

# Schlussbericht

## zum Vorhaben

Thema:

**Fehlvergärungen und Prozessstörungen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen - Etablierung und Umsetzung eines Labor- und Verfahrensprotokolls zur zeitnahen Ursachenaufklärung unter besonderer Berücksichtigung der Systemmikrobiologie**

Zuwendungsempfänger:

**Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB)  
Abt. Bioverfahrenstechnik  
Max-Eyth-Allee 100  
14469 Potsdam**

Förderkennzeichen:

**22013913**

Laufzeit:

**01.11.2014 bis 31.12.2017**

Monat der Erstellung:

**06/2018**

Monat der Veröffentlichung:

**06/2019**

Gefördert durch:



**Bundesministerium  
für Ernährung  
und Landwirtschaft**

**aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages**

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

bearbeitet durch:

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

Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB)

Abt. Bioverfahrenstechnik

Max-Eyth-Allee 100

14469 Potsdam

Tel.: 0331-5699-900

Email: [stheuerl@atb-potsdam.de](mailto:stheuerl@atb-potsdam.de)

## Inhaltsverzeichnis

I.	Ziele.....	3
1.	Aufgabenstellung.....	3
1.1.	Wissenschaftliche Zielstellung .....	3
1.2.	Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.....	4
1.3.	Planung und Ablauf des Vorhabens.....	5
2.	Stand des Wissens .....	8
2.1.	Forschungsbedarf und Prozessgrundlagen.....	8
2.2.	Prozessstörungen .....	10
2.3.	Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität .....	12
3.	Zusammenarbeit .....	12
II.	Ergebnisbericht.....	13
1.	Wissenschaftlich-technische Ergebnisse .....	13
1.1.	Übersicht.....	13
1.2.	Störungskategorie 1 - Nährstoffverfügbarkeit und Temperatur.....	13
1.3.	Störungskategorie 2 - Nährstoffverfügbarkeit und inhibierende Stoffwechselprodukte ..	18
1.4.	Störungskategorie 3 - Überlastung des mikrobiellen Abbaupotenzials .....	25
1.5.	Metaanalyse zur vergleichenden systemökologischen Bewertung .....	36
2.	Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises .....	38
3.	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	38
4.	Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des Verwertungsplans .....	39
5.	Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens seitens Dritter .....	40
6.	Veröffentlichungen.....	41
6.1.	Tagungsbeiträge.....	41
6.2.	Fachpublikationen.....	41
III.	Referenzen.....	41

## I. Ziele

### 1. Aufgabenstellung

#### 1.1. Wissenschaftliche Zielstellung

Biogasanlagen sind ein äußerst sensibles technisch-biologisches System, in dem eine komplex interagierende Gemeinschaft verschiedenster Mikroorganismen anaerob abbaubare Biomasse zu energiereichem, d. h. methanhaltigem Biogas umsetzt.

Zur Gewährleistung einer möglichst stabilen und effizienten Biogaserzeugung sind regelmäßige Prozessüberwachungen heutzutage Standard. Sie bieten nicht nur Einblicke in den grundlegenden Prozessverlauf, sondern darüber hinaus die Möglichkeit, Prozessinstabilitäten zu erkennen (Boe et al. 2010, Drosig 2013; Theuerl et al. 2019a). Nach wie vor beruht die Prozesssteuerung auf verfahrenstechnisch-chemischen Parametern sowie auf Erfahrungswerten der Anlagenbetreiber. Es fehlt jedoch an mikrobiellen Indikatoren, um Kontroll- und Managementstrategien zu entwickeln, die die Anforderungen der mikrobiellen Gemeinschaften berücksichtigen (Carballa et al. 2015, Theuerl et al. 2019a, b). Eine stabile und effiziente Biogasproduktion gelingt nur, wenn die Prozesssteuerung ein ausgewogenes mikrobielles Diversitätsmanagements berücksichtigt. Hierfür gilt es in verstärktem Maße, die Potenziale und vor allem die Grenzen der Leistungsfähigkeit des Ökosystems 'Biogasfermenter', insbesondere des Biogas-Mikrobioms zu definieren und darüber hinaus neue Methoden zu entwickeln, die die Anpassungs- und Widerstandsfähigkeit mikrobieller Populationen an spezifische ökologische Bedingungen bewerten. Die Identifizierung mikrobieller Prozessindikatoren für spezifische (positive und negative) Prozesszustände ist hierbei von entscheidender Bedeutung (De Vrieze et al. 2017).

Nach aktuellem Kenntnisstand bildet jeder Biogasfermenter (jede Biogasanlage) sein eigenes Mikrobiom aus (Theuerl et al. 2018), das durch seine taxonomische, funktionelle und ökologische Diversität charakterisiert ist. Trotz intensiver Forschung sind die meisten Arten und demzufolge auch ihre Ökosystemfunktion nach wie vor unbekannt. Das Pareto-Prinzip besagt, dass etwa 20 % der vorkommenden Arten für 80% des Energieflusses verantwortlich sind (De Vrieze und Verstraete, 2016). Diese als Generalisten anzusehenden Mikroorganismen können unter den verschiedensten Bedingungen existieren, kommen daher in den meisten Biogasanlagen vor und machen dort hinsichtlich ihrer Abundanz (Anzahl der Individuen einer Art bezogen auf ihr Habitat) den größten Teil der Gemeinschaft aus (Calusinska et al. 2018, Theuerl et al. 2018). Die restlichen 80 % der vorkommenden Arten sind Spezialisten, die besondere Funktionen im Ökosystem 'Biogasfermenter' erfüllen. Sie besetzen spezifische funktionelle Nischen, kommen daher nur mit geringer Häufigkeit vor, sind oft anlagenspezifisch und spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Prozessstabilität (Theuerl et al. 2018). Vergleichende systemökologische Analysen vermeintlich stabil laufender Anlagen bringen bei der Suche nach diesen Spezialisten nur bedingt zufriedenstellende Ergebnisse. Ein wichtiges Ziel derzeitiger Forschungsstrategien ist u. a. die Ermittlung des Einflusses der mikrobiellen Gemeinschaften auf die Prozesseffizienz, d.h. die Bestrebung einer möglichst optimalen Gestaltung des Prozesses unter Berücksichtigung der Potenziale und vor allem der Grenzen der Leistungsfähigkeit des vorkommenden Mikrobioms. In diesem Themengebiet war das hier dargestellte Forschungsvorhaben angesiedelt.

Die meisten Studien zu Prozessstörungen basieren auf Modellfermentationsexperimenten, da diese unter streng kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden und somit ein großes Spektrum an Prozesssteuerungs- und Manipulationsmöglichkeiten bieten. Störungen im Prozessverlauf in landwirtschaftlichen Biogasanlagen können nicht vorhergesagt und nachvollziehbarerweise auch nicht gezielt herbeigeführt werden. Darüber hinaus gibt es nur sehr wenige Versuchsanlagen, an denen

gezielt Manipulationen durchgeführt werden können. Dies erschwert die Untersuchung von Prozessstörungen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Das Projekt BIOGAS-LIVE war ein Forschungsvorhaben, das sich explizit mit der Ursachenaufklärung von Prozessinstabilitäten/-störungen unter besonderer Berücksichtigung der Systemmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen befasste (Abb. 1). Das Motto dieses Projektes lautete: „Patient Biogasanlage – Symptome erkennen, Ursachen aufklären“. Die grundlegende Herausforderung dieses Projektes war die Spurensuche direkt zum richtigen Zeitpunkt am Ort des Geschehens, der Prozessinstabilität/-störung. Eine enge Zusammenarbeit mit Anlagenbetreibern in Kombination mit einem störfallorientierten Informationssystem zur Ursachenaufklärung von Prozessstörungen war zur erfolgreichen Umsetzung des Projektes von entscheidender Bedeutung. Übergeordnetes Ziel des Projektes war es das „gestörte“ Mikrobiom vom „normalen/gesunden“ bzw. dem wieder „genesenen“ Mikrobiom abzugrenzen und prozessrelevante Mikroorganismen zu identifizieren. Auf Basis dessen sollten Empfehlungen zur Vermeidung von Prozessstörungen durch eine optimierte und an die Mikrobiologie angepasste Prozessführung abgeleitet werden.

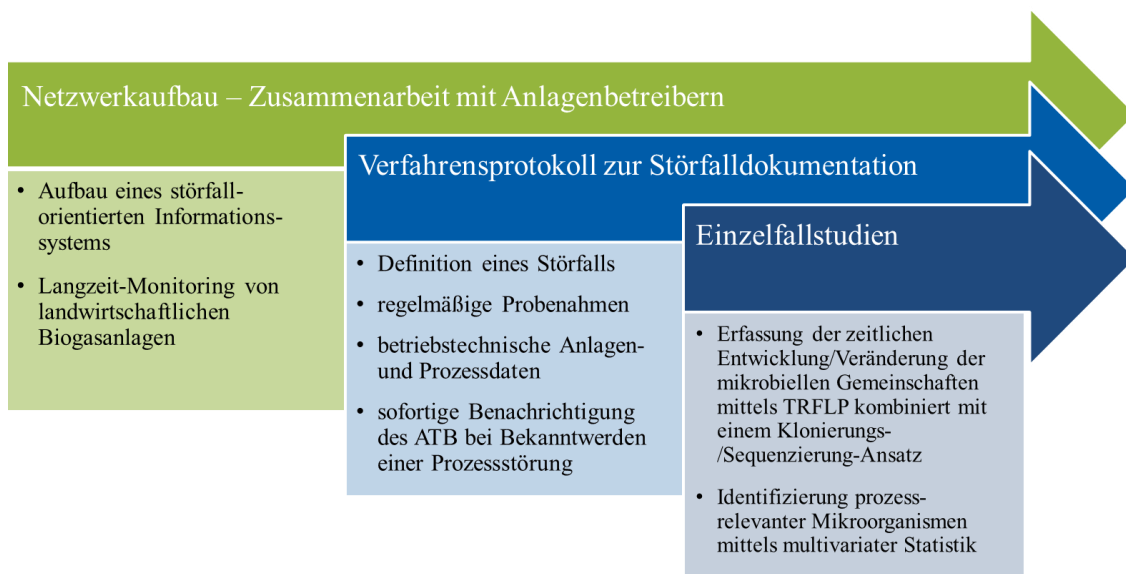


Abb. 1: Aufgabenstellung und Umsetzung des Vorhabens Biogas-Live: Ursachenaufklärung von Prozessinstabilitäten/-störungen unter besonderer Berücksichtigung der Systemmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen.

## 1.2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Forschungsvorhaben wurde am Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB) in der Abteilung Bioverfahrenstechnik durchgeführt.

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

Die Abteilung Bioverfahrenstechnik verfügt über langjährige Erfahrungen im Bereich der BiogASForschung, insbesondere auch zur Aufklärung der mikrobiellen Diversität. In einem eigenen Technikum können in etablierten und neuen entwickelten Anlagenkonzepten Modellfermentationsexperimente durchgeführt werden. Darüber hinaus verfügt die Abteilung über moderne mikro- und molekularbiologische Labore. Das Methodenspektrum reicht von der Isolierung, Kultivierung und

Charakterisierung von anaeroben Mikroorganismen, über die Erfassung komplexer mikrobieller Gemeinschaften mittels qPCR (quantitative Echtzeit-PCR), TRFLP (Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus), DGGE (Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese), Klonierung und Sequenzierung bis hin zur Anwendung multivariater Statistik mit dem Ziel, neue Erkenntnisse über die Fähigkeiten, die Stoffwechseleinstellungen sowie die Ökosystemfunktionen einzelner Mikroorganismen, Gruppen von Mikroorganismen oder ganzer Gemeinschaften zu generieren.

### 1.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

#### 1.3.1 Netzwerkaufbau - Zusammenarbeit mit Anlagenbetreibern (AP 1)

Der Forschungsbedarf zu Prozessstörungen ergibt sich aus den Anforderungen an die heutige und vor allem die zukünftige Biogasproduktion (Theuerl et al. 2019a, b). Eine der wichtigsten Anforderungen in diesem Zusammenhang ist eine hohe Prozessstabilität und -effizienz mit einer geringen Störanfälligkeit, um eine bedarfsgerechte Gasproduktion sicher gewährleisten zu können. Der Prozess soll zudem kontinuierlich überwacht werden, was möglichst einfache Kontroll- und Steuerungsoptionen benötigt. Übergeordnetes Ziel im Bereich der Prozessmikrobiologie ist es demnach herauszufinden, was anpassungsfähige und stresstolerante Mikrobiome charakterisiert. Dafür ist es erforderlich, sich mit den Ursachen und Mechanismen von Prozessinstabilitäten/-störungen sowie deren Auswirkungen auf das Mikrobiom zu befassen.

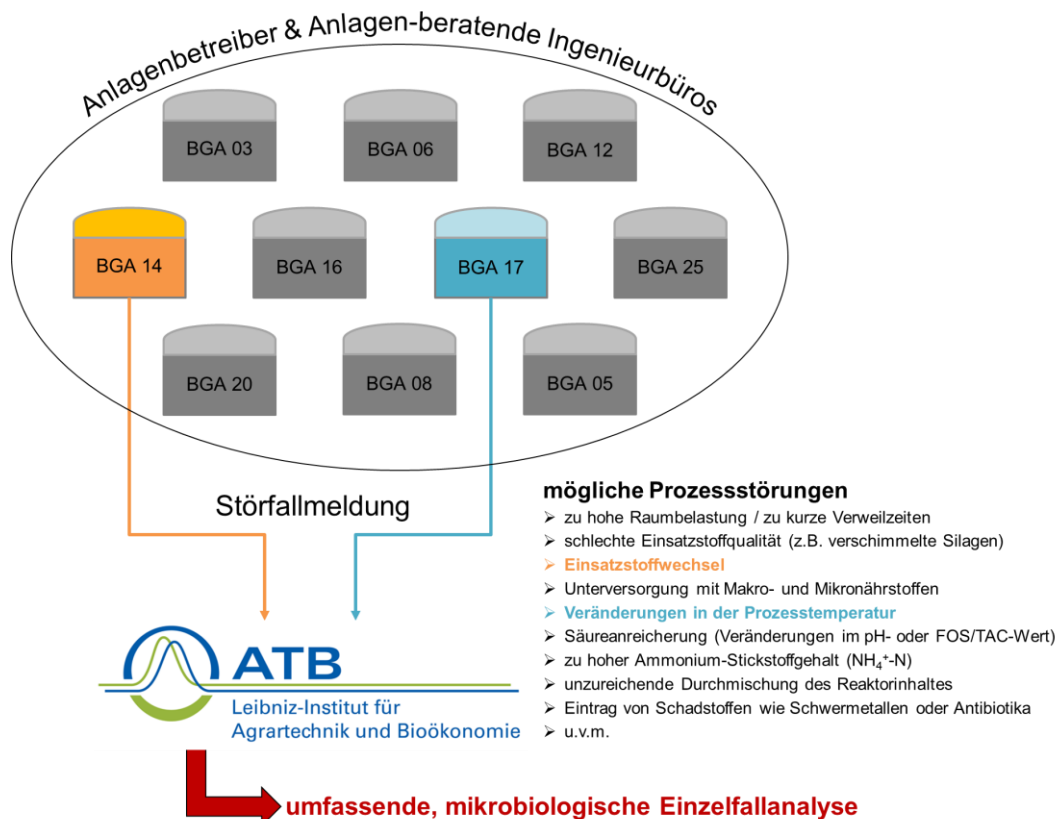


Abb. 2: Aufbau eines störfallorientierten Informationssystems in enger Zusammenarbeit mit Anlagenbetreibern und beratenden Ingenieurbüros zur Dokumentation und gezielten mikrobiologischen Einzelfallanalyse von Prozessstörungen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen.

Da Instabilitäten/Störungen im Betriebs- bzw. Prozessablauf nicht vorhergesagt werden können bzw. Prozessstörungen aus ökonomischen Gründen verständlicherweise nicht gezielt herbeigeführt werden können, war die grundlegende Herausforderung dieses Projektes, die Spurensuche direkt zum richtigen Zeitpunkt am Ort des Geschehens, der Prozessinstabilität/-störung. Ziel der ersten Projektphase war es demzufolge, mit Anlagenbetreibern und beratenden Ingenieurbüros ein störfallorientiertes Informationssystem im Rahmen eines Langzeit-Monitorings von landwirtschaftlichen Biogasanlagen aufzubauen (Abb. 2). Diese Herangehensweise ermöglichte es, eine gewisse Anzahl an Biogasanlagen über einen längeren Zeitraum unter Beobachtung zu stellen, so dass die Wahrscheinlichkeit der zeitnahen Erfassung von Prozessinstabilitäten/-störungen ausreichend hoch war.

Aus früheren gemeinsamen Forschungsprojekten waren Anlagenbetreiber und beratende Ingenieurbüros bekannt, die bereits zum Zeitpunkt der Antragstellung ihre Bereitschaft erklärt hatten, dieses Projekt zu unterstützen. Um weitere Anlagenbetreiber bzw. beratende Ingenieurbüros auf das Thema aufmerksam zu machen und für das Projekt zu gewinnen, wurde ein Artikel mit dem Titel „Tatort Biogasanlage – mikrobiologische Kriminaltechnik“ im Biogas Journal veröffentlicht, der in der Ausgabe 04\_15 erschienen ist (Theuerl & Klocke 2015). Des Weiteren wurde ein Projekt-Flyer entworfen (siehe Anhang), der zum einen an ausgewählte potenzielle Projektpartner versendet wurde, zum anderen beratenden Ingenieurbüros als unterstützendes Informationsmaterial diente, um Anlagenbetreiber zu gewinnen. Der Fachverband Biogas e.V. hatte ebenfalls sein Interesse bekundet, das Forschungsvorhaben BIOGAS-LIVE zu unterstützen und hat im Rahmen seiner Firmenrundmails auf das Projekt aufmerksam gemacht.

### 1.3.2 Verfahrensprotokoll zur Störfalldokumentation (AP 2)

Um in konkrete bilaterale Gespräche mit (potenziellen) Projektpartnern zu gehen, mussten Kriterien zur Definition eines Störfalls ausgearbeitet werden. Laut allgemeiner Definition ist eine Störung *„ein zeitlich abgrenzbares Ereignis, das den Normalzustand eines Systems maßgeblich verändert“*. Mit speziellem Bezug auf den anaeroben Abbau von Biomasse zu Biogas wird eine Störung definiert als *„zeitlich abgrenzbare, maßgebliche Veränderung der Funktionsfähigkeit innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft, die im Gesamtprozess einen inakzeptablen Rückgang der Biogaserzeugung verursacht und ein aktives Gegensteuern erfordert“* (Theuerl et al. 2019a). Ab welchem Ausmaß ein Rückgang als inakzeptabel betrachtet wird, liegt im Ermessen des Anlagenbetreibers. Dieser entscheidet im Wesentlichen unter Aspekten der Wirtschaftlichkeit, so dass das noch bzw. nicht mehr tolerierte Ausmaß von den jeweils gegebenen Kosten-Erlös-Relationen abhängig ist.

Störungen des Biogasprozesses haben vielfältige Ursachen, denen unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen (Boe et al. 2010, Drosig 2013, Theuerl et al. 2019a). Diese können wie folgt klassifiziert werden: (1) schwankende Nährstoffverfügbarkeit, (2) Überlastung des mikrobiellen Abbau-potenzials und (3) prozessbedingte Anreicherung inhibierend wirkender Stoffwechselprodukte wie Ammoniak (NH<sub>3</sub>), Wasserstoff (H<sub>2</sub>), Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) oder Salze. Darüber hinaus gibt es weitere Kategorien von Störungen wie z.B. Belastungen mit Schwermetallen oder Einfluss von Antibiotika, die jedoch mit den derzeit üblichen Parametern der Prozesskontrolle in Praxis-Biogasanlagen nicht identifizierbar sind.

Grundsätzlich ist es schwer, einzelne Störfälle klar und deutlich abzugrenzen, denn es ist fast immer eine Kombination verschiedener Faktoren. Ein Wechsel in der Beschickung der Anlage muss nicht, kann aber negative Auswirkungen auf den Anlagenbetrieb bzw. die Biogaserzeugung haben. Mit einem Wechsel der Einsatzstoffe ändern sich die Nährstoffbedingungen für die mikrobielle Gemein-

schaft. Die für die Substratumsetzung bzw. die Biogasproduktion verantwortlichen Mikroorganismen müssen sich an die gegebenen Bedingungen bzw. an sich verändernde Bedingungen anpassen. Einsatzstoffe mit einem höheren Anteil komplexer, schwerer abbaubarer Inhaltsstoffe (z. B. Zellulose) benötigen mehr Zeit, d.h. längere Verweilzeiten im Fermenter, um abgebaut bzw. umgesetzt zu werden. Demzufolge kann eine zu hohe Raumbelastung zu geringeren Umsatzraten oder gar zur Ausbildung einer Schwimmdecke und infolge dessen zu einem Einbruch in der Biogasproduktion führen. Einsatzstoffe wie Hühnertrockenkot oder Grassilage hingegen bergen das Risiko einer Ammoniak- oder Schwefelwasserstoffhemmung. Biogasanlagenbetreiber müssen hier vorsichtig sein, denn ein kleines Ungleichgewicht zwischen Säureproduktion und Säureverwertung in Kombination mit einer Temperaturerhöhung (z. B. in den Sommermonaten) kann zu einer erhöhten Freisetzung von zytotoxischem Ammoniak oder Schwefelwasserstoff führen. Einsatzstoffe mit einem hohen Zuckergehalt (z. B. Zuckerrübensilage) wiederum bergen die Gefahr der Säureanreicherung, weil die leicht verwertbaren Zucker und Alkohole enorm schnell zu Säuren umgesetzt werden, die jedoch aufgrund der langsameren Wachstumsraten der beteiligten säureabbauenden Mikroorganismen nicht im gleichen zeitlichen Rahmen in Biogas umgewandelt werden können. Derart komplexe Zusammenhänge wurden mit den (potenziellen) Projektpartnern besprochen, so dass am Ende ein gemeinsam entwickeltes Verfahrensprotokoll zur Dokumentation und zeitnahen Ursachenaufklärung von Prozessstörungen vorlag.

Für die Anlagenbetreiber ergaben sich demnach folgende zentrale Punkte:

- Bereitstellung von Probennahmegefäßen für regelmäßige, mindestens monatliche Probenahmen und (möglichst tiefgekühlte) Lagerung der Proben direkt beim Anlagenbetreiber oder in einem zuständigen Analyselabor. Der Versand der Proben wurde seitens der Projektpartner organisiert.
- kontinuierliche Aufzeichnung aller betriebstechnischen Anlagen- und chemischen Prozessdaten sowie die kostenfreie Nutzung dieser Daten zur vergleichenden systemökologischen Auswertung
  - anlagenspezifische Parameter: u. a. tägliche Einsatzstoffmengen, Fermentertemperatur, Rührwerksleistung, produzierte Gasmenge, Gastemperatur und Gaszusammensetzung
  - chemische Parameter (soweit vorhanden für Einsatzstoffe und Fermenterinhalt): Trockensubstanz (TS), organische Trockensubstanz (oTS), pH-Wert, FOS/TAC, Leitfähigkeit, organische Säuren, Gesamtstickstoffgehalt, Ammonium-Stickstoffgehalt, Zucker, Stärke, NDF (engl. neutral detergent fiber), ADF (engl. acid detergent fiber), ADL (engl. acid detergent lignin), Rohprotein, Rohfett, Phosphat, Calcium u.a.
- sofortige Benachrichtigung des ATB bei Bekanntwerden einer Prozessstörung und in Absprache mit dem ATB wöchentliche (evtl. tägliche) Probennahme bis zur vollständigen Genesung der Anlage

Entsprechend der erfolgten bilateralen Gespräche wurden für das ATB folgende zentrale Aufgaben definiert:

- auf Wunsch bzw. bei Bedarf Bereitstellung von Probennahmegefäßen und Versandmöglichkeiten
- umfangreiche mikro- und molekularbiologische Analysen im Falle einer Prozessstörung bis zur vollständigen Genesung der Anlage
  - Erfassung von Gemeinsamkeiten und insbesondere von Unterschieden in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften sowie der zeitlichen Entwicklung/Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaften mittels TRFLP
  - Erfassung der strukturellen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft mittels Klonierung/Sequenzierung des 16S rRNA Gens



- Verifizierung von prozessrelevanten Mikroorganismen(-gruppen) die verstärkt im Falle einer Prozessstörung auftreten mittels multivariater Statistik im Abgleich mit verfügbaren verfahrenstechnisch-chemischen Parametern
- Bereitstellung der erzielten Ergebnisse sowie Rücksprachen mit den Kooperationspartnern hinsichtlich der Verwertbarkeit

### 1.3.3 Probenrückstellung (AP 3) und Einzelfallanalysen (AP 4)

Die kooperierenden Anlagenbetreiber erklärten sich bereit regelmäßige, mindestens monatliche Probennahmen durchzuführen und diese (möglichst tiefgekühlt) direkt beim Anlagenbetreiber oder in einem zuständigen Analyselabor zwischenzulagern. Bei Bekanntwerden einer Prozessstörung wurde das ATB umgehend informiert, so dass eine entsprechende wöchentliche (evtl. tägliche) Probennahme bis zur vollständigen Genesung der Anlage erfolgen konnte. Die Abholung bzw. der Versand der Proben wurde seitens der Kooperationspartner organisiert.

