

# Metaproteomanalyse methanogener Mikrobiome aus Anreicherungskulturen im Labormaßstab

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

## **Doktoringenieur**

**(Dr.-Ing.)**

von Dipl.-Ing. Fabian Kohrs

geb. am 19. März 1985 in Celle

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Promotionskolloquium:	Prof. Dr.-Ing. Kai Sundmacher	(Vorsitz)
	Prof. Dr.-Ing. Udo Reichl	(Gutachter)
	Prof. Dr. Jana Seifert	(Gutachterin)
	Prof. Dr. Christiana Cordes	(Gutachterin)
	Dr. rer. nat. Dirk Benndorf	(Mitglied)

eingereicht am: 01. April 2021

Promotionskolloquium am: 30. September 2021

## Zusammenfassung und Abstract

Die Funktionsträger des anaeroben Abbaus von Biomasse in Biogasanlagen (BGA) sind komplexe mikrobielle Gemeinschaften, sogenannte Mikrobiome, deren umfassende Analyse auf strukturellem und funktionellem Niveau herausfordernd ist. Unter Laborbedingungen angereicherte Mikrobiome sind weniger komplex. Die geringere Anzahl an Organismen erleichtert die Analyse mittels moderner, massenspektrometrischer Methoden der Metaproteomanalytik. Basierend auf der Metaproteomanalyse lassen sich grundlegende Funktionen der reduzierten Mikrobiome sowie die entsprechenden stöchiometrischen Netzwerkmodelle ableiten und mittels experimenteller Daten validieren.

Im Rahmen einer ersten Reaktorstudie wurden sechs parallele Laborreaktoren (R1-R6) mit Schlamm aus einer industriellen BGA inokuliert und mit synthetischem Medium kultiviert, um die Entwicklung angereicherter Mikrobiome unter definierten Laborbedingungen zu erreichen. Während der ersten drei Monate verhielten sich alle Reaktoren bezüglich Biogas-Bildungsraten, Methanausbeuten, pH-Werten und der Konzentrationen flüchtiger organischer Säuren (FOS) sehr ähnlich. Nach Erhöhung der Prozesstemperaturen (R3, R4) und der Stickstofffracht im Medium (R5, R6) zeigten sich deutliche Auswirkungen auf die Prozesse. Nach vorübergehender Akkumulation von Acetat und Propionat in R3 und R4 (von  $<5$  mM auf 10-20 mM) sank die FOS-Konzentration in R4 nach wenigen Wochen wieder auf das Ausgangsniveau, während diese in R3 erhöht blieb und in einem deutlich niedrigeren pH-Wert resultierte (pH 6,5-6,9). R5 und R6 zeigten erhöhte Ammoniakkonzentrationen ( $>1$  gNH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>), pH-Werte (pH 7,5-8,0), Acetatkonzentrationen ( $>10$  mM) und sinkende Biogas-Bildungsraten. Obwohl die Prozessparameter der biologischen Replikate sehr ähnlich waren, zeigten die Metaproteomanalysen und die Analysen terminaler Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen deutliche Unterschiede der strukturellen und funktionellen Zusammensetzungen der jeweiligen Mikrobiome. Trotz definierter Laborbedingungen stellten sich offenbar multiple stabile Gleichgewichtszustände ein, ohne dass die Biogasproduktion beeinträchtigt wurde. Diese multiplen stabilen Gleichgewichtszustände sind vermutlich ein Grund, warum Mikrobiome landwirtschaftlicher BGA trotz ähnlicher Prozessbedingungen variieren.

Während einer zweiten Studie wurden zwei kontinuierlich betriebene 1,5 L Laborreaktoren genutzt, um durch die anaerobe Umwandlung von Ethanol zu Methan (CH<sub>4</sub>) und Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) weniger komplexe Mikrobiome bei verschiedenen hydraulischen Verweilzeiten von 78,6-24,1 d zu untersuchen. Die Prozessparameter eingestellter Gleichgewichtszustände wurden bestimmt und die Mikrobiome mittels Metaproteomanalyse charakterisiert. Die erzeugten Daten wurden für die Validierung und Verbesserung eines bestehenden stöchiometrischen Netzwerkmodells herangezogen, das aus den Netzwerken repräsentativer Organismen für verschiedene relevante Stoffwechselwege zusammengesetzt wurde. Der vom Modell vorgegebene große Lösungsraum mit verschiedenen Wegen zur Umwandlung von Ethanol zu CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub> konnte mit Hilfe der Metaproteomanalysen deutlich eingeschränkt werden. Die Ethanoloxidation erfolgte ausschließlich über Acetat und Wasserstoff (H<sub>2</sub>), nicht aber über Propionat. Weiterhin wurden keine Hinweise auf Homoacetogenese gefunden. Anstelle der erwarteten *Methanosarcinaceae*-Spezies, welche sowohl acetoklastische als auch hydrogenotrophe Methanogenese betreiben können, wurden *Methanosaetaceae*-Spezies als strikt acetoklastische Methanogene identifiziert, während der entstandene H<sub>2</sub> von strikt hydrogenotrophen Methanogenen verwertet wurde. Die Präsenz von *Methanosaetaceae* wies auf eine erforderliche Erweiterung des Modells um einen entsprechenden Organismus hin. Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse dieser Studie die Notwendigkeit zur Erzeugung geeigneter experimenteller Daten zur Validierung mathematischer Modelle. Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, dass Metaproteomdaten nicht nur für die Analyse der Biomassezusammensetzung geeignet sind, sondern auch wertvolle Impulse für die Verbesserung und Erweiterung mathematischer Netzwerkmodelle mikrobieller Gemeinschaften liefern.

Anaerobic digestion (AD) of agricultural biomass in biogas plants (BGP) is carried out by complex microbial communities - so called microbiomes. Due to their taxonomic complexity, comprehensive structural and functional analyses of these microbiomes are challenging. Microbiomes enriched under laboratory conditions are fully functional in terms of AD, but less complex, facilitating analyses using mass spectrometry based metaproteomics approaches. Metaproteomics analyses these microbiomes allowing evaluation of basic metabolic functions and supports construction as well as validation of stoichiometric network models using experimental data.

In a first study, six laboratory-scale BGP (R1-R6) were inoculated with sludge from an agricultural-scale BGP and operated in parallel by feeding synthetic medium in order to adapt microbiomes to defined laboratory conditions. Biogas formation rates, methane yields, pH values, and concentrations of volatile fatty acids (VFA) were similar during the first three months of cultivation. Switching to higher process temperatures (R3, R4) and higher nitrogen loads in the medium (R5, R6), resulted in significant changes of respective processes. Both R3 and R4 accumulated acetate and propionate (<5 mM to 10-20 mM). This led to a low pH of 6.5-6.9 in R3, whereas R4 slowly recovered to initial VFA concentrations. R5 and R6 showed increased ammonia concentrations (>1 gNH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) and pH values (pH 7.5-8.0), acetate concentrations of >10 mM as well as decreasing biogas productions. Although process parameters between biological replicates were similar, analyses of metaproteomes and terminal restriction fragment length polymorphisms revealed strong differences in respective structural and functional aspects. Even though BGPs were operated under defined laboratory conditions, multiple steady states in community compositions developed without impairing biogas production. Eventually, these multiple steady states might also explain variations in microbiomes derived from agricultural BGPs operated under similar process conditions.

In a second study, further enrichment was carried out in two 1.5 L continuously stirred tank reactors in order to investigate less complex microbiomes converting ethanol anaerobically into CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> at different hydraulic retention times ranging from 24.1 d to 78.6 d. Steady-state process parameters were determined and respective microbiomes characterized by metaproteomics analyses. Derived data were used to extend and validate an established stoichiometric network model that was assembled from selected microorganisms, each representing certain metabolic pathways involved in methane formation. By confirming the presence of specific pathways, the space of potential solutions allowed by the model for the conversion of ethanol to methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) was highly constrained. Oxidation of ethanol was solely observed using acetate and hydrogen (H<sub>2</sub>), but not using propionate. Furthermore, no evidence for homoacetogenic activity was found. Instead of *Methanosarcinaceae* species capable of performing both acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenesis, strict acetoclastic *Methanosaetaceae* species were identified. Produced H<sub>2</sub> was exclusively consumed by strict hydrogenotrophic methanogens. Identification of *Methanosaetaceae* in these microbiomes demands an extension of the current model community.

Altogether, results of this study underline the necessity to apply experimental data for validation of community models. Firstly, in addition to analysing community compositions, metaproteomics has been proven to contribute for validation or even extension of community models of microbial communities.

## Inhaltverzeichnis

Inhaltverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Symbolverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	1
2. Theoretische Grundlagen .....	3
2.1. Prozesse in Biogasanlagen .....	3
2.2. Mikrobieller Abbau von Biomasse.....	5
2.2.1. Hydrolyse .....	7
2.2.2. Gärung .....	7
2.2.3. Acetogenese .....	9
2.2.4. Methanogenese .....	11
2.3. Metaproteomanalytik zur Untersuchung von Mikrobiomen .....	12
2.4. <i>Proteotyping</i> als Auswertestrategie für komplexe Metaproteomik-Datensätze .....	18
2.5. Grundlagen metabolischer Netzwerkmodelle .....	19
2.6. <i>Transient-state</i> Kultivierungen .....	22
3. Material und Methoden .....	26
3.1. Anreicherung methanproduzierender Mikrobiome auf Medium mit Zellulose und Glukose .....	26
3.1.1. Kultivierung Sixfors Multi-Bioreaktorsystem .....	26
3.1.2. Probenherkunft und Inokulation .....	27
3.1.3. Medium mit Zellulose und Glukose .....	27
3.1.4. Quasi-kontinuierliche Prozessführung.....	28
3.1.5. Zufütterung und Beprobung .....	29
3.2. Anreicherung methanproduzierender Mikrobiome auf Medium mit Ethanol .....	29
3.2.1. Bioflo 320 Bioreaktorsystem.....	29
3.2.2. Inokulation .....	30
3.2.3. Ethanolmedium.....	31
3.2.4. <i>Transient-state</i> Prozessführung.....	31
3.2.5. Beprobung .....	31
3.2.6. Ethanolbestimmung.....	32
3.2.7. Biomassekonzentration .....	33
3.3. Gasanalyzesystem „GärOnA“ .....	34
3.4. Bestimmung von Ammonium und organischen Säuren .....	35

3.5.	Genetische Fingerabdrücke der Anreicherungskulturen mittels T-RFLP .....	36
3.5.1.	Probenaufschluss und DNA-Extraktion .....	37
3.5.2.	DNA-Amplifikation und Quantifizierung .....	37
3.5.3.	Visualisierung und Restriktionsverdau .....	38
3.5.4.	Kapillar-Gelelektrophorese und Datenauswertung mittels glyXtool .....	39
3.6.	Metaproteomik .....	40
3.6.1.	Probenvorbereitung und Proteinseparation .....	41
3.6.2.	Massenspektrometrische Proteinidentifikation .....	43
3.6.3.	Bioinformatische Datenauswertung .....	44
4.	Ergebnisse und Diskussion .....	48
4.1.	Dynamik und Stationarität von Mikrobiomen .....	48
4.1.1.	Abiotische Prozessparameter .....	49
4.1.2.	T-RFLP der 16S rRNA Gene .....	56
4.1.3.	Proteinfingerabdruck mittels SDS-PAGE .....	59
4.1.4.	<i>Proteotyping</i> und reaktorspezifische Metaproteine .....	60
4.1.5.	Funktionale Stabilität vs. strukturelle Stabilität von Mikrobiomen .....	69
4.2.	Kultivierung und Analyse biogasproduzierender Mikrobiome zur Etablierung und Validierung mathematischer Modelle .....	74
4.2.1.	Prozessverlauf der Anreicherungskulturen .....	74
4.2.2.	Kultivierungsparameter .....	76
4.2.3.	Metaproteomanalyse .....	90
4.2.4.	Abbildung biotischer und abiotischer Daten im metabolischen Modell .....	98
5.	Zusammenfassung .....	104
6.	Ausblick .....	106
	Literaturverzeichnis .....	108
	Anhang .....	A
	Verwendete Standard-Arbeitsanweisungen .....	J

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phasen des anaeroben Abbaus von Biomasse.....	6
Abbildung 2: Allgemeiner Ablauf einer Metaproteomanalyse. ....	14
Abbildung 3: Skizze der Metabolite und Stoffwechselprozesse einer definierten Modellkultur.....	22
Abbildung 4: Schema der Biomasse- und Substratkonzentrationen im kontinuierlichen Prozess. ....	23
Abbildung 5: Auslegungsparameter für die <i>transient-state</i> Kultivierung. ....	25
Abbildung 6: Kultivierungstemperaturen und Mengen der Stickstoffquelle im Kulturmedium über den Versuchszeitraum.....	28
Abbildung 7: Suchmaschinen-Grundeinstellungen für X!Tandem und OMSSA des MetaProteomeAnalyzers. ...	46
Abbildung 8: Analyseplan des Inokulums und der Anreicherungskulturen R1-R6.....	49
Abbildung 9: Abiotische Prozessdaten der mesophilen Regime R1 und R2. ....	51
Abbildung 10: Abiotische Prozessdaten der thermophilen Regime R3 und R4. ....	52
Abbildung 11: Abiotische Prozessdaten der Hochstickstoff-Regime R5 und R6. ....	53
Abbildung 12: Archaeelle T-RF aus Inokulum und den Reaktoren R1-R6 an den Tagen 93 und 261 der Kultivierung. ....	57
Abbildung 13: Bakterielle T-RF aus Inokulum und den Reaktoren R1-R6 an den Tagen 93 und 261 der Kultivierung. ....	58
Abbildung 14: SDS-PAGE von Proteinextrakten des Inokulums und der Reaktoren R1-R6 an den Tagen 93 und 261. ....	60
Abbildung 15: Hierarchisches Clustern von UniRef50-Metaproteinen des Inokulums und der Reaktoren R1-R6. .....	61
Abbildung 16: Boxplots identifizierter taxonomischer Ordnungen im Inokulum und in R1-R6 nach 93 d Kultivierung. ....	63
Abbildung 17: Hauptkomponenten-Analyse der in R1-R6 identifizierten biologischen Prozesse. ....	64
Abbildung 18: Modell eines taxonomischen und funktionalen <i>Core</i> Mikrobioms des Biogasprozesses. ....	72
Abbildung 19: Biogas-Bildungsraten und Gaszusammensetzungen der Gleichgewichtszustände. ....	77
Abbildung 20: Verlauf der pH-Werte von Unit 1 und Unit 2 über die Kultivierungsdauer. ....	78
Abbildung 21: Konzentrationen organischer Säureanionen in Unit 1 und 2.....	79
Abbildung 22: Biomassekonzentrationen im Prozessverlauf von Unit 1 und 2. ....	81
Abbildung 23: Verhältnisse gemessener zu theoretischer Gasbildungsraten aller HRT in Unit 1 und Unit 2.....	82
Abbildung 24: Schaumbildung nach Versäuerung in Unit 1.....	86
Abbildung 25: Experimentelle Bestimmung des Erhaltungskoeffizienten. ....	87
Abbildung 26: Biomasse- und Substratkonzentrationen im kontinuierlichen Prozess mit Berücksichtigung des Erhaltungsstoffwechsels. ....	88
Abbildung 27: Experimentelle Bestimmung des mittleren Erhaltungskoeffizienten von Mischkulturen. ....	89
Abbildung 28: SDS-PAGE von Proteinextrakten des Inokulums und aller HRT von Unit 1 und Unit 2.....	90

Abbildung 29: Taxonomische Zusammensetzung der Metaproteome von Unit 1 und Unit 2 auf Ebene der Domäne.....	92
Abbildung 30: Taxonomische Zusammensetzung der Metaproteome von Unit 1 und Unit 2 auf Ordnungsebene. ....	93
Abbildung 31: KEGG-Stoffwechselkarte 00640 mit Enzymen und Metaboliten der Propionatgärung.....	95
Abbildung 32: KEGG-Stoffwechselkarte 00720 mit beteiligten Enzymen und Metaboliten.....	96
Abbildung 33: Ausschnitt der KEGG-Stoffwechselkarte 00680 mit beteiligten Enzymen und Metaboliten.....	97
Abbildung 34: Biomassezusammensetzungen des stöchiometrischen Netzwerkmodells für $D=0,001 \text{ h}^{-1}$ .....	100
Abbildung 35: Skizze der definierten Modellkultur vor und nach Berücksichtigung der Metaproteomdaten...	102
Abbildung 36: Biogasausbeute für R1-R6.....	F
Abbildung 37: Verlauf der Konzentrationen von Laktat, Formiat und Butyrat in R1-R6 über die Prozesszeit.....	G
Abbildung 38: Boxplots identifizierter taxonomischer Ordnungen in R1-R6 nach 261 d Kultivierung. ....	H
Abbildung 39: Ethanolkonzentrationen erreichter Gleichgewichtszustände in Unit 1 und 2.....	I

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Notwendige Gesamtversuchsdauer bei klassischer kontinuierlicher Prozessführung. ....	24
Tabelle 2: Bestimmte Förderraten und resultierende hydraulische Verweilzeiten. ....	75
Tabelle 3: Spezifische Raten und Ausbeuten der Anreicherung in Unit 1 sowie der simulierten Modellkultur... ..	99
Tabelle 4: Spezifische Raten und Ausbeuten der Anreicherung in Unit 2 sowie der simulierten Modellkultur... ..	99
Tabelle 5: Prozesskenngrößen der BGA bei Magdeburg (Stand 24.02.2015). ....	A
Tabelle 6: Futtermittelzusammensetzung der BGA bei Magdeburg (Stand 24.02.2015). ....	A
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Stocklösungen zur Herstellung des Kultivierungsmediums. ....	B
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien zur Herstellung der Spurenelementlösung. ....	C
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien zur Herstellung der Vitaminlösung. ....	C
Tabelle 10: Medien- und Fütterungscharakteristika nach Kultivierungsabschnitt und Prozessregime. ....	D
Tabelle 11: Pipettierschemata und PCR-Programm für die T-RFLP-Analyse. ....	D
Tabelle 12: Ammonium- und Ammoniakkonzentrationen der Reaktoren R1-R6. ....	E
Tabelle 13: Verwendete Datenbanken für die Proteinidentifikation. ....	E
Tabelle 14: Liste der verwendeten Standard-Arbeitsanweisungen. ....	J

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
16S rRNA	rRNA der 16 Svedberg-Einheit (Ribosom)
ACDS-Komplex	Acetyl-Coenzym-A Decarboxylase/Synthase-Komplex
ACN	Acetonitril
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. woodii</i>	<i>Acetobacterium woodii</i> , auch AW
BGA	Biogasanlage(n)
BLAST	<i>engl.: basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Elementsymbol Kohlenstoff
<sup>13</sup> C	Isotop des Kohlenstoffatoms
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O	Acetaldehyd
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Ethanol
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> COO <sup>-</sup>	Propionat
C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Laktat
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> COO <sup>-</sup>	Butyrat
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glukose
C <sub>18</sub>	Kohlenwasserstoffverbindung mit 18 Kohlenstoffatomen
ca.	circa
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	Acetat
CH <sub>3</sub> COOH	Essigsäure
CH <sub>4</sub>	Methan
CID	<i>engl.: collision-induced dissociation</i> , kollisionsinduzierte Dissoziation
CGE	<i>engl.: capillary gel electrophoresis</i> , Kapillar-Gelelektrophorese
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
.CSV	Dateiformat <i>comma separated values</i>
<i>C. thermocellum</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>
DNA	<i>engl.: deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäuren
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>D. vulgaris</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> auch DV
EC-Nummer	<i>engl.: Enzyme Commission number</i> , numerisches Klassifikationssystem für Enzyme
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>engl.</i>	englisch
ESI	<i>engl.: electrospray ionization</i> , Elektrospray-Ionisierung
et al.	lateinisch: und andere
e-value	<i>engl.: expect value</i> , Erwartungswert, BLAST-Parameter
f	<i>engl.: forward</i> , vorwärts (hier: Vorwärtsprimer)
FA	<i>engl.: Formic acid</i> , Ameisensäure
FASP	<i>engl.: filter aided sample preparation</i> , filtergestützte Probenaufbereitung

## Abkürzungsverzeichnis

FDR	<i>engl.: false discovery rate</i> , Falschpositiv-Rate
Fe(III)	Eisen mit Oxidationsstufe drei in chemischer Verbindung
FOS	Flüchtige organische Säuren
GärOnA	Gärtestsystem mit Online-Gasanalytik
GC	Gaschromatograph, Gaschromatographie
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H	Elementsymbol für Wasserstoff
H <sup>+</sup>	Protonen, Wasserstoff-Ionen
H <sub>2</sub>	Wasserstoffmolekül
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
HAc <sub>eq</sub>	Essigsäure-Äquivalente
HF	Hauptfermenter
HPLC	<i>engl.: high pressure liquid chromatographie</i> , Hochdruck-Flüssigchromatographie
HRT	<i>engl.: hydraulic retention time(s)</i> , hydraulische Retentionszeit(en)
Ino	Probenbezeichnung für das Inokulum
KEGG	<i>engl.: Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LC	<i>engl.: liquid chromatography</i> , Flüssigchromatographie
LCA	<i>engl.: lowest common ancestor</i> , letzter gemeinsamer Vorfahre
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung
LIF	<i>engl.: laser induced fluorescence</i> , laserinduzierte Fluoreszenz
mM	millimolar
M	molar
MALDI-ToF	<i>engl.: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i> , matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse
<i>M. barkeri</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i> , auch MB
.MGF	Dateiformat <i>mascot generic format</i>
<i>M. maripaludis</i>	<i>Methanococcus maripaludis</i> auch MM
Mn(VI)	Mangan mit Oxidationsstufe vier in chemischer Verbindung
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer, auch MS <sup>1</sup>
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie/-Massenspektrometer, auch MS <sup>2</sup>
N	Elementsymbol für Stickstoff, hier auch: Art der Stickstoffverbindung
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NG	Nachgärer
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium-Ion
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	Ammoniumstickstoff
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis, auch m z <sup>-1</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat-Ion
O	Elementsymbol für Sauerstoff
O <sub>2</sub>	Sauerstoffmolekül
OMSSA	<i>engl.: Open Mass Spectrometry Search Algorithm</i> , öffentlicher MS-Suchalgorithmus
oTS	organische Trockensubstanz
Ox	Oxidierte Form
P	Elementsymbol für Stickstoff
P <sub>i</sub>	Phosphorylgruppe
PCR	<i>engl.: polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
<i>P. freudenreichii</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> , auch PF
<i>P. propionicus</i>	<i>Pelobacter propionicus</i>

## Abkürzungsverzeichnis

r	<i>engl.: reverse</i> , rückwärts (hier: Rückwärtsprimer)
R1, ..., R6	Reaktor 1, ..., Reaktor 6 (Sixfors-System)
Red	Reduzierte Form
rRNA	Ribosomale RNA
RNA	<i>engl.: ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäuren
RT	Raumtemperatur (hier: 21°C)
RV	Reaktorvolumen
S	Elementsymbol für Schwefel
SAO	Syntrophe Acetatoxidation
<i>S. avermitilis</i>	<i>Streptomyces avermitilis</i>
SDS-PAGE	<i>engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>S. fumaroxidans</i>	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> , auch SF
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfat-Ion
SpC	<i>engl.: spectral count</i> , Anzahl identifizierter Spektren
STD	Standard
TFA	<i>engl.: trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
TFE	<i>engl.: Trifluoroethanol</i> , Trifluorethanol
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8
ToF	<i>engl.: time-of-flight</i> , Flugzeitanalyse, Flugzeitanalysator
TPE	Puffer aus Tris, ortho-Phosphorsäure und EDTA
T-RF	Terminales Restriktionsfragment
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
TS	Trockensubstanz
U1, U2	<i>engl.: Unit 1, Unit 2</i> , Reaktoreinheit 1, Reaktoreinheit 2 (BioFlo 320-System)
u.a.	unter anderem
UniProtKB	<i>engl.: universal protein knowledge base</i> , universelle Protein-Informationsdatenbank
UniRef	<i>engl.: UniProt reference clusters</i> , UniProt Referenzcluster
USA	<i>engl.: United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
VDI	Verband deutscher Ingenieure
VE	vollentsalzt
vgl.	vergleiche
vs.	versus
VS	Probe der Versäuerung aus Unit 1 (U1)
z.B.	zum Beispiel

## Symbolverzeichnis

Symbole	
A (A1, A2)	Absorption (zum Zeitpunkt 1, 2) [-]
$\Delta A$	Absorptionsänderung (Differenz von A1 und A2) [-]
bp	Basenpaare [-]
c	Stoffmengenkonzentration [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
d	Schichtdicke einer Messküvette [cm]
D	Verdünnungsrate [ $\text{d}^{-1}$ ]
dD	Intervallgröße der Verdünnungsrate [ $\text{d}^{-1}$ ]
dt	Zeitintervall [d]
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient [ $\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]
e-value	<i>engl.: expect value</i> , BLAST-Parameter [-]
FDR	<i>engl.: false discovery rate</i> , Falschpositiv-Rate [%]
FOS	Massenkonzentration flüchtiger organischer Säuren [ $\text{g HAC}_{\text{eq}} \text{L}^{-1}$ ]
FOS/TAC	Verhältnis FOS zu TAC [-]
HRT	<i>engl.: hydraulic retention time(s)</i> , hydraulische Retentionszeit(en) [d]
$\text{HAC}_{\text{eq}}$	Massenkonzentration an Essigsäure-Äquivalenten [ $\text{g HAC}_{\text{eq}} \text{L}^{-1}$ ]
$m_1$	Masse Petrischale vor Zugabe der Biomassesuspension [g]
$m_2$	Masse Petrischale nach Zugabe der Biomassesuspension und Trockung [g]
$m_{\text{Medium}}$	Trockenmasse des Mediums [g]
M	Molare Masse bzw. Molmasse [ $\text{g mol}^{-1}$ ]
oTS	organische Trockensubstanz [ $\text{g L}^{-1}$ ]
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration [-]
$\text{pK}_s$	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante [-]
$R^2$	Bestimmtheitsmaß für lineare Regressionen [-]
t	Zeit, Prozesszeit [d]
T	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]
TAC	Totale anorganische Carbonat-Pufferkapazität [ $\text{g CaCO}_3 \text{L}^{-1}$ ]
TS	Trockensubstanz [ $\text{g L}^{-1}$ ]
upm	Umdrehungen pro Minute [ $\text{min}^{-1}$ ]
$\mu$	Spezifische Wachstumsrate [ $\text{d}^{-1}$ ]
$\mu_{\text{max}}$	Maximale spezifische Wachstumsrate [ $\text{d}^{-1}$ ]
v	Volumen der Probe [mL]
V	Volumen des Testansatzes (Ethanolbestimmung) [mL]
$V_F$	Fütterungsvolumen [mL], [L], [ $\text{m}^3$ ]
$V_R$	Reaktorvolumen [mL], [L], [ $\text{m}^3$ ]
X	Biomassekonzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ]
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung [-]

## 1. Einleitung

Die Umwandlung von landwirtschaftlichen Abfällen und von Energiepflanzen in Biogas ist eine Form erneuerbarer Energieerzeugung. Dabei geschieht der sogenannte anaerobe Abbau in großen parallel oder in Reihe geschalteten Reaktoren unterschiedlicher Größen und Geometrien, die allgemein auch als Fermenter bezeichnet werden. Eine grundlegende Klassifizierung von Biogasanlagen (BGA) erfolgt anhand der Prozessführung und -temperatur [1], der Zusammensetzung der verwendeten Substrate [2, 3] und der damit meist korrelierten Fracht an Ammoniumionen ( $\text{NH}_4^+$ ) bzw. Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) [4]. Unabhängig davon wird der anaerobe Abbauprozess in vier Stufen [3] unterteilt: Hydrolyse, Acetogenese, Acidogenese und Methanogenese. Diese Stufen werden jeweils von verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen durchgeführt, die zusammen eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft bilden – das Mikrobiom [5].

Laborskalige BGA mit einem Arbeitsvolumen von wenigen hundert Millilitern bis mehrere Liter werden häufig als maßstabsverkleinerte Modelle [6-8] zur Untersuchung des anaeroben Abbaus verwendet. Anlagen im Labormaßstab eignen sich gut für wissenschaftliche Untersuchungen, da sie einen vollständigen Zugriff auf Kultivierungsparameter ermöglichen. Weiterhin können Prozessänderungen oder Störungen gezielt und ohne die Gefahr von wirtschaftlichen Verlusten durch Produktionsausfall gesetzt werden. Zudem sind die eingesetzten Substrate definiert und das kontinuierliche Rühren erlaubt eine homogene Biomasse sowie repräsentative Beprobungen. Im Gegensatz dazu bilden sich in Industrieanlagen aufgrund der nur gelegentlichen Rührphasen zeitweise Totzonen [3] oder Schwimmschichten [9] und das Substrat kann in Abhängigkeit der Produktionschargen stark variieren [10]. Die unter Laborbedingungen angereicherten Mikrobiome zeigen im Vergleich zu Gemeinschaften aus Industrieanlagen eine reduzierte Komplexität [11], was die Analyse deutlich vereinfacht.

Für die Erforschung von Mikrobiomen in BGA wurde eine Vielzahl verschiedener Analysemethoden etabliert. Molekularbiologische Methoden erlauben die Untersuchung der Diversität von Archaeen und Bakterien, dazu zählen u.a. die Klonierung und Sequenzierung mikrobieller Desoxyribonukleinsäuren (DNA) [12] sowie die Analyse von 16S rRNA-Genen als Fingerabdruck-Methode (Analyse terminaler Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen,

T-RFLP [13]). Die Metaproteomanalyse [14] als komplementäre Anwendung zeichnet sich dadurch aus, dass sie zusätzlich Einblick in die Funktion bzw. den physiologischen Zustand eines Mikrobioms erlaubt. Moderne Techniken der Metaproteomanalyse basieren auf gelfreien Ansätzen [15], deren Erfolg auf den jüngsten Fortschritten im Bereich hochauflösender Massenspektrometer (MS) und leistungsfähiger Software für die Datenauswertung beruhen [16]. Daneben werden auch verstärkt theoretische Methoden zur Modellbildung angewandt, um Mikrobiome und ihre Funktionen zu analysieren [17-19]. Mathematische Modelle sollen durch Simulationen einerseits zum Systemverständnis beitragen und andererseits den experimentellen Aufwand für Laborversuche reduzieren. Herausforderungen dabei sind die große Zahl beteiligter Organismen und Metabolite sowie die komplexen Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Organismen. Die resultierenden Netzwerkmodelle sind umfangreich und aufgrund mangelnden Detailwissens über die Biomasse oder metabolische Vorgänge in Stoffwechselwegen ergeben sich große Lösungsräume [20-22]. Die Validierung von Modellen durch den Vergleich von Simulationen mit experimentellen Ergebnissen ist ein essenzieller Schritt bei der Verbesserung der Modelle basierend auf Ergebnissen aus molekularbiologischen oder proteinanalytischen Analysen.

Die Kultivierung von Anreicherungskulturen zur Produktion von Biogas erlaubt im Vergleich zu realen BGP eine höhere Reproduzierbarkeit der Prozessbedingungen bei einer gleichzeitigen Verringerung der Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaften. Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei Studien durchgeführt werden. In der ersten Studie war das Ziel, Markerorganismen und Markerproteinen für mesophile und thermophile Prozesse sowie für Prozesse mit einem hohen Stickstoffgehalt zu identifizieren (Abschnitt 4.1). In der zweiten Studie sollten Prognosen eines stöchiometrischen Netzwerkmodells geprüft und mit Hilfe von Metaproteomdaten der Lösungsraum eingeschränkt werden (Abschnitt 4.2) [23].

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Prozesse in Biogasanlagen

Die Bundesrepublik Deutschland hatte sich das Ziel gesetzt, die Treibhausgas-Emissionen bis 2020 um mindestens 40% im Vergleich zu 1990 zu reduzieren [24]. Dies sollte einerseits durch die Reduktion des Einsatzes fossiler Energieträger für die Stromerzeugung geschehen. Andererseits war die Steigerung des Anteils erneuerbarer Energien am bundesweiten Bruttoendenergieverbrauch (erzeugte und importierte Gesamtenergiemengen abzüglich exportierter Energiemenge) auf 18%, bis 2050 auf sogar 60%, angestrebt. Derzeit beziffert sich der Beitrag aus Photovoltaik, Biomasse sowie Wind- und Wasserkraft auf 12,6% [25], wobei die erneuerbaren Energien bereits über 30% im Bereich der nationalen Stromerzeugung einnehmen [26]. An dieser erbrachten Energiemenge hat der Biogassektor mit 17,2% einen nicht unerheblichen Anteil [27]. Insgesamt versorgen die mehr als 9.200 Anlagen rund 9 Millionen Haushalte mit Strom.

Die kontrollierte Bildung von Biogas, einem Gasgemisch von ungefähr gleichen Anteilen an Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Methan ( $\text{CH}_4$ ), durch den anaeroben Abbau von Biomasse findet in BGA statt. Auch wenn Geometrie und Größe deutlich zwischen Anlagen variieren können [28], handelt es sich überwiegend um zylindrische Reaktorkessel mit mehreren  $1.000 \text{ m}^3$  Arbeitsvolumen [29], von denen meist zwei Reaktoren in Reihe als Hauptfermenter und Nachgärer betrieben werden. Je nach Auslegung und Prozessführung können Anlagen auch parallel beschickt oder mit Rezirkulation betrieben werden. Die Substratgabe erfolgt quasi-kontinuierlich, indem regelmäßig mehrmals am Tag kleinere Mengen in den Hauptfermenter gegeben und mit Hilfe von mechanischen, hydraulischen oder pneumatischen Rührwerken im Reaktor verteilt werden [3]. Die Volumenkonstanz wird realisiert, indem Material aus dem Hauptfermenter in den Nachgärer gepumpt wird. Dieser wird mit einer deutlich höheren hydraulischen Retentionszeiten (*engl.: hydraulic retention times*, HRT) betrieben, um auch Restmengen an  $\text{CH}_4$  aufzufangen und die Biogasausbeute zu verbessern. Die HRT eines (quasi-)kontinuierlichen Prozesses wird nach Formel 1 anhand des Reaktorvolumens  $V_R$  sowie dem Fütterungsvolumen  $V_F$  pro Zeiteinheit  $t$  bestimmt und wird üblicherweise in Tagen

angegeben. In der Bioprozesstechnik erfolgt für die Angabe der HRT kontinuierlicher Prozesse häufig auch als Verdünnungsrate  $D$ , also der Reziproken HRT.

$$\text{HRT} = \frac{1}{D} = \frac{V_R}{\left(\frac{V_F}{t}\right)}$$

Formel 1

Ausgefaulter Schlamm wird in einem Gärrestlager gesammelt und als landwirtschaftlicher Dünger eingesetzt. Das gebildete Biogas wird im Kopfbereich des Reaktorkessels, der von einem gasdichten Tragluftdach nach oben abgeschlossen ist, gesammelt. Anschließend erfolgt die Verstromung durch Verbrennung in sogenannten Blockheiz-Kraftwerken oder die Aufbereitung des Biogases auf Erdgasqualität. Bei letzterem wird das Gas einer Gaswäsche unterzogen, wobei durch die Abscheidung von  $\text{CO}_2$  die Erhöhung des Methananteils auf über 95% erreicht wird. Das zu Biomethan veredelte Gas ist dann zur Einspeisung in das Erdgasnetz oder die Verwendung als Kraftstoff für Verbrennungsmotoren geeignet (z.B. in Erdgasautos [3]). Die bei einer Verbrennung des Biogases in Blockheiz-Kraftwerken oder Gasturbinen [30] freiwerdende Wärme ermöglicht weitere interessante Energienutzungen, beispielweise die Deckung des Eigenwärmebedarfs. Alternativ könnte eine einzige BGA im Jahresmittel über Fernwärmeleitungen schätzungsweise 170 Haushalte versorgen [27].

Ein wichtiger Einflussfaktor auf den qualitativen und quantitativen Gasertrag einer BGA ist das verwendete Substrat. Hier wird prinzipiell unterschieden zwischen Anlagen, die ausschließlich nachwachsende Rohstoffe (kurz Nawaro), wie Silagen aus Energiepflanzen oder Ernteresten, verwenden und Anlagen, die zusätzlich Abfälle aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung einsetzen. Die Wahl der Substrate hängt einerseits von der regionalen und jahreszeitlichen Verfügbarkeit, Preisentwicklungen und der bisherigen Prozessführung der BGA ab. Auch wenn sich prinzipiell jede Form der Biomasse anaerob abbauen lässt, haben die verschiedenen Substrate unterschiedliche Prozessanforderung und beeinflussen Gasbildung sowie abiotische Prozessparameter [31]. Fette liefern eine verhältnismäßig hohe Biogausausbeute, benötigen aber eine lange Prozesszeit, wohingegen proteinreiche Abfälle in kurzer Zeit abgebaut werden, dafür aber weniger Gas freisetzen und zusätzlich  $\text{NH}_4^+$  anreichern können [32]. Dieses gilt als besonders prozessrelevant, da es im chemischen Gleichgewicht mit dem zelltoxischen Ammoniak steht [33]. Formel 2 gibt die Berechnungs-Grundlage zur Bestimmung von freiem

NH<sub>3</sub> aus gemessenem NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, pH-Wert, T, pK<sub>s</sub>-Wert (Formel 3) und den Molmassen M<sub>NH<sub>3</sub></sub>= 17,03 g mol<sup>-1</sup> und M<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>= 18,04 g mol<sup>-1</sup> nach Hobiger [34] an.

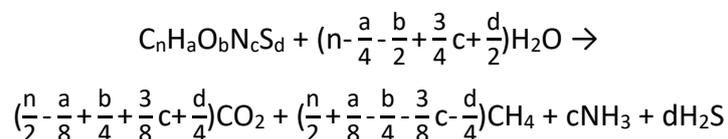
$$\text{NH}_3 = \frac{\text{NH}_4^+}{(1 + 10^{(\text{pK}_s - \text{pH}))}} \times \frac{M_{\text{NH}_3}}{M_{\text{NH}_4^+}}$$

Formel 2

$$\text{mit } \text{pK}_s = 0,0925 + \frac{2728,795}{T + 273,15}$$

Formel 3

Silagen aus Grünpflanzen bieten einen guten Kompromiss aus Abbaubarkeit, Verweilzeit und Verfügbarkeit und bilden daher häufig die Substratbasis. Als Richtwert für eine geeignete Substratzusammensetzung wird das molare Verhältnis der chemischen Elemente Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Phosphor (P) und Schwefel (S) bestimmt. Dieses C:N:P:S-Verhältnis wird für landwirtschaftliche BGA bei ca. 600:15:5:1 gesetzt [3]. Der theoretisch zu erwartende Gasertrag kann qualitativ und quantitativ mit Hilfe der empirischen Formel 4 von Boyle bestimmt werden [35], sofern die chemischen Zusammensetzung der Substrate bekannt ist.



Formel 4

## 2.2. Mikrobieller Abbau von Biomasse

Der Abbau von Biomasse und organischen Verbindungen ist Teil des natürlichen Stoffkreislaufs in jedem bekannten Ökosystem und wird durch komplexe Mikrobiome katalysiert. Diese setzen sich immer aus Organismen verschiedener Taxonomien und metabolischer Funktionen zusammen, die meist nur Teilprozesse der Biomassekonversion realisieren. Unter anaeroben (sauerstofffreien) Bedingungen, wie sie bspw. in Gewässersedimenten [36] oder dem Pansen von Wiederkäuern vorkommen [37], fehlt O<sub>2</sub> als terminaler Elektronenakzeptor, weshalb stattdessen anorganischer Kohlenstoff reduziert wird und CH<sub>4</sub> entsteht. Dieses Phänomen wird in BGA zur Gewinnung von CH<sub>4</sub> technisch umgesetzt.

Der Prozess des mikrobiellen Abbaus von landwirtschaftlichen Abfällen zu Biogas unterteilt sich grundsätzlich in die vier Phasen Hydrolyse, Gärung, Acetogenese und Methanogenese, die sich wiederum in verschiedene Teilprozesse gliedern [38]. An diesen sind unterschiedliche Organismengruppen und verschiedene Pools an Metaboliten beteiligt (Abbildung 1).

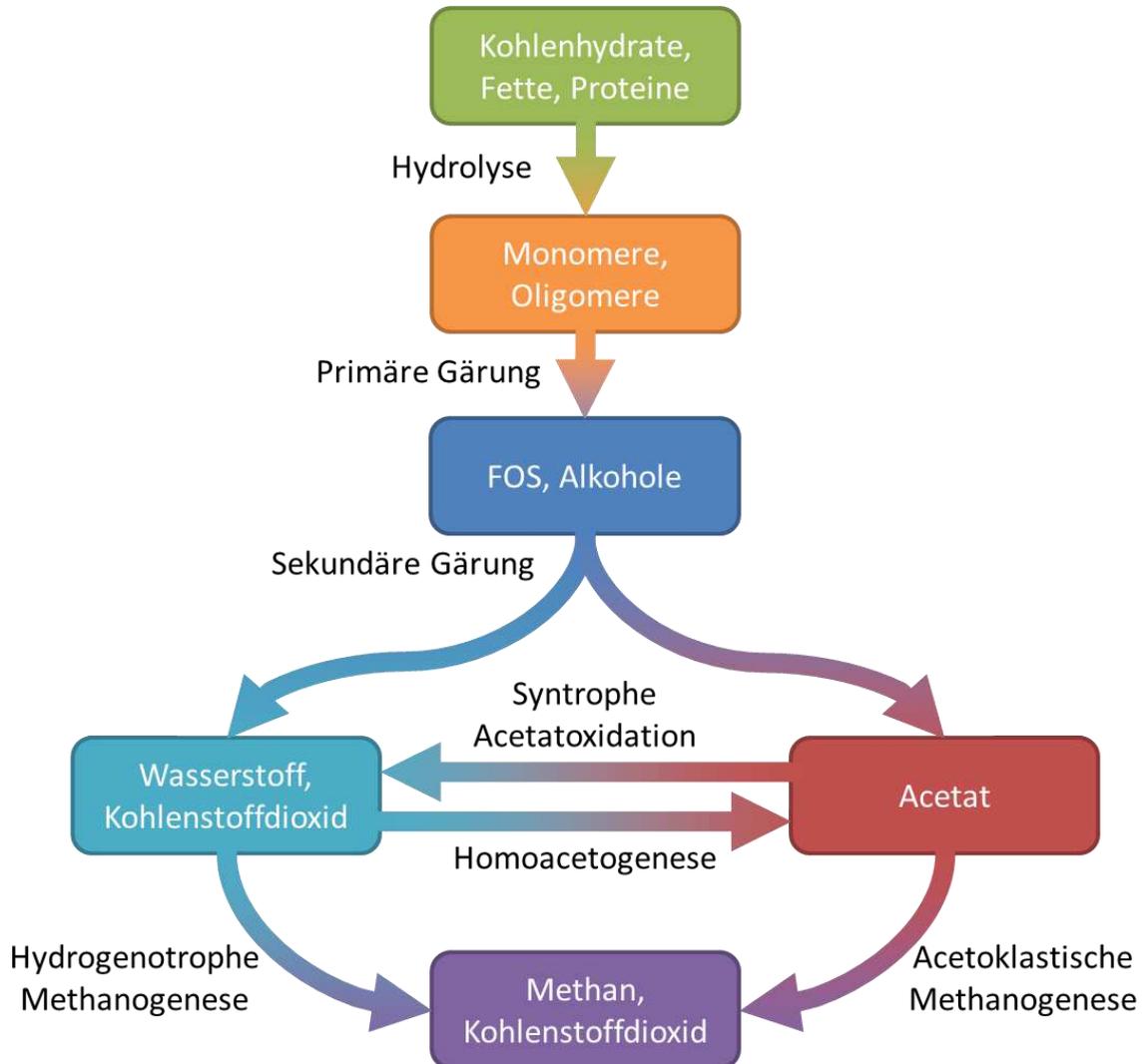


Abbildung 1: Phasen des anaeroben Abbaus von Biomasse. Die von den Mikroorganismen durchgeführten metabolischen Prozesse werden als Pfeile dargestellt, die Pools an Metaboliten als Kästen. FOS: flüchtige organische Säuren.

Die Vielfalt der beteiligten Mikroorganismen sowie ihrer Interaktionen und metabolischen Fähigkeiten erlauben einerseits erst den Abbau dieser komplexen Biomasse. Andererseits besitzt jeder Organismus ein individuelles, synökologisches Optimum bezüglich z.B. der Temperatur, des pH-Werts oder seiner Substrate und Stoffwechsel-Endprodukte. Je nach Schwere der Änderungen von Prozessparametern können einzelne Organismengruppen bzw. Teilprozesse gestört und dadurch sogar der Gesamtprozess zum Erliegen gebracht werden.

### 2.2.1. Hydrolyse

Im ersten Schritt des Abbaus von Biomasse werden die verschiedensten Biopolymere durch hydrolytische Bakterien zu Mono- und Oligomeren verdaut. Dies geschieht durch die Sekretion von hydrolytischen Enzymen, die an die Substrate anhaften. Fette werden durch Lipasen zu langkettigen Fettsäuren zersetzt, Proteine durch Proteinasen zu Aminosäuren, Polysaccharide durch z.B. Zellulasen und Amylasen zu Einfachzuckern und Nukleinsäuren durch Nukleasen zu Nukleotiden (Abbildung 1 [39]).

Die meisten Substrate für BGA enthalten Pflanzenmaterial, das zuvor mechanisch zerkleinert und siliert wurde. Diese faserigen, unlöslichen Materialien bestehen hauptsächlich aus Zellulose, Hemizellulose oder Lignozellulose und sind eine große Herausforderung in der Hydrolyse. Insbesondere erfordern Sie eine hohe HRT, um biologisch abgebaut werden zu können. Neben löslichen hydrolytischen Enzymen nutzen einige Organismen zu diesem Zweck extrazelluläre Superstrukturen, die sie u.a. zur Anheftung an das Substrat befähigen [40]. Dieses sogenannte Zellulosom ist ein Multienzym-Komplex bestehend aus Proteinen für die Strukturierung, Substratadhäsion und den Verdau pflanzlicher Zellwandbestandteile. Bisher wurde es in Vertretern der bakteriellen Ordnungen *Clostridiales* und *Bacteroidales*, sowie einigen anaeroben Pilzen nachgewiesen [41, 42].

Auch wenn in den meisten BGA Hydrolyse und Methanogenese zusammen in einem Hauptfermenter durchgeführt werden (Abschnitt 2.1), ist eine Trennung beider Prozesse durch einen vorgeschalteten Reaktor (Hydrolysestufe) sinnvoll, da sich die pH-Optima von Hydrolyse (pH 5,5-6,5) und Methanogenese (pH 6,8-7,2) unterscheiden [43, 44]. Allerdings stellt die Abstimmung beider Stufen prozesstechnisch eine größere Herausforderung dar. Neben der biologischen Hydrolyse von Zellulose, Hemizellulose und Lignozellulose werden auch chemische Methoden zur Vorbehandlung vorgeschlagen, bspw. mit Säuren, Basen, ionischen oder stark eutektischen Lösungsmitteln [45].

### 2.2.2. Gärung

Obligat und fakultativ anaerob lebende Mikroorganismen gewinnen durch Vergärung der mono- und oligomeren Hydrolyseprodukte Energie. Die Konservierung dieser Energie geschieht dabei durch Bildung von Adenosinriphosphat (ATP) infolge der Übertragung von Phosphatgruppen ( $P_i$ ) von phosphorylierten Intermediaten auf Adenosindiphosphat (Substratkettenphosphorylierung), oder in Form elektrochemischer Gradienten [46]. Generell

wird zwischen primärer und sekundärer Gärung unterschieden. Während der primären Gärung werden, neben  $H_2$  und  $CO_2$ , Alkohole und kurzkettige bzw. flüchtige organische Säuren (FOS: u.a. Acetat, Butyrat und Propionat) gebildet. Bei der sekundären Gärung werden die zuvor gebildeten Alkohole und Säuren weiter zu Acetat,  $H_2$  und  $CO_2$  vergärt (Abbildung 1).

Die Bezeichnung der Gärungswege richtet sich dabei allgemein nach den jeweils gebildeten Gärprodukten. Bei vielen Gärungswegen ist Glukose das Edukt, das nach dem Import in den cytoplasmatischen Raum der Zelle zu Pyruvat verstoffwechselt wird. Die Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg) wird am häufigsten genutzt, seltener auch der Pentosephosphat-Weg und nur bei wenigen Bakterien und Archaeen der Entner-Doudoroff-Weg [47]. Das Bakterium *Zymomonas mobilis* gehört zu den Organismen, die Ethanolgärung (Formel 5) betreiben. Glukose wird zuerst zu Pyruvat, dann zu Acetaldehyd und abschließend durch das Enzym Alkoholdehydrogenase zu Ethanol ( $C_2H_5OH$ ) verstoffwechselt.



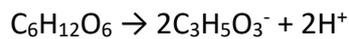
Formel 5

Die Bildung von Acetat als Gärungsprodukt durch *Moorella thermoacetica* (Homoacetatgärung, [46]) wird durch Formel 6 beschrieben. Glukose wird enzymatisch zu Pyruvat und weiter zu Acetyl-Coenzym A (CoA) umgesetzt, einem wichtigen Intermediat vieler Stoffwechselwege. Diese Teilreaktion ist typisch für strikte Anaerobier und kommt auch in anderen Gärungsarten vor. Aus Acetyl-CoA wird Acetylphosphat, welches abschließend durch das Enzym Acetatkinase unter ATP-Bildung zu Acetat ( $CH_3COO^-$ ) reagiert.



Formel 6

Bei der homofermentativen Laktatgärung (Formel 7) verwenden Milchsäurebakterien wie *Lactobacillus casei* oder *Lactobacillus plantarum* Glukose und bilden über Pyruvat als Zwischenprodukt Laktat ( $C_3H_5O_3^-$ ). Das Enzym Laktatdehydrogenase spielt hierbei eine Schlüsselrolle. Als mögliche Nebenprodukte dieses Gärungswegs sind sowohl Acetat als auch Ethanol beschrieben (heterofermentative Laktatgärung).



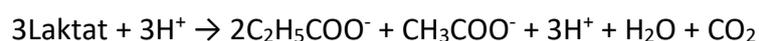
Formel 7

Die Vergärung von Glukose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) zu Butyrat ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{COO}^-$ , Formel 8) wird bei Mikroorganismen der Gattung *Clostridium* beobachtet. Vertreter dieser anaeroben Endosporenbildner sind *Clostridium acetobutylicum* und *Clostridium pasteurianum* [46].



Formel 8

Propionat wird hauptsächlich durch sekundäre Gärung von Laktat über Pyruvat gebildet (Formel 9, [46]). Für diesen Gärungsweg sind zwei verschiedene Stoffwechselrouten bekannt. Arten der Gattung *Propionibacterium* (z.B. *Propionibacterium freudenreichii*) nutzen den Methylmalonyl-CoA-Weg, bei dem Laktat zuerst zu Pyruvat oxidiert wird, welches dann über mehrere Zwischenschritte in den Citratzyklus gelangt. Über Methylmalonyl-CoA (Enzym Methylmalonyl-CoA-Mutase) und Propionyl-CoA (Enzym CoA-Transferase) wird schließlich Propionat ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{COO}^-$ ) gebildet. Unter Verwendung des Acrylyl-CoA-Wegs, wie ihn beispielsweise *Clostridium propionicum* nutzt, wird Laktat zu Lactyl-CoA aktiviert (CoA-Transferase), und über Acryloyl-CoA (Lactyl-CoA-Dehydratase) und Propionyl-CoA (Acrylyl-CoA-Reduktase) zu Propionat reduziert.



Formel 9

Neben den hier beschriebenen Gärungswegen sind auch sogenannte gemischte Säuregärungen möglich, bei denen die Zusammensetzungen gebildeter Säuren sowohl von exogenen Einflüssen als auch von den jeweils beteiligten Mikroorganismen abhängen [46]. Auch Fett- und Aminosäuren sowie Nukleobasen (aus DNA und RNA) können anaerob vergoren werden.

### 2.2.3. Acetogenese

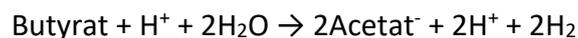
Der Begriff Acetogenese beschreibt allgemein die Bildung von Acetat als Teil des anaeroben Energiestoffwechsels. Dabei kann Acetat einerseits durch syntrophe Vergärung von FOS,

hauptsächlich Butyrat und Propionat (Abbildung 1), andererseits durch die Reduktion von CO<sub>2</sub> gebildet werden (Homoacetatgärung). Letztere wird durch homoacetogene Bakterien, bspw. *Clostridium ljungdahlii* oder *Acetobacterium woodii*, über den sogenannten reduktiven Acetyl-CoA-Weg (Wood-Ljungdahl-Weg) mit H<sub>2</sub> als Reduktionsmittel durchgeführt (Formel 10 [48]).



Formel 10

Für diese Art der CO<sub>2</sub>-Fixierung ist ein niedriger H<sub>2</sub>-Partialdruck von <2,05 mbar notwendig [49], weiterhin begünstigen thermophile Prozessbedingungen und lange HRT das Wachstum und die Aktivität dieser Mikroorganismen. Die andere Möglichkeit der Acetatbildung ist die Fettsäureoxidation unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> (Propionat) oder H<sub>2</sub> allein (Butyrat, Formel 11).



Formel 11

Diese Reaktion ist unter Standardbedingungen thermodynamisch nicht möglich. Wird jedoch der H<sub>2</sub>-Partialdruck verringert, verschiebt sich das chemische Gleichgewicht zugunsten der Produkte und die Reaktion wird exergon. So kommt es in einer syntrophen Lebensgemeinschaft zwischen bspw. *Syntrophomonas wolfei* und *Methanothermobacter thermoautotrophicus* mit gekoppelter Methanogenese durch Interspezies-Wasserstofftransfer zu einer direkten Zehrung von H<sub>2</sub>. Diese lokale Assoziation zweier metabolisch verschiedener Organismen, die für die Verwertung gewisser Substrate aus energetischen Gründen aufeinander angewiesen sind, ist eine spezielle Art der Symbiose und wird als Syntrophie bezeichnet [50]. Auf diese Weise gelingt es auch, Acetat zu H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> zu oxidieren. Die sogenannte syntrophe Acetatoxidation (SAO) stellt in Verbindung mit hydrogenotrophen Methanogenese einen alternativen Abbauweg von Acetat zur acetoklastischen Methanogenese dar (Abschnitt 2.2.4). Auch die Oxidation von Ethanol zu Acetat ist abhängig von einer syntrophen Beziehung zweier Mikroorganismen (Formel 12), wobei auch diese Reaktion nur ablaufen kann [51], wenn der Partnerorganismus den H<sub>2</sub>-Partialdruck in der Umgebung niedrig hält (<0,1 mbar [52]).

