine Aussage über die Stärke der Interaktion.

Netzwerke in hochkomplexen Systemen, zu denen auch mikrobielle Gemeinschaften gehören, erfüllen zumeist folgende Kriterien (Alon 2003; Clauset et al. 2008):

- Skalenfreiheit: Die Anzahl der Kanten eines Knotens sind nicht einheitlich festgelegt. Vielmehr folgen dieser einer Potenzverteilung. Das bedeutet, dass relativ wenig Knoten sehr viele Kanten aufweisen, die meisten Knoten hingegen eher wenig (Amaral et al. 2000).
- Kleine Welt: Die meisten Knoten sind keine direkten Nachbarn, also nicht direkt miteinander verbunden. Die meisten Knoten können aber indirekt über andere Knoten und deren Verbindung erreicht werden (Girvan und Newman 2002).
- Modularität: Komplexe Netzwerke können zumeist in kleinere Sub-Netzwerke (Module) unterteilt werden. Die Knoten eines Moduls sind stark miteinander vernetzt, und weisen deutlich weniger Kanten zu Knoten anderer Module auf (Newman 2006).

1.5.3 Die Berechnung mikrobieller Netzwerke

In dieser Arbeit wurden sowohl Netzwerke für die 16S rRNA Gen Amplikondaten, als auch für die Proteindaten berechnet. Dabei wurden die Netzwerke für die 16S-Daten mittels Molecular Ecological Network Analysis (MENA) (Zhou et al. 2010; Zhou et al. 2011; Deng et al. 2012) berechnet. Für die Berechnung der auf Proteindaten beruhenden Netzwerke wurde aufgrund der hohen Probenkomplexität der zum Zeitpunkt der Berechnung aktuellste Algorithmus CoNet gewählt (Faust und Raes 2016). Im Folgenden soll näher auf die grundlegende Theorie und Unterschiede beider Berechnungsmethoden eingegangen werden.

1.5.3.1 MENA

Deng et al. entwickelten einen sequenziell aufgebauten Algorithmus (**Abbildung 04**) für die Berechnung von Netzwerken auf Basis von High-Throughput-Sequenzdaten (Deng et al. 2012) Zunächst werden die Daten der Ausgangsmatrix (vgl. ① in **Abbildung 04**) durch die Berechnung relativer Abundanzen oder die log-Transformation standardisiert (②). Anschließend wird in Abhängigkeit der Werteverteilung in der Ausgangsmatrix, entweder Pearson oder Spearman als Korrelationsmaß gewählt. Eine Kombination beider Korrelationsmaße ist nicht möglich. Nach der Berechnung von Korrelationswerten (③) für jedes OTU-Paar (d.h. OTU1-OTU2, OTU2-OTU3, OTU1-OTU3...) liegt eine Korrelationsmatrix vor. Im Anschluss nutzt MENA die Zufallsmatrix-Theorie um einen Grenzwert für Korrelationen festzulegen, die im Netzwerk erhalten bleiben. Alle Korrelationen, die kleiner als dieser Grenzwert sind, werden aus dem Netzwerk entfernt. Dazu wird das Netzwerk zunächst in der Form einer Adjazenzmatrix dargestellt (⑤). Dann wird ein initialer Threshold festgelegt und dieser fortan immer weiter erhöht. Als geeigneter Threshold wird der Korrelationswert festgelegt, bei dem die Eigenwerte der zugehörigen Adjazenzmatrix nicht mehr dem Gauß'schen Orthogonalen Ensemble, sondern der Poisson-Verteilung folgen (Zhou et al. 2010; Deng et al. 2012; Luo et al. 2006). Nach der eigentlichen Netzwerkberechnung (⑥) werden Netzwerkindizes wie durchschnittliche Konnektivität oder Netzwerkdichte berechnet (eine ausführliche

Übersicht mit Definitionen der Netzwerkindices findet sich bei Deng et al. 2012). Für die Modularisierung wird die Methode nach Newman (Newman 2006) genutzt. Die statistische Absicherung der berechneten Netzwerke erfolgt im Anschluss durch Berechnung von 100 zufälligen Netzwerken nach der Maslov-Sneppen-Methode (Maslov und Sneppen 2002). In diesen Netzwerken wird die Anzahl der Knoten und Kanten konstant gehalten und lediglich die Verknüpfung der einzelnen Knoten durch die Kanten zufällig generiert.

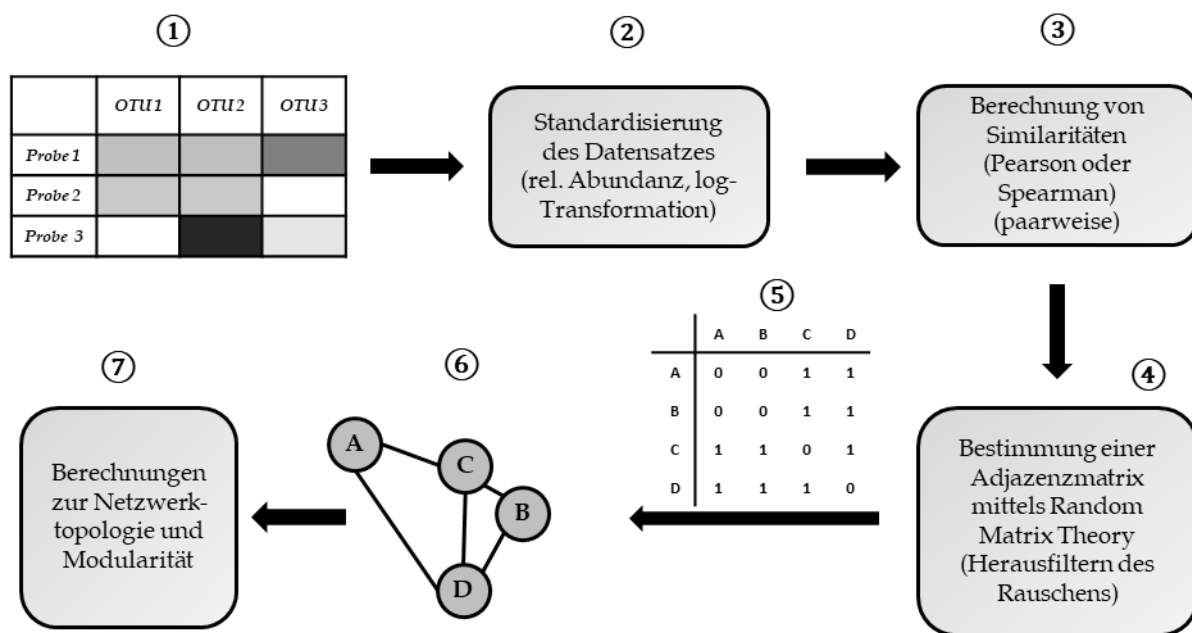


Abbildung 04: Netzwerkberechnungsschema für MENA (nach Deng et al. 2012)

1.5.3.2 CoNet

Die Netzwerkberechnung mittels CoNet (Faust und Raes 2016) wird in einzelne Schritte unterteilt (**Abbildung 05**). Für die Berechnung von Netzwerken mittels CoNet können nahezu alle Abundanz- bzw. Präsenz-/ Absenzzdaten genutzt werden (①). Die Rohdaten werden dabei im ersten Schritt je nach Fragestellung modifiziert (②). Anschließend werden beliebig viele Korrelationsmethoden (Pearson, Spearman, Kendall) bzw. Similaritäten (Steinhaus, diverse Distanzmetriken) und Dissimilaritäten (Bray-Curtis, Kullback-Leibler) ausgewählt (③). Eine Übersicht mit den Vor- und Nachteilen der einzelnen Metriken findet sich in der Originalpublikation (Faust und Raes 2016). Für jede der gewählten Methoden wird eine Paarmatrix berechnet (④).

Anschließend wird eine Vorauswahl der Korrelationswerte anhand des TOP-Argumentes getroffen (⑤), welches die Anzahl der beizubehaltenden Werte angibt (z.B. TOP 2.000: nur die 2.000 jeweils höchsten und niedrigsten Werte einer Metrik werden berücksichtigt). Dadurch wird die Datenkomplexität verringert und die nachfolgenden Berechnungen verkürzen sich um mehrere Stunden. Die Signifikanz der Kanten wird in CoNet in einem zweistufigen Ansatz zunächst separat für jede Methode berechnet. Im ersten Schritt wird mittels Permutations-Verfahren („Ziehen ohne Zurücklegen“) ein spezifischer p-Wert für jede Kante vergeben. Anschließend werden mittels Bootstrap-Verfahren („Ziehen mit Zurücklegen“) weitere p-Werte berechnet. Aus allen berechneten p-Werten wird anschließend ein einziger, nach dem Verfahren von Benjamini- und Hochberg (Benjamini und Hochberg 1995) korrigierter p-Wert für jede Kante berechnet (⑥). Über das *min_support*-Argument kann vor der Berechnung des finalen Netzwerkes ausgewählt werden, für wie viele Methoden eine Kante signifikant sein muss, um für das Netzwerk berücksichtigt zu werden (⑦). Das finale Netzwerk enthält schließlich nur noch Knoten, die durch signifikante Kanten miteinander verbunden sind (⑧).

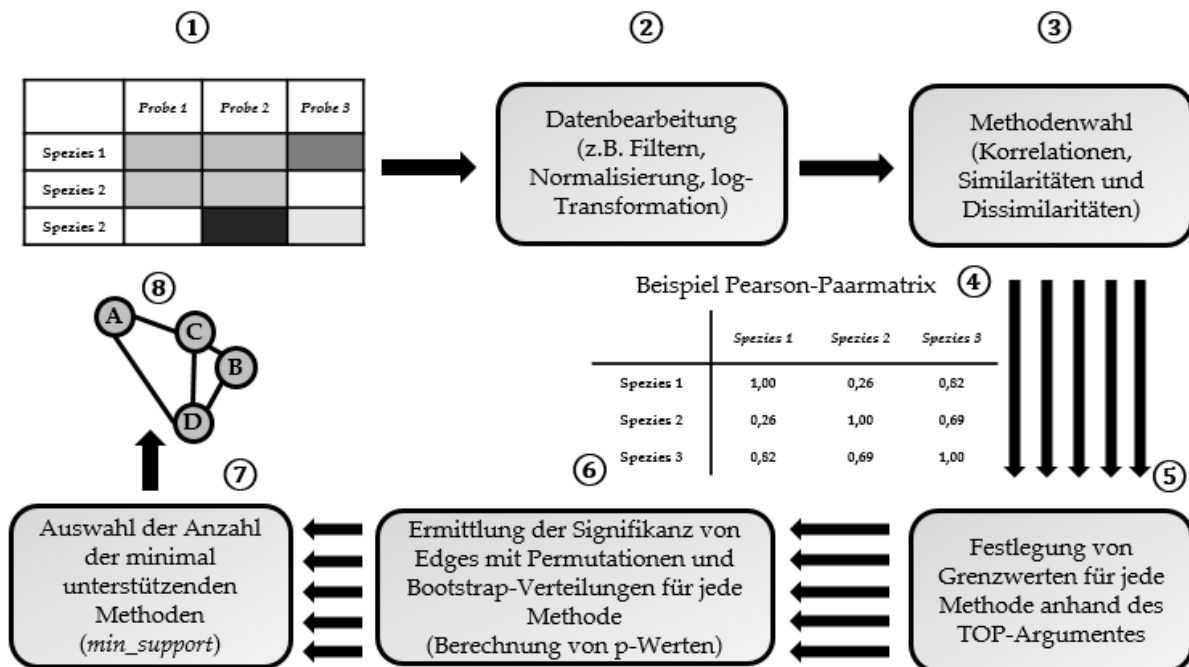


Abbildung 05: Berechnung mikrobieller Netzwerke mittels CoNet (nach Faust und Raes 2016)

1.5.4 Die topologische Rolle von Knoten

Anhand ihrer Verbindungsmuster innerhalb des Netzwerkes (Topologie) können den Knoten verschiedenen Rollen zugewiesen werden (Guimerà und Nunes Amaral 2005; Guimerà et al. 2007). Dazu werden für jeden Knoten zwei Kennzahlen berechnet: die sog. Intramodul-Konnektivität (Z) und die Intermodul-Konnektivität (P). Dabei beschreibt Z den Vernetzungsgrad eines Knotens innerhalb des eigenen Moduls im Vergleich zu allen anderen Knoten dieses Moduls:

$$z_i = \frac{k_i - \bar{k}_{s_i}}{\sigma_{k_{s_i}}}$$

mit k_i = Anzahl der Edges von Knoten i zu anderen Knoten im gleichen Modul

\bar{k}_{s_i} = Durchschnittliche Anzahl intramodularer Edges der Knoten im Modul s

$\sigma_{k_{s_i}}$ = Standardabweichung von k im Modul s

P hingegen beschreibt den Vernetzungsgrad eines Knotens zu Knoten, die einem anderen Modul zugeordnet wurden:

$$P_i = 1 - \sum_{s=1}^{N_M} \left(\frac{k_{i_s}}{k_i} \right)^2$$

mit k_{i_s} = Anzahl der Edges von Knoten i zu anderen Knoten im gleichen Modul

k_i = Gesamtanzahl an Edges von Node i

Knoten, welche P_i -Werte von 0 annehmen, haben dabei ausschließlich Kanten innerhalb des eigenen Moduls. Knoten nehmen hingegen Werte nahe 1 an, wenn die Kanten gleichmäßig auf verschiedene Module verteilt sind. Sind beide Kennzahlen für jeden Knoten des Netzwerkes berechnet, können diese in einem zweidimensionalen Koordinatensystem dargestellt werden. In diesem Koordinatensystem können Bereiche definiert werden, deren Lage eine Einordnung der Knoten anhand ihrer topologischen Rolle ermöglicht (**Abbildung 06**). Ursprünglich wurden dafür sieben verschiedene Bereiche definiert (Guimerà und Nunes Amaral 2005) die aber auf vier Bereiche vereinfacht werden können (Olesen et al. 2007).

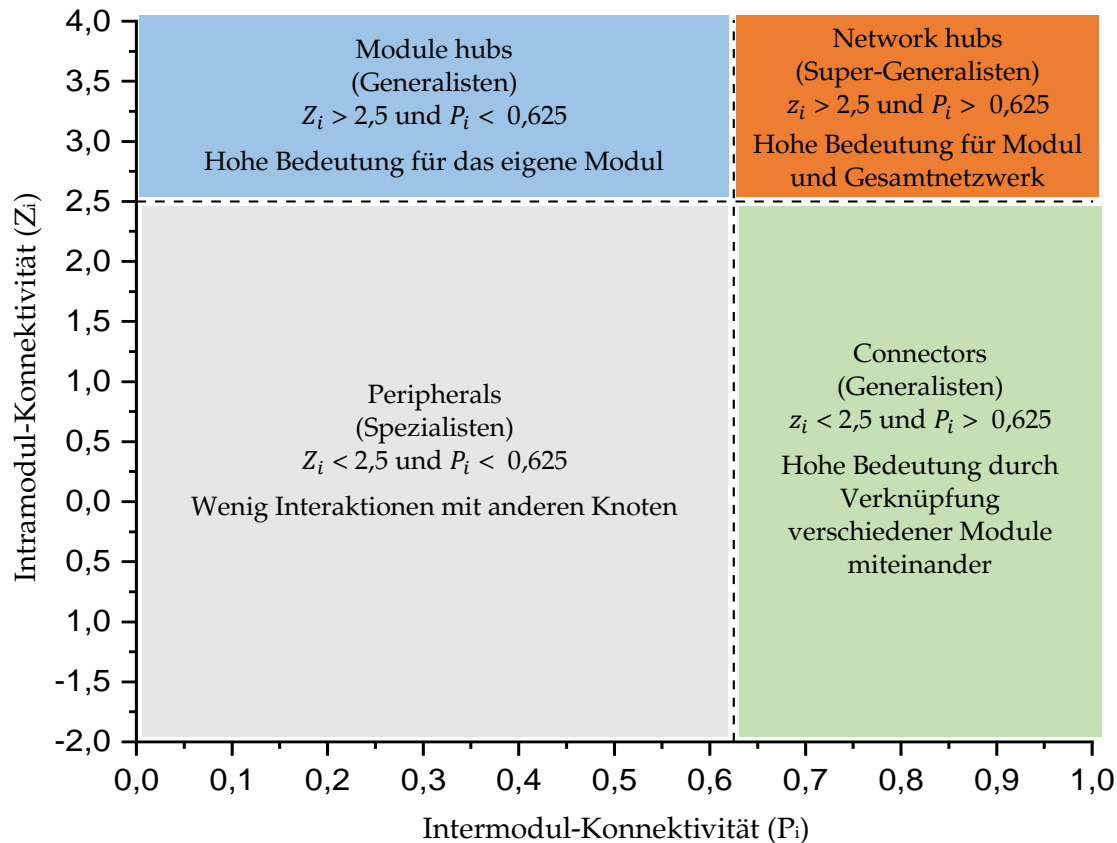


Abbildung 06: Einteilung von Knoten anhand ihrer topologischen Indizes Z_i und P_i .

Anhand festgelegter Grenzwerte für beide Indizes ergeben sich bei der Einteilung vier verschiedene, farblich gekennzeichnete Bereiche (Olesen et al. 2007).

Spezialisten und (Super-)Generalisten unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Bedeutung für das Netzwerk. Das Entfernen von Spezialisten hat aufgrund der geringen Anzahl an Kanten nur einen geringen Einfluss auf das eigene Modul und das Gesamtnetzwerk. Werden hingegen (Super-)Generalisten aus dem Netzwerk entfernt, kann dies zu einem Zusammenbruch bestimmter Module und auch des Gesamtnetzwerkes führen (Bascompte et al. 2003; Guimerà und Nunes Amaral 2005; Olesen et al. 2007). Deshalb sind die Interaktionsmuster der Generalisten von großer Bedeutung, und dabei wiederum die Interaktionen der Generalisten untereinander.

1.6 Motivation und Hypothesen

Der aktuelle Stand in der Erforschung des Biogas-Mikrobioms kann nach Theuerl et al. (Theuerl et al. 2019b) folgendermaßen zusammengefasst werden:

- (I) die Mehrheit der Spezies und deren Funktion während der AD ist immer noch unbekannt (Treu et al. 2016; Hassa et al. 2018).
- (II) Jeder Reaktor entwickelt sein eigenes, spezifisches Mikrobiom (Theuerl et al. 2018; Calusinska et al. 2018).
- (III) Es gibt sowohl generalistische Spezies, die in allen Biogasanlagen bzw. Kläranlagen gefunden werden können, als auch Spezialisten, die spezifische ökologische Nischen in den Anlagen besetzen (Calusinska et al. 2018).

Für eine stabile und effiziente AD ist die Adaption des Mikrobioms an die vorliegenden Prozessbedingungen essentiell. Die meisten AD-Reaktoren sind deshalb für konstante Prozessbedingungen ausgelegt. Bei einer Veränderung der Prozessbedingungen (z.B. Temperaturänderung, Überladung mit Substrat, pH-Wert-Änderung) können die ablaufenden mikrobiellen Prozesse gestört werden, wodurch es zum Abfall der Methanproduktion kommt (Theuerl et al. 2019b). Bei der angestrebten Substrat- und Prozessflexibilisierung sowie Prozessoptimierung in BPs und STPs sind solche temporären Änderungen der Prozessbedingungen allerdings beabsichtigt, weshalb ein tiefes Verständnis des AD-Mikrobioms nötig ist. Dazu gehören die Identifikation von prozessbeteiligten Mikroorganismen (taxonomische Diversität), die Erfassung des metabolischen Potentials, der ablaufenden Stoffwechselprozesse und der funktionellen Redundanz (funktionelle Diversität) sowie das Verständnis und Bewertung der Einflussfaktoren, Adaptionsmechanismen und mikrobiellen Interaktionsmuster (ökologische Diversität) (Theuerl et al. 2019a).

Seit der Einführung des NGS wurden deshalb mikrobielle Gemeinschaften in Biogasreaktoren sowohl im Labormaßstab (Ye et al. 2012; Li et al. 2013; Goux et al. 2015) als auch im großtechnischen Maßstab (Sundberg et al. 2013; Bremges et al. 2015; Theuerl et al. 2015; Goux et al. 2016; Calusinska et al. 2018) taxonomisch charakterisiert. Andere Studien haben sich auf die Beschreibung der mikrobiellen

Gemeinschaft auf funktioneller Ebene mittels Metaproteomuntersuchungen fokussiert (Abram et al. 2011; Kohrs et al. 2014; Gabris et al. 2015; Heyer et al. 2016).

Da sich viele der oben genannten Studien nur mit einer geringen Anzahl an Anlagen beschäftigten, bleibt es fraglich, ob sich die Erkenntnisse aus den Untersuchungen der einzelnen Anlagen auch auf andere Anlagen übertragen lassen. Es ist deshalb von großer Bedeutung eine größere Anzahl von Anlagen zu analysieren, um ein grundlegendes Verständnis der AD zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb die mikrobiellen Gemeinschaften in 16 Biogas- und 10 Kläranlagen im Detail mit Hochdurchsatzverfahren charakterisiert.

Auf Basis der oben genannten Informationen wurden folgende Hypothesen (H_1 bis H_3) aufgestellt, im Rahmen derer definierte biologischer Fragestellungen beantwortet werden sollten:

H₁: Die mikrobiellen Abbauwege der anaeroben Gärung in Biogas- und Kläranlagen sind identisch. Dennoch etablieren sich anlagenspezifische mikrobielle Gemeinschaften, die sich nicht nur in der Zusammensetzung, sondern auch in ihrer Diversität und ihren mikrobiellen Interaktionsmustern unterscheiden. (3.2)

- a) Welche Rolle spielen die Diversität und Evenness? (3.2.1)
- b) Unterscheiden sich die mikrobiellen Gemeinschaften in Biogas- und Kläranlagen voneinander? (3.2.2)
- c) Gibt es dominante Gruppen, die spezifisch für einen Anlagentyp sind? (3.2.3)
- d) Wie groß ist die Varianz der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften innerhalb der Anlagentypen? (3.2.4)
- e) Welche anlagenspezifischen Faktoren haben Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften? (3.2.5)
- f) Unterscheiden sich die Schlüsselorganismen in beiden Anlagentypen hinsichtlich ihrer Interaktionsmuster? (3.2.6)

H₂: Bestimmte Mikroorganismen bzw. Mikroorganismengruppen dominieren die Stoffwechselvorgänge bei der AD in Biogasanlagen trotz hochgradiger funktioneller Redundanz. (3.3)

- a) Sind alle repräsentativen Stoffwechselwege der AD durch Metaproteomanalysen abgedeckt? (3.3.1)
- b) Kann anhand des Proteinprofils eine Aussage über den dominanten Methanogeneseweg getroffen werden? (3.3.2)
- c) Besetzen die prozessbeteiligten Mikroorganismen in allen Anlagen die gleichen ökologischen Nischen? (3.3.3)
- d) Welche Mikroorganismen sind an welchen Stoffwechselwegen beteiligt? (3.3.4)
- e) Steht die relative Abundanz von Proteinen in Zusammenhang mit der funktionellen Redundanz? (3.3.5)
- f) Welche Mikroorganismen bzw. Mikroorganismengruppen und welche Funktionen werden von den Prozessparametern beeinflusst? (3.3.6)

H₃: Die drei dominierenden Methanogenesewege (AcMe, HyMe und BoMe) sind das Ergebnis von definiert zusammengesetzten, mikrobiellen Gemeinschaften und deren Interaktionsmustern. (3.3.7)

- a) Unterscheidet sich die Struktur der mikrobiellen Netzwerke und die mikrobielle Interaktivität bei den unterschiedlichen Methanogenesewegen? (3.3.7.1)
- b) Was sind Schlüsselorganismen der einzelnen Methanogenesewege? (3.3.7.2)
- c) Gibt es übergeordnete Schlüsselorganismen für alle Methanogenesewege? (3.3.7.3)

2 Material und Methoden

In folgendem Abschnitt werden alle in dieser Arbeit verwendeten Methoden näher beschrieben und die verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen aufgeführt.

2.1 Geräte und Materialien

Alle verwendeten Geräte und Materialien für die mikro- und molekularbiologischen Arbeiten finden sich nachfolgend dargestellt (**Tabelle 04**).

Tabelle 04: Übersicht der verwendeten Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller
µDrop-Platte	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
CFX 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Elementanalysator Vario EL II	Elementar Analysensysteme GmbH, Langenselbold, Deutschland
FastPrep®-24	MP Biomedicals, Irvine, CA, USA
GenoPlex Geldokumentationssystem	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific
MaxQ™ 6000 Shaker	Thermo Fisher Scientific
Mini-Protean® Tetra Handcast System	Bio-Rad Laboratories
PowerPac Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories
Molecular Imager® GelDoc™ XR+	Bio-Rad Laboratories
Multiskan GO	Thermo Fisher Scientific
See-saw rocker SSL4	Stuart, Staffordschire, UK
SpeedVac Concentrator plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf
C18-ZipTip-Spitzen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Zirkonia-Beads	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Verwendete Chemikalien

Im Folgenden wird ein Überblick der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungen gegeben (**Tabelle 05** und **Tabelle 06**).

Tabelle 05: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Qualität [%] bzw. Konzentration [%]	Quelle
1,4-Dithiothreitol	> 99	Carl Roth
Aceton	> 99,5	Carl Roth
Acetonitril	100	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Agarose Standard	-	Carl Roth
Albumin (BSA)	> 98	Carl Roth
Ameisensäure	> 98	Carl Roth
Amidoschwarz 10B	-	Carl Roth
Ammoniumacetat		Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat (Ambic)	> 98	Carl Roth
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	> 98	Carl Roth
Cetyltrimethylammoniumbromid	≥ 99,0	Carl Roth
DEPC-Wasser	-	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	> 99,5	Carl Roth
Essigsäure	100	Carl Roth
Ethanol	100	Carl Roth
Ethidiumbromid	-	Carl Roth
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	-	Thermo Fisher Scientific
Glycerin	> 99,5	Carl Roth
Glykogen	-	VWR
Harnstoff	> 99,5	Merck KGaA
Iodacetamid (IAA)	> 99	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 05: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Qualität [%] bzw. Konzentration [%]	Quelle
iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x)	-	Bio-Rad Laboratories
Loading Dye (6x)	-	Thermo Fisher Scientific
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	≥ 99,0	Carl Roth
Methanol (≥ 99,5 %)	≥99,5	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	-	Merck KgaA
Natriumchlorid	≥99,5	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	≥99,0	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	≥99,0	Carl Roth
Natronlauge 0,1 M	-	Carl Roth
Polyethylenglykol 6000	-	Carl Roth
Polyvinylpyrrolidon K25	-	Carl Roth
ROTI® Aqua-P/C/I	-	Carl Roth
Roti® Aqua-Phenol	-	Carl Roth
Rotiphorese Brilliant Blau	-	Carl Roth
ROTI®-Load 1	-	Carl Roth
Saccharose	> 99,5	Carl Roth
Schwefelsäure	95-98	Carl Roth
Sulfanilsäure Standard	≥ 99,0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
TAE-Puffer (50x)	-	Carl Roth
TaqMaster PCR Enhancer (5x)	-	Bio-Rad Laboratories
Thioharnstoff	> 99	Carl Roth
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid	> 99,9	Carl Roth
Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8)	-	BioRad Laboratories
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	-	BioRad Laboratories
Trypsin	-	Thermo Fisher Scientific
β-Mercaptoethanol	> 99,0	Carl Roth

Tabelle 06: Verwendete Puffer und Lösungen

Lösung	Finale Zusammensetzung
Acrylamid 30 % (Rotiphorese Gel 30)	30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid in H ₂ O _{dest.}
Amidoschwarz-Färbelösung	0,26 mg/mL Amidoschwarz 10% Essigsäure (v/v) 90 % Methanol (v/v)
Ammoniumacetatlösung	0,1 M Ammoniumacetat in Methanol
CI-Gemisch	Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 v/v)
CTAB-Extraktionspuffer	10% (w/v) CTAB 1% (w/v) PVP in 0,7 M NaCl-Lösung pH = 8,0
DTT-Lösung	10 mM Dithiothreitol in 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung
Extraktionspuffer	50 % Acetonitril (v/v) 0,1 % Ameisensäure (v/v) in H ₂ O _{dest.}
IAA-Lösung	100 mM Iodacetamid in 50 mM Ambic
Natriumphosphatpuffer	200 mM mit pH 5,6 bestehend aus Dinatriumhydrogenphosphat Natriumdihydrogenphosphat
PCI-Gemisch	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)
PEG-Lösung	30 % (w/v) Polyethylenglycol-6000 in 1,6 M Natriumchloridlösung
Resuspendierlösung	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 0,01 g/mL Dithiothreitol in H ₂ O _{dest.}
SDS-Aquaphenol-Gemisch	20 % Natriumdodecylsulfat (w/v) in Aqua-Phenol
SDS-Entfärbelösung	9 % Glycerin (v/v) 9 % Essigsäure (v/v) 9 % Methanol (v/v) in H ₂ O _{dest.} (v/v)

Fortsetzung Tabelle 06: Verwendete Puffer und Lösungen

Lösung	Finale Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 20 mM Essigsäure 0,1 mM Ethylendiamintetraacetat in H ₂ O _{dest.}
TE-Puffer	10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan 1 mM Ethylendiamintetraacetat in H ₂ O _{dest.}
TPM-Puffer	50 mM Tris-HCl 20 mM Magnesiumchlorid 1,7% Polyvinylpyrrolidon in H ₂ O _{dest.}
Trypsinlösung	10 ng/μL Trypsin in Puffer C (50 mM Ambic, 5 % Acetonitril)
Waschlösung	10 % (v/v) Essigsäure in Methanol

2.3 Probennahme

Die Proben von 16 Biogasanlagen und 10 Kläranlagen aus Nordbayern wurden im August 2016 genommen. Der Fermenterinhalt der Biogasanlagen und der Faultürme wurde vor Probennahme gut durchmischt und alle Leitungen mit der Gärflüssigkeit sorgfältig gespült, um Rückstände zu entfernen. Der herausgespülte Inhalt wurde verworfen. Von jeder Anlage wurden anschließend ca. 300 mL Probe entnommen, in 50 mL Gefäße aliquotiert und umgehend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Proben wurden während des Transports auf Eis gekühlt und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

Eine detaillierte Auflistung mit den Standorten der einzelnen Anlagen ist aufgrund der mit den Betreibern getroffenen Datenschutzvereinbarung nicht möglich, weshalb in dieser Arbeit darauf verzichtet wird. Die Anlagen wurden dementsprechend anonymisiert und durchnummeriert, woraus sich bei den Biogasanlagen die Probenamen BP01 bis BP16 und bei Kläranlagen die Probenamen STP01 bis STP10 ergeben.

2.4 Ermittlung der Anlagenparameter

Ein Teil der erfassten Anlagenparameter wurden beim jeweiligen Betreiber durch einen Fragebogen erhoben. Andere Parameter wurden im Labor der Hochschule Coburg bzw. in Zusammenarbeit mit externen Anbietern ermittelt. Da sich die erfassten Parameter hinsichtlich der Biogas- und Kläranlagen unterscheiden, wird im Folgenden auf jeden Anlagentyp gesondert eingegangen. Dabei ist zu beachten, dass Biogasanlagen für gewöhnlich bei stabilem Substratinput betrieben werden, wohingegen dieser bei Kläranlagen stark variiert (Wetterlage, angeschlossene Industrie u.ä.). Dadurch ergeben sich bei vielen Kläranlagenparametern ebenfalls starke Schwankungen, weshalb auf eine ausführlichere Analyse von Kläranlagenparametern verzichtet wurde.

2.4.1 Prozessparameter der Biogasanlagen

Anhand einer Literaturrecherche (Madsen et al. 2011; Abdelgadir et al. 2014; Teixeira Franco et al. 2016) wurde eine Auswahl an wesentlichen Prozessparametern getroffen, welche nachfolgend aufgeführt sind (**Tabelle 07**).

Tabelle 07: Erfasste Prozessparameter für Biogasanlagen

Parameter	Quelle
Substratinput	Betreiber
Fermentationstyp	Betreiber
Prozesstemperatur	Betreiber
Durchmischung	Betreiber
FOS	eigene Messungen
FOS/TAC	eigene Messungen
pH-Wert	eigene Messungen
Elementzusammensetzung	eigene Messungen
Organische Säuren	extern (atres Analytik, München)

2.4.1.1 Von den Anlagenbetreibern zur Verfügung gestellte Prozessparameter

Das eingesetzte Substratspektrum wurde vor Ort von den Biogasanlagenbetreibern erfragt. Ebenso wurden mit einem Fragebogen der Fermentationstyp (Trocken- oder Nassfermentation), die Prozesstemperatur und die Art der Durchmischung erfasst.

2.4.1.2 FOS, FOS/TAC und pH-Wert

Die Konzentration an FOS, deren Verhältnis zur TAC und der pH-Wert wurden gemeinsam in einem Verfahren bestimmt (Liebetau et al. 2013). Dazu wurden die Proben zunächst bei 4.696 x g für 10 min bei 10°C zentrifugiert. Anschließend wurden je 10 mL des klaren Überstandes in ein Becherglas überführt und der initiale pH-Wert bestimmt. Anschließend wurden die FOS durch Titration mit 0,05M Schwefelsäure ausgetrieben. Durch Erfassen des jeweiligen Säurevolumens, welches zum Erreichen der pH-Werte von jeweils 5,0, 4,4, 4,3 und 4,0 nötig ist, kann über folgende Formeln die Konzentration an FOS sowie das Verhältnis FOS/TAC berechnet werden:

Berechnung der FOS-Konzentration [mg/L] nach Kapp (Liebetau et al. 2013):

$$FOS = 131.340 * (V_{pH4,0} - V_{pH5,0}) * \frac{N_{H_2SO_4}}{V_{Probe}} - 3,08 * V_{pH4,3} * \frac{N_{H_2SO_4}}{V_{Probe}} * 1.000 - 10,9$$

mit $V_{pHx,x}$ = Volumen zugegebener Schwefelsäure bis zum entsprechenden pH – Wert [mL]

$$N_{H_2SO_4} = \text{Normalität der Säure} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$$

$$V_{Probe} = \text{Eingesetztes Probenvolumen [mL]}$$

Berechnung von FOS/TAC nach FAL (Liebetrau et al. 2013):

$$FOS/TAC = \frac{\left((V_{pH4,4} - V_{pH5,0}) * \frac{20}{V_{Probe}} * \frac{N_{Säure}}{0.1} * 1,66 - 0,15 \right) * 500 * V_{Probe}}{0,5 * N_{Säure} * V_{pH5,0} * M_{CaCO_3} * 1000}$$

mit $V_{pHX,X}$ = Volumen zutritierter Schwefelsäure bis zum entsprechenden pH – Wert [mL]

$$N_{H_2SO_4} = \text{Normalität der Säure} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]$$

$$V_{Probe} = \text{Eingesetztes Probenvolumen [mL]}$$

$$M_{CaCO_3} = \text{Molare Masse von Calciumcarbonat} (= 100 \frac{g}{mol})$$

Alle Messungen wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

2.4.1.3 Elementaranalyse

Für die Analyse der Elementzusammensetzung (C, N, S) wurden die Proben zunächst für 48h bei 50°C getrocknet. Die getrockneten Proben wurden anschließend mit Mörser und Pistill fein gemahlen. Nach Einwaage von je 10 mg in Zinnhüte wurden die Proben anschließend mit dem Vario EL III Elementaranalysator analysiert. Die Verbrennung erfolgte dabei in einer, mit Sauerstoff hoch angereicherten, Helium-Atmosphäre bei 1.150°C nach Herstellerangaben. Als Standard wurde Sulfanilsäure genutzt. Für alle Proben wurden Triplikate gemessen und im Anschluss der Mittelwert gebildet.

2.4.1.4 Messung der organischen Säuren

Die Messung des FOS-Spektrums mittels Gaschromatographie wurde von atres Analytik (München, Deutschland) nach einem hauseigenen Verfahren durchgeführt. Dabei wurde die Konzentration der folgenden Säuren gemessen: Essigsäure, Propionsäure, iso-Buttersäure, Buttersäure, iso-Valeriansäure, Valeriansäure, Hexansäure, Heptansäure. Zusätzlich wurde aus den Konzentrationen der einzelnen Säuren auch die Gesamtsäure und das Essigsäureäquivalent ermittelt. Die Bestimmungsgrenzen für Essigsäure, iso-Buttersäure und Hexansäure waren bei 55 mg/L, für alle anderen Säuren bei 40 mg/L.

2.4.2 Prozessparameter von Kläranlagen

Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus und Funktionsweise von Kläranlagen wurden nach Literaturrecherche (Bolzonella et al. 2005; Appels et al. 2008; Bachmann 2015) für diesen Anlagentyp andere Parameter als prozessrelevant eingestuft (**Tabelle 08**).

In den kommunalen Kläranlagen werden Routineuntersuchungen durch geschultes Personal selbstständig durchgeführt, weshalb die erfassten Prozessparameter von den Anlagenbetreibern selbst zur Verfügung gestellt werden konnten.

Tabelle 08: Erfasste Prozessparameter für Kläranlagen

Parameter	Quelle
Kapazität (Einwohnergleichwerte; EGW)	
Angeschlossene Industrien	
pH-Wert	
Temperatur	
Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)	alle Betreiber
Biologischer Sauerstoffbedarf (BSB)	
Verweilzeit (SRT)	
Substratvorbehandlung	
Raum-Zeit-Ausbeute (STY)	
Durchmischung	

2.5 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung

Alle für die DNA-Extraktionen nötigen Chemikalien und Lösungen wurden ausschließlich mit DEPC-Wasser hergestellt. Alle Lösungen wurden entweder durch Autoklavieren oder Sterilfiltration (0,2 µm) sterilisiert. Alle Schritte, die sterile Bedingungen erforderten, wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

2.5.1 Nukleinsäureextraktion

Aufgrund der hohen Probenkomplexität wurden zunächst verschiedene DNA-Extraktionsmethoden (inkl. unterschiedlicher Kits) getestet. Da keine Methode zufriedenstellende Ergebnisse für STPs und BPs lieferte, wurde die DNA aus beiden Anlagentypen mit zwei verschiedenen Methoden extrahiert, die nachfolgend detailliert beschrieben werden.

2.5.1.1 Biogasanlagen

Für die DNA-Extraktion aus Biogasanlagenproben wurde eine Methode von Griffiths et al. (Griffiths et al. 2000) modifiziert. Zunächst wurden 500 mg Probe in ein 2 mL Schraubdeckelröhrchen abgewogen und 500 µL CTAB-Extraktionspuffer, 500 µL PCI-Lösung, 5 µL β-Mercaptoethanol und 250 mg Zirkonia-Beads (Durchmesser 0,7 µm) zugegeben. Die Proben wurden für 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur Lyse für 30 s bei 5,5 m/s in die FastPrep®-24 gegeben. Nach Abschluss der mechanischen Zellyse wurden die Proben für 5 min bei 16.000 × g und 4°C zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. Im Anschluss wurden 500 µL des Überstandes abgenommen und in ein neues Schraubdeckelröhrchen überführt. Zur Erhöhung der Ausbeute und gleichzeitigen Aufreinigung wurden die oben genannten Schritte einmal wiederholt. Zum Überstand wurde anschließend das gleiche Volumen CI-Gemisch gegeben und erneut für 5 min bei 16.000 × g und 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 350 µL abgenommen und mit dem zweifachen Volumen PEG-Lösung und 2 µL Glykogen versetzt. Der Ansatz wurde dann für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 18.000 × g und 4°C. Das resultierende Pellet wurde anschließend zweimal mit

eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und jeweils bei 37°C in der SpeedVac getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µL TE-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.1.2 Kläranlagen

Für die Nukleinsäureextraktion wurde ein geringfügig modifiziertes Extraktionsprotokoll nach Noll et al. (Noll et al. 2005) verwendet. Die Proben wurden zunächst für 10 min bei 4.696 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit einem Spatel homogenisiert und 500 mg in ein Schraubdeckelröhrchen abgewogen. Dann wurden 400 µL kalter TPM-Puffer, 200 µL Na₃PO₄-Puffer, 600 µL warme SDS-Aquaphenol-Mischung (20% (w/V)) sowie 250 mg Zirkonia-Beads zugegeben. Nach einer Inkubation für 10 min bei 65°C wurden die Proben für 30 s bei 5,5 m/s in der FastPrep®-24 mechanisch aufgeschlossen und darauffolgend für 5 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Zu 800 µL des Überstandes wurden 800 µL TPM-Puffer gegeben und bei den gleichen Bedingungen wie im vorherigen Schritt zentrifugiert. Vom Überstand wurden 800 µL mit dem gleichen Volumen PCI-Lösung gemischt und bei den bereits genannten Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde dem Überstand des letzten Schrittes das doppelte Volumen an PEG-Lösung sowie 2 µL Glykogen zugegeben und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit eiskaltem, 70%-igen Ethanol gewaschen und in 100 µL TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung der Nukleinsäureextrakte erfolgte bei -20°C.

2.5.2 Quantitative und qualitative Überprüfung der Extrakte

Alle Nukleinsäureextrakte wurden vor der Sequenzierung photometrisch hinsichtlich Quantität (A_{260}) und Qualität (A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230}) beurteilt. Dazu wurden je 2 µL des Extraktes auf die µDrop-Platte gegeben und die Absorption bei den entsprechenden Wellenlängen gemessen. Zusätzlich wurde für jede Probe auch ein Absorptionsspektrum in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 350 nm aufgenommen. Zur Bestimmung des Blindwertes diente jeweils TE-Puffer. Als Kriterium für die Reinheit wurden Absorptionsverhältnisse von 1,8 (A_{260}/A_{280}) sowie

2,0 (A_{260}/A_{230}) festgelegt. Extrakte, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden verworfen und erneut extrahiert.

Eine zu starke Fragmentierung der gDNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese ausgeschlossen. Dafür wurde ein 0,8%-iges Agarosegel ((w/V) in TAE-Puffer) verwendet, welches mittels Ethidiumbromid gefärbt und anschließend unter UV-Licht im GenoPlex Geldokumentationssystem visualisiert wurde.

2.5.3 Primerwahl und Überprüfung der Amplifizierbarkeit

Ein für die Sequenzierung entscheidender Schritt ist die Primerwahl. Deshalb wurden vorab verschiedene Primerkombinationen (Klindworth et al. 2013) *in-silico* getestet. Die Abdeckung der Sequenzdiversität wurde für die SILVA-Datenbank (Quast et al. 2013) und für die RDP-Datenbank (Cole et al. 2014) ermittelt (**Tabelle 09**).

Tabelle 09: Coverage der getesteten Primerpaare für die SILVA- (A) und RDP-Datenbank (B)⁺

A Primer	Forward-Primer (5' --> 3')	Reverse-Primer (5' --> 3')	MM [#]	Sequenz-abdeckung [%] [*]		
				A	B	E
515F-806R	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	0	85,8	87,8	0,0
			1	95,6	95,2	1,4
A340F-A915R	CCCTAYGGGGYGCASCAG	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	0	73,4	0,0	0,0
			1	85,1	0,0	0,0
341F-785R	CCTACGGGNGGCWGCAG	GACTACHVGGGTATCTAAKCC	0	0,6	87,7	0,0
			1	67,1	95,1	0,1
Arch349F-Arch806R	GYGCASCAGKCGMGAAW	GGACTACVSGGGTATCTAAT	0	75,4	0,0	0,0
			1	91,4	0,0	0,0

B Primer	Forward-Primer (5' --> 3')	Reverse-Primer (5' --> 3')	MM [#]	Sequenz-abdeckung [%] [*]		
				A	B	E
515F-806R	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	0	90,9	88,0	-
			1	98,3	98,3	-
A340F-A915R	CCCTAYGGGGYGCASCAG	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	0	75,2	0,0	-
			1	85,9	0,0	-
341F-785R	CCTACGGGNGGCWGCAG	GACTACHVGGGTATCTAAKCC	0	0,0	90,1	-
			1	56,5	97,9	-
Arch349F-Arch806R	GYGCASCAGKCGMGAAW	GGACTACVSGGGTATCTAAT	0	80,3	0,0	-
			1	95,8	0,6	-

⁺Datenbanken abgerufen am 21.03.2018

[#]Anzahl erlaubter Fehlpaarungen (Mismatches)

^{*}Domänen: A: Archaea, B: Bacteria, E: Eukaryota

Aufgrund dieser *in-silico*-Ergebnisse wurde für die Sequenzierung das Primerpaar 515F/806R favorisiert, mit dem sich die V4-Region des 16S rRNA Gens amplifizieren lässt. Vor der Sequenzierung wurde jeder Extrakt zusätzlich auf seine Amplifizierbarkeit geprüft. Dazu wurden verschiedenen Verdünnungen (1:1, 1:10, 1:100, 1:1.000) der Extrakte mit den Primern 515F/806R mittels quantitativer PCR auf dem CFX 96 Touch™ Real-Time PCR Detection System amplifiziert.

2.5.4 Sequenzierung

Die Generierung der PCR-Bibliotheken für die Sequenzierung erfolgte in einer zweistufigen PCR mit dem v2 500 Zyklen-Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) nach Herstellerangaben. Die Sequenzierung erfolgte mittels 300 bp paired-end reading auf einer Illumina MiSeq. Die Zuordnung der einzelnen Reads zu den entsprechenden Proben, das Filtern sowie das Trimmen der Adapter erfolgte mit der Illumina Real Time Analyse-Software (Version 1.17.28). Die Qualität der einzelnen Reads wurde im Anschluss mit der FastQC Software (Andrews 2010), Version 0.11.5, überprüft. Zum Trimmen der lokusspezifischen V4-Adapter wurde cutadapt, Version 1.9.2.dev0 (Martin 2011), verwendet. Alle Reads, welche nicht getrimmt werden konnten, wurden verworfen. Forward- und Reverse-Reads wurden im Anschluss bei einem minimalen Overlap von 15 Basenpaaren mit USEARCH, Version 8.1.1861 (Edgar 2010) zusammengefügt. Alle zusammengefügt Reads mit mehr als einem Mismatch wurden genauso entfernt wie Reads, die mehrdeutige Basen enthielten. Für das OTU-Clustering wurde eine minimale Sequenzidentität von 99% gewählt. Alle nur einmal vorkommenden Sequenzen und Chimäre wurden ebenfalls verworfen. Die Konsensussequenzen der einzelnen OTUs wurden anschließend gegen die Greengenes-Datenbank, Version 13.8 (DeSantis et al. 2006) geblastet. Dafür wurde ein minimaler Identitätsgrenzwert von 0.7 (Wayne et al. 1987) angesetzt. Für alle letztgenannten Schritte wurde ebenfalls der USEARCH-Algorithmus genutzt.

Die Sequenzierung und die beschriebene Datenprozessierung wurden von der Microsynth AG (Balgach, Schweiz) durchgeführt.

Aufgrund des Alters und fehlender Aktualisierung der Greengenes-Datenbank wurden die Konsensussequenzen der OTUs für die weitere Datenauswertung nochmals mit der SILVA-Datenbank (Identity-Threshold ebenfalls 0.7; Stand vom 03.05.2018) verglichen. Bei Unstimmigkeiten hinsichtlich der taxonomischen Zuordnung zwischen beiden Datenbanken wurde die Taxonomie der SILVA-Datenbank verwendet, da diese regelmäßig aktualisiert wird.

2.5.5 Auswertung der Sequenzierung des 16S rRNA Gens

Um die Hypothesen dieser Arbeit (vgl. 1.6) bewerten zu können, wurden umfangreiche Analysen mit den Daten aus der 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung durchgeführt. Das Vorgehen bei der Auswertung ist nachfolgend ausführlich beschrieben.

2.5.5.1 Beurteilung der Sequenziertiefe

Um zu prüfen, ob bei allen Proben eine ausreichende Sequenziertiefe erreicht wurde, wurden zunächst für alle Proben anhand der absoluten, ungefilterten Abundanzen Species-Accumulation-Curves (SAC) mit dem R-package *vegan* (v.2.4-3) (Oksanen et al. 2017) erstellt.

2.5.5.2 Ermittlung von Kern-Mikrobiomen für Biogas- und Kläranlagen

Zur Identifizierung von Kernmikrobiomen, definiert als alle OTUs, die in 100 % der Anlagen vorkommen, wurde der Datensatz zunächst in Biogas- und Kläranlagen aufgeteilt. Um Unterschiede hinsichtlich der bakteriellen und methanogenen Gemeinschaft feststellen zu können, wurde jeder Datensatz zusätzlich in *Bacteria* und *Archaea* getrennt. Für jede OTU wurden anschließend die relativen Abundanzen, die mittlere relative Abundanz pro Anlagentyp und die Anzahl der Beobachtungen pro Anlagentyp berechnet. Alle beschriebenen Schritte wurden in Microsoft Excel 2016 durchgeführt.

2.5.5.3 Erfassung der Varianz bei der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogas- und Kläranlagen

Zur Identifikation von Anlagen mit ähnlicher mikrobieller Gemeinschaft wurden für jeden Anlagentyp und für die entsprechende bakterielle bzw. archaeelle Gemeinschaft eine Korrespondenzanalyse (Correspondence Analysis, CA) auf Basis von relativen Abundanzmatrices mittels Canoco 4.5 durchgeführt. Zur Reduktion der Datenkomplexität wurden nur OTUs berücksichtigt, die in wenigstens einer Anlage mit einer relativen Abundanz von mindestens 0,1 % gefunden wurden (Noll et al. 2005). Im Anschluss wurden die jeweiligen Koordinaten für jede Anlage in den ersten beiden Dimensionen extrahiert. Ausgehend von diesen Koordinaten wurde eine euklidische Distanzmatrix (d.h. der Abstand der Punkte im zweidimensionalen Raum) mit der im R-Package *stats* (R Core Team 2018) enthaltenen Funktion *dist* berechnet. Auf Basis dieser Distanzmatrices erfolgte das hierarchische Clustering mittels der Funktion *hclust* des Packages *fastcluster* (Müllner 2013). Als Clusteralgorithmus wurde Ward.D2 gewählt. Um die beiden Anlagentypen miteinander vergleichen zu können, wurde für die Clusterzuordnung eine euklidische Distanz von je 0,6 im zugehörigen Dendrogramm gewählt.

