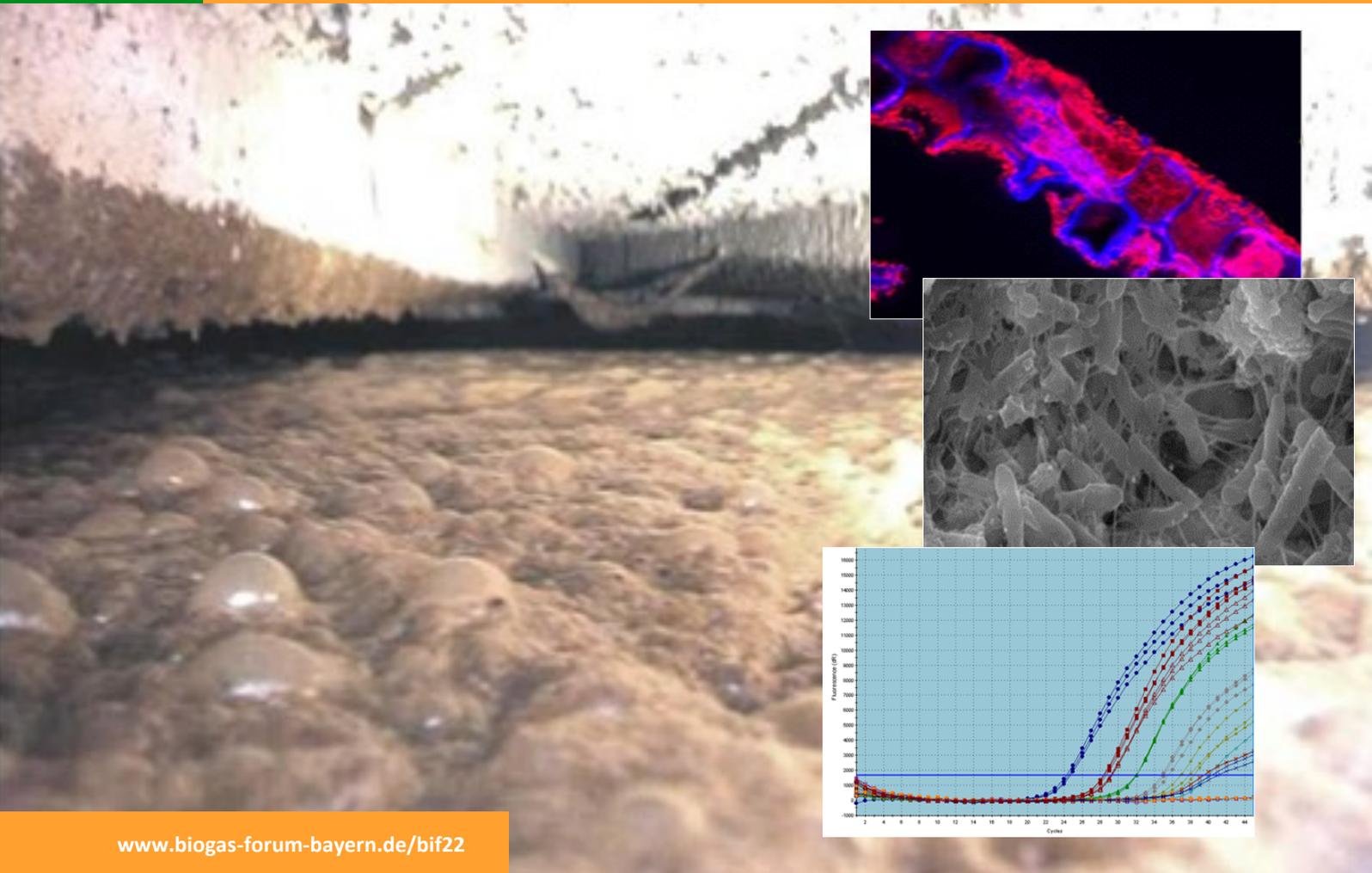


Mikro - und Molekularbiologie

Schlüsselparameter zur Kontrolle des Gärprozesses



www.biogas-forum-bayern.de/bif22

Biogas Forum Bayern, Verfasser:

Dr. Michael Lebuhn
Bernhard Munk
Bayerische Landesanstalt
für Landwirtschaft

Foren der ALB Bayern e.V.

Die ALB ist neutral und handelt als Mittler und Bindeglied zwischen landwirtschaftlicher Praxis, Forschung, Umwelt, staatlicher Verwaltung, Gewerbe und Industrie.

Arbeitsblätter, Beratungsblätter, Praxisblätter, Infobriefe, Leitfäden und Fachinformationen werden in den Foren der ALB erarbeitet.

Die Foren, denen Fachleute der jeweiligen Sachgebiete angehören, sind Expertenausschüsse zum Informationsaustausch und zur Wissensvermittlung.

Foren der ALB Bayern e.V.:

- ▶ Bau Forum Bayern (BaF),
Leitung: Jochen Simon, LfL-ILT
- ▶ Bewässerungsforum Bayern (BeF),
Leitung: Dr. Martin Müller, ALB
- ▶ Biogas Forum Bayern (BiF),
Leitung: Dr. Martin Müller, ALB
- ▶ Landtechnik Forum Bayern (LaF),
Leitung: Dr. Markus Demmel, LfL-ILT

Förderer



Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten



Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft



Ämter für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten

Impressum

Herausgeber Arbeitsgemeinschaft Landtechnik und Landwirtschaftliches Bauwesen in Bayern e.V. (ALB), Vöttinger Straße 36, 85354 Freising

Telefon: 08161 / 887- 0078

Telefax: 08161 / 887- 3957

E-Mail: info@alb-bayern.de

Internet: www.alb-bayern.de

1. Auflage Mai 2021

© ALB Alle Rechte vorbehalten

Abb. Titelseite großes Foto: Entwicklung von Biogasblasen in einem Biogasfermenter mit Schwefelablagerungen an der Decke (Quelle: LfL)

kl. Foto oben: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von wahrscheinlich cellulolytischen Bakterien (pink) auf Pflanzenzellen-Zellwänden (blau) (Quelle: M. Lebuhn, LfL)

kl. Foto Mitte: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Bakterien u. Archaeen, verbunden mit Plasmafäden, möglicherweise zum Austausch von Elektronen (Quelle: S. Weiß, AEA Wien)

kl. Abb. unten: Ergebnisdiagramm einer quantitativen Real-Time PCR mit Verdünnungen der Ziel - DNA (Quelle: B. Munk, LfL)

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Zusammenfassung: Mikrobiologische Analytik für die Praxis	5
1. Einführung: der Biogasprozess, die Mikroorganismen und Prozessstörungen	7
2. Das Mikrobiom: molekularbiologische Analytik von DNA und RNA.....	8
3. Quantifizierung von Mikroorganismen und ihrer (Transkriptions-) Aktivität.....	9
4. Bioindikatoren: DNA- und RNA-Sequenzierungen	10
5. Metabolischer Quotient	12
6. Transkript/Gen- (T/G-) Verhältnisse	14
7. Ausblick.....	16
8. Referenzen	17
9. Weiterführende Fachinformation	18

Abkürzungsverzeichnis

cDNA	Complementary DNA (in DNA umgeschriebene RNA)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Erbsubstanz)
FM	Frischmasse
FOS/TAC	Verhältnis flüchtiger organischer Säuren / gesamter anorganischer Kohlenstoff
MAG	Metagenome Assembled Genome (rekonstituiertes Genom)
<i>mcrA</i>	Untereinheit A des Methyl-Coenzym M Reduktase Gens
MP	Methanproduktivität
MQ	Metabolischer Quotient
mRNA	Messenger-RNA (Boten-RNA zur Bildung von Enzymen, Proteinen)
NGS	Next Generation Sequencing
OLR	Organic Loading Rate (organische Raumbelastung)
oTM	Organische Trockenmasse
oTS	Organische Trockensubstanz
OTU	Operational Taxonomic Unit (dient der Abgrenzung bzw. Einordnung von Mikroorganismenarten)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Quantitative Real-Time PCR (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure (Transkripte der DNA)
rRNA	Ribosomale RNA (Bestandteil der Ribosomen)
<i>rrs</i>	Kleine Untereinheit der ribosomalen RNA (16S rRNA bei Bacteria)
RT	Reverse Transkription (Umschreibung von RNA in cDNA)
RT-qPCR	qPCR mit vorgeschalteter RT
SCFA	Short chain fatty acid (kurzkettige Fettsäure)
SMA	Spezifische methanogene Aktivität
T/G	Transkript/Gen-Verhältnis (RNA/DNA, gemessen als cDNA/DNA)
TM	Trockenmasse
Transkriptom	Gesamtheit der RNA
TS	Trockensubstanz

Zusammenfassung: Mikrobiologische Analytik für die Praxis

In der jüngeren Vergangenheit hat die molekularbiologische Analytik enorme Fortschritte gemacht. In der „Black Box“ Biogasfermenter ist es deutlich heller geworden. Auch wenn bei Weitem nicht alle Mikroorganismen kultiviert werden können, die für Biogasprozesse relevant sind, lassen sie sich mit Polymerase-Kettenreaktion- (PCR-) gestützten Methoden nachweisen und quantifizieren. Neue Sequenzieretechniken erlauben es mittlerweile, das „Mikrobiom“ in seiner Gesamtheit zu erfassen, seine Zusammensetzung detailliert zu untersuchen, ganze Genome einzelner Mikroorganismen zu rekonstruieren und ihre Funktionen zu identifizieren.

