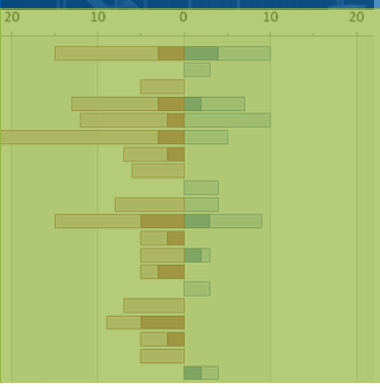
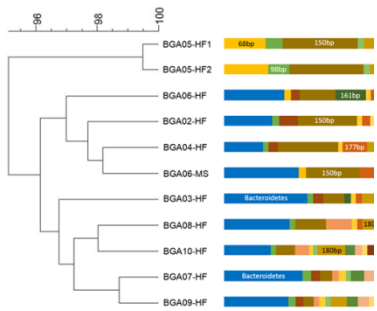
ATB
Leibniz-Institut für Agrartechnik
Potsdam-Bornim e.V.

Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen



Schlussbericht zum Forschungsverbund

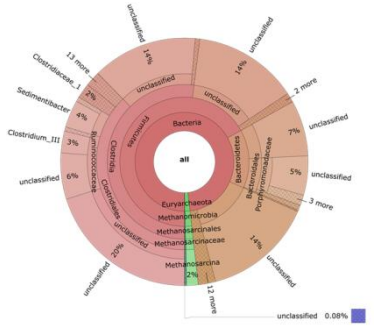
BIOGAS-BIOCOENOSIS



Gefördert durch:

Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



Bornimer Agrartechnische Berichte

Heft 84

Potsdam-Bornim 2014

ATB
Leibniz-Institut für Agrartechnik
Potsdam-Bornim e.V.

Gefördert durch:
Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft
aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen

Ermittlung der mikrobiellen Diversität sowie von hauptsächlichen verfahrenstechnischen Einflussfaktoren auf die Mikroflora

Schlussbericht zum Forschungsverbund BIOGAS-BIOCOENOSIS

Bornimer Agrartechnische Berichte
Heft 84

Potsdam-Bornim 2014

Herausgeber:

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.
Max-Eyth-Allee 100
14469 Potsdam-Bornim
☎ (0331)-5699-0
Fax.: (0331)-5699-849
E-mail: atb@atb-potsdam.de
Internet: http://www.atb-potsdam.de

August 2014

Redaktion:
Dr. Michael Klocke

Typografische Gestaltung:
Andrea Gabbert

Quellennachweis der Umschlagfotos:
1-3: R. Kausmann / ATB
4: F. Kohrs / D. Benndorf / Univ. Magdeburg
5: S. Theuerl / ATB
6: I. Maus / A. Schlüter / Univ. Bielefeld
(von oben nach unten)

Herausgegeben vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) mit Förderung durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) und das Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kultur des Landes Brandenburg (MWFK).

Für den Inhalt der Beiträge zeichnen die Autoren verantwortlich.

Eine Weiterveröffentlichung von Teilen ist unter Quellenangabe und mit Zustimmung des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. möglich.

ISSN 0947-7314

© Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., 2014

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen - Ermittlung der mikrobiellen Diversität sowie von hauptsächlichen verfahrenstechnischen Einflussfaktoren auf die Mikroflora

BIOGAS-BIOCOENOSIS

Zuwendungsempfänger:

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.
Universität Bielefeld
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Universität Hohenheim

Förderkennzeichen:

22010711, 22028711, 22028811, 22028911

Laufzeit:

01.11.2011 bis **31.10.2013**

Datum der Veröffentlichung: 29. August 2014

Gefördert durch:

Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

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

Bornimer Agrartechnische Berichte • Heft 84
ISSN 0947-7314
Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB)

Koordination

Dr. Michael Klocke

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB)
Abt. Bioverfahrenstechnik – AG Mikrobielle Systemökologie

Max-Eyth-Allee 100
D-14469 Potsdam

www.atb-potsdam.de

Inhalt

Teilvorhaben 1 - Mikrobiologisches Monitoring (FKZ 22010711) I

I Hintergrund I-12

II Ergebnisse I-23

Teilvorhaben 2 - Taxonomische Profilierung von Biogas-Gemeinschaften mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung von 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken (FKZ 22028711) II

I Hintergrund II-60

II Ergebnisse II-63

Teilvorhaben 3 - Metaproteom-Analytik (FKZ 22028811) III

I Hintergrund III-92

II Ergebnisse III-94

Teilvorhaben 4 - Biostatistische Prozessdatenauswertung (FKZ 22028911) IV

I Das Projekt ,,Biogas-Biocoenosis“: Teilvorhaben 4 – FKZ 22028911 IV-110

II Darstellung der Ergebnisse IV-114

Vorwort

In Biogasanlagen bewirkt eine komplexe und dynamische mikrobielle Biozönose den Aufschluss und Abbau der organischen Biomasse zu methanhaltigem Biogas. Eine Analyse dieser mikrobiellen Gemeinschaft ist jedoch schwierig, da (1) die mikrobiologische Gemeinschaft aus hunderten unterschiedlichster Arten von Mikroorganismen besteht, welche aufgrund ihrer anaeroben Lebensweise, ähnlicher Nährstoffanforderungen und syntropher bzw. symbiotischer Wechselbeziehungen zwischen den Mikroorganismen häufig nicht oder nur schwer kultivierbar sind, (2) daher viele der auftretenden Arten bislang weder taxonomisch noch physiologisch beschrieben sind, (3) die mikrobiologische Gemeinschaft zeitlich und in Abhängigkeit der Betriebsweise des Biogasreaktors variiert, (4) meistens keine systematische Beprobung von Praxis-Biogasreaktoren stattfinden kann und daher im Allgemeinen auf Modellsysteme zurückgegriffen werden muss, welche jedoch die Prozesse in Praxis-Reaktoren grundsätzlich nur begrenzt abbilden können.

In den letzten Jahren konnten in der mikrobiologischen Analytik allerdings gewaltige technologische Durchbrüche erzielt werden. Insbesondere konnten verschiedene kulturunabhängige Hochdurchsatzverfahren entwickelt und etabliert werden, welche die Analyse von komplexen Lebensgemeinschaften auch in höheren Probenzahlen ermöglichen. Hierzu zählen u.a. (1) die Hochdurchsatz-Sequenzierung des Gens für die mikrobielle 16S rRNA und die taxonomische Einordnung auf Basis der Gensequenz, (2) sog. *community-fingerprints* zur vergleichsweise zeitnahen Verfolgung von Veränderungen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft, (3) die Erfassung des Metaproteoms zur Verfolgung der mikrobiellen Enzyme sowie (4) die Erfassung des Metagenoms bzw. des Metatransskriptoms zur Erfassung des genetischen Potentials einer mikrobiellen Gemeinschaft. Mit der Etablierung solcher Hochdurchsatz-Technologien zur kulturunabhängigen molekularen Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften in Umweltproben und der entsprechenden bioinformatischen Software zur Auswertung der erzeugten Datenpakete steht erstmals eine Methodik für eine umfassende Inventarisierung der an der Biogasfermentation beteiligten Mikroorganismen zur Verfügung.

Im Rahmen des im Folgenden dargestellten Forschungsvorhabens sollten diese Techniken gezielt eingesetzt werden, um die Auswirkungen verschiedener Betriebsweisen von Biogasanlagen auf die Prozessmikrobiologie in der Praxis zu untersuchen. Weiterhin sollten Zusammenhänge zwischen der Prozessmikrobiologie sowie der Reaktorleistung ermittelt werden. Ziel ist die Ermittlung besonders prozessrelevanter Arten oder Organismengruppen.

Das Vorhaben ist ein Verbundvorhaben der Partner Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (Abt. Bioverfahrenstechnik & Abt. Technikbewertung und Stoffkreisläufe), Universität Bielefeld (Centrum für Biotechnologie), Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Bioprocess Engineering), Universität Hohenheim (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, FG Prozessanalytik und Getreidetechnologie) mit freundlicher Unterstützung von dem Max-Planck-Institut für Dynamik komple-

xer technischer Systeme (Bioprocess Engineering) und der Technische Universität Berlin (Institut für Technischen Umweltschutz, AG Umweltmikrobiologie).

Bei diesem Vorhaben handelt es sich um ein Begleitvorhaben zu dem ebenfalls durch das BMEL geförderten Vorhabens BiogasEnzyme (FKZ 22027707). Hierbei findet u.a. ein wissenschaftliches Monitoring von zehn landwirtschaftlichen Biogasanlagen über einen Zeitraum von knapp zwei Jahren hinweg statt. Diese Anlagen unterscheiden sich bezüglich des eingesetzten Substrats und ihrer Konstruktionsweise, wobei durch einen Kooperationsvertrag die Konstanz in der Substratzusammensetzung während des Monitorings gesichert ist. Im Rahmen dieses Monitorings findet eine genaue Analyse der Gärsubstrate, der Gasproduktion, der Reaktorchemie sowie aller verfahrenstechnischen Parameter statt.

Dieses Monitoringprogramm bietet eine einmalige Grundlage zur mikrobiologischen Charakterisierung der Systembiologie von Biogasanlagen, da normalerweise eine entsprechende Datensammlung für Praxis-Reaktoren nicht ohne einen erhöhten finanziellen Aufwand umzusetzen ist. Die Autoren danken daher dem Bundesministerium für Ernährung und Verbraucherschutz vielmals für die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsvorhabens sowie dem Projektträger Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) für die Projektbegleitung.

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen - Ermittlung der mikrobiellen Diversität sowie von hauptsächlichen verfahrenstechnischen Einflussfaktoren auf die Mikroflora

BIOGAS-BIOCOENOSIS

Teilvorhaben 1 - Mikrobiologisches Monitoring

Zuwendungsempfänger:

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB)

Förderkennzeichen:

22010711

Laufzeit:

01.11.2011 bis **31.10.2013**

Datum der Veröffentlichung: 29. August 2014

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

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

Autoren

Dr. Susanne Theuerl

Dr. Michael Klocke

Kontakt

Dr. Michael Klocke

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB)
Abt. Bioverfahrenstechnik – AG Mikrobielle Systemökologie

Max-Eyth-Allee 100
D-14469 Potsdam

www.atb-potsdam.de

Inhalt

I Hintergrund 12
I.1 Aufgabenstellung 12
I.2 Voraussetzungen 13
I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens 14
I.4 Stand der Wissenschaft und Technik 17
I.4.1 Energiewende und die Bedeutung der Biogasgewinnung 17
I.4.2 Der Biogasprozess aus mikrobiologischer Sicht 17
I.4.3 Methoden zur Erfassung und Interpretation der Systemmikrobiologie 18
I.4.4 Systemmikrobiologie von landwirtschaftlichen Biogasanlagen 20
I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 20
I.6 Zitierte Literatur 21

II Ergebnisse 23
II.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse 23
II.1.1 Kultivierungsunabhängige Charakterisierung der bakteriellen und archaeellen Biozönosen 23
II.1.2 Analyse der mikrobiellen Dynamik am Beispiel von Biogasanlage BGA 04 33
II.1.3 Analyse der mikrobiellen Dynamik am Beispiel von Biogasanlage BGA 03 41
II.1.4 Zusammenhang von Systemmikrobiologie und Reaktorleistung: Auswirkung von Prozessstörungen 45
II.1.5 Zitierte Literatur 48
II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises 49
II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit 49
II.4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse 49
II.4.1 Validierung der identifizierten Biomarker 49
II.4.2 Fortsetzung des mikrobiologischen Monitorings von landwirtschaftlichen Biogasanlagen 50
II.4.3 Erfassung der mikrobiologischen Ursachen für Prozessstörungen 51
II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 52
II.6 Veröffentlichungen 53
II.6.1 Tagungsbeiträge 53
II.6.2 Fachpublikationen 53

Verzeichnis der Abbildungen 54
Verzeichnis der Tabellen 55

I Hintergrund

I.1 Aufgabenstellung

In Biogasanlagen erfolgt der Aufschluss und Abbau von organischer Biomasse zu methanhaltigem Biogas durch komplexe, mikrobielle Lebensgemeinschaften (Biozönosen), deren Zusammensetzung und physiologisches Potential zur Stoffumwandlung in Abhängigkeit der abiotischen Umweltfaktoren (z. B. Betriebsweise der Biogasanlage, Substratverfügbarkeit, Reaktorchemie) variiert. Der Großteil der beteiligten Mikroorganismen ist bislang jedoch noch unbekannt, ebenso ihr Einfluss auf die Reaktoreffizienz.

In der wissenschaftlichen Literatur sind bislang nur sehr wenige Arbeiten verfügbar, die sich eingehend über einen längeren Zeitraum mit der Prozessmikrobiologie von landwirtschaftlichen Praxisbiogasanlagen befassen. Eine ganzheitliche Betrachtung sowohl der hydrolytischen und fermentativen Bakterien als auch der methanogenen Archaeen unter Berücksichtigung aller prozessrelevanten Parameter fehlt bislang. Das im Folgenden dargestellte Vorhaben BIOGAS-BIOCOENOSIS - Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen soll diese Lücke im Wissenstand schließen. Die Ermittlung besonders prozessrelevanter Organismengruppen wird als wesentliche Voraussetzung für die weitere Optimierung des Biogasanlagenbetriebes angesehen wie z. B. durch die möglichst optimale Einstellung der chemischen und verfahrenstechnischen Lebensbedingungen für die Mikroflora.

BIOGAS-BIOCOENOSIS wurde als Begleitvorhaben zu dem ebenfalls durch das BMEL geförderte Forschungsvorhaben BiogasEnzyme (FKZ 220027707) konzipiert. Gegenstand von BiogasEnzyme war u. a. ein regelmäßiges Monitoring von zehn landwirtschaftlichen Biogasanlagen über einen Zeitraum von ca. zwei Jahren hinweg. Die untersuchten Biogasanlagen unterschieden sich hinsichtlich der Konstruktionsweise sowie der eingesetzten Gärsubstrate. Während des Untersuchungszeitraums wurden die chemischen und verfahrenstechnischen Prozessparameter weitestgehend konstant gehalten und möglichst kontinuierlich erfasst.

Parallel zu dem physikalisch-chemischen Monitoring in BiogasEnzyme wurde in BIOGAS-BIOCOENOSIS eine Analyse der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften und ihrer Dynamiken durchgeführt. Ziel war die Ermittlung von hauptsächlichen verfahrenstechnisch-chemischen Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung der Mikroflora in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Diese Arbeiten wurden im Verbund der Partner Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (Koordination, Teilvorhaben 1), Universität Bielefeld (Teilvorhaben 2), Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Teilvorhaben 3) und Universität Hohenheim (Teilvorhaben 4) durchgeführt.

Im Teilvorhaben 1 erfolgte eine umfassende Inventarisierung der Bakterien und Achaeen durch Anwendung kultivierungsunabhängiger, DNA-basierter Analysemethoden. Zudem sollte durch eine eingehende bioinformatischen und biostatistische Auswertung der erhobenen Daten Zusammenhänge zwischen der Prozessmikrobiologie und

der Reaktorleistung ermittelt werden. Im Einzelnen sollten folgende wissenschaftliche Ziele erreicht werden:

(1) kultivierungsunabhängige Charakterisierung der bakteriellen und archaeellen Biozönosen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen;

(2) Analyse der Dynamiken innerhalb der mikrobiellen Lebensgemeinschaften;

(3) Ermittlung von hauptsächlichen Einflussfaktoren auf die Prozessmikrobiologie;

(4) Analyse des Einflusses von Struktur und Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft auf die Reaktorleistung (Abbaurate, Biogas- bzw. Methan-Bildung).

I.2 Voraussetzungen

Das Teilvorhaben 1 des Forschungsprojektes BIOGAS-BIOCOENOSIS wurde am Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) in der Abteilung Bioverfahrenstechnik durchgeführt. Für das Vorhaben waren die im Folgenden beschriebenen infrastrukturellen, organisatorischen und technischen Voraussetzungen gegeben.

Die Abteilung Bioverfahrenstechnik (Abteilungsleiter: Prof. Dr. B. Linke) bearbeitet schwerpunktmäßig Themen zu verfahrenstechnischen Grundlagen der Biokonversion, der Umweltbioverfahrenstechnik sowie der technischen Mikrobiologie. Insbesondere verfügt die Abteilung über langjährige Expertise auf dem Gebiet der Biogasforschung. Die Forschung der Abteilung Bioverfahrenstechnik ist eingebunden in die abteilungsübergreifende interdisziplinäre Forschungsstruktur des ATB insbesondere in das Forschungsprogramm *Stoffliche und energetische Nutzung von Biomasse*, dessen Ziel u. a. die Entwicklung effizienter Techniken und Verfahren zur Bereitstellung wirtschaftlicher Energieträger aus landwirtschaftlichen Roh- und Reststoffen ist.

Die AG Mikrobielle Systemökologie (Leitung: Dr. M. Klocke) bearbeitet Fragestellungen aus dem Bereich der angewandten Mikrobiologie, schwerpunktmäßig im Zusammenhang mit der Biogaserzeugung. Zu den Arbeitsschwerpunkten gehören die Charakterisierung komplexer mikrobieller Biozönosen in agrarbiotechnologischen Anwendungen mittels molekularer Ansätze, die Entwicklung von markergestützten Nachweisverfahren für bioverfahrenstechnisch relevante Mikroorganismen sowie die Isolierung, Kultivierung und eingehende Charakterisierung von prozessrelevanten anaeroben Bakterien und Archaeen. Eine Übersicht über Projekte und Fachpublikationen der AG ist unter folgender URL abrufbar:
http://www.atb-potsdam.de/institut/ueber-uns/mitarbeiterinnen/portrait/portrait/michael-klocke.html.

Das Vorhaben ist ein Begleitvorhaben zu dem ebenfalls durch das BMELV-geförderten Verbundvorhaben BiogasEnzyme (FKZ 220027707), in dessen Rahmen u. a. ein ausführliches und mehrjähriges Monitoring von zehn ausgewählten landwirtschaftlichen Biogasanlagen durchgeführt wurde. Das hierbei gesammelte Daten- und Probenmaterial bildete eine wesentliche Grundlage bei der Umsetzung des BIOGAS-BIOCOENOSIS-Projektes. Die Zusammenarbeit wurde auf Seiten des Verbunds BiogasEnzyme durch

das Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Abteilung Technikbewertung und Stoffkreisläufe (Dr. Monika Heiermann) koordiniert.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Monitoring-Programm für die Praxisbiogasanlagen aus dem Verbund-Vorhaben BiogasEnzyme (FKZ 220027707) wurde entsprechend der Anforderungen der mikrobiologischen Analyse modifiziert. Die Beprobung der ausgewählten Biogasanlagen und die Erhebung der verfahrenstechnisch-chemischen Parameter wurden auch weiterhin durch den Verbund BiogasEnzyme koordiniert.

Eine Übersicht über die zehn untersuchten landwirtschaftlichen Biogasanlagen wird in **Tabelle 1** gegeben. Der zeitliche Ablauf des Monitoring-Programms ist in **Abbildung 1** dargestellt.

Die Erfassung der Struktur, Variabilität und Dynamik der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in den Gärresten der ausgewählten Biogasanlagen erfolgte in erster Linie kultivierungsunabhängig auf Basis einer Sequenzanalyse des bakteriellen und archaeellen 16S rRNA Gens. Hierzu wurde in erster Linie ein molekulargenetisches „Fingerabdruck“-Verfahren (*terminal restriction fragment length polymorphism,* Abk. TRFLP) angewandt. Diese Methode ist relativ zeit- und kostengünstig und bietet damit die Möglichkeit, einen vergleichsweise großen Probensatz zu untersuchen. Insbesondere Unterschiede zwischen und dynamische Veränderungen innerhalb mikrobieller Gemeinschaften lassen sich durch solche molekulargenetischen „Fingerabdrücke“ gut erfassen und verfolgen. Nachteil derartiger Techniken ist jedoch, dass eine genaue Identifizierung der Mitglieder einer Lebensgemeinschaft nicht bzw. nur bedingt möglich ist. Aus diesem Grund wurden ergänzend Sequenzbibliotheken des mikrobiellen 16S rRNA Gens erstellt. Mittels quantitativer „Real-Time“-PCR erfolgte zudem eine relative Quantifizierung ausgewählter Gruppen von Mikroorganismen (z. B. methanogener Archaeen)

In weiteren Teilvorhaben wurden ergänzende Arbeiten zu der mikrobiologischen Charakterisierung von Teilvorhaben 1 durchgeführt. In Teilvorhaben 2 (Universität Bielefeld) erfolgte eine umfassende taxonomische Inventarisierung der mikrobiellen Populationen durch Hochdurchsatz-Sequenzierung der Nukleotidsequenz für das bakterielle bzw. archaeelle 16S rRNA Gen. In Teilvorhaben 3 (Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) wurden die hauptsächlich hydrolytisch- bzw. methanogen-aktiven Mikroorganismen durch die Analyse des Metaproteoms ermittelt. In Teilvorhaben 4 (Universität Hohenheim) sollte eine dezidierte, tiefgehende, biostatistische Auswertung der chemischen und physikalischen Prozessdaten und deren Korrelation mit den mikrobiologischen Daten erfolgen.

Tabelle 1: Charakteristika der zehn in dieser Studie untersuchten Biogasanlagen

Biogas-	Vefahrenstechnik				Einsatzstoffmix			Temperatur-	Raumbe-	Verweil-
anlage	Fementer	Anzahl	Typ	Größe [m³]	Kosubstrate	Anteil [%]	Gesamt [t_{FM}/a]	bereich	lastung HF [kg_{oTM}/(m³·d)]	zeit HF [d]
01	Haupt-	2	CSTR	1.000	Mais	85	10.000	mesophil	4,1	76
	Nach-	1	CSTR	1.300	Sorghum	15				
	Endlager	2	CSTR	1.800						
02	Hydrolyse-	1	Ring in Ring	500	Mais	65	10.400	mesophil	5,1	42
	Haupt-	1	CSTR	1.130	Rindergülle	35				
	Endlager	1	CSTR	2.677						
03	Haupt-	1	Plug Flow	270	Mais	35	6.200	mesophil	13,1	15
	Nach-	1	CSTR	370	Gras	10				
	Endlager	1	CSTR	2.000	Grünroggen	10				
					Ferkelmist	5				
					Rindergülle	40				
04	Haupt-	2	CSTR	1.500	Mais	55	12.800	mesophil	2,7	43
	Endlager	1	CSTR	1.500	Grünroggen	10				
					Rindermist	15				
					Rindergülle	20				
05	Haupt-	2	Plug Flow	325	Mais	80	11.200	thermophil	14,6	21
	Nach-	1	CSTR	1.600	HTK	20				
	Endlager	1	CSTR	2.250						
06	Haupt-	1	Plug Flow	270	Mais	99	3.700	mesophil	8,9	36
	Methanstufe	1	CSTR	1.065	Gerstenkorn	1				
	Nach-	1	CSTR	370						
	Endlager	1	CSTR	2.000						
07	Haupt-	1	CSTR	1.750	Mais	45	10.900	mesophil	3,9	59
	Nach-	1	CSTR	1.750	Grünroggen	5				
	Endlager	1	CSTR	4.400	Rindermist	10				
					Rindergülle	40				
08	Haupt-	1	CSTR	1.750	Mais	54	14.200	mesophil	5,0	45
	Nach-	1	CSTR	2.100	Grünroggen	10				
	Endlager	1	CSTR	3.880	Gras	1				
					Rindermist	5				
					Rindergülle	30				
09	Haupt-	1	CSTR	2.280	Mais	45	11.800	mesophil	3,3	71
	Endlager	1	CSTR	3.470	HTK	20				
					Gülle	35				
10	Haupt-	1	CSTR	1.400	Mais	50	6.900	mesophil	2,9	74
	Endlager	1	CSTR	3.380	Gras	10				
					Mischgülle	40				

CSTR… Volldurchmischter Rührkessel Plug Flow… Pfropfenstrom-Fermenter HF… Hauptfermenter

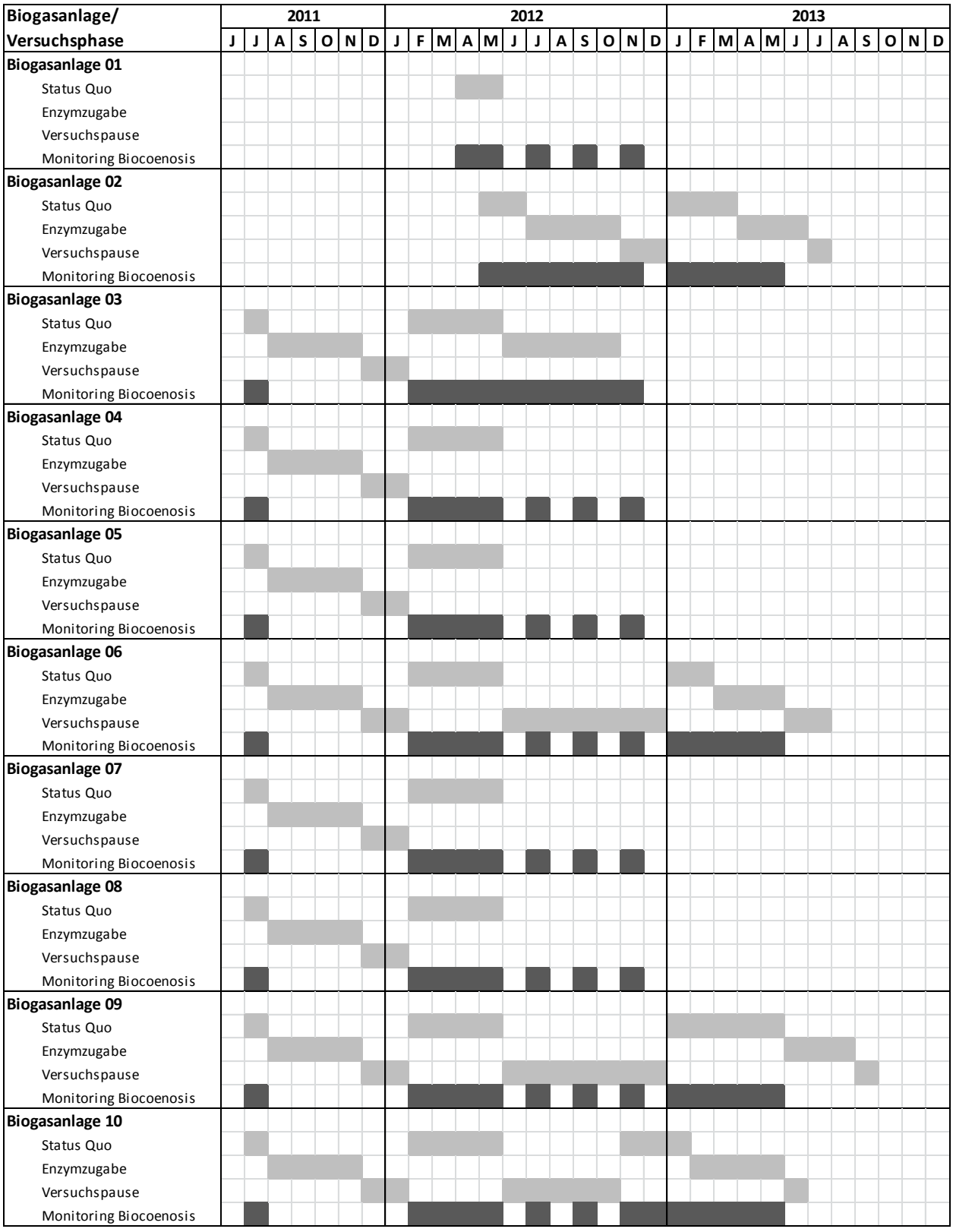


Abbildung 1: Versuchsdurchführung im Verbundprojekt BiogasEnzyme sowie Monitoring für das Forschungsvorhaben BIOGAS-BIOCONOSIS.

I.4 Stand der Wissenschaft und Technik

I.4.1 Energiewende und die Bedeutung der Biogasgewinnung

Der Energiebedarf der heutigen Gesellschaft ist enorm. Mit dem im September 2011 von der Bundesregierung beschlossenen beschleunigten Atomausstieg bis 2022 steht Deutschland vor einer großen Herausforderung: der Sicherstellung einer zuverlässigen, wirtschaftlichen und umweltschonenden Energieversorgung. In diesem Zusammenhang gilt die Produktion von energiereichem, methanhaltigem Biogas als eine zukunftsweisende, alternative, dezentrale und umweltfreundliche Methode zur Energiegewinnung. Gegenwärtig werden in Deutschland mehr als 7.500 Biogasanlagen mit einer elektrischen Gesamtleistung von mehr als 3.300 MW betrieben (FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE 2013). Die Stromerzeugung aus Biogas entsprach 2012 etwa 4,1 % des Gesamtstromverbrauchs in Deutschland (BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT 2013).

Für die Biogasgewinnung lässt sich eine Vielzahl organischer Substrate verwenden. Eine Publikation der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (2013) verweist auf nachwachsende Rohstoffe (54 %) und Wirtschaftsdünger wie Rinder- und Schweinegülle oder Geflügelmist (41 %) als hauptsächlich eingesetzte Gärsubstrate in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Unter den nachwachsenden Rohstoffen zählen Mais und Rübe aufgrund ihrer hohen Flächen- und Biogasertragseffizienz zu den bedeutendsten Substraten. Neben den Gärsubstraten spielen jedoch auch verfahrenstechnische Größen wie beispielsweise die Reaktorkonstruktion (Rührkessel- oder Propfenstromreaktor, Anzahl der Prozessphasen) und die Prozessführung (Art der Beschickung, Prozesstemperatur) für die Prozesseffizienz eine entscheidende Rolle.

I.4.2 Der Biogasprozess aus mikrobiologischer Sicht

Biogas ist ein Produkt des anaeroben mikrobiellen Abbaus organischer Biomasse, wobei die beteiligten Mikroorganismen über ein enormes Spektrum an physiologischen Fähigkeiten verfügen (TALBOT *et al.* 2008, WARD *et al.* 2008, NELSON *et al.* 2011). Der Prozess der Biogaserzeugung lässt sich in vier aufeinander folgende und voneinander abhängige Phasen unterteilen: (1) die Hydrolyse der makromolekularen Inhaltsstoffe (Kohlenhydrate, Fette, Eiweiße) zu Mono-, Di- und Oligomeren, (2) die Acidogenese, in der die Hydrolyseprodukte zu kurzkettigen Fettsäuren und Alkoholen umgesetzt werden, (3) der Acetogenese, bei der im Zuge der sekundären Vergärung Acetat, Kohlendioxid (CO_2) und Wasserstoff (H_2) entstehen, und (4) der Methanogenese, in der die Produkte der Acetogenese in Methan umgewandelt werden.

Die ersten drei Schritte der Biomassetransformation werde von Vertretern der Domäne *Bacteria* durchgeführt, wobei die Phyla (Abteilungen) *Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria* and *Cloriflexi* am häufigsten vertreten sind (NELSON *et al.* 2011). Der letzte Schritt in der Abbaukette wird ausschließlich von zwei Gruppen methanogener Ar-

chaeen ausgeführt, die Methan entweder direkt aus Acetat (acetoklatischer Weg) oder aus CO_2 und H_2 (hydrogenotropher Weg) produzieren.

Der anaerobe Abbau von Biomasse ist ein sehr empfindlicher Prozess. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die am Biogasprozess beteiligten Mikroorganismen z. T. hochsensibel auf bestimmte Prozessbedingungen reagieren (CHEN *et al.* 2007, WARD *et al.* 2008). Eine Störung in einem Teil der Prozesskette (z. B. die Produktion von prozessungünstigen Fettsäuren, zu hohe Anteile an Ammonium-Stickstoff oder Schwefelwasserstoff oder ein Mangel an Spurenelementen) kann den gesamten Prozess zum Erliegen bringen. Dies kann vor allem im Praxismaßstab drastische ökonomische Folgen haben (WEILAND 2010, NELSON *et al.* 2011).

Für einen stabilen Biogasprozess, d. h. für eine effiziente Ausbeute an Biogas mit möglichst hohem Methananteil ist demzufolge eine ausgeglichene Zusammensetzung der mikrobiellen Population von zentraler Bedeutung. Die mikrobielle Gemeinschaft sollte in sich stabil sein, aber variabel genug, um sich an Umweltschwankungen anpassen zu können und so mögliche Prozessstörungen zu kompensieren.

I.4.3 Methoden zur Erfassung und Interpretation der Systemmikrobiologie

Klassische mikrobiologische Techniken zur Analyse mikrobieller Biozönosen setzten zwingend das Vorliegen von Reinkulturen voraus, die es ermöglichen, die beteiligten Mikroorganismen auf Zellebene und hinsichtlich ihrer Stoffwechseleigenschaften zu charakterisieren. Damit im Zusammenhang stehen jedoch auch eine Reihe von Schwierigkeiten. Jede Art setzt die Entwicklung eines optimierten, selektiven Kulturmediums voraus. Mikroorganismen aus anaeroben Habitaten erfordern spezielle Kultivierungstechniken, u. a. eine anoxische Umgebung, da für die meisten von ihnen die Anwesenheit von Sauerstoff toxisch oder inhibierend ist. Durch die Auswahl der Kultivierungsbedingungen findet zudem immer eine Selektion von nur sehr wenigen Mitgliedern der mikrobiellen Lebensgemeinschaft statt, so dass nie die Gesamtheit erfasst werden kann. Des Weiteren finden sich insbesondere in Biogasanlagen obligate synthrophe Lebensgemeinschaften, die nicht als einzelne Reinkulturen isolierbar sind, da die beteiligten Mikroorganismen strikt auf ihren Synthrophiepartner angewiesen sind.

Obwohl kultivierungsbasierte Analysemethoden die eingehende physiologische Charakterisierung von Arten ermöglichen und somit wichtige Informationen über die Funktion der Mikroorganismen im Biogasprozess geben, so sind sie doch auch sehr arbeits- und zeitaufwendig. Für die Erfassung, Identifizierung und Quantifizierung von Struktur und Funktion mikrobieller Lebensgemeinschaften sind daher in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von kultivierungsunabhängigen Methoden entwickelt worden, die auf der direkten Extraktion von Indikatormolekülen wie z. B. Nukleinsäuren aus Umweltproben basieren (BRUNS & BUCKLEY 2002, OGRAM & SHARMA 2002). Durch die Nutzung solcher molekularbiologischer Techniken wurde es möglich, die räumliche und zeitliche Anordnung der Mikroorganismen sowie deren phylogenetischen Beziehungen zueinander zu verstehen und biochemische Prozesse mit den daran beteiligten Mikroorganismen in

Verbindung zu bringen. Die meisten Untersuchungen basieren auf der direkten Extraktion der Nukleinsäuren (DNA und/oder RNA) aus Umweltproben mit anschließender Vervielfältigung der Gens für die 16S rRNA (als Bestandteil der Ribosomen in jeder Zelle vorhaben). Der Amplifizierung spezifischer DNA- und/oder RNA-Sequenzen folgen bei vielen Biodiversitätsstudien die Erstellung von Sequenzbibliotheken mittels des Klonierungsverfahrens und die Analyse dieser mittels vergleichender Sequenzanalyse. Im Vergleich zum Klonierungs-/Sequenzierungsverfahren bieten sog. *Fingerprinting*-Techniken wie das TRFLP-Verfahren (*terminal restriction fragment length polymorphism*) eine zeit- und kostengünstigere Alternative (LIU *et al.* 1997, OSBORN *et al.* 2000). Diese Technik beruht darauf, dass ausgehend von einer DNA-Probe mittels PCR und nachfolgendem Restriktionsverdau eine Anzahl verschieden langer DNA-Fragmente (TRFs) entstehen, welche jeweils für eine bestimmte Gruppe von Mikroorganismen repräsentativ sind. Auch ohne unmittelbare Kenntnis darüber, von welcher Gruppe das jeweilige DNA-Fragment stammt, lassen sich doch Unterschiede und Veränderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft sehr gut untersuchen. Zudem bieten derartige *Fingerprinting*-Techniken die Möglichkeit einer Vielzahl von Proben zu untersuchen, was vor allem für Studien der zeitlich-dynamischen Veränderung einer Lebensgemeinschaft vorteilhaft ist. In den meisten Forschungsarbeiten werden jedoch mehrere Techniken parallel angewandt, da jede für sich ihre eigene vorteilhafte Aussagekraft hat und eine Kombination mögliche methodische Defizite ausgleicht (sog. polyphasischer Ansatz).

Um den Einfluss und die Auswirkung spezifischer Prozessparameter auf die mikrobielle Gemeinschaft zu ermitteln, können verschiedene aus der Ökologie bekannte Indizes ermittelt werden. Der Jaccard-Index erfasst die Ähnlichkeit zwischen zwei Proben basierend auf der An- bzw. Abwesenheit von Arten bzw. deren Indikatoren (z. B. TRFs) und kann somit als Maß für dynamische Veränderung in einer gegebenen Gemeinschaft angesehen werden (MARZORATI *et al.* 2008, PYCKE *et al.* 2011). Des Weiteren können Lorenz-Kurven und der sich daraus ableitende Gini-Index als Maß für die Gleichmäßigkeit der Verteilung der Gemeinschaftsmitglieder berechnet werden (VERSTRAETE *et al.* 2007, MARZORATI *et al.* 2008, WITTEBOLLE *et al*. 2009). Die Lorenz-Kurve visualisiert dabei die Disparität der Gemeinschaft verglichen mit einer angenommenen idealen Gleichverteilung (*perfect evenness*) aller vorhandenen Arten/TRFs. Der Gini-Index ergibt sich aus der Berechnung der normalisierten Fläche zwischen der Linie der perfekten Gleichverteilung und der Lorenz-Kurve. Aus ökologischer Sicht betrachtet heißt das: je höher der Gini-Index, desto ungleichmäßiger verteilt sind die Gemeinschaftsmitglieder bezüglich ihrer Anzahl sowie ihrer Abundanz. Mit Hilfe der sog. Indikatorartenanalyse (*indicator species analysis*, ISA) (DUFRÊNE & LEGENDRE 1997) lassen sich zudem für bestimmte bzw. besondere Prozessbedingungen repräsentative (Indikator-) Arten/TRFs identifizieren, die möglicherweise eine „Schlüssel"-Funktion ausüben. Ferner lassen sich mit der Berechnung von Korrelationskoeffizienten innerhalb und zwischen den verfahrenstechnisch-chemischen und mikrobiologischen Daten ebenfalls interessante Zusammenhänge herausfiltern.

I.4.4 Systemmikrobiologie von landwirtschaftlichen Biogasanlagen

Die meisten Studien zur Rolle der Mikroorganismen im Biogasprozess basieren auf Modellen im Labormaßstab (z. B. KLOCKE *et al.* 2007, ROY *et al.* 2009, WANG *et al.* 2010, CARBALLA *et al.* 2011). Grundsätzlich steht jedoch bei Modellen im Labormaßstab immer die Frage im Raum, in wie weit die Ergebnisse auf Praxisanlagen übertragbar sind. So konnte im Rahmen einer Studie gezeigt werden, dass die Mikrobiologie einer Praxisanlage deutliche Unterschiede zu dem vorangegangenen Labormodell aufwies (KLOCKE *et al.* 2008). Dies zeigt deutlich die Notwendigkeit, die Prozessmikrobiologie in Praxisbiogasanalgen eingehender zu untersuchen. Wie bereits erwähnt, finden sich in der wissenschaftlichen Literatur nur wenige Arbeiten zu dieser Thematik (z. B. NETTMANN *et al.* 2010, PYCKE *et al.* 2011, REGUEIRO *et al.* 2012). Aus diesen vorliegenden Studien geht u. a. hervor, dass die Biogasproduktion in landwirtschaftlichen Biogasanlagen vorwiegend über den hydrogenotrophen Stoffwechselweg erfolgt, wobei u. a. REGUEIRO *et al.* (2012) darauf hinweisen, dass das verstärkte Vorkommen der archaeellen Gattung *Methanosaeta*, die Methan strikt über den acetoklastischen Stoffwechselweg produzieren, auf eine gute Prozesseffizienz hinweisen könnte. Aus den vorliegenden Arbeiten lassen sich jedoch nur schwer allgemeingültige Hypothesen oder prozessrelevante mikrobiologische Indikatoren ableiten, da die vorliegenden Arbeiten entweder nur eine der beiden prozessrelevanten Organismengruppen untersucht hat (NETTMANN *et al.* 2010) oder aber ein Abgleich der Prozessmikrobiologie mit den verfahrenstechnisch-chemischen Daten (PYCKE *et al.* 2011) bzw. ein Langzeitmonitoring (REGUEIRO *et al.* 2012) fehlt.

Aufgrund der aktuellen gesellschaftspolitischen Entwicklung sowie der dargestellten wissenschaftlichen Arbeiten in diesem Bereich zeigt sich deutlich der dringende Bedarf für weiterführende Grundlagenforschung in diesem Sektor. Beim anaeroben Abbau von Biomasse zu energiereichem, methanhaltigem Biogas ist die mikrobielle Biozönose von entscheidender Bedeutung. Struktur und Zustand („Gesundheit“) der Biozönose spielen eine entscheidende Rolle beim Gasertrag und der Gasqualität und sind somit wesentlich für die wirtschaftliche Rentabilität von landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Das Hauptziel des hier dargestellten Forschungsvorhabens ist die Gewinnung eingehender Kenntnisse zur Prozessmikrobiologie landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Es sollen hauptsächliche Einflussfaktoren auf die Systemmikrobiologie ermittelt werden als Grundlage für zukünftige mikrobiologische Steuerungskonzepte, durch die eine möglichst optimale Einstellung der chemischen und verfahrenstechnischen Lebensbedingungen für die Mikroflora gewährleistet werden kann.

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Verbundvorhaben wurde mit folgenden Partnern durchgeführt:

(1) Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie (CeBiTec), Institut für Genomforschung und Systembiologie, Genomforschung Industrieller Mikroorganismen (Dr. Andreas Schlüter, Prof. Dr. Alfred Pühler): Teilvorhaben 2 - Ermittlung der

Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaften mittels 16S-rDNA-Amplicon-Sequenzierung (FKZ 22028711)

(2) Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Institut für Verfahrenstechnik, Lehrstuhl für Bioprozesstechnik (Dr. Dirk Benndorf, Prof. Dr. Udo Reichl): Teilvorhaben 3 - Ermittlung der hauptsächlich hydrolytisch- bzw. methanogen-aktiven Mikroorganismen durch Analyse des Metaproteoms (FKZ 22028811)

(3) Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, FG Prozessanalytik und Getreidetechnologie (Prof. Dr. Bernd Hitzmann): Teilvorhaben 4 - Bioinformatische und biostatistische Korrelation der Prozessmikrobiologie mit den verfahrenstechnisch-chemischen Prozessdaten (FKZ 22028911).

Das Vorhaben ist ein Begleitvorhaben zu dem ebenfalls durch das BMELV geförderten Verbundvorhaben BiogasEnzyme (FKZ 220027707). Die Zusammenarbeit wurde auf Seiten des Verbunds BiogasEnzyme durch das Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Abt. Technikbewertung und Stoffkreisläufe (Dr. Monika Heiermann) koordiniert.

Die Ergebnisse der Verbundpartner sowie des Forschungsverbundes BiogasEnzyme werden in gesonderten Schlussberichten dargestellt.

I.6 Zitierte Literatur

BRUNS M.A., BUCKLEY D.H. (2002): Isolation and purification of microbial community nucleic acids from environmental samples. In: HURST C.J., CRAWFORD R.L., KNUDSEN G.R., MC INERNEY M.J., STETZENBACH L.D. (Eds.): Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington, DC., USA, S. 564-572

BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT (2013): Erneuerbare Energie in Zahlen. Eigenverlag, 1. Auflage

CARBALLA M., SMIT M., ETCHEBEHERE C., BOON N., VERSTRATE W. (2011): Correlation between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic digestors. Appl Microbiol Biotechnol 89: 303-314

CHEN Y., CHENG J.J., CREAMER K.S. (2007): Inhibition of anaerobic digestion process: A review. Bioresour Technol 99: 4044-4064

DUFRÊNE M., LEGENDRE P. (1997): Species assemblges and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. Ecol Monogr 67: 345-366

FACHAGENTUR FÜR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE (2013): Informationsbroschüre Biogas. Eigenverlag, 9. Auflage

KLOCKE M., MÄHNERT P., MUNDT K., SOUIDI K., LINKE B. (2007): Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodde beet silage as mono-substrate. Syst Appl Microbiol 30: 139-151

KLOCKE M., NETTMANN E., BERGMANN I., MUNDT K., SOUIDI K., MUMME J., LINKE B. (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. Syst Appl Microbiol 31: 190-205

MARZORATI M., WITTEBOLLE L., BOON N., DAFFONCHIO D., VERSTRAETE W. (2008): How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. Environ Microbiol 10: 1571-1581

NELSON M.C., MORRISON M., ZHONGTANG Y. (2011): A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. Bioresour Technol 102: 3730-3739

NETTMANN E., BERGMANN I., PRAMSCHÜFER S., MUNDT K., PLOGSTIES V., HERRMANN C., KLOCKE M. (2010): Polyphasic analyses of methanogeneic archaeal communities in agricultural biogas plants. Appl Environ Microbiol 76: 2540-2548

OGRAM A., SHARMA K. (2002): Methods of soil microbial community analysis. In: HURST C.J., CRAWFORD R.L., KNUDSEN G.R., MCINERNEY M.J., STETZENBACH L.D. (Eds.): Manual of Environmental Microbiology, 2nd edition, ASM Press, Washington, DC, USA, S. 554-563

PYCKE B.F.G., ETCHEBEHERE C., VAN DE CAVEYE P., NEGRONI A., VERSTRAETE W., BOON N. (2011): A time-course analysis of four full-scale anaerobic digesters in relation to the dynamics of change of their microbial communities. Water Sci Technol 63: 769-775

REGUEIRO L., VEIGA P., FIGUEROA M., ALONSO-GUTIERREZ J., STAMS A.J.M., LEMA J.M., CARBALLA M. (2012): Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. Microbiol Res 167: 581-589

ROY C.S., TALBOT G., TOPP E., BEAULIEU C., PALIN M.F., MASSÉ D.I. (2009): Bacterial community dynamics in an anaerobic plug-flow type reactor treating swine manure. Water Res 43: 21-32

TALBOT G., TOPP E., PALIN M.F., MASSÉ D.I. (2008): Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic reactors. Water Res 42: 513-537

WANG H., TOLVANEN K., LEHTOMÄKI A., PUHAKKA J., RINTALA J. (2010): Microbial community structure in anaerobic co-digestion of grass silage and cow manure in a laoboratory continuously stirred tank reactor. Biodegradation 21: 135-146

WARD A.J., HOBBS P.J., HOLLIMAN P.J., JONES D.L. (2008): Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. Bioresour Technol 99: 7928-7940

WEILAND P. (2010): Biogas production: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 85: 849-860

WITTEBOLLE L., MARZORATI M., CLEMENT L., BALLOI A., DAFFONCHIO D,. HEYLEN K., DE VOS P., VERSTRAETE W., BOON N. (2009): Initial community evenness favours functionality under selective stress. Nature 458: 623-626

II Ergebnisse

II.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

II.1.1 Kultivierungsunabhängige Charakterisierung der bakteriellen und archaeellen Biozönosen

Untersucht werden sollten zehn Praxisbiogasanlagen (BGA), die sich hinsichtlich ihrer Konstruktionsweise, der Substratbeschickung sowie ihrer Prozessführung unterschieden. In **Tabelle 2** findet sich ein zusammenfassender Überblick zu den wichtigsten betriebstechnischen und chemischen Anlagendaten.