2.5.5.4 Berechnung ökologischer Indizes

Um die beiden Anlagentypen hinsichtlich ihrer Diversität und Speziesverteilung vergleichen zu können, wurden folgende ökologische Indizes auf Basis der gefilterten, in absolute Abundanzen zurückübersetzte Abundanzmatrix (vgl. 2.5.5.3) mit dem R-package *vegan* (Oksanen et al. 2017) berechnet:

Simpson-Diversität (1-D):

$$S_{1-D} = 1 - \sum_{i=1}^s \frac{n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)}$$

n_i = Zahl der Individuen einer Art i

n = Gesamtzahl der Individuen

Shannon-Diversität:

$$H' = - \sum_i p_i * \ln p_i \text{ mit } p_i = \frac{n_i}{N}$$

p_i = Anteil der jeweiligen Spezies an der Gesamtzahl N

Chao1-Richness-Estimator:

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{f_1^2}{2f_2}$$

S_{obs} = Anzahl der Individuen, deren absolute Abundanz > 0 ist (Richness)

f_1 = Anzahl der Spezies, deren absolute Abundanz 1 ist (Singletons)

f_2 = Anzahl der Spezies, deren absolute Abundanz 2 ist (Doubletons)

Abundance-Based-Coverage-Estimator (ACE):

$$S_{ACE} = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \frac{f_1}{C_{ACE}} * y_{ACE}^2$$

$$\text{mit } y_{ACE}^2 = \max \frac{S_{rare}}{C_{ACE}} * \frac{\sum_{k=1}^{10} k(k-1)f_k}{(n_{rare})(n_{rare}-1)} - 1,0 \quad \text{und } C_{ACE} = 1 - \frac{f_1}{n_{rare}}$$

f_k = Anzahl der Spezies, die k mal gefunden wurden

$$\sum_{k=1}^{10} f_k, \text{ die Summe der selten vorkommenden Spezies}$$

$$\sum_{k=11}^{max} f_k, \text{ die Summe der häufiger vorkommenden Spezies}$$

$$n_{rare} = \sum_{k=1}^{10} k * f_k, \text{ die Summe der absoluten Reads aller seltenen Spezies}$$

2.5.5.5 Identifizierung von Prozessparametern mit signifikantem Einfluss auf die mikrobiellen Gemeinschaften

Der Einfluss der Umweltparameter (vgl. 2.4) auf die jeweiligen taxonomischen Profile wurde durch Kanonische Korrespondenzanalysen (Canonical Correspondence Analysis, CCA) mit der Funktion *cca* aus dem R-Package *vegan* (Oksanen et al. 2017) überprüft. Um Kollinearitäten zwischen den einzelnen Parametern auszuschließen wurde mit dem gleichen Package der sog. *Variance Inflation Factor* (VIF) berechnet. Für die endgültige CCA wurden nur kontinuierliche Parameter mit einem VIF < 15 genutzt. Die statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$) wurde mittels eines Permutationstests mit 10.000 Permutationen überprüft. Um zu prüfen, ob die bakterielle und methanogene Gemeinschaft von den gleichen Parametern beeinflusst wurde, wurden separate CCAs für *Bacteria* und *Archaea* durchgeführt.

Die Spezifizierung des Einflusses der signifikant getesteten Prozessparameter erfolgte mittels Spearman-Korrelation mit dem R-Package *psych* (Revelle 2018). Dazu wurde die mikrobielle Gemeinschaft auf verschiedenen taxonomischen Ebenen zusammengefasst. Signifikante Korrelationen wurden definiert durch einen p-Wert $\leq 0,05$ und einem zugehörigen Spearmans rho $\geq 0,6$ bzw. $\leq -0,6$. Positive Korrelationen beschrieben dabei die direkte Proportionalität von Prozessparameter und Abundanz, negative Korrelationen hingegen einen indirekt proportionalen Zusammenhang.

2.5.5.6 Netzwerkberechnungen zur Identifikation mikrobieller Interaktionsmuster

Die Netzwerkanalysen wurden mit dem auf der Random-Matrix-Theorie basierenden Tool MENA (vgl. 1.5.3.1) durchgeführt. Als Ausgangsmatrix wurden die gefilterten Abundanzmatrices (2.5.5.3) genutzt. Für die Netzwerkberechnungen wurde der Majority-Parameter für die Anzahl der minimal nötigen Beobachtungen pro OTU auf vier (BPs) bzw. fünf (STPs) festgelegt, um vergleichbare Spearman-Thresholds für beide Netzwerke zu erhalten. Zunächst wurden für alle möglichen OTU-Paarungen die Spearman-Ähnlichkeitswerte berechnet. Die erhaltenen Netzwerke wurden statistisch durch Berechnung von 100 randomisierten Netzwerken nach dem Maslov-

Sneppen-Verfahren validiert (Maslov und Sneppen 2002). Die Modularisierung der Netzwerke erfolgte mit dem Fast Greedy-Algorithmus (Deng et al. 2012). Die topologische Rollenzuweisung der einzelnen Knoten erfolgte nach der vereinfachten Version (Olesen et al. 2007) der von Guimerá & Amaral (Guimerà und Nunes Amaral 2005) vorgeschlagenen Originaldefinition (vgl. 1.5.4).

2.6 Metaproteomuntersuchungen

Im Folgenden werden alle methodischen Schritte der Metaproteomanalysen näher beschrieben. Alle Schritte fanden soweit möglich unter aseptischen Bedingungen statt. Alle verwendeten Chemikalien waren vorher durch Autoklavieren oder Sterilfiltration (0,2 µm) sterilisiert worden. Für alle BPs wurden jeweils fünf biologische Replikate aus einer Probennahme erstellt.

2.6.1 Proteinextraktion

Die Extraktion erfolgte nach Heyer et al. (Heyer et al. 2013) mit einigen Modifikationen. Die Einwaage von 500 mg Probe wurde mit 300 µL 2M Saccharoselösung, ca. 1 g Zirkonia-Beads sowie 800 µL Aqua-Phenol versetzt. Die mechanische Zellyse erfolgte für 2 min bei Raumtemperatur und 5 m/s in der FastPrep-24[®]. Die Phasentrennung fand durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 min bei Raumtemperatur statt. Dann wurden 333 µL der oberen, proteinhaltigen Phenolphase abgenommen und das gleiche Volumen 1 M Saccharoselösung zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 min wurden 150 µL des Phenolüberstandes abgenommen und mit dem fünffachen Volumen 0,1M Ammoniumacetatlösung versetzt. Die Proteinpräzipitation erfolgte durch Inkubation der Proben für 1 h bei -20°C. Im Anschluss wurden die Proben für 20 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert und das Proteinpellet je zweimal mit 500 µL 80%-igem Aceton und 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Inkubation für 15 min bei -20°C und eine anschließende Zentrifugation mit 12.000 x g

bei 4°C für 15 min. Die gewaschenen Proteinpellets wurden anschließend in 500 µL Resuspendierlösung gelöst und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.6.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Extrakte wurden mittels Amidoschwarz-Assay nach Schweikl et al. (Schweikl et al. 1989) mit leichten Modifikationen bestimmt. Dazu wurden zu 25 µL des jeweiligen Proteinextraktes 150 µL Amidoschwarz-Färbelösung zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 250 µL Waschlösung zum Pellet gegeben. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zentrifugation bei gleichen Bedingungen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das finale Proteinpellet wurde in 0,1 M Natronlauge gelöst. Die Konzentration der Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 615 nm bestimmt. Für die Erstellung der Kalibrationsgeraden wurden frisch angesetzte BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 200 µg/mL bis 2.400 µg/mL (in Schritten von je 200 µg/mL) an den jeweiligen Versuchstagen mitgeführt.

Nach Messung aller Konzentrationen wurde jede Probe auf eine identische Proteinkonzentration gebracht. Dazu wurde von jeder Probe jeweils das Volumen, welches einer Gesamtmenge von 50 µg Protein entsprach entnommen, die Proteine mit dem fünffachen Volumen Ammoniumacetat für 1 h bei -20°C gefällt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 20 min pelletiert und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes für ca. 1 h in der SpeedVac getrocknet. Durch Resuspendieren der Pellets in je 50 µL Resuspendierlösung hatte jede Probe eine einheitliche Konzentration von 1 µg/µL.

2.6.3 SDS-Page und tryptischer Proteinverdau

Die Aufreinigung der Proteinextrakte erfolgte mittels SDS-Page. Das Gel setzte sich aus einem 4 %-igen Sammelgel und einem 12 %-igen Trenngel zusammen (**Tabelle 10**). Jeweils 50 µL jeder Probe wurden mit 17 µL Roti-Load® 1 gemischt und bei 95°C für zwei Minuten inkubiert. Anschließend wurden 26,8 µL µg jeder Probe (\triangleq

20 µg Protein) auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Aufreinigung erfolgte für sieben Minuten bei einer Spannung von 200 V. Die Gele wurden mit Rotiphorese® Brilliant Blau für 45 min bei 20 rpm im Wippschüttler gefärbt und anschließend zweimal mit H₂O_{dest.} gewaschen. Überschüssiges Färbemittel wurde durch Inkubation über Nacht in Entfärbelösung entfernt. Die Visualisierung der Gele erfolgte mit dem Molecular Imager® Gel Doc™ XR+.

Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele

Komponente	Volumen pro Trenngel [µL]	Volumen pro Sammelgel [µL]
30 % Acrylamid-Mischung	2.000	267
Tris (1,5 M, pH 8,8)	1.250	-
Tris (1 M, pH 6,8)	-	250
10 %-ige SDS-Lösung	50	20
10 %-ige APS-Lösung	50	20
TEMED	5	2
H ₂ O _{dest.}	1.645	1.441
Gesamtvolumen	5000	2000

Anschließend wurde die Proteinbande jeder Probe in einem ca. 1 cm langen Stück des Gels ausgeschnitten, in sechs bis acht kleinere Stücke zerkleinert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Gel wurde durch Zugabe von 200 µL Waschlösung mit anschließender Inkubation für 30 min bei 35°C bei 1400 rpm entfärbt. Dieser Entfärbeschritt wurde zweimal wiederholt. Der tryptische Verdau erfolgte nach leicht modifiziertem Protokoll von Shevchenko et al. (Shevchenko et al. 1996). Die Gelstücke wurden durch Zugabe von 200 µL 100 % Acetonitril (ACN) und fünfminütiger Inkubation bei 1400 rpm dehydriert. Das überschüssige ACN wurde verworfen und die Gelstücke in der SpeedVac getrocknet. Die Cysteine wurden durch 30-minütige Inkubation in 60 µL DTT-Lösung bei 1.400 rpm reduziert. Im Anschluss wurden die

reduzierten Cysteine durch Zugabe von 60 μL Iodacetamidlösung (IAA), gefolgt von einer Inkubation bei 1.400 rpm im Dunkeln, alkyliert. Die im Reaktionsgefäß verbleibende IAA-Lösung wurde abgenommen und verworfen und die Gelstücke mit Acetonitril dehydriert. Das überschüssige Acetonitril wurde verworfen und die Gelstücke mit 200 μL Ammoniumbicarbonatlösung (Ambic) rehydriert. Anschließend erfolgte eine erneute Dehydrierung mit Acetonitril und eine vollständige Trocknung in der SpeedVac. Die getrockneten Gelstücke quollen anschließend für 5 min in 20 μL Trypsin-Lösung (entspricht einem Verhältnis von Trypsin zu Protein von 1:50). Dann wurden ca. 100 μL 10 mM Ambic zugegeben, so dass die Gelstücke vollständig bedeckt waren. Die proteolytische Spaltung erfolgte über Nacht bei 37°C. Durch Zugabe von 5 μL 10%-iger Ameisensäure wurde der Proteinverdau gestoppt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die im Gel verbleibenden Peptide zu extrahieren wurden 75 μL Extraktionspuffer auf das im Reaktionsgefäß verbleibende Gel gegeben und für 20 min bei 1.400 rpm inkubiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt und alle Überstände vereint. Die gesammelten Überstände wurden anschließend in der SpeedVac für 90 min bei 35 °C vollständig eingengt und das verbleibende Proteinpellet mittels C18-ZipTip-Spitzen nach Herstellerangaben entsalzt.

2.6.4 NanoLC-MS/MS-Messungen

Die Proteinpellets wurden in 0,1 % (v/v) Ameisensäure gelöst. Zur Vorreinigung der Peptid-Lysate wurden je 5 μL für 5 min auf die Vorsäule (μ -Precolumn, Acclaim PepMap, innerer Durchmesser 75 μm , 2 cm, C18, Thermo Scientific) geladen. Die mobile Phase bestand dabei aus 4 % mobile Phase B (80 % (v/v) Acetonitril in Nanopure-Wasser mit 0,08 % (v/v) Ameisensäure) und 96 % (v/v) mobile Phase A (Nanopure Wasser mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure). Die chromatographische Trennung der Lysate erfolgte auf einer PepMap Acclaim C18 LC Säule (Länge 25 cm, 3 μm Partikelgröße, Thermo Scientific) über einen 150-minütigen linearen Gradienten von mobiler Phase B (4 – 55 % (v/v)). Die massenspektrometrische Analyse der chromatographisch aufgetrennten Peptidfraktionen erfolgte auf einem Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in Anlehnung an Starke et al. 2017

(Starke et al. 2017). Zur chipbasierten Electrospray-Ionisation wurde ein TriVersa NanoMate (Advion, Ltd., Harlow, Großbritannien) verwendet. Die genauen Einstellungen des Massenspektrometers können der Veröffentlichung (Buettner et al. 2019) entnommen werden. Zur Proteinidentifikation wurde die Software Proteome Discoverer (v2.2, Thermo Scientific) verwendet. Zum Proteinabgleich gegen die Uniprot-Datenbank aller Bakterien und Archaeen (Stand 08/2018) wurde der Suchalgorithmus Sequest HT (Eng et al. 1994) genutzt. Als Enzymspezifität wurde Trypsin gewählt, die maximal erlaubte Peptidion-Toleranz war 10 ppm und die Massentoleranz 0,05 Da MS/MS. Mögliche Modifikationen waren Oxidationen bei Methionin und die Carbamidomethylierung von Cystein. Nur Peptide mit einer mit dem Algorithmus Percolator (Käll et al. 2007) berechneten False-Discovery-Rate kleiner 1 % wurden als identifiziert betrachtet. Die Proteine wurden nach dem strikten Parsimonie-Prinzip gruppiert. Die Proteinabundanzen wurden mit dem im Proteome Discoverer integrierten TOP3-Ansatz berechnet.

Aufgrund der nötigen Geräteausstattung und Rechenkapazitäten wurden die in diesem Absatz beschriebenen nanoLC-MS/MS-Messungen und Auswertungen von Dr. Nico Jehmlich am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) Leipzig durchgeführt.

2.6.5 Auswertung der Metaproteomdatensätze

Aufgrund der Erkenntnisse aus der statistischen Auswertung der 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierungsdatensätze und der höheren wirtschaftlichen Relevanz von Biogasanlagen wurden die Metaproteomanalysen ausschließlich für die 16 bereits beprobten BPs durchgeführt. Zur Validierung der durchgeführten Methodik wurden für jede beprobte Biogasanlage fünf biologische Replikate erstellt und analysiert. Die verschiedenen Schritte der Auswertung der generierten Metaproteomdatensätze werden im Folgenden näher beschrieben.

2.6.5.1 Vergleich der Anlagen hinsichtlich ihrer Proteinprofile

Alle Proteine, die nicht in mindestens drei der fünf Replikate einer Anlage vorkamen, wurden verworfen. Die Rohintensitäten wurden anschließend median-normalisiert, um die unterschiedlichen Läufe miteinander vergleichbar zu machen. Die median-normalisierten Intensitäten wurden \log_2 -transformiert, um eine Normalverteilung der Proteinintensitäten zu erreichen. Anschließend wurden die Proteinintensitäten auf verschiedenen Ebenen (Proteine, Spezies, Funktion) zusammengefasst. Für jede dieser Ebenen wurde im Anschluss eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) mit dem R-Package FactoMineR (Lê et al. 2008) durchgeführt. Für alle Proben wurden die Koordinaten in den ersten drei Dimensionen extrahiert und die dreidimensionale euklidische Distanz berechnet. Diese Distanzen wurden für eine hierarchische Clusteranalyse mit dem R-Package *hclust* unter Verwendung des Algorithmus Ward.D2 genutzt. Die Clusterzuordnung erfolgte auf Basis der Höhe 50 in den jeweiligen Dendrogrammen.

2.6.5.2 Proteinmapping

Für die funktionelle Zuordnung der einzelnen Proteine wurde die Datenbank Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes genutzt (KEGG, Stand 02/2019) (Kanehisa et al. 2017). Anhand der mittels Uniprot-Datenbank zugeordneten Protein-Accessions bzw. EC-Nummern wurden den einzelnen Proteinen sowohl molekulare Funktionen (KEGG Orthology, KO) als auch die entsprechenden Stoffwechselwege zugeordnet.

2.6.5.3 Bestimmung des dominanten Methanogenesewegs

Anhand ihres Proteinprofils sollte den einzelnen Anlagen der entsprechende dominante Methanogeneseweg zugeordnet werden. Dazu wurden die median-zentrierten Proteinintensitäten in relative Abundanzen umgerechnet. Anhand der in der KEGG-Datenbank (Stand 02/2019) vorhandenen Module (Modul 00567: HyMe, Modul 00357: AcMe, Modul 00356: Methanogenese aus Methanol) wurden die Abundanzen der Proteine, die spezifisch für einen der genannten Methanogenesewege sind, summiert.

Anschließend wurde ein Faktor F berechnet:

$$F = \frac{\text{Summe der für die acetoklastische Methanogenese spezifischen Proteine}}{\text{Summe der für die hydrogenotrophe Methanogenese spezifischen Proteine}}$$

Für alle Replikate, für die $F \geq 2,5$ war, wurde AcMe als Hauptmethanogeneseweg angenommen. Hatten die Replikate $F \leq 0,4$ wurde überwiegend hydrogenotrophe Methanogenese vermutet. Für alle Replikate mit $F > 0,4$ und $F < 2,5$ wurde angenommen, dass eine Mischung aus beiden Methanogenesewegen vorlag.

In Abhängigkeit der F-Werte wurden die BPs in die drei Gruppen AcMe, HyMe und BoMe eingeteilt. Stimmt die Ergebnisse nicht für alle Replikate überein, so wurde die Anlage entsprechend der Mehrheit der Replikate eingeteilt.

2.6.5.4 Signifikanter Einfluss von Umweltparametern

Die Analysen der Einflüsse der Umweltparameter auf die Proteinexpression erfolgten analog zu denen auf 16S rRNA Gen Ebene (vgl. 2.5.5.5), allerdings wurde keine Trennung in bakterielle und archaelle Proteine vorgenommen. Um die Datenkomplexität bei den Korrelationsanalysen zu verringern, wurden auf jeder Ebene nur Einträge mit einer minimalen durchschnittlichen relativen Abundanz von 0,1 % berücksichtigt. Aufgrund der Datenkomplexität wurde das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,01$ festgelegt.

2.6.5.5 Korrelation der relativen Abundanz mit der funktionellen Redundanz

Für jeden Methanogeneseweg wurden die Ränge der mittleren relativen Abundanzen und die Anzahl an Proteinen für jeden KO-Term ermittelt. Mit dem R-package *stats* wurde anschließend der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient und der zugehörige p-Wert berechnet.

2.6.5.6 Netzwerkberechnungen

In Abhängigkeit des dominanten Methanogenesewegs wurden drei Netzwerke (AcMe, HyMe, BoMe) berechnet. Als Ausgangsdaten wurden die auf Speziesebene

zusammengefassten relativen Proteinabundanzen genutzt. Zur robusteren Netzwerkberechnung wurden keine Mittelwerte für jede Anlage berechnet, sondern jeweils alle Replikate einer Anlage genutzt. Für die Berechnung von AcMe wurden 25, für HyMe 40 und für BoMe 15 Replikate genutzt. Für die Berechnung wurde die Cytoscape-App CoNet (vgl. 1.5.3.2) verwendet. Es wurden nur Spezies berücksichtigt, die in mind. 60 % der jeweiligen Proben (AcMe: 15, HyMe: 24, BoMe: 9 Replikate) detektiert wurden. Als Korrelationen wurden die Pearson-, Kendall- und Spearman-Korrelation gewählt. Zusätzlich wurden auch die Bray-Curtis- und Kullback-Leibler-Dissimilaritäten genutzt. Der Threshold wurde auf TOP2500 (Top and Bottom) gesetzt, so dass jede Korrelationsmethode und jede Dissimilarität mit 2.500 positiven und 2.500 negativen Kanten im initialen Netzwerk vertreten war. Das *min_support*-Argument wurde auf drei gesetzt, so dass nur Kanten die von mind. drei der fünf gewählten Methoden unterstützt wurden, bei der Signifikanzberechnung berücksichtigt wurden. Die statistische Signifikanz der Kanten wurde sowohl durch Permutation, als auch durch Bootstrap mit jeweils 1.000 Wiederholungen sichergestellt. Die methodenspezifischen p-Werte wurden mit der Methode nach Brown (Brown 1975) zusammengeführt und nach Benjamini und Hochberg korrigiert (Benjamini und Hochberg 1995). Für die Einteilung der Knoten in Module wurde der in CoNet integrierte GLay-Algorithmus (Su et al. 2010) verwendet. Die Berechnung der zugehörigen Z- und P-Werte erfolgte mit einem eigens programmierten Excel-Sheet nach den bereits beschriebenen Formeln (vgl. 1.5.4). Die Knoten repräsentieren in den jeweiligen Netzwerken die verschiedenen Spezies.

2.7 Verfügbarkeit der generierten Datensätze

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Datensätze wurden archiviert. Die 16S rRNA Gensequenzen aller Anlagen sind im NCBI Short Read Archive unter der Accession-Nummer SRP126305 verfügbar. Die Proteomdatensätze aus dieser Arbeit sind im PRIDE-Archiv unter der Kennung PXD014605 abrufbar.

3 Ergebnisse

Nach Erfassung der Prozessparameter (vgl. 3.1) wurden die vorliegenden mikrobiellen Gemeinschaften in beiden Anlagentypen durch 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung verglichen (3.2). Die 16 Biogasanlagen wurden außerdem funktionell charakterisiert und Schlüsselmikroorganismen der verschiedenen Prozesse der AD identifiziert (3.3).

3.1 Prozessparameter der beprobten Anlagen

Um den Einfluss von definierten Prozessparametern (vgl. 2.4) auf die mikrobielle Gemeinschaft testen zu können, wurden diese für beide Anlagentypen erfasst. Weiterhin erlaubten Korrelationsanalysen (vgl. 3.2.5) von Prozessparametern und der mikrobiellen Gemeinschaft die Spezifizierung dieses Einflusses auf definierte taxonomische Einheiten.

3.1.1 Biogasanlagenparameter

Die beprobten Biogasanlagen verwendeten größtenteils landwirtschaftliche Substrate wie Maissilage, Rindergülle oder Getreidesilage als Substrat (**Tabelle 11**). Eine Ausnahme war BP16, in der ausschließlich Speisereste als Substrat eingesetzt wurden. In BP05 wurden hohe Anteile an Trockenkot mittels Trockenfermentation vergoren, alle anderen Anlagen nutzten die Nassfermentation. Zwei Anlagen waren thermophil, der Rest nutzte mesophile Prozesstemperaturen (**Tabelle 11**). Das Verhältnis FOS/TAC lag bei den meisten Anlagen im Normalbereich ($\leq 0,30$), lediglich bei BP10, BP12 und BP16 wurde deutlich erhöhte FOS/TAC-Verhältnisse beobachtet. Bei BP10 und BP12 wurden dementsprechend erhöhte Konzentrationen an Essig- und Propionsäure, bei BP16 zusätzlich von iso-Buttersäure und iso-Valeriansäure gemessen.

Tabelle 11: Detaillierte Übersicht der Prozessparameter in den Biogasanlagen

Anlagen	BP01	BP02	BP03	BP04	BP05	BP06	BP07	BP08	BP09	BP10	BP11	BP12	BP13	BP14	BP15	BP16
pH	7.5	7.6	7.7	7.7	7.9	8	7.9	7.7	7.8	8.1	7.8	7.7	7.7	7.7	8	7.5
Prozesstemperatur [°C]	38	38	42	42	42	43	43	43	45	45	45	45	45	45	54	60
Rindergülle	83	78	85	32	0	0	30	30	65	35	35	40	30	45	48	0
Maissilage	1	0	0	44	35	80	35	35	25	20	55	35	40	35	32	0
Grassilage	0	0	0	16	28	0	15	15	10	0	5	15	20	10	2	0
Getreide	0	0	15	6	2	20	20	20	0	45	5	5	10	10	15	0
Trockenkot	6	0	0	2	35	0	0	0	0	0	0	5	0	0	3	0
Speisereste	10	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
Fermentationstyp	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	trocken	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig
FOS [mg/L]	462 ± 56	489 ± 50	571 ± 1	1.819 ± 313	792 ± 44	1.395 ± 96	1.374 ± 36	1.468 ± 80	636 ± 2	3.754 ± 353	996 ± 2	2.780 ± 163	1.370 ± 137	820 ± 137	1.531 ± 32	7837 ± 50
FOS/TAC	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.33 ± 0.07	0.16 ± 0.0	0.16 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.55 ± 0.02	0.16 ± 0.00	0.49 ± 0.05	0.19 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.26 ± 0.00	1.44 ± 0.03
Essigsäure	<55	<55	338	1261	307	58	683	557	63	1847	494	2064	348	225	796	1812
Propionsäure	<40	<40	112	153	<40	<40	84	78	<40	3807	<40	1007	364	<40	140	13296
iso-Buttersäure	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	318	<55	302	<55	<55	<55	2338
Buttersäure	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	78
Iso-Valeriansäure	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	90	<40	<40	<40	<40	<40	1311
Valeriansäure	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	162
Hexansäure	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55	<55
Heptansäure	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40
N	3,38 ± 0,17	2,81 ± 0,09	3,12 ± 0,16	3,22 ± 0,07	4,03 ± 0,27	3,34 ± 0,17	2,89 ± 0,02	2,53 ± 0,06	2,36 ± 0,10	2,86 ± 0,03	3,52 ± 0,11	3,08 ± 0,01	3,12 ± 0,21	2,94 ± 0,03	2,81 ± 0,22	2,58 ± 0,20
C	39,67 ± 0,46	39,82 ± 0,46	39,94 ± 1,66	43,44 ± 1,01	43,72 ± 0,35	42,17 ± 1,17	40,05 ± 0,71	39,55 ± 0,66	40,03 ± 0,87	43,75 ± 0,22	42,94 ± 0,87	42,27 ± 0,37	41,81 ± 1,08	39,51 ± 0,26	41,94 ± 0,55	38,19 ± 0,18
S	0,68 ± 0,01	0,73 ± 0,04	0,59 ± 0,10	0,52 ± 0,02	0,69 ± 0,14	0,52 ± 0,02	0,58 ± 0,06	0,55 ± 0,04	0,56 ± 0,05	0,49 ± 0,02	0,60 ± 0,02	0,54 ± 0,05	0,51 ± 0,04	0,45 ± 0,01	0,58 ± 0,04	0,42 ± 0,05
C/N	11,76 ± 0,56	14,17 ± 0,28	12,8 ± 0,59	13,5 ± 0,36	10,88 ± 0,68	12,64 ± 0,35	13,83 ± 0,34	15,64 ± 0,26	16,99 ± 0,78	15,31 ± 0,12	12,21 ± 0,42	13,72 ± 0,11	13,45 ± 0,66	13,42 ± 0,15	14,97 ± 1,36	14,88 ± 1,18

3.1.2 Kläranlagenparameter

Die beprobten, kommunalen Kläranlagen waren für 25.000 bis 300.000 Einwohner ausgelegt (**Tabelle 12**). In einigen Anlagen wurde neben dem kommunalen Abwasser auch Abwasser von angeschlossenen Industrien wie der Textilindustrie und Lebensmittelindustrie behandelt. Die Faultürme aller Anlagen wurden im mesophilen Bereich betrieben und alle bis auf STP03 kontinuierlich durchmischt. In den meisten Anlagen wurde das Substrat vorher mechanisch oder enzymatisch aufgeschlossen.

Tabelle 12: Detaillierte Aufschlüsselung der Prozessparameter in den Kläranlagen

Anlage	Kapazität [EGW]	Angeschlossene Industrien*	pH	Temp. [°C]	CSB ⁺ [mg/L]	BSB ₅ ⁺ [mg/L]	SRT [d]	Substrat-behandlung	STY [#]	Durchmischung
STP01	30.000	1	7,00	35	20	3	33-35	mechanisch	0.16	kontinuierlich
STP02	40.000	1	7,00	36	350	100	45	mechanisch	0.25	kontinuierlich
STP03	62.500	1,2	7,00	37	45	20	60	enzymatisch	0.20	diskontinuierlich
STP04	300.000	1, 4, 5	7,05	35	18	2	28	enzymatisch	0.27	kontinuierlich
STP05	25.000	1	7,10	37	467	224	100	mechanisch	0.26	kontinuierlich
STP06	300.000	1, 3, 4, 5	7,20	41	752	437	33	enzymatisch	0.64	kontinuierlich
STP07	220.000	1, 3, 4, 5	7,25	40	890	440	18-21	Ultraschall	0.80	kontinuierlich
STP08	90.000	1	7,30	37	654	394	44	mechanisch und enzymatisch	0.28	kontinuierlich
STP09	35.000	1	7,50	37	365	212	55-60	mechanisch	0.27	kontinuierlich
STP10	290.000	1, 2, 3, 4	7,65	39	618	305	21	-	1.00	kontinuierlich

*1: Kommunale Abfälle/Abwasser 2: Textilindustrie 3: Lebensmittelindustrie 4: Brauereien 5: Schlachtabfälle

[#]Space-Time-Yield [m³ Biogas/m³ Fermentervolumen/Tag]

^{*}Chemischer bzw. Biologischer Sauerstoffbedarf

3.2 Mikrobielle Gemeinschaften in Biogas- und Kläranlagen

Zur Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogas- und Kläranlagen, wurden 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierungen durchgeführt, um einen Vergleich von Diversität und Evenness in beiden Anlagentypen (3.2.1) als auch der anlagenspezifischen mikrobiellen Gemeinschaften (3.2.2) zu realisieren. Für beide Anlagentypen wurden Kernmikrobiome identifiziert (3.2.3), die Varianz zwischen den einzelnen Anlagen analysiert (3.2.4) und die Abhängigkeit der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft von den Prozessparametern näher charakterisiert (3.2.5). Netzwerkanalysen ermöglichten Aussagen über die Abhängigkeit der Interaktionsmuster vom Anlagentyp (3.2.6).

3.2.1 Beschreibung der Biodiversität

Die DNA-Sequenzierung der 16 BPs und 10 STPs lieferte 11.688.311 verwertbare Sequenzen, die 1.113 bakteriellen bzw. 39 archaellen OTUs zugeordnet werden konnten (**Tabelle A01**). Alle bakteriellen OTUs wurden mit wenigen Ausnahmen (vier OTUs nur in BPs und ein OTU nur in STPs) in beiden Anlagentypen gefunden. Alle 39 archaellen OTUs wurden sowohl in BPs als auch STPs gefunden. Das Erreichen einer Plateauphase bei allen SACs bestätigte eine ausreichende Sequenziertiefe für alle Proben.

Die Artenvielfalt (Richness) war in den STPs signifikant höher ($p \leq 0,01$) als in den BPs (**Abbildung 07**). Dies galt für die mittlere Anzahl bakterieller (BPs: 727, STPs: 799) und archaeller OTUs (BPs: 24, STPs: 29). Der durchschnittliche Anteil archaeller Reads war in den STPs ($4,64 \pm 1,84$) signifikant ($p \leq 0,0001$) höher als in den BPs ($1,19 \pm 1,60$). Die Abschätzung der Richness mittels dem Chao1- als auch dem ACE-Richness-Estimator hingegen unterschied sich nicht signifikant zwischen den Anlagentypen.

Die mikrobielle Diversität in den STPs war signifikant höher als in den BPs (**Abbildung 07**). Der Shannon-Diversitätsindex war für die BPs im Mittel bei $3,719 \pm 0,667$ und für die STPs bei $4,683 \pm 0,203$ (**Tabelle A02**). Die BPs konnten, im Gegensatz zu den STPs, anhand des Shannon-Index in drei Gruppen eingeteilt werden, die sich in ihrer Diversität unterschieden. Die Gruppen beinhalteten BPs mit

hoher Diversität (Shannon-Index > 4 : BP01-05), mittlerer (> 3 und < 4 : BP06-BP14) und geringer Diversität (< 3 : BP15 und BP16). Beim Simpson-Index (1-D) waren die Werte der STPs ($0,974 \pm 0,012$) ebenfalls signifikant höher als bei den BPs ($0,915 \pm 0,055$).

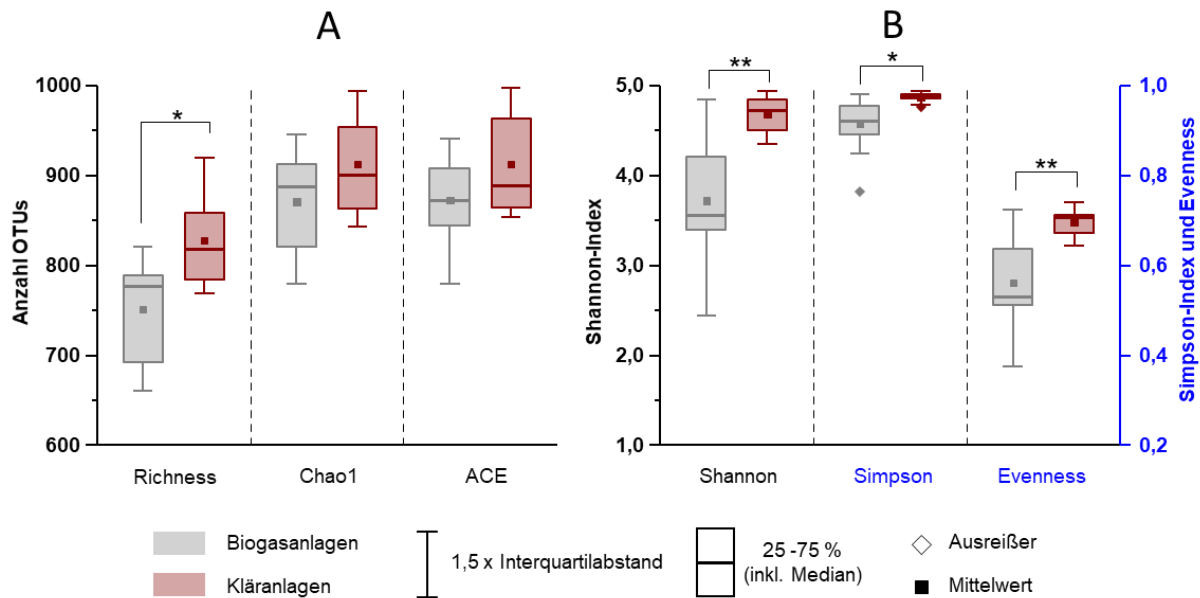


Abbildung 07: Vergleich ökologischer Indizes für BPs und STPs

Dargestellt sind sowohl die Richness und die Richness-Estimator Chao1 und ACE (A), als auch die Shannon- und Simpson-Diversitätsindices sowie die Evenness (B). Für die Testung auf signifikante Unterschiede wurden die Signifikanzniveaus auf $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ festgelegt.

Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in den STPs war im Vergleich zu den BPs durch eine gleichmäßigere Abundanzverteilung der OTUs gekennzeichnet. Die durchschnittliche Evenness in STPs ($0,697 \pm 0,031$) war dementsprechend signifikant höher als in den BPs ($0,561 \pm 0,098$). Bei BP16 führte die stark ausgeprägte Dominanz weniger Mikroorganismen zu einer im Vergleich zu allen anderen Anlagen niedrigen Evenness von 0,375 (Tabelle A02).

3.2.2 Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogas- und Kläranlagen

Beim Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaften in BPs und STPs mittels Bray-Curtis-Similarity wurden deutliche Unterschiede bei der taxonomischen Zusammensetzung auf OTU-Ebene festgestellt (Abbildung 08). BPs und STPs trennten sich in jeweils eigene Cluster. Insgesamt waren die Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften bei den STPs größer, weshalb keine Bildung von offensichtlichen Sub-Clustern beobachtet werden konnte. Aufgrund der hohen

Ähnlichkeit der mikrobiellen Gemeinschaften in einzelnen Anlagen konnten bei den BPs Sub-Cluster (z.B. BP06-BP14 oder BP04 und BP05) identifiziert werden.

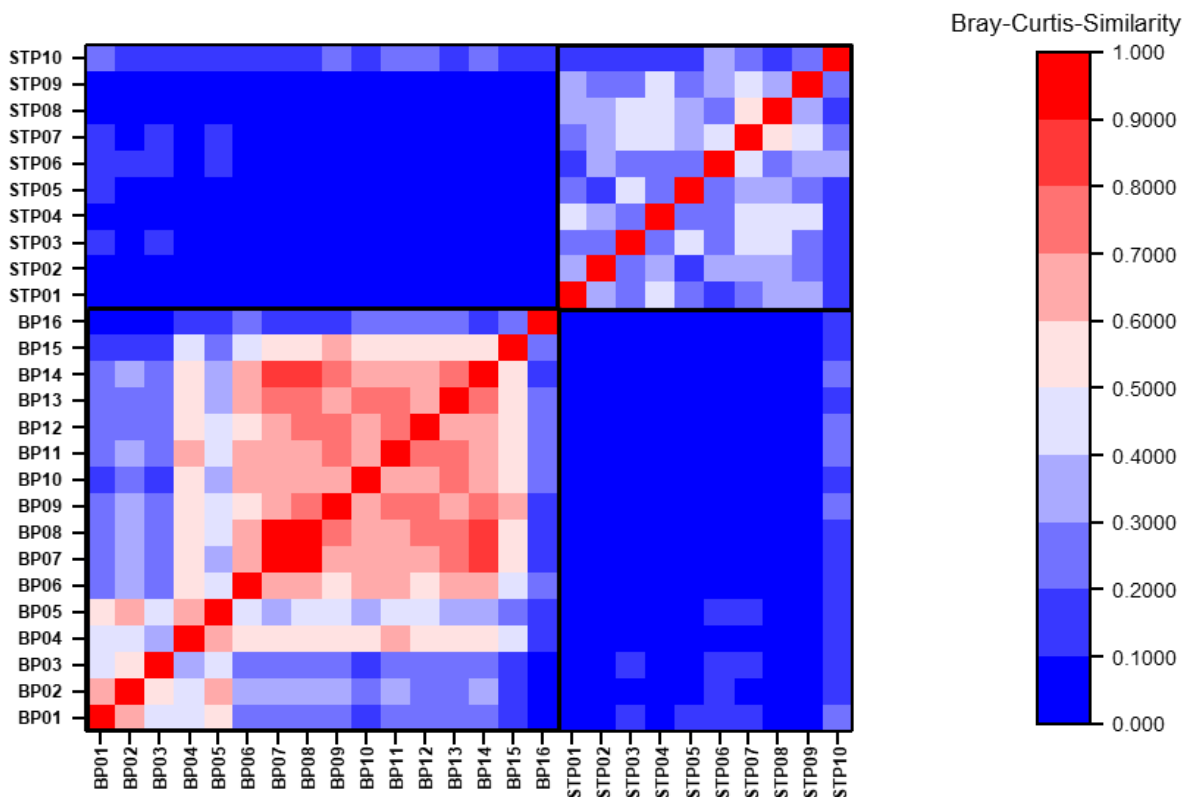


Abbildung 08: Heatmap der Bray-Curtis-Similarity für BPs und STPs (übernommen aus Buettner und Noll 2018a).

Für eine bessere Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Anlagentypen wurden zur Berechnung die ungefilterten, absoluten Abundanzdaten jeder Anlage verwendet. Eine dunkelblaue Farbe steht für eine geringe Ähnlichkeit (=0), eine tiefrote Farbe für eine hohe Ähnlichkeit (=1).

3.2.3 Kernmikrobiome von Biogas- und Kläranlagen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Zusammensetzung der Kernmikrobiome für BPs und STPs gibt. Als Kernmikrobiom wurden in dieser Arbeit die OTUs definiert, die in allen Anlagen des jeweiligen Anlagentyps (BPs: 3.2.3.1; STPs: 3.2.3.2) gefunden wurden. Anschließend wurde aus beiden Kernmikrobiomen ein gemeinsames Kernmikrobiom erstellt und näher charakterisiert (vgl. 3.2.3.3)

3.2.3.1 Das Kernmikrobiom in Biogasanlagen

In den Biogasanlagen bildeten 229 bakterielle OTUs (entspricht ca. 20 % aller gefundenen OTUs) das Kernmikrobiom (**Abbildung 09A**). Der Großteil der OTUs des Kernmikrobioms gehörten den Familien *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae* und unbekannten Familien der Ordnungen *Clostridiales*, *Bacteroidales* und *MBA08* an.

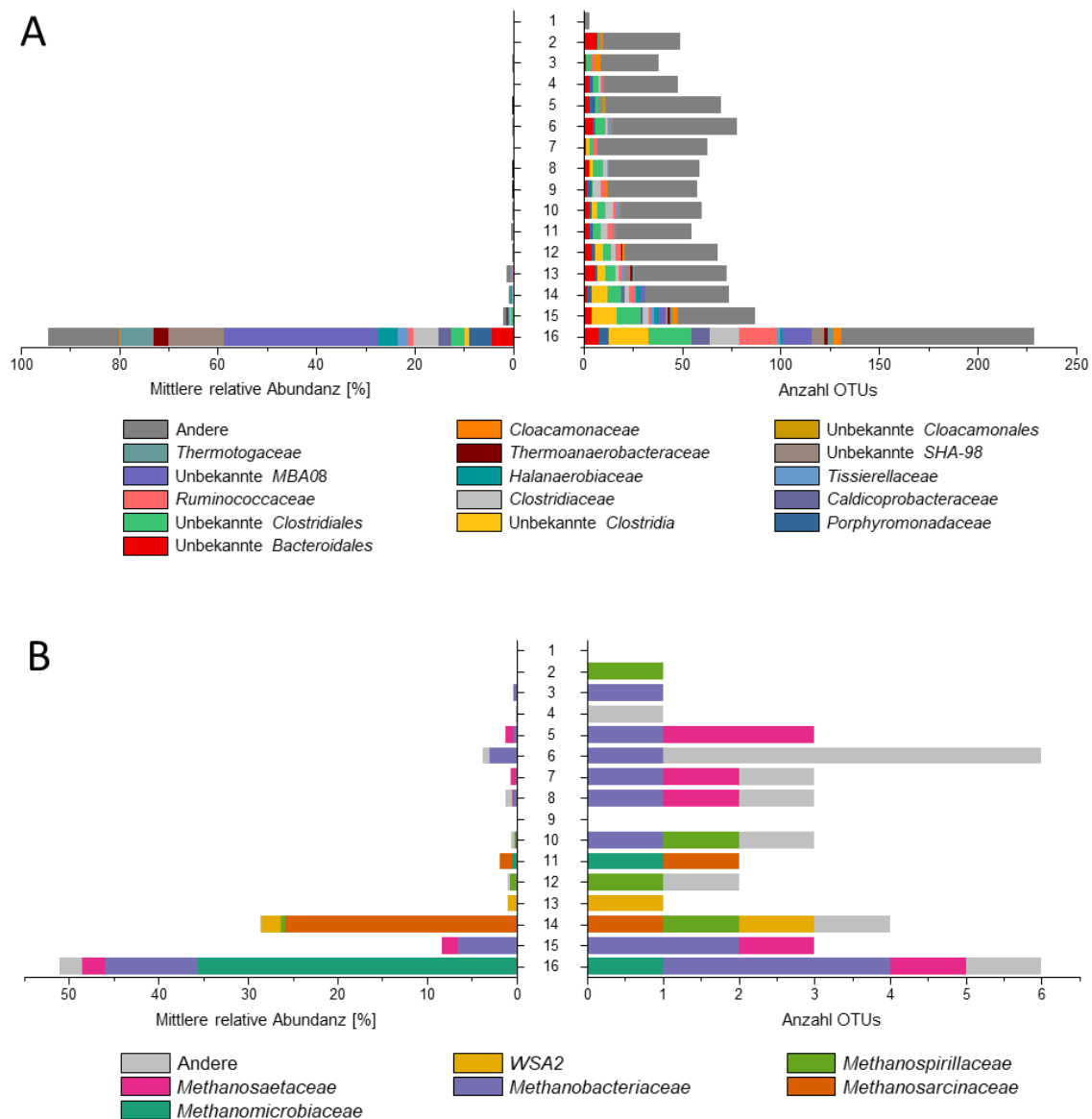


Abbildung 09: Kernmikrobiom von Biogasanlagen

Es wurden Kernmikrobiome für die bakterielle Gemeinschaft (A) und archaelle Gemeinschaft (B) identifiziert. Die Abbildung berücksichtigt sowohl die Anzahl an OTUs (rechts), als auch deren über alle Anlagen gemittelte, relative Abundanz (links). Eine ausführliche Übersicht der genauen Zusammensetzung der Kernmikrobiome findet sich im Anhang (**Tabelle AE01**).

Die OTUs des Kernmikrobioms dominierten die mikrobiellen Gemeinschaften und waren für >94 % der Gesamtabundanz verantwortlich. Besonders abundant im Vergleich zu ihrer Häufigkeit waren OTUs der Ordnungen *MBA08*, *SHA-98* und der Familie *Thermotogaceae*, wohingegen die auf OTU-Ebene zahlreich vertretenen Familien *Ruminococcaceae*, *Cloacamonaceae*, *Caldicoprobacteraceae* und unbekanntem Vertreter der Ordnung *Clostridiales* nur in niedrigen Abundanzen beobachtet wurden. Das archaelle Kernmikrobiom bestand aus lediglich sechs (ca. 15 %) der 39 in den Biogasanlagen gefundenen OTUs (**Abbildung 09B**). Die Zusammensetzung war im Vergleich zur bakteriellen Gemeinschaft diverser, weshalb die sechs OTUs, die den Familien *Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae* und *Methanosaetaceae* angehörten, im Durchschnitt lediglich einen Anteil von knapp 50 % an der Gesamtabundanz hatten. Auffällig war dabei die Dominanz von OTU0153 (Genus *Methanoculleus*), welcher in den Anlagen durchschnittlich mit einer Abundanz von knapp 35 % gefunden wurde.

3.2.3.2 Das Kernmikrobiom in Kläranlagen

Obwohl die taxonomische Zusammensetzung innerhalb der Kläranlagen sehr divers war (**Abbildung 08**), war die Zahl der OTUs, die in allen Anlagen gefunden wurden, mit 361 (ca. 33 %) im Vergleich zu den Biogasanlagen höher (**Abbildung 10B**). Das STP-Kernmikrobiom wurde im Vergleich zum BP-Kernmikrobiom von anderen OTUs dominiert. Diese gehörten Familien wie *Anaerolinaceae*, *Thermotogaceae* oder unbekanntem Familien der Ordnung *Burkholderiales* an. Der Anteil der Kern-OTUs war im Vergleich zu den BPs mit ca. 70 % geringer. Familien wie *Cloacamonaceae*, *Anaerolinaceae* und unbekanntem Mitglieder der Ordnung *Burkholderiales* hatten den größten Anteil an der Gesamtabundanz, wohingegen Familien wie *MBA08* trotz ihrer hohen Anzahl nur wenig zur Gesamtabundanz beitrugen.

Das archaelle Kernmikrobiom bildeten zehn OTUs, die eine mittlere relative Abundanz von knapp 44 % in den Anlagen hatten (**Abbildung 10B**). Die taxonomische Zusammensetzung des archaellen Kernmikrobiom der STPs unterschied sich von dem der BPs. Neben den auch bei den BPs gefundenen archaellen Familien *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae* und *Methanosaetaceae* enthielt das

Kernmikrobiom in STPs auch OTUs der Familien WSA2. Den größten Anteil an der mittleren Abundanz des Kernmikrobioms hatten die Familien *Methanobacteriaceae* und WSA2.

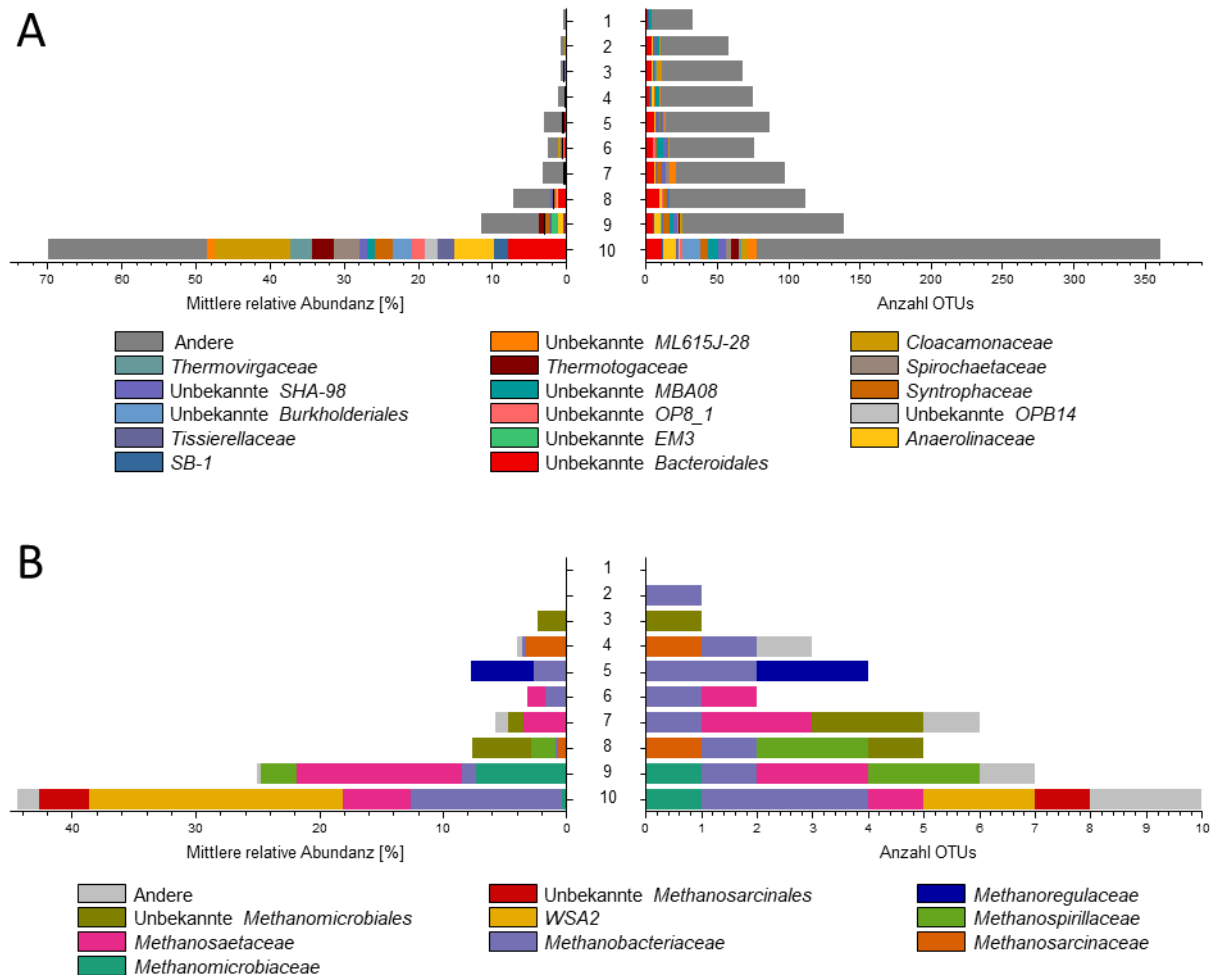


Abbildung 10: Kernmikrobiom von Kläranlagen

Es wurden Kernmikrobiome für die bakterielle Gemeinschaft (A) und archaelle Gemeinschaft (B) identifiziert. Die Abbildung berücksichtigt sowohl die Anzahl an OTUs (rechts), als auch deren über alle Anlagen gemittelte, relative Abundanz (links). Eine ausführliche Übersicht der genauen Zusammensetzung der Kernmikrobiome findet sich im Anhang (**Tabelle AE01**).