Die **quantitativen PCR-gestützten Untersuchungen** (Quantitative Real-Time PCR, qPCR) der Nukleinsäuren DNA und RNA (Transkripte der DNA) ermöglichen es, bestimmte Mikroorganismen, bestimmte Gruppen oder das ganze Mikrobiom einer Probe innerhalb eines Tages kostengünstig zu quantifizieren. Auf DNA-Ebene wird ihre Präsenz nachgewiesen, auf RNA-Ebene ihre Aktivität. Hiermit können ökophysiologische Parameter wie die **Transkript/Gen- (T/G-) Verhältnisse** oder unter Einbeziehung der Methanproduktivität der **Metabolische Quotient (MQ)** berechnet werden. Die T/G-Verhältnisse zeigen die spezifische Transkriptbildungsaktivität bestimmter, für den Prozess wichtiger Funktionen an. Der MQ kennzeichnet den Zustand des Energiestoffwechsels der methanogenen Archaeen, der einzigen zu relevanter Methanbildung fähigen und zugleich empfindlichsten Gruppe des Biogas-Mikrobioms. Der MQ informiert, ob die Methanogenen effizient arbeiten, unterfordert, gestresst oder schon geschädigt sind.

Für eine Prozessdiagnose indizieren die genannten ökophysiologischen Parameter den Zustand und die Veränderungen essentieller mikrobieller Aktivitäten. Dabei signalisiert insbesondere der MQ Prozessstörungen deutlich früher als z.B. der etablierte FOS/TAC-Wert, der zudem bei höheren N-Gehalten seine Aussagekraft verliert (siehe Fachinformation Schlüsselparameter zur Kontrolle des Gärprozesses - Physikalische

und chemische Untersuchungen). Der MQ ist damit ein ideales **„Frühwarnsystem“ vor Prozessstörungen**. Besonders aussagekräftig sind die molekularbiologisch-ökophysiologischen Parameter in Kombination mit den klassischen prozesschemischen Analysen. Bei allen diesen Untersuchungen wird geraten, Zeitreihen zu untersuchen, da sie Entwicklungen erkennen lassen und damit eine sehr viel sicherere Ergebnisinterpretation ermöglichen.

Die **qualitativen Untersuchungen** mit Sequenzierung der Nukleinsäuren dauern hingegen länger, sie erfordern eine umfangreiche IT-Infrastruktur zum Umgang mit großen Datenmengen („big data“) und sind entsprechend teurer. Sie ermöglichen es aber, die Zusammensetzung der Mikrobiome zu bestimmten Prozesszuständen zu analysieren und hierüber **Bioindikator-Mikroorganismen** zu identifizieren, deren Auftreten oder Fehlen wiederum mit der schnellen qPCR analysiert werden kann. Davon abgesehen wurde mit den Sequenzierungsergebnissen ein enormer Erkenntnisgewinn geschaffen, der entscheidend zur Klärung der Funktionen einzelner Mikroorganismen und ihrer stofflichen Umsetzungen beigetragen hat und weiter beitragen wird.

Welche dieser Analysen können nun in welcher Frequenz für einen Anlagenbetreiber von Nutzen oder wichtig sein? Sicher sind bei einem störungsfreien, effizienten Routinebetrieb (z.B. einer reinen „Gülleanlage“) keine „High-Tech“ Sequenzierungen erforderlich. Wenn aber die organische Raumbelastung hoch und die Verweilzeit kurz ist, wenn Substrate oder Futtermengen z.B. für eine Flexibilisierung der Methanerzeugung wechseln, oder wenn belastete Substrate wie verschimmelt oder stoffhaltiges Material eingesetzt werden sollen, wird eine häufigere Analyse insbesondere des MQ angeraten, da dieser sehr schnell Stressmetabolismus der empfindlichen methanogenen Archaeen und frühzeitig eine anstehende Prozessversäuerung anzeigt. Dies erlaubt dem Betreiber rechtzeitig gegenzusteuern, bevor Ertrags- einbußen entstehen. Bei einem niedrigen MQ ohne vorherige Stressperiode, wenn eine

„Unterforderung“ der Methanogenen erkennbar ist, lässt sich dagegen die organische Raumbelastung steigern, was für den Betreiber gewinnbringend sein kann.

Für prozesstechnische Innovationen und Zukunftstechnologien, beispielsweise für die biologische Methanisierung im Sektor „Power-to-Gas“, können die molekularbiologisch-ökophysiologicalen Parameter ähnlich hilfreich sein: Belastungsgrenzen neuer Prozesse sind in der Regel nicht bekannt, weswegen frühe, verlässliche Signale für Störungen für die Prozessoptimierung sehr dienlich sein können.

Sollte eine solche Analytik gewünscht werden, wird dringend empfohlen, ein in der molekular-

biologischen Analytik ausgewiesenes und erfahrenes Speziallabor einzubinden, da die Gerätausstattung für die Analytik aufwändig ist, der Umgang mit ihr Erfahrung erfordert und für die Ergebnisinterpretation weitreichende Kenntnisse der Prozesse sowie der mikrobiellen Fähigkeiten und Bedürfnisse notwendig sind.

Für den an den mikrobiologischen Hintergründen und der molekularbiologischen Analytik stärker interessierten Leser werden im Folgenden wichtige Grundlagen und Zusammenhänge detaillierter vorgestellt.

1. Einführung: der Biogasprozess, die Mikroorganismen und Prozessstörungen

Der Substratabbau im Fermenter, also alle Umsetzungen ausgehend von der eingesetzten Biomasse bis hin zum Biogas, erfolgt durch teils sehr unterschiedliche Mikroorganismen in einer engen, annähernd symbiotischen Nahrungskette (siehe Fachinformation „Prozessmodell Biogas“). Kein Organismus kann die eingesetzte Biomasse allein zu Biogas umsetzen. Der Prozess funktioniert nur, wenn die Produkte aus der Hydrolyse/Acidogenese von den Sekundärfermentierern weiter umgesetzt und diese Substanzen (insbesondere Acetat, H₂, Formiat, Methylverbindungen und CO₂) schließlich von methanogenen Archaeen zu Biogas abgebaut werden, das aus dem System entweicht.

Die Energie, die aus bestimmten Teilabbauschritten des anaeroben Prozesses gewonnen werden kann, ist nur sehr gering, die Mikroorganismen müssen also äußerst effizient arbeiten. Im Gegensatz zu aeroben Prozessen lassen sich im Anaeroben je nach Prozessführung energiereiche erneuerbare Produkte wie z.B. Methan gewinnen. Allerdings wachsen und vermehren sich anaerobe Mikroorganismen nur langsam, weswegen Störungen oft nachhaltig gravierende Folgen haben. Besonders problematisch ist dabei, dass schon einzelne Störungen an bestimmten Stellen der Substratabbauskette typischerweise eine Hemmung des gesamten Prozesses auslösen.

Tritt eine Prozessstörung auf, für die kein technischer Fehler verantwortlich ist, liegen eigentlich immer ungünstige Bedingungen für bestimmte Mikroorganismen vor. Meistens liegt das Problem bei den methanogenen Archaeen am Ende der Prozesskette, zuweilen aber auch

in vorgelagerten, energetisch ungünstigen Prozessschritten, in denen sogenannte „syntrophe Bakterien“ kurzkettenige Verbindungen (z.B. Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Ethanol) zu Kohlendioxid und Wasserstoff umsetzen. Näheres hierzu findet sich in der Fachinformation „Prozessmodell Biogas“. Beim Abbau „schwieriger“ Verbindungen können auch toxische Beiprodukte gebildet werden, beispielsweise Ammoniak (Tian et al., 2018) beim Abbau von Substrat(mischung)en mit hohem Proteingehalt. Schließlich kann auch zu Beginn des Substratabbaus ein Engpass entstehen, z.B. wenn zu viel lignocellulosereiches Material eingesetzt wird, das schwer und nur langsam von den Mikroorganismen abgebaut wird. Die Hydrolyse wird dann zum limitierenden Schritt, besonders TS (bzw. TM) aber auch oTS (bzw. oTM) steigen im Gärgemisch an, es wird zunehmend schlechter durchmischbar, ggf. bildet sich eine Schwimmschicht, und der Prozess kann zum Erliegen kommen.