Von den zehn ausgewählten Biogasanlagen konnten abschließend neun Anlagen ausgewertet werden. Aufgrund eines defekten Blockheizkraftwerks (BHKW) bei Anlage 01 und der damit unterbliebenen Aufzeichnung wesentlicher Prozessparameter (u. a. der produzierten Gasmenge und der Gaszusammensetzung), die für die Verifizierung der Prozesseffizienz jedoch entscheidend sind, wurde diese Anlage bei allen folgenden Analysen nicht berücksichtigt. Ein Vergleich der verbliebenden neun Praxisanlagen wurde für zwei Zeitpunkte (KW 30, 2011 = *status quo* vor Versuchsreihe 1 und KW 19, 2012 = *status quo* vor Versuchsreihe 2 des Monitoringprogramms von BiogasEnzyme) durchgeführt. Untersucht wurden jeweils die Hauptfermenter der Anlagen, wobei von drei Anlagen jeweils zwei Fermenter analysiert wurden (BGA 02: Hydrolyse- und Hauptfermenter, BGA 05: zwei parallel betriebene Hauptfermenter, BGA 06: Hauptfermenter und sog. „Methanstufe“).

Aus tiefgefrorenem Probenmaterial wurde die Gesamt-DNA mit dem PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories Inc., USA) extrahiert. Unter Verwendung der DNA-Präparationen wurde in getrennten Ansätzen das bakterielle und das archaeelle Gen für die 16S rRNA (*rrs*) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach dem Protokoll von RADEMACHER *et al.* (2012) vervielfältigt. Die fluoreszenz-markierten PCR-Produkte wurden mit einem (oder mehreren) Restriktionsenzym(en) geschnitten, so dass je nach Erkennungsschnittstelle innerhalb des Gens für die 16S rRNA unterschiedlich lange Fragmente entstanden, die anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und detektiert wurden. Jedes erfasste DNA-Fragment symbolisiert eine Art bzw. eine Gruppe von Mikroorganismen, wodurch sich diese Methode zur Erfassung der strukturellen Diversität einer Lebensgemeinschaft eignet (LIU *et al.* 1997). Als Endresultat erhält man ein für die Lebensgemeinschaft charakteristisches Elektropherogramm (= Profil der Restriktionsfragmente), in dem die Fragmente entsprechend ihrer Basenpaar-Größe und ihrer Fluoreszenzintensität, welche die relative Häufigkeit des erfassten Fragments definiert, sichtbar sind. Die Elektropherogramme wurden mit Hilfe des Software-Paketes BioNumerics 7.1 (Applied Math, Belgien) ausgewertet.

Die gewonnenen Daten wurden dann zum einem für eine hierarchische Clusteranalyse unter Anwendung des UPGMA-Models mit euklidischer Distanz (UPGMA = *unweighted pair group method with arithmetic mean*) verwendet, zum anderen zur Berechnung der relativen Häufigkeitsverteilung der erfassten TRFs. Als Ergebnis der Clusteranalyse

stellen die Dendrogramme prozentuale Ähnlichkeiten zwischen den mikrobiellen Lebensgemeinschaften der verschieden Biogasanlagen dar, während die Häufigkeitsverteilungsdiagramme die strukturelle Zusammensetzung darstellen (**Abbildung 2**). Zur Verifizierung wesentlicher Einflussfaktoren auf die Prozessmikrobiologie wurden verschiedene Diversitätsindizes berechnet und ökologische Theorien angewandt, die hauptsächlich auf dem Prinzip des *microbial resource managments* (VERSTRAETE *et al.* 2007, MARZORATI *et al.* 2008, READ *et al.* 2011) sowie einer Indikatorartenanalyse (DUFRÊNE & LEGENDRE 1997) basierten.

Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften zum Zeitpunkt KW 30, 2011

Ein Teil der ausgewählten BGA (s. **Abbildung 2A**) konnten in KW 30, 2011 erstmalig für die mikrobiologische Analyse beprobt werden. Ziel war die Gewinnung grundlegender Informationen über die Zusammensetzung und Struktur der vorhandenen mikrobiellen Gemeinschaften.

Wie zu erwarten, zeigten die Bakteriengemeinschaften eine deutlich höhere Diversität als die Archaeengemeinschaften (Häufigkeitsverteilungsdiagramme in **Abbildung 2A** und **2B**). Im Gegensatz zu den archaeellen Biozönosen, wo jede Anlage ihre eigene spezifische Gemeinschaft zu haben scheint, zeigten die Bakteriengemeinschaften eine gemeinsame Kerngemeinschaft, wobei sich aber die relative Häufigkeit der Gemeinschaftsmitglieder zwischen den Anlagen unterschied. Des Weiteren scheint das Vorkommen einer speziellen Bakteriengemeinschaft nicht zwingend auch das Vorkommen einer spezifisch dazu gehörigen Archaeengemeinschaft zu bedingen. Vielmehr scheint jede mikrobielle Gemeinschaft spezifisch an ihr jeweiliges Substrat, die Reaktorkonstruktion sowie die Prozessführung angepasst zu sein. Hierzu im Folgenden zwei Beispiele.

(1) BGA 03 (Pfropfenstromreaktor mit Mais- und Grassilage, Grünroggen, Ferkelmist und Rindergülle als Gärsubstrate) und BGA 07 (Rührkesselreaktor mit Maissilage, Grünroggen, Rindergülle und Rindermist) zeigten deutliche Unterschiede in der Struktur der bakteriellen Biozönosen, jedoch sind die Archaeengemeinschaften in beiden Anlagen sehr ähnlich und jeweils dominiert durch das TRF-106bp. Für eine taxonomische Zuordnung dieses TRFs wurde die ARB-Silva-Datenbank herangezogen (QUAST *et al.* 2013). Alle in der Datenbank enthaltenen Sequenzen des Gens für die 16S rRNA wurden virtuell einer archaeellen TRFLP-Analyse unterzogen. Im Ergebnis entstand eine tabellarische Übersicht theoretisch zu erwartender DNA-Fragmente und ihrer taxonomischen Zuordnung. Nach Abgleich mit dieser Datenbank lässt sich TRF-106bp mit 78 %iger Wahrscheinlichkeit der Familie *Methanosaetaceae* (obligat acetoklastisch) zuordnen. Eine eindeutige Zuordnung ist jedoch nicht möglich, da der Abgleich mit der ARB-Silva-Datenbank auch eine Zuordnung dieses TRFs zur Familie der *Methanosacinaceae* (9 %), *Methanomicrobiaceae* (8 %) oder *Methanobacteriaceae* (2 %) zeigt. Zur Beurteilung dieser Ergebnisse müssen jedoch auch die in der BGA vorherrschenden Umweltbedingungen berücksichtigt werden. So sind kurze Verweilzeiten der Gär-

substrate im Reaktor (z. B. in BGA 03, vgl. **Tabelle 2**) für die Etablierung von *Methanosaeta* sp. aufgrund ihrer langsamen Wachstumsraten (0,08-0,7 d^{-1}) und der daraus resultierenden hohen Auswaschungsrate (DEMIREL & SCHERER 2008) grundsätzlich ungünstig.

(2) BGA 04 und BGA 08 (beides Rührkessel-Reaktoren betrieben mit Maissilage, Grünroggen, Rindermist und Rindergülle) wiesen im Unterschied zu vorgenanntem Beispiel ähnlich strukturierte Bakteriengemeinschaften auf, zeigten jedoch deutliche Unterschiede innerhalb ihrer Archaeengemeinschaften. Während in BGA 04 mixotrophe Vertreter der Ordnung *Methanosarcinales* (TRF-626bp) vorherrschend waren, konnte für BGA 08 eine deutliche Dominanz von hydrogenotrophen Methanogenen der Ordnung *Methanobacteriales* (TRF-340bp) nachgewiesen werden.

Tabelle 2: Wichtige verfahrenstechnisch-chemische Daten der ausgewählten Praxisanlagen. Alle angegebenen Daten sind Medianwerte bezogen auf die Zeiträume Juli 2011 sowie Februar bis Mai 2012. Hyd = Hydrolyse, HF = Hauptfermenter, MS = Maissilage, GS = Grassilage, RS = Roggenganzpflanzensilage, RG = Rindergülle, FM = Ferkelmist, RM = Rindermist, HTK = Hühnertrockenkot, GM = Güllemischung, RiR = Ring-in-Ring-Reaktor, CSTR = Rührkesselreaktor, PF = Propfenstromreaktor, E-Säure = Essigsäure, P-Säure = Propionsäure, nB = n-Buttersäure, iB = Iso-Buttersäure, nV = n-Valeriansäure, iV-Säure = Iso-Valeriansäure, H-Säure = Hexansäure, NH_4^+-N = Ammoniumstickstoff, nb = nicht bestimmt.

Prozessparameter		BGA02 Hyd	BGA02 HF		BGA03 HF	BGA04 HF	BGA05 HF1	BGA05 HF2	BGA06 HF	BGA06 MS	BGA07 HF	BGA08 HF	BGA09 HF	BGA10 HF
Substrat-beschickung		MS, GS, RS, RG			MS, GS, RS, RG, FM	MS, RS, RM, RG	MS, HTK		MS		MS, RS, RM, GM	MS, GS, RS,RM, RG	MS, GR, GM, HTK	MS, GS, GM
Reaktortyp		RiR	CSTR		PF	CSTR	PF	PF	PF	CSTR	CSTR	CSTR	CSTR	CSTR
Raumbelastung	[kg_{oTS} m^{-3} d^{-1}]	4,1			5,4	2,5	3,3		3,5		1,1	4,0	3,4	1,7
Verweilzeit	[d]	54			16	86	22		158		68	45	70	125
Biogasertrag	[m^3_N kg_{oTS}^{-1}]	0,56			0,70	nb	nb		0,97		nb	nb	0,81	nb
Gas pro Tag	[m^3 d^{-1}]	4392			2175	3866	6734		2784		4118	5938	6474	2634
Temperatur	[°C]	49	44		42	45	52	52	44	42	40	41	41	40
Leitfähigkeit	[mS cm^{-1}]	15	14		8	17	31	32	14	19	16	14	27	18
pH Wert	[-]	5,4	7,7		7,8	8,0	8,4	8,5	7,3	8,1	7,7	7,6	8,0	7,8
FOS/TAC	[-]	nd	0,3		0,3	0,1	0,7	0,6	1,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3
Gesamsäuren	[g l^{-1}]	17,4	1,0		1,4	0,1	7,8	9,8	9,2	0,2	1,0	0,02	0,3	0,09
E-Säure	[g l^{-1}]	9,5	0,8		1,3	0,1	4,3	5,3	4,5	0,2	0,8	0,02	0,3	0,09
P-Säure	[g l^{-1}]	1,6	0,2		0,06	0,0	1,9	2,4	2,4	0,0	0,1	0,0	0,01	0,0
nB-Säure	[g l^{-1}]	4,1	0,0		0,0	0,0	0,4	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
iB-Säure	[g l^{-1}]	0,3	0,0		0,01	0,0	0,5	0,6	0,5	0,0	0,02	0,0	0,0	0,0
nV-Säure	[g l^{-1}]	0,3	0,0		0,0	0,0	0,0	0,1	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
iV-Säure	[g l^{-1}]	1,7	0,0		0,06	0,0	0,8	1,0	0,8	0,0	0,01	0,0	0,0	0,0
H-Säure	[g l^{-1}]	0,0	0,0		0,005	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NH_4^+-N	[g l^{-1}]	2,0	2,1		1,9	2,4	5,4	5,4	2,4	2,8	2,1	2,0	5,2	3,3

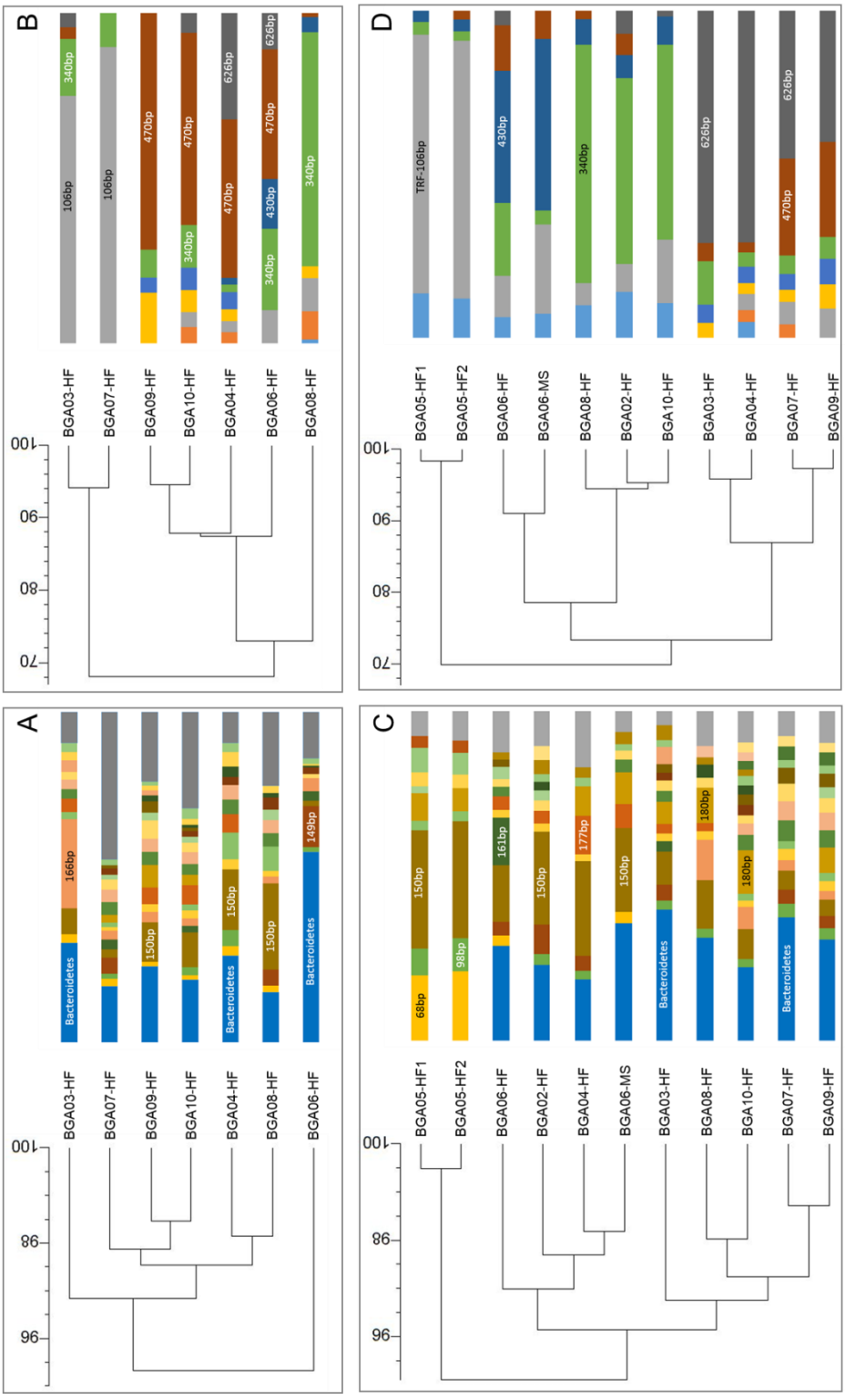


Abbildung 2: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaften in den untersuchten Biogasanlagen (BGA) auf Basis der ermittelten TRFLP-Profile für die Zeitpunkte KW 30, 2011 (A, B) und KW 19, 2012 (C, D). Bei der Analyse wurde zwischen den phylogenetischen Gruppen *Bacteria* (A, C) und *Archaea* (B, D) unterschieden. Dargestellt sind UPGMA-Clusteranalysen basierend auf der euklidischen Distanz (Baumdiagramme) bzw. die relativen Häufigkeiten der erfassten TRFs (Balkendiagramme). 2011 wurden ausschließlich die Hauptfermenter (HF) der Anlagen 03, 04 sowie 06-10 untersucht. 2012 wurden zusätzlich zwei parallel-betriebene HF von BGA 05 sowie die sog. „Methanstufe“ (MS) von BGA 06 beprobt. Bis auf BGA 05 (thermophile Prozesstemperatur, 52°C) wurden alle BGA mesophil bei Temperaturen zwischen 40 und 45°C betrieben.

Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften zum Zeitpunkt KW 19, 2012

Eine mikrobiologische Untersuchung aller Anlagen war aus versuchstechnischen Gründen erst ab 2012 möglich (vgl. **Abbildung 1**). Mit der wiederholten Analyse der ausgewählten Biogasanlagen in KW 19, 2012 konnten grundsätzlich die Ergebnisse der ersten Untersuchung bestätigt werden. So zeigten die Bakteriengemeinschaften in KW 19, 2012 ebenfalls eine deutlich höhere Diversität als die Archaeengemeinschaften, was sich zum einen in der Anzahl der erfassten TRFs und zum anderen in den ermittelten relativen Anteilen an Bakterien und Archaeen in der Gemeinschaft wiederspiegelte (**Tabelle 3**). Die höhere bakterielle Diversität ist grundsätzlich darauf zurück zu führen, dass die ersten drei Biomassetransformationsschritte (Hydrolyse, Acido- und Acetogenese) durch eine enorme Substratvielfalt geprägt sind. Das wiederum erfordert eine hohe Diversität an physiologischen Fähigkeiten und damit verbunden eine höhere Artendiversität. Im Gegensatz dazu haben die methanogenen Archaeen ein sehr enges, spezifisches Substratspektrum (Acetat oder CO_2/H_2).

Tabelle 3: Mikrobiologische Kenngrößen im Vergleich der untersuchten Anlagen. Abk. wie in **Tabelle 2**.

Anlage	Anzahl erfasster TRFs			Quantifizierung [%]		Gini-Index	
	Bacteria	Archaea	Summe	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea
BGA02-Hyd	19	nd	19	nb	nb	0,43	nb
BGA02-HF	18	6	24	99,6	0,4	0,56	0,44
BGA03-HF	21	5	26	99,8	0,2	0,36	0,57
BGA04-HF	18	7	25	97,8	2,2	0,43	0,61
BGA05-HF1	12	4	16	99,9	0,1	0,50	0,59
BGA05-HF2	12	5	17	99,9	0,1	0,54	0,65
BGA06-HF	20	6	26	99,7	0,3	0,44	0,33
BGA06-MS	15	5	20	97,6	2,4	0,45	0,47
BGA07-HF	22	7	29	91,5	8,5	0,33	0,51
BGA08-HF	21	5	26	99,4	0,6	0,36	0,56
BGA09-HF	24	6	30	96,4	3,6	0,27	0,39
BGA10-HF	26	5	31	99,8	0,2	0,33	0,50

Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft in einer thermophilen Biogasanlage

Bei einem Vergleich der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften zwischen den unterschiedlichen BGA zeigte sich, dass die Prozesstemperatur einen sehr wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung der Mikroflora hat. Die mikrobielle Gemeinschaft in der einzigen in dieser Studie untersuchten thermophil betriebenen (52°C) Anlage BGA 05 zeigte deutliche Unterschiede zu allen anderen, mesophil betriebenen Anlagen (**Abbildung 2C** und **2D**). Beide parallel betriebenen Hauptfermenter von BGA 05 wiesen die

geringste Anzahl erfasster TRFs auf (**Tabelle 3**). Zudem gab es in BGA 05 auf Bakterien-Ebene deutliche strukturelle Unterschiede, vor allem bezüglich der dominanten TRFs im Vergleich zu allen mesophil-betriebenen Anlagen. Dies ist deutlich erkennbar in **Tabelle 3** an den höheren Gini-Indizes (mit Ausnahme von BGA 02, die als ausgewiesene zweistufige Anlage gesondert betrachtet werden muss bzw. weiter unten separat betrachtet wird). Aus der Literatur ist bekannt, dass unter thermophilen Bedingungen Mitglieder der Bakterien-Abteilung *Bacteroidetes* (blauer Balken im Verteilungsdiagramm von **Abbildung 2C**) einen Konkurrenznachteil gegenüber den *Firmicutes* haben (z. B. RADEMACHER *et al.* 2012), was sich sehr deutlich in ihrer Abwesenheit (ggf. auch unter der Nachweisgrenze) zeigt (**Abbildung 2C**).

Eine Indikatorartenanalyse zeigt deutlich, dass sowohl das Vorkommen bestimmter TRFs als auch die Abundanz einem Selektionsdruck durch die Temperatur unterliegen. Indikatorwerte (*indicator values*, IV) von 100 zeigen das Vorkommen bestimmter TRFs (in diesem Fall TRF-260bp, TRF-466bp und TRF-520bp) an, die ausschließlich unter thermophilen Bedingungen gefunden wurden (**Tabelle 4**). Statistisch abgesicherte ($p < 0.05$) Indikatorwerte < 100 deuten auf einen Einfluss der betrachteten Prozessgröße auf die relative Abundanz und/oder die Frequenz (d. h. die Häufigkeit des Vorkommens der jeweiligen TRFs im gesamten Datensatz) hin. Als Beispiel sei hier auf TRF-150bp mit einem IV von 27 ($p = 0{,}0002$) hingewiesen, das in allen untersuchten Anlagen gefunden wurde, jedoch seine höchste Abundanz in BGA 05 zeigt (**Tabelle 4, Abbildung 2C**). Ähnliches zeigt sich auch für die Archaeengemeinschaft: TRF-106bp zeigt zwar keinen Indikatorwert von 100, jedoch ist seine Abundanz deutlich durch die Temperatur beeinflusst (**Tabelle 4, Abbildung 2D**).

Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft in mesophilen Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von Anlagen mit räumlicher Trennung der Abbauphasen

Im Vergleich zur thermophil betriebenen Anlage zeigen alle mesophil betriebenen Anlagen eine deutlich höhere Diversität, sowohl auf Bakterien- als auch auf Archaeen-Ebene (**Tabelle 3, Abbildung 2C-D**). Grundsätzlich lässt sich jedoch auch für den zweiten Vergleichszeitpunkt feststellen, dass das Vorkommen einer speziellen Bakteriengemeinschaft nicht auch das Vorkommen einer spezifisch dazu gehörigen Archaeengemeinschaft bedingt. Als Beispiel sei hier auf die Verwandtschaftsanalyse von BGA 03 und BGA 04 verwiesen, die zwar in unterschiedlichen Clustern hinsichtlich der Bakteriengemeinschaft vorzufinden sind, hinsichtlich der Archaeengemeinschaft aber im gleichen Cluster liegen (**Abbildung 2C-D**).

Bei Betrachtung der Organisationsstruktur (d. h. der (Un-) Gleichmäßigkeit der Verteilung der Gemeinschaftsmitglieder) zeigt sich deutlich, dass die einstufigen Reaktorsysteme (BGA 03, 04, 07-10) von den zweistufigen Systemen (BGA 02 und 06) zu unterscheiden sind. Die Begriffe „einstufig“ bzw. „zweistufig“ beziehen sich dabei auf die Anzahl der in die jeweilige Anlage intregrierten Fermenter. In den einstufigen Systemen (hierbei laufen alle vier Prozessphasen in einem Reaktorsystem ab) ist die Bakteriengemeinschaft deutlich gleichmäßiger organisiert als die Archaeengemeinschaft, wohin-

gegen in den zweistufigen Systemen (räumliche Trennung beiden Hauptphasen des Prozesses) die Verteilung innerhalb der jeweiligen Gemeinschaften etwas ungleichmäßiger ist (Vergleich der Gini-Indizes in **Tabelle 3**).

Wie bereits erwähnt werden zweistufige Systeme genutzt, um die beiden Hauptphasen des Prozesses (Hydrolyse und Methanogenese) voneinander zu trennen, so dass beide Phasen unter optimierten Bedingungen ablaufen können. Die Hydrolyse/ Fermentation läuft optimal bei leicht saurem pH-Wert ab, während die Methanogenese ein eher alkalisches Milieu bevorzugt. Die einzige offiziell ausgewiesene zweistufige Biogasanlage im ausgewählten Anlagenset war BGA 02 (**Tabelle 2**). BGA 06 besteht zwar auch aus zwei hinter-/nebeneinander geschalteten Fermentern (Hauptfermenter und sog. „Methanstoffe“), die jedoch hinsichtlich der Prozessführung nicht phasenspezifisch getrennt sind (**Tabelle 2**). Eine Indikatorartenanalyse bezogen auf die Gesamtsäurekonzentration zeigt deutlich, dass es in beiden Anlagen im ersten Fermenter (Hydrolysereaktor BGA 02 bzw. Hauptfermenter BGA 06) mit höherer Säurekonzentration (**Tabelle 2**) typische bakterielle Organismengruppen gibt (symbolisiert durch TRFs, vgl. **Tabelle 5**), die an die jeweils im Reaktor vorherrschenden Bedingungen angepasst sind.

Die beiden untersuchten zweistufigen Anlagen unterschieden sich nicht nur hinsichtlich ihres Gesamtsäuregehaltes (BGA 02 Hyd: 17,44 g l^{-1}, BGA 06 HF: 9,16 g l^{-1}), sondern auch bezüglich ihres Säurespektrums. Während in der Hydrolysestufe von BGA 02 hauptsächlich Essig- und Buttersäure gebildet wurden, produzierten die Bakterien im Hauptfermenter von BGA 06 vorwiegend Essig- und Propionsäure (**Tabelle 2**). Das könnte erklären, warum in beiden Anlagen unterschiedliche TRFs gefunden worden sind, deren Vorkommen und Abundanz wesentlich durch die produzierten Säuren beeinflusst werden. Diese Unterschiede könnten wiederum im Zusammenhang mit der Substratbestückung oder aber auch mit der Reaktorkonstruktion und der betriebstechnischen Anlagenführung stehen (vgl. **Tabelle 2**).

Beim Vergleich der Säurespektren aller Anlagen fällt auf, dass alle drei Anlagen mit Propfenstromreaktor (BGA 03, 05 und 06) unabhängig von der Substratbestückung oder der Prozesstemperatur ein breiteres Säurespektrum aufwiesen als die Anlagen mit Rührkesselreaktoren (**Tabelle 2**). Beim Vergleich von BGA 03 und BGA 06 zeigt sich zudem, dass möglicherweise die Co-Fermentation von mehreren verschiedenen Substraten einen positive Effekt auf die Prozesseffizienz bzw. -stabilität haben kann, denn die Gesamtsäurekonzentration sowie das Säurespektrum in BGA 03 ist deutlich geringer als in BGA 06, die ausschließlich Maissilage verwertet.

Tabelle 4: Einfluss und Auswirkung einer thermophilen Prozessführung auf die Struktur der Prozessmikrobiologie. Dargestellt sind ausgewählte bakterielle und archaeelle TRFs, deren Indikatorwerte (IV) bezogen auf eine Prozesstemperatur von 52°C sowie die relative Häufigkeitsverteilung der ausgewählten TRFs im Vergleich aller Anlagen. Fett markiert sind die Ergebnisse der Analyse der einzigen thermophil-betriebenen Anlage BGA 05. TRF = terminales Restriktionsfragment, bp = Basenpaare, IV = Indikatorwert (*indicator value*), *p* value = Wert für die statistische Signifikanz, BGA = Biogasanlage, Hyd = Hydrolysereaktor, HF = Hauptfermenter, nd = nicht detektiert.

Organismengruppe	TRF [bp]	Temp: 52 °C IV	Temp: 52 °C p value	BGA02 Hyd	BGA02 HF	BGA03 HF	BGA04 HF	**BGA05 HF1**	**BGA05 HF2**	BGA06 HF	BGA06 MS	BGA07 HF	BGA08 HF	BGA09 HF	BGA10 HF
Bacteria	68	87	0,0002	0,0	0,0	0,0	0,0	**20,5**	**21,1**	3,2	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	98	45	0,0002	0,0	3,4	2,8	2,6	**8,4**	**10,2**	0,0	0,0	4,0	2,6	3,3	2,4
	150	27	0,0002	12,3	28,3	10,1	28,8	**37,2**	**35,8**	17,7	24,8	5,6	14,7	4,8	9,1
	168	49	0,0002	0,0	0,0	0,0	0,0	**3,0**	**3,1**	0,0	0,0	2,3	0,0	2,4	2,0
	260	100	0,0002	0,0	0,0	0,0	0,0	**4,3**	**4,1**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	368	33	0,0022	0,0	0,0	0,0	0,0	**0,0**	**1,4**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	373	41	0,0002	0,0	2,3	2,2	2,6	**7,8**	**6,8**	0,0	2,0	2,2	0,0	2,4	2,7
	466	100	0,0002	0,0	0,0	0,0	0,0	**3,7**	**3,7**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	520	100	0,0002	0,0	0,0	0,0	0,0	**2,7**	**2,5**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	569	79	0,0002	0,0	0,0	0,0	0,0	**2,8**	**2,9**	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Archaea	106	59	0,0002	nd	8,6	0,0	4,8	**81,4**	**77,9**	12,7	27,3	6,8	6,5	8,9	19,1

Tabelle 5: Einfluss und Auswirkung der Gesamtsäurekonzentration auf die Struktur der Prozessmikrobiologie im Vergleich der Anlagen BGA 02 und BGA 06. Dargestellt sind ausgewählte bakterielle terminale Restriktionsfragmente (TRFs), deren Indikatorwerte (IV) bezogen auf die Gesamtsäurekonzentration im Hydrolysereaktor von BGA 02 bzw. im Hauptfermentor von BGA 06 sowie die relative Häufigkeitsverteilung der ausgewählten TRFs im Vergleich.

Gesamt-säuren	TRF [bp]	Indikatorwerte IV	p value	BGA02 Hyd	BGA02 HF	BGA06 HF	BGA06 MS
17,44 g/l	149	60	0,0002	**44,7**	9,0	4,2	0,0
	159	100	0,0002	**3,3**	0,0	0,0	0,0
	264	100	0,0002	**1,8**	0,0	0,0	0,0
	384	100	0,0002	**1,9**	0,0	0,0	0,0
	454	100	0,0002	**1,7**	0,0	0,0	0,0
9,16 g/l	161	81	0,0002	0,0	0,0	**14,8**	0,0
	204	100	0,0002	0,0	0,0	**2,2**	0,0
	279	100	0,0002	0,0	0,0	**2,6**	0,0
	285	100	0,0002	0,0	0,0	**2,3**	0,0

Tabelle 6: Grundlegende Kenndaten der untersuchten Biogasanlage BGA 04. CSTR = Rührkesselreaktor, HF = Hauptfermenter, NH_4^+-N = Ammonumstickstoff, oTS = organische Trockensubstanz.

Anlagen- und Prozessdaten			**Substratdaten**		
Reaktortyp		CSTR	**Zugabe Frischmasse:**	**[t d^{-1}]**	35,1 ± 2,4
Hauptfermenter	[m^3]	2x 1500	Maissilage	[%]	52 ± 4
Endlager	[m^3]	1x 1500	Roggensilage	[%]	10 ± 2
Temperature HF1	[°C]	43 ± 2	Rindermist	[%]	16 ± 1
Temperature HF2	[°C]	40 ± 3,0	Rindergülle	[%]	22 ± 1
Raumbelastung	[kg_{oTS} m^{-3} d^{-1}]	1,7 ± 0,2	**Zugabe oTS:**	**[t d^{-1}]**	7,5 ± 0,7
Verweilzeit	[d]	129 ± 9	Maissilage	[%]	77 ± 5
pH Wert	[-]	7,9 ± 0,1	Roggensilage	[%]	8 ± 2
Gesamtsäuren	[g l^{-1}]	0,51 ± 0,65	Rindermist	[%]	14 ± 2
NH_4^+-N	[g l^{-1}]	2,3 ± 0,4	Rindergülle	[%]	3 ± 2

II.1.2 Analyse der mikrobiellen Dynamik am Beispiel von Biogasanlage BGA 04

Im Untersuchungszeitraum unterlag die mesophil betriebene Biogasanlage BGA 04 von allen Anlagen den wenigsten Veränderungen hinsichtlich Substratbeschickung als der auch Prozessführung. Entsprechend sollte die enthaltene mikrobielle Gemeinschaft auch weitgehend konstant sein bzw. maximal endogen bedingten Dynamiken unterworfen sein.

Diese Anlage wurde im Juli 2011 sowie über einen Zeitraum von 15 Wochen von Februar bis Mai 2012 untersucht. Die betriebstechnischen Anlagendaten wurden täglich seitens des Anlagenbetreibers aufgenommen. Die chemischen Daten wurden wöchentlich erhoben und die mikrobiologischen Daten einmal pro Monat.

Die Hauptcharakteristika für BGA 04 sind in **Tabelle 6** zusammengefasst. Die untersuchte Anlage wurde mit Mais- und Roggenganzpflanzensilage sowie mit Rindermist und Rindergülle als Gärsubstrate betrieben (**Abbildung 3**). Die Raumbelastung betrug 1,7 ± 0,2 kg_{oTS} m^{-3} d^{-1} mit einer hydraulischen Verweilzeit von 128,8 ± 9,3 Tagen. Die Biogasausbeute war mit 0,7 ± 0,08 m^3 kg_{oTS}^{-1} und einem Methangehalt von 51,4 ± 2,1 % nahezu konstant über den gesamten Untersuchungszeitraum. Die Gesamtsäuremenge schwankte zwischen 0,08 g L^{-1} AAE (*acetic acid equivalents*, Essigsäureäquivalente) und 2,14 ± 0,04 g L^{-1} AAE (**Abbildung 3**). Ein konstanter pH- und FOS/TAC-Wert (7,9 ± 0,1 bzw. 0,1) weisen auf einen stabil-laufenden Biogasreaktor hin. Der Ammoniumstickstoffgehalt betrug im Mittel 2,3 ± 0,4 g L^{-1}, wobei er im Juli 2011 mit 3,0 ± 0,07 g L^{-1} etwas höher war im Vergleich zum Untersuchungszeitraum in 2012.

Wie zu erwarten war zeigte eine Korrelationsanalyse der wichtigsten verfahrenstechnischen Prozessparameter untereinander, dass die Biogasausbeute durch die Raumbelastung negativ beeinflusst ist, je höher die Raumbelastung, desto niedriger die Biogasausbeute. Weder die Prozesstemperatur noch der Gehalt an Gesamtsäuren oder der Ammoniumstickstoff zeigten eine signifikante Korrelation mit der Biogasausbeute, was auf einen stabilen mikrobiologischen Abbauprozess hindeutet.

Die Struktur und Dynamik der Prozessmikrobiologie wurde mittels TRFLP erfasst. Die Identifizierung der gefundenen TRFs erfolgte mittels Klonierung und Sequenzierung des 16S rRNA Gens (Sequenzbibliothek). Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurden fünf Zeitpunkte für die mikrobiologischen Analysen ausgewählt. Die Profile der mikrobiellen Gemeinschaften sind in **Abbildung 4** dargestellt.

Für die Bakteriengemeinschaft wurden 27 verschiedene TRFs detektiert, von denen 21 mit Hilfe der angelegten Sequenzbibliothek identifiziert werden konnten. Das am häufigsten in BGA 04 nachgewiesene TRF mit 19-29 % war TRF-150bp. In der Sequenzbibliothek konnten fünf verschiedene OTUs (*operational taxonomic unit,* vorläufige taxonomische Einheiten) gefunden werden, die ein theoretisches Fragment von 150 bp aufwiesen. Die Identifizierung mit dem RDP Naïve Bayesian rRNA Classifier Version 2.6 (WANG *et al.* 2007) ergab eine Zuordnung zu der Abteilung *Firmiuctes*, vermutlich zur Klasse *Clostridia*.

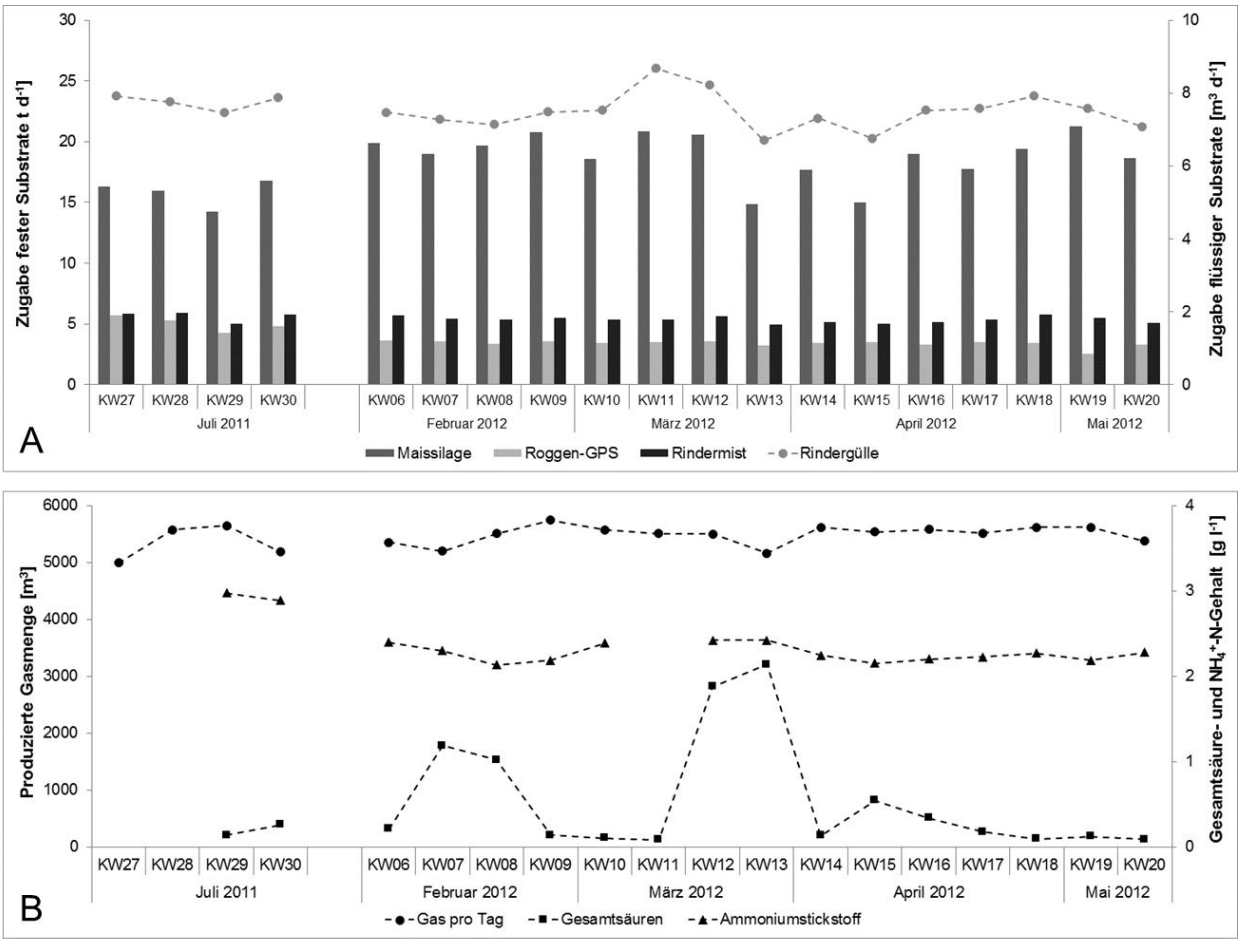


Abbildung 3: Substratbeschickung (A), produzierte Biogasmenge sowie Gesamtsäure- und NH_4^+-N-Gehalt (B) im Juli 2011 sowie über einen Untersuchungszeitraum von 15 Wochen von Februar bis Mai 2012 hinweg. KW = Kalenderwoche.

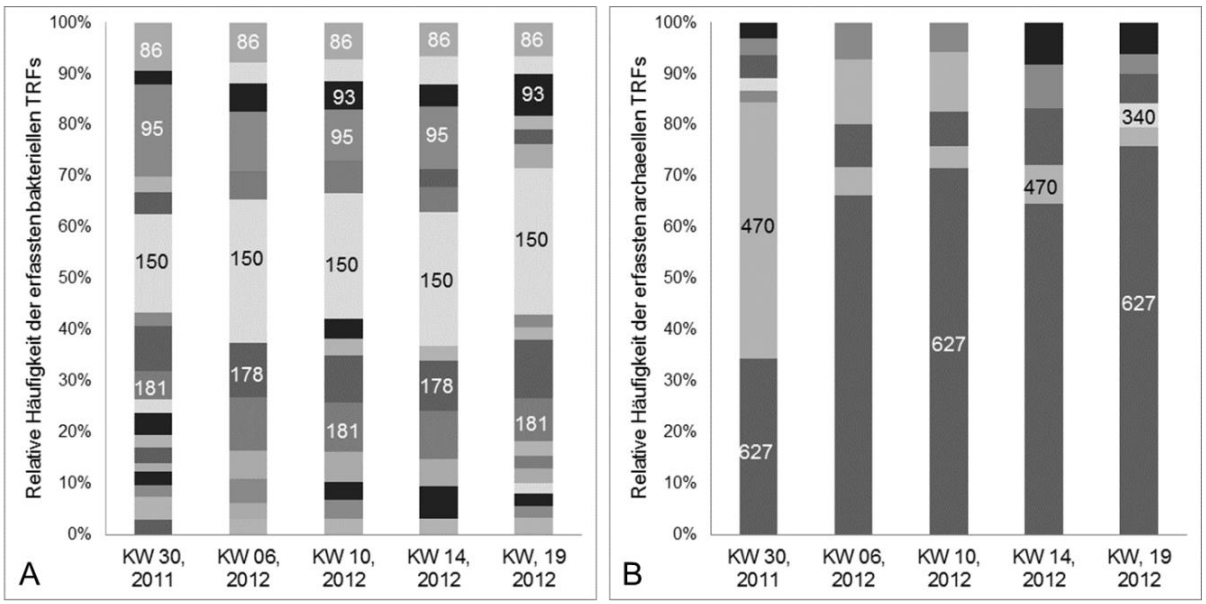


Abbildung 4: Strukturelle Zusammensetzung der bakteriellen (A) und archaeellen (B) Gemeinschaft in BGA 04 im Vergleich der fünf analysierten Zeitpunkte. Dargestellt ist der relative Anteil der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (TRFs) als Indikator für die am Biogasprozess beteiligten taxonomischen Gruppen.

Tabelle 7: Mikrobiologische Kenngrößen der Biogasanlage BGA 04. Dargestellt ist die Anzahl der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (TRFs), die Organisationsstruktur (Gini-Index) der bakteriellen und archaeellen Biozönosen sowie der Jaccard-Index als Maß für die Ähnlichkeit der gesamten mikrobiellen Gemeinschaften im paarweisen Vergleich von zwei Zeitpunkten.

Probe	Anzahl der TRFs			Gini index		Jaccard Index [%]				
	Bacteria	Archaea	Summe	Bacteria	Archaea	KW 30, 2011	KW 06, 2012	KW 10, 2012	KW 14, 2012	KW 19, 2012
KW 30, 2011	18	8	26	0,41	0,61	-	43	41	53	65
KW 06, 2012	12	5	17	0,36	0,52		-	80	68	50
KW 10, 2012	14	5	19	0,34	0,58			-	77	42
KW 14, 2012	14	6	20	0,38	0,45				-	55
KW 19, 2012	18	7	25	0,43	0,61					-

Tabelle 8: Identifizierung von „Schlüssel"-TRFs mittels Indikatorartenanalyse bezogen auf eine Prozesstemperatur von 45°C (KW 30, 2011 und KW 19, 2012), dem höchsten Ammoniumstickstoffgehalt (KW 30, 2011) sowie den zwei Haupttypen der Methanogenese. IV = Indikatorwerte, *p*-Werte = statistische Signifikanz. Gruppe 1 repräsentiert den geringsten prozentualen Anteil an acetoklatischen bzw. hydrogenotrophen Methanogeneseproteinen, Gruppe 2 die höchsten prozentualen Anteile.

		Prozessparameter				**acetoklastisch**				**hydrogenotroph**			
	TRF [bp]	Temp.: 45 °C		NH_4^+-N: 3 g L^{-1}		Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 1		Gruppe 2	
		IV	*p* value	IV	*p* value	IV	*p* value	IV	*p* value	IV	*p* value	IV	*p* value
Bacteria	99	**85**	**0,0002**	74	0,0004								
	130	72	0,0002	76	0,0002								
	167	**100**	**0,0002**	77	0,0004								
	216	nicht signifikant		**100**	**0,0002**								
	217	nicht signifikant		73	0,0044								
	296	**100**	**0,0002**	72	0,0140								
	303	nicht signifikant		**100**	**0,0002**								
	490	**100**	**0,0002**	74	0,0032								
	558	nicht signifikant		**100**	**0,0002**								
Archaea	106	59	0,0042	60	0,0304	nicht signifikant		nicht signifikant		nicht signifikant		45	0,0432
	340	**83**	**0,0002**	nicht signifikant		66	0,0002	nicht signifikant		nicht signifikant		**79**	**0,0002**
	437	nicht signifikant		67	0,0012	nicht signifikant		67	0,0030	nicht signifikant		nicht signifikant	
	470	66	0,0310	**92**	**0,0004**	nicht signifikant		**75**	**0,0004**	64	0,0446	nicht signifikant	

Innerhalb des bakteriellen Datensets wurden weitere vier TRFs gefunden, die in allen Proben enthalten waren: TRF-178bp mit 9-11 %, TRF-181bp mit 6-10 %, TRF-86bp mit 6-9 % und TRF-93bp mit 3-8 % relativem Anteil an der Gesamtgemeinschaft. Über die Klonbibliothek konnten die ersten beiden TRFs der Abteilung *Firmicutes* zugeordnet werden, während die letzten beiden der Familie *Porphyromonadaceae* (Ordnung *Bacteroidales*, Abteilung *Bacteroidetes*) angehören. Eine tiefere phylogenetische Zuordnung zeigte, dass OTU-B046 mit einem theoretischen TRF von 86 bp der Gattung *Proteiniphilum* zugeordnet werden konnte, wohingegen OTU-B043 mit einem theoretischen TRF von 93 bp der Gattung *Petrimonas* angehört.

Grundsätzlich war die Bakteriengemeinschaft gleichmäßiger strukturiert als die Archaeengemeinschaft, was sich gut an den ermittelten Gini-Indizes erkennen lässt (**Tabelle 7**). Die Jaccard-Indizes (**Tabelle 7**) zeigten, dass die mikrobiellen Gemeinschaften von KW 30, 2011 und KW 19, 2012 eine Ähnlichkeit von 65 % aufwiesen. Beide Gemeinschaften unterschieden sich jedoch von den Gemeinschaften der anderen drei Zeitpunkte (KW 06, 2012, KW 10, 2012 und KW 14, 2012) um mehr als 60 %, wobei die letzten drei Ähnlichkeitswerte zwischen 68 bis 80 % aufwiesen, was für diesen Zeitraum (Februar bis April) auf eine äußerst stabile Prozessphase hinweist.

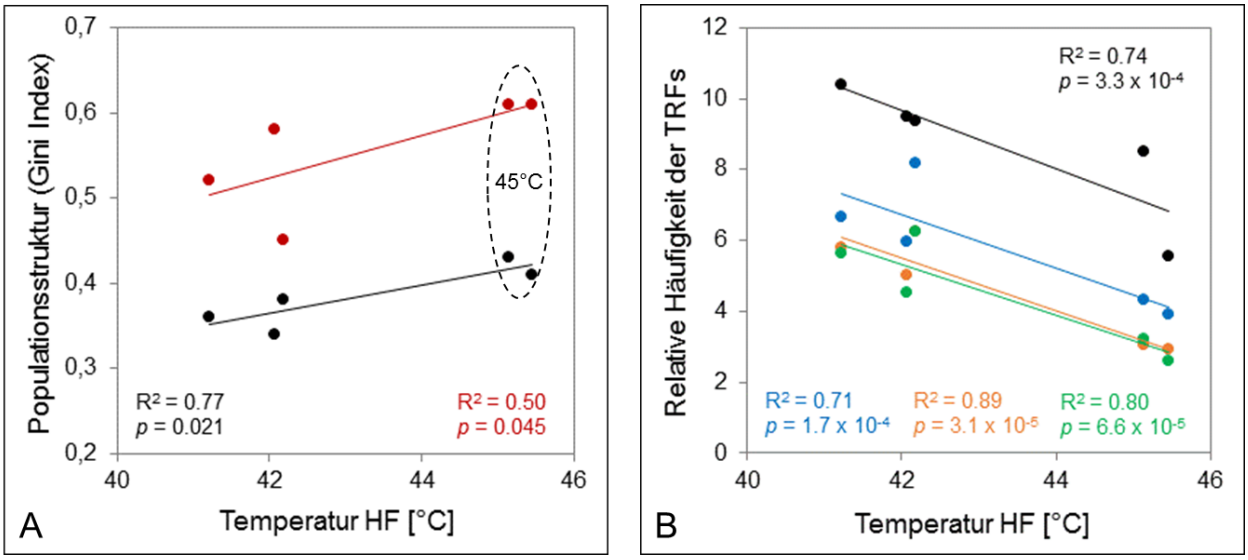


Abbildung 5: Korrelation der mikrobiellen Gemeinschaft mit der Prozesstemperatur (A) bezogen auf die bakterielle (schwarz) und archaeelle (rot) Populationsstruktur und (B) bezogen auf vier dominante TRFs (Bakterien: TRF-181bp = schwarz, Archaeen: TRF-318bp = blau, TRF-174bp = orange, TRF-84bp = grün). Dargestellt ist die lineare Regression mit dem Korrelationskoeffizienten (R^2) und der statistischen Signifikanz (*p*-Wert).