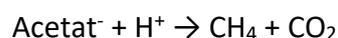


Formel 12

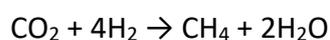
So können Spezies von *Desulfovibrio* bspw. Ethanol in Gegenwart eines methanogenen, homoacetogenen oder sulfatreduzierenden Organismus oxidieren [53]. Im ethanoloxidierenden Organismus ist dafür das Enzym Alkohol-Dehydrogenase von zentraler Bedeutung, da es für die Bildung von Acetaldehyd als Vorform von Acetat verantwortlich ist [54].

#### 2.2.4. Methanogenese

Die Methanbildung, oder Methanogenese, kann nur von methanogenen Archaeen durchgeführt werden und bildet den letzten Schritt des anaeroben Abbaus von Biomasse (Abbildung 1). Sie wird häufig als geschwindigkeitsbestimmender Schritt des Gesamtprozesses betrachtet, da die beteiligten Mikroorganismen empfindlich auf Auslenkungen der Prozessparameter reagieren und aufgrund der geringen Energieausbeuten sehr niedrige Wachstumsraten (mehrere Tage) aufweisen [55]. Das Schlüsselenzym für den methanfreisetzenden Reaktionsschritt ist die Methyl-Coenzym-M-Reduktase, ein Proteinkomplex bestehend aus mehreren Untereinheiten (*engl.: Kyoto encyclopedia of genes and genomes*, KEGG map00680 [54], vgl. Abbildung 33). Neben N-methylierten Kohlenstoffverbindungen und Methanol werden überwiegend Acetat (acetoklastische Methanogenese [56], Formel 13) oder  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$  (hydrogenotrophe Methanogenese, Formel 14) zu  $\text{CH}_4$  umgesetzt. Die Reduktion organischer Kohlenstoffverbindungen zu  $\text{CH}_4$  kann allerdings nur dann stattfinden, wenn keine alternativen Elektronenakzeptoren zur Verfügung stehen, wie bspw. Sulfat- ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), Nitrat- ( $\text{NO}_3^-$ ), Mn(IV)- oder Fe(III)-Ionen. Diese würden von anderen Bakterien mit höheren Energieausbeuten verstoffwechselt werden und somit bevorzugt ablaufen [56].



Formel 13



Formel 14

Die acetoklastische Methanogenese wird von den Familien *Methanosaetaceae* und *Methanosarcinaceae* durchgeführt und als charakteristisch für mesophile Prozessbedingungen (35-42°C) mit geringen Stickstoff-Frachten beschrieben. Dabei ist der Acetyl-Coenzym-A Decarboxylase/Synthase-Komplex das Schlüsselenzym für diesen Stoffwechselweg (KEGG map00680 [54]) [57]. Im Gegensatz dazu findet die hydrogenotrophe Methanogenese verstärkt bei thermophilen Bedingungen (45-60°C) und bei hohen Stickstoff-Belastungen statt und wird durch Vertreter der Familien *Methanomicrobiales* und *Methanobacterales* ausgeführt. Beteiligte Enzyme sind u.a. 5,10-Methylen-Tetrahydromethanopterin-Reduktase, Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase und Coenzym-F<sub>420</sub> reduzierende Hydrogenase (KEGG map00680 [54]) [57].

### **2.3. Metaproteomanalytik zur Untersuchung von Mikrobiomen**

Proteine sind in nahezu allen biologischen Prozessen von Lebewesen beteiligt und übernehmen eine Vielzahl von zellulären Funktionen, bspw. die Katalyse oder den Transport von Metaboliten, Gerüst- und Strukturbildung oder die Aufrechterhaltung von elektrochemischen Ionengradienten an Membranen. Als Proteom wird die Gesamtheit aller in einer Zelle, einem Organismus oder einem Ökosystem zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter den vorherrschenden Umweltbedingungen exprimierten Proteine bezeichnet [58]. Im Gegensatz zum genetischen Potential eines Organismus (Genotyp), das durch sein Genom repräsentiert wird, bildet das Proteom die Menge der tatsächlich exprimierten Gene ab (Phänotyp). Die bloße Präsenz eines Gens hat wenig Aussagekraft bezüglich seiner Aktivität [14]. Deshalb trägt die Untersuchung der Proteine in erheblichem Maße zum Verständnis von biologischen Systemen bei [59]. Dieses Forschungsgebiet, die Proteomik, umfasst die Untersuchung des Proteoms mit Hilfe verschiedener chemischer und biochemischer Methoden, von denen die wichtigsten am Ende dieses Abschnitts vorgestellt werden.

Im Unterschied zu Reinkulturen im Labor werden natürliche Ökosysteme nicht nur von Mikroorganismen einer einzigen Spezies bewohnt, sondern von Mikrobiomen [60] bestehend aus Bakterien, Archaeen und eukaryotischen Einzellern. Die Gesamtheit aller Proteome der einzelnen Organismen zu einem Zeitpunkt bildet somit sämtliche Stoffwechselvorgänge eines Mikrobioms unter synökologischen Bedingungen ab. Die Proteomanalyse von Mikrobiomen wird als Metaproteomanalyse bezeichnet [61, 62]. Ultimatives Ziel dieser Herangehensweise

ist die Verknüpfung möglichst aller beteiligten Spezies mit ihrer entsprechenden Funktion im biologischen System [14]. Daraus ergeben sich aber auch viele Herausforderungen.

Mikrobiome aus Umweltproben sind äußerst komplex, im Rahmen von genetischen Studien wurden in BGA über 1.000 verschiedene Spezies nachgewiesen [12]. Bereits der nahezu vollständige Nachweis sämtlicher Proteine nur einer einzelnen Spezies erforderte einen hohen experimentellen Aufwand [63]. Bei der Metaproteomanalyse steigt die Komplexität mit der Zahl der Spezies an. Trotz eines hohen Auflösungsvermögens und der Sensitivität der experimentellen Methoden, können häufig nur die jeweils abundantesten Proteine des Metaproteoms identifiziert werden. Außerdem können nur Proteine identifiziert werden, deren Aminosäuresequenzen aus Sequenzdatenbanken abgeleitet werden können, welche wiederum im Rahmen von Reinkulturexperimenten oder vorrangig erfassten Metagenomstudien erfasst wurden. Dies stellt bei explorativen Metaproteomstudien eine große Hürde dar, da nur ein Bruchteil der terrestrischen Mikroorganismen überhaupt untersucht, respektive als Reinkultur verfügbar ist [64]. Eine weitere Herausforderung bei der Analyse von Umweltproben ist die Extraktion der Proteine aus der Probenmatrix. Das sind bei Bodenproben kleine Steine und Sand, Pflanzenmaterial oder auch Huminstoffe [65, 66]. Vor allem letztere beeinträchtigen gängige Methoden der Proteinanalytik, da sie aufgrund ihrer chemischen Struktur viele Eigenschaften mit Proteinen teilen und deshalb nur schwer zu entfernen sind. Darüber hinaus neigen u.a. hydrolytische Mikroorganismen in BGA zur Anhaftung an das abzubauen Substrat, weshalb für eine repräsentative Beprobung und spätere Analyse eine Ablösung erforderlich ist [67]. Nicht zuletzt ist darauf zu achten, dass bei Beprobung, Transfer oder Konservierung des Materials die Umweltbedingungen des Habitats möglichst beibehalten werden, da sonst das Metaproteom eines Mikrobioms im Rahmen von Anpassungen verfälscht werden kann, bspw. durch eine Stressantwort. Dies gilt in besonderem Maße bei der Beprobung anaerober Systeme, die empfindlich gegenüber der Exposition mit Sauerstoff sind.

Trotz aller hier aufgeführten Herausforderungen wurden innerhalb der letzten Jahre viele Metaproteome aus verschiedenen Habitaten untersucht und Schlussfolgerungen über die Struktur und die metabolischen Funktionen des Mikrobioms gezogen. Neben den bereits genannten Mikrobiomen aus Böden und BGA sind das Mikrobiome aus dem menschlichen Darm [68], Belebtschlamm von Kläranlagen [61], oder maritimen Systemen [69].

Abbildung 2 zeigt den generellen Ablauf einer Metaproteomanalyse für Mikrobiome aus BGA, welcher im Folgenden ausführlicher beschrieben wird. Grundsätzlich sind die Abschnitte Probenvorbereitung, Separation und Verdau, MS-Analyse und Datenauswertung (Abbildung 2, ①-④) als Module zu betrachten, die in ihrer Anwendung prinzipiell immer in der gezeigten Reihenfolge durchgeführt werden. Einzelne Methoden können allerdings ausgetauscht, verändert oder ergänzt werden.

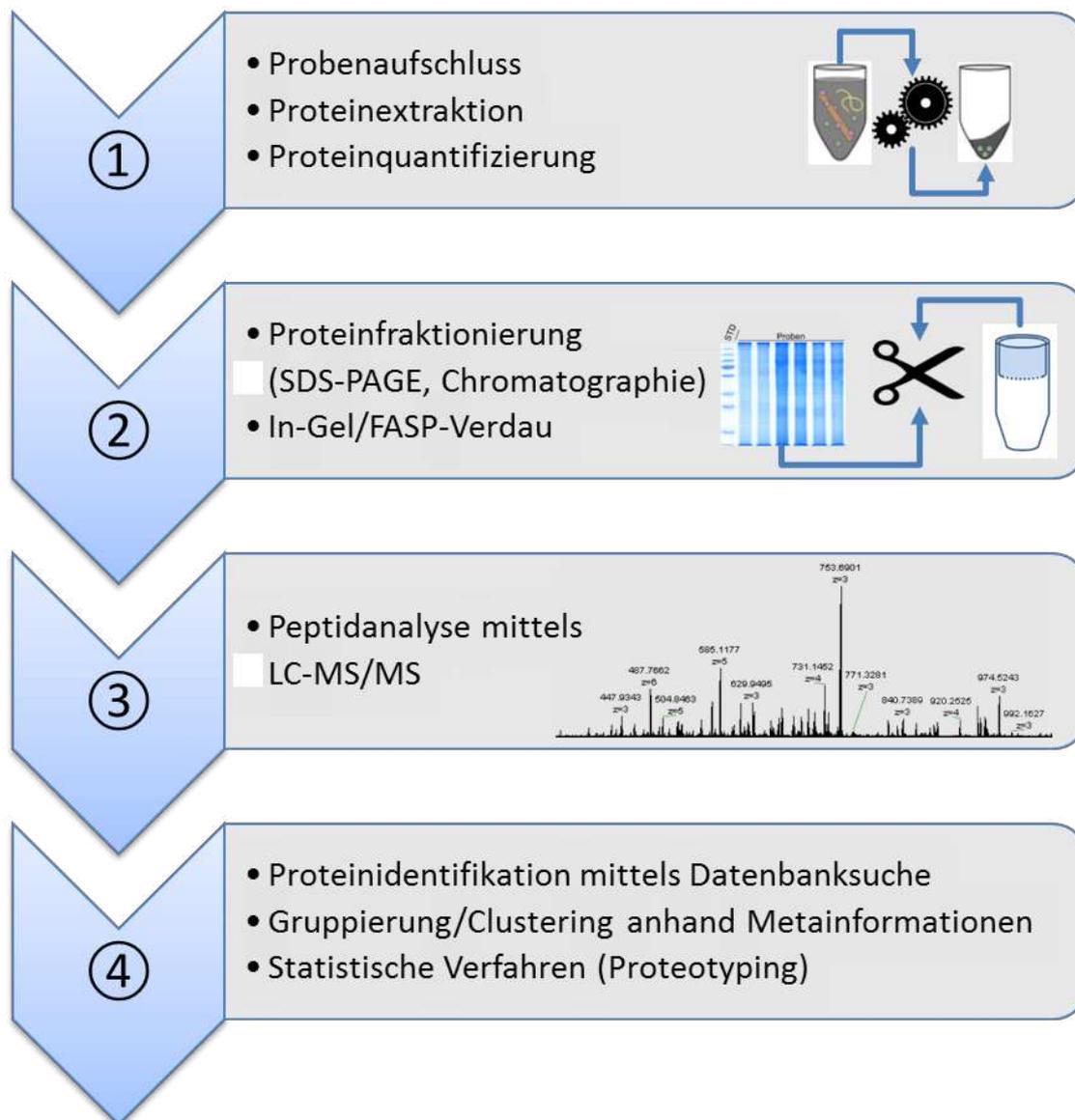


Abbildung 2: Allgemeiner Ablauf einer Metaproteomanalyse. ①: Probenvorbereitung. ②: Proteintrennung und/oder Proteinverdau. ③: Massenspektrometrie. ④: Datenauswertung. SDS-PAGE: Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese, FASP: *filter aided sample preparation*. LC-MS/MS: Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung.

Nach der Probennahme aus einer BGA wird der Gärrest entweder direkt bei -20°C gelagert oder unverzüglich aufgearbeitet. Der mechanische Probenaufschluss wird in einer Kugelmühle durchgeführt, damit auch an Pflanzenfasern haftende Mikroorganismen und solche mit festen

Zellwänden zerstört werden. Zum Aufschluss werden außerdem das organische Lösungsmittel Phenol sowie eine wässrige Saccharoselösung hinzugegeben. Zwischen beiden Lösungen besteht eine Mischungslücke, sodass sich nach Zentrifugation zwei Phasen bilden. Die obere Phenolphase enthält hydrophobe Bestandteile, hauptsächlich Proteine, die untere Saccharosephase enthält DNA und RNA. Die proteinreiche Phenolphase wird einer Fällung mit  $\text{NH}_4^+$ -Acetat in Methanol unterzogen, um Proteine aus dem Phenol zu präzipitieren und weitere Verunreinigungen zu entfernen. Nachfolgend werden mehrmalige Waschschriffe mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt, um dem Proteinpellet Rückstände von Phenol und Salzen zu entziehen. Die Resuspendierung der Proteine für die anschließende Quantifizierung erfolgte lange Zeit mit Wasser oder Ethanol [70], was eine unzureichende Homogenisierung der Proteinlösung zur Folge hatte. Puffer mit hohen Harnstoff- und Thioharnstoff-Konzentrationen zeigten ein besseres Lösungsverhalten, sind aber mit klassischen Methoden der Proteinquantifizierung (Bradford [71], Bicinchoninsäure-Test [72] oder Lowry [73]) nicht kompatibel. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die weitestgehend störungsfreie Quantifizierung mit Amidoschwarz angewendet [74]. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Harnstoff- und Thioharnstoff-Puffern ist die direkte Kompatibilität mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE* [75]) und der filtergestützten Probenaufbereitung [76] (*engl.: filter aided sample preparation, FASP, Abbildung 2, ②*). Letztere erlaubt den direkten tryptischen Verdau der Proteine auf einer Membran. Die erzeugten Peptide sammeln sich im darunterliegenden Reaktionsgefäß. Neben der weiteren Abreicherung von Nichtprotein-Bestandteilen zeichnet sich diese Methode durch eine schnelle und einfache Handhabung aus und bietet damit eine Alternative zum Verdau in Lösung (*engl.: in-solution digestion*), welcher sich für Proteinextrakte von Umweltproben häufig als unzureichend herausstellte. Deutlich mehr Zeit nimmt der Verdau von Proteinen aus einem SDS-PAGE Gel in Anspruch (*in-Gel, engl.: in-gel digestion*), ermöglicht dafür allerdings eine erste Fraktionierung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Die nachgestellte Analyse der tryptischen Peptide ist weitestgehend unabhängig von der Wahl der vorangegangenen Methoden (Abbildung 2, ③) und erfolgt mittels Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS). Nach Injektion des Peptidgemisches in den Flüssigchromatographen (*engl.: liquid chromatographie, LC*) erfolgt die Bindung an eine Vorsäule mit einer hydrophoben stationären Phase (Umkehrphase), z.B.  $\text{C}_{18}$ -Silikagel. Die

Vorsäule wird dann in einen anderen Lösungsmittelfluss geschaltet, an den ein binärer Gradient aus Wasser und steigendem Anteil organischen Lösungsmittels angelegt wird. Durch diesen kommt es zu einer graduellen Elution der Peptide auf die Trennsäule, die ebenfalls aus einer hydrophoben stationären Phase besteht, und zu einer finalen Elution proportional zur Hydrophobizität der mobilen Lösungsmittelphase. Die online-Kopplung der LC an ein MS/MS ermöglicht abschließend die Analyse der Peptide anhand ihrer Masse-zu-Ladung-Verhältnisse ( $m/z$ ), respektive der jeweiligen Fragmente. Zuerst erfolgt in der Ionenquelle die Ionisierung der Peptide durch Versprühen der Analytione in ein Hochspannungsfeld (Elektrospray-Ionisierung, ESI [77]). Durch Evaporation des Lösungsmittels steigt die Dichte an gleichnamigen Ladungsträgern in den Tröpfchen, bis diese aufgrund der zu starken Abstoßungsenergie zerfallen (Coulomb-Explosion) und einzelne geladene Peptidionen entstehen. Nach dem Transfer dieser Peptidionen (auch *Precursor*, Parental- oder Vorläuferionen genannt) in ein Hochvakuum, erfolgt die  $m/z$ -Bestimmung durch einen Massenanalysator, welchen es in verschiedenen Ausführungen gibt. ToF- (*engl.: time-of-flight*) bzw. Flugzeitanalysatoren ermitteln anhand von Driftzeiten im elektrischen Feld das Masse-zu-Ladung-Verhältnisse, während Multipole durch wechselnde elektrische Felder wiederholt  $m/z$ -Bereiche scannen und gezielt Massen selektieren. Ionenfallen reichern vor der Massenanalyse Ionen an, wodurch höhere Sensitivitäten erreicht werden können. Die Orbitale Ionenfalle bildet die neueste Generation der Massenanalysatoren und erlaubt die gleichzeitige Detektion der Peptidionen, indem diese auf einer Kreisbahn um die zentrale Spindel in der Ionenkammer gehalten werden [78]. Dabei induzieren sie einen elektrischen Strom, der mittels Fourier-Transformation direkt in ein Massenspektrum übersetzt werden kann. Um die Struktur von Peptidionen zu bestimmen, werden diese in der sogenannten Kollisionszelle fragmentiert. Dabei werden die Ionen mit einem Inertgas (Stickstoff oder Edelgase) zur Kollision gebracht, woraufhin sie zu Fragmentionen verschiedener Längen zerbrechen. Bei der kollisionsinduzierten Dissoziation (CID, *engl.: collision-induced dissociation*) zerbrechen fast ausschließlich Peptidbindungen zwischen einzelnen Aminosäuren der Peptidionen. N-terminale Fragmentionen werden als b-Ionen und C-terminale als y-Ionen bezeichnet [79]. Nach einer weiteren Massenanalyse erfolgt die Erfassung der Fragmentionen durch den Detektor des MS, welcher den jeweiligen  $m/z$ -Werten die zugehörigen Intensitäten liefert. Die zweidimensionale Darstellung von  $m/z$ -Werten und Intensitäten aller Peptidionen eines Messzeitpunkts wird als  $MS^1$ -Massenspektrum

bezeichnet. Die b- und y-Fragmentionen eines fragmentierten Peptids erscheinen in dem resultierenden MS<sup>2</sup>-Massenspektrum als Ionenserie, aus dessen m/z-Abständen sich im Rahmen der Datenauswertung (Abbildung 2, ④) die Aminosäuresequenz ableiten lässt.

Die LC-MS/MS-Analyse eines Peptidgemischs resultiert in einer Liste aus Fragment-Massenspektren für alle während der Messung detektierten und fragmentierten Peptidionen der untersuchten Probe. Die Identifikation von Peptiden durch Rückführung dieser Daten auf Aminosäuresequenzen wird von Suchalgorithmen unter Verwendung von Referenzdatenbanken bewerkstelligt. Mascot gehört dabei seit einigen Jahren zu den etabliertesten Suchmaschinen [80], wobei die öffentliche Swiss-Prot-Datenbank aufgrund ihrer detaillierten manuellen Annotationen und ständigen Überprüfungen häufig Verwendung findet [81]. Der Algorithmus erzeugt aus den Proteinsequenzen der Referenzdatenbank zuerst virtuelle, tryptische Peptide. Einer gemessenen Peptidmasse werden nun alle isobaren, virtuellen Peptide aus der Datenbank zugeordnet, welche in einem zweiten Schritt in ihr theoretisches Fragmentspektrum überführt werden. Abschließend erfolgt der Vergleich aller potenziellen Fragmentspektren aus der Datenbank mit dem gemessenen Fragmentspektrum des jeweiligen Peptidions. Nach Validierung anhand statistischer Verfahren werden die wahrscheinlichsten Identifikationen für ein Massenspektrum ausgegeben, womit die Verknüpfung mit dem Peptid bzw. dem Protein aus der Datenbank erfolgt. Somit hängt eine Identifikation nicht nur von der Qualität des Massenspektrums ab, sondern auch von der Verfügbarkeit einer passenden Aminosäuresequenz in der Datenbank. Swiss-Prot enthält neben Sequenzen von eukaryotischen Organismen und Zellen meist Sequenzen von mikrobiellen Reinkulturen, viele davon mit medizinischer Relevanz. Ein Großteil der Organismen aus Umweltproben ist jedoch weder sequenziert, noch als Reinkultur verfügbar. Metagenomsequenzen als Gesamtheit der genetischen Informationen von Mikrobiomen eignen sich als alternative Datenbanken [82], wenn die Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen übersetzt werden. Sie sind häufig jedoch schlecht oder gar nicht annotiert, sodass zusätzlich eine Homologiesuche der unbekannt Sequenzen gegen eine öffentliche Datenbank mittels *basic local alignment search tool* (BLAST) erfolgt [83]. Trotzdem gelingt es nicht in jedem Fall, Sequenzen aus Metagenomen zu annotieren bzw. ihnen eine Funktion oder Taxonomie zuzuordnen. Deshalb können diese Proteine lediglich als „unbekannt“ identifiziert werden.

Während bei ersten Metaproteomanalysen von Umweltproben nur wenige Proteine identifiziert werden konnten [61, 70], erhöhte sich diese Zahl, vor allem aufgrund technischer Fortschritte der verwendeten MS, schnell auf mehrere 1.000 [84]. Softwarepakete, wie der MetaProteomeAnalyzer [85], ermöglichen die Kombination verschiedener Suchmaschinen, um die Zahl der Identifikationen zu erhöhen. Daneben erlaubt die Bildung von Metaproteinen einen sinnvollen Umgang mit redundanten Identifikationen und eine korrekte taxonomische Zuordnung. Für eine systembiologische Untersuchung erfolgt eine automatische Verknüpfung identifizierter Proteine mit sogenannten Metainformationen von externen Datenbanken (Abbildung 2, ④).

## 2.4. *Proteotyping* als Auswertestrategie für komplexe Metaproteomik-

### Datensätze

Der Begriff *Proteotyping*, eine Wortneuschöpfung aus den englischen Begriffen „*proteomics*“ und „*typing*“, war bis vor kurzem auf die Identifikation von Mikroorganismen anhand charakteristischer Protein-Massenspektren mittels matrixunterstützter Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalyse beschränkt [86] (engl.: *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS*, MALDI-ToF-MS). In einem 2015 veröffentlichten Review-Artikel wurde die Definition von *Proteotyping* auf die Klassifikation, Charakterisierung und Identifikation von Mikroorganismen und Mikrobiomen mittels MS/MS oder MS/MS-basierten *Shotgun*-Methoden erweitert [58], um alleinige taxonomische Identifikation von Mikroorganismen zur Charakterisierung von Mikrobiomen abzulösen. Darüber hinaus beinhaltet *Proteotyping* die Zuordnung zusätzlicher physiologischer Merkmale, wie die taxonomische Verteilung von Proteinen, ihre molekularen Funktionen oder Beteiligung an biologischen Prozessen. Diese Metainformationen werden ebenfalls in Form von öffentlichen Datenbanken bereitgestellt [85] und im Rahmen der Auswertung mit identifizierten Proteinen verknüpft.

Alle *Proteotyping*-Anwendungen beinhalten die Proteinidentifikation mittels MS. Verbesserte Leistungsmerkmale moderner Geräte erlauben Identifikationen auch von niederabundanten Peptiden und Proteinen über einen wachsenden dynamischen Bereich, was zu längeren Listen identifizierter Proteine führt. Vor dem Hintergrund mehrerer tausend Identifikationen pro Messung ist ein manueller Vergleich von Proteinlisten in zeitlich angemessenem Rahmen nicht möglich. Biostatistische und *data mining* Methoden ermöglichen es hingegen, Ähnlichkeiten

oder Unterschiede in Sets identifizierter Proteine anhand ihrer Abundanz (z.B. Anzahl identifizierter Spektren, *engl.: spectral count*, SpC) oder der verknüpften Metainformationen aufzudecken und ersetzen somit die manuelle Auswertung der Proteinlisten.

Im Rahmen einer umfassenden *Proteotyping*-Studie von BGA gelang die Identifikation von grundlegenden Korrelationen zwischen Taxonomien, Funktionen und Metaproteinen mit Prozessparametern wie Temperatur, Substrat, Reaktordesign oder Stickstoff-Fracht [87]. Mittels hierarchischer Clusteranalyse [88] und Hauptkomponenten-Analyse [89] wurden verschiedene Datenebenen der identifizierten Metaproteine untersucht und bezüglich ihrer Aussagekraft verglichen. Neben der Taxonomie und den biologischen Prozessen war die Ebene der Metaproteine am besten geeignet, klar getrennte Cluster für verschiedene Reaktordesigns bzw. Prozessarten zu erzeugen. Dabei gelang sogar die Differenzierung scheinbarer biologischer Replikate, die sich bei näherer Betrachtung der Prozessparameter als Prozessanomalie herausstellten [87].

### 2.5. Grundlagen metabolischer Netzwerkmodelle

Metabolische Netzwerke beschreiben die Gesamtheit aller von Mikroorganismen und Mikrobiomen durchgeführten biochemischen Auf- und Abbaureaktionen. Da Stoffwechselfvorgänge immer durch Enzyme katalysiert werden, können entsprechende Netzwerke aus Genomdaten unter Zuhilfenahme öffentlicher Datenbanken (z.B. KEGG [54] und MetaCyc [90]) abgeleitet werden. Diese Netzwerkrepräsentationen dienen dem generellen Verständnis von Stoffwechselabläufen. Sie können aber auch spezifische Informationen über zentrale Knotenpunkte (*engl.: hubs*) im Stoffwechsel von Organismen liefern, Interventionsstrategien für genetische Manipulationen aufzeigen oder die medizinische Wirkstoffentwicklung unterstützen.

Die stöchiometrische Netzwerk- bzw. Flussanalyse ist ein systembiologischer Ansatz zur Untersuchung von Stoffwechselnetzwerken [91]. Unter der Annahme, dass metabolische Prozesse deutlich schneller ablaufen als Umwelteinflüsse wirken können, wird für die Netzwerkanalyse von einem Fließgleichgewicht oder Gleichgewichtszustand (*engl.: steady-state*) ausgegangen. Dies ermöglicht Aussagen über mögliche Flussverteilung auch ohne kinetische Parameter, die in vielen Fällen nicht zur Verfügung stehen oder schwer zu bestimmen sind. Dafür lassen sich wiederum nur sehr begrenzte Aussagen über die Dynamik eines Systems treffen.

Der CellNetAnalyzer (<http://www2.mpi-magdeburg.mpg.de/projects/cna/cna.html>) ist eine MATLAB-Toolbox, die die Erstellung metabolischer Netzwerke über eine grafische Nutzeroberfläche erlaubt [21, 92, 93]. Diese basiert auf stöchiometrischen Reaktionen von Metaboliten, deren Aufnahme- und Bildungsraten, beteiligten Enzymen sowie Reaktionsgleichgewichten. Weiterhin werden Koeffizienten für den Erhaltungsstoffwechsel und spezifische Wachstumsraten bzw. die Biomasse-Zusammensetzung der beteiligten Mikroorganismen berücksichtigt [94]. Differenziert wird dabei zwischen intrazellulären und extrazellulären Pools von Metaboliten, wobei ausschließlich die extrazellulären Pools als Quellen oder Senken wirken können [95-97]. Weiterhin erlaubt der CellNetAnalyzer umfassende Untersuchungen bezüglich struktureller und funktionaler Eigenschaften von zellulären Netzwerken. Dazu stehen verschiedene Methoden und Algorithmen zur Analyse von Fließgleichgewichten, Flussvariabilitäten, Metabolitflüssen, Elementarmoden oder minimalen Interventionssets zur Verfügung (*engl.: flux balances, flux variabilities, metabolic fluxes, elementary-modes, minimal cut sets*).

Zentrale Ziele der Modellanalysen sind Vorhersagen zum Metabolismus und der Zusammensetzung von Mikrobiomen, bspw. unter welchen Bedingungen Wachstumsgeschwindigkeiten oder Biomasseausbeuten maximiert werden können [98]. Eine anwendungsorientierte Fragestellung bei der Modellierung eines biogasproduzierenden Mikrobioms lautet, welche Biomassezusammensetzungen eine optimale Methanausbeute und Biogasproduktionsrate ermöglichen und welche Stoffwechselwege dabei genutzt werden. Im Vorfeld an die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde ein metabolisches Netzwerkmodell einer Mischkultur erstellt [23], das unter anaeroben Bedingungen Biogas aus Ethanol produziert. Als Grundlage dafür wurden sechs Organismen ausgewählt, die für die entsprechenden Teile des Biogasprozesses repräsentativ sind (Abbildung 3). *Desulfovibrio vulgaris* (*D. vulgaris*) ist ein sulfatreduzierendes Bakterium, das unter sulfatlimitierten Bedingungen und unter Verwendung von  $H^+$  als Elektronenakzeptor syntroph Ethanol zu Acetat oxidieren kann (Abschnitt 2.2.3, Formel 12) [99]. Bedingung für den Ablauf dieser energetisch ungünstigen Reaktion ist ein niedriger  $H_2$ -Partialdruck, welcher durch direkte Methanisierung von  $H_2$  und  $CO_2$  in hydrogenotrophen Archaeen erreicht wird (Abschnitt 2.2.4, Formel 14). Diese werden in der Modellkultur durch *Methanococcus maripaludis* (*M. maripaludis*) repräsentiert. *Methanosarcina barkeri* (*M. barkeri*) kann zwar ebenfalls hydrogenotrophe Methanogenese betreiben, besitzt aber eine geringere Affinität gegenüber

H<sub>2</sub> als *M. maripaludis*, und kann außerdem noch die acetoklastische Methanogenese (Abschnitt 2.2.4, Formel 13) durchführen [56]. *Acetobacterium woodii* (*A. woodii*) ist ein homoacetogenes Bakterium der Ordnung *Clostridiales* [100], welches sowohl autotroph durch Acetogenese aus H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> als auch durch Gärung organischer Substanzen wachsen kann (Abschnitt 2.2.3, Formel 10). Sekundäre Gärung von Ethanol zu Propionat und Acetat wird im Modell durch den Methylmalonyl-Weg abgebildet (Abschnitt 2.2.2). Sowohl *Propionibacterium freudenreichii* (*P. freudenreichii*) als auch z.B. *Pelobacter propionicus* (*P. propionicus*) nutzen diesen Stoffwechselweg, jedoch über verschiedene Substrate [101]. Ethanol bspw. kann nur von *P. propionicus*, nicht aber von *P. freudenreichii* verstoffwechselt werden. Das Modell aber bildet funktionelle Gilden ab, weshalb hier die Ethanoloxidation integriert wurde. Auch für *A. woodii* wurde die Acetogenese aus Ethanol experimentell gezeigt, allerdings waren dafür hohe Hydrogencarbonat-Konzentrationen von 50 mM bis 120 mM nötig [102]. Über syntrophe Oxidation durch *Syntrophobacter fumaroxidans* (*S. fumaroxidans*) wird Propionat schließlich in Acetat umgewandelt (sekundäre Gärung bzw. Acetogenese, Abschnitt 2.2.3) und steht somit der acetoklastischen Methanogenese durch *M. barkeri* zur Verfügung.

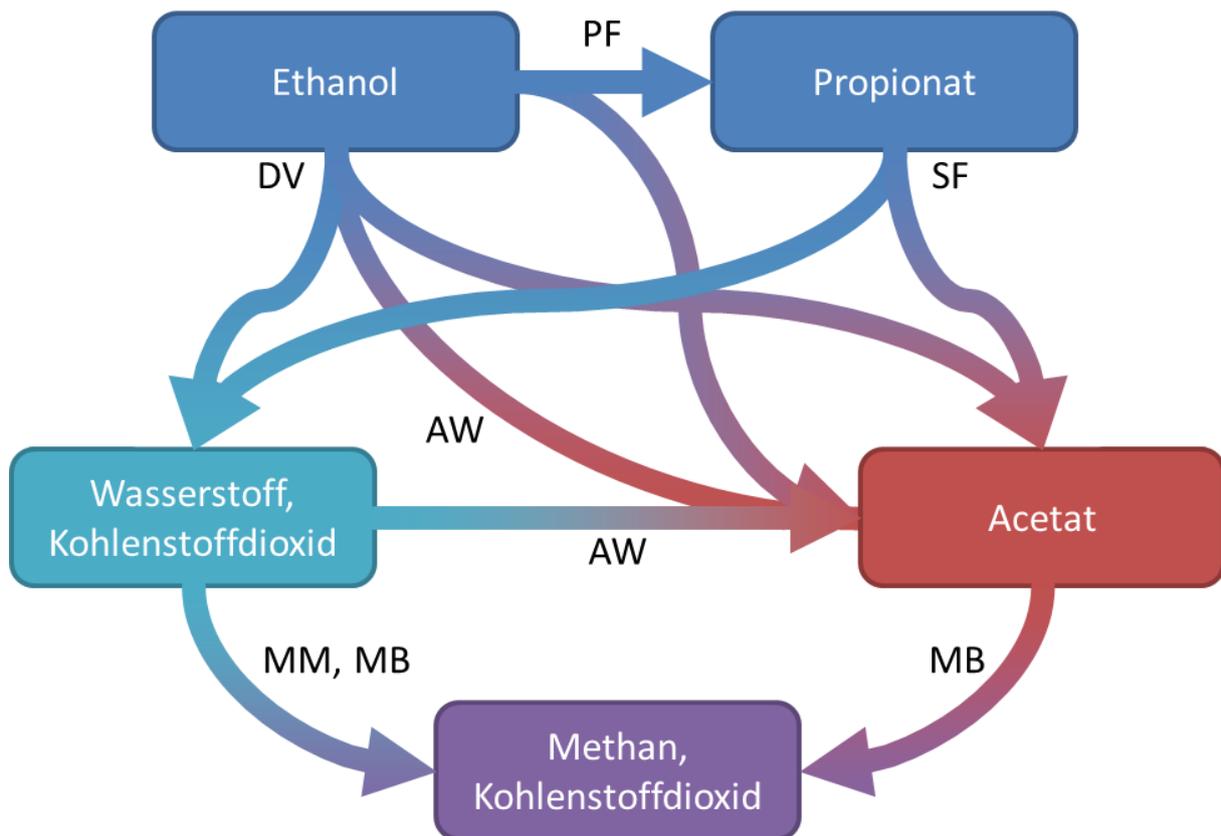


Abbildung 3: Skizze der Metabolite und Stoffwechselprozesse einer definierten Modellkultur. Abgebildet ist der Teil des Gesamtprozesses (Abbildung 1), der durch die Mikroorganismen repräsentiert wird. PF: *Propionibacterium freudenreichii*; DV: *Desulfovibrio vulgaris*; AW: *Acetobacterium woodii*; SF: *Syntrophobacter fumaroxidans*; MM: *Methanococcus maripaludis*; MB: *Methanosarcina barkeri*.

## 2.6. *Transient-state* Kultivierungen

Zellen und Mikroorganismen werden in Bioreaktoren häufig kontinuierlich kultiviert [103]. Dabei wird Medium mit der gleichen, konstanten Förderrate in ein Kultivierungsgefäß gepumpt, mit der auch Kulturbrühe abgezogen wird. Eine ebenfalls kontinuierliche Homogenisierung des Reaktorinhalts wird eine gleichmäßige Verteilung von Medienkomponenten, Metaboliten und Biomasse gewährleistet. Die abgepumpte Kulturbrühe bzw. die enthaltene Biomasse ist deshalb zu jedem Zeitpunkt repräsentativ für den Reaktorinhalt. Ausgetragene Zellen oder Mikroorganismen werden durch Wachstum auf dem frisch zugeführten Substrat ersetzt. Die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  der Organismen entspricht dabei der Verdünnungsrate  $D$  im Reaktor (das Reziproke von  $D$  entspricht der HRT, vgl. Formel 1). Daraus folgt, dass die Konzentrationen von Biomasse, Substraten und möglichen extrazellulären Metaboliten oder Produkten im Reaktor konstant sind, wenn der Reaktor ausreichend lang mit konstantem  $D$  betrieben wird. Dieser Gleichgewichtszustand wird auch als stabiles Fließgleichgewicht oder *steady-state* bezeichnet. Erst beim

Überschreiten einer organismen-spezifischen maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  kommt es zur Abreicherung von Biomasse, da der Austrag schneller stattfindet als seine Biomasseneubildung (Abbildung 4). Gleichzeitig steigt die Konzentration jener Substratkomponente an, die im *steady-state* die Biomassebildung limitiert und dadurch einen stabilen Prozess erst ermöglicht.

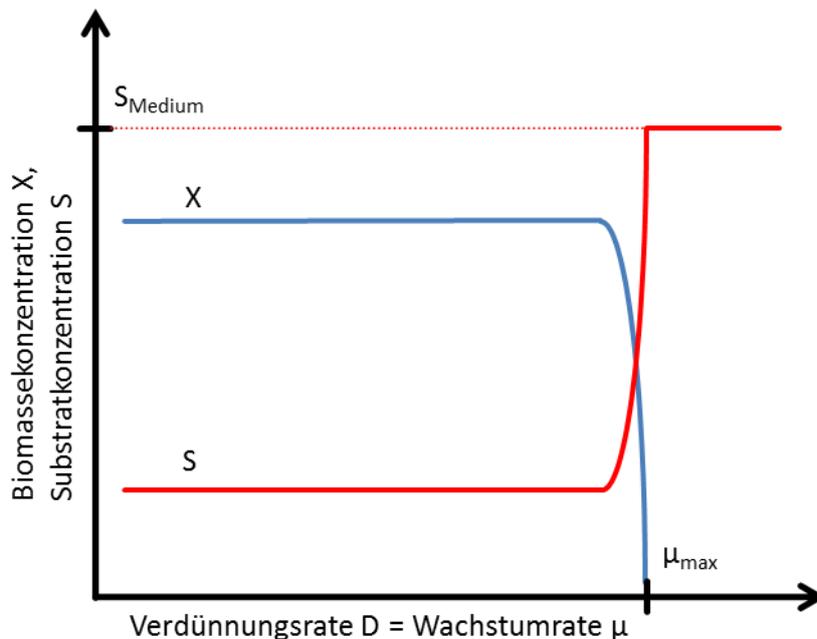


Abbildung 4: Schema der Biomasse- und Substratkonzentrationen im kontinuierlichen Prozess. Dargestellt sind die Verläufe der Biomassekonzentrationen  $X$  (blau) und der Substratkonzentration  $S$  (rot) in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate  $D$ , welche der Wachstumsrate  $\mu$  entspricht. Im Bereich des Auswaschpunkts  $D = \mu_{\max}$  beginnt der Austrag der Biomasse mit dem Überschreiten der maximalen spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$ , in Folge dessen das limitierende Substrat nicht mehr umgesetzt wird und die Konzentration des Mediums  $S_{\text{Medium}}$  erreicht.

Die notwendige Dauer für das Erreichen eines Gleichgewichtszustands bei kontinuierlicher Prozessführung wird in der Literatur unterschiedlich definiert. Bei Reinkulturversuchen wird von mehreren Verdopplungszeiten gesprochen [104], während bei Fermentationsversuchen im Labormaßstab nicht selten mehr als 20 HRT veranschlagt werden [105, 106]. Für den Vergleich von Modell- und Prozessdaten (Abschnitt 2.5) war die Beprobung verschiedener *steady-states* mit HRT zwischen 100 d und 10 d geplant. Eine zeitliche Abschätzung der Gesamtversuchsdauer unter Berücksichtigung von jeweils 3 HRT bis zur Einstellung des entsprechenden Gleichgewichtszustands ist in Tabelle 1 dargestellt und beläuft sich auf über 4 Jahre.

Tabelle 1: Notwendige Gesamtversuchsdauer bei klassischer kontinuierlicher Prozessführung.

HRT [d]	Zeit bis Einstellung eines Gleichgewichtszustands (3 x HRT) [d]	Gesamtversuchsdauer [d] / [a]
100	300	300 / 0,8
90	270	570 / 1,6
80	240	810 / 2,2
70	210	1.020 / 2,8
60	180	1.200 / 3,3
50	150	1.350 / 3,7
40	120	1.470 / 4,0
30	90	1.560 / 4,3
20	60	1.620 / 4,4
10	30	1.650 / 4,5

Als Alternative zur *steady-state* Methode wurde die *transient-state* Methode vorgeschlagen, um in kürzerer Zeit vergleichbare Daten von Prozessen in Gleichgewichtszuständen zu erhalten [107]. Diese Abwandlung des klassischen kontinuierlichen Prozesses basiert auf der Annahme, dass die physiologische Adaption von Organismen in einem Mikrobiom an veränderte Umweltbedingungen deutlich weniger Zeit in Anspruch nimmt, wenn die Auslenkungen verhältnismäßig klein sind. Übertragen auf die hier geplanten Versuche bedeutet dies, dass ausgehend von HRT 100 d die Verdünnungsraten jeweils nach Ablauf des Zeitintervalls  $dt$  um sogenannte Verdünnungsraten-Intervalle  $dD$  erhöht werden (Abbildung 5). Dies erlaubt die Einstellung vieler quasi *steady-states* in kürzerer Zeit als im klassischen kontinuierlichen Prozess. Besonderes Augenmerk bei der Auslegung einer *transient-state* Kultivierung liegt auf der Bestimmung der Intervallgrößen  $dt$  und  $dD$ . Ein zu kleines  $dt$ , respektive ein zu großes  $dD$ , führen zu einer unzureichenden Anpassung des Stoffwechsels und der Biomasse und damit zu einer Abweichung des quasi *steady-states* vom eigentlichen Gleichgewichtszustand. Für Reinkulturen mit bekanntem  $\mu_{\max}$  können diese für eine Prozessauslegung direkt herangezogen werden [107], andernfalls ist eine Ableitung von  $\mu_{\max}$  aus diskontinuierlichen (*engl.: batch*) Kultivierungen notwendig [108, 109]. Anstelle einer Auslegung auf der Grundlage theoretischer Betrachtungen wurde ebenfalls vorgeschlagen, Prozesssignale als Indikatoren für das Erreichen des *steady-states* heranzuziehen. Hier sind aufgrund der höheren Prozesssensitivität vorzugsweise stabile Biomasse- oder Substratkonzentrationen zu betrachten [110, 111]. In BGA ist eine stabile Gasbildung ein

geeigneter Zeiger für Prozesse im Gleichgewichtszustand [111-113], da sowohl im Labor als auch im industriellen Maßstab Biogas das hauptsächliche Produkt ist [114].

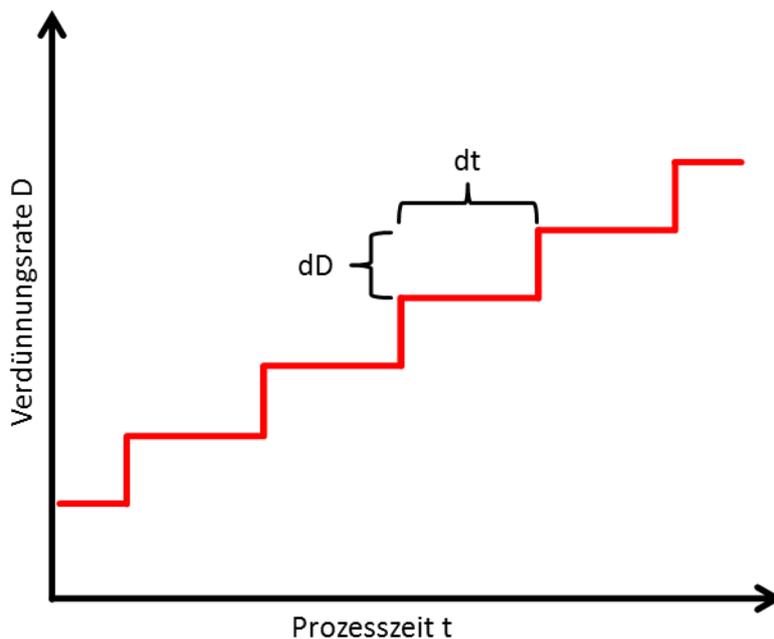


Abbildung 5: Auslegungsparameter für die *transient-state* Kultivierung.  $dD$ : Intervallgröße der Verdünnungsrate  $D$ ;  $dt$ : Intervallgröße der Prozesszeit  $t$ .

Anwendung fand die *transient-state* Methode z.B. bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *Hansenula polymorpha* während der Gabe zusätzlicher chemo-organoheterotropher Substrate und in leicht abgewandelter Form bei der Bestimmung von Schwefelbildungsraten während der Kultivierung von *Thiobacillus* Spezies [115, 116]. Weiterhin wurde im Rahmen einer theoretischen Arbeit die *transient-state* Methode dem klassischen kontinuierlichen Prozess gegenübergestellt und darüber hinaus als geeignete Methode zur Bestimmung maximaler Wachstumsraten in Kultivierungssystemen mit Substrat- oder Produktinhibition diskutiert [107].

### 3. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandten Analysemethoden, die verwendeten Geräte, die Reaktorkonfiguration und die Parameter der verwendeten Prozesse beschrieben. Anwendungen, für die bereits etablierte Standard-Arbeitsanweisungen vorhanden waren, werden nur genannt oder zusammengefasst. Darüber hinaus enthält Tabelle 14 eine Liste aller verwendeten Arbeitsanweisungen, welche auf Anfrage durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt werden können.

#### 3.1. Anreicherung methanproduzierender Mikrobiome auf Medium mit Zellulose und Glukose

Dieser Abschnitt beschreibt den experimentellen Aufbau und Betrieb sowie die Analysen mehrerer, parallel betriebener Reaktoren, die mit Impfschlamm aus einer industriellen BGA inokuliert wurden. Ziel war u.a. die Untersuchung und der Vergleich des Mikrobioms von Anreicherungskulturen unter definierten Laborbedingungen (Abschnitt 4.1). Die Ergebnisse dieser Studie wurden 2017 von Kohrs et al. veröffentlicht [117].

##### 3.1.1. Kultivierung Sixfors Multi-Bioreaktorsystem

Für die Anreicherungskulturen wurde das Sixfors Multi-Bioreaktorsystem der Firma INFORS AG (Bottmingen, Schweiz) mit sechs parallel betriebenen 500 mL Kultivierungsgefäßen aus Glas verwendet (R1-R6). Durch den Reaktordeckel wurden der Pt100-Temperatursensor für die Temperaturregelung, eine pH-Elektrode (Typ 405-DPAS-SC-K8S, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland), ein Probenahmerohr mit gasdichtem Schlauch (Innendurchmesser und Wandstärke je 1,6 mm, Santoprene® LEZ-SAN, St. Wendel, Deutschland) und Luer/Lock-Zweiwegeventil (EPPENDORF 78200077 sampling valve, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) installiert. Die Aufhängung der Rührerwelle erfolgte ebenfalls über den Reaktordeckel; das Magnetrührwerk mit zwei Schrägblatt-Rührern wurde am Rundboden des Glasreaktors durch eine Kunststofffassung gehalten. Ein Abgaskühler, der über ein externes Kühlaggregat mit Umwälzpumpe (Minichiller, Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg, Deutschland, Kühlmitteltemperatur 20°C) gespeist wurde, sorgte für die Kondensatabscheidung und wurde ebenfalls mittels gasdichter Schläuche an die Gasanalytik

(Abschnitt 3.2) angeschlossen. Alle weiteren Öffnungen wurden mit Blindstopfen verschlossen oder von innen mittels gasdichter Schläuche kurzgeschlossen.

### 3.1.2. Probenherkunft und Inokulation

Für die Inokulation wurde eine BGA bei Magdeburg (Deutschland) bestehend aus zwei parallel geschalteten Hauptfermenter (HF) und einem Nachgärer (NG) beprobt. Auf ausdrücklichen Wunsch des Betreibers wird auf Nennung des Anlagennamens, des genauen Standorts und des Betreibers verzichtet. Die jeweils baugleichen Reaktoren besaßen ein maximales Volumen von 3.830 m<sup>3</sup> mit einem Arbeitsvolumen von 3.779 m<sup>3</sup> bei 7,4 m Füllhöhe, als Gasspeicher fungierten Tragluftdächer mit einer Kapazität von jeweils 1.300 m<sup>3</sup>. Mit 44 ±1°C war die Betriebsweise einer mesophilen Prozessführung zuzuordnen, die mittlere Verweilzeit der HF betrug 43 d bei einer Faulraumbelastung von 5,38 kg<sub>oTS</sub> (m<sup>3</sup> d)<sup>-1</sup>. Die gesamte gebildete Gasmenge betrug im Tagesmittel ca. 30.000 Nm<sup>3</sup> mit 53,8% CH<sub>4</sub>, 44,2% CO<sub>2</sub> und <100 ppm H<sub>2</sub>S. Nach einer abschließenden Entschwefelung und Gaswäsche liefert der Prozess ca. 16.140 Nm<sup>3</sup> Biomethan. Weitere Prozesskenngrößen und die Futtermittelzusammensetzung können Tabelle 5 und Tabelle 6 entnommen werden (Angaben laut Anlagenbetreiber).

Der HF1 der BGA bei Magdeburg wurde am 24.02.2015 beprobt, etwa 5 L Gärschlamm wurden zur Inokulation des Reaktorsystems (Abschnitt 3.1.1) in das Labor verbracht und umgehend wie folgt aufgearbeitet: je Reaktor wurden 300 mL Material für 3 min bei dem 3.000-fachen der Erdbeschleunigung (x g) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, um grobe Materialien, bspw. Pflanzenfasern oder Sand, die die Rührbarkeit beeinträchtigen würden, zu entfernen. 190 mL des so gewonnenen Überstands wurden gemeinsam mit 210 mL Wassers (vortemperiert auf 40°C) in den Reaktor gegeben. Als Startpunkt der Kultivierung (0 d) erfolgte nach zwei Tagen erstmals eine Probenahme mit 5 mL Substratgabe des Kulturmediums (Abschnitt 3.1.3, Tabelle 7) sowie der Anschluss an das Gerätesystem mit Online-Gasanalytik (GärOnA, Abschnitt 3.2).

### 3.1.3. Medium mit Zellulose und Glukose

Für die Kultivierung wurde als Grundlage ein Medium verwendet, das durch Bensmann et al. 2016 [106] beschrieben wurde. Die komplexen Bestandteile Hefeextrakt, Fleischextrakt und Pepton wurden durch Glukose, mikrokristalline Zellulose und Harnstoff als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen ersetzt. Weiterhin wurde die Vitaminlösung um einige essenzielle Komponenten erweitert. Tabelle 7 bis Tabelle 9 beschreiben die Zusammensetzungen der

Stocklösungen für die Medienherstellung. Das häufig für die Charakterisierung von Substraten verwendete Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff zu Phosphor (C:N:P-Verhältnis) lag bei 135:7:1 für R1-R6 und 138:14:1 für R5/R6 im Kultivierungsabschnitt 93-200 d, respektive 152:41:1 für 200-298 d (Abschnitt 3.1.4, Tabelle 10).

### 3.1.4. Quasi-kontinuierliche Prozessführung

Die sechs parallelen Anreicherungskulturen R1-R6 wurden bis Tag 93 bei gleichen Prozessbedingungen und gleicher Medienkomposition kultiviert. Ab Tag 93 erfolgte bei R3 und R4 eine Anhebung der Prozesstemperatur stufenweise mit 2°C pro Woche von 40°C auf 54°C und abschließend mit 1°C pro Woche auf 56°C. Für die Reaktoren R5 und R6 erfolgte eine Anpassung des Mediums durch Erhöhung der Harnstoffkonzentrationen von 2,56 g L<sup>-1</sup> zuerst auf 5,13 g L<sup>-1</sup> (Tag 93-200), dann auf 15,38 g L<sup>-1</sup> (Tag 200-298, Tabelle 10). R1 und R2 wurden als Kontrollen weiterhin bei 40°C und 2,56 g L<sup>-1</sup> betrieben. In Abbildung 6 sind die Prozessregime der Reaktoren R1-R6 für die angewandten Temperaturen und Harnstoffkonzentrationen dargestellt.