In den Abschnitten 3 - 6 wird ausgeführt, dass und wie die Analyse des mikrobiellen Stoffwechsels und seiner Veränderung solche Prozessstörungen früher anzeigen kann als die klassischen Analysen der Stoffwechselprodukte und andere prozesschemische bzw. -physikalische Untersuchungen (siehe Fachinformation „Schlüsselparameter zur Kontrolle des Gärprozesses - Physikalische und chemische Untersuchungen“), z.B. die Bestimmung (von Veränderungen) des FOS/TAC-Werts, des Fettsäurespektrums, des Ammoniumgehalts, der TM- und oTM-Gehalte, der Gaszusammensetzung, der Temperatur und des pH-Werts. Idealerweise werden diese Untersuchungen kombiniert.

2. Das Mikrobiom: molekularbiologische Analytik von DNA und RNA

In der klassischen Mikrobiologie werden Mikroorganismen und ihre Leistungen mittels Kultivierung untersucht. Allerdings lässt sich nur ein verschwindend geringer Bruchteil des Mikrobioms (Gesamtheit der betrachteten Mikroorganismengesellschaft) in vereinzelter Aufzucht kultivieren, die Kultivierung dauert lange und ist meist sehr aufwändig, und die Anzucht auf künstlichen Medien führt zudem oft zu verfälschten Ergebnissen. Deswegen hat sich in den letzten Jahrzehnten die Analyse der Erbsubstanz der vorhandenen Mikroorganismen, der Nucleinsäuren DNA und der RNA-Species durchgesetzt. Hiermit kann das gesamte Mikrobiom untersucht werden, das aus Tausenden verschiedener Mikroorganismen-Arten besteht - darunter auch aktuell nicht kultivierbare Mikroorganismen, von denen einige neueren Erkennt-

nissen zufolge einen ganz entscheidenden Beitrag zu den Stoffumsetzungen im Biogasprozess leisten (z.B. Nobu et al., 2015; Ruiz-Sánchez et al., 2018).

Bei den molekularbiologischen Analysen des Mikrobioms (s. Flusschema Abbildung 1) ist noch eine Unterscheidung wichtig: mittels Untersuchung ihrer DNA können Mikroorganismen identifiziert und ihre Präsenz nachgewiesen werden. In einem effizienten, ungestörten, im Fließgleichgewicht befindlichen Prozess sind diese Mikroorganismen wohl auch aktiv, dies ist aber beim Auftreten von Störungen für manche Teile des Mikrobioms nicht mehr der Fall. Zudem werden Mikroorganismen mit dem Substrat in den Fermenter eingetragen und sind dort auf DNA-Ebene wegen der Langlebigkeit

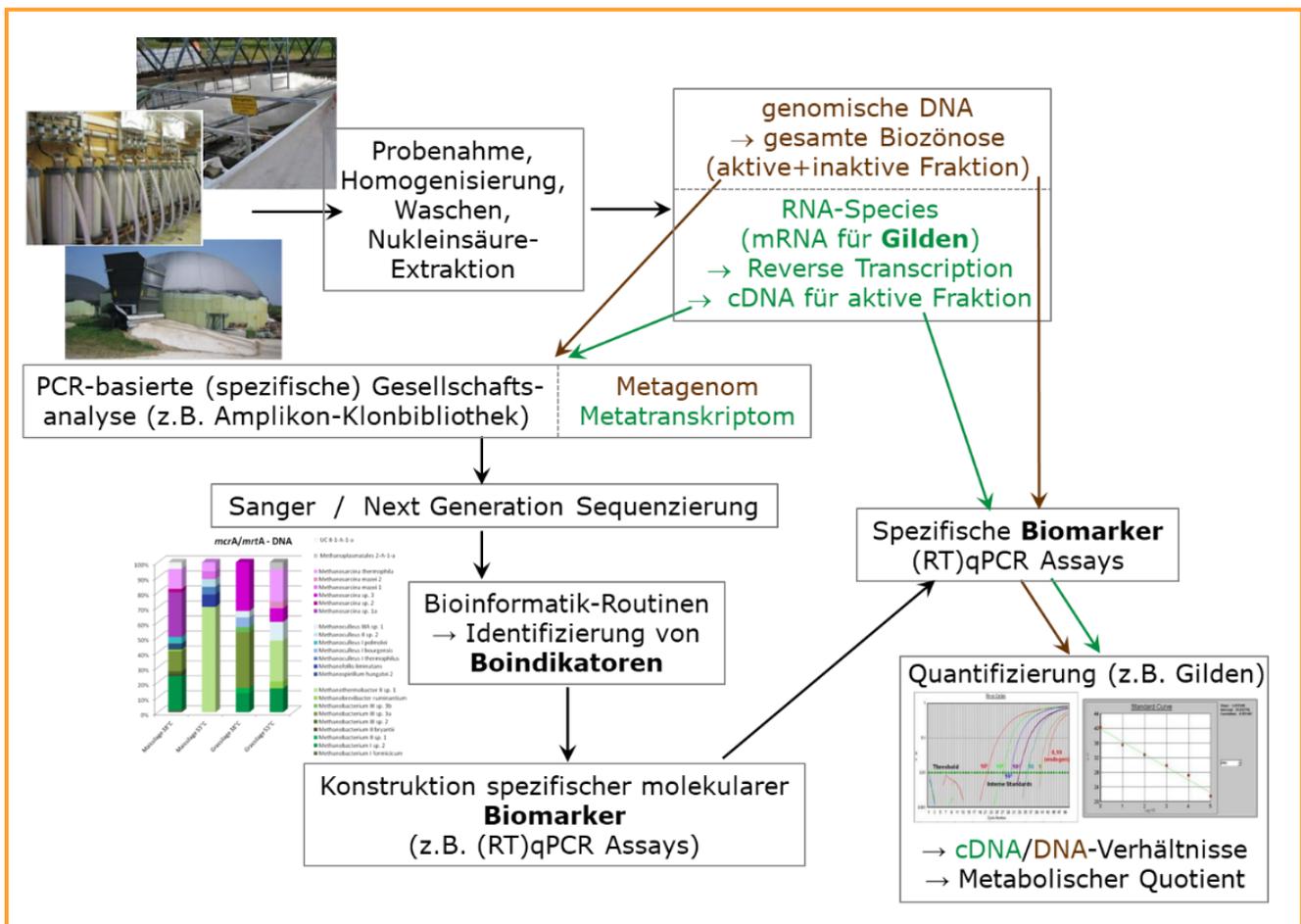


Abbildung 1: Flusschema der Abläufe der nukleinsäurebasierten (DNA bzw. RNA) molekularbiologischen Untersuchungen (Lebuhn et al., 2015, verändert)

der DNA nachweisbar. Sie sind aber oft nicht am Biogasprozess beteiligt und stellen bei den veränderten Bedingungen im Fermenter wie dem äußerst niedrigen Redox-Potential schnell ihre Aktivität ein. Deshalb ist es neben der Identifizierung der Mikroorganismen wichtig, auch ihre Aktivität zu bestimmen. Dies ist möglich mittels der Analyse der RNA- (Ribonukleinsäure-) Produktion. Nur lebende Zellen können RNA (Transkripte der DNA) produzieren, die für die Bildung von Enzymen (mRNA, messenger-RNA) oder Ribosomen (rRNA, ribosomale RNA) wichtig ist. Um diese RNA nachzuweisen, muss sie in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wird zunächst die DNA-Fraktion im Nukleinsäure-Extrakt verdaut. Die RNA wird in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben (Reverse Transkription, RT) und als DNA analysiert. Das Mikrobiom lässt sich damit molekularbiologisch auf DNA- und RNA-Ebene nicht nur schnell und umfassend (s. Abschnitt 4) untersuchen, sondern die Ergebnisse können auch Prozessstörungen deutlich früher anzeigen als dies mit den einschlägigen prozesschemischen Analysen möglich ist (s. Abschnitt 5).