Anpassungsfähigkeit der Mikroflora an schwankende Temperaturbedingungen

Bei genauerer Betrachtung der betriebstechnischen Daten fiel auf, dass es eine gewisse Variation der Prozesstemperatur während des Untersuchungszeitraums gab. Die Temperatur im untersuchten Hauptfermenter von BGA 04 schwankte zwischen 40,9 und 45,6°C. Da die Temperatur einen starken Selektionsdruck auf die Mikroflora ausü-

ben kann, wurde eine Korrelationsanalyse der mikrobiologischen Daten mit den verfahrenstechnisch-chemischen Prozessdaten durchgeführt. Die Korrelationsanalyse zeigte deutlich eine Trennung der fünf untersuchten mikrobiellen Gemeinschaften in zwei Gruppen in Abhängigkeit von der Prozesstemperatur (**Abbildung 5A**). Sowohl die Bakterien- als auch die Archaeengemeinschaft war bei höherer Prozesstemperatur (45°C in KW 30, 2011 und KW 19, 2012) deutlich ungleichmäßiger strukturiert (erkennbar an höheren Gini-Indizes). Wie bereits erwähnt unterschieden sich die Gemeinschaften dieser beiden Zeitpunkte deutlich von den Gemeinschaften der anderen drei Zeitpunkten, was darauf schließen lässt, dass die Gemeinschaften von KW 30, 2011 und KW 19, 2012 spezifisch an die erhöhte Temperatur angepasst waren.

Innerhalb der neun, die Gemeinschaft dominierenden TRFs (Bakterien: TRF-150bp, TRF-177bp, TRF-181bp, TRF-86bp, TRF-93bp; Archaeen: TRF-627bp TRF-318bp, TRF-174bp und TRF-84bp) unterlagen nur vier (Bakterien: TRF-181bp; Archaeen: TRF-318bp, TRF-174bp und TRF-84bp) dem direkten Einfluss der Temperatur, wobei alle eine geringere Abundanz bei erhöhter Temperatur zeigten (**Abbildung 5B**). Eine Indikatorartenanalyse zeigte, dass sowohl das Vorkommen als auch die Abundanz von vier nicht-dominanten bakteriellen TRFs (TRF-99bp, TRF-167bp, TRF-296bp und TRF-490bp) und einem nicht-dominanten archaeellen TRF (TRF-340bp, zugehörig zur Gattung *Methanobacterium*) in KW30, 2011 und KW 19, 2012 mit Indikatorwerten > 80 (p = 0,0002) dem Selektionsdruck durch die Prozesstemperatur unterliegen (**Tabelle 8**).

Anpassung der Mikroflora an die Ammoniumstickstoffkonzentration

Ein weiterer Punkt, der bei der Betrachtung der betriebstechnischen Anlagendaten auffiel, war, dass im Juli 2011 der Anteil an Roggenganzpflanzensilage im Gärsubstrat ca. 5 % höher war als im Untersuchungszeitraum 2012 (**Abbildung 3**). Dies führte folglich zu einem leicht erhöhten Proteingehalt im Gärsubstratmix. In Kombination mit der erhöhten Prozesstemperatur (45°C) und dadurch bedingt einem verstärktem Abbau der Proteine stiegt der NH_4^+-N-Gehalt im Gärrest an. Der NH_4^+-N-Gehalt betrug im Mittel 2,3 ± 0,4 g L^{-1}, wobei er im Juli 2011 mit 3,0 ± 0,07 g L^{-1} etwas höher war im Vergleich zum Untersuchungszeitraum in 2012.

Auf Bakterienebene wurden mittels Indikatorartenanalyse drei TRFs (TRF-216bp, TRF-303bp und TRF-558bp) gefunden, die ausschließlich (IV > 80, p = 0,0002) in KW 30, 2011 mit erhöhtem NH_4^+-N-Gehalt vorkommen (**Tabelle 7**). Eine Korrelationsanalyse zeigte zudem, dass TRF-86bp (einem der fünf dominanten bakteriellen TRFs in BGA 04, repräsentativ für die Gattung *Proteiniphilum*) nicht nur einen starken positiven Zusammenhang zum NH_4^+-N-Gehalt (R^2 = 0,97, p = 0,024) sondern auch zum Proteingehalt (R^2 = 0,64, p = 0,002) aufwies (**Abbildung 6**).

Unter den gegebenen Prozessbedingungen in KW 30, 2011 (erhöhter Gehalt an Proteinen und NH_4^+-N) wurden auch zwei archaeelle TRFs (TRF-627bp und TRF-470bp) gefunden, die zusammen ca. 75 % der gesamten Archaeengemeinschaft repräsentierten (**Abbildung 4**). Während die relative Abundanz von TRF-627bp in KW30, 2011 ca.

25 % geringer war verglichen mit den anderen Zeitpunkten, zeigte TRF-470bp in KW30, 2011 mit 45 % seine höchste Abundanz. Die starke Korrelation von TRF-470bp mit den in KW 30, 2011 gegebenen Umweltbedingungen, vor allem dem erhöhten NH_4^+-N-Gehalt (R^2 = 0,89, p = 3,6 x 10^{-5}, ISA-IV = 91,2, p = 4,0 x 10^{-4}) zeigt deutlich, dass die durch TRF-470bp repräsentierten Archaeen zu diesem Zeitpunkt eine Schlüsselfunktion bei der Methanproduktion zukam.

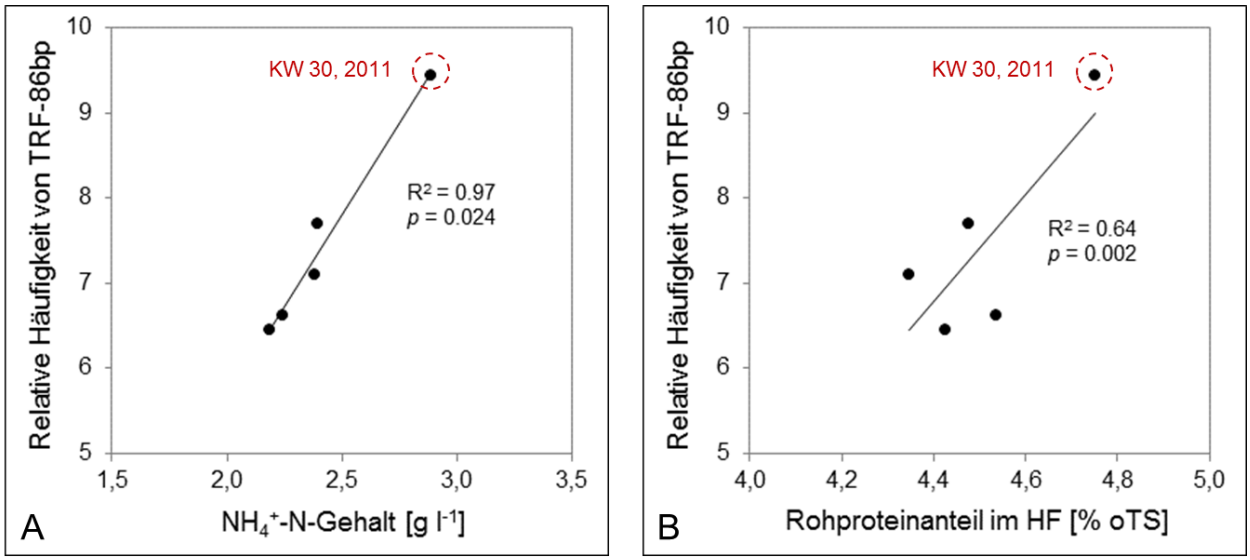


Abbildung 6: Korrelation von TRF-86bp (repräsentativ für die Gattung *Proteiniphilum*) mit dem Ammoniumstickstoffgehalt (A) und dem Proteingehalt im Gärrest (B). Dargestellt ist die lineare Regression mit dem Korrelationskoeffiezenten (R^2) und der statistischen Signifikanz (p-Wert).

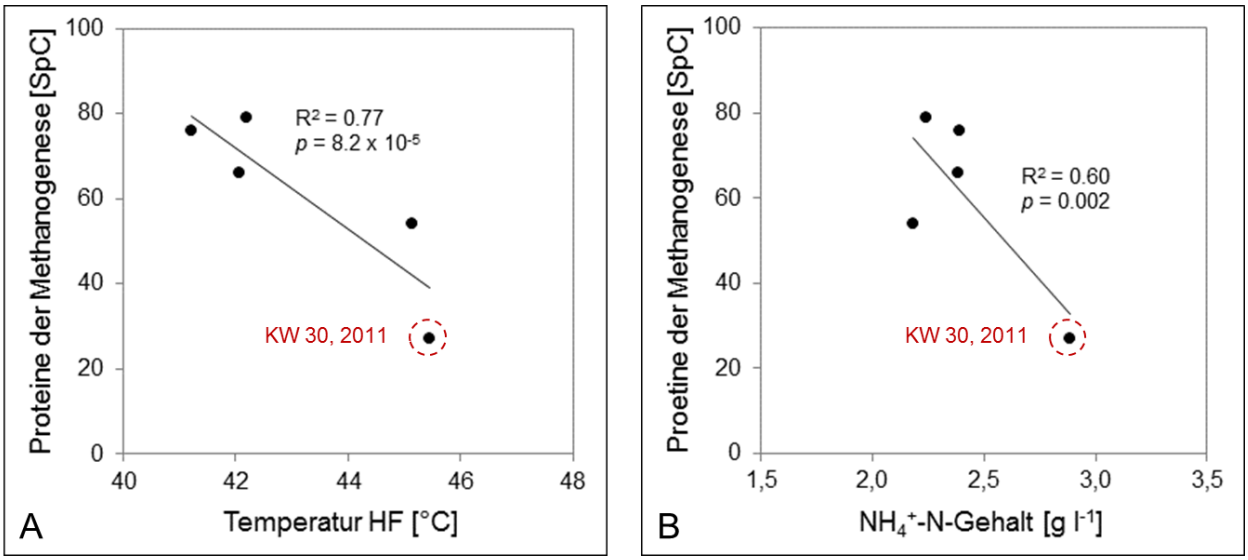


Abbildung 7: Korrelation der Methanogeneseproteine mit der Prozesstemperatur (A) und dem Ammoniumstickstoffgehalt im Gärrest (B). Dargestellt ist die lineare Regression mit dem Korrelationskoeffizienten (R^2) und der statistischen Signifikanz (p-Wert).

Die Zusammenführung der molekulargenetischen Daten (TRFLP-Daten) mit den Daten aus der Metaproteomanalyse aus Teilprojekt 3 ergab, dass das Auftreten von typischen Enzymen der Methanogenese ebenfalls abhängig ist von der Prozesstemperatur (KW 30, 2011 und KW 19, 2012) und dem NH_4^+-N-Gehalt (KW 30, 2011) (**Abbildung 7**). Sowohl die erhöhte Temperatur als auch der erhöhte NH_4^+-N-Gehalt haben einen negativen Einfluss auf die Anzahl (*spectral sounts*, SpC) der Methanogeneseenzyme.

Wie weiterhin aus der Metaproteomanalyse hervorgeht, erfolgte die Produktion von methanhaltigem Biogas in der untersuchten Anlage hauptsächlich über den acetoklatischen Stoffwechselweg. Eine Ausnahme stellt dabei KW 19, 2012 dar, in der vergleichbare Mengen an acetoklastischen und hydrogenotrophen Proteinen gefunden wurden (**Tabelle 9**). Wie bereits oben erwähnt, wurde TRF-340bp (zugehörig zur hydrogenotrophen Gattung *Methanobaterium*) ausschließlich in KW 30, 2011 und KW 19, 2012 bei erhöhter Prozesstemperatur (45°C) gefunden. Die physiologische Aktivität der Organismen war jedoch in KW 30, 2011 unterdrückt (möglicherweise durch den erhöhten NH_4^+-N-Gehalt) und sie wurden erst aktiv in KW 19, 2012, als geeignetere Umweltbedingungen vorlagen. Die Indikatorartenanalyse bezogen auf die Methanogeneseenzyme weist zudem darauf hin, dass TRF-470bp (IV = 79, p = 0,0002) vermutlich für die Aufrechterhaltung des acetoklastischen Stoffwechselweges verantwortlich ist, trotz des erhöhten NH_4^+-N-Gehalt in KW 30, 2011.

Tabelle 9: Nachweis von Schlüsselenzymen der Methanogenese in BGA 04

Enzyme der Methanogenese	KW 30, 2011	KW 06, 2012	KW 10, 2012	KW 14, 2012	KW 19, 2012
Gesamt als Anzahl	51	146	102	136	262
acetoklastische Proteine [%]	35,3	21,2	16,7	14,7	13,0
hydrogenotrophe Proteine [%]	3,9	4,8	3,9	5,1	10,3
finale Schritt der Methanbildung [%]	60,8	74,0	79,4	80,1	76,7

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass selbst eine vermeintlich stabil laufende Anlage stetigen Schwankungen unterliegt, auf die die mikrobielle Gemeinschaft reagieren muss um die Ökosystemfunktion effizient aufrecht zu erhalten. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich aus der relativen Häufigkeit einer Art oder Gruppe von Arten (hier repräsentiert durch TRFs) nicht immer auf ihre Bedeutung für das Ökosystem schließen lässt. Es sind vielmehr die physiologischen Eigenschaften der vorkommenden Organismen, die einen starken Einfluss auf die Ökosystemfunktion haben. Demzufolge können auch selten auftretende Arten oder Gruppen von Mikroorganismen einen starken Einfluss auf die Beschaffenheit und Funktionalität des Ökosystems haben, was

sich sowohl auf Bakterien- als auch auf Archaeenebene durch die Indikatorarten-analysen gezeigt hat. Diese Studie konnte zeigen, dass für einen effizient ablaufenden Prozess ein gewisses Maß an Stabilität in der Prozessmikrobiologie notwendig ist, wobei die mikrobielle Gemeinschaft variabel genug sein muss, um auf Umweltschwankungen zu reagieren und mögliche Störungen zu kompensieren.

II.1.3 Analyse der mikrobiellen Dynamik am Beispiel von Biogasanlage BGA 03

Die Biogasanlage BGA 03 zeigte für den Untersuchungszeitraum Februar bis Oktober 2012 verhältnismäßig konstante Prozessparameter, einzig eine Änderung in der Zusammensetzung der Gärsubstrate trat auf. Wie aus **Abbildung 8A** hervorgeht, wurde ab KW 24, 2012 über einen Zeitraum von fünf Wochen keine Roggenganzpflanzensilage (Roggen-GPS) zugegeben, dafür jedoch der Anteil an Grassilage um mehr als das Doppelte erhöht. Es liegt nahe, die Anpassung der mikrobiellen Gemeinschaft an diese veränderte Nährstoffversorgung im Detail zu betrachten. Ebenfalls ergab sich hieraus die Möglichkeit den Prozess der „Rückgewöhnung“ der Systemmikrobiologie nach ca. einer Verweilzeit bei Wiedereinführen von Roggen-GPS im Substrat zu untersuchen.

Die betriebstechnischen Anlagendaten wurden täglich seitens des Anlagenbetreibers aufgenommen. Die chemischen Daten wurden wöchentlich erhoben und die mikrobiologischen Daten einmal pro Monat für den Zeitraum Februar bis August.

Die untersuchte Anlage wurde als liegender Propfenstromreaktor (270 m^3) mit Mais-, Gras- und Roggen-GPS zusammen mit Ferkelmist und Rindergülle als Gärsubstrate (**Abbildung 8A**) unter mesophilen Bedingungen (42,4 ± 0,4°C) betrieben. Die Raumbelastung betrug 12,6 ± 0,9 $kg_{oTS}\ m^{-3}\ d^{-1}$ mit einer hydraulischen Verweilzeit von 13,9 ± 2,4 Tagen. Die Biogasausbeute war mit 0,65 ± 0,07 $m^3_N\ kg_{oTS}^{-1}$ und einem Methangehalt von 51,5 ± 0,8 % nahezu konstant über den gesamten Untersuchungszeitraum. Die Gesamtsäuremenge schwankte zwischen 0,02 und 7,6 g l^{-1} AAE (*acetic acid equivalents*, Essigsäureäquivalente). Der Ammoniumstickstoffgehalt betrug im Mittel 1,8 ± 0,2 g l^{-1} (**Abbildung 8B**).

Die Struktur und Dynamik der Prozessmikrobiologie in BGA 03 wurde mittels TRFLP-Analyse erfasst. Die Profile der mikrobiellen Gemeinschaften sind in **Abbildung 9** dargestellt. Für die Bakteriengemeinschaft wurden insgesamt 39 verschiedene terminale Restriktionsfragmente (TRFs) gefunden, von denen vier TRFs (TRF-98bp, TRF-149bp, TRF-150bp und TRF-186bp) zu allen Probenahmezeitpunkten nachweisbar waren. Im Vergleich zur Bakteriengemeinschaft war die Archaeengemeinschaft mit insgesamt acht verschiedenen TRFs, von denen nur TRF-340bp und TRF-627bp in allen Proben enthalten waren, wie erwartet deutlich weniger divers. Grundsätzlich jedoch scheint die mikrobielle Gemeinschaft großen Fluktuationen zu unterliegen, was sich sowohl beim Vergleich der Gemeinschaftsorganisation (Gini-Indizes) als auch in den Jaccard-Indizes deutlich zeigt (**Tabelle 10**).

Die Ergebnisse der Indikatorartenanalyse (ISA) zeigten deutlich eine Reaktion der Bakteriengemeinschaft sowohl auf die während des Untersuchungszeitraums erfolgten Wechsel des Gärsubstrats als auch auf die Schwankungen im Säuregehalt.

Wie aus **Abbildung 8A** hervorgeht wurde ab KW 24, 2012 über einen Zeitraum von fünf Wochen keine Roggen-GPS zugegeben, dafür jedoch der Anteil an Grassilage um mehr als das Doppelte erhöht. Nach zwei Verweilzeiten (zum Zeitpunkt KW 28, 2012) wurde die Prozessmikrobiologie analysiert. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die bakterielle Gemeinschaft mit 24 verschiedenen TRFs die höchste Diversität, wobei sechs TRFs (TRF-156bp, TRF-294bp, TRF-362bp, TRF-385bp, TRF472bp und TRF-543bp) mit einer Gesamtabundanz von 11.7 % gefunden wurden, die ausschließlich (IV = 100, p = 0.0002) zu diesem Zeitpunkt auftraten.

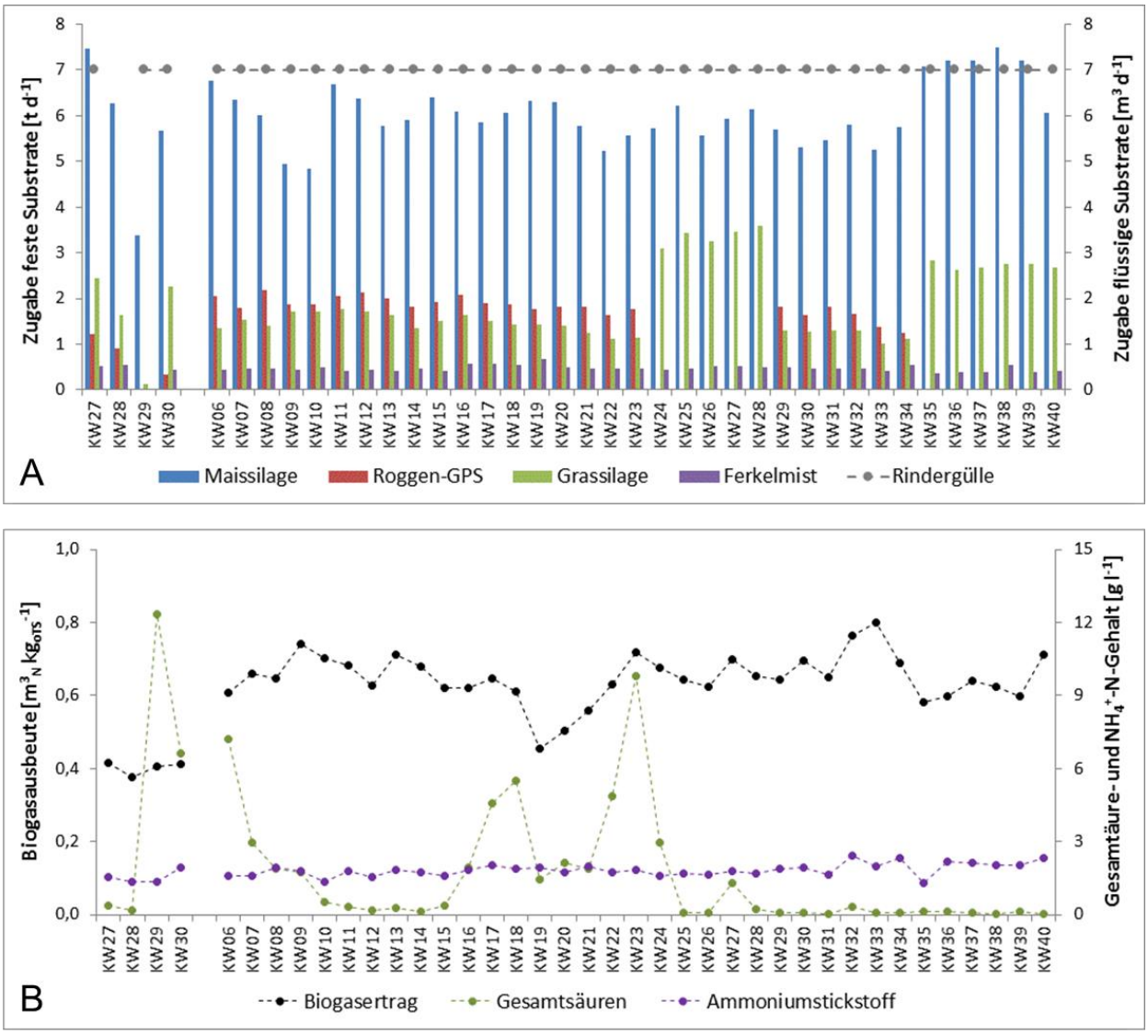


Abbildung 8: Substratbeschickung (A), produzierte Biogasmenge sowie Gesamtsäure- und NH_4^+-N-Gehalt (B) bei BGA 03 im Juli 2011 sowie über einen Untersuchungszeitraum von 35 Wochen von Februar bis Oktober 2012. KW = Kalenderwoche.

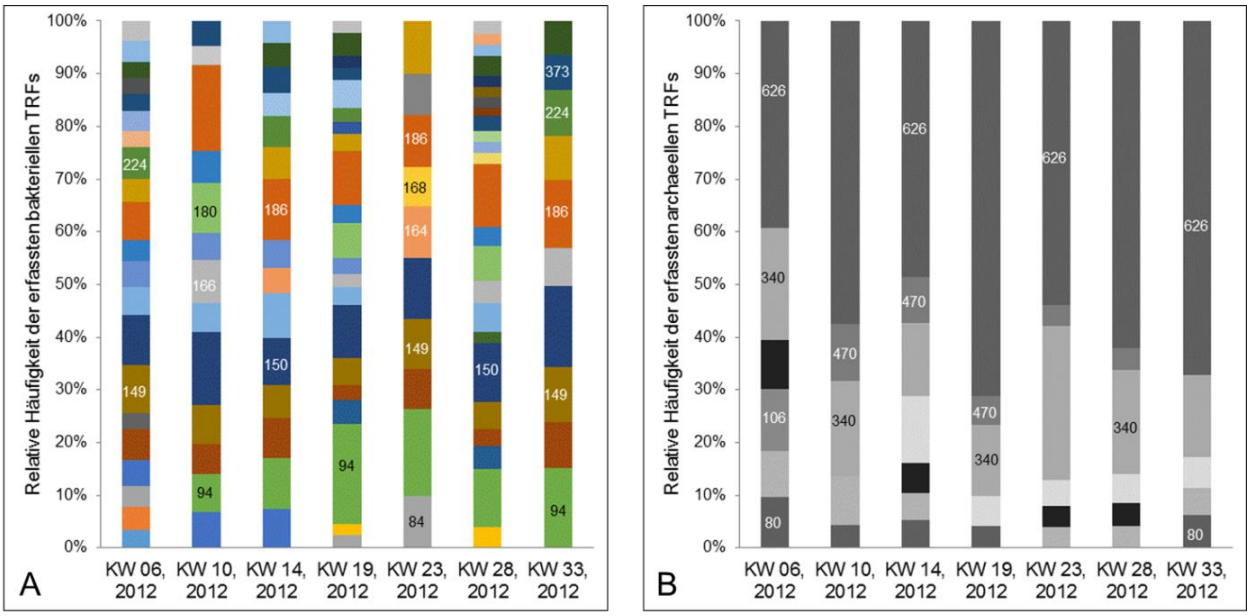


Abbildung 9: Strukturelle Zusammensetzung der bakteriellen (A) und archaeellen (B) Gemeinschaft in BGA 03 im Vergleich der sieben analysierten Zeitpunkte. Dargestellt ist der relative Anteil der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (TRFs) als Indikator für die am Biogasprozess beteiligten taxonomischen Gruppen.

Tabelle 10: Mikrobiologische Kenngrößen der Biogasanlage BGA 03. Dargestellt ist die Anzahl der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (TRFs), die Organisationsstruktur (Gini-Index) der bakteriellen und archaeellen Biozönosen sowie der Jaccard-Index als Maß für die Ähnlichkeit der gesamten mikrobiellen Gemeinschaften im paarweisen Vergleich von zwei Zeitpunkten.

Probe [2012]	Anzahl der TRFs			Gini index		Jaccard Index [%]						
	Bacteria	Archaea	Summe	Bacteria	Archaea	KW 06	KW 10	KW 14	KW 19	KW 23	KW 28	KW 33
KW 06	21	6	27	0,20	0,32	-	36	48	43	26	39	40
KW 10	13	5	18	0,24	0,46		-	54	52	36	37	50
KW 14	15	7	22	0,17	0,44			-	55	46	41	61
KW 19	21	5	26	0,36	0,57				-	31	51	52
KW 23	10	6	16	0,12	0,54					-	31	48
KW 28	24	6	30	0,33	0,57						-	36
KW 33	10	5	15	0,17	0,53							-

Hinsichtlich der vorherrschenden Säureverhältnisse (hauptsächlich bezogen auf das gebildete Säurespektrum) lassen sich über die Indikatorartenanalyse ebenfalls TRFs finden, die darauf hindeuten, dass die zugehörigen Bakterien spezifisch an die jeweiligen Säurebedingungen angepasst sind. In KW 06, 2012 und KW 23, 2012 traten mit 6,6 bzw. 7,6 g L^{-1} die höchsten Gesamtsäurekonzentrationen auf, wobei sich beide Zeitpunkte in ihren Säurespektren deutlich unterschieden (**Abbildung 10**). Über die Indikatorartenanalyse konnten für beide Zeitpunkte spezifische TRFs gefunden werden, die zu keinem anderen Zeitpunkt während des Monitorings nachzuweisen waren. Zum Probenahmezeitpunkt KW 06, 2012 fanden sich beispielsweise vier bakterielle TRFs (TRF-63bp, TRF-77bp, TRF-108bp und TRF-279bp) mit einer Gesamtabundanz von 13,5 % sowie ein archaeelles TRF (TRF-106bp) mit einer Abundanz von 11,7 %. Im Vergleich dazu wurden für den Zeitpunkt KW 23, 2012 zwei spezifische bakterielle TRFs (TRF-168bp und TRF-216bp) mit einer Gesamtabundanz von 15,2 % gefunden. Das archaeelle TRF-340bp zeigte zu diesem Zeitpunkt zwar keinen IV von 100, jedoch ist seine Abundanz mit ca. 30 % deutlich erhöht.

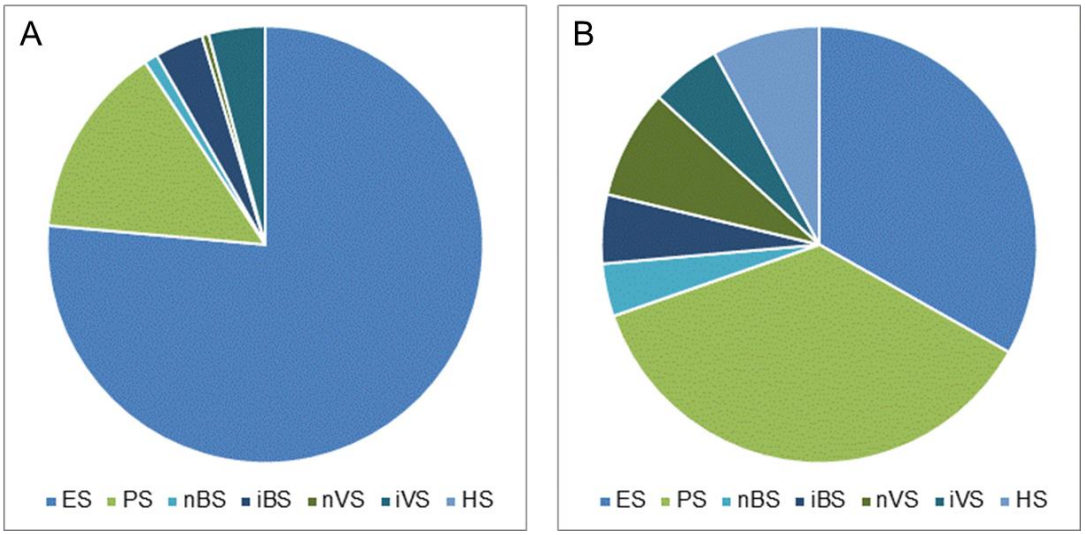


Abbildung 10: Zusammensetzung des Gärsäurespektrums in BGA 03 zu den Zeitpunkten KW 06, 2012 (A) und KW 23, 2012 (B). ES = Essigsäure, PS = Propionsäure, nBS = n-Buttersäure, iBS = Iso-Buttersäure, nVS = n-Valeriansäure, iVS = Iso-Valeriansäure, HS = Hexansäure.

II.1.4 Zusammenhang von Systemmikrobiologie und Reaktorleistung: Auswirkung von Prozessstörungen

Um eine möglichst hohe Prozesseffizienz mit konstanter Biogasausbeute gewährleisten zu können, sollten die Lebensbedingungen für die Mikroflora in einer Biogasanlage möglichst optimal sein. Mikrobiologische Indikatoren (sog. Biomarker) als Bewertungsmaßstab für die Stabilität, Effizienz oder Anpassungsfähigkeit einer Biozönose oder als Anzeiger bzw. Frühwarnindikatoren von Störungen des Prozesses lassen sich jedoch nur dann etablieren, wenn es gelingt prozessrelevante Zeigerorganismen (-gruppen) im positiven wie auch im negativen Sinne zu identifizieren. Da Störungen im Betriebsablauf von landwirtschaftlichen Biogasanlagen aus ökonomischen Gründen

schwerlich gezielt herbeigeführt werden können, sind sich zufällig ereignende Prozessstörungen und Fehlvergärungen während eines Monitorings von erheblichem Wert.

Während des in dieser Studie durchgeführten Langzeitmonitorings trat nur in den Biogasanlagen BGA 03 und BGA 06 eine solche zufällige Prozessstörung auf, jedoch in beiden Fällen mit drastischen Folgen. Die BGA 03 unterlag im Juli 2011 zum Zeitpunkt der ersten Bestandsaufnahme einer Prozessstörung, vermutlich hervorgerufen durch die Bildung einer Schwimmdenke aufgrund unzureichender Substratdurchmischung (persönliche Mitteilung des Anlagenbetreibers). Ähnliches gilt auch für BGA 06, wobei hier die Prozessstörung auf eine schlechte d.h. fehlsilierte Charge Maissilage zurückzuführen ist (persönliche Mitteilung des Anlagenbetreibers).

Bei beiden Anlagen wird der Hauptfermenter als liegender Pfropfenstromreaktor mit einem Volumen von 270 m^3 unter mesophilen Bedingungen betrieben. Die Anlagen unterscheiden sich jedoch in ihren betriebstechnischen Daten (**Tabelle 11**). Während die BGA 03 mit Mais- und Grassilage, Grünroggen, Ferkelmist und Rindergülle beschickt wurde, verwertete BGA 06 ausschließlich Maissilage. Zudem ist die Raumbelastung bei BGA 03 deutlich höher und dementsprechend die Verweilzeit deutlich niedriger als bei BGA 06 (**Tabelle 11**).

Unabhängig von diesen grundlegenden Unterschieden zwischen beiden Anlagen sind in **Tabelle 11** jeweils vier Zeitpunkte gegenübergestellt, zwei Zeitpunkte zur Prozessstörung (KW28, 2011 und KW 30, 2011) und zwei Zeitpunkte, zu denen die Anlagen relativ stabil liefen (KW 10, 2012 und KW 19, 2012). Bei beiden Anlagen ist deutlich die Auswirkung der jeweiligen Störung auf die strukturelle Zusammensetzung der Mikroflora zu erkennen (**Abbildung 11**).

In BGA 03 dominierte in KW 28, 2011 und KW 30, 2011 das bakterielle TRF-166bp die mikrobielle Gemeinschaft mit einer relativen Häufigkeit von mehr als 40 %. Nach der Prozessstörung in der stabilen Prozessphase in KW10, 2012 und KW19, 2012 nahm der relative Anteil dieses TRFs jedoch rasch ab (**Abbildung 11**). Die Ergebnisse der TRFLP-Analyse zeigten zudem zwei weitere bakterielle TRFs (TFR-84bp mit ca. 10 % und TRF-560bp mit ca. 7 % relativem Anteil), die nur zum Zeitpunkt der Störung innerhalb der Bakterienpopulation auftraten.

Da es im Zuge einer Schwimmdeckenbildung oft zu einer Anreicherung der Säurekonzentration als Ergebnis eines nicht vollständigen Abbaus der organischen Biomasse zu methanhaltigem Biogas kommt, liegt die Vermutung nahe, dass die genannten TRFs Vertreter acidotoleranter Organismengruppen symbolisieren. Eine Indikatorartenanalyse weist zudem darauf hin, dass TRF-84bp vor allem dann auftrat, wenn im Säurespektrum erhöhte Konzentrationen von Propion- und Buttersäure vorlagen. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die hier ermittelten prozessstörungsrelevanten TRFs möglicherweise als Indikatoren für instabile Prozessphasen betrachtet werden können. Eventuell sind diese TRFs bzw. die hierdurch repräsentierten Mikroorganismen sogar geeignet als Frühwarnindikatoren vor der Ausbildung einer Schwimmdecke zu dienen.

Tabelle 11: Verfahrenstechnisch-chemische Prozessparameter der Biogasanlagen 03 und 06 während und nach einer Prozessstörung. Die Störung ereignete sich bei beiden Anlagen im Juli 2011 (KW 28, 2011 und KW30, 2011). E-Säure = Essigsäure, P-Säure = Propionsäure, nB = n-Buttersäure, iB = Iso-Buttersäure, nV = n-Valeriansäure, iV-Säure = Iso-Valeriansäure, H-Säure = Hexansäure, NH_4^+-N = Ammoniumstickstoff, nb = nicht bestimmt.

Parameter		BGA 03				BGA 06			
		KW28-11	KW30-11	KW10-12	KW19-12	KW28-11	KW30-11	KW10-12	KW19-12
Fütterung	[t d^{-1}]	9,4	15,7	15,9	17,2	5,4	5,1	7,8	7,8
Raumbelastung	[kg_{oTS} m^{-3} d^{-1}]	14,7	12,7	11,9	13,8	6,5	6,2	2,8	2,6
Verweilzeit	[d]	12,3	17,2	17,0	15,7	50,3	52,8	117,0	129,3
Temperatur	[°C]	42	41	42	42	42	42	42	44
Biogas	[m^3_N kg_{oTS}^{-1}]	0,4	0,4	0,7	0,5	1,3	1,3	0,7	0,8
Methan	[%]	nb	51,5	51,7	48,5	50,3	50,6	49,1	51,3
Leitfähigkeit	[mS cm^{-1}]	nb	nb	14,2	8,0	20,2	20,4	17,6	12,7
pH Wert	[-]	7,8	7,5	7,9	7,8	6,6	6,5	7,4	7,3
FOS/TAC	[-]	0,3	0,9	0,2	0,3	2,1	2,4	1,1	1,1
Säuren	[g l^{-1}]	0,2	6,6	0,5	1,5	18,4	20,3	3,7	9,2
E-Säure	[g l^{-1}]	0,2	5,0	0,4	1,3	6,8	9,9	2,1	4,5
P-Säure	[g l^{-1}]	0,0	1,0	0,1	0,1	1,1	1,6	0,9	2,4
nB-Säure	[g l^{-1}]	0,0	0,1	0,0	0,0	4,5	4,1	0,2	0,5
iB-Säure	[g l^{-1}]	0,0	0,2	0,0	0,0	0,3	0,2	0,2	0,5
nV-Säure	[g l^{-1}]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	1,2	0,1	0,4
iV-Säure	[g l^{-1}]	0,0	0,2	0,0	0,1	0,7	0,7	0,2	0,8
H-Säure	[g l^{-1}]	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	2,7	0,0	0,1
NH_4^+-N	[g l^{-1}]	1,4	1,9	1,4	1,9	3,0	2,7	2,7	2,4

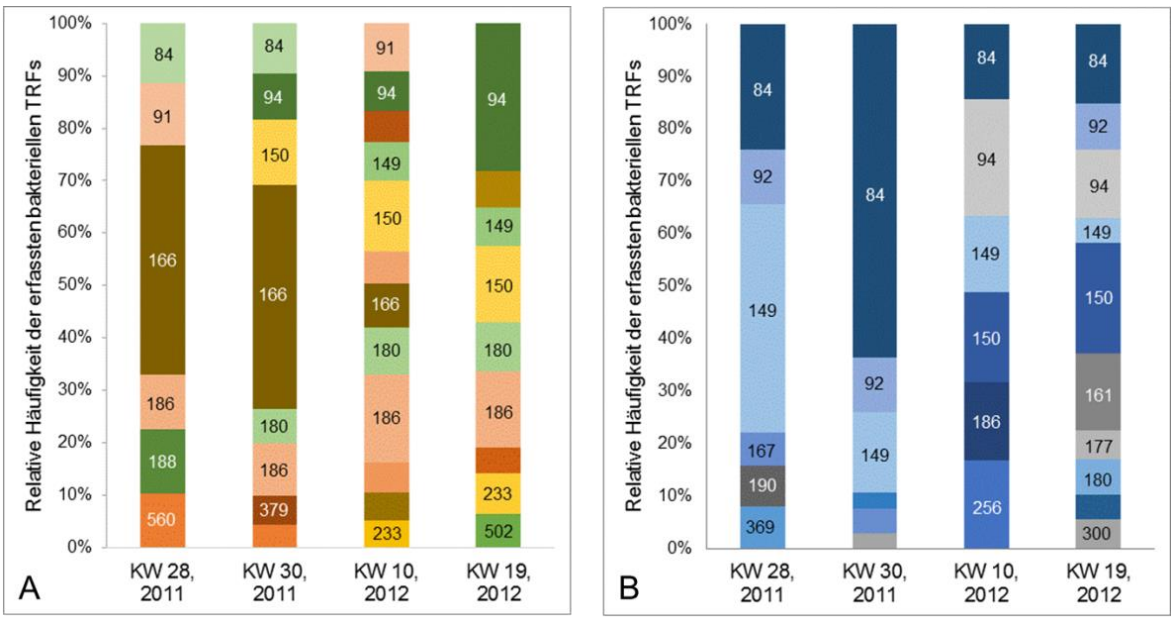


Abbildung 11: Strukturelle Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften der Biogasanlagen BGA 03 (A) und 06 (B) während (KW28, 2011 und KW30, 11) und nach (KW14, 2012 und KW19, 2012) einer Prozessstörung basierend auf der relativen Häufigkeitsverteilung der erfassten terminalen Restriktionsfragmente (TRFs).

Im Vergleich zu BGA 03 war bei BGA 06 in KW 28, 2011 und KW 30, 2011 sehr deutlich eine sog. Versäuerung zu beobachten, was sich deutlich im pH-Wert (ca. 6,5) und auch im FOS/TAC-Wert (2,1) wiederspiegelt (**Tabelle 11**). Die zu diesen Zeitpunkten in BGA 06 vorliegenden Säureverhältnisse (d. h. sowohl die Gesamtsäurekonzentration als auch das gebildete Säurespektrum) sind eher charakteristisch für eine Hydrolysestufe bei zweistufigen Reaktorsystemen (vgl. **Tabelle 2**, Werte für BGA 02). Dementsprechend fanden sich auch Gemeinsamkeiten hinsichtlich der auftretenden Mikroorganismen. So wurde in BGA 06 beispielsweise ebenfalls das für die Hydrolysestufe von BGA 02 vorherrschende und prozessrelevante TRF-149bp nachgewiesen, dessen relative Häufigkeit mit sinkenden Säurekonzentrationen deutlich abnahm. Des Weiteren findet sich zum Zeitpunkt der Prozessstörung in der Bakteriengemeinschaft von BGA 06 aber auch wieder das bereits erwähnte TRF-84bp, sogar mit einer noch höheren relativen Häufigkeit als in BGA 03 (**Abbildung 11B**). Möglicherweise sind die Mikroorganismen, die durch dieses TRF repräsentiert werden, potentielle Indikatoren für Stresssituationen im Prozess, vor allem in Bezug auf die Bildung von prozessungünstigen Säuren. Um diese Vermutungen aufzuklären, sind jedoch weiterführende Studien dringend erforderlich.

II.1.5 Zitierte Literatur

DEMIREL B., SCHERER P. (2008): The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. Rev Environ Sci Biotechnol 7: 173-190

DUFRÊNE M., LEGENDRE P. (1997): Species assemblges and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. Ecological Monographs 67: 345-366

LIU W.T., MARSH T.L., CHENG H., FORNEY L.J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 63: 4516-4522

MARZORATI M., WITTEBOLLE L., BOON N., DAFFONCHIO D., VERSTRAETE W. (2008): How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. Environ Microbiol 10: 1571-1581

QUAST C., PRUESSE E., YILMAZ P., GERKEN J., SCHWEER T., YARZA P., PEPLIES J., GLÖCKNER F.O. (2013): The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res 41: D590-D596

RADEMACHER A., NOLTE C., SCHÖNBERG M., KLOCKE M. (2012): Temperature increases from 55 to 75°C in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within the bacterial and archaeal community structure. Appl Microbiol Biotechnol 96: 565-576

READ S., MARZORATI M., GUIMARÃES B.C.M., BOON N. (2011): Microbial resource management revisited: successful parameters and new concepts. Appl Microbiol Biotechnol 90: 861-871

VERSTRAETE W., WITTEBOLLE L., HEYLEN K., VANPARYS B., DE VOS P., VAN DE WIELE T., BOON N. (2007): Microbial resource management: the road to go for environmental biotechnology. Eng Life Sci 7: 117-126

WANG Q., GARRITY G.M., TIEDJE J.M., COLE J.R. (2007): Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol 73: 5261-5267

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Alle Arbeiten wurden wie ursprünglich in der Vorhabenbeschreibung dargestellt durchgeführt. Änderungen im Arbeitsprogramm wurden in den jährlichen Zwischenberichten sowie in Kap. I.3 dargestellt.

Die finanzielle Abwicklung erfolgte zentral durch die Buchhaltung des ATB. Hierzu folgt ein gesonderter Verwendungsnachweis. Aus Sicht der Projektleitung erfolgten jedoch alle Ausgaben entsprechend der Vorhabenbeschreibung und bestimmungsgemäß.

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

In diesem Vorhaben sollten folgende wissenschaftliche Ziele erreicht werden:

(1) kultivierungsunabhängige Charakterisierung der bakteriellen und archaeellen Bio-zönosen in zehn ausgewählten landwirtschaftlichen Biogasanlagen,

(2) Analyse der Dynamiken innerhalb der mikrobiellen Lebensgemeinschaften,

(3) Ermittlung von hauptsächlichen Einflussfaktoren auf die Prozessmikrobiologie,

(4) Analyse des Einflusses von Struktur und Dynamik der mikrobiellen Gemeinschaft auf die Reaktorleistung (Abbaurate, Biogas- bzw. Methan-Bildung).

Die hierzu durchgeführten Arbeiten waren notwendig zur Erreichung der o.g. Ziele und in ihrem Umfang und Kostenumfang angemessen.

II.4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das Forschungsvorhaben ist im Bereich der anwendungsorientierten Grundlagenforschung angesiedelt. Die erarbeiteten Ergebnisse sollen daher primär als wissenschaftliche Fachpublikationen (Schlussbericht, Tagungsteilnahmen, Artikel in Fachzeitschriften) der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden. Eine Übersicht über die geplanten und erfolgten Veröffentlichungen wird in Kap. II.6 gegeben.

Nach Auswertung der Daten sollen alle genombasierten Daten in öffentlichen Datenbanken hinterlegt werden, um sie so für weitere wissenschaftliche Arbeiten zur Verfügung zu stellen. Die weltweit größte Datenbank hierfür ist die GenBank-Datenbank des US- National Center for Biotechnology Information.

II.4.1 Validierung der identifizierten Biomarker

Aufgrund der umfangreichen Daten, die in den zwei Verbundprojekten BIOGAS-BIOCOENOSIS und BiogasEnzyme in mehrjähriger Arbeit erzeugt wurden, konnten in diesem Schlussbericht nur einzelne besonders herausragende Ergebnisse dargestellt werden. Derzeit werden weitere Metaanalysen der Daten durchgeführt, insbesondere Korrelationsanalysen der verfahrenstechnisch-chemischen und der mikrobiologischen Daten unter- und miteinander. Hierbei sollen zudem stärker die umfangreichen Datens-

ätze aus der *rrs*-Amplicon-Sequenzierung (Teilvorhaben 2, FKZ 22028711) sowie die Metaproteomanalyse (Teilvorhaben 3, FKZ 22028811) genutzt werden.

Wie in Kap. II.1 dargestellt, konnten jedoch eine Reihe von Biomarkern für bestimmte Prozesszustände ermittelt werden, u. a. für Prozessstörungen wie Schwimmdeckenbildung oder Fehlsilierung des Substrates. Bislang handelt es sich hierbei jedoch um Marker auf molekularer Ebene, d. h. diese Marker müssen erst noch einem konkreten Mikroorganismus zugeordnet werden. Im Einzelnen sind folgende weiterführenden Arbeiten erforderlich:

(1) Ermittlung der Gesamtsequenz des 16S rRNA Gens (*rrs*-Sequenzen) für die ermittelten TRFs bzw. *rrs*-Amplicons aus den Rückstellproben;

(2) Gewinnung von Isolaten mit Hilfe einer marker-gestützen Selektion;

(3) Sequenzierung des Genoms isolierten Arten;

(4) bioinformatische Analyse der funktionellen Eigenschaften der Isolate;

(5) Ableitung art-spezifischer Marker für einen Schnellnachweis z.B. mittels quantitativer PCR;

(6) Ableitung funktioneller Marker für bestimmte Stoffwechseleigenschaften der Isolate ggf. auf Ebene der RNA als Aktivitätsnachweis;

(7) Nachweis des Vorkommens bzw. der Aktivität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen;

(8) Simulierung von Stresszuständen in Modellfermentationen und Monitoring der Zielorganismen zur Verifizierung der Eignung als Biomarker;

(9) Modellierung der Systemmikrobiologie unter besonderer Berücksichtigung der neuen Biomarker und ihres Einflusses auf die Biomethanisierung.