Für alle unter Beobachtung stehenden Anlagen wurden die Prozessstörungen anhand der zur Verfügung gestellten Anlagen- und Prozessdaten identifiziert (Sichtung und Kontrolle der Anlagen- und Prozessdaten, ggf. Rückfragen an den jeweiligen Anlagenbetreiber, Extraktion relevanter Daten aus Betriebstagebüchern, Anlagendatenblättern sowie Prozessdatenblättern, Auswertung und Visualisierung der Daten) und retrospektiv mikrobiologisch charakterisiert. Die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften wurde mittels TRFLP-Analyse in Kombination mit einem Klonierungs-/Sequenzierungsansatz auf Basis der Untersuchung des Gens der 16S rRNA separat für Bakterien und Archaeen erfasst. Die Auswertung der erhobenen mikrobiologischen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms BioNumerics Version 7.6 (Applied Math, Belgien).

Unter Anwendung multivariater Statistik (Hauptkomponenten- und Ähnlichkeitsanalysen; PC Ord Version 6, McCune and Mefford 2011; The R Project for Statistical Computing, Pakete “vegan” und “vegan3D”; R Core Team 2018, Oksanen et al. 2017 und 2018, ) wurden die Prozesszustände charakterisiert und die Anpassungsfähigkeit des Mikrobioms an diese spezifischen Bedingungen bewertet. Zudem können anhand der Ergebnisse aus der multivariaten Statistik entsprechend des formulierten Ziels des Projektes „gestörte“ Mikrobiome von „normalen/gesunden“ bzw. wieder „genesenen“ Mikrobiomen abgegrenzt und prozessrelevante Mikroorganismengruppen identifiziert werden.

## 2. Stand des Wissens

### 2.1. Forschungsbedarf und Prozessgrundlagen

Die Biogasproduktion ist in vielen Ländern zur gängigen Praxis geworden, wird ausgebaut oder es gibt fortgeschrittene Überlegungen, sie zu etablieren. Dieser Trend kann auf eine Reihe von Vorteilen zurückgeführt werden (Appels et al. 2011, Dahiya et al. 2018, Hagman et al. 2018, Hagos et al. 2017, Theuerl et al. 2019b): Die Produktion von Biogas ist unabhängig von witterungsbedingten Schwankungen und kann daher zur Sicherung einer (bedarfsgerechten) Grundversorgung mit Elektrizität verwendet werden, wobei gleichzeitige Wärme erzeugt wird. Biogas eignet sich als Brennstoff und als Ersatz für Erdgas. Für die Produktion von Biogas kann eine hohe Vielfalt von Einsatzstoffen verwendet werden, einschließlich Energiepflanzen, landwirtschaftliche Reststoffe sowie biogene Siedlungs-, Gewerbe- und Industrieabfälle. Biogasanlagen können in unterschiedlichsten Skalen etabliert werden, von Haushalten bis zu großen kommerziellen Anlagen. Darüber

hinaus sind Biogasanlagen Teil eines nachhaltigen Landwirtschaftskonzeptes und können mit anderen bioökonomischen Produktionssystemen gekoppelt werden (Theuerl et al. 2019b).

Wie oben bereits erwähnt, ergibt sich der Forschungsbedarf aus den Anforderungen an die heutige und vor allem die zukünftige Biogasproduktion (Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030<sup>1</sup>, Nationale Politikstrategie Bioökonomie<sup>2</sup>). In erster Linie soll die Produktion von Biogas integraler Bestandteil der Bioökonomie sein, so dass Stoff- und Energiekreisläufe geschlossen werden. Darüber hinaus wird eine nachhaltige Biomassenutzung, die überwiegend reststoffbasiert sein soll, gefordert, wodurch es zu einer hohen Einsatzstoffvariabilität kommt. Eine der wichtigsten Anforderungen in diesem Zusammenhang ist eine hohe Prozessstabilität und -effizienz mit einer geringen Störanfälligkeit, um eine bedarfsgerechte Gasproduktion sicher gewährleisten zu können (Bensmann et. al. 2016, Carballa et al. 2015, Theuerl et al. 2019b, De Vrieze & Verstraete 2016). Der Prozess soll zudem kontinuierlich überwacht werden, was möglichst einfache Kontroll- und Steuerungsoptionen bedarf. Zur Gewährleistung einer möglichst stabilen und effizienten Biogasproduktion ist es demzufolge erforderlich, sich mit den Ursachen und Mechanismen von Prozessstörungen sowie deren Auswirkungen auf das Mikrobiom zu befassen, um mittel- bis langfristig neue Kontroll- und Managementstrategien zu entwickeln, die die Anforderungen des Mikrobioms berücksichtigen.

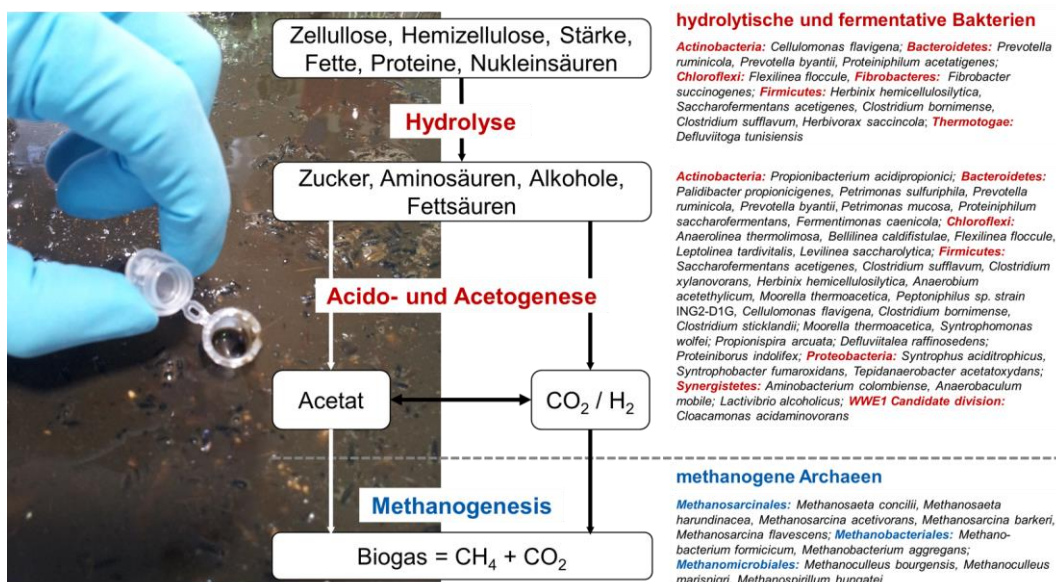


Abb. 3: Biochemische Prozesskette der Biogasproduktion und Zusammenstellung der derzeit identifizierten und physiologisch und/oder genetisch beschriebenen Mikroorganismen, die mutmaßlich an den verschiedenen Stufen des anaeroben Abbaus von Biomasse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen beteiligt sind. Foto: J. Klang.

In Biogasanlagen bewirkt eine komplex interagierende mikrobielle Lebensgemeinschaft den anaeroben Abbau organischer Biomasse zu energiereichem, d.h. methanhaltigem Biogas (Talbot et al. 2008, Nelson et al. 2011). Der Prozess kann grob in die vier Stufen Hydrolyse, Acidogenese,

<sup>1</sup> Bundesministerium für Bildung und Forschung (2010) Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030 - Unser Weg zu einer bio-basierten Wirtschaft. DruckVogt, Berlin.

<sup>2</sup> Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2014) - Nationale Politikstrategie Bioökonomie - Wachsende Ressourcen und biotechnologische Verfahren als Basis für Ernährung, Industrie und Energie. MKL Druck GmbH & Co KG, Ostbevern

Acetogenese und Methanogenese eingeteilt werden (Abb. 3). Diese Stufen laufen gleichzeitig im Fermenter ab und bauen so aufeinander auf, dass die Stoffwechselprodukte der einen Stufe die Ausgangsstoffe für die nächste Stufe sind (Weiland 2010, Hagos et al. 2017).

Jeder Biogasfermenter bildet sein eigenes Mikrobiom aus (Calusinska et al. 2018, Theuerl et al. 2018), das durch seine taxonomische, funktionelle und ökologische Diversität charakterisiert ist. Die taxonomische Diversität umfasst die Artenanzahl und -verteilung. Die funktionelle Diversität definiert die potenziellen (d.h. genetisch festgelegten) und realisierten Funktionen und Prozesse der vorkommenden Arten. Die ökologische Diversität beschreibt die Wechselwirkungen der Mikroorganismen untereinander und mit ihrer Umwelt. Das Biogas-Mikrobiom besteht aus hydrolytischen, acido- und acetogenen Bakterien sowie aus methanogenen Archaeen (Abb. 3), wobei die Mitglieder des Biogas-Mikrobioms unterschiedliche Optima bezüglich ihrer Lebensanforderungen haben und darüber hinaus sehr unterschiedliche Toleranzbereiche gegenüber wirkenden Umweltfaktoren aufweisen. Befinden sich Umweltfaktoren außerhalb von Toleranzbereichen, kommt es zu Prozessinstabilitäten/-störungen.

### 2.2. Prozessstörungen

Laut Definition ist eine Störung „eine zeitlich abgrenzbare, maßgebliche Veränderung der Funktionsfähigkeit innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft, die im Gesamtprozess einen inakzeptablen Rückgang der Biogaserzeugung verursacht und ein aktives Gegensteuern erfordert“. Diese können vielfältige Ursachen haben und unterliegen verschiedenen Mechanismen, wie beispielsweise schwankende Nährstoffverfügbarkeit, Überlastung des mikrobiellen Abbaupotenzials oder prozessbedingte Anreicherung inhibierend wirkender Stoffwechselprodukte (Theuerl et al. 2019a). Prozessstörungen lassen sich nur sehr schwer eindeutig voneinander trennen; oft ist es eine Kombination von mehreren Faktoren.

Eine stabile und effiziente Biogasproduktion gelingt nur, wenn in der Prozesssteuerung ein ausgewogenes, mikrobielles Diversitätsmanagements berücksichtigt wird. Hierfür gilt es, die Potenziale und Grenzen der Leistungsfähigkeit des Biogas-Mikrobioms zu definieren, die durch die spezifischen Lebensanforderungen der Mikroorganismen bestimmt werden. Das Wachstum und die Aktivität von Mikroorganismen werden im Wesentlichen durch die Verfügbarkeit von Makro- und Mikronährstoffen sowie durch die Temperatur bestimmt. Je nach Menge, Zusammensetzung und Qualität der Einsatzstoffe sowie der grundlegenden Prozessführung variieren diese Parameter sehr stark, was direkte Auswirkungen auf die Diversität des Biogas-Mikrobioms hat (Alsouleman et al. 2016, Kim & Lee 2016, Klang et al. 2015, 2019).

Eine Überlastung des Prozesses bzw. der Funktionsfähigkeit des Mikrobioms kann vorliegen, wenn die zur Verfügung gestellte Menge an Biomasse die Abbaukapazität der mikrobiellen Gemeinschaft übersteigt, oder wenn die Bildung eines Stoffwechselzwischenproduktes die Abbaukapazität der an der jeweils nachfolgenden Prozessstufe beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft überschreitet. Der hier zugrunde liegende Mechanismus begründet sich in unterschiedlichen Wegen der Energiegewinnung und demzufolge in unterschiedlichen Wachstumsraten: Je günstiger die Energiegewinnung thermodynamisch ist, desto schneller wachsen die Mikroorganismen (Roden & Jin 2011, Montag & Schink 2016, Leng et al. 2018). Die Energiebilanz der meisten hydrolytischen und acidogenen Reaktionen ist negativ, bedeutet also einen direkten Energiegewinn für die Mikroorganismen (Leng et al. 2018). Hingegen sind die Reaktionen, die von säureabbauenden Mikroorganismen durchgeführt werden, thermodynamisch ungünstig. Die bakterielle Umsetzung von Fettsäuren (z.B. Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Bernsteinsäure) ist aus Mangel an geeigneten Elektronenakzeptoren nur über die

Produktion von energiereichem Wasserstoff ( $H_2$ ) möglich. Ohne die Weiterverwertung des produzierten  $H_2$  durch hydrogenotrophe Archaeen würde es zu einer Endprodukthemmung der säureabbauenden Bakterien kommen (Schink 1997, Leng et al. 2018). Ein besonders eingehend untersuchter Prozess in diesem Zusammenhang ist die syntrophe Essigsäureoxidation. Hierbei wird Essigsäure über die umgekehrte Homoacetogenese in  $CO_2$  und  $H_2$  umgewandelt. Diesem Mechanismus bedient sich die mikrobielle Gemeinschaft, für den Fall, dass Essigsäure nicht mehr direkt durch den thermodynamisch günstigeren Weg der acetoklastischen Methanproduktion umgewandelt werden kann, da die verantwortlichen Methanogenen beispielsweise durch zu hohe Konzentrationen an Ammonium ( $NH_4^+$ -N) und Ammoniak ( $NH_3$ ) in ihrer Funktionsfähigkeit inhibiert sind (Alsouleman et al. 2016, Klang et al. 2019, Hattori 2008, Westerholm et al. 2016). Basierend auf Ergebnissen unterschiedlicher Studien liegt der Grenzwert für die Ausbildung der syntrophen Essigsäureoxidation bei  $0,14 - 0,25 \text{ g } NH_3 \text{ L}^{-1}$  (ca.  $3,0 - 3,3 \text{ g } NH_4^+$ -N  $L^{-1}$ ) bei einer Temperatur von ca.  $37^\circ\text{C}$  und einem pH-Wert von 7,5 bis 8,0 (Westerholm et al. 2016).

Als Beispiel wird hier die stufenweise Erhöhung des Anteils an Geflügelmist (Basiseinsatzstoff Rindergülle/-festmist) und folglich einer kontinuierlichen Erhöhung der  $NH_4^+$ -N-Konzentration dargestellt (Alsouleman et al. 2016): Der Einsatzstoffwechsel führte zu einer kurzfristigen Prozessstörung (Säurekonzentration von  $9,6 \text{ g L}^{-1}$  bei  $5,9 \text{ g } NH_4^+$ -N  $L^{-1}$  und  $500 \text{ mg } NH_3 \text{ L}^{-1}$ ), im Zuge derer es zu einer Umstrukturierung der mikrobiellen Gemeinschaft von einer *Bacteroidales*-dominierten zu einer *Clostridiales*-dominierten Bakteriengemeinschaft kam, begleitet durch einen Wechsel vom acetoklastischen zum hydrogenotrophen Weg der Methanbildung. Ohne aktives Gegensteuern gelang es der mikrobiellen Gemeinschaft, sich an die neuen Bedingungen anzupassen und den Prozess der Biogasproduktion wieder zu stabilisieren. Die „neue“ mikrobielle Gemeinschaft ist funktionell redundant, da nach der Anpassung an die neuen Umweltbedingungen wieder vergleichbare Biogas-/Methanabbeuten erzielt wurden wie vor der Prozessstörung. Aus ökologischer Sicht kann man hier von einem natürlich-reguliertem, mikrobiellen Diversitätsmanagement sprechen.

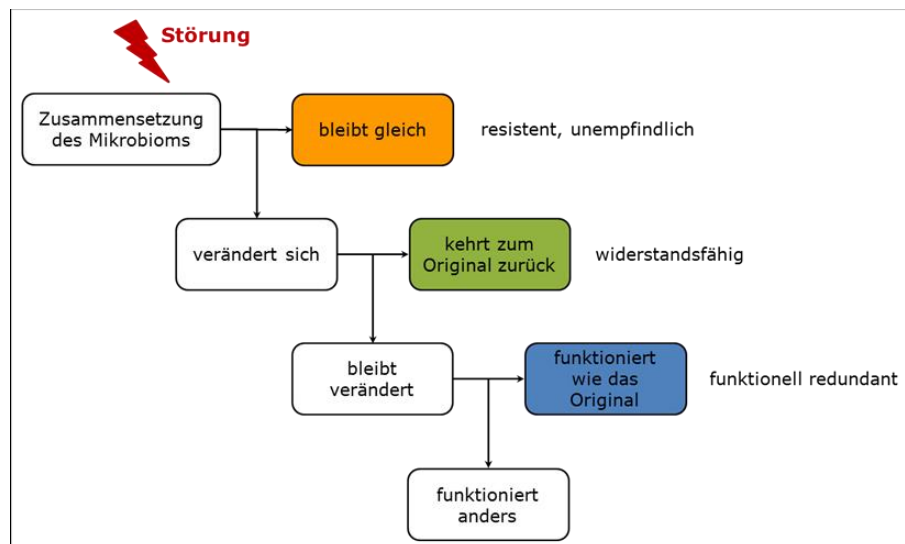


Abb. 4: Möglichkeiten der Reaktion des Mikrobioms auf Prozessinstabilitäten/-störungen (modifiziert nach Allison und Martiny, 2008)

Den mikrobiellen Gemeinschaften stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, um auf Prozessinstabilitäten oder -störungen zu reagieren (Abb. 4, Allison & Martiny 2008): (1) Eine

mikrobielle Gemeinschaft ist resistent (unempfindlich), wenn die mikrobielle Diversität bei einer Störung unverändert bleibt. (2) Eine mikrobielle Gemeinschaft ist resilient (widerstandsfähig, belastbar), wenn die mikrobielle Diversität nach einer Störung in ihren Ursprungszustand zurückkehrt. (3) Eine mikrobielle Gemeinschaft ist funktionell redundant, wenn sich die mikrobielle Gemeinschaft im Zuge einer Prozessstörung taxonomisch umstrukturiert, wobei die „neue“ mikrobielle Gemeinschaft nach der Anpassung an die neuen Umweltbedingungen eine vergleichbare Funktionsfähigkeit aufweist, wie die mikrobielle Gemeinschaft vor der Prozessstörung.

### **2.3. Methoden zur Erfassung der mikrobiellen Diversität**

Das heutige Wissen über Mikroorganismen und ihre physiologischen Fähigkeiten basiert auf der Anwendung traditioneller mikrobiologischer Methoden wie beispielsweise der Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Rein- und Anreicherungskulturen. Diese kulturbasierten Methoden waren viele Jahre die wichtigsten Werkzeuge, um Wissen über das mikrobielle Leben zu erzeugen (Schnürer 2012). Moderne molekularbiologische Methoden ermöglichen es, detaillierte Informationen über die Genomstruktur und die Genexpression, d.h. über die potenziellen, genetisch festgelegten und realisierten Funktionen und Prozesse von Rein- und Anreicherungskulturen zu erfassen. Diese Methoden können ebenso für die Analyse komplexer Lebensräume und ihrer Mikrobiome genutzt werden (Alivisatos et al. 2015, Vanwonterghem et al. 2014). Die Anwendung des Next-Generation-Sequencing (NGS) einschließlich der Erstellung von Amplikondatensätzen des Gens für die 16S rRNA sowie Metagenom-, Metatranskriptom- und Metaproteom-Analysen zur Erfassung der mikrobiellen Diversität führte in den vergangenen zehn Jahren zu zahlreichen Entdeckungen von bisher unbekanntem mikrobiellem Leben im Ökosystem `Biogasfermenter` (Hassa et al. 2018, Zhang et al. 2019)). Dabei handelt es sich jedoch überwiegend um Momentaufnahmen, die die mikrobiellen Funktionen und Gemeinschaftsdynamiken in einem hoch komplexen und sensiblen System bisher kaum beleuchten (Alivisatos et al., 2015). Daher sind etablierte Methoden wie die TRFLP immer noch essentiell für ein Gemeinschaftsprofiling, insbesondere hinsichtlich der Notwendigkeit einer mikrobiellen Prozessüberwachung (De Vrieze et al. 2018, Lim et al. 2018, Prakash et al. 2014). Für den Aufbau einer nachhaltigen Bioökonomie ist das Verständnis und die wissenschaftliche Steuerung der Mikrobiome unerlässlich (Blaser et al. 2016, De Vrieze et al. 2017, Leng et al. 2018, Theuerl et al. 2019b). Die erhobenen mikrobiologischen Daten können weiterführend verwendet werden, um mikrobielle Netzwerke zu modellieren, mit denen die Ökosystemfunktionen des Biogas-Mikrobioms abgebildet und Optionen der Prozesssteuerung abgeleitet werden (Theuerl et al. 2019b, Zhang et al. 2019).

## **3. Zusammenarbeit**

Dieses Projekt konnte nur durch eine enge Zusammenarbeit mit Anlagenbetreibern und beratenden Ingenieurbüros erfolgreich umgesetzt werden. Seit Beginn der Projektlaufzeit waren die Bioenergie-Beratung Bornim GmbH (B<sup>3</sup>) mit Sitz in Potsdam und die Deutsche Agrar Holding GmbH (DAH) (ehemals KTG Energie AG) mit Sitz in Oranienburg feste Kooperationspartner. Da die Rekrutierung von landwirtschaftlichen Biogasanlagen über die Projektlaufzeit stetig weiter lief, konnte Ende 2016 die GETEC green energy AG mit Sitz in Magdeburg ebenfalls als Kooperationspartner gewonnen werden. Dank dieser Kooperationen standen insgesamt ca. 30 Biogasanlagen über drei Jahre unter stetiger Beobachtung.

## II. Ergebnisbericht

### 1. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

#### 1.1. Übersicht

Im Rahmen des Projektes wurden in vier Anlagen(-komplexen) Prozessstörungen/-instabilitäten beobachtet, die sich drei Kategorien von Prozessstörungen zuordnen lassen:

- Störungskategorie 1: Der hier betrachtete Störfall steht im Zusammenhang mit einer schwankenden Nährstoffverfügbarkeit und dem Einfluss der Temperatur auf die stoffwechselphysiologischen Eigenschaften von Mikroorganismen. Die Biogasanlage BGA 01 besteht aus zwei parallel betriebenen Fermentern mit einem gemeinsamen Nachgärer. Hier wurden die beiden Hauptfermenter über einen Zeitraum von sechs Monaten (01.01.2015 bis 30.06.2015) vergleichend untersucht (insgesamt 48 Proben).
- Störungskategorie 2: Der hier betrachtete Störfall steht im Zusammenhang mit einer schwankenden Nährstoffverfügbarkeit und der prozessbedingte Anreicherung inhibierend wirkender Stoffwechselprodukte. Die Biogasanlage BGA 10 besteht aus vier parallel betriebenen Fermentern, die über einen Zeitraum von zwölf Monaten untersucht wurden (insgesamt 44 Proben).
- Störungskategorie 3: Der hier betrachtete Störfälle steht im Zusammenhang mit einer Überlastung des mikrobiellen Abbaupotenzials bedingt durch eine prozessbedingte Anreicherung inhibierend wirkender Stoffwechselprodukte. Diese Störfallkategorie wurde in zwei Anlagen beobachtet. Die Biogasanlage BGA 07 besteht aus einem Durchflussfermenter und einem Nachgärer. Diese Anlage wurde über einen Zeitraum jeweils von sechs Monaten im Jahr 2015 und 2016 betrachtet (insgesamt 22 Proben). Die Biogasanlage BGA 01 ist ein Anlagenkomplex mit zwei Fermentationssystemen: vier baugleiche Anlagen jeweils bestehend aus einer Hydrolysestufe, einem Hauptfermenter und einem Nachgärer sowie drei baugleiche Anlagen jeweils bestehend aus einem Garagenfermenter und einem Nachgärer. Betrachtet wurden sieben Zeitpunkte (06/2015-09/2015 und 02/2016-04/2016) des Fermentationssystems mit vier baugleichen Anlagen, wobei jeweils die Hydrolysestufe und der Hauptfermenter analysiert wurden (insgesamt 56 Proben).