3.2.3.3 Gemeinsames Kernmikrobiom für BPs und STPs

Die bakteriellen und archaeellen Kernmikrobiome unterschieden sich in BPs und STPs voneinander (**Tabelle 13**). Das aus beiden anlagenspezifischen Kernmikrobiomen gebildete, gemeinsame Kernmikrobiom für BPs und STPs enthielt 126 bakterielle und drei archaeelle OTUs (**Abbildung 11**).

Tabelle 13: Taxonomische Zusammenfassung der Schlüsselmikroorganismen der Kernmikrobiome von Biogas- und Kläranlagen

Berücksichtigt wurden sowohl die Anzahl der zur Schlüsseltaxonomie zugehörigen OTUs im Kernmikrobiom (Häufigkeit), als auch deren Beitrag zur mittleren relative Abundanz.

Anlagen	Ebene	Bakterien	Archaeen
BPs	Häufigkeit	<i>Ruminococcaceae</i>	
		<i>Clostridiaceae</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>
		Unbekannte <i>Clostridiales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>
		Unbekannte <i>Clostridia</i>	<i>Methanosaetaceae</i>
	Mittlere rel. Abundanz	Unbekannte <i>MBA08</i>	
		<i>Thermotogaceae</i>	
STPs	Häufigkeit	<i>Anaerolinaceae</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>
		<i>Thermotogaceae</i>	WSA2
		Unbekannte <i>Clostridiales</i>	
	Mittlere rel. Abundanz	<i>Anaerolinaceae</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>
		Unbekannte <i>Clostridiales</i>	WSA2
		<i>Cloacamonaceae</i>	

Ausgehend von der mittleren relativen Abundanz in jedem Anlagentyp hatte lediglich eine OTU eine wesentliche Rolle in beiden Anlagentypen. Dies war die archaeelle OTU0164, welche zum Genus *Methanosaeta* gehörte. Weiterhin konnten spezifisch für jeden Anlagentyp abundante OTUs definiert werden. Dazu gehörten bei den STPs bspw. OTU0007 (Genus *W5*) oder OTU0021 (Genus *W22*) und bei den BPs OTU0001 (Ordnung *MBA08*) oder OTU0153 (Genus *Methanoculleus*).

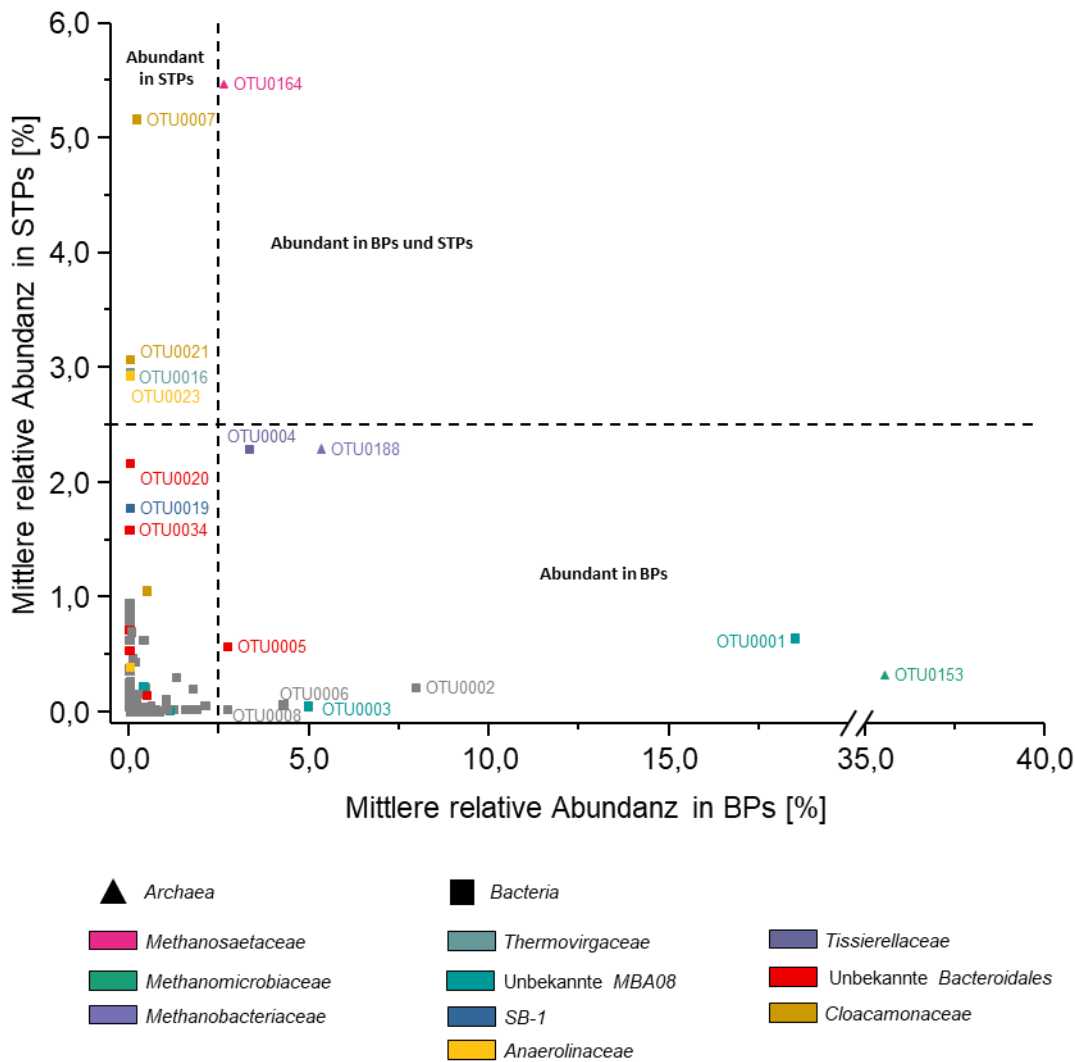


Abbildung 11: Analyse der Zusammensetzung des gemeinsamen Kernmikrobioms für BPs und STPs anhand der mittleren relativen Abundanzen

Als abundante OTUs wurden die OTUs definiert, die in einem oder beiden Anlagentypen mit einer mittleren relativen Abundanz von mind. 2,5 % gefunden wurden.

3.2.4 Die Varianz in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in BPs und STPs

Zunächst wurden Korrespondenzanalysen für die bakteriellen und archaellen Gemeinschaften für jeden Anlagentyp durchgeführt, um die Varianz in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften vergleichen zu können (vgl. 2.5.5.3). Anschließend wurden Cluster von Anlagen mit ähnlichen mikrobiellen Gemeinschaften für BPs (3.2.4.1) und STPs (3.2.4.2) identifiziert.

3.2.4.1 Die Varianz der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen

Auf bakterieller und archaeller Ebene konnten Anlagen mit ähnlichen mikrobiellen Gemeinschaften identifiziert werden (**Abbildung 12**). Die Zusammensetzung der archaellen und bakteriellen Gemeinschaften waren voneinander unabhängig, weshalb die Zusammensetzung der einzelnen Cluster auf beiden Ebenen verschieden war. Auf bakterieller Ebene bildeten sich zwei Cluster mit je zwei Anlagen (C1: BP01, BP03; C2: BP02, BP05) und ein Cluster mit neun Anlagen (C3: BP06-BP14) (**Abbildung 12A**). Die mikrobiellen Gemeinschaften in BP04, BP15 und BP16 hatten spezifische bakterielle Gemeinschaften und konnten keinem Cluster zugeordnet werden.

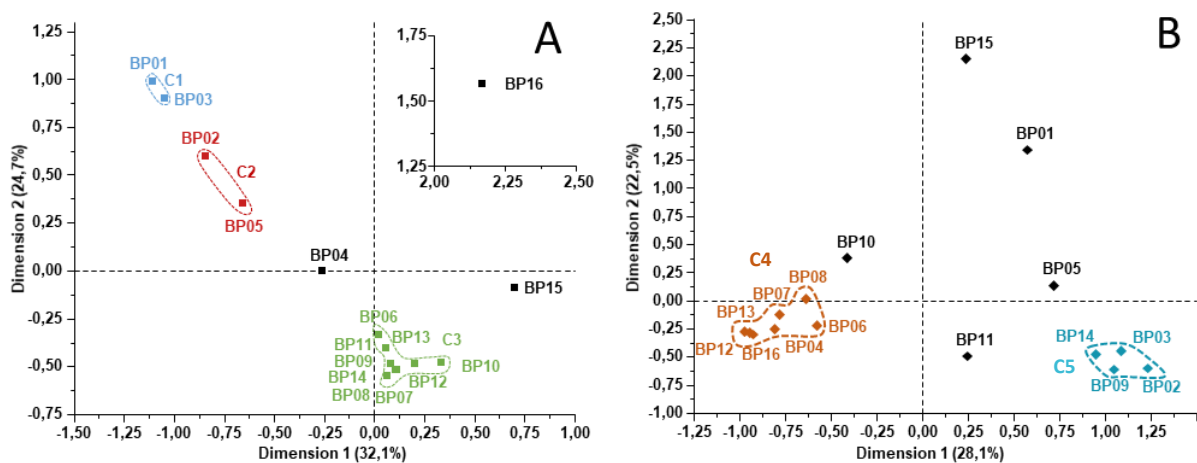


Abbildung 12: Korrespondenzanalyse der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen (modifiziert übernommen aus Buettner und Noll 2018b)

Die Clusterbildung der bakteriellen (A) und archaellen (B) Gemeinschaft erfolgte auf Basis der euklidischen Distanz von 0,6 (vgl. 2.5.5.3). Die einzelnen Cluster sind farblich gekennzeichnet.

In allen Anlagen waren die Familien *Clostridiaceae*, *Tissierellaceae*, *Ruminococcaceae* sowie die Ordnungen *MBA08*, *Bacteroidales* und *SHA-98* dominant (**Abbildung 13A**). Den restlichen Teil der mikrobiellen Gemeinschaft bildeten in C1 vorwiegend *Cloacamonaceae* (BP01) bzw. die Ordnung *Cloacamonales* (BP03). Charakteristisch für C3 waren die im Vergleich zu C1 hohen Abundanzen für *SHA-98*, *Porphyromonadaceae* und *Thermoanaerobacteraceae*. In den beiden thermophilen Anlagen BP15 und BP16 wurden *Thermotogaceae* in hohen Abundanzen gefunden.

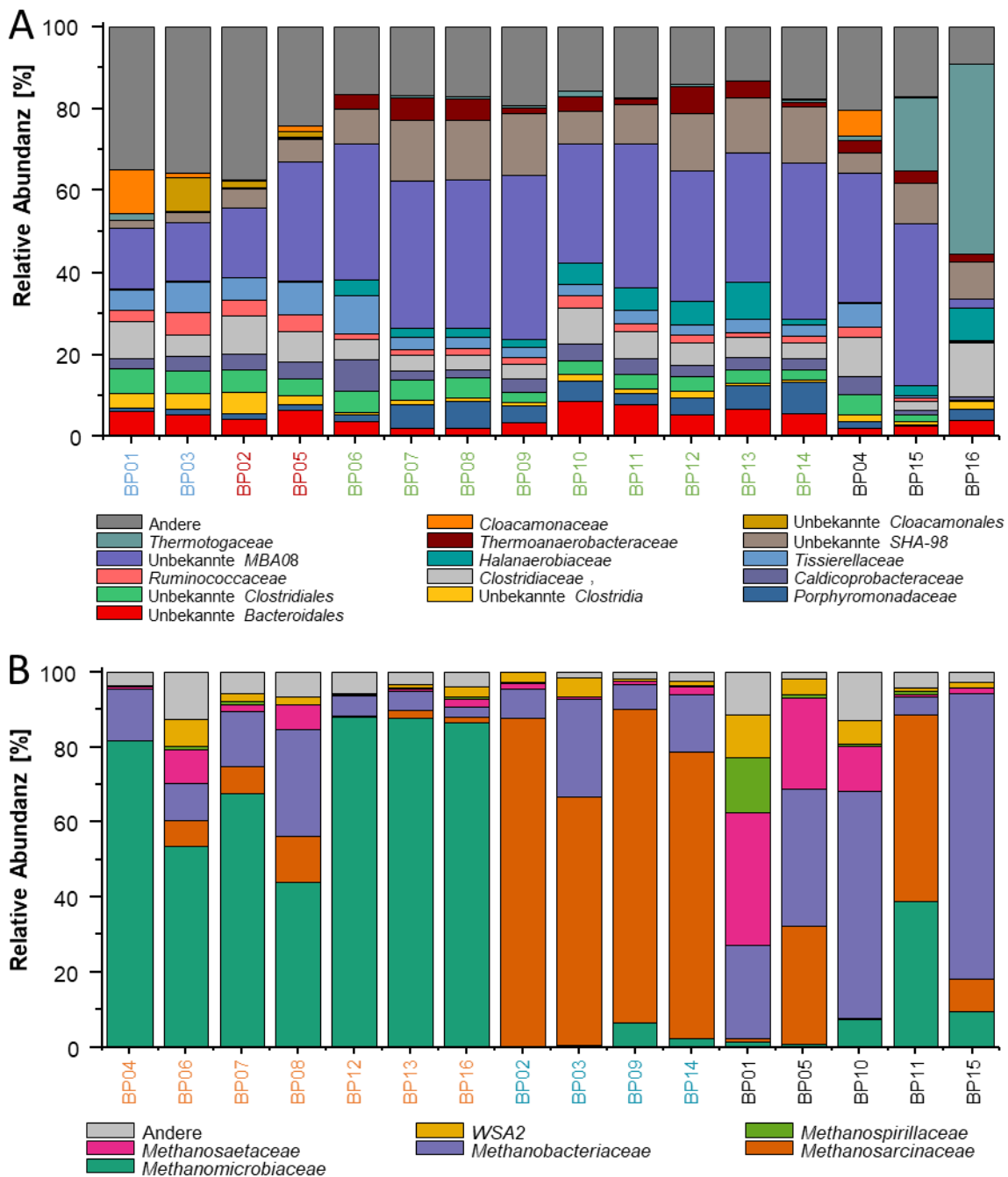


Abbildung 13: Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen auf Basis der Sequenzierung des 16S rRNA Gens

Die Abbildung unterscheidet zwischen der bakteriellen (A) und archaeellen (B) Gemeinschaft. Für die Übersichtlichkeit wurden die verschiedenen Spezies auf Familienebene zusammengefasst. Alle Familien, die in keiner der Anlagen eine relative Abundanz von mind. 5 % (Bakterien) bzw. 10 % (Archaeen) erreicht haben, wurden unter *Andere* zusammengefasst. Die Farbe der Anlagenbeschriftung bezieht sich auf die mittels Korrespondenzanalysen identifizierten Cluster (**Abbildung 12**). Eine detaillierte Übersicht der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften findet sich im Anhang (Tabelle AE02).

Auf archaeller Ebene wurden zwei Cluster identifiziert, welche aus sieben (C4:BP04, BPs06-08, BP12, BP13, BP16) bzw. vier Anlagen bestanden (C5: BP02, BP03, BP09, BP14) (**Abbildung 12B**). Die Anlagen in C4 wurden von Mitgliedern der hydrogenotrophen Familien *Methanomicrobiaceae* und *Methanobacteriaceae* dominiert (**Abbildung 13B**). In den Anlagen von C5 wurden hohe Abundanzen der Familien *Methanosarcinaceae* und *Methanobacteriaceae* detektiert. In den Anlagen BP01, BP05 und BP10 waren neben *Methanobacteriaceae* Mitglieder der Familie *Methanosaeetaceae* abundant. Die archaelle Gemeinschaft in BP11 setzte sich zu etwa gleichen Teilen aus *Methanomicrobiaceae* und *Methanosarcinaceae* zusammen, wohingegen *Methanobacteriaceae* in BP15 dominierten.

3.2.4.2 Die Varianz der mikrobiellen Gemeinschaften in Kläranlagen

In STPs wurde eine höhere Varianz bei der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft beobachtet als bei BPs. Es bildeten sich auf bakterieller und archaeller Ebene ausschließlich Cluster, die aus maximal drei Anlagen bestanden (**Abbildung 14**). Die archaelle Zusammensetzung war dabei von der bakteriellen Gemeinschaft größtenteils unabhängig, wodurch sich die Cluster in ihrer Zusammensetzung auf beiden Ebenen unterschieden (**Abbildung 15**).

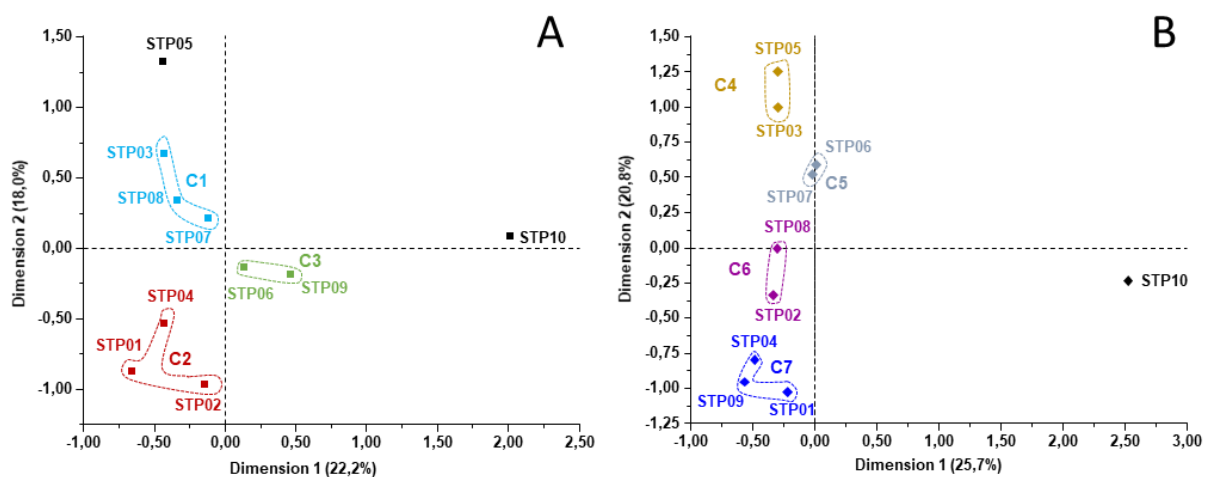


Abbildung 14: Korrespondenzanalyse der mikrobiellen Gemeinschaften in Kläranlagen (modifiziert übernommen aus Buettner und Noll 2018b).

Als Basis für die Clusterbildung der bakteriellen (A) und archaellen (B) Gemeinschaft wurde eine euklidische Distanz von 0,6 verwendet (vgl. 2.5.5.3). Die einzelnen Cluster sind farblich gekennzeichnet.

In allen Anlagen waren Mitglieder der Familien *Anaerolinaceae*, *Cloacamonaceae* und der Ordnung *Bacteroidales* abundant (**Abbildung 15A**). Der Anteil anderer Mikroorganismen war aufgrund der hohen Diversität und Evenness der mikrobiellen Gemeinschaften in Kläranlagen (vgl. 3.2.1) stark anlagenabhängig. In den Anlagen von C1 wurden bspw. hohe Abundanzen für die Familie *Syntrophaceae*, *Thermovirgaceae* und *SB-1* beobachtet.

Mit Ausnahme von STP10 dominierten in allen Anlagen die Familien *Methanobacteriaceae*, *Methanosaetaceae* und *WSA2* die archaellen Gemeinschaften (**Abbildung 15B**). In STP10 waren *Methanosarcinaceae* und *Methanomicrobiaceae* die dominanten Familien. In den Anlagen von C5, C6 und C7 waren außerdem unbekannte Vertreter der Ordnung *Methanosarcinales* oder der Familie *Methanoregulaceae* abundant.

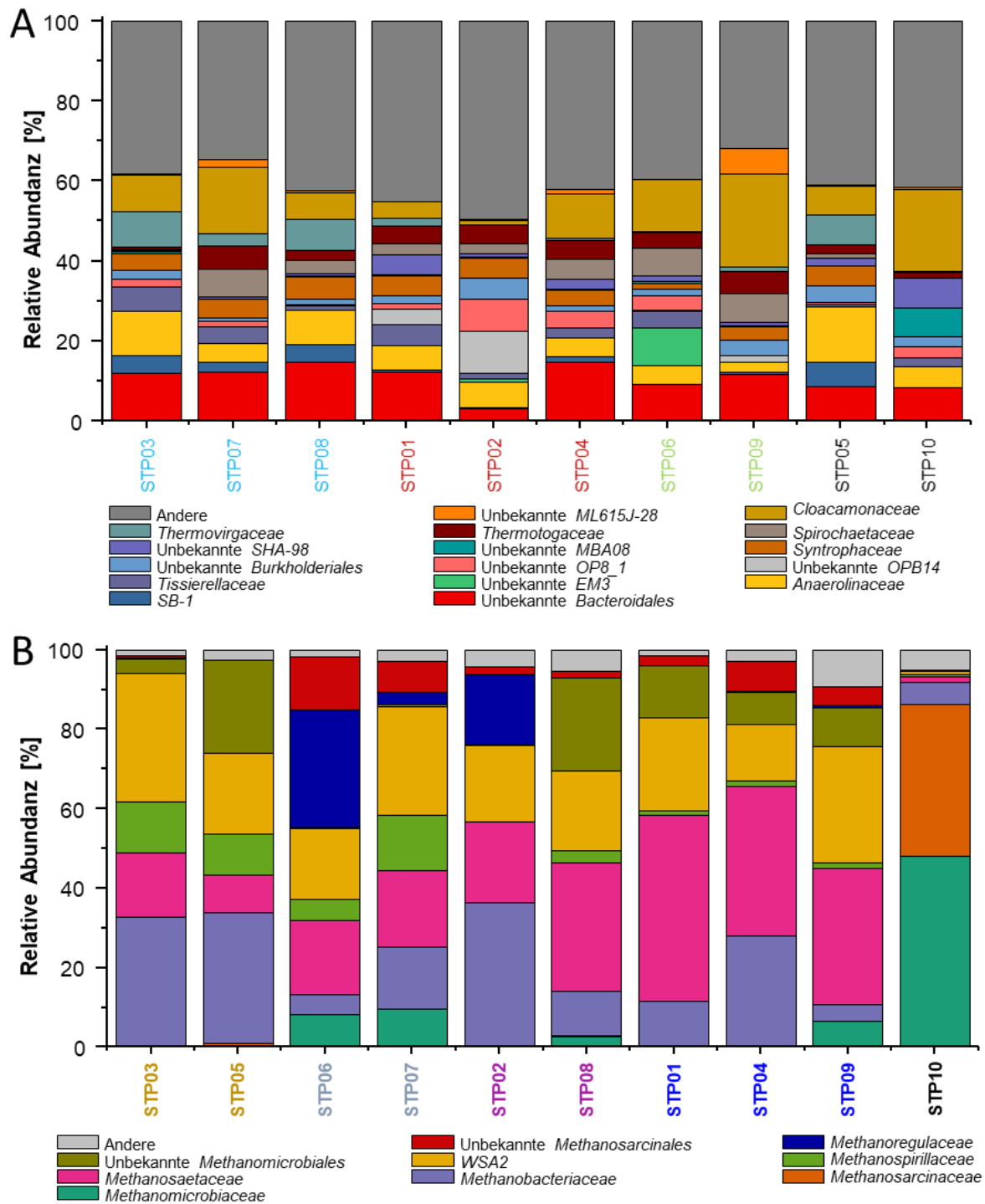


Abbildung 15: Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in Kläranlagen auf Basis der Sequenzierung des 16S rRNA Gens

Die Abbildung unterscheidet zwischen der bakteriellen (A) und archaellen (B) Gemeinschaft. Für die Übersichtlichkeit wurden die verschiedenen Spezies auf Familienebene zusammengefasst. Alle Familien, die in keiner Anlage eine relative Abundanz von mind. 5 % (Bakterien) bzw. 10 % (Archaeen) hatten, wurden unter *Andere* zusammengefasst. Eine detaillierte Übersicht der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften findet sich im Anhang (**Tabelle AE03**).

3.2.5 Einfluss von Prozessparametern auf die mikrobielle Gemeinschaft

Für BPs und STPs wurden mittels CCA zunächst die abiotischen Parameter identifiziert, die einen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften hatten. Anschließend wurden Korrelationsanalysen genutzt, um den Einfluss auf verschiedenen taxonomischen Ebenen näher zu analysieren. Die Parameter mit signifikanten Einflüssen unterschieden sich zwischen den beiden Anlagentypen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Effekt der Einflussfaktoren auf die taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen (A) und Kläranlagen (B)

Der Einfluss auf die bakterielle und archaelle Gemeinschaft wurde dabei getrennt voneinander getestet. Die Signifikanzniveaus wurden definiert als * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ und *** $p \leq 0.001$.

A Parameter	Variance Inflation Factor	Bakterielle Gemeinschaft		Archaelle Gemeinschaft	
		F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
pH	9,488	2,603	0.0241*	1.9298	0.0864
Temperatur	3,986	7,119	0.0001***	1.9619	0.1299
Rindergülle	13,125	1,550	0.1749	3.0371	0.0070**
Maissilage	10,952	2,051	0.0672	1.539	0.1723
Grassilage	3,124	1,466	0.1977	0.8036	0.5835
Getreide	5,891	1,421	0.231	2.3794	0.0358*
Trockenkot	8,444	1,215	0.3076	2.0071	0.0648
FOS	9,907	0,452	0.6172	0.9889	0.4316
C/N	3,010	2,603	0.886	0.5634	0.7598

B Parameter	Variance Inflation Factor	Bakterielle Gemeinschaft		Archaelle Gemeinschaft	
		F-Wert	p-Wert	F-Wert	p-Wert
Kapazität	2,355	1,2822	0,1389	1,3021	0,1877
pH	1,991	1,4016	0,0967	1,9062	0,0154*
Temperatur	2,826	1,1088	0,3368	1,7156	0,0726
Raum-Zeit-Ausbeute	6.348	0,8467	0,7468	1,1536	0,3106

Die Zusammensetzung der bakteriellen und archaellen Gemeinschaft in Biogasanlagen wurde von verschiedenen Umweltparametern beeinflusst. Den stärksten Einfluss auf die bakterielle Gemeinschaft hatte die Prozesstemperatur, gefolgt vom pH-Wert.

Die Zusammensetzung der archaellen Gemeinschaft war dagegen abhängig vom Anteil an Rindergülle und Getreide am Gesamtsubstrat.

Entsprechend den Ergebnissen der CCA konnten für eine Vielzahl von bakteriellen Familien signifikante Korrelationen mit der Temperatur beobachtet werden (**Tabelle AE04**). Dabei wurden deutlich mehr negative (29) als positive (3) Korrelationen beobachtet. Positive Korrelationen wurden für die Familien *Halanaerobiaceae*, *Anaerobaculaceae* und *TIBD11* festgestellt. Negative Korrelationen mit der Temperatur wurde für eine Vielzahl von Familien der Ordnung *Clostridiales* beobachtet. Darunter befanden sich auch abundante Familien wie *Ruminococcaceae* oder *Tissierellaceae*. Für den pH-Wert konnten weder auf Familien-, noch auf Genusebene signifikante Korrelationen beobachtet werden. Entgegen den Ergebnissen der CCA konnten keine signifikanten Korrelationen des Anteils an Rindergülle mit bestimmten archaellen Familien gefunden werden. Dafür wurden signifikante, positive Korrelationen für abundante, bakterielle Familien wie *Anaerolinaceae* oder *Thermovirgaceae* gefunden. Positiv mit dem Anteil an Getreide war nur die Familie *Methanomassillicoccaceae* korreliert. Obwohl die FOS-Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der bakteriellen oder archaellen Zusammensetzung hatte, wurde eine Vielzahl von Korrelationen beobachtet. Positive Korrelationen wurden beispielsweise für *Methanomassillicoccaceae*, *Methanomicrobiaceae* oder *Halanaerobiaceae* gefunden. Negativ korreliert zur FOS-Konzentration waren die Familien *Methanosarcinaceae*, *Peptococcaceae*, *Anaerolinaceae* oder *Thermovirgaceae*.

Bei den Kläranlagen hatte der pH-Wert als einziger Parameter einen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der archaellen Gemeinschaft. Alle anderen Parameter beeinflussten weder die bakterielle noch die archaelle Gemeinschaft. Eine positive Korrelation mit dem pH-Wert wurde für die Familie *Methanomicrobiaceae* beobachtet, wohingegen die Familie *Methanobacteriaceae* negativ korrelierte (**Tabelle AE05**). Auf Genusebene wurde die positive Korrelation dem Genus *Methanoculleus* und auf OTU-Ebene den OTUs OTU0153 und OTU0218 zugeordnet. Die höchsten Sequenzübereinstimmungen (kleinster E-Wert) wurden in der NCBI-Datenbank für *Methanoculleus bourgensis* (OTU0153) und *Methanoculleus receptaculi* (OTU0128) beobachtet.

Obwohl bei der CCA kein signifikanter Einfluss des pH-Wertes auf die bakterielle Gemeinschaft gefunden werden konnte, waren Korrelationen vorhanden. Die meisten dieser Korrelationen konnten nur wenig abundanten Familien zugeordnet werden. Negative Korrelationen wurden beispielsweise für die Familien *Flavobacteriaceae* und *Planctomycetaceae* beobachtet. Eine Ausnahme bildete hierbei die positive Korrelation mit der abundanten Familie *Cloacamonaceae*, die auf Genusebene dem Genus *W5* zugeordnet werden konnte.

3.2.6 Mikrobielle Interaktionsmuster

Um Interaktionsmuster in beiden Anlagentypen unterscheiden zu können, wurden mikrobielle Netzwerke für BPs und STPs berechnet und diese im Anschluss verglichen (3.2.6.1). Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die Interaktionsmuster der jeweiligen Schlüsselmikroorganismen gelegt (3.2.6.2).

3.2.6.1 Vergleich der Netzwerkparameter beider Netzwerke

Die betrachteten Netzwerkparameter unterschieden sich sowohl für das BP-, als auch für das STP-Netzwerk von den jeweils 100 zufällig generierten Netzwerken (**Tabelle 15**), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass diese die oben genannten Kriterien (vgl. 1.5.2) erfüllten.

Die berechneten mikrobiellen Netzwerke der BPs und STPs unterschieden sich deutlich in ihrer Komplexität (**Tabelle 15**). Das Netzwerk für BPs bestand aus weniger Knoten (183) und Kanten (367) als das Netzwerk der STPs (Knoten: 275; Kanten: 397). Im BP-Netzwerk war der Anteil an intermodularen Kanten (39,2 %) mehr als doppelt so hoch wie im STP-Netzwerk (19,4 %). Auch der Anteil an archaellen Knoten an der Zahl der Gesamtknoten war beim BP-Netzwerk (ca. 16 %) mehr als doppelt so hoch im Vergleich zum STP-Netzwerk (ca. 7 %). Die Konkurrenzsituation zwischen verschiedenen Spezies wurde auch in den mikrobiellen Interaktionsmustern deutlich: der höhere Anteil an negativen Interaktionen im BP-Netzwerk war indikativ für einen hohen Konkurrenzdruck, wohingegen dieser beim STP-Netzwerk niedriger war und deshalb weniger negative Interaktionen beobachtet wurden.

Die durchschnittliche Anzahl an Kanten war im BP-Netzwerk mit 4,011 deutlich höher als im STP-Netzwerk (2,887), d.h. die Knoten wiesen eine stärkere Vernetzung auf. Trotzdem waren sowohl die Anzahl der Module, als auch der durchschnittliche Clusterkoeffizient im STP-Netzwerk höher, was indikativ für eine starke Vernetzung der Knoten innerhalb der Module aufgrund des unspezifischen Substratspektrums war.

Tabelle 15: Übersicht der Netzwerkparameter für die berechneten Netzwerke in Biogas- und Kläranlagen (modifiziert übernommen aus Buettner und Noll 2018b)

Zur statistischen Absicherung wurden jeweils 100 zufällige Netzwerke mit der gleichen Anzahl an Knoten und Kanten generiert (vgl. 2.5.5.6).

Parameter	Biogasanlagen (BPs)		Kläranlagen (STPs)	
	Finales Netzwerk	Zufällige Netzwerke	Finales Netzwerk	Zufällige Netzwerke
Anzahl Knoten	183	183	275	275
Anzahl Kanten	Intramodular	223	320	-
	Intermodular	144	77	-
Anzahl Kanten	Positiv	138	224	-
	Negativ	229	173	-
	Gesamt	367	397	397
Anzahl Module	10	-	30	-
Modularität	0,458	0,449 ± 0,006	0,708	0,624 ± 0,009
Durchschnittlicher Clusterkoeffizient ¹	0,106	0,084 ± 0,016	0,142	0,013 ± 0,005
Durchschnittliche Konnektivität ²	4,011	-	2,887	-

¹Maß für die Vernetzung von benachbarten Knoten untereinander

²Durchschnittliche Anzahl an Kanten pro Knoten

3.2.6.2 Identifikation von Schlüsselorganismen und deren Interaktionsmuster

Im BP-Netzwerk wurde ein hoher Anteil der Knoten (39 Knoten, ca. 21 %) einer generalistischen Rolle zugeordnet (**Abbildung 16**). Diese 39 Generalisten wiesen untereinander 88 Kanten auf. Zusätzlich hatten die Generalisten 197 Kanten zu OTUs, die den Spezialisten zugeordnet wurden.

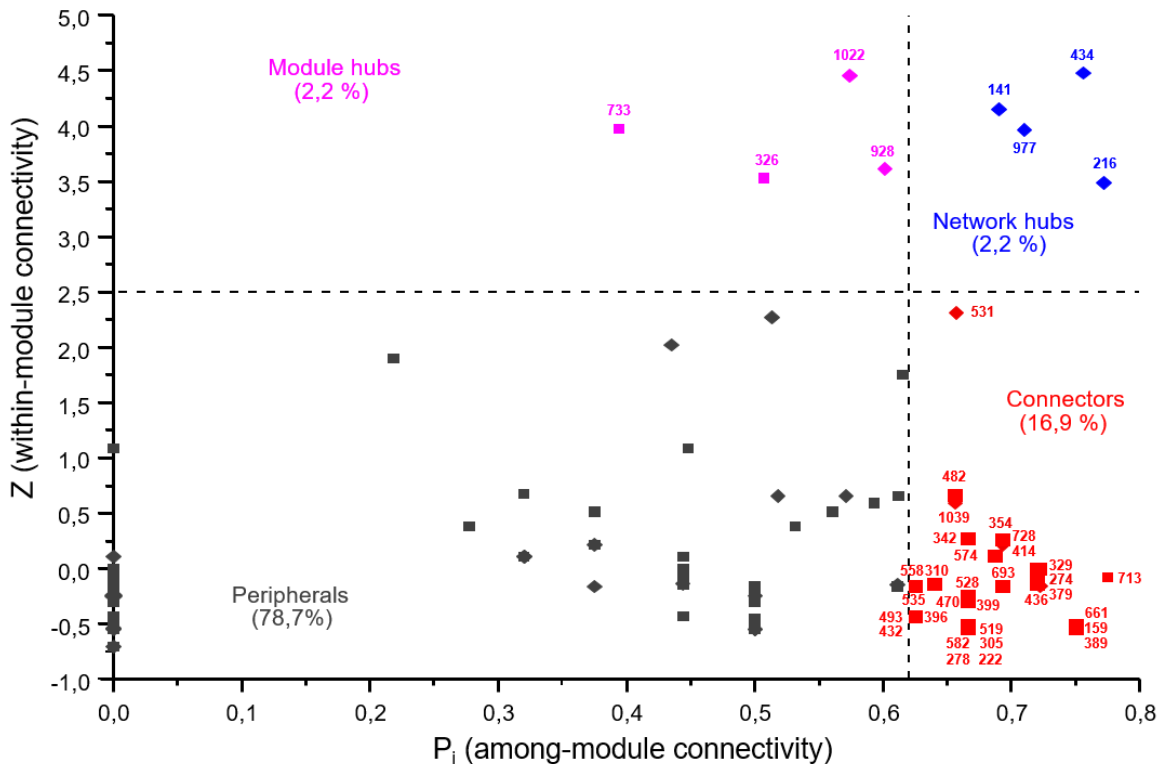


Abbildung 16: Einteilung der OTUs in den Biogasanlagen anhand ihrer topologischen Rollen im Netzwerk (übernommen aus Buettner und Noll 2018b)

Allen OTUs wurden anhand ihrer individuellen Z- und P-Werte einer der vier Gruppen zugewiesen (vgl. 1.5.4). Bakterielle OTUs sind als Rechtecke gekennzeichnet, archaelle OTUs als Rauten. Die zugehörige Zahl kennzeichnet die jeweilige OTU-Nummer. Eine Übersicht mit den Interaktionen aller Knoten findet sich im Anhang (**Tabelle AE06**).

Es wurden vier Module Hubs, vier Network Hubs und 31 Connectors identifiziert (**Tabelle A03**). Als Module Hubs wurden Vertreter der bakteriellen Ordnungen *SHA-98* (OTU0326) und *Cloacamonales* (OTU0733) sowie zwei OTUs (OTU1022, OTU0928) der archaellen, hydrogenotrophen Ordnung *Methanomicrobiales* identifiziert. Alle Network Hubs waren Vertreter der hydrogenotrophen Taxa *Methanobacteriaceae* (OTU0434), *Methanomicrobiales* (OTU0216) oder dem acetoklastischen Genus *Methanosaeta* (OTU0141 und OTU0977). Die Connectors waren zum größten Teil

Vertreter der hydrolytischen Ordnungen *Bacteroidales* (OTU0305 und OTU310) und *Clostridiales* (OTUs 0379, 0396, 0399, 0436, 0558, 0574, 0661 und 0728). Archaelle Connectors waren die OTUs 0274 (*Methanosaetaceae*), 0354 und 1039 (beide *Methanobacteriaceae*). Rund zwei Drittel der Generalist-Generalist-Interaktionen waren negativ. Am häufigsten (23) wurden generalistische Interaktionen zwischen an der Hydrolyse/Acidogenese beteiligten OTUs und archaellen, hydrogenotrophen OTUs beobachtet (**Tabelle 16**). Ebenso wurden acht Interaktionen zwischen OTUs gefunden, die an der Hydrolyse/Acidogenese und AcMe beteiligt waren. An 51 % der Interaktionen waren OTUs beteiligt, deren Rolle während der AD nicht bekannt war.

Tabelle 16: Anzahl der Interaktionen zwischen generalistischen OTUs im BP-Netzwerk (modifiziert übernommen aus Buettner und Noll 2018b)

Die Zuordnung der jeweiligen OTUs zum jeweiligen Schritt der AD (**Tabelle A03**) wurde anhand der vorliegenden Literatur getroffen. Die Zahlen geben die Anzahl der Interaktionen (negativ/positiv) unter den generalistischen OTUs an.

Schritte der AD	Hydrolyse/ Acidogenese	Acetogenese	Hydrogenotrophe Methanogenese	Acetoklastische Methanogenese	Acetat-Oxidation	Unbekannt
Hydrolyse/ Acidogenese	1/0	0/0	16/9	5/3	0/0	4/3
Acetogenese		0/0	2/0	1/1	0/0	2/0
Hydrogenotrophe Methanogenese			0/2	1/1	0/2	18/4
Acetoklastische Methanogenese				0/0	1/0	5/3
Acetat-Oxidation					0/0	0/1
Unbekannt						3/2

Im Kläranlagen-Netzwerk wurden lediglich elf Generalisten identifiziert, was einem Anteil der Generalisten von 4 % entsprach (**Abbildung 17**). Es wurden drei Module Hubs und acht Connectors gefunden (**Tabelle A04**). Zwischen den elf Generalisten

waren lediglich drei Interaktionen vorhanden (**Tabelle 17**). Module Hubs waren die bakteriellen OTUs 0129 und 0228. Der dritte Module Hub war OTU0789, ein Mitglied der hydrogenotrophen Ordnung *Methanomicrobiales*. Die Connectors beinhalteten *Acidobacteria* (OTU1021, OTU0964), *Firmicutes* (OTU0883, OTU0121), *Actinobacteria* (OTU0707), *Bacteroidetes* (OTU556), *Fibrobacteres* (OTU0322) und *Spirochaetes* (OTU0363)

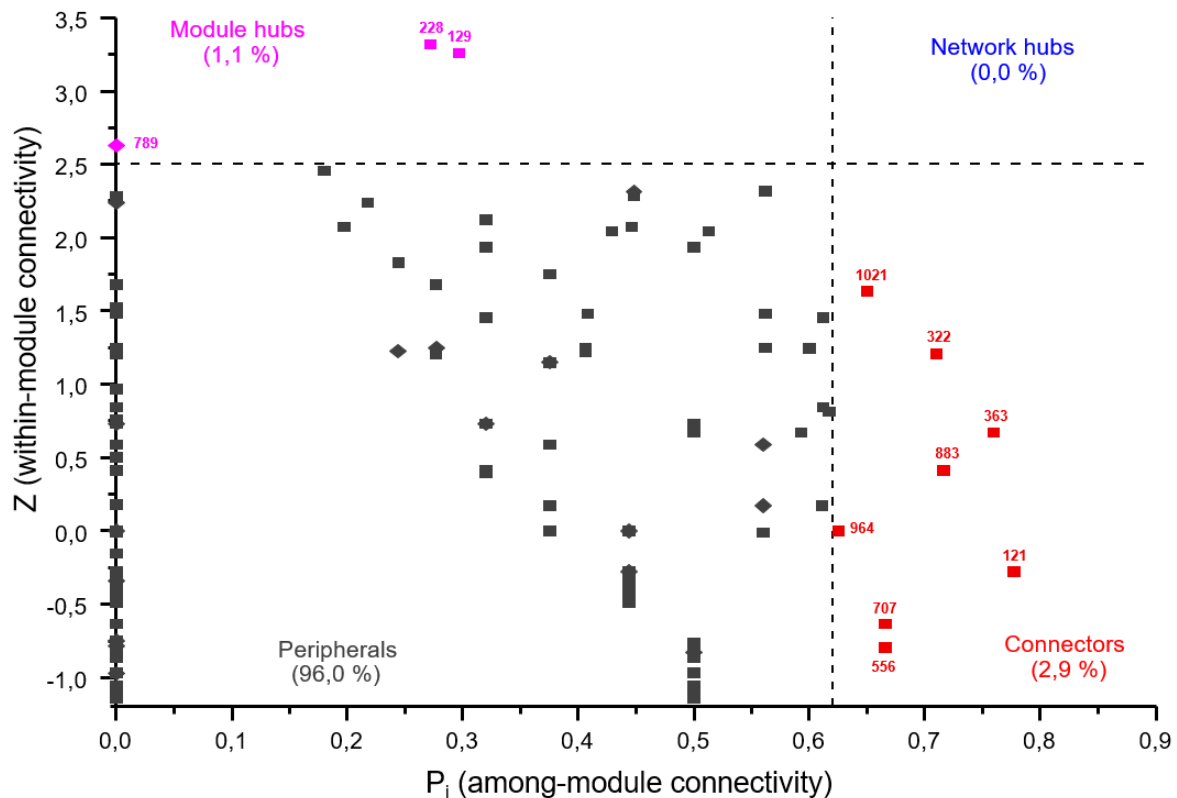


Abbildung 17: Einteilung der OTUs in den Kläranlagen anhand ihrer topologischen Rollen im Netzwerk (übernommen aus Buettner und Noll 2018b)

Allen OTUs wurden anhand ihrer individuellen Z- und P-Werte einer der vier Gruppen zugewiesen (vgl. 1.5.4). Bakterielle OTUs sind als Rechtecke gekennzeichnet, archaeelle OTUs als Rauten. Die zugehörige Zahl kennzeichnet die jeweilige OTU-Nummer. Eine Übersicht mit den Interaktionen aller Knoten findet sich im Anhang (**Tabelle AE06**).

Aufgrund der unvollständigen taxonomischen Zuordnung konnte lediglich fünf der elf generalistischen OTUs eine definierte Rolle während der AD zugeordnet werden (**Tabelle A04**). Eine Interaktion wurde für OTUs beobachtet, die beide an der Hydrolyse/Acidogenese beteiligt waren. An den beiden anderen Interaktionen war jeweils eine OTU beteiligt, deren Rolle während der AD nicht näher beschrieben werden konnte.

Tabelle 17: Anzahl der Interaktionen zwischen generalistischen OTUs im STP-Netzwerk (modifiziert übernommen aus Buettner und Noll 2018b)

Die Zuordnung der jeweiligen OTUs zum jeweiligen Schritt der AD (Tabelle A04) wurde anhand der vorliegenden Literatur getroffen. Die Zahlen geben die Anzahl der Interaktionen (negativ/positiv) unter den generalistischen OTUs an.

Schritte der AD	Hydrolyse/ Acidogenese	Acetogenese	Hydrogenotrophe Methanogenese	Acetoklastische Methanogenese	Acetat-Oxidation	Unbekannt
Hydrolyse/ Acidogenese	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1
Acetogenese		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Hydrogenotrophe Methanogenese			0/0	0/0	0/0	0/0
Acetoklastische Methanogenese				0/0	0/0	0/0
Acetat-Oxidation					0/0	0/0
Unbekannt						0/0

3.3 Funktionelle Charakterisierung der Biogasanlagen

Zur funktionellen Charakterisierung der Biogasanlagen wurden für je fünf Replikate aller 16 Biogasanlagen die Proteinprofile ermittelt. Die detektierten Proteine wurden taxonomisch und funktionell zugeordnet (3.3.1) und anschließend der dominierende Methanogeneseweg für jedes Replikat bestimmt (3.3.2). Zur Identifikation ähnlicher Proteinprofile wurden Hauptkomponentenanalysen auf Spezies-, Protein- und KO-Ebene (3.3.3) durchgeführt. Anhand der Proteinprofile wurden außerdem Schlüsselorganismen für die verschiedenen Schritte der AD identifiziert (3.3.4) und die Abhängigkeit der relativen Abundanz von der funktionellen Redundanz evaluiert (3.3.5). Der Einfluss der Prozessparameter auf die Proteinprofile wurde zunächst durch eine CCA ermittelt und der Einfluss anschließend mittels Korrelationsanalysen näher spezifiziert (3.3.6). Zuletzt wurden Netzwerke berechnet, um unterschiedliche mikrobielle Interaktionsmuster in Abhängigkeit der Methanogenesewege zu identifizieren (3.3.7).

3.3.1 Taxonomische und funktionelle Proteinzusammensetzung

Insgesamt wurden 5.854 Proteingruppen detektiert, die 2.178 verschiedenen Spezies zugeordnet werden konnten. Auf taxonomischer Ebene stammten 1.346 dieser Proteine von Archaeen, während die verbleibenden 4.508 Proteine bakterielle Proteine waren. Die meisten Proteine wurden den Phyla *Firmicutes* (1291 ± 91), *Euryarcheota* (876 ± 97), *Proteobacteria* (745 ± 14) und *Bacteroidetes* (303 ± 29) zugeordnet (**Abbildung 18**). Außerdem wurden eine hohe Anzahl an Proteinen für die Phyla *Cyanobacteria* (51 ± 5) und *Thermotogae* (58 ± 4) beobachtet. Für alle anderen Phyla wurden weniger als 50 Proteine identifiziert.

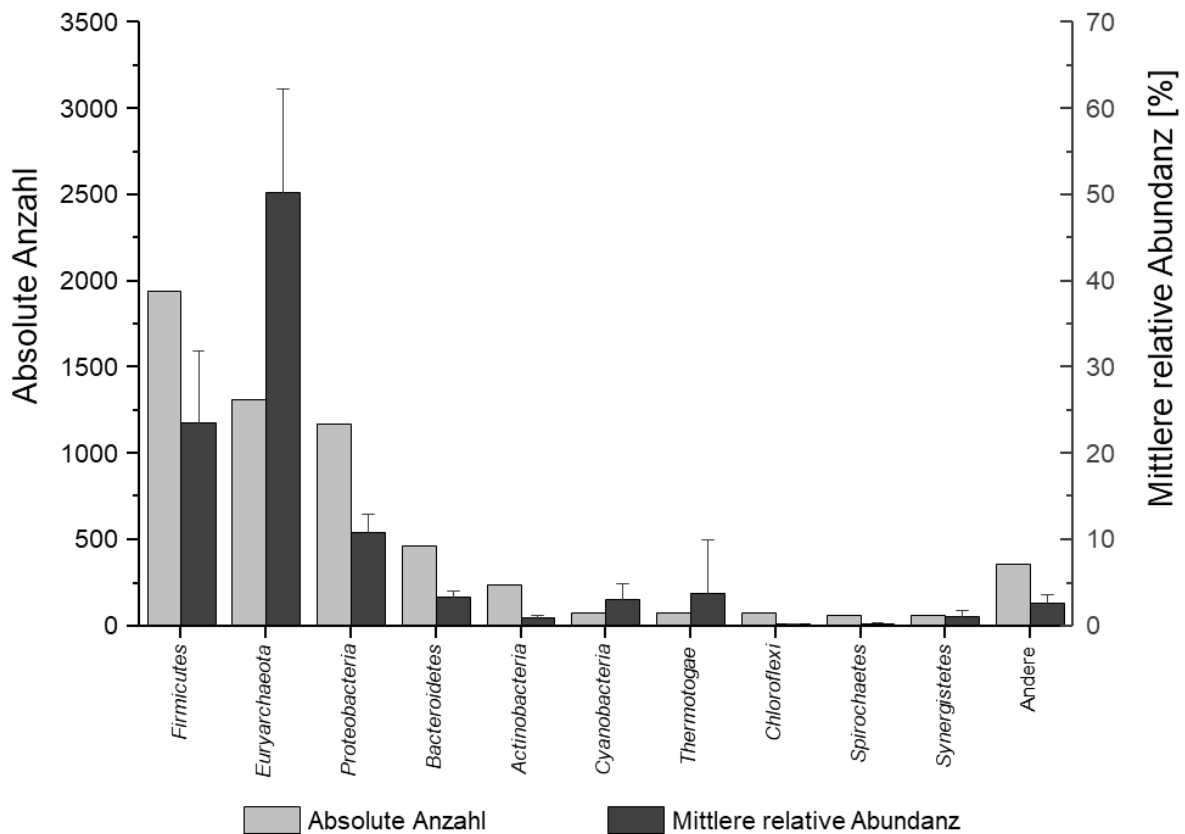


Abbildung 18: Taxonomische Affiliation der Proteine in den Biogasanlagen

Dargestellt sind die absolute Anzahl (grau) und mittlere relative Abundanz der Proteine (schwarz) auf Phylumlevel. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden nur Phyla berücksichtigt, für die mindestens 50 verschiedene Proteine detektiert wurden. Alle anderen Phyla wurden unter *Andere* zusammengefasst. Die mittlere relative Abundanz wurde aus allen Proben berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für jedes Phylum ($n = 80$). Eine Übersicht für alle Phyla findet sich im Anhang (**Tabelle AE07**).