Es ist beabsichtigt, diese Arbeiten zeitnah im Rahmen eines gesonderten Forschungsvorhabens durchzuführen. Eine wesentliche Voraussetzung hierzu ist insbesondere die Verknüpfung mit den laufenden Forschungsvorhaben BIOGAS-CORE – Etablierung eines *core*-Mikrobioms für Biogasanlagen (BMEL 22017111), BIOGAS-MARKER – Bioindikatoren der Biogasfermentation (BMBF 03SF0440) und BioMetModell – Analyse und Modellierung der Biomethanisierung von pflanzlicher Biomasse (DFG KL 2069/3-1).

II.4.2 Fortsetzung des mikrobiologischen Monitorings von landwirtschaftlichen Biogasanlagen

Im Rahmen dieses Vorhabens konnten umfassende Erfahrungen bei der chemischen und mikrobiologischen Analytik von Probenmaterial aus Biogasanlagen gesammelt werden. Weitere wesentliche Erkenntnisse hinsichtlich der mikrobiologischen Untersuchung von Praxisanlagen sind insbesondere folgende:

(1) Die Probenahme aus Biogasanlagen muss grundsätzlich durch qualifiziertes Personal erfolgen. Bei einer Beprobung durch den Anlagenbetreiber besteht das Risiko einer ungeeigneten Probenahme.

(2) Die Lagerung und der Transport des Probenmaterials müssen unter kontrollierten Bedingungen erfolgen. Insbesondere müssen Kühlketten gewahrt bleiben, um die weitere mikrobielle Stoffwechselaktivität zu unterbinden.

(3) Für zellbiologische Untersuchungen insbesondere der metabolisch aktiven Mikroorganismen muss eine chemische Fixierung unmittelbar nach der Probenahme erfolgen. Jede zeitliche Verzögerung führt zu Veränderungen innerhalb der stoffwechselaktiven Gemeinschaft.

(4) Die Untersuchung von zehn Biogasreaktoren ermöglicht nur sehr begrenzt Aussagen über Zusammenhänge zwischen Mikrobiologie und Reaktorleistung, da die mikrobiellen Biozönosen vielfältiger und variabler als ursprünglich angenommen sind.

(5) Die vollständige Erfassung der mikrobiellen Diversität ist nur mittels moderner Hochdurchsatz-Verfahren möglich. Entsprechende Verfahren konnten im Rahmen von BIOGAS-BIOCOENOSIS etabliert werden.

(6) Aufgrund der speziellen Limitierungen jedes einzelnen methodischen Ansatzes ist eine polyphasische Analyse mit der Kombination verschiedener Ansätze unerlässlich. Von besonderem Interesse ist dabei die Unterscheidung zwischen stoffwechselaktiven und -inaktiven Mikroorganismen, der jeweiligen funktionellen Eigenschaften, ihrer Populationsgröße sowie ihrer Dynamiken im Prozessverlauf.

Geplant ist daher die Durchführung eines wesentlich umfangreicheren Monitoringprogramms unter Berücksichtigung aller vorgenannten Prämissen. Eine entsprechende Skizze wurde bereits bei dem Projektträger Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. eingereicht. Im Rahmen des vorgeschlagenen Forschungsvorhabens sollen daher folgende wissenschaftlichen Ziele erreicht werden:

(1) repräsentative Auswahl und Beprobung von 100 landwirtschaftlichen Biogasanlagen in ganz Deutschland;

(2) Anwendung einer auf die spätere mikro- und molekularbiologische Analyse hin optimierten Probenahmestrategie;

(3) kultivierungsunabhängige Erfassung der mikrobiellen Diversität mittels Hochdurchsatz-Amplikon-Sequenzierung des prokaryontischen 16S rRNA Gens;

(4) kultivierungsunabhängige Erfassung der stoffwechselaktiven Mikroorganismen auf Basis des mikrobiellen Metaproteoms;

(5) Entwicklung und Etablierung von quantitativen Nachweisverfahren für ausgewählte Großgruppen von Mikroorganismen.

II.4.3 Erfassung der mikrobiologischen Ursachen für Prozessstörungen

Ein wesentliches Ergebnis dieser Studie ist, dass die in landwirtschaftlichen Biogasanlagen vorliegenden mikrobiellen Gemeinschaften nicht uniform sind. In einem Biogasreaktor existieren vielmehr verschiedene räumliche, zeitliche und ökologische „Nischen“, die von unterschiedlichen Arten von Mikroorganismen besetzt werden können. Nichtsdestotrotz zeigen nicht zuletzt auch die Ergebnisse von BIOGAS-BIOCOENOSIS, dass bestimmte Arten von Mikroorganismen an typische Prozessstörungen wie z.B. Übersäuerung durch zu hohe Raumbelastungen, Fehlversäuerung durch Bildung ungünstiger Gärsäuren (z.B. Propionat) oder Fehlversäuerung durch Eintrag ungünstiger Sub-

strate (z.B. fehlvergorene Silagen) besser angepasst sind als andere. Solche Arten sind u.U. geeignet als mikrobielle Indikatoren für fehllaufende Prozesse zu dienen, eventuell sogar als „Frühwarn-“ Indikatoren.

Obwohl Modellfermentationen im Labormaßstab grundsätzlich zur Prozesssimulation geeignet sind, besteht die grundsätzliche Frage, inwieweit Labormodelle der Praxis entsprechen bzw. überhaupt entsprechen können. Idealerweise sollten daher Prozessstörungen in der Praxis untersucht werden. Entsprechende Arbeiten sind jedoch nur schwer umzusetzen, da nur wenige Anlagen im Praxismaßstab für Experimentalarbeiten zur Verfügung stehen. Folgende Schwierigkeiten in diesem Zusammenhang sind zu berücksichtigen: (1) Wenn Modellanlagen verfügbar sind, stehen diese nur für einen begrenzten Zeitraum zur Verfügung oder bieten nur sehr wenige Möglichkeiten zur experimentellen Variation. (2) Anlagenbetreiber sind nicht bereit, gut laufende Anlagen durch eine Variation des Prozessregimes zu gefährden. (3) Störungen in der Praxis können schwer im Voraus prognostiziert werden. (4) Langzeitbeobachtungen einzelner Praxis-Anlagen sind mit einem hohen logistischen Aufwand verbunden und binden viele Ressourcen, ohne jedoch das Auftreten von Prozessstörungen zu garantieren. (5) An Forschungsinstituten können schwerlich Personal und technische Ressourcen zur spontanen Bearbeitung etwaiger Schadensfälle bereitgehalten werden.

Eine Lösung könnte darin liegen, in enger Zusammenarbeit mit Ingenieurbüros und einzelnen Anlagenbetreibern ein Verfahrensprotokoll zur Dokumentation und Analyse von Prozessstörungen zu etablieren. Bei einer rechtzeitigen Information könnten dann Einzelfallanalysen der Prozessmikrobiologie unter Nutzung des in früheren Vorhaben etablierten Methodenspektrums an kultivierungsunabhängigen aber auch kultivierungsbasierten Verfahren durchgeführt werden.

Ein entsprechendes Konzept mit dem Titel BIOGAS-LIVE – Fehlvergärungen und Prozessstörungen in landwirtschaftlichen Biogasanlagen – Etablierung und Umsetzung eines Labor- und Verfahrensprotokolls zur zeitnahen Ursachenaufklärung unter besonderer Berücksichtigung der Prozessmikrobiologie wurde bereits bei dem Projektträger Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. eingereicht.

II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Eine Abfrage in der Literaturdatenbank Web-of-Knowledge der Fa. Thompson-Reuters am 10.01.2014 für die Stichwörter „*agricultural biogas plant T-RFLP*“ in der Rubrik „*Topic*“ ergab keine Einträge. Eine weitere Recherche mit den Stichwörtern „*biogas microbial community*“ ergab 18 Treffer.

Eine Publikation (CARBALLA *et al.* 2011, Appl Microbiol Biotechnol 89: 303-314) befasst sich zwar mit den Zusammenhängen zwischen der Prozessmikrobiologie und chemisch-physiklaischen Prozessparametern, dies jedoch im Labormaßstab. In drei weiteren Publikationen (PYCKE *et al.* 2011, Water Sci Technol 63: 769-775; REGUEIRO *et al.* 2012, Microbiol Res 167: 581-589; QIAO *et al.* 2013, Bioresour Technol 143: 512-518)

werden Ergebnisse zur mikrobiellen Diversität in landwirtschaftlichen Biogasanalagen untersucht, jedoch fehlt hier ein Abgleich (Korrelation) mit den Prozessdaten und demzufolge Rückschlüsse hinsichtlich hauptsächlicher Einflussfaktoren auf die Prozessmikrobiologie bzw. hinsichtlich der Einfluss der mikrobiellen Gemeinschaft auf die Prozesseffizienz.

II.6 Veröffentlichungen

II.6.1 Tagungsbeiträge

Eine Auswahl der Ergebnisse wurden auf der Fachtagung 5th Congress of European Microbiologists in Leipzig (21.-25.07.13) einem Fachpublikum in Form einer Posterpräsentation vorgestellt.

- **THEUERL S., KAUSMANN R., HEIERMANN M., KLOCKE M. (2013):** Process microbiology of agricultural biogas plants. 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, Germany, July 21-25, 2013

Weitere Präsentationen sind auf folgenden internationalen Fachtagungen geplant:

- 2nd International Conference on Biogas Microbiology, Uppsala, Sweden, June 10-12, 2014,
- Biogas Science 2014, Vienna, Austria, October 26-30, 2014.

II.6.2 Fachpublikationen

Es ist geplant, wesentliche Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens außer im Schlussbericht auch in Form von wissenschaftlichen Fachartikeln zu veröffentlichen. Mehrere Manuskripte befinden derzeit sich in Vorbereitung.

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Versuchsdurchführung im Verbundprojekt BiogasEnzyme sowie Monitoring für das Forschungsvorhaben BIOGAS-BIOCONOSIS 16

Abbildung 2: Vergleich der mikrobiellen Gemeinschaften in den untersuchten Biogasanlagen auf Basis der ermittelten TRFLP-Profile für die Zeitpunkte KW 30, 2011 und KW 19, 2012 27

Abbildung 3: Substratbeschickung, produzierte Biogasmenge sowie Gesamtsäure- und NH_4^+-N-Gehalt im Juli 2011 sowie über einen Untersuchungszeitraum von 15 Wochen von Februar bis Mai 2012 hinweg 34

Abbildung 4: Strukturelle Zusammensetzung der bakteriellen und archaeellen Gemeinschaft in BGA 04 im Vergleich der fünf analysierten Zeitpunkte 34

Abbildung 5: Korrelation der mikrobiellen Gemeinschaft mit der Prozesstemperatur bezogen auf die bakterielle und archaeelle Populationsstruktur und bezogen auf vier dominante TRFs 37

Abbildung 6: Korrelation von TRF-86bp (repräsentativ für die Gattung *Proteiniphilum*) mit dem Ammoniumstickstoffgehalt und dem Proteingehalt im Gärrest 39

Abbildung 7: Korrelation der Methanogeneseproteine mit der Prozesstemperatur und dem Ammoniumstickstoffgehalt im Gärrest 39

Abbildung 8: Substratbeschickung, produzierte Biogasmenge sowie Gesamtsäure- und NH_4^+-N-Gehalt bei BGA 03 im Juli 2011 sowie über einen Untersuchungszeitraum von 35 Wochen von Februar bis Oktober 2012 42

Abbildung 9: Strukturelle Zusammensetzung der bakteriellen und archaeellen Gemeinschaft in BGA 03 im Vergleich der sieben analysierten Zeitpunkte 43

Abbildung 10: Zusammensetzung des Gärsäurespektrums in BGA 03 zu den Zeitpunkten KW 06, 2012 und KW 23, 2012 45

Abbildung 11: Strukturelle Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften der Biogasanlagen BGA 03 und 06 während (KW28, 2011 und KW30, 11) und nach (KW14, 2012 und KW19, 2012) einer Prozessstörung basierend auf der relativen Häufigkeitsverteilung der erfassten terminalen Restriktionsfragmente 47

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Charakteristika der zehn in dieser Studie untersuchten Biogasanlagen 15

Tabelle 2: Wichtige verfahrenstechnisch-chemische Daten der ausgewählten Praxisanlagen 26

Tabelle 3: Mikrobiologische Kenngrößen im Vergleich der untersuchten Anlagen 28

Tabelle 4: Einfluss und Auswirkung einer thermophilen Prozessführung auf die Struktur der Prozessmikrobiologie 31

Tabelle 5: Einfluss und Auswirkung der Gesamtsäurekonzentration auf die Struktur der Prozessmikrobiologie im Vergleich der Anlagen BGA 02 und BGA 06 32

Tabelle 6: Grundlegende Kenndaten der untersuchten Biogasanlage BGA 04 32

Tabelle 7: Mikrobiologische Kenngrößen der Biogasanlage BGA 04 35

Tabelle 8: Identifizierung von „Schlüssel"-TRFs mittels Indikatorartenanalyse bezogen auf eine Prozesstemperatur von 45°C (KW 30, 2011 und KW 19, 2012), dem höchsten Ammoniumstickstoffgehalt (KW 30, 2011) sowie den zwei Haupttypen der Methanogenese 36

Tabelle 9: Nachweis von Schlüsselenzymen der Methanogenese in BGA 04 40

Tabelle 10: Mikrobiologische Kenngrößen der Biogasanlage BGA 03 44

Tabelle 11: Verfahrenstechnisch-chemische Prozessparameter der Biogasanlagen 03 und 06 während und nach einer Prozessstörung 47

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen - Ermittlung der mikrobiellen Diversität sowie von hauptsächlichen verfahrenstechnischen Einflussfaktoren auf die Mikroflora

BIOGAS-BIOCOENOSIS

Teilvorhaben 2 - Taxonomische Profilierung von Biogas-Gemeinschaften mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung von 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken

Zuwendungsempfänger:

Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie (CeBiTec)
Institut für Genomforschung und Systembiologie

Förderkennzeichen:

22028711

Laufzeit:

01.11.2011 bis **31.10.2013**

Datum der Veröffentlichung: 29. August 2014

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

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

Autoren

Irena Maus

Dr. Andreas Schlüter

Kontakt

Dr. Andreas Schlüter

Universität Bielefeld, Centrum für Biotechnologie (CeBiTec)
Institut für Genomforschung und Systembiologie
Genomforschung Industrieller Mikroorganismen

Universitätsstr. 27
D-33615 Bielefeld

www.cebitec.uni-bielefeld.de

Inhalt

I Hintergrund 60

I.1 Aufgabenstellung 60

I.2 Voraussetzungen 60

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens 60

I.3.1 Herstellung von 16S rDNA Amplikon Bibliotheken 60

I.3.2 Bioinformatische Aufarbeitung der Sequenzdaten und taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaften 61

I.4 Stand der Wissenschaft und Technik 62

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 62

II Ergebnisse 63

II.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse 63

II.1.1 Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaften von zehn Biogas-Produktionsanlagen 63

II.1.2 Wiederholung der taxonomischen Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaften für ausgewählte Biogas-Produktionsanlagen 71

II.1.3 Separate taxonomische Profilierung der bakteriellen Sub-Gemeinschaft von zehn Biogas-Produktionsanlagen 74

II.1.4 Fazit zu Teilvorhaben 2 77

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises 77

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit 77

II.4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse 77

II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 78

II.6 Veröffentlichungen 78

Anhang: Taxonomische Profile 80

Verzeichnis der Abbildungen 85

Verzeichnis der Tabellen 86

I Hintergrund

I.1 Aufgabenstellung

Das CeBiTec arbeitet im Rahmen des Biogas-Biocoenosis-Projekts im Arbeitspaket (AP2) an der Ermittlung der Struktur und Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in Praxisbiogasanlagen mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung des 16S rRNA Markergens. Dieses Gen kodiert für die 16S rRNA der kleinen Untereinheit des Ribosoms der Domänen *Bacteria* und *Archaea*. Es ist ubiquitär in beiden Domänen vorhanden und wird als Marker für phylogenetische Untersuchungen verwendet (BARTRAM *et al*. 2011, NARIHIRO *et al*. 2011).

I.2 Voraussetzungen

Die Ermittlung der Struktur und Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in Praxisbiogasanlagen sollte im Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld durchgeführt werden. Die Verfügbarkeit unterschiedlicher Plattformen für die Hochdurchsatz-Sequenzierung von 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken wie die 454-Technologie (Roche) oder der MiSeq von Illumina bieten die Möglichkeit zur kulturunabhängigen Erfassung der mikrobiellen Diversität eines Habitats. Diese Techniken sind am Cebitec vorhanden und etabliert.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

I.3.1 Herstellung von 16S rDNA Amplikon Bibliotheken

Die zu analysierenden Proben waren Gärreste aus den Hauptfermentern von zehn ausgewählten Biogasanlagen, wobei zwei der zehn beprobten Biogasanlagen zwei Hauptfermenter besaßen, so dass insgesamt zwölf Proben für die Analyse zur Verfügung standen. Die Grundeigenschaften der zu analysierenden Anlagen sind im Schlussbericht von Teilvorhaben 1 (FKZ 22010711) zusammenfassend dargestellt.

Im ersten Schritt wurde die Gesamt-DNA der mikrobiellen Gemeinschaften isoliert. Die DNA-Präparationen erfolgten am Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. und dienten als Ausgangsmaterial für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften (sowohl für Teilvorhaben 2 als auch für Teilvorhaben 1). Die 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken für die Hochdurchsatz-Sequenzierung wurden am CeBiTec der Universität Bielefeld erzeugt. Der grundsätzliche Versuchsablauf ist in der **Abbildung 1** dargestellt.

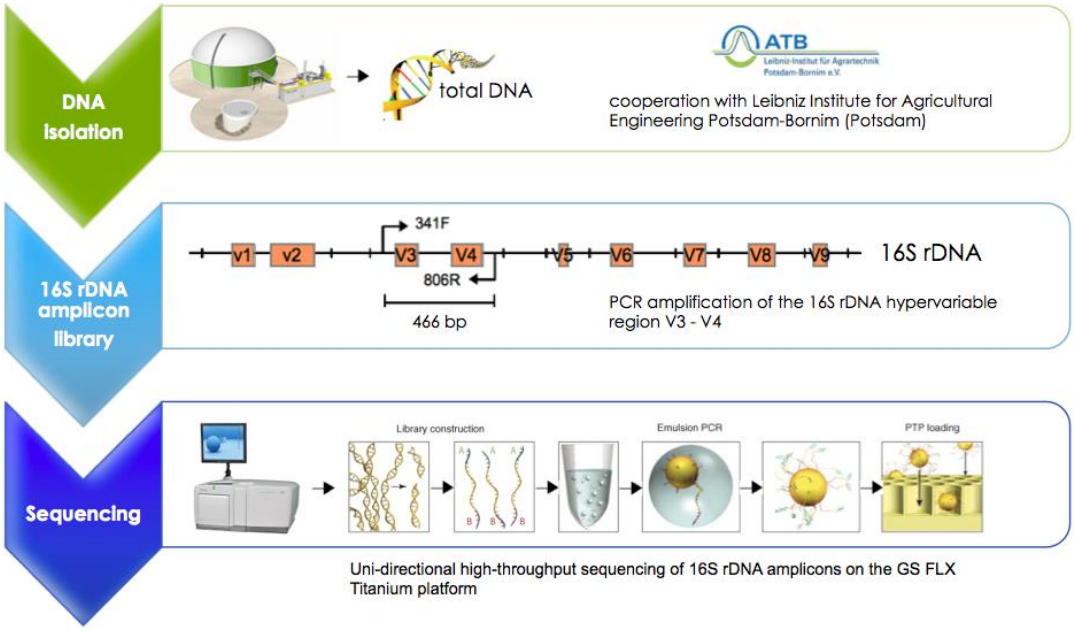


Abbildung 1: Schematische Übersicht zur Erstellung einer 16S rDNA Amplikon-Bibliothek für die Hochdurchsatz Sequenzierung (nähere Erklärungen im Text).

Die 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken wurden mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R; YU *et al*. 2008), die die V3-V4-Region (hypervariable Regionen) des 16S rRNA Gens einschließen, mittels PCR hergestellt. Die erhaltenen 16S rDNA Amplifikate sind im Mittel 466 bp lang und wurden mittels Gelelektrophorese aufgereinigt. Eine anschließende zweite PCR diente der Verknüpfung der amplifizierten DNA mit den *Rapid-Library-MIDs* (*Multiplex-Identifier*) und Sequenzier-Adaptoren. Die zehn Nukleotide langen *MIDs* erlauben die spätere Proben-spezifische Trennung der erhaltenen Sequenzen. Nach einer abschließenden Aufreinigung der gewonnenen PCR-Amplifikate mit dem Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter) erfolgte eine Konzentrations- und Qualitätskontrolle der 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken für die anschließende Sequenzierung auf der *Genome Sequencer* FLX Plattform (Roche).

I.3.2 Bioinformatische Aufarbeitung der Sequenzdaten und taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaften

Für die Analyse von 16S rDNA Amplikon Sequenzen musste eine bioinformatische Pipeline zur Prozessierung und Klassifikation der Sequenzen implementiert werden (**Abbildung 2**). Bei der Erstellung von 16S rDNA Amplikon Sequenzen kann es zu unterschiedlichen Fehlern kommen (z. B. Fehler während der Amplifikation der PCR-Produkte, Chimären-Bildung und Fehler bei der Sequenzierung), die bei Nichtbeachtung zu einer Überschätzung der mikrobiellen Diversität in den Gemeinschaften führen würde. Die Software *mothur* (SCHLOSS *et al*. 2009) vereinigt verschiedene Algorithmen, mit denen eine Fehlerbereinigung möglich ist. Des Weiteren bietet die *Pipeline* die Möglichkeit, einfach repräsentierte Sequenzen (sog. *Singletons*) mit dem Durchlaufen des SLP-Prozessierungsschritts (*Single Linkage Preclustering*) zu identifizieren und aus

dem Datensatz zu entfernen, denn diese können ebenfalls zu einer verfälschten Einschätzung der Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft führen. Als Resultat der unterschiedlichen Filterprozesse liegen anschließend qualitativ hochwertige 16S rDNA Sequenzen vor, die dann weitergehenden Analysen zugeführt werden können. Die taxonomische Klassifizierung erfassten Sequenzen erfolgte durch Vergleiche mit Sequenzen einer Datenbank für 16S ribosomale RNAs mit Hilfe des RDP-Classifer 2.3 (Ribosomal-Database-Project-RDP: rdp.cme.msu.edu). Zur Visualisierung der taxonomischen Profile wurde die Software Krona verwendet (ONDOV *et al*. 2011).

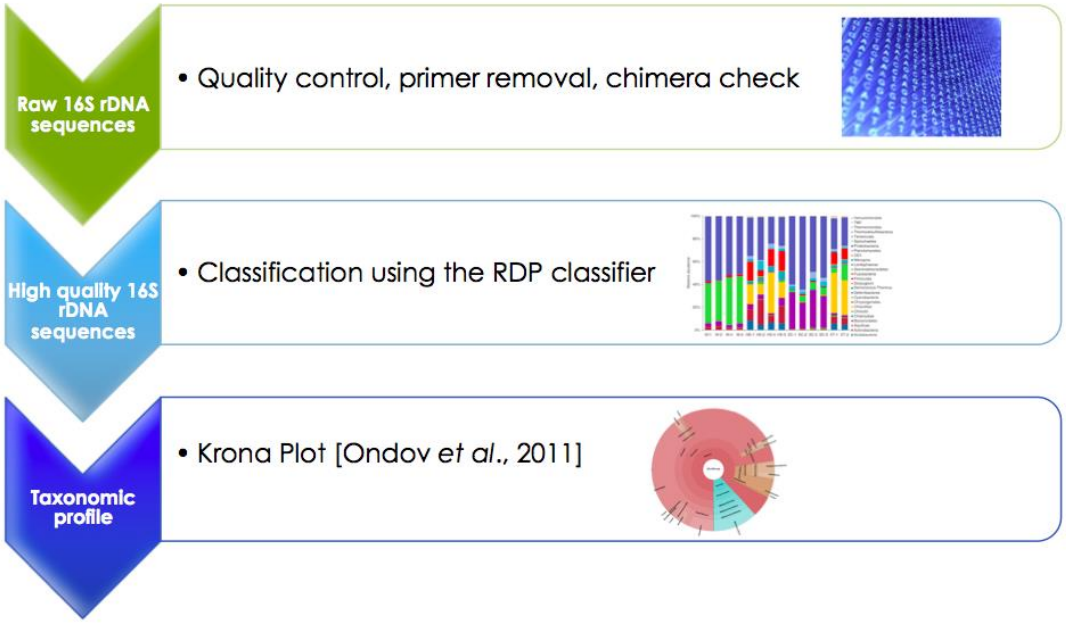


Abbildung 2: Schematische Übersicht der grundlegenden Schritte zur Prozessierung und Klassifikation der 16S rDNA Sequenzen.

I.4 Stand der Wissenschaft und Technik

Aus der wissenschaftlicher Literatur sowie aus verschiedenen Forschungsvorhaben unserer eigenen Arbeitsgruppen ist die grundsätzliche Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaften (bestehend aus den Hauptgruppen *Firmucutes*, *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* usw. auf der taxonomischen Ebene Phylum) in Biogasfermentationen bekannt (KRAUSE *et al*. 2008, SCHLÜTER *et al*. 2008, ZAKRZEWSKI *et al*. 2012, RADEMACHER *et al*. 2012, HANREICH *et al*. 2013). Bislang ist jedoch wenig über den Zusammenhang zwischen Prozessmikrobiologie und der Reaktorleistung in Praxisanlagen beschrieben worden (TOWN *et al*. 2014).

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die direkte Zusammenarbeit umfasste alle Mitglieder des Biogas-Biocoenosis-Konsortiums, besonders die Partner vom Teilvorhaben 1, die Gesamt-DNA der mikrobiellen Gemeinschaften isoliert und zur Verfügung gestellt haben.

II Eingehende Darstellung

I.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

II.1.1 Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaften von zehn Biogas-Produktionsanlagen

Nach erfolgreicher Herstellung von 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken der zwölf zu analysierenden Biogasproben wurden diese auf der *Genome Sequencer* FLX Plattform (Roche) sequenziert. Die gewonnenen Sequenzdaten sind anschließend einer im Abschnitt II.2 beschriebenen bioinformatischen Verarbeitung unterzogen worden. **Tabelle 1** fasst die gesamte Prozessierungsstatistik zusammen und gibt einen Überblick über die wichtigsten Filterprozesse der zwölf zu analysierenden Datensätzen.

Tabelle 1: Statistik der Sequenzierungsergebnisse der erzeugten 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken und Prozessierung der Daten mit bioinformatischen Methoden.

Sample	No. of raw sequences	No. of sequences after quality trimming: Length 200-530 bp Phred > 20 No. mismatches in primer = 2 No. mismatches in MID =1 No. ambiguous bases = 0	No. of sequences after Chimera check
BGP 1-1	45282	26988	20494
BGP 1-2	51875	36128	24131
BGP 2	48629	29916	23298
BGP 3	50153	33691	26272
BGP 4	46033	30946	23022
BGP 5-1	46712	22916	17254
BGP 5-2	50127	29216	21999
BGP 6	88151	57415	21999
BGP 7	47980	29555	22442
BGP 8	46676	28563	21333
BGP 9	47022	28512	22304
BGP 10	49987	31606	23173

Taxonomische Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Vergleich einer mesophil und einer thermophil betriebenen Biogasanlage

Die taxonomische Struktur der Biogasgemeinschaften wurde mit der Software Krona visualisiert und ist in **Abbildung 3** für zwei Biogas-Produktionsanlagen exemplarisch dargestellt (taxonomische Charakterisierung der restlichen Biogasgemeinschaften befindet sich im Anhang). Bei den beiden aufgezeigten Beispielen handelt es sich um eine

mesophil betriebene Biogasanlage (BGA 4, 490 kW Anlage, kontinuierliche Vergärung von Maissilage, Roggenganzpflanzensilage, Rindermist und Rindergülle), die im Vergleich zu einer thermophil betriebenen Biogasanlage (BGA 5, erster Hauptfermenter, 500 kW Anlage, kontinuierliche Vergärung von Maissilage und Hühnertrockenkot) betrachtet wird.

Nach der Sequenzierung standen für Anlage 4 46.033 Einzelsequenzen und für Anlage 5 46.712 Einzelsequenzen zur Verfügung. Nach der Qualitätskontrolle, dem Chimären Check und dem Durchlaufen des SLP-Prozessierungsschritts (*Single Linkage Preclustering*) verblieben noch 23.022 hochwertige Sequenzen für die Anlage 4 und 22.916 hochwertige Sequenzen für die Anlage 5, die für die taxonomische Profilierung dieser Anlagen ausgewertet wurden.

Die taxonomische Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften aus den untersuchten Biogas-Produktionsanlagen zeigt, dass die mikrobielle Gemeinschaft von Bakterien dominiert wird (98 % aller Sequenzen für BGP 4 und 99 % für BGP 5), während nur in Biogasanlage 4 2 % der Sequenzen als *Archaea* klassifiziert wurden. Ein geringer Anteil an Sequenzen (1 %) ist im Datensatz der Biogasanlage 5 als nicht klassifiziert gekennzeichnet. Nach dem Abgleich der Sequenzen gegen die Datenbank für 16S ribosomale RNAs wurde kein Treffer erzielt.

Die 16S rDNA Amplikon-Sequenzen der beiden Biogasanlagen wurden hauptsächlich dem Phylum *Firmicutes* zugeordnet (67 bis 70 %). Die meisten dieser Sequenzen gehören der Klasse *Clostridia* an (47 bis 52 %), gefolgt von *Bacteroidetes* (15 %) in der Anlage 4 und *Thermotogae* (11 %) in der Anlage 5. Das Phylum *Euryarchaeota* ist mit ca. 2 % der Sequenzen nur in der Anlage 4 repräsentiert, während 0,06 % der Sequenzen in der Anlage 5 dem Taxon *Archaea* zugeordnet werden konnten. Auf der taxonomischen Ebene Klasse sind für die Anlage 4 die *Clostridia* (52 %), *Bacteroidia* (7 %) und *Methanomicrobia* (2 %) die dominanten Taxa, während für die Anlage 5 die Taxa *Clostridia* (47 %), *Bacteroidetes* (1 %) und *Thermotogae* (0,9 %) die prominentesten sind. Auf der taxonomischen Ebene Familie spielen für die Anlage 4 die Taxa *Ruminococcaceae* (9 %) gefolgt von *Porphyromonadaceae* (6 %) sowie *Clostridiales incertae sedis* (4 %) und *Methanomicrobia* (2 %) und für die Anlage 5 die Taxa *Clostridiales incertae sedis* (6 %), *Ruminococcaceae* (4 %) sowie *Thermotogaceae* (0,9 %) eine Rolle. *Methanosaeta* ist der abundanteste Genus der *Archaea*. Weitere prominente Genera der beiden Anlagen sind die Folgenden: *Sedimentibacter* (4 %), *Clostridium III* (3 %), und *Petrimonas* (0,8 %) in der mesophilen Anlage sowie *Tepidimicrobium* (5 %) und *Halocella* (0,8 %) in der thermophilen Anlage.

Eine weiterführende komparative Analyse der beiden Profile zeigte eine starke Reduzierung des Anteils an *Bacteroidetes* in der mikrobiellen Gemeinschaft der thermophil betriebenen Anlage vergleichen mit der mikrobiellen Gemeinschaft der mesophil betriebenen Anlage (**Abbildung 3A** und **3B**). Des Weiteren ist in der thermophilen Anlage eine hohe Abundanz der *Thermotogales* mit *Thermotogaceae* als der abundantesten Familie in dieser Ordnung zu beobachten. Die bekannten Spezies der *Thermotogales* wurden

zwar aus verschiedenen geothermal oder vulkanisch geprägten Habitaten isoliert, *Thermotoga neapolitana* ist aber auch in Biogas-Produktionsanlagen zu finden (DE VRIJE *et a*l. 2009). Das Phylum *Thermotogae* besteht aus einer weitgehend homogenen Gruppe von überwiegend thermophilen, heterotrophen, anaeroben Bakterien (GUPTA *et al*. 2011). Einige Vertreter des Phylums können verschiedene komplexe Kohlenhydrate wie Xylan und Cellulose als Energiequelle nutzen, wobei Wasserstoff (H2) freigesetzt wird (GUPTA *et al.* 2011, DE VRIJE *et al*. 2009). Möglicherweise übernehmen die Vertreter dieses Phylums die Aufgabe der *Bacteroidetes*, von denen aus der Literatur bekannt ist, dass sie unter mesophilen Bedingungen mit der Hydrolyse komplexer Polymere assoziiert sind (JAENICKE *et al*. 2011).

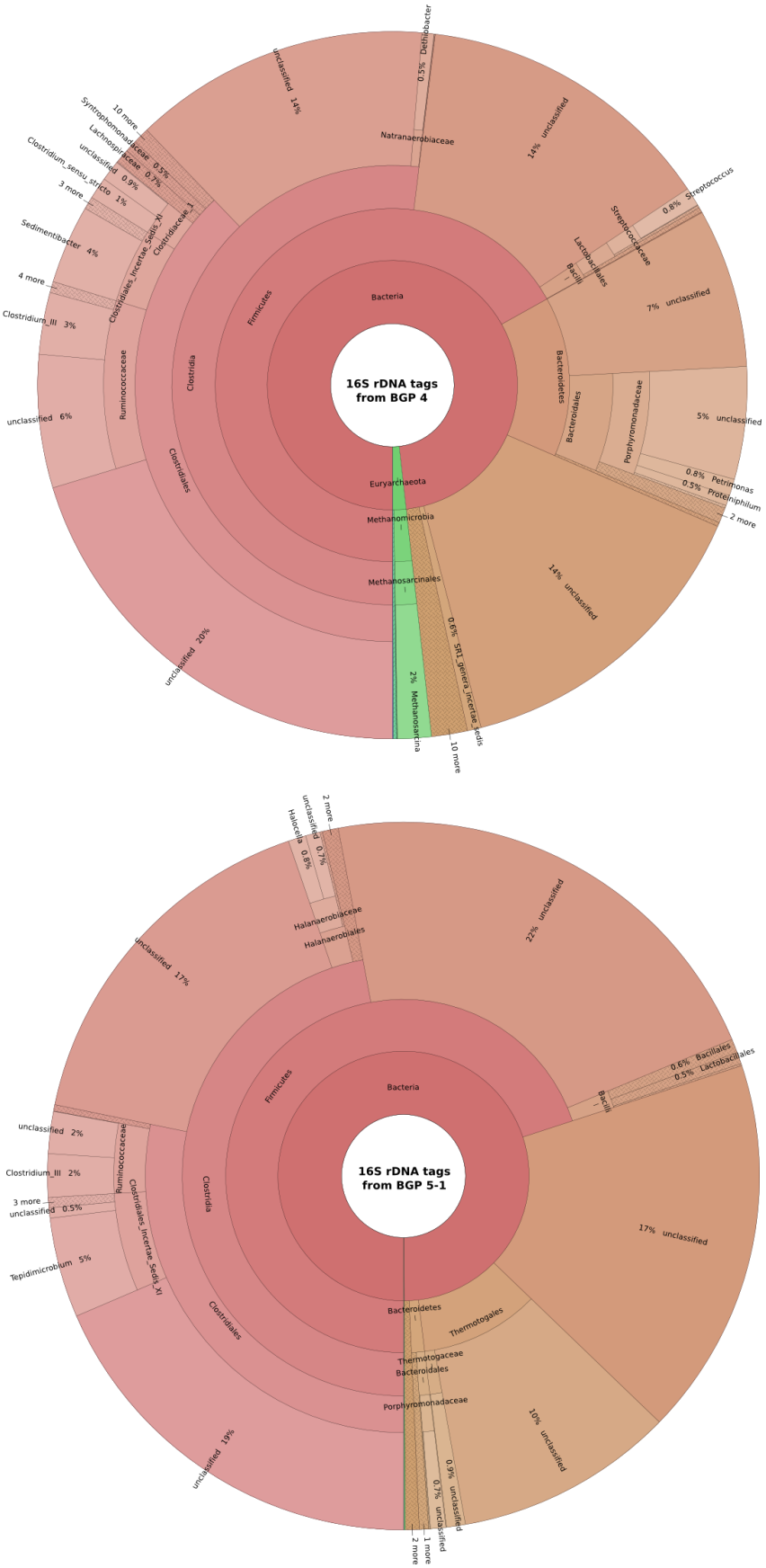


Abbildung 3: Taxonomische Profilierung einer mesophilen (oben) und thermophilen (unten) Biogasanlage basierend auf 16S rDNA Amplikon-Sequenzen. Die Amplikon-Sequenzen wurden mit dem RDP-Classifier klassifiziert. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe des Programms Krona (2.1).

Struktur der bakteriellen Gemeinschaften im Vergleich aller zehn Biogasanlagen

Für komparative Analysen der mikrobiellen Gemeinschaften von allen untersuchten Biogas-Produktionsanlagen wurden die taxonomischen Profile auf den Ebenen Phylum, Klasse und Familie betrachtet (**Abbildung 4-6**). Alle zehn taxonomischen Profile zeigen die Dominanz des Phylums *Firmicutes* (69-94 %), gefolgt von *Bacteroidetes* (1-23 %). Insbesondere sind hohe Anteile des Phylums *Bacteroidetes* in den Biogasanlagen 3 (14 %), 4 (23 %) und 7 (23 %) zu erkennen (**Abbildung 4**). Einen hohen Anteil an Sequenzen, die anderen Phyla (*Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Thermotogae* usw.) in variierenden Anteilen angehören (dunkelblau in **Abbildung 4**), zeigen die Biogasanlagen 4, 5, 6 und 9.

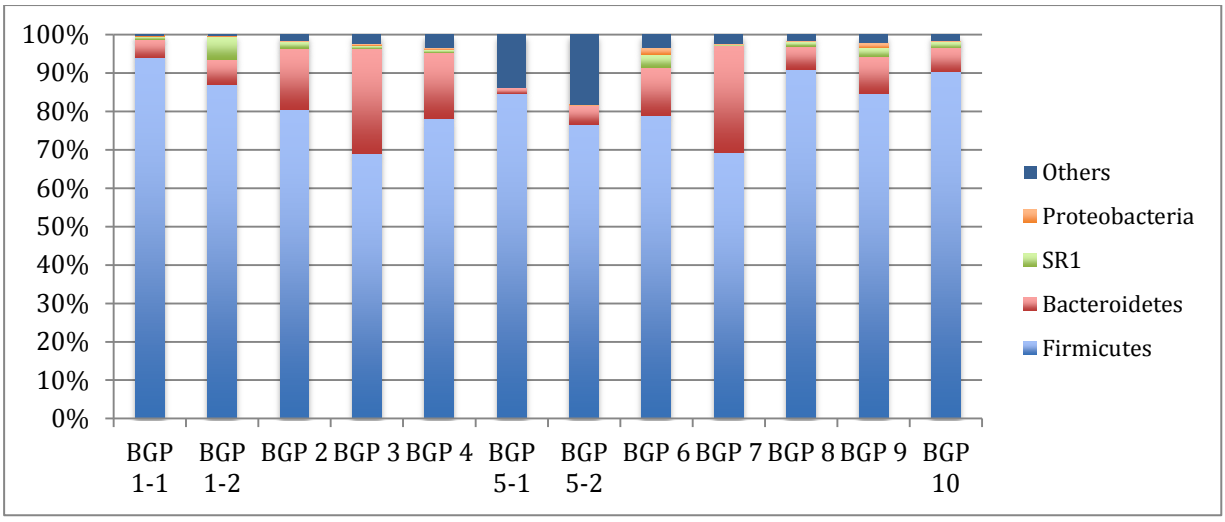


Abbildung 4: Abundanz von prominenten Taxa der mikrobiellen Gemeinschaften der untersuchten Biogas-Produktionsanlagen auf der Ebene Phylum. Die taxonomische Klassifikation erfolgte anhand von 16S rDNA Amplikon-Sequenzen. Die abundantesten Phyla in allen zehn Biogas-Produktionsanlagen sind die der *Firmicutes* und *Bacteroidetes* in variierenden Anteilen.

Die am stärksten vertretene Klasse des Phylums *Firmicutes* ist die der *Clostrida* (69 %-94 % aller Sequenzen), gefolgt von SR1 *class incertae sedis* (1-5 %) und *Bacilli* (1-2 %) in neun von zehn untersuchten Anlagen sowie die Klasse *Bacteroidia* (1-12 %), aus dem Phylum *Bacteroidetes* (**Abbildung 5**). Vertreter der Klasse *Clostridia* können komplexe Kohlenhydrate wie z.B. zellulosehaltiges Material anaerob aufschließen (GUEDON *et al*. 2000) Die Vertreter des Phylums *Bacteroidetes,* wie z.B. *Petrimonas sulfuriphila* (GRABOWSKI *et al*. 2005), sind in der Literatur ebenfalls mit Hydrolyse von komplexen Polymeren in Zusammenhang gebracht worden. Die beispielsweise nach der Glucose Fermentation entstandene Endprodukte Acetat, H_2 und CO_2 repräsentieren die wichtigsten Substrate für die Synthese von Methan durch methanogene *Archaea*.

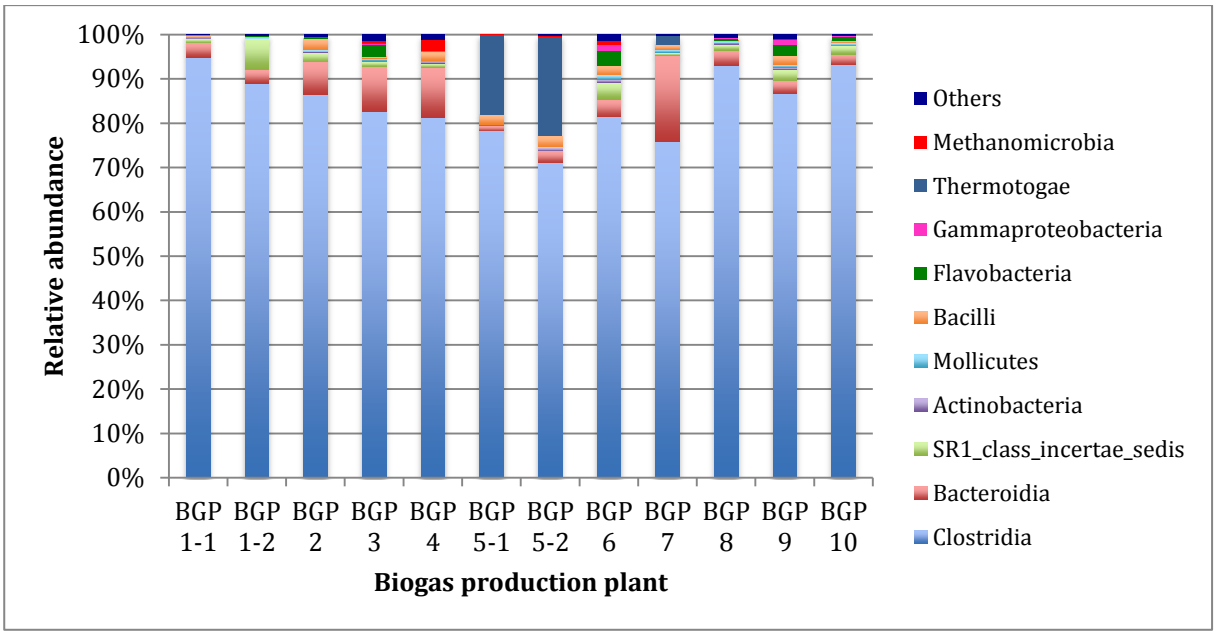


Abbildung 5: Abundanz von prominenten Taxa der mikrobiellen Gemeinschaften der untersuchten Biogas-Produktionsanlagen auf der Ebene Klasse. Die taxonomische Klassifikation erfolgte anhand von 16S rDNA Amplikon-Sequenzen. Die abundantesten Klassen in allen zehn Biogas-Produktionsanlagen sind *Clostridia* und *Bacteroidia*, mit Ausnahme der Klasse *Thermotogae* in der thermophilen Biogasanlage 5.

Neben den aufgezeigten strukturellen Gemeinsamkeiten der mikrobiellen Biozönosen, konnten allerdings auch Unterschiede in den taxonomischen Profilen beobachtet werden. Es ist zu vermuten, dass unterschiedliche Prozessparameter und Substratzusammensetzungen für diese Unterschiede verantwortlich sind. So zeigen beispielsweise die Biogasanlagen 2 und 3, die leichte Unterschiede in der Substratzusammensetzung aufweisen (Anlage 2 wird mit Mais-, Gras- und Roggen-Ganzpflanzensilage sowie Rindergülle als Substrate betrieben, während die Anlage 3 zusätzlich zu den genannten Substraten Ferkelmist erhält), eine sehr ähnliche *Core*-Gemeinschaft. Unterschiede ergeben sich jedoch hinsichtlich variierender Anteile an *Bacilli,* die häufig an der Lactatproduktion beteiligt sind und der *Flavobacteria,* die in die Fermentation von organischen Verbindungen involviert sind (**Abbildung 4**). Die Anlage 2 wird mit Mais, Roggen-Ganzpflanzensilage Gras und Rindergülle als Substrate betrieben, während die Anlage 3 zusätzlich zu den genannten Substraten Ferkelmist erhält. Der Einsatz von Ferkelmist bedingt möglicherweise das Vorkommen von *Flavobacteria* und *Bacteroidia* in der Anlage 3. Auch der Anlagentyp kann einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft haben. Bei der Anlage 2 handelt es sich um einen kontinuierlichen Rührkesselreaktor (*Continuous Stirred Tank Reactor,* CSTR) mit einer separat vorgeschalteten Hydrolysestufe, während die Biogasanlage 3 einen *Plug-Flow*-Fermenter betreibt. Derzeit lässt sich aber noch nicht ableiten, welche Mikroorganismen besonders gut an den einen oder anderen Anlagentyp angepasst sind.

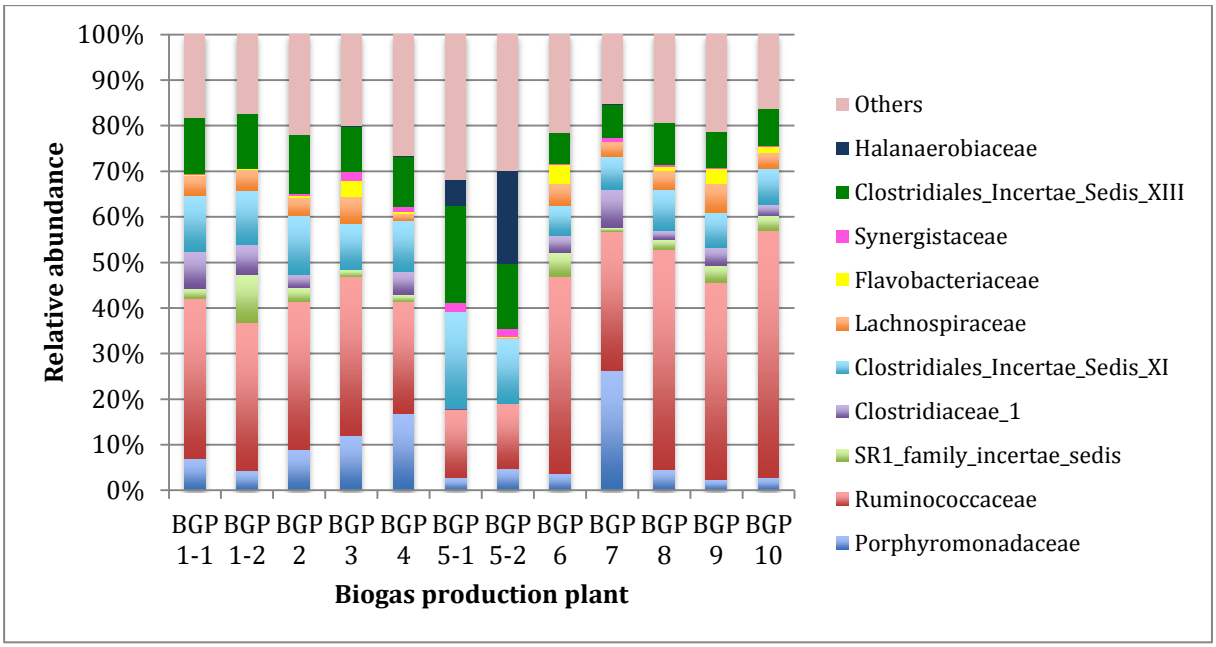


Abbildung 6: Relative Häufigkeiten von zehn Familien bakterieller Sub-Gemeinschaften der zehn untersuchten Biogas-Anlagen. Die taxonomische Klassifikation erfolgte anhand von 16S rDNA Amplikon-Sequenzen. Die prominenteste Familie in den zwölf 16S rDNA Datensätzen ist *Ruminococcaceae*, gefolgt von *Clostridiales Incertae Sedis* XIII und *Clostridiales Incertae Sedis* XI in variierenden Anteilen.