Voraussetzung für zuverlässige Ergebnisse ist vor allem eine repräsentative Probenahme (siehe Fachinformation Probenahme aus Gülle-, Fermenter- und Gärrestbehältern, Einsatzstofflagern und offenen Silos), aber auch eine effiziente Extraktion der Nukleinsäuren. Um

Verluste während der Extraktion und der Reinigung zu bestimmen, werden „spike-in“-Experimente (Dotierung mit bekannten Organismen) durchgeführt. Mit diesen Techniken und Kenntnissen wurden in den letzten Jahren molekularbiologische Analyseroutinen entwickelt, die allerdings aktuell nur bei spezialisierten Laboren beauftragt werden können. Je nach Zielsetzung können quantitative Untersuchungen (s. Abschnitt 3) und Analysen der Gesellschaftszusammensetzung (s. Abschnitt 4) unterschiedlich spezifisch gestaltet werden. Beispielsweise kann die Konzentration aller oder bestimmter methanogener Archaeen analysiert werden, ebenso die Gesellschaftszusammensetzung der Bacteria oder bestimmter Untergruppen. Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen geben Auskunft über den jeweiligen Zustand der Gärbiologie. Er wird z.B. anhand der Präsenz und Aktivität bestimmter Bioindikator-Mikroorganismen (s. Abschnitt 4), über den „Metabolischen Quotient“ (MQ, Abschnitt 5) und/oder andere Parameter wie z.B. die Transkript/Gen-Verhältnisse (Abschnitt 6) ermittelt. Diese Analysen werden möglichst in synergistischer Kombination mit den klassischen prozesschemischen Analysen als Frühwarnsystem vor Prozessstörungen eingesetzt.

Abbildung 1 zeigt ein Flussschema der Abläufe der nukleinsäurebasierten molekularbiologischen Untersuchungen.

3. Quantifizierung von Mikroorganismen und ihrer (Transkriptions-) Aktivität

Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren bzw. der Organismen, aus denen sie extrahiert wurden, wird seit etwa 30 Jahren die „Quantitative Real-Time PCR“ (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, qPCR) eingesetzt. Sie ist mittlerweile zum „Gold-Standard“ geworden. Mithilfe der qPCR lässt sich beispielsweise die Konzentration der methanogenen Archaeen oder von bestimmten (funktionellen) Bakteriengruppen in Substraten, Gärgemischen und Gärresten ermitteln. Der Nachweis methanogener Archaeen erfolgt idealerweise anhand des Genabschnitts

mcrA der Methyl-Coenzym M Reduktase (Schlüsselenzym der Methanogenese) bzw. der entsprechenden Transkripte. Keine anderen Mikroorganismen besitzen dieses Enzym und die Fähigkeit, nennenswert Methan zu produzieren. Bacteria lassen sich wegen ihrer hohen Diversität am besten anhand des 16S rRNA Gens (*rrs*) bzw. dessen Transkripte nachweisen und identifizieren.

In ungestörten landwirtschaftlichen Biogasprozessen liegt die Konzentration methanogener

Archaeen etwa im Bereich 10^7 bis 10^8 , die der Bacteria etwa bei 10^9 bis 10^{11} pro mL Gärgemisch (DNA-Ebene). Dem ähnlich lassen sich mit Vorschaltung einer Reversen Transkription (RT, s. Abschnitt 2; RNA-Ebene) mittels RT-qPCR auch Zeitreihen für (transkriptionell) aktive Organismen ermitteln. Hier liegen typische Konzentrationen für methanogene Archaeen etwa im Bereich 10^6 bis 10^7 mRNA-Kopien und für Bacteria etwa bei 10^{11} bis 10^{13} rRNA-Kopien pro mL Gärgemisch. Werden Zeitreihen aufgenommen, geben diese Auskunft über quantitative Veränderungen der Zielorganismen bzw. -

gruppen, also darüber, ob ihre Vermehrung im Durchflussbetrieb gehemmt wird und sie deshalb ausgespült werden, ob sie unverändert bleiben, oder ob sie zunehmen, weil sich die Bedingungen zu ihren Gunsten verändert hatten.

Die auf DNA-Ebene ermittelten qPCR- bzw. RT-qPCR-Ergebnisse bilden auch die Grundlage zur Bestimmung der ökophysiologischen Parameter „Metabolischer Quotient“ (MQ, s. Abschnitt 5) und Transkript/Gen-Verhältnisse (T/G, s. Abschnitt 6).

4. Bioindikatoren: DNA- und RNA Sequenzierungen

Mittels „Sequenzierung“ der DNA bzw. RNA, d.h. der Bestimmung der Abfolge der einzelnen Nukleotide der Nukleinsäuren, lässt sich die Identität von Mikroorganismen in einer Probe bestimmen. Mittlerweile sind verschiedene Sequenzieretechniken verfügbar. Neben der sehr exakten klassischen Sanger-Sequenzierung hat sich in den letzten Jahren die massive parallele „Next-Generation“-Sequenzierung (NGS) durchgesetzt. Mittels NGS können Millionen von Nukleinsäuresequenzen gleichzeitig analysiert werden, was zwar einen hohen Aufwand an Bioinformatik und Rechnerleistung erfordert („big data“), aber angesichts von Tausenden mikrobieller Species in einer Probe die statistische Sicherheit der Ergebnisse, insbesondere den Nachweis wenig abundanter Species, gegenüber der Sanger-Sequenzierung entscheidend verbessert.

Nach der Sequenzierung von DNA oder in cDNA umgeschriebener RNA (s. Abschnitt 2) wird die Ähnlichkeit von Nukleinsäuresequenzen mit in Datenbanken hinterlegten Sequenzen berechnet. Hierüber wird die Gesellschaftszusammensetzung der Mikroorganismen oder spezieller Gruppen wie der methanogenen Archaeen oder der syntrophen Bakterien ermittelt. Besonderes Interesse gilt dabei den „Gilden“, bestimmten wichtigen funktionellen Gruppen des Mikrobioms. In den letzten Jahren wurden mit diesen Techniken unterschiedliche Prozesszustände

analysiert, insbesondere um die Mikroorganismen, die die in Abschnitt 1 genannten schwierigen Prozessschritte durchführen, ihre Aktivität und ihren Zustand zu erfassen (Hassa et al., 2018; Lebuhn et al., 2014). Dabei wurden Bioindikator-Organismen für intakte und beeinträchtigte Gärprozesse identifiziert („mikrobielles Benchmarking“).

Beispielsweise zeigt eine Dominanz mit vergleichsweise hoher Aktivität der obligat acetoklastischen *Methanosaeta concilii*-2 OTU001 (Abbildung 2 A, im hellgrünen Rahmen) oder auch des Candidatus *Methanofastidiosum* III sp. 2b (Abbildung 2 A, im pinken Rahmen) einen bis ca. Versuchstag 380 eher weniger belasteten Prozess mit relativ langer hydraulischer Verweilzeit an. Dies gilt in ähnlicher Weise für den Candidatus *Cloacimonas* sp. OTU0001 (Abbildung 2 B, im hellgrünen Rahmen), einem nicht kultivierten und daher kaum untersuchten Vertreter der Bacteria, den Evidenzen zufolge ein syntropher Aminosäureverwerter und Propionat-Oxidierer. Demgegenüber ließen sich im gleichen Experiment mit der physiologisch vielseitigen *Methanosarcina* IIIC sp. 1 OTU003 (Abbildung 2 A, im roten Rahmen) und dem nicht kultivierten, nicht näher beschriebenen *Peptostreptococcales-Tissierellales* W5053 OTU0006 (Abbildung 2 B, im roten Rahmen) Mikroorganismen identifizieren, die durch eine höhere organische Raumbelastung (organic loa-