Die häufigsten Phyla waren auch bei den relativen Abundanzen dominierend. Die relative Abundanz war bei Vertretern des Phylums *Euryarchaeota* ($50,2 \pm 12,0$ %) am höchsten, gefolgt von *Firmicutes* ($23,5 \pm 8,4$ %) und *Proteobacteria* ($10,9 \pm 2,0$ %). Die Phyla *Cyanobacteria* und *Thermotogae* wiesen im Vergleich zur Häufigkeit hohe Proteinabundanzen von $3,1 \pm 1,8$ % bzw. $3,8 \pm 6,1$ % auf.

Auf funktioneller Ebene waren Proteine am häufigsten dem EMP zugeordnet worden, für den durchschnittlich 372 ± 28 Proteine detektiert wurden (**Abbildung 19**). Abundante glykolytische Proteine waren die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase ($1,7 \pm 0,5$ %), Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase ($1,4 \pm 0,4$ %) und Enolase ($1,0 \pm 0,3$ %). Auch Proteine der Methanogenese waren häufig (287 ± 21) und abundant ($36,9 \pm 8,9$ %). Dominierende methanogene Proteine waren die

verschiedenen Untereinheiten der Methyl-Coenzym-M-Reduktase (MCMR) (α : $7,4 \pm 3,1$ %, β : $5,6 \pm 1,4$ %, γ : $7,1 \pm 3,6$ %). Außerdem wurden hohe Abundanzen für die 5,10-Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase ($4,0 \pm 2,5$ %) und die Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase ($2,1 \pm 1,4$ %) beobachtet. Andere abundante Proteine waren das Hitzeschockprotein 60 kD Chaperonin ($3,2 \pm 1,3$ %), der Elongationsfaktor Tu ($2,8 \pm 0,6$ %) oder Transporter-Proteine wie ABC.PE.S ($2,6 \pm 2,0$ %).

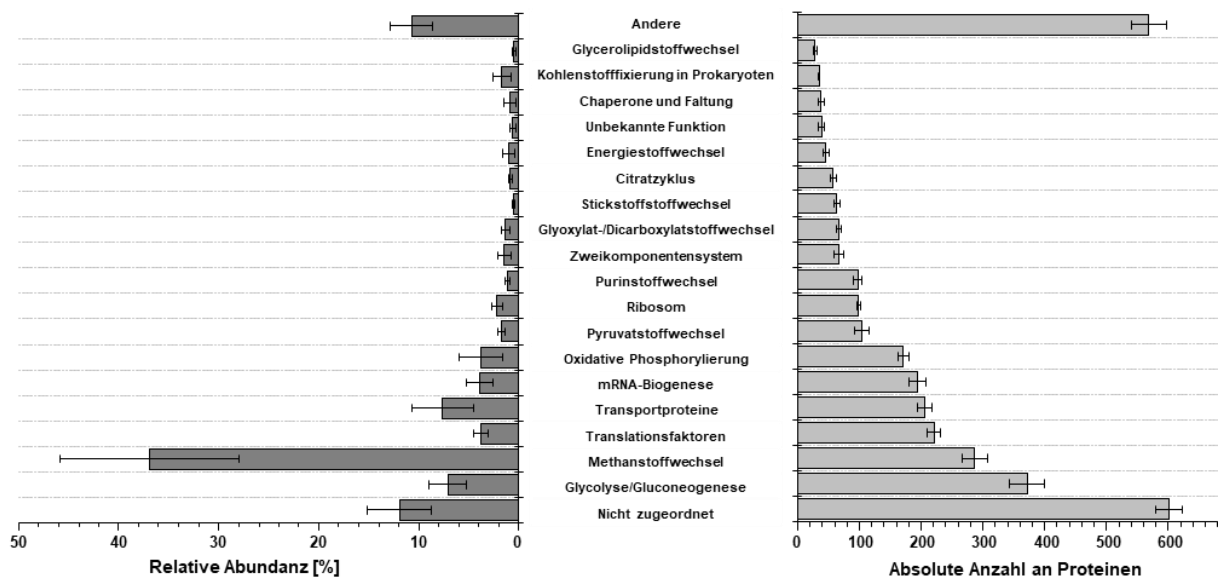


Abbildung 19: Übersicht der Abundanzen für die TOP20 der KEGG-Stoffwechselwege (modifiziert übernommen aus Buettner et al. 2019)

Dargestellt werden sowohl die mittlere relative Abundanz (links, dunkelgrau) und die mittlere absolute Abundanz (rechts, hellgrau). Alle weiteren Stoffwechselwege sind unter *Andere* zusammengefasst. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für die Replikate aller Biogasanlagen ($n = 80$) an.

3.3.2 Einteilung der Anlagen auf Basis des vorherrschenden Methanogenesewegs

Nach Berechnung des F_M -Faktors (vgl. 2.6.5.3) wurden 25 Replikate AcMe und 40 Replikate der HyMe zugeordnet. Bei den restlichen 15 Replikaten, für die der F_M -Wert zwischen 2,5 und 0,4 lag, wurde eine Mischung aus beiden Methanogenesewegen angenommen. Bei lediglich zwei Anlagen (BP11, BP12) wurden nicht alle Replikate dem gleichen Methanogeneseweg zugeordnet (**Tabelle 18**).

Tabelle 18: Zuordnung der Biogasanlagen zum vorherrschenden Methanogeneseweg

Wurden nicht alle Replikate dem gleichen Methanogeneseweg zugeordnet (BP11, BP12), wurde die gesamte Anlage entsprechend der Mehrheit der Replikate eingeteilt.

Anlage	Replikat					Zuordnung
	1	2	3	4	5	
BP01	X	X	X	X	X	AcMe
BP02	X	X	X	X	X	AcMe
BP03	X	X	X	X	X	AcMe
BP04	X	X	X	X	X	HyMe
BP05	X	X	X	X	X	AcMe
BP06	X	X	X	X	X	HyMe
BP07	X	X	X	X	X	HyMe
BP08	X	X	X	X	X	HyMe
BP09	X	X	X	X	X	BoMe
BP10	X	X	X	X	X	HyMe
BP11	X	X	X	X	X	BoMe
BP12	X	X	X	X	X	HyMe
BP13	X	X	X	X	X	HyMe
BP14	X	X	X	X	X	AcMe
BP15	X	X	X	X	X	BoMe
BP16	X	X	X	X	X	HyMe

3.3.3 Anlagencluster auf verschiedenen taxonomischen und funktionellen Ebenen

Es wurden PCAs auf taxonomischer Ebene (Spezies) und funktionellen Ebenen (Proteine, KO) durchgeführt (**Abbildung 20**). Bis auf wenige Ausnahmen (BP11.1, BP12.1, BP14.2 auf Protein- und Speziesebene und zusätzlich BP16.2 auf KO-Ebene) konnten auf den drei genannten Ebenen alle Replikate einer Anlage demselben Cluster zugeordnet werden.

Auf der Protein- und Speziesebene wurden jeweils neun Cluster identifiziert, deren Anlagenzusammensetzung identisch war (**Abbildung 20A+B**). Für alle Anlagen mit HyMe (C1, C3, C5, C8) waren hohe Proteinabundanzen für die Familien *Methanomicrobiaceae* und *Methanosarcinaceae* und moderate Abundanzen für *Methanoregulaceae* charakteristisch (**Abbildung 21**). Für diese Familien waren die Spezies *M. bourgensis*, *Methanoculleus marisnigri*, *M. barkeri* und *Methanosphaerula palustris* dominant. Bei den Bakterien wurden in diesen Anlagen hohe Abundanzen für *Pseudomonadaceae*, *Peptococcaceae*, *Clostridiaceae* und *Thermoanaerobacterales Family III Incertae Sedis* beobachtet. Dafür verantwortlich waren auf Speziesebene insbesondere *Pseudomonas fluorescens*, *Peptococcaceae bacterium 109* und *S. schinkii*. Für die hohe Abundanz der Familie *Clostridiaceae* waren viele verschiedene Spezies verantwortlich. Bei Cluster 5 (Replikate von BP16) wurden außerdem hohe Abundanzen der Proteine von *Defluviitoga tunisiensis* und niedrige Abundanzen von *P. bacterium 1109* beobachtet.

Bei den Anlagen mit BoMe (BP09, BP11, BP15) wurden hohe Abundanzen für Proteine der Familie *Methanosarcinaceae* detektiert, wobei *M. barkeri* und *Methanosarcina mazei* dominierten. Außerdem wurden im Vergleich zu den anderen Anlagen hohe Abundanzen für *Methanosarcina sp. Ant1* und *Methanosarcina acetivorans* gefunden. Bei BP15 waren hingegen vergleichsweise niedrige Abundanzen der oben genannten archaellen Familien vorhanden. Dafür waren bakterielle Proteine insbesondere von *S. schinkii* und *D. tunisiensis* hochabundant.

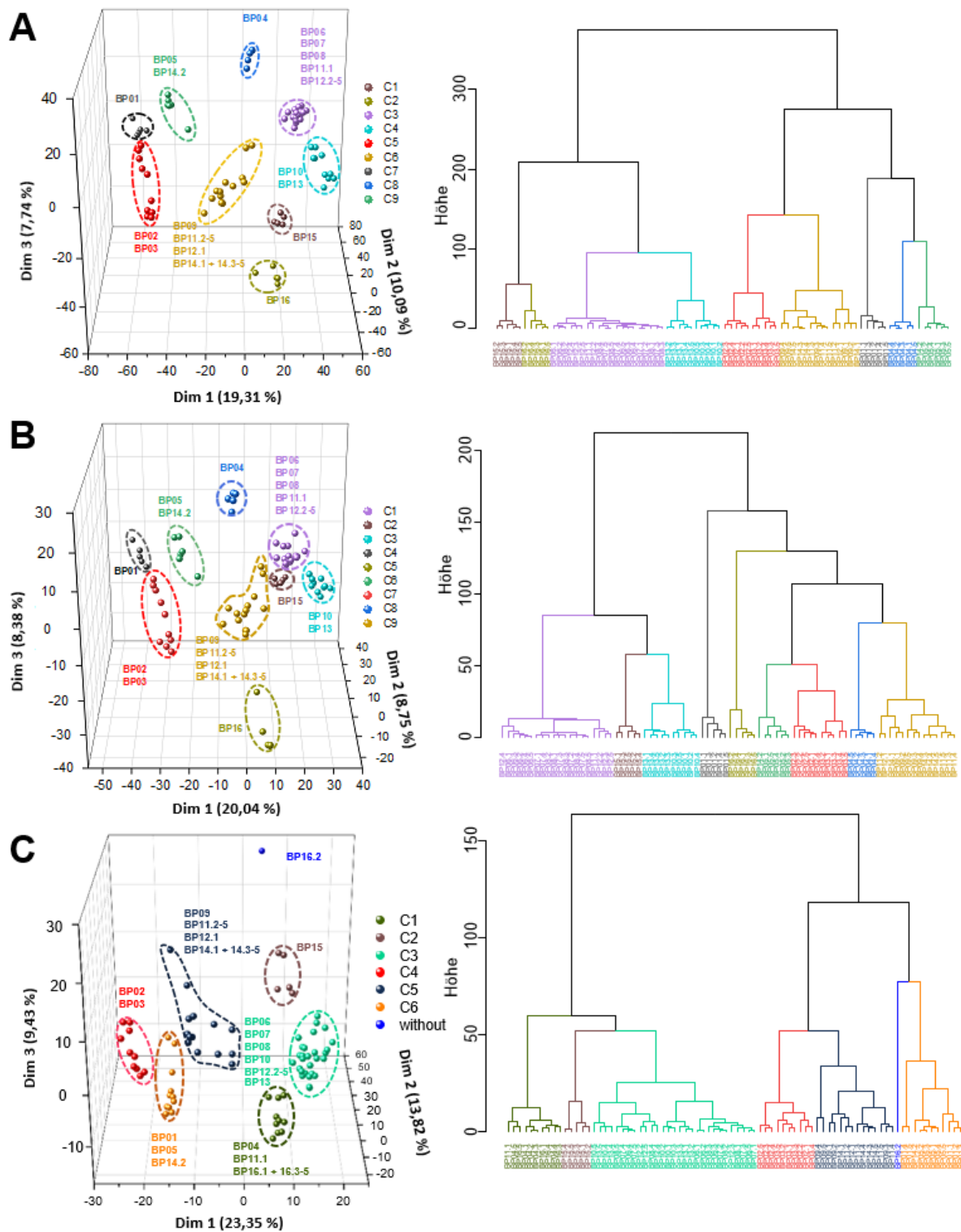


Abbildung 20: Vergleich der Proteindiversität der 16 Biogasanlagen auf verschiedenen taxonomischen und funktionellen Ebenen (übernommen aus Buettner et al. 2019) sind die dreidimensionalen Plots auf Proteinebene (A), Speziesebene (B) und KO-Ebene (C). Jeweils rechts von der PCA finden sich die Dendrogramme, die für die Clusterbildung herangezogen wurden. Als Höhe wurde eine dreidimensionale euklidische Distanz von 50 gewählt.

Charakteristisch für Anlagen mit AcMe war die Dominanz der Familien *Methanosaetaceae* (BP01, BP05) oder *Methanosarcinaceae* (BP02, BP03 und BP14). Dabei dominierten entweder *M. soehngenii* (BP01, BP05) oder *M. barkeri* und *M. mazei* (BP02, BP03, BP14). Auffällig waren die im Vergleich zu den anderen Anlagen niedrigen Abundanzen für *P. bacterium 1109* und *S. schinkii* bei allen Anlagen mit AcMe.

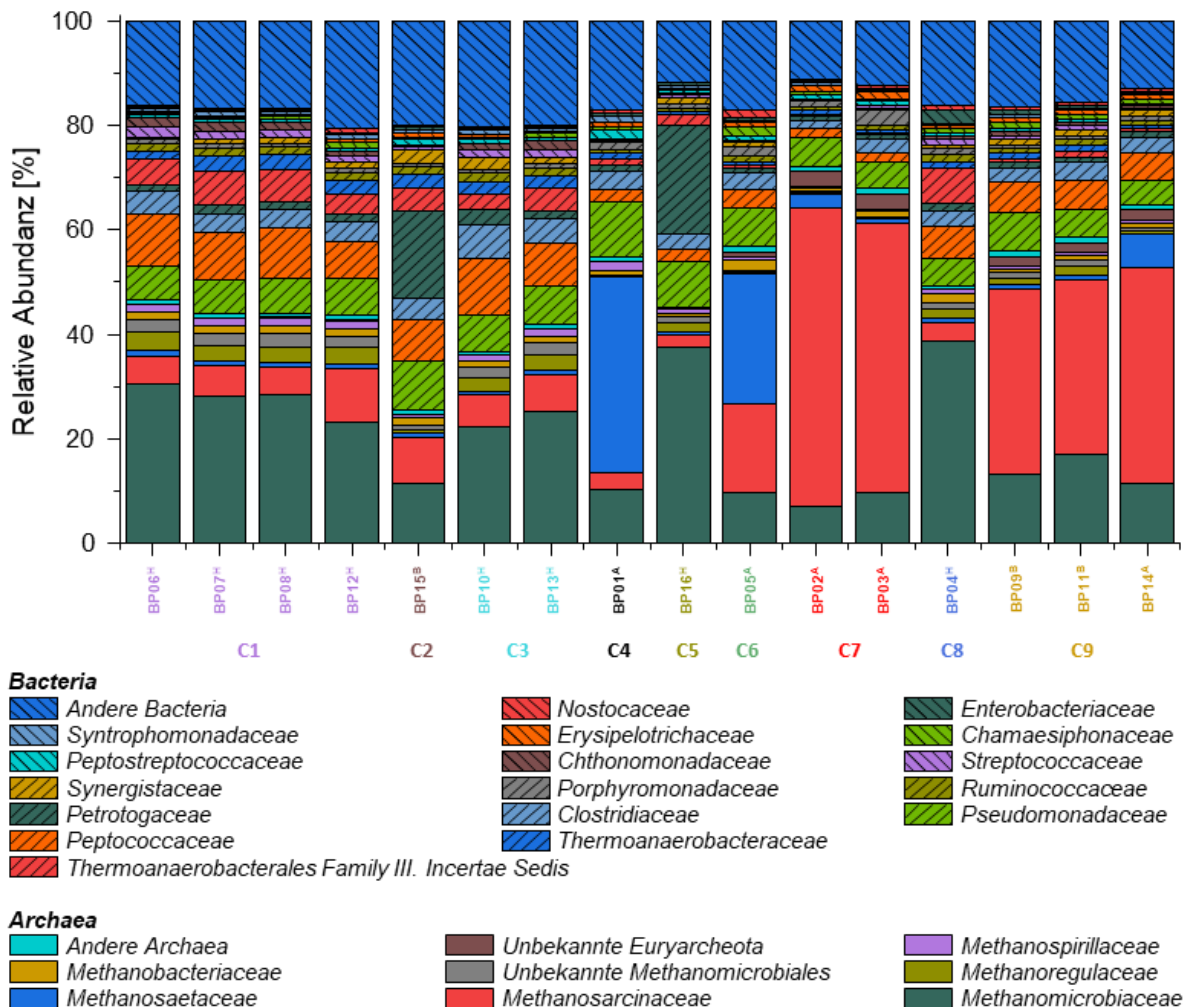


Abbildung 21: Taxonomische Zusammensetzung der Proteinprofile der Biogasanlagen

Die relativen Proteinabundanzen wurden für eine übersichtlichere Darstellung auf Familienebene für alle Replikate einer Anlage zusammengefasst. Dabei wurden nur Familien berücksichtigt, die in mind. einer der Anlagen eine relative Abundanz von 1,0 % hatten, alle anderen Familien sind unter *Andere Bacteria* oder *Andere Archaea* zusammengefasst. Die Farbe der Beschriftung ist analog zu der Clusterzuordnung auf Speziesebene (**Abbildung 20B**). Der Buchstabe über den einzelnen Anlagen entspricht die Zuordnung zu den Hauptmethanogenesewegen (H: hydrogenotroph, A: acetoklastisch, B: beide Wege; **Tabelle 18**). Eine genauere Auflistung für verschiedene taxonomische Ebenen findet sich im Anhang (**Tabelle AE07**).

Auf funktioneller Ebene (KO) wurden lediglich sechs Cluster identifiziert (**Abbildung 20C**). Dabei wurde beobachtet, dass auch Anlagen, die sich im Speziesprofil unterschieden haben, auf funktioneller Ebene gemeinsam clusterten. Die Anlagen trennten sich dabei nach dem vorherrschenden Methanogeneseweg auf. Grund für diese Auftrennung war die unterschiedliche mittlere relative Abundanz der methanogenen Proteine zwischen den Methanogenesewegen (**Abbildung 22**). Zusätzlich wurde eine Unterteilung des jeweiligen Methanogenesewegs in verschiedene Sub-Cluster beobachtet (HyMe: C1, C3; AcMe; C4, C5, C6; BoMe: C2, C5). Gemäß der Einteilung des Methanogenesewegs, waren für die hydrogenotrophe Anlagen hohe Abundanzen der Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (mtd, EC 1.5.98.1) und der 5,10-Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (mer, EC 1.5.98.2) charakteristisch. In acetoklastischen Anlagen wurden hingegen signifikant höhere Abundanzen der Acetyl-Coenzyme A-Synthetase (ACSS, EC 6.2.1.1) und des Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplexes (ACDS) (cdh; ECs 2.3.1.169 und 2.1.1245) detektiert. Auch Proteine der methylotrophen Methanogenese (ECs 2.1.1.246 und 2.1.1.90) wurden in den acetoklastischen Anlagen in signifikant höherer Abundanz beobachtet.

Die Abundanz der Proteine, die am finalen Methanogeneseschritt beteiligt sind, unterschieden sich ebenfalls signifikant zwischen den Methanogenesewegen. Die Abundanzen der MCMR (mcr, 2.8.4.1) waren in den acetoklastischen Anlagen signifikant höher. In hydrogenotrophen Anlagen wurden hingegen signifikant höhere Abundanzen für Proteine, die an der Regenerierung von Coenzym M (z.B. Heterodisulfid-Reduktase, hdr, ECs 1.8.7.3 + 1.8.91.1 + 1.8.98.4-6), beteiligt sind, beobachtet.

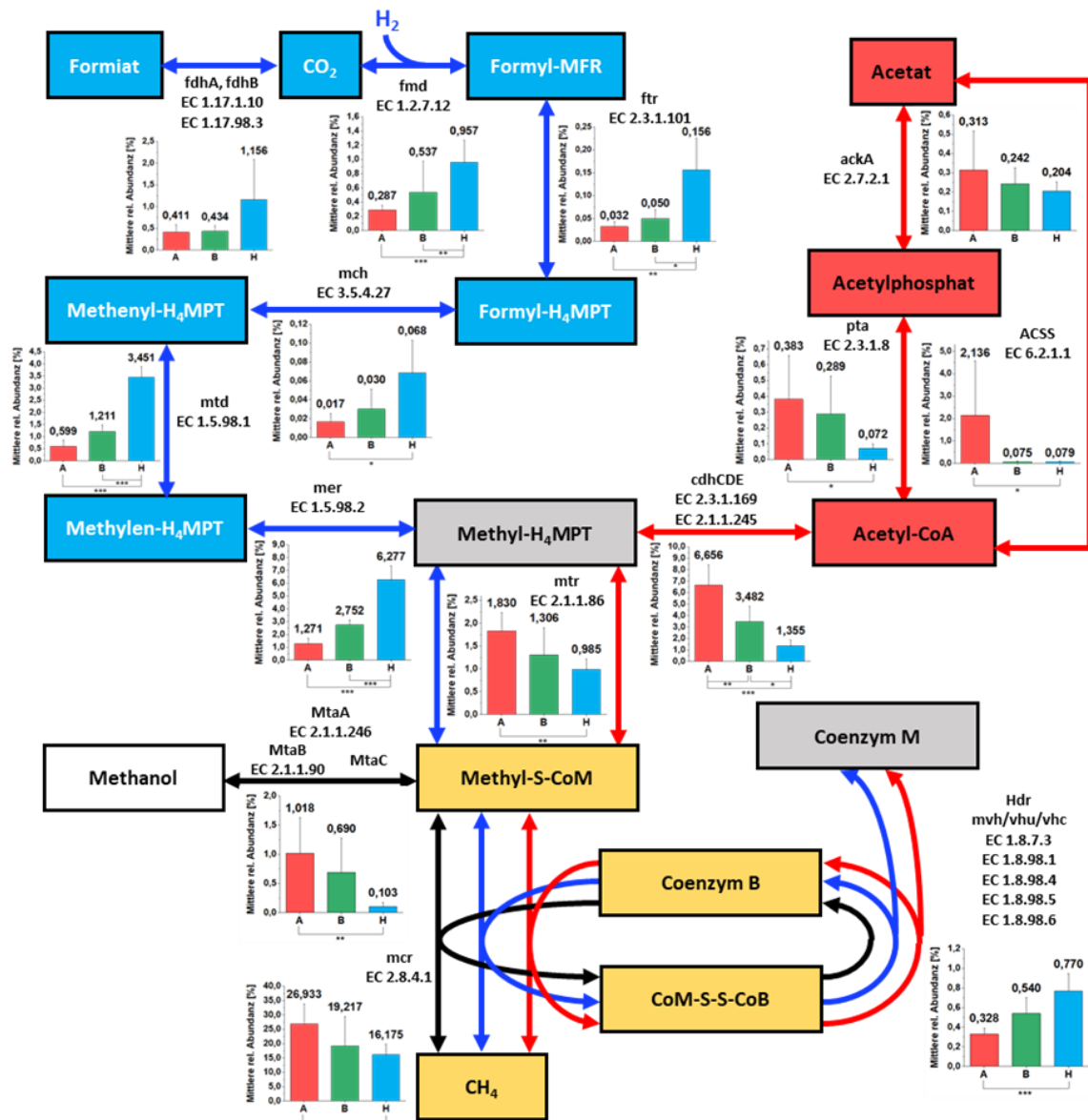


Abbildung 22: Dominante Methanogeneseschritte in Biogasanlagen (modifiziert übernommen aus Buettner et al. 2019).

Die Strukturierung der Methanogeneseschritte erfolgte nach Guo et al. 2015. Die Schritte sind abhängig vom Hauptmethanogeneseweg farblich gekennzeichnet (rot: AcMe, blau: HyMe, schwarz: methylotroph, gelb: Teil aller Methanogenesewege). Die Diagramme zeigen die durchschnittlichen relativen Abundanzen in Abhängigkeit der Methanogenese (A: AcMe, B: BoMe, H: HyMe). Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA ermittelt, dabei gilt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Abkürzungen entsprechen den folgenden Enzymen/Stoffwechselprodukten:

fdhAB: Formiat-Dehydrogenase; Formyl-MFR: Formylmethanofuran; H₄MPT: Tetrahydromethanopterin; CoM: Coenzym M; CoM-SS-CoB: Disulfid aus Coenzym M und Coenzym B; MtaA: Methylcobalamin:Coenzym M-Methyltransferase; MtaB/MtaC: Methanol-5-Hydroxybenzimidazolylcobamid-Co-Methyltransferase; ackA: Acetatkinase; pta: Phosphat-Acetyltransferase; ACSS: Acetyl-CoA-Synthetase; cdhCDE: Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplex; fdhAB: Formiat-Dehydrogenase; fmd: Formylmethanofuran-Dehydrogenase; ftr: Formylmethanofuran—tetrahydromethanopterin N-formyltransferase; mch: Methenyltetrahydromethanopterin-Cyclohydrolase; mtd: Methyltetrahydromethanopterin-Dehydrogenase; mer: 5,10-Methylen-tetrahydromethanopterin-Reduktase; mtr: Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase; hdr: Heterodisulfid-Reduktase; mcr: Methyl-Coenzyme M-Reduktase.

3.3.4 Funktionelle Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften

Die Proteine wurden anhand der ECs bzw. KOs den Stoffwechselwegen der AD zugeordnet (Tabelle AE08). Zahlreiche Proteine für die Hydrolyse von Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden wurden detektiert (Abbildung 23A).

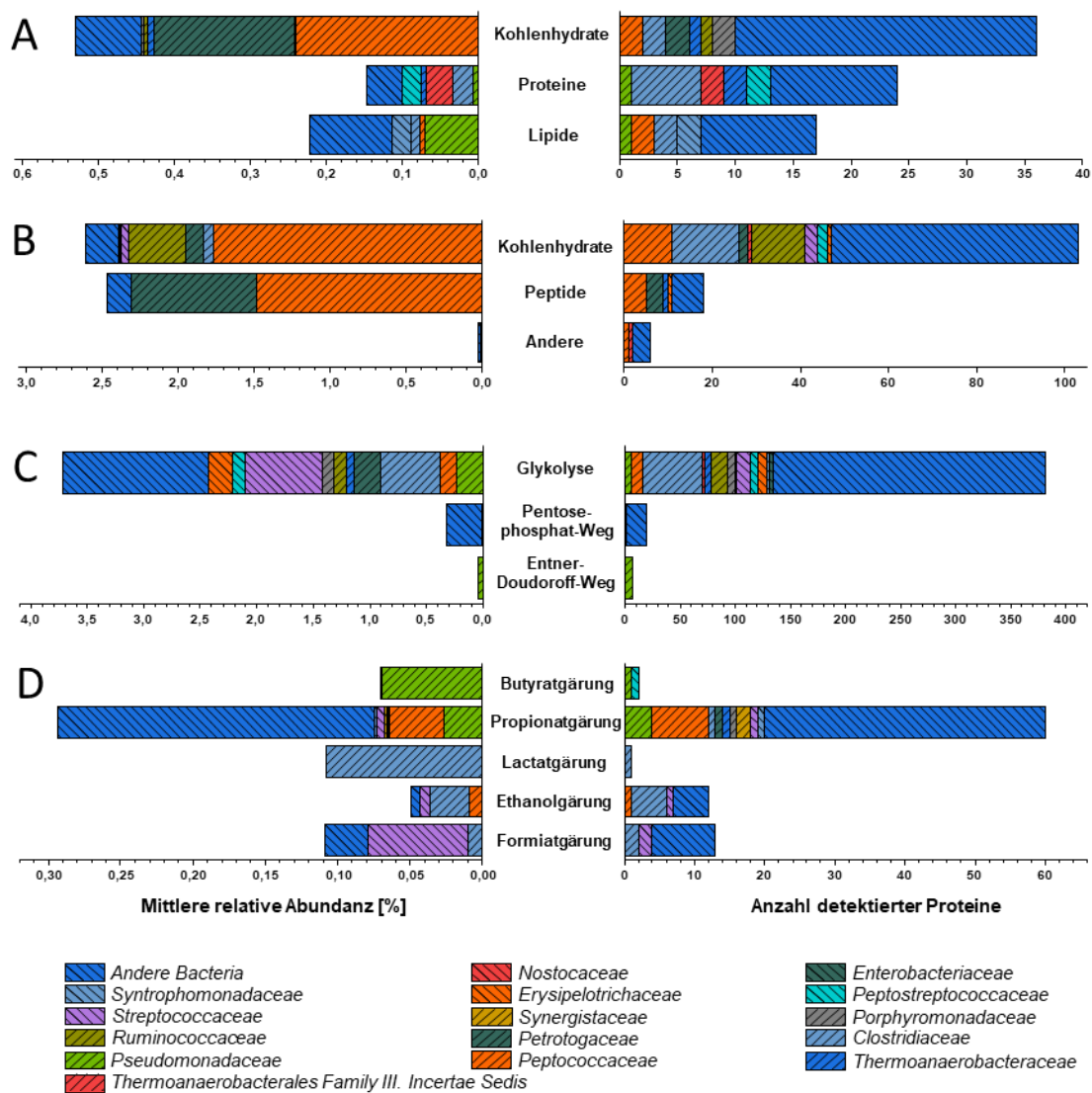


Abbildung 23: Beteiligung verschiedener Bakteriengruppen an den Prozessen der anaeroben Gärung

Dabei wurde zwischen den Prozessen der Hydrolyse (A), dem Substratumsatz/Transporterproteine (B), Zuckerstoffwechsel (C) und der Acidogenese (D) unterschieden.

Obwohl an der Hydrolyse von Kohlenhydraten eine Vielzahl verschiedener Spezies partizipierten, waren *P. bacterium* 1109 und *D. tunisiensis* die Spezies mit hoher relativer Abundanz. Für die Hydrolyse von Proteinen und Lipiden wurde hingegen keine Dominanz bestimmter Mikroorganismen bzw. Mikroorganismengruppen

beobachtet. Gemessen an der Zahl der Proteine, die dem Substratumsatz dienen, waren nur wenige Spezies besonders aktiv. Neben Proteinen der beiden oben genannten Spezies wurden insbesondere Proteine für den Zuckertransport von *Clostridium termitidis* gefunden. Der Großteil der Kohlenhydrate wurde über den EMP abgebaut, woran insbesondere Mikroorganismen der Familien *Clostridiaceae* und *Streptococcaceae* beteiligt waren. Im Gegensatz zum EMP wurden nur wenige Proteine für den PPW und den ED-Weg identifiziert. Für letzteren wurden ausschließlich Proteine von *Pseudomonadaceae* gefunden. Der Acidogenese wurden ebenfalls zahlreiche Proteine zugeordnet. Die häufigste und abundanteste Fermentationsform war dabei die Propionatgärung, die von einer Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen betrieben wurde, wobei kein Organismus dominant war. Im Gegensatz dazu konnte für die anderen Fermentationsformen eine Dominanz bestimmter Mikroorganismen bzw. -gruppen nachgewiesen werden. An der Butyratgärung war v.a. *P. fluorescens* beteiligt, an der Ethanolgärung Vertreter der Familie *Clostridiaceae* und an der Formiatgärung *Streptococcus lutetiensis*. Die L-Lactat-Dehydrogenase, das Schlüsselenzym der Milchsäuregärung, wurde ausschließlich für *Clostridium pasteurianum* detektiert.

Für die Acetogenese und Methanogenese wurde zusätzlich noch der vorwiegende Methanogeneseweg berücksichtigt (vgl. 3.3.2), da bei beiden Schritten der AD deutliche Unterschiede vermutet wurden. In allen Anlagen wurde eine ähnliche Anzahl von Proteinen des WLP gefunden (**Abbildung 24A**). Sowohl die mittlere relative Abundanz, als auch die dominierenden Mikroorganismen unterschieden sich hingegen in Abhängigkeit des Methanogenesewegs.

In Anlagen mit AcMe wurden für den WLP v.a. Proteine der Familie *Erysipelotrichaceae* (*Candidatus Stoquefichus*) gefunden, in Anlagen mit HyMe waren hingegen Proteine der Familien *Thermoanaerobacteraceae* und *Thermoanaerobacterales Family III. Incertae Sedis* dominant (**Abbildung 24A**). In Anlagen mit BoMe wurde eine Mischung von Proteinen für alle drei genannten Familien beobachtet.

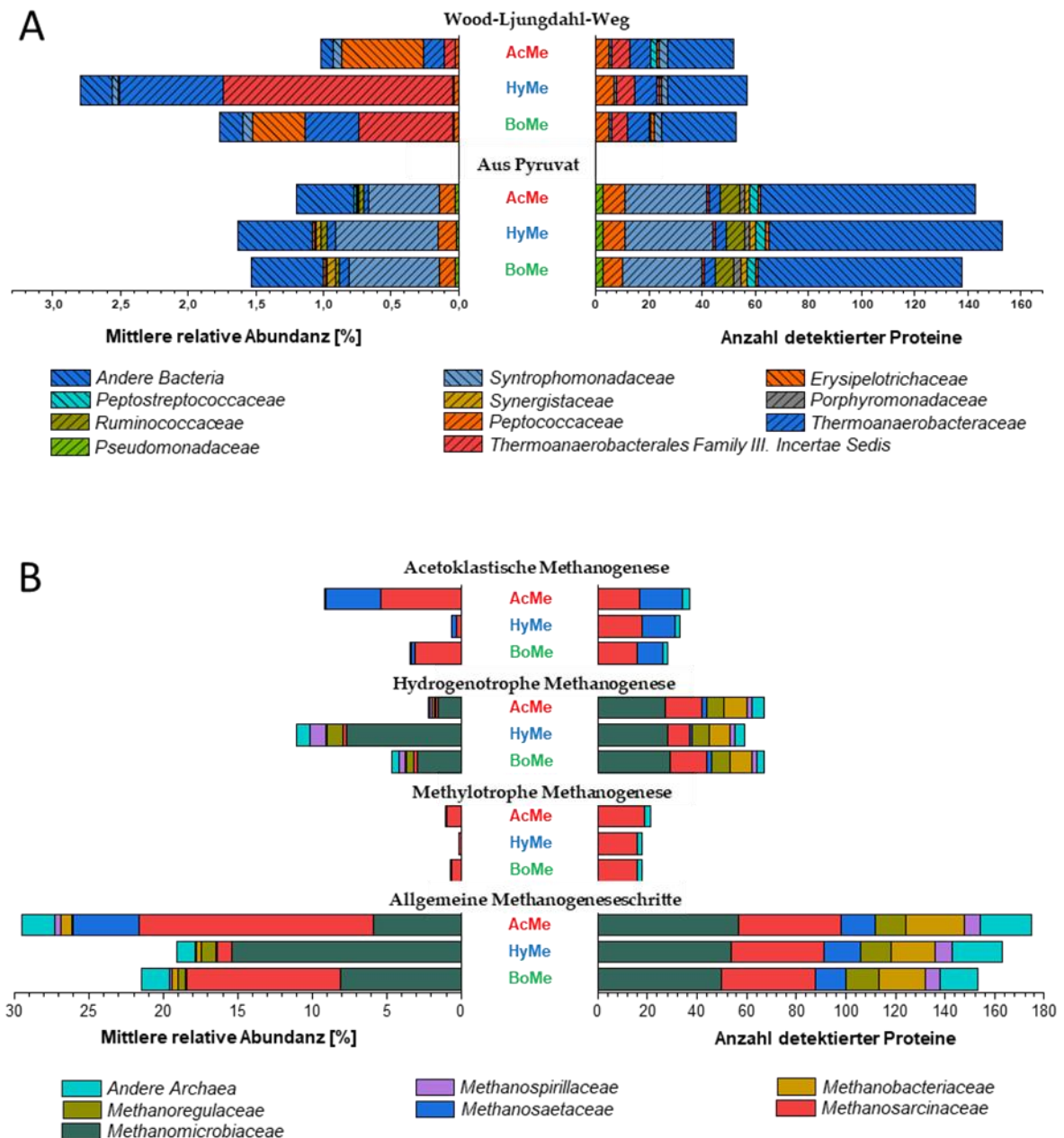


Abbildung 24: Taxonomische Zuordnung der an der Acetogenese und Methanogenese beteiligten Mikroorganismengruppen

Bei der Acetogenese (A) wurden lediglich bakterielle Proteine berücksichtigt, bei der Methanogenese (B) lediglich archaelle Proteine. Die Abbildung unterscheidet weiterhin zwischen den unterschiedlichen Methanogenesewegen (AcMe: rot; HyMe: blau; BoMe: grün).

In fast allen hydrogenotrophen Anlagen (Ausnahme BP12) war die Abundanz des bakteriellen ACDS zudem höher, als die des archaellen ACDS (**Abbildung 25**). In acetoklastischen Anlagen stammte der ACDS hingegen überwiegend von Archaeen. In Anlagen, für die eine Mischung beider Methanogenesewege angenommen wurde, wurde entweder eine Dominanz des bakteriellen ACDS-Komplexes (BP15) oder des

archaellen ACDS-Komplexes (BP09, BP11) beobachtet. Für die Methanogenese wurden in allen Anlagen Proteine für AcMe und HyMe gefunden, die sich allerdings in ihrer relativen Abundanz unterschieden (**Abbildung 24B**). In Anlagen mit AcMe dominierten Proteine der Familien *Methanosaetaceae* und *Methanosarcinaceae*, in Anlagen mit HyMe stammten die methanogenen Proteine überwiegend von der Familie *Methanomicrobiaceae*. In Anlagen von BoMe wurden ähnliche mittlere relative Abundanzen für die Familien *Methanosarcinaceae* und *Methanomicrobiaceae* detektiert. Am finalen Schritt der Methanogenese waren in allen Anlagen alle drei oben genannten Familien beteiligt.

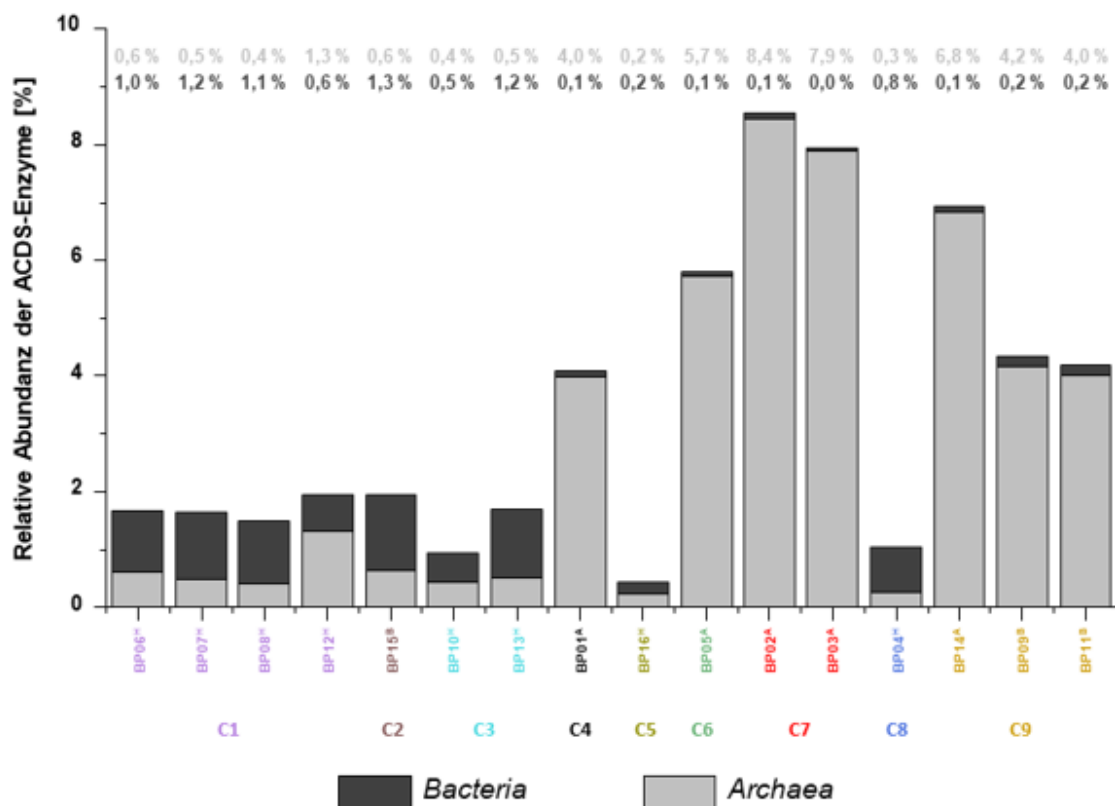


Abbildung 25: Relative Abundanzen des Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplexes für Bakterien und Archaeen

Die Gesamtsummen ergeben sich dabei aus den Einzelsummen für K00193, K00194 und K00197 (β -, δ - und γ -Untereinheit des CODH/ACDS-Komplexes) für das jeweilige Königreich.

3.3.5 Zusammenhang zwischen relativer Abundanz und funktioneller Redundanz auf KO-Ebene

Um zu testen, ob die relative Abundanz der Proteine von der funktionellen Redundanz abhängt, wurde für jeden Methanogeneseweg der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient auf Ebene der KOs berechnet. Die berechneten Werte für Spearman's ρ unterschieden sich zwischen den Methanogenesewegen nur marginal. In allen Anlagen wurde eine signifikante ($p < 0,001$) Abhängigkeit der relativen Abundanz von der funktionellen Redundanz beobachtet (**Abbildung 26**).

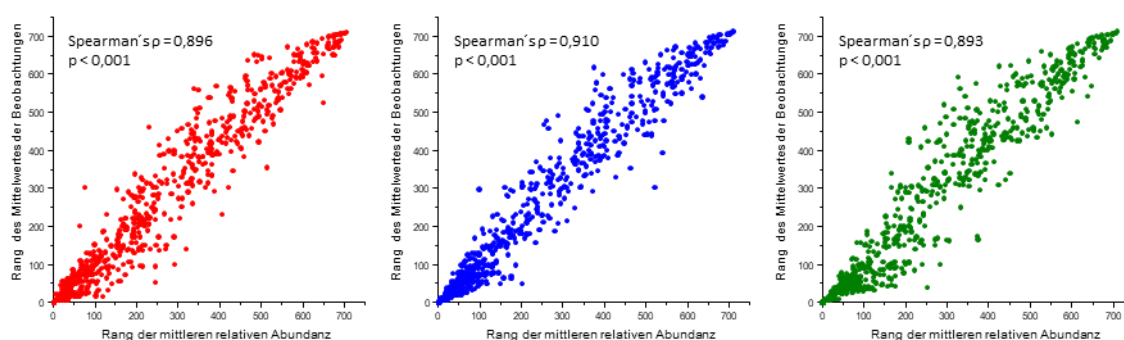


Abbildung 26: Zusammenhang zwischen mittlerer relativer Abundanz und der mittleren Anzahl der Beobachtungen auf KO-Ebene

Für alle drei identifizierten Methanogenesewege (AcMe: rot, HyMe: blau, BoMe: grün) wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient sowie der zugehörige p-Wert berechnet.

Die Dominanz einzelner Spezies war dabei abhängig vom Grad der funktionellen Redundanz. Während bei hochgradiger funktioneller Redundanz (d.h. ein Protein wurde für viele verschiedene Spezies detektiert) selten eine Dominanz eines einzelnen Organismus beobachtet wurde, waren bei geringerer funktioneller Redundanz oftmals einzelne Spezies dominant (**Tabelle 19**).

Tabelle 19: Abhängigkeit der Dominanz einzelner Spezies vom Grad der funktionellen Redundanz für ausgewählte Proteine des Substratumsatzes

Dargestellt sind Proteine des Substratumsatzes mit hoher (> 50 Beobachtungen), mittlerer (> 10 und < 50) und geringer (< 10) funktioneller Redundanz.

Enzym	KO	Anzahl Proteine	Dominante Mikroorganismen (TOP3)	Mittlere relative Abundanz [%]			Anteil an KO [%]		
				AcMe	HyMe	BoMe	AcMe	HyMe	BoMe
Multiples			<i>C. ternitidis</i>	0.135	0.289	0.219	33.82	31.61	30.61
Zuckertransport-System	K10112	68	<i>P. bacterium 1109</i>	0.045	0.164	0.151	11.27	17.88	21.19
			<i>D. tunisiensis</i>	0.044	0.089	0.088	10.97	9.69	12.30
ABC-Transporter Protein	K02035	24	<i>P. bacterium 1109</i>	0.466	2.137	1.451	66.85	60.14	48.39
			<i>D. tunisiensis</i>	0.085	1.134	1.207	12.23	31.91	40.23
			<i>Dictyoglomus turgidum</i>	0.034	0.134	0.099	4.81	3.76	3.29
Einfaches Zuckertransport-System	K02058	6	<i>P. bacterium 1109</i>	0.489	1.436	1.138	91.23	99.66	99.64
			<i>Sphaerochaeta globosa</i>	0.045	0.004	0.002	8.40	0.28	0.17
			<i>Sphaerochaeta pleomorpha</i>	0.002	0.000	0.002	0.37	0.03	0.19

3.3.6 Einfluss von Prozessparametern auf verschiedene taxonomische und funktionelle Ebenen

Mittels CCA konnte eine Vielzahl an Parametern identifiziert werden, die einen signifikanten Einfluss auf das Proteinprofil der jeweiligen Anlage hatten (**Tabelle 20**). Der stärkste Einfluss wurde für die Temperatur beobachtet. Neben verschiedenen Substrattypen (Trockenkot, Maissilage und Grassilage) hatten auch der pH-Wert und die Konzentration an FOS einen signifikanten Effekt auf die mikrobielle Proteinexpression.

Tabelle 20: Einfluss der Prozessparameter auf die Metaproteomprofile der Biogasanlagen (modifiziert übernommen aus Buettner et al. 2019)

Es wurden nur Variablen mit einem Variance Inflation Factor < 10 bei der CCA berücksichtigt. Die Signifikanz jedes Parameters wurde mittels Permutationstests mit 9.999 Permutationen ermittelt.

Variable	VIF	F-Wert	p-Wert	Signifikanz [#]
Temperatur	3,775	2,609	0,002	**
Trockenkot	1,486	1,8466	0,014	*
Maissilage	2,857	1,9117	0,017	*
pH	3,605	1,7889	0,019	*
FOS	5,101	1,6246	0,037	*
Grassilage	4,025	1,6323	0,047	*
Rindergülle	2,532	1,5865	0,052	
Getreide	7,350	1,1328	0,321	
Speisereste	9,119	0,9951	0,467	
C/N-Verhältnis	4,197	0,9118	0,588	

[#]: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Um die Einflüsse näher charakterisieren zu können, wurden Korrelationsanalysen auf verschiedenen Ebenen (Taxonomie: Familie bis Spezies, Funktion: Proteine, KO, Stoffwechselweg, **Tabelle AE09**) für alle signifikant getesteten Prozessparameter durchgeführt (vgl. **2.6.5.4**). Aufgrund der Vielzahl der beobachteten Korrelationen werden nachfolgend die Ergebnisse für jeden Prozessparameter, nach absteigender Signifikanz sortiert, gesondert beschrieben.

3.3.6.1 Temperatur

Die überwiegende Mehrzahl der Familien, deren Proteinabundanzen signifikant mit der Temperatur korrelierten, wiesen nur eine geringe Abundanz auf. Abundante Familien mit signifikanter Korrelation zu der Temperatur waren *Porphyromonadaceae* (negativ), *Synergistaceae* und *Petrotogaceae* (beide positiv). Auf Speziesebene konnten diese Korrelationen *Fermentimonas caenicola*, *Acetomicrobium mobile* und *D. tunisiensis* zugeordnet werden. Für alle Mikroorganismen wurden auch Proteine mit signifikanter Korrelation zur Temperatur identifiziert. Proteine von *D. tunisiensis* mit signifikanter Korrelation waren: 60kDa Chaperonin groEL (A0A0C7NWX1), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (A0A0C7NKZ2) und die Pyruvat-Phosphat-Dikinase (A0A0C7NPA3).

Auf funktioneller Ebene konnten v.a. positive Korrelationen zwischen Temperatur und KOs des Methanmetabolismus beobachtet werden. Korrelationen wurden für K00401, K00402 (β - bzw. γ -Untereinheit MCMR) und K00581 (ϵ -Untereinheit Tetrahydromethanopterin S-Methyltransferase) beobachtet.

3.3.6.2 Trockenkot

Auf Familienebene wurden ausschließlich positive Korrelationen zwischen bakteriellen Familien und dem Anteil an Trockenkot beobachtet. Die überwiegende Mehrheit der Familien gehörten dem Phylum *Cyanobacteria* an. Abundante Vertreter dieser Familien waren auf Speziesebene bspw. *Chamaesiphon minutus* oder *Calothrix parietina*. Auf funktioneller Ebene korrelierten die Abundanzen für die KO-Stoffwechselwege Purinmetabolismus und Photosynthese positiv mit Trockenkot.