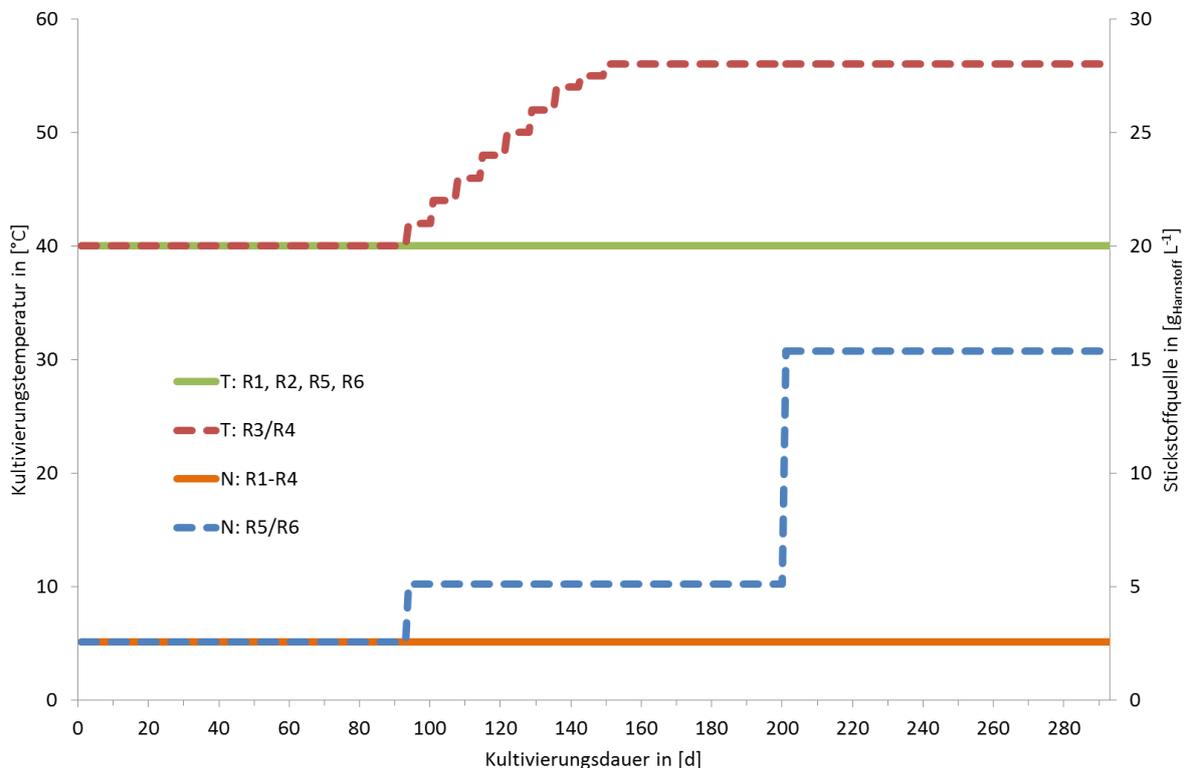


Abbildung 6: Kultivierungstemperaturen und Mengen der Stickstoffquelle im Kulturmedium über den Versuchszeitraum. T: Prozesstemperatur, N: Stickstoffquelle, R1-R6: Reaktoren 1-6.

### 3.1.5. Zufütterung und Beprobung

Bei einer durchschnittlichen Fütterung von 4,5 Substratgaben pro Woche stellte sich eine mittlere Verweilzeit von 62 d während der Hauptphase des Versuchszeitraums ein (Tag 14-298, siehe Tabelle 10, Berechnung der HRT gemäß Formel 1).

Über die gesamte Kultivierungsdauer von 298 d erfolgte fortan die Beprobung direkt vor jeder Substratgabe unter Beibehaltung eines Kultivierungsvolumens von 400 mL. Um bei der Entnahme der Probe die volumetrische Gasmessung nicht zu stören, wurde der Abluftschlauch kurz vorher mit einer Schlauchklemme verschlossen und nach der Substratgabe wieder geöffnet. Vor der Probenrückstellung bei -20°C wurde der pH-Wert mit einer externen pH-Elektrode (Basic Meter PB-11 und PY-P20 Elektrode, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) für jeden Reaktor überprüft.

## 3.2. Anreicherung methanproduzierender Mikrobiome auf Medium mit Ethanol

Die im Folgenden vorgestellte Kultivierung methanogener Mikrobiome diente der Erzeugung von Prozessdaten für die Validierung eines metabolischen Netzwerkmodells (Abschnitt 2.5), das im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr.-Ing. Sabine Koch (Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme Magdeburg, Deutschland) erstellt und publiziert wurde [23]. In Zusammenarbeit mit Dr.-Ing. Sabine Koch erfolgte ebenfalls die Planung und Auswertung des Versuchs (Abschnitt 4.2). Die Durchführung der Experimente fand im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn Patrick Lahmann (B.Sc.) statt.

### 3.2.1. Bioflo 320 Bioreaktorsystem

Für die Kultivierung wurden zwei baugleiche BioFlo 320 Reaktorsysteme mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 2 L verwendet (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland, im Folgenden bezeichnet als U1 und U2). Über den Reaktordeckel wurden jeweils der Messfühler für die Temperaturregelung, eine pH-Sonde (ISM 12/225 mm, Mettler Toledo, Columbus, Ohio, *engl.: United States of America*, Vereinigte Staaten von Amerika, USA), der Rührermotor (Rushton Rotor mit direct-drive Motor, 533898-15, Industrial Indexing Systems, Victor, New York), ein Abgaskühler mit Anschluss an das Gasanalyzesystem „GärOnA“ (Abschnitt 3.3), ein Probenahme-Ventil sowie der Medienzulauf und Biomasseablauf eingebracht bzw. angeschlossen. Für den Zulauf wurden eine der vier eingebauten peristaltischen Pumpen,

gasdichte Schläuche mit einem Innendurchmesser von 1,59 mm (APST-0063-0188, AdvantaPure, NewAge Industries, Southampton, Pennsylvania, USA) und sterile Kanülen verwendet (Sterican 1,20 x 50 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Der Ablauf erfolgte über eine externe peristaltische Pumpe (120U/DV analogue control variable speed pump, Watson-Marlow, Falmouth, Cornwall, UK) und Schläuche mit einem Innendurchmesser von 4,76 mm (APST-0188-0313, AdvantaPure, NewAge Industries, Southampton, Pennsylvania, USA). Die Temperierung wurde mittels Wärmeübertragung durch den Reaktorboden erreicht, für eine gewichtsabhängige Füllstands-Regelung wurde der Reaktor auf eine Waage gestellt. Um einen möglichen Einfluss von Licht auf die Biomasse sowie einen Wärmeverlust über die Glaswand zu minimieren, wurden die Reaktoren mit Aluminiumfolie umwickelt. Mittels Touchscreen-Monitor (Elo TouchSystem, Inc., Menlo Park, Kalifornien, USA) erfolgte die Prozesskontrolle und Überwachung, weiterhin wurde ein externer Rechner angeschlossen, der mit Hilfe der Software BioCommand Batch Control (Version 4.01.0006, New Brunswick Scientific, Enfield, Connecticut, USA) die Datensicherung durchführte.

### 3.2.2. Inokulation

Die Inokulation erfolgte mit Biomasse aus den zuvor angereicherten Kulturen auf Medium mit Glukose und Zellulose (Abschnitt 3.1). Dazu wurden die mesophilen Kontrollregime R1 und R2 nach Abschluss der eigentlichen Versuchsphase weitere 220 d (bis Tag 520) wie zuvor quasi-kontinuierlich kultiviert. Dann wurde die Hauptkohlenstoffquelle des Mediums von Glukose und Zellulose auf Ethanol umgestellt (Abschnitt 3.2.3) und weitere 80 d (bis Tag 600) verwendet, um eine Adaption der Mikrobiome zu ermöglichen. In Vorbereitung auf den Transfer der Biomasse wurden jeweils 500 mL Medium mit Wasser statt Ethanol im Reaktor vorgelegt, der Kopfraum für 5 min mit Stickstoff begast und anschließend mit jeweils 150 mL aus R1 und R2 beimpft. Dieser Vorgang wurde an den folgenden Tagen wiederholt, bis sämtlicher Inhalt von R1 und R2 auf U1 und U2 übertragen war. Die folgenden 27 d wurden die Reaktoren im Zulaufverfahren (*engl.: fed-batch*) betrieben, indem alle 8 h ein Fütterungspuls von 7 mL gegeben wurde. Mit dem Erreichen des Zielvolumens von 1,5 L wurde die *transient-state* Kultivierung gestartet (Abschnitt 3.2.4), im Folgenden bezieht sich die Kultivierungsdauer immer auf diesen Zeitpunkt.

### 3.2.3. Ethanolmedium

Die Herstellung des Mediums erfolgte wie in Abschnitt 3.1.3 gemäß Tabelle 7, allerdings ohne Zellulose und die Stocklösung für Glukose. Stattdessen wurden je 100 mL Medium 14,6 mL Ethanol ( $2,5 \text{ mol}_{\text{Ethanol}} \text{ L}_{\text{Medium}}^{-1}$ ) eingesetzt und die Menge an vollentsalztem (VE) Wasser zum Auffüllen angepasst. Das C:N:P-Verhältnis des Ethanolmediums betrug 400:7:1, respektive einem C:N:P:S-Verhältnis von 1.268:22:3:1. Für Bestimmung der Förderraten der Pumpen über definierte Prozessintervalle anhand der Massendifferenzen der Medienflaschen wurde die Dichte des Mediums bestimmt, diese lag bei  $0,975 \text{ g mL}^{-1}$ .

### 3.2.4. *Transient-state* Prozessführung

Nach Abschluss der Inokulation (Abschnitt 3.2.2) erfolgte die *transient-state* Kultivierung, deren einzelne Phasen wiederum prozesstechnisch einem kontinuierlichen Betrieb entsprachen. Über den gesamten Prozesszeitraum betrug die Temperatur  $40^\circ\text{C}$  und die Rührergeschwindigkeit 100 Umdrehungen pro Minute (upm). Die Volumenkonstanz des Reaktorinhalts (1,5 L) wurde über einen Regelkreis mittels Zulaufpumpe, Ablaufpumpe und Waage realisiert. Initial wurde eine HRT von 100 d angestrebt (vgl. Formel 1). Nach einer Prozessdauer von mindestens sieben Tagen und Erreichen eines stabilen Prozesses (Gasbildungsrate, Gaszusammensetzungen und pH-Werte) erfolgte jeweils eine umfassende Probenahme (Abschnitt 3.2.5) und anschließend durch Erhöhung der Flussrate der Zulaufpumpe die Verringerung der HRT um zehn Tage (HRT 90 d, HRT 80 d, usw.).

### 3.2.5. Beprobung

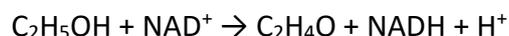
Die ganzheitliche Beprobung beider Reaktoren erfolgte bei Erreichen stabiler Gasbildungsrate, Gaszusammensetzungen und pH-Werte für mindestens 24 h, frühestens jedoch nach sieben Tagen ab Verringerung der HRT. Sie umfasste jeweils 7 mL für die Bestimmung der Biotrockenmasse (Abschnitt 3.2.7), die direkt im Anschluss durchgeführt wurde. Außerdem wurden 3 mL Material zentrifugiert (5 min, RT,  $16.400 \times g$ ), über einen  $0,2 \mu\text{m}$  Spritzenvorsatzfilter filtriert (Whatman SPARTANTM 13/0.2 RC Filter Units, GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland) und der zellfreie Überstand anschließend bis zur Bestimmung der Restethanol-Konzentration (Abschnitt 3.2.6) oder der organischen Säuren (Abschnitt 3.4) bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Weitere 5 mL Biomasse wurden direkt bei  $-20^\circ\text{C}$

gelagert, um sie zu einem späteren Zeitpunkt für die Metaproteomanalyse (Abschnitt 3.6) und die Lowry-Proteinbestimmung (Abschnitt 3.2.7) zu verwenden.

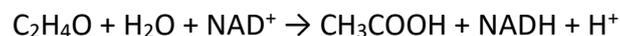
Nach Bedarf wurden einzelne Analysen, bspw. die Bestimmung der Biotrockenmasse, häufiger durchgeführt, um die Datendichte zu erhöhen.

### 3.2.6. Ethanolbestimmung

Die Bestimmung von Ethanol erfolgte mittels zweier enzymgekoppelter Reaktionen [118], bei denen pro Molekül Ethanol zwei Moleküle Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form, NADH) gebildet werden (Faktor 2 im Nenner von Formel 17 und Formel 19). Über eine photometrische Absorptionsmessung bei 340 nm konnte die Konzentrationszunahme von NADH detektiert und quantifiziert werden kann. Im ersten Schritt oxidiert Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form, NAD<sup>+</sup>) Ethanol enzymatisch mittels Alkohol-Dehydrogenase zu Acetaldehyd (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) und NADH (Formel 15). Gebildetes Acetaldehyd oxidiert anschließend in Anwesenheit des Enzyms Aldehyd-Dehydrogenase zu Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH) und NADH (Formel 16).



Formel 15



Formel 16

Unter Zuhilfenahme einer allgemeinen Berechnungsformel (Formel 17) erfolgt dann die Bestimmung Ethanolkonzentration  $c$  anhand der Absorptionsänderung  $\Delta A$ , die durch die Enzymzugabe und die damit verbundene Bildung von NADH eintritt. Weiterhin werden die folgenden Parameter für die Berechnung herangezogen: Volumen des Testansatzes  $V$ , Molmasse von Ethanol  $M$ , Extinktionskoeffizient von NADH  $\epsilon$ , Schichtdicke der Küvette  $d$  und das Volumen der Probe  $v$ .

$$c = \frac{V \times M \times \Delta A}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000}$$

Formel 17

Die Bestimmung der Restethanol-Konzentration im Reaktor erfolgte offline in zellfreien Überständen, die direkt nach der Beprobung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden (Abschnitt 3.2.5). Dazu wurde ein fotometrischer Ethanol-Test verwendet (10176290035, Boehringer Mannheim/R-Biopharm AG Darmstadt, Deutschland). Die Herstellung der gebrauchsfertigen Lösungen erfolgte gemäß Angaben des Herstellers. Abweichend davon wurden Küvetten mit einem Volumen von 1 mL statt der vorgeschlagenen 3 mL verwendet, weshalb die jeweils eingesetzten Mengen der Proben, Puffer und Enzymlösungen entsprechend auf ein Drittel reduziert wurden. Die Bestimmung von Ethanol erfolgte jeweils in Triplikaten unter Einsatz von 33  $\mu\text{L}$  der Probenlösung, bei jeder Bestimmung wurde ebenfalls eine Negativkontrolle mit VE-Wasser durchgeführt. Zur Ermittlung der Absorptionsänderung  $\Delta A$  wurde jeweils die Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm vor Zugabe der Enzymlösung ( $A_1$ ) und erneut 10 min nach Zugabe bestimmt ( $A_2$ , Formel 18). Durch Einsetzen der gültigen Parameter in Formel 17 ergibt sich die Ethanolkonzentration in Abhängigkeit von  $\Delta A$  zu Formel 19.

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{Probe}} - (A_2 - A_1)_{\text{Negativkontrolle}}$$

Formel 18

$$c = \frac{1,05 \text{ mL} \times 46,07 \text{ g mol}^{-1} \times \Delta A}{6,3 \text{ L mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times 0,033 \text{ mL} \times 2 \times 1000} = 0,115 \text{ g L} \times \Delta A$$

Formel 19

### 3.2.7. Biomassekonzentration

Für die Abschätzung der Biomassekonzentrationen in den Reaktoren wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Einerseits erfolgte die Bestimmung der Biotrockenmasse. Dazu wurden für 4 h bei  $160^{\circ}\text{C}$  behandelte und anschließend ausgewogene Petrischalen verwendet ( $m_1$ ). Nach Zugabe von 7 mL frischer Probe erfolgte die Trocknung bei  $105^{\circ}\text{C}$  über Nacht und eine erneute Wiegung. Aus der Differenz der beiden Wiegeungen vor und nach dem Eintrocknen ( $m_2$ ) und unter Berücksichtigung des Trockengewichts vom Medium allein ( $m_{\text{Medium}}$ ) sowie der eingesetzten Probenmenge konnte die Biomassekonzentration berechnet werden (Formel 20).

$$\text{Biomassekonzentration [g L}^{-1}\text{]} = (m_2 - m_1 - m_{\text{Medium}}) [\text{g}] \times \frac{1000}{7} [\text{L}^{-1}]$$

Formel 20

Zusätzlich wurde auf Grundlage der „3.4 Arbeitsanweisung Proteinbestimmung in einer Zellsuspension V01“ (Version 1, 02.03.2017) eine Proteinbestimmung durchgeführt. Bei dieser Variante des klassischen Lowry Assays erfolgt die Bestimmung des Proteingehalts direkt aus dem Probenmaterial und nicht anhand des Proteinextrakts [73]. Zur Homogenisierung der Biomasseflocken wurden 200  $\mu\text{L}$  Probe und 1 g Silikaperlen (Abschnitt 3.6.1) in ein 2 mL Reaktionsgefäß gegeben und 1 min bei 30 Hz geschüttelt. Von der erzeugten Suspension wurden anschließend 25  $\mu\text{L}$  mit 100  $\mu\text{L}$  einer 2 M Natriumhydroxid-Lösung auf einem Schüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) für 1 min bei 99°C und 1.300 upm inkubiert, um den Aufschluss der Zellen zu erreichen. Mit dem Zelllysat erfolgte nun die Proteinbestimmung nach Lowry.

### 3.3. Gasanalyzesystem „GärOnA“

Für die Analyse des gebildeten Biogases wurde das GärOnA-System der Gesellschaft zur Förderung von Medizin- Bio- und Umwelttechnologie e.V. und der ECH Elektrochemie Halle GmbH (beide Halle, Deutschland) verwendet. Dieses vollautomatische Gärtestsystem diente der volumetrischen Bestimmung der gebildeten Gasmengen sowie deren Zusammensetzungen auf Grundlage der Handlungsvorschriften für statische und dynamische Gärtests der Richtlinie des Verbands Deutscher Ingenieure (VDI-Richtlinie) 4630 für die „Vergärung organischer Stoffe- Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche“ vom April 2006.

Das GärOnA-System bestand aus einem Gaschromatographen (GC), einem auf 40°C temperierten Inkubationsschrank (KB 115, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) mit innenliegenden Messplätzen für Gärtests. Je Messplatz stand ein Messkopf mit integriertem Druck- und Temperatursensor mit GL 45-Verschraubung zur Verfügung. Für die Benutzung von Bioreaktoren wurden die im Messkopf verbauten Drucksensoren über Teflonschläuche für den Gastransfer durch die Inkubator-Rückwand nach außen geführt und mit den Abgaskühlern verbunden. Abgeleitetes Gas wurde über eine Transferverbindung dem MobilGC (ECH Elektrochemie Halle GmbH, Halle, Deutschland) zugeführt.

Die Inbetriebnahme des Gasmesssystems erfolgte gemäß „10.4 Arbeitsanweisung Gärtest GärOnA GC V02“ (Version 2, 04.07.2018) unter Verwendung folgender Messzellenparameter: unteres Drucklimit 900 mbar, Entlüftungsdruck 1.050 mbar, Probenahmezeit 180 s, Abflusszeit 30 s, Wartezeit 300 s. Kalibrierung, Steuerung der Messautomatik des GC sowie Parametrisierung der GC-Messläufe erfolgten über die Software MobilGC Version 13.03 (ECH Elektrochemie Halle GmbH, Halle, Deutschland). Nach 2 s begann die Datenaufzeichnung, das Probenschleifenventil schaltete die Probenschleife jeweils nach 10 s für 20 s in den Trägergasfluss vor die Säule. Folgende Parameter wurden für die vorgelegten Messläufe eingestellt: Gasanalytik (Einzelpeak-Auswertung), externes Startsignal, Messabbruch-Kriterium nach 4,9 min. Die Peaks wurden automatisch integriert, über ihre Retentionszeiten und Peakflächen annotiert sowie quantifiziert und schließlich von der GärOnA-Software WinRespi 32 Version 3.0.7 (Gesellschaft zur Förderung von Medizin- Bio- und Umwelttechnologie e.V., Halle, Deutschland) importiert. WinRespi stellte die Konzentrationen der gemessenen Gase, Druck- und Temperaturverläufe sowie gebildete Gasmengen über die Zeit für jede Messzelle dar. Gasmengen in NL wurden dabei unter Berücksichtigung der gemessenen Temperaturen und den vorgegebenen Kopfraumvolumina der Reaktoren aus den Druckänderungen mithilfe des idealen Gasgesetzes bestimmt.

### **3.4. Bestimmung von Ammonium und organischen Säuren**

Die Bestimmungen von Ammoniumstickstoff ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) und der organischen Säuren wurden am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme Magdeburg von Frau Claudia Best und Herrn Dipl.-Biol. (t.o.) Thomas Bissinger durchgeführt.

Zwei mL der frischen Bioreaktorprobe wurden zentrifugiert (5 min, RT, 16.400 x g) und der gewonnene Überstand über einen 0,2  $\mu\text{m}$  Spritzenvorsatzfilter filtriert (Whatman SPARTANTM 13/0.2 RC Filter Units, GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland). Die Filtrate wurden vor der  $\text{NH}_4^+$ -Bestimmung mittels BioProfile® (Nova Biomedical, Waltham, Massachusetts, USA) mit hochreinem Wasser 1:10, 1:20, 1:40 und 1:50 verdünnt (Millipore Type 1 ultrapure water, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Aus den resultierenden  $\text{NH}_4^+$ -Konzentrationen wurden mit Hilfe der Formel 2 die entsprechenden  $\text{NH}_3$ -Konzentrationen bestimmt [33].

Formiat, Acetat, Laktat, Propionat und Butyrat wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie quantifiziert (Dionex ICS-5000 Reagent-Free HPIC System, Thermo Fisher

Scientific Inc.) Von aufgetauten Rückstellproben wurden jeweils 2 mL zentrifugiert (5 min at 16.400 x g und RT), der Überstand wurde wie zuvor mit 0,2 µm Spritzenvorsatzfiltern filtriert, 1:100 mit hochreinem Wasser verdünnt und in 2 mL Glasküvetten überführt (WIC 41150 und WIC 43945/B, WICOM Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland). Mittels automatischem Probengeber (Dionex AS-AP Autosampler) wurden 5 µL in das Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie-System (HPLC) mit Eluentengenerator (Dionex ICS-5000+ EG mit Kaliumhydroxid-Kartusche) und Elektrolytunterdrückung (Dionex AERS 500 2 mm) injiziert. Die organischen Säuren wurden mittels zweier Anionenaustausch-Säulen (Dionex IonPac AS11 Analytical Column 2 x 250 mm, Thermo Fisher Scientific Inc.) und einem Kaliumhydroxid-Gradienten bei einer Flussrate von 0,35 mL min<sup>-1</sup> getrennt: 0-2 min, linear 0,2-0,5 mM; 2-8 min, isokratisch 0,5 mM; 8-10 min, linear 0,5-3,0 mM; Regeneration: 3 min 50 mM, 5 min 0.2 mM). Die Detektion der Analyten erfolgte durch einen Leitfähigkeits-Detektor. Anhand einer vorangegangenen Methodvalidierung wurden eine Detektionsgrenze und eine untere Quantifizierungsgrenze festgelegt, wozu ein externer Standard mit verschiedenen Konzentrationen (1-310 µM) der zu bestimmenden Komponenten verwendet wurde (vgl. Abschnitt 4.1.1 und Abschnitt 4.2.2 für jeweils gültige Grenzen).

### **3.5. Genetische Fingerabdrücke der Anreicherungskulturen mittels T-**

#### **RFLP**

Die T-RFLP-Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit als Fingerabdruckmethode zur Bestimmung der genetischen Diversität von Mikrobiomen im zeitlichen Verlauf verwendet. Eine Untergliederung erfolgte hierbei in die Schritte (i) Extraktion der mikrobiellen DNA (Abschnitt 3.5.1), (ii) Amplifikation der 16S rRNA-Gensequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (*engl.: polymerase chain reaction, PCR*), DNA-Aufreinigung und Quantifizierung (Abschnitt 3.5.2), (iii) Visualisierung und Restriktionsverdau (Abschnitt 3.5.3), sowie (iv) Größenbestimmung der terminalen Restriktionsfragmente (T-RFs) mittels Kapillar-Gelelektrophorese und laserinduzierter Fluoreszenz (CGE-LIF) in einem DNA-Sequenzierer (ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City CA, USA) und Datenauswertung (Abschnitt 3.5.4).

Den im Folgenden beschriebenen Arbeitsabläufen lagen die „*Arbeitsanweisung\_T-RFLP-Methode\_Ver8\_Uni*“ (Version 8, 28.02.2011), die Publikation von Rademacher et al. (2012) [119] sowie die entsprechenden Protokolle der Anbieter bei Verwendung entsprechender Kits

zugrunde. Diese sind in der „11.1 Arbeitsanweisung DNA Extraktion PCR TRFLP V05“ (Version 5, 13.01.2015) zusammengefasst, die auf Anfrage von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt werden kann.

### 3.5.1. Probenaufschluss und DNA-Extraktion

Der Aufschluss und die DNA-Extraktion erfolgten mittel FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, USA). Dazu wurden 500 µg bzw. 500 µL in das Aufschlussgefäß gegeben, mit 978 µL Phosphatpuffer und 122 µL MT-Puffer versetzt und anschließend 2 min bei 30 Hz in einer Kugelmühle (MM 400, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) geschüttelt. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 14.000 x g und RT erfolgte das Überführen des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß, die Zugabe von 250 µL PPS-Lösung zur Proteinfällung, das zehnmahlige Invertieren sowie ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 min, 14.000 x g, RT). In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden der so gewonnene Überstand mit 1 mL Bindungspuffer gemischt und 2 min lang invertiert. Zum Absetzen des Matrixmaterials wurde der Ansatz 3 min stehen gelassen, danach wurden 500 µL des klaren Überstands verworfen. Nach dem Resuspendieren der Matrix durch Schütteln wurden 700 µL auf einen SPIN-Filter pipettiert und bei 14.000 x g und RT zentrifugiert, bis keine Flüssigkeit mehr auf dem Filter stand. Das Auffanggefäß wurde entleert und der Vorgang so lange wiederholt, bis sämtliche Matrix filtriert war. Das Retentat wurde mit Filter auf ein neues Auffanggefäß gesetzt, in 500 µL SEWS-M-Lösung resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Nach dem Entleeren des Auffanggefäßes wurde der Ansatz zum Trocknen der Matrix erneut zentrifugiert und 5 min unter einem Abzug stehen gelassen. Abschließend erfolgte das Umsetzen des trockenen SPIN-Filters auf ein neues Auffanggefäß, die Matrix wurde mit 100 µL DES-Wasser resuspendiert und 5 min bei 55°C inkubiert, bevor die Elution der an die Matrix gebundenen DNA durch Zentrifugation wie zuvor erfolgte. Das DNA-Extrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.5.2. DNA-Amplifikation und Quantifizierung

Für die Amplifikation der 16S rRNA-Gensequenzen wurden jeweils Primerpaare bestehend aus einem Rückwärtsprimer (*engl.: reverse, r*) und einem am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) fluoreszenzmarkierten Vorwärtsprimer (*engl.: forward, f*) verwendet. In getrennten Ansätzen erfolgten eine PCR für Archaeen (6-FAM-Ar109f [120] und Ar912r [121]) und eine für Bakterien (6-FAM-27f [122] und 926MRr [123]); alle Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg,

Deutschland). Die Pipettierschemata und das PCR-Programm des Thermocyclers (T3000, Biometra, Göttingen, Niedersachsen) sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Die Aufreinigung der amplifizierten DNA erfolgte mittels QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). 25 µL des PCR-Produkts wurden mit 125 µL PB-Puffer versetzt, auf die Matrix der QIAquick Säule gegeben und auf ein Auffanggefäß gesetzt. Nach einer Zentrifugation bei 17.000 x g und RT für 1 min wurde dieses entleert und die Säulenmatrix mit 750 µL PE-Puffer während einer weiteren Zentrifugation wie zuvor gewaschen. Das Auffanggefäß wurde ersetzt, zum Trocknen der Matrix erfolgte eine dritte Zentrifugation. Abschließend wurde die Matrix mit 50 µL EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) versetzt, 1 min bei RT inkubiert und die DNA mittels Zentrifugation in ein neues Auffanggefäß eluiert. Der Filter wurde verworfen und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Quantifizierung der aufgereinigten DNA-Amplifikate erfolgte mittels Tecan Infinite 200 PRO NanoQuant und einer NanoQuant DNA-Platte (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz). Für die Referenzwert-Erfassungen wurden auf jeden Probenplatz der Platte 2 µL EB-Puffer pipettiert und der Träger dann in den Reader gegeben. Mit Hilfe der Bedien- und Auswertesoftware Tecan i-control (Tecan Group Ltd.) erfolgte die Vorgabe der DNA-Platte („Nano Quant Tecan16 Flat black“, Tecan Group Ltd.), der Messwellenlänge (260 nm und 280 nm) und der Nukleinsäureart (doppelsträngige DNA, dsDNA). Nach der Referenzwert-Erfassung wurden zweimal 2 µL jeder Probe auf den Träger gegeben und gemessen, die DNA-Konzentrationen wurden automatisch berechnet und in einer Excel-Arbeitsmappe ausgegeben.

### **3.5.3. Visualisierung und Restriktionsverdau**

Um den Erfolg der Amplifikation des Zielgens zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 1 g Agarose in 100 mL Puffer aus 890 mM Tris, ortho-Phosphorsäure (Titration auf pH 7,5) und 2 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) gelöst (TPE-Puffer) und bei 700 W für 2 min in einer Mikrowelle (MW 7809, Sundern, Deutschland) erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Unter Rühren wurden 10 µL DNA-Farbstoff (DNA Stain Clear G, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) hinzugegeben und der Ansatz anschließend in den vorbereiteten Gelgießstand gegeben. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer (GH202, biostep

GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland) eingesetzt, mit TPE-Puffer überschichtet und beladen. 5 µL GeneRuler 1 kb Plus DNA Leiter (#SM1333, Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Deutschland) wurden als Größenstandard im Bereich 75-20.000 Basenpaare (bp) aufgetragen, 8 µL Proben-DNA wurden vor dem Laden mit 2 µL 5-fach Ladepuffer (BBS gel loading dye, FastDNA™ SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals, Solon, USA) gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 50 V für 1 h, für die Visualisierung wurde ein Fototisch mit Ultraviolett-Lampe (Royal Bio-Imaging System-Intas Gel iX Imager, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) verwendet.

Für den Verdau archaeeller DNA-Amplifikate wurden 250 ng DNA mit Wasser für die Molekularbiologie auf 17 µL aufgefüllt, mit 2 µL 10-fach Tango-Puffer und 1 µL der Restriktionsendonuklease AluI (10 U µL<sup>-1</sup>, beide #ER0011, Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Deutschland) gemischt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach einer Hitzeinaktivierung bei 65°C für 20 min erfolgte die Lagerung bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

Der Verdau bakterieller DNA erfolgte in zwei Schritten. Auch hier wurden 250 ng DNA mit Wasser für die Molekularbiologie auf 17 µL aufgefüllt, mit 2 µL 10-fach Tango-Puffer und 1 µL der Restriktionsendonuklease MspI (10 U µL<sup>-1</sup>, beide #ER0541, Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Deutschland) gemischt und für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte bei 80°C für 20 min, im Anschluss wurde 1 µL der Restriktionsendonuklease Hin6I (10 U µL<sup>-1</sup>, #ER0481, Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Deutschland) hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 4 h bei 37°C und einer 20-minütigen Inaktivierung bei 65°C erfolgte die Lagerung bei -20°C bis zur weiteren Verwendung.

### **3.5.4. Kapillar-Gelelektrophorese und Datenauswertung mittels glyXtool**

Die Analysen der T-RF aus den vorangegangenen Amplicon-Verdaus erfolgte anhand multiplex Kapillar-Gelelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenzdetektion mit Hilfe eines 4-Kapillar DNA-Sequenzierers (xCGE-LIF, ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City) [119]. Jede der vier verwendeten Kapillare besaß eine effektive Länge von 50 cm (Applied Biosystems), als Trennmatrix wurde unverdünntes POP-6™-Polymer verwendet (Applied Biosystems). Zu analysierende Proben wurden 1:10 in Hi-Di™ verdünnt (Applied Biosystems) und mit einem internen Größenstandard versetzt (35-500 bp, *Gene Scan*™ 500 ROX™, Applied Biosystems) [124]. Injiziert wurden die Proben über 20 s bei 1,5 kV und über 6.500 s bei 12,2 kV und 50°C getrennt.

Erzeugte Daten der Elektropherogramme wurden mittels Data File Converter Software (Applied Biosystems) von dem FSA- in das XML-Datenformat konvertiert und weiterhin mit der glyXtool Software (Version 5.2.5., glyXera GmbH, Magdeburg, Deutschland) prozessiert. Dies umfasste u.a. die Migrationszeit-Normalisierung anhand des internen Basenpaar-Standards. Folgende Softwareparameter wurden verwendet: (1) settings file: Standard\_POP6.set; (2) peak number threshold: 100; (3) peak picking intensity threshold (entspricht der unteren Quantifizierungsgrenze): 10 times signal-to-noise ratio; (4) left peak picking limit: -10 migration time units; (5) right peak picking limit: 700 migration time units and (6) baseline correction using moving averages. Zuerst wurden die Höhen aller Peaks eines Elektropherogramms auf die entsprechende Gesamtintensität normalisiert, um mögliche Variationen in der DNA-Beladung für vorangegangene PCR abzubilden [125]. Für jedes Set an Elektropherogrammen einer Probe, bestehend aus den jeweils sechs gemessenen Replikaten, wurden gemeinsame Peaks mittels Migrationszeit-Abgleich identifiziert (maximale Toleranz der normalisierten Migrationszeiten:  $\pm 0,5$  units). Diese Peaks der normalisierten Elektropherogramme entsprachen jeweils einzelnen T-RF, wobei nur T-RF für die Folgeauswertung betrachtet wurden, die in mindestens vier der sechs Replikate einer Probe identifiziert wurden [119]. Diese sogenannten Konsensuspeaks wurden aus dem Mittelwert der Migrationszeiten und dem Median der Intensitäten gebildet. Da dieses Verfahren wiederum Einfluss auf die Anzahl der Peaks eines Elektropherogramms hatte, und somit auch auf seine Gesamtintensität, wurden T-RF-Intensitäten wiederum auf die Gesamtintensitäten der neuen Konsensus-Profile normalisiert. Abschließend konnte nun der Probenvergleich anhand der entsprechenden Profile erfolgen, wobei für die genetischen Fingerabdrücke der bakteriellen oder archaeellen Gemeinschaften nur T-RF berücksichtigt wurden, deren normalisierte Intensitäten  $>3\%$  betragen [119].

### **3.6. Metaproteomik**

Bei der Extraktion, Aufreinigung, Quantifizierung, Separation und MS-basierten Analyse mikrobieller Metaproteome wurde zum Teil auf bereits zuvor publizierte Methoden oder etablierte hausinterne Arbeitsanweisungen zurückgegriffen. Diese werden entsprechend beschrieben und referenziert. Im Folgenden werden die Abläufe der Analysen zusammengefasst, Abweichungen von den genannten Protokollen sowie die im Rahmen der Arbeit entwickelten Methoden werden ausgeführt.

### 3.6.1. Probenvorbereitung und Proteinseparation

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen Aufarbeitungsschritte von Biomassen beschrieben, wobei immer von bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlten Primärproben ausgegangen wird. Die Visualisierung extrahierter und getrennter Proteine mittels SDS-PAGE ist dabei ein wichtiges Bewertungskriterium für die Qualität der vorangegangenen Methodenabschnitte und ist Ausgangspunkt für den darauf folgenden in-Gel-Verdau (Abschnitt 3.6.2).

#### Probenaufschluss, Proteinextraktion und Quantifizierung

Die hier verwendete Aufschluss- und Extraktionsmethode wurde 2013 von Heyer & Kohrs et al. publiziert und ist in den Arbeitsanweisungen „2.3 Arbeitsanweisung Phenolextraktion mit Kugelmühle V05“ und „V06“ (Version 5, 22.04.2016, Version 6, 07.11.2016) im Detail beschrieben. Amidoschwarz wurde bereits 1975 von Popov et al. [74] für die Proteinquantifizierung vorgeschlagen, worauf auch die Arbeitsanweisung „3.1 Arbeitsanweisung Proteinbestimmung mit Amidoschwarz V04“ (Version 4, 23.01.2015) beruht.

Für den Aufschluss der Biomasse wurden für jede Probe 400  $\mu\text{L}$  Material in jeweils fünf separate Reaktionsgefäße überführt, mit flüssigem Phenol und 2 molarer Saccharoselösung gemischt und mit Silikaperlen (0,5 mm Durchmesser, BioSpec Products Inc., Bartlesville, USA) für 20 min in einer Kugelmühle (MM 400, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) geschüttelt. Für die spätere Studie (Abschnitt 4.2) stand ein FastPrep-96 Homogenisator (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) zur Verfügung, der einen höheren Probendurchsatz erlaubte. Hierbei wurden je Ansatz 2 mL Material und 5 g Silikaperlen in ein 50 mL Reaktionsgefäß gegeben, mit 2 mL Saccharose- sowie 3,5 mL Phenollösung versetzt und dann für 5 min bei 1.800 upm aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation zum Ausbilden von zwei Phasen, dem phenolhaltigen Proteinextrakt oben und der wässrigen Saccharosephase unten, wurden die oberen Phasen aller fünf Aufschlüsse vereinigt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mittels eiskaltem  $\text{NH}_4^+$ -Acetat in Methanol erfolgte die Fällung der Proteinfraction aus Phenol bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , das nach Zentrifugation gewonnene Pellet wurde anschließend erneut mit  $\text{NH}_4^+$ -Acetat in Methanol gewaschen. Um Phenol und anorganische Salze weiter abzureichern, erfolgte jeweils zweimal abwechselnd das Waschen der Proteinpellets mit eiskaltem 80%-igem Aceton und eiskaltem 70%-igem Ethanol. Die Resuspension des Proteinextrakts erfolgte in einem denaturierenden Puffer aus  $7 \text{ mol L}^{-1}$  Harnstoff,  $4 \text{ mol L}^{-1}$  Thioharnstoff und

0,01 g mL<sup>-1</sup> 1,4-Dithiothreitol (DTT) über Nacht bei RT. Jeweils 10 µL Extrakt wurden für eine triplikate Proteinbestimmung mittels Amidoschwarz unter Verwendung einer Proteinstandard-Reihe mit 0,0-1,0 µg µL<sup>-1</sup> bovinen Serumalbumins herangezogen.

### SDS-PAGE und Gelfärbung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SDS-PAGE nach Laemmli [75] zur Visualisierung der Proteinextrakte mittels Coomassie Brilliant Blau verwendet („4.1 Arbeitsanweisung SDS-PAGE BIORAD klein V06“ Version 6, 05.04.2016, „5.1 Arbeitsanweisung Gelfärbung Coomassie V05“ Version 5, 22.04.2016) [126]. SDS-PAGE wurde zur Fraktionierung von Proteinen nach Molekulargewicht als Ausgangspunkt für einen anschließenden in-Gel-Verdau mit Trypsin genutzt.

Die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE erfolgte für die Proben zur Untersuchung der Dynamik und Stationarität von Mikrobiomen (Abschnitt 4.1) wie folgt: ein 25 µg Protein entsprechendes Volumen wurde mit SDS-Probenpuffer auf 40 µL aufgefüllt, 5 min bei 60°C und 1.400 upm inkubiert und dann bei 16.400 x g und RT für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die diskontinuierliche SDS-PAGE mit einem 12%-igen Trenngel und einem 4%-igen Sammelgel. Neben der Trennung der Proteine über die gesamte Länge des Gels wurde in einigen Fällen die Elektrophorese vorzeitig abgebrochen, nachdem die Lauffront wenige Millimeter weit in das Trenngel eingetreten war, die Proteine aber das Sammelgel bereits verlassen hatten (die farbigen Banden des Molekulargewicht-Standards dienten hierbei als Hilfsmittel, PageRuler™ Prestained Protein Ladder #26616, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Diese elektrophoretische Probenreinigung diente hierbei der präparativen Aufarbeitung der Probe für den Trypsinverdau ohne vorherige Proteinseparation. Die Gelfärbung mittels kolloidalen Coomassie-Brillant-Blaus wurde verkürzt, damit späteres Entfärben der Gelstücke nicht erschwert wurde. Bei der normalen Elektrophorese erfolgte das Abstoppen erst mit dem Erreichen der Lauffront des unteren Gelrandes. Das Gel wurde über Nacht in Färbelösung inkubiert. Die Elektrophorese-Gele wurden nach dem Scannen in VE-Wasser bei 4°C wenige Tage bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.6.2. Massenspektrometrische Proteinidentifikation

Im Rahmen der Arbeit kam ein Orbitrap Elite™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap MS (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Deutschland) zum Einsatz. Die Konfigurationen des gekoppelten HPLC-Systems, ihre Gradientenparameter und Lösungsmittel-Zusammensetzungen, sowie die MS-Messmodi unterschieden sich jeweils leicht. In den Ergebnissen (Kapitel 4) erfolgt jeweils der explizite Verweis auf die entsprechende Publikation [84, 87, 127], der das gültige Parametersetup der älteren Methoden entnommen werden kann.

#### Tryptischer in-Gel-Verdau

Die methodische Grundlage für den in-Gel-Verdau mit Hilfe der Endopeptidase Trypsin wurde von Shevchenko et al. [128] publiziert und ist in der Arbeitsanweisung „6.3 Arbeitsanweisung InGel-Verdau von zerschnittenen SDS-PAGE-Spuren V08“ (Version 8, 22.04.2016) beschrieben. Mit einem Skalpell wurden die entsprechenden Proteinbereiche zerschnitten und in wenige Millimeter große Würfel zerteilt. Bei der elektrophoretischen Probenreinigung (Abschnitt 3.6.1) wurde dazu die gesamte Proteinfraction ausgeschnitten und als ein Verdauansatz behandelt. Für Proteine, die mit SDS-PAGE getrennt wurden, erfolgte das Ausschneiden und horizontale Zerteilen der gesamten Gelspur in zehn gleichgroße Fragmente. Zum Entfärben wurden die Fraktionen zweimalig in einer Methanol-Essigsäure-Lösung inkubiert. Der Reduktion mit DTT und Alkylierung mit Iodacetamid schloss sich der eigentliche Verdau bei 37°C über Nacht mit einem Trypsin zu Protein-Verhältnis von 1:100 an. Abschließend erfolgte die Extraktion der Peptide zuerst mit 10%-iger Ameisensäure (*engl.: formic acid*, FA) und danach mit 50%-igem Acetonitril (ACN). Beide Extrakte wurden vereinigt und mittels Vakuumzentrifugation eingetrocknet.

#### LC-MS/MS-Analysen

Vor der Analyse des Peptidgemischs mittels LC-MS/MS wurde es in 12 µL Lösungsmittel A (2% ACN, 0,05% TFA, *engl.: trifluoroacetic acid*, Trifluoressigsäure) aufgenommen, resuspendiert und zentrifugiert, 11 µL des Überstands wurden in LC-Küvetten überführt und bis zur Messung bei -20°C gelagert. Für die Messung wurden 5 µL der Probe durch ein UltiMate 3000 nano splitted LC-System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) injiziert und auf einer C18-Umkehrphasen-Vorsäule in Kartuschenform konzentriert und entsalzt (Thermo Fisher Scientific Inc.). Die Trennung erfolgte in einer 250 mm Acclaim™ PepMap™ C18

RSLCnano Umkehrphasen-Säule mit einer Partikelgröße von 2 µm (Thermo Fisher Scientific Inc.) bei 40°C über 120 min in einem binären A/B-Lösungsmittel-Gradienten (A: 97,9% Wasser, 2% ACN, 0,1% FA; B: 80% ACN, 10% Trifluorethanol, 9,9% Wasser, 0,1% TFA) von 4-55% B. Eluierende Peptide wurden online mit dem Orbitrap Elite™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap MS (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Deutschland) in einem datenabhängigen Messverfahren analysiert. Dabei wurden die 20 intensivsten positiv geladenen Peptidionen je Messzyklus zur Fragmentierung mittels kollisionsinduzierter Dissoziation ausgewählt (350-2,000 m z<sup>-1</sup>). In der linearen Ionenfalle erfolgte dann die Aufnahme der Fragmentionenspektren (MS/MS-Spektren).

### 3.6.3. Bioinformatische Datenauswertung

Die aufgezeichneten Rohdaten (.RAW-Format) wurden mittels Proteome Discoverer Software 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) in das generische Mascotformat (.MGF-Format) umgewandelt.

#### Verwendete Datenbanken

Als Datenbank-Grundlage für die Proteinidentifikation wurden die kurierte, universelle Protein-Informationsdatenbank (*engl.: universal protein knowledge base*) UniProtKB/Swiss-Prot [81] sowie mehrere, zum Teil öffentliche Metagenome von biogasproduzierenden Mikrobiomen verwendet. Tabelle 13 enthält eine detaillierte Beschreibung der für die verschiedenen Studien verwendeten Sequenzdatenbanken.

#### Proteinidentifikation mittels Mascot-Datenbank-Suchalgorithmus und BLAST

Zur Identifikation von Peptiden und Proteinen anhand der MS/MS-Spektren wurde der Datenbank-Suchalgorithmus Mascot 2.5 verwendet (Matrix Science, London, England [80]). Die folgenden Parameter wurden eingestellt: tryptischer Verdau, maximal eine ausgelassene Spaltstelle pro Protein, monoisotopische Masse, variable Modifikationen von Cystein (Carbamido-Methylierung) und Methionin (Oxidation), 10 ppm Massentoleranz bei Peptidionen und 0,5 Da Massentoleranz bei Fragmentionen, ein <sup>13</sup>C-Atom, zweifache und dreifache Ladung von Peptidionen. Die Ergebnisdateien der Mascot-Suchen (mDAT) wurden in die MetaProteomeAnalyzer Software (<https://www.code.google.com/p/meta-proteome-analyzer/>, version 1.0.9 [85]) importiert (*engl.: false discovery rate, FDR ≤1%*). Hier erfolgte

auch die Annotation der Sequenzen der Metagenome mittels BLAST gegen UniProtKB/Swiss-Prot (Download November 2016) unter Verwendung eines Erwartungswerts (*engl.: expect value, e-value*) von  $10^{-4}$  [83]. Redundante Proteinidentifikationen wurden anschließend durch eine Proteingruppierung anhand der UniRef50-Cluster (*engl.: UniProt reference clusters, UniProt Referenzcluster*) zu nicht-redundanten Metaproteinen zusammengefasst [129]. Dabei erfolgte die taxonomische Klassifizierung der Metaproteine anhand des „letzten gemeinsamen Vorfahren“ (*engl.: lowest common ancestor, LCA*) ihrer jeweiligen Peptide. Abschließend wurden nun alle Metaproteine, die zugeordneten UniProtKB-Schlüsselwörter für biologische Prozesse und die Taxonomie auf Ordnungsebene zusammen mit der Anzahl identifizierter Spektren (*engl.: spectral count, SpC*) als .CSV-Textdatei (*engl.: comma separated values*) exportiert. Um Verwechslungen vorzubeugen, werden im Folgenden alle UniProtKB-Schlüsselwörter in ‚einfache Anführungszeichen‘ gesetzt.

### Proteinidentifikation mittels X!Tandem und OMSSA

Alternativ zur Mascot-Datenbanksuche und dem Import der Ergebnisse (siehe oben), können .MGF-Dateien auch direkt im MetaProteomeAnalyzer eingeladen und Proteine mittels der Suchalgorithmen X!Tandem [130] und/oder *Open Mass Spectrometry Search Algorithm* (OMSSA [131]) identifiziert werden. Hierfür wurde die Onlineversion 2.11 des MetaProteomeAnalyzers (<http://www.mpa.ovgu.de/>) mit den Suchmaschinen-Grundeinstellungen (*engl.: defaults*, Abbildung 7) und der Metagenomsammlung von Heyer et al. 2016 (Tabelle 13) verwendet [87]. Analog der mittels Mascot identifizierten Proteine wurde anschließend eine Annotation mittels BLAST durchgeführt (e-value  $10^{-4}$ ) [83], Metaproteine gebildet („*Peptide Rule*“, „*have at least one peptide in common*“, LCA-Taxonomie) und dann als .CSV-Dateien exportiert (FDR  $\leq 5\%$ ).

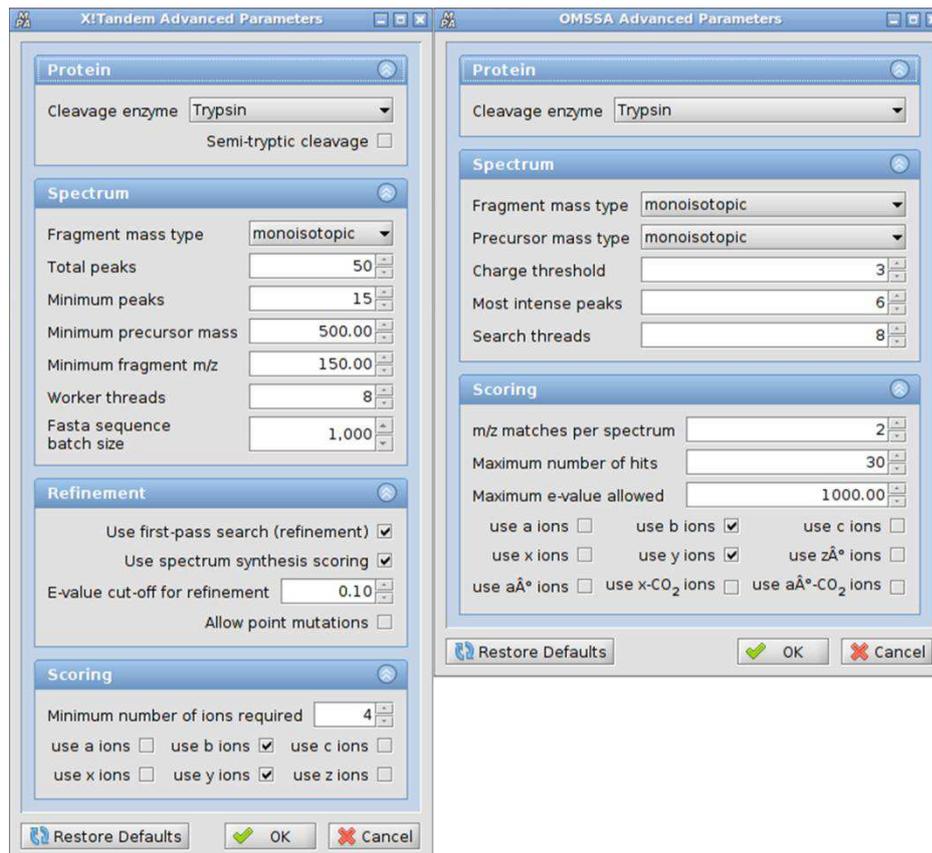


Abbildung 7: Suchmaschinen-Grundeinstellungen für X!Tandem und OMSSA des MetaProteomeAnalyzers. Version 2.11 der Onlineversion (<http://www.mpa.ovgu.de/>).

### Proteotyping mittels biostatistischer Analysen

Die hier angewandten Auswertungsverfahren wurden von Dr.-Ing. Robert Heyer als Skriptsammlung mit MATLABs statistischer *Bioinformatics Toolbox* (The MathWorks GmbH, Ismaning, Deutschland, Version 8.3.0.532 R2014a) implementiert und 2016 gemeinsam publiziert [87]. Der Anhang dieser Publikation enthält sowohl die Skripte als auch eine detaillierte Beschreibung zur Anwendung. Im ersten Schritt wurden die von der MetaProteomeAnalyzer-Software exportierten .CSV-Dateien extrahiert und als Datenmatrix aus Metaproteinen, ihren Taxonomien und UniProtKB-Schlüsselwörtern für biologische Prozesse mit den zugehörigen SpC abgelegt. Metaproteine ohne Identifikation oder BLAST-Annotation wurden für die Folgebetrachtungen nicht berücksichtigt (*engl.: unknown*). Danach erfolgte für die drei Datenebenen Metaproteine, Taxonomie und biologischer Funktion eine Normalisierung der SpC auf die Gesamt-SpC des Datensatzes einer Probe. Es wurden nur Einträge berücksichtigt, die in mindestens einer Probe und mit einer Abundanz  $\geq 1\%$  auftraten. Die Auswertungen erfolgte visuell anhand von Boxplots (Funktion *boxplot*), einer

hierarchischen Clusteranalyse (Funktion *dendrogram* mit *average distance* und *euclidian distance*), einer Hauptkomponenten-Analyse und zugehörigem *Loading-Plot* (Funktion *pca*).

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen der Studie zur Dynamik und Stationarität von Mikrobiomen erfolgte die taxonomische Untersuchung von Mikrobiomen unter gleichen Umweltbedingungen und stabiler Prozessleistung (Abschnitt 4.1). Ziel war die Identifizierung von Markerorganismen und Markerproteinen für die eingestellten Prozessbedingungen. Die zweite Reaktorstudie diente der Erzeugung von Prozessdaten für die Evaluierung und Verbesserung eines metabolischen Netzwerkmodells (Abschnitt 4.2). Hierbei sollte untersucht werden, wie anhand von Metaproteomdaten Informationen über die taxonomische Zusammensetzung der Prozessbiomasse gewonnen und die Bedeutung bestimmter Stoffwechselwege innerhalb einer Modellgemeinschaft erschlossen werden können.

### 4.1. Dynamik und Stationarität von Mikrobiomen

Im Rahmen dieser Studie wurden sechs parallel betriebene Laborbiogasanlagen mit Impfmateriale aus einer landwirtschaftlichen BGA inokuliert, um biogasproduzierende Mikrobiome unter definierten Bedingungen anzureichern. Ziel dieser Studie war es, anhand von Metaproteomanalysen die folgenden Fragen zu beantworten. (i): wie ähnlich sind sich Mikrobiome auf funktioneller und taxonomischer Ebene, die unter identischen Umweltbedingungen kultiviert wurden? (ii): lassen sich für Laborreaktoren, wie bereits für landwirtschaftliche BGA gezeigt [132], mithilfe von *Proteotyping* Markerspezies oder Markerproteine für die jeweiligen mesophilen, thermophilen oder Hochstickstoff-Regime identifizieren? Die für die Beantwortung dieser Fragen durchgeführten Untersuchungen und ihre Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt vorgestellt und diskutiert.

Aufbau, Inokulation und Betrieb der sechs Anreicherungskulturen R1-R6 sowie der Gasanalytik erfolgten wie in Abschnitt 3.1 beschrieben. Nach 93 d Prozesszeit wurden für alle Reaktoren Gleichgewichtszustände angenommen und es erfolgte die schrittweise Temperaturerhöhung der Reaktoren R3 und R4 sowie die Erhöhung der Harnstoff-Konzentrationen als Stickstoffquelle im Medium von R5 und R6. Die Prozessparameter der Reaktoren R1 und R2 wurden über die gesamte Kultivierungszeit von 298 d konstant gehalten (Abbildung 6). Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 8 die verschiedenen Prozessregime unter der Prozesszeit mit den jeweils durchgeführten Analysen dargestellt.