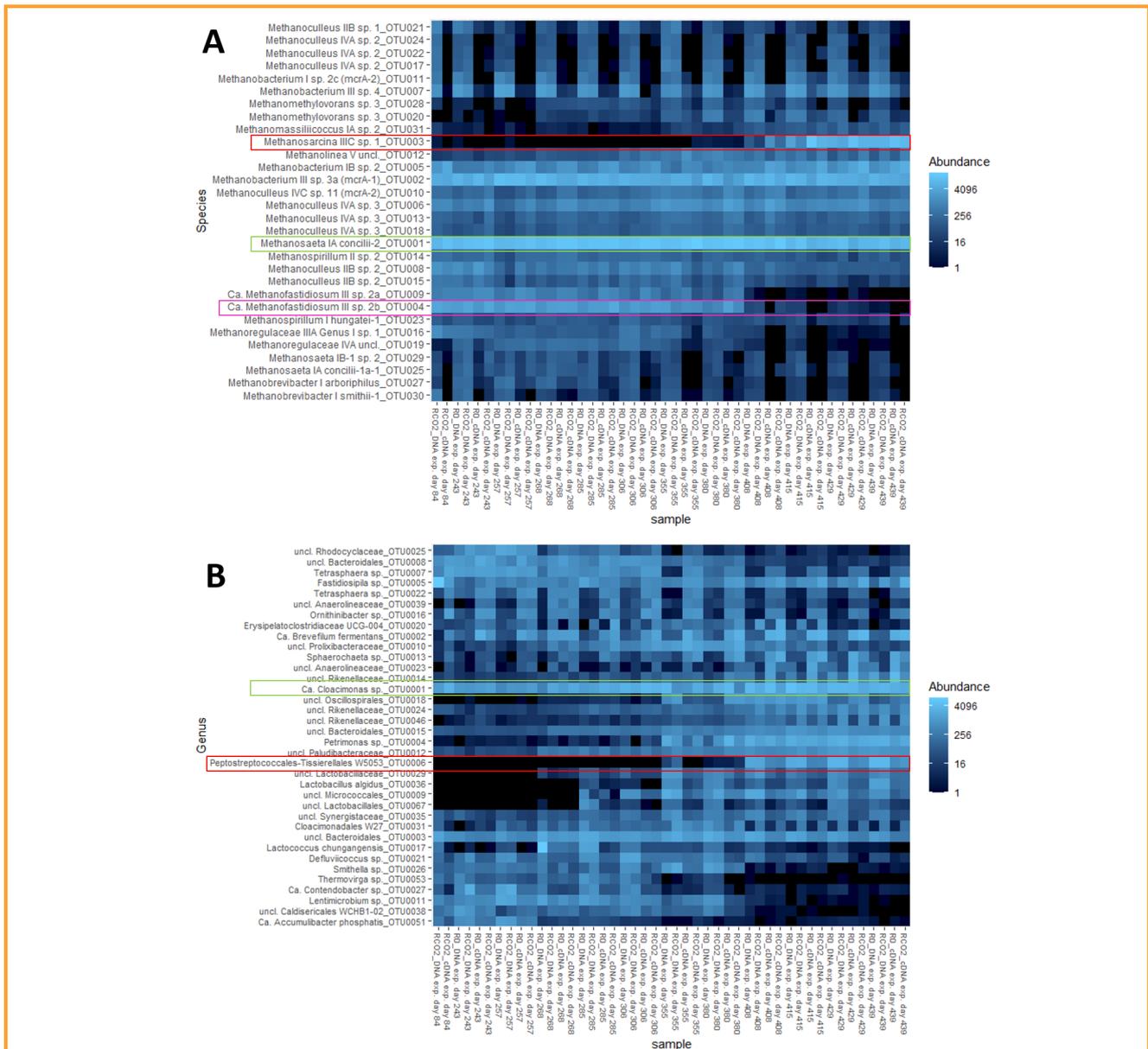


Abbildung 2: Beispiel zweier „heatmaps“ für die Abundanz von (A) *mcrA*- und (B) 16S-rRNA-Genen (*rrs*, DNA) und -Transkripten (cDNA) für methanogene Archaeen (A) und Bacteria (B) in einem Versuchsverlauf zweier Fermenter (R0, RCO2); OTU: Operational Taxonomic Unit (Polag et al., 2020; Munk und Lebuhn, unveröffentlicht). Je heller das Symbol, desto stärker präsent waren die Zielgene bzw. -transkripte. Mit zunehmender Versuchsdauer (Abszisse nach rechts) stiegen die Säuregehalte an.

ding rate, OLR) bei höheren Gehalten kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) wie Acetat begünstigt werden.

Auf Grundlage der Kenntnisse solcher mikrobieller Bioindikatoren mit ihren Vorlieben und Bedürfnissen lassen sich bestimmte Prozesszustände besser abbilden und eventuelle Störungen feststellen. Erkannten Defiziten kann damit zielgerichteter und schneller entgegenwirkt werden.

Während die bisher beschriebenen Analyseroutinen zumindest einen PCR-Schritt zur Vervielfältigung eines bestimmten DNA- bzw. Genabschnitts beinhalten, um die in den kleinen Proben volumina enthaltenen Mikroorganismen bzw. Nukleinsäuremengen nachweisbar zu machen, verzichten die neueren Metagenom- und Metatranskriptomanalysen (Abbildung 1) auf solche PCR-Schritte. Dadurch wird vermieden, dass bestimmte Mikroorganismen nicht erfasst oder bevorzugt detektiert werden. Wenn inten-

siv genug im Hochdurchsatz sequenziert wird, kann die gesamte DNA bzw. RNA in einer Probe analysiert werden. Der hiermit verbundene Informationsgewinn ist immens, da bislang unbekannte Mikroorganismen mit ihren Funktionen und ihrer Aktivität entdeckt und beschrieben werden können. Die Analyse und die Prozessierung der großen Datenmengen erfordern allerdings eine entsprechend große IT-Infrastruktur mit leistungsfähigen Rechnerclustern.

Die Weiterentwicklung dieser Techniken erlaubt es neuerdings, ganze (idealerweise komplette, geschlossene) Genome aus den sequenzierten

DNA-Puzzlefragmenten zu rekonstruieren. Die Möglichkeit, solche „Metagenome Assembled Genomes“ (MAGs) zu bilden (Parks et al., 2017; Campanaro et al., 2020) und mit den zugeordneten Transkriptomen zu kombinieren, ist ein methodischer Durchbruch zur Analyse der Mikrobiome in bestimmten Proben, ihrer Funktionen und ihrer Aktivitäten, die „Black Box“ wird immer stärker erhellt. Hierzu tragen auch die neuen Ansätze der „Metaproteomik“ bei, in denen die in Proben enthaltenen Proteine bzw. Enzyme untersucht werden (Heyer et al., 2015; Hassa et al., 2018).

5. Metabolischer Quotient

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass die methanogenen Archaeen das empfindlichste Glied der Biogas-Mikrobiome sind. Prozessstörungen sind daher frühzeitig an Veränderungen ihrer Leistung erkennbar. Vor diesem Hintergrund wurde der „Metabolische Quotient“ (MQ) für eine schnelle Analyse des Zustands der methanogenen Archaeen entwickelt (Abbildung 1; Lebuhn et al., 2014; Munk et al., 2012). In den MQ gehen die Methanproduktivität (MP, in $L_{CH_4} / (kg_{FM} \cdot d)$) als Aktivitätsparameter und die mit qPCR ermittelte Konzentration der methanbildenden Archaeen (in Anzahl methanogener Zellen / g_{FM} ; s. Abschnitt 3) im Gärgemisch zum Zeitpunkt der Probenahme ein (zur Vereinfachung wird angenommen, dass 1 kg Gärgemisch ein Volumen von 1 L einnimmt). Die damit bestimmte aktuelle spezifische methanogene Aktivität (SMA_{akt}), also die Methanproduktivität pro methanogenem Archaeon, wird einer methanogenen Standard-Aktivität (SMA_{std}) gegenübergestellt, die in vielen Versuchsreihen mit Maissilage über verschiedene

organische Raumbelastungen bei 38°C hinweg ermittelt wurde (Abbildung 3). Die Werte zur Ermittlung der SMA_{std} (grüne Punkte und Beschriftung in Abbildung 3) stammen ausschließlich aus Proben ohne jeglichen Hinweis auf Vorliegen einer Prozessstörung.