3.3.6.3 Maissilage

Positive Korrelationen mit dem Anteil an Maissilage waren für die Mikroorganismen *Methanomicrobiales archaeon 53_19* und *Chthonomonas caldirosea* vorhanden, für die allerdings keine direkt korrelierenden Proteine identifiziert werden konnten. Negative Korrelation wurden für eine Vielzahl an Proteinen verschiedener *Pseudomonas spp.* gefunden. Zusätzlich wurden positive Korrelationen für die β - bzw. γ -Untereinheit der

MCMR von *M. bourgensis* und für einen Zuckertransporter von *P. bacterium 1109* beobachtet.

3.3.6.4 pH-Wert

Beim pH-Wert wurden ausschließlich positive Korrelationen mit verschiedenen bakteriellen Familien beobachtet. Abundante Familien, welche mit dem pH-Wert korrelierten, waren bspw. *Peptococcaceae* und *Ruminococcaceae*, für deren Korrelation auf Speziesebene *P. bacterium 1109* und *Clostridium thermocellum* verantwortlich waren. Für erstere Spezies wurden Korrelationen für Proteine des Zuckerstoffwechsels, wie die Pyruvat-Phosphat-Dikinase, festgestellt.

3.3.6.5 Grassilage

Der Anteil von Grassilage am Substrat korrelierte mit der Proteinabundanz der Familien *Bacteroidaceae* und *Rhodobacteraceae*. Auf Speziesebene wurden Korrelationen mit *Thermovirga lienii* sowie jeweils einer *Bacteroides* und *Candidatus Claocimonas sp.* beobachtet.

3.3.6.6 Flüchtige organische Säuren

Für die Konzentration an flüchtigen organischen Säuren waren die mit Abstand meisten Korrelationen vorhanden. Auch wurden hier im Gegensatz zu den meisten anderen Parametern eine Vielzahl an Korrelationen mit *Archaea* beobachtet. Auffällig waren negative Korrelationen mit acetoklastischen Mikroorganismen und positive Korrelationen mit hydrogenotrophen Mikroorganismen (**Tabelle 21**), die auf Proteinebene zumeist auch eine oder mehrere Untereinheiten der MCMR umfassten.

Tabelle 21: Übersicht wichtiger Korrelationen mit der Konzentration an FOS

Dargestellt ist lediglich eine Auswahl an Korrelationen, eine vollständige Übersicht findet sich im Anhang (Tabelle AE09).

Familie	Spezies	Proteine
Negative Korrelationen		
<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta harundiceae</i>	MCMR (α -Untereinheit) Acetyl-CoA Decarboxylase/Synthase Komplex (δ -Untereinheit)
	<i>Methanotherix soehngenii</i>	MCMR ATP-Synthase
-	<i>Methanosarcina mazei</i>	MCMR Katalase
<i>Methanocellaceae</i>	<i>Methanocella paludicola</i>	Methanol Corrinoid Methyltransferase -
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-	-
Positive Korrelationen		
<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Clostridium termitidis</i>	ABC-Transporter
<i>Thermoanaerobacterales</i> Family III. Incertae Sedis	<i>Syntrophaceticus schinkii</i>	S-(Hydroxymethyl)glutathion Dehydrogenase Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
<i>Petrotogaceae</i>	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	Pyruvat-Phosphat-Dikinase
	<i>Methanofollis liminatans</i>	- MCMR
<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase 5,10-Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase Heterodisulfid-Reduktase (α -Untereinheit)

Einige Stoffwechselwege korrelierten ebenfalls mit der FOS-Konzentration. Negative Korrelationen wurden u.a. für den Methanmetabolismus und die oxidative Phosphorylierung beobachtet. Positive Korrelationen wurden hingegen für den Zuckerstoffwechsel (Fruktose, Mannose, Stärke, Saccharose) und Aminosäurestoffwechsel (Cystein, Methionin, Glycin, Serin und Threonin) festgestellt.

3.3.7 Mikrobielle Interaktionsmuster in Abhängigkeit des Methanogenesewegs

Zur Berechnung der mikrobiellen Netzwerke wurden die Proteindaten zunächst für jedes Replikat auf Speziesebene zusammengefasst. Anschließend wurde für jeden Methanogeneseweg (AcMe, HyMe, BoMe) auf Basis der relativen Abundanzen ein mikrobielles Netzwerk berechnet, welches Aufschluss über die Komplexität der mikrobiellen Interaktionsmuster gab (3.3.7.1). Ein besonderer Fokus lag auf der Identifikation von Schlüsselorganismen (3.3.7.2) und den über allen Methanogenesewegen konservierten Interaktionen (3.3.7.3).

3.3.7.1 Komplexität der mikrobiellen Netzwerke

Alle berechneten Netzwerke unterschieden sich in ihren Netzwerkparametern (Tabelle 22). Am komplexesten war das Netzwerk HyMe, welches die meisten Knoten und Kanten hatte. Die geringste Komplexität wurde für BoMe beobachtet.

Tabelle 22: Übersicht der Netzwerkparameter für die drei auf Speziesebene berechneten Netzwerke (modifiziert übernommen aus Buettner et al. 2019)

Als Input dienten jeweils die relativen Abundanzen auf Speziesebene aller der dem entsprechenden Methanogeneseweg (AcMe: acetoklastisch; HyMe: hydrogenotroph; BoMe: beide Methanogenesewege) zugeordneten Replikate (Tabelle 18). Die Prozentzahlen in Klammern geben den jeweiligen Anteil der Kanten bzw. Knoten gemessen an der jeweiligen Gesamtzahl an.

Parameter	AcMe	HyMe	BoMe
Knoten	672	706	504
positiv	960 (48,3 %)	1.331 (58,9 %)	903 (62,1 %)
negativ	1.024 (51,7 %)	929 (41,1 %)	550 (37,9 %)
Kanten			
In-Module	1.851 (93,3%)	2.077 (91,9 %)	1.253 (86,2 %)
Outside-module	133 (6,7 %)	183 (8,1 %)	200 (13,8 %)
Gesamt	1.984	2.260	1.453
Anzahl Module	26	42	32
Connector	0	5 (0,7 %)	6 (1,2 %)
Topologische Rollen			
Module Hub	12 (1,8 %)	16 (2,3 %)	11 (2,2%)
Network Hub	0	0	0
Peripheral	660 (98,2 %)	685 (97,0 %)	487 (96,6 %)
Durchschnittlicher Clusterkoeffizient	0,242	0,256	0,227
Durchschnittliche Konnektivität	5,905	6,402	5,766

Die an der AD beteiligten Mikroorganismen und deren Interaktionsmuster unterschieden sich zwischen den Methanogenesewegen. Am ähnlichsten waren sich die Netzwerke von AcMe und HyMe, welche 349 Knoten und 180 Kanten teilten. Große Unterschiede waren zwischen den Netzwerken AcMe und BoMe zu beobachten, in denen 274 identische Knoten und 75 gemeinsame Kanten vorhanden waren. 35 Knoten und 51 Kanten waren über alle Netzwerke hinweg konserviert (vgl. 3.3.7.3).

Während in HyMe und BoMe deutlich mehr positive als negative Interaktionen zwischen den Knoten beobachtet wurden, war der Anteil an positiven und negativen Kanten in AcMe ungefähr gleich. Die Knoten in HyMe waren stärker miteinander vernetzt als in AcMe und BoMe (durchschnittliche Konnektivität). Dabei interagierten in HyMe insbesondere benachbarte Knoten häufiger miteinander (durchschnittlicher Clusterkoeffizient) als dies in AcMe und BoMe der Fall war. Dementsprechend war die Anzahl der Module in HyMe am größten. Die stärkste Spezialisierung der Mikroorganismen wurde im Netzwerk AcMe beobachtet. Dort konnten keine Knoten der Rolle eines Connectors zugeordnet werden und zusätzlich war dort der Anteil an Peripherals am höchsten. Mikroorganismen in BoMe waren hingegen weniger stark spezialisiert, weshalb dort der Anteil an Knoten mit generalistischer Rolle am höchsten war.

3.3.7.2 Identifikation von Schlüsselorganismen

In allen drei Netzwerken wurden Knoten identifiziert, die anhand ihrer Z- und P-Werte den Generalisten zugeordnet werden konnten (**Abbildung 27**). Die meisten dieser generalistischen Knoten gehörten zu den Phyla *Firmicutes* (AcMe/HyMe/BoMe 4/7/9) und *Proteobacteria* (2/4/4) (**Tabelle 23**). Drei generalistische Knoten aus HyMe waren zudem Vertreter des Phylums *Bacteroidetes*. Die Generalisten der Netzwerke unterschieden sich bei den unterschiedlichen Methanogenesewegen. Lediglich zwei Knoten waren anhand ihrer Topologie Generalisten in mehr als einem Netzwerk. Knoten S0024 (*P. bacterium 1109*) war Module Hub in AcMe und HyMe sowie Peripheral in BoMe. S0016 (*D. tunisiensis*) war als Module Hub in den Netzwerken HyMe und BoMe vertreten und kein Teil des Netzwerkes von AcMe. Beide Knoten hatten außerdem eine hohe Flexibilität hinsichtlich ihrer Interaktionspartner und/oder Interaktionsart. Für *P. bacterium 1109* wurden mit einer einzigen Ausnahme ausschließlich positive Interaktionen in beiden Netzwerken beobachtet. Allerdings waren in beiden Netzwerken lediglich vier Interaktionen mit dem gleichen Interaktionspartner vorhanden. *D. tunisiensis* hatte in HyMe ausschließlich negative Interaktionen, in BoMe hingegen waren fast 40 % positive Interaktionen. Alle Interaktionen waren dabei spezifisch für das jeweilige Netzwerk.

Für die drei bekannten SAOBs *T. phaeum* (S0034), *Clostridium ultunense* (S0060) und *S. schinkii* (S0163) konnten in keinem Netzwerk direkte Interaktionen mit hydrogenotrophen Methanogenen beobachtet werden. Allerdings waren in HyMe und BoMe deutlich mehr Interaktionen der SAOBs (AcMe: 2, HyMe: 30, BoMe: 9) mit anderen Mikroorganismen zu sehen, was indikativ für eine höhere Aktivität war.

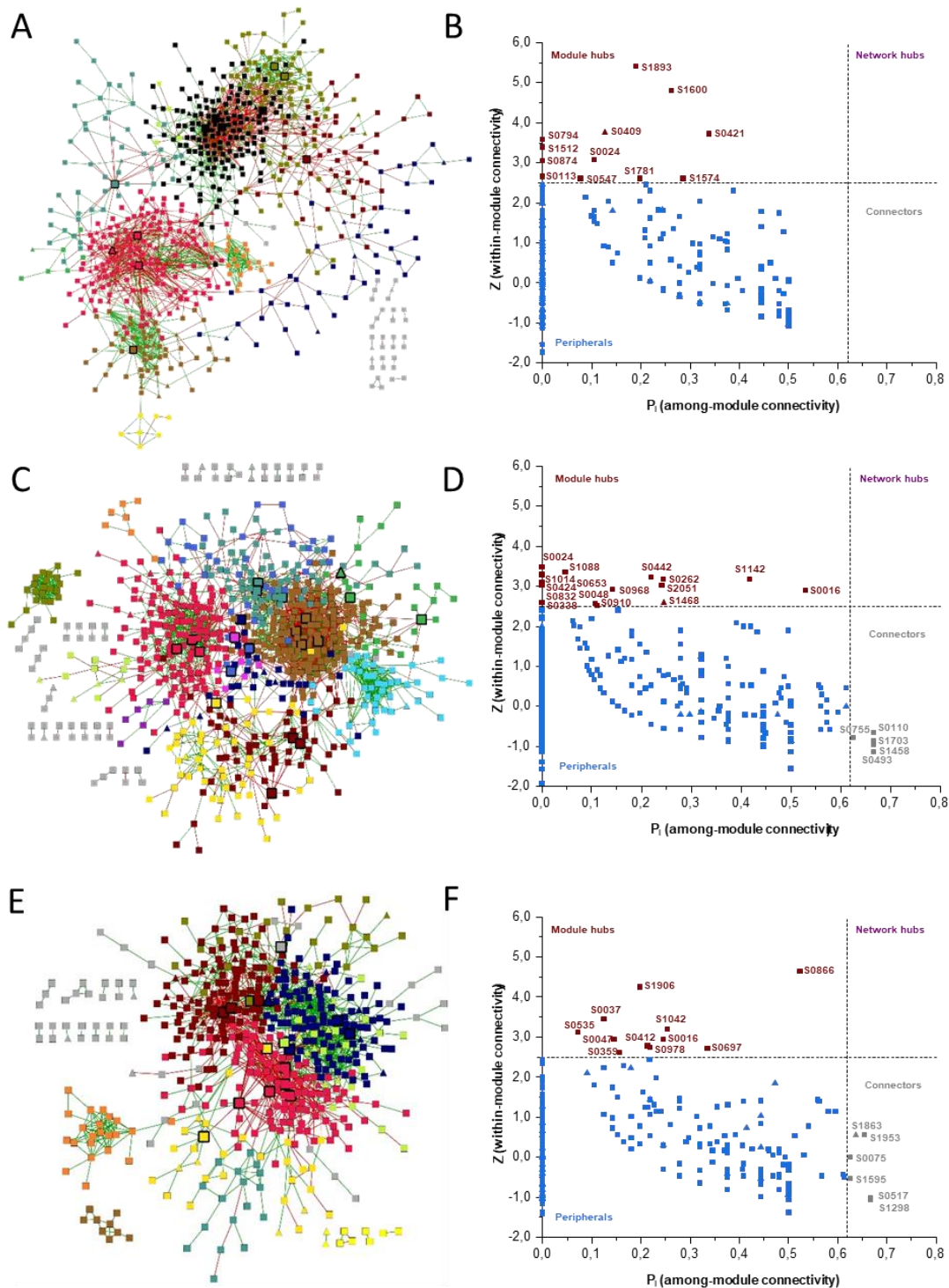


Abbildung 27: Mikrobielle Netzwerke und zugehörige topologische Rollen aller Knoten (übernommen aus Buettner et al. 2019)

Die Netzwerke wurden getrennt nach vorrangigen Methanogeneseweg (AcMe: acetoklastisch, A, B; HyMe: hydrogenotroph, C, D; BoMe: beide Methanogenesewege, E, F) berechnet. Bakterielle Knoten sind jeweils als Quadrat, archaelle Knoten als Dreieck dargestellt. Rote Kanten stehen für eine negative, grüne Kanten für eine positive Interaktion. Die Beschriftungen in den Z-P-Plots geben die taxonomische Zuordnung auf Speziesebene an (Tabelle AE07). Eine Übersicht aller Knoten und Kanten für jedes Netzwerk findet sich im Anhang (Tabelle AE10).

Tabelle 23: Knoten mit generalistischer Rolle im jeweiligen Netzwerk

Die ID gibt die Spezieszuordnung im Netzwerk an (Tabelle AE07). Die Knoten wurden anhand ihrer Topologie (Z_i und P_i) als Generalisten identifiziert und sind nach ihrer topologischen Rolle und der absteigenden mittleren relativen Abundanz im jeweiligen Netzwerk sortiert.

ID	Kanten			Rolle	Phylum	Spezies	Mittlere rel. Abundanz [%]		
	Gesamt (pos./neg.)	Inside Module	Outside Module				AcMe	HyMe	BoMe
AcMe									
S0024	18 (18/0)	17	1	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Peptococcaceae bacterium 1109</i>	1.952	6.985	5.501
S0409	30 (5/25)	28	2	Module Hub	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanomethylovorans hollandica</i>	0.121	0.025	0.102
S0113	23 (23/0)	23	0	Module Hub	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Arthrospira platensis (Spirulina platensis)</i>	0.072	0.042	0.053
S0874	24 (3/21)	24	0	Module Hub	<i>Candidatus Gottesmanbacteria</i>	<i>Candidatus Gottesmanbacteria bacterium GW2011_GWA1_47_8</i>	0.009	0.018	0.060
S0794	19 (19/0)	19	0	Module Hub	<i>Proteobacteria</i>	<i>Luminiphilus syltensis</i>	0.006	0.023	0.019
S1512	29 (3/26)	29	0	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium sp. CAG:306</i>	0.006	0.018	0.014
S0547	25 (12/13)	24	1	Module Hub	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella ruminicola (Bacteroides ruminicola)</i>	0.005	0.000	0.001
S0421	15 (0/15)	12	3	Module Hub	<i>Proteobacteria</i>	<i>Robbsia andropogonis</i>	0.004	0.005	0.002
S1781	27 (1/26)	24	3	Module Hub	<i>Thermotogae</i>	<i>Marinitoga piezophila</i>	0.004	0.021	0.020
S1574	29 (0/29)	24	5	Module Hub	<i>Actinobacteria</i>	<i>Williamsia sp. D3</i>	0.003	0.010	0.007
S1600	40 (0/40)	34	6	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes bacterium CAG:882</i>	0.002	0.000	0.001
S1893	19 (0/19)	17	2	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	0.001	0.002	0.002
HyMe									
S0024	25 (24/1)	25	0	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Peptococcaceae bacterium 1109</i>	1.952	6.985	5.501
S0016	10 (0/10)	6	4	Module Hub	<i>Thermotogae</i>	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	0.939	3.975	6.283
S0048	36 (25/11)	34	2	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>	0.449	0.238	0.279
S0424	23 (19/4)	23	0	Module Hub	<i>Thermotogae</i>	<i>Ferroidobacterium thailandense</i>	0.056	0.181	0.193
S0262	22 (19/3)	19	3	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium bornimense</i>	0.024	0.079	0.056
S0338	11 (10/1)	11	0	Module Hub	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.028	0.045	0.039
S1142	27 (4/23)	19	8	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Eubacterium sp. 3_1_31</i>	0.011	0.019	0.016
S1088	42 (15/27)	41	1	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Solibacillus silvestris</i>	0.003	0.018	0.005
S1014	24 (18/6)	24	0	Module Hub	<i>Chloroflexi</i>	<i>Dehalogenimonas alkenigignens</i>	0.004	0.017	0.015
S0968	13 (12/1)	12	1	Module Hub	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Macellibacteroides sp. HH-ZS</i>	0.003	0.015	0.007
S0442	8 (0/8)	7	1	Module Hub	<i>Proteobacteria</i>	<i>marine gamma proteobacterium HTCC2148</i>	0.007	0.013	0.014
S0653	11 (0/11)	11	0	Module Hub	<i>Acidobacteria</i>	<i>Solibacter usitatus</i>	0.005	0.006	0.001
S0832	38 (3/35)	38	0	Module Hub	<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonas sp. SM23_52</i>	0.003	0.005	0.003
S2051	44 (16/28)	38	6	Module Hub	<i>Proteobacteria</i>	<i>Kangiella koreensis</i>	0.000	0.004	0.002
S1468	7 (0/7)	6	1	Module Hub	<i>Crenarchaeota</i>	<i>Thermogladius calderae</i>	0.000	0.003	0.001
S0910	17 (0/17)	16	1	Module Hub	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonas atlantica (Alteromonas atlantica)</i>	0.002	0.001	0.002
S0110	3 (3/0)	1	2	Connector	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Dyadobacter fermentans</i>	0.040	0.031	0.020
S0755	4 (3/1)	2	2	Connector	<i>Proteobacteria</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i>	0.003	0.014	0.010
S1703	3 (0/3)	1	2	Connector	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus alvei (Bacillus alvei)</i>	0.000	0.013	0.001
S0493	3 (0/3)	1	2	Connector	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Leptolyngbya sp. NIES-2104</i>	0.007	0.003	0.003
S1458	3 (0/3)	1	2	Connector	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus bataviensis</i>	0.000	0.001	0.001
BoMe									
S0016	43 (17/26)	31	12	Module Hub	<i>Thermotogae</i>	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	0.939	3.975	6.283
S0037	30 (28/2)	28	2	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>	0.199	0.327	0.376
S0978	8 (7/1)	7	1	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Streptococcus suis</i>	0.057	0.743	0.307
S0535	27 (27/0)	26	1	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Oxobacter pfennigii</i>	0.048	0.107	0.105
S0047	26 (2/24)	24	2	Module Hub	NA	<i>Parcubacteria group bacterium GW2011_GWA1_59_11</i>	0.038	0.006	0.041
S0359	24 (0/24)	22	2	Module Hub	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria bacterium SG8_31</i>	0.004	0.001	0.024
S0866	37 (5/32)	24	13	Module Hub	<i>Proteobacteria</i>	<i>Candidatus Magnetomorum sp. HK-1</i>	0.004	0.007	0.020
S0697	20 (10/10)	16	4	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Acetohalobium arabaticum</i>	0.003	0.006	0.006
S1906	36 (3/33)	32	4	Module Hub	<i>Firmicutes</i>	<i>Ruminococcus sp. CAG:254</i>	0.000	0.002	0.005
S1042	21 (10/11)	18	3	Module Hub	<i>Proteobacteria</i>	<i>Hyphomicrobium sp. (strain MC1)</i>	0.002	0.002	0.003
S0412	26 (2/24)	23	3	Module Hub	<i>Actinobacteria</i>	<i>Nocardia sp. NRRL S-836</i>	0.007	0.001	0.002
S0075	4 (4/0)	2	2	Connector	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium sp. CAG:299</i>	0.074	0.089	0.093
S1595	4 (2/2)	2	2	Connector	<i>Proteobacteria</i>	<i>Desulfovibrio piger</i>	0.001	0.012	0.012
S0517	3 (0/3)	1	2	Connector	<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	0.010	0.008	0.010
S1953	32 (7/25)	11	21	Connector	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus litoralis</i>	0.009	0.018	0.004
S1863	25 (3/22)	11	14	Connector	<i>Euryarchaeota</i>	<i>Ferroglobus placidus</i>	0.003	0.000	0.003
S1298	3 (0/3)	1	2	Connector	<i>Firmicutes</i>	<i>Cohnella kolymensis</i>	0.000	0.001	0.001

3.3.7.3 Konservierte mikrobielle Interaktionsmuster

Durch Vergleich aller Netzwerke konnten 35 verschiedene Spezies identifiziert werden, deren Interaktionsmuster in allen Netzwerken identisch war. Diese Spezies waren an 51 Interaktionen beteiligt (**Abbildung 28**). Alle netzwerkunabhängig konservierten Interaktionen waren dabei positiv. Unter diesen 35 Spezies waren 15 *Pseudomonas spp.*, die in allen Netzwerken durch 37 Interaktionen (vgl. blaue Gruppe aus **Abbildung 28**) miteinander verbunden waren. Mit Ausnahme von *P. fluorescens* waren keine abundanten Spezies darunter.

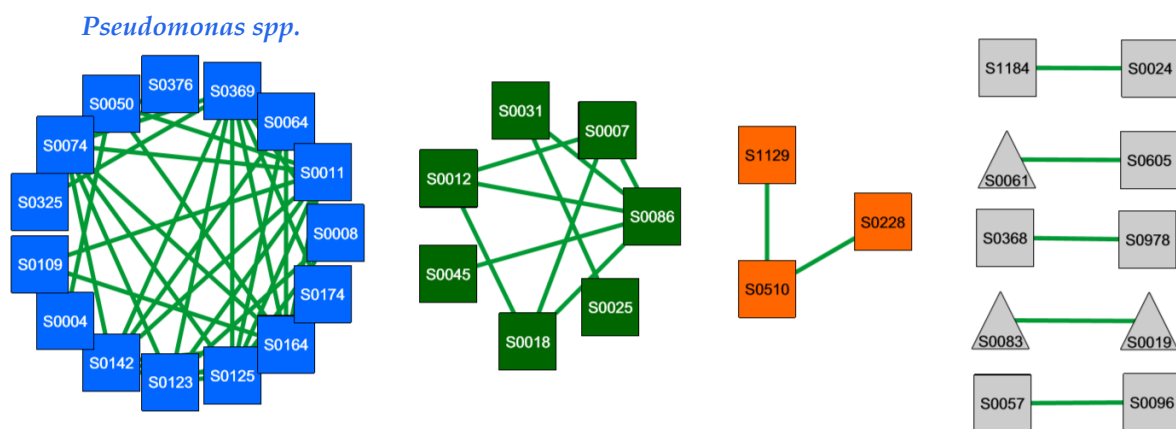
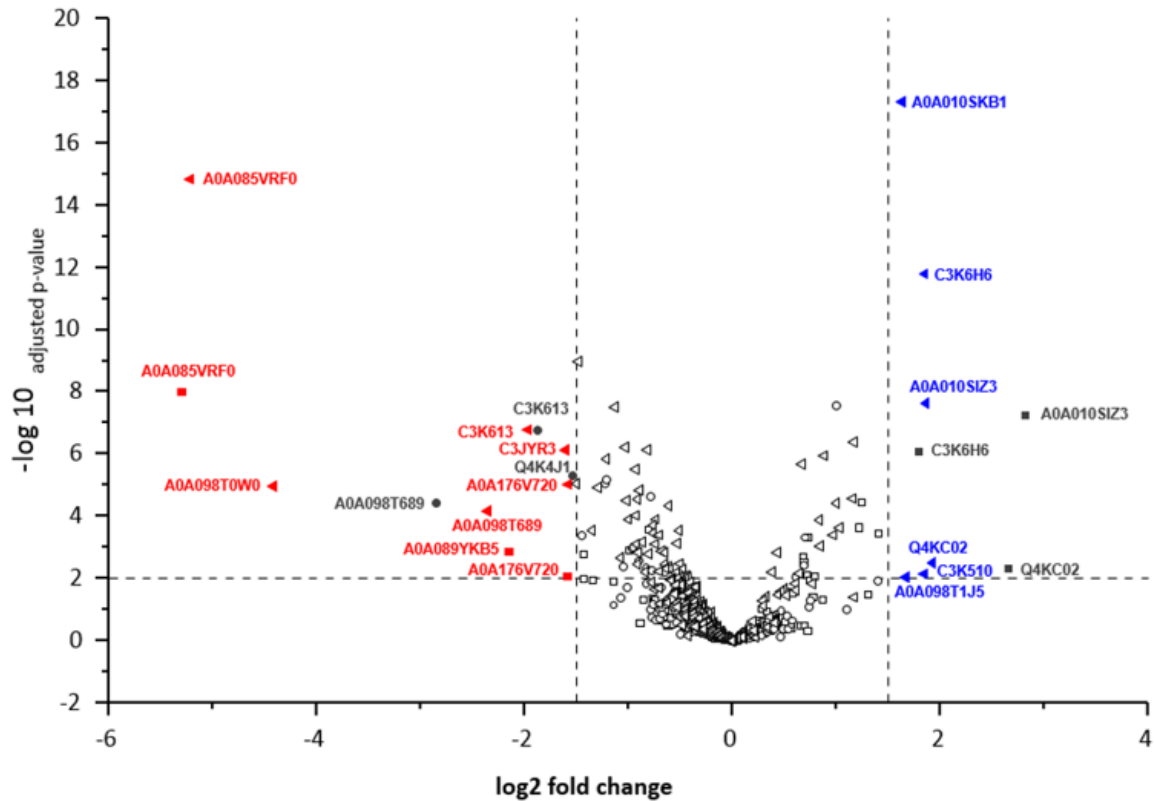


Abbildung 28: Konservierte Interaktionen in allen Netzwerken (modifiziert übernommen aus Buettner et al. 2019)

Die verschiedenen Gruppen der miteinander interagierenden Spezies sind farblich markiert. Diese Farben stehen in keinem Zusammenhang mit den Modulfarben aus den einzelnen Netzwerken. Die vollständige taxonomische Zuordnung der Spezies-ID findet sich im Anhang (**Tabelle AE10**).

Neben den Interaktionsmustern war auch die Proteinexpression der 15 *Pseudomonas spp.* stark konserviert (**Abbildung 29**). Die meisten der abundanten Proteine wie die Succinat-CoA-Ligase oder die Enolase stammten dabei von *P. fluorescens*. Die Abundanzen der Enolase (Uniprot-Accession: C3K6H6) und der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Reduktase waren in HyMe und BoMe signifikant höher als in AcMe. Im Gegensatz dazu wurden in AcMe höhere Abundanzen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (A0A176V720) oder die Alpha-Untereinheit des Fettsäureoxidations-Komplexes (C3K613) detektiert.



- ◁ Kein Unterschied in AcMe-HyMe (264) ◀ Hochreguliert in AcMe (6) ◀ Hochreguliert in HyMe (6)
 ○ Kein Unterschied in HyMe-BoMe (269) ● Hochreguliert in HyMe (0) ● Hochreguliert in BoMe (3)
 □ Kein Unterschied in AcMe-BoMe (289) ■ Hochreguliert in AcMe (6) ■ Hochreguliert in BoMe (3)

Abbildung 29: Expression aller für die 15 *Pseudomonas spp.* gefundenen Proteine in Abhängigkeit des dominanten Methanogenesewegs (modifiziert übernommen aus Buettner et al. 2019).

Die unterschiedliche Expression wurde separat für jeden der drei Vergleiche (AcMe-HyMe: ◁; HyMe-BoMe: ○; AcMe-BoMe: □) berechnet. Die unterschiedlich stark exprimierten Proteine sind dabei farblich gekennzeichnet und mit der entsprechenden Uniprot-ID gekennzeichnet. Die berechneten p-Werte wurden nach Benjamini und Hochberg (Benjamini und Hochberg 1995) korrigiert.

4 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung zeigen, dass sich mikrobielle Gemeinschaften und deren mikrobielle Interaktionsmuster in den BPs und STPs voneinander unterscheiden (vgl. 3.2). Die funktionelle Charakterisierung der BPs erlaubte die Trennung der BPs hinsichtlich ihrer Prozessparameter, die Zuweisung des vorherrschenden Hauptmethanogenesewegs und die Identifikation möglicher Biomarker für die Prozessüberwachung (3.3). Die wichtigsten Beobachtungen auf 16S rRNA Gen-Ebene sowie auf Proteinebene sollen im folgenden Kapitel diskutiert werden (4.1 und 4.2). Auf die Unterschiede zwischen beiden Ebenen wird anhand ausgewählter Beispiele am Ende des Kapitels ebenfalls näher eingegangen (4.3).

4.1 Mikrobielle Gemeinschaften der anaeroben Gärung

Im folgenden Unterkapitel werden die Ergebnisse der 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung diskutiert. Dabei wird zunächst auf die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Diversität in BPs und STPs eingegangen (4.1.1). Anschließend werden mögliche Gründe für die unterschiedlichen Kernmikrobiome in beiden Anlagentypen angeführt (4.1.2) und der Einfluss der Prozessparameter auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft diskutiert (4.1.3). Zuletzt werden die Unterschiede der mikrobiellen Interaktionsmuster in beiden Anlagentypen erörtert (4.1.4).

4.1.1 Unterschiede in der Diversität zwischen den Anlagentypen

Für STPs wurde im Vergleich zu BPs eine signifikant höhere Richness (**Tabelle A01**) und Diversität (**Tabelle A02**) festgestellt. Dies kann mit der ökologischen Versicherungshypothese (Yachi und Loreau 1999) erklärt werden, nach der eine hohe taxonomische Diversität der Schlüssel für stabile und robuste biologische Prozesse ist. Bei sehr divers zusammengesetzten Gemeinschaften kann mit einer hohen funktionellen Redundanz gerechnet werden. Das Ausmaß der, für einen stabilen Prozess erforderlichen, funktionellen Redundanz ist dabei abhängig von der Stabilität

der Umweltparameter des jeweiligen Systems, weshalb in Prozessen mit stabilen Prozessparametern eine geringere funktionelle Redundanz nötig ist (Konopka et al. 2015). Während Prozessbedingungen wie pH-Wert und Temperatur sowohl in BPs als auch STPs engmaschig kontrolliert und eingehalten werden, unterscheiden sich beide Anlagentypen in der Stabilität des Substratspektrums. BPs werden in der Regel mit einem festgelegten Substratspektrum gefahren, was dazu führt, dass die mikrobielle Gemeinschaft optimal an die Substratbedingungen adaptiert ist und auch über Jahre stabil bleibt (Bengelsdorf et al. 2013; Calusinska et al. 2018). Folglich konnten eine geringere Richness und Diversität in BPs beobachtet werden. Da eine höhere Diversität positiv mit dem Grad der funktionellen Redundanz korreliert, kann davon ausgegangen werden, dass in den BPs auch eine geringere funktionelle Redundanz vorhanden war (McMahon et al. 2007; Langer et al. 2015; Venkiteshwaran et al. 2015). In STPs hingegen existiert kein festes Substratspektrum, da die Substratzusammensetzung einerseits von der Wetterlage (z.B. Anteil an Oberflächenwasser), aber auch von der Art und Menge der Abwässer der angeschlossenen Industrien abhängig ist. Dementsprechend erfolgt in den STPs keine ausgeprägte Adaption der mikrobiellen Gemeinschaft an die Prozessparameter, so dass in STPs eine höhere taxonomische, und damit auch funktionelle Diversität zu finden war (**Abbildung 07**). Die fehlende Adaption führte wahrscheinlich auch zur schwächeren Ausprägung der Dominanz spezifischer Mikroorganismen in STPs, was die höheren Evenness-Werte erklärt (**Tabelle A02**).

In beiden Anlagentypen war die bakterielle Diversität höher als die archaelle (**Tabelle A01**). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Studien gemacht (Nelson et al. 2011; Ros et al. 2017; Li et al. 2013; Guo et al. 2015). Diese Erkenntnis beruht wahrscheinlich auf der unterschiedlichen funktionellen Rollenverteilung von Bakterien und Archaeen bei der AD. Während Bakterien in den ersten drei Schritten der AD (Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese) aktiv sind und somit eine Vielzahl von Substraten umsetzen, sind Archaeen hauptsächlich bei der Methanogenese aktiv (Theuerl et al. 2015), wodurch das Substratspektrum der Archaeen deutlich eingeschränkter ist. Bekräftigt wurde dies durch die durchschnittlichen, relativen Abundanzen von Bakterien und Archaeen. In BPs erreichten Archaeen eine

durchschnittliche relative Abundanz von 1,14 % und in STPs 4,64 % (**Tabelle A01**). Ähnliche Abundanzen wurden sowohl für BPs (Theuerl et al. 2015) als auch STPs (Yang et al. 2014) beschrieben. Vergleichbar mit anderen Studien (Moset et al. 2015; Gagliano et al. 2015; Li et al. 2015; Guo et al. 2014) war die, im Vergleich zu den mesophilen Anlagen, geringere Diversität in den thermophilen Anlagen BP15 und BP16 (**Tabelle A02**). Der Grund dafür war der hohe Selektionsdruck des thermophilen Temperaturregimes, der dazu führt, dass an höhere Temperaturen adaptierte Spezies dominant werden und dabei andere, weniger gut angepasste, Mikroorganismen verdrängen (Vanwonterghem et al. 2015). Diese Dominanz wurde auch in der geringeren Evenness (**Tabelle A02**) in den thermophilen BPs ersichtlich.

4.1.2 Unterschiedliche Kernmikrobiome in BPs und STPs

In dieser Arbeit wurden die Kernmikrobiome von BPs und STPs als die OTUs definiert, die in allen Anlagen des jeweiligen Anlagentyps vorhanden waren. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten in denen das Kernmikrobiom als OTUs definiert wurden, die in 80% (Calusinska et al. 2018) oder 90% (Rui et al. 2015) der Anlagen vorgekommen sind, wurden in dieser Arbeit sehr stringente Ausschlusskriterien gewählt, um ein stark konserviertes Kernmikrobiom identifizieren zu können. In den BPs wurde ca. 95 % der bakteriellen Gesamtabundanz durch das Kernmikrobiom erklärt, das ca. 20 % der bakteriellen OTUs beinhaltet (**Abbildung 09**). In den STPs bestand das Kernmikrobiom trotz höherer Diversität aus ca. 33 % der bakteriellen OTUs, welche allerdings lediglich 70 % zu der Gesamtabundanz beitrugen (**Abbildung 10**). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Pareto-Prinzip, welches auch auf mikrobielle Gemeinschaften angewandt werden kann (Verstraete et al. 2007). Es besagt, dass ca. 20 % der Spezies für 80 % des Energieflusses bzw. 80 % der Gesamtabundanz verantwortlich sind (Vrieze und Verstraete 2016; Theuerl et al. 2018). Diese 20 % der Spezies können aus ökologischer Sicht als Mikroorganismen angesehen werden, die eine hohe Toleranz für verschiedene Prozessbedingungen besitzen und deshalb in allen BPs bzw. STPs in hohen relativen Abundanzen zu finden waren (Theuerl et al. 2018). Daher können diese Mikroorganismen in Bezug auf Veränderungen der Ökosystemsituation als robust interpretiert werden. Die

verbleibenden Spezies hingegen waren Spezialisten, die ökologische Nischen in den Anlagen besetzen und nur bei einem relativ engen Spektrum an Prozessparametern aktiv waren. Aufgrund der unterschiedlichen Prozessparameter innerhalb der BPs und STPs konnten diese deshalb nur in einer geringeren Anzahl an Anlagen beobachtet werden.

Trotz geringerer Diversität der Archaeen (**Tabelle A01**), hatten die OTUs des Kernmikrobioms lediglich einen Anteil von 55 % (BPs) bzw. 44 % (STPs) an den relativen Gesamtabundanzen in den Anlagen (**Abbildung 09, Abbildung 10**). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die methanogenen Nischen sowohl innerhalb als auch zwischen den Anlagentypen von unterschiedlichen Archaeen besetzt wurden, die sich an die Prozessparameter der jeweiligen Anlagen adaptiert haben. Der geringe Beitrag des archaellen Kernmikrobioms zur Gesamtabundanz kann durch das Vorhandensein von Mikroorganismen erklärt werden, die lediglich in einer begrenzten Anzahl an Anlagen gefunden wurden, dort aber gleichzeitig in hohen Abundanzen vorkamen. Ein Beispiel dafür war OTU0038 (Genus *Methanosarcina*), die in 14 der 16 BPs gefunden wurde, aber Abundanzen von bis zu 87 % (BP02) hatte (**Tabelle AE01**). In STPs waren die OTUs 00127 und OTU00141 (beide Genus *Methanosaetaceae*) in neun von zehn STPs vorhanden und hatten einen Anteil von bis zu 45 % (OTU00141 in STP01) an der Gesamtabundanz (**Tabelle AE01**). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die dominanten Bakterien innerhalb der BPs und STPs stark konserviert waren, wohingegen sich archaelle Schlüsselorganismen stärker zwischen den einzelnen Anlagen unterscheiden haben. Die Zusammensetzungen der Kernmikrobiome unterschieden sich außerdem grundlegend zwischen den BPs und STPs (**Abbildung 11 und Tabelle 13**). Dabei wurde auf bakterieller Ebene in den BPs eine Dominanz von den bisher nicht kultivierten Ordnungen *MBA08* und *SHA-98* beobachtet, wohingegen in STPs *Cloacamonaceae* und *Anaerolinaceae* dominierten. Obwohl die Ordnung *MBA08* erstmals in einem thermophilen Biogasreaktor entdeckt wurde (Tang et al. 2004), ist diese auch in landwirtschaftlichen, mesophilen Biogasreaktoren gefunden worden (Weithmann et al. 2016). Man kann deshalb davon ausgehen, dass die Mitglieder der Ordnung *MBA08* eine hohe Temperaturtoleranz besitzen (Sun et al. 2016), was die Dominanz

und Existenz in den BPs erklärt. Über die Funktion der Ordnung *SHA-98* während der AD ist bisher wenig bekannt, es wird aber vermutet, dass es sich um FOS-oxidierende Mikroorganismen handeln könnte (Jiang et al. 2019). Die Familie *Anaerolinaceae* beinhaltet fermentative Bakterien, die oftmals Acetat bilden und deshalb häufig gemeinsam mit dem acetoklastischen Genus *Methanosaeta* auftreten (Liang et al. 2015; McIlroy et al. 2017). Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (**Abbildung 15**). Die Familie *Cloacamonaceae* wurde bisher positiv mit der Produktion von Propionat und Methan, aber negativ mit der Acetatproduktion korreliert (Miceli et al. 2016). Möglicherweise spielen diese Mikroorganismen deshalb eine bedeutende Rolle beim Umsatz von Stoffwechselintermediaten der Fermentation.

Auch die archaellen Kernmikrobiome haben sich zwischen beiden Anlagentypen unterschieden (**Tabelle 13**). Im Kernmikrobiom der BPs war eine klare Dominanz der hydrogenotrophen Familien *Methanomicrobiaceae* und *Methanobacteriaceae* zu beobachten, wohingegen in den STPs die Familien *WSA2*, *Methanobacteriaceae* und *Methanosaeta* dominierten. Dies lässt den Schluss zu, dass in den BPs überwiegend HyMe stattgefunden hat. Die Zusammensetzung des archaellen Kernmikrobioms in STPs deutet darauf hin, dass Methan in den beprobten STPs über BoMe produziert wurde, was im Gegensatz zu anderen Studien steht (Kirkegaard et al. 2017). In dieser Studie wurde überwiegend AcMe durch das Genus *Methanosaeta* beobachtet. Genomanalysen von *WSA2* lassen den Schluss zu, dass es sehr wahrscheinlich die ersten Methanogenen sind, deren Methanogeneseprozess auf der Reduktion von methylierten Thiolverbindungen basiert (Nobu et al. 2016). Aufgrund dieser Reaktion konkurrieren sie möglicherweise auch mit Sulfatreduzierern und haben damit auch Einfluss auf die Bildung von H_2S in den STPs (Calusinska et al. 2018). Neben AcMe und HyMe, scheint also in STPs auch die methylotrophe Methanogenese eine bedeutende Rolle zu spielen. Es ist denkbar, dass dafür die höhere bakterielle Diversität verantwortlich ist, durch die der methanogenen Gemeinschaft ein breiteres Spektrum an Substraten zur Verfügung gestellt werden kann.

4.1.3 Einfluss der Umweltparameter auf die mikrobielle Zusammensetzung

In BPs konnte sowohl für die Temperatur, als auch für den pH-Wert ein signifikanter Einfluss auf die bakterielle Gemeinschaft nachgewiesen werden, während die archaelle Gemeinschaft lediglich von einzelnen Substraten beeinflusst wurde (**Tabelle 14**). Dies konnte durch die Ergebnisse der CA bestätigt werden, bei der die thermophilen Anlagen (BP15, BP16) keinem Cluster zugeordnet werden konnten (**Abbildung 12**). Die euklidische Distanz von BP15 und BP16 zu den mesophilen Anlagen verdeutlichte, dass die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften von der Temperatur abhängig war. Eine mögliche Erklärung lieferte die Korrelationsanalyse: die negativen Korrelationen abundanter Familien wie *Ruminococcaceae* oder *Tissierellaceae* mit der Temperatur (vgl. 3.2.5) deuten darauf hin, dass diese Mikroorganismen, welche der hydrolytischen Ordnung *Clostridiales* angehörten, v.a. in mesophilen Anlagen einen bedeutenden Beitrag zur Hydrolyse geleistet haben. In thermophilen Anlagen hingegen scheinen diese eine weniger wichtige Rolle gespielt zu haben, was in Kontrast zu anderen Studien steht (Tang et al. 2008; Moset et al. 2015; Vanwonterghem et al. 2015). In diesen Arbeiten wurden allerdings Reaktoren im Kleinmaßstab genutzt, in denen die Verweilzeit der Substrate lediglich einige Tage betrug, was eine effektive Adaption der mikrobiellen Gemeinschaft an die Prozessbedingungen gestört haben könnte. Erschwerend für die Vergleichbarkeit ist außerdem die Verwendung anderer Primerpaare und/oder deutlich geringere Sequenziertiefen in den genannten Veröffentlichungen.

Auffällig war außerdem der hohe Anteil an OTU0006 (Genus *Defluviitoga*) in den thermophilen Anlagen (**Tabelle AE02**). Vertreter dieses Genus sind hydrolytisch aktiv und zumeist thermophil, was die hohe Abundanz in den Anlagen mit thermophilen Temperaturregime erklärt (Maus et al. 2016a). Die meisten hydrolytischen Bakterien gehören zu den Phyla *Firmicutes* oder *Bacteroidetes* (Vrieze et al. 2018). Während ersteres Phylum bei BP16 deutlich erniedrigte Abundanzen aufwies, war letzteres bei BP15 vergleichsweise selten zu finden. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass bei hohen Temperaturen Vertreter des Genus *Defluviitoga* eine Schlüsselrolle bei der Hydrolyse einnahmen und andere hydrolytische Mikroorganismen verdrängt haben.

Auch wenn mittels CCA gezeigt wurde, dass der pH-Wert einen signifikanten Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft hatte, konnten keine Korrelationen auf den verschiedenen taxonomischen Ebenen beobachtet werden (vgl. 3.2.5). Alle beprobten BPs waren einstufige Anlagen (d.h. die Hydrolyse und die darauffolgenden Schritte waren räumlich nicht voneinander getrennt). In der Praxis werden derartige Anlagen deshalb im leicht basischen Bereich gefahren, um das pH-Optimum der Methanogenen zu gewährleisten. Die pH-Werte lagen somit vermutlich zu eng beieinander, um gezielte Schlussfolgerungen zu ziehen und die Abhängigkeit einzelner Mikroorganismen näher definieren zu können.

Rindergülle und Getreide waren Substratkomponenten, die einen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der archaeellen Gemeinschaft hatten (**Tabelle 14**). Bei der Verwendung von Rindergülle kann es zu einem Eintrag der ursprünglichen archaeellen Gemeinschaft in die Biogasanlage kommen (Senés-Guerrero et al. 2019). Dieser Effekt tritt vor allem während der Startphase einer Biogasanlage auf und verliert mit der Zeit aufgrund der mikrobiellen Adaption immer mehr an Bedeutung (Goux et al. 2016). Da alle beprobten Anlagen bereits seit Jahren stabil liefen, ist dieser Effekt zu vernachlässigen. Es ist stattdessen zu vermuten, dass sich in allen Anlagen eine individuelle, archaeelle Gemeinschaft gebildet hat, die sich gut an die jeweiligen Substratbedingungen angepasst hat. Da Archaeen allerdings hauptsächlich Energie durch die Methanogenese generieren, muss auch berücksichtigt werden, dass sich die archaeelle Gemeinschaft ebenso an die vorliegende bakterielle Gemeinschaft anpasst, welche das methanogene Substratspektrum im großen Maße beeinflusst.

Obwohl kein signifikanter Einfluss der FOS-Konzentration auf die archaeelle Gemeinschaft festgestellt werden konnte, wurde eine Vielzahl an Korrelationen beobachtet (vgl. 3.2.5). Dabei korrelierten hohe FOS-Konzentrationen in den Anlagen signifikant mit hohen Abundanzen der Familien *Methanomassillicoccaceae* und *Methanomicrobiaceae* (**Tabelle 12** und **Abbildung 13A**). Beide sind strikt hydrogenotrophe Familien, deren Dominanz sehr wahrscheinlich zu einer Akkumulation von Acetat und anderen FOS geführt hat. Im Gegensatz dazu bestanden die archaeellen Gemeinschaften der Anlagen mit niedrigeren FOS-Werten zu größeren Anteilen aus den acetoklastischen Familien *Methanosaetaceae* und

Methanosarcinaceae. Vertreter der letzteren Familie weisen oftmals ein sehr diverses Substratspektrum auf und sind in der Lage, AcMe, HyMe und auch methylo trope Methanogenese zu betreiben (Ferguson et al. 1996; Ferry 1999; Ferry 2011). Insbesondere die niedrigen Acetatkonzentrationen lassen vermuten, dass in den Anlagen mit hohen Anteilen an *Methanosarcinaceae* zu großen Teilen AcMe stattgefunden hat. Allerdings muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass SAOBs in den Anlagen besonders aktiv gewesen sind. Dann hätte einerseits überwiegend HyMe stattgefunden, während zugleich nur niedrige Acetatkonzentrationen zu beobachten gewesen wären.

Im Gegensatz zu den BPs konnte bei STPs kein signifikanter Einfluss der Umweltparameter auf die bakterielle Gemeinschaft festgestellt werden (**Tabelle 14**), was möglicherweise in Zusammenhang mit der Wahl der Prozessparameter bzw. Auswahl der Kläranlagen steht. In dieser Arbeit konnten ausschließlich mesophile Anlagen beprobt werden, wodurch die Prozesstemperaturen in einem eng umgrenzten Bereich lagen, was die Beobachtung eines signifikanten Einflusses erschwert hat. Weiterhin mussten für die CCA viele erfasste Parameter entfernt werden, da diese Kollinearitäten (z.B. BOD, COD) aufwiesen (vgl. 2.5.5.5). Zusätzlich konnten die Anteile der angeschlossenen Industrien nur schlecht genauer beschrieben werden, da diese stark schwanken und nur sehr schwer zu quantifizieren sind.

Dennoch legen die Ergebnisse der Arbeiten von Meerbergen et al. und Zhang et al. nahe, dass die Substratzusammensetzung auch in STPs einen Einfluss auf die vorliegende mikrobielle Gemeinschaft hat (Meerbergen et al. 2017; Zhang et al. 2018). Alle Anlagen wiesen, mit Ausnahme der Anlage STP10, pH-Werte im optimalen Bereich von 6,5 – 7,5 für die anaerobe Gärung in STPs auf (Liu et al. 2008). Obwohl die pH-Werte der beprobten SPTs vergleichsweise eng (Range 7,00 – 7,65) beieinander lagen (**Tabelle 08**), konnte eine Vielzahl an signifikanten Korrelationen auf verschiedenen taxonomischen Ebenen beobachtet werden. Eine tiefergehende Diskussion der Abhängigkeit einzelner Mikroorganismen vom pH-Wert ist allerdings durch die oftmals unvollständige taxonomische Zuordnung der Mikroorganismen nicht zielführend.

4.1.4 Identifikation mikrobieller Interaktionsmuster mittels Netzwerkanalysen

Die berechneten Netzwerke für beide Anlagentypen unterschieden sich deutlich voneinander (3.2.6). Im Folgenden werden deshalb die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Komplexität der Netzwerke (3.3.7.1), den Schlüsselorganismen des jeweiligen Anlagentyps (3.3.7.2) und den mikrobiellen Interaktionsmustern diskutiert (3.3.7.3).

4.1.4.1 Komplexität der Netzwerke

Das Netzwerk der STPs hatte deutlich mehr Knoten auf (275) als das Netzwerk der BPs (183) (Tabelle 15). Bei Berücksichtigung der jeweiligen OTU-Ausgangsmatrix sind sowohl bei den BPs, als auch bei den STPs knapp 46 % der ursprünglichen OTUs auch im Netzwerk vertreten. Die Selektivität der Netzwerkberechnungen war also in beiden Netzwerken nahezu identisch, wodurch die Netzwerke gut miteinander verglichen werden konnten. Beide Netzwerke wiesen jeweils einen höheren durchschnittlichen Clusterkoeffizienten auf als die zufällig berechneten Netzwerke. Dies spricht, ebenso wie die im Vergleich zu den Zufallsnetzwerken höhere Modularität, für das Kleinwelt-Phänomen in beiden Netzwerken (Lu et al. 2013).