Auf der taxonomischen Ebene der Familie ist die Dominanz von *Ruminococcaceae* (4-25 %) gefolgt von *Clostridiales Incertae Sedis* XIII (8-21 %), *Clostridiales Incertae Sedis* XI (5-19 %) sowie *Lachnospiraceae* (1-4 %) in variierenden Anteilen zu beobachten (**Abbildung 6**). Ein Großteil der erhaltenen Sequenzen konnte zu der Familie *Porphyromonadaceae* (11-26 %) klassifiziert werden. Die Abundanz dieser Familie ist insbesondere in der Biogasanlage 4 (11 %) und 7 (26 %) deutlich. Interessanterweise zeigt die thermophile Biogasanlage 5 die Dominanz von *Halanaerobiaceae* (4-19 %) und repräsentiert somit die einzige Anlage im Rahmen des Biogas-Biocoenosis Projektes, die diese Familie im taxonomischen Profil aufweist. Bekannte Vertreter dieser Familie, wie *Halanaerobium sehlinense* sp., sind extrem halophile, strickt anaerobe Bakterien, die durch die Fermentation von Monosacchariden Lactat, Acetat, Formiat, Ethanol, Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Wasserstoff (H_2) bilden.

Eine komparative Betrachtung der zehn untersuchten Biogasanlagen mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*; PCA ist in der *Software* U-CHIME implementiert; EDGAR *et al*. 2011) zeigt, dass die mikrobiellen Gemeinschaften der Biogasanlagen, die ähnliche Substratzusammensetzungen aufweisen, im *PCA*-Plot gemeinsam *clustern* (**Abbildung 7**). Es bestehen zwar Unterschiede in der Zusammensetzung der jeweiligen Gemeinschaften, bei Betrachtung der jeweiligen *Core*-Gemeinschaften wird jedoch ersichtlich, dass der Einsatz von ähnlichen/gleichen Substraten zu einer ähnlichen mikrobiellen Gemeinschaft führt. So *clustern* die taxonomischen Profile der Biogasanlagen 2, 3, 4 und 7 in unmittelbarer Nähe im *PCA Plot*. Diese Anlagen erhielten zellulosehaltige Biomasse mit variierenden Anteilen von Rinder- und

Schweinegülle. Die genannten Anlagen verarbeiteten keinen Hühnertrockenkot. Ebenso *clustern* die taxonomischen Profile der jeweils doppelt vorhandenen Hauptfermenter der Biogasanlagen 1 und 5 zusammen. Diese wurden jeweils unter vergleichbaren Bedingungen betrieben. Basierend auf den erzielten Ergebnissen lasst sich ableiten, dass der Einsatz von ähnlichen Substraten und der Erhalt von vergleichbaren Prozessbedingungen demnach zu einer vergleichbaren mikrobiellen *Core*-Gemeinschaft zum Zeitpunkt der Probename geführt haben sollte.

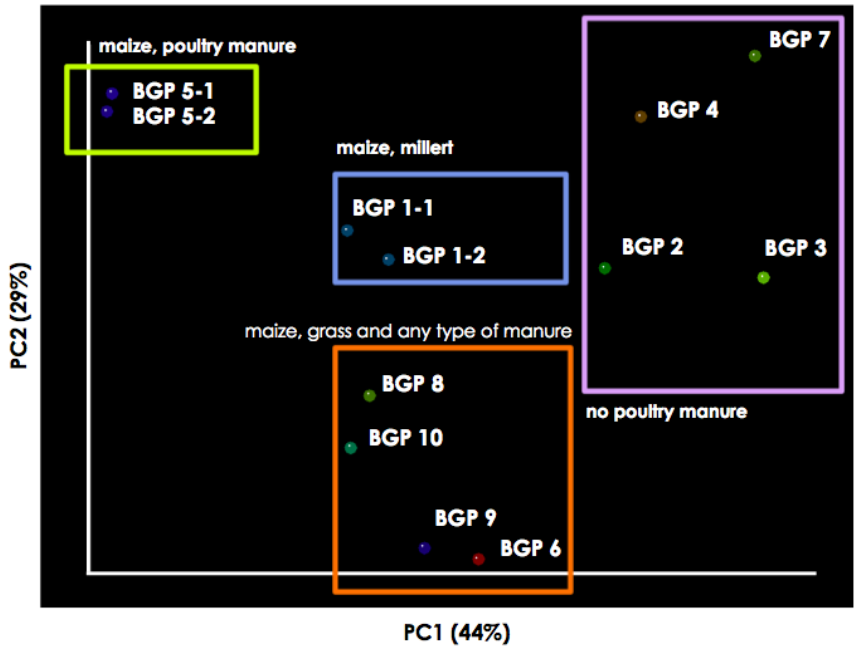


Abbildung 7: Komparative Betrachtung der taxonomischen Profile der zehn untersuchten Biogas-Produktionsanlagen, basierend auf einer Hauptkomponentenanalyse (*principal component* analysis, *PCA*) mittels der *Software* UCHIME. Biogas-Produktionsanlagen deren mikrobielle Gemeinschaften Gemeinsamkeiten aufweisen, *clustern* in dieser Analyse in räumlicher Nähe zueinander. Biogas-Produktionsanlagen, die ähnliche Substratzusammensetzungen aufweisen, sind durch farbige Kästchen in der Abbildung gekennzeichnet.

Struktur der archaeellen Gemeinschaften im Vergleich aller zehn Biogasanlagen

Repräsentative Anteile an methanogenen Archaeen konnten nur in zwei von zehn Anlagen nachgewiesen werden. Die Domäne *Archaea* wird durch die Klasse *Methanomicrobia* (**Abbildung 5**) in der Biogas-Anlage 4 (2 %) und 6 (0,7 %) repräsentiert. Dabei ist in beiden Fällen *Methanosarcina* der abundanteste Genus. Die übrigen acht Profile weisen einen sehr geringen Anteil an Methanogenen auf (0,01-0,4 %). Als mögliche Ursachen für diese Beobachtungen kommt Folgendes in Betracht: i) Die *Archaea* nahmen während der Probennahme und/oder des anschließenden Transports in das Partnerlabor Schaden. ii) Die angewandte Methode für die Extraktion der metagnomischen DNA war nicht für alle vorliegenden Mikroorganismen gleichermaßen gut geeignet. iii) Die verwendeten Primer für die Amplifikation der 16S rRNA Genfragmente sind nicht für alle vorliegenden Gruppen von Mikroorganismen gleichermaßen gut geeignet, obwohl diese als ‚universelle' Primer in der Literatur beschrieben wurden. Zur Überprüfung die-

ser Vermutungen wurde eine erneute Beprobung ausgewählter Biogas-Produktionsanlagen aus dem Biogas-Biocoenosis Projekt durchgeführt. Dabei sollten große Probenvolumina (1 Liter) genommen werden, um den schädigenden Sauerstoffeinfluss möglichst gering zu halten und die Proben wurden umgehend zur weiteren Verarbeitung ins Labor transportiert. Außerdem wurden verschiedene DNA-Extraktionsmethoden angewandt. Neu hergestellte 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken wurden auf der *Genome Sequencer* FLX Plattform (Roche) sequenziert.

II.1.2 Wiederholung der taxonomischen Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaften für ausgewählte Biogas-Produktionsanlagen

Um zu untersuchen, warum die Sub-Gemeinschaft der methanogenen *Archaea* in manchen Biogasanlagen unterrepräsentiert war, wurden die taxonomischen Profilierungen für ausgewählte Anlage unter modifizierten Bedingungen wiederholt. Hierfür wurden vier Biogas-Produktionsanlagen aus dem Biogas-Biocoenosis Projekt erneut beprobt. Dabei handelt es sich um die Biogasanlagen 4 (Rinteln), 6 (Schwarme), 9 (Bad Waldliesborn) und 10 (Halle/Westfalen). Die Auswahl fiel auf diese vier Anlagen, dass sie in unmittelbarer Labornähe lokalisiert sind.

Alle Proben wurden unmittelbar nach dem Transport im Labor verarbeitet (innerhalb von 30-60 min nach der Beprobung im Gegenteil zu ca. 24 Std. im Rahmen des Projektes). Die Extraktion der metagenomischen DNA erfolgte nach einem publizierten Protokoll, das in der Vergangenheit erfolgreich für die taxonomische Profilierung von Biogas-Gemeinschaften angewendet wurde (SCHLÜTER *et al*. 2008). Die 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll (Abschnitt 3.1) erstellt und auf der *Genome Sequencer* FLX Plattform (Roche) sequenziert. Zur Kontrolle der angewandten DNA Extraktionsmethode und der modifizierten Probenahmebedingungen wurde eine eingefrorene Geärrestprobe der Anlage 2 (KW19 des Jahres 2012; die gleiche Probenahme wie für die erste Sequenzierung verwendet). Diese Probe wurde auf die gleiche Art und Weise behandelt, wie die frisch genommenen Fermentationsproben.

Nach der erfolgreichen bioinformatischen Verarbeitung der erhaltenen Sequenzen (**Tabelle 2**) wurde für Vergleichszwecke ein taxonomisches Profil der fünf zu analysierenden Datensätze auf den taxonomischen Ebenen Phylum und Klasse erstellt.

Tabelle 2: Überblick über die wichtigsten Filterprozesse von fünf 16S rDNA Amplikon Datensätzen, die durch Sequenzierung auf der *Genome Sequencer* FLX Plattform (Roche) erzeugt wurden.

Sample	No. of raw sequences	No. of sequences after quality trimming: Length 200 - 530 bp Phred > 20 No. mismatches in primer = 2 No. mismatches in MID =1 No. ambiguous bases = 0	No. of sequences after Chimera check
BGP 2	25678	14145	13642
BGP 4	10512	6532	6169
BGP 6	283036	173421	162998
BGP 9	25852	13005	12117
BGP 10	13631	8173	7223

Eine vergleichende Analyse zeigte, dass Vertreter der *Archaea* in drei von fünf der untersuchten Biogasproben identifiziert und klassifiziert werden konnten (**Abbildung 8**). Hierbei handelt es sich um die Biogas-Produktionsanlagen 4, 9 und 10. Mit Hilfe des RDP-*Classifiers* konnten die archaeellen Sequenzen dem Phylum *Euryarchaeota (3-4 %)*, der Klasse *Methanomicrobia* (2-4 %), der Ordnung *Methanomicrobiales* (2-4 %), der Familie *Methanomicrobiaceae* (2-4 %) und dem Genus *Methanoculleus* (2-4 %) zugeordnet werden. Interessanterweise lässt sich in allen drei taxonomischen Profilen der methanogenen Sub-Gemeinschaften die Dominanz der Klasse *Methanomicrobia* (**Abbildung 9**) und des Genus *Methanoculleus* (93-95 % aller archaeellen Sequenzen) beobachten.

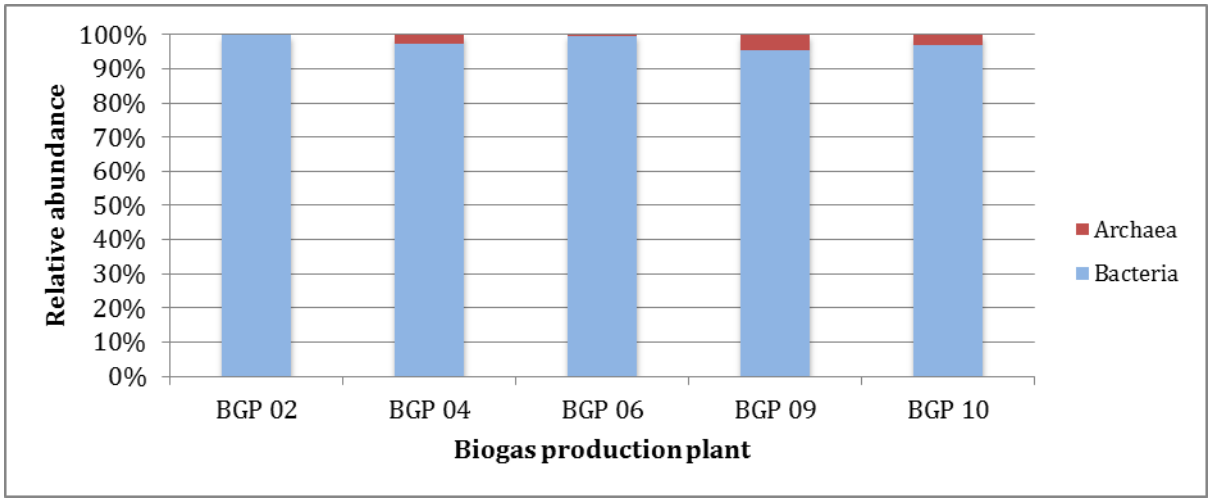


Abbildung 8: Abundanz der *Archaea* in den taxonomischen Profilen der untersuchten Biogas-Produktionsanlagen. Die Untersuchung erfolgte anhand der erzeugten 16S rDNA Sequenzen und ihrer taxonomischen Klassifizierung.

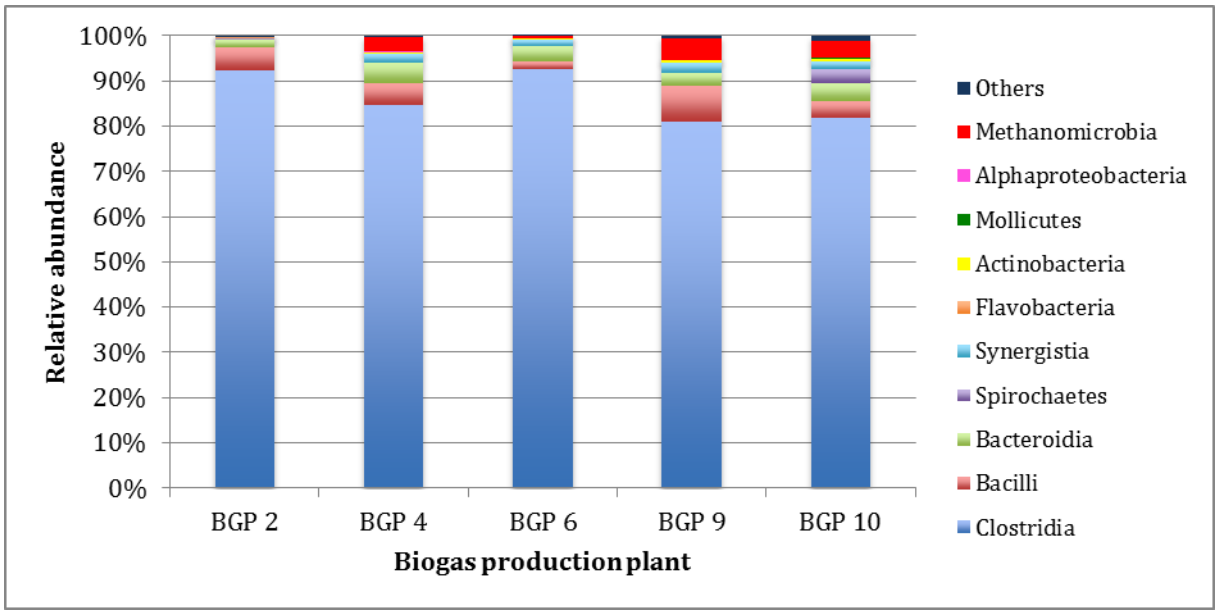


Abbildung 9: Taxonomische Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft von fünf ausgewählten Biogas-Produktionsanlagen auf der taxonomischen Ebene Klasse basierend auf 16S rDNA Amplikon-Sequenzen.

In einer Studie zur taxonomischen Charakterisierung von 21 Biogas-Produktionsanlagen fanden SUNDBERG *et al.* ebenfalls sehr geringe Anteile von Methanogenen in 8 von 21 Anlagen (SUNDBERG *et al*. 2013). In dieser Studie wurden die 16S rDNA Amplikon- Bibliotheken auf eine vergleichbare Art und Weise konstruiert (unter der Verwendung von modifizierten universellen Primern 341F und 806R) wie die Amplikons im Biogas-Biocoenosis Projekt. SUNDBERG *et al.* postuliert, dass mit der Pyrosequenzierung nur DNA-Fragmente erfasst werden, deren Konzentration einen bestimmten Schwellenwert übersteigt. Aufgrund ihrer geringen Abundanz werden demzufolge archaeelle Sequenzen möglicherweise nur unzureichend erfasst. Es ist wahrscheinlich, dass die Amplifikation der achaeellen Sequenzen in Gegenwart der sehr abundanten bakteriellen Sequenzen diskriminiert wird. Des Weiteren kann vermutet werden, dass die Art der DNA-Isolierungsmethode einen Einfluss auf das taxonomische Profile der untersuchten Biogas-Produktionsanlagen aufweist, wie dies LI *et al*. 2013 in ihrer Studie zeigt (LI *et al*. 2013). Die Verwendung einer bestimmten Isolierungsmethode kann dazu führen, dass nicht alle vorkommenden Mikroorganismen gleichermaßen gut aufgeschlossen werden. Ebenso ist derzeit nicht klar, ob die *Archaea* besonders empfindlich gegenüber von Sauerstoff oder anderen Stress-Faktoren bei der Probenahme bzw. beim Transport sind.

Eine detaillierte Betrachtung der neu gewonnenen taxonomischen Profile zeigt, dass alle fünf Profile eine ähnliche Diversität aufweisen wie die taxonomischen Profile derselben Biogasanlagen nach der ersten Sequenzierung. Im Detail ergeben sich Unterschiede, die auf eine neue Probenahme bzw. auf eine modifizierte Aufarbeitung der Proben oder aber auch auf natürliche Schwankungen der Biozönosen zurückgeführt werden können. So ist z.B. die Klasse *Bacilli* mit einem höheren Anteil in der zweiten

Sequenzierung für die Probe der Biogasanlage 9 vertreten (7 % *vs*. 2 %). Außerdem sind Unterschiede in den relativen Anteilen der Klassen SR1 *class incertae sedis* (2 % *vs.* 0,3 % in der zweiten Sequenzierung) und *Synergistia* (2 % *vs.* 0,1 % in der zweiten Sequenzierung) zu erkennen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die durchgeführte Analyse zur taxonomischen Profilierung von Biogas-Gemeinschaften mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung von 16S rDNA Amplikons tiefe Einblicke in die Struktur dieser Gemeinschaften erlaubt. Die im Rahmen dieses Projektes sich entwickelte Fragen konnten jedoch aufgrund der limitierenden Zeit nicht alle beantwortet werden. So bleibt die Fragestellung, ob die methanogene Sub-Gemeinschaft durch die angewandte Probenaufarbeitung (Transportzeit, DNA-Extraktionsmethode, die Wahl der Primer) unterrepräsentiert ist und demzufolge schwer zu erfassen ist, ungeklärt.

II.1.3 Separate taxonomische Profilierung der bakteriellen Sub-Gemeinschaft von zehn Biogas-Produktionsanlagen

Da die gemeinsame Erfassung von *Archaea* und *Bacteria* in einem Ansatz problematisch zu sein scheint, sollte im Folgenden versucht werden, diese Gruppen getrennt zu bestimmen.

Hierfür wurde die taxonomische Profilierung basierend auf der Konstruktion von 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken mit Bakterien- bzw. *Archaea*-spezifischen Primern vorgenommen. Die bakteriellen 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken wurden mit Hilfe der Primer S-D-Bact-0564-a-S-15 und S-D-Bact-0785-b-A-18 erzeugt (KLINDWORTH *et al*. 2013). Diese amplifizieren die V4-Region des 16S rRNA Gens. Die Gesamt-DNA-Präparationen aus den Fermentationsproben der Anlagen erfolgten am Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. in der KW 19 des Jahres 2012 und dienten als Ausgangsmaterial für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften. Die erzeugten 16S rDNA Amplikons sind im Mittel 253 bp lang und wurden in einer zweiten PCR mit den *Rapid-Library-MIDs* (Multiplex-Identifier) und Sequenzier-Adaptoren aus dem *TrueSeq* Protokoll (Illumina) verknüpft. Die Sequenzierung der Amplikon-Bibliotheken erfolgte auf dem Illumina MiSeq System. Die bioinformatische Prozessierung der Sequenzen wurde wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben durchgeführt. Die **Tabelle 3** fasst die Datensätze und ihre Prozessierung zusammen.

Tabelle 3: Bioinformatische Prozessierung von 12 16S rDNA Amplikon Sequenzdatensätzen zur taxonomischen Profilierung der bakteriellen Gemeinschaften von 10 Biogas-Produktionsanlagen. Die bakteriellen 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken wurden mit Hilfe der Primer S-D-Bact-0564-a-S-15 und S-D-Bact-0785-b-A-18, die die V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt. Die Sequenzierung erfolgte auf dem Illumina MiSeq System.

Sample	No. of raw sequence reads	No. after quality trimming Length 100 - 250 bp Phred > 20 No. mismatches in primer = 2 No. mismatches in MID =1 No. ambiguous bases = 0	No. after removal of unique sequences
BGP 1-1	40734	40734	27802
BGP 1-2	29334	29334	22578
BGP 2	16585	16566	9338
BGP 3	231721	231021	96589
BGP 4	45929	33327	11877
BGP 5-1	5775	5774	4214
BGP 5-2	29786	29552	25540
BGP 6	14187	14145	12267
BGP 7	6625	6577	6051
BGP 8	59129	58861	45187
BGP 9	207883	207007	129046
BGP 10	110480	107220	96520

Eine detaillierte Betrachtung der taxonomischen Profile von zehn ausgewählten Biogas-Produktionsanlagen basierend auf der Amplifikation des 16S rRNA Genfragments mit Bakterien-spezifischen Primern zeigt, dass die ermittelten taxonomischen Profile nicht sehr divers sind (**Abbildung 10**). Anhand der Abbildung ist zu erkennen, dass in einigen Profilen das Phylum *Firmicutes* mit über 95 % der Sequenzen repräsentiert ist. Mit Ausnahme der taxonomischen Profile der Anlagen 3, 4, 5 und 8 ist die bakterielle Diversität unzureichend abgedeckt. Viele Phyla, die in der ersten Profilierung deutlich zu erkennen waren, sind nun nur noch marginal vorhanden, was Zweifel an der Zuverlässigkeit des verwendeten Primer-Systems aufkommen lässt. Das für die erste Profilierung eingesetzte Primerpaar scheint die Diversität der bakteriellen Gemeinschaft deutlich besser abzubilden. Die Betrachtung der neuen Profile auf niedrigeren taxonomischen Ebenen bestätigt diese Einschätzung (**Abbildung 11**). Zukünftige taxonomische Profilierungen sollten daher mit dem zunächst verwendeten universellen Primerpaar 341F und 806R durchgeführt werden.

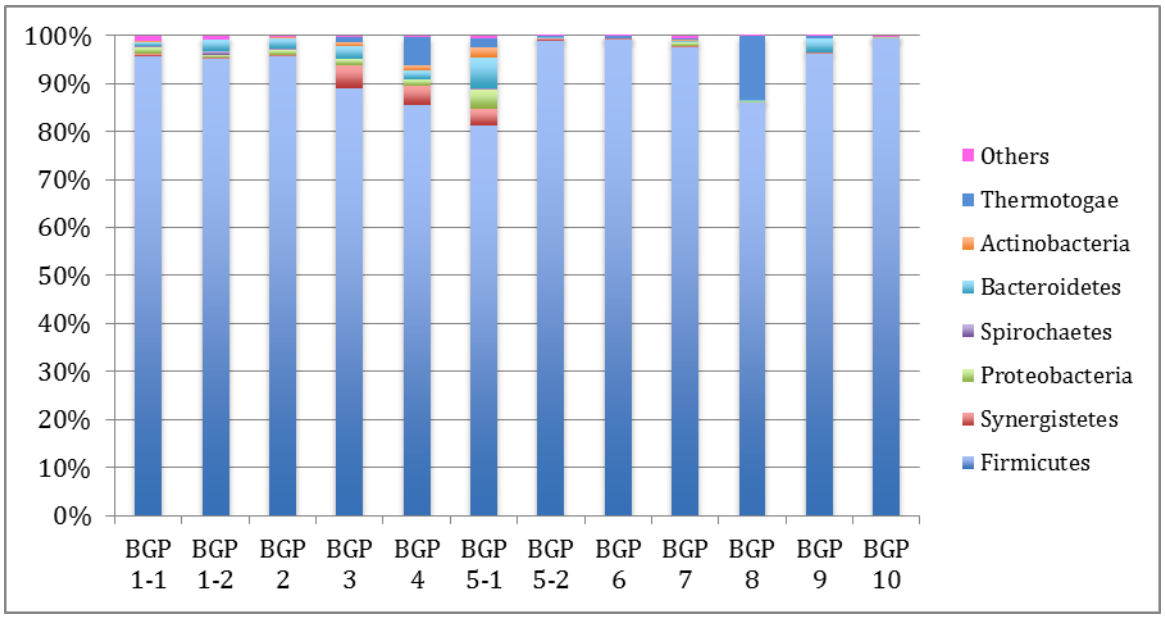


Abbildung 10: Taxonomische Profilierung der bakteriellen Gemeinschaften für zwölf Biogas-Reaktoren auf der Ebene Phylum. Die Herstellung der entsprechenden 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken erfolgte mit bakterienspezifischen Primern.

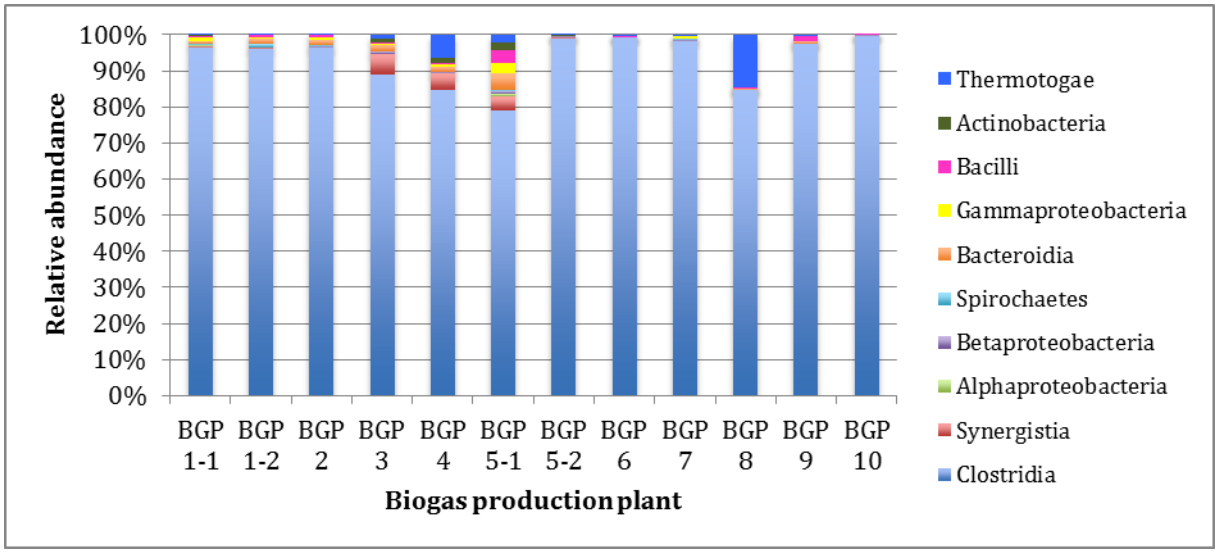


Abbildung 11: Taxonomische Profilierung der bakteriellen Gemeinschaften für zwölf Biogas-Reaktoren auf der Ebene Klasse. Die Herstellung der entsprechenden 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken erfolgte mit bakterienspezifischen Primern.

Die taxonomische Profilierung der methanogenen Sub-Gemeinschaft der zehn Biogas-Produktionsanlagen mit *Archaea*-spezifischen Primern befindet sich zur Zeit in der Erprobungsphase. Abschließende Ergebnisse liegen für diesen Ansatz noch nicht vor.

II.1.4 Fazit zu Teilvorhaben 2

Die folgenden Aufgaben im Rahmen dieses Teilvorhabens konnten erfolgreich bearbeitet werden:

(1) Nach Beprobung aller zehn Praxis-Biogasanlagen (durch das BiogasEnzyme Konsortium) sowie der Isolierung der Gesamt-DNA aus den Proben der Hauptfermenter (durch die ATB-Kooperationspartner) konnten 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken zur taxonomischen Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaften mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung erfolgreich hergestellt und sequenziert werden.

(2) Eine bioinformatische *Pipeline* für die Prozessierung und Klassifikation von 16S rDNA Amplikon-Sequenzen wurde implementiert und für die taxonomische Profilierung der erzeugten 16S rDNA Amplikonsequenzen eingesetzt.

(3) Errechnete taxonomische Profile für die beprobten Biogas-Anlagen wurden mit Hilfe der *Software* Krona visualisiert.

(4) Die beprobten Biogas Anlagen konnten somit mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung von 16S rDNA Amplikons taxonomisch profiliert werden. Die Abdeckung der methanogenen Sub-gemeinschaften muss derzeit noch kritisch hinterfragt werden. Hier werden derzeit alternative Aufarbeitungsmethoden und Primer-Systeme getestet, die eine bessere Darstellung der archaeellen Gemeinschaft erwarten lassen. Ergebnisse hierzu liegen gegenwärtig noch nicht vor.

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der zahlenmäßige Gesamtverwendungsnachweis lag zum Projektende noch nicht vor. Er wird schnellstmöglich nachgereicht.

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die durchgeführte Arbeit zeigte die grundlegenden Erkenntnisse zur methodentechnischen Herangehensweisen sowie zur Erfassung der Struktur der mikrobieller Lebensgemeinschaft in Biogasanlagen auf und stellt somit eine solide Basis für weiterführende Analysen dar.

II.4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die im Rahmen dieses Projektes erzielten taxonomischen Profile geben eine umfassende Charakterisierung der mikrobielle Diversität in den untersuchten Biogasanlagen. Basierend auf der mikrobiellen Zusammensetzung der Gemeinschaft und der Abundanz der jeweiligen Taxa lässt sich ein Überblick über die mikrobiologischen Prozesse (Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese, Methanogenese) gewinnen. Schlussfolgernd lässt sich beurteilen, sich ob die Anlage stabil betrieben wird oder eine mögliche Prozessstörung vorliegt.

II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

In einer Studie von SUNDBERG *et al*. 2013 werden 21 landwirtschaftlichen Biogasanlagen mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung des 16S rRNA Markergens taxonomisch charakterisiert, jedoch ist zur Zeit wenig über den Zusammenhang zwischen Substratzusammensetzung und mikrobieller Diversität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen bekannt.

II.6 Veröffentlichungen

Im Rahmen des Biogas-Biocoenosis Projektes sind gemeinsame Publikation mit den Projektpartnern vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (Teilvorhaben 1) und Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (Teilvorhaben 3) über die komparative Analyse von betrachteten Biogas-Produktionsanlagen im Bezug auf die Prozessparameter angestrebt. Die entsprechenden Manuskripte sind derzeit in Arbeit und liegen gegenwertig noch nicht vor.

Vorab wurden einzelne Teilergebnisse der Öffentlichkeit im Rahmen folgender Fachveranstaltungen präsentiert:

- Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen des CLIB-Graduiertenclusters „Industrielle Biotechnologie“ (Lühnen, 2013).
- Teilnahme und Posterpräsentation im Rahmen des „2nd Thünen Symposium on Soil Metagenomics“ (Braunschweig, 2013).

Referenzen

BARTRAM A.K., LYNCH M.D.J., STEARNS J.C., MORENO-HAGELSIEB G., NEUFELD J.D. (2011): Generation of Multimillion-Sequence 16S rRNA Gene Libraries from Complex Microbial Communities by Assembling Paired-End Illumina Reads. Appl. Env. Mirobiol., Vol. 77, No. 11: 3846-3852.

DE VRIJE T., BAKKER R.R., BUDDE M.A., LAI M.H., MARS A.E., CLAASSEN P.A. (2009): Efficient hydrogen production from the lignocellulosic energy crop Miscanthus by the extreme thermophilic bacteria Caldicellulosiruptor saccharolyticus and Thermotoga neapolitana. Biotechnol Biofuels. 2(1):12.

EDGAR R.C., HAAS B.J., CLEMENTE J.C., QUINCE C., KNIGHT R. (2011): UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics., 27(16): 2194–2200.

GRABOWSKI A., TINDALL B.J., BARDIN V., BLANCHET D., JEANTHON C. (2005): Petrimonas sulfuriphila gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir. Int J Syst Evol Microbiol. 55(Pt 3):1113-21.

GUEDON E.S., PAYOT M., DESVAUX H., PETITDEMANGE A. (2000): Relationships between cellobiose catabolism, enzyme levels and metabolic intermediates in Clostridium celluloly- ticum grown in a synthetic medium. Biotechn. Bioeng. 67:327-335.

GUPTA R.S., BHANDARI V. (2011): Phylogeny and molecular signatures for the phylum Thermotogae and its subgroups. Antonie Van Leeuwenhoek 100(1):1-34.

HANREICH A., SCHIMPF U., ZAKRZEWSKI M., SCHLÜTER A., BENNDORF D., HEYER R., RAPP E., PÜHLER A., REICHL U., KLOCKE M. (2013): Metagenome and metaproteome analyses of mi-

crobial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. Syst. Appl. Microbiol. 36(5):330-8.

JAENICKE S., ANDER C., BEKEL T., BISDORF R., DRÖGE M., GARTEMANN K.H., JÜNEMANN S., KAISER O., KRAUSE L., TILLE F., ZAKRZEWSKI M., PÜHLER A., SCHLÜTER A., GOESMANN A. (2011): Comparative and Joint Analysis of Two Metagenomic Datasets from a Biogas Fermenter Obtained by 454- Pyrosequencing. PLoS ONE 6(1): e14519. doi:10.1371/journal.pone.0014519.

KLINDWORTH A., PRUESSE E., SCHWEER T., PEPLIES J., QUAST C., HORN M., GLÖCKNER F.O. (2013): Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research 41(1): e1.

LI A., CHU Y., WANG X., REN L., YU J., LIU X., YAN J., ZHANG L., WU S., LI S. (2013): A pyrosequencing-based metagenomic study of methane-producing microbial community in solid-state biogas reactor. Biotechnol Biofuels. 6(1):3.

NARIHIRO T., SEKIGUCHI Y. (2011): Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. Microbial Biotechnology, 4(5): 585-602.

ONDOV B., BERGMAN N., PHILLIPPY A. (2011): Interactive metagenomic visualization in a Web browser. BMC Bioinformatics, 12(1): 385.

RADEMACHER A., ZAKRZEWSKI M., SCHLÜTER A., SCHONBERG M., SZCZEPANOWSKI R., GOESMANN A., PÜHLER A., KLOCKE M. (2012): Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. FEMS Microbiology Ecology 79(3): 785–799.

SCHLOSS P.D., WESTCOTT S.L., RYABIN T., HALL J.R., HARTMANN M., HOLLISTER E.B., LESNIEWSKI R.A., OAKLEY B.B., PARKS D.H., ROBINSON C.J., SAHL J.W., STRES B., THALLINGER G.G., VAN HORN D.J., WEBER C.F. (2009): Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol. 75(23):7537-41.

SCHLÜTER A., BEKEL T., DIAZ N.N., DONDRUP M., EICHENLAUB R., GARTEMANN K.-H., KRAHN I., KRAUSE L., KROEMEKE H., KRUSE O., MUSSGNUG J.H., NEUWEGER H., NIEHAUS K., PÜHLER A., RUNTE K.J., SZCZEPANOWSKI R., TAUCH A., TILKER A., VIEHÖVER P., GOESMANN A. (2008): 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(1-2): 77–90.

SUNDBERG C., AL-SOUD W.A., LARSSON M., ALM E., YEKTA S.S., SORENSEN S.J., KARLSSON A. (2013): 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. FEMS Microbiology Ecology 85(3): 612–626.

TOWN J.R., LINKS M.G., FONSTAD T.A., DUMONCEAUX T.J. (2014): Molecular characterization of anaerobic digester microbial communities identifies microorganisms that correlate to reactor performance. Bioresour Technol. 151:249-57.

ZAKRZEWSKI M., GOESMANN A., JAENICKE S., JUNEMANN S., EIKMEYER F., SZCZEPANOWSKI R., ABU AL-SOUD W., SORENSEN S., PÜHLER A., SCHLÜTER A. (2012): Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. Journal of Biotechnology 158(4): 248–258.

Anhang 1: Taxonomische Profile

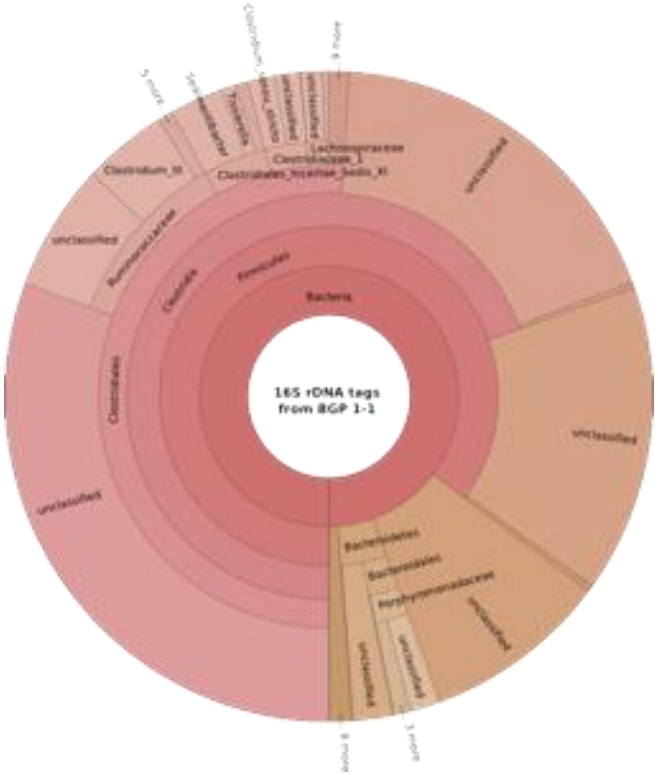


Abbildung 12: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 1-1 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen. Die 16S rDNA Amplikon-Bibliothek wurde mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R), die die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt und auf der *Genome Sequencer* FLX Plattform (Roche) sequenziert.

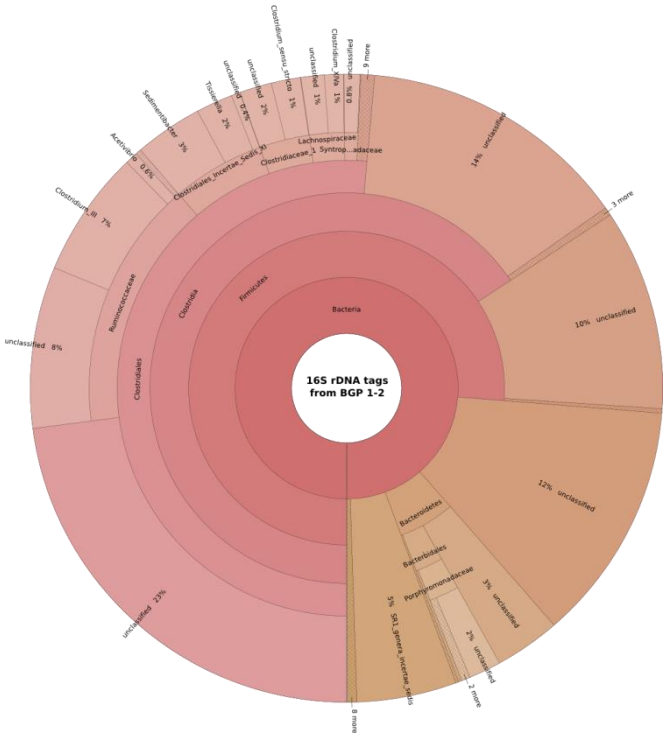


Abbildung 13: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 1-2 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen. Die 16S rDNA Amplikon-Bibliothek wurde mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R), die die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt und auf der Genome Sequencer FLX Plattform (Roche) sequenziert.

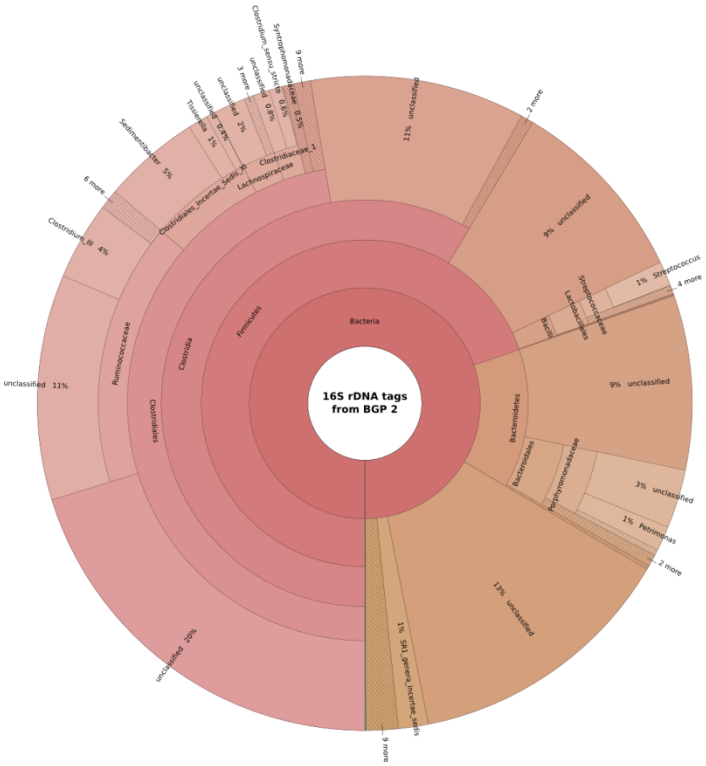


Abbildung 14: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 2 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen. Die 16S rDNA Amplikon-Bibliothek wurde mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R), die die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt und auf der Genome Sequencer FLX Plattform (Roche) sequenziert.

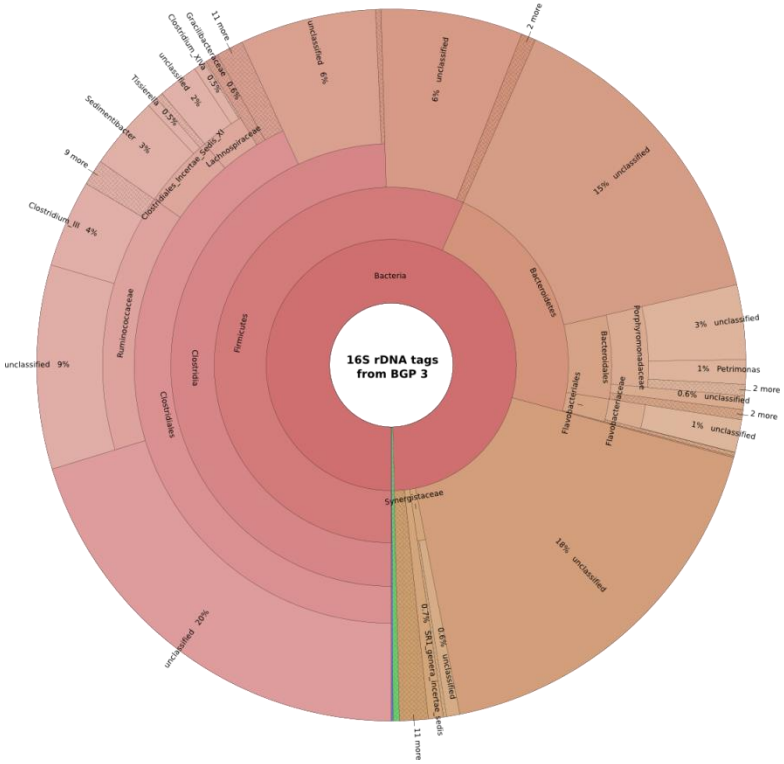


Abbildung 15: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 3 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen. Die 16S rDNA Amplikon-Bibliothek wurde mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R), die die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt und auf der Genome Sequencer FLX Plattform (Roche) sequenziert.

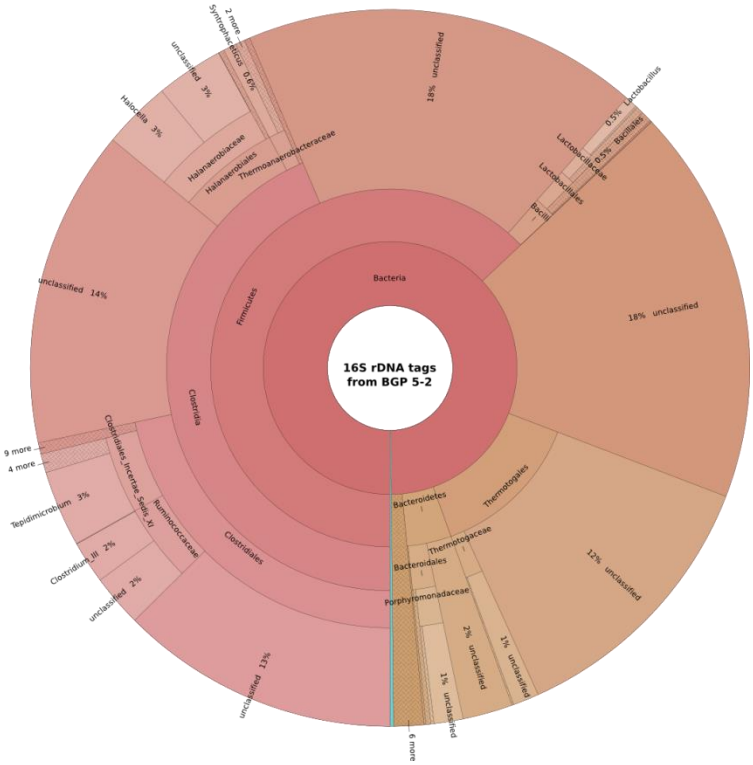


Abbildung 16: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 5-2 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen. Die 16S rDNA Amplikon-Bibliothek wurde mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R), die die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt und auf der Genome Sequencer FLX Plattform (Roche) sequenziert.

Abbildung 17: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 6 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen. Die 16S rDNA Amplikon-Bibliothek wurde mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R), die die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt und auf der Genome Sequencer FLX Plattform (Roche) sequenziert.