Für jede dieser Störfallkategorien werden verfahrenstechnische, chemische und mikrobiologische Daten gezeigt, Ursachen und Wirkungen diskutiert sowie Schlussfolgerungen für den Anlagenbetrieb und weiterführende Arbeiten gezogen.

Abschließend erfolgt eine Metaanalyse mit einer repräsentativen Probenauswahl, die die verschiedenen in den Fallstudien beschriebenen Prozesszustände charakterisieren. Dieses Probenset wurde durch Proben von sechs weiteren Anlagen ergänzt, die alle einen konstanten Anlagenbetrieb aufwiesen. Ziel dieser Metaanalyse ist eine vergleichende systemökologische Bewertung der erfassten Mikrobiomstrukturen, um den Einfluss von spezifischen Anlagen- und Prozessparametern zu beschreiben.

#### 1.2. Störungskategorie 1 - Nährstoffverfügbarkeit und Temperatur

Im ersten Störfall handelt es sich um eine Biogasanlage (BGA 05), die aus zwei parallel betriebenen Pfpfenstromfermentern besteht und mit einer Mischung aus nachwachsenden Rohstoffen (Mais, Gras, Zuckerrüben, Hirse und Getreide) betrieben wurde (Abb. 5A und Abb. 6A). Zu Beginn des Beobachtungszeitraumes wurde in beiden Fermentern die Einsatzstoffzufuhr von Gras- auf

Zuckerrübensilage umgestellt. Nahezu zeitgleich wurde entschieden, die Betriebstemperatur von mesophil (42°C) auf thermophil (52°C) zu erhöhen. Diese Umstellung konnte jedoch nur in Fermenter F1 initiiert werden (Abb. 5A), da es technische Probleme mit der Temperaturregelung in Fermenter F2 gab, wodurch die Temperatur hier konstant bis leicht abfallend war (Abb. 6A). Aufgrund der sehr inkonsistenten Datenlage im Betriebstagebuch muss hier auf die Angabe der Daten zur Biogasproduktion und demzufolge auf die Bewertung des Störfalls infolge eines inakzeptablen Rückgangs der Biogasproduktion verzichtet werden.

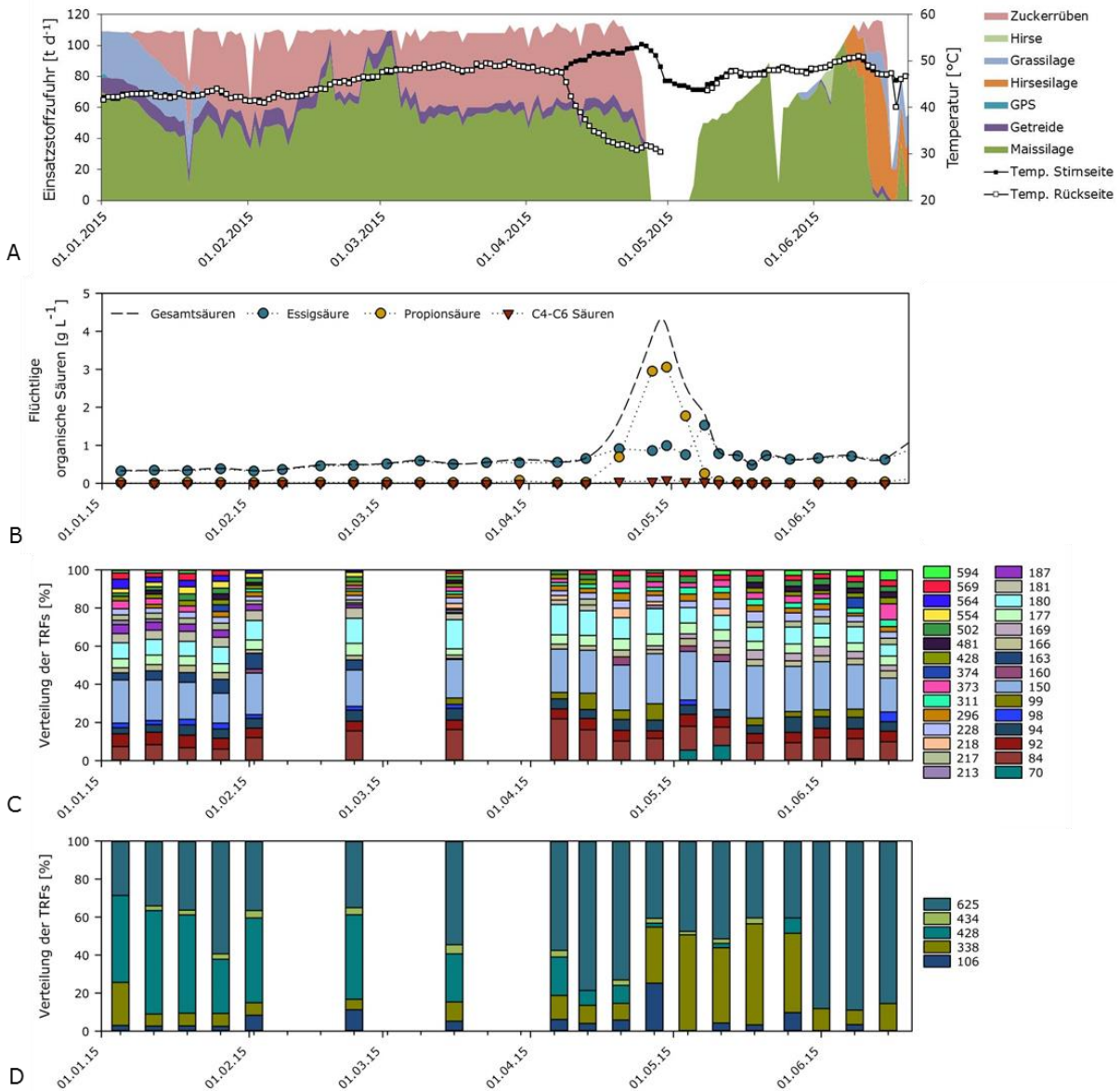


Abb. 5: Prozessparameter im Fermenter F1 der untersuchten Anlage zur Störungskategorie 1: Einsatzstoffzufuhr und Temperatur an der Stirn- und Rückseite des Pfropfenstromfermenters (A), Säurekonzentrationen (B) sowie die strukturelle Zusammensetzung der Bakterien- (C) und Archaeengemeinschaft (D) basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken).

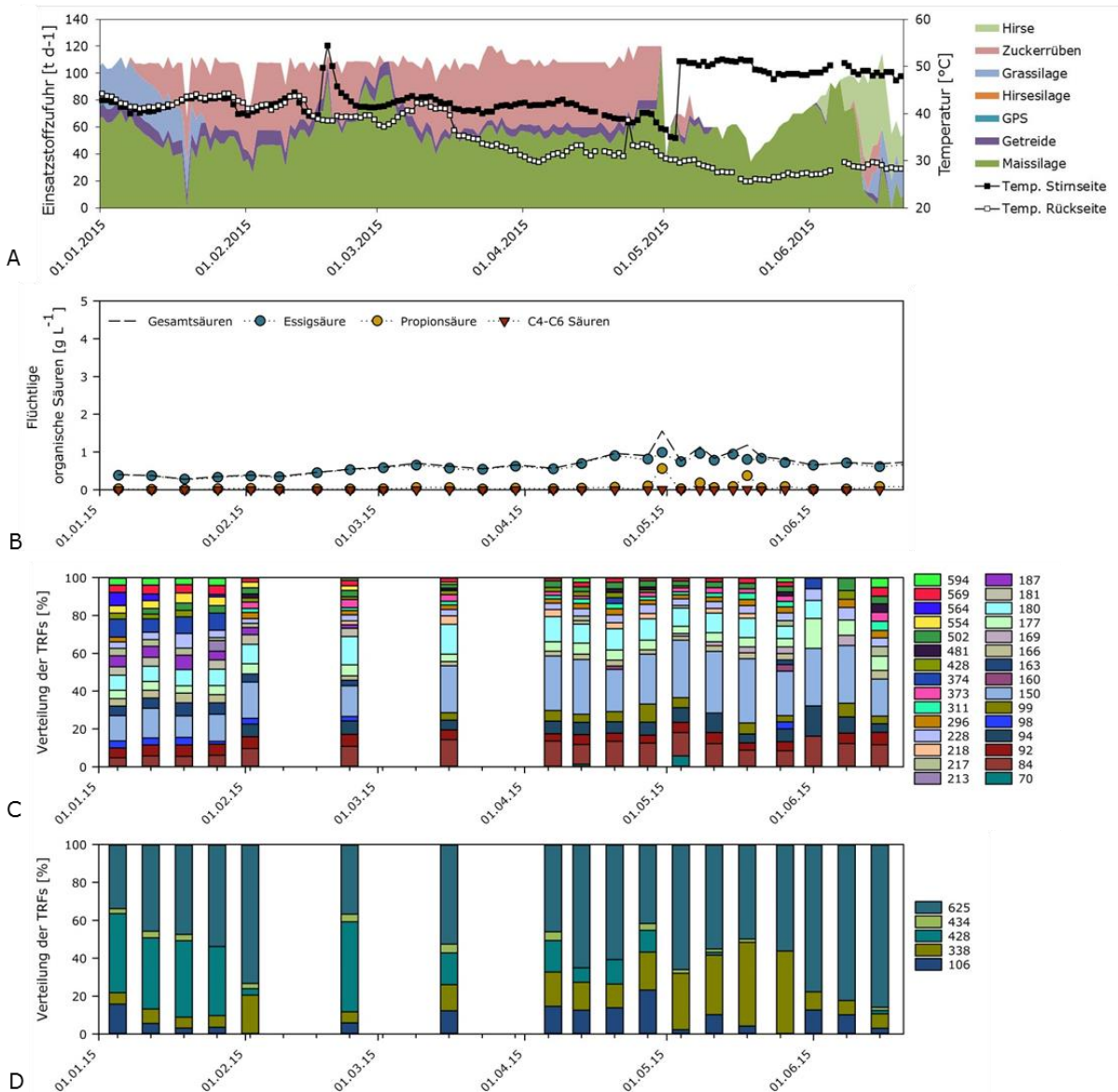


Abb. 6: Prozessparameter im Fermenter F2 der untersuchten Anlage zur Störungskategorie 1: Einsatzstoffzufuhr und Temperatur an der Stirn- und Rückseite des Pfropfenstromfermenters (A), Säurekonzentrationen (B) sowie die strukturelle Zusammensetzung der Bakterien- (C) und Archaeengemeinschaft (D) basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken).

Zum Zeitpunkt der vorgenommenen verfahrensspezifischen Veränderungen in Fermenter F1 (Einsatzstoffwechsel und Temperaturerhöhung) fallen zwei wesentliche Aspekte zusammen: ein erhöhter Anteil sehr leicht verwertbarer Substrate (eingetragen durch die Zuckerrübensilage) und eine erhöhte mikrobielle Stoffwechselaktivität aufgrund der Temperaturerhöhung.

Die Einsatzstoffe bilden die Nahrungsgrundlage für die Mikroorganismen, denn sie enthalten Makro- und Mikronährstoffe, die für das mikrobielle Wachstum und die Aktivität essentiell sind. Je nach Menge, Zusammensetzung und Qualität der Einsatzstoffe sowie der grundlegenden Prozessführung ändert sich die Verfügbarkeit von Makro- und Mikronährstoffen, was direkte Auswirkungen auf die Diversität des Biogas-Mikrobioms hat. Biogasfermenter, in denen leicht verwertbare Einsatzstoffe wie z.B. Zuckerrübensilage umgesetzt werden, weisen weniger diverse mikrobielle Gemeinschaften auf, die durch Vertreter der Abteilung *Bacteroidetes* dominiert werden, wohingegen Einsatzstoffe mit einer



komplexeren chemischen Zusammensetzung wie beispielsweise Mais- oder Grassilage durch eine höhere taxonomische Diversität mit zahlreichen Vertretern der bakteriellen Abteilungen *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria* sowie der Abteilung *Cloacimonetes* charakterisiert sind (Klang et al. 2015). Die Temperatur ist ein weiterer wichtiger Umweltfaktor, der das Wachstum und die Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen beeinflusst (Kim & Lee 2016). Allgemein gilt: Eine Temperaturerhöhung um 10°C verdoppelt die Reaktionsgeschwindigkeit. Für den Prozess der Biogasproduktion bedeutet dies, dass mit einer Temperaturerhöhung die Umsetzung der organischen Biomasse schneller verläuft und demzufolge pro Zeiteinheit mehr Biomasse zu Biogas umgesetzt wird. Diese Aspekte konnten im vorliegenden Fall beobachtet werden. Auf bakterieller Ebene zeigten sich unter den gegebenen Bedingungen in Fermenter F1 Veränderungen in der strukturellen Zusammensetzung. Beispielsweise wurden signifikante Anstiege (um 10 % bzw. 5 %) bei Vertretern der Familie *Porphyromonadaceae* (Abteilung *Bacteroidetes*), symbolisiert durch TRF-84bp und TRF-180bp, nachgewiesen, die mit einer Erhöhung der Essigsäurekonzentration von 0,3 g L<sup>-1</sup> auf 0,7 g L<sup>-1</sup> korreliert werden konnten (Abb. 5, Abb. 7A und Abb. 7B). Dies kann auf eine erhöhte Abbaurrate im Zuge einer erhöhten Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen zurückgeführt werden. Vertreter der bakteriellen Abteilung *Cloacimonetes* (symbolisiert durch TRF-163bp) scheinen ihre optimalen Wachstums- bzw. Lebensbedingungen im mesophilen Temperaturbereich zu haben, da ihre Abundanz mit zunehmender Temperatur deutlich abnahm bzw. ihr Vorkommen bei über 45°C nicht mehr nachweisbar war (Abb. 5C, Abb. 7C). Ähnliches zeigte sich auch für die Archaeengemeinschaft: Beispielhaft sei hier auf die Gattung *Methanoculleus* (TRF-428bp) hingewiesen, deren relative Häufigkeit im Zuge der Temperaturerhöhung von 30 % auf 7 % sank (Abb. 5D, Abb. 7D).

Während des Wechsels von mesophilen zu thermophilen Prozessbedingungen in Fermenter F1 kam es aufgrund einer technischen Störung zu einem drastischen Temperaturabsturz von 48°C auf 32°C. Infolgedessen kam es zu einer starken Propionsäureanreicherung auf ca. 3,0 g L<sup>-1</sup> (Abb. 5A); ein deutliches Indiz für eine Prozessstörung (Boe et al. 2010, Drosig 2013). Nach ca. zwei Wochen sinkt die Propionsäurekonzentration signifikant. Zeitgleich zeigte sich eine Anreicherung von Vertretern der archaeellen Gattung *Methanobacterium* (TRF-338bp) (Abb. 5D). Vertreter dieser Gattung produzieren Methan ausschließlich über den hydrogenotrophen Stoffwechselweg und sind daher wichtige Partner in syntrophen Lebensgemeinschaften. Syntrophie bezeichnet allgemein eine Vergesellschaftung verschiedener Organismen, die jeweils gegenseitig bestimmte Stoffwechselprodukte für den anderen Partner herstellen oder verwerten und damit wechselseitig voneinander abhängen. Die Umsetzung von Fettsäuren (z.B. Propionsäure, Buttersäure, Bernsteinsäure) ist aus Mangel an geeigneten Elektronenakzeptoren nur über die Produktion von energiereichem Wasserstoff (H<sub>2</sub>) möglich. Ohne die Weiterverwertung des produzierten H<sub>2</sub> durch hydrogenotrophe Archaeen würde es zu einer Endprodukthemmung der säureabbauenden Bakterien kommen, da zu hohe H<sub>2</sub>-Konzentrationen die Fettsäureoxidation thermodynamisch unmöglich machen (Schink 1997, Leng et al. 2018). Eine durch Wasserstoff herbeigeführte Hemmung der säureabbauenden Bakterien kann ab 100 ppm stattfinden, wobei eine Prozessstabilitätsgrenze ab 500 ppm definiert wird (Drosig 2013).

Interessant an diesem Beispiel ist, dass es über die Prozessstörung einen Wechsel von *Methanoculleus* (TRF-428bp) zu *Methanobacterium* (TRF-338bp) gab (Abb. 5D), wobei die Korrelationsanalyse keinen direkten signifikanten Zusammenhang zeigt (Abb. 7E). Aus der Literatur geht hervor, dass Vertreter der Gattung *Methanoculleus* (TRF-428bp) ihre optimalen Wachstumsbedingungen im mesophilen Bereich bei ca. 40°C haben (Anderson et al. 2009, Manzoor et al. 2016). Dies wird durch das Vorkommen von TRF-428bp im Fermenter F2 bestätigt (Vergleich Abb. 5D und Abb. 6D). Der Temperaturabfall von 48°C auf 32°C im Fermenter F1 führte nicht zu einer Regeneration von *Methanoculleus* (TRF-428bp), da hier die optimalen Wachstumsbedingungen offensichtlich unterschritten wurden. Auch für diese Beobachtung findet sich im Fermenter F2 eine Bestätigung, da die

Abundanz von *Methanoculleus* (TRF-428bp) mit sinkender Temperatur (von 41°C auf 33°C) von 32% auf 9% sank. In beiden Fällen scheint die Funktion von *Methanoculleus* (TRF-428bp) durch Vertreter der Gattung *Methanobacterium* (TRF-338bp) vorübergehend kompensiert worden zu sein, da am Ende, also nachdem sich der gesamte Prozess wieder erholt hat, Vertreter der Gattung *Methanosarcina* (TRF-625bp) die Archaeengemeinschaft in beiden Fermentern dominierten. Entsprechend der möglichen Reaktionen des Mikrobioms (Abb. 5) bzw. hier der archaeellen Gemeinschaft auf Prozessstörungen kann im vorliegenden Fall von funktioneller Redundanz gesprochen werden.

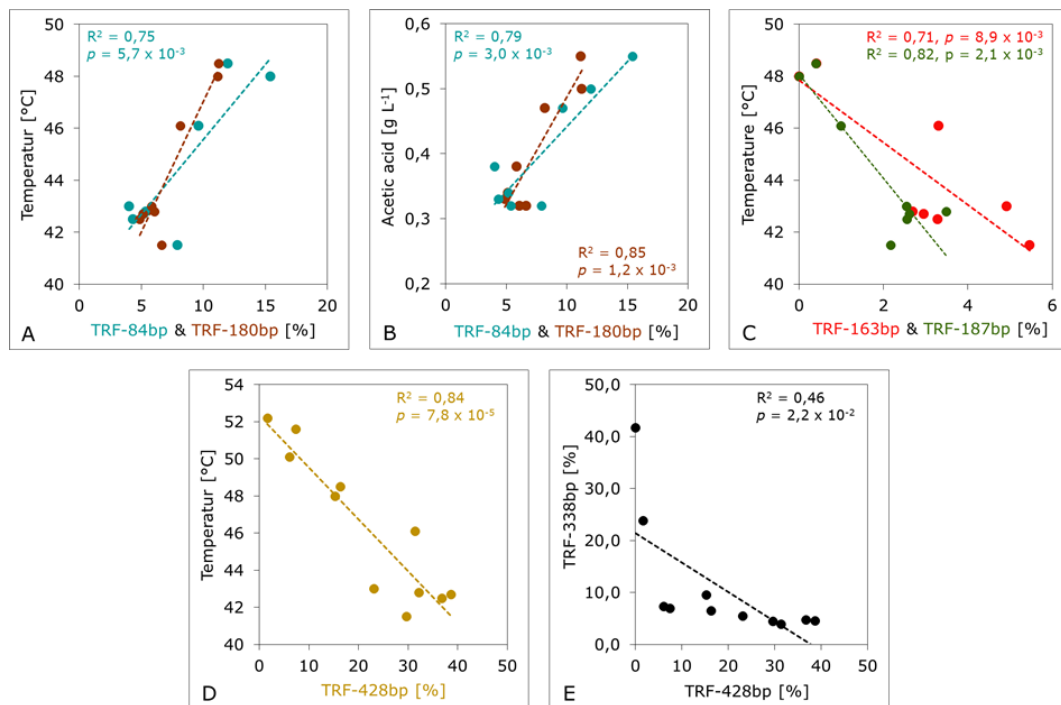


Abb. 7: Korrelationsanalysen (basierend auf einer linearen Regression) zwischen der Fermentertemperatur (A, C und D) bzw. der Essigsäurekonzentration (B) und den relativen Abundanz von ausgesuchten Vertretern der Bakterien- und Archaeengemeinschaft, symbolisiert durch die terminalen Restriktionsfragmente TRF-84bp, TRF-180bp, TRF-163bp, TRF-187bp und TRF-428bp sowie eine Korrelationsanalyse zwischen den relativen Abundanz von TRF-428bp (*Methanoculleus*) und TRF-338bp (*Methanobacterium*) (E).  $R^2$  = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression,  $p$  = statistische Signifikanz.

Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse lassen sich Hinweise auf potenziell prozessrelevante Mikroorganismen(-gruppen) ableiten:

- Von besonderem Interesse sind Vertreter der bakteriellen Familie *Porphyromonadaceae* (u.a. symbolisiert durch TRF-84bp), die im Zusammenhang mit der Verwertung leicht verfügbarer Einsatzstoffe stehen und denen dadurch ihre Ökosystemfunktion als Säureproduzenten in der Acido- und Acetogenese zugeordnet werden kann. Weiterführende Arbeiten hierzu wären z. B die Entwicklung von Nachweisverfahren mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR). Eine Identifizierung des erfassten TRF-84bp mittels einer für diese Anlage erstellten Sequenzbibliothek ergab eine phylogenetische Übereinstimmung mit *Petrimonas mucosa*, einem Bakterium, das am ATB isoliert und beschrieben wurde (Hahnke et al. 2016). Die Entwicklung eines TaqMan-qPCR Assays hat bereits begonnen (Schlussbericht BMEL/FNR-Verbundvorhaben „Biogas-Core“, ISBN 0947-7314), wobei dessen Anwendbarkeit auf Umwelt-/Biogasproben noch aussteht.

- Als weiteres potenziell prozessrelevantes TRF wurde TRF-163bp identifiziert, das eine Temperatursensibilität zeigte. Auf Basis der Sequenzbibliothek konnte dieses TRF als Vertreter der Abteilung *Cloacimonetes* identifiziert werden. Vertreter dieser Abteilung sind bisher nicht kultivierbar (Chouari et al. 2005, Limam et al. 2014, Pelletier et al. 2008), wodurch eine Zuordnung ihrer Ökosystemfunktion nicht vorliegt. Derzeit gibt es vier Genome, die aus NGS-Datenbanken rekonstruiert wurden (Pelletier et al. 2008, Calusinska et al. 2018). In der Literatur finden sich weitere Hinweise, dass Vertreter dieser Abteilung als potenzielle Prozessindikatoren in Frage kommen: Die Arbeiten von Regueiro et al. (2014) und Westerholm et al. 2018 geben ebenfalls einen Hinweis auf eine Temperatursensibilität. In den Arbeiten von Alsouleman et al. (2016) und Klang et al. (2019) finden sich Hinweise auf eine Sensibilität gegen erhöhte Ammonium/Ammoniak-Konzentrationen, wobei es zu einem Rückgang der relativen Abundanz kommt, bevor eine Störung in den Prozessparametern sichtbar wird. Auf Basis der vorliegenden Daten soll versucht werden, auch für diese Gruppe ein Nachweisverfahren zu entwickeln. Zur Entwicklung, Verifizierung und Etablierung solcher Nachweisverfahren wäre ein weiteres Forschungsvorhaben erforderlich.