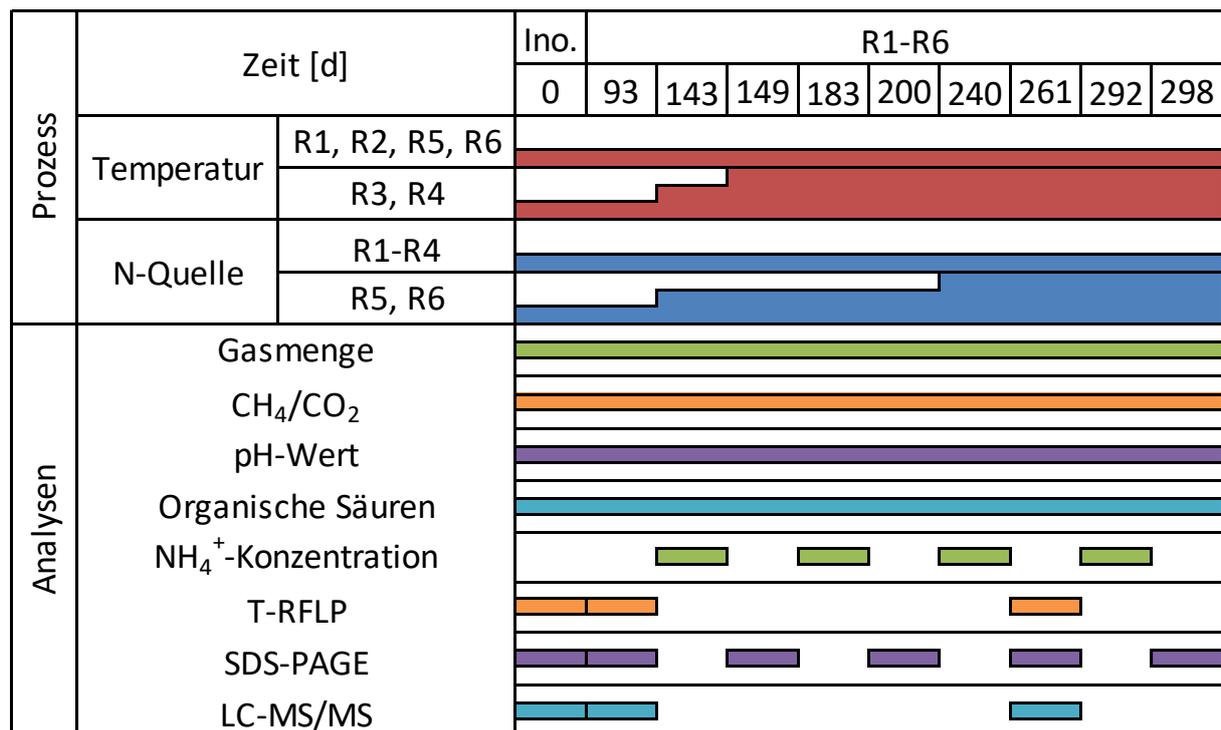


Abbildung 8: Analyseplan des Inokulums und der Anreicherungskulturen R1-R6. Oben: Prozess, Darstellung der Zeitverläufe der Prozesstemperaturen in R3 und R4 sowie der Stickstoff-Quelle (N-Quelle) im Medium in R5 und R6. Unten: Analysen, Zeitpunkte von Untersuchungen abiotischer und biotischer Prozessparameter. Durchgezogene Balken: kontinuierliche Analysen benannter Parameter. Ino.: Inokulum, T-RFLP: terminaler Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus, SDS-PAGE: Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese, LC-MS/MS: Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung.

#### 4.1.1. Abiotische Prozessparameter

Für alle in diesem Abschnitt berechneten Biogas-Bildungsraten wurden die Korrekturfaktoren für den jeweiligen Kopfraum des Reaktors berücksichtigt (gemäß Standard-Arbeitsanweisung, Tabelle 14). Diese Faktoren dienen der korrekten Umrechnung der Messsignale der Druckköpfe in entsprechende Normvolumina. Ihre Bestimmung ist notwendig, wenn Reaktorkopfräume mit unregelmäßiger Geometrie vorliegen, die nicht direkt errechnet werden können. Die Korrekturfaktoren wurden für R1-R6 wie folgt bestimmt: 1,791, 1,783, 1,940, 1,933, 1,695 und 1,732.

Prozessbegleitend wurden NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Konzentrationen bestimmt (vgl. Abbildung 8), um zu überprüfen, ob die im Medium von R5 und R6 vorgelegten Harnstoffanteile (Tag 93, Tabelle 10) ausreichen, eine NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Konzentration >3 gNH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup> einzustellen [133]. Da bis Tag 183 nur jeweils 1,83 gNH<sub>4</sub><sup>+</sup> L<sup>-1</sup> erreicht wurden, erfolgte eine weitere Anpassung des Mediums ab Tag 200 (Abbildung 6). Damit gelang an Tag 240 der Kultivierung die Einstellung von

Konzentrationen in R5 von  $5,05 \text{ gNH}_4^+ \text{ L}^{-1}$  ( $0,50 \text{ gNH}_3 \text{ L}^{-1}$ ) und  $5,07 \text{ gNH}_4^+ \text{ L}^{-1}$  ( $0,55 \text{ gNH}_3 \text{ L}^{-1}$ ) in R6 (Tabelle 12).

Nach einer kurzen Anlaufphase während der ersten beiden Wochen der Anreicherung, stiegen die täglichen Biogas-Bildungsraten der sechs Reaktoren auf im Mittel  $0,512 \pm 0,097 \text{ NL L}_{\text{RV}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Abbildung 9 bis Abbildung 11). Die Hochstickstoff-Regime R5 und R6 zeigten nach 200 Tagen fallende Produktionsraten von unter  $0,125 \text{ NL L}_{\text{RV}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Bis auf kleinere Fluktuationen zeigten auch die Methananteile des produzierten Biogases stabile Verläufe für alle Regime (Mittelwert  $53,8 \pm 6,7\% \text{ CH}_4$ ). Schwankungen des Verlaufs lassen sich durch die Fütterungen erklären, da die Freisetzung von  $\text{CO}_2$  zeitlich vor der Bildung von  $\text{CH}_4$  erfolgt, was initial zu höheren  $\text{CO}_2$ -Anteilen im Biogas führte. Überraschenderweise wurden einhergehend mit den abfallenden Biogasproduktionen in R5 und R6 ab Tag 200 keine abnehmenden Methankonzentrationen beobachtet.

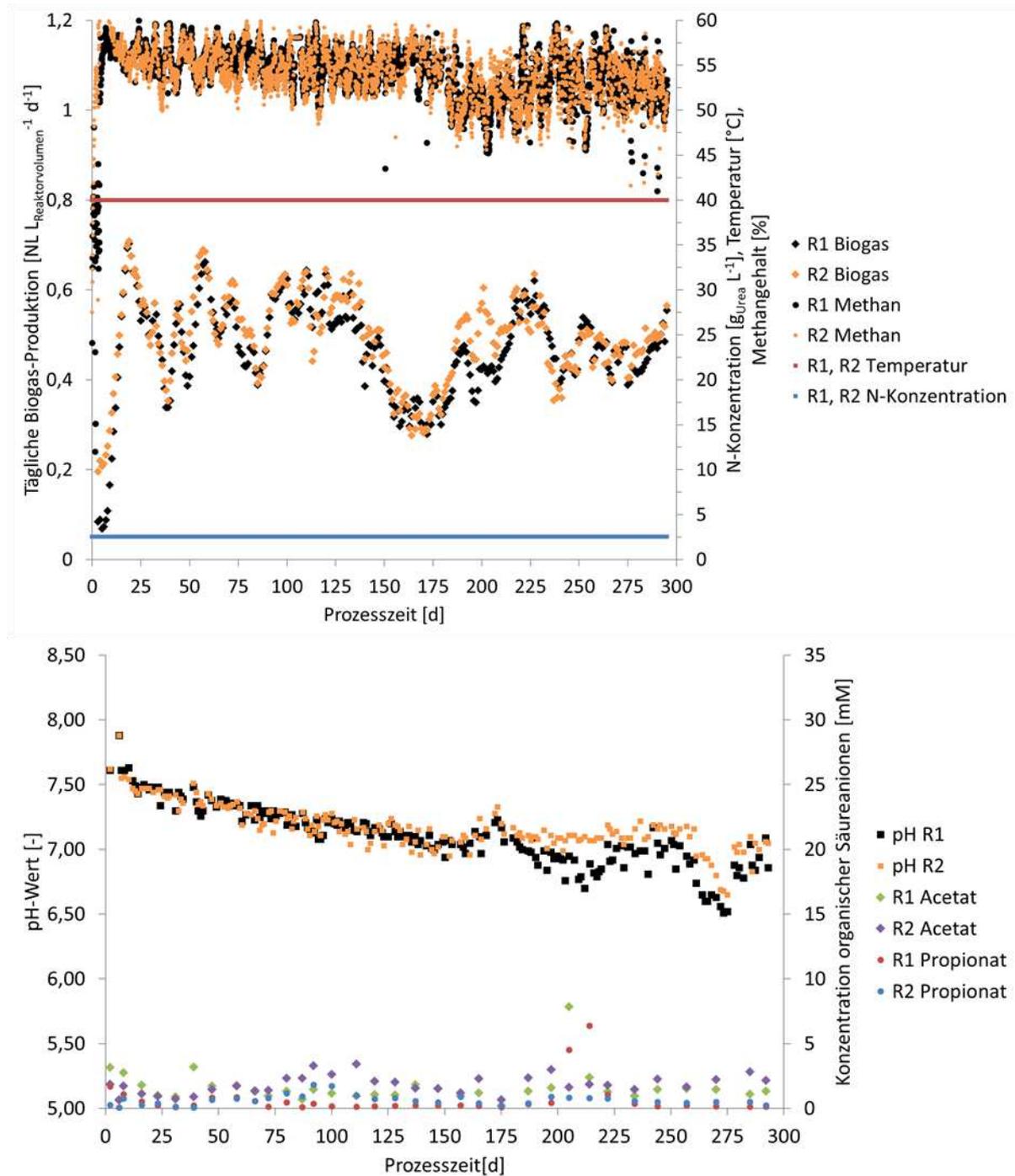


Abbildung 9: Abiotische Prozessdaten der mesophilen Regime R1 und R2. Oben: Temperatur, Stickstoffkonzentration des Mediums (N-Konzentration), Methangehalt und tägliche Biogas-Produktion für die Reaktoren R1 und R2. Letztere wird in  $\text{NL L}_{\text{RV}}^{-1} \text{d}^{-1}$  angegeben (Gasvolumen bei physikalischem Normzustand, Abschnitt 3.3). Biogas-Produktion: ungewichteter gleitender Mittelwert ( $\pm 3$  d); Methangehalt: Wert größer oder kleiner der doppelten Standardabweichung wurden als Ausreißer definiert und entfernt. Unten: pH-Werte, Acetat- und Propionatkonzentrationen (Abschnitt 3.4).

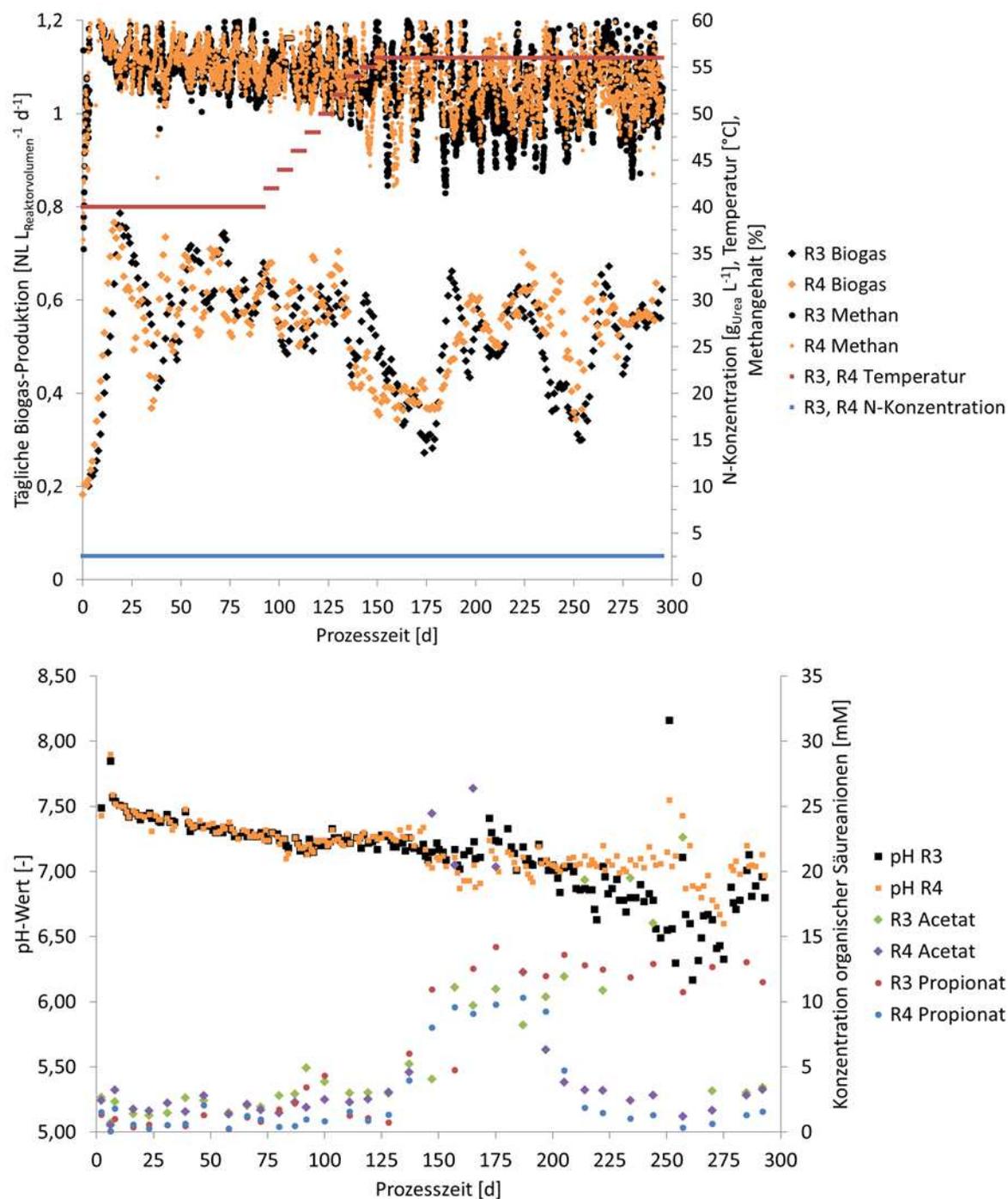


Abbildung 10: Abiotische Prozessdaten der thermophilen Regime R3 und R4. Oben: Temperatur, Stickstoffkonzentration des Mediums (N-Konzentration), Methangehalt und tägliche Biogas-Produktion für die Reaktoren R3 und R4. Letztere wird in  $\text{NL L}_{\text{RV}}^{-1} \text{d}^{-1}$  angegeben (Gasvolumen bei physikalischem Normzustand, Abschnitt 3.3). Biogas-Produktion: ungewichteter gleitender Mittelwert ( $\pm 3$  d); Methangehalt: Wert größer oder kleiner der doppelten Standardabweichung wurden als Ausreißer definiert und entfernt. Unten: pH-Werte, Acetat- und Propionatkonzentrationen (Abschnitt 3.4).

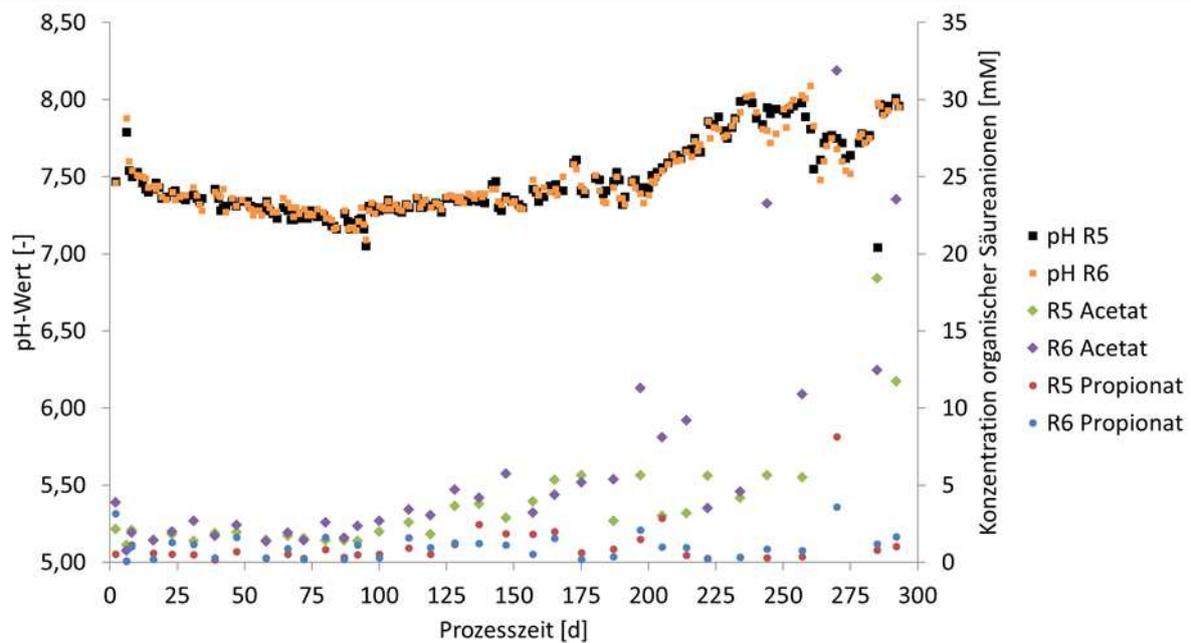
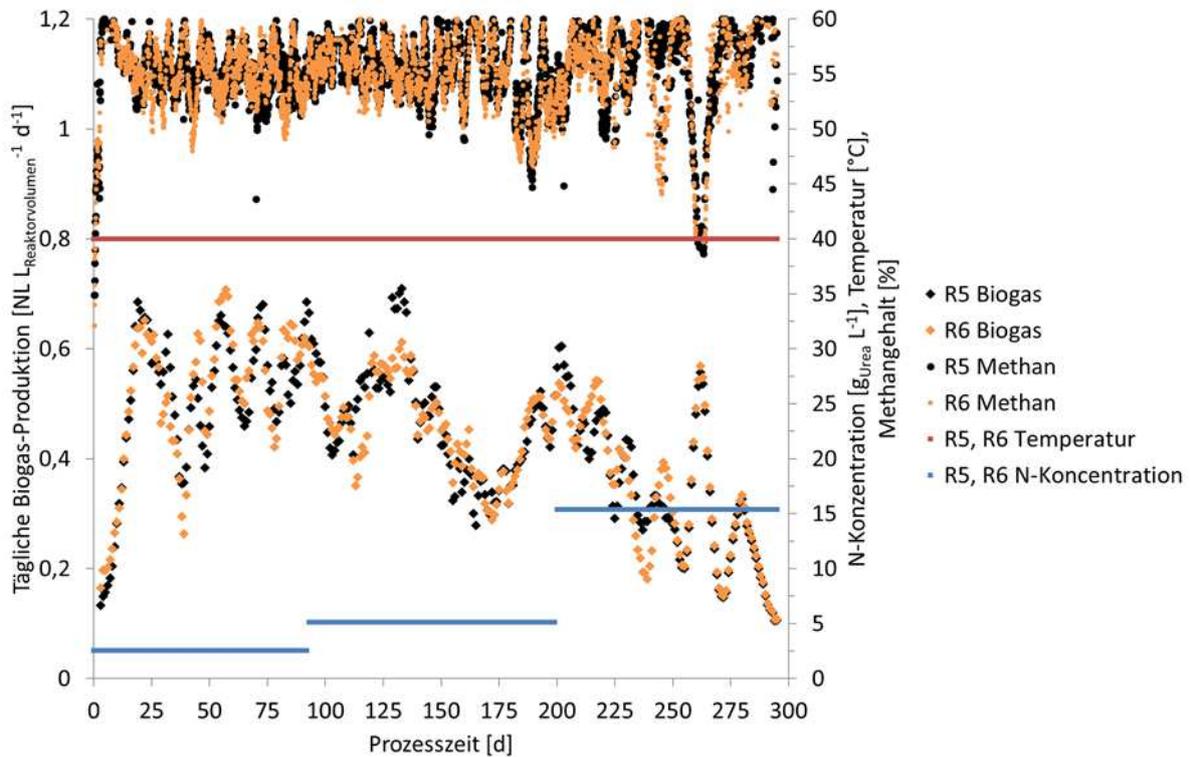


Abbildung 11: Abiotische Prozessdaten der Hochstickstoff-Regime R5 und R6. Oben: Temperatur, Stickstoffkonzentration des Mediums (N-Konzentration), Methangehalt und tägliche Biogas-Produktion für die Reaktoren R5 und R6. Letztere wird in  $\text{NL L}_{\text{RV}}^{-1} \text{d}^{-1}$  angegeben (Gasvolumen bei physikalischem Normzustand, Abschnitt 3.3). Biogas-Produktion: ungewichteter gleitender Mittelwert ( $\pm 3$  d); Methangehalt: Wert größer oder kleiner der doppelten Standardabweichung wurden als Ausreißer definiert und entfernt. Unten: pH-Werte, Acetat- und Propionatkonzentrationen (Abschnitt 3.4).

Der pH-Wert aller Reaktoren fiel von 7,5 an Tag 0 innerhalb der ersten 93 d stetig ab auf pH 7,1-7,3, was in guter Näherung dem pH-Wert des Mediums entspricht (pH 7,0). In R5 und R6 stieg der pH-Wert in Folge der ersten Stickstoff-Erhöhung im Medium (Tag 93) leicht auf 7,5 an, durch die zweite Erhöhung an Tag 200 nochmals weiter auf pH 8,0 (Abbildung 11). Im

Gegensatz dazu verblieben die pH-Werte der mesophilen und thermophilen Reaktoren bis Tag 175 der Kultivierung im Bereich 7,1-7,3. Im späteren Verlauf zeigte sich bei R3 und R4 ein leichter Abfall auf pH 6,5-6,9 (Abbildung 10), für R3 zeitweise sogar auf unter pH 6,2 an Tag 261), was wahrscheinlich auf die Akkumulation von FOS zurückzuführen ist (Abbildung 10, unten).

Vor der Analyse der organischen Säuren wurden die unteren Quantifizierungsgrenzen der erwarteten Analyten bestimmt (Abschnitt 3.4). Diese betragen 0,40 mM für Formiat, 0,23 mM für Acetat, 0,25 mM für Laktat, 0,28 mM für Propionat und 0,18 mM für Butyrat. Die Konzentrationen von Laktat, Formiat und Butyrat blieben über den gesamten Kultivierungszeitraum und in allen Reaktoren stabil bei <5 mM (Abbildung 37). Dies galt auch für die Konzentrationen von Acetat und Propionat in den Referenzreaktoren R1 und R2 (Abbildung 9), sowie für die anderen Regime (R3-R6) während der ersten 93 d Prozesszeit. In Folge der Temperaturerhöhungen in den thermophilen Reaktoren (R3, R4) stiegen die Konzentrationen von Acetat auf 10-20 mM und von Propionat auf 10 mM an (Abbildung 10). Während in R3 beide FOS für den Rest der Kultivierungszeit erhöht blieben, fielen die Konzentrationen von Acetat und Propionat in R4 zwischen 130 d und 200 d zurück auf das Ausgangsniveau von <5 mM. Die Hochstickstoff-Regime in R5 und R6 zeigten lediglich einen leichten Anstieg der Acetatkonzentrationen auf 5 mM in Folge der erhöhten Stickstoffkonzentration im Medium (93-200 d, Abbildung 11). Erst in der Schlussphase der Kultivierung (ab Tag 240) wurden Konzentrationen >10 mM Acetat gemessen.

Die für die Reaktoren R3-R6 über die gesamte Prozesszeit aufgezeichneten Methangehalte betragen im Mittel 53,7%-55,6% mit Standardabweichungen  $\leq 3,7\%$  (Abbildung 9 bis Abbildung 11). Mit Ausnahme der späteren Kultivierungsphasen von R5 und R6 (Abbildung 11) waren die gebildeten Biogasmengen ebenfalls ähnlich und relativ stabil, was gleichzeitig auf ein funktionell stabiles Mikrobiom hinwies. Um die Biogasproduktion qualitativ und quantitativ bewerten zu können, wurde mithilfe der empirischen Formel 4 von Boyle et al. die Biogasmenge und -zusammensetzung anhand der Substratzusammensetzung (Tabelle 7) bestimmt. Der theoretische Methananteil im Gas betrug 48,7% für R1-R6, respektive 43,3% aufgrund der angepassten Substratzusammensetzung (Abbildung 6) für R5 und R6 ab Tag 200. Die Abweichungen zu den gemessenen Werten erklären sich vermutlich durch eine höhere Löslichkeit von CO<sub>2</sub> im wässrigen Schlamm, woraus verhältnismäßig mehr Methan im

Kopfraum des Reaktors resultiert. Bei den regelmäßigen Probenahmen wird gelöstes CO<sub>2</sub> wiederum ständig aus dem Reaktor abgeführt, was sich in geringem Maße auch auf die Biogasausbeute auswirkte. Generell lagen die gemessenen Biogasmengen im Bereich von 60%-100% des theoretischen Gasertrags (Abbildung 36) für den Kultivierungszeitraum zwischen 50 d und 210 d. Anfängliche Ausbeuten >100% erklären sich durch eine Verschleppung von noch unverwertetem Substrat aus dem Animpfmaterial, welches während der ersten Prozesstage abgebaut wurde. Bei den Hochstickstoff-Regimen R5 und R6 war nach 250 d ein Einbruch der Ausbeute auf unter 20% zu verzeichnen. Dies ist zurückzuführen auf die Akkumulation von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> auf über 5 g L<sup>-1</sup> in Folge der zweiten Erhöhung von Harnstoff im Medium an Tag 200. Hohe NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Konzentrationen bewirkten ein Ansteigen der pH-Werte von 7,5 auf 8 (Abbildung 11), was wiederum das chemische Gleichgewicht von NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> in Richtung des toxischen Ammoniaks verschob und in errechneten Konzentrationen von 0,50 gNH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> und 0,55 gNH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> resultierte (Tabelle 12). Dieser Effekt wurde bereits in früheren Studien beschrieben, bei denen eine Vergiftung der methanogenen Mikroorganismen und ein damit verbundener Rückgang der Biogasproduktion ab Konzentrationen von 0,7 gNH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> für adaptierte [134] und 0,1 gNH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> für nicht adaptierte Gemeinschaften eintrat [135]. Ammoniaktoxizität wirkt sich besonders auf die acetoklastischen methanogenen Archaeen aus, was ebenfalls eine mögliche Erklärung für die zeitgleiche Akkumulation von Acetat in R5 und R6 lieferte (Abbildung 11). Fehlende acetoklastische Aktivität der Methanogenen allein hätte allerdings eine deutlich höhere Säureakkumulation zur Folge. Eine Limitierung der Säurebildung während der Hydrolyse und der primären Gärung ist sehr wahrscheinlich. Im Vergleich dazu waren die Zeitverläufe des pH-Werts und der FOS in den mesophilen Reaktoren R1 und R2 unauffällig (Abbildung 9). Bei den thermophilen Reaktoren R3 und R4 zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede bezüglich pH-Wert und FOS, nicht nur zu den anderen Regimen, sondern auch untereinander (Abbildung 10). In direkter Folge der Temperaturerhöhung kam es in R4 zu einer Akkumulation von Acetat und Propionat (von <5 mM auf >10 mM), die kurz nach Erreichen der maximalen Prozesstemperatur von 56°C wieder abgebaut wurde. Diesem Verhalten lag vermutlich die Adaption an die veränderten Umgebungsbedingungen zugrunde und damit verbunden eine Beeinträchtigung durch Temperaturstress. Ähnliche FOS-Verläufe wurden auch von Ziemińska-Buczyńska et al. [136] während der Temperaturerhöhung von mesophile auf thermophile Prozesstemperaturen beobachtet. In R3 blieben die ebenfalls gestiegenen Acetat- und Propionatwerte allerdings bei

>10 mM, was mitverantwortlich für einen geringeren pH-Wert im Vergleich zum biologischen Replikat R4 war (Abbildung 10). Aus bislang unbekanntem Gründen war das Mikrobiom in R4 besser in der Lage, sich an die Temperaturerhöhung zu adaptieren und die akkumulierten FOS zu verwerten. Sowohl Acetat [57] als auch Propionat [137] in hohen Konzentrationen wurden bereits als Marker für instabile Biogasprozesse beschrieben, allerdings wurden in den hier vorliegenden Kultivierungsexperimenten keine kritischen Konzentrationen erreicht. Offenbar deuten die bisherigen Prozessparameter verschiedene Zusammensetzungen der Mikrobiome in R3 und R4 an. Ungeachtet dieser Unterschiede zeigten die mesophilen und thermophilen Reaktoren, ebenso wie die Hochstickstoff-Regime während der ersten 200 d, eine aus der Sicht eines Anlagenbetreibers gute Biogasausbeute, was auf stabile Prozesse hinweist.

### **4.1.2. T-RFLP der 16S rRNA Gene**

Mit Hilfe von T-RFLP-Analysen wurden die 16S rRNA-Gene (16 Svedberg-Einheit der Ribosomen) von Archaeen (Abbildung 12) und Bakterien (Abbildung 13) im Inokulum und in allen Reaktoren jeweils vor (93 d) und nach (261 d) der Temperatur- bzw. Stickstoffhöhung untersucht (Abbildung 6). Für eine taxonomische Annotation der T-RF wäre die Erstellung einer Sequenzbibliothek nötig gewesen, was im Rahmen der Arbeit aus Kostengründen nicht möglich war.

Von den acht dominanten archaeellen T-RF, die im Inokulum detektiert wurden, in den Reaktoren R1-R6 konnten nach 93 d nur noch zwischen zwei und vier Fragmente nachgewiesen werden. Alle Reaktoren wiesen dafür neue und zum Teil spezifische T-RF auf. Ab Tag 261 d zeigten sich erneut veränderte Profile: T-RF 106 war eines der am meisten vorkommenden archaeellen Fragmente in R1-R6. Allgemein erscheinen die Profile gleicher Prozessregime an Tag 261 zueinander ähnlicher als noch an Tag 93.

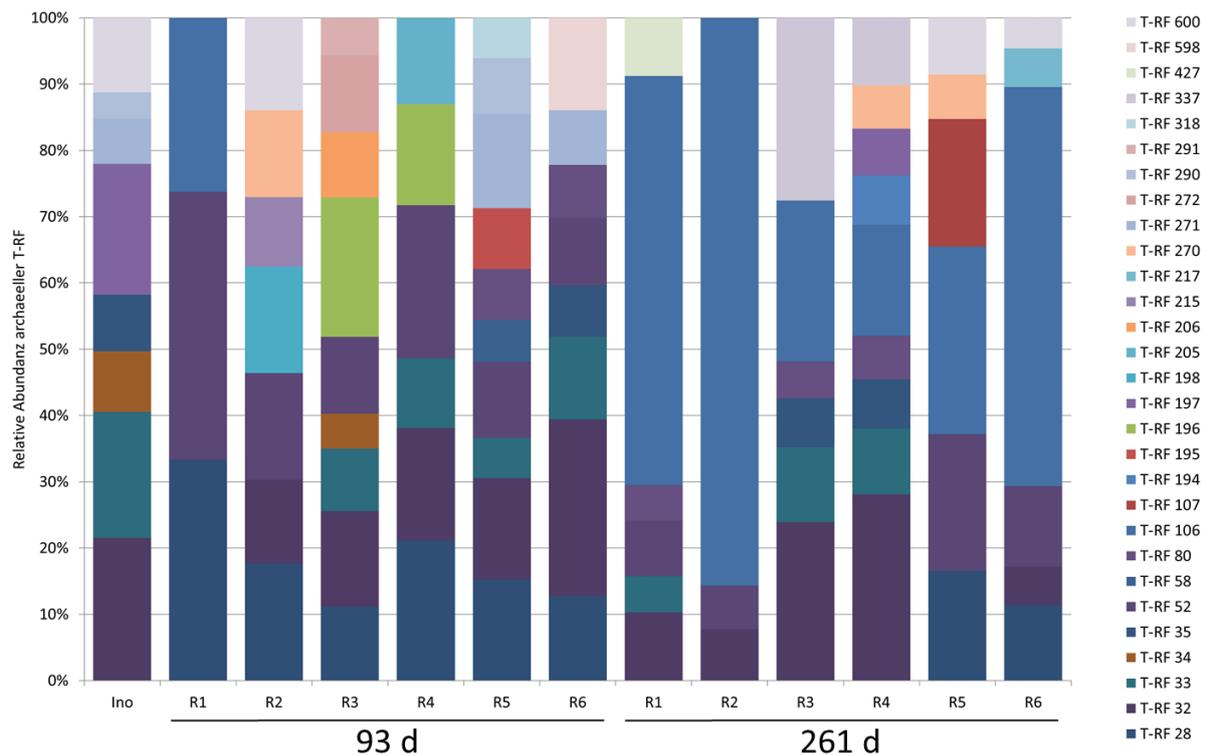


Abbildung 12: Archaeelle T-RF aus Inokulum und den Reaktoren R1-R6 an den Tagen 93 und 261 der Kultivierung. Die T-RF rechts entsprechen der jeweiligen Fragmentgröße in bp. Von jeder Probe wurden drei unabhängige DNA-Extraktionen mit zwei anschließenden PCR durchgeführt, woraus sechs Elektropherogramme resultierten (Abschnitt 3.5.) Nach der Normalisierung auf die Gesamtintensitäten wurden nur Amplicons mit einer relativen Abundanz von >3% berücksichtigt. T-RF: terminale Restriktionsfragmente.

Im Inokulum waren vier bakterielle T-RF nachweisbar (Abbildung 13). Die Zahl an T-RF insgesamt in dieser Probe war deutlich höher, ihre relative Abundanz erreichte jedoch nicht den geforderten Schwellenwert von 3%. In den Reaktoren R1-R6 wurden nach 93 d Kultivierungsdauer hingegen deutlich mehr Fragmente identifiziert. Weiterhin waren die T-RF-Profile der einzelnen Reaktoren sehr heterogen, was sich bereits bei den archaeellen Profilen beobachten ließ. Die taxonomische Komplexität reduzierte sich im mesophilen Reaktor 2 nach insgesamt 261 d auf nur noch drei Fragmente. Der thermophile Reaktor R3 wurde nach 261 d zu fast 80% von T-RF 67 dominiert. Für die beiden Hochstickstoff-Regime R5 und R6 wurde das Fragment 216 als das am meisten vorkommende identifiziert.

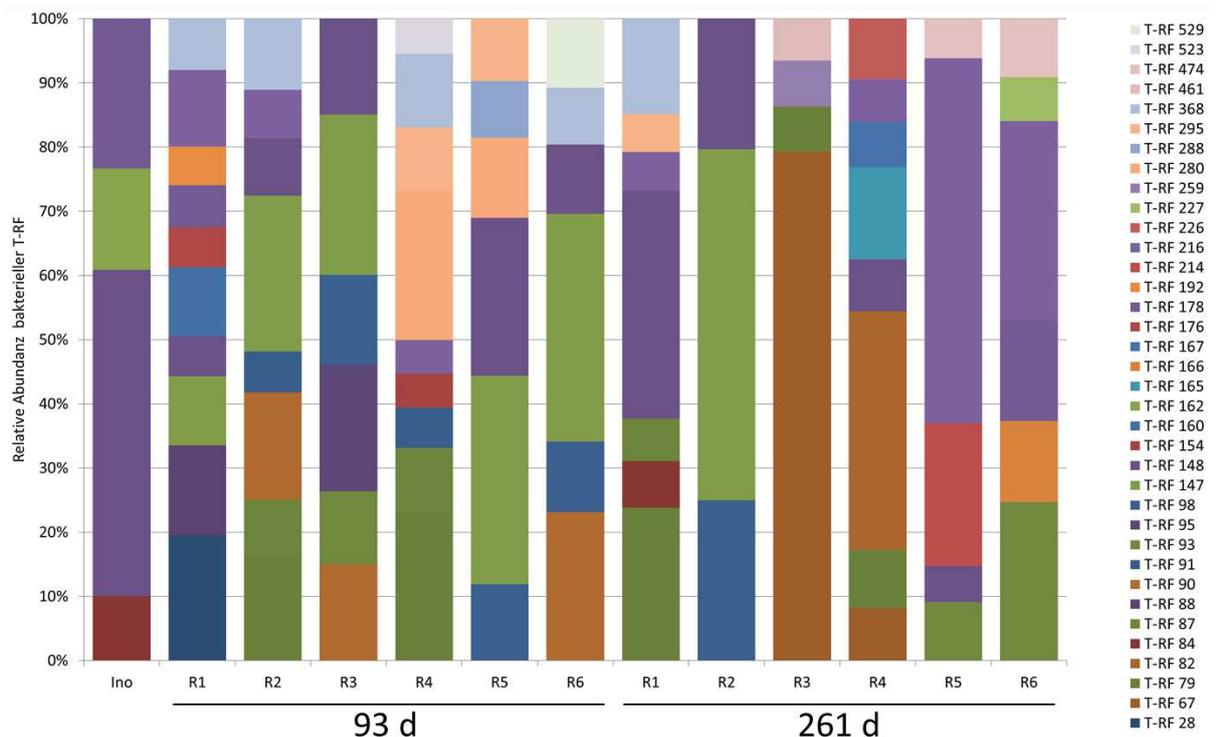


Abbildung 13: Bakterielle T-RF aus Inokulum und den Reaktoren R1-R6 an den Tagen 93 und 261 der Kultivierung. Die T-RF rechts entsprechen der jeweiligen Fragmentgröße in bp. Von jeder Probe wurden drei unabhängige DNA-Extraktionen mit zwei anschließenden PCR durchgeführt, woraus sechs Elektropherogramme resultierten (Abschnitt 3.5.) Nach der Normalisierung auf die Gesamtintensitäten wurden nur Amplicons mit einer relativen Abundanz von >3% berücksichtigt. T-RF: terminale Restriktionsfragmente.

Eine Sequenzbibliothek zur taxonomischen Annotation der T-RF stand nicht zur Verfügung. Als Alternative wurde versucht, mithilfe des Webdienstes MiCA3 einen theoretischen Verdau der dort verfügbaren öffentlichen Archaeen- und Bakteriendatenbanken mit 16S rRNA-Sequenzen durchzuführen (Version Oktober 2016) [138]. Es zeigte sich allerdings, dass die vorgeschlagenen taxonomischen Zuordnungen überwiegend ‚*uncultured archaeon*‘ bzw. ‚*uncultured bacterium*‘ lauteten und somit keine genauere Klassifikation erlaubten (nicht dargestellt). Unabhängig von einer Annotation ermöglichten die T-RFLP-Profile trotzdem einen Vergleich der genetischen Diversität des Inokulums sowie der verschiedenen Reaktoren und Probenahme-Zeitpunkte (Abbildung 12 und Abbildung 13). Für Archaeen und Bakterien zeigten sich jeweils Veränderungen des T-RF-Profiles ausgehend vom Inokulum zu den Reaktoren R1-R6 an Tag 93. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass für R1-R6 bis Tag 93 die gleichen Prozessparameter eingestellt waren und diese somit als biologische Replikate betrachtet werden konnten. Trotzdem zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den genetischen Fingerabdrücken, was wiederum auf verschiedene Mikrobiome hinweisen könnte. Interessanterweise zeigten nicht nur die Regime mit veränderten Prozessparametern (R3, R4: Temperaturerhöhung; R5, R6: Stickstofferhöhung im Medium) Verschiebungen im T-

RF-Profil nach 261 d, sondern auch die mesophilen Referenzregime R1 und R2. Dies bedeutet, dass entweder die Kultivierung über fast 9 Monate (mehr als die vierfache HRT) nicht zum Einstellen eines biologischen Gleichgewichtszustands ausreichte oder die Mikrobiome in den verschiedenen Reaktoren im Rahmen gewisser Grenzen, die durch die Prozessparameter gesetzt werden, einer fortwährenden Dynamik unterliegen. Letzteres würde auch die Heterogenität der T-RF-Profile von Archaeen und Bakterien zwischen den entsprechenden biologischen Replikaten erklären, vor allem an Tag 93 der Anreicherung. Ob die Unterschiede in den Mikrobiomen als Ursache oder als Resultat der in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen FOS und pH-Wert-Unterschiede zwischen R3 und R4 (Abbildung 10) angesehen werden können, bleibt offen. Mit Blick auf die Biogasausbeuten ist aber festzuhalten, dass die strukturellen Verschiedenheiten die Gasproduktion weder qualitativ noch quantitativ nennenswert beeinflussten, was bestätigt, dass Biogasprozesse relativ robust betrieben werden können.

### **4.1.3. Proteinfingerabdruck mittels SDS-PAGE**

Ähnlich der T-RFLP-Analysen (4.1.2) wurden Proteinprofile des Inokulums und aller Reaktoren von Tag 93 und 261 mittels SDS-PAGE erzeugt, um anhand der Größenverteilungen der Proteine Aussagen über mögliche Einflüsse der verschiedenen Prozessbedingungen auf die Mikrobiome treffen zu können. Entgegen den Erwartungen zeigten die Proteinprofile der Reaktoren R1-R6, die bis zum Tag 93 prozesstechnisch als biologische Replikate zu betrachten sind, bereits Unterschiede (Abbildung 14) und bestätigten somit die Ergebnisse der T-RFLP-Analysen (4.1.2). Neben kleineren Veränderungen konnte ausschließlich bei R1 eine sehr intensive Proteinbande bei 18 kDa Molekulargewicht nachgewiesen werden, während R2 und R3 jeweils eine spezifische Bande unterhalb 15 kDa aufwiesen. Weiterhin fehlten in den Gelspuren von R2 und R5 einige hochmolekulare Strukturen im Bereich >180 kDa, die in den anderen Reaktoren zu sehen waren. Im Vergleich zu Tag 93 zeigten die Profile aller Reaktoren nach der Adaption an die veränderten Prozessbedingungen (261 d) wiederum deutliche Unterschiede (Abbildung 14, bspw. R1: spezifische Bande bei 15 kDa; R4: weniger hochmolekulare Proteine >100 kDa als R3; R5 und R6: unterschiedliche Muster im Bereich 15-25 kDa).

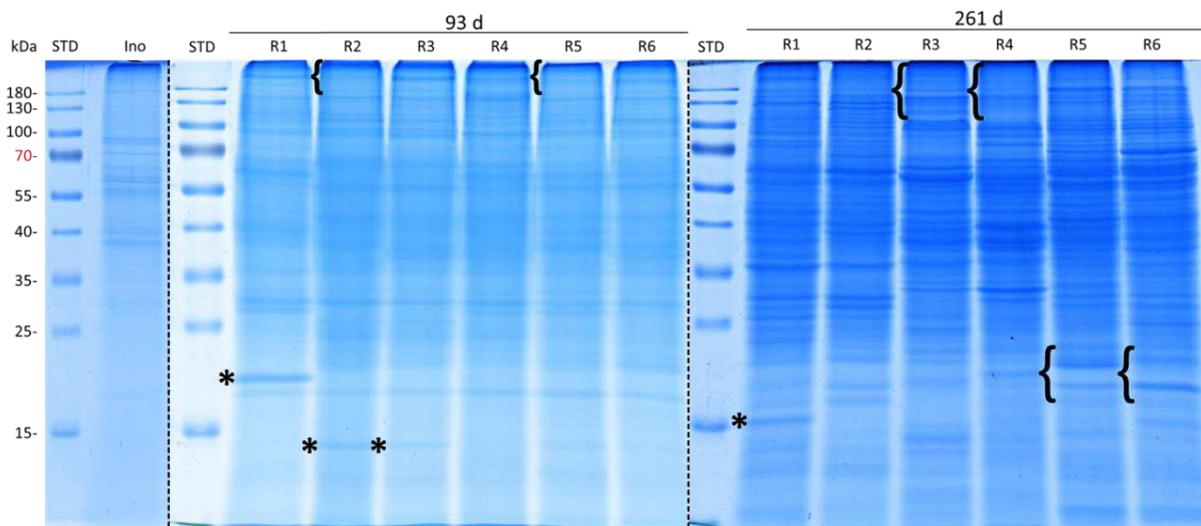


Abbildung 14: SDS-PAGE von Proteinextrakten des Inokulums und der Reaktoren R1-R6 an den Tagen 93 und 261. Proteinprofile des Inokulums (Ino), der mesophilen Reaktoren (R1 und R2), thermophilen Reaktoren (R3 und R4) und Hochstickstoff-Reaktoren (R5 und R6); je Probe und Spur wurden 25 µg Proteinextrakt geladen (Ino 100 µg), die Visualisierung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau (Abschnitt 3.6.1). Gelbereiche mit Unterschieden im Proteinmuster sind mit \* und { gekennzeichnet. STD: Standard, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, kDa: Kilodalton.

Wie auch bei den T-RFLP-Analysen (Abbildung 12 und Abbildung 13), zeigten sich in den Proteinfingerabdrücken deutliche Unterschiede zwischen den biologischen Replikaten der Reaktoren bis Tag 93, den Replikaten der jeweiligen Proben an Tag 261 und auch zwischen beiden Probenahme-Zeitpunkten der mesophilen Referenzreaktoren R1 und R2 (Abbildung 14). In Übereinstimmung mit der genetischen Fingerabdruck-Methode mittels T-RFLP, wiesen auch die Größenverteilungen des Metaproteoms mittels SDS-PAGE darauf hin, dass die gewählten, definierten Kultivierungsparameter strukturelle Unterschiede der angereicherten Mikrobiome zuließen, ohne die Produktion von Biogas wesentlich zu beeinflussen.

#### 4.1.4. *Proteotyping* und reaktorspezifische Metaproteine

Für eine umfassendere Untersuchung der Mikrobiome wurden das Inokulum sowie die Reaktorproben R1-R6 von den Tagen 93 und 261 elektrophoretisch aufgereinigt (Abschnitt 3.6.1), einem tryptischen in-Gel-Verdau unterzogen und anschließend massenspektrometrisch analysiert (Abschnitt 3.6.2). Dabei erfolgte die gelbasierte Aufarbeitung des Inokulums als Triplikat (Ino1-3) und die MS-Analyse jeder Probe als technisches Messreplikat (Probensuffix 1 bzw. 2). Nach der bioinformatischen Datenauswertung zur Proteinidentifikation (Abschnitt 3.6.3) erfolgte die Analyse der Datensätze mit Hilfe verschiedener *Proteotyping*-Ansätze auf Grundlage der UniRef50-Metaproteine und ihrer normalisierten SpC.

Im ersten Schritt sollte die Reproduzierbarkeit der MS/MS-Analysen untersucht werden. Dazu wurden die Datensätze auf Grundlage der UniRef50-Metaproteine und ihren SpC einem hierarchischen Clustering unterzogen (Abbildung 15). Es bestätigte sich, dass jeweils die Replikate der einzelnen MS/MS-Messungen bzw. die technischen Replikate der Proteinextraktionen des Inokulums die jeweils größten Ähnlichkeiten zueinander zeigten, wobei das Inokulum einen deutlich getrennten Subcluster bildete. Während die Proben der verschiedenen Reaktoren nach 93 d klar voneinander getrennt waren, bildeten sie doch innerhalb des Dendrogramms einen gemeinsamen Zweig. Im Gegensatz dazu verteilten sich die Proben der Kultivierungs-Endpunkte (261 d) über den gesamten Clusterbaum: die Hochstickstoff-Regime R5 und R6 zeigten eine verhältnismäßig geringe Distanz zum Inokulum. Die mesophilen Regime R1 und R2 wiesen zueinander eine große Ähnlichkeit auf, separierten sich aber vom Inokulum. Im Gegensatz dazu zeigten die thermophilen Regime R3 und R4 untereinander große Unterschiede. Der Cluster mit R3 261 d stellte sogar den Zweig mit der größten Distanz zu allen anderen Proben.

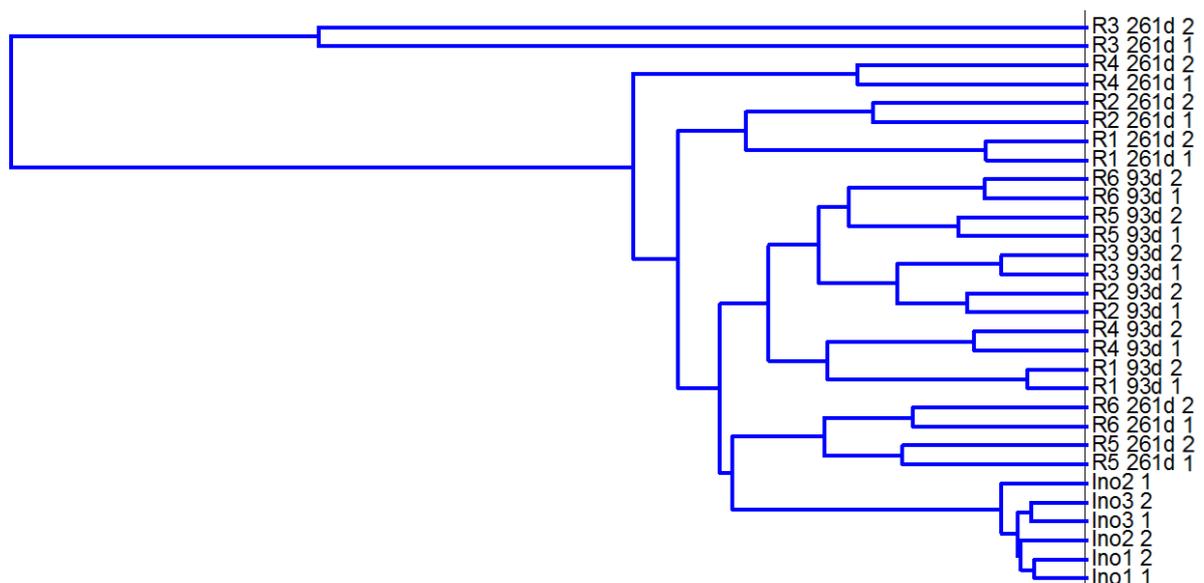


Abbildung 15: Hierarchisches Clustern von UniRef50-Metaproteinen des Inokulums und der Reaktoren R1-R6. Die Daten der Messreplikate der MS/MS-Analysen (Probensuffix 1 bzw. 2) des Inokulum (Ino) und aller Regime nach 93 d und 261 d (R1, R2: mesophil; R3, R4: thermophil; R5, R6: Hochstickstoff) wurden zur Überprüfung der technischen Reproduzierbarkeit dargestellt. Zusätzlich wurden Proteinextrakte des Inokulums nach der SDS-PAGE (Abschnitt 3.6.1) als Triplikate (Ino1-3) tryptisch verdaut (Abschnitt 3.6.2). Nach der Normalisierung der SpC jedes Metaproteins auf die jeweiligen Gesamt-SpC der Messung wurden nur Metaproteine berücksichtigt, die  $\geq 1\%$  der Gesamtabundanz aufwiesen (Abschnitt 3.6.3).

Der Clusterbaum in Abbildung 15 zeigt, dass mit Ausnahme einer Probe des Inokulums alle Messreplikate die größten Ähnlichkeiten jeweils zueinander haben und die verschiedenen Prozessregime (mesophil, thermophil und Hochstickstoff) voneinander getrennte Cluster bilden, was auf eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Messungen hinweist. Eine

reproduzierbare Quantifizierung von Proteinen und Peptiden stellt grundsätzlich eine Herausforderung in der Proteomik und Metaproteomik dar und beeinflusst auch die Anwendung statistischer Auswerteverfahren. Für eine Quantifizierung anhand der SpC ist beschrieben, dass bei datenabhängigen top-N-Messmethoden die Aufnahme von Spektren bei Messreplikaten einer gewissen Zufälligkeit unterliegt [139], was dazu führen kann, dass Peptide sehr unterschiedlich quantifiziert und auch detektiert werden. Als alternatives Verfahren dazu kommt die Quantifizierung mittels stabiler isotoopenmarkierter Marker in Frage. Dieses ist jedoch für den Einsatz bei Proben mit vielen organischen und anorganischen Kontaminationen, wie bspw. dem Inokulum [140], nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Studie die Quantifizierung anhand der SpC angewandt. Um die große Variation zwischen den Mikrobiomen der sechs Anreicherungen, vor allem jener von Kultivierungsbeginn bis Tag 93, eingehender zu untersuchen, wurden die taxonomischen Zusammensetzungen auf Grundlage der identifizierten Metaproteine und ihrer SpC als Boxplots dargestellt (Abbildung 16).

Das Inokulum wurde von *Bacillales* (17%), *Methanosarcinales* (12,5%), *Enterobacterales* (11%), *Rhizobiales* (8,5%) und *Methanococcales* (4,5%) dominiert. Die Streuung (Wertebereich zwischen linker und rechter Antenne) der prozentualen Abundanz zwischen den einzelnen Replikaten lag für alle Ordnungen bei unter 2% des gesamten Mikrobioms. Für die Proben R1-R6 zeigte der Boxplot allerdings sowohl andere dominante Taxonomien als auch eine deutlich breitere Streuung (Abbildung 16, unten): *Bacillales* (12%), *Enterobacterales* (10,5%), *Methanosarcinales* (10%), *Rhizobiales* (8%) und *Lactobacillales* (6,5%) gehörten zu den dominierenden Ordnungen der Proben von Tag 93. Die erhöhte Streuung zeigte sich besonders bei *Methanosarcinales* mit bis zu 6,5%. Dieser Trend wurde noch deutlicher bei der taxonomischen Zusammensetzung in Folge der Erhöhungen von Temperatur und Stickstoff zwischen Tag 93 und dem Endpunkt der Kultivierungen an Tag 261 (Abbildung 38), vor allem für die thermophilen Regime R3 und R4.

Trotz der unterschiedlichen Zusammensetzungen der Mikrobiome (Abbildung 12 bis Abbildung 14), sowohl der biologischen Replikate als auch der verschiedenen Prozessregime, waren die produzierten Biogasmengen und die Methangehalte (Abbildung 9 bis Abbildung 11) über die ersten 200 Prozesstage in allen Reaktoren sehr ähnlich. Dies legte nahe, dass die Stoffwechselwege der Mikrobiome von R1-R6 ungeachtet der taxonomischen Unterschiede auf funktionaler Ebene ähnlich sein mussten. Um diese funktionale Ähnlichkeit zu

untersuchen, wurden die Proben der verschiedenen Reaktoren und Zeitpunkte anhand von UniProtKB-Schlüsselwörtern verglichen [141], die mit den jeweils identifizierten Metaproteinen verknüpft waren. In der grafischen Darstellung dieser Hauptkomponenten-Analyse (Abbildung 17, oben) ließen sich visuell vier Gruppen unterscheiden. Die Proben des Inokulums (i) lagen nahe beieinander im vierten Quadranten. Relativ zentral, nahe des Koordinatenursprungs (ii), ordneten sich alle Proben von Tag 93 sowie die meisten Proben von Tag 261 an. Im dritten Quadranten und deutlich vom Koordinatenursprung (ii) entfernt, lagen die Proben der Endzeitpunkte von R3. Des Weiteren setzten sich die Proben von R1 von Tag 261 nach oben von den übrigen Proben ab (iv). Der *Loading*-Plot der Hauptkomponenten-Analyse (Abbildung 17, unten) veranschaulicht dabei, wie die Position der einzelnen Datenpunkte durch die jeweils identifizierten biologischen Prozesse bestimmt wurden.