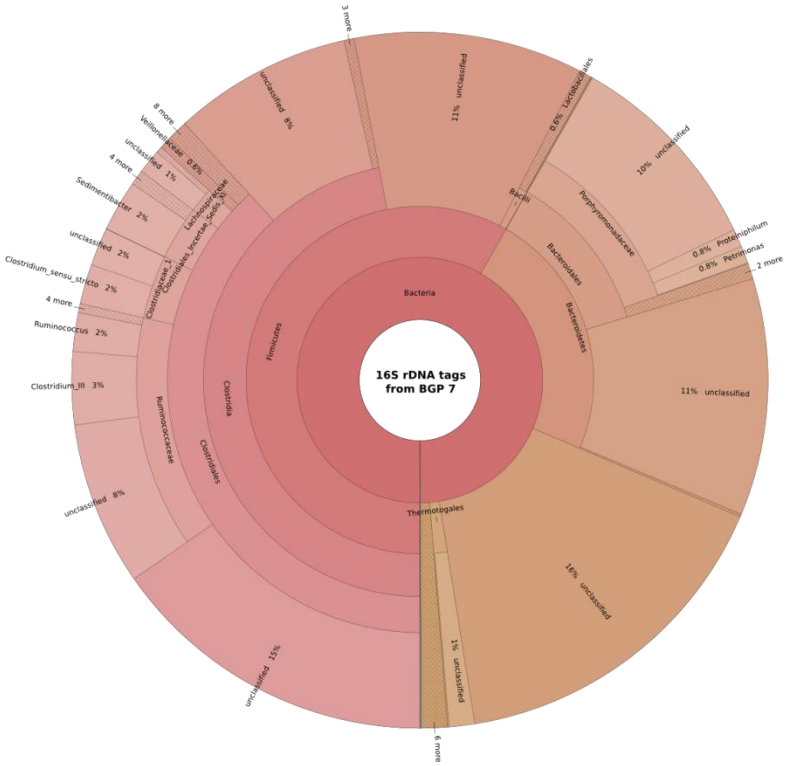


Abbildung 18: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 7 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen. Die 16S rDNA Amplikon-Bibliothek wurde mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R), die die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt und auf der Genome Sequencer FLX Plattform (Roche) sequenziert.

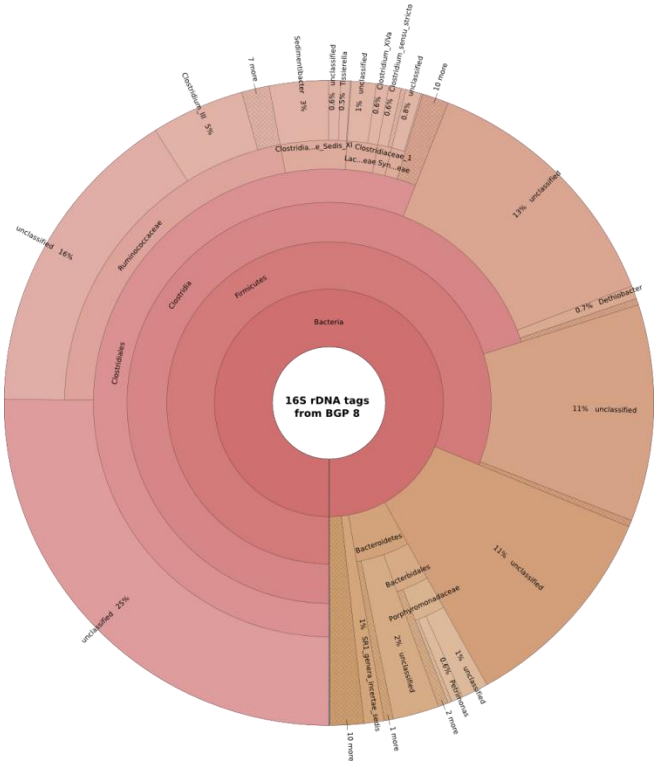


Abbildung 19: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 8 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen. Die 16S rDNA Amplikon-Bibliothek wurde mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R), die die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt und auf der Genome Sequencer FLX Plattform (Roche) sequenziert.

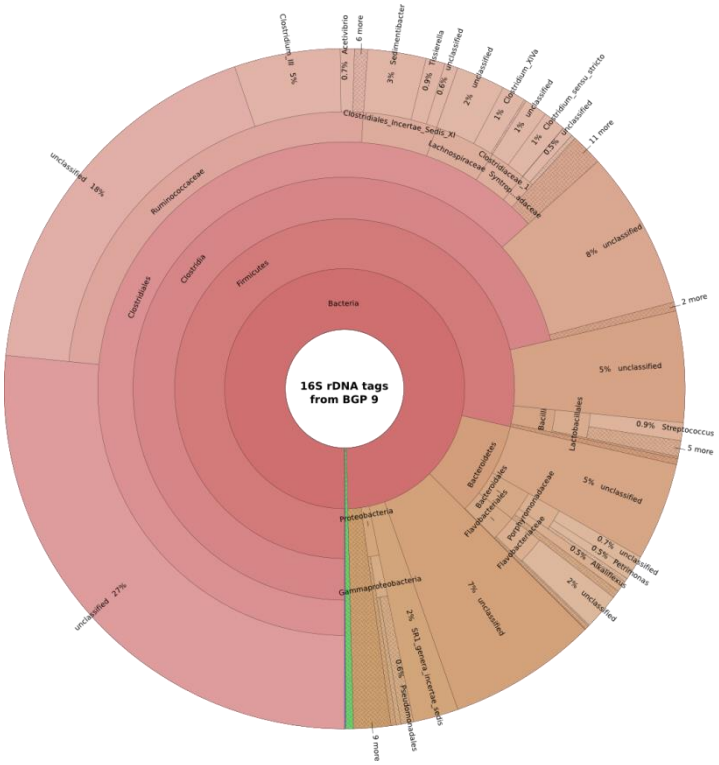


Abbildung 20: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 9 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen. Die 16S rDNA Amplikon-Bibliothek wurde mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R), die die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt und auf der Genome Sequencer FLX Plattform (Roche) sequenziert.

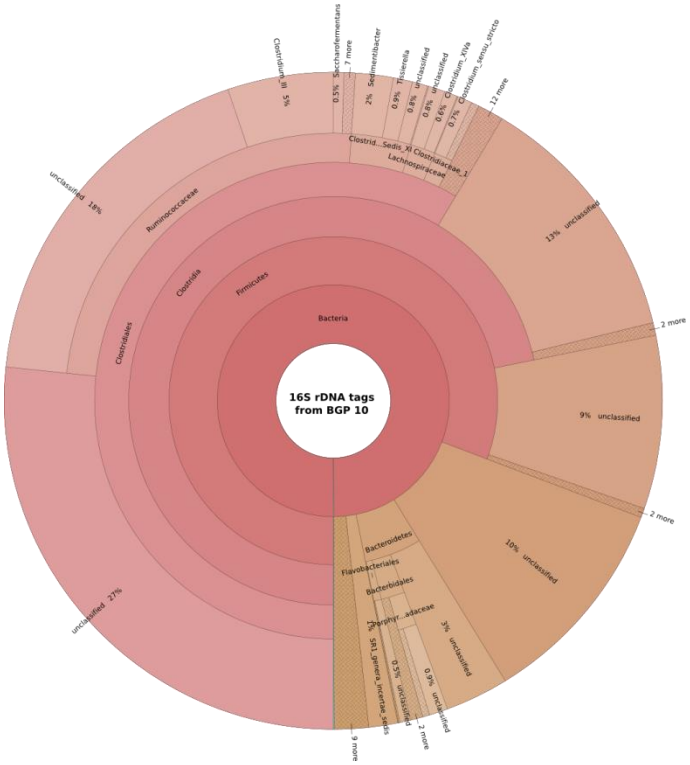


Abbildung 21: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 10 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen. Die 16S rDNA Amplikon-Bibliothek wurde mit Hilfe von universellen Primern (341F und 806R), die die V3-V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt und auf der Genome Sequencer FLX Plattform (Roche) sequenziert.

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Übersicht zur Erstellung einer 16S rDNA Amplikon-Bibliothek für die Hochdurchsatz Sequenzierung 61

Abbildung 2: Schematische Übersicht der grundlegenden Schritte zur Prozessierung und Klassifikation der 16S rDNA Sequenzen 62

Abbildung 3: Taxonomische Profilierung einer mesophilen und thermophilen Biogasanlage basierend auf 16S rDNA Amplikon-Sequenzen..... 66

Abbildung 4: Abundanz von prominenten Taxa der mikrobiellen Gemeinschaften der untersuchten Biogas-Produktionsanlagen auf der Ebene Phylum 67

Abbildung 5: Abundanz von prominenten Taxa der mikrobiellen Gemeinschaften der untersuchten Biogas-Produktionsanlagen auf der Ebene Klasse 68

Abbildung 6: Relative Häufigkeiten von zehn Familien bakterieller Sub-Gemeinschaften der zehn untersuchten Biogas-Anlagen 69

Abbildung 7: Komparative Betrachtung der taxonomischen Profile der zehn untersuchten Biogas-Produktionsanlagen, basierend auf einer Hauptkomponentenanalyse mittels der *Software* UCHIME..... 70

Abbildung 8: Abundanz der *Archaea* in den taxonomischen Profilen der untersuchten Biogas-Produktionsanlagen..... 72

Abbildung 9: Taxonomische Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft von fünf ausgewählten Biogas-Produktionsanlagen auf der taxonomischen Ebene Klasse basierend auf 16S rDNA Amplikon-Sequenzen..... 73

Abbildung 10: Taxonomische Profilierung der bakteriellen Gemeinschaften für zwölf Biogas-Reaktoren auf der Ebene Phylum 76

Abbildung 11: Taxonomische Profilierung der bakteriellen Gemeinschaften für zwölf Biogas-Reaktoren auf der Ebene Klasse..... 76

Abbildung 12: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 1-1 basierend auf 16S rDNA Amplikon Sequenzen 80

Abbildung 13: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 1-2 80

Abbildung 14: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 2..... 81

Abbildung 15: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 3..... 81

Abbildung 16: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 5-2 82

Abbildung 17: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 6..... 82

Abbildung 18: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 7..... 83

Abbildung 19: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 8..... 83

Abbildung 20: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 9..... 84

Abbildung 21: Taxonomische Profilierung der mikrobiellen Gemeinschaft der BGA 10.... 84

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Statistik der Sequenzierungsergebnisse der erzeugten 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken und Prozessierung der Daten mit bioinformatischen Methoden. 63

Tabelle 2: Überblick über die wichtigsten Filterprozesse von fünf 16S rDNA Amplikon Datensätzen, die durch Sequenzierung auf der *Genome Sequencer* FLX Plattform (Roche) erzeugt wurden. 72

Tabelle 3: Bioinformatische Prozessierung von 12 16S rDNA Amplikon Sequenzdatensätzen zur taxonomischen Profilierung der bakteriellen Gemeinschaften von 10 Biogas-Produktionsanlagen. Die bakteriellen 16S rDNA Amplikon-Bibliotheken wurden mit Hilfe der Primer S-D-Bact-0564-a-S-15 und S-D-Bact-0785-b-A-18, die die V4-Region des 16S rRNA Gens einschließen, erstellt. Die Sequenzierung erfolgte auf dem Illumina MiSeq System. 75

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen - Ermittlung der mikrobiellen Diversität sowie von hauptsächlichen verfahrenstechnischen Einflussfaktoren auf die Mikroflora

BIOGAS-BIOCOENOSIS

Teilvorhaben 3 - Metaproteom-Analytik

Zuwendungsempfänger:

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Lehrstuhl Bioprozesstechnik

Förderkennzeichen:

22028811

Laufzeit:

01.11.2011 bis **31.10.2013**

Datum der Veröffentlichung: 29. August 2014

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

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

Autoren

Dr. Dirk Benndorf
benndorf@mpi-magdbeburg.mpg.de

Dipl.-Ing. Fabian Kohrs
kohrs@mpi-magdeburg.mpg.de

Kontakt

Prof. Dr. Udo Reichl

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Institut für Verfahrenstechnik, Lehrstuhl Bioprozesstechnik

Universitätsplatz 2, Gebäude 25
D-39106 Magdeburg

udo.reichl@ovgu.de
Telefon: +49 391 67-58402
Telefax: +49 391 67-11209

Inhalt

I Hintergrund 90
I.1 Aufgabenstellung 90
I.2 Voraussetzungen 90
I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens 90
I.4 Stand der Wissenschaft und Technik 90
I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 91

II Ergebnisse 92
II.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse 92
II.1.1 Anpassung und Optimierung der Methodik 92
II.1.2 Vergleich des Metaproteoms von einer mesophilen und einer thermophilen Anlage 93
II.1.3 Metaproteomanalyse von Störfällen 97
II.1.4 Bioinformatorische Auswertung 99
II.1.5 Entwicklung eines proteinbasierten Schnelltests 99
II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises 102
II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit 102
II.4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse 103
II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen 104
II.6 Veröffentlichungen 104
II.6.1 Fachpublikationen 104
II.6.2 Software 104

Verzeichnis der Abbildungen 105
Verzeichnis der Tabellen 105

I Hintergrund

I.1 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeiten des Teilvorhabens 3 im Rahmen von „BIOGAS-BIOCOENOSIS– Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen“ an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (OvGU) war die Ermittlung der hauptsächlich hydrolytisch und methanogen aktiven Mikroorganismen in mikrobiellen Gemeinschaften aus Biogasanlagen durch Analyse des Metaproteoms.

I.2 Voraussetzungen

Die entsprechenden Techniken zur Proteinextraktion, der gelbasierten Separation und verschiedener massenspektrometrischer Analyseverfahren waren an der OvGU und dem **Max-Planck-Institut** (MPI) **für Dynamik komplexer technischer Systeme (Abteilung Biopozesstechnik)** in Magdeburg zu Beginn des Projekts vorhanden und etabliert. Kleinere Optimierungen der analytischen Arbeitsabläufe waren im zeitlichen Rahmen von wenigen Wochen vorgesehen. Die bioinformatische Auswertung massenspektrometrischer Daten war zwar prinzipiell möglich, jedoch noch sehr zeitintensiv und nicht automatisiert. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieses Projekts unter anderem eine geeignete Auswertungssoftware unter Leitung des MPI weiterentwickelt (II.1. Bioinformatische Auswertung). Überschaubare Teilarbeitspakete des Vorhabens konnten im Rahmen von betreuten Abschlussarbeiten und hilfswissenschaftlichen Tätigkeiten ausgelagert werden.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Eine detaillierte Beschreibung der Planung und des Ablaufs des Forschungsvorhabens findet sich im Schlussbericht von Teilvorhaben 1 dargelegt seitens der Projektpartner vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB).

I.4 Stand der Wissenschaft und Technik

Der wissenschaftliche Stand, an den die Arbeiten für dieses Projekt anschlossen, ist in der Vorhabenbeschreibung ausführlich dokumentiert (II.1.4.). Mittels Metaproteomanalyse können Unterschiede in der Proteinexpression mikrobieller Gemeinschaften detektiert und mit Umweltbedingungen korreliert werden (BECHER *et al.* 2013). Daraus können wiederum Erkenntnisse über Signal- und Stoffwechselwege der Zellen, Zell-Zell-Interaktionen und Reaktionen der Zellen auf Umwelteinflüsse gewonnen werden (DUNN 2000). Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich zur Analyse der Mikroflora von Boden- und anaeroben Grundwasser (BENNDORF *et al.* 2007, BENNDORF *et al.* 2009, JEHMLICH *et al.* 2010) sowie von Abwassermembranreaktoren (KUHN *et al.* 2011) angewandt. In der Arbeitsgruppe wurde diese Analytik bereits erfolgreich für Probenmaterial aus

Biogasreaktoren etabliert (HANREICH *et al.* 2012, HANREICH *et al.* 2013). Eine Beschreibung der technischen Ausstattung, die für die Durchführung des Vorhabens verwendet wurde, ist in Abschnitt I.2. zu finden. Es wurden keine Verfahren verwendet, die einem Schutzrecht unterliegen. Für Literaturrecherchen und Quellennachweise wurden ausschließlich Fachpublikationen genutzt, die über gängige Onlineportale (bspw. Science-Direct: http://www.sciencedirect.com) oder Literaturdatenbanken (bspw. Web-of-Knowledge der Fa. Thompson-Reuters) verfügbar sind.

Zitierte Literatur

BECHER D. ET AL. (2013): Metaproteomics to unravel major microbial players in leaf litter and soil environments: Challenges and perspectives. Proteomics 13: 2895-2909.

DUNN M. (2000): From genome to proteome: advances in the practice and application of proteomics. Wiley-VCH.

BENNDORF D., BALCKE G., HARMS H., VON BERGEN M. (2007): Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. ISME J 1: 224-234.

BENNDORF D., VOGT C., JEHMLICH N., SCHMIDT Y., THOMAS H., WOFFENDIN G., SCHEVCHENKO A., RICHNOW H., VON BERGEN M. (2009): Improving protein extraction and separation methods for investigating the metaproteome of anaerobic benzene communities within sediments. Biodegradation 20: 737-750.

JEHMLICH N., KLEINSTEUBER S., VOGT C., BENNDORF D., HARMS H., SCHMIDT F., VON BERGEN M., SEIFERT J. (2010): Phylogenetic and proteomic analysis of an anaerobic toluene-degrading community. J Appl Microbiol 109: 1937-1945.

KUHN R., BENNDORF D., RAPP E., REICHL U., PALESE L.L., POLLICE A. (2011): Metaproteome Analysis of sewage sludge from membrane bioreactors. Proteomics 11: 2738-2744.

HANREICH A., HEYER R., BENNDORF D., RAPP E., PIOCH M., REICHL U., KLOCKE M. (2012): Metaproteome analysis to determine the metabolically active part of a thermophilic microbial community producing biogas from agricultural biomass. Can J Microbiol 58: 917-922.

HANREICH A., SCHIMPF U., ZAKRZEWSKI M., SCHLÜTER A., BENNDORF D., HEYER R., RAPP E., PÜHLER A., REICHL U., KLOCKE M. (2013): Metagenome and metaproteome analyses of mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermenters indicate concerted plant carbohydrate degradation. System Appl Microbiol 36: 330-338

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Als Kooperationspartner der OvGU ohne gesonderte Mittelzuweisung ist das MPI für Dynamik komplexer technischer Systeme, Arbeitsgruppe Bioprozessanalytik (Dr. Erdmann Rapp), in Magdeburg zu nennen. Im Rahmen dieser Kooperation erfolgte eine Unterstützung in der Durchführung und Auswertung von Metaproteom-Analysen.

II Ergebnisse

II.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

II.1.1 Anpassung und Optimierung der Methodik

Ziel des Teilvorhabens 3 ist die Ermittlung der hauptsächlich hydrolytisch bzw. methanogen aktiven Mikroorganismen durch Analyse des Metaproteoms. Dafür wurden jeweils die Proben analysiert, die zu Monatsbeginn aus allen Hauptfermentern entnommen wurden. Folgende Vorgehensweise erwies sich nach initialen Versuchen als günstig:

- Probenaufschluss mit Glaskugeln und gleichzeitige Phenolextraktion
- Proteinquantifizierung mit Amidoschwarz
- Trennung des Metaproteoms mithilfe eindimensionaler SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung (**Abbildung 1**)
- nanoLC-MS/MS der kompletten Gelspuren nach SDS-PAGE geteilt in je 10 Fraktionen

Für die Visualisierung der Proteinmuster im Gel wurden neben der Coomassiefärbung weitere Techniken getestet. Eine Fluoreszenzfärbung erwies sich als ungeeignet, da im Probenmaterial enthaltene Huminstoffe eine sehr hohe Eigenfluoreszenz aufwiesen und eine hohe Hintergrundfärbung erzeugten. Die Silberfärbung als sehr sensitive Methode kommt für Routineanwendungen nicht in Frage, da eine anschließende massenspektrometrische Untersuchung eine aufwändige Entfärbung erfordert und eine verlässliche Quantifizierung der Proteine mit dieser Färbetechnik nicht möglich ist. Gemessen am experimentellen und zeitlichen Aufwand im Verhältnis zum Ergebnis zeigte sich die Gelfärbung mittels kolloidalem Coomassie als am besten geeignet.

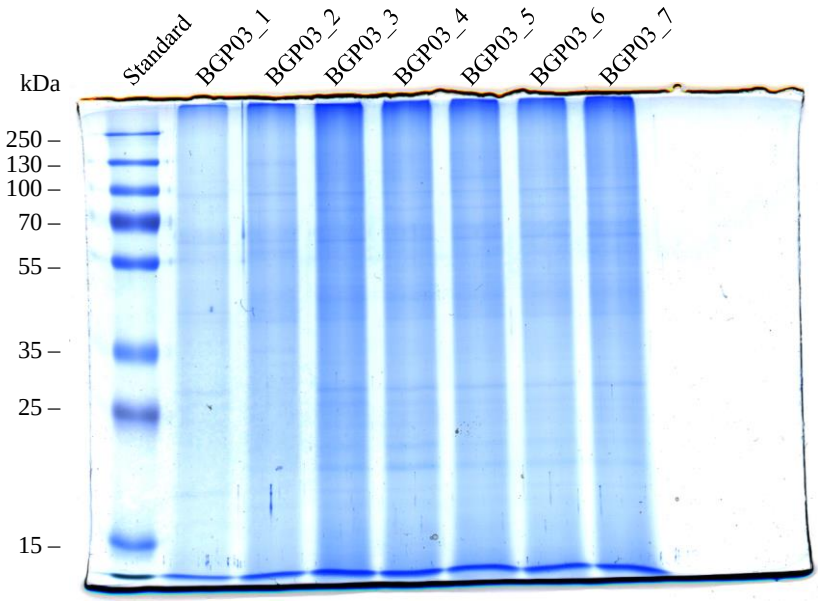


Abbildung 1: SDS-PAGE Proteinmuster aufeinander folgender Proben des Hauptfermenters der Anlage BGA 03.

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Spuren nach der SDS-PAGE in 10 Fraktionen geteilt und jeweils tryptisch verdaut. Die entstandenen Peptide wurden mittels nanoHPLC getrennt und die Massenspektren mit einem Ionenfallenmassenspektrometer (amaZon^{TM} ETD von Bruker Daltonics) aufgenommen. Nach Datenbanksuche mit MASCOT^{TM} (Matrix Science) konnten Proteine von Mikroorganismen, aber auch von Pflanzen, nachgewiesen werden. Der Zeitaufwand für diese Vorgehensweise limitierte den Probendurchsatz für eine detaillierte Analyse auf den Umfang von maximal einer Probe pro Biogasanlage und Arbeitstag.

II.1.2 Vergleich des Metaproteoms von einer mesophilen und einer thermophilen Anlage

Die Analyse komplexer Proben aus Biogasanlagen erfordert eine möglichst hohe Auflösung. In welchem Umfang dies zur Differenzierung zweier Proben zu geschehen hat, wurde in einer weiteren Studie beantwortet. Hierbei wurden die Metaproteome der mesophilen Anlage BGA 04 (Meso1) und der thermophilen Anlage BGA 05 (Thermo1_1) mittels unterschiedlich stark auflösender Methoden untersucht. Verglichen wurde die Anzahl identifizierter Peptide und Proteine nach Anwendung verschiedener Präfraktionierungstechniken während der Probenvorbereitung:

1. eindimensionaler Ansatz (1D): Trennung tryptischer Peptide mittels Umkehrphasenchromatographie vor MS/MS-Analyse
2. zweidimensionaler Ansatz (2D): Trennung der Proteine nach Molekulargewicht vor Trennung der tryptischen Peptide mittels Umkehrphasenchromatographie vor MS/MS-Analyse
3. dreidimensionaler Ansatz (3D): Trennung der Proteine nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht vor Trennung tryptischer Peptide mittels Umkehrphasenchromatographie vor MS/MS-Analyse.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den **Abbildungen 2** und **3** dargestellt.

Erwartungsgemäß erlaubte die dreidimensionale Probenvorbereitung die höchste Anzahl identifizierter Peptide und Proteine. Aufgrund des hohen zeitlichen Messaufwands (bis zu vier Wochen für eine Probe) eignet sich diese Methode jedoch nicht für Screening-Versuche, sondern ausschließlich für detaillierte Analysen einzelner Proben. Eine Probemessung mit einem hochauflösenden Massenspektrometer (orbitale Ionenfalle) am Ende der Projektlaufzeit zeigte, dass vergleichbar gute Ergebnisse bei geringerer Messzeit erzielt werden können (hier nicht dargestellt).

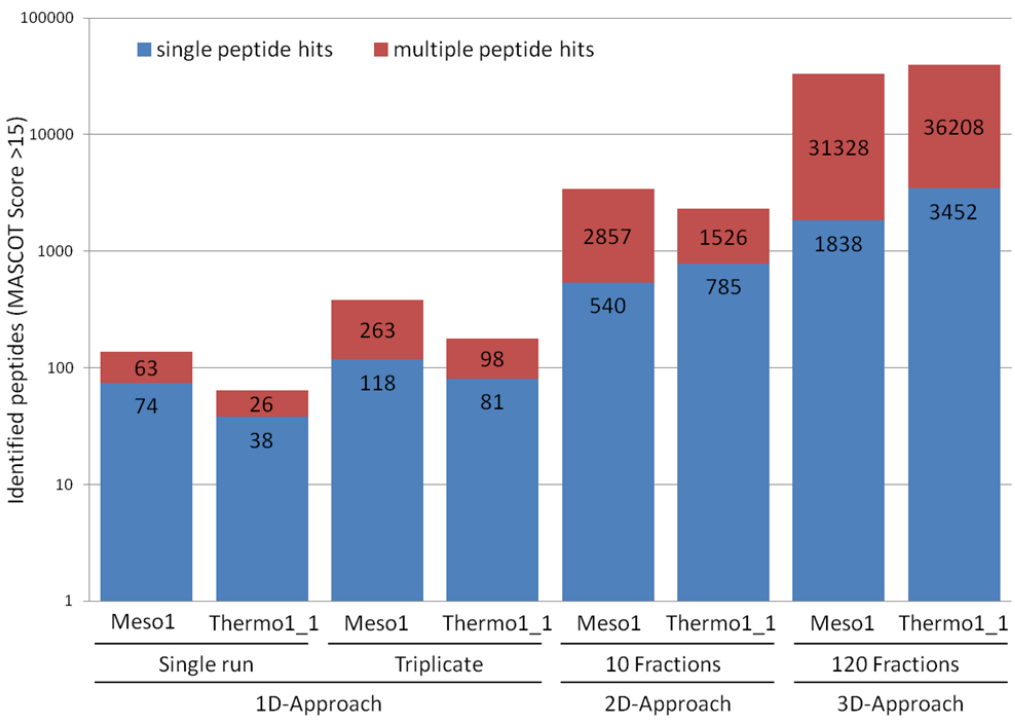


Abbildung 2: Anzahl identifizierter Peptide nach Anwendung von ein-, zwei- und dreidimensionaler Präfraktionierung der Proben von Anlage 4 (Probenahme 10.04.2012) und 5 (Probenahme 05.03.2012, Abbildung aus KOHRS, HEYER *et al.* 2013).

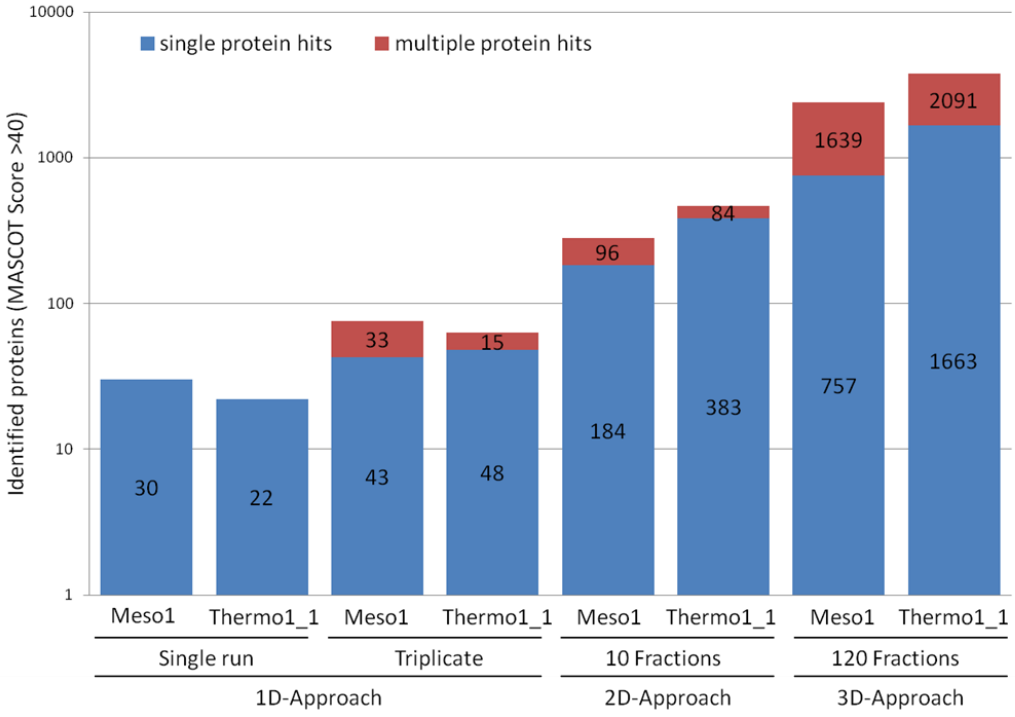


Abbildung 3: Anzahl identifizierter Proteine nach Anwendung von ein-, zwei- und dreidimensionaler Präfraktionierung der Proben von Anlage 4 (Probenahme 10.04.2012) und 5 (Probenahme 05.03.2012, Abbildung aus KOHRS, HEYER *et al.* 2013).

Die mittels 2D- und 3D-Analyse identifizierten Proteine der mesophilen und thermophilen Anlagen wurden zur Erstellung eines taxonomischen Profils der Biomasse herange-

zogen. Zur Vermeidung redundanter Peptid-zu-Protein-Zuweisungen wurden Proteine, die sich ein oder mehrere Peptide teilen, zu sogenannten Metaproteinen zusammengefasst. Auf dieser Grundlage erfolgte eine Charakterisierung, dessen Ergebnis in **Abbildung 4** dargestellt ist. Die Anlage mit mesophiler Prozessführung zeigte eine überragende Dominanz von *Methanosarcinales* sowie weitere charakteristische Ordnungen wie *Bacteroidales*, *Burkholderiales* und *Methanobacteriales*. Im Gegensatz dazu werden bei der thermophilen Anlage *Methanosarcinales* von *Methanomicrobiales* und *Thermococcales* verdrängt, was die Ergebnisse vorrangegangener Publikationen bestätigt (PENDER *et al.* 2004, KRAKAT *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu beschreiben genetische Studien auch unter thermophilen Bedingungen eine mögliche Anwesenheit von *Methanosarcinales*, was hier jedoch mit metaproteomischen Methoden nicht bestätigt werden konnte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Temperatur nicht als einziger Faktor die Abundanz dieser Ordnung beeinflusst (MCHUGH *et al.* 2003, BOURQUE *et al.* 2008). Weitere für die thermophile Prozessführung typische und exklusive Ordnungen sind *Thermoanaerobacterales* und *Thermotogales*.

Im Rahmen dieser taxonomischen Auswertungen zeigte sich die Notwendigkeit einer hochauflösenden Analysetechnik. *Bacteroidales* und *Clostridiales* als Schlüsselorganismen der anaeroben Fermentation werden erst mit Anwendung der 3D-Technik detektiert. Des Weiteren werden bei thermophiler Prozessführung nur mit hochauflösender Technik die zu den Archaeen gehörenden Ordnungen *Thermococcales* und *Halobacteriales* identifiziert.

Ein weiterer Schwerpunkt der Analysen lag bei der Identifikation von Enzymen, die maßgeblich am Abbau von hochmolekularen Polysacchariden des Substrats beteiligt sind. Für folgende Substratmoleküle wurden spezifische Abbauenzyme nachgewiesen: Cellulose (EC: 3.2.1.91: Cellulose-1,4-Beta-Cellobiosidase; GH5, 6 und 9), Hemicellulose (EC: 3.2.1.155: Xyloglucanase), Xylan (EC: 3.2.1.8: Endo-1,4-Beta-Xylanase; GH5, 8-12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 und 66), Arabinan (EC: 3.2.1.55: intrazelluläre Exo-Alpha-(1->5)-L-Arabinofuranosidase; GH3, 10, 43, 51, 54 und 62) und Beta-Galactosidase (EC:3.2.1.23: Beta-Galactosidase; GH1-3, 35, 42 und 50).

Die identifizierten Proteine aus *Archaeen* wurden mit Hilfe der KEGG-Datenbank ihren entsprechenden metabolischen Stoffwechselwegen zugeordnet. Erwartungsgemäß konnten wesentliche Enzyme der Methanogenese nachgewiesen werden. Methylenetetra-hydromethanopterin-Dehydrogenase (EC:1.5.99.9), Coenzyme-F420-Hydrogenase (EC:1.12.98.1) und Coenzyme-F420-abhängige N5,N10-methenyltetrahydromethanopterin-Reduktase (EC:1.5.99.11) gelten als spezifisch für die hydrogenotrophe Methanogenese. Acetate-Kinase (EC:2.7.2.1), Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase (EC:1.2.99.2) und Acetyl-CoA-Decarbonylase/Synthase-Komplex (EC:2.3.-) hingegen sind spezifisch für den acetoklastischen Methanogeneseweg. Für beide Wege wurden die Enzyme Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase (EC:2.1.1.86), Methyl-Coenzyme-M-Reduktase (EC: 2.8.4.1) und V-typische H^+-Transport-ATPase Untereinheit (EC:3.6.3.14), welche im finalen Schritt der Methanbildung und des Energiegewinns beteiligt sind, identifiziert.

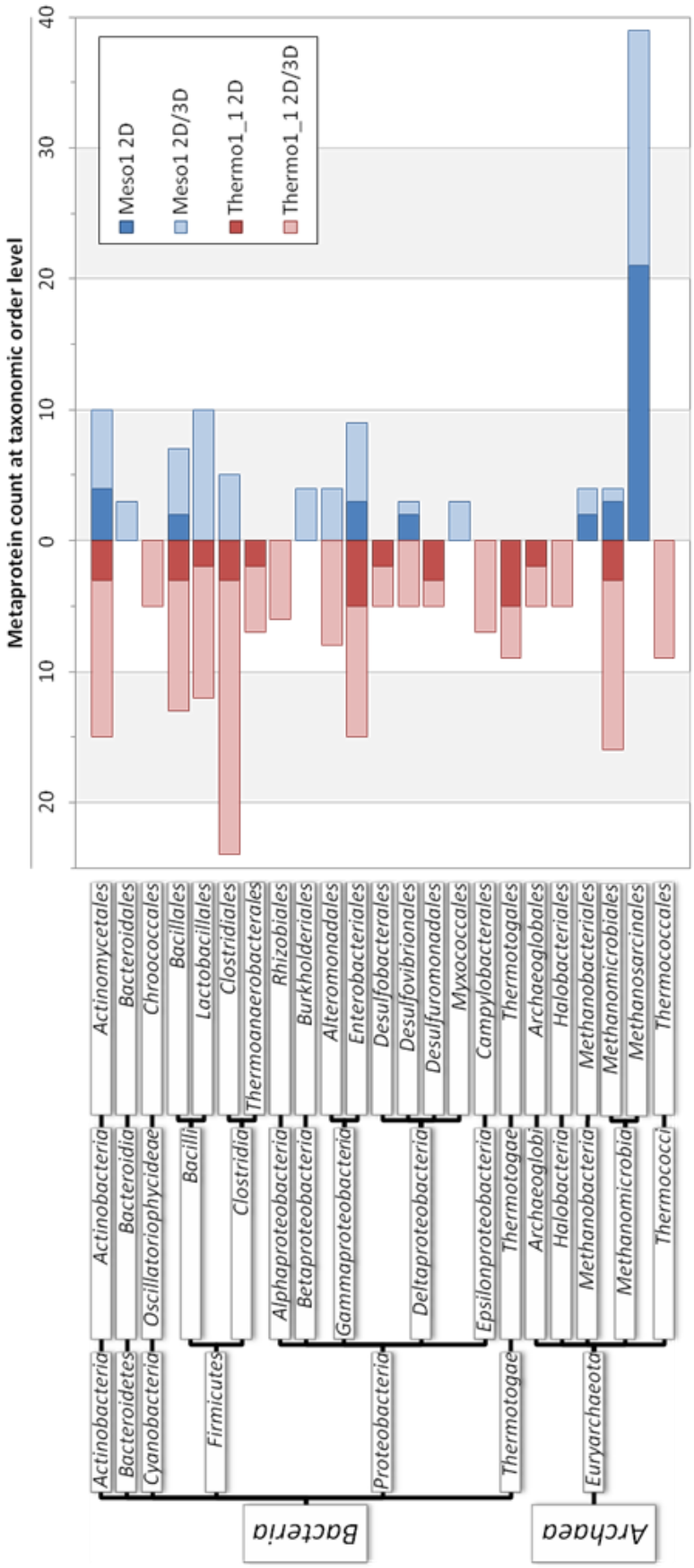


Abbildung 4: Taxonomische Profile der Anlagen Meso1 und Thermo1_1. Dargestellt ist die taxonomische Verteilung der mikrobiellen Organismen nach Metaproteinen für die 2D-Analyse und die kombinierte 2D/3D-Analyse (Abbildung aus KOHRS, HEYER *et al.* 2013).

Das gleichzeitige Verschwinden der Ordnung *Methanosarcinales* und der Enzyme des acetoklastischen Methanogenesewegs bestätigt vorrangegangene Ergebnisse, die einen Wechsel von acetoklastischer zu hydrogenotropher Methanogenese bei steigender Prozesstemperatur von mesophil zu thermophil beschreiben.

Die Ergebnisse dieser Studie wurden als Fachpublikation bei der Zeitschrift ANAEROBE eingereicht, am 25. November 2013 akzeptiert und befindet sich derzeit im Druck (http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.11.009).

II.1.3 Metaproteomanalyse von Störfällen

Die Proteinmuster der Biogasanlagen wurden mit den zugehörigen Prozessdaten verglichen. Bereits in eindimensionalen Proteinmustern nach SDS-PAGE ließen sich charakteristische Banden erkennen, die bei stabilen Prozessen eine zeitliche Konstanz aufwiesen. Dies galt sowohl für Anlagen mit thermophiler als auch mit mesophiler Prozessführung. Wurden Änderungen im zeitlichen Verlauf der Muster sichtbar, erfolgte die Analyse mit einer höheren zeitlichen Auflösung (soweit möglich wöchentlich, **Abbildung 1**). Anlage BGA 3 zeigte im Sommer 2011 sinkende pH-Werte und Gaserträge (**Abbildung 5**). Die Proteinmuster der entsprechenden Proben zeigten im Vergleich zum relativ stabilen Verlauf in der ersten Jahreshälfte 2012 große Unterschiede.

Die massenspektrometrische Analytik zeigte, dass viele Enzyme, die an der Methanogenese beteiligt sind, zum Zeitpunkt der Störung mit geringerer Abundanz als im Normalzustand vorlagen (**Tabelle 1**). Bemerkenswert ist, dass anhand einer Änderung im Proteinmuster der Beginn dieser Störung noch vor dem Einbruch des Gasertrags und eines sinkenden pH-Werts mittels SDS-PAGE detektierbar war (Investigation of the microbial community in industrial biogas plants by metaproteome analysis, HEYER & KOHRS *et al.* 2013, doi 10.1016/j.nbt.2013.01.002).

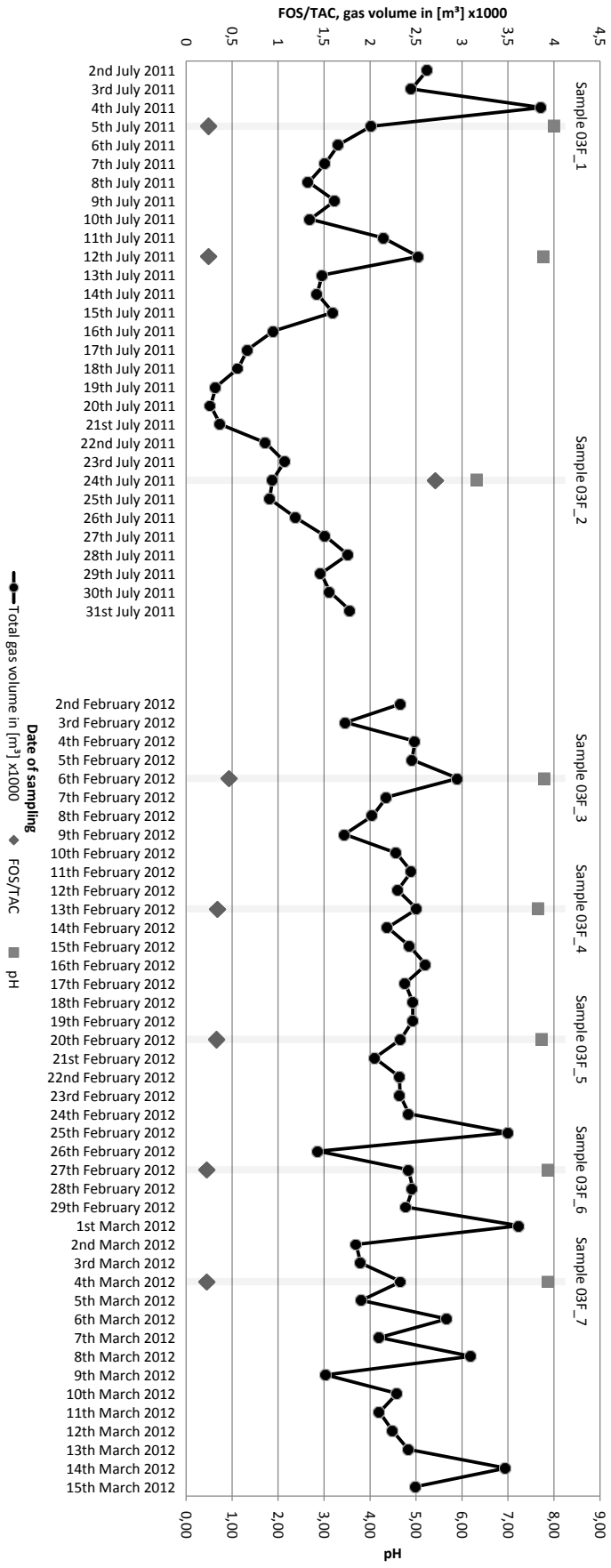


Abbildung 5: Prozessdaten und Zeitpunkte der Probennahmen für Metaproteomanalysen der Anlage 3. ⊸: Totales Gasvolumen in m³ x1000. ◆ = FOS/TAC. ■ = pH-Wert (Abbildung aus KOHRS, HEYER *et al.* 2013).

Tabelle 1: Anzahl nicht redundanter Spektren pro Protein während (03F_1 und 03F_2) und nach einer Übersäuerung (03F_3 und 03F_7) der Anlage BGA 3

Name des Proteins	Probenname			
	03F_1	03F_2	03F_3	03F_7
Acetyl-CoA-decarbonylase/synthase complex alpha	0	0	2	12
Acetyl-CoA-decarbonylase/synthase complex beta	2	0	16	53
Acetyl-CoA-decarbonylase/synthase complex gamma	0	0	7	17
Acetyl-CoA-decarbonylase/synthase complex delta	0	0	1	8
Acetyl-CoA-decarbonylase/synthase complex epsilon	0	0	72	13
Methyl-coenzyme M reductase, alpha subunit	14	33	100	100
Methyl-coenzyme M reductase, beta subunit	34	80	140	160
Methyl-coenzyme M reductase, gamma subunit	54	44	83	195
V-type ATP synthase alpha	3	8	20	27
V-type ATP synthase beta	8	10	36	28
V-type ATP synthase gamma	0	0	2	6
V-type ATP synthase delta	1	0	9	12
V-type ATP synthase epsilon	0	0	5	2
V-type proton ATPase subunit E	0	2	0	0

II.1.4 Bioinformatische Auswertung

Auffällig bei der Auswertung der massenspektrometrischen Daten war die geringe Anzahl identifizierter Proteine, was für diese Art der Proben hauptsächlich an unvollständigen Sequenzdatenbanken liegt. Zudem stellte sich die Nutzung der kommerziellen Software MASCOT™ sowohl für die taxonomische als auch für die die quantitative Auswertung der Daten als unzureichend heraus. Zur Optimierung der bioinformatische Datenauswertung der Massenspektren wurde innerhalb der Arbeitsgruppe des MPI eine Software geschrieben, die die Ergebnisse mehrerer Suchmaschinen verbindet, exaktere taxonomische Zuordnungen erlaubt und nicht-identifizierte Spektren bekannten Spektren zuordnen kann. Eine entsprechende Veröffentlichung dieser Software („MetaProteomeAnalyzer“) ist für das erste Quartal 2014 geplant und steht kurz vor der Einreichung.

II.1.5 Entwicklung eines proteinbasierten Schnelltests

Im Rahmen des Projekts wurde versucht, einen proteinbasierten Schnelltest zur Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften in Umweltproben zu entwickeln. Methyl-CoM Reduktase ist ein Schlüsselenzym des Biogasprozesses, welches den letzten Schritt der Methanbildung katalysiert. Die in Kapitel II.1.3 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass das Enzym ein potentieller Biomarker für Störungen sein kann. Konkreter Inhalt der Versuche war der Nachweis des Modellenzyms Elastase und der Methyl-CoM

Reduktase mittels Western-Blot und ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Zudem wurde untersucht, ob aus der Menge an Enzym auf die Biogasproduktivität geschlossen werden kann.

Da für Methyl-CoM Reduktase kein kommerzieller Antikörper erhältlich war und eine Herstellung durch Immunisierung im Tier mit erheblichen Kosten verbunden ist, wurden Vorversuche mit dem humanen Pankreas-Enzym Elastase III durchgeführt. Für dieses Protein ist ein Antikörper verfügbar. Vorrangegangene Arbeiten zeigten, dass dieses Enzym in Proben aus Abwasserbehandlungsanlagen mit gängigen proteomischen Methoden nachweisbar ist. Proben von mikrobiellen Gemeinschaften aus Kläranalagen zeigen eine vergleichbare Komplexität wie die aus Biogasanlagen. Außerdem beinhalten sie in ähnlichem Maße Mengen störender Verunreinigungen. Mittels Western-Blot einer 2D-PAGE von Metaproteomproben aus Abwasser konnte die Immunreaktion gegen Elastase III reproduzierbar nachgewiesen werden. In darauf folgenden Versuchen wurde diese Immunreaktion für eine Mischprobe aus Proteinextrakten von Abwasser- und Biogasmaterial untersucht, um den Einfluss der Matrix von Biogasproben auf die Immunreaktion beurteilen zu können. Der Nachweis von Elastase III in Gegenwart der Biogasprobe gelang, ein erhöhter Anteil an Huminsäuren, der durch das Biogasmaterial eingetragen wurde, erwies sich jedoch aufgrund einer erheblichen Eigenfluoreszenz dieser Säuren bei 200-500 nm Wellenlänge als potentieller Störfaktor bei der Detektion mittels Chemilumineszenz (vgl. Kap. II.1.1 Anpassung und Optimierung der Methodik).

Für verschiedene Abwasserproben wurde nun eine Studie durchgeführt, in der (I.) die Fluoreszenzintensität des Sekundärantikörpers gegen Elastase III in Western-Blot und (II.) ELISA sowie (III.) die Anzahl der Spektren von Elastase III nach massenspektrometrischer Analyse verglichen wurden. Es zeigte sich, dass eine quantitative Korrelation dieser Techniken vorlag und Aussagen über eine Zu- oder Abnahme des Proteins Elastase III getroffen werden können.

Um einen spezifischen Antikörper gegen Methyl-CoM-Reduktase zu generieren, wurden die Proteinsequenzen sämtlicher Untereinheiten dieses Proteins aller methanogenen Archaeen der öffentlichen Datenbanken UniProt (www.uniprot.org) in einem multiplen Alignment verglichen. In der beta-Untereinheit der Methyl-CoM-Reduktase fand sich eine speziesübergreifende, konservierte Aminosäuresequenz an der Position 358-375 (AVGFSFFSHSIYGGGGPG). Ein Protein-BLAST (http://blast.ncbi.nlm. nih.gov) dieser Sequenz ergab keine Sequenzübereinstimmungen in anderen Proteinen, weshalb ein polyklonaler Antikörper gegen diese Sequenz in Auftrag gegeben wurde (Firma Genosphere, Frankreich).

Nach ersten, positiven Chemilumineszenz-Signalen im Western-Blot des Antikörpers gegen das Peptid wurden die entsprechenden Gelbanden ausgeschnitten, massenspektrometrisch analysiert und die Detektion der beta-Untereinheit von Methyl-CoM-Reduktase bestätigt. Wider Erwarten wurden jedoch auch falsch-positive Chemilumineszenz-Signale in einem Proteinextrakt von *E. coli* detektiert, zudem kam es zu Lö-

schungen von Signalintensität in Biogasproben, was durch die Eigenfluoreszenz der beinhalteten Huminstoffe erklärt wird.