### 1.3. Störungskategorie 2 - Nährstoffverfügbarkeit und inhibierende Stoffwechselprodukte

Die im Störfall 2 untersuchte Biogasanlage (BGA 10) besteht aus vier parallel betriebenen Fermentern, die bezüglich der Menge und Zusammensetzung der Einsatzstoffe nahezu gleich betrieben wurden (Abb. 8, Abb. 11). In allen Fermentern wurde Ende Januar die Menge an Maissilage von ca. 60 % auf ca. 25 % reduziert und durch Zuckerrübensilage ersetzt. Im Gegensatz zum ersten Störfall wurde nahezu zeitgleich in allen Fermentern die Temperatur um 5°C reduziert, um einer Säureanreicherung aufgrund einer erhöhten Stoffwechselaktivität in Kombination mit einem sehr leicht verwertbaren Substrat entgegenzuwirken. Ende März wurde erneut ein Einsatzstoffwechsel vollzogen. Dabei wurde die Zuckerrübensilage durch Maissilage und Hirse ersetzt. Zeitgleich wurde die Prozesstemperatur wieder erhöht.

Im betrachteten Fallbeispiel wurden, wie schon im ersten Störfall beschrieben, chemisch sehr unterschiedliche Einsatzstoffe gegeneinander ausgetauscht, für deren Umsetzung systemökologisch sehr unterschiedlich strukturierte Mikrobiome benötigt werden, wie aus der Studie von Klang et al. (2015) hervorgeht. Bei solch gravierenden Wechseln bezüglich der Umsetzbarkeit der Einsatzstoffe ist mit einer Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft zu rechnen. Die Hauptkomponentenanalyse zeigt deutlich einen Zusammenhang zwischen zugeführten Einsatzstoffen und der Ausbildung einer speziellen mikrobiellen Gemeinschaft (Abb. 11A). Die Mikrobiome aller vier Fermenter werden durch die Zuckerrübensilage maßgeblich beeinflusst, wobei hier u. a. Vertreter der Familie *Porphyromonadaceae* (Abteilung *Bacteroidetes*), symbolisiert durch die TRF-84bp, TRF-92bp und TRF-94bp, eine zentrale Rolle innerhalb der Gemeinschaft einnehmen. Die meisten bisher beschriebenen Arten der Abteilung *Bacteroidetes* sind dafür bekannt, dass sie leicht verwertbare Zucker und Alkohole schnell zu Säuren umwandeln (z.B. Chassard et al. 2008, Chen & Dong 2005, Grabowski et al. 2005, Hahnke et al. 2016, Jabari et al. 2012, Ueki et al. 2006); dadurch spielen sie eine tragende Rolle während der Acido- und Acetogenese. Die vorliegenden Ergebnisse sind ein Beispiel dafür, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften bei einem Wechsel der Einsatzstoffe spezifisch an die neuen Nährstoffbedingungen anpassen, vor allem hinsichtlich der vorherrschenden ökosystemaren Funktionen.

Über den Beobachtungszeitraum 2015 wiesen alle vier Fermenter Prozessstörungen auf. Besonders auffällig dabei war Fermenter F2, der sogar einen kompletten Prozesszusammenbruch zeigte (Abb. 9) und infolgedessen entleert wurde. Anhand der vorliegenden Anlagen- und Prozessparameter lässt sich nicht erkennen, warum es in diesem Fermenter zu einem kompletten Prozesszusammenbruch kam.

Das erneute Anfahren dieses Fermenters war nicht erfolgreich, da die zugeführte Menge an Einsatzstoffen innerhalb von drei Tagen auf  $100 \text{ t}_{\text{FM}} \text{ d}^{-1}$  (Tonnen Frischmasse pro Tag) erhöht wurde. Dies führte zu einer Überlastung des Prozesses, d.h. die zur Verfügung gestellte Menge an Biomasse überstieg die Abbaukapazität des Mikrobioms. Diese Überlastung wird deutlich anhand der erhöhten Essig- und Propionsäureproduktion (Abb. 9B). Anhand der vorliegenden Daten zur zeitlichen Variabilität der mikrobiellen Gemeinschaft lässt sich nicht ableiten, warum es zu diesem Störfall kam.

In den anderen drei Fermentern (F1, F3 und F4) wurden ebenfalls zwischen Juli und Oktober 2015 Störungen beobachtet, die ein aktives Gegensteuern erforderten: In allen Fermentern wurde die zugeführte Einsatzstoffmenge stark reduziert bzw. zum Teil sogar ganz ausgesetzt (Abb. 8, Abb. 10, Abb. 11). Aus den Werten zur Gaszusammensetzung lässt sich zu diesen Zeitpunkten eine Erhöhung der Wasserstoffkonzentration erkennen, die vermutlich die nachfolgende Säureanreicherung aufgrund einer Endprodukthemmung hervorgerufen hat. Im betrachteten Untersuchungszeitraum befanden sich diese Fermenter wahrscheinlich am Belastungslimit, nicht nur aufgrund der Menge an zugeführten Einsatzstoffen, sondern auch, weil die Fermenter in einem vermeintlich kritischen Temperaturbereich betrieben wurden ( $45\text{-}52^\circ\text{C}$ ). Kim & Lee (2016) fanden heraus, dass der Temperaturbereich zwischen  $45^\circ\text{C}$  und  $50^\circ\text{C}$  für den Prozess sehr problematisch ist, da hier der Übergang von mesophil zu thermophil stattfindet. Innerhalb dieses Temperaturbereiches muss sich die mikrobielle Gemeinschaft nicht nur strukturell, sondern vor allem funktionell umstellen. Während unter mesophilen Bedingungen beide Wege der Methanproduktion (acetoklastisch und hydrogenotroph) parallel ablaufen können, ist die Methanbildung unter thermophilen Bedingungen fast ausschließlich über den hydrogenotrophen Weg möglich. Da die hydrogenotrophen Archaeen mit die langsamsten Wachstumsraten aufweisen (Roden & Jin 2011), muss bei einem Temperaturwechsel in diesem Bereich darauf geachtet werden, dass der mikrobiellen Gemeinschaft ausreichend Zeit zur Verfügung steht, um sich auf die neuen Bedingungen einzustellen, was bedeutet, dass ein Temperaturwechsel in Richtung thermophilen Anlagenbetrieb sehr langsam vollzogen werden muss. In der Studie von Kim & Lee (2016) dauerte diese Umstellung ca. zwei Monate.

Mit der funktionellen Umstellung innerhalb der Archaeengemeinschaft geht eine Veränderung in der Bakteriengemeinschaft einher bzw. ist zu erwarten, dass diese zeitlich früher stattfindet, da Bakterien aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften schneller auf Veränderungen reagieren. Eine Umstellung auf thermophile Bedingungen auf Ebene der Bakterien bedeutet, dass alle produzierten Säuren in Kohlendioxid und Wasserstoff umgewandelt werden müssen; die beiden Substrate, die für die hydrogenotrophen Archaeen die Nahrungs- und Energiegrundlage bilden. Wenn diese jedoch aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften (langsame Wachstumsraten) den von den Bakterien produzierten Wasserstoff nicht verwerten, kommt es zu einer sogenannten Endprodukthemmung, da die säureabbauenden Bakterien nur dann wachsen können, wenn der von ihnen selbst produzierte Wasserstoff von ihren syntrophen Partnern, den Archaeen, verwertet und in Methan umgewandelt wird (Theuerl et al. 2019a). Die „gestörten“ Mikrobiome der Fermenter F1, F3 und F4 zeigen für den Zeitraum Juni bis September ein eigenständiges Cluster (Abb. 12). Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass sich die bakteriellen Gemeinschaften in ihrer strukturellen Zusammensetzung veränderten, bevor die Prozessstörung in den Prozessparametern (Wasserstoffgehalt und Säurekonzentration/-spektrum) zum Tragen kam. Das für dieses Cluster charakteristische TRF ist TRF-99bp, das der Familie *Porphyromonadaceae* zugeordnet werden kann. Eine Verifizierung als prozessrelevant ist nur durch zusätzliche Experimente möglich.

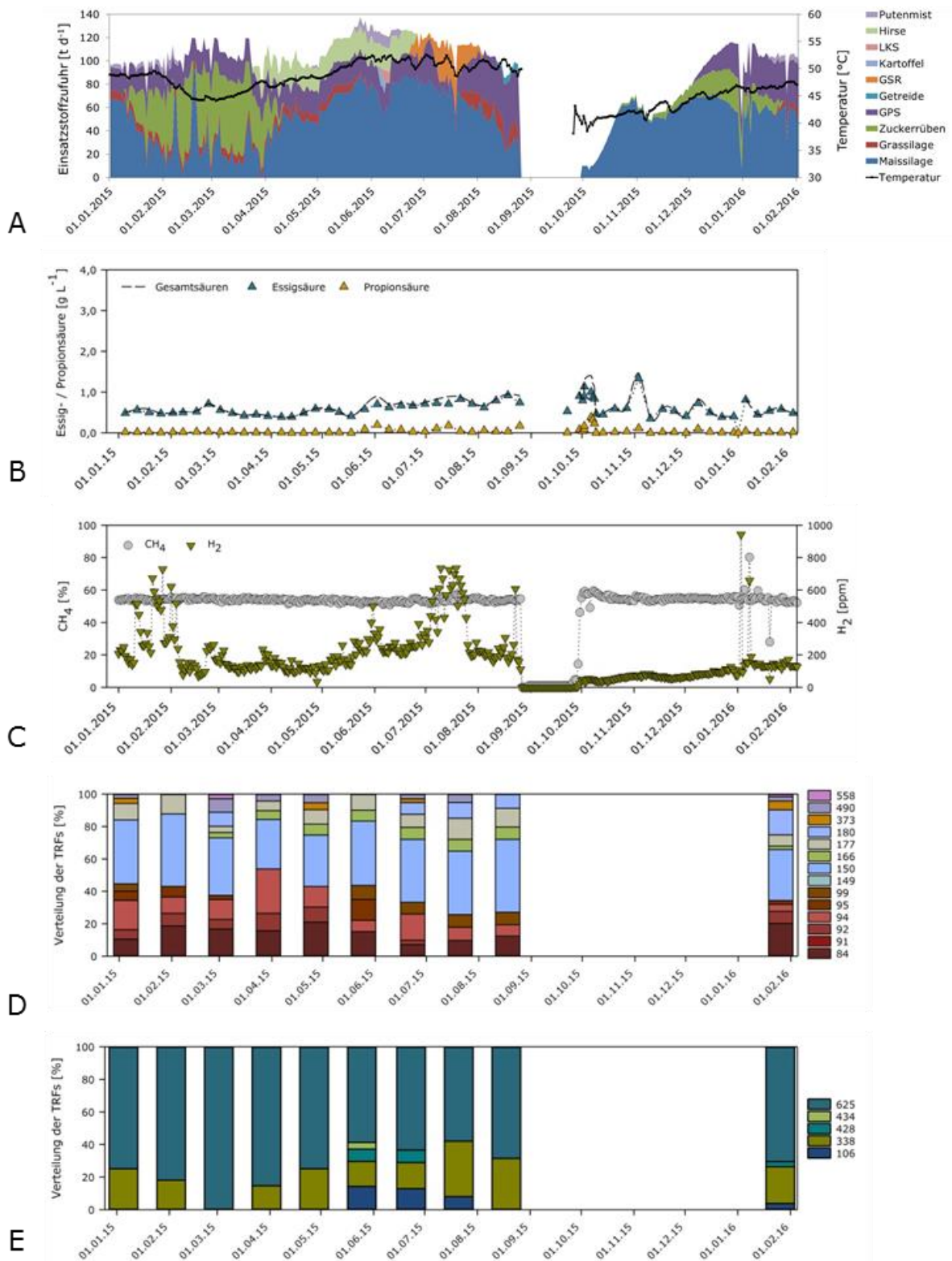


Abb. 8: Prozessparameter im Fermenter 1 der untersuchten Anlage zur Störungskategorie 2: Einsatzstoffzufuhr (A), Säurekonzentrationen (B), Gehalte an Methan ( $CH_4$ ) und Wasserstoff ( $H_2$ ) im produziertem Biogas (C) sowie die strukturelle Zusammensetzung der Bakterien- (D) und Archaeengemeinschaft (E) basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken).

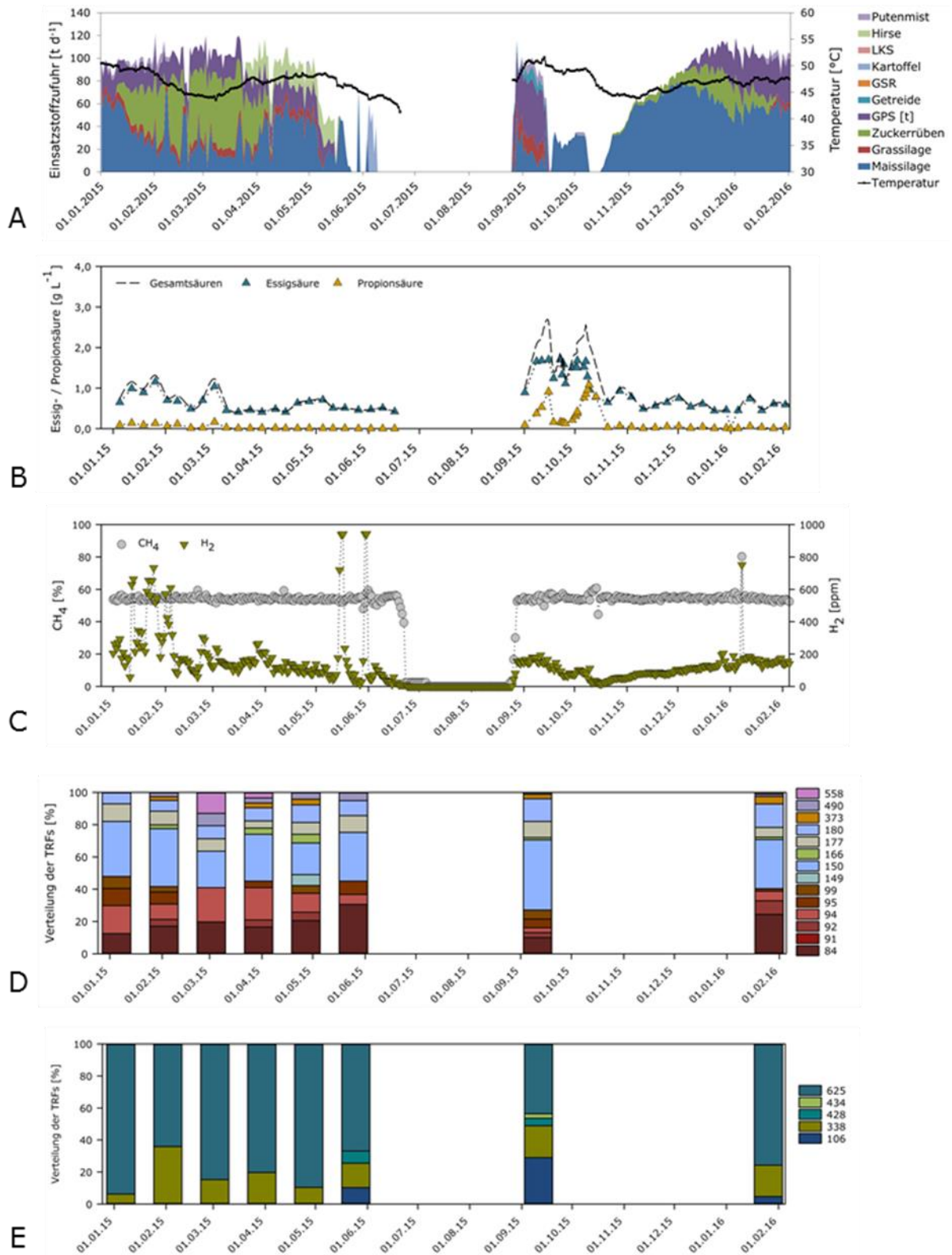


Abb. 9: Prozessparameter im Fermenter 2 der untersuchten Anlage zur Störungskategorie 2: Einsatzstoffzufuhr (A), Säurekonzentrationen (B), Gehalte an Methan ( $CH_4$ ) und Wasserstoff ( $H_2$ ) im produziertem Biogas (C) sowie die strukturelle Zusammensetzung der Bakterien- (D) und Archaeengemeinschaft (E) basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken).

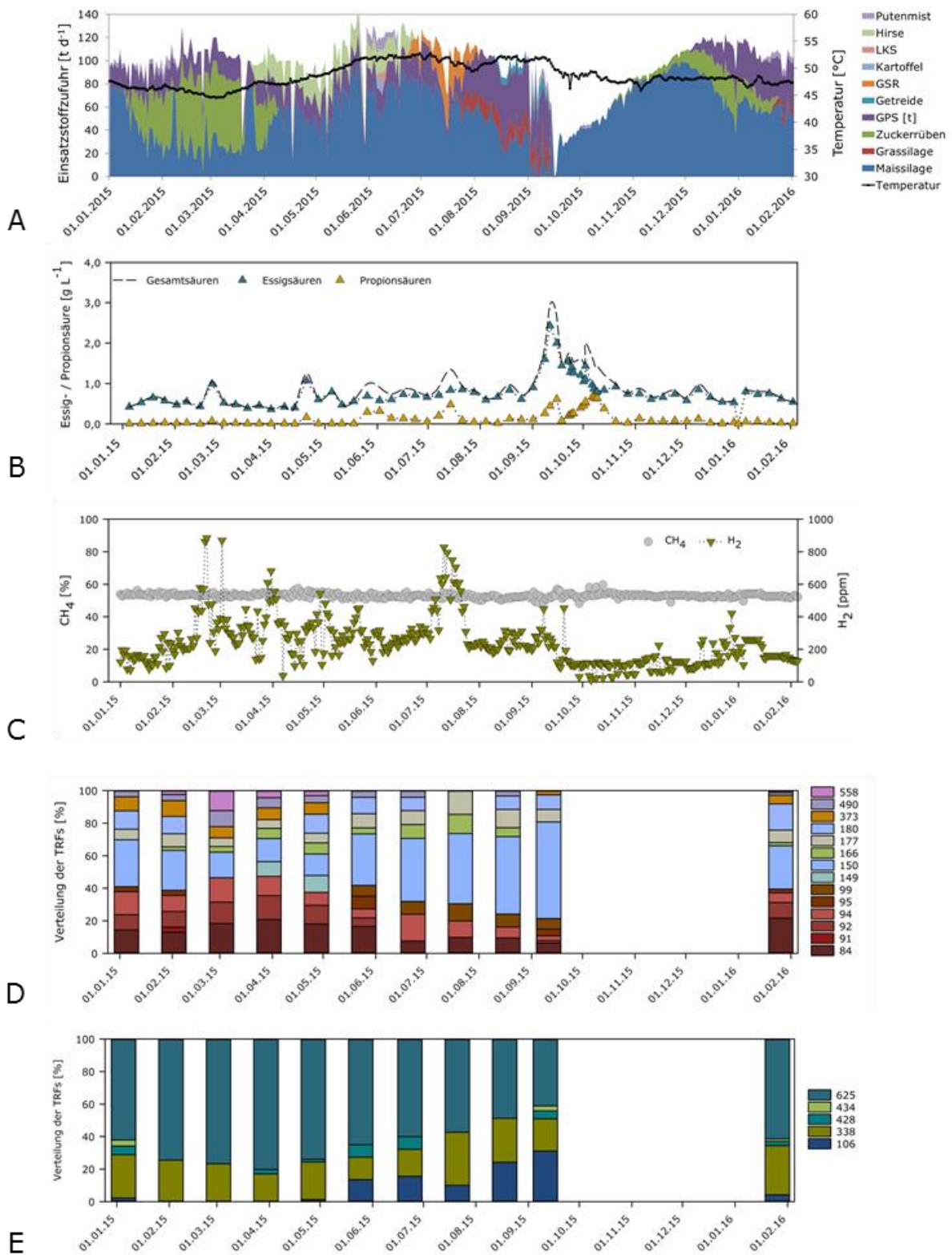


Abb. 10: Prozessparameter im Fermenter 3 der untersuchten Anlage zur Störungskategorie 2: Einsatzstoffzufuhr (A), Säurekonzentrationen (B), Gehalte an Methan ( $CH_4$ ) und Wasserstoff ( $H_2$ ) im produziertem Biogas (C) sowie die strukturelle Zusammensetzung der Bakterien- (D) und Archaeengemeinschaft (E) basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken).

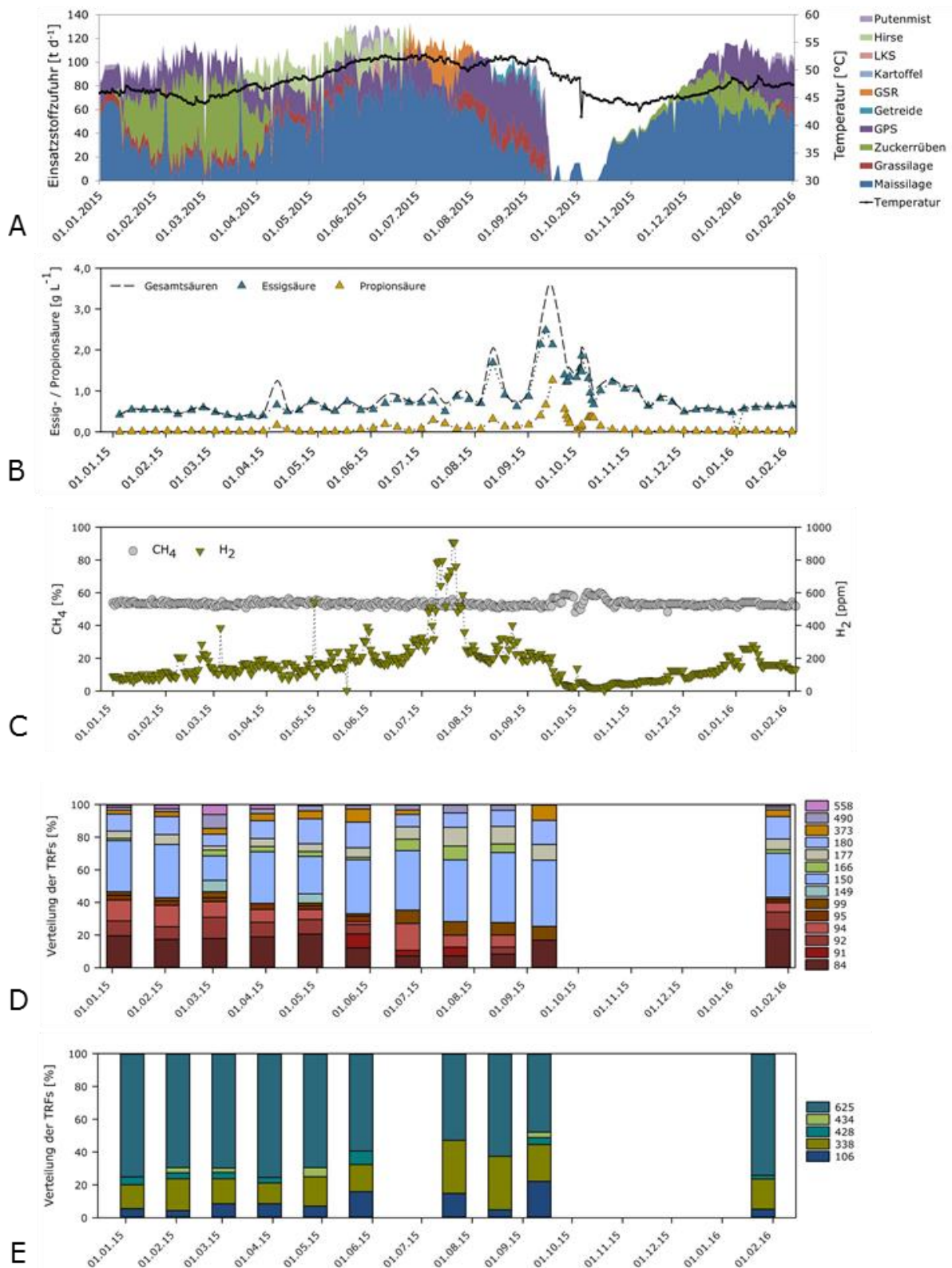


Abb. 11: Prozessparameter im Fermenter 4 der untersuchten Anlage zur Störungskategorie 2: Einsatzstoffzufuhr (A), Säurekonzentrationen (B), Gehalte an Methan ( $CH_4$ ) und Wasserstoff ( $H_2$ ) im produziertem Biogas (C) sowie die strukturelle Zusammensetzung der Bakterien- (D) und Archaeengemeinschaft (E) basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken).