Damit definiert ein MQ von ungefähr 1 einen effizienten Standardbetrieb (nicht nur für die mesophile Maissilagevergärung, s. unten). MQ-Werte über ca. 4 (rote Punkte und Beschriftung in Abbildung 3) weisen auf Stressmetabolismus der methanogenen Archaeen hin. Hier leisten die Methanogenen mehr als im effizienten Standardzustand. Da Methanbildung und Energiegewinnung der Methanogenen direkt miteinander gekoppelt sind, zeigt ein hoher MQ-Wert an, dass ihr Energiemetabolismus zu den gegebenen, offenbar ungünstigen Bedingungen intensiviert werden musste, um überleben und sich im Durchflussprozess halten zu können. Bei Werten unter ca. 0,2 (blaue Punkte und Beschriftung in Abbildung 3) sind die Methanoge-

Der Metabolische Quotient wird wie folgt berechnet:

$$MQ = SMA_{akt} / SMA_{std}$$

Mit:

$SMA_{(akt bzw. Std)} = MP_{(akt bzw. Std)} / \text{Konzentration methanogener Zellen in der Probe}$

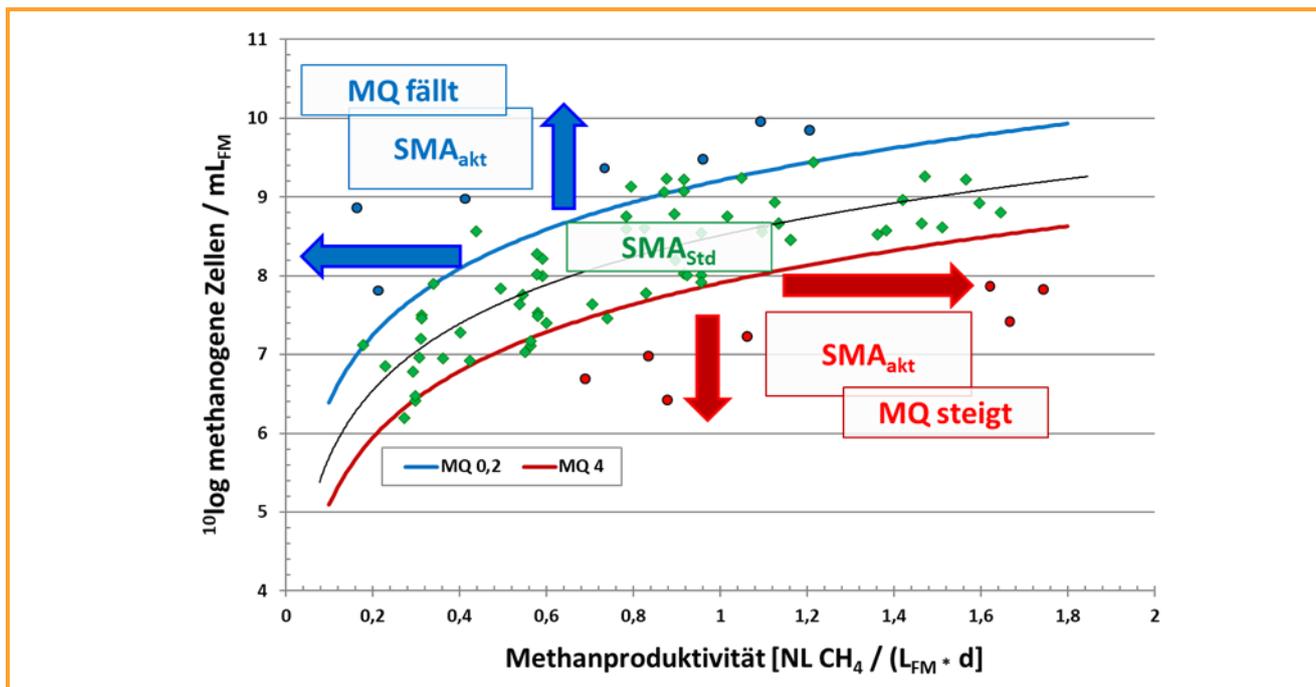


Abbildung 3: Konzentration methanogener Archaeen, Methanproduktivitäten und Metabolische Quotienten (MQ) für methanbildende Archaeen in verschiedenen Gärsystemen und Interpretation der Daten (Lebuhn et al., 2014)

nen unterfordert, dann ließe sich z.B. die OLR erhöhen, oder aber sie sind geschädigt. Letzteres ist der Fall, wenn sie trotz Stressmetabolismus nicht mehr genügend Energie für ihren Stoffwechsel und ihr Wachstum erzeugen können, die Verweilzeit für ihre Vermehrung nicht mehr ausreicht und sie ausgespült werden. Welcher der beiden Zustände vorliegt, ist anhand einer Zeitreihe zu beurteilen. Eine solche Entwicklung ist exemplarisch in Abbildung 4 dargestellt: Nach Reaktivierung eines versauerten Gärgemischs sank der FOS/TAC-Wert (ab ca. Versuchstag 50) sowie stieg der MQ (ab ca. Tag 40) in den jeweiligen Normalbereich. Ungefähr ab Versuchstag 150 begann der MQ Stressmetabolismus anzuzeigen, während das FOS/TAC-Verhältnis erst etwa 3 Wochen später deutlich anstieg und eine angehende Versäuerung signalisierte. Zu diesem Zeitpunkt begann der MQ ausgehend von sehr hohen Werten wegen der einbrechenden SMA_{akt} bereits wieder zu sinken. Als Grund für die Versäuerung zu Versuchsende wurde der unter das Minimum gefallene Kobaltgehalt (Abbildung 4) identifiziert.

In weiteren Untersuchungen ließ sich zeigen, dass der MQ als Prozessindikator auch bei Vergärungsprozessen auf anderem Temperaturniveau und von anderen Substraten (Munk et al., 2017) angewendet werden kann. Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass Einsatzstoffe wie z.B. Gülle einen geringeren spezifischen Methanertrag haben als Maissilage. Um die MQ-Werte vom Betrag her vergleichbar zu machen, müsste um den entsprechenden Faktor korrigiert werden. Weiterhin ist zu bedenken, dass Praxisanlagen häufig mehrstufig konfiguriert sind, die Gasbildung in der Regel aber nur gesammelt erfasst wird, und auch ein Gärrestlager noch zur erfassten Gasmenge beitragen kann. Bei Sammelgasmessung müssten die verschiedenen Kompartimente separat molekularbiologisch untersucht und die Methanproduktivitäten für eine erste Näherung anhand von Erfahrungswerten geschätzt werden. Eine Alternative ohne Erfordernis von Daten zur Gasproduktion bieten die im folgenden Kapitel 6 erläuterten Transkript/Gen-Verhältnisse.

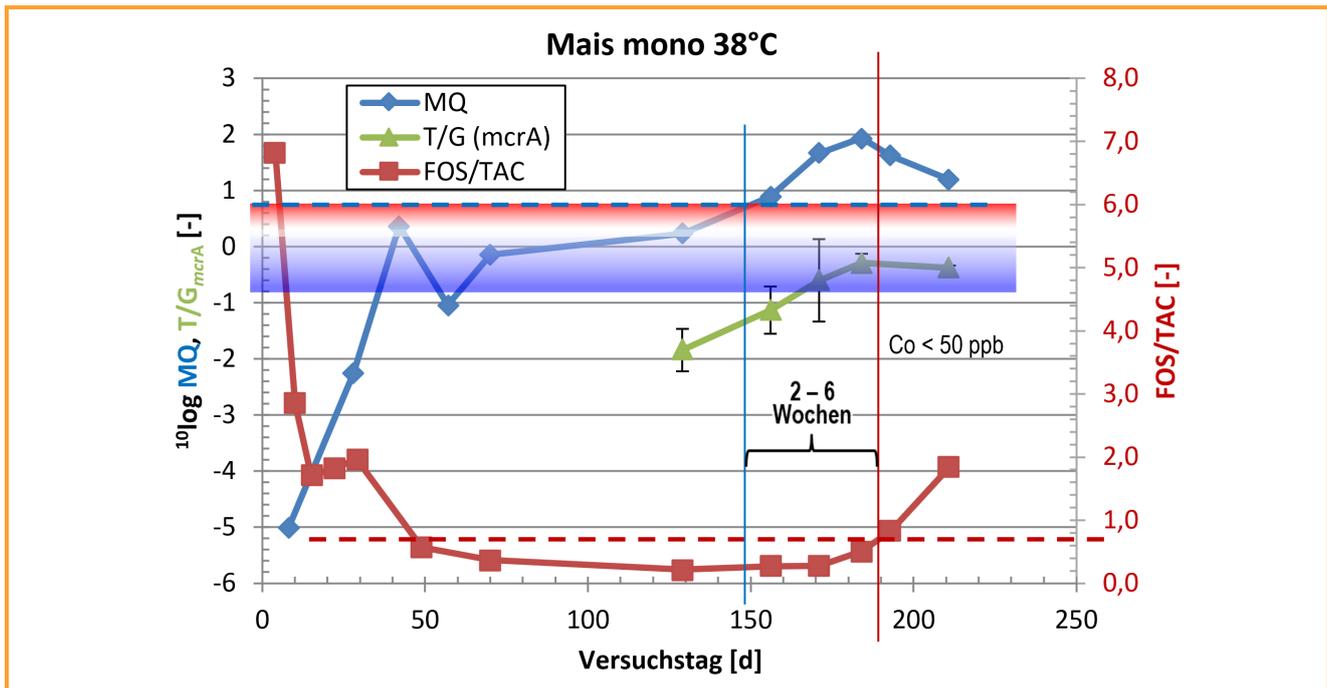


Abbildung 4: Entwicklung des FOS/TAC-Wertes, des Metabolischen Quotienten (MQ) und des *mcrA*-cDNA/DNA-Verhältnisses (T/G_{mcrA} , ab d 127) bei der mesophilen Vergärung von Maissilage. Der Prozess im zu Versuchsbeginn stark versauerten Fermenter wurde reaktiviert (etwa d 40); etwa ab d 150 zeigte der MQ erste Störungsanzeichen infolge Ko-