Wegen der unspezifischen Bindungen gelang es bisher nicht, gefundene Banden sinnvoll mit entsprechenden Prozessparametern der Biogasanlagen zu korrelieren. Die Spezifität des Primärantikörpers soll nun noch mit Proteinextrakten von methanogenen Reinkulturen geprüft werden.

Die Dokumentation dieser Ergebnisse erfolgte im Rahmen einer Master-Arbeit am Lehrstuhl für Bioprozesstechnik an der OvGU durch Frau J. Rüdiger unter Betreuung von Dr. D. Benndorf und ist auf Anfrage zu erhalten.

Zitierte Literatur

KOHRS F., HEYER R. ET AL. (2013): Sample prefractionation with liquid isoelectric focusing enables in depth microbial metaproteome analysis of mesophilic and thermophilic biogas plants. Anaerobe (Artikel im Druck, http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.11.009).

PENDER S. ET AL. (2004): Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors. Water Res 38: 619-630.

KRAKAT N. ET AL. (2010): Anaerobic digestion of renewable biomass: thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. Appl Environ Microbiol 76: 1842-1850.

MCHUGH S. ET AL. (2003): Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. FEMS Microbiol Lett 219:297-304.

BOURQUE J.S. ET AL. (2008): Methane production in an UASB reactor operated under periodic mesophilic-thermophilic conditions. Biotechnol Bioeng, 100: 1115-1121.

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Ca. 75 % des im Gesamtfinanzierungsplan genehmigten Finanzvolumens wurden planmäßig für Personalkosten ausgegeben (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Zusammenfassung der abgerechneten Ausgaben gegenüber des Gesamtfinanzierungsplans

Position des Gesamtfinanzierungsplans	Abgerechnete Ausgaben (Summe bis 2013)	Vorgabe des Gesamtfinanzierungsplan
0812	56.629,08 Euro	56.076,00 Euro
0843	14.857,46 Euro	15.108,00 Euro
0846	2.180,55 Euro	2.404,00 Euro
Summe	73.667,09 Euro	73.588,00 Euro

Wichtige Positionen der Dienstreiseabrechnungen sind die Tagungsgebühren von D. Benndorf und F. Kohrs bei der VAAM in Bremen 2013 und die damit verbundenen Reiskosten. Des Weiteren nimmt die Tagungsgebühr des FEMS-Kongresses in Leipzig 2013 mit 550,00 Euro für F. Kohrs die größte Position ein.

Kostenintensive Sachmittel sind einerseits Vor- und Trennsäulen für die genutzte HPLC-Anlage sowie deren Verbrauchsmittel (Probenflaschen und Schnappverschlüsse). Die größte Position nimmt mit 2.644,18 Euro die einmalige Anschaffung von Fluoreszenzfarbstoffen für die Färbung von SDS-PAGE-Gelen ein.

Zur Minimierung der Kosten für die Beschaffung von Sach- und Verbrauchsmitteln wurden, soweit möglich, Angebote von drei Anbietern eingeholt und das jeweils günstigste angefordert. In wenigen Ausnahmefällen war aufgrund von Gerätespezifikationen kein Bezug der Mittel von einem alternativen Anbieter möglich.

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die für die Bearbeitung des Teilvorhabens veranschlagten 16 Monate erwiesen sich als nicht ausreichend für den Abschluss der Forschungsarbeiten, weshalb nach Absprache mit dem Projektträger eine kostenneutrale zweimonatige Verlängerung der Stelle vorgenommen wurde. Dies diente u.a. dem Abschluss der Dokumentation von Ergebnissen, die im Sinne des Verwertungsplans der Öffentlichkeit im Rahmen einer Fachpublikation zugänglich gemacht werden sollten. Finanziert wurde die Verlängerung aus bis dahin nicht verbrauchten Personalmitteln und, in geringem Maß, durch Umwidmung von Sachmitteln

Gelbasierte Separationstechniken für Proteine (1D- und 2D-SDS-PAGE) sind im Vergleich zu den gelfreien Methoden der Proteinanalytik mittels Massenspektrometrie weniger kosten- und zeitintensiv. Sie eignen sich daher besser für die Anwendung zur Prozessüberwachung der funktionellen Biomasse von Biogasanlagen. Die Qualität der

Proteinfingerprints in SDS-Gelen hängt maßgeblich von den vorangegangenen Aufreinigungsschritten und der verwendeten Färbetechnik zur Visualisierung ab. Aus diesem Grund werden die Optimierungsarbeiten und die damit verbundenen Kosten (u.a. für Fluoreszenzfarbstoffe) als notwendig und angemessen angesehen.

Die ebenfalls relativ kostenintensive Versorgung der verwendeten HPLC-Anlage mit Verbrauchsmitteln ist durch den hohen Probendurchsatz dieser Analysemethode zur Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie zu erklären. Die Beschreibung der Proteine hauptsächlich stoffwechselaktiver Mikroorganismen galt jedoch als Hauptziel des Teilvorhabens und war somit als notwendig anzusehen.

Die Entwicklung der antikörperbasierten Detektion des Biomarkers Methyl-CoM-Reduktase als Beispiel für einen Biomarker war absolut notwendig für die Entwicklung eines in der Praxis anwendbaren Schnelltests zur Prozessüberwachung von Biogasanlagen.

II.4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

In Anlehnung an den im Vorhabenschreiben aufgestellten Verwertungsplan kann folgender Nutzen aus den erzielten Ergebnissen gezogen werden. Erwartungsgemäß konnten Ergebnisse des Teilvorhabens 3 bereits in Form von zwei Fachartikeln publiziert werden, weitere Publikationen sind in Bearbeitung bzw. in Vorbereitung (II.6). Weiterhin wurden die Arbeiten bereits auf wissenschaftlichen Fachtagungen in Form von Posterbeiträgen vorgestellt (Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie in Bremen 2013 „Evaluation of multidimensional separation techniques to increase identification of proteins from anaerobic digesters“ und 5th Congress of European Microbiologists der Federation of European Microbiological Societies in Leipzig 2013 „Evaluation of SDS-PAGE profiles for process monitoring of anaerobic digesters“).

Ein großes Anwendungspotential besteht in der wirtschaftlichen Verwertung. Aufgrund der prinzipiellen Eignung des Enzyms Methyl-CoM-Reduktase als Biomarker für eine voranschreitende Reaktorversäuerung sollte im Rahmen anschließender Forschungsarbeiten verstärkt nach weiteren Prozessmarkern gesucht werden. Denkbar wären nicht nur Biomarker für die Detektion verschiedener Störfälle, sondern auch die Ableitung von Markern zur Überwachung und Analyse von Kohlenstoffabbauwegen, Kreisläufen oder einzelner Teilprozesse der Methanogenese. Gelänge hier eine Korrelation mit den entsprechenden verfahrenstechnischen Parametern bei Biogasanlagen, könnte die Prozessüberwachung zu großen Teilen mithilfe preiswerter markergestützter Schnelltests erfolgen. Hieraus ergibt sich ein hohes Potential zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit von Biogasfermentationen, insbesondere auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen. Zur Überführung der Ergebnisse in die Praxis werden weitere, dem Projekt BIOGAS-BIOCOENOSIS vergleichbare, Forschungs- und Entwicklungsarbeiten erforderlich sein. Diese sollten dann in enger Kooperation mit der Industrie umgesetzt werden.

II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Eine Abfrage in der Literaturdatenbank Web-of-Knowledge der Fa. Thompson-Reuters am 09.01.2014 für die Stichwörter „biogas plant metaproteome“ und „anaerobic digester metaproteome“ in der Rubrik „Topic“ ergab zwei Einträge. Im Rahmen der einen Studie erfolgten die Analysen im Labormaßstab (HANREICH *et al.* 2012) und nicht, wie im Projekt BIOGAS-BIOCOENOSIS, im Praxismaßstab. Die zweite Publikation ist im Rahmen dieses Projekts angefertigt worden. Andere den Autoren bekannte Publikationen im Bereich Metaproteomics biogasbildender mikrobieller Gemeinschaften oder Archaeen behandeln entweder Reinkulturen, Labor- und Pilotreaktoren, die Biogasbildung in Abwasserbehandlungsanlagen oder bei Temperaturen unter 20°C.

Basierend auf dieser Recherche kann gesagt werden, dass Publikation seitens Dritter zum Thema des Teilvorhabens 3 nicht bekannt sind.

Zitierte Literatur

HANREICH A., HEYER R., BENNDORF D., RAPP E., PIOCH M., REICHL U., KLOCKE M. (2012): Metaproteome analysis to determine the metabolically active part of a thermophilic microbial community producing biogas from agricultural biomass. Can J Microbiol 58: 917-922.

II.6 Veröffentlichungen

II.6.1 Fachpublikationen

Teilergebnisse dieses Forschungsvorhabens wurden vorab in zwei renommierten internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht:

- **KOHRS F., HEYER R., MAGNUSSEN A., BENNDORF D., MUTH T., BEHNE A., RAPP E., KAUSMANN R., HEIERMANN M., KLOCKE M., REICHL U. (2014):** Sample prefractionation with liquid isoelectric focussing enables in depth microbial metaproteome analysis of mesophilic and thermophilic biogas plants. Anaerobe 29: 59-67.
- **HEYER R., KOHRS F., BENNDORF D., RAPP E., KAUSMANN R., HEIERMANN M., KLOCKE M., REICHL U. (2013):** Metaproteome analysis of the microbial communities in agricultural biogas plants. New Biotechnology 30: 614-622.
- Drei weitere Fachartikel sind in Abstimmung mit den Verbundpartnern geplant.

II.6.2 Software

Die Veröffentlichung der „MetaProteomeAnalyzer“-Software unter Leitung von Herrn T. Muth (MPI Magdeburg) ist für das I. Quartal 2014 geplant und steht kurz vor der Einreichung.

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: SDS-PAGE Proteinmuster aufeinander folgender Proben des Hauptfermenters der Anlage BGA 03 92

Abbildung 2: Anzahl identifizierter Peptide nach Anwendung von ein-, zwei- und dreidimensionaler Präfraktionierung der Proben von Anlage 4 (Probenahme 10.04.2012) und 5 (Probenahme 05.03.2012) 94

Abbildung 3: Anzahl identifizierter Proteine nach Anwendung von ein-, zwei- und dreidimensionaler Präfraktionierung der Proben von Anlage 4 (Probenahme 10.04.2012) und 5 (Probenahme 05.03.2012) 94

Abbildung 4: Taxonomische Profile der Anlagen Meso1 und Thermo1_1 96

Abbildung 5: Prozessdaten und Zeitpunkte der Probennahmen für Metaproteomanalysen der Anlage 3 98

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Anzahl nicht redundanter Spektren pro Protein während und nach einer Übersäuerung der Anlage BGA 3 99

Tabelle 2: Zusammenfassung der abgerechneten Ausgaben gegenüber des Gesamtfinanzierungsplans 102

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen - Ermittlung der mikrobiellen Diversität sowie von hauptsächlichen verfahrenstechnischen Einflussfaktoren auf die Mikroflora

BIOGAS-BIOCOENOSIS

Teilvorhaben 4 - Biostatistische Prozessdatenauswertung

Zuwendungsempfänger:

Universität Hohenheim (UHoh)
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
FG Prozessanalytik und Getreidetechnologie

Förderkennzeichen:

22028911

Laufzeit:

01.11.2011 bis **31.10.2013**

Datum der Veröffentlichung: 29. August 2014

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

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

Autoren

Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Tetyana Beltramo

Kontakt

Universität Hohenheim (UHoh)
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
FG Prozessanalytik und Getreidetechnologie

Inhalt

I Das Projekt ,,Biogas-Biocoenosis‘‘: Teilvorhaben 4 – FKZ 22028911....110
I.1 Aufgaben im Rahmen des Projektes 110
I.2 Voraussetzungen für die Umsetzung der Ziele 111
I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens 112
I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand 113
I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 114

II Darstellung der Ergebnisse 114
II.1 Materialien und Methoden 114
II.1.1 Materialien....114
II.1.2 Methoden 114
II.2 Ergebnisse....122
II.2.1 Korrelationsanalyse der Prozessgrößen....122
II.2.2 Vorhersage der Zielgröße mit Hilfe von Regressionsmodellen....129
II.2.3 Kreuzvalidierung der Prozessdaten....132
II.2.4 Implementierung eines Optimierungsalgorithmus 135
II.3 Ausblick und weiteres Vorhaben....149
II.4 Anhang 151
II.4.1 Korrelation der Prozessgrößen....152
II.4.2 Vorhersage der Zielgröße mit Hilfe von Regressionsmodellen....161
II.4.3 Kreuzvalidierung der Prozessdaten....165
II.4.4 Implementierung eines Optimierungsalgorithmus 182

Verzeichnis der Abkürzungen....184
Verzeichnis der Abbildungen....186
Verzeichnis der Tabellen....188
Verzeichnis der Tabellen im Anhang....189
Quellen....190

I Das Projekt „Biogas-Biocoenosis“: Teilvorhaben 4 – FKZ 22028911

I.1 Aufgaben im Rahmen des Projektes

Das Teilvorhaben 4 umfasst die statistische Auswertung der Prozessdaten von zehn untersuchten Biogasanlagen. Es sollten die Einflussparameter auf das Wachstum und die Aktivität der fermentativen Mikroorganismen und der methanbildenden Archaeen während der Biogasherstellung bestimmt werden. Unter anderen sollte eine bioinformatische/biostatistische Auswertung der Prozessdaten und eine Untersuchung der Korrelation zwischen den chemischen sowie den verfahrenstechnischen Prozessgrößen und der Prozessmikrobiologie durchgeführt werden.

I.2 Voraussetzungen für die Umsetzung der Ziele

Voraussetzung für die Durchführung des Teilprojektes war die Verfügbarkeit der Messdaten, die im Laufe des ersten Projektteiles erfasst wurden. Die bisher zur Verfügung gestellten Daten umfassen die chemischen und verfahrenstechnischen Messdaten, gemessen bei neun[1] landwirtschaftlichen Biogasanlagen. In **Tabelle 1** ist eine Übersicht über die untersuchten Biogasanlagen dargestellt. Die chemischen und verfahrenstechnischen Messdaten wurden bisher nur teilweise zur Verfügung gestellt. Die Datensätze der Biogasanlage BGA 03 (Erchinger) wurde im Dezember 2012 vollständig zur Verfügung gestellt. Die mikrobiologischen Messdaten aller beprobten Biogasanlagen sind ebenfalls in Bearbeitung und werden später veröffentlicht. **Tabelle 2** zeigt die erfassten Prozessdaten. In grau markierte Prozessgrößen werden später zur Verfügung gestellt.

[1] Die Messdaten von der Biogasanlage Bischheim (01) wurden aufgrund der fehlenden verfahrenstechnischen Messdaten in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Tabelle 1: Biogasanlagen 02 bis 10.

Anlage (Nr.)	*Substrat*	*Aufbau*	*Prozessführung*
Neumann (02)	Mais, Rindergülle	Hydrolyse, HF, EL	mesophil
Erchinger (03)	Maissilage, Grassilage, Grünroggensilage, Rindergülle	HF, NF	mesophil
Eckel (04)	Maissilage, Grünroggensilage, Rindermist, Rindergülle	HF, NF, EL	mesophil
Kuhls (05)	Maissilage, Hühnertrockenkot	HF, NF, EL	thermophil
Meyer-H. (06)	Maissilage	HF, MS, NF, EL	mesophil
Schwenker (07)	Maissilage, Grünroggensilage, Rindermist, Güllenmischung	HF, NF, EL	mesophil
Demes (08)	Maissilage, Grünroggensilage, Grassilage, Rindermist, Rindergülle	HF, NF, EL	mesophil
Bürger (09)	Maissilage, Hühnertrockenkot, Güllenmischung	HF, EL	mesophil
Fuest (10)	Mais-, Grassilage, Güllenmischung	HF, EL	mesophil

Tabelle 2: Messdaten der Biogasanlagen 02 bis 10.

Chemische Messdaten	*Verfahrenstechnische Messdaten*	*Mikrobiologische Messdaten*
pH-Wert	Biogasvolumenstrom	Metaproteomische Messdaten
Leitfähigkeit	Substrateingangsstrom	Messdaten TRFLP-Analyse
Rohasche	Stromverbrauch	
Rohfaser	Energiebedarf	
FOS/TAC	Wirkarbeit	
Organische Säuren	Heizölverbrauch	
Stickstoffgehalt	Betriebsstunden	
NH4 Gehalt	Enzymatik	
Spurenelemente	Niederschlag	
Futtermittelanalytik	Substratzusammensetzung	
Zuckeranalytik	Raumbelastung	
oTS/TS	Verweilzeit	
Temperatur		

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Der Prozess der Biogasherstellung ist ein sehr komplexer Vorgang, welcher in mehreren Stufen abläuft. Um den Prozess zu beschreiben wurde eine biostatistische Auswer-

testrategie entwickelt, welche zu einem umfassenden Verständnis der Prozessabläufe und Zusammenhänge führen sollte. In **Abbildung 1** ist ein Schema der Auswertemethodik dargestellt. Zu Beginn wurde eine Korrelationsanalyse der chemischen und verfahrenstechnischen Prozessgrößen durchgeführt, um die linearen Abhängigkeiten zwischen den Prozessgrößen zu bestimmen. Die weitere Auswertung der Prozessdaten wurde anhand der Regressionsmodelle zur Vorhersage der Zielgröße, die Biogasausbeute pro Tag, durchgeführt. Hier sollten die möglichen nicht-linearen Abhängigkeiten zwischen den einzelnen Prozessgrößen untersucht werden. Die Implementierung eines Optimierungsalgorithmus sollte zu einer Verbesserung der Robustheit und zu einer besseren Genauigkeit der Modelle führen. Die Robustheit der Modelle beschreibt die Funktionalitätsgüte der berechneten Modelle und wird als Bestimmtheitsmaß (R^2) erfasst. Die Genauigkeit der berechneten Modelle wird durch den mittleren Fehler (RMSE Root Mean Square Error) ausgedruckt.

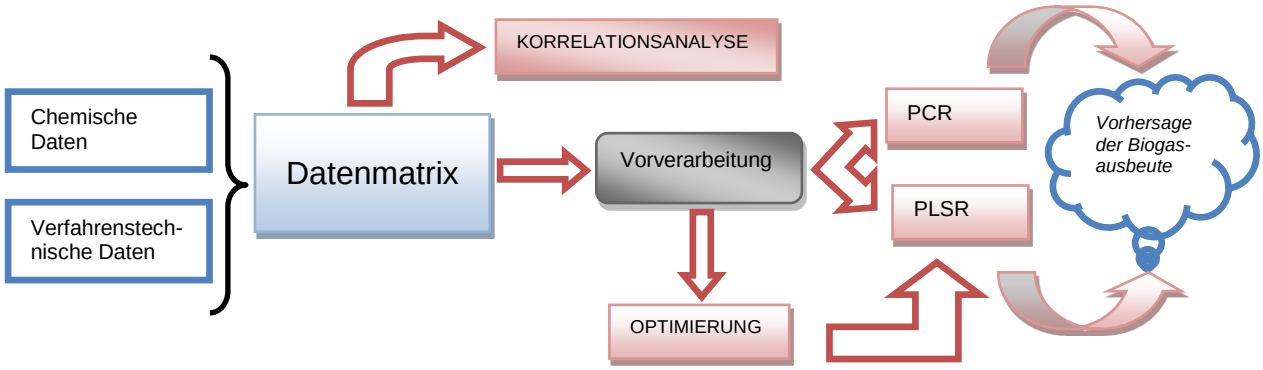


Abbildung 1: Schema der Auswertemethodik für die chemischen und verfahrenstechnischen Prozessdaten.

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Der Prozess der Biogasherstellung ist seit mehreren Jahrzehnten bekannt. Bisher gab es zahlreiche Versuche den Prozess im Labormaßstab abzubilden. Die meisten Versuche brachten keine relevanten Ergebnisse, da die Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaften schwer von den reellen Bedingungen auf einen Labormaßstab übertragen werden kann. Es war daher notwendig den Prozess unter reellen Bedingungen zu untersuchen, um die Zusammenhänge zwischen den Prozessgrößen und der Mikrobiologie analysieren zu können.

Im Rahmen des Projektes wurden neun landwirtschaftlichen Biogasanlagen untersucht. Dabei wurde eine Vielzahl an Prozessgrößen gemessen, welche die chemischen Messdaten, die verfahrenstechnischen Messdaten und die Mikrobiologie während der Biogasherstellung umfasste. Um die komplexen Zusammenhänge zwischen den Einflussgrößen und der Aktivität der Mikroorganismen aus den erfassten Messdaten zu ermitteln wurde eine Reihe statistischer Methoden angewendet. Unter anderen wurden eine Korrelationsanalyse, multivariate Analysemethoden und ein metaheuristischer Optimierungsalgorithmus implementiert.

Die Korrelationsanalyse ist eine einfache Methode, um die Korrelationen der Messdaten untereinander sichtbar zu machen. Dabei handelt es sich um einen linearen Zusammenhang zwischen den Messdaten.

Mittels multivariater Regressionsverfahren, ist es möglich einen Zusammenhang zwischen einer abhängigen Prozessvariable (Zielgröße) und mehreren unabhängigen Variablen (Prozessgrößen) zu beschreiben (KESSLER 2007A). Es handelt sich um einen funktionalen Zusammenhang zwischen den messbaren Prozessgrößen und der schwer bestimmenden Zielgröße (KESSLER 2007B). Dafür wurden die Principal Component Regression (PCR) und die Partial Least Squares Regression (PLSR) verwendet.

Um die Modellgüte der berechneten Regressionsmodelle zu verbessern, wurde ein metaheuristischer Optimierungsalgorithmus implementiert. Metaheuristische Algorithmen werden für die Lösung komplexer kombinatorischen Problemen verwendet. In diesem Beitrag wurde für die Lösung der vorliegenden Optimierungsprobleme ausschließlich die Ameisenkolonieoptimierung verwendet.

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Projektes wurde eine Zusammenarbeit mit den Projektpartnern vorgesehen. Eine Kooperation mit fremden Stellen wurde bisher nicht in Anspruch genommen.

II Darstellung der Ergebnisse

II.1 Materialien und Methoden

II.1.1 Materialien

Die verwendete Software

Für die Berechnung der Regressionsmodelle und die Implementierung eines Optimierungsalgorithmus wurde die Matlab-Version 7.10.0.499 (R2010a) Release 5.2.2010 verwendet.

Die verwendete Hardware

Für die vorliegende Arbeit wurde der Computer AMD Phenom ™ II X2 B57 mit einem 3.20 GHz Prozessor und einem Arbeitsspeicher von 4,00 GB verwendet. Der Computer lief unter dem Betriebssystem MS-Windows 10.

Die Datensätze

Die Datensätze umfassen die chemischen, verfahrenstechnischen und mikrobiologischen Messdaten.

Die chemischen und verfahrenstechnischen Messdaten stellten uns

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB)
Abt. Bioverfahrenstechnik (Teilvorhaben 1) zur Verfügung.

Die mikrobiologischen Messdaten werden von den folgenden Projektpartnern zur Verfügung gestellt:

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB)
Abt. Bioverfahrenstechnik (Teilvorhaben 1)

Universität Bielefeld
Centrum für Biotechnologie (CeBiTec)
Institut für Genomforschung und Systembiologie
Genomforschung Industrieller Mikroorganismen (Teilvorhaben 2)

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (OVGU)
Bioprocess Engineering (Teilvorhaben 3).

II.1.2 Methoden

II.1.2.1 Vorverarbeitung der Prozessdaten

Die Vorverarbeitung der Messdaten ist ein sehr wichtiger Schritt bei jeder statistischen Auswertung. Die Datensätze können die so genannten Ausreißer enthalten, die durch eine falsche Handhabung der Proben oder durch einen systematischen Messfehler ver-

ursacht werden können. Diese Messwerte stellen eine falsche Quelle für die Varianz der Messdaten dar und können somit das Ergebnis negativ beeinflussen. Es gibt eine Reihe von Methoden, welche typischerweise als Standardverfahren in Statistik und Chemometrie angewendet werden. In **Tabelle 3** ist eine Übersicht der Vorverarbeitungsmethoden dargestellt.

Tabelle 3: Methoden der Messdaten-Vorverarbeitung.

Methode	***Eigenschaft***
Normalisierung	skaliert alle Messdaten auf eine Ebene
Gewichtung	bestimmte Messdaten haben mehr Einfluss auf das Ergebnis
Glättung	entfernt das Rauschen
Baseline-Korrektur	entfernt systematische Abweichungen

Für die Auswertung der chemischen und verfahrenstechnischen Messdaten wurde das Normalisierungsverfahren angewendet. Die mathematische Grundlage dieser Methode ist in Gleichung 1 dargestellt.

$$X_{i,norm} = \frac{X_i - \bar{X}}{\sigma(X_i)}$$ *Gleichung 1*

$X_{i,norm}$: $normalisierte\ X_i\ Messwerte$
X_i: $Messwerte\ zum\ Zeitpunkt\ i$
$\bar{X}$: $Mittelwert\ aller\ X_i\ Messwerte$
$\sigma(X_i)$: $Standardabweichung\ der\ Messwerte\ X_i$

In **Abbildung 2** ist der Verlauf chemischer Messdaten der Biogasanlage Erchinger (03) dargestellt. Das Ergebnis einer Normalisierung dieser Messdaten ist in **Abbildung 3** ersichtlich.

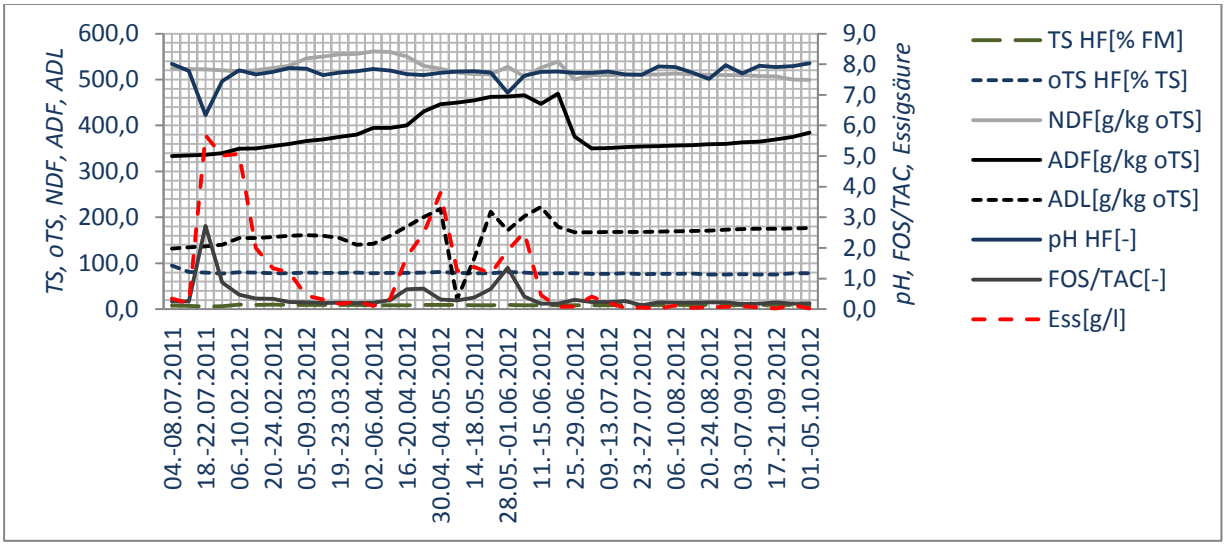


Abbildung 2: Verlauf der chemischen Messdaten der BGA Erchinger (03).

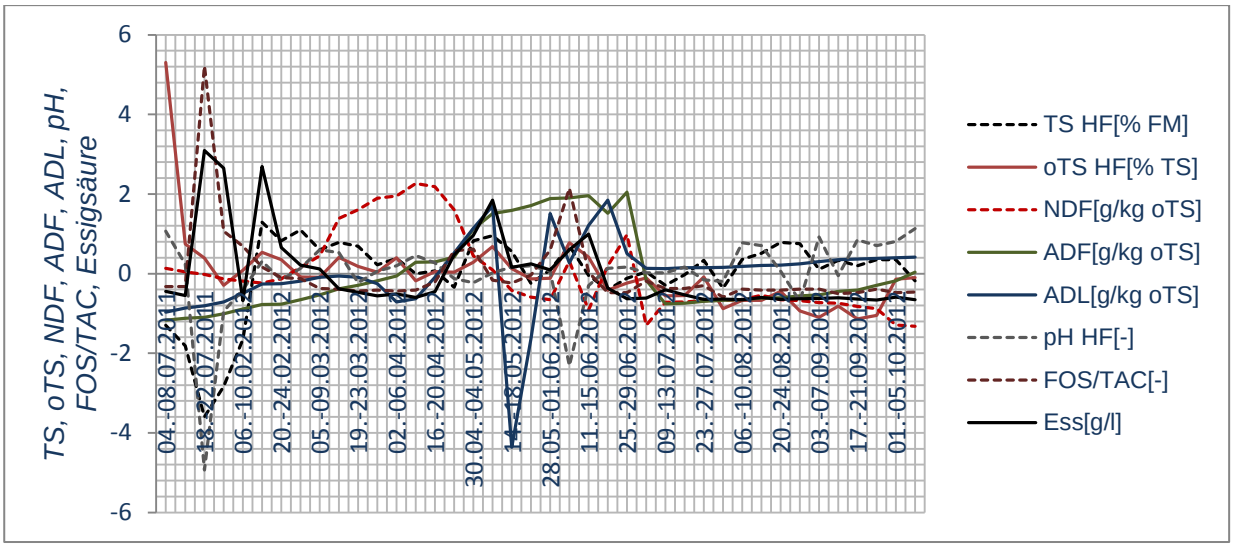


Abbildung 3: Verlauf der normalisierten chemischen Messdaten der BGA Erchinger (03).

II.1.2.2 Korrelationsanalyse der Prozessgrößen

Die Korrelationsanalyse ist eine einfache Methode zur Untersuchung der linearen Abhängigkeiten zwischen den Prozessgrößen. Der Korrelationskoeffizient (*Korr*) ist die beschreibende Größe für die Korrelation, seine Werte liegen zwischen -1 und 1. Ein betragsmäßig hoher Korrelationskoeffizient weist auf eine starke lineare Abhängigkeit der Prozessgrößen hin. In Gleichungen 2, 3 und 4 ist der mathematische Weg, um den Korrelationskoeffizienten zu berechnen, dargestellt.

$$Var(X_i) = \frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(X_i - \bar{X})^2 \qquad \textit{Gleichung 2}$$

$Var(X_i)$: $Varianz\ der\ Messwerte\ X_i$
X_i: $Messwerte\ zum\ Zeitpunkt\ i$
$\bar{X}$: $Mittelwert\ aller\ X_i\ Messwerte$

$$\sigma(Xi) = \sqrt{Var(X_i)} \qquad \textit{Gleichung 3}$$

$\sigma(X_i)$: $Standardabweichung\ der\ Messwerte\ X_i$

$$Korr(X_i, Y_j) = \frac{\mathrm{cov}(X_i, Y_j)}{\sigma(X_j)\cdot\sigma(Y_j)} \qquad \textit{Gleichung 4}$$

Y_j: $Y - Messwerte\ zum\ Zeitpunkt\ j$
$Korr(X_i, Y_j)$: $Korrelationskoeffizient\ von\ X_i\ und\ Y_j$
$Cov(X_i, Y_j)$: $Kovarianz\ der\ Messwerte\ X_i\ und\ Y_j$

II.1.2.3 Kreuz-Validierung der Prozessdaten

Für die Berechnung der Regressionsmodelle wurden die Messdaten in zwei Datensets aufgeteilt: in das Kalibrationsset (70 % aller Messdaten) und in das Test-Set (die restlichen 30 % der Messdaten). Die Aufteilung der Daten in die Datensets erfolgte zufällig. Dieser Schritt wird vor der Berechnung der Modelle durchgeführt und gehört zu den Standardverfahren in Statistik. Mit dem Kalibrationsset wird das berechnete Modell validiert. Damit wird das berechnete Modell auf seine Funktionalität für die unbekannten Messdaten überprüft. Das Test-Set dient zur eigentlichen Vorhersage der Zielgröße. Der Ablauf dieser Methode ist in **Abbildung 4** dargestellt.

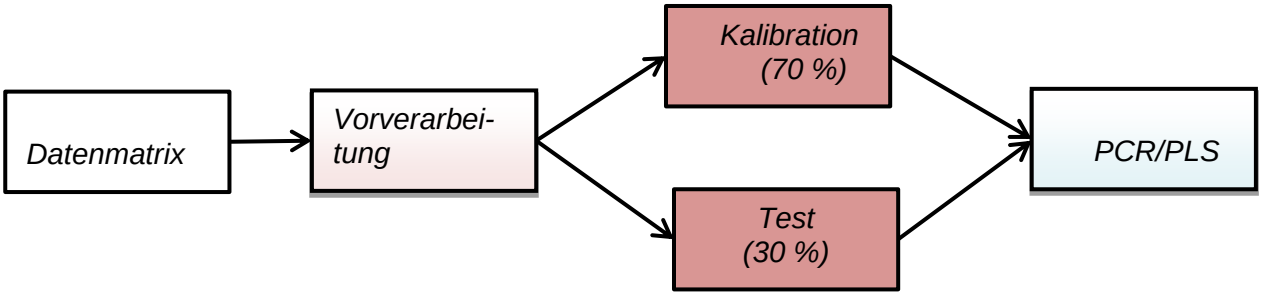


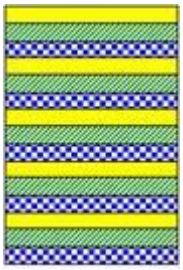
Abbildung 4: Ablauf der Berechnung von der Zielgröße.

Das oben beschriebene Verfahren liegt im Grunde der Kreuzvalidierung. Diese Methode wird sehr häufig verwendet um das so genannte ,,**Over-Fitting**‘‘ zu vermeiden. Von ,,Over-Fitting‘‘ spricht man bei einer guten Anpassung der Kalibrationsdaten an das Modell und bei gleichzeitig schlechter Vorhersage der Testdaten. Nun wird der gesamte Datensatz in gleiche Datenmengen **n** aufgeteilt. Ein bestimmter Anteil der Datenmengen wird für den Test und der Rest für die Kalibration verwendet. In **Tabelle 4** sind die Methoden der Kreuzvalidierung dargestellt. Die Güte der berechneten kreuzvalidierten Regressionsmodelle wird anhand der folgenden Modell-Größen beurteilt:

RMSECV (Root Mean Square Error of Cross-Validation): Wurzel aus mittlerem quadratischem Fehler der Kreuzvalidierung

R^2 *CV*: Bestimmtheitsmaß der kreuzvalidierten Regressionsmodelle.

Tabelle 4: Methoden der Kreuzvalidierung.

	Venetian Blinds	*Contiguous Blocks*	*Random Subsets*	*Leave-One-Out*
				
Anzahl der Schnitte	s	s	s	s
Anzahl der Teil-mengen	n	n	n	n
Anzahl der Teil-mengen für das Kalibrierungsset	s	s	(s*r) *r = Anzahl der Wiederholungen	n-1
Anzahl der Teil-mengen für das Test-Set	n/s	n/s	n/s	1

Für die Auswertung der Datensätze wurde die **Leave-One-Out** (*Full Cross Validation*) verwendet. Bei dieser Methode wird der gesamte Datensatz in **n** Teilmengen aufgeteilt. Dabei wird jede einzelne Teilmenge für den Test verwendet, den Rest (**n-1**) verbleibt für die Kalibration. Der Vorgang wird so oft durchgeführt bis jede einzelne Teilmenge für den Test verwendet wird. Das Nutzen von Leave-One-Out liegt ebenfalls daran, dass keine zufällige Stichprobenauswahl getroffen wird und dass ,,Over-Fitting‘‘ nicht vorkommt. Dies wird für das Vermeiden von Over-Fitting angewendet. Der einzige Nachteil im Vergleich zu den anderen Methoden der Kreuzvalidierung ist der zeitliche Aufwand.

II.1.2.4 Vorhersage der Zielgröße anhand der Regressionsmodellen

Als weiterer Schritt der Auswertestrategie für die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den Prozessgrößen wurden die multivariaten Regressionsverfahren angewendet. Damit wurde die Zielgröße (Biogasausbeute pro Tag) anhand der gemessenen Prozessgrößen vorhergesagt. Es wurden die Principal Component Regression (PCR) und die Partial Least Squares Regression (PLSR) berechnet. Das Ziel beider Methoden ist aus den empirischen Daten und einem Vorwissen eine mathematische Transferfunktion zu bilden, um die Zusammenhänge zwischen den Prozessvariablen abbilden zu können. Diese Transferfunktion kann später für die Schätzung der unbekannten Informationen verwendet werden.

Die Grundlade der PCR-Methode ist die Hauptkomponentenanalyse (**Principal Component Analysis**, **PCA**). Diese Methode berechnet aus den ursprünglichen Messdaten (X-Datenmatrix) die neuen latenten Variablen (Faktoren oder Hauptkomponenten, PC).

Demzufolge ermöglicht dieses Verfahren alle Variablen mit möglichst wenigen Faktoren zu beschreiben. Dadurch kommt es zu einer Reduktion der Datenmenge. Zur Berechnung der Hauptkomponenten werden die so genannten Faktorladungen (**Loadings**) verwendet. Die Scores stellen die Projektionen von jeden Punkt auf die Hauptachse dar. Die **Residuen** sind die Fehler oder das Rauschen der Messdaten. Der Zusammenhang zwischen den Messwerten (**X**), Loadings (**P**), Scores (**T**) und Residuen (**E**) ist in Gleichung 5 dargestellt.

$$X = TP^T + E \qquad \textit{Gleichung 5}$$

$X: Datenmatrix$
$T: Scorematrix$
$P^T: transponierte\ Loadingsmatrix$
$E: Residuenmatrix$

Für die Faktorladungen gilt die Bedingung:

$$p_1{}^2 + p_2{}^2 + \cdots + p_n{}^2 = 1 \qquad \textit{Gleichung 6}$$

Das Prinzip der Hauptkomponentenanalyse ist schematisch in **Abbildung 5** dargestellt (KESSLER 2007B).

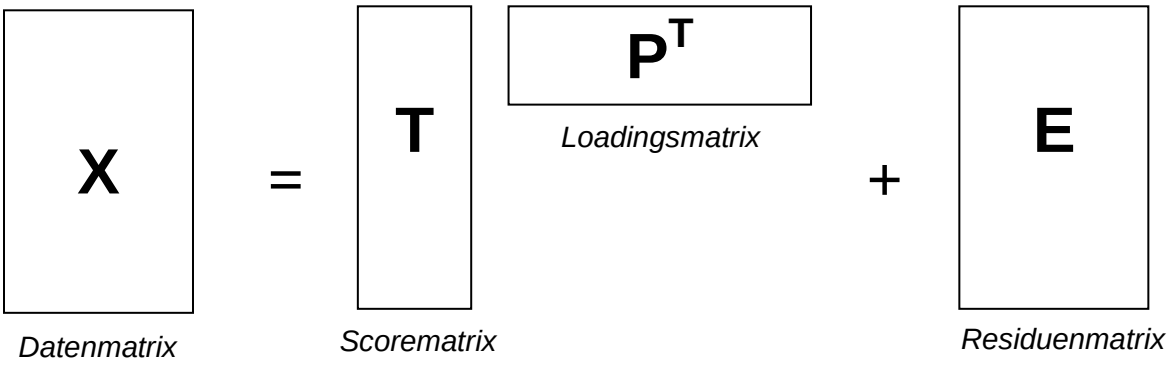


Abbildung 5: Die Hauptkomponentenanalyse (PCA).

Die PLS-Regression ist ein weiteres Verfahren, welches zur Vorhersage der Zielgröße verwendet wurde. Diese Methode wurde im Jahr *1960* von dem schwedischen Ökonometriker *Herman Wold* vorgestellt. PLSR ist mit PCR zwar verwandt, weist aber einen wesentlichen Unterschied in der Vorgehensweise der Auswertung auf. Für die Berechnung der PCR-Modelle wird die Kovarianz der X-Werte (Variablen) berücksichtigt, für Berechnung der PLS-Modelle die Kovarianz der X-Werte (Variablen) und Y- Werte (Zielgröße). Dieser Unterschied ist in **Abbildung 6** schematisch dargestellt.

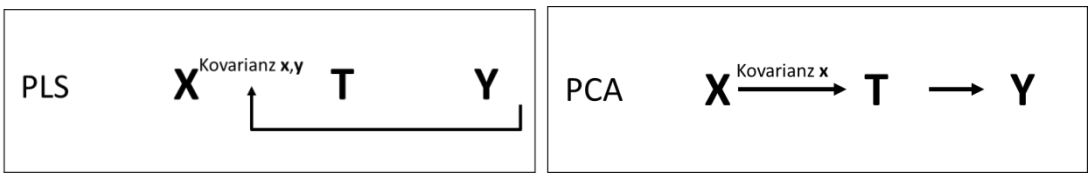


Abbildung 6: Unterschied zwischen der PCR- und PLSR- Methoden.

Mathematisch wird dieser Unterschied dadurch ausgedrückt, dass anstelle von Loadings (**P**), welche bei dem PCR-Verfahren verwendet werden, die Gewichtsmatrix (**W**) genommen wird. Die Gewichtsmatrix stellt eine ,,effektive‘‘ Ladungsmatrix dar, welche die Beziehungen zwischen den X- und Y-Daten abbildet. In Gleichung 7 ist der Zusammenhang zwischen den Messwerten (**X**), der Gewichtsmatrix (**W**) und der Scorematrix (**T**) mathematisch dargestellt (KESSLER 2007C).

$$X = TW^T \qquad \textit{Gleichung 7}$$

$X: Datenmatrix$
$T: Scorematrix$
$W^T: transponierte\ Gewichtsmatrix\ (enthält\ die\ Zielgröße\ Y)$

Der gesamte Algorithmus heißt *Nonlinear Iterative Partial Least Squares (NIPALS)* und besteht aus mehreren Schritten, welche mehrmals wiederholt werden. Diese Teilschritte werden so oft berechnet bis entweder alle möglichen Hauptkomponenten berechnet sind oder die vorher bestimmte Menge an Gesamtvarianz erklärt ist.

Um die Modellgüte der Regressionsmodelle zu beschreiben werden die so genannten Modellgrößen berechnet (das **Bestimmtheitsmaß** und der **mittlere Fehler**). Das **Bestimmtheitsmaß (R^2)** beschreibt die Robustheit der berechneten Modelle und liegt zwischen 0 und 1. Je höher das Bestimmtheitsmaß ist, desto stabiler sind die berechneten Modelle. Der mittlerer Fehler **RMSE** (*Root Mean Square Error = Wurzel aus mittlerem quadratischen Fehler*) steht für die Genauigkeit der kalkulierten Modelle.

In **Tabelle 5** sind diese Größen für die Kalibration, für den Test und für die kreuzvalidierten Regressionsmodelle zusammengestellt.

Tabelle 5: Modellgrößen.

	Bestimmtheitsmaß (R^2)	***Mittlerer Fehler (RMSE)***
Kalibration	R^2 Kalibration	RMSEC
Test	R^2 Test	RMSEP
Kreuzvalidierung	R^2 CV	RMSECV

II.1.2.5 Implementierung eines Optimierungsalgorithmus

Für eine bessere Vorhersage der Zielgröße und eine Suche nach relevanten Prozessgrößen wurde ein Optimierungsalgorithmus implementiert. **Ant Colony Optimization** (**ACO**) ist ein metaheuristisches Verfahren zur Lösung kombinatorischer Optimierungsprobleme. Dieses Verfahren hat seinen Ursprung in der Natur. Das natürliche Verhalten der Ameisen auf der Suche nach Nahrungsquellen stellt eine Lösung kombinatorischer Probleme dar. In der Natur hinterlassen Ameisen auf ihrem Weg zur Nahrungsquelle Botenstoffe, die so genannten Pheromone. Andere Ameisen folgen mit höherer Wahrscheinlichkeit die Pfade, auf den bereits viel Pheromon abgelegt wurde. Dieses Prinzip wurde mathematisch in ACO-Algorithmus umgesetzt. Eine der ersten Anwendungen

von ACO findet man bei der Lösung eines kombinatorischen Problems von ,,Traveling Sales Problem (TSP)“ (DORIGO & GAMBARDELLA 1997).

In diesem Beitrag wurde die Ameisenkolonieoptimierung für die Verbesserung der Vorhersagegüte der PLSR-Modelle und für eine Identifikation der relevanten Prozessgrößen verwendet. Der Ameisenkolonieoptimierungsalgorithmus stellt einen komplexen Vorgang dar, welcher aus mehreren Teilschritte besteht. Diese Teilschritte werden in mehreren Iterationen wiederholt. Der Ablauf des ACO-Algorithmus ist in **Abbildung 7** schematisch dargestellt. Als Ergebnis werden die besten berechneten Modelle mit den besten Kombinationen der Prozessgrößen (PG) und der Verlauf der Pheromonkonzentration für alle Prozessgrößen dargestellt.

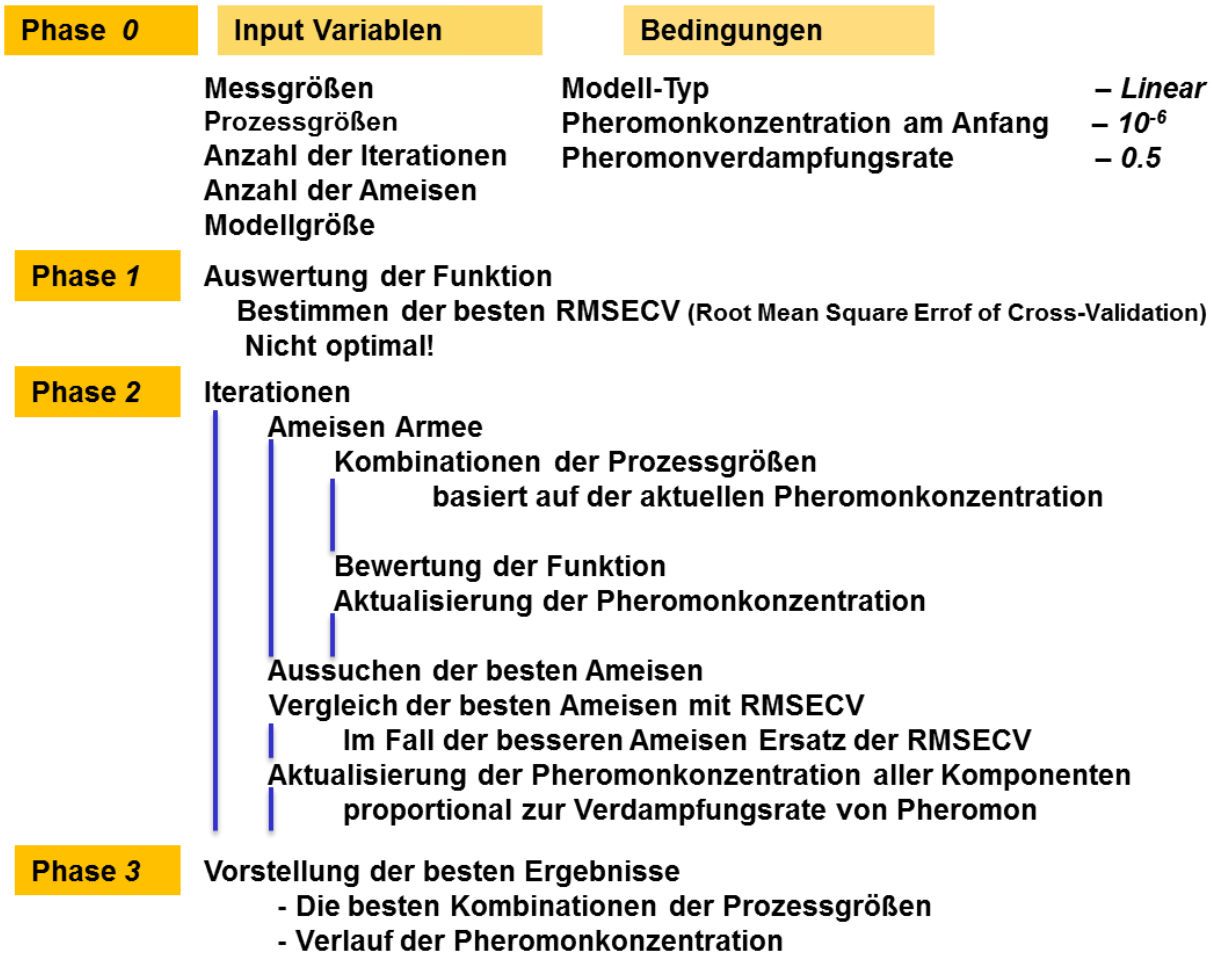


Abbildung 7: Schema eines ACO-Algorithmus.