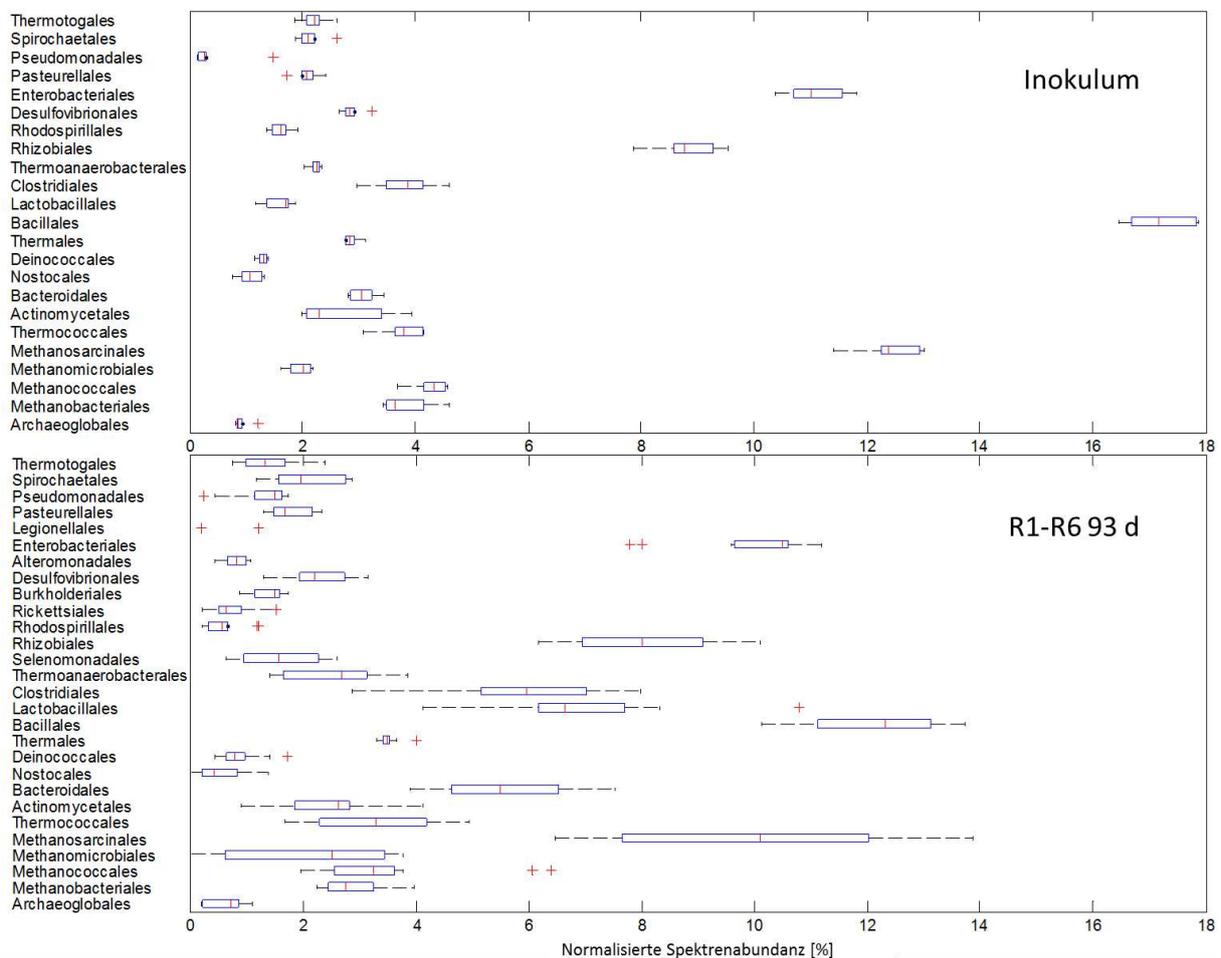


Abbildung 16: Boxplots identifizierter taxonomischer Ordnungen im Inokulum und in R1-R6 nach 93 d Kultivierung. Oben: Proben des Inokulums (drei replikate Proteinextraktionen mit je duplikaten MS/MS-Messungen; 3.6.1 und 3.6.2), unten: Proben von R1-R6 nach 93 d Kultivierung (jeweils duplikate MS/MS-Messungen). Blaue Box: mittlere 50% der Datenpunkte, roter Hochstrich: Median, linke/rechte Antenne: kleinster/größter Wert der jeweiligen Taxonomie, rotes Kreuz: Ausreißer. Nach der Normalisierung der SpC auf die jeweiligen Gesamt-SpC der Messung wurden nur taxonomischen Ordnungen berücksichtigt, die  $\geq 1\%$  der Gesamtabundanz aufwiesen (Abschnitt 3.6.3).

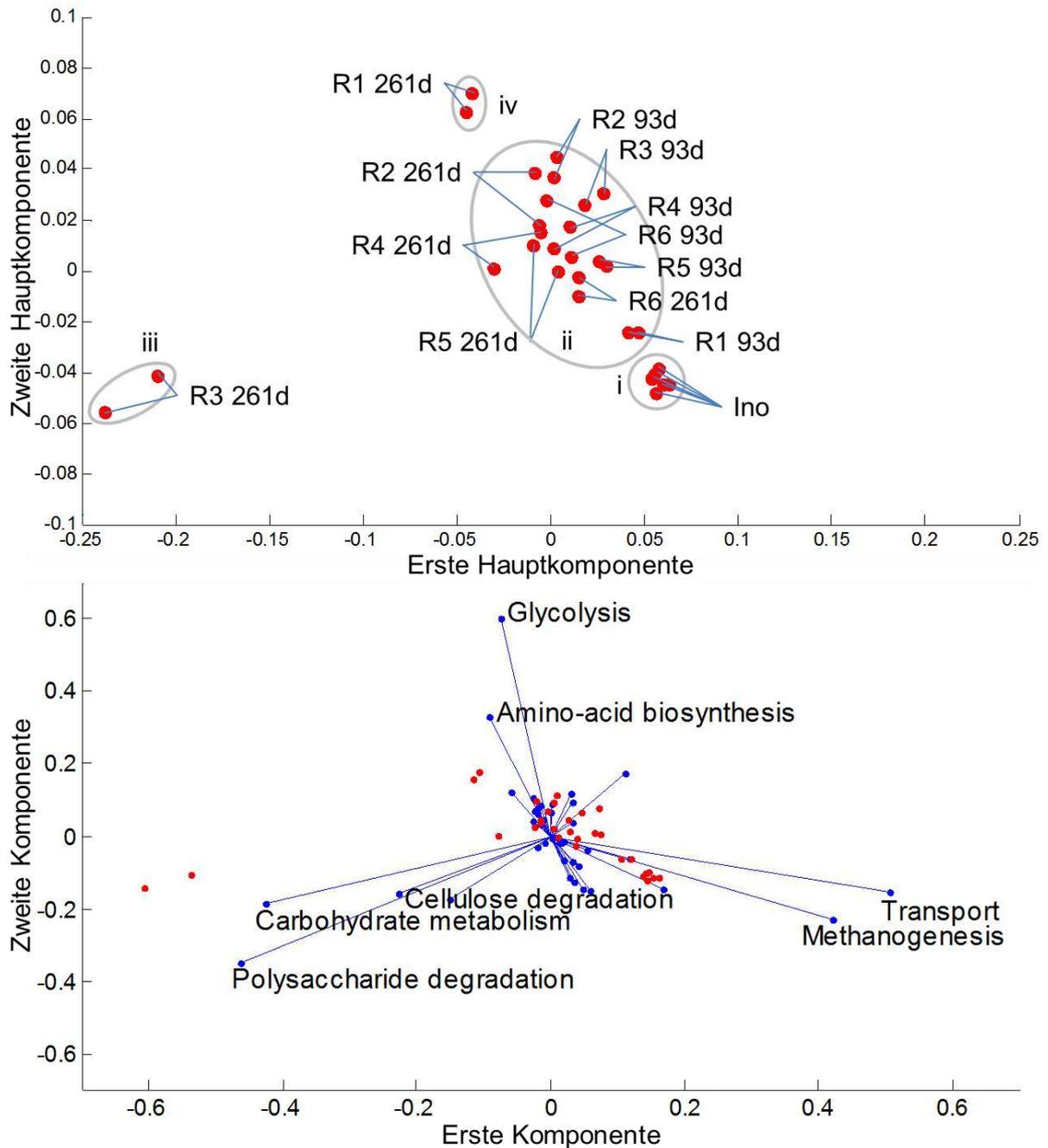


Abbildung 17: Hauptkomponenten-Analyse der in R1-R6 identifizierten biologischen Prozesse. Es wurden nur biologische Prozesse berücksichtigt, deren normalisierten Spektrenanzahlen >1% der gesamten Spektren einer Probe betragen. Oben: Hauptkomponenten-Analyse der Proben (●) des Inokulum (Ino, drei replikate Proteinextraktionen mit je duplikaten MS/MS-Messungen; 3.6.1 und 3.6.2) sowie der Reaktoren R1-R6 nach 93 d und nach 261 d Kultivierung zur Visualisierung relativer Ähnlichkeit (R1, R2: mesophil; R3, R4: thermophil; R5, R6: Hochstickstoff-Regime; duplikate MS/MS-Messungen); i-iv: Gruppierungen, auf die im Text Bezug genommen wird. Unten: *Loading*-Plot der Daten, die für die Hauptkomponenten-Analyse verwendet wurden. Dieser stellt den Einfluss der verschiedenen biologischen Prozesse (●) auf die Lage der Datenpunkte in der Hauptkomponenten-Analyse dar (●: Datenpunkte, entsprechen den Proben aus der oberen Abbildung).

Maßgebend für Betrag und Richtung der Positionierungen abseits des Ursprungs waren dabei die UniProtKB-Schlüsselwörter und die SpC. Eine relativ höhere Abundanz der biologischen Prozesse ‚Transport‘ und ‚Methanogenese‘ erklärte die Abhebung des Inokulum-Clusters. Im

mesophilen Reaktor R1 (Tag 261) wurden verhältnismäßig viele Metaproteine der Prozesse ‚Glykolyse‘ und ‚Aminosäure-Biosynthese‘ identifiziert und der thermophile Reaktor R3 (Tag 261) wurde von Metaproteinen dominiert, die an den Prozessen ‚Kohlenhydrat-Metabolismus‘, ‚Polysaccharid-Abbau‘ und ‚Zelluloseabbau‘ beteiligt waren.

Bereits in einer vorangegangenen *Proteotyping*-Studie wurden ‚Transport‘ und ‚Methanogenese‘ als dominante biologische Prozesse in landwirtschaftlichen BGA beschrieben [87]. Vor dem Hintergrund, dass das Inokulum direkt aus einer landwirtschaftlichen BGA entnommen wurde, bestätigten sich somit die Ergebnisse des *Loading*-Plots (Abbildung 17, Cluster (i)), der ebenfalls ‚Transport‘ und ‚Methanogenese‘ als charakteristische biologische Prozesse für diese Probe identifizierte. Die Proben des mesophilen Reaktors R1 nach 261 d (iv) und des thermophilen Reaktors R3 nach 261 d (iii) lagen jeweils abseits ihrer biologischen Replikate R2 und R4 im Hauptcluster (ii). Für R1 (iv) erklärte sich die Verschiebung anhand des *Loading*-Plots durch eine höhere Abundanz von Proteinen der biologischen Prozesse ‚Glykolyse‘ und ‚Aminosäure-Biosynthese‘. Im Falle von R3 waren identifizierte Metaproteine von ‚Polysaccharid-Abbau‘ und ‚Zelluloseabbau‘ für den großen Abstand des Clusters (iii) vom Zentrum verantwortlich, was auch die große Distanz dieser Probe im Clusterbaum erklären könnte (Abbildung 15). Obwohl ‚Zelluloseabbau‘ in Reaktoren, die Zellulose als Hauptkohlenstoffquelle im Medium erhalten, zu erwarten war, wurden in vorangegangenen Metaproteomstudien keine oder nur sehr wenige entsprechende Proteine nachgewiesen [127]. Die hier durch die Laborbedingungen unter mesophilen Bedingungen angereicherten Mikrobiome wurden durch die Temperaturerhöhung weiter auf Mikroorganismen reduziert, die thermophile Bedingungen bevorzugen. Damit war eine Reduktion der Probenkomplexität verbunden, die möglicherweise eine bessere Auflösung der MS-Messungen und Identifikation von Proteinen sowie biologischer Prozesse, in diesem Fall des Zelluloseabbaus, erlaubte [140]. Trotz der beschriebenen Unterschiede waren alle für den Biogasprozess notwendigen biologischen Funktionen vertreten, was auch ähnliche Reaktorleistungen der replikaten Anreicherungskulturen (bis Tag 93) bezüglich des Biogasertrags bestätigten (Abbildung 9 bis Abbildung 11). Allerdings können funktionell ähnliche mikrobielle Gemeinschaften (Abbildung 17) durchaus strukturelle taxonomische Unterschiede aufweisen (Abbildung 16). Auslöser für die Entwicklung verschiedener stabiler Zustände könnten minimale Änderungen der Umweltbedingungen sein. Stöchiometrische Modelle des Biogasprozesses zeigen allerdings auch einen Lösungsraum mit mehreren stabilen Zuständen [23]. Welche Ursachen letztendlich

die Ausprägung eines bestimmten stabilen Zustands hervorrufen, bleibt ebenso offen, wie die Frage nach seiner Persistenz. Die gezeigten Unterschiede der späten Probenahme-Zeitpunkte von R1 und R2 sowie R3 und R4 (Abbildung 17, Cluster (iii) und (iv)) belegen diese Schlussfolgerungen. Bezüglich der Durchführung von Experimenten im Labor wird auch klar, dass zwei oder mehr biologische Replikate aufgrund der Variabilität der Mikrobiome möglicherweise nicht ausreichen, um Schlüsselfunktionen für einzelne Prozessregime zu identifizieren.

Die vorrangegangenen *Proteotyping*-Ergebnisse zur taxonomischen und funktionellen Zusammensetzung der Mikrobiome sollten abschließend durch eine detaillierte Auswertung der identifizierten Metaproteine ergänzt werden, um mögliche Markerproteine zu bestimmen, wurden die quantitativen Änderungen der Metaproteine jedes Reaktors zwischen den entsprechenden Probenahmen an Tag 93 und Tag 261 paarweise verglichen. Betrachtet wurden alle Metaproteine, die in beiden technischen Replikaten einer Probe einen SpC >1 hatten und deren SpC-Summe sich an Tag 261 im Vergleich zu Tag 93 mindestens verdoppelt oder halbiert hatte.

Für die sechs Reaktoren wurden jeweils mehr als 100 Metaproteine mit den oben genannten Kriterien identifiziert, von denen im Folgenden eine Auswahl vorgestellt wird (Zahlen in Klammern entsprechen der summierten SpC beider Replikate für Tag 93 oder Tag 261, Taxonomien als LCA). Im thermophilen Reaktor R3 zeigte sich in Folge der Temperaturerhöhung eine deutliche Reduktion der Abundanz der archaeellen Methyl-Coenzym-M-Reductase alpha-Untereinheit (UniRef50\_P07962) von *M. barkeri* (SpC: 28 auf 4) sowie des Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplexes alpha-Untereinheit 2 (UniRef50\_Q46G04) von *Methanosarcina* (SpC: 11 auf 0). Andere Proteine wurden im Gegensatz dazu erstmalig bei erhöhter Temperatur identifiziert, bspw. das Zelloberflächen-Glykoprotein 1 (UniRef50\_Q01866, SpC: 0 auf 83), die Zellulose-1,4-beta-Zellobiosidase (UniRef50\_P0C2S1, SpC: 0 auf 199) und die zellulosomalen Gerüstproteine A (UniRef50\_Q06851, SpC: 0 auf 60) und B (UniRef50\_Q06851, SpC: 0 auf 85) von *Clostridium thermocellum*. Weiterhin waren bakterielle 60 kDa Chaperonine (UniRef50\_Q9C667, SpC: 19 auf 81) hochabundant, insbesondere das 60 kDa Chaperonin 1 von *Streptomyces avermitilis* (*S. avermitilis*, UniRef50\_Q08854, SpC: 18 auf 53). Der Spezies *Thermotoga maritima* MSB8 (*T. maritima*) konnten gleich mehrere Metaproteine mit deutlich erhöhter Abundanz

zugeordnet werden. Im zweiten thermophilen Reaktor R4 zeigte sich eine Reduktion der F420-abhängigen Methylenetetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (UniRef50\_P55300) von *Methanomicrobiales* (SpC: 18 auf 7) und Methyl-Coenzym-M-Reductase gamma-Untereinheit (UniRef50\_P12973) von *Methanothermus fervidus* (SpC: 10 auf 1). Im Gegensatz zu R3 waren die Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplex gamma-Untereinheit 2 und epsilon-Untereinheit 1 (UniRef50\_Q9C4Z0, UniRef50\_Q46G05) von *Methanosarcina* nach der Temperaturerhöhung höher abundant (SpC: 2 auf 32 und 2 auf 18). Die bereits genannten 60 kDa Chaperonine von Bakterien (UniRef50\_P35635, SpC: 3 auf 22) und von *S. avermitilis* (UniRef50\_Q08854, SpC: 19 auf 53), sowie das Zellulose-Gerüstprotein B von *Clostridium thermocellum* (*C. thermocellum*, UniRef50\_Q01866, SpC: 0 auf 24) und Metaproteine von *T. maritima* wurden in R4 ebenfalls mit erhöhter Abundanz identifiziert. Unter den Hochstickstoff-Bedingungen von R5 und R6 an Tag 261 wurden nur wenige höher abundante Metaproteine identifiziert. Dazu zählten bspw. die 5,10-Methylenetetrahydromethanopterin-Reductase von *Methanothermobacter thermautotrophicus* (UniRef50\_Q50744, SpC: 2 auf 6), die Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplex alpha-Untereinheit 2 von *Methanosarcina* (UniRef50\_Q46G04, Spc: 1 auf 12), die Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase von *Propionibacterium acnes* (UniRef50\_Q8FPB7, SpC: 0 auf 6) und das 60 kDa Chaperonin 1 von *S. avermitilis* (UniRef50\_Q08854, SpC: 12 auf 42) in R5. In R6 waren ebenfalls die Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplex alpha-Untereinheit 2 von *Methanosarcina* (UniRef50\_Q46G04, SpC: 2 auf 16) und das 60 kDa Chaperonin 1 von *S. avermitilis* (UniRef50\_Q08854, SpC: 21 auf 46) höher abundant.

In R3 waren in Folge der Temperaturerhöhung zu thermophilen Bedingungen archaelle Metaproteine von *Methanosarcina* reduziert. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen früherer Studien [142, 143], in denen eine Reduktion von Spezies der acetoklastischen Methanogenese in Zusammenhang mit steigenden Prozesstemperaturen resultierte. Entsprechend der erhöhten Abundanz von Metaproteinen des ‚Zelluloseabbaus‘ (Abbildung 17), wurden in R3 an Tag 261 zellulolytische Enzyme, bspw. die Zellulose-1,4-beta-Zellobiosidase und das zellulosomale Gerüstprotein, von *C. thermocellum* mit hohen SpC gefunden. Im Gegensatz zu R3 wurde in R4 an Tag 261 der Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplex von *Methanosarcina* mit deutlich höherem SpC identifiziert als vor der Temperaturerhöhung an Tag 93. Dies ließ auf eine höhere acetoklastische

Methanogeneseaktivität unter thermophilen Bedingungen schließen [87], steht aber im Widerspruch zu R3. Die unterschiedlich ausgeprägte Präsenz acetoklastischer Mikroorganismen lieferte allerdings eine plausible Erklärung für die übergangsweise Akkumulation von Acetat in R4, während in R3 die Konzentration von Acetat bis zum Ende des Prozesses hoch blieb (>10 mM, Abbildung 10). Auch wenn *Methanosarcina* hauptsächlich unter mesophilen Bedingungen kultiviert werden, gelang bereits mehrfach die Isolierung dieser Archaeen aus thermophilen Habitaten [144-146]. Die erfolgreiche Anreicherung eines thermophilen *Methanosarcina* in R4 erscheint also plausibel. Im Rahmen dieser Studie zeigten vor allem die Unterschiede zwischen den Reaktoren R3 und R4, dass sich unter den gleichen definierten Laborbedingungen verschiedene Mikrobiome entwickeln können.

Für die Hochstickstoff-Regime R5 und R6 zeigten die Sets identifizierter Metaproteine ähnliche Veränderungen beim Vergleich der Prozesszeiten an Tag 93 und 261. Allerdings konnte die erhöhte Abundanz des Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplexes acetoklastischer *Methanosarcina* in Gegenwart der hohen Ammoniak-Konzentrationen (Tabelle 12) nicht erklärt werden. Als weitere mögliche Senke für Acetat wirkt neben der Methanogenese auch die syntrophe Acetatspaltung, respektive SAO. Diese thermodynamisch ungünstige Umkehrreaktion der Homoacetatgärung (Formel 10) kann nur ablaufen, wenn in unmittelbarer Umgebung des acetatoxidierenden Organismus ein syntropher, hydrogenotropher Partner den Partialdruck des gebildeten H<sub>2</sub> niedrig hält. Obwohl ein leichter Anstieg von Metaproteinen der hydrogenotrophen Methanogenese verzeichnet werden konnte, wurde das SAO-Schlüsselenzym Formyltetrahydrofolat-Synthetase nicht identifiziert [147]. Es wurden auch keine anderen Metaproteine identifiziert, die den bekannten SAO-Spezies, bspw. *Pseudothermotoga lettingae*, *Clostridium ultunense*, oder *Tepidanaerobacter acetatoxydans*, zugeordnet werden konnten. Die Anreicherung eines SAO-Mikrobioms gelang im Rahmen dieser Studie offensichtlich nicht. Unter Umständen könnten die zur Identifizierung verwendeten Datenbanken allerdings nicht für die Identifikation von SAO geeignet gewesen sein. Jedoch gelang vorher mit genau diesen Datenbanken bereits die Identifikation von SAO-Spezies [87]. Im Fall von R5 und R6 war also die Umsetzung von Acetat durch einen Ammoniak-toleranten acetoklastischen Methanogenen wahrscheinlicher als durch SAO [148]. In den späteren Phasen der Kultivierungen trat eine langsame Akkumulation von Acetat auf und damit einher ging der Einbruch der Methanproduktion (Abbildung 11). Die fortschreitende Inhibierung der Methanogenese als Folge von Ammoniak-Konzentrationen

>0,8 gNH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> (Tabelle 12) zeigt die Grenzen dieser Ammoniaktoleranten acetoklastischen Methanogenen in den Anreicherungen R5 und R6 auf.

#### 4.1.5. Funktionale Stabilität vs. strukturelle Stabilität von Mikrobiomen

Sechs unabhängige Biogasreaktoren, die mit demselben Animpfslamm inokuliert und unter den gleichen, definierten Bedingungen kultiviert wurden, zeigten während der ersten 93 d sehr ähnliche Prozessverläufe bezüglich der Qualität und Quantität des produzierten Gases, des pH-Werts und den FOS (Abbildung 9 bis Abbildung 11). Im Gegensatz dazu belegten die Ergebnisse von SDS-PAGE, Metaproteomanalysen und T-RFLP der 16S rRNA Gene deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiome (Abbildung 12 bis Abbildung 17). Möglicherweise könnte ein Zeitraum von 93 d unzureichend für eine vollständige Adaption an Laborbedingungen sein, sodass es sich bei den beobachteten Mikrobiomen um Übergangszustände statt Gleichgewichtszuständen handelt. Die SDS-PAGE und T-RFLP-Muster der Kontrollreaktoren R1 und R2 zeigen sogar noch nach 261 d, also mehr als der dreifachen HRT, Unterschiede zu Tag 93 und auch untereinander. Längere Adaptionszeiten als die üblicherweise angenommenen drei HRT bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustands sind eher unwahrscheinlich [149]. Vielmehr etablierten sich wahrscheinlich innerhalb eines durch die Prozessparameter abgesteckten Bereichs verschiedene stabile Gemeinschaften, was auch die Unterschiede zwischen R1 und R2 erklärte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Fernández et al. beim kontinuierlichen Betrieb eines Fermenters über 600 d und der Analyse der genetischen Zusammensetzung des Mikrobioms [150, 151]. Trotz stabiler Reaktorleistung änderten sich die Verhältnisse der dominanten Bakterien und Archaeen fortlaufend. Die Kernaussage dieser Studie reduzierte sich darauf, dass funktionale Stabilität nicht zwangsweise eine taxonomische Stabilität impliziert, was auch im Rahmen dieser Studie deutlich wird. Der Vergleich der taxonomischen Zusammensetzungen des Inokulums und der späteren Probenahme-Zeitpunkte anhand der SpC identifizierter Metaproteine zeigt, dass für letztere deutlich breitere Streuungen der Ordnungen *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* oder *Bacillales* bestimmt wurden (Abbildung 16 und Abbildung 38). Die Abundanzen einzelner Taxa können also in einem gewissen Rahmen variieren, ohne einen Einfluss auf die Biogas-Produktivität des Reaktors zu haben. Dass sich diese Beobachtung nicht nur auf Anreicherungskulturen unter Laborbedingungen beschränken, zeigten Studien an

industriellen BGA [152, 153], wo ebenfalls trotz kompositioneller Variabilität der Mikrobiome stabile Gaserträge erzielt wurden.

Schwieriger gestaltet sich der Umgang mit diesen Ergebnissen bezüglich der Reproduzierbarkeit und Interpretation von Experimenten an komplexen Mikrobiomen, sowie der Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus Laborexperimenten auf industrielle BGA oder auch von einer BGA auf eine andere. Bisher wurden widersprüchliche Ergebnisse oft durch methodische Unterschiede und verschiedenen spezifische Analysemethoden erklärt [140, 147, 154], bspw. beim Zellaufschluss oder der Extraktion von DNA und Proteinen [155]. Zweifelsfrei haben die Wahl und Anwendung von Methoden einen Einfluss auf das Ergebnis von Analysen [127, 156]. Ebenso müssen aber auch multiple biologische Gleichgewichts-Zustände, wenn nicht gar eine Dynamik innerhalb einer Zeitreihe für jede BGA, von Mikrobiomen berücksichtigt werden, insbesondere für den Versuch, ein sogenanntes *Core* Mikrobiom für Biogasprozesse zu definieren [60, 87, 153, 157]. Vor dem Hintergrund der hier erzielten Ergebnisse erscheinen Ansätze zur Definition von *Core* Mikrobiomen auf Grundlage von biologischen oder metabolischen Funktionen an Stelle von gemeinsamen Taxonomien als eine sinnvolle Alternative [158, 159]. Ansätze dafür bietet die – durchaus umstrittene – hologenomische Evolutionstheorie: Gene als Teil eines Genoms werden mit Organismen als Teil eines Mikrobioms gleichgesetzt [160]. Gene sind austauschbar oder durch Mutation veränderbar, solange das resultierende Genprodukt nach wie vor die für den Organismus nötige, metabolische Funktion erfüllen kann. Gleiches gilt für einzelne Mikroorganismen eines Mikrobioms. In der humanen Darmflora wurden bspw. sogenannte funktionelle Gene beschrieben, die in verschiedenen Taxa identifiziert wurden [161, 162]. Die daraus resultierende Redundanz entkoppelt die metabolische Systemfunktion von einer definierten Taxonomie. Im Rahmen einer Studie von Burke et al. [163] wurde zwischen den Mikrobiomen verschiedener Meerlattich Grünalgen (*Ulva australis*) 70% funktionelle aber nur 15% taxonomische Ähnlichkeit festgestellt. Die Menge taxonomisch verschiedener aber metabolisch redundanter Organismen wird in der klassischen Ökologie als Gilde bezeichnet. Innerhalb dieser Gilden kann es sowohl zu negativen (Konkurrenz) als auch zu positiven Beziehungen (horizontaler Gentransfer) kommen.

Doolittle und Booth schlagen für die Beziehungen innerhalb eines funktionellen *Core* Mikrobioms ein einfaches Modell vor, das in Abbildung 18 grundlegend auf das Mikrobiom des Biogasprozesses übertragen und dem „klassischen“ taxonomischen *Core* Mikrobiom

gegenübergestellt wurde [159]. Daraus wird klar, dass aufgrund der Dynamik innerhalb einzelner Gilden die taxonomische Zusammensetzung eines Mikrobioms immer nur eine Momentaufnahme sein kann. Zeitlich stabil ist nur die Menge an Stoffwechselfunktionen, die zum Systemerhalt notwendig ist. Auch wenn das hier gezeigte Modell gegenüber dem Mikrobiomen in einer landwirtschaftlichen BGA vergleichsweise einfach ist, bildet es in reduzierter Form Umwelteinflüsse durch z.B. Substratänderungen oder veränderte Prozessparameter ab, die zuerst auf taxonomischer Ebene (also innerhalb von Gilden) Auswirkungen hätten, indem ein Gildenmitglied durch ein anderes ersetzt wird. Ein Gleichgewichtszustand auf funktionaler Ebene wäre davon weitestgehend unberührt. Das Modell des funktionalen *Core* Mikrobioms berücksichtigt allerdings keine Organismen einer auftretenden Begleitflora, also anderer Mikroorganismen, die keiner Gilde angehören. Diese Organismen bewohnen das Habitat, weil es für sie gute Lebensbedingungen schafft oder sie Nutznießer des Pools umgesetzter Intermediate sind (parasitäre Beziehung). Für das menschliche Mikrobiom im Darm sind sogar extreme Fälle von Dysbakterie durch z.B. *Clostridium difficile* bekannt [164], die systemische Ausmaße annehmen und das Gleichgewicht auch auf funktionaler Ebene nachhaltig beeinträchtigen können. Einen ähnlichen Einfluss hätte der Befall von Phagen, der nachweislich in aquatischen Ökosystemen [165] oder den Mikrobiomen in Belebtschlämmen von Kläranlagen eine Rolle spielt [166] bzw. über den in BGA lange Zeit nur spekuliert werden konnte. Im Jahr 2016 gelang jedoch auch hier der Nachweis von Phagen-DNA [167] und wurde wenig später bereits als Ursache für Prozessstörungen diskutiert [168]. 2019 wies dann auch die erste Metaproteom-Studie Phagenproteine für die Familien *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* und *Clostridiaceae* nach und machte damit einen Einfluss am Biomasse-Umsatz in BGA wahrscheinlich [169]. Eine entsprechende Berücksichtigung von Phagenbefall in taxonomischen und vor allem auch funktionalen Modellen für Mikrobiome wäre also von Bedeutung.

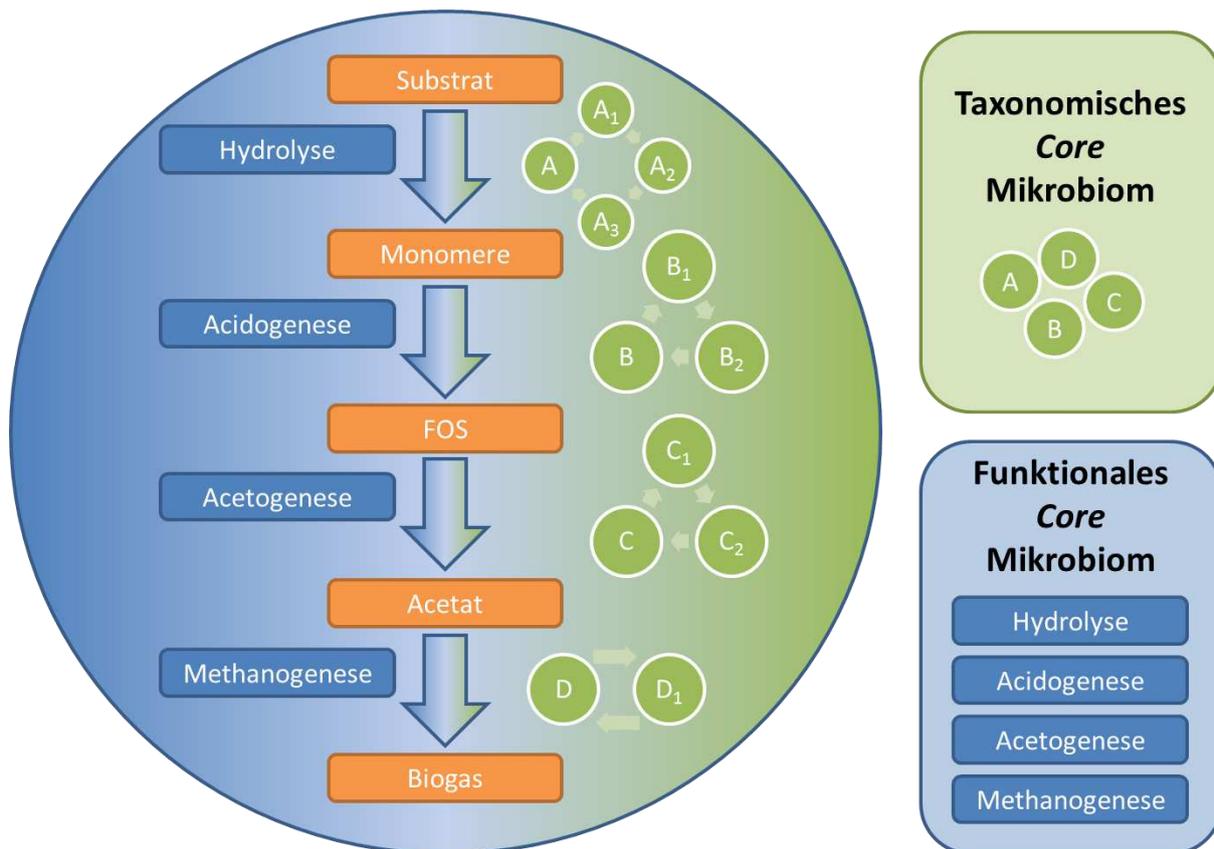


Abbildung 18: Modell eines taxonomischen und funktionalen *Core* Mikrobioms des Biogasprozesses. Orangene Kästen: Intermediate des Abbaus; Blaue Kästen: Prozesse der Biogasbildung (vereinfacht); A-D (grüne Kreise): Taxonomien, die die jeweiligen Prozesse durchführen, mit Index 1-3: Spezies mit redundanter metabolischer Funktion. Die Gesamtheit aller Taxonomien, die einen Prozess durchführen können, wird als Gilde bezeichnet. Innerhalb einer Gilde treten horizontaler Gentransfer und Konkurrenzverhalten auf, weiterhin können Spezies auch von außerhalb des Systems rekrutiert werden, wenn sie über das metabolische Potential der entsprechenden Gilde verfügen. Das repräsentative funktionale oder taxonomische *Core* Mikrobiome wird durch die entsprechenden Felder rechts dargestellt. FOS: flüchtige organische Säuren.

Bisher befassten sich hauptsächlich Metagenom-Studien damit, die Problematik multipler stationärer Zustände in Mikrobiomen und ihrer Dynamik grundlegend zu erfassen und einfache Modelle zu erarbeiten (Abbildung 18) [60, 159, 162, 170]. Dabei wurde klar, dass sich eine taxonomische Gruppe, bspw. Spezies, als kleinster Strukturbaustein nicht mehr eignet. Dies gilt besonders dann, wenn z.B. die Beziehungen innerhalb eines Mikrobioms trophisch werden oder essentielle Gene verloren gehen, sodass ein unabhängiges Wachstum nicht mehr möglich ist [171]. Alternativ dazu wurden bereits Sets von nicht redundanten Genen oder biologischen Funktionen vorgeschlagen (siehe oben), letztere können mithilfe der verwendeten Metaproteomanalyse (Abschnitt 3.6.1 bis Abschnitt 3.6.2) und dem *Proteotyping* (Abschnitt 3.6.3) untersucht werden. Grundlage hierfür ist allerdings eine passende Sequenzdatenbank und eine möglichst umfassende Annotation, vorzugsweise mit Verknüpfung der Proteinsequenzen und den Metainformationen der UniProtKB-Datenbank. Diese Metainformationen können dann zur Übertragung der identifizierten Proteine auf

Klassen biologischer Prozesse, molekularer Funktionen oder KEGG-Stoffwechselkarten genutzt werden [54]. Für mehrstufige biologische Vorgänge, wie dem anaeroben Abbau von Biomasse zu Biogas, sollten durch Anreicherungskulturen Modellsysteme einzelner Phasen etabliert werden, die die Untersuchung der beteiligten Gilden und Sets an Stoffwechselfunktionen erleichtern.

Zu Beginn des Abschnitts 4.1 wurden zwei Fragestellungen formuliert, die im Rahmen dieser Studie beantwortet werden sollten. (i): wie ähnlich sind sich Mikrobiome auf funktioneller und taxonomischer Ebene, die unter den gleichen Umweltbedingungen kultiviert wurden, und (ii) lassen sich mithilfe von *Proteotyping*-Methoden Markerspezies oder Markerproteine für die jeweiligen mesophilen, thermophilen oder Hochstickstoff-Regime identifizieren? Auf Grundlage der erzielten *Proteotyping*-Ergebnisse zeigte sich, dass die Mikrobiome trotz definierter Laborbedingungen einer starken taxonomischen Dynamik unterlagen. Im Gegensatz dazu lagen auf funktionaler Ebene kaum Unterschiede zwischen biologischen Replikaten bei gleicher Prozessführung vor. Daraus resultiert, dass die Möglichkeiten, taxonomische Ergebnisse zwischen Replikaten zu übertragen, sehr limitiert sind. Durch die technischen Unterschiede zwischen BGA im Labor- und Industriemaßstab ergeben sich grundlegend verschiedene Einflüsse auf die Mikrobiome, wodurch noch größere taxonomische Abweichungen zu erwarten sind. Zwar erlaubte die angewandte *Proteotyping*-Strategie die Identifikation möglicher taxonomischer und Proteinmarker (Abschnitt 4.1.4) für die einzelnen Prozessregime, deren Spezifität und Eindeutigkeit sowie – allem voran – die Übertragbarkeit dieser Biomarker müssen in Folgeversuchen allerdings bestätigt werden. Zukünftige Studien sollten Proben einer möglichst großen Anzahl industrieller Anlagen über längere Zeiträume untersuchen (vgl. Biogas-Messprogramm III der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V.). Eine schnelle und robuste Metaproteomanalytik wurde bereits entwickelt [172], um reale BGA-Proben im Hochdurchsatz auszuwerten. Durch die Untersuchung einer ausreichenden Probenzahl kann vielleicht sogar die Beschreibung multipler stationärer Zustände bei industriellen BGA gelingen.

## 4.2. Kultivierung und Analyse biogasproduzierender Mikrobiome zur Etablierung und Validierung mathematischer Modelle

Im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. Sabine Koch (Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme Magdeburg) wurde ein mathematisches Modell etabliert (Abbildung 3), um Metabolitflüsse innerhalb eines biogasproduzierenden Mikrobioms zu untersuchen, das nur aus für den Biogasprozess repräsentativen Organismen zusammengesetzt wurde [23]. Ziel war es, die gewonnenen abiotischen und biotischen Daten zur Validierung und Verbesserung des stöchiometrischen Netzwerkmodells zu nutzen (Abschnitt 2.5). Da eine definierte Mischkultur mit den im Modell vorgesehenen Organismen nicht zur Verfügung stand, wurde die Anreicherung eines reduzierten Mikrobioms im Labormaßstab durchgeführt (Abschnitt 3.2). Durch die Verwendung von Ethanol als Hauptkohlenstoffquelle wurde gewährleistet, dass die Stoffwechselphysiologie dieser Ersatzkultur vergleichbar war. Da das Modell Flussverteilungen für Gleichgewichtszustände ausgibt, wurden mittels kontinuierlicher Kultivierung (Abschnitt 2.6) Gleichgewichtszustände verschiedener HRT eingestellt und beprobt, um die Übertragbarkeit der Daten zu gewährleisten. Es sollte untersucht werden, in welcher Weise Daten von Metaproteomanalysen dieser Mikrobiome genutzt werden können, um die großen Lösungsräume des Modells bezüglich der Biomassezusammensetzungen, der genutzten Stoffwechselwege und für verschiedene Produktionsraten einzuschränken.

### 4.2.1. Prozessverlauf der Anreicherungskulturen

Vor Beginn der *transient-state* Kultivierung sollte die Bestimmung der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  der Anreicherungskultur erfolgen, um sie für eine Auslegung der Intervallgrößen von Prozesszeit ( $dt$ ) und Verdünnungsrate ( $dD$ ) heranzuziehen (Abschnitt 2.6, Abbildung 5). Dazu erfolgte die Aufnahme der Biomassezunahme in einem Kulturansatz im Batchbetrieb. Allerdings war die Biomassezunahme zu gering, sodass keine Wachstumsphasen und somit auch keine Wachstumsrate bestimmbar waren (hier nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden stabile Biogas-Bildungsraten, Gaszusammensetzungen, pH-Werte und die Restsubstrat-Konzentrationen als Marker für das Erreichen eines *steady-states* festgelegt (Abschnitt 3.2.4). Während der ersten Prozesstage (HRT 100 d) stellte sich nach ca. 20 Tagen heraus, dass trotz kalibrierter Pumpen nur ca. 50-70% der gemäß Formel 1 bestimmten und

über die Prozesseinheit vorgegebenen Soll-Förderraten erreicht werden konnten. Dies erklärte sich durch Materialermüdung der für die peristaltischen Pumpen verwendeten Schläuche. In Abhängigkeit der jeweils beobachteten Abweichung wurden bei der Einstellung späterer Soll-Förderrate grundsätzlich ein Aufschlag von 30-50% vorgenommen, um die resultierende Differenz zwischen Soll- und Ist-Wert zu minimieren. Ab einer Prozesszeit von 24 d wurde die resultierende Ist-Förderrate durch regelmäßiges Auswiegen der Medienflaschen bestimmt und daraus wiederum nach Formel 1 die HRT berechnet. Dieses Vorgehen ermöglichte zwar die genaue HRT-Bestimmung, erschwerte allerdings durch die abgeschätzten Beaufschlagungen an den Förderraten das genaue Einstellen der gewünschten HRT sowie der 10 d Intervalle. Aus prozesstechnischer Sicht wäre ein zusätzlicher Regelkreis notwendig gewesen, der die Förderrate unter Einbindung einer zweiten Waage für die Medienflasche anhand einer stündlichen Gewichtsabnahme regelt. Die resultierenden Förderraten und HRT sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Bestimmte Förderraten und resultierende hydraulische Verweilzeiten.

Prozesszeit [d]	Unit 1			Unit 2		
	Förderrate [mL min <sup>-1</sup> ]		HRT [d]	Förderrate [mL min <sup>-1</sup> ]		HRT [d]
	Soll <sup>1)</sup>	Ist		Soll <sup>1)</sup>	Ist	
26	0,0104/0,015	n.b. <sup>2)</sup>	100 <sup>3)</sup>	0,0104/0,015	n.b. <sup>2)</sup>	100 <sup>3)</sup>
33	0,0116/0,017	0,0135	77,3	0,0116/0,017	0,0132	78,6
47	0,0130/0,019	0,0150	69,6	0,0130/0,019	0,0145	71,9
55	0,0149/0,022	0,0179	58,1	0,0149/0,022	0,0178	58,7
63	0,0174/0,026	0,0213	48,9	0,0174/0,026	0,0209	49,9
77	0,0208/0,031	0,0251	41,5	0,0208/0,031	0,0251	41,5
91	0,0260/0,040	0,0288	36,2	0,0260/0,040	0,0310	33,6
111	0,0347/0,055	0,0431	24,1	0,0347/0,055	0,0457	-

<sup>1)</sup> Förderrate gemäß Formel 1/Eingabe Prozesseinheit. <sup>2)</sup> n.b.: nicht bestimmbar. Korrektur auf tatsächliche Werte aufgrund nicht durchgeführter Wiegungen der Medienflaschen nicht möglich. <sup>3)</sup> approximierte HRT.

Die Biogasproduktion der Anreicherungskulturen U1 und U2 verlief in den ersten drei Monaten stabil und unauffällig. Nach den Beprobungen der jeweils erreichten *steady-states* (Abschnitt 3.2.5) erfolgten die Erhöhungen der Förderraten, um die nächst niedrigeren HRT einzustellen. Dabei zeigten sich Zunahmen der Gasbildungsraten innerhalb weniger Minuten, das Erreichen konstanter Gaszusammensetzungen dauert hingegen bis zu einem Tag. Die Einstellung konstanter pH-Werte nahm mit mehreren Tagen die meiste Zeit in Anspruch und

war somit das geschwindigkeitsbestimmende Prozesskriterium für das Herabsetzen der HRT (Abschnitt 4.2.2).

Insgesamt wurden für U1 innerhalb von 111 d acht HRT eingestellt und beprobt. In Folge der weiteren Erhöhung der Förderrate auf eine HRT von 16,7 d kam es nach 114 d zu einem starken Abfall des pH-Werts zusammen mit einem Einbruch der Biogasbildung sowie einer Akkumulation von Substrat und organischen Säuren. In Anbetracht dieses Phänotyps einer Prozessversäuerung wurde die Kultivierung nach insgesamt 123 d beendet. Für U2 war die niedrigste erreichte HRT 33,6 d, mit insgesamt sieben beprobten HRT in 97 Prozesstagen (Tabelle 2). Der im Vergleich zu U1 frühere Prozessabbruch erklärte sich durch einen technischen Defekt im Rührwerk. Die Verschraubung von Rührermotor und Rührerwelle löste sich über Nacht, wodurch keine Durchmischung des Reaktorinhalts mehr gegeben war. Biomasse setzte sich am Reaktorboden ab, was vermutlich zu einer Isolierung gegenüber dem Temperaturfühler im zentralen Bereich des Reaktors führte. Da über den Reaktorboden die Temperierung des Reaktors stattfand, kam es zu einer übermäßigen Aufheizung des Kühlwassers und somit auch der Biomasse auf dem Reaktorboden. Aufgrund dieses Vorfalles lag eine Verletzung der Versuchsbedingungen vor, dessen Auswirkungen auf die Mikrobiologie nicht abzuschätzen waren, weshalb die Kultivierung beendet wurde.

In den folgenden Abschnitten 4.2.2 und 4.2.3 erfolgt die eingehende Vorstellung und Diskussion der verschiedenen abiotischen Prozessparameter sowie der Biomasse-Zusammensetzung anhand der massenspektrometrischen Metaproteomanalyse.

### **4.2.2. Kultivierungsparameter**

Die im Folgenden vorgestellten täglichen Gasbildungsraten wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Studien auf das jeweilige Reaktorvolumen (RV) normiert. Weiterhin erfolgte die Berücksichtigung des reaktorspezifischen Kopfraums (Abschnitt 3.3) bei der Korrektur der vom GärOnA-System bestimmten Gasbildungen mithilfe eines zuvor bestimmten Faktors. Dieser Kopfraumkorrekturfaktor betrug 2,000 für U1 und 1,923 für U2.

Die Biogas-Bildungsraten und Gaszusammensetzungen von U1 und U2 zeigten zueinander ähnliche, steigende Verläufe und Größenordnungen über die beprobten Gleichgewichtszustände der HRT (Abbildung 19, links). Für U1 wurden Bildungsraten von  $4,329 \text{ NL L}_{\text{RV}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  bei HRT 24,1 d bis  $1,054 \text{ NL L}_{\text{RV}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  bei HRT 100 d bestimmt. Unter

Berücksichtigung der Substrat-Beladungsraten (*engl.: organic loading rate*, kurz OLR) von  $6,66 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für U1 und HRT 36,2 bzw. mit  $7,16 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für U2 und HRT 33,6 ergeben sich Biogasausbeuten, die mit denen von industriellen BGA ähnlich sind [132]. Die Konzentrationen von  $\text{CO}_2$  und  $\text{CH}_4$  (Abbildung 19, rechts) lagen für Unit 1 bei 21,36% und 67,80% zu HRT 24,1 d bzw. 18,36% und 66,96% zu HRT 100 d. In beiden Units war ein leichter Aufwärtstrend des Verhältnisses von  $\text{CH}_4$  zu  $\text{CO}_2$  mit steigender HRT zu verzeichnen (bspw. Unit 1: 3,174 zu HRT 24,1 d sowie 3,647 zu HRT 100 d).

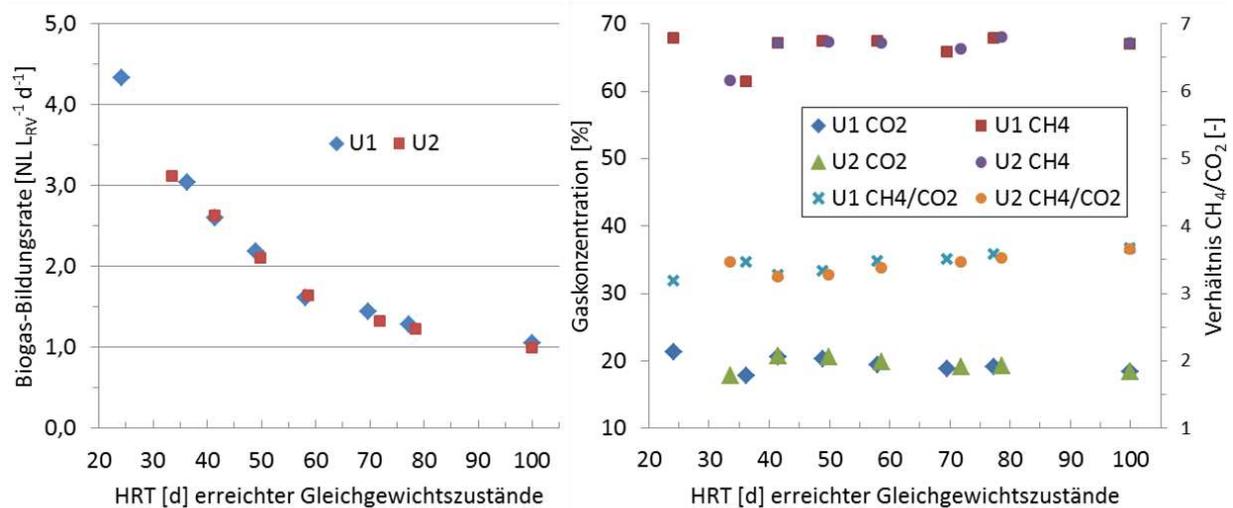


Abbildung 19: Biogas-Bildungsraten und Gaszusammensetzungen der Gleichgewichtszustände. Links: auf das Reaktorvolumen (RV) normierte Biogas-Bildungsraten in Normlitern (NL, Gasvolumen bei physikalischem Normzustand, Abschnitt 3.3) pro Tag (d). Die Raten wurden als Steigungen der volumetrischen Gasbildungen der letzten 24 h vor dem Erreichen des Gleichgewichtszustands einer hydraulischen Retentionszeit (HRT) ermittelt. Rechts: Konzentrationen von  $\text{CO}_2$  und  $\text{CH}_4$  als Mittelwerte der letzten 10 h vor Erreichen der jeweiligen Gleichgewichtszustände sowie das Verhältnis beider Gase. U1: Unit 1, U2: Unit 2, HRT: hydraulische Retentionszeit.

Die pH-Werte beider Units blieben während der ersten 47 Kultivierungstage auch während der HRT-Wechsel stabil und betragen im Mittel 7,24 für U1 und 7,19 für U2 (Abbildung 20). Der Einbruch an Tag 38 auf pH 7,13 und pH 6,99 erklärt sich durch einen Defekt der Gasanalytik, der kurzzeitig zum Aufbau eines Überdrucks im Reaktor führte. Daraufhin löste sich verhältnismäßig mehr  $\text{CO}_2$  im Reaktor, was den pH-Wert absenkte. Die Beprobung dieser HRT wurde um eine Woche verschoben, damit der Einfluss dieser Auslenkung von den Gleichgewichtszuständen möglichst gering war. Mit der weiteren Erhöhung der Flussraten, um die HRT 58,1 d und 58,7 d anzufahren, stellte sich ein leichter Abwärtstrend der pH-Werte in beiden Units ein, der über die nächsten 3 HRT bis Prozesstag 91 anhielt (U1: pH 6,97, U2: pH 7,06). Nach der Einstellung der Flussraten für die HRT 24,1 d und 22,8 d zeigten sich nach wenigen Tagen deutlichere Abfälle der pH-Werte, bei Unit 2 ereignete sich zwischen

Prozesstag 96 und 97 der beschriebene Defekt am Rührwerk, in dessen Folge der Prozess zum Erliegen kam (keine Biogasbildung detektierbar) und ein pH-Wert von 5,33 gemessen wurde. Der pH-Wert in Unit 1 stabilisierte sich zwischen Prozesstag 101 und 110 wieder mit einem Mittelwert von 6,05. Erst nach der weiteren Erhöhung der Flussrate für das Einstellen der HRT 16,7 d fiel der pH-Wert erneut unter 5,8. Dieser Wert ist vermutlich durch eine Akkumulation organischer Säuren zu erklären. Die Konzentrationen von Propionat und Butyrat in U1 und U2 lagen allerdings für alle HRT unterhalb der Detektionsgrenzen. Für Laktat, Acetat und Formiat wurden jeweils Konzentrationen zwischen 5,3  $\mu\text{M}$  und 122,7  $\mu\text{M}$ , 10,9  $\mu\text{M}$  und 124,9  $\mu\text{M}$  sowie 7,6  $\mu\text{M}$  und 44,2  $\mu\text{M}$  gemessen (Abbildung 21). Die Detektions- und Quantifizierungsgrenzen wurden bei den Vorversuchen zur Validierung des Messbereichs der organischen Säureanionen (Abschnitt 3.4) wie folgt bestimmt: 7  $\mu\text{M}$  und 22  $\mu\text{M}$  für Laktat, 16  $\mu\text{M}$  und 49  $\mu\text{M}$  für Acetat, 9,11  $\mu\text{M}$  und 27,6  $\mu\text{M}$  für Propionat, 13,1  $\mu\text{M}$  und 39,7  $\mu\text{M}$  für Formiat sowie 6  $\mu\text{M}$  und 18  $\mu\text{M}$  für Butyrat.