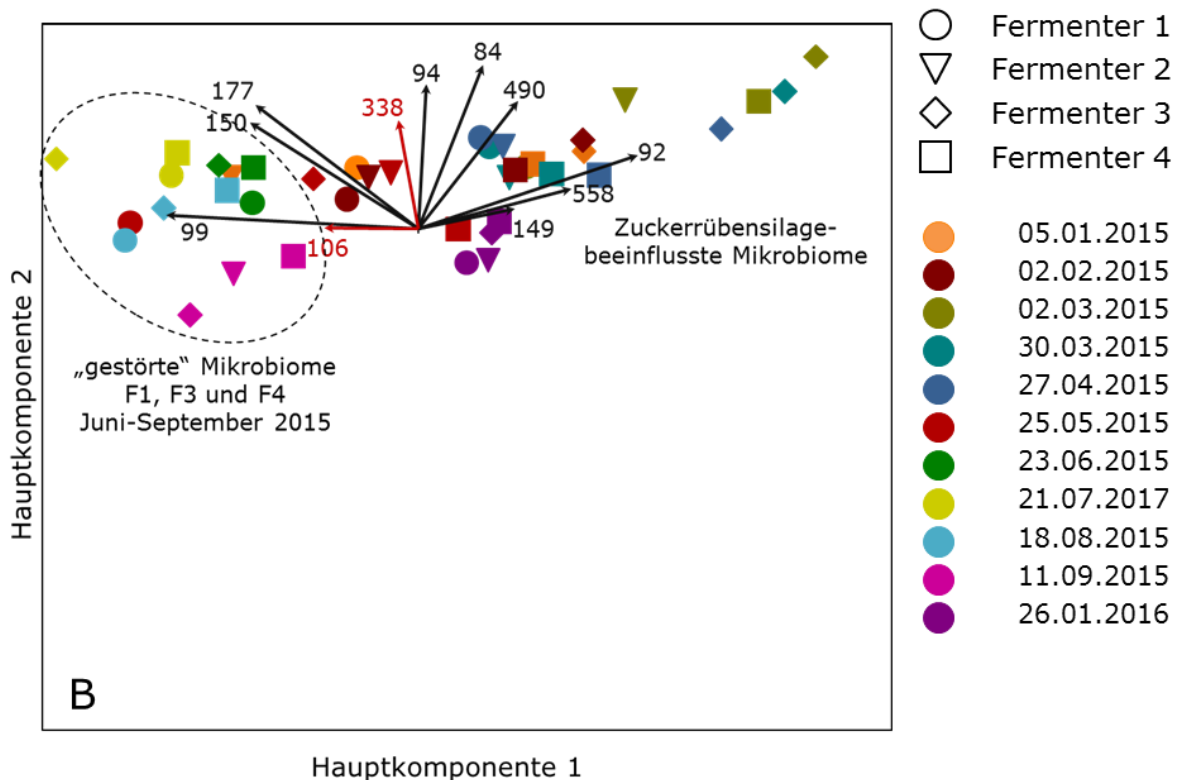
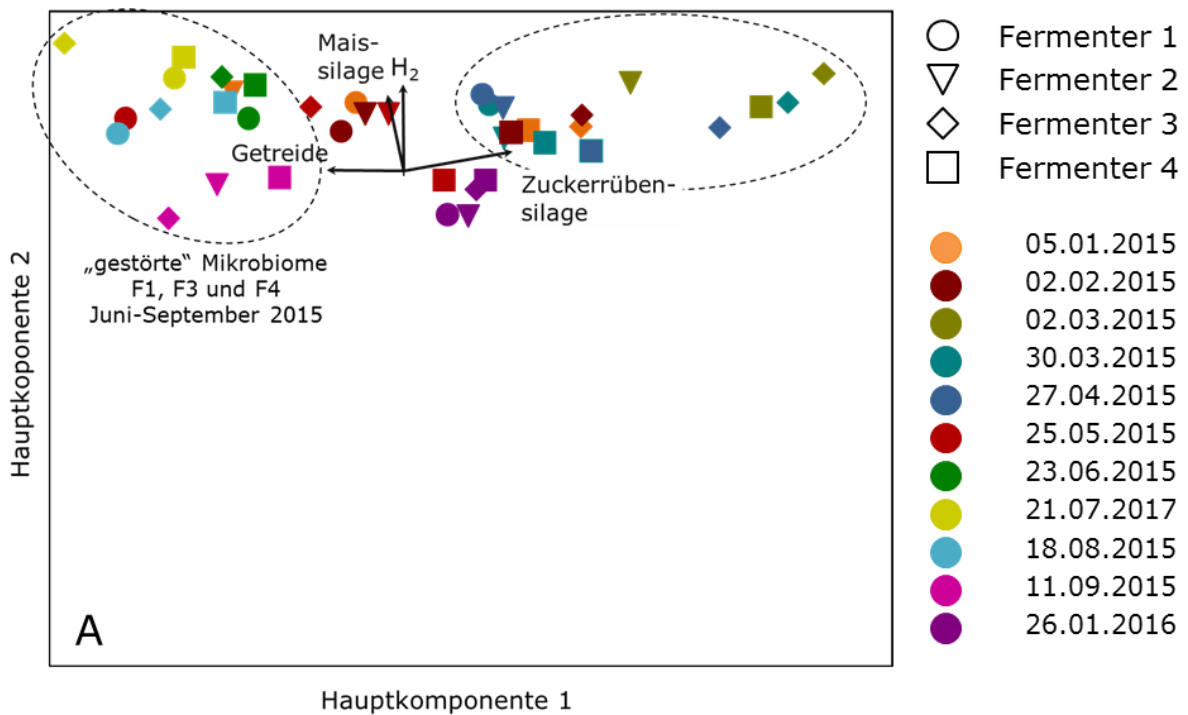


Abb. 12: Hauptkomponentenanalyse zur Erkennung von Mustern, die die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften beschreiben unter Berücksichtigung der verfahrensspezifischen und chemischen Analysedaten (A) sowie der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (TRF), wobei schwarze Zahlen bakterielle TRFs und rote Zahlen archaeelle TRFs symbolisieren (B).

#### 1.4. Störungskategorie 3 - Überlastung des mikrobiellen Abbaupotenzials

Die erste im Störfall 3 untersuchte Biogasanlage (BGA 07, Abb. 13) fiel 2015 durch eine sehr ungleichmäßige Einsatzstoffzufuhr auf (Abb. 14). Bei nahezu täglich wechselnder Beschickung schwankten die Einsatzstoffmengen zwischen 9 und 97 t<sub>FM</sub> d<sup>-1</sup> (Tonnen Frischmasse pro Tag). Im Vergleich dazu wurde die Einsatzstoffmenge 2016 deutlich auf 30-40 t<sub>FM</sub> d<sup>-1</sup> reduziert, wobei die Einsatzstoffzusammensetzung wesentlich konstanter war (Mais- und Grassilage sowie Rindergülle).

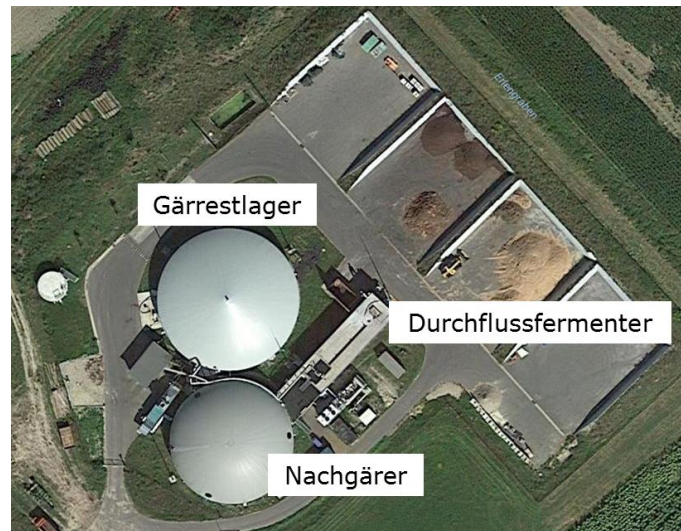


Abb. 13: Aufbau der untersuchten Biogasanlage zum Störfall 3. Diese Anlage besteht aus einem Durchflussfermenter (Pfropfenstromfermenter), einem Nachgärer (Rührkesselreaktor) und einem Gärrestlager. Quelle: Google Maps (Oktober 2017).

Im ersten Halbjahr 2015 wurde diese Anlage mit Maissilage, Hirse, Grassilage, Rindergülle und Hühnertrockenkot betrieben. Im Zeitraum April bis September 2015 wurden in der Gaszusammensetzung im Durchflussfermenter erhöhte Mengen an Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) und Wasserstoff (H<sub>2</sub>) erfasst (Abb. 14). Da H<sub>2</sub>S beim Abbau von Proteinen bzw. schwefelhaltiger Aminosäuren wie Cystein und Methionin entsteht, können die erhöhten H<sub>2</sub>S-Mengen auf die zugeführte Grassilage (Januar, Februar, März), einem proteinreichen Einsatzstoff (Herrmann et al. 2016), zurückgeführt werden. H<sub>2</sub>S wirkt toxisch auf methanogene Archaeen, da es durch die Zellmembran diffundiert und innerhalb der Zelle Proteine denaturiert, was zu einer Inhibierung von Enzymen führt (Gerardi 2003, Paulo et al. 2015, de Jonge et al. 2017). H<sub>2</sub>S reagiert zudem mit Metallionen. Die Ausfällung von beispielsweise Chrom (Co) oder Nickel (Ni), die als Enzym-Cofaktoren essentiell sind, ist eine indirekte Form der Inhibierung der Methanogenese durch H<sub>2</sub>S (Paulo et al. 2015). Im Falle einer Inhibierung der Funktionalität der hydrogenotrophen Archaeen kann es, wie schon in den beiden zuvor beschriebenen Störfällen, zu einer Endproduktthemmung der säureabbauenden Bakterien durch Wasserstoff kommen (Schink 1997, Theuerl et al. 2019a). In der Konsequenz bedeutet dies eine Säureanreicherung im Reaktor, da die während der Hydrolyse/Acidogenese gebildeten Säuren nicht mehr verwertet werden können (Abb. 15). Diese Zusammenhänge sind ein Indiz dafür, dass die syntrophe Lebensgemeinschaft aus säureabbauenden Bakterien und methanbildenden Archaeen in ihrer Funktion gestört ist. Für den Anlagenbetrieb bedeuten solche Funktionsstörungen einen inakzeptablen Rückgang der Biogaserzeugung (siehe Abb. 14 Gaseinspeisung August bis November 2015).

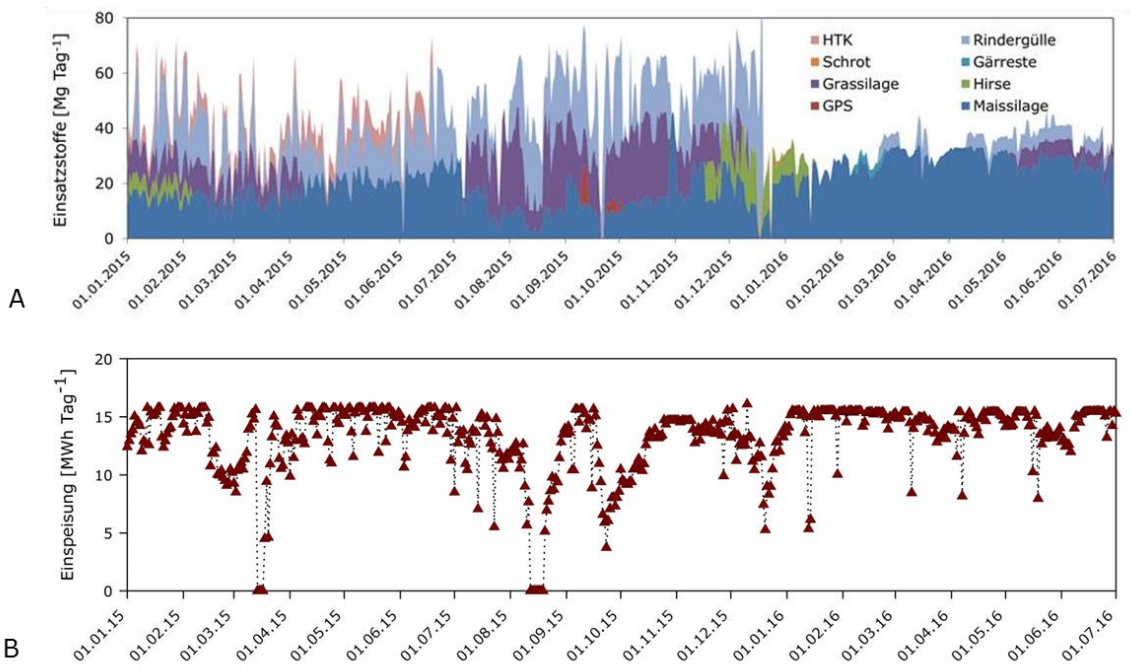


Abb. 14: Prozessparameter der untersuchten Anlage zum Störfall 3: Einsatzstoffzufuhr (A) und eingespeiste Gasmengen (B) im Vergleich der Jahre 2015 und 2016.

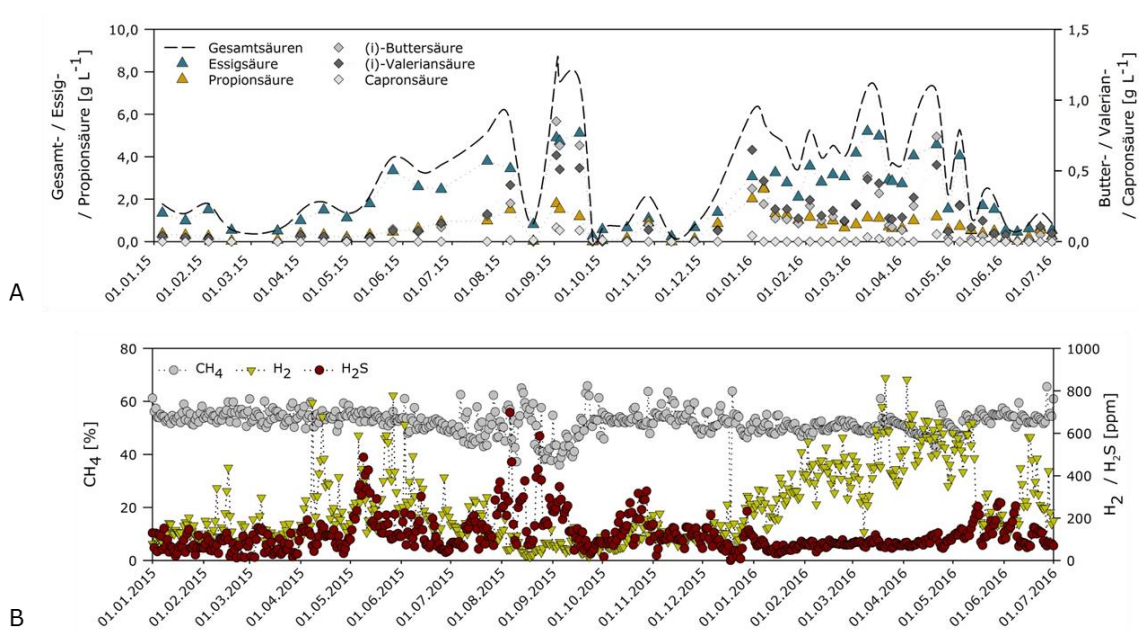


Abb. 15: Prozessparameter im Durchflussfermenter der untersuchten Anlage zum Störfall 3: Säurekonzentrationen (A) sowie die Gehalte an Methan (CH<sub>4</sub>), Wasserstoff (H<sub>2</sub>) und Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) im produziertem Biogas (B) im Vergleich der Jahre 2015 und 2016.

Betrachtet man dazu den Durchflussfermenter im Untersuchungszeitraum 2016 zeigt sich, dass die veränderte Beschickung der Anlagen zu Veränderungen im Prozess führte (Abb. 14). Die Säurewerte, vor allem das gebildete Säurespektrum, zeigt in 2016 erneut eine Anreicherung von Propion-, Butter-, Valerian- und Capronsäure (Abb. 15). Diese Säuren können nicht direkt von methanogenen Archaeen verwertet werden, da diese im Wesentlichen nur H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> sowie Essigsäure als Substrate nutzen

können. Die gebildeten Fettsäuren müssen erst in verwertbare Substrate umgewandelt werden, wobei die Umsetzung von Fettsäuren aus Mangel an geeigneten Elektronenakzeptoren nur über die Produktion von energiereichem  $H_2$  möglich ist. Ohne die Weiterverwertung des produzierten  $H_2$  durch hydrogenotrophe Archaeen kommt es zu einer Endprodukthemmung der syntrophen Bakterien, was sich in einer Säureanreicherung widerspiegelt. Im gezeigten Beispiel liegen die  $H_2$ -Werte im Februar und Mai 2016 zwischen 400 ppm und 700 ppm (z. T. darüber), wobei eine Prozessstabilitätsgrenze allgemein ab 500 ppm definiert wird (Drosg 2013).

Im Vergleich zum Durchflussfermenter zeigte der Nachgärer deutlich konstantere Werte sowohl bezüglich der gebildeten Säuren als auch der Gehalte an Methan ( $CH_4$ ), Wasserstoff ( $H_2$ ) und Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) im produzierten Biogas (Abb. 16). Im Beobachtungszeitraum wurden vor allem in 2016 im Nachgärer leicht erhöhte  $H_2$ -Konzentrationen gemessen, die jedoch zu keinem Säureanstieg führten. Leider ist es an dieser Stelle nicht möglich Aussagen bezüglich einer reduzierten Gasmenge zu treffen, da entsprechende Daten (z.B. Gaseinspeisung) im Betriebstagebuch der Anlage nicht aufgeführt sind.

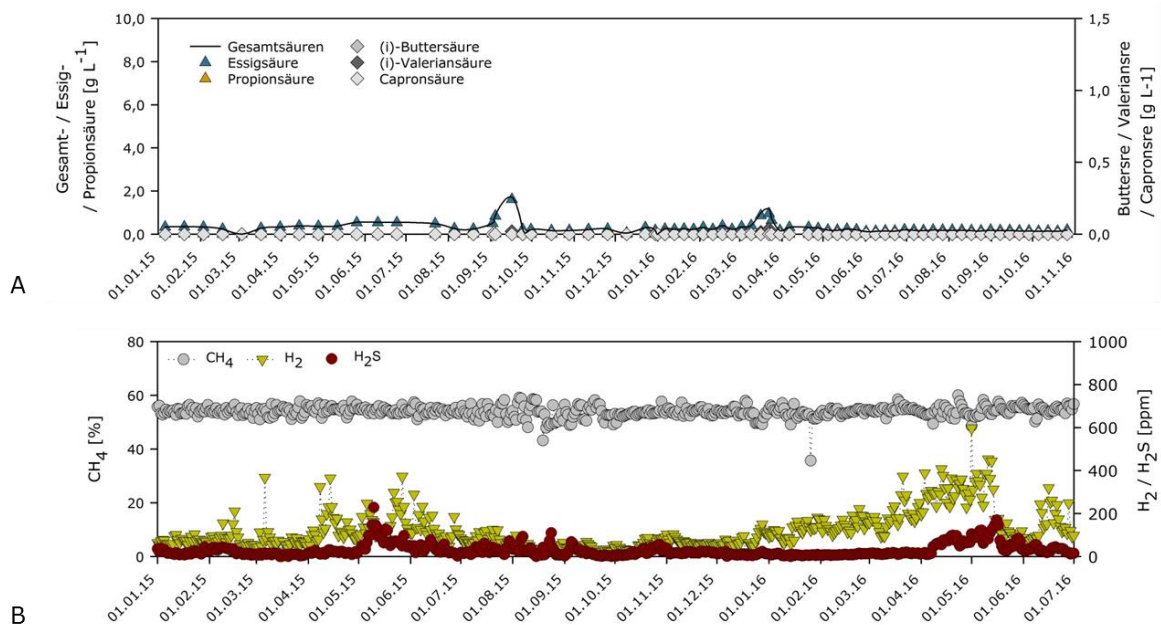


Abb. 16: Prozessparameter im Nachgärer der untersuchten Anlage zum Störfall 3: Säurekonzentrationen (A) sowie die Gehalte an Methan ( $CH_4$ ), Wasserstoff ( $H_2$ ) und Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) im produziertem Biogas (B) im Vergleich der Jahre 2015 und 2016.

Basierend auf der Auswertung der verfahrensspezifischen und chemischen Analysedaten wurden gezielt Proben für die mikrobiologischen Analysen ausgewählt und analysiert. Bei Betrachtung der TRFLP-Profile sind Unterschiede in der strukturellen Zusammensetzung der mikrobiellen, vor allem der bakteriellen Lebensgemeinschaften sowohl im Vergleich der beiden untersuchten Fermenter als auch im Vergleich der Jahre 2015 und 2016 erkennbar (Abb. 17 und Abb. 18). Diese Beobachtung wird durch die Anwendung multivariater Statistik, im vorliegenden Fall einer Ähnlichkeitsanalyse (engl. non-metric, multidimensional scaling, NMS), verdeutlicht. Formales Ziel der NMS-Analyse ist es, die Objekte, hier die Mikrobiomstruktur symbolisiert durch die Gesamtheit (Anzahl und Häufigkeit) der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (Abb. 19) räumlich so anzuordnen, dass

die Abstände zwischen den Objekten möglichst exakt den erhobenen (Un-)Ähnlichkeiten entsprechen. Je weiter die Objekte voneinander entfernt sind, desto unähnlicher sind sie.