Im BP-Netzwerk war die durchschnittliche Konnektivität der OTUs höher als im STP-Netzwerk (Tabelle 15). Eine mögliche Erklärung findet sich dabei in der jeweiligen Substratsituation beider Anlagentypen. Aufgrund der Kontinuität der Substratbeschickung in den BPs entstanden stabile ökologische Nischen, die von definierten, gut adaptierten Mikroorganismen besetzt wurden, wodurch sich stabile Interaktionsmuster ausbilden konnten. Die hohe Stabilität der ökologischen Nischen führte wahrscheinlich allerdings auch dazu, dass eine Vielzahl von Mikroorganismen dieselbe Nische besetzt haben, was zu erhöhten Konkurrenzsituationen führte, weshalb ein hoher Anteil der Interaktionen negativ war (Tabelle 15). In den STPs hingegen entstanden durch die diskontinuierliche Substratzusammensetzung ständig neue ökologische Nischen, weshalb für einen stabilen Abbau zum einen mehr Netzwerkmitglieder nötig waren und diese zum anderen auch zu verstärkter Zusammenarbeit aufgrund der notwendigen Spezialisierung gezwungen waren. Dies

wurde in den Netzwerken sowohl durch die höhere Anzahl an Knoten, als auch den höheren Anteil an positiven Interaktionen deutlich. Der hohe Spezialisierungsgrad aufgrund der Vielzahl an ökologischen Nischen wurde zudem auch an der, im Vergleich zum BP-Netzwerk höheren Anzahl an Modulen im STP-Netzwerk deutlich (**Tabelle 15**). Es ist möglich, dass die einzelnen Module aus Mikroorganismen bestanden, welche sich auf die Verwertung bestimmter Substrate bzw. Stoffwechselprodukte spezialisiert hatten. Die Prüfung dieser These war aufgrund der oftmals fehlenden Informationen zu der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen in dieser Arbeit leider nicht möglich.

4.1.4.2 Mikrobielle Interaktionsmuster sind abhängig vom Anlagentyp

Obwohl die meisten OTUs in beiden Anlagentypen gefunden wurden (vgl. **3.2.1**) waren die überwiegende Mehrheit der Knoten (BPs: 77 %, STPs: 85 %) und alle beobachteten Interaktionen, spezifisch für eines der beiden Netzwerke (**Tabelle AE06**). Außerdem hatte von den 42 in beiden Netzwerken vorhandenen OTUs keines eine generalistische Rolle in beiden Netzwerken. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die ökologischen Nischen in beiden Anlagentypen von unterschiedlichen OTUs besetzt wurden, was auch die voneinander abweichenden Kernmikrobiomen erklären würde (vgl. **4.1.2**). Diese unterschiedliche Nischenbesetzung führte sehr wahrscheinlich auch zu der Ausbildung der unterschiedlichen Interaktionsmuster.

Auffällig war weiterhin der deutlich höhere Anteil an Generalisten im BP-Netzwerk (21 %) im Vergleich zum STP-Netzwerk (4 %) (vgl. **3.2.6.2**). Nach der Netzwerktheorie tragen Generalisten substantiell zu einem stabilen Netzwerk bei (Deng et al. 2012; Qi et al. 2019). Legt man diese Annahme zugrunde, muss das BP-Netzwerk als stabiler angesehen werden, was wiederum eine Folge der Substratbasis in beiden Anlagentypen gewesen sein könnte. Das STP-Netzwerk wies hingegen weniger Generalisten auf, d.h. es war zwar vermutlich instabiler, dafür aber, aufgrund der stärkeren Spezialisierung der Mikroorganismen, in der Lage schneller auf Schwankungen der Substratbasis oder Änderungen der Prozessparameter reagieren zu können, was einen effizienten Substratabbau in den STPs sichergestellt hat.

Die OTUs, denen bei der topologischen Analyse des BP-Netzwerkes eine generalistische Rolle zugewiesen wurde, repräsentierten alle vier bekannten Phasen des anaeroben Abbaus (**Tabelle 16**). So gehörten einige OTUs (Connectors 0399, 0436, 0558, 0661, 0728) zur Familie *Ruminococcaceae*, deren Vertreter eine Vielzahl verschiedener Stoffwechselwege nutzen um komplexe Polysaccharide zu hydrolysieren (Yu et al. 2010; Sträuber et al. 2012; Sivagurunathan et al. 2016; Shaw et al. 2017). Von Mitgliedern der Ordnung *Bacteroidales* (OTU305 und 0310) ist bekannt, dass diese saccharolytisch und proteolytisch aktiv sind und oftmals verschiedene FOS produzieren (Krieg et al. 2010; Cardinali-Rezende et al. 2012). Weitere drei Connectors (OTUs 0379, 0396, 0574) gehörten zur Familie *Clostridiaceae*. Diese Familie besteht aus Mikroorganismen, die ein breites Substratspektrum besitzen, hydrolytisch aktiv sind und ebenfalls FOS produzieren (Wiegel et al. 2006). Auch OTU0582, welches taxonomisch dem Phylum *Spirochaetes* und der Ordnung *PL-11B10* zugeordnet werden konnte, gehörte vermutlich zu der kohlenhydratabbauenden mikrobiellen Gemeinschaft (Shelton et al. 2016). Unter den Generalisten waren auch SAOBs (OTU1059), welche dem bekannten acetat-oxidierendem Genus *Thermacetogenium* angehörten (Hattori et al. 2000; Hattori 2008; Hagen et al. 2017). Die bisher unkultivierte Ordnung *SBR1031* und die Familie *SHA-31* (OTUs 0389 bzw. 0519) verfügen über die metabolische Ausstattung für den Abbau von Cellulose. Die Ordnung *SBR1031* besitzt außerdem Schlüsselenzyme für die Acetogenese (Xia et al. 2016). Der Schritt der finalen Methanogenese war durch OTUs des acetoklastischen Genus *Methanosaeta* vertreten, dem drei OTUs angehörten. Zwei der OTUs waren Network Hubs (OTU0141 und OTU0977) und eines ein Connector (OTU0274). Hydrogenotrophe Generalisten gehörten entweder zu der Ordnung *Methanomicrobiales* (Network Hub: OTU0216; Connectors OTU0928 und 1022) oder *Methanobacteriales* (Network Hub: OTU0928; Connectors OTU0354 und 1039). Die Zuordnung der einzelnen OTUs zu den Schritten der anaeroben Gärung (**Tabelle 16**), an denen sie möglicherweise beteiligt sind, bestätigte die gut beschriebene syntrophe Interaktion zwischen SAOBs und hydrogenotrophen Mikroorganismen (Zinder und Koch 1984; Schnürer et al. 1999; Karakashev et al. 2006; Schnürer und Nordberg 2008; Li et al. 2018). Obwohl bekannt ist, dass H₂-produzierende und hydrogenotrophe

Mikroorganismen oftmals miteinander interagieren (Schink 1997; de Bok et al. 2005), konnten im Netzwerk unter den Generalisten ausschließlich negative Interaktionen (z.B. zwischen *Ruminococcaceae* und hydrogenotrophen Methanogenen) beobachtet werden. Möglicherweise sind die meisten H₂-Produzenten im Netzwerk aber auch den Spezialisten zugeordnet worden, weshalb diese Interaktionen nicht näher betrachtet wurden. Die hohe Zahl an negativen Interaktionen zwischen Mikroorganismen die an der Hydrolyse und/oder Acidogenese beteiligt waren, basierte vermutlich auf ähnlichen Substrataffinitäten der beteiligten Mikroorganismen. Die positiven Interaktionen zwischen Acetogenen (z.B. Familie *SHA-31*) und dem Genus *Methanosaeta* könnte mit den metabolischen Kapazitäten der Interaktionspartner erklärt werden. Das von den Acetogenen produzierte Acetat konnte durch acetoklastische Mikroorganismen direkt zu Methan verstoffwechselt werden. Die besondere Rolle der Methanogenen bei der AD wurde auch dadurch deutlich, dass diese an mehr als 70% der Generalist-Generalist-Interaktionen beteiligt waren.

Im STP-Netzwerk wurden deutlich weniger Generalisten gefunden als im BP-Netzwerk. Folglich konnten auch nur sehr wenige Generalist-Generalist-Interaktionen beobachtet werden (**Tabelle 17**). Connector OTUs gehörten zu den Familien *Intrasporangiaceae* (OTU0707) und der unkultivierten Ordnung TG3-1 (OTU0322). Die Familie *Intrasporangiaceae* beinhaltet Spezies, die eine große Vielfalt an metabolischen Kapazitäten besitzen (Dworkin et al. 2006). Vertreter der Ordnung TG3-1 wurden bisher in STPs (Wu et al. 2017), vor allem aber im Darm von Termiten gefunden (Auer et al. 2017) und sind möglicherweise lignocellulolytisch aktiv (Mikaelyan et al. 2014). Ein anderer Connector (OTU0556) wurde der Familie *Porphyromonadaceae* zugeordnet, deren Mitglieder FOS produzieren (Cardinali-Rezende et al. 2012). Die Ordnung *OPB54* ist in der Lage verschiedene Kohlenhydrate, Aminosäuren und andere organische Substrate abzubauen (FitzGerald et al. 2015) und war durch OTU0121 (Connector) repräsentiert. Ein weiterer Connector (OTU0883) gehörte zum Genus *Clostridium*, welches ein breites Substratspektrum aufweist und ebenfalls verschiedene FOS produziert (Dworkin et al. 2006). Einige Vertreter, wie beispielsweise *C. ultunense* gehören nachweislich auch zu den SAOBs (Manzoor et al. 2013). Mikroorganismen des Genus *SJA-88* (Phylum *Spirochaetes*) oxidieren vermutlich langkettige Fettsäuren und

Alkohole (Gupta et al. 2013; FitzGerald et al. 2015). Lediglich ein Vertreter der Archaeen war mit OTU0789 vorhanden, die der strikt hydrogenotrophen Ordnung *Methanomicrobiales* angehörte.

In beiden Netzwerken waren OTUs Generalisten, über deren Rolle während der AD bisher nur sehr wenig bekannt ist, weshalb vor allem in den STPs kaum Aussagen über die metabolischen Kapazitäten und die daraus resultierenden mikrobiellen Interaktionen getroffen werden konnten. Dies verdeutlicht, dass unbedingt weitere Arbeiten nötig sind, um die Prozesse während der AD besser zu verstehen und ein tieferes Verständnis zu entwickeln.

4.2 Metaproteomuntersuchungen

Die funktionelle Charakterisierung ermöglichte einen Einblick in die taxonomische Zusammensetzung der BPs und die Funktion der jeweiligen Mikroorganismengruppen (vgl. 3.3). In diesem Unterkapitel soll die in dieser Arbeit verwendete Methodik zunächst mit anderen methodischen Ansätzen verglichen (4.2.1), die Reproduzierbarkeit der angewendeten Methodik bewertet (4.2.2), sowie die Eignung der Metaproteomik zur Bestimmung des dominanten Methanogenesewegs erörtert werden (4.2.3). Anschließend wird die Rolle der detektierten Mikroorganismen und -gruppen während der AD (4.2.4) und die Bedeutung der funktionellen Redundanz für den Gesamtprozess diskutiert (4.2.5). Im Anschluss werden potentieller Biomarker für die zukünftige Prozessüberwachung erörtert (4.2.6), bevor zum Abschluss die mikrobiellen Interaktionsmuster der jeweiligen Methanogenesewege diskutiert werden (4.2.7).

4.2.1 Anzahl detektierter Proteine

Insgesamt wurden in den Proben mehr als 60.000 verschiedene Proteine gefunden, die zu insgesamt 5.854 Proteingruppen zusammengefasst wurden (**Tabelle AE07**). Im Vergleich zu anderen Studien (Heyer et al. 2016) war die Anzahl der detektierten Proteine sehr hoch. Es muss trotzdem davon ausgegangen werden, dass weit mehr Proteine in den Proben vorhanden waren. Ausgehend von der Proteinzahl in *E. coli*, welche auf ca. 3.000 geschätzt wird (Soufi et al. 2015), und der Anzahl identifizierter Spezies (> 2000) ist folglich mit mehreren Millionen Proteinen zu rechnen. Eine Herausforderung der zukünftigen Metaproteomik ist die Erfassung und vollständige taxonomische und funktionelle Zuordnung von möglichst vielen dieser Proteine. Weil öffentliche Datenbanken wie bspw. die Uniprot-Datenbank oftmals unspezifisch sind, kann es zu einem Verlust an Proteinidentifikationen, v.a. für bisher unbekannte bzw. unkultivierte Mikroorganismen kommen (Heyer et al. 2016). Eine Möglichkeit die Abhängigkeit von öffentlichen Datenbanken zu umgehen ist die Nutzung von Proteindatenbanken, die aus dem jeweiligen Metagenomen einer Probe abgeleitet werden können (Theuerl et al. 2019a). Ortseifen et al. und Heyer et al. konnten zeigen,

dass in manchen Proben durch Nutzung spezifischer, aus dem Metagenomen abgeleiteten Datenbanken fast doppelt so viele Proteine identifiziert werden konnten wie bei Nutzung öffentlicher Datenbanken (Ortseifen et al. 2016; Heyer et al. 2017). Dabei muss aber immer auch gewährleistet werden, dass die erhaltenen Datenmengen auch sinnvoll ausgewertet werden können. Hierfür existieren bereits verschiedene, oftmals frei verfügbare, Möglichkeiten wie Galaxy-P (Blank et al. 2018) oder MetaproteomeAnalyzer (Muth et al. 2015).

4.2.2 Trennung der Anlagen auf Basis der Proteinprofile

Bis auf wenige Ausnahmen wurden alle fünf biologische Replikate einer Anlage dem gleichen Cluster in der PCA auf Proteinebene zugeordnet (**Abbildung 20**). Der Fokus der PCA liegt auf der Reduktion der Datenkomplexität bei gleichzeitiger Beschreibung eines möglichst hohen Anteils der Varianz (Ringnér 2008). Dabei bildet die euklidische Distanz im Ordinationsdiagramm der PCA die Ähnlichkeit der Proben ab, wobei gilt, dass eng beieinanderliegende Proben ähnlicher in der Zusammensetzung der Kontingenztabelle (hier: Abundanzmatrix der Proteinprofile) sind als weiter entfernte Proben (Elmore und Richman 2001). Auf Basis dieser Prinzipien kann davon ausgegangen werden, dass die Replikate einer Probe sehr ähnliche Proteinprofile hatten, was belegt, dass die verwendete Methode trotz ihrer Komplexität äußerst robust und reproduzierbar ist. Momentan werden Metaproteomuntersuchungen aufgrund der Methodenkomplexität und des hohen instrumentellen Aufwands nicht für die Prozessüberwachung der AD genutzt (Heyer et al. 2016). Auf Basis der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse, könnte die Anzahl der nötigen Messungen für eine valide Aussage reduziert werden, womit Metaproteomuntersuchungen zukünftig auch für den Einsatz als Routinemethode in Betracht gezogen werden könnten.

In den ersten drei Dimensionen der PCA wurden auf Protein- und Speziesebene jeweils ca. 37 % der Varianz im Datensatz erklärt (**Abbildung 20**). Diese niedrige Prozentzahl erklärter Varianz beruhte auf der Komplexität der Daten. So konnten bei den weniger komplexen Daten auf funktioneller Ebene ca. 47 % der Varianz erklärt werden. Es ist möglich, durch die Betrachtung weiterer Hauptkomponenten die kumulierte, erklärte Varianz weiter zu steigern und eine noch detailliertere

Unterteilung der Anlagen vorzunehmen. Allerdings würde dadurch die Möglichkeit der einfachen Visualisierung in einem zwei- bzw. dreidimensionalen Koordinatensystem verloren gehen, weshalb darauf verzichtet wurde.

Während die Clusterzusammensetzung auf Protein- und Speziesebene erwartungsgemäß identisch war, unterschieden sich die Cluster auf funktioneller Ebene (**Abbildung 20**). Dies ist ein Beleg dafür, dass die zum Teil sehr ähnlichen mikrobiellen Gemeinschaften in den Anlagen auf funktioneller Ebene unterschiedlich organisiert waren und die einzelnen Mitglieder unter Umständen verschiedene Funktionen erfüllten. Sehr wahrscheinlich hat sich im Rahmen der AD ein hochvariables metabolisches Netzwerk zwischen den Mikroorganismen ausgebildet, deren Funktion abhängig von vorliegenden Prozessparametern und möglichen mikrobiellen Interaktionspartnern war. Dabei hatten sicherlich Mikroorganismen Vorteile, welche die sich in der jeweiligen Anlage bietenden ökologischen Nischen variabel besetzen konnten.

4.2.3 Bestimmung des dominanten Methanogenesewegs

In allen Anlagen konnten Proteine für alle drei Methanogenesewege gefunden werden (**Abbildung 22**). Dies weist darauf hin, dass in allen Anlagen Methan über alle drei Methanogenesewege generiert wurde. Nichtsdestotrotz sprechen die Ergebnisse dafür, dass sich in den meisten Anlagen ein dominanter Methanogeneseweg etablierte. Die Ergebnisse legen außerdem nahe, dass sich Metaproteomuntersuchungen gut zur Bestimmung des dominanten Methanogenesewegs eignen. Allerdings sollten weitere Anlagen untersucht werden, um diese Aussagen statistisch abzusichern. Dies würde zudem die Möglichkeit bieten, ein genaueres Verhältnis zwischen hydrogenotrophen und acetoklastischen Proteinen zu berechnen, welches nötig ist, um sicher von der Dominanz eines Methanogenesewegs sprechen zu können. Idealerweise sollten solche Untersuchungen zusätzlich auch die Isotopenverhältnisse des entstehenden Methans und Kohlendioxids berücksichtigen, um den dominanten Methanogeneseweg mit einer bereits etablierten Methode abzusichern. Nikolausz et al. konnten mittels SIP zeigen, dass in Laborreaktoren der jeweils dominante Methanogeneseweg abhängig vom Substrat war (Nikolausz et al. 2013). Während das Methan in einem Reaktor mit

Hühnermist überwiegend durch HyMe gebildet wurde, wurde bei den Substraten Maissilage und Trockenschlempe die Bildung von Methan über BoMe beobachtet. Die Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs in Methan können außerdem zur Vorhersage von Prozessstörungen genutzt werden (Nikolausz et al. 2013; Lv et al. 2014).

4.2.4 Mikrobielle Gemeinschaften und deren Funktion

Die Mehrheit der Schritte der AD waren durch verschiedene Proteine repräsentiert (**Abbildung A02**). Den größten Anteil an diesen Proteinen hatten die Phyla *Firmicutes*, *Euryarcheota*, *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* (**Abbildung 18**). Diese Phyla wurden in hoher Abundanz auch in anderen Studien, insbesondere auf DNA-Ebene gefunden (Guo et al. 2015; Pampillón-González et al. 2017; Campanaro et al. 2019; Senés-Guerrero et al. 2019).

Es wurden zahlreiche Proteine für die Hydrolyse von Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden gefunden, deren Abundanz zumeist von wenigen Mikroorganismen dominiert wurde (**Abbildung 23A**). Während der Hydrolyse von Kohlenhydraten dominierte *P. bacterium 1109* in den mesophilen Anlagen, in den thermophilen Anlagen *D. tunisiensis*. Bisher ist nur wenig über die metabolischen Kapazitäten von *P. bacterium 1109* bekannt, es besitzt aber zwei Glykosidasen für die Hydrolyse von Oligosacchariden (Wirth et al. 2019). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit für *P. bacterium 1109* auch eine Alpha-N-Arabinofuranosidase identifiziert (**Tabelle AE07**), was auf die Aktivität bei der Hydrolyse von Hemicellulose hindeutet und diesen Organismus besonders für den Abbau von pflanzenhaltigen Substraten interessant macht. *D. tunisiensis* (Ben Hania et al. 2012) ist ein thermophiler Organismus, dessen Genom bereits vollständig sequenziert (Maus et al. 2015) und der bereits mehrfach in Biogasanlagen gefunden wurde (Maus et al. 2016b; Liang et al. 2018; Campanaro et al. 2019). *D. tunisiensis* besitzt eine Vielzahl von Genen, deren codierte Enzyme am Abbau komplexer Polysaccharide beteiligt sind (Maus et al. 2016a). Die in dieser Arbeit identifizierte Pullulanase (A0A0C7P2X0; **Tabelle AE08**) ist an der Spaltung der α -1,6-glykosidischen Bindung in Stärke beteiligt, die zur Bildung von Glucose führt (Hii et al. 2012). Unter den Proteinen befanden sich überraschenderweise kaum Cellulasen. Möglicherweise war die Anzahl der Proteine zu gering, um diese zu detektieren. Das

Fehlen von Cellulasen könnte aber auch damit erklärt werden, dass diese sehr schnell von der mikrobiellen Gemeinschaft abgebaut werden (Binner et al. 2011).

Schlüsselorganismen der Hydrolyse von Proteinen gehörten überwiegend zu den Familien *Clostridiaceae*, und *Peptostreptococcaceae* und *Thermoanaerobacterales Family III Incertae Sedis* (**Abbildung 23**). Mitglieder der beiden erstgenannten Familien sind am Abbau von Proteinen beteiligt (Sieber et al. 2012; Schink und Stams 2006). Die letztgenannte Familie ist beim Abbau von cellulosehaltigem Material unter thermophilen Bedingungen aktiv (Strang et al. 2017).

Beim Abbau von Fetten waren überwiegend Mitglieder der Familie *Pseudomonadaceae* aktiv. Dabei wurde vor allem die Alpha-Untereinheit des Fettsäureoxidationskomplexes von *P. fluorescens* detektiert. Auch wenn die meisten Vertreter des Genus *Pseudomonas* aerob sind, so wurden sie bereits in Biogasanlagen gefunden (Kovács et al. 2015). Zum anaeroben Wachstum nutzen diese *Pseudomonas spp.* anstelle von Sauerstoff Nitrat oder Nitrit als finalen Elektronenakzeptor (Muriel et al. 2015). Da alle alternativen Elektronenakzeptoren ein geringeres Reduktionspotential als Sauerstoff besitzen, wird unter anaeroben Bedingungen weniger Energie produziert (Gerardi 2003), was die Beobachtung der sehr stabilen Proteinexpression der *Pseudomonas spp.* in allen Anlagen (**Abbildung 29**) erklären könnte.

Die Kohlenhydrate wurden in den Anlagen vorwiegend über den EMP abgebaut, für den PPW und den ED-Weg wurden hingegen nur geringe Proteinabundanzen beobachtet (**Abbildung 23**). Dies lässt sich damit erklären, dass der Energiegewinn beim EMP im Vergleich zu den anderen beiden Abbauwegen doppelt so hoch ist und deswegen von den Mikroorganismen bevorzugt wird (Bar-Even et al. 2012; Flamholz et al. 2013). Interessanterweise wurden Enzyme des ED lediglich für *Pseudomonadaceae* gefunden. Die meisten *Pseudomonas spp.* besitzen kein Gen, das für die Phosphofruktokinase codiert, weshalb Glucose über Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Pyruvat abgebaut wird (Rojo 2010; Maleki et al. 2017).

In allen Anlagen wurden Proteine verschiedener Fermentationswege detektiert. Dabei waren die Propionat-, Lactat- und Formiatgärung dominant (**Abbildung 23C**). An der Propionatgärung war eine Vielzahl von Mikroorganismen beteiligt, wohingegen bei der Lactatgärung und Formiatgärung wenige Mikroorganismen die Prozesse

dominierten. Die Lactat-Dehydrogenase als Schlüsselenzym der Lactatgärung konnte lediglich für den Organismus *Clostridium pasteurianum* nachgewiesen werden (**Tabelle AE08**), der ein bekannter Lactatproduzent ist, aber auch andere FOS wie Propionat oder Butyrat bilden kann (Dabrock et al. 1992; Masset et al. 2012). Da keinerlei Proteine anderer Gärungsformen für *C. pasteurianum* detektiert wurden, betreibt dieser möglicherweise homofermentative Lactatgärung. Proteine der Familie *Streptococcaceae* wurden hingegen sowohl für die Propionat-, Ethanol, und Formiatgärung gefunden, weshalb diese Mikroorganismengruppe vermutlich heterofermentative Gärung betrieben haben. Für die Butyratgärung wurden hohe Abundanzen für *P. fluorescens* beobachtet. Als einziges detektierbares Protein war die Alpha-Untereinheit des Fettsäureoxidationskomplexes (*fadB*) nachweisbar, die allerdings ebenso bei der Lipiddegradation von Bedeutung ist. Da keine weiteren Schlüsselenzyme der Butyratgärung (wie z.B. die Butyratkinase) nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass diese Mikroorganismen keine Butyratgärung betrieben haben, sondern stattdessen am Lipidabbau beteiligt waren (Tzirita et al. 2019).

Für die Acetogenese wurden eine Vielzahl verschiedener Proteine beobachtet, die in Abhängigkeit des vorherrschenden Methanogenesewegs von verschiedenen Mikroorganismen stammten. Während bei AcMe die Familie *Erysipelotrichaceae* die acetogenen Proteine dominierte, wurden in HyMe hohe Abundanzen für Proteine der Familien *Thermoanaerobacteraceae* (*T. phaeum*) und *Thermoanaerobacterales Family III Incertae Sedis* (*S. schinkii*) beobachtet (**Abbildung 24B**).

Die Familie *Erysipelotrichaceae* wurde bereits häufiger in Biogasanlagen detektiert (Belostotskiy et al. 2015; Park et al. 2019), allerdings ist nur wenig über deren Bedeutung für die AD bekannt. Fischer et al. (Fischer et al. 2019) schlagen vor, diese Familie als Marker für hohe Ammoniumkonzentrationen zu nutzen. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit deuten allerdings darauf hin, dass Mitglieder dieser Familie während der AD Acetat gebildet haben, welches durch syntrophe Interaktionen von Vertretern der Familien *Methanosarcinaceae* und *Methanosaetaceae* verwertet wurde.

T. phaeum ist ein thermophiles Bakterium, welches bei einer Vielzahl von Substraten wachsen kann und über die genetische Ausstattung für den WLP verfügt (Hattori et

al. 2000). Die Richtung des WLP ist dabei abhängig von den Substraten, d.h. es kann sowohl als SAOB, als auch als Acetatbildner fungieren (Keller et al. 2019). Die hohe Toleranz gegenüber Ammonium (Kato et al. 2014) führt dazu, dass hohe Abundanzen für *T. phaeum* v.a. in Reaktoren mit hohen Ammoniumkonzentrationen beobachtet werden können (Frank et al. 2016; Müller et al. 2016). Im Gegensatz zu anderen SAOBs wie *T. acetatoxydans*, verfügt *T. phaeum* über ein aktives Acetat-Aufnahmesystem, weshalb es auch bei geringen Acetatkonzentrationen seine SAOB-Aktivität aufrechterhalten kann (Westerholm et al. 2016).

S. schinkii ist ein mesophiler Organismus der aufgrund seines sehr engen Substratspektrums über einen hochspezialisierten Metabolismus verfügt (Westerholm et al. 2010). In Reaktoren mit geringen Ammoniumkonzentrationen wurden mittels qPCR moderate Zellzahlen von 10^5 bis 10^7 pro Milliliter detektiert (Westerholm et al. 2011a; Sun et al. 2014). Allerdings sind die Zellzahlen aufgrund der hohen Generationszeit der SAOBs im Vergleich zur bakteriellen Gesamtzellzahl i.d.R. eher gering (Westerholm et al. 2016). Für beide Spezies wurden in dieser Arbeit in Anlagen von HyMe einige Schlüsselenzyme der Acetatoxidation (z.B. Formiat-Tetrahydrofolat-Ligase) in hohen Abundanzen gefunden, was bestätigt, dass Acetat bei HyMe vorwiegend über syntrophe Acetatoxidation abgebaut wurde.

Bei der Methanogenese waren in Anlagen von HyMe vor allem *M. bourgensis* und *M. marisnigri* (*Methanomicrobiaceae*) aktiv und in AcMe *M. mazei*, *M. barkeri* (*Methanosarcinaceae*) sowie *M. soehngenii* (*Methanosaetaceae*). In Anlagen von BoMe wurden ähnliche Proteinabundanzen für *Methanomicrobiaceae* und *Methanosarcinaceae* detektiert (**Abbildung 21**). Mitglieder der Familie *Methanomicrobiaceae* decken ihren Energiebedarf überwiegend durch Reduktion von CO_2 mit H_2 als Reduktionsmittel, sind also hydrogenotroph (Demirel und Scherer 2008; Thauer et al. 2008). In den meisten Anlagen von HyMe wurde eine Mischung aus Rindergülle und landwirtschaftlichen Substraten vergoren (**Tabelle 11** und **Tabelle 18**). Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeiten überein, in denen eine Dominanz von HyMe durch *Methanoculleus spp.* in Reaktoren mit Schweinegülle (Patil et al. 2010; Zhu et al. 2011) und einer Mischung aus Schweinegülle bzw. Rindergülle mit landwirtschaftlichen Substraten (Nettmann et al. 2010; Jaenicke et al. 2011) beobachtet wurde.

Die Familie *Methanosarcinaceae*, welche in einigen Anlagen (BP02, BP03 und BP14) mit AcMe dominierte, unterscheidet sich von anderen archaellen Familien in ihrer höheren Toleranz gegenüber Stressoren (Calli et al. 2005; Thauer et al. 2008). Weiterhin sind die meisten Vertreter dieser Familie in der Lage ein breites Substratspektrum zu nutzen. *M. barkeri* ist bspw. in der Lage, sowohl H_2/CO_2 und Acetat, als auch Methanol und Methylamine als Substrate zu verwerten (Boone und Mah 2015). Dabei nutzt *M. barkeri* zur Energiegewinnung zelluläre Mechanismen, die sich von denen der anderen hydrogenotrophen und acetoklastischen Mikroorganismen unterscheiden (Thauer et al. 2008; Welte und Deppenmeier 2014). Lü et al. konnten zeigen, dass *Methanosarcinaceae* zudem in der Lage sind, auf Änderungen der Acetatkonzentration mit einer Verschiebung des Methanogenesewegs hin zu HyMe zu reagieren (Lü et al. 2013). Diese hohe Flexibilität gegenüber Prozessbedingungen und Substraten führte wahrscheinlich dazu, dass *M. barkeri* in allen Anlagen gefunden werden konnte. Dabei spricht die hohe Abundanz von Proteinen für AcMe dafür, dass *M. barkeri* bevorzugt Energie über diesen Stoffwechselweg generiert hat, wohingegen die Methanbildung aus H_2 und CO_2 in den beprobten Anlagen durch diesen Organismus vernachlässigt werden konnte. Die verbleibenden Anlagen von AcMe (BP01, BP05) wurden von der Familie *Methanosaetaceae* dominiert, welche die einzige archaelle Familie ist, deren Mitglieder ausschließlich Acetat zur Energiegewinnung nutzen (Ferry 1993; Demirel und Scherer 2008). *Methanosaetaceae* verfügen über eine höhere Acetat-Affinität als *Methanosarcina spp.*, was dazu führt, dass *Methanosaetaceae* die acetoklastische Methanogenese bei niedrigen Acetatkonzentrationen (ab 7 – 70 μM) dominieren, wohingegen dies bei hohen Acetatkonzentrationen (ab 0,2 - 1,2 mM) für *Methanosarcina spp.* zutrifft (Jetten et al. 1992; Manzoor et al. 2016). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, im Zuge derer eine Dominanz von *Methanosaeta spp.* während AcMe in den Anlagen mit niedrigen Acetatkonzentrationen beobachtet wurde (**Tabelle 11**).

4.2.5 Bedeutung der funktionellen Redundanz für die mikrobielle Gemeinschaft

In dieser Arbeit wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen funktioneller Redundanz und relativer Proteinabundanz festgestellt. Proteine, die für viele verschiedene Mikroorganismen gefunden wurden, waren folglich hochabundant (**Abbildung 26**). Langer et al. konnten zeigen, dass unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaften in der Lage waren, verschiedene Substrate bei gleicher Methanrate abzubauen und führten dies auf die funktionelle Redundanz innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften zurück (Langer et al. 2015). Eine andere Studie untersuchte das in der mikrobiellen Gemeinschaft vorhandene, metabolische Potential für verschiedene Schritte der AD (Vanwonterghem et al. 2016). Dabei wurden hohe funktionelle Redundanzen für Gene der Hydrolyse und der Fermentation beobachtet. Für die syntrophe Acetatoxidation und die Methanogenese wurde hingegen eine geringere funktionelle Redundanz ermittelt. Diese Ergebnisse stimmen nur teilweise mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit überein. Insbesondere bei der Hydrolyse von Kohlenhydraten wurde bei den relativen Abundanzen eine Dominanz von wenigen Spezies beobachtet (**Abbildung 23**). Möglicherweise ist diese Dominanz ein Grund dafür, dass die Hydrolyse oftmals der geschwindigkeitsdeterminierende Schritt während der AD ist (Vavilin et al. 1996; Zhang et al. 2014). Ebenso wurde beschrieben, dass die syntrophe Acetatoxidation ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt während der AD sein kann (Yi et al. 2020). Auch diesen Prozess dominierten in den Anlagen, die im Rahmen dieser Arbeit beprobt wurden, nur wenige Spezies (**Abbildung 23C**) was als Erklärung für diese Beobachtung dienen kann.

In Kombination mit den beobachteten FOS-Werten (**Tabelle 11**) der einzelnen Anlagen spricht vieles dafür, dass die Oxidation der FOS der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in Anlagen mit hydrogenotropher Methanogenese war. Besonders die hohen Konzentrationen von Propionat in den Anlagen BP10, BP12 und BP16 lassen vermuten, dass die Oxidation von Propionat zu Acetat einen Flaschenhals während der AD dargestellt hat. Dafür spricht auch, dass die Propionat-CoA-Transferase, welche die Oxidation von Propionat zu Acetat katalysiert, in keiner der Anlagen detektiert werden konnte.

4.2.6 Identifikation geeigneter Biomarker

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Korrelationsanalysen ermöglichten eine Aussage über die Korrelation taxonomischer Einheiten und Proteine mit den Prozessparametern (vgl. 2.5.5.5 und 2.6.5.4). Dadurch konnte eine Reihe von möglichen Biomarkern identifiziert werden, die sich zukünftig möglicherweise auch zur Prozessüberwachung in Biogasanlagen einsetzen lassen. Zur Überwachung der Prozesstemperatur eignen sich thermophile Mikroorganismen. In dieser Arbeit wurde als möglicher Modellorganismus *D. tunisiensis* identifiziert, der in thermophilen Anlagen weit verbreitet ist (Maus et al. 2016b; Campanaro et al. 2019).

Als geeignetes Markerprotein konnte dabei das 60kDa Chaperonin groEL identifiziert werden, dessen Abundanz signifikant mit hohen Temperaturen korrelierte (vgl. 3.3.6.1). Da die meisten Bakterien über dieses Protein verfügen (Zeilstra-Ryalls et al. 1991) und es für eine Vielzahl von Proteinen benötigt wird (Ranford et al. 2000), ist es denkbar, zukünftig die Gesamtkonzentration von groEL als Indikator für den Temperaturstress innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft zu verwenden.

Weiterhin wurden eine signifikante negative Korrelation verschiedener Untereinheiten der MCMR mit dem Gehalt an FOS beobachtet (vgl. 3.3.6.6). Dieses Enzym katalysiert den letzten Schritt der Methanogenese bei dem Methyl-Coenzym M und Coenzym B zu Methan und dem Heterodisulfid aus Coenzym M und Coenzym B umgesetzt werden (Thauer 1998). Bereits mehrfach wurde beobachtet, dass bei einem pH-Wert Abfall in Folge einer FOS-Akkumulation die Kopienzahl des *mcrA*-Gens stark abgenommen hat (Blume et al. 2010; Munk et al. 2012). Heyer et al. beschreiben außerdem eine signifikante negative Korrelation zwischen der MCMR-Abundanz und der OLR (Heyer et al. 2016). Auch bei einer zu hohen OLR kann es durch einen zu schnellen Abbau der Substrate zu einer Akkumulation von FOS kommen (Ferguson et al. 2016). Die Ergebnisse aus der Literatur unterstützen also die These, dass die Abundanz der MCMR ein geeigneter Biomarker für eine bevorstehende Übersäuerung und damit einer Störung des Biogasprozesses ist. Allerdings sollte beachtet werden, dass Korrelationsanalysen keine Aussage über die Kausalität ermöglichen. Es ist also unklar, ob die Akkumulation der FOS ein

Absterben der Archaeen, und damit auch eine Reduktion der MCMR-Abundanz verursacht, oder ob die FOS-Akkumulation aufgrund einer niedrigen Aktivität der Archaeen zustande kommt.

Interessanterweise wurde in dieser Arbeit auch beobachtet, dass in den acetoklastischen Anlagen höhere Abundanzen der MCMR vorhanden waren als in den hydrogenotrophen Anlagen. Allerdings lässt die Datenlage keinerlei valide Aussage über den Grund für diese Beobachtung zu. Die geringen Acetat-konzentrationen in den acetoklastischen Anlagen sprechen aber für eine hohe Aktivität der acetoklastischen Mikroorganismen, infolgedessen auch die MCMR-Abundanzen erhöht sind. Möglicherweise liefern also Messungen der Abundanz der MCMR auch erste Hinweise auf den Hauptmethanogeneseweg. Um diese These zu prüfen wäre allerdings die Analyse der MCMR-Abundanzen in einer sehr großen Anzahl an Anlagen, inklusive der Bestimmung des dominanten Methanogenesewegs mittels SIP, notwendig.

4.2.7 Abhängigkeit der mikrobiellen Interaktionsmuster vom Methanogeneseweg

Die Netzwerke unterschieden sich deutlich in der Anzahl der Knoten und Kanten. Das komplexeste Netzwerk hinsichtlich der Knoten, Kanten und Anzahl an Modulen stellte HyMe dar. BoMe hingegen war das Netzwerk mit der geringsten Komplexität (**Tabelle 22**). Möglicherweise entstanden durch das Vorhandensein von zwei Methanogenesewegen weniger spezifische ökologische Nischen, die durch die Mikroorganismen besetzt werden konnten, was auch die geringere Anzahl an Knoten im Netzwerk erklären würde. Für diese These spricht auch die Beobachtung eines hohen Anteils an positiven Interaktionen: durch die geringere Anzahl an ökologischen Nischen entstand eine weniger starke Konkurrenzsituation. Gleichzeitig wurde dies auch durch den höchsten Anteil an intermodularen Interaktionen für BoMe bestätigt. In HyMe und AcMe hingegen könnte die klare Dominanz eines Methanogenesewegs zu stärkeren Konkurrenzsituationen geführt haben, weshalb ein höherer Anteil an negativen Interaktionen beobachtet werden konnte. Besonders hoch war deren Anteil mit über 50 % in AcMe. Dabei konkurrieren acetoklastische Methanogene mit den

vorhandenen SAOBs (Westerholm et al. 2016). Da SAOBs in der Regel sehr langsam wachsen (Hattori 2008), sind diese in Anlagen mit AcMe zumeist nur in geringen Abundanzen vorhanden. Bei HyMe treten SAOBs häufig gemeinsam mit hydrogenotrophen Methanogenen auf (Ziganshin et al. 2016). Zum einen kann das bei der Acetatoxidation generierte CO₂ direkt durch diese Mikroorganismen zu Methan verstoffwechselt werden, zum anderen muss die Acetatkonzentration niedrig gehalten werden, um eine Versäuerung und damit die Störung der Methanogenese zu verhindern. Vor allem bei extremen Bedingungen ist die syntrophe Acetatoxidation deshalb der Hauptweg des Acetatabbaus (Karakashev et al. 2006; Noll et al. 2010; Westerholm et al. 2012). Die derzeit bekannten SAOBs sind die thermophilen Mikroorganismen *T. phaeum* (Hattori et al. 2005), *Pseudothermotoga lettingae* (Balk et al. 2002) und der thermotolerante Mikroorganismus *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (Westerholm et al. 2011b). Mesophile SAOBs sind *C. ultunense* (Schnürer et al. 1996) und *S. schinkii* (Westerholm et al. 2010). Es wurden für alle Mikroorganismen mit Ausnahme von *P. lettingae* Proteine in den verschiedenen Anlagen gefunden. Proteine, die direkt an der Acetatoxidation beteiligt sind (z.B. ACDS), wurden allerdings nur für *T. phaeum* und *S. schinkii* detektiert. Dies deutet darauf hin, dass im Wesentlichen diese beiden Mikroorganismen an der syntrophen Acetatoxidation beteiligt waren.

Interessanterweise wurde im Netzwerk HyMe eine positive Interaktion zwischen *T. acetatoxydans* und *T. phaeum* beobachtet (**Tabelle AE10**). Wahrscheinlich kommt diese Interaktion durch die gleiche Substratspezifität zustande. Ein weiteres Bakterium, für welches Proteine der Acetatoxidation gefunden wurden war *Desulfotomaculum kuznetsovii* (Nazina et al. 1988). Die Oxidation von Acetat durch diesen Organismus ist stets an die Reduktion von Sulfat gekoppelt (Visser et al. 2013), womit er auch zu den Sulfatreduzierern gehört. Auch wenn keine direkten Interaktionen von den SAOBs mit hydrogenotrophen Mikroorganismen gefunden werden konnten, so zeigen die mittleren relativen Abundanzen von *T. phaeum* (AcMe: 0,2 %, HyMe: 1,0 %, BoMe, 0,6 %) und *S. schinkii* (AcMe: 0,3 %, HyMe: 4,7 %, BoMe: 1,88 %) die Bedeutung der Acetatoxidation für HyMe. Einen weiteren Beweis liefert die genauere Betrachtung der taxonomischen Zusammensetzung der beobachteten Abundanzen des ACDS-Komplexes (**Abbildung 25**). So wurden in fast allen hydrogenotrophen

Anlagen hohe Anteile an bakteriellen Proteinen des ACDS-Komplexes gefunden, in acetoklastischen Anlagen hingegen nicht. Die mittleren relativen Abundanzen des ACDS-Komplexes für BP09 und BP11 lagen zwischen den Abundanzen der Anlagen für HyMe und AcMe, wohingegen für BP15 höhere bakterielle Proteinabundanzen beobachtet wurden. Bereits bei der funktionellen Klassifizierung der Anlagen (**Abbildung 20**) wurde deutlich, dass BP09 und BP11 näher an den acetoklastischen Anlagen lagen, BP15 hingegen näher an den hydrogenotrophen Anlagen. Dies spricht dafür, dass in BP15 HyMe möglicherweise doch überwogen hat. Folglich sollte die Zuordnung der Anlagen zu einem dominanten Methanogeneseweg anhand des Proteinprofiles noch genauer untersucht werden.

Bei der topologischen Analyse der Netzwerke wurden zwei Generalisten beobachtet, welche diese Rolle in mehr als einem Netzwerk einnahmen (**Tabelle 23**). Dies waren *P. bacterium 1109* (AcMe und HyMe) und *D. tunisiensis* (HyMe und BoMe). Für beide wurden in den jeweiligen Anlagen hohe Abundanzen beobachtet, was eine Schlüsselrolle vermuten lässt.

Die funktionellen Kapazitäten von *P. bacterium 1109* (Jennifer R. Town und Tim J. Dumonceaux 2016) sind bisher kaum beschrieben. Erste Studien zeigen aber, dass dieser Organismus möglicherweise zu den SAOBs gehört, da auf dem Genom das Gen für die Formyltetrahydrofolat-Synthetase vorhanden ist (Wirth et al. 2019). Dieses Protein gilt als Schlüsselenzym für den reduktiven Acetyl-CoA-Weg und wurde in sehr geringen Abundanzen auch im Zuge dieser Arbeit nachgewiesen (A0A0J1DIK5; **Tabelle AE08**). Man muss folglich davon ausgehen, dass die Acetatoxidation durch *P. bacterium 1109* in den Anlagen nur von untergeordneter Bedeutung ist. Die Mehrheit der gefundenen Proteine waren Zuckertransportproteine, weshalb es vermutlich stark am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt war (vgl. 4.2.4). Die funktionelle Charakterisierung des Genoms von *D. tunisiensis* (Maus et al. 2015; Maus et al. 2016a) lässt darauf schließen, dass dieser Mikroorganismus eine zentrale Rolle beim Kohlenhydratstoffwechsel, insbesondere in thermophilen Anlagen spielt. In HyMe und BoMe wurden höhere mittlere Proteinabundanzen für diesen Organismus beobachtet, als in AcMe. Den größten Anteil an diesen Proteinabundanzen hatten allerdings BP15 (BoMe) und BP16 (HyMe), die beiden Anlagen mit thermophilen

Prozesstemperaturen. Dies bestätigt die Vermutung der zentralen Rolle bei der Hydrolyse bei thermophilen Prozesstemperaturen. Als mögliche Endprodukte des Stoffwechsels von *D. tunisiensis* wurden Ethanol, Acetat, H₂ und CO₂ identifiziert, allesamt Ausgangssubstrate für die Methanogenese. Es kann deshalb vermutet werden, dass syntrophe Interaktionen zwischen *D. tunisiensis* und Methanogenen bestanden haben. Während in HyMe und AcMe keine derartigen Interaktionen vorhanden waren, konnten in BoMe lediglich negative Interaktionen mit *M. barkeri*, *M. mazei* und *Methanosarcina sp. Ant1* beobachtet werden. Diese Mikroorganismen sind allerdings im Wesentlichen mesophil (Cairó et al. 1992; Rocheleau et al. 1999), die dementsprechend in den thermophilen Anlagen in einer niedrigeren Abundanz vorhanden waren. Die Beobachtung der negativen Interaktionen ist also wahrscheinlich eine Folge der unterschiedlichen Temperaturanforderungen von *D. tunisiensis* und den verschiedenen Vertretern des Genus *Methanosarcina*.

Die Interaktionsmuster der beiden genannten Mikroorganismen waren vom vorliegenden Methanogeneseweg abhängig (**Tabelle AE10**). Die hohe Flexibilität hinsichtlich der Interaktionspartner könnte der Grund dafür sein, dass beide Mikroorganismen Schlüsselrollen in der AD eingenommen haben.

Im Gegensatz dazu wurden in allen Netzwerken 37 konservierte Interaktionen zwischen 15 verschiedenen *Pseudomonas spp.* beobachtet (**Abbildung 28**). Diese waren überwiegend bei der Hydrolyse von Fetten aktiv und die einzigen Mikroorganismen, für die Proteine des ED nachgewiesen werden konnten (**Abbildung 23**). Zudem wurde neben den Interaktionsmustern eine starke Konservierung der Proteinexpression beobachtet (**Abbildung 29**). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass *Pseudomonas spp.* über eine starke Spezialisierung verfügen und eng begrenzte ökologische Nischen besetzt haben. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese ökologischen Nischen in allen Anlagen identisch waren und deshalb sowohl Interaktionsmuster als auch Proteinexpression stark konserviert waren.

4.3 Vergleich ausgewählter Ergebnisse auf beiden Ebenen für Biogasanlagen

In dieser Arbeit wurden für die Biogasanlagenproben teilweise deutliche Unterschiede hinsichtlich der mikrobiellen Gemeinschaft auf DNA- und Proteinebene beobachtet. Nachfolgend sollen die beobachteten Unterschiede der relativen Abundanz von Archaeen und Bakterien (4.3.1) als auch die Aussagekraft beider Ebenen am Beispiel des dominanten Methanogenesewegs (4.3.2) diskutiert werden.

4.3.1 Unterschiede in der relativen Abundanz von Archaeen und Bakterien zwischen beiden Ebenen

Im Mittel hatten Archaeen auf DNA-Ebene einen Anteil von 1,14 % an der mikrobiellen Gemeinschaft in BPs (**Tabelle A01**), bei den detektierten Proteinen wurde eine relative Abundanz von durchschnittlich 50,54 % ermittelt (**Tabelle AE07**). Diskrepanzen der relativen Abundanzen für Archaeen zwischen verschiedenen OMICs-Methoden wurden in der Literatur häufiger beobachtet. Hanreich et al. stellten für Archaeen in Biogasanlagen einen Anteil von 4 % auf Metagenomebene fest, auf Metaproteomebene hingegen von 20 – 30 % (Hanreich et al. 2013). De Vrieze et al. geben für Archaeen auf 16S rRNA Ebene einen Anteil von bis zu 25 % an, auf Metatranskriptomebene hingegen 42 % (Vrieze et al. 2018). Die gleiche Gruppe beobachtete in anderen Anlagen eine archaelle Abundanz von ca. 1 % auf 16S rRNA Ebene, für die Heyer et al. eine archaelle Proteinabundanz von 32 % angeben (Vrieze et al. 2015; Heyer et al. 2016).

Ein bekanntes Problem der 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung ist die Verzerrung der Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Primeraffinitäten für das 16S Gen verschiedener Mikroorganismen und der variablen Anzahl an Kopien des 16S Gens (Acinas et al. 2004; Louca et al. 2018). Weiterhin kann auch die Verwendung verschiedener Datenbanken zu Unterschieden in den Ergebnissen führen (Park und Won 2018). Auch bei Metaproteomanalysen bestehen gewisse Limitierungen, die das Ergebnis beeinflussen können. Essentiell ist eine vollständige Zelllyse und die Entfernung von Störstoffen wie Huminsäuren. Außerdem ist die Zahl der

Peptidspektren so hoch, dass aufgrund der technischen Möglichkeiten lediglich eine vergleichsweise geringe Anzahl an Proteinen identifiziert werden kann (Heyer et al. 2015). Es ist also davon auszugehen, dass viele Proteine, insbesondere die weniger abundanten, nicht erfasst wurden (vgl. dazu auch 4.2.1). Ein interessanter Ansatz für diese Probleme ist die mathematische Modellierung der Biogasprozesse, das sog. Anaerobic Digestion Model 1 (ADM1), das für Archaeen eine theoretische Abundanz von ungefähr 30 - 40 % angibt (Batstone et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft auf Metaproteomebene korrekter dargestellt werden kann, als auf 16S rRNA Ebene.