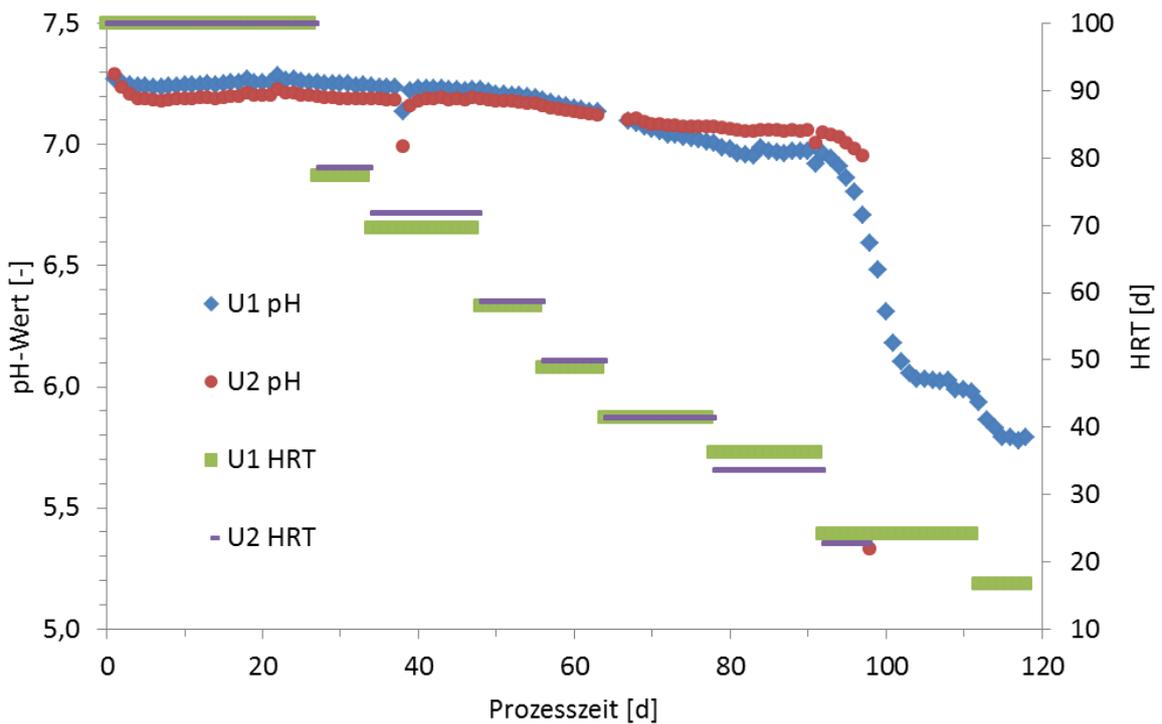


Abbildung 20: Verlauf der pH-Werte von Unit 1 und Unit 2 über die Kultivierungsdauer. Die pH-Werte wurden online gemessen und von den Prozesseinheiten im Minutenabstand gespeichert, zur übersichtlicheren Darstellung erfolgt hier die Abbildung eines Messpunktes pro Tag (jeweils 09:00 Uhr). Weiterhin sind den Prozessabschnitten zugehörige HRT aufgetragen. U1: Unit 1, U2: Unit 2, HRT: hydraulische Retentionszeit.

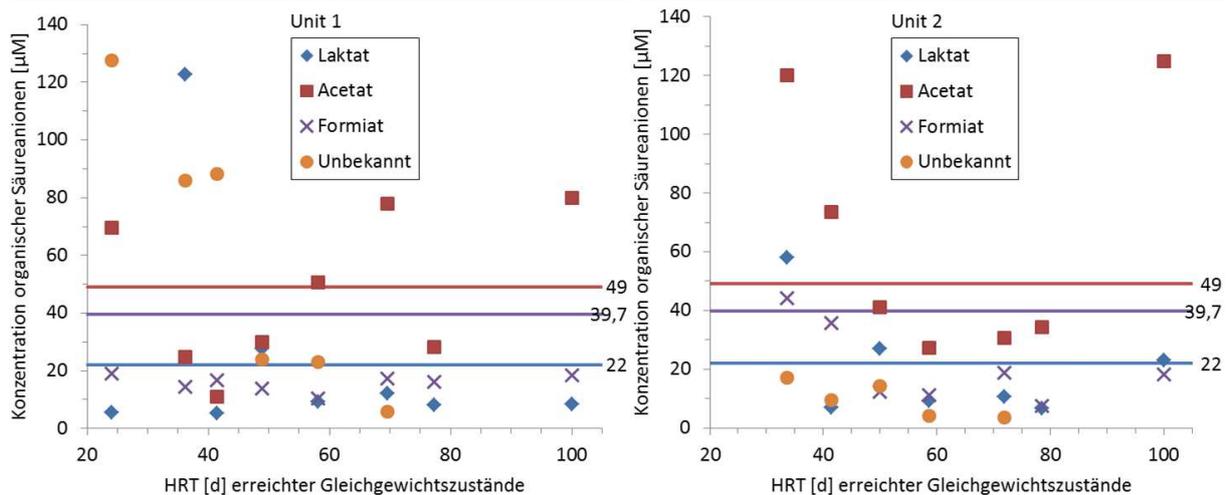


Abbildung 21: Konzentrationen organischer Säureanionen in Unit 1 und 2. Links: Bestimmte Konzentrationen von Laktat, Acetat, Formiat und einer unbekannt Komponente (Abschnitt 3.4) zu den jeweils angegebenen hydraulischen Retentionszeiten (HRT) von Unit 1. Rechts: Unit 2. Die unteren Quantifizierungsgrenzen für Laktat, Acetat und Formiat sind durch horizontale Linien gekennzeichnet.

Darüber hinaus war bis zu einer HRT von 69,6 d (U1) bzw. 71,9 d (U2) eine unbekannte Substanz nachweisbar, die vergleichbare Signalintensitäten wie die übrigen Analyten aufwies, was ähnliche Konzentrationsbereiche andeutete (3,6 µM bis 127,6 µM). Im Verlauf der abnehmenden HRT war in keiner der beiden Units ein deutlicher Trend erkennbar, die Konzentrationen der Säureanionen lagen größtenteils unterhalb ihrer Quantifizierungsgrenzen, mit nur wenigen Ausnahmen (hauptsächlich Laktat und Acetat, Abbildung 21). Generell waren die bestimmten Konzentrationen äußerst gering. Die in der Reaktorstudie aus Abschnitt 4.1.1 gemessenen FOS-Konzentrationen lagen mit 5 mM bis 15 mM um den Faktor  $10^2$ - $10^3$  höher. Die Streuung der hier bestimmten Werte erklärt sich also vermutlich durch das Messrauschen im Bereich der unteren Quantifizierungsgrenze. Anhand nachträglicher HPLC-Messungen wurde zusätzlich versucht, die unbekannte Substanz zu identifizieren. Dazu wurden die Elutionszeiten für Valerat, Succinat und Pyruvat bestimmt (Abschnitt 3.4), welche als mögliche Metabolite vermutet wurden. Ein Vergleich der so erzeugten Chromatogramme mit dem Elutionsprofil der unbekannt Substanz ermöglichte jedoch keine Zuordnung. Schließlich wurde die Konzentration dieses Analyten aufgrund der geringen Signalintensität auch als vernachlässigbar klein angenommen.

In beiden Units wurden über nahezu die gesamte Prozesszeit und alle HRT gleichbleibend niedrige Ethanolkonzentrationen von unter  $1 \text{ mg L}^{-1}$  bestimmt (Abbildung 39). Einzig in U1 wurde mit  $7,7 \text{ mg L}^{-1}$  bei der niedrigsten erreichten HRT von 24,1 d eine vergleichsweise hohe Konzentration gemessen. Allerdings liegt die untere Nachweisgrenze des Ethanoltests bei

einer Extinktionsdifferenz von 0,020 (Angabe des Herstellers), was laut Formel 19 einer Ethanolkonzentration von  $23 \text{ mg L}^{-1}$  entspricht. Die hier bestimmten Restsubstratkonzentrationen befanden sich also deutlich unterhalb des linearen Messbereichs, weshalb von einer vollständigen Umsetzung des Ethanols ausgegangen wurde.

Als Parameter für die Biomassekonzentrationen wurden die Biotrockenmassen und die Proteingehalte bestimmt (Abbildung 22). Während der ersten 36 Prozesstage blieb die Biotrockenmassekonzentration in U1 stabil bei  $2,22 \pm 0,54 \text{ g L}^{-1}$ . Danach war eine stetige Zunahme der Biomasse im Verlauf der Kultivierung auf  $8,61 \pm 1,19 \text{ g L}^{-1}$  innerhalb der letzten 2 Wochen zu beobachten. In U2 wurde eine relativ konstante Biotrockenmassekonzentration von  $2,43 \pm 0,47 \text{ g L}^{-1}$  während der ersten 51 d gemessen. Wie auch in U1 stieg diese im Verlauf der folgenden Prozesstage stetig an bis auf  $7,13 \text{ g L}^{-1}$  nach 96 d, bzw. auf  $9,56 \text{ g L}^{-1}$  in Folge des bereits beschriebenen technischen Defekts am Rührwerk nach 97 d. Die mittels Lowry bestimmten Gesamtproteingehalte wurden mithilfe des Faktors von 0,64 in Biomassekonzentrationen umgerechnet [21]. Auch die anhand des Proteingehalts abgeleiteten Biomassekonzentrationen waren in U1 mit  $3,03 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$  während der ersten 70 d konstant. In der zweiten Phase von Prozesstag 71-111 stiegen die Konzentrationen auf  $6,57 \pm 0,39 \text{ g L}^{-1}$  während der letzten Woche der Kultivierung. Auch in U2 waren die Biomassekonzentrationen über die ersten 70 d relativ stabil bei  $2,61 \pm 0,20 \text{ g L}^{-1}$  und stiegen im folgenden Zeitraum auf  $8,02 \text{ g L}^{-1}$  am Tag des technischen Defekts (97 d).

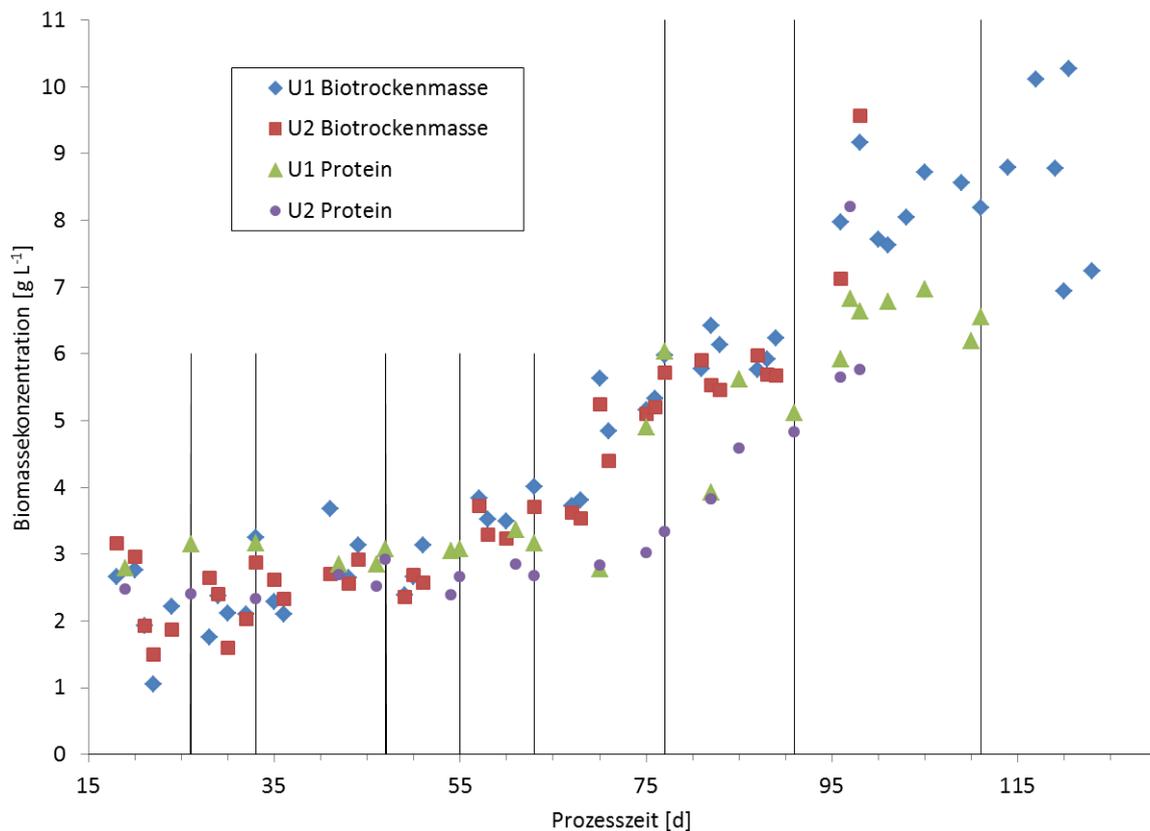


Abbildung 22: Biomassekonzentrationen im Prozessverlauf von Unit 1 und 2. Die Abschätzung der Biomassekonzentrationen anhand der Biotrockenmassen und der Proteingehalte nach Lowry erfolgte gemäß Abschnitt 3.2.7. Protein: dargestellt sind die aus den Proteingehalten errechneten Biomassekonzentrationen anhand des Umrechnungsfaktors 0,64 [21]. Vertikale Striche: Zeitpunkte des Erreichens von Gleichgewichtszuständen (vgl. Tabelle 2). U1: Unit 1, U2: Unit 2, HRT: hydraulische Retentionszeit.

Zur qualitativen Bewertung des gebildeten Biogases in den Units 1 und 2 wurden mithilfe von Formel 4 die Gaszusammensetzung anhand des verwendeten Mediums (Abschnitt 3.2.3) bestimmt. Das theoretische Verhältnis von  $\text{CH}_4$  zu  $\text{CO}_2$  lag dabei mit 2,89 unter den beobachteten Verhältnissen, deren Mittelwert über die beprobten Gleichgewichtszustände 3,40 betrug (Abbildung 19). Eine mögliche Erklärung liefern die notwendigerweise sehr langen Verbindungen vom Reaktor zur Gasmessung. Trotz der Verwendung gasdichter Schläuche kann an Verbindungsstücken durch Gasdiffusion eine leichte Verfälschung auftreten. Dies deutet sich auch dadurch an, dass die Summen der Anteile von  $\text{CO}_2$  und  $\text{CH}_4$  nicht 100% ergeben (79%-89%). Bei stichprobenartigen Injektionen von Gas aus dem Reaktorkopfraum in den GC wurde dies nicht beobachtet (hier nicht dargestellt). Weiterhin besteht eine deutlich bessere Löslichkeit von  $\text{CO}_2$  im wässrigen Reaktorinhalt als von  $\text{CH}_4$ , wodurch gleichzeitig ein Carbonatpuffer aufgebaut wird. Durch das stetige Absinken der pH-Werte im späteren Prozessverlauf (Abbildung 20) kommt es zum Abbau des Puffers und einer verstärkten Ausgasung des  $\text{CO}_2$ , was wiederum den leichten Abwärtstrend der  $\text{CH}_4$ : $\text{CO}_2$ -Verhältnisse über

die abnehmenden HRT erklärt. Bei der quantitativen Betrachtung des Verhältnisses aus gemessener und theoretisch möglicher Biogasbildung (Abbildung 23) wurden Ausbeuten zwischen 82,4 und 97,2% erzielt, wobei ein leichter Anstieg der Ausbeuten mit abnehmender HRT zu verzeichnen war.

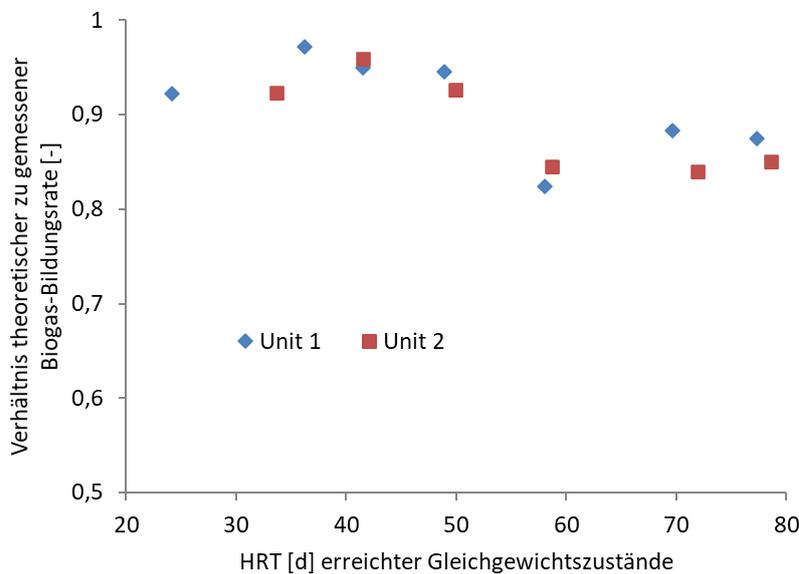


Abbildung 23: Verhältnisse gemessener zu theoretischer Gasbildungsrate aller HRT in Unit 1 und Unit 2. Die gemessenen Bildungsrate wurden anhand der Ist-Förderraten (Tabelle 2) und der nicht auf das Reaktorvolumen normierten Biogas-Bildungsrate bestimmt (Abbildung 19). Die Berechnung der theoretischen Gasbildungsrate erfolgte anhand der Ist-Förderraten, der Medienzusammensetzung (Abschnitt 3.2.3) und Formel 4. HRT: hydraulische Retentionszeit.

Im Prozessverlauf und über alle erreichten HRT wurden gleichbleibend niedrige Konzentrationen von Ethanol (Abbildung 39) oder organischen Säuren (Abbildung 21) gemessen. Da also keine Akkumulation von Substrat oder Metaboliten stattfand, erklärt sich die Differenz zwischen gemessener und theoretischer Biogas-Bildungsrate durch Substratkohlenstoff, der nicht für den Energiestoffwechsel, sondern für den Erhalt von Biomasse genutzt wurde.

Die Quantifizierung der Biomassekonzentration erfolgte im Rahmen dieser Studie über die Trockengewichte und die Proteingehalte der Proben (Abschnitt 3.2.7, Abbildung 22). Vorversuche zeigten, dass die Streuung von Biomassekonzentrationen einer Probe, die mittels Trockengewichten bestimmt wurden, hoch sein kann (46,3% relative Standardabweichung bei Triplikaten). Dafür ist neben Inhomogenitäten des Probenmaterials (z.B. durch Flockenbildung) vor allem aber das Abtrennen der Biomasse von flüssigen Medienbestandteilen verantwortlich, was häufig durch Waschen pelletierter Zellen nach Zentrifugation geschieht. Dieser Schritt ist allerdings wichtig, um nach der Trocknung nicht die

Medienbestandteile mit auszuwiegen. Als Alternative wurde die Filtration der Biomasse durch ein Filterpapier mit 0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße und einer Vakuumpumpe versucht. Dabei stellte sich heraus, dass bereits bei kleinen Probenmengen (wenige mL) auch trotz starker Verdünnung eine umgehende Verblockung der Filter einsetzte, weshalb diese Methode hier keine Anwendung fand. Weiterhin wurde für die Quantifizierung der Trockengewichte keine Trennung von Biomasse und Medium vorgenommen, sondern 7 mL Probe direkt für die Trocknung eingesetzt. Stattdessen erfolgte die Bestimmung der Trockengewichte des Mediums ( $4,24 \pm 0,16 \text{ g}_{\text{Trockenmasse}} \text{ L}_{\text{Medium}}^{-1}$ ) und wurde dann von den jeweiligen Trockengewichten der Proben abgezogen. Zur Erhöhung der statistischen Belastbarkeit einzelner Probenzeitpunkte wären Triplikate wünschenswert gewesen, die zusätzlichen Entnahmen der dafür notwendigen Biomassen hätten allerdings die Reaktorvolumina vor allem bei hohen HRT verfälscht.

Für die Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry war deutlich weniger Probenmaterial notwendig, sodass Triplikate durchgeführt werden konnten. Nachteil dieser Methode ist allerdings die hohe Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber einer Vielzahl von Substanzen [173]. Daneben bestimmt diese Methode Biomasse nur indirekt anhand von Proteinmengen über den allgemeinen Umrechnungsfaktor von 0,64. Dieser stammt aus dem stöchiometrischen Netzwerkmodell (Abschnitt 2.5) [21]. Seine generelle Gültigkeit und Übertragbarkeit zwischen Spezies oder Mikroorganismen in verschiedenen Wachstumsphasen sowie von Rein- auf Mischkulturen ist bisher allerdings nicht belegt.

Trotz der hier diskutierten Probleme beider Methoden wurden diese für die Quantifizierung der Biomassen in U1 und U2 angewendet, da die Biomassekonzentration ein wichtiger Parameter für das stöchiometrische Netzwerkmodell darstellt. Um trotz erwarteter Schwankungen der Messwerte, vor allem für die Trockengewichte, möglichst gute Abschätzung der Biomassen im Prozessverlauf zu erhalten, wurden Proben auch zwischen den Gleichgewichtszuständen der HRT untersucht (Abbildung 22). Generell lagen in der ersten Prozesshälfte die auf Grundlage der Biotrockenmassen und Proteingehalte bestimmten Biomassekonzentrationen mit Mittelwerten von  $2,89 \text{ g L}^{-1}$  und  $2,80 \text{ g L}^{-1}$  (U1, U2) sowie  $3,03 \text{ g L}^{-1}$  und  $2,61 \text{ g L}^{-1}$  (U1, U2) relativ nah beieinander. Im zweiten Abschnitt der Kultivierung (ab 71 d) waren die anhand der Biomassetrockenmassen bestimmten Konzentrationen mit  $6,22 \text{ g L}^{-1}$  und  $5,95 \text{ g L}^{-1}$  für U1 und U2 deutlich höher. Prinzipiell zeigten sich beide Methoden als geeignet, um die Biomassekonzentration abzuschätzen. Eine bessere statistische

Absicherung der bestimmten Werte, vor allem bei Erreichen der jeweiligen Gleichgewichtszustände, sollte bei Folgeversuchen gewährleistet werden. Bei Anwendung der Biomassequantifizierung mittels Trockengewichten muss dazu eine wiederholte Beprobung bei erreichter HRT an den Folgetagen durchgeführt werden, um die relativ hohen Biomasseverluste zu kompensieren, was die Prozesszeit verlängert. Die Proteinbestimmung nach Lowry erfolgt unter deutlich geringerem Biomasseeinsatz, sodass innerhalb kürzerer Zeiten replikative Messungen durchgeführt werden können. Hier ist jedoch die Umrechnung in Biomasse anhand eines allgemeinen Faktors zu überdenken. Während einerseits das Verhältnis von Proteingehalt und Trockenmasse bei planktonischen Mikroorganismen als konstant über den gesamten Zellgrößenbereich beschrieben und auf 63% beziffert wurde [174], ist für Reinkulturen von *Escherichia coli* ein Proteingehalt von nur 55% beschrieben [175]. Ein für die untersuchte Probe individuell gültiger Faktor für das Verhältnis von Proteingehalt zu Zelltrockenmasse könnte durch eine Kombination von Protein-Fluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie bestimmt werden [176]. Die Kompatibilität dieser Methode mit möglichen Kontaminationen in der Kultur wäre im Vorfeld zu untersuchen. Generell ließ sich aber eine deutliche Klärung des Probenmaterials im Prozessverlauf vom Inokulum (Abschnitt 3.1.2) über die Anreicherung auf Glukose und Zellulose (Abschnitt 3.1) und schließlich auf Ethanol (Abschnitt 3.2) beobachten, was auch auf einen Rückgang möglicher störender Substanzen hinweist.

FOS, respektive ihre organischen Säureanionen, sind wichtige Metabolite des anaeroben Abbaus von Biomasse und dienen als potenzielle Marker für Prozessstörungen, wenn sie sich im Reaktor anreichern. Dies gilt vor allem für Acetat [57] und Propionat [137]. Ihre Akkumulation kann ebenfalls den pH-Wert beeinflussen und damit auch weitreichende Folgen für Mikrobiome haben. Kritische FOS-Konzentrationen bzw. eine Akkumulation in einer der Units wurden allerdings zu keiner der analysierten Gleichgewichtszustände erreicht. Dies galt auch für die späte Kultivierungsphase von U1, in der ein deutlicher Abfall des pH-Werts auf pH 6,05 (Abbildung 20, HRT 24,1 d) verzeichnet wurde. Eine mögliche Erklärung wäre das Erschöpfen eines Puffersystems, dessen Säure und Base mit den hier verwendeten Methoden nicht erfasst bzw. dessen chemisches Gleichgewicht durch die neue Prozessführung beeinflusst wurde. Mögliche Puffersysteme wären  $\text{CO}_2/\text{Hydrogencarbonat}/\text{Carbonat}$  oder  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ , wobei keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Ursache biologische oder chemische Ursachen hatte. Da der pH-Wert im bestehenden stöchiometrischen

Netzwerkmodell bisher keine Berücksichtigung findet, wurde von weiteren Untersuchungen abgesehen.

Zur Nutzung dieser Daten für eine mögliche Modellvalidierung müssen diese aus Gleichgewichtszuständen des Anreicherungsprozesses abgeleitet worden sein. Das tatsächliche Erreichen dieser *steady-states* wurde jeweils anhand konstanter Gasbildungsraten und Gaszusammensetzungen (Abbildung 19) [114], stabilen pH-Werten (Abbildung 20) und gleichbleibend niedrigen FOS- sowie Restsubstratkonzentrationen (Abbildung 21 und Abbildung 39) festgelegt [110]. Dass diese Parameter tatsächlich als Unterscheidungsmerkmale zwischen einem stabilen und einem instabilen Prozess gelten können, zeigte sich anhand der beobachteten Versäuerung in U1 nach Einstellen der HRT 16,7 d ab Tag 115. Die Biogas-Bildungsrate von  $6,974 \text{ NL L}_{\text{RV}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  brach mit Erreichen eines pH-Werts von 5,8 innerhalb weniger Stunden ein und war ab diesem Zeitpunkt nicht mehr bestimmbar. Zur Kontrolle wurden an Tag 115 im Abstand weniger Stunden drei weitere Proben entnommen, um die Konzentrationen der FOS zu bestimmen. Diese zeigten eine deutliche Akkumulation von Acetat mit Konzentrationen von 10,96 mM, 25,34 mM und 23,66 mM und zeigten ähnliche Konzentrationen wie bei der beobachteten Versäuerung während der  $\text{NH}_3$ -Toxifikation in R5 und R6 der vorangegangenen Studie (Abschnitt 4.1, Abbildung 11). Weiterhin war eine zunehmende Schaumbildung auf der Oberfläche des Reaktorinhalts zu erkennen, die zu keinem vorherigen Zeitpunkt beobachtet wurde und auf ein verstärktes Absterben von Mikroorganismen und der daraus folgenden Zellyse hinweist (Abbildung 24).



Abbildung 24: Schaumbildung nach Versäuerung in Unit 1.

Obwohl im Rahmen dieser Versuche definierte HRT eingestellt werden sollten, zeigten die Biomassekonzentrationen eine stetige Zunahme. Konstante Biomassekonzentrationen zu jeweils eingestellten HRT zeigen sich lediglich an wenigen Stellen in Form angedeuteter Plateaus. Eine Erhöhung der Zeitintervalle  $dt$  (vgl. Abbildung 5) wäre vermutlich geeignet gewesen, eine bessere Anpassung der Biomasse auf stabile und gleichbleibende Konzentrationen zu erlauben und gleichzeitig eine ausreichende Probendichte zu ermöglichen. Der generelle Trend der Biomasse im Kultivierungsverlauf steht allerdings im Widerspruch zur klassischen Annahme, dass in kontinuierlichen Prozessen Biomassebildung und -austag gleich groß sind, was keine Zunahme der Biomassekonzentration mit steigender Verdünnungsrate  $D$  zulässt (vgl. Abbildung 4, Abschnitt 2.6). Bei näherer Betrachtung der zugrundeliegenden Modellgleichungen eignet sich dieser konstante Verlauf der Biomassekonzentration jedoch hauptsächlich für die Beschreibung von Reinkulturen in kontinuierlichen Prozessen [177] und unter Vernachlässigung des Erhaltungskoeffizienten für den Erhaltungsstoffwechsel [178]. Dieser fasst alle intrazellulären und für das Überleben essenziellen Vorgänge zusammen, bspw. den Umsatz von Makromolekülen, Stofftransport-Vorgängen oder den Erhalt des osmotischen Drucks. Der für den Erhaltungsstoffwechsel verbrauchte Anteil des energieliefernden Substrats steht nicht für die Biomassebildung zur Verfügung und wird als Erhaltungskoeffizient bezeichnet. Eine mögliche Berücksichtigung des Erhaltungskoeffizienten erfolgt über die Substrataufnahmerate (Abbildung 25) [94], die

Bestimmung des Verhältnisses von Biomassebildung und Erhaltungstoffwechsel kann experimentell erfolgen.

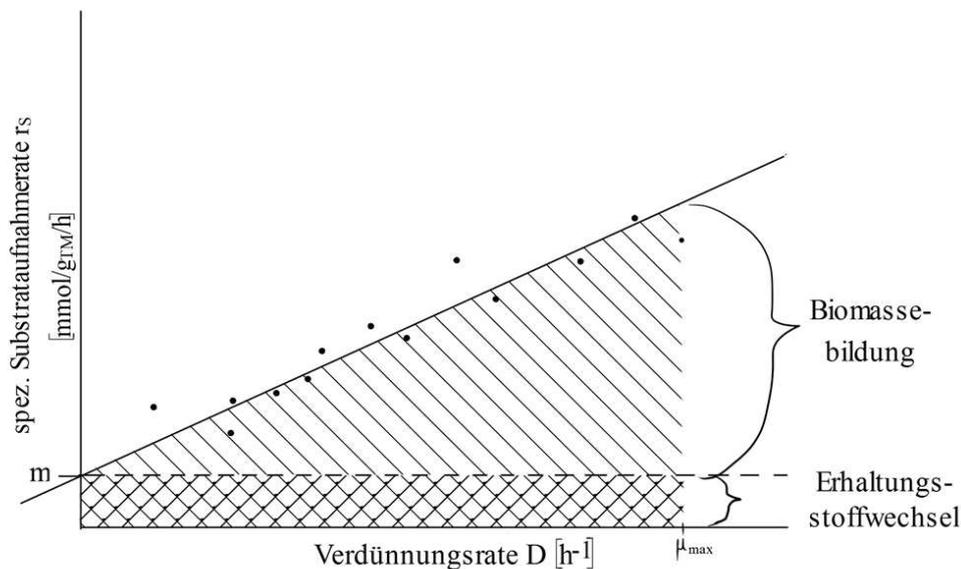


Abbildung 25: Experimentelle Bestimmung des Erhaltungskoeffizienten. Abbildung aus Koch 2014 [97]. Durch grafische Auftragung der spezifischen Substrataufnahmerate  $r_s$  von kontinuierlichen Kultivierungen im Gleichgewichtszustand gegen verschiedene Verdünnungsraten  $D$  (zwischen 0 und der maximalen spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\text{max}}$ ) lässt sich der Erhaltungstoffwechsel  $m$  über den Ordinatenschnittpunkt der Regressionsgeraden ablesen.  $g_{\text{TM}}$ : Gramm Trockenmasse.

Anhand der Darstellung des Verhältnisses von Erhaltungstoffwechsel und Biomassebildung in Abbildung 25 wird deutlich, dass vor allem bei kleinen Verdünnungsraten  $D \ll \mu_{\text{max}}$ , respektive sehr hohen HRT, der Erhaltungstoffwechsel einen großen Anteil am Verbrauch des jeweils aufgenommenen Substrats hat. Ausgehend von niedrigen Verdünnungsraten werden also nur relativ kleine Biomassekonzentrationen möglich, da ein verhältnismäßig hoher Anteil der durch das Substrat zur Verfügung stehenden Energie in den Erhaltungstoffwechsel fließt.

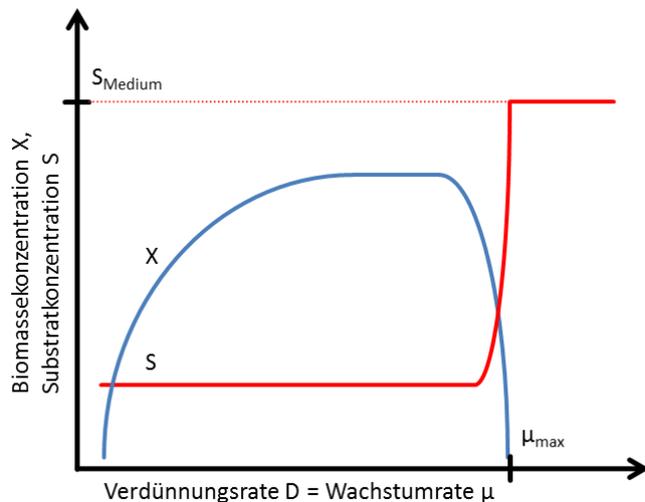


Abbildung 26: Biomasse- und Substratkonzentrationen im kontinuierlichen Prozess mit Berücksichtigung des Erhaltungstoffwechsels. Abbildung abgewandelt von Schmideder 2016 [179]. Dargestellt sind die Verläufe der Biomassekonzentrationen  $X$  (blau) und Substratkonzentrationen  $S$  (rot) in Abhängigkeit der Verdünnungsrate  $D$ , welche der Wachstumsrate  $\mu$  entspricht.  $\mu_{\text{max}}$ : maximale spezifische Wachstumsrate.

Mit zunehmender Verdünnungsrate sinkt dieser Anteil und mehr Biomasse kann gebildet werden (Abbildung 26). Diese theoretische Betrachtung lässt sich wiederum gut von den im Experiment bestimmten, zunehmenden Biomassekonzentrationen stützen (vgl. Abbildung 22). Auch eine entsprechende Auftragung der spezifischen Substrataufnahmeraten gegen die Verdünnungsraten für die durchgeführten Kultivierungen (Abbildung 27) zeigt einen ähnlichen Trend wie der theoretisch erwartete Verlauf in Abbildung 25. Zwar deuten die Werte der Bestimmtheitsmaße mit  $R^2=0,2758$  bzw.  $R^2=0,2686$  eine unzureichende Güte der linearen Regressionen an, die erhaltenen Erhaltungskoeffizienten der mikrobiellen Gemeinschaften liegen mit  $0,48 \text{ mmol g}_{\text{TM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und  $0,42 \text{ mmol g}_{\text{TM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  im Erwartungsbereich mathematischer Modelle, die sich auf Literaturwerte von Einzelorganismen stützen (vgl. Abschnitt 4.2.4). Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass der in Abbildung 25 dargestellte Verlauf idealisiert ist und für Reinkulturexperimente Anwendung findet. Von einer grundlegenden Eignung dieser Betrachtung für Experimente mit komplexen Mischkulturen kann allerdings ausgegangen werden.

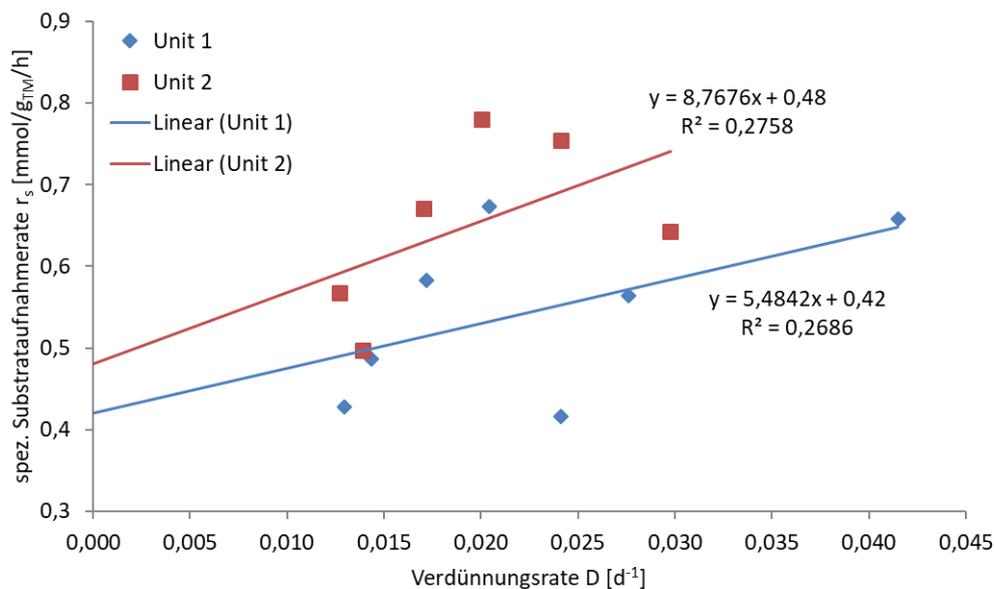


Abbildung 27: Experimentelle Bestimmung des mittleren Erhaltungskoeffizienten von Mischkulturen. Grafische Auftragung der spezifischen Substrataufnahmerate  $r_s$  von Unit 1 und Unit 2 gegen verschiedene Verdünnungsraten  $D$ . Der Koeffizient für den Erhaltungsstoffwechsel ergibt sich als Ordinatenschnittpunkt der jeweiligen Regressionsgraden (Unit 1:  $0,42 \text{ mmol g}_{\text{TM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , Unit 2:  $0,48 \text{ mmol g}_{\text{TM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).  $\text{g}_{\text{TM}}$ : Gramm Trockenmasse,  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß der linearen Regression.

Ein Mikrobiom ist die Assemblierung einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen, die jeweils zueinander in trophischen oder konkurrierenden Beziehungen stehen können und dadurch voneinander abhängige oder unabhängige Wachstumsraten haben. Die daraus resultierenden synökologischen Optima jeder Spezies werden wiederum durch jede Änderung der Kultivierungsbedingungen beeinflusst. Aus diesem Sachverhalt leitet sich die Frage ab, ob die beobachtete Zunahme der Nettobiomasse (Abbildung 22) aus einer gleichmäßigen Zunahme der Biomassen jeder Spezies resultiert. In diesem Fall würden alle Organismen während eines Gleichgewichtszustand mit vergleichbaren spezifischen Wachstumsraten  $\mu$  wachsen. Alternativ könnten die steigenden Verdünnungsraten und damit verbundenen Umweltbedingungen bestimmten Spezies einen Wachstumsvorteil verschaffen, was zu einer relativen Verschiebung der Biomasseanteile im Rahmen der zunehmenden Biomassekonzentration führen würde. Weiterhin sind die Biomasseanteile der verschiedenen Organismengruppen wichtige Größen für die Validierung des stöchiometrischen Netzwerkmodells. Aus diesen Gründen wurde die LC-MS/MS-basierte Metaproteomanalyse zur funktionalen und taxonomischen Untersuchung der beprobten Gleichgewichtszustände herangezogen (Abschnitt 4.2.3).

### 4.2.3. Metaproteomanalyse

Für einen initialen, visuellen Vergleich der Proteinfingerabdrücke der Mikrobiome aller beprobten HRT und des Inokulums in U1 und U2 wurden Elektrophorese-Gele der Proteinextrakte angefertigt (Abbildung 28). Diese zeigten für fast alle beprobten HRT sehr ähnliche Größenverteilungen der Proteine, was auf ein gleichbleibendes, stabiles Mikrobiom hinweist. Generell fiel auf, dass die Qualität der Bandenmuster sehr gut war, vor allem durch das Fehlen einer Hintergrundfärbung (vgl. Abbildung 14, Ino), und darüber hinaus die Zahl der Banden in den Gelspuren deutlich geringer war als in den Anreicherungen der vorangegangenen Studie (Abschnitt 4.1). Wenige Änderungen im Verlauf der abnehmenden HRT zeigten sich aber in den Bandenmustern von U1 und U2 durch die Zu- oder Abnahme von Intensitäten. Für U1 zeigten sich bspw. Proteinbanden zwischen 55 kDa und 72 kDa sowie zwischen 26 kDa und 34 kDa mit leicht abnehmender Intensität im Prozessverlauf, wohingegen Banden im Bereich <55 kDa und zwischen 34 kDa und 43 kDa intensiver wurden. Bei U2 zeigten sich leichte Bandenintensivierungen zwischen 26 kDa und 34 kDa sowie 55 kDa und 72 kDa über die HRT 78,6 d bis 49,9 d. Weiterhin wurden auf Ebene der SDS-PAGE auch keine deutlichen Unterschiede zwischen den Bandenmustern von U1 und U2 festgestellt. Lediglich die Probe der Versäuerung (VS) in U1 nach 114 d hob sich durch extrem starke Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 34 kDa und 55 kDa ab.

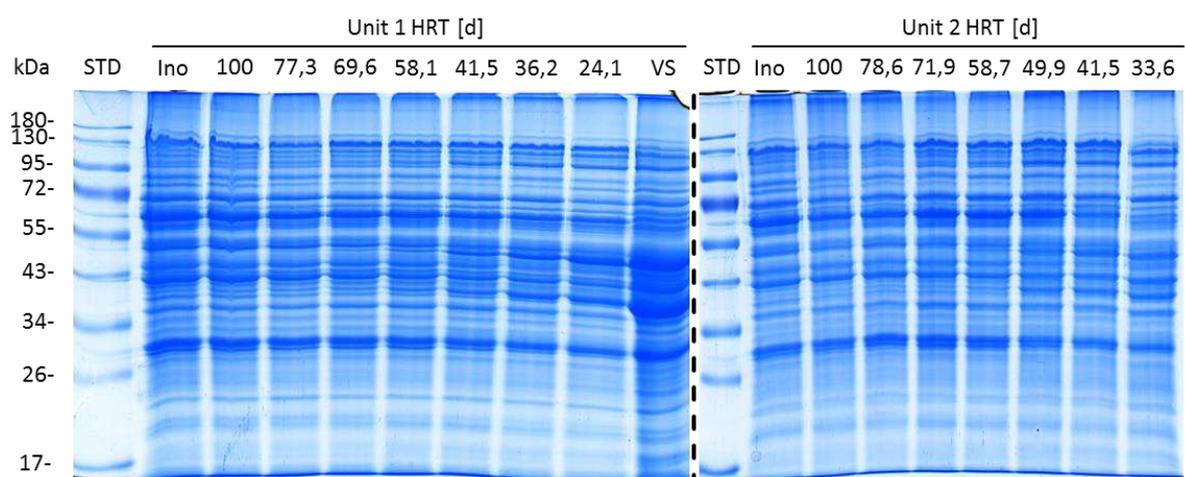


Abbildung 28: SDS-PAGE von Proteinextrakten des Inokulums und aller HRT von Unit 1 und Unit 2. Je Probe und Spur wurden 25 µg Proteinextrakt mit Aceton gefällt und geladen (Abschnitt 3.6.1), die Visualisierung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau (Abschnitt 3.6.1). Ino: Inokulum; VS: Probe der Versäuerung; STD: Standard, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, HRT: hydraulische Retentionszeit.

Ausgehend vom Animpfschlamm aus der industriellen BGA, der als Inokulum zuerst für die Anreicherung auf Glukose und Zellulose (Abschnitt 3.1.2), danach auf Ethanol (Abschnitt 3.2.2) verwendet wurde, zeigten sich über die Gesamtprozesszeit von ca. 700 d

deutliche qualitative Verbesserungen der Proteinextrakte. Während das Inokulum (Abbildung 14, Ino) bei einer Beladung von 100 µg sehr wenige Proteinbanden mit geringen Intensitäten zeigt, was auf die Co-Extraktion von Verunreinigungen hinweist, sind nach 261 d bei Beladungsmengen von dagegen nur 25 µg bereits mehr und intensivere Banden zu erkennen, die sich ebenfalls deutlicher vom Gelhintergrund abheben (Abbildung 14). Dies erklärt sich einerseits durch die Verdünnung und andererseits durch den Austrag von Verunreinigungen durch die kontinuierliche Substratgabe. Weiterhin sind Glukose und mikrokristalline Zellulose deutlich schneller bioverfügbar, als die zum Teil sehr komplexen Substrate einer BGA (bspw. Ganzpflanzensilagen, Mist, Gülle). Aus diesem Grund musste deutlich weniger komplexes Substrat hydrolysiert werden (Abschnitt 2.2.1), was eine Reduktion des Mikrobioms zur Folge hatte. Diese Effekte wurden während der Anreicherung auf Ethanol verstärkt, da höhere HRT eingestellt wurden und Ethanol als Kohlenstoffquelle eine Hydrolyse, und damit alle an der Hydrolyse beteiligten Mikroorganismen, überflüssig macht. Die Proteinfingerabdrücke der Proteinextrakte aller beprobten HRT (Abbildung 28) zeigen wiederum weniger, dafür deutlich intensivere und vom Gelhintergrund abgehobene Banden, die qualitativ mit denen von Reinkulturextrakten vergleichbar waren. Auf dem Gelbild der Extrakte von Unit 1 wurde ebenfalls die Probe der Versäuerung aufgetragen (Abbildung 28, VS). Das Proteinstreifenmuster erscheint von der Verteilung der Proteine ähnlich, allerdings sind verhältnismäßig intensivere Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 34 kDa und 43 kDa zu erkennen, die diese Probe von den stabilen HRT unterscheidet. Bereits eine frühere Studie, die den Verlauf einer Versäuerung in einer industriellen BGA untersuchte [57], konnte anhand von SDS-PAGE-Gelen zwischen einem stabilen und einem instabilen Biogasprozess unterscheiden.

Für eine weiterführende taxonomische und funktionale Klassifikation der extrahierten und getrennten Proteine erfolgte der tryptische Verdau der gezehtelten Gelspuren (2D-Ansatz, Abschnitt 3.6.1) sowie die LC-MS/MS-Analyse mittels Orbitrap Elite™ Hybrid Ion Trap-Orbitrap MS (Abschnitt 3.6.2). Die Proteine wurden im MetaProteomeAnalyzer unter Verwendung von X!Tandem und OMSSA identifiziert und anschließend für die weitere Auswertung als Metaproteinlisten separat für Unit 1 und Unit 2 sowie die jeweils beprobten HRT exportiert (Abschnitt 3.6.3), wobei nur HRT berücksichtigt wurden, für die konstante Biogas-Bildungsrate erreicht wurden.

Anhand der Metaproteomanalysen wurden die taxonomischen Zusammensetzungen der Mikrobiome bestimmt, indem auf Grundlage der Metaproteintaxonomien jeweils SpC einer

Domäne zugeordnet und summiert wurden (Abbildung 29). Für U1 und U2 konnten im Mittel 22,5% und 21,1% der identifizierten Spektren keiner Taxonomie zugeordnet werden. Der prozentuale Anteil an Archaeen lag mit 45,4% und 46% in beiden Reaktoren zu jeder HRT am höchsten, wobei sich ein leichter Abwärtstrend mit sinkender HRT zeigte. Einen ähnlichen Verlauf zeigte auch der Anteil an Bakterien mit 22,7% in U1 und 21,2% in U2. Der Anteil an Eukaryoten nahm mit sinkender HRT leicht ab (9,2% und 11,4%), virale Metaproteine wurden ebenfalls zu jedem Zeitpunkt identifiziert, allerdings mit einem Anteil von jeweils unter 1%. Auffällig zeigten sich die hohen SpC eukaryotischer Metaproteine. Diese ließen sich jedoch auf die Kontamination mit Keratin während der Aufarbeitung, sowie wenige pflanzliche Rückstände und Flocken zurückführen, die noch von der Inokulation stammten. Generell zeigten sich die Zusammensetzungen der Mikrobiome auf taxonomischer Ebene der Domänen relativ stabil über alle HRT und auch ähnlich zwischen Unit 1 und Unit 2, was in guter Übereinstimmung mit den einheitlichen Bandenmustern der SDS-PAGE (Abbildung 28) steht.

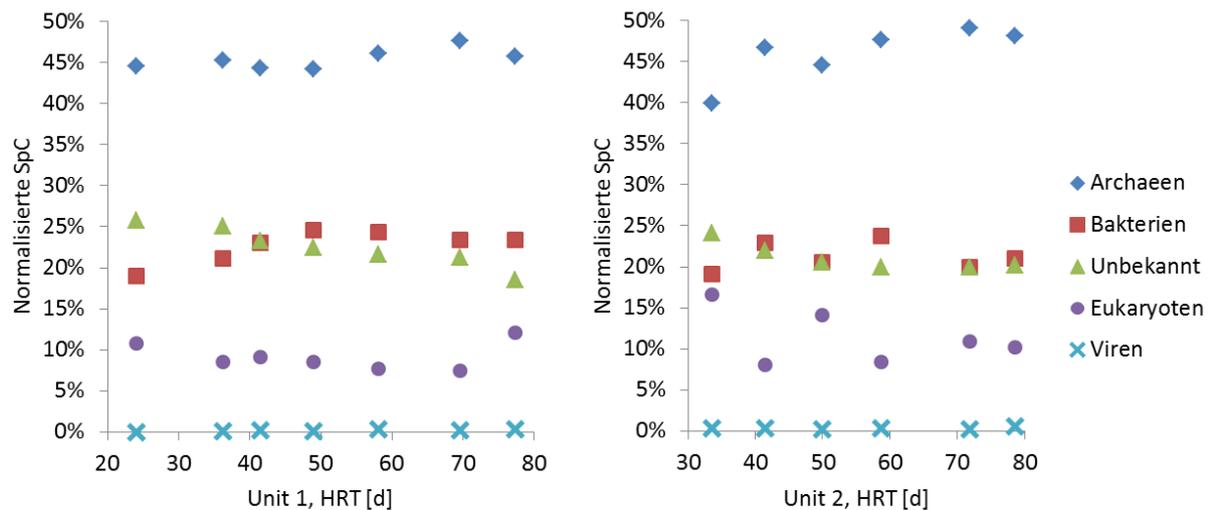


Abbildung 29: Taxonomische Zusammensetzung der Metaproteome von Unit 1 und Unit 2 auf Ebene der Domäne. Mittels LC-MS/MS-basierter Metaproteomanalyse (Abschnitt 3.6) identifizierte Metaproteine (Peptidregel „share at least one peptide“) aller HTRs wurden anhand ihrer LCA-Taxonomie (engl.: lowest common ancestor, letzter gemeinsamer Vorfahre) den Domänen der Archaeen, Bakterien oder Eukaryoten zugeordnet. Daneben erfolgte ebenfalls die Klassifikation in virale Proteine (Viren) bzw. Protein ohne taxonomische Zuordnung (Unbekannt). SpC: engl.: spectral counts, Anzahl identifizierter Spektren; hier: Normalisierung auf die Gesamtanzahl identifizierter Spektren der jeweiligen hydraulische Retentionszeit (HRT). Die Grundgesamtheit der Spektren je Messung betrug  $18.920 \pm 4.240$ .

Für eine eingehendere Analyse der taxonomischen Zusammensetzung und in Vorbereitung auf den Vergleich von experimentellen Daten mit der Modellkultur (vgl. Abbildung 3, bzw. Abschnitt 4.2.4) wurde die Ordnungsebene untersucht (Abbildung 30). In beiden Units war *Methanosarcinales* mit Mittelwerten über alle HRT von 28,2% und 31,3% die am häufigsten vertretene Ordnung, gefolgt von *Methanobacteriales* (10,2%) und *Desulfovibrionales* (9,2%)

in U1, respektive *Desulfovibrionales* (8,6%) und *Methanobacteriales* (8,2%) in U2. Weiterhin wurden die Ordnungen *Enterobacteriales* (U1: 8,0%, U2: 7,0%), *Methanomicrobiales* (5,8%, 5,9%), *Methanococcales* (5,3%, 5,4%), *Bacillales* (je 4,9%) und *Clostridiales* (je 4,0%) identifiziert. Der Anteil an verschiedenen Ordnungen, die zu allen HRT weniger als 5% Gesamtabundanz betragen, lag in U1 und U2 bei 20,4% und 22,2%.

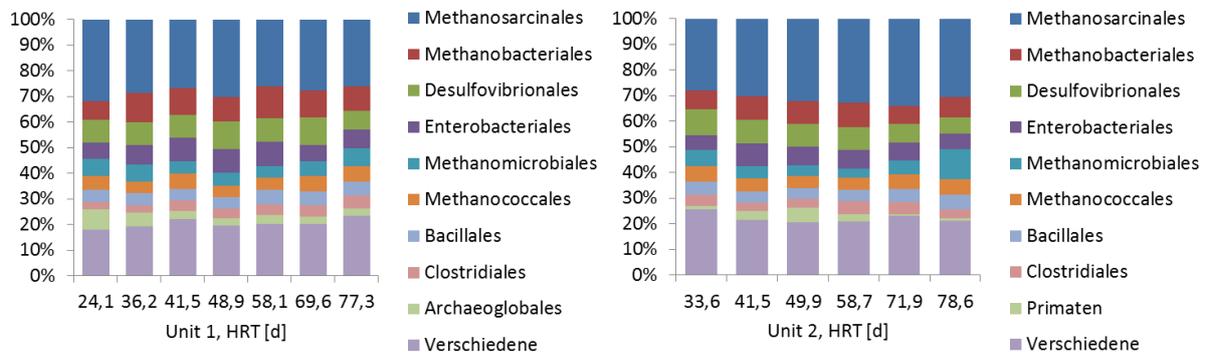


Abbildung 30: Taxonomische Zusammensetzung der Metaproteome von Unit 1 und Unit 2 auf Ordnungsebene. Mittels LC-MS/MS-basierter Metaproteomanalyse (Abschnitt 3.6) identifizierte Metaproteine (Peptidregel „share at least one peptide“) aller hydraulischen Retentionszeiten (HRT) wurden anhand ihrer LCA-Taxonomie (*engl.: lowest common ancestor*, letzter gemeinsamer Vorfahre) den entsprechenden Ordnungen zugeordnet. Prozentangaben entsprechen der Anzahl identifizierter Spektren nach Normalisierung auf Gesamtanzahl identifizierter Spektren der jeweiligen HRT. Ordnungen, die zu keiner HRT mindestens 5% Abundanz erreichten, wurden als Verschiedene zusammengefasst. Metaproteine, deren LCA-Taxonomien systematisch über der Ordnungsebene lagen (Mittelwert 49% über alle HRT), wurden nicht berücksichtigt. Die Grundgesamtheit der Spektren je Messung betrug  $18.920 \pm 4.240$ .