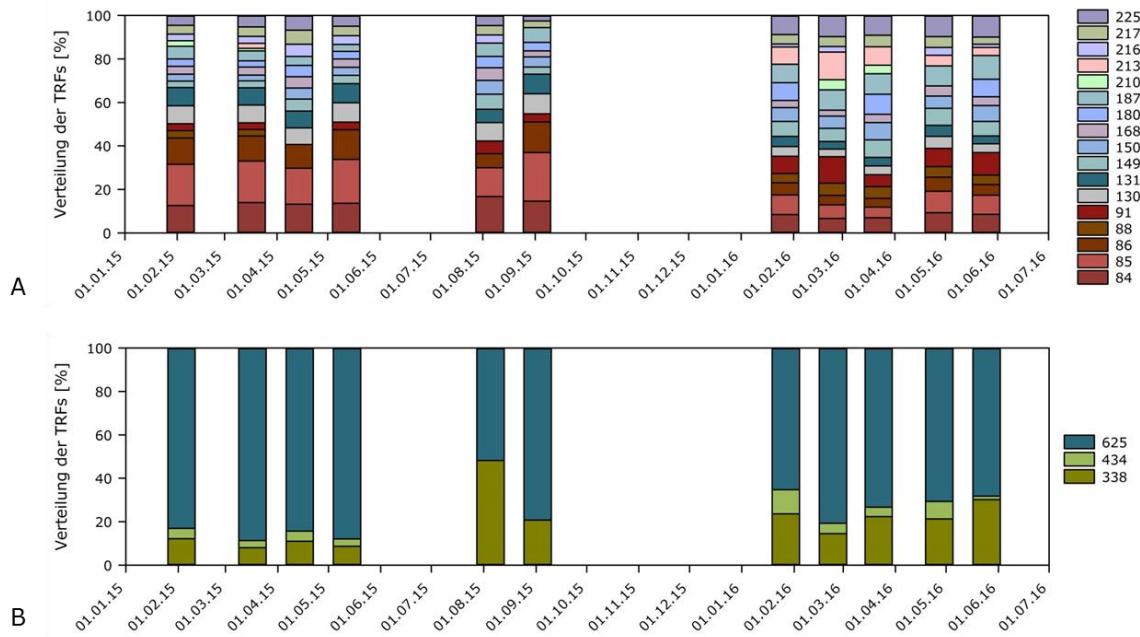


Abb. 17: Zusammensetzung der bakteriellen (A) und archaeellen (B) Lebensgemeinschaft basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken) im Durchflussfermenter der untersuchten Anlage zum Störfall 3 im Vergleich der Jahre 2015 und 2016.

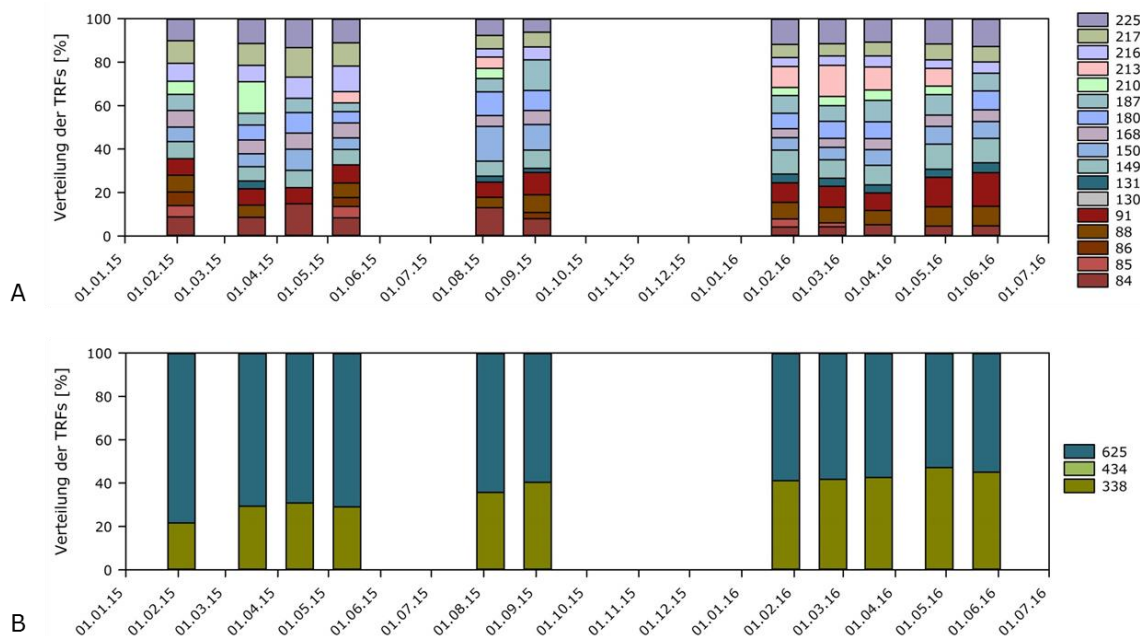


Abb. 18: Zusammensetzung der bakteriellen (A) und archaeellen (B) Lebensgemeinschaft basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken) im Nachgärer der untersuchten Anlage zum Störfall 3 im Vergleich der Jahre 2015 und 2016.

Aus der NMS-Analyse geht hervor, dass sich die bakteriellen Gemeinschaften im Durchflussfermenter von denen im Nachgärer unterscheiden (Abb. 19). Besonders auffällig ist, dass die Bakteriengemeinschaften des Durchflussfermenters im Jahr 2015 ein separates Cluster bilden, das sich von den Bakteriengemeinschaften des Durchflussfermenters im Jahr 2016 unterscheidet. Zudem ist erkennbar, dass die Proben 2015 deutlich verstreuter liegen als im Beobachtungszeitraum 2016. Interessanterweise zeigt die NMS-Analyse, dass sich potenziell syntroph lebende Bakterien, vertreten durch die TRFs 172bp/173bp und 216bp/217bp (siehe zweites Beispiel zu diesem Störfall), 2015 auf den Durchflussfermenter und den Nachgärer verteilen, was darauf hindeutet, dass alle vier Schritte der Biogasbildung in beiden Fermentern stattfanden. Diese Anlage wurde anscheinend im Beobachtungszeitraum 2015 aufgrund der sehr inkonsistenten Einsatzstoffzufuhr nicht optimal betrieben. Diese Vermutung wird durch die konstante Gaseinspeisung im Beobachtungszeitraum 2016 bestätigt (Abb. 14). Obwohl die relevanten Prozessparameter (Säurekonzentration/-spektrum und Gaszusammensetzung) auf eine Prozessstörung in 2016 hinweisen, deuten die verhältnismäßig stabilen mikrobiellen Gemeinschaften darauf hin, dass der Prozess konstant verlief, was anhand der eingespeisten Gasmenge auch deutlich wird. Die Umstellung in der Betriebsweise der Anlage führte dazu, dass der Durchflussfermenter als eine klassische Hydrolysestufe und der Nachgärer als Acido-/Methanogenesestufe betrieben wurden. Demzufolge ist die Säureanreicherung 2016 bedingt durch eine Endproduktthemmung keine Störung im Sinne der angeführten Definition, sondern eine gewünschte Prozesssteuerung. Zur Bestätigung der Vermutung wäre es hilfreich gewesen, die quantitativen Anteile der Bakterien und Archaeen zu erfassen. Dies war jedoch aufgrund von methodischen Schwierigkeiten nicht möglich. Im hier vorliegenden Fallbeispiel lassen sich keine einzelnen potenziellen Prozessindikatoren auf mikrobiologischer Ebene identifizieren. Der Prozesszustand konnte jedoch anhand der strukturellen Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft erfasst bzw. beschrieben werden.

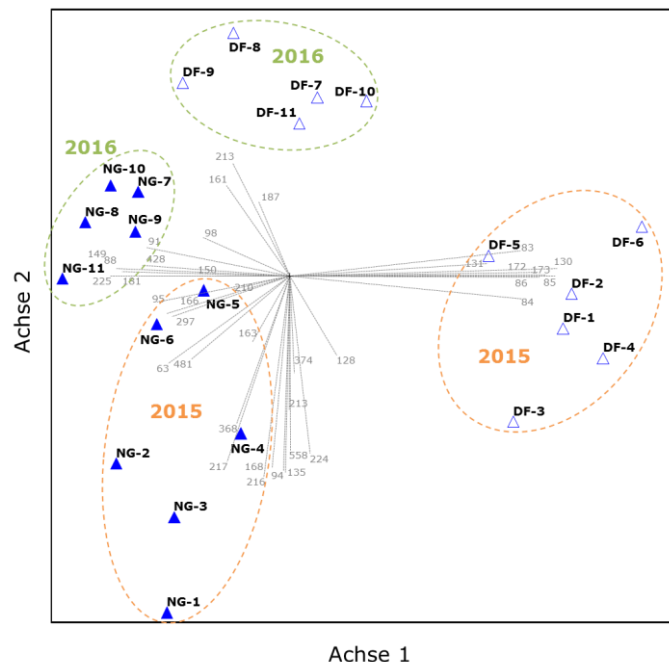


Abb. 19: Ähnlichkeitsanalyse (non-metric, multidimensional scaling, NMS) der bakteriellen Lebensgemeinschaften im Vergleich der untersuchten Fermenter in den betrachteten Untersuchungszeiträumen 2015 und 2016. Dargestellt sind die (Un-)Ähnlichkeiten der erfassten TRFs bzw. der durch sie symbolisierten bakteriellen Vertreter des Mikrobioms. DF = Durchflussfermenter, NG = Nachgärer. Zahlen 1-11 = untersuchte Zeitpunkte.

Im zweiten Beispiel zu Störfall 3 wurden vier baugleiche Anlagen eines Anlagenkomplexes aus zwei Fermentationssystemen vergleichend untersucht (Abb. 20). Alle vier Anlagen bestehen aus einem liegenden Pfpfenstromfermenter (Hydrolysestufe), einem nachgeschalteten Hauptfermenter (Rührkesselreaktor) sowie einem Nachgärer (Rührkesselreaktor). Diese Anlagen wurden mit einer Mischung aus nachwachsenden Rohstoffen (Mais, Gras, Zuckerrüben, Getreide und Grünroggen) beschickt, wobei die durchschnittliche Einsatzstoffzufuhr bei  $30\text{-}50\text{ t}_{\text{FM}}\text{ d}^{-1}$  (Tonnen Frischmasse pro Tag) lag. Anfang Juli und im September 2015 wurde die Menge an Maissilage erst auf ca.  $15\text{ t}_{\text{FM}}\text{ d}^{-1}$ , dann auf ca.  $5\text{ t}_{\text{FM}}\text{ d}^{-1}$  reduziert und mit Grassilage und Grünroggenschnitt ersetzt. Ab November 2015 erfolgte die Zugabe von ca.  $5\text{ t}_{\text{FM}}\text{ d}^{-1}$  Zuckerrübensilage (Abb. 21). Mit der Erhöhung des Anteils an Grünroggen und Grassilage stiegen die Gehalte an Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ) im produzierten Biogas, was zu einer Inhibierung der methanogenen Archaeen führen kann (siehe erstes Beispiel zu Störfall 3). Ebenso wie im Störfall 1, muss hier aufgrund der sehr inkonsistenten Datenlage im Betriebstagebuch leider auf eine Angabe der Biogasdaten und demzufolge einer Bewertung des Störfalls auf Basis eines inakzeptablen Rückgangs der Biogasproduktion verzichtet werden.

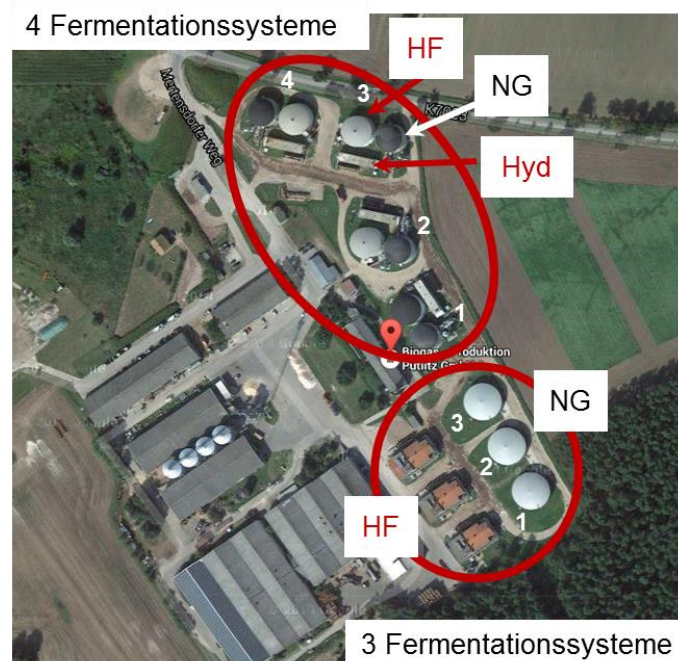


Abb. 20: Aufbau des Biogasanlagenkomplexes mit zwei Fermentationssystemen: vier baugleiche Anlagen jeweils bestehend aus einer Hydrolysestufe (Hyd, Pfpfenstromfermenter), einem Hauptfermenter (HF, Rührkesselreaktor) und einem Nachgärer (NG, Rührkesselreaktor) und drei baugleiche Anlagen jeweils bestehend aus einem Hauptfermenter (HF, Garagenfermenter) und einem Nachgärer (NG, Rührkesselreaktor).

Bei diesen Anlagen handelt es sich um zweistufige Biogasanlagen, in denen die ersten Schritte des Biogasbildungsprozesses (Hydrolyse und Acido-/Acetogenese) überwiegend in den Pfpfenstromfermentern stattfinden. Obwohl alle vier Anlagen gleich betrieben wurden, zeigten die Hydrolysestufen deutliche Unterschiede sowohl hinsichtlich der produzierten Säurekonzentrationen als auch der gebildeten Säurespektren (Abb. 22).

Mikrobiologisch untersucht wurden sieben Zeitpunkte (Mai bis August 2015 und Januar bis März 2016) der vier Hydrolysestufen und ihrer entsprechenden Hauptfermenter. Ein Vergleich der TRFLP-Profile, d. h. der strukturellen Zusammensetzung der Bakterien- (Abb. 23) sowie der Archaeengemein-

schaften (Abb. 24) lässt erkennen, dass sich die Gemeinschaften der Hydrolysestufen von denen der Hauptfermenter unterscheiden, wobei diese Unterschiede auf Ebene der Archaeen deutlicher sind. Diese Beobachtungen werden durch eine Hauptkomponentenanalyse bestätigt (Abb. 25).

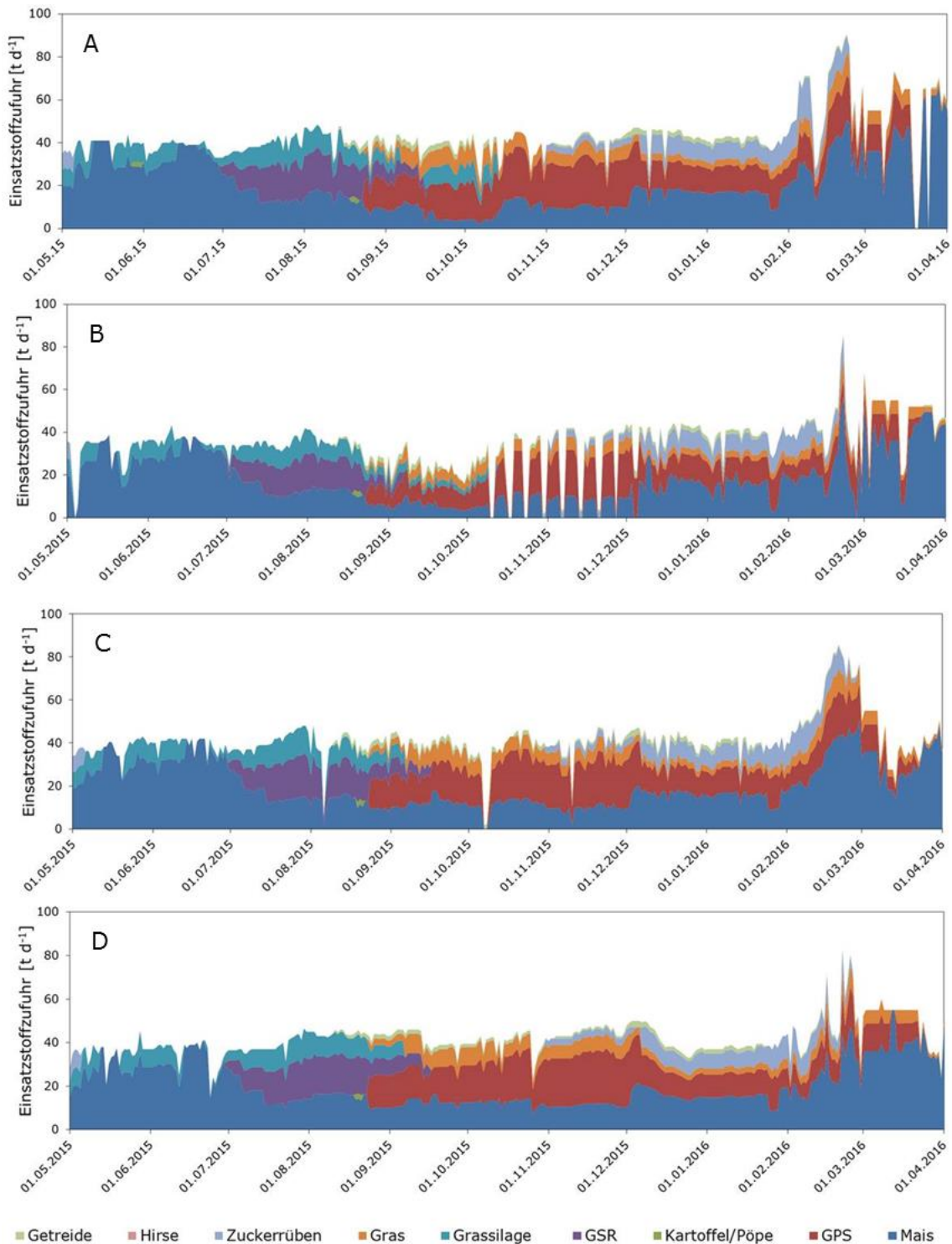


Abb. 21: Einsatzstoffzufuhr in die vier parallel-betriebenen Hydrolysestufen (A-D) der untersuchten Anlage zum Störfall 3.



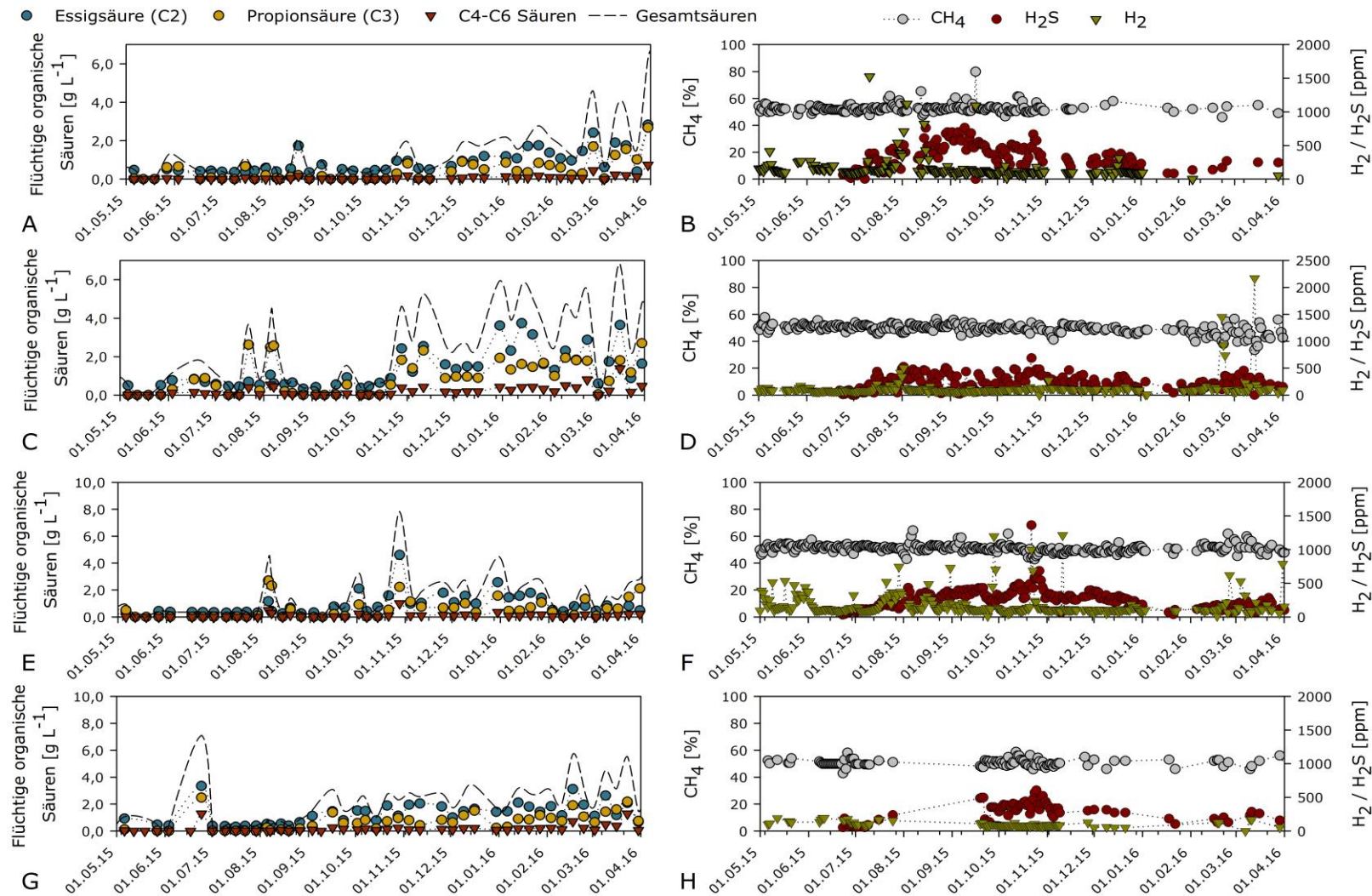


Abb. 22: Prozessparameter der untersuchten Anlage zum Störfall 3: Säurekonzentrationen (A, C, E und G) sowie die Gehalte an Methan (CH<sub>4</sub>), Wasserstoff (H<sub>2</sub>) und Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) im produziertem Biogas (B, D, F und H) der Hydrolysestufen im Vergleich der Jahre 2015 und 2016.

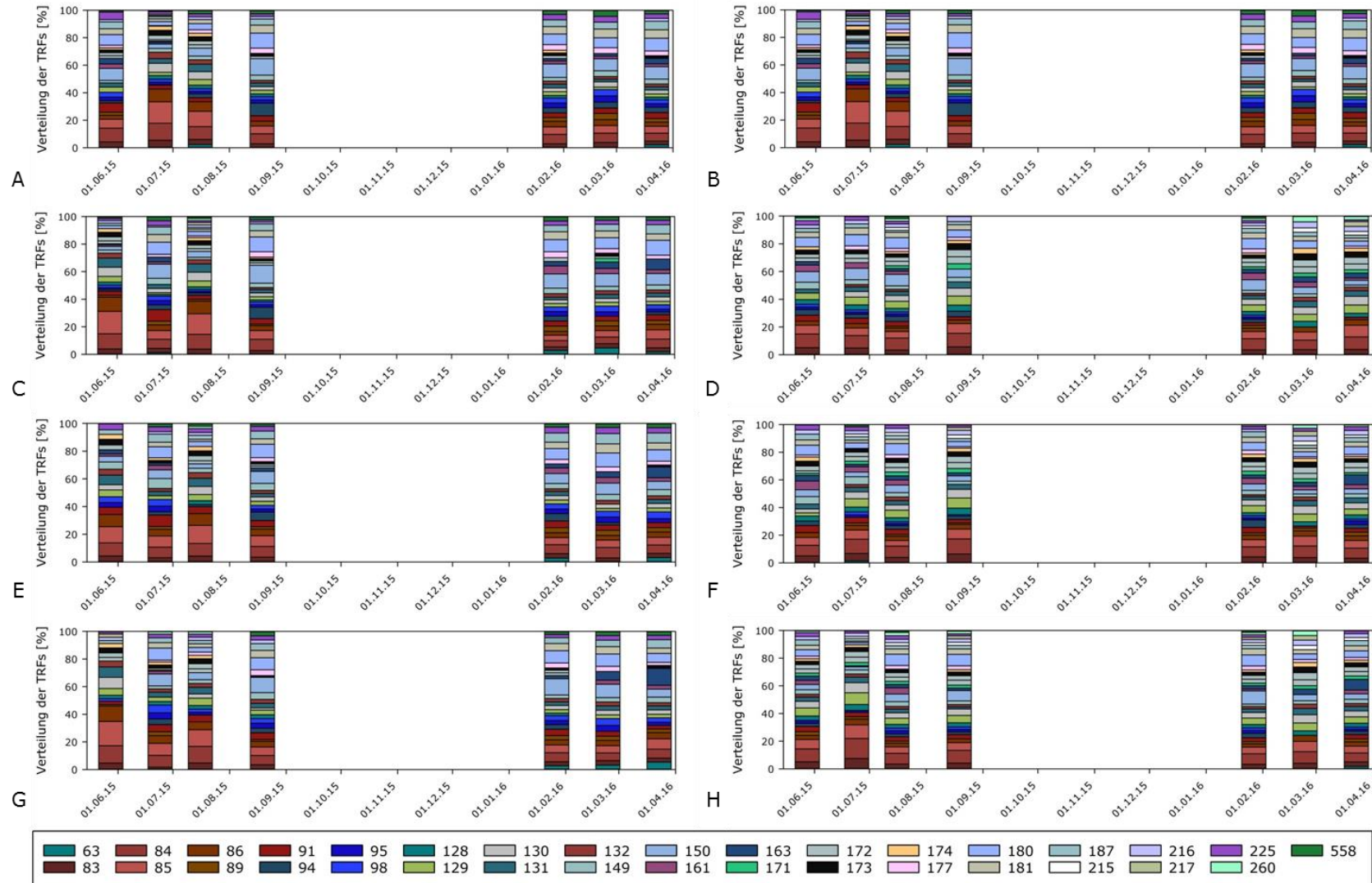


Abb. 23: Strukturelle Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft in den Hydrolysestufen (A, C, E und G) sowie der Hauptfermenter (B, D, F und H) der vier untersuchten Anlage im Störfall 3 basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken).