4.3.2 Unterschiede hinsichtlich der Aussagekraft auf DNA- und Proteinebene am Beispiel des wahrscheinlichen Hauptmethanogenesewegs

Die Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften mittels 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung hat essentiell dazu beigetragen ein Verständnis der mikrobiellen Prozesse während der AD zu entwickeln. So konnte gezeigt werden, dass die Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* die bakteriellen Gemeinschaften zumeist dominieren (Nelson et al. 2011; Sundberg et al. 2013; Vrieze et al. 2015). Allerdings haben DNA-basierte Methoden den Nachteil, dass sie nicht zwischen der gesamten und der aktiven mikrobiellen Gemeinschaft unterscheiden können. Aussagen über die funktionellen Kapazitäten auf DNA-Ebene beruhen deshalb entweder auf der Analyse der in der Literatur beschriebenen metabolischen Kapazitäten (vgl. 4.1.4) oder auf der Ableitung der funktionellen Kapazitäten anhand vollständig sequenzierter Genome. Im Gegensatz dazu fokussiert sich die Metaproteomik auf die Mikroorganismen, die während der AD aktiv sind. Dabei können sich die mikrobielle Gesamtgemeinschaft und die aktive mikrobielle Gemeinschaft deutlich unterscheiden (Hanreich et al. 2013; Vrieze et al. 2018).

Dieser Unterschied wurde auch in dieser Arbeit hinsichtlich der Feststellung des Hauptmethanogenesewegs deutlich. Die Vorhersage des Hauptmethanogenesewegs anhand der Dominanz von acetoklastischen und hydrogenotrophen Methanogenen unterschied sich in der Hälfte der Anlagen zwischen der DNA- und der Proteinebene. Hauptgrund für diese Tatsache war dabei, dass für die Familie *Methanosarcinaceae* auf

DNA-Ebene aufgrund ihres breiten Substratspektrum keine eindeutige Zuordnung zu AcMe oder HyMe möglich war. Auf Proteinebene konnte hingegen beobachtet werden, dass Mitglieder der Familie *Methanosarcinaceae* in den beprobten Anlagen überwiegend AcMe betrieben haben. Dies verdeutlicht, dass anhand der DNA-Ebene nur sehr schwer Aussagen über die Funktion und Aktivität bestimmter Mikroorganismengruppen getroffen werden können und dafür die Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft auf RNA- oder Proteinebene nötig ist.

4.4 Fazit

Das folgende Kapitel fasst die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit zusammen und bewertet diese im Hinblick auf die am Anfang dieser Arbeit aufgestellten Hypothesen und deren biologischen Fragestellungen (vgl. 1.6). Eine ausführliche Diskussion der zusammengefassten Ergebnisse findet sich im vorherigen Teil dieses Kapitels (vgl. 4.1 - 4.3).

4.4.1 Unterschiede in Diversität und Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in BPs und STPs

Die Ergebnisse der 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung (vgl. 3.2) verifizieren die erste Hypothese, die besagt, dass sich trotz identischer mikrobieller Prozesse in beiden Anlagentypen charakteristische mikrobielle Gemeinschaften etablieren, die sich in ihrer Diversität und ihren mikrobiellen Interaktionsmustern unterscheiden (vgl. 1.6). Als Folge der diskontinuierlichen Substratzufuhr (vgl. 4.1.1) waren die mikrobiellen Gemeinschaften in STPs durch eine im Vergleich zu den BPs höhere Diversität und Evenness charakterisiert (**Abbildung 07**). Die identifizierten Kernmikrobiome unterschieden sich zwischen beiden Anlagentypen (**Abbildung 11**) und erklärten in Übereinstimmung mit dem ökologischen Pareto-Prinzip (vgl. 4.1.2) jeweils einen hohen Anteil der Gesamtabundanz (**Abbildung 09, Abbildung 10**), wobei die Varianz der mikrobiellen Gemeinschaften in den STPs höher war (vgl. 3.2.4, **Abbildung 12** und **Abbildung 14**). Diese Beobachtung kann als gezielte Adaption der mikrobiellen Gemeinschaften an die individuellen Prozessparameter in den STPs interpretiert werden (vgl. 4.1.3). Dabei wurden die bakteriellen und archaellen Gemeinschaften von unterschiedlichen Prozessparametern beeinflusst (**Tabelle 14**), weshalb auch bei ähnlichen bakteriellen Gemeinschaften zum Teil unterschiedliche archaelle Gemeinschaften selektiert wurden (**Abbildung 12, Abbildung 14**).

Für beide Anlagentypen waren spezifische mikrobielle Netzwerke charakteristisch (**Tabelle 15**), die auf eine besonders anlagenspezifische Diversität und Funktion zum effektiven anaeroben Abbau der organischen Substrate hinweisen. Dabei konnte die

stärkere Spezialisierung in STPs durch Identifikation von Kernmikrobiomen und Korrespondenzanalysen bestätigt werden (**Abbildung 16, Abbildung 17**).

4.4.2 Funktionelle Charakterisierung der anaeroben Gärung in Abhängigkeit des dominanten Methanogenesewegs

Proteine für alle wichtigen Stoffwechselprozesse der AD wurden identifiziert (**Abbildung 19**) und überwiegend den Phyla *Euryarcheota*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* zugeordnet (**Abbildung 18**). Die funktionelle Zuordnung der Proteine ermöglichte eine Bestimmung des dominierenden Methanogenesewegs, wobei die Ergebnisse nahelegen, dass HyMe in BPs häufiger auftritt als AcMe (**Tabelle 18, Abbildung 20**). Unterschiede in der Clusterzusammensetzung auf Protein-/Speziesebene und funktioneller Ebene belegten, dass in den Anlagen eine Stoffwechseladaption der Mikroorganismen stattfand und ökologische Nischen variabel besetzt wurden (**4.2.2**). Dementsprechend wurde für die meisten Prozesse der AD eine funktionelle Redundanz festgestellt, wobei die Dominanz bestimmter Mikroorganismengruppen abhängig vom Grad der funktionellen Redundanz war. Für abundante Prozesse, wie der Glykolyse wurde eine hochgradige funktionelle Redundanz ohne Dominanz spezifischer Mikroorganismen beobachtet (**Abbildung 23**), während Prozesse wie die Hydrolyse und die syntrophe Acetatoxidation durch geringe funktionelle Redundanz, bei gleichzeitiger Dominanz weniger Mikroorganismen, charakterisiert waren (**Abbildung 23, Abbildung 24**). Diese Ergebnisse falsifizieren die zweite Hypothese, die postuliert, dass bestimmte Mikroorganismen trotz hochgradiger funktioneller Redundanz die Stoffwechselvorgänge während der AD dominieren (vgl. **1.6**). Gleichzeitig liefern diese aber eine mögliche Erklärung für das Auftreten von stoffwechselphysiologischen Flaschenhälsen der AD. Möglicherweise ist eine geringe funktionelle Redundanz in Kombination mit der Abhängigkeit von wenigen Mikroorganismen der Grund für die bekannten Flaschenhalse und der damit verbundenen Gefahr einer Störung der Biogasproduktion (vgl. **4.2.5**). Zur zukünftigen, frühzeitigen Erkennung derartiger Störungen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt, um mögliche Biomarker für die Beurteilung bestimmter Prozessschritte

zu identifizieren (vgl. 3.3.6). Als geeignete Biomarker konnten die Abundanz des 60kDa Chaperonin groEL für Temperaturstress und der MCMR für eine bevorstehende Übersäuerung des Reaktors identifiziert werden (vgl. 3.3.6).

4.4.3 Spezifische Interaktionsmuster für jeden Methanogeneseweg

Die für die dominanten Methanogenesewege berechneten Netzwerke unterschieden sich hinsichtlich der Netzwerkparameter und der mikrobiellen Interaktionsmuster (vgl. 3.3.7). Die Netzwerke HyMe und AcMe waren komplexer als BoMe (**Tabelle 22**), was mit der Anzahl der vorhandenen ökologischen Nischen und der stärkeren Spezialisierung der beteiligten Mikroorganismen erklärt werden konnte (vgl. 4.2.7). Die meisten anhand ihrer Topologie identifizierten Schlüsselorganismen (**Abbildung 27**) gehörten in allen Netzwerken den Phyla *Firmicutes* und *Proteobacteria* an, unterschieden sich aber zwischen den Netzwerken (**Tabelle 23**). Von besonderer Bedeutung für die AD waren *P. bacterium 1109* und *D. tunisiensis*, da diese beiden Mikroorganismen aufgrund ihrer Topologie in mehr als einem Netzwerk ein generalistisches Verhalten zugeschrieben werden konnte (**Tabelle 23**). Da der Großteil der Interaktion der beiden Mikroorganismen netzwerkspezifisch war, ist es wahrscheinlich die hohe Flexibilität hinsichtlich möglicher Interaktionspartner, die zur Sonderstellung beider Mikroorganismen führt (vgl. 4.2.7). Über alle Netzwerke konserviert waren hingegen die Interaktionsmuster und die Proteinexpression verschiedener *Pseudomonas spp.*, die deshalb möglicherweise ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der AD einnehmen (**Abbildung 28**). Eine mögliche Erklärung ist die starke Spezialisierung und die damit verbundene Besetzung identischer ökologischer Nischen, wie die Hydrolyse von Fetten, in allen Anlagen (vgl. 4.2.7).

Die beschriebenen Ergebnisse verifizieren die dritte Hypothese. Es kann davon ausgegangen werden, dass die vorliegenden mikrobiellen Gemeinschaften spezifische Interaktionsmuster ausbilden, die zur Dominanz eines oder mehrerer Methanogenesewege führen.

5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften in BPs und STPs hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, Diversität und mikrobieller Interaktionsmuster voneinander unterscheiden. Weiterführende Untersuchungen könnten klären, ob diese Ergebnisse auch einen Einfluss auf die Resilienz und Robustheit der mikrobiellen Gemeinschaften haben. Dazu bieten sich strukturierte Adaptionsversuche mit hoher Replikationszahl (z.B. mittels Mikrofluidik) an, in deren Rahmen Starterkulturen aus beiden Anlagentypen verschiedene Substrate bzw. Substratmischungen bei variablen Prozessbedingungen (z.B. pH, Temperatur) zur Verfügung gestellt werden. Aufgrund der höheren Diversität und Evenness in STPs ist anzunehmen, dass sich STP-Starterkulturen schneller an geänderte Substrat- und Prozessbedingungen adaptieren und konstant Biogas produzieren. Durch Monitoring der aktiven mikrobiellen Gemeinschaft (Metatranskriptomik, Metaproteomik) könnten Rückschlüsse auf mögliche Adaptionsmechanismen und die Bedeutung der funktionellen Redundanz für die AD gezogen werden. Derartige Versuche können einen wichtigen Beitrag zum tieferen Verständnis der AD leisten und für das gezielte Modellieren der mikrobiellen Gemeinschaft eingesetzt werden.

Aufgrund der hohen Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaften sind die mikrobiellen Interaktionsmuster ebenfalls von großer Bedeutung. Die durch Netzwerkanalysen identifizierten, möglichen Interaktionen können durch Fermentationsversuche mit definierten Co-Kulturen untersucht werden, bei denen bildgebende Methoden wie NanoSIMS und FISH eingesetzt werden, um die zugrundeliegenden Interaktionsmechanismen näher zu charakterisieren. Weiterhin ist es wichtig, die hohe Zahl an bisher nicht kultivierten Organismen näher zu charakterisieren. Aufgrund der hohen Abundanz in allen BPs bietet sich hierzu die Isolierung und Charakterisierung der Mitglieder der Ordnung *MBA08* an, wohingegen dies in STPs für Mitglieder der Familie *Cloacamonaceae* gilt.

Die Analyse der Metaproteome aus 16 Biogasanlagen hat wichtige Einblicke in die Funktion einzelner Mikroorganismen geliefert und das bisherige Wissen um die Funktionalität der mikrobiellen Gemeinschaften während der AD wesentlich ergänzt. Durch die dynamische Weiterentwicklung der Methoden und Analysegeräte ist derzeit die Auswertung der generierten Peptidspektren die größte Herausforderung der Metaproteomik. Für die AD existieren bisher keine umfassenden Datenbanken zur Identifikation der detektierten Proteine. Als vielversprechender Lösungsansatz für dieses Problem gilt die Verwendung von anlagenspezifischen Datenbanken, die durch Annotation der zugehörigen Metagenome gebildet werden können. Um unnötig hohe Kosten für die Metaproteomanalysen zu vermeiden, wäre es empfehlenswert, die in der Literatur vorhandenen Metagenome in einer einzigen, umfassenden Datenbank zusammenzuführen und diese für zukünftige Analysen zu nutzen.

Die Netzwerkanalysen belegten, dass die Mehrheit der mikrobiellen Interaktionen vom dominanten Methanogeneseweg abhängig waren. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten sich deshalb auf die nähere Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften und mikrobiellen Interaktionen der bekannten Methanogenesewege konzentrieren. Nur wenn diese für jeden Methanogeneseweg verstanden sind, können zukünftig Anlagen aus der Praxis gezielt beeinflusst und die Biogasausbeute optimiert werden. Um den Kohlenstofffluss während der AD besser nachvollziehen und mikrobielle Interaktionsmuster identifizieren zu können, empfiehlt sich neben den Netzwerkanalysen auch der Einsatz von fluoreszenz- oder isotopenmarkiertem Substrat. Als geeignetes Substrat würde sich dabei ^{13}C -Glukose anbieten, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass eine Vielzahl von Mikroorganismen über die metabolische Fähigkeit zur Verstoffwechslung verfügt. Durch Verwendung spezifischerer Substrate wie ^{13}C -Cellulose, ^{13}C -Acetat oder ^{13}C -Propionat könnten außerdem gezielt mögliche Flaschenhälse der AD wie die Hydrolyse, syntrophe Acetatoxidation oder die Propionat-Oxidation mittels Metaproteomik und anderen, zwischen stabilen Isotopen diskriminierenden, molekularbiologischen Nachweisverfahren untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der oben vorgeschlagenen, nachfolgenden Arbeiten könnten in Zukunft genutzt werden, um den Biogasprozess stabiler und sowohl

biologisch wie auch ökonomisch effizienter zu gestalten. Denkbar ist die Durchführung eines regelmäßigen Routinescreenings, bei dem, ähnlich einem humanen Blutbild, bestimmte Biomarker (z.B. groEL, MCMR, Abundanz von SAOBs) gemessen werden, um bevorstehende Prozessstörungen zu diagnostizieren. Anschließend können diese Prozessstörungen verhindert werden, indem die Ergebnisse aus den Adaptionversuchen und des SIP-Versuchen genutzt werden, um gezieltes Mikrobiom-Management zu betreiben. Je nach diagnostizierter Prozessstörung könnten dann bestimmte Mikroorganismen (z.B. SAOBs bei Acetatakkumulation) zugegeben, bzw. deren Wachstum unterstützt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abdelgadir, A., Chen, X., Liu, J., Xie, X., Zhang, J., Zhang, K., Wang, H. und Liu, N.** (2014). Characteristics, process parameters, and inner components of anaerobic bioreactors. *Biomed Res. Int.* **2014**, 841573.
- Abram, F., Enright, A.-M., O'Reilly, J., Botting, C. H., Collins, G. und O'Flaherty, V.** (2011). A metaproteomic approach gives functional insights into anaerobic digestion. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1550–1560.
- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V. und Polz, M. F.** (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J. Bacteriol.* **186**, 2629–2635.
- Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S. und Janssen, R.** (2008). *Biogas handbook*. Esbjerg: University of Southern Denmark Esbjerg.
- Alon, U.** (2003). Biological networks: the tinkerer as an engineer. *Science (New York, N.Y.)* **301**, 1866–1867.
- Amann, R. I., Ludwig, W. und Schleifer, K. H.** (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143–169.
- Amaral, L. A., Scala, A., Barthelemy, M. und Stanley, H. E.** (2000). Classes of small-world networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 11149–11152.
- Andrews, S.** (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available Online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C. M. und Stams, A. J. M.** (2011). Biomethanation and its potential. *Methods in enzymology* **494**, 327–351.
- Appels, L., Baeyens, J., Degève, J. und Dewil, R.** (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science* **34**, 755–781.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L. et al.** (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180.

- Auer, L., Lazuka, A., Sillam-Dussès, D., Miambi, E., O'Donohue, M. und Hernandez-Raquet, G.** (2017). Uncovering the Potential of Termite Gut Microbiome for Lignocellulose Bioconversion in Anaerobic Batch Bioreactors. *Front. Microbiol.* **8**, 2623.
- Bachmann, N.** (2015). *Sustainable biogas production in municipal wastewater treatment plants*: IEA Bioenergy.
- Balk, M., Weijma, J. und Stams, A. J. M.** (2002). *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1361–1368.
- Barberán, A., Bates, S. T., Casamayor, E. O. und Fierer, N.** (2014). Erratum: Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J.* **8**, 952.
- Bar-Even, A., Flamholz, A., Noor, E. und Milo, R.** (2012). Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 509–517.
- Bascompte, J., Jordano, P., Melián, C. J. und Olesen, J. M.** (2003). The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9383–9387.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W. T. M., Siegrist, H. und Vavilin, V. A.** (2002). The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Sci. Technol.* **45**, 65–73.
- Bauman, J.G.J., Wiegant, J., Borst, P. und van Duijn, P.** (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA. *Exp. Cell Res.* **128**, 485–490.
- Bayer, E. A., Belaich, J.-P., Shoham, Y. und Lamed, R.** (2004). The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 521–554.
- Belostotskiy, D. E., Ziganshina, E. E., Siniagina, M., Boulygina, E. A., Miluykov, V. A. und Ziganshin, A. M.** (2015). Impact of the substrate loading regime and phosphoric acid supplementation on performance of biogas reactors and microbial community dynamics during anaerobic digestion of chicken wastes. *Bioresour. Technol.* **193**, 42–52.

- Ben Hania, W., Godbane, R., Postec, A., Hamdi, M., Ollivier, B. und Fardeau, M.-L.** (2012). *Defluviitoga tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a mesothermic and anaerobic whey digester. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **62**, 1377–1382.
- Bengelsdorf, F. R., Gerischer, U., Langer, S., Zak, M. und Kazda, M.** (2013). Stability of a biogas-producing bacterial, archaeal and fungal community degrading food residues. *FEMS Microbiol. Ecol.* **84**, 201–212.
- Benjamini, Y. und Hochberg, Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* **57**, 289–300.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., Bignell, H. R., Boutell, J. M., Bryant, J., Carter, R. J., Keira Cheetham, R., Cox, A. J. et al.** (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456**, 53–59.
- Binner, R., Menath, V., Huber, H., Thomm, M., Bischof, F., Schmack, D. und Reuter, M.** (2011). Comparative study of stability and half-life of enzymes and enzyme aggregates implemented in anaerobic biogas processes. *Biomass Conv. Bioref.* **1**, 1–8.
- Blank, C., Easterly, C., Gruening, B., Johnson, J., Kolmeder, C. A., Kumar, P., May, D., Mehta, S., Mesuere, B., Brown, Z., Elias, J. E., Hervey, W. J., McGowan, T., Muth, T., Nunn, B., Rudney, J., Tanca, A., Griffin, T. J. und Jagtap, P. D.** (2018). Disseminating Metaproteomic Informatics Capabilities and Knowledge Using the Galaxy-P Framework. *Proteomes* **6**.
- Blume, F., Bergmann, I., Nettmann, E., Schelle, H., Rehde, G., Mundt, K. und Klocke, M.** (2010). Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 441–450.
- Boe, K., Batstone, D. J., Steyer, J.-P. und Angelidaki, I.** (2010). State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. *Water Res.* **44**, 5973–5980.
- Bolzonella, D., Pavan, P., Battistoni, P. und Cecchi, F.** (2005). Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge: influence of the solid retention time in the wastewater treatment process. *Process Biochem.* **40**, 1453–1460.

- Boone, D. R. und Mah, R. A.** (2015). Methanosarcina. In *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria* (ed. W. B. Whitman), pp. 1–15. [Hoboken, New Jersey]: Wiley.
- Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., Jovanovich, S. B., Krstic, P. S., Lindsay, S., Ling, X. S., Mastrangelo, C. H. et al.** (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* **26**, 1146–1153.
- Bremges, A., Maus, I., Belmann, P., Eikmeyer, F., Winkler, A., Albersmeier, A., Pühler, A., Schlüter, A. und Sczyrba, A.** (2015). Deeply sequenced metagenome and metatranscriptome of a biogas-producing microbial community from an agricultural production-scale biogas plant. *GigaSci* **4**, 33.
- Brown, M. B.** (1975). A Method for Combining Non-Independent, One-Sided Tests of Significance. *Biometrics* **31**, 987.
- Buettner, C. und Noll, M.** (2018a). Comparing microbial community compositions of biogas and sewage treatment plants by analyzing 16S rRNA gene data. *Data Brief* **21**, 395–402.
- Buettner, C. und Noll, M.** (2018b). Differences in microbial key players in anaerobic degradation between biogas and sewage treatment plants. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **133**, 124–132.
- Buettner, C., von Bergen, M., Jehmlich, N. und Noll, M.** (2019). Pseudomonas spp. are key players in agricultural biogas substrate degradation. *Sci. Rep.* **9**.
- Cairó, J. J., Clarens, M., Touzel, J. P., Bardulet, M. und París, J. M.** (1992). Methanosarcina mazei JC2, a new methanogenic strain isolated from lake sediments, that does not use H₂/CO₂. *Microbiologia* **8**, 21–31.
- Calli, B., Mertoglu, B., Inanc, B. und Yenigun, O.** (2005). Community changes during start-up in methanogenic bioreactors exposed to increasing levels of ammonia. *Environ. Technol.* **26**, 85–91.
- Calusinska, M., Goux, X., Fossépré, M., Muller, E. E. L., Wilmes, P. und 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. *Biotechnol. Biofuels* **11**, 196.

- Campanaro, S., Treu, L., Rodriguez-R, L. M., Kovalovszki, A., Ziels, R. M., Maus, I., Zhu, X., Kougias, P. G., Basile, A., Luo, G., Schlüter, A., Konstantinidis, K. T. und Angelidaki, I.** (2019). *The anaerobic digestion microbiome: a collection of 1600 metagenome-assembled genomes shows high species diversity related to methane production.*
- Cardinali-Rezende, J., Colturato, L. F. D. B., Colturato, T. D. B., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. M. A. und Sanz, J. L.** (2012). Prokaryotic diversity and dynamics in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor from start-up to steady-state conditions. *Bioresour. Technol.* **119**, 373–383.
- Clauset, A., Moore, C. und Newman, M. E. J.** (2008). Hierarchical structure and the prediction of missing links in networks. *Nature* **453**, 98–101.
- Clement, B. G., Kehl, L. E., DeBord, K. L. und Kitts, C. L.** (1998). Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Methods* **31**, 135–142.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R. und Tiedje, J. M.** (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **42**, D633-42.
- Connor, E. F. und Simberloff, D.** (1979). The Assembly of Species Communities: Chance or Competition? *Ecology* **60**, 1132.
- Conrad, R.** (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**, 193–202.
- Dabrock, B., Bahl, H. und Gottschalk, G.** (1992). Parameters Affecting Solvent Production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1233–1239.
- DBFZ** (2017). *Anlagenbestand Biogas und Biomethan - Biogaserzeugung und -nutzung in Deutschland.* Leipzig: DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH.
- de Bok, F. A. M., Harmsen, H. J. M., Plugge, C. M., Vries, M. C. de, Akkermans, A. D. L., Vos, W. M. de und Stams, A. J. M.** (2005). The first true obligately syntrophic propionate-oxidizing bacterium, *Pelotomaculum schinkii* sp. nov., co-cultured with

- Methanospirillum hungatei*, and emended description of the genus *Pelotomaculum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1697–1703.
- Demirel, B. und Scherer, P.** (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **7**, 173–190.
- Deng, Y., Jiang, Y.-H., Yang, Y., He, Z., Luo, F. und Zhou, J.** (2012). Molecular ecological network analyses. *BMC Bioinformatics* **13**, 113.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P. und Andersen, G. L.** (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5069–5072.
- Deublein, D. und Steinhauser, A.** (2008). *Biogas from waste and renewable resources. An introduction*. Weinheim [Germany]: Wiley-VCH.
- Diamond, J. M.** (1975). Assembly of Species Communities. In *Ecology and evolution of communities. Dedicated to Robert MacArthur* (ed. M. L. Cody and J. M. Diamond), pp. 342–444. Cambridge, Mass.: Belknap Press.
- Doerfert, S. N., Reichlen, M., Iyer, P., Wang, M. und Ferry, J. G.** (2009). *Methanobrevibacterium zinderi* sp. nov., a methylotrophic methanogen isolated from a deep subsurface coal seam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1064–1069.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. und Stackebrandt, E., eds.** (2006). *The Prokaryotes*: Springer US. New York, NY.
- Edgar, R. C.** (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461.
- EEG 2000** (Fassung vom 29.03.2020). Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien (Erneuerbare-Energien-Gesetz – EEG) sowie zur Änderung des Energiewirtschaftsgesetzes und des Mineralölsteuergesetzes. In Bundesgesetzblatt Jahrgang 2000.
- EEG 2004** (Fassung vom 31.07.2004). Gesetz zur Neuregelung des Rechts der Erneuerbaren Energien im Strombereich. In Bundesgesetzblatt Jahrgang 2004.

- EEG 2009** (Fassung vom 31.10.2008). Gesetz zur Neuregelung des Rechts der Erneuerbaren Energien im Strombereich und zur Änderung damit zusammenhängender Vorschriften. In Bundesgesetzblatt Jahrgang 2009.
- EEG 2012** (Fassung vom 28.07.2011). Gesetz zur Neuregelung des Rechtsrahmens für die Förderung der Stromerzeugung aus erneuerbaren Energien. In Bundesgesetzblatt Jahrgang 2012.
- EEG 2014** (Fassung vom 21.07.2014). Gesetz zur grundlegenden Reform des Erneuerbaren-Energien-Gesetzes und zur Änderung weiterer Bestimmungen des Energiewirtschaftsrechts. In Bundesgesetzblatt Jahrgang 2014.
- EEG 2017** (Fassung vom 13.10.2016). Gesetz zur Einführung von Ausschreibungen für Strom aus erneuerbaren Energien und zu weiteren Änderungen des Rechts der erneuerbaren Energien. In Bundesgesetzblatt Jahrgang 2016.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R. et al.** (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science (New York, N.Y.)* **323**, 133–138.
- Elmore, K. L. und Richman, M. B.** (2001). Euclidean Distance as a Similarity Metric for Principal Component Analysis. *Mon. Wea. Rev.* **129**, 540–549.
- Eng, J. K., McCormack, A. L. und Yates, J. R.** (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 976–989.
- Faust, K. und Raes, J.** (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 538–550.
- Faust, K. und Raes, J.** (2016). CoNet app. Inference of biological association networks using Cytoscape. *F1000Res.* **5**, 1519.
- Ferguson, D. J., Krzycki, J. A. und Grahame, D. A.** (1996). Specific roles of methylcobamide:coenzyme M methyltransferase isozymes in metabolism of methanol and methylamines in *Methanosarcina barkeri*. *J. Biol. Chem.* **271**, 5189–5194.
- Ferguson, R. M. W., Coulon, F. und Villa, R.** (2016). Organic loading rate: A promising microbial management tool in anaerobic digestion. *Water Res.* **100**, 348–356.

- Ferry, J. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 13–38.
- Ferry, J. G., ed. (1993). *Methanogenesis. Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. Chapman & Hall Microbiology Series, Physiology / Ecology / Molecular Biology / Biotechnology: Springer US; Imprint; Springer. Boston, MA.
- Ferry, J. G. (2011). Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 351–357.
- Fischer, M. A., Ulbricht, A., Neulinger, S. C., Refai, S., Waßmann, K., Künzel, S. und Schmitz, R. A. (2019). Immediate Effects of Ammonia Shock on Transcription and Composition of a Biogas Reactor Microbiome. *Front. Microbiol.* **10**, 2064.
- FitzGerald, J. A., Allen, E., Wall, D. M., Jackson, S. A., Murphy, J. D. und Dobson, A. D. W. (2015). *Methanosarcina* play an important role in anaerobic co-digestion of the seaweed *Ulva lactuca*: taxonomy and predicted metabolism of functional microbial communities. *PLoS ONE* **10**, e0142603.
- Flamholz, A., Noor, E., Bar-Even, A., Liebermeister, W. und Milo, R. (2013). Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 10039–10044.
- FNR (2012). Basisdaten Bioenergie Deutschland 2012. Gülzow-Prüzen.
- FNR (2019). Basisdaten Bioenergie Deutschland 2019. Gülzow-Prüzen.
- Fotidis, I. A., Karakashev, D., Kotsopoulos, T. A., Martzopoulos, G. G. und Angelidaki, I. (2013). Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *FEMS microbiology ecology* **83**, 38–48.
- Frank, J. A., Arntzen, M. Ø., Sun, L., Hagen, L. H., McHardy, A. C., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H., Schnürer, A. und Pope, P. B. (2016). Novel Syntrophic Populations Dominate an Ammonia-Tolerant Methanogenic Microbiome. *mSystems* **1**.
- Freier, D., Mothershed, C. P. und Wiegell, J. (1988). Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 204–211.
- Frias-Lopez, J., Shi, Y., Tyson, G. W., Coleman, M. L., Schuster, S. C., Chisholm, S. W. und Delong, E. F. (2008). Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 3805–3810.

- Fröschle, B., Heiermann, M., Lebuhn, M., Messelhäusser, U. und Plöchl, M.** (2015). Hygiene and Sanitation in Biogas Plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **151**, 63–99.
- Gabris, C., Bengelsdorf, F. R. und Dürre, P.** (2015). Analysis of the key enzymes of butyric and acetic acid fermentation in biogas reactors. *Microb. Biotechnol.* **8**, 865–873.
- Gagliano, M. C., Braguglia, C. M., Gallipoli, A., Gianico, A. und Rossetti, S.** (2015). Microbial diversity in innovative mesophilic/thermophilic temperature-phased anaerobic digestion of sludge. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**, 7339–7348.
- Gemmecke, B.** (2009). Biogasmessprogramm II. 61 Biogasanlagen im Vergleich.
- Gerardi, M. H.** (2003). *Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process*. New York: Wiley-Interscience John Wiley & Sons.
- Gilbert, J. A., Steele, J. A., Caporaso, J. G., Steinbrück, L., Reeder, J., Temperton, B., Huse, S., McHardy, A. C., Knight, R., Joint, I., Somerfield, P., Fuhrman, J. A. und Field, D.** (2012). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J.* **6**, 298–308.
- Girvan, M. und Newman, M. E. J.** (2002). Community structure in social and biological networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 7821–7826.
- Goux, X., Calusinska, M., Fossepre, M., Benizri, E. und Delfosse, P.** (2016). Start-up phase of an anaerobic full-scale farm reactor - Appearance of mesophilic anaerobic conditions and establishment of the methanogenic microbial community. *Bioresour. Technol.* **212**, 217–226.
- Goux, X., Calusinska, M., Lemaigre, S., Marynowska, M., Klocke, M., Udelhoven, T., Benizri, E. und Delfosse, P.** (2015). Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnol. Biofuels* **8**, 1.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G. und Bailey, M. J.** (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5488–5491.
- Guimerà, R. und Nunes Amaral, L. A.** (2005). Functional cartography of complex metabolic networks. *Nature* **433**, 895–900.

- Guimerà, R., Sales-Pardo, M. und Amaral, L. A. N.** (2007). Classes of complex networks defined by role-to-role connectivity profiles. *Nat. Phys.* **3**, 63–69.
- Guo, J., Peng, Y., Ni, B.-J., Han, X., Fan, L. und Yuan, Z.** (2015). Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microb Cell Fact* **14**, 33.
- Guo, X., Wang, C., Sun, F., Zhu, W. und Wu, W.** (2014). A comparison of microbial characteristics between the thermophilic and mesophilic anaerobic digesters exposed to elevated food waste loadings. *Bioresour. Technol.* **152**, 420–428.
- Gupta, R. S., Mahmood, S. und Adeolu, M.** (2013). A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum Spirochaetes and its major clades. *Front. Microbiol.* **4**, 217.
- Hagen, L. H., Frank, J. A., Zamanzadeh, M., Eijsink, V. G. H., Pope, P. B., Horn, S. J. und Arntzen, M. Ø.** (2017). Quantitative Metaproteomics Highlight the Metabolic Contributions of Uncultured Phylotypes in a Thermophilic Anaerobic Digester. *Applied and Environmental Microbiology* **83**.
- Hahn, H., Krautkremer, B., Hartmann, K. und Wachendorf, M.** (2014). Review of concepts for a demand-driven biogas supply for flexible power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **29**, 383–393.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. und Goodman, R. M.** (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**, R245-R249.
- Hanreich, A., Schimpf, U., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Benndorf, D., Heyer, R., Rapp, E., Pühler, A., Reichl, U. und Klocke, M.** (2013). Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 330–338.
- Hassa, J., Maus, I., Off, S., Pühler, A., Scherer, P., Klocke, M. und Schlüter, A.** (2018). Metagenome, metatranscriptome, and metaproteome approaches unraveled compositions and functional relationships of microbial communities residing in biogas plants. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 5045–5063.

- Hattori, S.** (2008). Syntrophic Acetate-Oxidizing Microbes in Methanogenic Environments. *Microbes Environ.* **23**, 118–127.
- Hattori, S., Galushko, A. S., Kamagata, Y. und Schink, B.** (2005). Operation of the CO dehydrogenase/acetyl coenzyme A pathway in both acetate oxidation and acetate formation by the syntrophically acetate-oxidizing bacterium *Thermacetogenium phaeum*. *J. Bacteriol.* **187**, 3471–3476.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S. und Shoun, H.** (2000). *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50 Pt 4**, 1601–1609.
- Hecht, M.** (2009). *Die Bedeutung des Carbonat-Puffersystems für die Stabilität des Gärprozesses landwirtschaftlicher Biogasanlagen*. Bonn: Verein zur Förderung der Agrikulturchemie e.V. c/o Inst. für Pflanzenernährung.
- Heyer, R., Benndorf, D., Kohrs, F., Vrieze, J. de, Boon, N., Hoffmann, M., Rapp, E., Schlüter, A., Sczyrba, A. und Reichl, U.** (2016). Proteotyping of biogas plant microbiomes separates biogas plants according to process temperature and reactor type. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 155.
- Heyer, R., Kohrs, F., Benndorf, D., Rapp, E., Kausmann, R., Heiermann, M., Klocke, M. und Reichl, U.** (2013). Metaproteome analysis of the microbial communities in agricultural biogas plants. *N. Biotechnol.* **30**, 614–622.
- Heyer, R., Kohrs, F., Reichl, U. und Benndorf, D.** (2015). Metaproteomics of complex microbial communities in biogas plants. *Microb. Biotechnol.* **8**, 749–763.
- 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. und Reichl, U.** (2019). Metaproteome analysis reveals that syntrophy, competition, and phage-host interaction shape microbial communities in biogas plants. *Microbiome* **7**, 69.
- Heyer, R., Schallert, K., Zoun, R., Becher, B., Saake, G. und Benndorf, D.** (2017). Challenges and perspectives of metaproteomic data analysis. *J. Biotechnol.* **261**, 24–36.
- Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C. und Ariff, A. B.** (2012). Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Res.* **2012**.

- Huser, B. A., Wuhrmann, K. und Zehnder, A. J. B.** (1982). *Methanothrix soehngenii* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.* **132**, 1–9.
- Imachi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohashi, A. und Harada, H.** (2002). *Pelotomaculum thermopropionicum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1729–1735.
- Jaenicke, S., Ander, C., Bekel, T., Bisdorf, R., Dröge, M., Gartemann, K.-H., Jünemann, S., Kaiser, O., Krause, L., Tille, F., Zakrzewski, M., Pühler, A., Schlüter, A. und Goesmann, A.** (2011). Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PloS one* **6**, e14519.
- Jennifer R. Town und Tim J. Dumonceaux** (2016). Laboratory-scale bioaugmentation relieves acetate accumulation and stimulates methane production in stalled anaerobic digesters. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 1009–1017.
- Jetten, M. S.M., Stams, A. J.M. und Zehnder, A. J.B.** (1992). Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **88**, 181–198.
- Jiang, Y., Banks, C., Zhang, Y., Heaven, S. und Longhurst, P.** (2018). Quantifying the percentage of methane formation via acetoclastic and syntrophic acetate oxidation pathways in anaerobic digesters. *Waste management (New York, N.Y.)* **71**, 749–756.
- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor, P. G., Hu, Z., McCabe, M., Cormican, P., Zhan, X. und Gardiner, G. E.** (2019). Exploring the roles of and interactions among microbes in dry co-digestion of food waste and pig manure using high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Biotechnol Biofuels* **12**, 5.
- Jin, P., Bhattacharya, S. K., Williams, C. J. und Zhang, H.** (1998). Effects of sulfide addition on copper inhibition in methanogenic systems. *Water Res.* **32**, 977–988.
- Kanehisa, M.** (2000). KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 27–30.

- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. und Morishima, K.** (2017). KEGG - New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **45**, D353-D361.
- Karakashev, D., Batstone, D. J., Trably, E. und Angelidaki, I.** (2006). Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5138–5141.
- Katcher, H. L. und Schwartz, I.** (1994). A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. *BioTechniques* **16**, 84–92.
- Kato, S., Sasaki, K., Watanabe, K., Yumoto, I. und Kamagata, Y.** (2014). Physiological and transcriptomic analyses of the thermophilic, acetoclastic methanogen *Methanosaeta thermophila* responding to ammonia stress. *Microbes Environ.* **29**, 162–167.
- Keller, A., Schink, B. und Müller, N.** (2019). Energy-Conserving Enzyme Systems Active During Syntrophic Acetate Oxidation in the Thermophilic Bacterium *Thermacetogenium phaeum*. *Front. Microbiol.* **10**, 2785.
- Kirkegaard, R. H., McIlroy, S. J., Kristensen, J. M., Nierychlo, M., Karst, S. M., Dueholm, M. S., Albertsen, M. und Nielsen, P. H.** (2017). The impact of immigration on microbial community composition in full-scale anaerobic digesters. *Sci. Rep.* **7**, 9343.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. und Glockner, F. O.** (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **41**, e1.
- Kohrs, F., Heyer, R., Magnussen, A., Benndorf, D., Muth, T., Behne, A., Rapp, E., Kausmann, R., Heiermann, M., Klocke, M. und Reichl, U.** (2014). Sample prefractionation with liquid isoelectric focusing enables in depth microbial metaproteome analysis of mesophilic and thermophilic biogas plants. *Anaerobe* **29**, 59–67.
- Konopka, A., Lindemann, S. und Fredrickson, J.** (2015). Dynamics in microbial communities: unraveling mechanisms to identify principles. *ISME J.* **9**, 1488–1495.

- Kougias, P. G. und Angelidaki, I.** (2018). Biogas and its opportunities—A review. *Front. Environ. Sci. Eng.* **12**, 14.
- Kougias, P. G., Kotsopoulos, T. A. und Martzopoulos, G. G.** (2014). Effect of feedstock composition and organic loading rate during the mesophilic co-digestion of olive mill wastewater and swine manure. *Renewable Energy* **69**, 202–207.
- Kougias, P. G., Treu, L., Campanaro, S., Zhu, X. und Angelidaki, I.** (2016). Dynamic functional characterization and phylogenetic changes due to Long Chain Fatty Acids pulses in biogas reactors. *Scientific reports* **6**.
- Kovács, E., Wirth, R., Maróti, G., Bagi, Z., Nagy, K., Minárovits, J., Rákhely, G. und Kovács, K. L.** (2015). Augmented biogas production from protein-rich substrates and associated metagenomic changes. *Bioresour. Technol.* **178**, 254–261.
- Krieg, N. R., Staley, J. T., Brown, D. R., Hedlund, B. P., Paster, B. J., Ward, N. L., Ludwig, W. and Whitman, W. B., eds.** (2010). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*, Vol. 4: Springer-Verlag. New York.
- Labatut, R. A., Angenent, L. T. und Scott, N. R.** (2014). Conventional mesophilic vs. thermophilic anaerobic digestion: a trade-off between performance and stability? *Water Res.* **53**, 249–258.
- Langer, S. G., Ahmed, S., Einfalt, D., Bengelsdorf, F. R. und Kazda, M.** (2015). Functionally redundant but dissimilar microbial communities within biogas reactors treating maize silage in co-fermentation with sugar beet silage. *Microb. Biotechnol.* **8**, 828–836.
- Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepile, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G. und Huttenhower, C.** (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* **31**, 814–821.
- Lê, S., Josse, J. und Husson, F.** (2008). FactoMineR. An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Soft.* **25**.

- Li, A., Chu, Y.'n., Wang, X., Ren, L., Yu, J., Liu, X., Yan, J., Zhang, L., Wu, S. und Li, S. (2013). A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 3.
- Li, Q., Cheng, X., Yuwen, C., Yang, X., Qiao, W., Li, Y.-Y. und Wang, X. (2018). Strategies for the stable performance and rapid inhibition recovery of a thermophilic digester treating coffee wastes and the synergistic effects of microbes. *Int. Biodeterior. Biodegradation*.
- Li, Y.-F., Nelson, M. C., Chen, P.-H., Graf, J., Li, Y. und Yu, Z. (2015). Comparison of the microbial communities in solid-state anaerobic digestion (SS-AD) reactors operated at mesophilic and thermophilic temperatures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 969–980.
- Liang, B., Wang, L.-Y., Mbadanga, S. M., Liu, J.-F., Yang, S.-Z., Gu, J.-D. und Mu, B.-Z. (2015). Anaerolineaceae and Methanosaeta turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation. *AMB Expr* **5**, 117.
- Liang, X., Whitham, J. M., Holwerda, E. K., Shao, X., Tian, L., Wu, Y.-W., Lombard, V., Henrissat, B., Klingeman, D. M., Yang, Z. K., Podar, M., Richard, T. L., Elkins, J. G., Brown, S. D. und Lynd, L. R. (2018). Development and characterization of stable anaerobic thermophilic methanogenic microbiomes fermenting switchgrass at decreasing residence times. *Biotechnol. Biofuels* **11**, 243.
- Liebetrau, J., Pfeiffer, D. and Thrän, D., eds. (2013). *Messmethodensammlung Biogas. Methoden zur Bestimmung von analytischen und prozessbeschreibenden Parametern im Biogasbereich*. Schriftenreihe des BMU-Förderprogramms, 7.
- Lienen, T., Kleyböcker, A., Brehmer, M., Kraume, M., Moeller, L., Görsch, K. und Würdemann, H. (2013). Floating layer formation, foaming, and microbial community structure change in full-scale biogas plant due to disruption of mixing and substrate overloading. *Energ Sustain Soc* **3**, 1–14.
- Lin, L., Yan, R., Liu, Y. und Jiang, W. (2010). In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. *Bioresource technology* **101**, 8217–8223.

- Lindgren, S. E., Axelsson, L. T. und McFeeters, R. F.** (1990). Anaerobic l-lactate degradation by *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**, 209–213.
- Liu, C.-F., Yuan, X.-Z., Zeng, G.-M., Li, W.-W. und Li, J.** (2008). Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Bioresour. Technol.* **99**, 882–888.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. und Forney, L. J.** (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4516–4522.
- Louca, S., Doebeli, M. und Parfrey, L. W.** (2018). Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome* **6**, 41.
- Lu, L., Yin, S., Liu, X., Zhang, W., Gu, T., Shen, Q. und Qiu, H.** (2013). Fungal networks in yield-invigorating and -debilitating soils induced by prolonged potato monoculture. *Soil Biol. Biochem.* **65**, 186–194.
- Lü, F., Hao, L., Guan, D., Qi, Y., Shao, L. und He, P.** (2013). Synergetic stress of acids and ammonium on the shift in the methanogenic pathways during thermophilic anaerobic digestion of organics. *Water Res.* **47**, 2297–2306.
- Luo, F., Zhong, J., Yang, Y., Scheuermann, R. H. und Zhou, J.** (2006). Application of random matrix theory to biological networks. *Physics Letters A* **357**, 420–423.
- Lv, Z., Hu, M., Harms, H., Richnow, H. H., Liebetrau, J. und Nikolausz, M.** (2014). Stable isotope composition of biogas allows early warning of complete process failure as a result of ammonia inhibition in anaerobic digesters. *Bioresour. Technol.* **167**, 251–259.
- Madsen, M., Holm-Nielsen, J. B. und Esbensen, K. H.** (2011). Monitoring of anaerobic digestion processes: A review perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**, 3141–3155.
- Maleki, S., Hrudikova, R., Zotchev, S. B. und Ertesvåg, H.** (2017). Identification of a New Phosphatase Enzyme Potentially Involved in the Sugar Phosphate Stress Response in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**.

- Manzoor, S., Bongcam-Rudloff, E., Schnürer, A. und Müller, B.** (2016). Genome-Guided Analysis and Whole Transcriptome Profiling of the Mesophilic Syntrophic Acetate Oxidising Bacterium *Syntrophaceticus schinkii*. *PLoS ONE* **11**, e0166520.
- Manzoor, S., Müller, B., Niazi, A., Bongcam-Rudloff, E. und Schnürer, A.** (2013). Draft Genome Sequence of *Clostridium ultunense* Strain Esp, a Syntrophic Acetate-Oxidizing Bacterium. *Genome Announc.* **1**, e0010713.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C. et al.** (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376–380.
- Martin, M.** (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* **17**, 10.
- Maslov, S. und Sneppen, K.** (2002). Specificity and stability in topology of protein networks. *Science* **296**, 910–913.
- Masset, J., Calusinska, M., Hamilton, C., Hiligsmann, S., Joris, B., Wilmotte, A. und Thonart, P.** (2012). Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. *Biotechnol Biofuels* **5**, 35.
- Maus, I., Cibis, K. G., Bremges, A., Stolze, Y., Wibberg, D., Tomazetto, G., Blom, J., Sczyrba, A., König, H., Pühler, A. und Schlüter, A.** (2016a). Genomic characterization of *Defluviitoga tunisiensis* L3, a key hydrolytic bacterium in a thermophilic biogas plant and its abundance as determined by metagenome fragment recruitment. *Journal of biotechnology* **232**, 50–60.
- Maus, I., Cibis, K. G., Wibberg, D., Winkler, A., Stolze, Y., König, H., Pühler, A. und Schlüter, A.** (2015). Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. *J. Biotechnol.* **203**, 17–18.
- Maus, I., Koeck, D. E., Cibis, K. G., Hahnke, S., Kim, Y. S., Langer, T., Kreubel, J., Erhard, M., Bremges, A., Off, S., Stolze, Y., Jaenicke, S., Goesmann, A., Sczyrba, A., Scherer, P. et al.** (2016b). Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas

- plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 171.
- McIlroy, S. J., Kirkegaard, R. H., Dueholm, M. S., Fernando, E., Karst, S. M., Albertsen, M. und Nielsen, P. H.** (2017). Culture-Independent Analyses Reveal Novel Anaerolineaceae as Abundant Primary Fermenters in Anaerobic Digesters Treating Waste Activated Sludge. *Front. Microbiol.* **8**, 1134.
- McMahon, K. D., Martin, H. G. und Hugenholtz, P.** (2007). Integrating ecology into biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 287–292.
- Meegoda, J. N., Li, B., Patel, K. und Wang, L. B.** (2018). A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**.
- Meerbergen, K., van Geel, M., Waud, M., Willems, K. A., Dewil, R., van Impe, J., Appels, L. und Lievens, B.** (2017). Assessing the composition of microbial communities in textile wastewater treatment plants in comparison with municipal wastewater treatment plants. *MicrobiologyOpen* **6**.
- Miceli, J. F., Torres, C. I. und Krajmalnik-Brown, R.** (2016). Shifting the balance of fermentation products between hydrogen and volatile fatty acids: microbial community structure and function. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**.
- Mikaelyan, A., Strassert, J. F. H., Tokuda, G. und Brune, A.** (2014). The fibre-associated cellulolytic bacterial community in the hindgut of wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.). *Environ. Microbiol.* **16**, 2711–2722.
- Moset, V., Poulsen, M., Wahid, R., Højberg, O. und Møller, H. B.** (2015). Mesophilic versus thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. Methane productivity and microbial ecology. *Microb. Biotechnol.* **8**, 787–800.
- Müller, B., Sun, L., Westerholm, M. und Schnürer, A.** (2016). Bacterial community composition and fhs profiles of low- and high-ammonia biogas digesters reveal novel syntrophic acetate-oxidising bacteria. *Biotechnol Biofuels* **9**, 48.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263–273.

- Müllner, D.** (2013). fastcluster. fast hierarchical, agglomerative clustering routines for R and Python. *J. Stat. Soft.* **53**.
- Munk, B., Bauer, C., Gronauer, A. und Lebuhn, M.** (2012). A metabolic quotient for methanogenic Archaea. *Water Sci. Technol.* **66**, 2311–2317.
- Muriel, C., Jalvo, B., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R. und Martín, M.** (2015). Chemotactic Motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under Aerobic and Denitrification Conditions. *PLoS ONE* **10**, e0132242.
- Muth, T., Behne, A., Heyer, R., Kohrs, F., Benndorf, D., Hoffmann, M., Lehtevä, M., Reichl, U., Martens, L. und Rapp, E.** (2015). The MetaProteomeAnalyzer: a powerful open-source software suite for metaproteomics data analysis and interpretation. *J. Proteome Res.* **14**, 1557–1565.
- Muyzer, G., Waal, E. C. de und Uitterlinden, A. G.** (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700.
- Nazina, T., Ivanova, A., Kanchaveli, L. P. und Rozanova, E. P.** (1988). A new sporeforming thermophilic methylotrophic sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum kuznetsovii* sp. nov. *Mikrobiologiya* **47**, 823–827.
- Nelson, M. C., Morrison, M. und Yu, Z.** (2011). A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresour. Technol.* **102**, 3730–3739.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschufer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C. und Klocke, M.** (2010). Polyphasic Analyses of Methanogenic Archaeal Communities in Agricultural Biogas Plants. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 2540–2548.
- Newman, M. E. J.** (2006). Modularity and community structure in networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 8577–8582.
- Nikolausz, M., Walter, R F H, Sträuber, H., Liebetrau, J., Schmidt, T., Kleinsteuber, S., Bratfisch, F., Günther, U. und Richnow, H. H.** (2013). Evaluation of stable isotope fingerprinting techniques for the assessment of the predominant methanogenic pathways in anaerobic digesters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 2251–2262.