6. Transkript/Gen- (T/G-) Verhältnisse

Zur Bestimmung des Prozesszustands ist ein aussagekräftiger Aktivitätsparameter erforderlich. Idealerweise wäre dies die Methanproduktivität, jedoch besitzen die wenigsten Biogasanlagen eine separate Gaserfassung und -analyse für die einzelnen Gärbehälter bzw. Gärrestlager. Zuweilen werden überhaupt keine Gasmengen gemessen, oder die Messwerte sind unzuverlässig. Deswegen wurden zur rein molekularbiologischen Analyse der Aktivität bestimmter Umsetzungsprozesse und der Mikroorganismen (gruppen), die sie durchführen, die Transkript/Gen- (T/G-) Verhältnisse entwickelt. Es wurde vielfach gezeigt, dass z.B. die Transkription (mRNA-Produktion) der *mcrA*-Gene in verschiedenen Ökosystemen mit der Methanproduktion korrelierte (Freitag and Prosser, 2009; Watanabe et al., 2009; Munk et al., 2012).

Mit den T/G-Verhältnissen können die spezifischen (transkriptionellen) Aktivitäten der einzelnen im Biogasprozess relevanten Mikroorganismen, bestimmten Gruppen oder Gilden (z.B. syntrophe Bakterien, methanogene Archaeen)

bestimmt werden (Munk et al., 2012; Lebuhn et al., 2014). Dabei werden die Konzentration von „Messenger-RNA“ (mRNA: von den Genen (DNA) abgelesen und aktivitätsabhängig produziert) und die Konzentration der zugeordneten DNA (Maß für die Zellzahl) gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Je höher das T/G-Verhältnis eines bestimmten Transkript/Gen-Paars ist, desto höher ist auch die spezifische transkriptionelle Aktivität der Mikroorganismen, die den betrachteten Prozess bzw. die enzymatische Umsetzung durchführen.

Die molekularbiologischen Parameter MQ (s. Abschnitt 5) und T/G-Verhältnisse geben Aufschluss über den Zustand des betrachteten Mikrobioms zum Zeitpunkt der Probenahme. Für eine aussagekräftige Prozessdiagnose ist allerdings die Darstellung der Entwicklung der Analyseergebnisse im Zeitverlauf noch wichtiger (steigen oder fallen die Werte?). Es ist also ähnlich wie z.B. für die FOS/TAC-Bestimmung (s. „Schlüsselparameter zur Kontrolle des Gärprozesses - Physikalische und chemische Untersu-

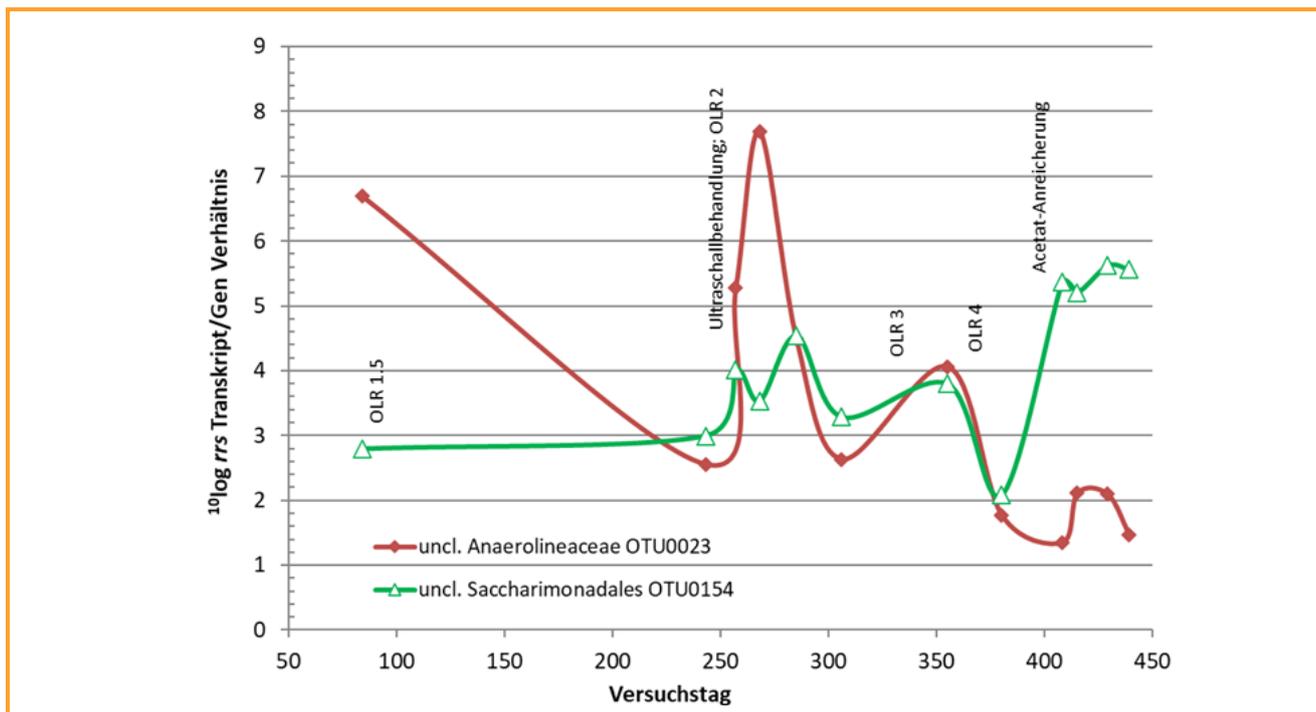


Abbildung 5: Entwicklung der *rrs* Transkript/Gen-Verhältnisse (T/G_{rrs}) zweier *Bacteria*-Genospecies im Verlauf eines OLR-Steigerungsversuchs; uncl: nicht klassifiziert; OTU: Operational Taxonomic Unit; OLR: organische Raumbelastung ($\text{kg} / (\text{m}^3 \cdot \text{d})$) (Munk und Lebuhn, unveröffentlicht)

chungen“) angeraten, eine Zeitreihe zu analysieren. Nur aufgrund einer einmaligen Bestimmung kann kaum eine zuverlässige Aussage getroffen werden. Besonders deutlich wird dies in Abbildung 5.

Ausgehend von einem sehr hohen Wert sank T/G_{rrs} einer nicht-klassifizierten Genospecies (OTU0023) der Familie *Anaerolineaceae* in einer Untersuchung mit zunehmender organischer Raumbelastung, während sich T/G_{rrs} der nicht-klassifizierten Genospecies OTU0154 der Ordnung *Saccharimonadales* von einem normalen

(ca. 10^2 bis 10^3) zu einem ziemlich weiten Verhältnis entwickelte (Abbildung 5). Kurz nach Versuchstag 250 fand eine Ultraschallbehandlung statt, und die OLR wurde gesteigert, was die spezifische *rrs*-Transkription von OTU0023 sehr stark, die von OTU0154 dagegen nur wenig aktivierte. Der komplette Verlauf zeigt, dass OTU0023 kein Freund hoher organischer Raumbelastungen und/oder SCFA-Konzentrationen ist, wo sich OTU0154 eher wohlfühlt. Eine alleinige Probenahme etwa am Tag 260 hätte zu einer falschen Interpretation geführt.

7. Ausblick

Ohne eine verlässliche spezifische Analytik ist ein wissenschaftsbasierter Fortschritt kaum möglich. Neue Fragestellungen können Weiter- oder Neuentwicklungen der Analytik erfordern. In diesem Sinne wurden die ökophysiologischen Frühwarnparameter MQ (Abschnitt 5) und T/G-Verhältnisse (Abschnitt 6) entwickelt bzw. weiterentwickelt. Aktuell werden die Einsatzgrenzen dieser Techniken untersucht. Ein Ziel ist es dabei, Einsatzmöglichkeiten prozesstechnischer (z.B. neue Reaktortypen) oder substratspezifischer Innovationen zu prüfen. Ersten Ergebnissen zufolge kann damit z.B. die Wirkung einer H₂ und/oder CO₂-Begasung zur biologischen Methansynthese *in-* sowie *ex-situ* präzise und schnell beurteilt werden (Polag et al., 2020; Mößnang et al., 2019). Weitere Entwicklungen zielen darauf ab, molekularbiologische Analytik unproblematisch vor Ort zu ermöglichen. Eine online-/inline-Sensorik erscheint allerdings in näherer Zukunft noch nicht realisierbar.