Die definierte Mischkultur des metabolischen Netzwerkmodells, das im Rahmen der Promotion von Dr. Sabine Koch etabliert wurde, wird durch die sechs Organismen *Desulfovibrio. vulgaris* (*D. vulgaris*), *M. maripaludis*, *M. barkeri*, *A. woodii*, *P. freudenreichii* und *S. fumaroxidans* aufgebaut (Abschnitt 2.5). Jeder dieser Organismen repräsentiert spezifische Stoffwechselwege (Abbildung 3), denen sich wiederum viele der hier identifizierten taxonomischen Ordnungen zuordnen lassen (Abbildung 30). Die Ordnung *Methanosarcinales* wird durch *M. barkeri* repräsentiert, *Desulfovibrionales* durch *D. vulgaris* und die hydrogenotrophen, methanogenen Ordnungen *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* und *Methanococcales* durch *M. maripaludis*. *Bacillales* umfasst hauptsächlich aerobe Mikroorganismen [180, 181], wobei auch der anaerobe Stoffwechsel für die hier u.a. identifizierten *Bacillus subtilis* Spezies beschrieben ist [182, 183]. Vertreter dieser Ordnung wurden auch in Metaproteomanalysen industrieller BGA nachgewiesen [87], konnten hier aber keinem Repräsentanten im Modell zugeordnet werden, da die identifizierten Metaproteine keine Schlüsse auf die mögliche metabolische Aktivität zuließen. Weiterhin wurden *Enterobacteriales* mit 8,0% (U1) und 7,0% (U2) Spektrenabundanz

identifiziert. 78,6% dieser SpC entfielen dabei auf das Enzym Alkohol-Dehydrogenase (*engl.: Enzyme Commission number, EC 1.1.1.1*, mittlere SpC von 594,5 über alle HRT). Für *Enterobacteriales* ist allerdings die Ethanolbildung wahrscheinlicher, als die Nutzung, zudem sind für Alkohol-Dehydrogenasen beide Reaktionsrichtungen beschrieben [184] (Datenbankzugriff auf [www.expasy.org](http://www.expasy.org) am 10.04.2018). An der enzymatischen Umwandlung von Ethanol ist neben der Alkohol-Dehydrogenase auch die Aldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.99.7, mittlerer SpC von 806,6) beteiligt (Abschnitt 2.2.3), welche für *Desulfovibrio gigas* identifiziert wurde und 90,9% der SpC von *Desulfovibrionales* betrug. Da die Annotationen im Fall aller identifizierten Alkohol-Dehydrogenasen ausschließlich mittels BLAST gegen die UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank erzeugt wurden, und diese bei *Desulfovibrionales* keine Einträge für Alkohol-Dehydrogenasen (EC 1.1.1.1 und 1.1.1.2) beinhaltet im Vergleich zu 17 Einträgen bei *Enterobacteriales* (Datenbankzugriff auf [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) am 11.04.2018, wurde von einer Falschzuordnung ausgegangen. Aus diesen Gründen erfolgte eine manuelle Re-Annotation der Alkohol-Dehydrogenasen von *Enterobacteriales* zu *Desulfovibrionales*. Weitere taxonomische Ordnungen ohne Modellentsprechung waren *Archaeoglobales* (Abbildung 30), die ausschließlich hyperthermophile Organismen umfassten, *Primaten*, die überwiegend auf Keratin-Verunreinigungen zurückzuführen waren, sowie *Clostridiales*. Für Letztere wurden hauptsächlich hochabundante Metaproteine identifiziert, die keine EC-Nummer besaßen (Wolframat-Bindeprotein, metallabhängige Hydrolasen oder Flagelline), was wiederum keine Zuordnung innerhalb der Modellkultur erlaubte.

Zur Klärung der Frage, welche Stoffwechselwege die identifizierten Organismen bei der Umsetzung von Ethanol zu Biogas nutzen, wurde in den identifizierten Metaproteinen nach spezifischen Enzymen für die möglichen metabolischen Reaktionen gesucht. Vordergründig sollte untersucht werden, welche der möglichen Methanogenese-Routen genutzt werden, da bspw. *Methanosarcinales* sowohl acetoklastisch als auch hydrogenotroph Methan produzieren können. Weiterhin wurden auf taxonomischer Ebene keine Hinweise auf Ordnungen für Homoacetatgärung (*A. woodii* im Modell), Propionatbildung (*P. freudenreichii*) oder -oxidation (*S. fumaroxidans*) gefunden (Abbildung 30).

Sechs mögliche Schlüsselenzyme der Propionatgärung (KEGG-Karte 00640), einschließlich des Methylmalonyl-CoA- und Acryloyl-CoA-Wegs, sind in Abbildung 31 dargestellt. Lediglich für die Enzyme Propionyl-CoA-Carboxylase (EC 6.4.1.3) und Methylmalonyl-CoA-

Carboxytransferase (EC 2.1.3.1) wurden einzelne Spektren bakterieller Herkunft identifiziert (Mittelwert der SpC über U1 und U2 sowie alle HRT betrug 8,32).

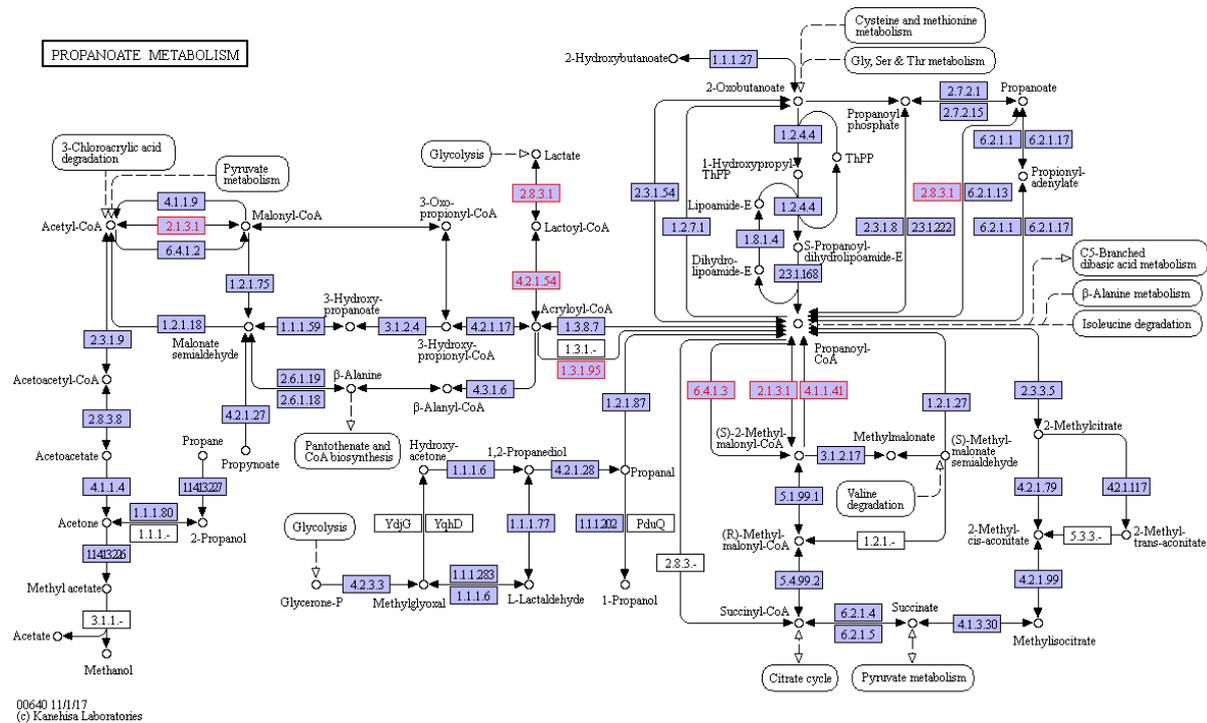
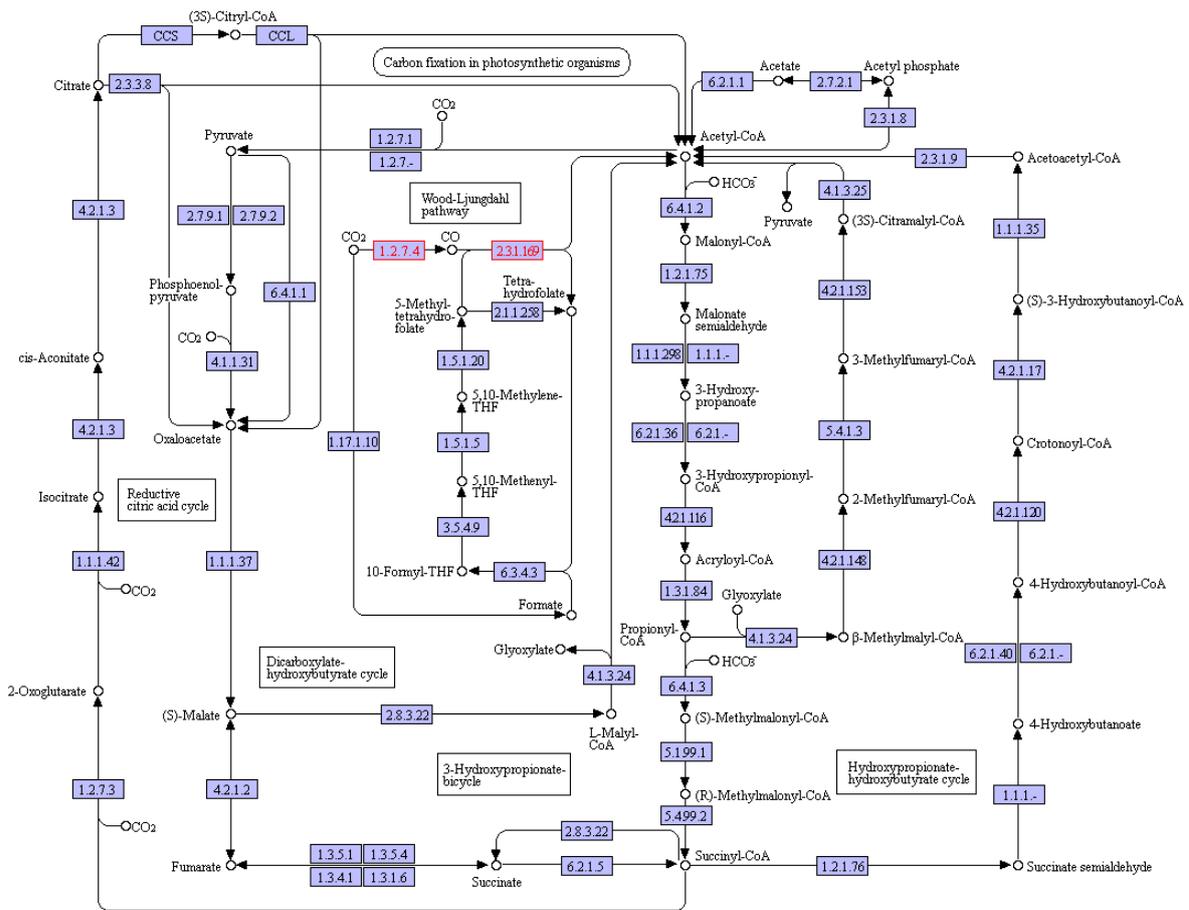


Abbildung 31: KEGG-Stoffwechselkarte 00640 mit Enzymen und Metaboliten der Propionatgärung. Rot hervorgehoben: untersuchte Schlüsselenzyme. EC 2.8.3.1: Propionat-CoA-Transferase, EC 6.4.1.3: Propionyl-CoA-Carboxylase, EC 2.1.3.1: Methylmalonyl-CoA-Carboxytransferase, EC 4.1.1.41: (S)-Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, EC 1.3.1.95: Acrylyl-CoA-Reductase, EC 4.2.1.54: Lactoyl-CoA-Dehydrtase.

Weiterhin wurden die beiden Enzyme Kohlenstoffmonoxid (CO) methylierende Acetyl-CoA-Synthase (EC 2.3.1.169) und anaerobe CO-Dehydrogenase (EC 1.2.7.4) des Wood-Ljungdahl-Wegs untersucht (KEGG-Karte 00720, Abbildung 32) [185]. Der Mittelwert über alle Proben lag bei einem SpC von 38,9 für archaeelle CO-methylierende Acetyl-CoA-Synthase, für die bakterielle Domäne wurde nur ein mittlerer SpC von 2,35 bestimmt. Ebenso wurde die anaerobe CO-Dehydrogenase nur mit archaeeller Taxonomie identifiziert (mittlerer SpC von 569,4). Da die hier ausgewählten Enzyme des Wood-Ljungdahl-Wegs noch keine Spezifizierung bezüglich hydrogenotropher oder acetoklastischer Methanogenese erlaubten, wurden anhand der KEGG-Karte 00680 des Methanmetabolismus entsprechende Schlüsselenzyme bestimmt (Abbildung 33).

CARBON FIXATION PATHWAYS IN PROKARYOTES



00720 11/22/17  
(c) Kanehisa Laboratories

Abbildung 32: KEGG-Stoffwechselkarte 00720 mit beteiligten Enzymen und Metaboliten. Rot hervorgehoben: untersuchte Schlüsselenzyme. EC 1.2.7.4: anaerobe CO-Dehydrogenase, EC 2.3.1.169: CO-methylierende Acetyl-CoA-Synthase.

Für die hydrogenotrophe Methanogenese wurden Methylen-tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (EC 1.5.98.1) und 5,10-Methylen-tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (EC 1.5.98.2) ausgewählt und mit mittleren SpC von 665,1 und 723,8 identifiziert. Da während der Kultivierungen keine Akkumulation von FOS beobachtet wurde (Abbildung 21), stellte sich die Frage, ob Acetat, das als Produkt bei der Ethanoloxidation gebildet wird, acetoklastisch methanisiert oder auf einem anderen Stoffwechselweg abgebaut wird. Dazu wurden die Metaproteomdaten nach den Schlüsselenzymen Acetatkinase (EC 2.7.2.1), Phosphat-Acetyltransferase (EC 2.3.8.1) sowie Untereinheiten des Acetyl-Coenzym-A Decarbonylase/Synthase-Komplexes (ACDS-Komplex: EC 2.3.1.-, EC 2.1.1.245) durchsucht (Abbildung 33).

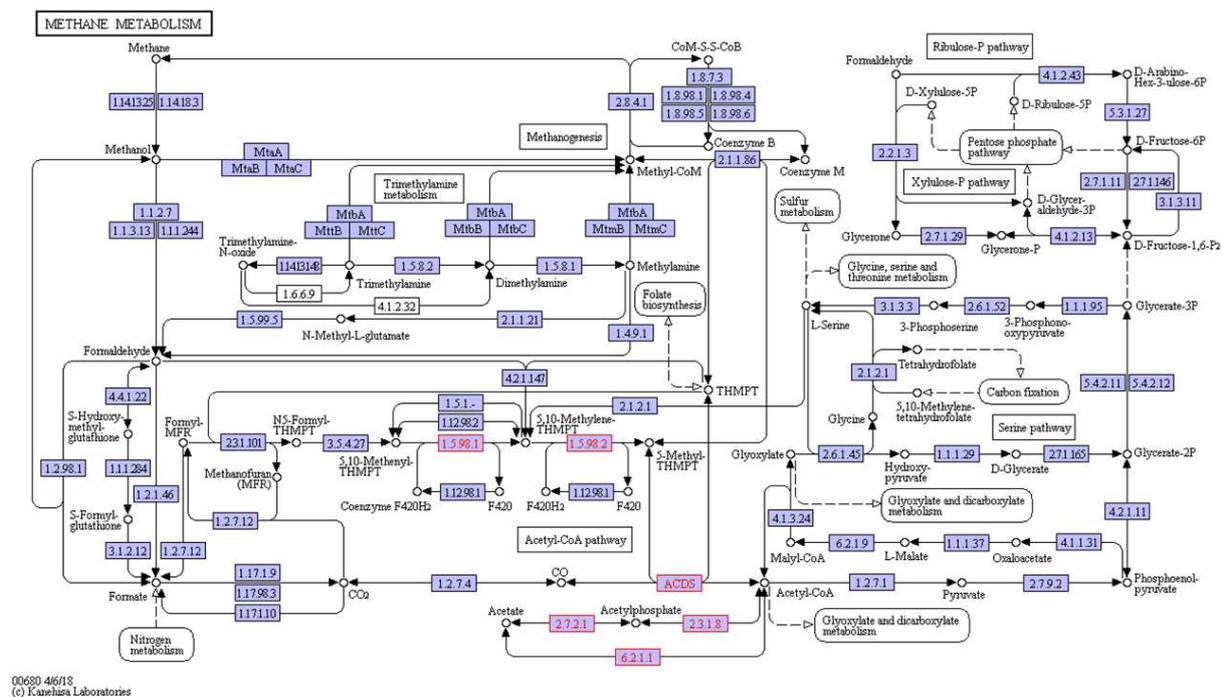


Abbildung 33: Ausschnitt der KEGG-Stoffwechselkarte 00680 mit beteiligten Enzymen und Metaboliten. Rot hervorgehoben: untersuchte Schlüsselenzyme. EC 1.5.98.1: Methylen-tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase, EC 1.5.98.2: 5,10-Methylen-tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase, ACDS: Untereinheiten des Acetyl-Coenzym-A Decarboxylase/Synthase-Komplexes (EC 2.3.1.-, EC 2.1.1.245), EC 2.7.2.1: Acetatkinase, EC 2.3.1.8: Phosphat-Acetyltransferase, EC 6.2.1.1: Acetat-CoA-Ligase.

Obwohl jeweils Proteinsequenzen in der UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank für die Ordnung *Methanosarcina* hinterlegt sind (Datenbankzugriff auf [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) am 12.04.2018), konnten für die Acetatkinase keine, den ACDS-Komplex nur wenige bakterielle (mittlerer SpC von 2,69), und für die Phosphat-Acetyltransferase ebenfalls nur wenige bakterielle Metaproteine identifiziert werden (SpC 3,15). Stattdessen wurde die Acetat-CoA-Ligase (EC 6.2.1.1) identifiziert, die Acetyl-CoA direkt aus Acetat generiert, ohne den Zwischenschritt über Acetyl-Phosphat gehen zu müssen (Abbildung 33). Dieses Enzym ist innerhalb der taxonomischen Ordnung *Methanosaetaceae*, die ausschließlich Acetat als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen können ([186], Seite 253). Die Taxonomien der identifizierten Acetyl-CoA-Ligase-Metaproteine wurden fast ausschließlich als ‚root‘ bestimmt, was auf bakterielle und archaeelle Proteine hinweist. Bei näherer Untersuchung der Metaproteine zeigte sich allerdings, dass im Mittel über alle Proben 508 der 654 Spektren (77,6%), die der EC 6.2.1.1 zugeordnet wurden, auf Proteine von *Methanosaeta sp.* entfallen. Die übrigen identifizierten Spektren verteilen sich auf bakterielle und eukaryotische Ordnungen (u.a. *Psychromonas ingrahamii*, *Actinomycetales*-Ordnungen oder *Drosophila melanogaster*) oder konnten keiner Taxonomie zugeordnet werden, was in jedem Fall dazu führt, dass die Metaprotein-

Taxonomie als ‚root‘ bestimmt wird. Generell lag der Anteil identifizierter Spektren von *Methanosaetaceae* innerhalb der Ordnung *Methanosarcinales* bei 37,1% in U1 und bei 35,5% in U2 (vgl. Abbildung 30), was ebenfalls auf eine verstärkte acetoklastische Funktion innerhalb der Mikrobiome hinweist.

#### 4.2.4. Abbildung biotischer und abiotischer Daten im metabolischen Modell

Die während der Kultivierungen erhaltenen Prozessdaten (Abschnitt 4.2.1 und Abschnitt 4.2.2) sollen in einem ersten Schritt genutzt werden, um grundlegende Parameter wie Wachstums-, Substrataufnahme- und Gasbildungsraten zu bestimmen und mit dem zu validierenden Modell zu vergleichen. Danach sollen die funktionalen und taxonomischen Erkenntnisse der Metaproteomanalyse (Abschnitt 4.2.3) genutzt werden, um Aussagen über die Relevanz von bestimmten Stoffwechselwegen zu machen, respektive über die Notwendigkeit, diese im Modell zu berücksichtigen.

In kontinuierlichen Prozessen wachsen Mikroorganismen mit einer Wachstumsrate  $\mu$ , die der Verdünnungsrate  $D$  entspricht (Abschnitt 2.6). Diese ließ sich jeweils gemäß Formel 1 direkt aus den während den Kultivierungen eingestellten und beprobten HRT ableiten (Tabelle 2). Für die Modellierung wurden diese Wachstumsraten in Form von Gemeinschafts-Wachstumsraten für jeden Organismus im Modell als gleich groß gesetzt. Aus der Bestimmung der Restsubstratkonzentrationen ging hervor, dass Ethanol nicht akkumulierte (Abbildung 39), also vom Mikrobiom mit der gleichen Rate aufgenommen wie über die Fütterung zugegeben wurde. Weiterhin wurde keine Akkumulation organischer Säuren beobachtet und die gemessenen Konzentrationen lagen im Bereich der unteren Quantifizierungsgrenzen (Abbildung 21), weshalb diese als vernachlässigbar angenommen wurden. Dies hatte insbesondere für die Bilanzierung des Kohlenstoffs im Modell Relevanz, da die Akkumulation von Acetat, Butyrat und Propionat vernachlässigt werden konnte. Unter Ausschluss einer Ethanol- und FOS-Akkumulation kann der Substratkohlenstoff nur in Biomasse bzw. durch Methanogenese in  $\text{CH}_4$  und  $\text{CO}_2$  umgewandelt werden. Die Biogas-Bildungsraten sowie die Zusammensetzungen der Gase wurden mit Hilfe des GärOnA-Systems bestimmt (Abbildung 19). Die Berücksichtigung gebildeter Biomassen (Verwendung spezifischer Raten) erfolgte durch Normierung auf die entsprechenden Biomassenkonzentrationen auf Grundlage der Proteingehalte (Abbildung 22). Tabelle 3 und Tabelle 4 zeigen die Wertebereiche der spezifischen Raten und Ausbeuten des Modells sowie der Kultivierungsexperimente von U1

und U2 (Modellanpassung und Parameterbestimmung erfolgten durch Dr. Sabine Koch im Rahmen ihrer Dissertation).

Tabelle 3: Spezifische Raten und Ausbeuten der Anreicherung in Unit 1 sowie der simulierten Modellkultur.

Unit 1		Spezifische Raten [mmol g <sub>Biomasse</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]						Produktausbeuten [mol mol <sup>-1</sup> ]			
		Ethanol		CO <sub>2</sub>		CH <sub>4</sub>		CH <sub>4</sub> :CO <sub>2</sub>		CH <sub>4</sub> :Ethanol	
D [h <sup>-1</sup> ]	Modell	Exp.*	Modell	Exp.*	Modell	Exp.*	Modell	Exp.*	Modell	Exp.*	
0,00054	0,19-1,27	0,43	0,08-0,62	0,17	0,27-1,89	0,59	3,03-3,24	3,56	1,44-1,49	1,38	
0,00060	0,19-1,27	0,49	0,08-0,62	0,19	0,27-1,89	0,67	3,04-3,27	3,50	1,43-1,49	1,39	
0,00072	0,20-1,28	0,58	0,09-0,63	0,22	0,28-1,90	0,75	3,05-3,31	3,47	1,42-1,49	1,29	
0,00085	0,20-1,29	0,67	0,09-0,63	0,30	0,29-1,91	0,99	3,05-3,37	3,31	1,41-1,48	1,47	
0,00100	0,21-1,30	0,42	0,09-0,63	0,19	0,30-1,93	0,61	3,06-3,43	3,25	1,40-1,48	1,47	
0,00115	0,22-1,32	0,56	0,09-0,63	0,25	0,30-1,95	0,86	3,07-3,49	3,44	1,38-1,48	1,52	
0,00173	0,25-1,36	0,66	0,09-0,64	0,29	0,33-1,99	0,93	3,11-3,72	3,17	1,34-1,47	1,42	

\*Exp.: Experimentelle Ergebnisse

Tabelle 4: Spezifische Raten und Ausbeuten der Anreicherung in Unit 2 sowie der simulierten Modellkultur.

Unit 2		Spezifische Raten [mmol g <sub>Biomasse</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]						Produktausbeuten [mol mol <sup>-1</sup> ]			
		Ethanol		CO <sub>2</sub>		CH <sub>4</sub>		CH <sub>4</sub> :CO <sub>2</sub>		CH <sub>4</sub> :Ethanol	
D [h <sup>-1</sup> ]	Modell	Exp.*	Modell	Exp.*	Modell	Exp.*	Modell	Exp.*	Modell	Exp.*	
0,00053	0,19-1,27	0,57	0,08-0,62	0,22	0,27-1,89	0,76	3,03-3,24	3,52	1,44-1,49	1,34	
0,00058	0,19-1,28	0,50	0,08-0,62	0,19	0,27-1,90	0,65	3,04-3,26	3,46	1,43-1,49	1,32	
0,00071	0,20-1,29	0,67	0,08-0,63	0,26	0,28-1,92	0,88	3,04-3,31	3,37	1,42-1,49	1,32	
0,00083	0,20-1,30	0,78	0,09-0,63	0,34	0,29-1,93	1,12	3,05-3,36	3,27	1,41-1,49	1,43	
0,00100	0,21-1,31	0,75	0,09-0,63	0,34	0,30-1,94	1,12	3,06-3,43	3,25	1,40-1,48	1,48	
0,00124	0,22-1,36	0,64	0,09-0,63	0,27	0,31-1,99	0,93	3,08-3,53	3,46	1,38-1,48	1,45	

\*Exp.: Experimentelle Ergebnisse

Die jeweils bestimmten spezifischen Ethanolaufnahme-, sowie CO<sub>2</sub>- und CH<sub>4</sub>-Bildungsraten liegen im Bereich der Modellvorhersagen. Bei den Produktausbeuten liegen die experimentellen Daten bei einigen Verdünnungsraten außerhalb der theoretischen Bereiche. Diese sind allerdings auch deutlich kleiner, weshalb methodische Messungenauigkeiten einen größeren relativen Einfluss darauf haben, ob die bestimmten Werte innerhalb des Bereichs liegen oder nicht. Das stöchiometrische Netzwerkmodell berücksichtigt weiterhin nicht die

Löslichkeit von Gasen in der Kulturbrühe, hier vor allem  $\text{CO}_2$ , was das geringere Verhältnis von  $\text{CH}_4:\text{CO}_2$  gegenüber den Experimenten erklärt. Die Ausbeute  $\text{CH}_4:\text{Ethanol}$  ist maßgeblich von der Biomassezusammensetzung abhängig, ebenso von der ATP- und Biomasseausbeute der Modellorganismen sowie ihren individuellen Koeffizienten für den Erhaltungsstoffwechsel. Da für die Modellierung keine Vorgaben bezüglich der Biomasseanteile der einzelnen Organismen gemacht werden konnten, werden sämtliche möglichen Zusammensetzungen berücksichtigt, weshalb die Modellvorhersagen nur Lösungsbereiche ausgeben.

Die Gesamtheit der möglichen Biomassezusammensetzungen für die Verdünnungsrate  $D=0,001 \text{ h}^{-1}$  ist in Abbildung 34 (links) dargestellt. Ohne Vorwissen zur Struktur der Modellgemeinschaft einfließen zu lassen, sind grundverschiedene metabolische Stoffflüsse möglich, bspw. entweder Ethanoloxidation zu Acetat durch *D. vulgaris* oder syntrophe Oxidation in zwei Schritten über Propionat durch *P. propionicum* und *S. fumaroxidans* (vgl. Abbildung 3). Weiterhin gibt es Lösungen für die Biomassezusammensetzung, die jeweils mit und ohne acetoklastische Methanogenese funktionieren. Im Folgenden werden also die Ergebnisse der Metaproteomanalysen (Abschnitt 4.2.3) sowie die daraus abgeleiteten Beschränkungen für die Modellgemeinschaft vorgestellt.

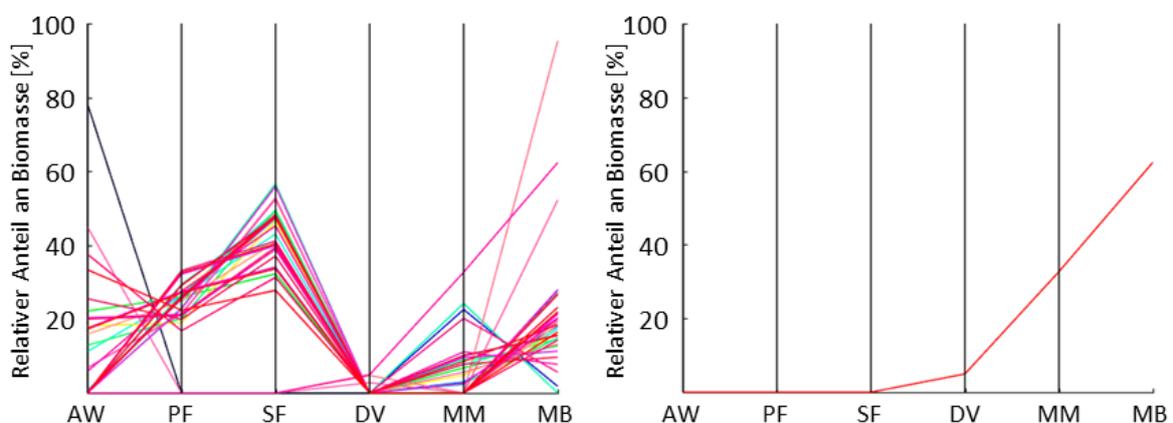


Abbildung 34: Biomassezusammensetzungen des stöchiometrischen Netzwerkmodells für  $D=0,001 \text{ h}^{-1}$ . Links: Repräsentationen möglicher Verteilungen der Organismen innerhalb der Modellkultur. Rechts: mögliche Organismenverteilung nach Einbezug der Ergebnisse der Metaproteomanalysen (Abschnitt 4.2.3). PF: *Propionibacterium freudenreichii*; DV: *Desulfovibrio vulgaris*; AW: *Acetobacterium woodii*; SF: *Syntrophobacter fumaroxidans*; MM: *Methanococcus maripaludis*; MB: *Methanosarcina barkeri*.

Für den Stoffwechselweg der Propionatgärung bzw. der anschließenden syntrophen Propionatoxidation waren keine taxonomischen Ordnungen mit Spektrenabundanz über 5% nachweisbar (Abbildung 30). Weiterhin wurden lediglich zwei Enzyme mit möglicher Relevanz für die Propionatgärung identifiziert (Abbildung 31), allerdings mit einem geringen mittleren

SpC von jeweils <10 (EC 6.4.1.3: Propionyl-CoA-Carboxylase, EC 2.1.3.1: Methylmalonyl-CoA-Carboxytransferase). Im Vergleich zu den deutlich abundanteren Enzymen der Ethanoloxidation durch *Desulfovibrionales*-Ordnungen (mittlere SpC jeweils >800, bzw. >1.400 nach Re-Annotation der EC 1.1.1.1) wurde von einer vernachlässigbaren Rolle des Propionatmetabolismus ausgegangen, weshalb dieser aus der Modellkultur entfernt wurde. Des Weiteren wurden keine Organismen und Enzyme nachgewiesen, die eindeutig der Homoacetatgärung zugeordnet werden konnten. Gleichzeitig gab es auch keinerlei Hinweise auf die Ethanoloxidation durch homoacetogene Bakterien [102], was aufgrund der dafür notwendigen hohen Hydrogencarbonat-Konzentration (bis zu 150 mM) auch nicht erwartet wurde. Identifizierte Metaproteine des Wood-Ljungdahl-Wegs (Abbildung 32) waren archaeellen Ursprungs, und somit höchstwahrscheinlich an der acetoklastischen Methanogenese beteiligt, statt an SAO [187]. Diese ist zwar nicht als Senke für Acetat im hier vorgestellten Modell vorgesehen (Abbildung 3), kann aber einen signifikanten Einfluss auf den Acetatpool in einer BGA haben [32, 188, 189].

Für die hydrogenotrophe Methanogenese wurden insgesamt drei verschiedene Ordnungen identifiziert, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* und *Methanococcales*, die in der Modellgemeinschaft nur durch *M. maripaludis* repräsentiert werden. Spezies von *Methanosaetaceae* wurden dagegen als exklusive acetoklastische Methanogene identifiziert (Abbildung 33). Vertreter dieser Familie sind nicht zu hydrogenotropher Methanogenese in der Lage, weshalb im Modell die H<sub>2</sub>-Aufnahme von *M. barkeri* ausgeschaltet werden konnte. Die Dominanz von *Methanosaeta*-Spezies gegenüber *Methanosarcina*-Spezies erklärt sich durch eine deutlich höhere Substrataffinität für Acetat [190]. Aufgrund der geringen Acetatkonzentrationen in den Kultivierungsversuchen (Abbildung 21) besaßen die *Methanosaeta*-Spezies einen Wachstumsvorteil gegenüber *Methanosarcina*. Für die Methanogenese im stöchiometrischen Netzwerkmodell wurden also aufgrund der Metaproteomdaten jeweils verschiedene taxonomische Ordnungen für die hydrogenotrophe und acetoklastische Bildung von Methan angenommen, obwohl *M. barkeri* über beide Stoffwechselwege verfügt.

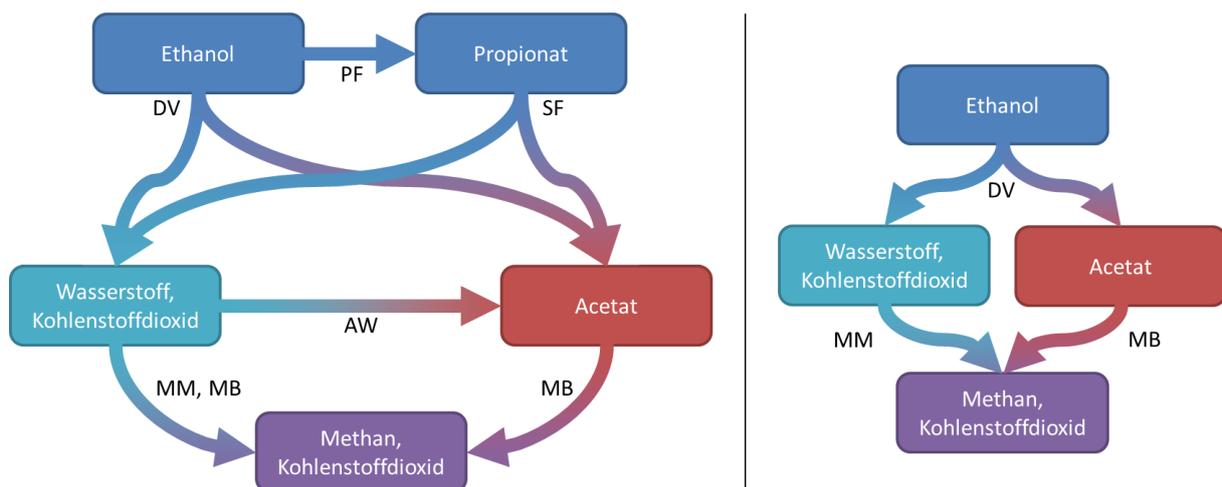


Abbildung 35: Skizze der definierten Modellkultur vor und nach Berücksichtigung der Metaproteomdaten. PF: *Propionibacterium freudenreichii*; DV: *Desulfovibrio vulgaris*; AW: *Acetobacterium woodii*; SF: *Syntrophobacter fumaroxidans*; MM: *Methanococcus maripaludis*; MB: *Methanosarcina barkeri*.

Nach Berücksichtigung der aus den Metaproteomdaten abgeleiteten Beschränkungen, reduziert sich die Modellkultur von ursprünglich sechs Organismen auf *D. vulgaris*, *M. maripaludis* und *M. barkeri* (Abbildung 34, rechts, Abbildung 35). Bei den im Kultivierungsprozess angereicherten Mikrobiomen wurden zu keiner der beprobten Prozesszeiten Hinweise auf verstärkt ablaufende Homoacetatgärung, syntrophe Acetatoxidation oder Propionatgärung während der Biogasbildung aus Ethanol gefunden, respektive Vertreter entsprechender Taxonomien identifiziert. Der Biomasseanteil des Ethanoloxidierers ist laut dem auf diese Weise vereinfachten stöchiometrischen Netzwerkmodell für die untersuchten Raten und Ausbeuten (Tabelle 3 und Tabelle 4) am geringsten (*D. vulgaris*, <10%). Der Anteil der hydrogenotrophen Methanogenen beträgt ca. 30% (*M. maripaludis*), der der acetoklastischen Methanogenen ca. 60% (*M. barkeri*). Dieser Trend spiegelt sich auch in den zuvor bestimmten Biomasseanteilen der Metaproteomanalyse wider (Abschnitt 4.2.3), die eine deutliche archaeelle Dominanz zeigten (Abbildung 29). Da der untersuchte Bereich der Verdünnungsraten verhältnismäßig klein war, sind auch keine Verschiebungen der Biomasseverhältnisse zu erwarten (<2% laut Modell), bzw. wurden diese auch nicht beobachtet (Abbildung 30). Daneben galt für alle untersuchten Gleichgewichtszustände, dass die eingestellten D deutlich kleiner waren, als die  $\mu_{\max}$  der identifizierten Organismen. Dies ist vermutlich auf einen hohen Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels auf die ATP- und Biomasseausbeuten zurückzuführen, was wiederum für Abweichungen von Modell und Experiment sorgt. Eine experimentelle Bestimmung des Koeffizienten für den Erhaltungsstoffwechsel aus Reinkulturexperimenten ist aber nur zur

ungefähren Größeneinordnung sinnvoll (Abbildung 27), da innerhalb eines Mikrobioms andere Wachstumsbedingungen gelten (autökologisches vs. synökologisches Optimum).

Insgesamt gesehen waren die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Anreicherungsexperimente geeignet, Prozessparameter abzuleiten, anhand derer die grundlegende Gültigkeit eines stöchiometrischen Netzwerkmodells für die Biogasbildung aus Ethanol durch ein Mikrobiom gezeigt werden konnte. Weiterhin lieferte die Metaproteomanalyse wertvolle Informationen zur Biomassezusammensetzung und durch Identifikation von Schlüsselenzymen Aussagen über die Nutzung bzw. Abwesenheit spezifischer Stoffwechselwege, wodurch Lösungsräume des Modells systematisch verkleinert werden konnten. Weiterhin konnten mögliche und notwendige Modellerweiterungen aufgezeigt werden.

Die Assemblierung einer definierten Mischkultur aus Einzelkulturen anstelle einer Anreicherungskultur gestaltete sich aufgrund der sehr anspruchsvollen Kultivierungsbedingungen von Anaerobiern als schwierig. Problematisch war vor allem der Umgang mit den sehr sensiblen Reinkulturen an sich, allem voran der Transfer und die Kultivierung in einem Kultivierungssystem außerhalb einer Anaerobwerkbank. Hier sollten zukünftige Arbeiten anknüpfen, da eine assemblierte Mischkultur einerseits die Analytik deutlich erleichtert und andererseits nicht die komplexe Begleitmikrobiologie einer Anreicherungskultur aufweist. Die genaue Erfassung von Erhaltungskoeffizienten beteiligter Mikroorganismen sollte dabei mehr im Vordergrund stehen, da sie nachweislich einen großen Einfluss auf spezifische Substrataufnahme- und Produktbildungsraten haben und damit auch maßgeblich die Zusammensetzung eines Mikrobioms beeinflussen. Die Etablierung weiterer definierter Mischkulturen auf anderen Substraten oder Substratmischungen würde darüber hinaus die Untersuchung verschiedener Teilgemeinschaften ermöglichen. Der Einsatz von Substraten mit isotonenmarkiertem Kohlenstoff würde ergänzend dazu sogar die Möglichkeit einer vollumfassenden Stoffflussanalyse bieten.

## 5. Zusammenfassung

Die Funktionsträger des anaeroben Abbaus von Biomasse in Biogasanlagen (BGA) sind komplexe mikrobielle Gemeinschaften, sogenannte Mikrobiome, deren umfassende Analyse auf strukturellem und funktionellem Niveau herausfordernd ist. Unter Laborbedingungen angereicherte Mikrobiome sind weniger komplex. Die geringere Anzahl an Organismen erleichtert die Analyse mittels moderner, massenspektrometrischer Methoden der Metaproteomanalytik. Basierend auf der Metaproteomanalyse lassen sich grundlegende Funktionen der reduzierten Mikrobiome sowie die entsprechenden stöchiometrischen Netzwerkmodelle ableiten und mittels experimenteller Daten validieren.

Im Rahmen einer ersten Reaktorstudie wurden sechs parallele Laborreaktoren (R1-R6) mit Schlamm aus einer industriellen BGA inokuliert und mit synthetischem Medium kultiviert, um die Entwicklung angereicherter Mikrobiome unter definierten Laborbedingungen zu erreichen. Während der ersten drei Monate verhielten sich alle Reaktoren bezüglich Biogas-Bildungsraten, Methanausbeuten, pH-Werten und der Konzentrationen flüchtiger organischer Säuren (FOS) sehr ähnlich. Nach Erhöhung der Prozesstemperaturen (R3, R4) und der Stickstofffracht im Medium (R5, R6) zeigten sich deutliche Auswirkungen auf die Prozesse. Nach vorübergehender Akkumulation von Acetat und Propionat in R3 und R4 (von <math><5\text{ mM}</math> auf 10-20 mM) sank die FOS-Konzentration in R4 nach wenigen Wochen wieder auf das Ausgangsniveau, während diese in R3 erhöht blieb und in einem deutlich niedrigeren pH-Wert resultierte (pH 6,5-6,9). R5 und R6 zeigten erhöhte Ammoniakkonzentrationen ( $>1\text{ gNH}_3\text{ L}^{-1}$ ), pH-Werte (pH 7,5-8,0), Acetatkonzentrationen ( $>10\text{ mM}$ ) und sinkende Biogas-Bildungsraten. Obwohl die Prozessparameter der biologischen Replikate sehr ähnlich waren, zeigten die Metaproteomanalysen und die Analysen terminaler Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen deutliche Unterschiede der strukturellen und funktionellen Zusammensetzungen der jeweiligen Mikrobiome. Trotz definierter Laborbedingungen stellten sich offenbar multiple stabile Gleichgewichtszustände ein, ohne dass die Biogasproduktion beeinträchtigt wurde. Diese multiplen stabilen Gleichgewichtszustände sind vermutlich ein Grund, warum Mikrobiome landwirtschaftlicher BGA trotz ähnlicher Prozessbedingungen variieren.

Während einer zweiten Studie wurden zwei kontinuierlich betriebene 1,5 L Laborreaktoren genutzt, um durch die anaerobe Umwandlung von Ethanol zu Methan ( $\text{CH}_4$ ) und Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) weniger komplexe Mikrobiome bei verschiedenen hydraulischen Verweilzeiten von 78,6-24,1 d zu untersuchen. Die Prozessparameter eingestellter Gleichgewichtszustände wurden bestimmt und die Mikrobiome mittels Metaproteomanalyse charakterisiert. Die erzeugten Daten wurden für die Validierung und Verbesserung eines bestehenden stöchiometrischen Netzwerkmodells herangezogen, das aus den Netzwerken repräsentativer Organismen für verschiedene relevante Stoffwechselwege zusammengesetzt wurde. Der vom Modell vorgegebene große Lösungsraum mit verschiedenen Wegen zur Umwandlung von Ethanol zu  $\text{CH}_4$  und  $\text{CO}_2$  konnte mit Hilfe der Metaproteomanalysen deutlich eingeschränkt werden. Die Ethanoloxidation erfolgte ausschließlich über Acetat und Wasserstoff ( $\text{H}_2$ ), nicht aber über Propionat. Weiterhin wurden keine Hinweise auf Homoacetogenese gefunden. Anstelle der erwarteten *Methanosarcinaceae*-Spezies, welche sowohl acetoklastische als auch hydrogenotrophe Methanogenese betreiben können, wurden *Methanosaetaceae*-Spezies als strikt acetoklastische Methanogene identifiziert, während der entstandene  $\text{H}_2$  von strikt hydrogenotrophen Methanogenen verwertet wurde. Die Präsenz von *Methanosaetaceae* wies auf eine erforderliche Erweiterung des Modells um einen entsprechenden Organismus hin. Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse dieser Studie die Notwendigkeit zur Erzeugung geeigneter experimenteller Daten zur Validierung mathematischer Modelle. Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, dass Metaproteomdaten nicht nur für die Analyse der Biomassezusammensetzung geeignet sind, sondern auch wertvolle Impulse für die Verbesserung und Erweiterung mathematischer Netzwerkmodelle mikrobieller Gemeinschaften liefern.

## 6. Ausblick

Für weiterführende Arbeiten sind methodische Verbesserungen zu empfehlen. Alternativ zum SpC als relative Quantifizierungsmethode für Peptide und Proteine sollten bessere Verfahren verwendet werden. Obwohl das Zählen identifizierter Spektren eine direkt zugängliche und einfache Quantifizierungsgröße darstellt, resultieren bereits aus der Spektrenakquisition gängiger *Shotgun*-Messmethoden Verzerrungen. Sogenannte Top-N-Messmethoden als eine datenabhängige Art der Spektrenakquisition erfassen prinzipiell nur die intensivsten Peptidsignale, zusätzlich sorgen aktive Ausschlusszeiten gleichartiger Peptidmassen für eine Unterrepräsentation hochabundanter Peptide. Die Quantifizierung der gesamten Peptidflächen (*engl.: area under curve* [191]) oder die Akquisition aller theoretischen Spektren mittels aufeinanderfolgender Messfenster (*engl.: sequential window acquisition of all theoretical spectra, SWATH* [192, 193]) bietet eine deutlich robustere Alternative. Darüber hinaus würde die Identifikation der Metaproteine deutlich durch die Verwendung eines passenden Metagenoms der zu untersuchenden Probe erleichtert werden. Die hier verwendeten Biogasmetagene Dritter und die UniProtKB-Datenbank zeigten sich zwar, wie auch schon in vorangegangenen Studien [6, 12, 87, 194], als ausreichend, bei der hohen Anzahl nicht identifizierter Proteine (Abbildung 29) ist jedoch durch die Verwendung eines passenden Metagenoms mit einer deutlichen Verbesserung zu rechnen. Großes Potential für bessere taxonomische Zuordnung haben zusammengesetzte (assemblierte) Genome, die durch sogenanntes *Binning* ähnlicher Sequenzen aus Metagenomen erzeugt werden (*engl.: metagenome assembled genomes, MAG* [195]).

Inhaltlich an diese Arbeit anknüpfende Projekte sollten die Assemblierung definierter Mischkulturen im Labormaßstab behandeln, um die Validierung von Modellen zu verbessern. Schwerpunkte sollten dabei auch die Erfassung von Erhaltungskoeffizienten beteiligter Mikroorganismen sowie die Nutzung weiterer Substrate zur Untersuchung verschiedener Teilgemeinschaften und alternativer Stoffwechselwege sein. Die Erkenntnisse über Prozessmarker und multiple stationäre Zustände von Mikrobiomen aus den Anreicherungsversuchen sollten weiterhin im Rahmen umfassender Messkampagnen an industriellen BGA validiert bzw. erweitert werden. Die Funktion redundanter Mikroorganismen und ihre Bedeutung für Ausbildung multipler biologische Gleichgewichts-

Zustände oder für Systemrobustheit durch Gildenbildung könnten dabei im Mittelpunkt stehen. Langfristig gelingt möglicherweise sogar eine Zusammenführung beider Themengebiete in Form der Modellierung des Stoffflusses in einer industriellen BGA sowie der ausführlichen Prozessüberwachung anhand von Sets an repräsentativen Markerproteinen mit ihren metabolischen Funktionen und ihrer taxonomischen Zuordnung.

## Literaturverzeichnis

- [1] McInerney, M. J., and Bryant, M. P. (1981) Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis. *Biomass Conversion Processes for Energy and Fuels*, 277-296, Springer
- [2] Demirel, B. *Major pathway of methane formation from energy crops in agricultural biogas digesters*. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44, 199-222, 2014.
- [3] Weiland, P. *Biogas production: current state and perspectives*. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 849-860, 2010.
- [4] Angelidaki, I., Boe, K., and Ellegaard, L. *Effect of operating conditions and reactor configuration on efficiency of full-scale biogas plants*. *Water Science and Technology*, 52, 189-194, 2005.
- [5] Lederberg, J., and McCray, A. T. *Ome SweetOmics--A Genealogical Treasury of Words*. *The Scientist*, 15, 8-8, 2001.
- [6] Hanreich, A., Schimpf, U., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Benndorf, D., Heyer, R., Rapp, E., Pühler, A., Reichl, U., and Klocke, M. *Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation*. *Systematic and applied microbiology*, 36, 330-338, 2013.
- [7] Pobeheim, H., Munk, B., Johansson, J., and Guebitz, G. M. *Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage*. *Bioresource technology*, 101, 836-839, 2010.
- [8] Liu, J., Olsson, G., and Mattiasson, B. *A volumetric meter for monitoring of low gas flow rate from laboratory-scale biogas reactors*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 97, 369-372, 2004.
- [9] Gerardi, M. H. (2003) *The microbiology of anaerobic digesters*, John Wiley & Sons
- [10] Herrmann, C., Heiermann, M., and Idler, C. *Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops*. *Bioresource Technology*, 102, 5153-5161, 2011.
- [11] Weiß, S., Tauber, M., Somitsch, W., Meincke, R., Müller, H., Berg, G., and Guebitz, G. *Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite*. *Water research*, 44, 1970-1980, 2010.
- [12] Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N. N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Krahn, I., Krause, L., Krömeke, H., and Kruse, O. *The metagenome of a biogas-*

- producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology.* Journal of biotechnology, 136, 77-90, 2008.
- [13] Clement, B. G., Kehl, L. E., DeBord, K. L., and Kitts, C. L. *Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities.* Journal of microbiological methods, 31, 135-142, 1998.
- [14] Wilmes, P., and Bond, P. L. *Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems.* Trends in microbiology, 14, 92-97, 2006.
- [15] Graham, R. L., Graham, C., and McMullan, G. *Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists.* Microbial Cell Factories, 6, 26, 2007.
- [16] Muth, T., Renard, B. Y., and Martens, L. *Metaproteomic data analysis at a glance: advances in computational microbial community proteomics.* Expert Review of Proteomics, 13, 757-769, 2016.
- [17] Stolyar, S., Van Dien, S., Hillesland, K. L., Pinel, N., Lie, T. J., Leigh, J. A., and Stahl, D. A. *Metabolic modeling of a mutualistic microbial community.* Molecular systems biology, 3, 92, 2007.
- [18] Taffs, R., Aston, J. E., Brileya, K., Jay, Z., Klatt, C. G., McGlynn, S., Mallette, N., Montross, S., Gerlach, R., and Inskeep, W. P. *In silico approaches to study mass and energy flows in microbial consortia: a syntrophic case study.* BMC systems biology, 3, 114, 2009.
- [19] Hamilton, S. H., ElSawah, S., Guillaume, J. H., Jakeman, A. J., and Pierce, S. A. *Integrated assessment and modelling: overview and synthesis of salient dimensions.* Environmental Modelling & Software, 64, 215-229, 2015.
- [20] Maarleveld, T. R., Wortel, M. T., Olivier, B. G., Teusink, B., and Bruggeman, F. J. *Interplay between constraints, objectives, and optimality for genome-scale stoichiometric models.* PLoS computational biology, 11, e1004166, 2015.
- [21] Klamt, S., Saez-Rodriguez, J., and Gilles, E. D. *Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer.* BMC systems biology, 1, 2, 2007.
- [22] Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S., Pavlostathis, S., Rozzi, A., Sanders, W., Siegrist, H., and Vavilin, V. *The IWA anaerobic digestion model no 1 (ADM1).* Water Science and Technology, 45, 65-73, 2002.
- [23] Koch, S., Kohrs, F., Lahmann, P., Bissinger, T., Wendschuh, S., Benndorf, D., Reichl, U., and Klamt, S. *RedCom: A strategy for reduced metabolic modeling of complex microbial communities and its application for analyzing experimental datasets from anaerobic digestion.* PLoS Comput. Biol., 15, e1006759, 2019.
- [24] Bundesministerium für Umwelt, N., Bau und Reaktorsicherheit. [www.bmu.de/fileadmin/Daten\\_BMU/Download\\_PDF/Klimaschutz/klimaschutz\\_in\\_zahlen\\_klimaziele\\_bf.pdf](http://www.bmu.de/fileadmin/Daten_BMU/Download_PDF/Klimaschutz/klimaschutz_in_zahlen_klimaziele_bf.pdf). Zugriff 18.06.2018.

- [25] (ZSW), Z. f. S.-u. W.-F. B.-W., and Umweltbundesamt (UBA), F. I. *Entwicklung der erneuerbaren Energien in Deutschland im Jahr 2016*. Stand: Februar 2017.
- [26] Wasserstoff-Forschung, Z. f. S.-u., and Baden-Württemberg (ZSW); Umweltbundesamt (UBA), F. I. *Erneuerbare Energien in Deutschland- Daten zur Entwicklung im Jahr 2016*. Stand: Februar 2017.
- [27] e.V., F. B. *Branchenzahlen 2016 und Prognose der Branchenentwicklung 2017*. Stand: Oktober 2017.
- [28] Schulz, H., and Eder, B. (2001) *Biogas-Praxis: Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele*, Ökobuch
- [29] Gemmeke, B., Rieger, C., Weiland, P., and Schröder, J. *Biogas-Messprogramm II, 61 Biogasanlagen im Vergleich*. Guelzow-Pruezen: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, 2009.
- [30] Schmid, J., Krautkremer, B., and Müller, J. (2005) Biogas-powered microgas-turbine. *Proc. Expo World Conference on Wind Energy, Renewable Energy and Fuel Cells, Hamamatsu/Japan*, p. 2005
- [31] Braun, R. (2007) Anaerobic digestion: a multi-faceted process for energy, environmental management and rural development. *Improvement of crop plants for industrial end uses*, 335-416, Springer
- [32] Schnürer, A., Zellner, G., and Svensson, B. H. *Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors*. *FEMS microbiology ecology*, 29, 249-261, 1999.
- [33] Hansen, K. H., Angelidaki, I., and Ahring, B. K. *Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia*. *Water research*, 32, 5-12, 1998.
- [34] Lindorfer, H., Waltenberger, R., Köllner, K., Braun, R., and Kirchmayr, R. *New data on temperature optimum and temperature changes in energy crop digesters*. *Bioresource technology*, 99, 7011-7019, 2008.
- [35] Boyle, W. *Energy recovery from sanitary landfills—a review*. *Microbial Energy Conversion* (Ed. HG Schlegel and J. Barnea). Pergamon Press, Oxford, UK, 119-138, 1976.
- [36] Koyama, T. *Gaseous metabolism in lake sediments and paddy soils and the production of atmospheric methane and hydrogen*. *Journal of Geophysical Research*, 68, 3971-3973, 1963.
- [37] Li, Y., Park, S. Y., and Zhu, J. *Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste*. *Renewable and sustainable energy reviews*, 15, 821-826, 2011.