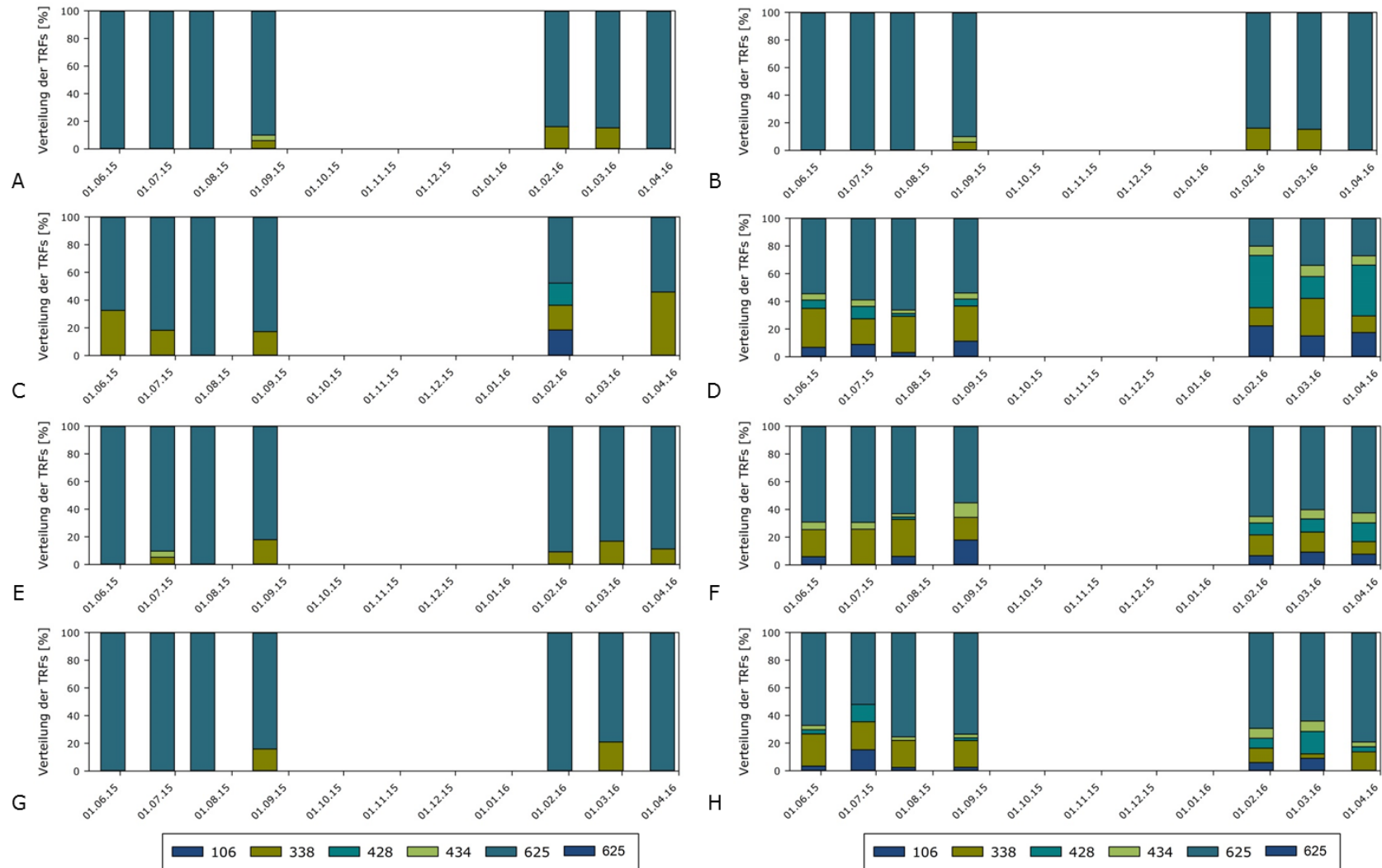


Abb. 24: Strukturelle Zusammensetzung der Archaeengemeinschaften der Hydrolysestufen (A, C, E und G) sowie der Hauptfermenter (B, D, F und H) der vier untersuchten Anlagen im Störfall 3 basierend auf der relativen Häufigkeit der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (farbige Balken).

Aus der Hauptkomponentenanalyse wird ersichtlich, dass sich die bakteriellen Gemeinschaften der vier untersuchten Hydrolysestufen zu den ersten beiden Zeitpunkten (28.05.2015 und 24.06.2015) deutlich voneinander unterscheiden, da sie weit voneinander entfernt liegen (Abb. 25). Mit dem Wechsel von Maissilage zu Grassilage und Grünroggenschnitt (Anfang Juli 2015) veränderten sich die bakteriellen Gemeinschaften. Sie wurden strukturell ähnlicher (siehe Proben vom 16.07.2015). Im weiteren zeitlichen Verlauf (August 2015 sowie Januar, Februar und März 2016) zeigte sich eine weitere Angleichung der vier untersuchten Hydrolysestufen, da alle vier Fermenter von diesen vier Zeitpunkten ein eigenständiges Cluster bilden und sich eindeutig mit den gebildeten Säurespektren korrelieren lassen (Abb. 25). Diese bakteriellen Gemeinschaften werden u. a. von Säureproduzenten aus der Abteilung *Bacteroidetes* (symbolisiert durch die TRFs 84bp/85bp/86bp, 91bp, 95bp, 98bp, 180bp/181bp/187bp) charakterisiert. Zudem finden sich in diesem Cluster Vertreter potenziell hydrolytischer Bakterien wie z.B. TRF-63bp, TRF-149bp, TRF-150bp oder TRF-177bp, die der Abteilung *Firmicutes* zugeordnet werden können.

Die Bakteriengemeinschaften der Hauptfermenter werden hingegen durch die TRFs 128bp/129bp, 171bp/172bp/173bp/174bp und 215bp/216bp charakterisiert (Abb. 25). Unter Berücksichtigung dessen, dass in den Hauptfermentern vermutlich der Großteil der Biogas-/Methanproduktion über den hydrogenotrophen Weg der Methanbildung stattfindet (symbolisiert durch TRF-428bp/TRF-434bp = *Methanomicrobiaceae*, TRF-338bp = *Methanobacteriaceae*), liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den erfassten Bakterien um syntrophe Partner der methanogenen Archaeen handelt. Zur phylogenetischen Identifizierung der erfassten TRFs wurde eine ATB-interne Datenbank verwendet, die derzeit ca. 3.250 16S-rRNA-Gensequenzen aus verschiedenen am ATB durchgeführten Projekten (inkl. den Daten aus dem hier dargestellten Vorhaben) enthält. Die erfassten bakteriellen TRFs können den Abteilungen *Firmicutes* und *Proteobacteria* zugeordnet werden, wobei eine eindeutige Identifizierung nicht möglich ist. In beiden Abteilungen finden sich jedoch Gattungen wie *Syntrophomonas*, *Clostridium*, *Syntrophobacter*, *Syntrophus* oder *Propionibacter*, die in Syntrophie mit hydrogenotrophen Archaeen leben.

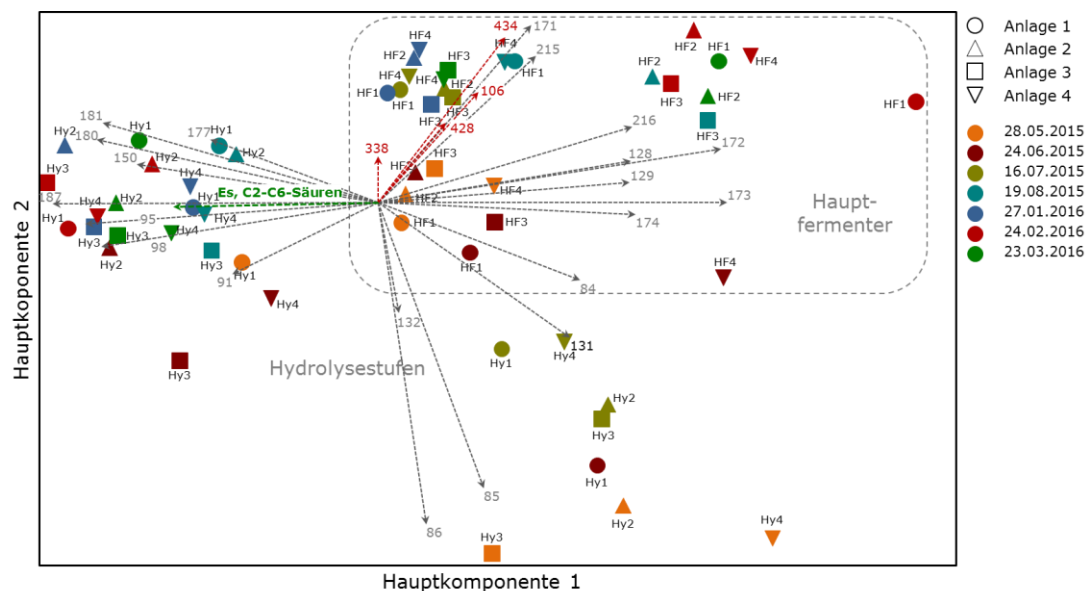


Abb. 25: Hauptkomponentenanalyse zur Erkennung von Mustern, die die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften in den Fermentern von Störfall 3 beschreiben unter Berücksichtigung der verfahrensspezifischen sowie der mikrobiologischen Daten.

### 1.5. Metaanalyse zur vergleichenden systemökologischen Bewertung

Im Rahmen der vierten Studie wurde mit einer repräsentativen Probenauswahl eine vergleichende systemökologische Analyse durchgeführt. Für diese Studie wurden aus allen zuvor beschriebenen Fallstudien Proben ausgewählt, die die verschiedenen Prozesszustände charakterisieren. Dieses Probenstet wurde durch Proben von sechs weiteren Anlagen ergänzt, die alle einen konstanten Anlagenbetrieb aufwiesen. Insgesamt wurden die mikrobiellen Gemeinschaften von 66 Fermenterproben miteinander verglichen, die zu zehn verschiedenen Biogasanlagen gehören, wobei pro Anlage zwei bis vier Zeitpunkte betrachtet wurden. Die untersuchten Biogasanlagen unterschieden sich in ihrem Anlagenbau sowie der grundlegenden Prozessführung, insbesondere den Mengen und der Zusammensetzung der zugeführten Einsatzstoffe (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einsatzstoffzusammensetzung der untersuchten Biogasanlagen für die vergleichende Metaanalyse. Angaben in Klammer geben die prozentuale Menge des Einsatzstoffes an der Gesamtmenge an.

Anlage	Zeitpunkt	Einsatzstoffzusammensetzung	Fermenter	Anlage	Zeitpunkt	Einsatzstoffzusammensetzung	Fermenter
BGA 01	16.07.2015	G (32), GS (24), MS (44)	4x Hyd, 4x HF	BGA 21	01.09.2017	HTK (6), MS (63), R (32)	2x HF
BGA 01	24.02.2016	G (23), GS (12), MS (55), R (11)	4x Hyd, 4x HF	BGA 21	15.05.2017	HTK (6), MS (57), R (38)	2x HF
BGA 05	12.01.2015	G (9), GS (28), MS (54), R (10)	2x HF	BGA 22	23.01.2017	BT (1), HTK (21), K (1), MS (41), RG (10), R (21), SS (5)	2x HF
BGA 05	27.04.2015	G (7), MS (50), R (44)	2x HF	BGA 22	10.07.2017	HTK (15), MS (35), RG (8), R (40)	2x HF
BGA 05	08.06.2015	G (2), H (25), MS (73)	2x HF	BGA 23	06.02.2017	G (7), GS (2), HTK (11), MS (47), RG (9), WP (24)	2x HF
BGA 07	17.03.2015	GS (26), HTK (13), MS (39), RG (22)	1x DF, 1x HF	BGA 23	21.06.2017	G (5), GS (1), HTK (18), MS (38), RG (8), R (5), WP (25)	2x HF
BGA 07	12.05.2015	HTK (17), MS (50), RG (33)	1x DF, 1x HF	BGA 24	07.02.2017	HTK (18), MS (42), R (40)	2x HF
BGA 07	24.02.2016	GR (9), MS (75), RG (15)	1x DF, 1x HF	BGA 24	26.06.2017	G (4), HTK (19), MS (45), R (32)	2x HF
BGA 07	27.04.2016	MS (85), RG (15)	1x DF, 1x HF	BGA 25	08.05.2017	GS (15), H (15), HTK (20), MS (48), ZM (3)	2x HF
BGA 10	02.02.2015	G (21), GS (7), MS (24), PM (7), R (43)	4x HF	BGA 25	18.07.2017	G (1), GS (17), HTK (21), MS (50), ZM (12)	2x HF
BGA 10	25.05.2015	G (16), GS (2), H (16), MS (64), PM (1)	4x HF	BGA 26	12.12.2016	BT (20), G (18), HTK (8), MS (49), R (6)	2x HF
BGA 10	26.01.2016	G (33), GS (4), MS (55), PM (5), R (4)	4x HF	BGA 26	31.01.2017	BT (9), G (22), HTK (8), MS (59), R (2)	2x HF

G = Getreide (inkl. Getreidekörner, Getreideganzpflanzensilage, Grünroggenschnitt), GS = Grassilage, MS = Maissilage, R = Rübe (inkl. Zuckerrübensilage, Rübenmus, Rübenpressschnitzel), H = Hirse, HTK = Hühnertrockenkot (=Geflügelmist), RG = Rindergülle, GR = Gärrest, PM = Putenmist, BT = Biertreber, K = Kaffeereste, SS = Schleimstoffe, WP = Weizenpülpe, ZM = Ziegenmist, Hyd = Hydrolyse, HF = Hauptfermenter, DF = Durchflussfermenter

Wie schon in der Studie von Theuerl et al. (2018) gezeigt, bildet jede Biogasanlage ihr eigenes, individuelles Mikrobiom aus, das an die vorherrschenden Bedingungen angepasst ist (Abb. 26). Die hier betrachteten Anlagen wurden in einem Temperaturbereich zwischen 40-48°C betrieben; einem Bereich, der zwischen den optimalen Werten für eine mesophile (33-38°C) oder thermophile (50-60°C) Prozessführung liegt (Kim und Lee, 2016, Theuerl et al. 2018). Wie in den ersten beiden Störfällen beschrieben ist vor allem der Temperaturbereich zwischen 45°C und 48°C für den Prozess kritisch, da hier der Übergang von mesophil zu thermophil stattfindet und sich die mikrobiellen Gemeinschaften strukturell und funktionell umstellen müssen (siehe Studie 1 und 2 sowie Kim & Lee 2016). Das bedeutet, dass in den meisten Fällen die Biogasanlagen in Deutschland am oberen Limit für den mesophilen Temperaturbereich betrieben werden. Zwar ist allgemein bekannt, dass eine Temperaturerhöhung auch zu einer Leistungssteigerung führt, jedoch befinden sich die meisten mesophilen Mikroorganismen hier außerhalb ihrer optimalen Produktivitätsgrenze. Möglicherweise ist dies ein Grund, warum es in Biogasanlagen immer wieder zu Instabilitäten kommt.

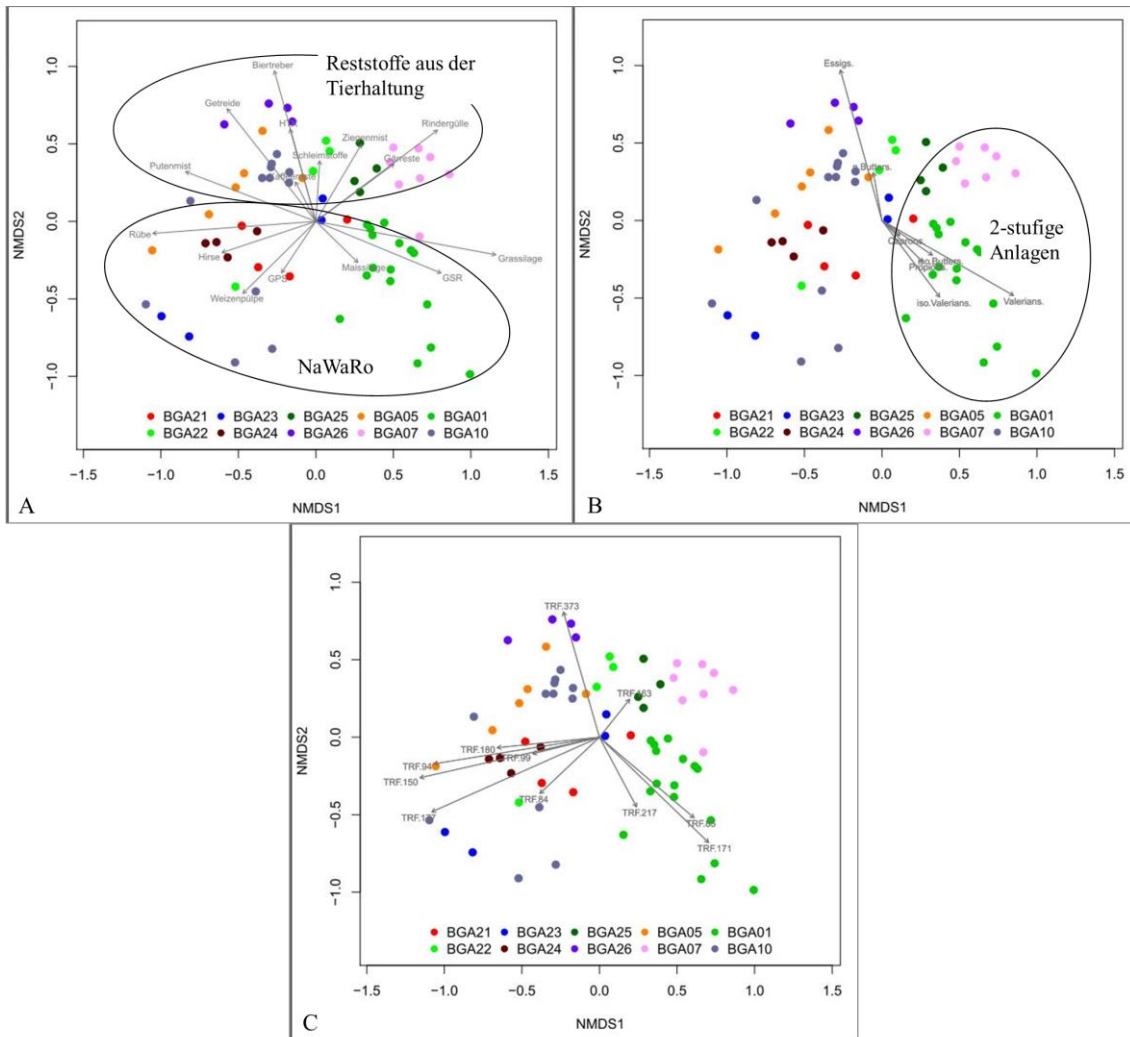


Abb. 26: Ähnlichkeitsanalyse (non-metric, multidimensional scaling, NMS) zur vergleichenden systemökologischen Betrachtung der mikrobiellen Gemeinschaften aus 66 Fermenterproben, die von 10 verschiedenen Biogasanlagen stammen. Dargestellt sind (A) der Einfluss der zugeführten Einsatzstoffe auf die strukturelle Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften, (B) der Zusammenhang zwischen produzierten Säuren und der Mikrobiomstruktur und (C) wichtige Vertreter der Mikrobiome (symbolisiert durch die erfassten TRFs), die die jeweilige strukturelle Zusammensetzung charakterisieren. Die NMS-Analyse wurde mit dem Softwarepaket R durchgeführt.

Neben der Temperatur ist die Nährstoffverfügbarkeit ein wesentlicher Einflussfaktor, der die Struktur und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaften beeinflusst (z.B. Klang et al. 2015, Theuerl et al. 2018). Die Metaanalyse zeigt, dass sich die Mikrobiome von NaWaRo-Anlagen von denen unterscheiden, die in der Einsatzstoffzusammensetzung landwirtschaftliche Reststoffe aus der Tierhaltung (Putenmist, HTK, Ziegenmist, Rindergülle) beinhalten (Abb. 26A). Darüber hinaus zeigt sich, dass leicht verwertbare Einsatzstoffe wie Zuckerrüben, Rübenmus oder Rübenpressschnitzel (in Abb. 26A unter dem Begriff „Rübe“ zusammengefasst) Einfluss auf die Ausbildung der Mikrobiomstruktur haben. In diesen Gemeinschaften spielen Mikroorganismen, die an der zweiten und dritten Phase (Acido-/Acetogenese) des Biogasbildungsprozesses beteiligt sind, eine wichtige Rolle (z.B. TRF-84bp, TRF-94bp, TRF-99bp in Abb. 26C), wie in den zuvor aufgezeigten Fallstudien dargestellt wurde.

Auffällig, aber nicht überraschend, in dieser Metastudie ist, dass der Anlagenaufbau und damit die grundlegende Prozessführung einen erheblichen Einfluss auf die Mikrobiomstruktur hat. Das zweite Beispiel in Studie 3 befasste sich mit einem Anlagenkomplex (BGA 01) bestehend aus vier baugleichen Anlagen (jeweils mit einer Hydrolysestufe und einem Hauptfermenter). Die Metastudie zeigt, dass sich die Mikrobiomstrukturen aller vier Anlagen eindeutig von den anderen Anlagen abgrenzen lassen, was darin begründet ist, dass in zweistufigen Anlagen, die Hauptprozesse Hydrolyse/Acidogenese und Methanogenese räumlich bzw. mikrobiologisch voneinander getrennt ablaufen, so dass für die jeweils prozessverantwortlichen Mikroorganismen möglichst optimale Lebensbedingung geschaffen werden können. Dies wird verdeutlicht, wenn zusätzlich das gebildete Säurespektrum berücksichtigt wird (Abb. 26B). Dementsprechend konnten mit Hilfe der Ähnlichkeitsanalyse die Mikroorganismen herausgefiltert werden, die für dieses Anlagenbeispiel charakteristisch sind, die Säurekonsumenten (symbolisiert durch TRF 171bp, TRF217bp in Abb. 26C). Anhand der beschriebenen Fallbeispiele hätte man erwarten können, dass auch das erste Beispiel aus dem Störfall 3 (BGA 07) in dieses Cluster fällt, da auch hier eine zweistufige Anlage betrieben wird. Dies ist jedoch nicht eindeutig der Fall. Im Vergleich zur BGA 01, die ausschließlich mit nachwachsenden Rohstoffen (NaWaRo) betrieben wird, wirkt sich im Falle der BGA 07 die zugeführte Rindergülle maßgeblich auf die Mikrobiomstruktur aus.