Ein erhebliches Potential wird auch in der Weiterentwicklung der neuen Sequenziertechnologien (s. Abschnitt 4) gesehen. Besonders beim Einsatz ohne Vorschaltung einer PCR (Metagenomik/-transkriptomik, s. Abschnitt 4) können sie die Informationen liefern, um bislang unbekannte Mikroorganismen mittels Bioinformatik zu identifizieren und ihre physiologischen Möglichkeiten nach Rekonstruktion ihrer Genome (MAGs, s. Abschnitt 4) auf genetischer Basis zu charakterisieren. Sie eignen sich zwar nicht zur schnellen Routinediagnostik, auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse lassen sich aber neue PCR-Systeme maßschneidern oder vorhandene modifizieren, mit denen wiederum die als relevant erkannten Mikroorganismen und ihre Aktivitäten gezielt nachgewiesen, verfolgt und quantifiziert werden können.

8. Referenzen

- ▶ Campanaro, S., Treu, L., Rodriguez-R, L.M., Kovalovszki, A., Ziels, R.M., Maus, I., Zhu, X., Kougias, P.G., Basile, A., Luo, G., Schlüter, A., Konstantinidis, K.T., Angelidaki, I. (2020): New insights from the biogas microbiome by comprehensive genome-resolved metagenomics of nearly 1600 species originating from multiple anaerobic digesters. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1-18.
- ▶ Freitag, T.E., Prosser, J.I. (2009): Correlation of methane production and functional gene transcriptional activity in a peat soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6679–6687.
- ▶ Hassa, J., Maus, I., Off, S., Pühler, A., Scherer, P., Klocke, M., Schlüter, A. (2018): Metagenome, metatranscriptome, and metaproteome approaches unraveled compositions and functional relationships of microbial communities residing in biogas plants. *Applied Microbiology Biotechnology*, 102(12), 5045-5063.
- ▶ Heyer, R., Kohrs, F., Reichl, U., Benndorf, D. (2015): Metaproteomics of complex microbial communities in biogas plants. *Microbial Biotechnology*, 8(5), 749-763.
- ▶ Lebuhn, M., Munk, B., Effenberger, M. (2014): Agricultural biogas production in Germany - from practice to microbiology basics, *Energy, Sustainability and Society* 4, (10) 1-21.
- ▶ Lebuhn, M., Weiß, S., Munk, B., Guebitz, G.M. (2015): Microbiology and molecular biology tools for biogas process analysis, diagnosis and control. In: *Biogas Science and Technology* (G.M. Guebitz, ed.), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 151, 1-40.
- ▶ Mößnang, B.; Lebuhn, M.; Strübing, D.; Koch, K. (2019): Mikrobiologie der Biologischen Wasserstoff-Methanisierung (BHM) im thermophilen Rieselbettverfahren (MikMeth). *Biogasinfotagen Ulm, IBBK*, 30.01.–31.01.2019.
- ▶ Munk, B., Bauer, C., Gronauer, A., Lebuhn, M. (2012): A metabolic quotient for methanogenic Archaea. *Water Science & Technology*, 66(11), 2311-2317.
- ▶ Munk, B., Lebuhn, M. (2014): Process diagnosis using methanogenic Archaea in maize-fed, trace element depleted fermenters. *Anaerobe*, 29, 22-28.
- ▶ Munk, B., Guebitz, G. M., Lebuhn, M. (2017): Influence of nitrogen-rich substrates on biogas production and on the methanogenic community under mesophilic and thermophilic conditions. *Anaerobe*, 46, 146-154.
- ▶ Nobu, M.K., Narihiro, T., Rinke, C., Kamagata, Y., Tringe, S.G., Woyke, T., Liu, W.T. (2015): Microbial dark matter ecogenomics reveals complex synergistic networks in a methanogenic bioreactor. *The ISME Journal*, 9(8), 1710-1722.
- ▶ Parks, D.H., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P.A., Woodcroft, B.J., Evans, P.N., Hugenholtz, P., Tyson, G.W. (2017): Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature Microbiology*, 2(11), 1533-1542.
- ▶ Polag, D., Koch, K., Lebuhn, M. (2020): Increasing methane productivity in anaerobic digesters by addition of CO₂. *DFG-Bericht PO 1982/2-1, KO 3542/3-1, LE 3744/2-1*, pp. 13.
- ▶ Ruiz-Sánchez, J., Campanaro, S., Guivernau, M., Fernández, B., Prenafeta-Boldú, F.X. (2018): Effect of ammonia on the active microbiome and metagenome from stable full-scale digesters. *Bioresource Technology*, 250, 513-522.
- ▶ Tian, H., Fotidis, I. A., Kissas, K., Angelidaki, I. (2018): Effect of different ammonia sources on acetlastic and hydrogenotrophic methanogens. *Bioresource Technology*, 250, 390-397.
- ▶ Watanabe, T., Kimura, M., Asakaw, S. (2009): Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry* 41(2), 276–285.

9. Weiterführende Fachinformationen

Folgende Titel der im Biogas Forum Bayern erschienenen Fachinformationen geben Ihnen weiterführende Informationen im angesprochenen Themenbereich:

Schlüsselparameter zur Kontrolle des Gärprozesses - Physikalische und chemische Untersuchungen

www.biogas-forum-bayern.de/bif17

Motivation, Voraussetzungen und Methoden für die Prozessüberwachung

https://www.biogas-forum-bayern.de/De/Fachinformationen/Prozessbiologie/nachhaltig-erneuerbar-energie_MotivationProzessuberwachung.html

Hinweise zum Anfahren einer Biogasanlage

https://www.biogas-forum-bayern.de/De/Fachinformationen/Prozessbiologie/nachhaltig-erneuerbar-energie_HinweiseWiederanfahren.html

Prozessmodell Biogas

https://www.biogas-forum-bayern.de/De/Fachinformationen/Prozessbiologie/nachhaltig-erneuerbar-energie_Prozessmodell.html

Prozessbiologische Störungen in NawaRo-Gütleanlagen: Symptome, Ursachen und mögliche Lösungsansätze

<https://www.biogas-forum-bayern.de/media/files/0001/Prozessbiologische-Storungen-in-NawaRo-Anlagen.pdf>

Marktübersicht Zusatz- und Hilfsstoffe in Biogasanlagen

https://www.biogas-forum-bayern.de/De/Fachinformationen/Prozessbiologie/nachhaltig-erneuerbar-energie_Zusatzstoffe.html

Probenahme aus Gülle-, Fermenter- und Gärrestbehältern, Einsatzstofflagern und offenen Silos

https://www.biogas-forum-bayern.de/De/Fachinformationen/Laboranalytik/nachhaltig-erneuerbar-energie_Probenahme.html

Substrataufbereitung zur Verbesserung des Abbaus faserreicher Biomasse

https://www.biogas-forum-bayern.de/De/Fachinformationen/AnlagenteileAnlagentechnik/aufbereitungsverfahren-faserreiche-biomasse_Substrataufbereitung.html

Qualität der Laboranalytik

https://www.biogas-forum-bayern.de/De/Fachinformationen/Laboranalytik/nachhaltig-erneuerbar-energie_QualitatderLaboranalytik.html

Hinweise zum sicheren Umgang mit Gefahrstoffen Teil 1: Rechtliche Grundlagen, Kennzeichnung, Gefährdungsbeurteilung

https://www.biogas-forum-bayern.de/De/Fachinformationen/Anlagensicherheit/gefahrstoffe_HinweiszumsicherenUmgangmitGEfahrstoffenTeil1.html

Hinweise zum sicheren Umgang mit Gefahrstoffen Teil 2: Praxishilfe für die Umsetzung der TRGS 529

https://www.biogas-forum-bayern.de/De/Fachinformationen/Anlagensicherheit/nachhaltig-erneuerbar-energie_GefahrstoffeTeil2.html

Zitiervorlage: M. Lebuhn, B. Munk (2021):
Schlüsselparameter zur Kontrolle des Gärprozesses - Mikro- und Molekularbiologie. In: Biogas Forum Bayern, bif22, Hrsg. ALB Bayern e.V., <https://www.biogas-forum-bayern.de/bif22>, Stand [Abrufdatum].



Arbeitsgemeinschaft Landtechnik und
Landwirtschaftliches Bauwesen (ALB)
in Bayern e.V.

Vöttinger Straße 36, 85354 Freising

Telefon: 08161 / 887-0078

Telefax: 08161 / 887-3957

E-Mail: info@alb-bayern.de

Internet: www.alb-bayern.de