- [38] Gujer, W., and Zehnder, A. J. *Conversion processes in anaerobic digestion*. Water science and technology, 15, 127-167, 1983.
- [39] Zeb, B. S., Mahmood, Q., and Pervez, A. *Characteristics and performance of anaerobic wastewater treatment (a review)*. Journal of Chemical Society of Pakistan, 35, 1-6, 2013.
- [40] Shoham, Y., Lamed, R., and Bayer, E. A. *The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides*. Trends in microbiology, 7, 275-281, 1999.
- [41] Ljungdahl, L. G. *The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus Orpinomyces PC-2 and aspects of its applied use*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1125, 308-321, 2008.
- [42] Steenbakkers, P. J., Li, X. L., Ximenes, E. A., Arts, J. G., Chen, H., Ljungdahl, L. G., and Op Den Camp, H. J. *Noncatalytic docking domains of cellulosomes of anaerobic fungi*. J. Bacteriol., 183, 5325-5333, 2001.
- [43] Viéitez, E., and Ghosh, S. *Biogasification of solid wastes by two-phase anaerobic fermentation*. Biomass and Bioenergy, 16, 299-309, 1999.
- [44] Parawira, W., Read, J. S., Mattiasson, B., and Björnsson, L. *Energy production from agricultural residues: high methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion*. Biomass and Bioenergy, 32, 44-50, 2008.
- [45] Fang, C., Thomsen, M. H., Frankær, C. G., Brudecki, G. P., Schmidt, J. E., and AlNashef, I. M. *Reviving Pretreatment Effectiveness of Deep Eutectic Solvents on Lignocellulosic Date Palm Residues by Prior Recalcitrance Reduction*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 56, 3167-3174, 2017.
- [46] Schlegel, H. G. (2007) *Allgemeine mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag
- [47] De Vrije, T., Mars, A., Budde, M., Lai, M., Dijkema, C., De Waard, P., and Claassen, P. *Glycolytic pathway and hydrogen yield studies of the extreme thermophile Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. Applied microbiology and biotechnology, 74, 1358, 2007.
- [48] Zhang, F., Ding, J., Zhang, Y., Chen, M., Ding, Z.-W., van Loosdrecht, M. C., and Zeng, R. J. *Fatty acids production from hydrogen and carbon dioxide by mixed culture in the membrane biofilm reactor*. Water research, 47, 6122-6129, 2013.
- [49] Poehlein, A., Schmidt, S., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Vollmers, J., Thürmer, A., Bertsch, J., Schuchmann, K., Voigt, B., and Hecker, M. *An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis*. PloS one, 7, e33439, 2012.

- [50] Schink, B. *Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation*. Microbiology and molecular biology reviews, 61, 262-280, 1997.
- [51] Seitz, H.-J., Schink, B., Pfennig, N., and Conrad, R. *Energetics of syntrophic ethanol oxidation in defined chemostat cocultures*. Archives of microbiology, 155, 82-88, 1990.
- [52] Thauer, R. K., Jungermann, K., and Decker, K. *Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria*. Bacteriol Rev, 41, 100-180, 1977.
- [53] Cord-Ruwisch, R., Seitz, H.-J., and Conrad, R. *The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor*. Archives of Microbiology, 149, 350-357, 1988.
- [54] Kanehisa, M., and Goto, S. *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. Nucleic Acids Res, 28, 27-30, 2000.
- [55] Karakashev, D., Batstone, D. J., and Angelidaki, I. *Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors*. Applied and environmental microbiology, 71, 331-338, 2005.
- [56] Thauer, R. K., Kaster, A. K., Seedorf, H., Buckel, W., and Hedderich, R. *Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation*. Nature Reviews Microbiology, 6, 579-591, 2008.
- [57] Heyer, R., Kohrs, F., Benndorf, D., Rapp, E., Kausmann, R., Heiermann, M., Klocke, M., and Reichl, U. *Metaproteome analysis of the microbial communities in agricultural biogas plants*. New biotechnology, 30, 614-622, 2013.
- [58] Karlsson, R., Gonzales-Siles, L., Boulund, F., Svensson-Stadler, L., Skovbjerg, S., Karlsson, A., Davidson, M., Hulth, S., Kristiansson, E., and Moore, E. R. *Proteotyping: Proteomic characterization, classification and identification of microorganisms—A prospectus*. Systematic and applied microbiology, 38, 246-257, 2015.
- [59] Patterson, S. D., and Aebersold, R. H. *Proteomics: the first decade and beyond*. Nature genetics, 33, 311-323, 2003.
- [60] Shade, A., and Handelsman, J. *Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome*. Environmental microbiology, 14, 4-12, 2012.
- [61] Wilmes, P., and Bond, P. L. *The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms*. Environmental Microbiology, 6, 911-920, 2004.
- [62] Rodriguez-Valera, F. *Environmental genomics, the big picture?* FEMS Microbiol Lett, 231, 153-158, 2004.

- [63] Schmidt, A., Kochanowski, K., Vedelaar, S., Ahrné, E., Volkmer, B., Callipo, L., Knoop, K., Bauer, M., Aebersold, R., and Heinemann, M. *The quantitative and condition-dependent Escherichia coli proteome*. Nature biotechnology, 34, 104, 2016.
- [64] Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. *Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation*. Microbiol Rev, 59, 143-169, 1995.
- [65] Schulze, W. X., Gleixner, G., Kaiser, K., Guggenberger, G., Mann, M., and Schulze, E. D. *A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles*. Oecologia, 142, 335-343, 2005.
- [66] Benndorf, D., Balcke, G. U., Harms, H., and von Bergen, M. *Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater*. Isme J, 1, 224-234, 2007.
- [67] Hanreich, A., Heyer, R., Benndorf, D., Rapp, E., Pioch, M., Reichl, U., and Klocke, M. *Metaproteome analysis to determine the metabolically active part of a thermophilic microbial community producing biogas from agricultural biomass*. Can J Microbiol, 58, 917-922, 2012.
- [68] Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., and Gordon, J. I. *The Human Microbiome Project*. Nature, 449, 804-810, 2007.
- [69] Morris, R. M., Nunn, B. L., Frazar, C., Goodlett, D. R., Ting, Y. S., and Roco, G. *Comparative metaproteomics reveals ocean-scale shifts in microbial nutrient utilization and energy transduction*. Isme J, 4, 673-685, 2010.
- [70] Kuhn, R., Benndorf, D., Rapp, E., Reichl, U., Palese, L. L., and Pollice, A. *Metaproteome analysis of sewage sludge from membrane bioreactors*. Proteomics, 11, 2738-2744, 2011.
- [71] Bradford, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 72, 248-254, 1976.
- [72] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., and Klenk, D. *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical biochemistry, 150, 76-85, 1985.
- [73] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 193, 265-275, 1951.
- [74] Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S., and Matthies, H. *Eine störungsfreie Mikromethode zur bestimmung des Proteingehaltes in Gewebehomogenaten*. Acta Biol Med Ger, 34, 1441-1446, 1975.

- [75] Laemmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *nature*, 227, 680-685, 1970.
- [76] Wisniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. *Universal sample preparation method for proteome analysis*. *Nat Methods*, 6, 359-U360, 2009.
- [77] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. *Science*, 246, 64-71, 1989.
- [78] Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., and Graham Cooks, R. *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. *J Mass Spectrom*, 40, 430-443, 2005.
- [79] Biemann, K. *Mass spectrometry of peptides and proteins*. *Annu Rev Biochem*, 61, 977-1010, 1992.
- [80] Cottrell, J. S., and London, U. *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. *electrophoresis*, 20, 3551-3567, 1999.
- [81] Consortium, U. *UniProt: the universal protein knowledgebase*. *Nucleic acids research*, 45, D158-D169, 2016.
- [82] Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S., and Banfield, J. F. *Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment*. *Nature*, 428, 37-43, 2004.
- [83] Shevchenko, A., Sunyaev, S., Loboda, A., Shevchenko, A., Bork, P., Ens, W., and Standing, K. G. *Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching*. *Analytical chemistry*, 73, 1917-1926, 2001.
- [84] Kohrs, F., Heyer, R., Magnussen, A., Benndorf, D., Muth, T., Behne, A., Rapp, E., Kausmann, R., Heiermann, M., and Klocke, M. *Sample prefractionation with liquid isoelectric focusing enables in depth microbial metaproteome analysis of mesophilic and thermophilic biogas plants*. *Anaerobe*, 29, 59-67, 2014.
- [85] Muth, T., Behne, A., Heyer, R., Kohrs, F., Benndorf, D., Hoffmann, M., Lehtevä, M., Reichl, U., Martens, L., and Rapp, E. *The MetaProteomeAnalyzer: a powerful open-source software suite for metaproteomics data analysis and interpretation*. *Journal of proteome research*, 14, 1557-1565, 2015.
- [86] Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.-E., Rolain, J. M., and Raoult, D. *Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 543-551, 2009.

- [87] Heyer, R., Benndorf, D., Kohrs, F., Vrieze, J., Boon, N., Hoffmann, M., Rapp, E., Schlüter, A., Sczyrba, A., and Reichl, U. *Proteotyping of biogas plant microbiomes separates biogas plants according to process temperature and reactor type*. *Biotechnology for biofuels*, 9, 155, 2016.
- [88] Sokal, R. R. *A statistical method for evaluating systematic relationship*. *University of Kansas science bulletin*, 28, 1409-1438, 1958.
- [89] Pearson, K. *LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space*. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 2, 559-572, 1901.
- [90] Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C. A., Holland, T. A., Keseler, I. M., Kothari, A., and Kubo, A. *The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases*. *Nucleic acids research*, 42, D459-D471, 2013.
- [91] Stelling, J., Klamt, S., Bettenbrock, K., Schuster, S., and Gilles, E. D. *Metabolic network structure determines key aspects of functionality and regulation*. *Nature*, 420, 190, 2002.
- [92] Klamt, S., and von Kamp, A. *An application programming interface for CellNetAnalyzer*. *Biosystems*, 105, 162-168, 2011.
- [93] von Kamp, A., Thiele, S., Hädicke, O., and Klamt, S. *Use of CellNetAnalyzer in biotechnology and metabolic engineering*. *Journal of biotechnology*, 261, 221-228, 2017.
- [94] Pirt, S. (1965) The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 224-231, The Royal Society
- [95] Varma, A., and Palsson, B. O. *Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use*. *Nature Biotechnology*, 12, 994, 1994.
- [96] Schuster, S., Fell, D. A., and Dandekar, T. *A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks*. *Nature biotechnology*, 18, 326, 2000.
- [97] Koch, S. (2014) Erweiterung und Validierung eines stochiometrischen Netzwerkmodells der Biogasbildung. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
- [98] Koch, S., Benndorf, D., Fronk, K., Reichl, U., and Klamt, S. *Predicting compositions of microbial communities from stoichiometric models with applications for the biogas process*. *Biotechnology for biofuels*, 9, 1, 2016.
- [99] Archer, D. B., and Powell, G. E. *Dependence of the specific growth rate of methanogenic mutualistic cocultures on the methanogen*. *Archives of microbiology*, 141, 133-137, 1985.

- [100] Balch, W. E., Schoberth, S., TANNER, R. S., and Wolfe, R. *Acetobacterium, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 27, 355-361, 1977.
- [101] Schink, B., Kremer, D. R., and Hansen, T. A. *Pathway of propionate formation from ethanol in Pelobacter propionicus*. Archives of microbiology, 147, 321-327, 1987.
- [102] Buschhorn, H., Durre, P., and Gottschalk, G. *Production and Utilization of Ethanol by the Homoacetogen Acetobacterium woodii*. Appl Environ Microbiol, 55, 1835-1840, 1989.
- [103] Novick, A., and Szilard, L. *Description of the chemostat*. Science, 112, 715-716, 1950.
- [104] Schmideder, A. (2016) Kontinuierliche Bioprozessführung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren.
- [105] Connelly, S., Shin, S. G., Dillon, R. J., Ijaz, U. Z., Quince, C., Sloan, W. T., and Collins, G. *Bioreactor Scalability: Laboratory-Scale Bioreactor Design Influences Performance, Ecology, and Community Physiology in Expanded Granular Sludge Bed Bioreactors*. Front Microbiol, 8, 664, 2017.
- [106] Bensmann, A., Hanke-Rauschenbach, R., Heyer, R., Kohrs, F., Benndorf, D., Kausmann, R., Plöchl, M., Heiermann, M., Reichl, U., and Sundmacher, K. *Diagnostic concept for dynamically operated biogas production plants*. Renewable Energy, 96, 479-489, 2016.
- [107] Muller, R. H., Bley, T., and Babel, W. *Transient State Cultivation as a Means for Determining Maximum Growth-Rates of Microorganism in Inhibition-Kinetics*. Journal of Microbiological Methods, 22, 209-219, 1995.
- [108] Adams, S., and Hungate, R. *Continuous Fermentation Cycle Times-Prediction from Growth Curve Analysis*. Industrial & Engineering Chemistry, 42, 1815-1818, 1950.
- [109] Luedeking, R., and Piret, E. L. *Transient and steady states in continuous fermentation. Theory and experiment*. Biotechnology and Bioengineering, 1, 431-459, 1959.
- [110] Müller, R., and Babel, W. *Oxidative capacity determines the growth rate with Acetobacter methanolicus*. Engineering in Life Sciences, 13, 3-11, 1993.
- [111] Mauky, E., Jacobi, H. F., Liebetrau, J., and Nelles, M. *Flexible biogas production for demand-driven energy supply--feeding strategies and types of substrates*. Bioresour. Technol., 178, 262-269, 2015.
- [112] Lua Aik Chong, L. G. Q. M., Liu C Y. *Sustainable Energy And Environmental Technology*. Proceedings Of The Asia-pacific Conference, 120, 17.06.1996.

- [113] De Francisci, D., Kougias, P. G., Treu, L., Campanaro, S., and Angelidaki, I. *Microbial diversity and dynamicity of biogas reactors due to radical changes of feedstock composition*. *Bioresour. Technol.*, 176, 56-64, 2015.
- [114] Luo, G., Xie, L., Zhou, Q., and Angelidaki, I. *Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process*. *Bioresour Technol*, 102, 8700-8706, 2011.
- [115] Babel, W., Brinkmann, U., and Müller, R. *The auxiliary substrate concept—an approach for overcoming limits of microbial performances*. *Engineering in Life Sciences*, 13, 211-242, 1993.
- [116] Stefess, G. C., Torremans, R. A. M., deSchrijver, R., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G. *Quantitative measurement of sulphur formation by steady state and transient state continuous cultures of autotrophic Thiobacillus species*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 169-175, 1996.
- [117] Kohrs, F., Heyer, R., Bissinger, T., Kottler, R., Schallert, K., Puttker, S., Behne, A., Rapp, E., Benndorf, D., and Reichl, U. *Proteotyping of laboratory-scale biogas plants reveals multiple steady states in community composition*. *Anaerobe*, 46, 56-68, 2017.
- [118] Bücher, T., and Redetzki, H. *Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege*. *Journal of Molecular Medicine*, 29, 615-616, 1951.
- [119] Rademacher, A., Nolte, C., Schönberg, M., and Klocke, M. *Temperature increases from 55 to 75 C in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within the bacterial and archaeal community structure*. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 565-576, 2012.
- [120] Großkopf, R., Janssen, P. H., and Liesack, W. *Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval*. *Applied and environmental microbiology*, 64, 960-969, 1998.
- [121] Lueders, T., and Friedrich, M. *Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2732-2742, 2000.
- [122] Lane, D. *16S/23S rRNA sequencing*. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 125-175, 1991.
- [123] Muyzer, G. *Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA, a new molecular approach to analyse genetic diversity of mixed microbial communities*. *Molecular microbial ecology manual*, 1995.

- [124] Hennig, R., Rapp, E., Kottler, R., Cajic, S., Borowiak, M., and Reichl, U. *N-glycosylation fingerprinting of viral glycoproteins by xCGE-LIF*. Carbohydrate-Based Vaccines: Methods and Protocols, 123-143, 2015.
- [125] Dunbar, J., Ticknor, L. O., and Kuske, C. R. *Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities*. Applied and Environmental Microbiology, 67, 190-197, 2001.
- [126] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. Electrophoresis, 9, 255-262, 1988.
- [127] Kohrs, F., Wolter, S., Benndorf, D., Heyer, R., Hoffmann, M., Rapp, E., Bremges, A., Sczyrba, A., Schlüter, A., and Reichl, U. *Fractionation of biogas plant sludge material improves metaproteomic characterization to investigate metabolic activity of microbial communities*. Proteomics, 15, 3585-3589, 2015.
- [128] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. *Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels*. Analytical chemistry, 68, 850-858, 1996.
- [129] Suzek, B. E., Huang, H., McGarvey, P., Mazumder, R., and Wu, C. H. *UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters*. Bioinformatics, 23, 1282-1288, 2007.
- [130] Craig, R., and Beavis, R. C. *TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra*. Bioinformatics, 20, 1466-1467, 2004.
- [131] Geer, L. Y., Markey, S. P., Kowalak, J. A., Wagner, L., Xu, M., Maynard, D. M., Yang, X., Shi, W., and Bryant, S. H. *Open mass spectrometry search algorithm*. Journal of proteome research, 3, 958-964, 2004.
- [132] Heyer, R., Benndorf, D., Kohrs, F., De Vrieze, J., Boon, N., Hoffmann, M., Rapp, E., Schlüter, A., Sczyrba, A., and Reichl, U. *Proteotyping of biogas plant microbiomes separates biogas plants according to process temperature and reactor type*. Biotechnol Biofuels, 9, 155, 2016.
- [133] Westerholm, M., Müller, B., Isaksson, S., and Schnürer, A. *Trace element and temperature effects on microbial communities and links to biogas digester performance at high ammonia levels*. Biotechnology for biofuels, 8, 1, 2015.
- [134] Angelidaki, I., and Ahring, B. *Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia*. Applied Microbiology and biotechnology, 38, 560-564, 1993.

- [135] De Baere, L., Devocht, M., Van Assche, P., and Verstraete, W. *Influence of high NaCl and NH<sub>4</sub>Cl salt levels on methanogenic associations*. Water Research, 18, 543-548, 1984.
- [136] Ziemińska-Buczyńska, A., Banach, A., Bacza, T., and Pieczykolan, M. *Diversity and variability of methanogens during the shift from mesophilic to thermophilic conditions while biogas production*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30, 3047-3053, 2014.
- [137] Blume, F., Bergmann, I., Nettmann, E., Schelle, H., Rehde, G., Mundt, K., and Klocke, M. *Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading*. Journal of applied microbiology, 109, 441-450, 2010.
- [138] Shyu, C., Soule, T., Bent, S. J., Foster, J. A., and Forney, L. J. *MiCA: a web-based tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes*. Microbial ecology, 53, 562-570, 2007.
- [139] Tabb, D. L., Fernando, C. G., and Chambers, M. C. *MyriMatch: highly accurate tandem mass spectral peptide identification by multivariate hypergeometric analysis*. Journal of proteome research, 6, 654-661, 2007.
- [140] Heyer, R., Kohrs, F., Reichl, U., and Benndorf, D. *Metaproteomics of complex microbial communities in biogas plants*. Microbial biotechnology, 8, 749-763, 2015.
- [141] Consortium, U. *Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt)*. Nucleic acids research, 40, D71-D75, 2011.
- [142] Krakat, N., Westphal, A., Satke, K., Schmidt, S., and Scherer, P. *The microcosm of a biogas fermenter: comparison of moderate hyperthermophilic (60 C) with thermophilic (55 C) conditions*. Engineering in Life Sciences, 10, 520-527, 2010.
- [143] Nozhevnikova, A. N., Nekrasova, V., Ammann, A., Zehnder, A. J., Wehrli, B., and Holliger, C. *Influence of temperature and high acetate concentrations on methanogenesis in lake sediment slurries*. FEMS microbiology ecology, 62, 336-344, 2007.
- [144] Mladenovska, Z., and Ahring, B. K. *Growth kinetics of thermophilic Methanosarcina spp. isolated from full-scale biogas plants treating animal manures*. FEMS Microbiol Ecol, 31, 225-229, 2000.
- [145] Touzel, J. P., Petroff, D., and Albagnac, G. *Isolation and Characterization of a New Thermophilic Methanosarcina, the Strain CHTI 55*. Syst. Appl. Microbiol., 6, 66-71, 1985.
- [146] Zinder, S. H., and Mah, R. A. *Isolation and Characterization of a Thermophilic Strain of Methanosarcina Unable to Use H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> for Methanogenesis*. Appl. Environ. Microbiol., 38, 996-1008, 1979.

- [147] Müller, B., Sun, L., Westerholm, M., and Schnürer, A. *Bacterial community composition and fhs profiles of low-and high-ammonia biogas digesters reveal novel syntrophic acetate-oxidising bacteria*. *Biotechnology for biofuels*, 9, 1, 2016.
- [148] Schnürer, A., and Nordberg, Å. *Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature*. *Water Science and Technology*, 57, 735-740, 2008.
- [149] Sprenger, B. (2013) *Umweltmikrobiologische Praxis: mikrobiologische und biotechnische Methoden und Versuche*, Springer-Verlag
- [150] Fernández, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., and Tiedje, J. *How stable is stable? Function versus community composition*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3697-3704, 1999.
- [151] Fernandez, A. S., Hashsham, S. A., Dollhopf, S. L., Raskin, L., Glagoleva, O., Dazzo, F. B., Hickey, R. F., Criddle, C. S., and Tiedje, J. M. *Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose*. *Applied and environmental microbiology*, 66, 4058-4067, 2000.
- [152] Theuerl, S., Kohrs, F., Benndorf, D., Maus, I., Wibberg, D., Schlüter, A., Kausmann, R., Heiermann, M., Rapp, E., and Reichl, U. *Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 7791-7803, 2015.
- [153] De Vrieze, J., Raport, L., Roume, H., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Pieper, D. H., and Boon, N. *The full-scale anaerobic digestion microbiome is represented by specific marker populations*. *Water Research*, 104, 101-110, 2016.
- [154] Werner, J. J., Garcia, M. L., Perkins, S. D., Yarasheski, K. E., Smith, S. R., Muegge, B. D., Stadermann, F. J., DeRito, C. M., Floss, C., and Madsen, E. L. *Microbial community dynamics and stability during an ammonia-induced shift to syntrophic acetate oxidation*. *Applied and environmental microbiology*, 80, 3375-3383, 2014.
- [155] Weiss, A., Jérôme, V., and Freitag, R. *Comparison of strategies for the isolation of PCR-compatible, genomic DNA from a municipal biogas plants*. *Journal of Chromatography B*, 853, 190-197, 2007.
- [156] Kohrs, F., Heyer, R., Magnussen, A., Benndorf, D., Muth, T., Behne, A., Rapp, E., Kausmann, R., Heiermann, M., Klocke, M., and Reichl, U. *Sample prefractionation with liquid isoelectric focusing enables in depth microbial metaproteome analysis of mesophilic and thermophilic biogas plants*. *Anaerobe*, 29, 59-67, 2014.
- [157] De Vrieze, J., Saunders, A. M., He, Y., Fang, J., Nielsen, P. H., Verstraete, W., and Boon, N. *Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome*. *Water research*, 75, 312-323, 2015.

- [158] Turnbaugh, P. J.; Ley, R. E.; Mahowald, M. A.; Magrini, V.; Mardis, E. R.; Gordon, J. I. *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. *Nature*, 444, 1027, 2006.
- [159] Doolittle, W. F.; Booth, A. *It's the song, not the singer: an exploration of holobiosis and evolutionary theory*. *Biology & Philosophy*, 32, 5-24, 2017.
- [160] Bordenstein, S. R.; Theis, K. R. *Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes*. *PLoS biology* 13, e1002226, 2015.
- [161] Huttenhower, C.; Gevers, D.; Knight, R.; Abubucker, S.; Badger, J. H.; Chinwalla, A. T.; Creasy, H. H.; Earl, A. M.; FitzGerald, M. G.; Fulton, R. S. *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. *Nature*, 486, 207, 2012.
- [162] Boon, E.; Meehan, C. J.; Whidden, C.; Wong, D. H.-J.; Langille, M. G.; Beiko, R. G. *Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes*. *FEMS microbiology reviews*, 38, 90-118, 2014.
- [163] Burke, C.; Steinberg, P.; Rusch, D.; Kjelleberg, S.; Thomas, T. *Bacterial community assembly based on functional genes rather than species*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 14288-14293, 2011.
- [164] Rao, K., and Safdar, N. *Fecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile infection*. *Journal of hospital medicine*, 11, 56-61, 2016.
- [165] Haldal, M., and Bratbak, G. *Production and decay of viruses in aquatic environments*. *Marine Ecology Progress Series*, 205-212, 1991.
- [166] Wu, Q., and Liu, W.-T. *Determination of virus abundance, diversity and distribution in a municipal wastewater treatment plant*. *Water research*, 43, 1101-1109, 2009.
- [167] Calusinska, M.; Marynowska, M.; Goux, X.; Lentzen, E.; Delfosse, P. *Analysis of dsDNA and RNA viromes in methanogenic digesters reveals novel viral genetic diversity*. *Environmental microbiology*, 18, 1162-1175, 2016.
- [168] Zhang, J.; Gao, Q.; Zhang, Q.; Wang, T.; Yue, H.; Wu, L.; Shi, J.; Qin, Z.; Zhou, J.; Zuo, J.; Yang, Y. *Bacteriophage-prokaryote dynamics and interaction within anaerobic digestion processes across time and space*. *Microbiome*, 5, 57, 2017.
- [169] Heyer, R., Schallert, K., Siewert, C., Kohrs, F., Greve, J., Maus, I., Klang, J., Klocke, M., Heiermann, M., Hoffmann, M., Püttker, S., Calusinska, M., Zoun, R., Saake, G., Benndorf, D., and Reichl, U. *Metaproteome analysis reveals that syntrophy, competition, and phage-host interaction shape microbial communities in biogas plants*. *Microbiome*, 7, 69, 2019.
- [170] Braakman, R., Follows, M. J., and Chisholm, S. W. *Metabolic evolution and the self-organization of ecosystems*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, E3091-E3100, 2017.

- [171] Brown, C. T., Hug, L. A., Thomas, B. C., Sharon, I., Castelle, C. J., Singh, A., Wilkins, M. J., Wrighton, K. C., Williams, K. H., and Banfield, J. F. *Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria*. Nature, 523, 208, 2015.
- [172] Wenzel, L., Heyer, R., Schallert, K., Loser, L., Wunschiers, R., Reichl, U., and Benndorf, D. *SDS-PAGE fractionation to increase metaproteomic insight into the taxonomic and functional composition of microbial communities for biogas plant samples*. Eng Life Sci, 18, 498-509, 2018.
- [173] Peterson, G. L. *Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall*. Analytical biochemistry, 100, 201-220, 1979.
- [174] Simon, M., and Azam, F. *Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria*. Marine ecology progress series, 201-213, 1989.
- [175] Ingraham, J. L., Maaløe, O., and Neidhardt, F. C. *Growth of the bacterial cell*, Sinauer Associates, 1983.
- [176] Zubkov, M. V., Fuchs, B. M., Eilers, H., Burkill, P. H., and Amann, R. *Determination of total protein content of bacterial cells by SYPRO staining and flow cytometry*. Applied and environmental microbiology, 65, 3251-3257, 1999.
- [177] Chmiel, H., *Bioprozesstechnik*, Springer-Verlag, 2011.
- [178] Righelato, R.; Trinci, A.; Pirt, S.; Peat, A. *The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of Penicillium chrysogenum*. Microbiology, 50, 399-412, 1968.
- [179] Schmideder, A. *Kontinuierliche Bioprozessführung in miniaturisierten Rührkesselreaktoren*. Technische Universität München, 2016.
- [180] Shida, O.; Takagi, H.; Kadowaki, K.; Komagata, K. *Proposal for Two New Genera, Brevibacillus gen. nov. and Aneurinibacillus gen. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 46, 939-946, 1996.
- [181] Spencer, R. C. *Bacillus anthracis*. Journal of clinical pathology, 56, 182-187, 2003.
- [182] Nakano, M. M.; Zuber, P. *Anaerobic growth of a "strict aerobe" (Bacillus subtilis)*. Annual Reviews in Microbiology, 52, 165-190, 1998.
- [183] Marino, M., Ramos, H. C., Hoffmann, T., Glaser, P., and Jahn, D. *Modulation of anaerobic energy metabolism of Bacillus subtilis by arfM (ywiD)*. Journal of bacteriology, 183, 6815-6821, 2001.
- [184] Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., and Gasteiger, E. *ExPASy: SIB bioinformatics resource portal*. Nucleic acids research, 40, W597-W603, 2012.

- [185] Ragsdale, S. W. *The Eastern and Western branches of the Wood/Ljungdahl pathway: how the East and West were won*. *Biofactors*, 6, 3-11, 1997.
- [186] Dworkin, M. *The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Springer Science & Business Media, 2006.
- [187] Müller, B.; Sun, L.; Schnürer, A. *First insights into the syntrophic acetate-oxidizing bacteria—a genetic study*. *MicrobiologyOpen*, 2, 35-53, 2013.
- [188] Karakashev, D.; Batstone, D. J.; Trably, E.; Angelidaki, I. *Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae*. *Applied and environmental microbiology*, 72, 5138-5141, 2006.
- [189] Sun, L.; Müller, B.; Westerholm, M.; Schnürer, A. *Syntrophic acetate oxidation in industrial CSTR biogas digesters*. *Journal of biotechnology*, 171, 39-44, 2014.
- [190] De Vrieze, J.; Hennebel, T.; Boon, N.; Verstraete, W. *Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation*. *Bioresource technology*, 112, 1-9, 2012.
- [191] Zhang, G., Ueberheide, B. M., Waldemarson, S., Myung, S., Molloy, K., Eriksson, J., Chait, B. T., Neubert, T. A., and Fenyö, D. *Protein quantitation using mass spectrometry*. *Computational Biology*, Springer-Verlag, 211-222, 2010.
- [192] Gillet, L. C.; Navarro, P.; Tate, S.; Rost, H.; Selevsek, N.; Reiter, L.; Bonner, R.; Aebersold, R. *Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis*. *Mol. Cell. Proteomics*, 11, O111 016717, 2012.
- [193] Schütze, A.; Benndorf, D.; Puttker, S.; Kohrs, F.; Bettenbrock, K. *The Impact of ackA, pta, and ackA-pta Mutations on Growth, Gene Expression and Protein Acetylation in Escherichia coli K-12*. *Front Microbiol*, 11, 233, 2020.
- [194] Rademacher, A.; Zakrzewski, M.; Schlüter, A.; Schönberg, M.; Szczepanowski, R.; Goesmann, A.; Pühler, A.; Klocke, M. *Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing*. *FEMS microbiology ecology*, 79, 785-799, 2012.
- [195] Parks, D. H.; Rinke, C.; Chuvochina, M.; Chaumeil, P.-A.; Woodcroft, B. J.; Evans, P. N.; Hugenholtz, P.; Tyson, G. W. *Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life*. *Nature Microbiology*, 2, 1533-1542, 2017.

## Anhang

Tabelle 5: Prozesskenngrößen der BGA bei Magdeburg (Stand 24.02.2015).

	HF1	HF2	NG
pH-Wert [-]	8,0	7,9	8,0
Leitfähigkeit [mS cm <sup>-1</sup> ]	33,3	33,4	30,4
FOS [g HAC <sub>eq</sub> L <sup>-1</sup> ]	3,76	3,72	2,97
TAC [g CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> ]	21,1	21,3	18,2
FOS/TAC [-]	0,18	0,17	0,16
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N [g L <sup>-1</sup> ]	3,40	3,47	3,01
TS [g L <sup>-1</sup> ]	97,9	100,0	74,9
oTS [g L <sup>-1</sup> ]	71,0	73,3	53,4
Essigsäure [g L <sup>-1</sup> ]	0,41	0,32	0,21
Propionsäure [g L <sup>-1</sup> ]	0,04	0,04	0,04
Buttersäure [g L <sup>-1</sup> ]	<0,03	<0,03	<0,03
Iso-Buttersäure [g L <sup>-1</sup> ]	<0,03	<0,03	<0,03
Valeriansäure [g L <sup>-1</sup> ]	<0,03	<0,03	<0,03
Iso-Valeriansäure [g L <sup>-1</sup> ]	<0,03	<0,03	<0,03
Capronsäure [g L <sup>-1</sup> ]	<0,03	<0,03	<0,03
Essigsäureäquivalent [g HAC <sub>eq</sub> L <sup>-1</sup> ]	0,44	0,36	0,24

Tabelle 6: Futtermittelzusammensetzung der BGA bei Magdeburg (Stand 24.02.2015).

	HF1	HF2	NG
Maissilage[t d <sup>-1</sup> ]	39,55	39,55	-
Rübenpressschnitzel [t d <sup>-1</sup> ]	20,075	20,075	-
Hühnertrockenkot [t d <sup>-1</sup> ]	11,93	11,93	-
Rindergülle [t d <sup>-1</sup> ]	10,44	10,44	-
Eisenschlamm [t d <sup>-1</sup> ]	2,725	2,725	-
Wasser [m <sup>3</sup> ]	10,24	10,24	-
Rübenmus [m <sup>3</sup> ]	-	-	23,54

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Stocklösungen zur Herstellung des Kultivierungsmediums.

Chemikalie	Einwaage für Stocklösung [g]	Volumen der Stocklösung [L]	Volumen je 100 mL Medium [mL]	Bemerkungen
Glukose	114,58	0,5	5	Sterilfiltrieren
Zellulose	-	-	3,44 g	Als Einwaage vorlegen
Harnstoff	25,64	0,5	5/10/30 <sup>1)</sup>	Sterilfiltrieren
Cysteinhydrochlorid- Monohydrat	2,5	0,5	10	Autoklavieren
Calciumchlorid- Dihydrat	0,265	0,1	2	Autoklavieren
Di-Kalium- Hydrogenphosphat	11	0,1	2	Autoklavieren
Magnesiumsulfat- Heptahydrat	3,07	0,1	2	Autoklavieren
Eisen(II)sulfat- Heptahydrat	0,256	0,1	2	Autoklavieren
Natriumchlorid	0,035	0,1	2	Autoklavieren
Spurenelemente	-	-	5	Sterilfiltrieren, Tabelle 8
Vitaminlösung	-	-	1	Sterilfiltrieren, Tabelle 9
Vollentsalztes Wasser	-	-	Auf 100 mL auffüllen	

<sup>1)</sup> Einsatzmenge abhängig von jeweiliger Prozessführung (vgl. 3.1.4, Abbildung 6)

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien zur Herstellung der Spurenelementlösung.

Chemikalie	Einwaage für Stocklösung [g]	Volumen der Stocklösung [L]	Bemerkungen
Cobaltchlorid-Hexahydrat	0,1	0,5	Autoklavieren
Kupfer(II)chlorid-Hexahydrat	0,005		
Borsäure	0,15		
Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat	0,015		
Natriummolybdat-Dihydrat	0,015		
Natriumselenit	0,01		
Nickel(II)chlorid-Hexahydrat	0,01		
Zinksulfat-Heptahydrat	3,6		

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien zur Herstellung der Vitaminlösung.

Chemikalie	Einwaage für Stocklösung [mg]	Volumen der Stocklösung [L]	Bemerkungen
Liponsäure	0,5	0,1	Sterilfiltrieren
Pyridoxinhydrochlorid	1		
Thiaminhydrochlorid	0,5		
Riboflavin	0,5		
Cobalamin	0,01		
Nicotinsäure	0,5		
D-Calcium-Pantothenat	0,5		
Biotin	0,2		
Folsäure	0,2		
p-Aminobenzoessäure	0,5		

Tabelle 10: Medien- und Fütterungscharakteristika nach Kultivierungsabschnitt und Prozessregime.

Prozesszeit [d]	Substrat [mL]	Harnstoffkonzentration [g L <sup>-1</sup> ]		Molares C:N:P:-Verhältnis		HRT <sup>1)</sup> [d]
		R1-R4	R5-R6	R1-R4	R5-R6	
0-10	5	2,56	2,56	135:7:1	135:7:1	200
10-14	7,5					71
14-93	10					62
93-200			5,13		138:14:1	
200-298			15,38		152:41:1	

<sup>1)</sup> gemäß Formel 1

Tabelle 11: Pipettierschemata und PCR-Programm für die T-RFLP-Analyse.

<u>Chemikalie</u>	<u>Archaeen-PCR</u>	<u>Bakterien-PCR</u>
Gesamtansatzvolumen 50 µL	Volumen je Ansatz [µL]	Volumen je Ansatz [µL]
Wasser für die Molekularbiologie	38,75	38,75
10-fach Ex Taq Puffer (Mg <sup>2+</sup> plus) <sup>1)</sup>	5	5
dNTP-Mix (2,5 mM) <sup>1)</sup>	4	4
6-FAM-Ar109f (5' 6-FAM- ACKGCTCAGTAACACGT 3')	0,5	
Ar912r (5' CTCCCCGCAATTCCTTTA 3')	0,5	
6-FAM-27f (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3')		0,5
926MRr (5' CCGTCAATTCMTTTRAGTTT 3')		0,5
TaKaRa Ex Taq (5 U µl <sup>-1</sup> ) <sup>1)</sup>	0,25	0,25
Proben-DNA	1	1
Thermocycler-Programm	Temperatur in [°C]	Dauer [s]
„PCRTFLP“	94	120
	50	30
	72	60
	94	10
	55	60
	72	300
	4	(bis Entnahme)

<sup>1)</sup> TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase Kit (Takara Bio USA Inc., Mountain View, Kalifornien, USA)

Tabelle 12: Ammonium- und Ammoniakkonzentrationen der Reaktoren R1-R6.

Prozesszeit [d]	N [g L <sup>-1</sup> ] <sup>1)</sup>	R1	R2	R3	R4	R5	R6
143	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,93	1,03	0,94	1,16	1,76	1,78
	NH <sub>3</sub>	0,02	0,02	0,05	0,09	0,07	0,07
183	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,11	1,21	1,23	1,05	1,83	1,83
	NH <sub>3</sub>	0,02	0,02	0,06	0,05	0,06	0,06
240	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,86	1,08	0,83	0,70	5,05	5,07
	NH <sub>3</sub>	0,01	0,02	0,02	0,03	0,50	0,55
292	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1,21	1,31	0,86	0,98	6,68	6,61
	NH <sub>3</sub>	0,02	0,02	0,03	0,05	0,87	0,83

<sup>1)</sup> Unter Verwendung von Formel 2

Tabelle 13: Verwendete Datenbanken für die Proteinidentifikation.

Datenbank	Abschnitt	Quellen
UniProtKB/Swiss-Prot & 7 Metagenome	4.1, 4.2	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot/">http://www.uniprot.org/uniprot/</a> (Download 23.10.2014) <a href="http://genome.jgi.doe.gov/BioPla1DNA1/BioPla1DNA1.info.html">http://genome.jgi.doe.gov/BioPla1DNA1/BioPla1DNA1.info.html</a> (Download 15.01.2016) Schlüter et al. 2008 [12] Rademacher et al. 2012 [194]  Hanreich et al. 2013 [6] Heyer et al. 2016 [87], Kohrs et al. 2017 [117] und Koch et al. 2019 [23]

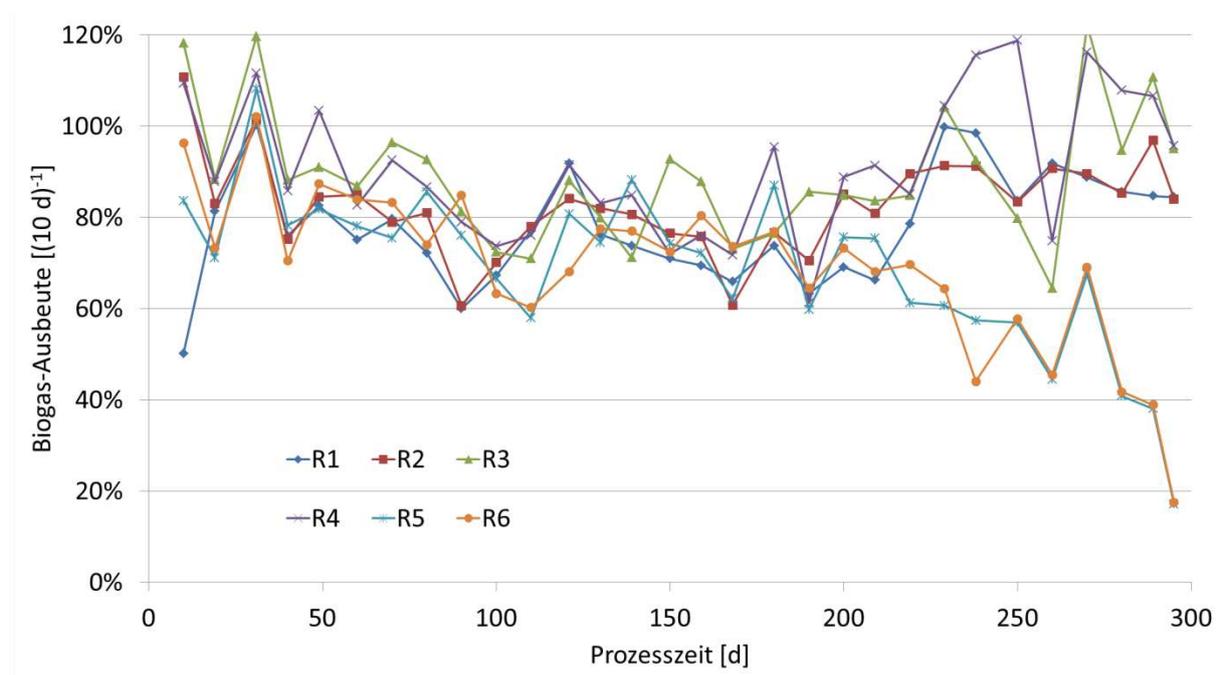


Abbildung 36: Biogasausbeute für R1-R6. Die jeweiligen Ausbeuten wurden aus dem Verhältnis von gemessener und theoretischer Biogasmenge ermittelt. Für die theoretischen Biogasmengen wurden die Medienkomponenten (Tabelle 7) über jeweils zehn Tage Prozesszeit addiert und nach der Formel 4 von Boyle et al. in Gasvolumina umgerechnet [35]. Werte >100% resultieren aus Fütterungen, deren resultierenden Gasbildungen sich über zwei Zeitintervalle zogen. Die Verbindung der Datenpunkte erfolgte aus Gründen der Deutlichkeit.

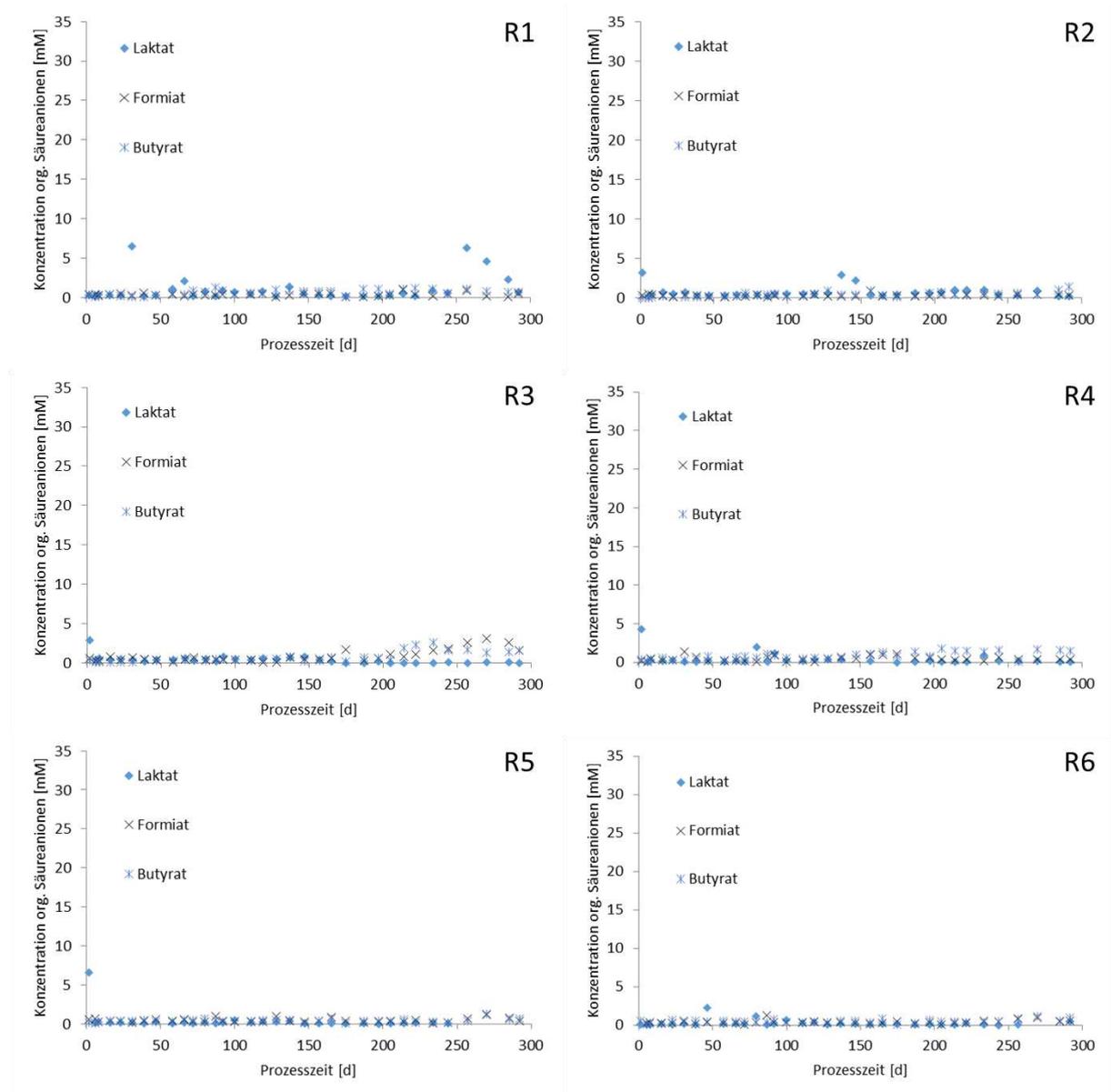


Abbildung 37: Verlauf der Konzentrationen von Laktat, Formiat und Butyrat in R1-R6 über die Prozesszeit.

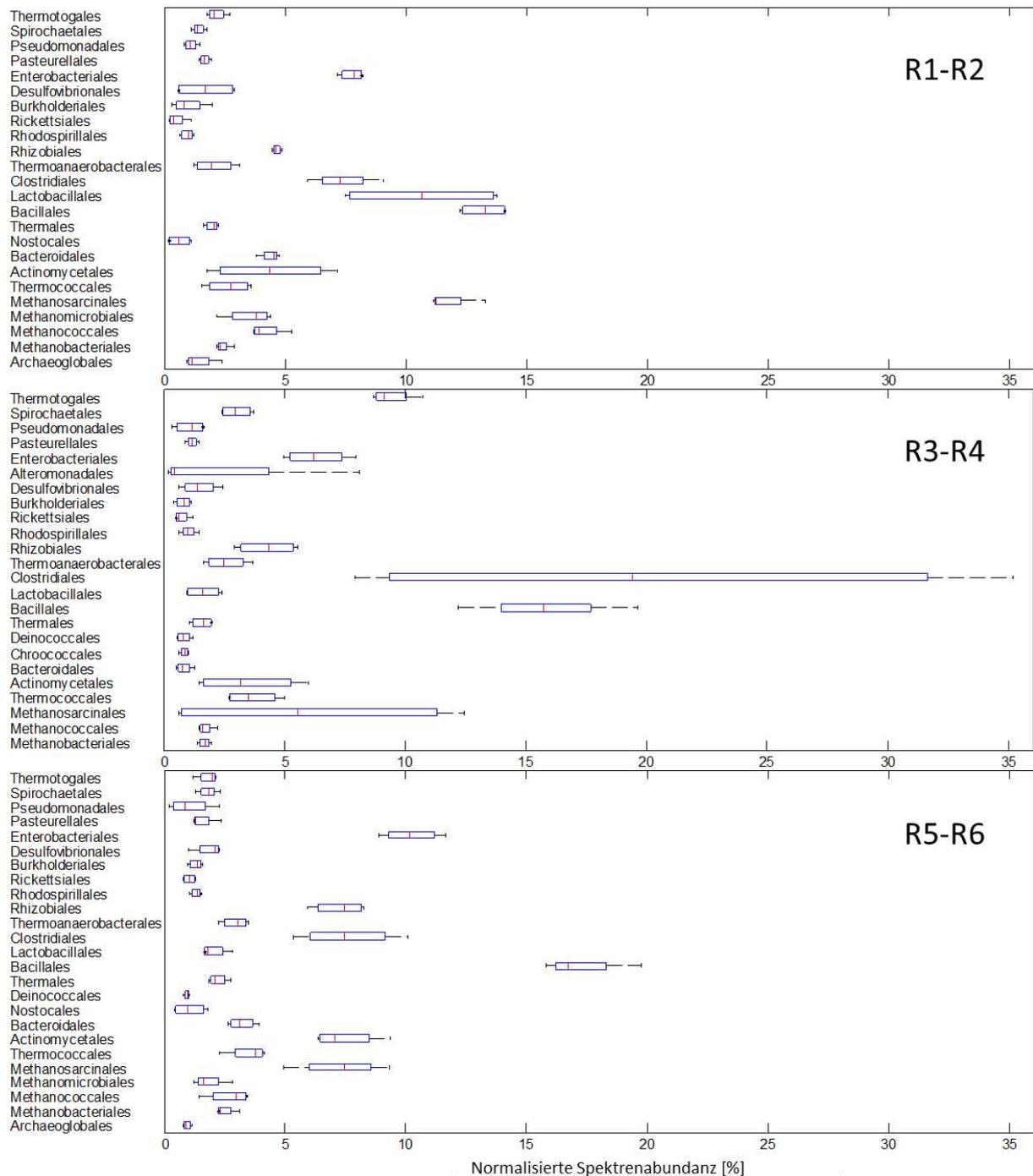


Abbildung 38: Boxplots identifizierter taxonomischer Ordnungen in R1-R6 nach 261 d Kultivierung. Oben: Proben von R1 und R2 (jeweils duplikate MS/MS-Messungen; Abschnitt 3.6.2), Mitte: Proben von R3 und R4 (jeweils duplikate MS/MS-Messungen), unten: (jeweils duplikate MS/MS-Messungen). Blaue Box: mittlere 50% der Datenpunkte, roter Hochstrich: Median, linke/rechte Antenne: kleinster/größter Wert der jeweiligen Taxonomie, rotes Kreuz: Ausreißer. Nach der Normalisierung der SpC auf die jeweiligen Gesamt-SpC der Messung wurden nur taxonomischen Ordnungen berücksichtigt, die  $\geq 1\%$  der Gesamtabundanz aufwiesen (Abschnitt 3.6.3).

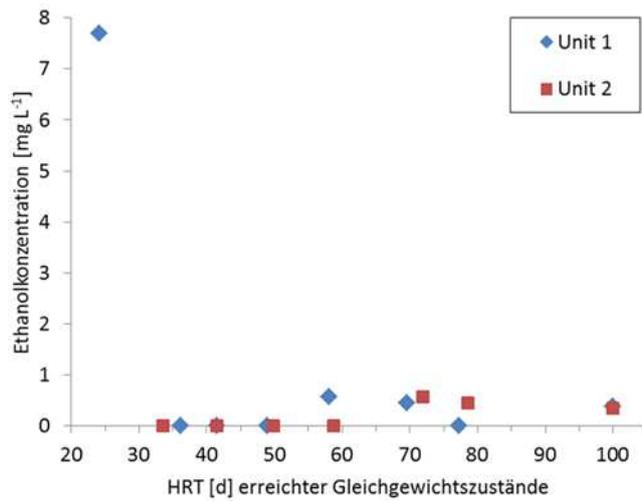


Abbildung 39: Ethanolkonzentrationen erreichter Gleichgewichtszustände in Unit 1 und 2. Bestimmung der Restsubstrat-Konzentrationen gemäß Abschnitt 3.2.6. HRT: hydraulische Retentionszeit.

## Verwendete Standard-Arbeitsanweisungen

PDF-Versionen der verwendeten Standard-Arbeitsanweisungen (Tabelle 14) können auf Anfrage durch die Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik der Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik zur Verfügung gestellt werden.

Tabelle 14: Liste der verwendeten Standard-Arbeitsanweisungen.

Name der Arbeitsanweisung	Abschnitt
2.3 Arbeitsanweisung Phenolextraktion mit Kugelmühle V05	3.6.1
2.3 Arbeitsanweisung Phenolextraktion mit Kugelmühle V06	3.6.1
2.4 Arbeitsanweisung Acetonfällung V06	3.6.1
3.1 Arbeitsanweisung Proteinbestimmung mit Amidoschwarz V04	3.6.1
3.4 Arbeitsanweisung Proteinbestimmung in einer Zellsuspension V01	3.2.7
4.1 Arbeitsanweisung SDS-PAGE BIORAD klein V06	3.6.1
4.7 Arbeitsanweisung OFFGEL Fractionator 3100 Agilent V03	3.6.1
5.1 Arbeitsanweisung Gelfärbung Coomassie V05	3.6.1
5.6 Arbeitsanweisung Scannen STD ArgusX1 V01	3.6.1
6.3 Arbeitsanweisung InGel-Verdau von zerschnittenen SDS-PAGE-Spuren V08	3.6.2
6.6 Arbeitsanweisung Messung Orbitrap Uni V05	3.6.2
10.4 Arbeitsanweisung Gärtest GäronaGC V02	3.3
11.1 Arbeitsanweisung DNA Extraktion PCR TRFLP V05	3.5
Arbeitsanweisung_T-RFLP-Methode_Ver8_Uni	3.5