Die Mikrobiome der sechs zusätzlich in dieser Studie berücksichtigten Anlagen (BGA 21-26) integrieren sich je nach Nährstoffverfügbarkeit in das Gesamtbild, wobei hier die Menge an Hühner-trockenkot und/oder Rübe ein entscheidendes Kriterium bezüglich der strukturellen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft ist. Als Beispiel sei hier die BGA 24 erwähnt, die zwar vergleichbare Mengen Hühnertrockenkot einsetzt, wie in den Anlagen BGA 22, 23, 25 und 26 (siehe Tabelle 1), die Mikrobiomstruktur aber maßgeblich durch den hohen Anteil an Rübenpressschnitzeln in der Einsatzstoffzusammensetzung definiert wird.

Diese Metastudie ist abschließend noch mal ein gutes Beispiel wie Anlagen- und Prozessparameter die Mikrobiomstruktur und damit auch die Funktionalität mikrobieller Gemeinschaften beeinflussen.

## **2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

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

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

## **3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Für den Aufbau einer nachhaltigen Bioökonomie sind das Verständnis über die systemökologische Funktionalität und die wissensbasierte Steuerung von Mikrobiomen unerlässlich. Ziel des hier dargestellten Vorhabens war es, den Einfluss von Anlagen- und Prozessparametern auf die mikrobiellen Gemeinschaften zu ermitteln und damit retrospektive Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen Mikrobiomstruktur und Prozesseffizienz zu ziehen. Dementsprechend lag der Fokus auf der Ursachenaufklärung von Prozessstörungen, wobei das „gestörte“ Mikrobiom vom „normalen/gesunden“ bzw. dem wieder „genesenen“ Mikrobiom abgegrenzt und prozessrelevante Mikroorga-

nismen identifiziert werden sollten. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu dienen, den Prozess der Biogasproduktion unter Berücksichtigung der Potenziale und vor allem der Grenzen der Leistungsfähigkeit des Biogas-Mikrobioms möglichst optimal zu gestalten.

Da Instabilitäten/Störungen im Betriebs- bzw. Prozessablauf nicht vorhergesagt werden können bzw. Prozessstörungen aus ökonomischen Gründen verständlicherweise nicht gezielt herbeigeführt werden können, war eine enge Zusammenarbeit mit Anlagenbetreibern und beratenden Ingenieurbüros inklusive eines störfallorientierten Informationssystems im Rahmen eines Langzeit-Monitorings von landwirtschaftlichen Biogasanlagen essentiell. Zentrale Arbeiten in diesem Projekt waren:

- wissenschaftliche Leitung und Koordination des Vorhabens: hier insbesondere des Netzaufbaus und die regelmäßige Kommunikation mit Anlagenbetreibern und beratenden Ingenieurbüros
- Verifizierung der zur Verfügung gestellten Anlagen- und Prozessdaten: Sichtung und Kontrolle der Daten, ggf. Rückfragen an den jeweiligen Anlagenbetreiber, Extraktion relevanter Daten aus Betriebstagebüchern, Anlagendatenblättern sowie Prozessdatenblättern, Auswertung und Visualisierung der Daten
- retrospektive mikrobiologische Charakterisierung von Prozessstörungen: Erfassung der strukturellen Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften mittels TRFLP-Analyse in Kombination mit einem Klonierungs-/Sequenzierungsansatz auf Basis der Untersuchung des Gens der 16S rRNA separat für Bakterien und Archaeen, vergleichende systemökologische Datenauswertung mittels multivariater Statistik zur Charakterisierung der Prozesszustände und der Anpassungsfähigkeit des Mikrobioms

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

#### **4. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des Verwertungsplans**

Das Vorhaben war im Bereich der anwendungsorientierten Grundlagenforschung angesiedelt. Die erarbeiteten Ergebnisse sollen daher primär als wissenschaftliche Beiträge auf (inter-)nationalen Konferenzen oder in Form von Fachartikeln der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden.

Mittel- bis langfristige wissenschaftliche Erfolgsaussichten (Zeithorizont 3-5 Jahre) betreffen u. a. ein tiefergehendes Verständnis für mikrobiologische Aspekte beim Betrieb von Biogasanlagen. Hier steht vor allem die Aufklärung von Mechanismen, welche die biotischen und abiotischen Wechselwirkungen über Raum und Zeit steuern, im Mittelpunkt des Interesses (kausale Interaktionsökologie von Einzelorganismen, Organismengruppen und ganzen Gemeinschaften). Es konnten Aussagen zum Zusammenhang zwischen Prozessbetrieb, Prozesseffizienz und Prozessmikrobiologie abgeleitet werden. Wie im Ergebnisbericht dargestellt gibt es Hinweise auf potenziell nutzbare mikrobielle Prozessindikatoren. Daraus ergibt sich ein hohes Potential zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit von Biogasanlage bzw. ermöglicht es, die Potenziale, vor allem aber die Grenzen der Leistung des Ökosystems 'Biogasfermenter' bzw. des Biogas-Mikrobioms besser zu verstehen, um mittel- bis langfristig neue Kontroll- und Managementstrategien zu entwickeln. Hierzu bedarf es der Etablierung einer mikrobiologischen Analytik (im Idealfall laborunabhängige Schnelltests) zur Beurteilung des Prozesszustandes. Da es sich im vorliegenden Forschungsvorhaben jedoch um Einzelfallanalysen handelte, besteht dringender Handlungsbedarf, die gewonnenen Ergebnisse in weiterführenden Projekten zu reproduzieren bzw. zu verifizieren, um möglichst einfache Kontrollstrategien/-methoden zu entwickeln bzw. um die Ergebnisse in die Praxis zu überführen.



Die erhobenen Daten könnten darüber hinaus zur Entwicklung von neuen Ansätzen zur Modellierung und Optimierung des Biogasprozesses unter Berücksichtigung der Anforderung der Mikroorganismen an ihren Lebensraum genutzt werden.

Alle erhobenen genomischen Daten (d. h. Daten aus dem Klonierungs-/Sequenzierungsansatz) werden nach Abschluss des Projektes bzw. im Zuge der wissenschaftlichen Veröffentlichungen in öffentlichen Datenbanken (z. B. den National Center for Biotechnology Information) hinterlegt.

## 5. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens seitens Dritter

Eine Literaturabfrage für die Stichwörter „biogas process disturbance indicator microbes“ bzw. „biogas process disturbance (alternativ: imbalance oder variation) microbial community“ ergab fünf Publikationen, die theoretischen bzw. konzeptionellen Charakter aufwiesen und sich mit der Frage nach zukünftigen Managementkonzepten im Sinne einer Prozessoptimierung für die Produktion von Biogas befassen (Bensmann et al. 2016, *Renewable Energy* 96: 479 - 489; Carballa et al. 2015, *Current Opinion in Biotechnology* 33: 103 – 111; De Vrieze & Verstrate 2016, *Environmental Microbiology* 18: 2797-2809; De Vrieze et al. 2017, *New Biotechnology*, 39: 206-214; De Vrieze et al. 2018, *Environmental Microbioloy* 20, doi.org/10.1111/1462-2920.14269). In diesen Studien finden sich jedoch keine konkreten Hinweise, in welcher Form Mikroorganismen bzw. mikrobielle Gemeinschaften für eine Prozesskontrolle bzw. für ein Prozessmanagement genutzt werden könnten.

In der Literatur finden sich einige Studien, die sich mit sehr spezifischen Fragestellungen bezüglich des Einflusses einzelner Prozessparameter (Veränderungen der Einsatzstoffe inklusive prozessbedingte Anreicherung inhibierend wirkender Stoffwechselprodukte, Überfütterung oder Temperaturveränderungen) auf das Mikrobiom befassen (u.a. Regueiro et al. 2014, *Journal of Biotechnology* 192: 179-186; Goux et al. 2015, *Biotechnology for Biofuels* 8: 122; Munk et al. 2017 *Anaerobe* 46: 146-154; Alsouleman et al. 2016 *Bioresource Technology* 208: 200-204; De Vries et al. 2017 *Water Research* 111: 109-117; Grohmann et al. 2018 *Bioresource Technology* 247: 347-356; Lin et al. 2017 *Water Research* 123: 134-143 und De Jonge et al. 2017 *Bioresource Technology* 232: 313-320). Diese Studien wurden alle im Labormaßstab durchgeführt und geben nur marginale Hinweise auf potenzielle prozessrelevante Mikroorganismen(-gruppen), die sich als Störfallindikatoren eignen. In allen Studien finden sich aber hilfreiche Informationen, um spezifische Prozesszustände mit bestimmten Mikroorganismengruppen oder anpassungsfähigen/stresstoleranten Mikrobiomen in Verbindung zu bringen, wodurch sie zur Interpretation der erhobenen Ergebnisse des vorliegenden Forschungsvorhabens beigetragen haben. Eine aktuelle Studie (Theuerl et al 2018, *Bioresource Technology*, 263: 128-135), in der 36 Biogas-Mikrobiome aus 22 landwirtschaftlichen Biogasanlagen miteinander verglichen wurden, gibt interessante Hinweise darauf, dass sich entsprechend der vorherrschenden Umweltparameter spezifische Mikrobiome ausbilden, wobei eine Gewichtung der wesentlichen Einflussparameter von höherer zu niedrigerer Wichtigkeit abgeleitet werden konnte: (i) Temperatur, (ii) Ammonium/Ammoniak-Konzentrationen und Leitfähigkeit und (iii) die chemische Zusammensetzung der Einsatzstoffe. Zudem zeigte sich, dass spezifische Mikroorganismenkombinationen (*Bacterioidetes-Cloacimonetes-Methanotrix*) Anzeiger für stabile Prozesszustände sind. Interessantestes Ergebnis dieser Studie war jedoch, dass jede Biogasanlage ihr eigenes Mikrobiom ausbildet, wobei die Spezialisten der Gemeinschaft mutmaßlich für die Aufrechterhaltung der Ökosystemfunktion verantwortlich sind.

## 6. Veröffentlichungen

### 6.1. Tagungsbeiträge

Erste Ergebnisse wurden im Rahmen des 3rd International Congress on Biogas Microbiology (Wageningen, Niederlande, 01.-03.05.2017), des KTBL/FNR Kongresses „Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven“ (Bayreuth, 26./27.09.2017) sowie auf der BiogasScience 2018 – International Conference on Anaerobic Digestions (Turin, Italien, 17.-19.09.2018) vorgestellt.

Theuerl S, Alsouleman K, Klang J – “Members of the WWE1 candidate division and the phylum Bacteroidetes as indicators for (in-)stable process conditions” - 3rd International Conference on Biogas Microbiology (ICBM), Wageningen (Niederlande), 01.-03.05.2017

Theuerl S, Klang J, Prochnow A – „Prozessstörungen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen - Ursachen, Mechanismen und Auswirkungen auf das Biogas-Mikrobiom“ - KTBL/FNR-KONGRESS: Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven, Bayreuth (Deutschland), 26./27.09.2017

Theuerl S, Klang J, Prochnow A – “Causes, mechanisms and effects of process disturbances on biogas microbiomes” - BiogasScience 2018 - International Conference on Anaerobic Digestions, Turin (Italien), 17.-19.09.2018)

### 6.2. Fachpublikationen

Es ist geplant, wesentliche Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens in Form von wissenschaftlichen Fachartikeln zu veröffentlichen. Ein Übersichtsartikel zur Thematik wurde Anfang 2019 veröffentlicht:

Theuerl S, Klang J, Prochnow A (2019): Process disturbances in agricultural biogas production – causes, mechanisms and effects on the biogas microbiome: A review. *Energies* 12(3), 365; doi:10.3390/en12030365.

Derzeit befinden sich folgende Manuskripte in Vorbereitung und sollen 2018/2019 zur Begutachtung bei ausgewählten Fachzeitschriften eingereicht werden.

Klang J, Bock D, Blume F, Theuerl S (in Planung): Effect of a profound temperature drop: Distinction of a "disturbed" from a "healthy" respectively "recovered" biogas microbiome: A case study. Einreichung geplant für 12/2018 in *Microbial Biotechnology*

Klang J, Bock D, Blume F, Theuerl S (in Planung): Overstraining of the microbial digestion potential and effects of process-related accumulation of inhibiting hydrogen (H<sub>2</sub>) on the biogas microbiome: A case study. Einreichung geplant für 2019 in *Microbial Biotechnology*

Theuerl S, Bock D, Blume F, Klang J (in Planung): Changing feedstock regimes and their risks for process disturbances based on process-related accumulation of inhibiting hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S). Einreichung geplant für 2019 in *Bioresource Technology*

## III. Referenzen

Allison SD, Martiny JB (2008): Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 11512-11519.

- Alivisatos AP, Blaser MJ, Brodie EL, Chun M, Dangl JL, Donohue TJ, Dorrestein PC, Gilbert JA, Green JL, Jansson JK, Knight R, Maxon ME, McFall-Ngai MJ, Miller JF, Pollard KS, Ruby EG, Taha SA (2015): A unified initiative to harness Earth's microbiomes. *Science* 350: 507-508.
- Alsouleman K, Linke B, Klang J, Klocke M, Krakat N, Theuerl S (2015): Reorganisation of a mesophilic biogas microbiome as response to a stepwise increase of ammonium nitrogen induced by poultry manure supply. *Bioresource Technology* 208: 200-204.
- Anderson IJ, Sieprawska-Lupa M, Lapidus A, Nolan M, Copeland A, Glavina Del Rio T, Tice H, Dalin E, Barry K, Saunders E, Han C, Brettin T, Detter JC, Bruce D, Mikhailova N, Pitluck S, Hauser L, Land M, Lucas S, Richardson P, Whitman WB, Kyrpides NC (2009): Complete genome sequence of *Methanoculleus marisnigri* Romesser et al. 1981 type strain JR1. *Standards in Genomic Sciences* 1: 189-196.
- Appels L, Lauwers J, Degreve J, Helsen L, Lievens B, Willems, K, Van Impe J, Dewil R (2011): Anaerobic digestion in global bio-energy production: potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15: 4295-4301.
- Bensmann A, Hanke-Rauschenbach R, Heyer R, Kohrs F, Benndorf D, Kausmann R, Plöchl M, Heiermann M, Reichl U, Sundmacher K (2016): Diagnostic concept for dynamically operated biogas production plants. *Renewable Energy* 96: 479-489.
- Blaser MJ, Cardon ZG, Cho MK, Dangl JL, Donohue TJ, Green JL, Knight R, Maxon ME, Northen TR, Pollard KS, Brodie EL (2016): Toward a predictive understanding of Earth's microbiomes to address 21st century challenges. *mBio* 7(3), e00714-16.
- Boe K, Batstone DJ, Steyer J-P, Angelidaki I (2010): State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. *Water Research* 44: 5973-5980.
- Calusinska M, Goux X, Fossépré M, Muller EEL, Wilmes P, Delfosse P (2018): A year of monitoring 20 mesophilic full-scale bioreactors reveals the existence of stable but different core microbiomes in bio-waste and wastewater anaerobic digestion systems. *Biotechnology for Biofuels* 11: 196, <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1195-8>.
- Carballa M, Rigueiro L, Lema JM (2015): Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology* 33: 103-111.
- Chassard C, Delmas E, Lawson PA, Bernalier-Donadille A (2008): *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1008-1013.
- Chen S, Dong X (2005): *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2257-2261.
- Chouari R, Le Paslier D, Dauga C, Daegelen P, Weissenbach J, Sghir A (2005): Novel major bacterial candidate division within a municipal anaerobic sludge digester, *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2145-2153.
- Dahiya S, Kumar AN, Sravan JS, Chatterjee S, Sarkar O, Mohan SV, (2018): Food waste biorefinery: sustainable strategy for circular bioeconomy. *Bioresource Technology* 248: 2-12.
- de Jonge N, Moset V, Møller HB, Lund Nielsen J (2017): Microbial population dynamics in continuous anaerobic digester systems during start up, stable conditions and recovery after starvation. *Bioresource Technology* 232: 313-320.

- De Vrieze J, Christiaens MER, Verstraete W (2017): The microbiome as engineering tool: Manufacturing and trading between microorganisms. *New Biotechnology* 39: 206-214.
- De Vrieze J, Ijaz UZ, Saunders AM, Theuerl S (2018): Terminal restriction fragment length polymorphism is an “old school” reliable technique for swift microbial community screening in anaerobic digestion. *Scientific Reports* 8, 16818, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34921-7>.
- De Vrieze J, Verstraete W (2016): Perspectives for microbial community composition in anaerobic digestion: from abundance and activity to connectivity. *Environmental Microbiology* 18: 2797-2809.
- Drosg B (2013): Process monitoring in biogas plants. IEA Bioenergy Task 37 - Energy from Biogas.
- Gerardi MH (2003): The microbiology of anaerobic digesters. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. ISBN 0-471-20693-8
- Grabowski A, Tindall BJ, Bardin V, Blanchet D, Jeanthon C (2005): *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1113-1121.
- Hagman L, Blumenthal A, Eklund M, Svensson N (2018): The role of biogas solutions in sustainable biorefineries. *Journal of Cleaner Production* 172: 3982-3989.
- Hagos K, Zong J, Li D, Liu C, Lu X (2017): Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 76: 1485-1496.
- Hahnke S, Langer T, Koeck DE, Klocke M (2016): Description of *Proteiniphilum saccharofermentans* sp. nov., *Petrimonas mucosa* sp. nov. and *Fermentimonas caenicola* gen. nov., sp. nov., isolated from mesophilic laboratory-scale biogas reactors, and emended description of the genus *Proteiniphilum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 1466-1475.
- Hassa J, Maus I, Off S, Pühler A, Scherer P, Klocke M, Schlüter A (2018): Metagenome, metatranscriptome, and metaproteome approaches unraveled compositions and functional relationships of microbial communities residing in biogas plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 5045-5063.
- Hattori S (2008): Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environment* 23: 118-127.
- Herrmann C, Idler C, Heiermann M (2016): Biogas crops grown in energy crop rotations: Linking chemical composition and methane production characteristics. *Bioresource Technology* 206: 23-35.
- Jabari L, Gannoun H, Cayol J-L, Hedi A, Sakamoto M, Falsen E, Ohkuma M, Hamdi M, Fauque G, Ollivier B, Fardeau M-L (2012): *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Porphyromonadaceae* isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 2522-2527.
- Kim J, Lee C (2016): Response of a continuous anaerobic digester to temperature transitions: A critical range for restructuring the microbial community structure and function. *Water Research* 89: 241-251.
- Klang J, Szewzyk U, Bock D, Theuerl S (2019): Nexus between the microbial diversity level and the stress tolerance within the biogas process. *Anaerobe* 56: 8-16.
- Klang J, Theuerl S, Szewzyk U, Huth M, Tölle R, Klocke M (2015): Dynamic variation of the microbial community structure during the long-time mono-fermentation of maize and sugar beet silage. *Microbial Biotechnology* 8: 764-775.

- Leng L, Yang P, Singh S, Zhuang H, Xu L, Chen W-H, Dolfing J, Li D, Zhang Y, Zeng H, Chu W, Lee P-H (2018): A review on the bioenergetics of anaerobic microbial metabolism close to the thermodynamic limits and its implications for digestion applications. 247: 1095-1106.
- Lim JW, Ge T, Tong YW (2018): Monitoring of microbial communities in anaerobic digestion sludge for biogas optimisation. Waste Management 71: 334–341.
- Limam RD, Chouari R, Mazeas L, Wu TD, Li T, Grossin-Debattista J, Guerquin-Kern JL, Saidi M, Landoulsi A, Sghir A (2014): Members of the uncultured bacterial candidate division WWE1 are implicated in anaerobic digestion of cellulose. Microbiology Open 3: 157-167.
- Manzoor S, Schnürer A, Bongcam-Rudloff E, Müller B (2016): Complete genome sequence of *Methanoculleus bourgensis* strain MAB1, the syntrophic partner of mesophilic acetate-oxidising bacteria (SAOB). Standards in Genomic Sciences 11: 80-89.
- McCune B, Mefford MJ (2011) PC-ORD - Multivariate analysis of ecological data Version 6.08.
- Montag D, Schink B (2016): Biogas process parameters - energetics and kinetics of secondary fermentations in methanogenic biomass degradation. Applied Microbiology and Biotechnology 100: 1019-1026.
- Nelson MC, Morrison M, Zhongtang Y (2011): A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. Bioresource Technology 102: 3730-3739.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. (2018): vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-2.
- Oksanen J, Kindt R, Simpson GL (2017): vegan3d: Static and Dynamic 3D Plots for the 'vegan' Package. R package version 1.1-1.
- Paulo LM, Stams AJM, Sousa DZ (2015): Methanogens, sulphate and heavy metals: a complex system. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 14: 537-553.
- Pelletier E, Kreimeyer A, Bocs S, Rouy Z, Gyapay G, Chouari R, Rivière D, Ganesan A, Daegelen P, Sghir A, Cohen GN, Médigue C, Weissenbach J, Le Paslier D (2008): “Candidatus *Cloacamonas acidaminovorans*”: Genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. Journal of Bacteriology 190: 2572-2579.
- Regueiro L, Carballa M, Lema JM (2014): Outlining microbial community dynamics during temperature drop and subsequent recovery period in anaerobic co-digestion systems. Journal of Biotechnology 192: 179-186.
- Prakash O, Pandey PK, Kulkarni GJ, Mahale KN, Shouche YS (2014): Technicalities and glitches of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). Indian Journal of Microbiology 54: 255-261.
- R Core Team (2018): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria.: R Foundation for Statistical Computing.
- Roden EE, Jin Q (2011): Thermodynamics of microbial growth coupled to metabolism of glucose, ethanol, short-chain organic acids, and hydrogen. Applied and Environmental Microbiology 77: 1907-1909.
- Schink B (1997): Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61: 262-280.

- Schnürer A (2012): Cristal ball – Know thy microorganism – why metagenomics is not enough! *Microbial Biotechnology* 6: 3-16.
- Talbot G, Topp E, Palin MF, Massé DI (2008): Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic reactors. *Water Research* 42:513-537.
- Theuerl S, Klang J, Heiermann M, De Vrieze J (2018): Marker microbiome clusters are determined by operational parameters and specific key taxa combinations in anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 263: 128-135.
- Theuerl S, Klang J Prochnow A (2017): Prozessstörungen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen - Ursachen, Mechanismen und Auswirkungen auf das Biogas-Mikrobiom. In: KTBL-Schrift 512, *Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven*. Hersg. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), Darmstadt. ISBN: 978-3-945088-52-4.
- Theuerl S, Klang J, Prochnow A (2019a): Process disturbances in agricultural biogas production – causes, mechanisms and effects on the biogas microbiome: A review. *Energies* 12(3): 365; doi:10.3390/en12030365.
- Theuerl S, Herrmann C, Heiermann M, Grundmann P, Landwehr N, Kreidenweis U, Prochnow A (2019b) The future agricultural biogas plant in Germany: A vision. *Energies* 12(3): 396; <https://doi.org/10.3390/en12030396>
- Theuerl S, Klocke M (2015): Tatort Biogasanlage – mikrobiologische Kriminaltechnik. *Biogas Journal*, Ausgabe 4\_15.
- Ueki A, Akasaka H, Suzuki D, Ueki K (2006): *Paludibacter propionicigenes* gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 39-44.
- Vanwonterghem I, Jensen PD, Ho DP, Batstone DJ, Tyson GW (2014): Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 55-64.
- Weiland P (2010): Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 849-860
- Westerholm M, Isaksson S, Karlsson Lindsjö O, Schnürer A (2018): Microbial community adaptability to altered temperature conditions determines the potential for process optimisation in biogas production. *Applied Energy* 226: 838-848.
- Westerholm M, Moestedt J, Schnürer A (2016): Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance. *Applied Energy* 179: 124-135.
- Zhang L, Loh K-C, Lim JW, Zhang J (2019): Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 100: 110–126.