- Nisman, B.** (1954). The Stickland reaction. *Bacteriol. Rev.* **18**, 16–42.
- Nobu, M. K., Narihiro, T., Kuroda, K., Mei, R. und Liu, W.-T.** (2016). Chasing the elusive Euryarchaeota class WSA2: genomes reveal a uniquely fastidious methyl-reducing methanogen. *ISME J.* **10**, 2478–2487.
- Noike, T., Endo, G., Chang, J. E., Yaguchi, J. und Matsumoto, J.** (1985). Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 1482–1489.
- Noll, M., Klose, M. und Conrad, R.** (2010). Effect of temperature change on the composition of the bacterial and archaeal community potentially involved in the turnover of acetate and propionate in methanogenic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**, 215–225.
- Noll, M., Matthies, D., Frenzel, P., Derakshani, M. und Liesack, W.** (2005). Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ. Microbiol.* **7**, 382–395.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E. und Wagner, H.** (2017). vegan: community Ecology Package. R package version 2.4-3.
- Olesen, J. M., Bascompte, J., Dupont, Y. L. und Jordano, P.** (2007). The modularity of pollination networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 19891–19896.
- Oliver, S.** (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* **16**, 373–378.
- Ortseifen, V., Stolze, Y., Maus, I., Sczyrba, A., Bremges, A., Albaum, S. P., Jaenicke, S., Fracowiak, J., Pühler, A. und Schlüter, A.** (2016). An integrated metagenome and -proteome analysis of the microbial community residing in a biogas production plant. *Journal of biotechnology* **231**, 268–279.
- Pampillón-González, L., Ortiz-Cornejo, N. L., Luna-Guido, M., Dendooven, L. und Navarro-Noya, Y. E.** (2017). Archaeal and Bacterial Community Structure in an Anaerobic Digestion Reactor (Lagoon Type) Used for Biogas Production at a Pig Farm. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 306–317.

- Park, J.-G., Shin, W.-B., Shi, W.-Q. und Jun, H.-B.** (2019). Changes of Bacterial Communities in an Anaerobic Digestion and a Bio-Electrochemical Anaerobic Digestion Reactors According to Organic Load. *Energies* **12**, 2958.
- Park, S.-C. und Won, S.** (2018). Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using Mock Community. *Genomics Inform.* **16**, e24.
- Parro, V., Moreno-Paz, M. und González-Toril, E.** (2007). Analysis of environmental transcriptomes by DNA microarrays. *Environ. Microbiol.* **9**, 453–464.
- Patel, G. B. und Sprott, G.** (1990). *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("Methanothrix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 79–82.
- Patil, S. S., Kumar, M. S. und Ball, A. S.** (2010). Microbial community dynamics in anaerobic bioreactors and algal tanks treating piggery wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 353–363.
- Pavlostathis, S. G. und Giraldo-Gomez, E.** (1991). Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Critical Reviews in Environmental Control* **21**, 411–490.
- Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J. und Gaudin, C.** (1984). *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a Cellulolytic, Mesophilic: Species from Decayed Grass. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 155–159.
- Poretsky, R. S., Bano, N., Buchan, A., LeCleir, G., Kleikemper, J., Pickering, M., Pate, W. M., Moran, M. A. und Hollibaugh, J. T.** (2005). Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4121–4126.
- Qi, G., Ma, G., Chen, S., Lin, C. und Zhao, X.** (2019). Microbial Network and Soil Properties Are Changed in Bacterial Wilt-Susceptible Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. und Glockner, F. O.** (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, D590-6.
- R Core Team** (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.

- Ranford, J. C., Coates, A. R. und Henderson, B.** (2000). Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. *Expert Rev. Mol. Med.* **2**, 1–17.
- Revelle, W.** (2018). psych: Procedures for Personality and Psychological Research. R-package version 1.8.12.
- Rieger, C. und Weiland, P.** (2006). Prozessstörungen frühzeitig erkennen. *Biogas-Journal*, 18–20.
- Ringnér, M.** (2008). What is principal component analysis? *Nat Biotechnol* **26**, 303–304.
- Rocheleau, Greer, Lawrence, Cantin, Laramee und Guiot** (1999). Differentiation of methanosaeta concilii and methanosarcina barkeri in anaerobic mesophilic granular sludge by fluorescent In situ hybridization and confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2222–2229.
- Rodríguez-Valera, F.** (2004). Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 153–158.
- Rojo, F.** (2010). Carbon catabolite repression in Pseudomonas : optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 658–684.
- Ros, M., Souza Oliveira Filho, J. de, Perez Murcia, M. D., Bustamante, M. A., Moral, R., Coll, M. D., Lopez Santísima-Trinidad, A. B. und Pascual, J. A.** (2017). Mesophilic anaerobic digestion of pig slurry and fruit and vegetable waste. Dissection of the microbial community structure. *J. Clean. Prod.* **156**, 757–765.
- Rosenwinkel, K.-H., Kroiss, H., Dichtl, N., Seyfried, C.-F. and Weiland, P., eds.** (2015). *Anaerobtechnik. Abwasser-, Schlamm- und Reststoffbehandlung, Biogasgewinnung*. SpringerLink : Bücher: Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg.
- Rudkin, G. T. und Stollar, B. D.** (1977). High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* **265**, 472–473.
- Rui, J., Li, J., Zhang, S., Yan, X., Wang, Y. und Li, X.** (2015). The core populations and co-occurrence patterns of prokaryotic communities in household biogas digesters. *Biotechnol. Biofuels* **8**, 158.
- Salmonová, H. und Bunešová, V.** (2017). Methods of Studying Diversity of Bacterial Communities: A Review. *Scientia Agriculturae Bohemica* **48**, 154–165.

- Schink, B.** (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 262–280.
- Schink, B. und Stams, A. J. M.** (2006). Syntrophism Among Prokaryotes. In *The Prokaryotes* (ed. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt), pp. 471–493. New York, NY: Springer US.
- Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N. N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Krahn, I., Krause, L., Krömeke, H., Kruse, O., Mussnug, J. H., Neuweiger, H., Niehaus, K., Pühler, A., Runte, K. J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Tilker, A., Viehöver, P. und Goesmann, A.** (2008). The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J. Biotechnol.* **136**, 77–90.
- Schnürer, A. und Nordberg, A.** (2008). Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Sci. Technol.* **57**, 735–740.
- Schnürer, A., Schink, B. und Svensson, B. H.** (1996). *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 1145–1152.
- Schnürer, A., Zellner, G. und Svensson, B. H.** (1999). Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* **29**, 249–261.
- Schweikl, H., Klein, U., Schindlbeck, M. und Wieczorek, H.** (1989). A vacuolar-type ATPase, partially purified from potassium transporting plasma membranes of tobacco hornworm midgut. *J. Biol. Chem.* **264**, 11136–11142.
- Senés-Guerrero, C., Colón-Contreras, F. A., Reynoso-Lobo, J. F., Tinoco-Pérez, B., Siller-Cepeda, J. H. und Pacheco, A.** (2019). Biogas-producing microbial composition of an anaerobic digester and associated bovine residues. *MicrobiologyOpen* **8**, e00854.
- Shaw, G. T.-W., Liu, A.-C., Weng, C.-Y., Chou, C.-Y. und Wang, D.** (2017). Inferring microbial interactions in thermophilic and mesophilic anaerobic digestion of hog waste. *PLoS ONE* **12**, e0181395.

- Shelton, J. L., Akob, D. M., McIntosh, J. C., Fierer, N., Spear, J. R., Warwick, P. D. und McCray, J. E.** (2016). Environmental Drivers of Differences in Microbial Community Structure in Crude Oil Reservoirs across a Methanogenic Gradient. *Front. Microbiol.* **7**, 1535.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M.** (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* **68**, 850–858.
- Shoham, Y., Lamed, R. und Bayer, E. A.** (1999). The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol.* **7**, 275–281.
- Sieber, J. R., McNerney, M. J. und Gunsalus, R. P.** (2012). Genomic insights into syntrophy: the paradigm for anaerobic metabolic cooperation. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 429–452.
- Siggins, A., Gunnigle, E. und Abram, F.** (2012). Exploring mixed microbial community functioning: recent advances in metaproteomics. *FEMS microbiology ecology* **80**, 265–280.
- Sivagurunathan, P., Anburajan, P., Kumar, G., Kobayashi, T., Xu, K. Q., Lee, C.-Y. und Kim, S.-H.** (2016). High-rate hydrogen production from galactose in an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASBr). *RSC Adv.* **6**, 59823–59833.
- Soufi, B., Krug, K., Harst, A. und Macek, B.** (2015). Characterization of the *E. coli* proteome and its modifications during growth and ethanol stress. *Front. Microbiol.* **6**, 103.
- Stams, A. J. M. und Plugge, C. M.** (2009). Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 568–577.
- Starke, R., Müller, M., Gaspar, M., Marz, M., Küsel, K., Totsche, K. U., von Bergen, M. und Jehmlich, N.** (2017). Candidate Brocadiales dominates C, N and S cycling in anoxic groundwater of a pristine limestone-fracture aquifer. *J. Proteomics* **152**, 153–160.
- Statistisches Bundesamt** (2019). *Statistisches Jahrbuch Deutschland 2019*. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt.

- Steele, J. A., Countway, P. D., Xia, L., Vigil, P. D., Beman, J. M., Kim, D. Y., Chow, C.-E. T., Sachdeva, R., Jones, A. C., Schwalbach, M. S., Rose, J. M., Hewson, I., Patel, A., Sun, F., Caron, D. A. und Fuhrman, J. A.** (2011). Marine bacterial, archaeal and protistan association networks reveal ecological linkages. *ISME J.* **5**, 1414–1425.
- Stickland, L. H.** (1934). Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*): The chemical reactions by which *Cl. sporogenes* obtains its energy. *Biochem. J.* **28**, 1746–1759.
- Strang, O., Ács, N., Wirth, R., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G. und Kovács, K. L.** (2017). Bioaugmentation of the thermophilic anaerobic biodegradation of cellulose and corn stover. *Anaerobe* **46**, 104–113.
- Sträuber, H., Schröder, M. und Kleinsteuber, S.** (2012). Metabolic and microbial community dynamics during the hydrolytic and acidogenic fermentation in a leach-bed process. *Energ Sustain Soc* **2**, 13.
- Su, G., Kuchinsky, A., Morris, J. H., States, D. J. und Meng, F.** (2010). GLayer. Community structure analysis of biological networks. *Bioinformatics (Oxford, England)* **26**, 3135–3137.
- Sun, L., Liu, T., Müller, B. und Schnürer, A.** (2016). The microbial community structure in industrial biogas plants influences the degradation rate of straw and cellulose in batch tests. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 128.
- Sun, L., Müller, B., Westerholm, M. und Schnürer, A.** (2014). Syntrophic acetate oxidation in industrial CSTR biogas digesters. *J. Biotechnol.* **171**, 39–44.
- Sundberg, C., Al-Soud, W. A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S. S., Svensson, B. H., Sørensen, S. J. und Karlsson, A.** (2013). 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**, 612–626.
- Sutlovic, D., Gamulin, S., Definis-Gojanovic, M., Gusic, D. und Andjelinovic, S.** (2008). Interaction of humic acids with human DNA: proposed mechanisms and kinetics. *Electrophoresis* **29**, 1467–1472.
- Swings, J. und Ley, J. de** (1977). The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* **41**, 1–46.

- Tang, Y., Shigematsu, T., Iqbal, Morimura, S. und Kida, K.** (2004). The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester. *Water Res.* **38**, 2537–2550.
- Tang, Y.-Q., Matsui, T., Morimura, S., Wu, X.-L. und Kida, K.** (2008). Effect of temperature on microbial community of a glucose-degrading methanogenic consortium under hyperthermophilic chemostat cultivation. *J. Biosci. Bioeng.* **106**, 180–187.
- Teixeira Franco, R., Buffière, P. und Bayard, R.** (2016). Ensiling for biogas production: Critical parameters. A review. *Biomass and Bioenergy* **94**, 94–104.
- Thauer, R. K.** (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology (Reading, Engl.)* **144 (Pt 9)**, 2377–2406.
- Thauer, R. K., Jungermann, K. und Decker, K.** (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**, 100–180.
- Thauer, R. K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W. und Hedderich, R.** (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 579–591.
- Theuerl, S., Herrmann, C., Heiermann, M., Grundmann, P., Landwehr, N., Kreidenweis, U. und Prochnow, A.** (2019a). The Future Agricultural Biogas Plant in Germany: A Vision. *Energies* **12**, 396.
- Theuerl, S., Klang, J., Heiermann, M. und Vrieze, J. de** (2018). Marker microbiome clusters are determined by operational parameters and specific key taxa combinations in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* **263**, 128–135.
- Theuerl, S., Klang, J. und Prochnow, A.** (2019b). Process Disturbances in Agricultural Biogas Production—Causes, Mechanisms and Effects on the Biogas Microbiome: A Review. *Energies* **12**, 365.
- Theuerl, S., Kohrs, F., Benndorf, D., Maus, I., Wibberg, D., Schlüter, A., Kausmann, R., Heiermann, M., Rapp, E., Reichl, U., Pühler, A. und Klocke, M.** (2015). Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 7791–7803.

- Treu, L., Kougias, P. G., Campanaro, S., Bassani, I. und Angelidaki, I.** (2016). Deeper insight into the structure of the anaerobic digestion microbial community; the biogas microbiome database is expanded with 157 new genomes. *Bioresour. Technol.* **216**, 260–266.
- Tringe, S. G. und Hugenholtz, P.** (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 442–446.
- Tsavkelova, E. A. und Netrusov, A. I.** (2012). Biogas production from cellulose-containing substrates: a review. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **48**, 469–483.
- Tweeddale, H., Notley-McRobb, L. und Ferenci, T.** (1998). Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *J. Bacteriol.* **180**, 5109–5116.
- Tzirita, M., Papanikolaou, S. und Quilty, B.** (2019). Enhanced fat degradation following the addition of a *Pseudomonas* species to a bioaugmentation product used in grease traps. *J. Environ. Sci. (China)* **77**, 174–188.
- Urich, T., Lanzén, A., Qi, J., Huson, D. H., Schleper, C. und Schuster, S. C.** (2008). Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. *PLoS ONE* **3**, e2527.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P. D., Ho, D. P., Batstone, D. J. und Tyson, G. W.** (2014). Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Current Opinion in Biotechnology* **27**, 55–64.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P. D., Rabaey, K. und Tyson, G. W.** (2015). Temperature and solids retention time control microbial population dynamics and volatile fatty acid production in replicated anaerobic digesters. *Sci. Rep.* **5**, 8496.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P. D., Rabaey, K. und Tyson, G. W.** (2016). Genome-centric resolution of microbial diversity, metabolism and interactions in anaerobic digestion. *Environmental microbiology* **18**, 3144–3158.
- Vavilin, V. A., Fernandez, B., Palatsi, J. und Flotats, X.** (2008). Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview. *Waste Manag.* **28**, 939–951.

- Vavilin, V. A., Rytov, S. V. und Lokshina, L.Y.** (1996). A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresour. Technol.* **56**, 229–237.
- Venkiteshwaran, K., Bocher, B., Maki, J. und Zitomer, D.** (2015). Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function. *Microbiology insights* **8**, 37–44.
- Verstraete, W., Wittebolle, L., Heylen, K., Vanparys, B., Vos, P. de, van de Wiele, T. und Boon, N.** (2007). Microbial Resource Management: The Road To Go for Environmental Biotechnology. *Eng. Life Sci.* **7**, 117–126.
- Visser, M., Worm, P., Muyzer, G., Pereira, I. A. C., Schaap, P. J., Plugge, C. M., Kuever, J., Parshina, S. N., Nazina, T. N., Ivanova, A. E., Bernier-Latmani, R., Goodwin, L. A., Kyrpides, N. C., Woyke, T., Chain, P., Davenport, K. W., Spring, S., Klenk, H.-P. und Stams, A. J. M.** (2013). Genome analysis of *Desulfotomaculum kuznetsovii* strain 17(T) reveals a physiological similarity with *Pelotomaculum thermopropionicum* strain SI(T). *Stand. Genomic Sci.* **8**, 69–87.
- Vrieze, J. de, Pinto, A. J., Sloan, W. T. und Ijaz, U. Z.** (2018). The active microbial community more accurately reflects the anaerobic digestion process: 16S rRNA (gene) sequencing as a predictive tool. *Microbiome* **6**, 63.
- Vrieze, J. de, Saunders, A. M., He, Y., Fang, J., Nielsen, P. H., Verstraete, W. und Boon, N.** (2015). Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. *Water Res.* **75**, 312–323.
- Vrieze, J. de und Verstraete, W.** (2016). Perspectives for microbial community composition in anaerobic digestion: from abundance and activity to connectivity. *Environ. Microbiol.* **18**, 2797–2809.
- Wagner, A. O., Lackner, N., Mutschlechner, M., Prem, E. M., Markt, R. und Illmer, P.** (2018). Biological Pretreatment Strategies for Second-Generation Lignocellulosic Resources to Enhance Biogas Production. *Energies* **11**, 1797.
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J. und Meng, L.** (2009). Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy* **33**, 848–853.

- Washburn, M. P., Wolters, D. und Yates, J. R.** (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242–247.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W.E.C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. und Truper, H. P.** (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **37**, 463–464.
- Weiland, P.** (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 849–860.
- Weithmann, N., Weig, A. R. und Freitag, R.** (2016). Process parameters and changes in the microbial community patterns during the first 240 days of an agricultural energy crop digester. *AMB Express* **6**, 53.
- Welander, P. V. und Metcalf, W. W.** (2005). Loss of the mtr operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 10664–10669.
- Welte, C. und Deppenmeier, U.** (2014). Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetoclastic methanogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 1130–1147.
- Westerholm, M., Dolfing, J., Sherry, A., Gray, N. D., Head, I. M. und Schnürer, A.** (2011a). Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. *Environmental microbiology reports* **3**, 500–505.
- Westerholm, M., Levén, L. und Schnürer, A.** (2012). Bioaugmentation of syntrophic acetate-oxidizing culture in biogas reactors exposed to increasing levels of ammonia. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7619–7625.
- Westerholm, M., Moestedt, J. und Schnürer, A.** (2016). Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance. *Appl. Energy* **179**, 124–135.
- Westerholm, M., Roos, S. und Schnürer, A.** (2010). *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. *FEMS Microbiol. Lett.* **309**, 100–104.

- Westerholm, M., Roos, S. und Schnürer, A.** (2011b). *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 260–266.
- Wiegel, J., Tanner, R. und Rainey, F. A.** (2006). An Introduction to the Family Clostridiaceae. In *The Prokaryotes* (ed. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt), pp. 654–678. New York, NY: Springer US.
- Wintzingerode, F. von, Göbel, U. B. und Stackebrandt, E.** (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 213–229.
- Winzer, K., Lorenz, K. und Dürre, P.** (1997). Acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum*: a highly specific enzyme that is actively transcribed during acidogenesis and solventogenesis. *Microbiology (Reading, Engl.)* **143 (Pt 10)**, 3279–3286.
- Wirth, R., Böjti, T., Lakatos, G., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G. und Kovács, K. L.** (2019). Characterization of Core Microbiomes and Functional Profiles of Mesophilic Anaerobic Digesters Fed With *Chlorella vulgaris* Green Microalgae and Maize Silage. *Front. Energy Res.* **7**.
- Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G. und Kovács, K. L.** (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol. Biofuels* **5**, 41.
- Wofford, N. Q., Beaty, P. S. und McInerney, M. J.** (1986). Preparation of cell-free extracts and the enzymes involved in fatty acid metabolism in *Syntrophomonas wolfei*. *J. Bacteriol.* **167**, 179–185.
- Wu, J., Cao, Z., Hu, Y., Wang, X., Wang, G., Zuo, J., Wang, K. und Qian, Y.** (2017). Microbial Insight into a Pilot-Scale Enhanced Two-Stage High-Solid Anaerobic Digestion System Treating Waste Activated Sludge. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **14**.
- Yachi, S. und Loreau, M.** (1999). Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1463–1468.

- Yang, Y., Yu, K., Xia, Y., Lau, F. T. K., Tang, D. T. W., Fung, W. C., Fang, H. H. P. und Zhang, T.** (2014). Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5709–5718.
- Ye, L., Zhang, T., Wang, T. und Fang, Z.** (2012). Microbial structures, functions, and metabolic pathways in wastewater treatment bioreactors revealed using high-throughput sequencing. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 13244–13252.
- Yi, Y., Wang, H., Chen, Y., Gou, M., Xia, Z., Hu, B., Nie, Y. und Tang, Y.** (2020). Identification of Novel Butyrate- and Acetate-Oxidizing Bacteria in Butyrate-Fed Mesophilic Anaerobic Chemostats by DNA-Based Stable Isotope Probing. *Microb. Ecol.* **79**, 285–298.
- Yu, Z., Morrison, M. und Schanbacher, F. L.** (2010). Production and Utilization of Methane Biogas as Renewable Fuel. In Biomass to biofuels. *Strategies for global industries* (ed. A. A. Vertes), pp. 403–433. Chichester, U.K.: Wiley.
- Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O. und Georgopoulos, C.** (1991). The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 301–325.
- Zhang, B., Yu, Q., Yan, G., Zhu, H., Xu, X. Y. und Zhu, L.** (2018). Seasonal bacterial community succession in four typical wastewater treatment plants: correlations between core microbes and process performance. *Sci. Rep.* **8**, 4566.
- Zhang, C., Su, H., Baeyens, J. und Tan, T.** (2014). Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **38**, 383–392.
- Zhang, C., Xiao, G., Peng, L., Su, H. und Tan, T.** (2013). The anaerobic co-digestion of food waste and cattle manure. *Bioresour. Technol.* **129**, 170–176.
- Zhou, J., Deng, Y., Luo, F., He, Z., Tu, Q. und Zhi, X.** (2010). Functional molecular ecological networks. *mBio* **1**, e00169-10.
- Zhou, J., Deng, Y., Luo, F., He, Z. und Yang, Y.** (2011). Phylogenetic molecular ecological network of soil microbial communities in response to elevated CO₂. *mBio* **2**, e00122-11.

- Zhu, C., Zhang, J., Tang, Y., Zhengkai, X. und Song, R.** (2011). Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by mcrA analysis. *Microbiol. Res.* **166**, 27–35.
- Ziganshin, A. M., Ziganshina, E. E., Kleinsteuber, S. und Nikolausz, M.** (2016). Comparative Analysis of Methanogenic Communities in Different Laboratory-Scale Anaerobic Digesters. *Archaea (Vancouver, B.C.)* **2016**, 3401272.
- Zinder, S. H.** (1993). Physiological Ecology of Methanogens. In *Methanogenesis. Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics* (ed. J. G. Ferry), pp. 128–206. Boston, MA: Springer US; Imprint; Springer.
- Zinder, S. H. und Koch, M.** (1984). Non-aceticlastic methanogenesis from acetate. Acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. *Arch. Microbiol.* **138**, 263–272.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater **Prof. Dr. Matthias Noll** für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Herzlichen Dank für die immerwährende Diskussionsbereitschaft und die stets offene Tür bei Problemen, das entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit bei der Umsetzung meiner Ideen.

Frau **Prof. Dr. Ruth Freitag** danke ich herzlich für die Übernahme des Mentorats, ebenso **Herrn Prof. Dr. Dirk Schüler**, der sich außerdem bereit erklärt hat, ein Gutachten dieser Arbeit anzufertigen. Auch danke ich **Prof. Dr. Tillmann Lüders** für die Bereitschaft zur Anfertigung des Drittgutachtens.

Danke an die **Bayerische Forschungsförderung**, die einen Teil dieser Arbeit finanziert hat.

Weiterer Dank geht an **Herrn Dr. Nico Jehmlich** vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig für den Crashkurs in der Metaproteomik und die Möglichkeit die Proteommessungen in Leipzig durchführen. Danke auch für die Einladung zum Metaproteomsymposium und die Möglichkeit in diesem Rahmen meine Forschung präsentieren zu können. Diese Erfahrungen waren für mich äußerst lehrreich.

Danke an die **Betreiber aller Biogas- und Kläranlagen**, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei allen aktuellen oder ehemaligen Doktoranden der Bioanalytik: **Sandra Lasota, Julia Kenzel, Angeline Hoffmann, Isabelle Aillaud, Sarah Muszynski, Marwa Malhis, Laura Hoen** und **Maik Szendy**. Danke für die unzähligen fachlichen Diskussionen und den positiven Zuspruch in schlechten Phasen.

Ebenfalls danke ich auch an allen weiteren Mitarbeitern der Bioanalytik für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung in den letzten Jahren. Vielen

Dank an **Dr. Eva-Maria Wittmann** für das Korrekturlesen dieser Arbeit, die konstruktiven Verbesserungsvorschläge und für alle unsere Gespräche.

Besonderer Dank gebührt **Florian Westhäuser**, mit dem ich lange Zeit ein Büro teilen durfte, für das Korrekturlesen und die vielen wissenschaftlichen und auch nichtwissenschaftlichen Gespräche - ich habe noch viel von dir lernen können!

Auch allen Studenten, deren Abschlussarbeit ich betreuen durfte, möchte ich herzlich danken. Es hat mir viel Spaß bereitet mit euch zusammenzuarbeiten. Ihr habt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen!

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner ganzen **Familie**, insbesondere meinen **Eltern**, meiner **Oma** und meinen beiden **Brüdern**. Ihr habt mich immer unterstützt, und wart immer für mich da. **Opa**, wir vermissen dich!

Danke **Marion** für die vergangenen Jahre, die ich mit dir verbringen durfte. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft und bin gespannt, was das Leben noch so alles für uns bereithält.

8 Anhang

8.1 Abbildungen

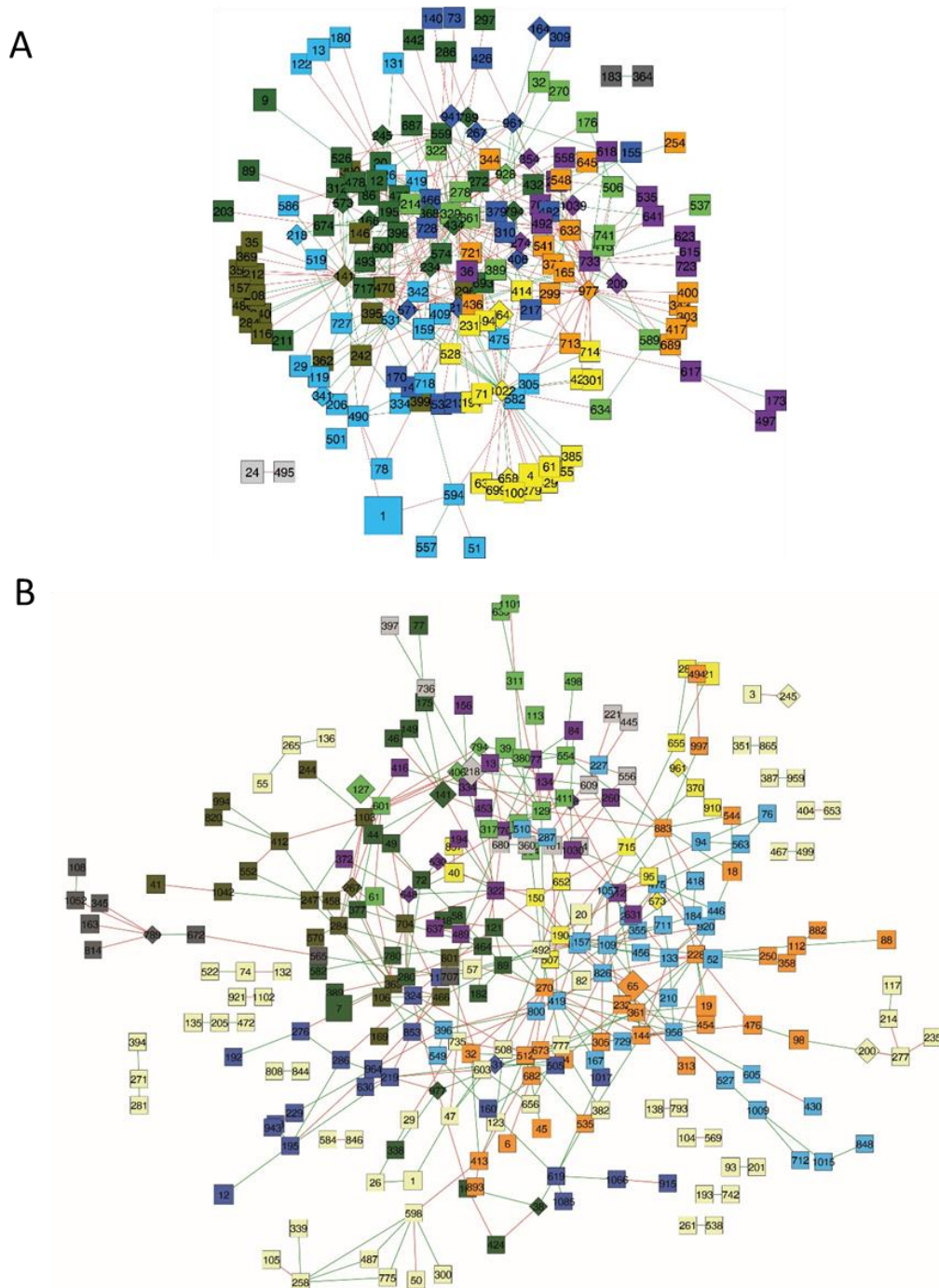


Abbildung A01: Berechnete OTU-Netzwerke für Biogasanlagen (A) und Kläranlagen (B)

Jeder Knoten repräsentiert eine OTU, welche mit der entsprechenden Nummer gekennzeichnet ist. Archaeelle OTUs sind als Raute dargestellt, bakterielle OTUs als Rechteck. Die Größe der Knoten gibt die Summe der relativen Abundanzen in allen Biogas- bzw. Kläranlagen an. Die verschiedenen Farben zeigen die jeweilige Modulzugehörigkeit an, wobei OTU in Modulen mit weniger als zehn Mitgliedern in schwachem Gelb dargestellt werden. Grüne Kanten zeigen positive Interaktionen an, rote Kanten negative Interaktionen.

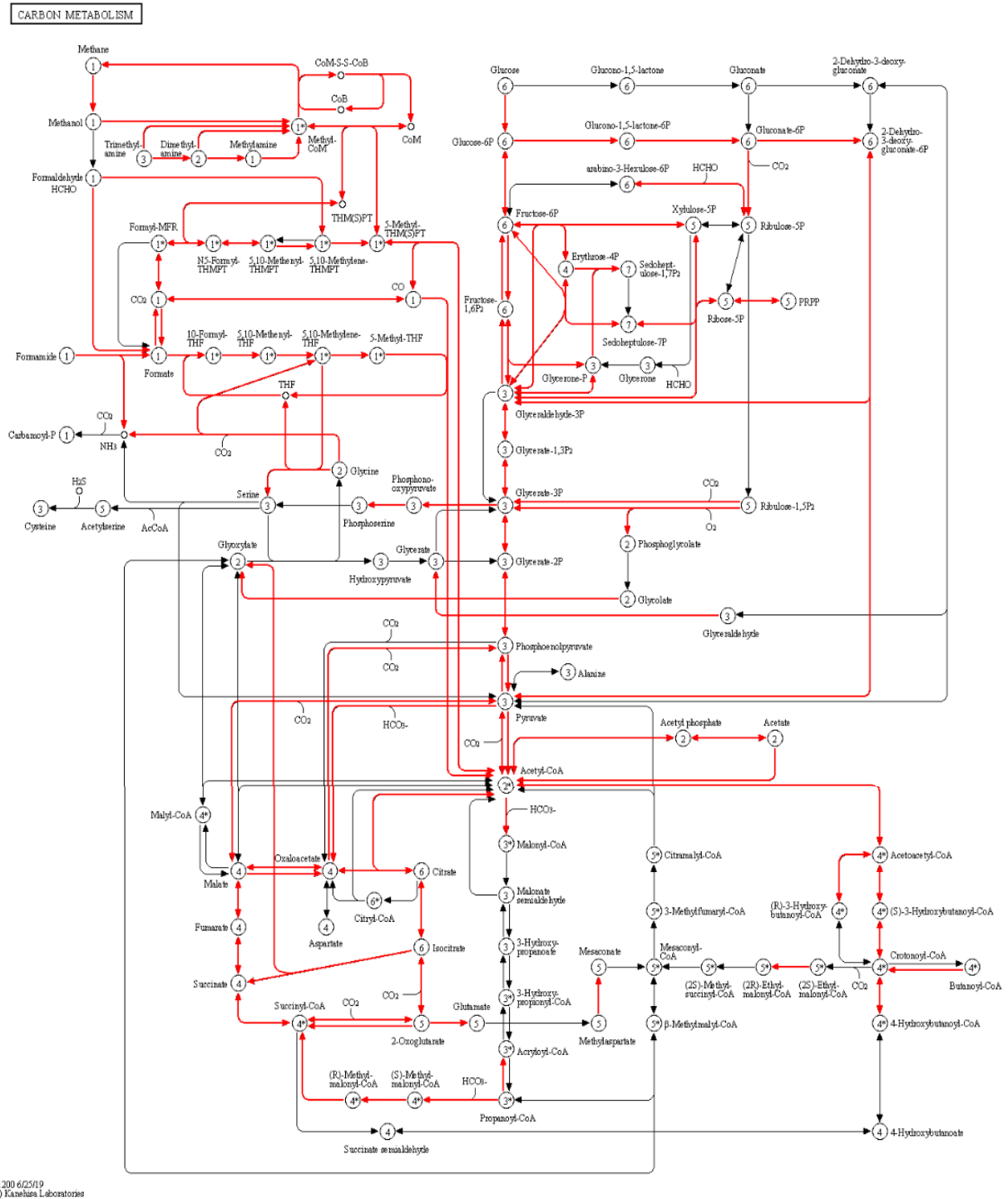


Abbildung A02: Mapping aller gefundenen Proteine auf KEGG-Stoffwechselkarte 1200 (Carbon metabolism)

In rot sind alle Stoffwechselwege markiert, für die entsprechende Proteine gefunden wurden. Dabei wurden weder Abundanzen, noch das Vorhandensein in einer bestimmten Zahl an Proben o.ä. berücksichtigt.

8.2 Tabellen

Tabelle A01: Übersicht der erhaltenen Reads in den verschiedenen Anlagen

Anlage	Archaeelle Reads	Bakterielle Reads	Gesamtreads	Anteil an <i>Archaea</i> [%]
BP01	12.582 (25)	528.877 (751)	541.459 (776)	2,32
BP02	32.702 (27)	532.193 (788)	564.895 (815)	5,79
BP03	10.008 (25)	278.469 (774)	288.477 (799)	3,47
BP04	3.428 (18)	617.422 (691)	620.850 (709)	0,55
BP05	5.174 (23)	589.997 (756)	595.171 (779)	0,87
BP06	444 (23)	677.397 (764)	677.841 (787)	0,07
BP07	1.453 (23)	547.612 (768)	549.065 (791)	0,26
BP08	1.165 (32)	491.586 (750)	492.751 (782)	0,24
BP09	4.227 (28)	360.512 (750)	364.739 (778)	1,16
BP10	823 (32)	567.344 (788)	568.167 (820)	0,14
BP11	2.842 (19)	457.160 (657)	460.002 (676)	0,62
BP12	3.580 (19)	370.102 (651)	373.682 (670)	0,96
BP13	3.915 (21)	580.618 (734)	584.533 (755)	0,67
BP14	2.763 (27)	562.615 (728)	565.378 (755)	0,49
BP15	1.763 (22)	344.700 (638)	346.463 (660)	0,51
BP16	677 (27)	337.862 (647)	338.539 (674)	0,20
BPs	$\Sigma = 87.546$	$\Sigma = 7.844.466$	$\Sigma = 7.932.012$	$\bar{\Sigma} = 1,14 \pm 1,52$
STP01	17.551 (29)	353.740 (818)	371.291 (847)	4,73
STP02	14.264 (29)	261.399 (753)	275.663 (782)	5,17
STP03	34.710 (32)	414.954 (888)	449.664 (920)	7,72
STP04	29.478 (32)	366.452 (752)	395.930 (784)	7,45
STP05	15.841 (24)	365.226 (862)	381.067 (886)	4,16
STP06	15.259 (28)	466.103 (770)	481.362 (798)	3,17
STP07	9.090 (29)	340.744 (786)	349.834 (815)	2,60
STP08	13.631 (32)	247.368 (790)	260.999 (822)	5,22
STP09	14.681 (28)	367.327 (741)	382.008 (769)	3,84
STP10	9.588 (31)	398.893 (827)	408.481 (858)	2,35
STPs	$\Sigma = 174.093$	$\Sigma = 3.582.206$	$\Sigma = 3.756.299$	$\bar{\Sigma} = 4,64 \pm 1,84$

Tabelle A02: Berechnete Diversitätsindices für alle BPs und STPs. Berücksichtigt wurden dabei nur OTUs mit einer relativen Abundanz von mind. 0,1%. Die Signifikanzwerte sind definiert als $p < 0,01$ (*) und $p < 0,001$ (**) und beziehen sich auf den Unterschied zwischen den dem Mittelwert des ökologischen Indizes in BPs und STPs.

Anlage	Richness*	Chao1	ACE	Shannon**	Simpson*	Evenness**
BP01	776	855	851	4,675	0,976	0,703
BP02	815	889	905	4,737	0,98	0,707
BP03	799	888	898	4,842	0,98	0,724
BP04	709	822	837	4,036	0,944	0,615
BP05	779	886	871	4,394	0,964	0,66
BP06	787	917	917	3,584	0,922	0,537
BP07	791	934	906	3,415	0,893	0,512
BP08	782	909	909	3,408	0,892	0,512
BP09	778	945	941	3,47	0,9	0,521
BP10	820	936	934	3,538	0,922	0,527
BP11	676	780	800	3,711	0,923	0,57
BP12	670	819	826	3,685	0,932	0,566
BP13	755	892	874	3,4	0,92	0,513
BP14	755	860	858	3,232	0,875	0,488
BP15	660	781	779	2,924	0,849	0,45
BP16	674	819	858	2,445	0,765	0,375
Ø BPs	752 ± 55	871 ± 54	873 ± 47	3,719 ± 0,667	0,915 ± 0,055	0,561 ± 0,098
STP01	847	954	969	4,933	0,986	0,732
STP02	782	863	864	4,697	0,978	0,705
STP03	920	994	998	4,596	0,975	0,673
STP04	784	843	853	4,94	0,987	0,741
STP05	886	951	963	4,837	0,976	0,713
STP06	798	914	895	4,508	0,971	0,675
STP07	815	881	884	4,755	0,981	0,709
STP08	822	889	884	4,766	0,981	0,71
STP09	769	857	858	4,446	0,956	0,669
STP10	858	981	959	4,348	0,953	0,644
Ø STPs	828 ± 49	913 ± 54	913 ± 54	4,683 ± 0,203	0,974 ± 0,012	0,697 ± 0,031

Tabelle A03: Übersicht generalistischer OTUs im Biogasanlagen-Netzwerk

OTU	Rolle	Königreich	Stamm	Klasse	Ordnung	Familie	Genus	Rolle während AD
OTU0354		Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobacterium	Hyd. Methanogenese
OTU1039		Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobacterium	Hyd. Methanogenese
OTU0274		Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosaetaceae	Methanosaeta	Acet. Methanogenese
OTU0531		Archaea	Parvarchaeota	Parvarchaea	WCHD3-30	NA	NA	Unbekannt
OTU0159		Bacteria	Acidobacteria	BPC102	MVS-40	NA	NA	Hyd./Acid.
OTU0310		Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	NA	NA	Hyd./Acid.
OTU0305		Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	NA	Hyd./Acid.
OTU0493		Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Caldilineales	NA	NA	Unbekannt
OTU0519		Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SBR1031	SHA-31	NA	Acetogenese
OTU0389		Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	SBR1031	SHA-31	NA	Acetogenese
OTU0432		Bacteria	Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	Fibrobacter	Hyd./Acid.
OTU0379		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	Hyd./Acid.
OTU0574		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	NA	Hyd./Acid.
OTU0396		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	Hyd./Acid.
OTU0728		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	NA	Hyd./Acid.
OTU0661	Connector	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	Hyd./Acid.
OTU0558		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	NA	Hyd./Acid.
OTU0436		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	NA	Hyd./Acid.
OTU0399		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	NA	Hyd./Acid.
OTU0414		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	NA	NA	NA	Unbekannt
OTU0342		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacteriales	Thermoanaerobacteraceae	Thermacetogenium	Acetat-Oxidation
OTU0713		Bacteria	Firmicutes	NA	NA	NA	NA	Unbekannt
OTU0482		Bacteria	Lentisphaerae	Lentisphaeria	Z20	R4-45B	NA	Unbekannt
OTU0535		Bacteria	OD1	NA	NA	NA	NA	Unbekannt
OTU0528		Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetia	Pirellulales	Pirellulaceae	NA	Unbekannt
OTU0582		Bacteria	Spirochaetes	MVP-15	PL-11B10	NA	NA	Hyd./Acid.
OTU0222		Bacteria	SR1	NA	NA	NA	NA	Unbekannt
OTU0329		Bacteria	Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Thermovirgaceae	NA	Unbekannt
OTU0278		Bacteria	Tenericutes	RF3	ML615J-28	NA	NA	Unbekannt
OTU0470		Bacteria	WPS-2	NA	NA	NA	NA	Unbekannt
OTU0693		Bacteria	WS1	NA	NA	NA	NA	Unbekannt
OTU1022		Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanoregulaceae	Methanolinea	Hyd. Methanogenese
OTU0928	Module Hub	Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	NA	NA	Hyd. Methanogenese
OTU0326		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	SHA-98	NA	NA	Unbekannt
OTU0733		Bacteria	WWE1	Cloacamonae	Cloacamonales	NA	NA	Hyd./Acid.
OTU0434		Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobacterium	Hyd. Methanogenese
OTU0216	Network Hub	Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	NA	NA	Hyd. Methanogenese
OTU0977		Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosaetaceae	Methanosaeta	Acet. Methanogenese
OTU0141		Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales	Methanosaetaceae	Methanosaeta	Acet. Methanogenese

Tabelle A04: Übersicht generalistischer OTUs im Kläranlagen-Netzwerk

OTU	Rolle	Königreich	Stamm	Klasse	Ordnung	Familie	Genus	Rolle während AD
OTU1021		Bacteria	Acidobacteria	BPC102	B110	NA	NA	Unbekannt
OTU0964		Bacteria	Acidobacteria	Chloracidobacteria	DS-100	NA	NA	Unbekannt
OTU0707		Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Intrasporangiaceae	NA	Unbekannt
OTU0556	Connector	Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	NA	Hyd./Acid.
OTU0322		Bacteria	Fibrobacteres	TG3	TG3-1	NA	NA	Unbekannt
OTU0883		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium	Hyd./Acid.
OTU0121		Bacteria	Firmicutes	Clostridia	OPB54	NA	NA	Hyd./Acid.
OTU0363		Bacteria	Spirochaetes	Leptospirae	Leptospirales	Sediment-4	SJA-88	Hyd./Acid.
OTU0789		Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanomicrobiales	NA	NA	Hyd. Methanogenese
OTU0129	Module Hubs	Bacteria	NA	NA	NA	NA	NA	Unbekannt
OTU0228		Bacteria	SR1	NA	NA	NA	NA	Unbekannt

Tabelle A05: Übersicht der mittleren absoluten Häufigkeit und relativen Abundanz jedes Phylums pro Anlage.

Phylum	Absolut [1/BP]		Relativ [%]	
	Mittelwert	Standardabweichung	Abundanz	Standardabweichung
Firmicutes	1291	91	23.4862	8.4054
Euryarchaeota	876	97	50.2299	12.0376
Proteobacteria	745	14	10.8735	2.0429
Bacteroidetes	303	29	3.3043	0.8167
Actinobacteria	109	6	0.9764	0.2562
Cyanobacteria	51	5	3.1338	1.7542
Thermotogae	58	4	3.8073	6.0907
Chloroflexi	40	2	0.2185	0.0626
Spirochaetes	37	3	0.2422	0.121
Synergistetes	42	5	1.063	0.6614
Candidatus Cloacimonetes	17	4	0.1834	0.149
Fusobacteria	11	2	0.1484	0.0993
Planctomycetes	10	1	0.0341	0.0107
Tenericutes	12	1	0.0363	0.0117
Deinococcus-Thermus	9	1	0.0545	0.0231
Crenarchaeota	11	2	0.0479	0.0087
Verrucomicrobia	10	2	0.0332	0.0164
Acidobacteria	10	1	0.071	0.0316
Nitrospirae	7	2	0.0809	0.0236
Ignavibacteriae	8	1	0.0863	0.0327
Chlorobi	5	2	0.0339	0.0102
Fibrobacteres	6	3	0.0444	0.0581
Candidatus Bathyarchaeota	6	1	0.1937	0.1252
Gemmatimonadetes	7	2	0.0228	0.0057
candidate division Zixibacteria	5	1	0.1109	0.0608
Deferribacteres	4	1	0.0133	0.0062
Candidatus Omnitrophica	4	1	0.0175	0.0094
Armatimonadetes	4	1	0.7917	0.6904
Aquificae	4	1	0.0177	0.0117
Candidatus Parcubacteria	2	1	0.0069	0.0126
Dictyoglomi	3	1	0.0988	0.0534
Chlamydiae	2	1	0.0079	0.0052
candidate division NC1NA	1	0	0.003	0.0032
Candidatus Amesbacteria	1	0	0.1817	0.0906
Candidatus Atribacteria	1	0	0.0051	0.0054
Kiritimatiellaeota	1	0	0.0233	0.0137
Candidatus Latescibacteria	2	0	0.015	0.0055
Candidatus Peregrinibacteria	1	0	0.0046	0.0051
Nitrospinae	1	1	0.001	0.0016
Candidatus Gottesmanbacteria	2	0	0.027	0.0377
Thaumarchaeota	2	0	0.0526	0.0358
Thermodesulfobacteria	1	0	0.0027	0.0028
Elusimicrobia	1	1	0.001	0.0012
candidate division WOR-3	2	1	0.0039	0.0021
Calditrichaeota	1	1	0.0027	0.0019
Candidatus Nomurabacteria	1	1	0.0025	0.0028
Candidatus Fermentibacteria	1	0	0.0048	0.0046
Candidatus Marinimicrobia	1	0	0.0067	0.0074
candidate division CPR3	1	0	0.0015	0.0015
Balneolaeota	0	1	0.0005	0.0012
Candidatus Acetothermia	1	0	0.0031	0.0023
candidate division KD3-62	1	0	0.0336	0.0394
Candidatus Beckwithbacteria	1	0	0.0023	0.0021
Candidatus Curtissbacteria	1	0	0.0015	0.0014
Candidatus Korarchaeota	1	0	0.0029	0.0019
Candidatus Saccharibacteria	0	0	0.0003	0.0005
candidate division WWE3	0	0	0.0001	0.0002
Candidatus Yanofskybacteria	1	0	0.0013	0.0012
Candidatus Roizmanbacteria	1	1	0.0007	0.0008
Caldiserica	0	0	0.0003	0.0006
Candidatus Woesebacteria	1	0	0.0011	0.0008
Candidatus Tectomicrobia	1	1	0.0011	0.0012
Chrysiogenetes	0	1	0.0003	0.0004
Candidatus Berkelbacteria	1	1	0.0011	0.0014
Unassigned Bacteria	24	3	0.1267	0.059
Unassigned Archaea	2	1	0.0135	0.0086

8.3 Elektronische Tabellen

Folgende Tabellen finden sich aufgrund ihres großen Umfangs auf der dieser Arbeit beiliegenden CD:

- Tabelle AE01:** Ausführliche Übersicht der Kernmikrobiome in Biogas- und Kläranlagen
- Tabelle AE02:** Detaillierte Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften der Biogasanlagen auf Basis der 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung für verschiedene taxonomischen Ebenen
- Tabelle AE03:** Detaillierte Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften der Biogasanlagen auf Basis der 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung für verschiedene taxonomischen Ebenen
- Tabelle AE04:** Beobachtete Korrelationen der mikrobiellen Gemeinschaft in Biogasanlagen mit den Prozessparametern auf verschiedenen taxonomischen Ebenen für die 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung
- Tabelle AE05:** Beobachtete Korrelationen der mikrobiellen Gemeinschaft in Kläranlagen mit den Prozessparametern auf verschiedenen taxonomischen Ebenen für die 16S rRNA Gen Amplikonsequenzierung
- Tabelle AE06:** Übersicht aller Knoten und Kanten der berechneten mikrobiellen Netzwerke für Biogas- und Kläranlagen
- Tabelle AE07:** Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft auf Basis der taxonomischen Zuordnung identifizierter Proteine für verschiedene taxonomische Ebenen
- Tabelle AE08:** Funktionelle Zuordnung der identifizierten Proteine zu KO-Terms und Enzymklassen
- Tabelle AE09:** Korrelationen verschiedener taxonomischer Einheiten und Funktionen mit den Prozessparametern der Biogasanlagen auf Basis der Proteindaten
- Tabelle AE10:** Übersicht der Knoten und Kanten für alle auf Basis der Proteindaten berechneten Netzwerke

9 Publikationen, Vorträge und Poster

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Originalpublikationen:

Buettner, C. and Noll, M. (2018a). Comparing microbial community compositions of biogas and sewage treatment plants by analyzing 16S rRNA gene data. *Data Brief* **21**, 395–402.

Buettner, C. and Noll, M. (2018b). Differences in microbial key players in anaerobic degradation between biogas and sewage treatment plants. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **133**, 124–132.

Buettner, C., von Bergen, M., Jehmlich, N. and Noll, M. (2019). *Pseudomonas* spp. are key players in agricultural biogas substrate degradation. *Sci. Rep.* **9**, 12871.

Tagungsbeiträge:

Buettner, C., Noll, M. (2017). Comparing microbial diversity in biogas and sewage treatment plants by 16S rRNA gene amplicon sequencing. 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM, Würzburg, Deutschland, 5.-8. März 2017, Poster 356/EEP.

Buettner, C., Jehmlich, N., Noll, M. (2018). Comparative 16S rRNA gene amplicon and proteome analyses of 16 biogas plants revealed unexpected insights into anaerobic degradation of different organic wastes. 17th International Symposium on Microbial Ecology, Leipzig, Deutschland, 12.-17. August 2018, Poster 418A.

Buettner, C., Jehmlich, N., Noll, M. (2018). Complex microbial interaction patterns during anaerobic degradation in 16 biogas plants discovered by network analyses of metaproteome data sets. 3rd International Metaproteomics Symposium, Leipzig, Deutschland, 3.-5. Dezember 2018, Vortrag.

Zusätzlich wurden Beiträge zu folgenden Publikationen geleistet, die kein Teil dieser Arbeit sind:

Noll, M., Buettner, C. und Lasota, S. (2019). Copper containing wood preservatives shifted bacterial and fungal community compositions in pine sapwood in two field sites. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **142**, 26–35.

Haange, S.-B., Jehmlich, N., Krügel, U., Hintschich, C., Wehrmann, D., Hankir, M., Seyfried, F., Froment, J., Hübschmann, T., Müller, S., Wissenbach, D. K., Kang, K., Buettner, C., Panagiotou, G., Noll, M., Rolle-Kampczyk, U., Fenske, W. und von Bergen, M. (2020). Gastric bypass surgery in a rat model alters the community structure and functional composition of the intestinal microbiota independently of weight loss. *Microbiome* **8**, 13

10 (Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....

Ort, Datum, Unterschrift