II.2 Ergebnisse

II.2.1 Korrelationsanalyse der Prozessgrößen

Die zur Verfügung gestellten Prozessdaten der Biogasanlagen 02 bis 10 wurden bezüglich ihrer Korrelation analysiert. Die verwendeten Daten sowie der Zeitraum der durchgeführten Messungen sind in **Tabelle 6** aufgelistet.

Tabelle 6: Messdaten BGA 02 bis 10 (Dezember 2013).

BGA (Nr.)	*Zeitraum*	*Quelle*	*Bemerkung*
Neumann (02)	Juni - November 2012	Hydrolyse-Stufe	Ein großer Teil der Prozessdaten von HF ist noch in Bearbeitung. Die mikrobiologische Messdaten sind noch in Bearbeitung.
Erchinger (03)	Juli 2011, Februar – Oktober 2012	Hauptfermenter (HF)	Daten sind vollständig. Die mikrobiologische Messdaten wurden teilweise zur Verfügung gestellt ein größer Teil ist noch in Bearbeitung.
Eckel (04)	Juli 2011, Februar – Mai 2012	HF	Ein Teil der chemischen und der verfahrenstechnischen Prozessdaten ist noch in Bearbeitung. Die mikrobiologische Messdaten sind ebenfalls noch in Bearbeitung.
Kuhls (05)	Juli 2011, Februar – März 2012	HF 1 und 2	Ein Teil der verfahrenstechnischen Prozessdaten ist noch in Bearbeitung. Die mikrobiologische Messdaten sind ebenfalls noch in Bearbeitung.
Meyer-H. (06)	Juli 2011, März – Mai 2012	HF	Ein Teil der chemischen und der verfahrenstechnischen Prozessdaten ist in Bearbeitung. Die mikrobiologische Messdaten sind ebenfalls noch in Bearbeitung.
Schwenker (07)	Juli 2011, Februar – Mai 2012	HF	Viele Daten von NF fehlen. Ein Teil der verfahrenstechnischen Prozessdaten ist noch in Bearbeitung. Die mikrobiologische Messdaten sind ebenfalls noch in Bearbeitung.
Demes (08)	Juli 2011, Februar – April 2012	HF	Ein Teil der verfahrenstechnischen und der chemischen Prozessdaten ist noch in Bearbeitung.
Bürger (09)	Juli 2011, Februar – Mai 2012	HF	Ein Teil der chemischen und der verfahrenstechnischen Prozessdaten fehlt. Die mikrobiologische Messdaten sind noch in Bearbeitung.
Fuest (10)	Juli 2011, Februar – Mai 2012	HF	Ein Teil der chemischen und der verfahrenstechnischen Prozessdaten ist noch in Bearbeitung. Die mikrobiologische Messdaten sind noch in Bearbeitung.

In **Abbildungen 8** bis **17** ist die Korrelation zwischen der Zielgröße Biogasausbeute pro Tag und den restlichen Prozessgrößen dargestellt. Die gesamten Korrelationstabellen sind im Anhang (**Tabellen 1** bis **10**) dargestellt.

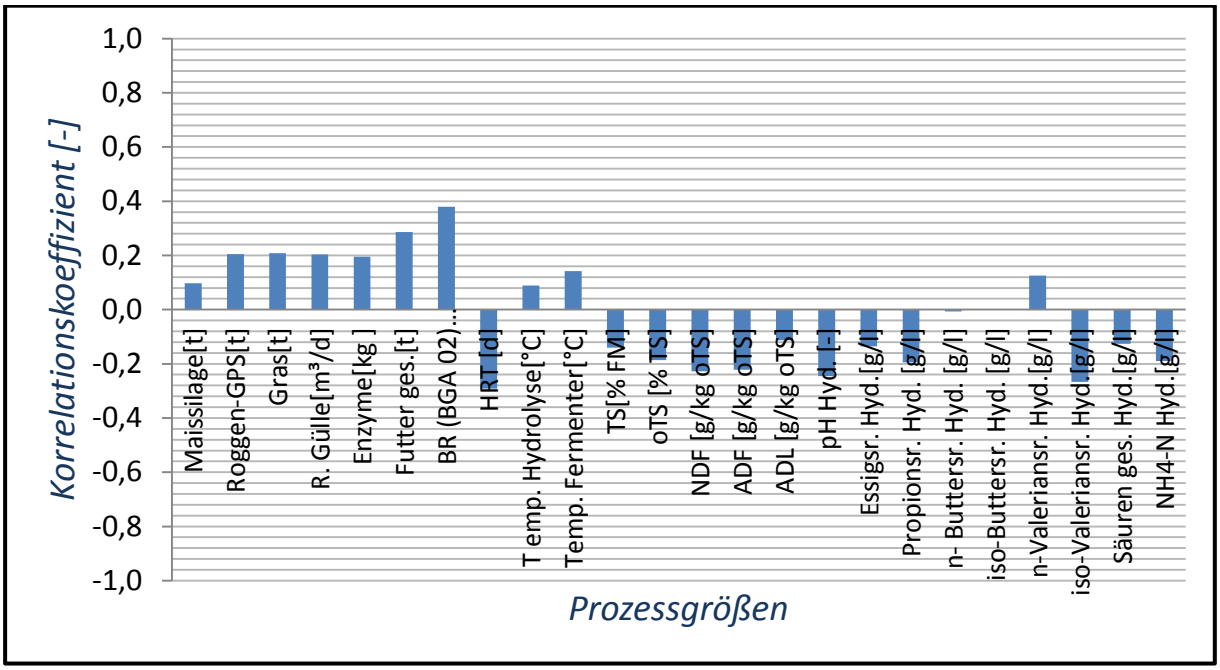


Abbildung 8: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Neumann (02), Hydrolyse.

Die Prozessgrößen (PG) der BGA Neumann (02) (**Abbildung 8**) hatten insgesamt eine schwache Korrelation mit der Zielgröße Biogasausbeute pro Tag. Der höchste betragsmäßige Korrelationskoeffizient von 0,38 wurde von der PG Raumbelastung erreicht. Die chemischen Prozessgrößen außer der PG n-Valeriansäure hatten insgesamt eine negative Korrelation mit der Zielgröße. Dies ist typisch für die Hydrolysestufe, da während der Hydrolyse hauptsächlich Säuren gebildet werden, was nach einer Übersäuerung der Biogasanlage aussieht und einen negativen Einfluss auf die Biogasbildung darstellt.

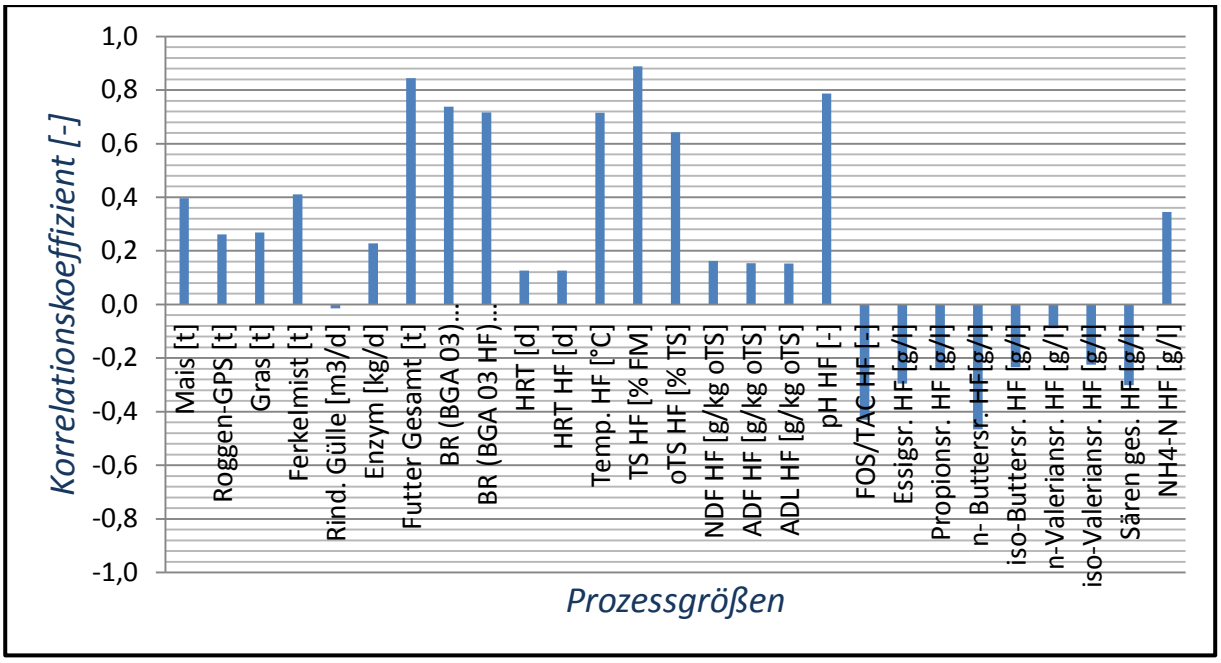


Abbildung 9: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Erchinger (03), HF.

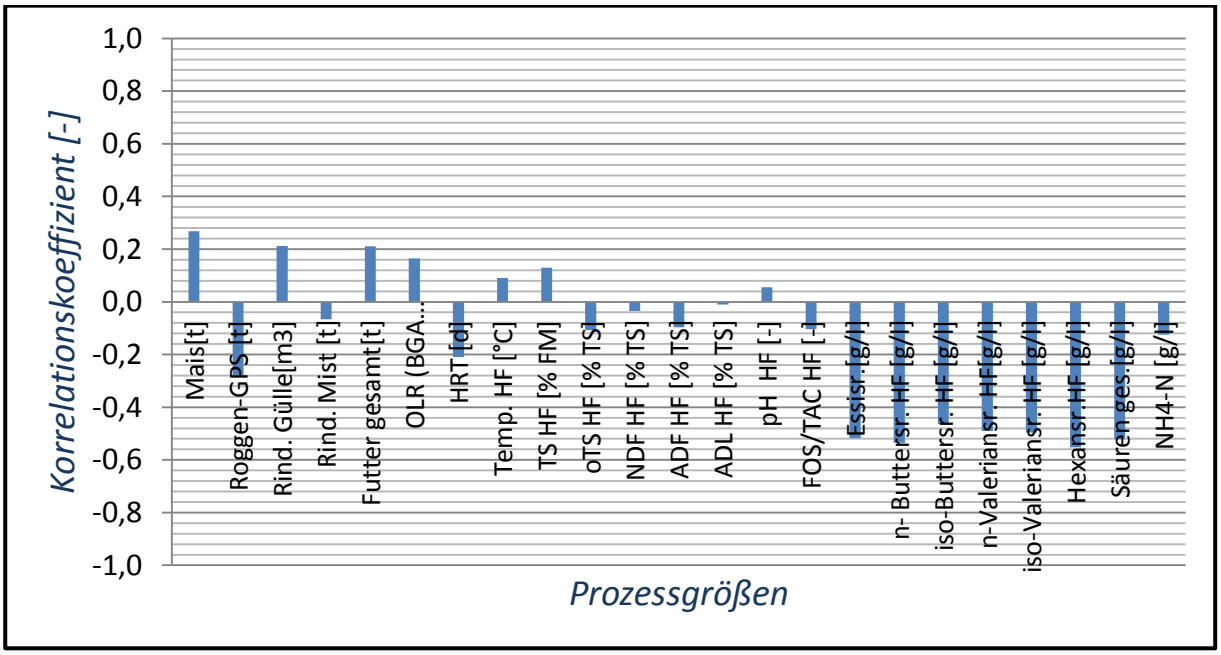


Abbildung 10: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Eckel (04), HF.

Der gleiche Effekt trat bei der BGA Erchinger (03), Eckel (04), Kuhls (05: HF 1 und HF 2), Meyer-H. (06), Demes (08) und Bürger (09) auf. In diesem Fall könnte es auf eine Übersäuerung der Biogasanlage hindeuten. Diesbezüglich sollten die Stufen zusätzlich überprüft werden. Dagegen korrelierten die verfahrenstechnischen Prozessgrößen der BGA Erchinger (03) mit der Biogasausbeute pro Tag stark und positiv, besonders die PG Futter gesamt und die PG Raumbelastung. Einen starken Einfluss auf die

Biogasproduktion hatte laut der Korrelationsanalyse der pH-Wert, dessen Korrelationskoeffizient bei 0,79 lag.

Die Korrelation der verfahrenstechnischen Prozessgrößen der BGA Eckel (04) (**Abbildung 10**) mit der Biogasausbeute pro Tag ist sehr schwach. Die dazu gehörigen Korrelationskoeffizienten erreichten die Werte von 0,10 bis 0,30. Die chemischen Prozessgrößen korrelierten mit der PG Biogasausbeute pro Tag negativ und schwach. Den höchsten Korrelationskoeffizienten hatte n-Buttersäure, welche bei -0,5 lag.

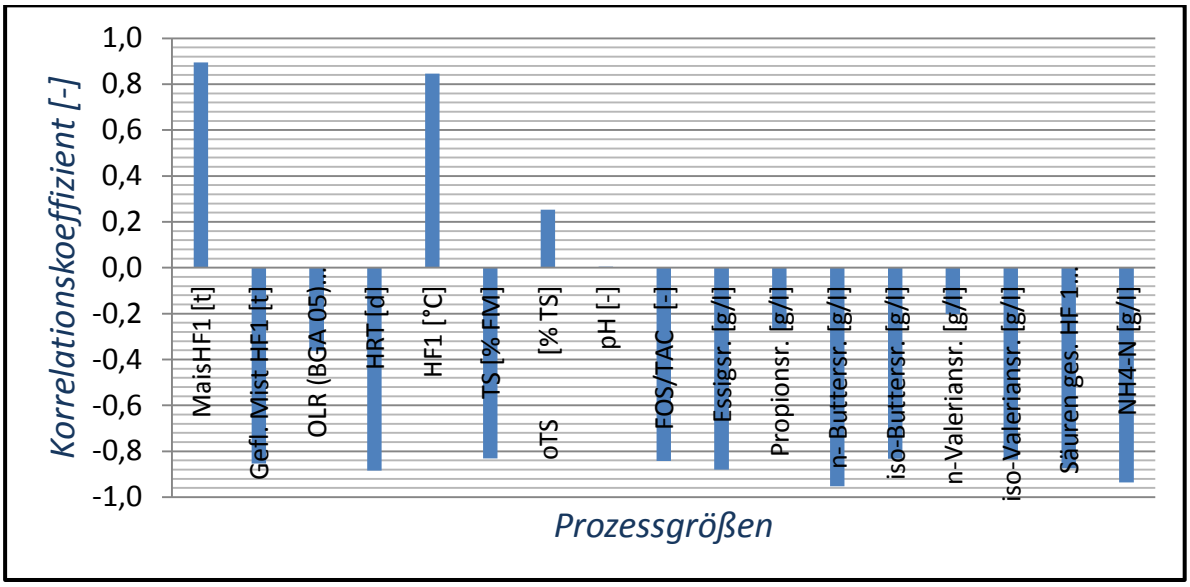


Abbildung 11: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Kuhls (05), HF 1.

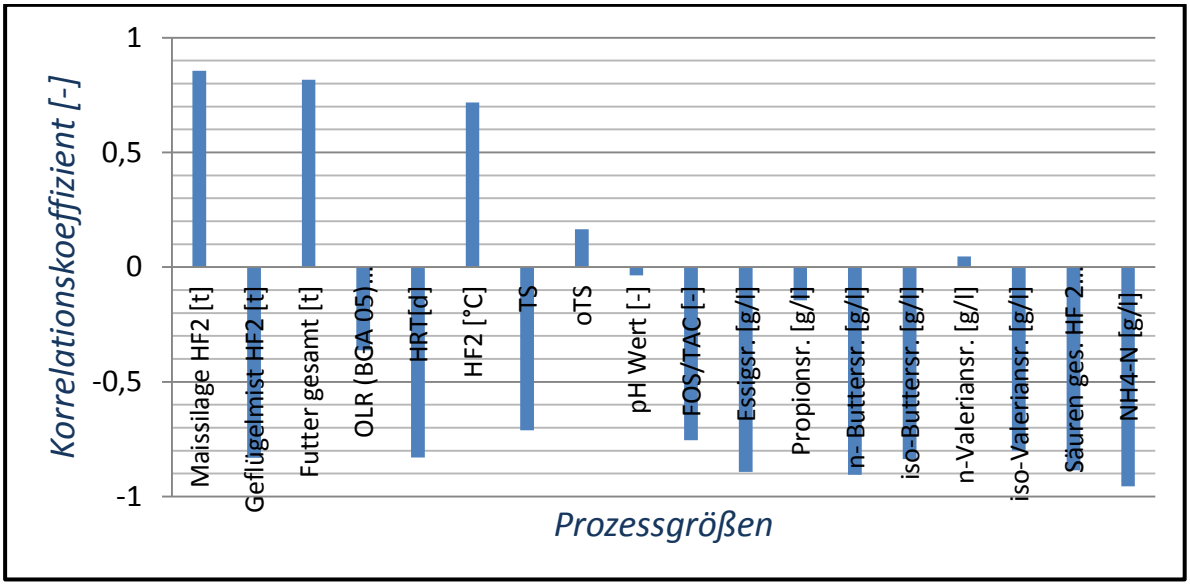


Abbildung 12: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Kuhls (05), HF 2.

Für die BGA Kuhls (05) (**Abbildung 11** und **12**) wurden die Prozessgrößen beider Fermenter ausgewertet. Hier war die Korrelation der Prozessgrößen bis auf wenigen Ausnahmen vergleichbar. Die verfahrenstechnischen Prozessgrößen zeigten eine negative

Korrelation mit der Zielgröße. Die Ausnahmen stellten die PG Maissilage und Fermenter-Temperatur dar. Ein Unterschied war ebenfalls bei der PG n-Valeriansäure zu sehen. Im Hauptfermenter 1 (HF1) hatte die PG n-Valeriansäure eine negative Korrelation mit der Zielgröße, während im HF 2 war sie positiv. Die niedrigen Korrelationskoeffizienten weisen jedoch auf einen schwachen Einfluss dieser PG auf die Bildung von Biogas. Andere organische Säuren hatten hohe Korrelationskoeffizienten, dessen betragsmäßige Werte zwischen 0,85 und 0,95 lagen. Eine Ausnahme stellte die PG Propionsäure (der höhere Wert war 0,30) dar.

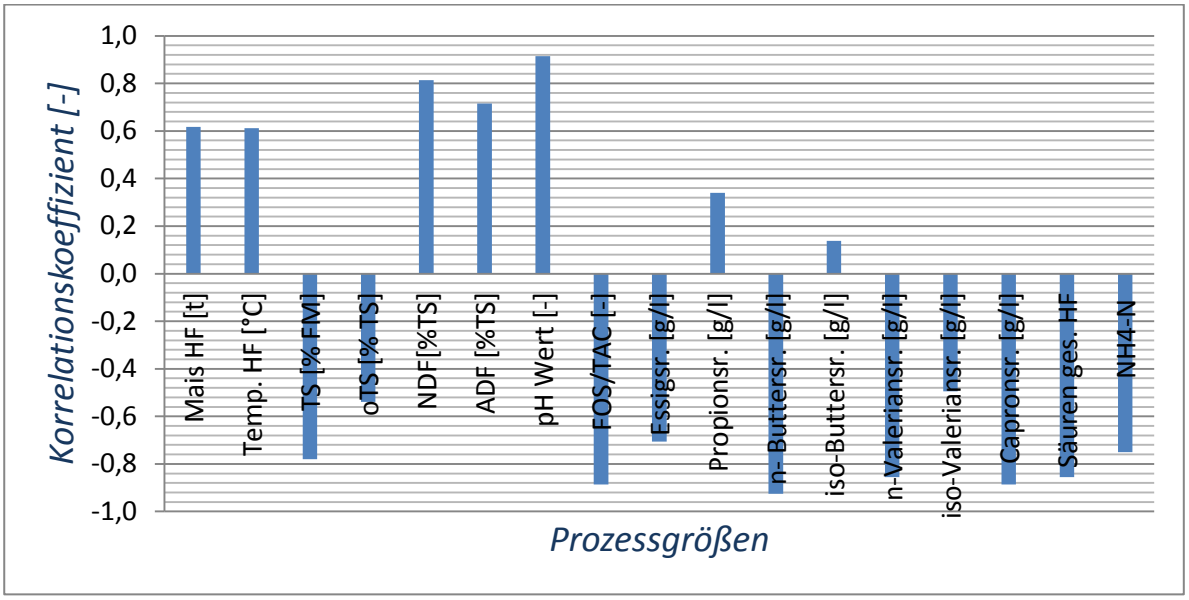


Abbildung 13: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Meyer-H. (06), HF.

Bei der BGA Meyer-H. (06) (**Abbildung 13**) korrelierten die ausgewerteten verfahrenstechnischen Prozessgrößen positiv mit der Zielgröße. Die dazu gehörigen Korrelationskoeffizienten (die PG Maissilage und die PG Temperatur im Fermenter) lagen leicht über dem Wert von 0,60. Eine sehr starke positive Korrelation mit der Zielgröße hatte der pH-Wert (0,91). Die organischen Säuren hatten dagegen eine starke negative Korrelation mit der Biogasausbeute pro Tag. Der betragsmäßige Korrelationskoeffizient in diesem Fall lag zwischen 0,71 und 0,89. Eine Ausnahme stellten die PG Propionsäure (0,34) und die PG i-Buttersäure (0,14) dar. Die Korrelation beider Säuren mit der Biogasausbeute pro Tag war dagegen positiv und sehr schwach.

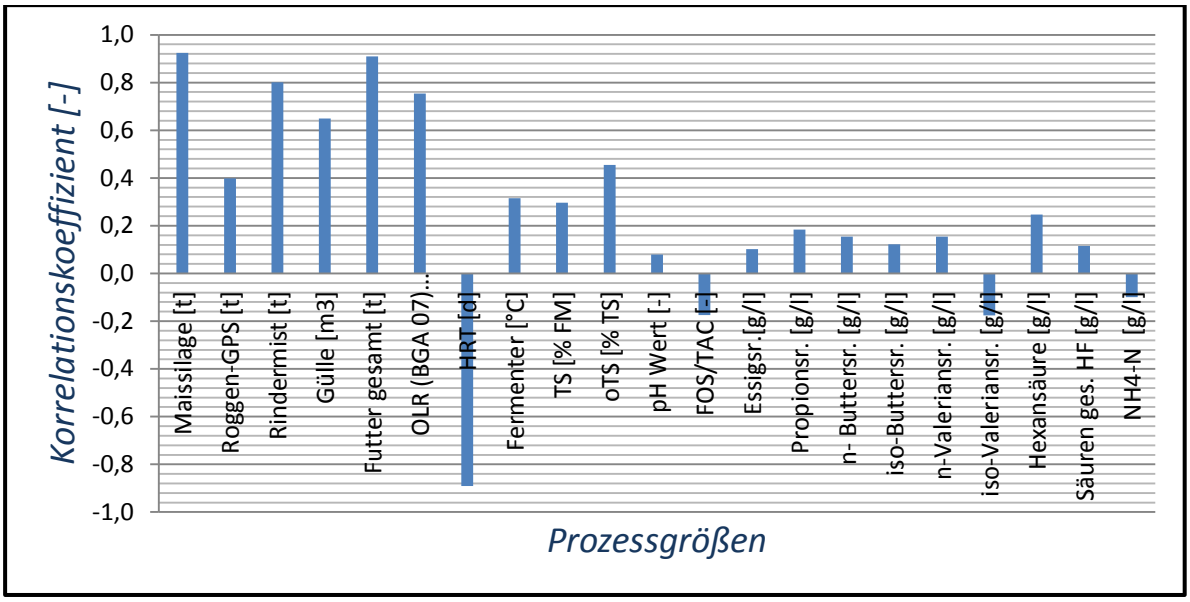


Abbildung 14: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Schwenker (07), HF.

Die verfahrenstechnischen Prozessgrößen der BGA Schwenker (07) (**Abbildung 14**) korrelierten positiv und stark mit der Zielgröße (0,65 bis 0,92). Die größten Korrelationskoeffizienten hatten die PG Maissilage und die PG Futter gesamt, beide Werte waren höher als 0,9. Auffällig war eine negative Korrelation zwischen der PG HRT (hydraulische Verweilzeit) und der Zielgröße, deren betragsmäßiger Korrelationskoeffizient einen Wert von 0,89 erreichte. Die Korrelation zwischen den organischen Säuren und der Biogasausbeute pro Tag war positiv, die dazu gehörigen Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,10 und 0,25. Eine Ausnahme stellte die PG iso-Valeriansäure (-0,18) dar.

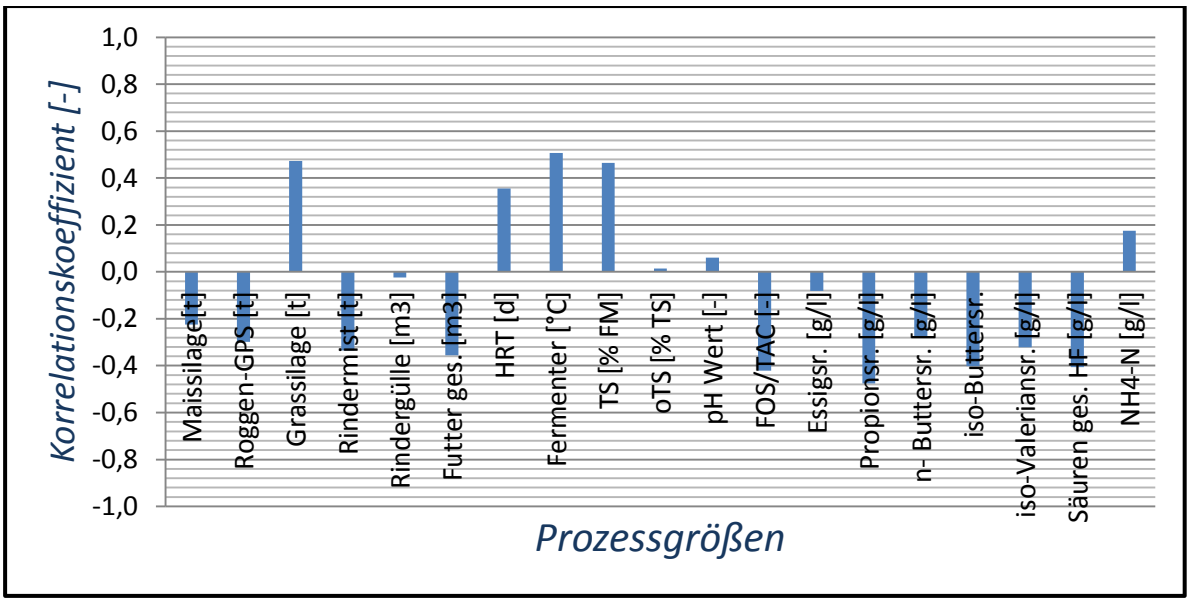


Abbildung 15: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Demes (08), HF.

Die Korrelation der Substratbestandteile der BGA Demes (08) mit der Biogasausbeute pro Tag (**Abbildung 15**) ist negativ und schwach (-0,02 bis -0,34). Eine Ausnahme stellte die PG Grassilage (0,47) dar, sie war in dem Fall positiv. Eine ebenfalls positive und deutlich höhere Korrelation hatten die PG hydraulische Verweilzeit (HRT), dessen Korrelationskoeffizient einen Wert von 0,36 erreichte. Die PG Fermenter-Temperatur hatte einen Korrelationskoeffizient von 0,51 und der von der PG Trockensubstanz (TS) lag bei 0,46. Die organischen Säuren korrelierten mit der Biogasausbeute negativ und hatten im Durchschnitt einen betragsmäßig niedrigen Korrelationskoeffizienten. Den betragsmäßig kleinsten Korrelationskoeffizient hatte die PG Essigsäure (0,08), den höchsten Wert erreichte dagegen die PG Propionsäure (0,48).

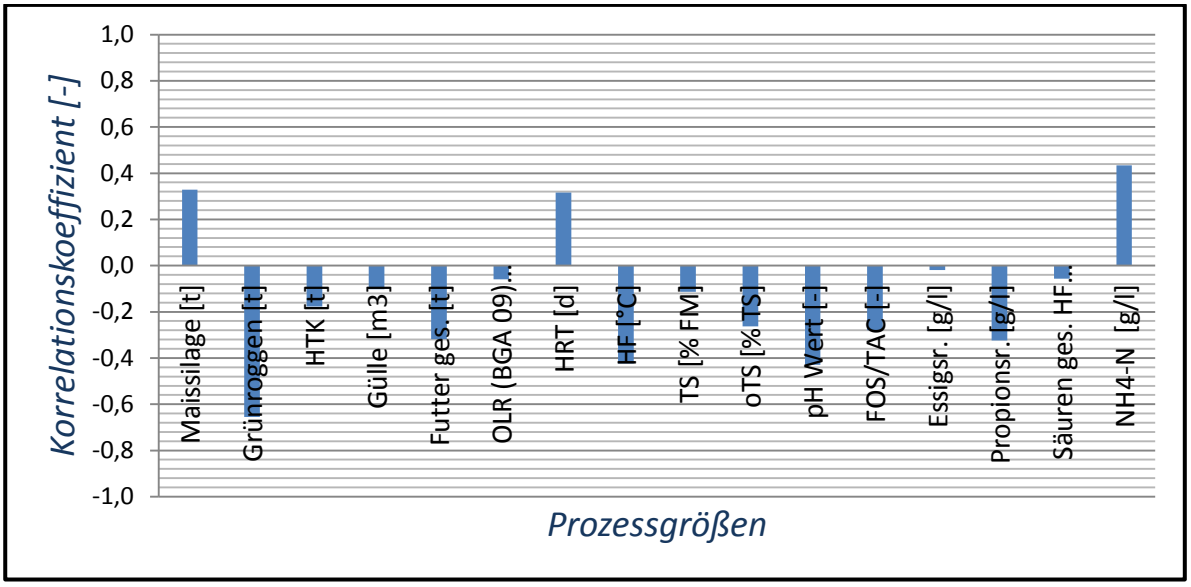


Abbildung 16: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Bürger (09), HF.

Die Prozessgrößen der BGA Bürger (09) (**Abbildung 16**) hatten insgesamt eine negative und schwache Korrelation mit der Biogasausbeute pro Tag. Eine positive Korrelation mit der Biogasausbeute pro Tag zeigten nur die PG Mais (0,33), die PG HRT (0,32) und die PG NH_4-N (0,43). Der betragsmäßig höchste Korrelationskoeffizient war der von der PG Grünroggen, welcher bei 0,66 lag.

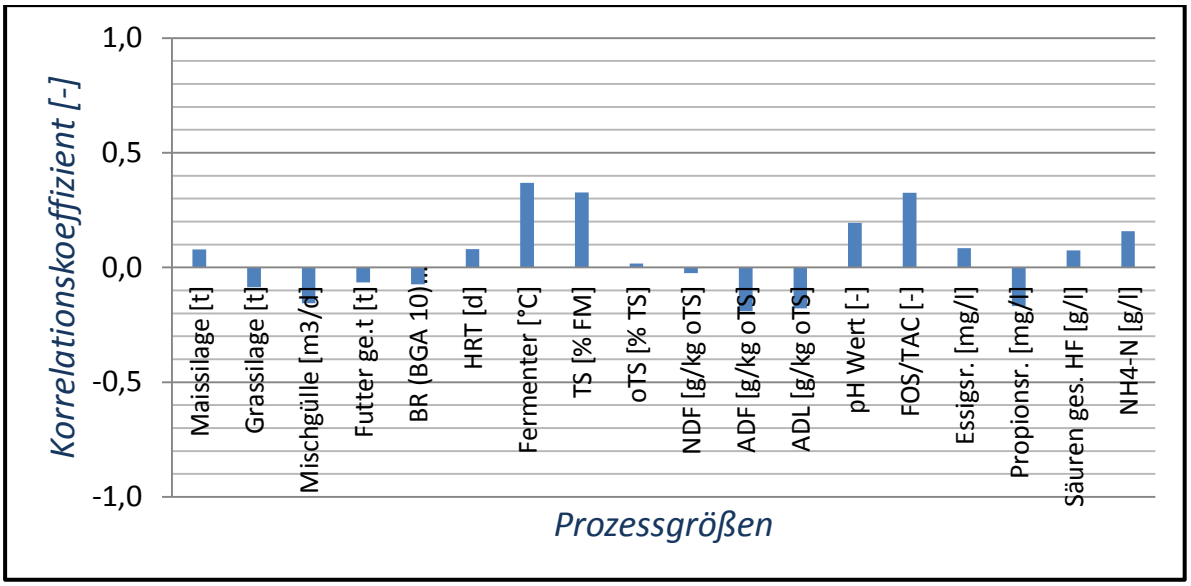


Abbildung 17: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Fuest (10), HF.

Die BGA Fuest (10) (**Abbildung 17**) zeigte ebenfalls eine schwache Korrelation zwischen der Biogasausbeute pro Tag und den Prozessgrößen. Die höchsten Korrelationskoeffizienten hatten die PG Fermenter-Temperatur, TS und das Verhältnis FOS/TAC (Flüchtige organische Säuren/Totaler anorganischer Carbonat). Diese waren positiv und erreichten Werte zwischen 0,33 und 0,37.

Zusammengefasst hatten die meisten untersuchten Biogasanlagen eine schwache Korrelation zwischen der Zielgröße Biogasausbeute pro Tag und den Messgrößen. Die Ausnahmen stellten die BGA Erchinger (03) mit einigen stark korrelierenden Prozessgrößen, die BGA Meyer-H. (06) und die BGA Schwenker (07) mit den verfahrenstechnischen Messgrößen dar. Die höchsten betragsmäßigen Korrelationskoeffizienten hatte der pH-Wert, die Konzentration an n-Buttersäure, NH_4-N Konzentration, das Verhältnis FOS/TAC, die Messdaten aus der Futtermittelanalytik und die verfahrenstechnische Messgrößen.

II.2.2 Vorhersage der Zielgröße mit Hilfe von Regressionsmodellen

Um die Zusammenhänge zwischen den Prozessgrößen weiter zu analysieren, wurden die Regressionsmodelle berechnet. Hier wurde eine Vorhersage der Biogasausbeute pro Tag (Zielgröße) anhand der gemessenen Prozessgrößen durchgeführt. Dafür wurden die aktualisierten Messdaten vom September 2012 verwendet. Aufgrund der bei den Datensätzen bestehenden Unterschiede bezüglich der erfassten Prozessgrößen können einzelne Datensätze Abweichungen bezüglich der Anzahl der Messpunkte sowie der verwendeten Prozessgrößen aufweisen. Eine Übersicht über die zur Auswertung verwendeten Prozessgrößen ist in **Tabelle 11** im Anhang dargestellt. Der Zeitraum der Probenziehung, die Anzahl der Messpunkte und die Quelle der Messdaten sind in **Tabelle 12** im Anhang zusammengestellt.

Die Ergebnisse der berechneten Modell-Größen (**RMSEC, RMSEP, R^2 Kalibration, R^2 Test**) sind in **Tabelle 7** dargestellt. Für alle berechneten Modelle wurden **vier Hauptkomponenten** (PC) verwendet.

Tabelle 7: Ergebnisse der Vorhersage von Biogasausbeute pro Tag für die BGA 2 bis 10 anhand PCR und PLSR-Modellen.

BGA (NR.)	***Modell-Typ***	***RMSEC [m^3/d]***	***RMSEP [m^3/d]***	***R^2 Kalibration [-]***	***R^2 Test [-]***
Neumann(02)	PLSR	62,21	378,83	0,98	0,53
	PCR	194,93	421,71	0,80	0,39
Erchinger (03)	PLSR	116,51	325,51	0,98	0,78
	PCR	312,20	376,21	0,82	0,74
Eckel (04)	PLSR	47,17	122,76	0,83	0,59
	PCR	91,98	121,73	0,37	0,20
Kuhls (05)	PLSR	85,05	133,67	0,95	0,92
	PCR	116,37	178,30	0,92	0,88
Meyer-H. (06)	PLSR	60,04	61,88	0,97	0,97
	PCR	242,73	291,22	0,56	0,28
Schwenker (07)	PLSR	33,16	89,89	0,99	0,81
	PCR	106,81	201,51	0,85	0,63
Demes (08)	PLSR	46,57	73,98	0,96	0,90
	PCR	101,27	91,39	0,82	0,94
Bürger (09)	PLSR	86,40	757,74	0,99	0,32
	PCR	505,92	898,18	0,78	0,30
Fuest (10)	PLSR	36,18	194,82	0,98	0,00
	PCR	202,15	78,73	0,44	0,62

In **Abbildung 18** sind die berechneten Fehler für die Kalibration (***RMSEC***) und für den Test (***RMSEP***) beider Modelltypen dargestellt. In **Abbildung 19** sind die entsprechenden Bestimmtheitsmaß-Werte (R^2 Kalibration und R^2 Test) aufgeführt.

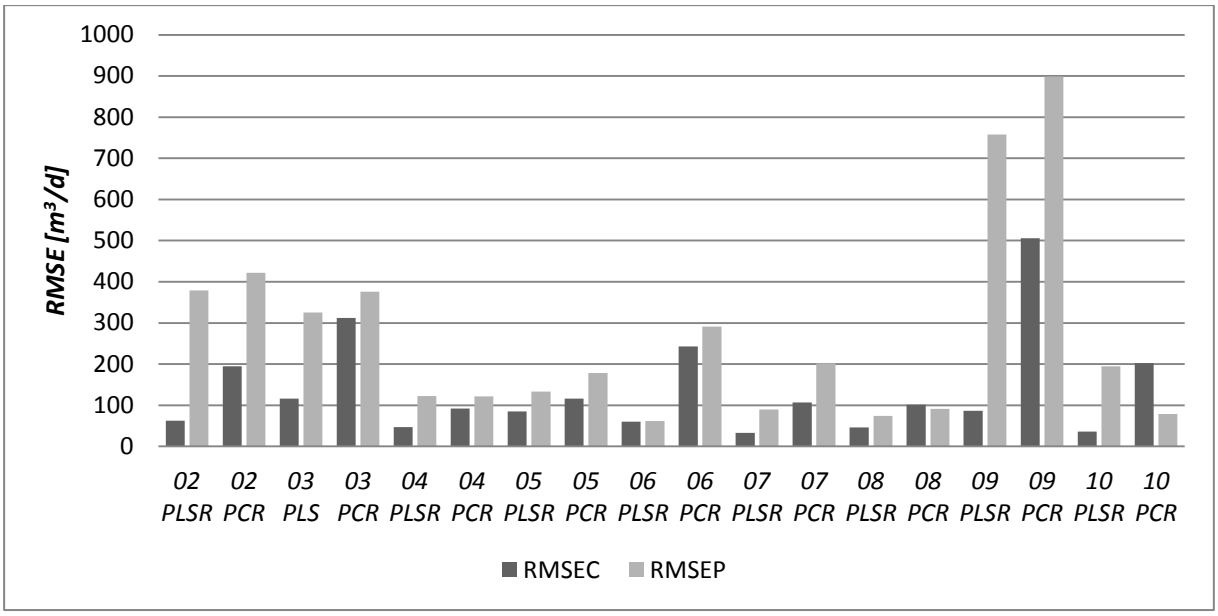


Abbildung 18: RMSEC, RMSEP für PLSR und PCR der BGA 02 bis 10.

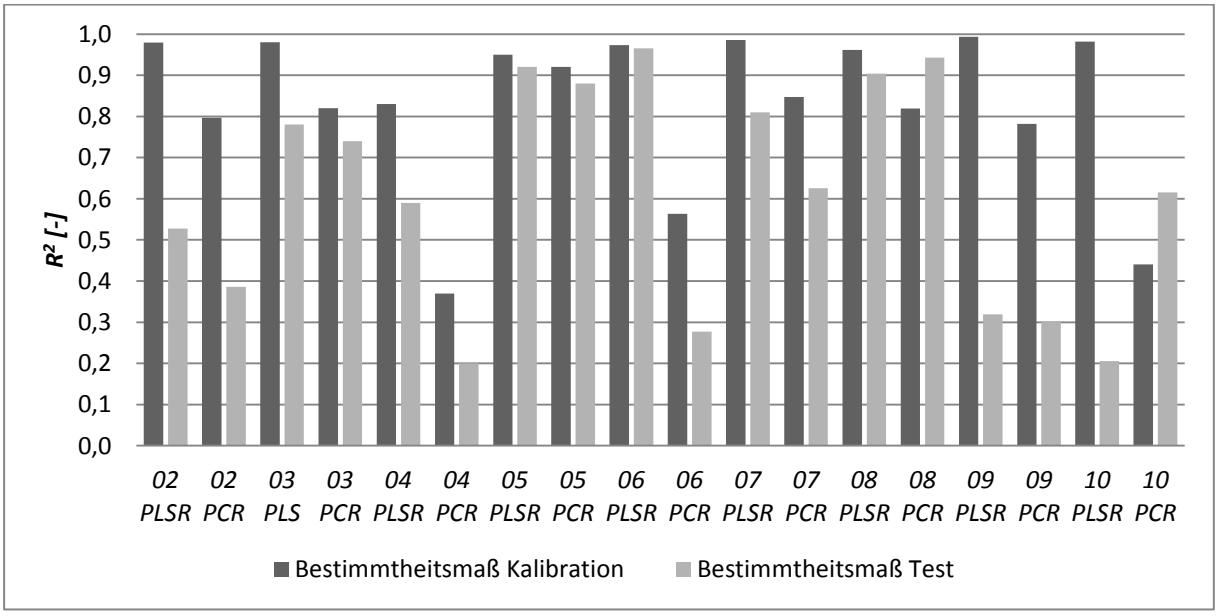


Abbildung 19: R^2 Kalibration, R^2 Test für PLSR und PCR der BGA 02 bis 10.

Aus dem Vergleich der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass die PLSR-Modelle für die Berechnung der Vorhersage der Zielgröße Biogasausbeute pro Tag anhand der verwendeten chemischen und verfahrenstechnischen Prozessgrößen besser geeignet sind (**Abbildung 17** und **18**).

Sehr gute Ergebnisse der Vorhersage konnten mit den Messdaten der BGA Erchinger (03), Kuhls (05), Schwenker (07), Demes (08) erzielt werden. Für die PLSR-Modelle lag der berechnete RMSEC im Durchschnitt bei 70 [m^3/d] und der RMSEP bei 155 [m^3/d]. Etwas schlechtere Ergebnisse wurden mit PCR-Modellen erzielt. Der RMSEC erreichte im Durchschnitt einen Wert von 159 [m^3/d] und der RMSEP lag bei 211 [m^3/d]. Das Be-

stimmtheitsmaß für die Kalibration aller Modelle war deutlich höher (lag über 0,8) als für den Test.

Deutlich schlechter ließ sich die Vorhersage anhand der PCR-Modelle bei der BGA Neumann (02), Eckel (04) und Meyer-H. (06) berechnen. Das Bestimmtheitsmaß für die Kalibration lag zwischen 0,37 und 0,8. Für den Test war der R^2 kleiner als 0,5. Der berechnete RMSEC lag im Durchschnitt bei 176 [m^3/d] und der RMSEP bei 278 [m^3/d].

Bei den Biogasanlagen Bürger (09) und Fuest (10) konnte das Bestimmtheitsmaß für beide Modell-Typen nur einen niedrigen Wert erreichen. Für die BGA Bürger(09) stieg es leicht über den Wert von 0,3. Das Bestimmtheitsmaß für die Kalibration beider Modelltypen erreichte einen hohen Wert welcher zwischen 0,78 und 0,98 lag.

II.2.3 Kreuzvalidierung der Prozessdaten

Um die Messdaten effizienter einzusetzen wurde die Kreuzvalidierung (die Leave-One-Out Methode) implementiert. Für die Auswertung wurden die aktualisierten Daten vom Dezember 2013 verwendet (siehe **Tabelle 13** im Anhang). Für die Vorhersage der Zielgröße wurden vier Hauptkomponenten benutzt. Als Zielgröße wurde die Biogasausbeute pro Tag verwendet. Die nicht-kreuzvalidierten (nicht-CV) PCR Modell-Größen und die Mittelwerte der kreuzvalidierten (CV) PCR Modell-Größen sind in **Tabelle 8** dargestellt. In **Tabelle 9** sind die entsprechenden Ergebnisse der PLSR-Modelle ersichtlich. Die gesamten Ergebnisse der Kreuzvalidierung sind im Anhang in **Tabelle 14** bis **22** dargestellt.

Tabelle 8: Ergebnisse der PCR-Modelle zur Vorhersage der Biogasausbeute pro Tag BGA 2 bis 10.

PCR									
	Neumann (02)	**Erchinger (03)**	**Eckel (04)**	**Kuhls (05)**	**Meyer-H. (06)**	**Schwenker (07)**	**Demes (08)**	**Bürger (09)**	**Fuest (10)**
RMSEP [%]	**8,15**	**10,58**	**5,03**	**10,37**	**3,28**	**23,26**	**4,27**	**1,45**	**2,35**
RMSECV [%]	**7,61**	**19,18**	**3,37**	**9,57**	**4,32**	**16,36**	**4,03**	**2,69**	**2,19**
R^2Test [-]	**0,24**	**0,50**	**0,14**	**0,89**	**0,93**	**0,64**	**0,14**	**0,73**	**0,05**
R^2CV [-]	**0,08**	**0,39**	**0,17**	**0,89**	**0,88**	**0,86**	**0,44**	**0,42**	**0,11**

Tabelle 9: Ergebnisse der PLSR-Modelle zur Vorhersage der Biogasausbeute pro Tag BGA 2 bis 10.

PLSR									
	Neumann (02)	**Erchinger (03)**	**Eckel (04)**	**Kuhls (05)**	**Meyer-H. (06)**	**Schwenker (07)**	**Demes (08)**	**Bürger (09)**	**Fuest (10)**
RMSEP [%]	**11,70**	**9,77**	**5,03**	**10,48**	**3,94**	**21,41**	**3,25**	**2,85**	**2,22**
RMSECV [%]	**7,88**	**16,97**	**3,99**	**8,20**	**4,45**	**18,33**	**4,99**	**3,44**	**2,75**
R^2Test [-]	**0,02**	**0,53**	**0,01**	**0,93**	**0,95**	**0,63**	**0,22**	**0,45**	**0,48**
R^2CV [-]	**0,11**	**0,66**	**0,43**	**0,94**	**0,93**	**0,88**	**0,48**	**0,55**	**0,29**

Anhand der dargestellten Ergebnisse ist es ersichtlich, dass eine Verbesserung der Modellgüte durch die Kreuzvalidierung nicht bei allen Datensätzen erzielt werden konnte. Eine deutliche Verbesserung der Modellgüte durch die Kreuzvalidierung konnte bei der BGA Neumann (02), Schwenker (07) und Fuest (10) erreicht werden. Hier war der CV R^2 höher und der RMSECV kleiner im Vergleich zu den nicht-CV Regressionsmodellen. Wobei diese Verbesserung der Modellgüte der BGA Neumann (02) nicht als relevant betrachtet werden kann, da die verwendeten Messdaten aus der Hydrolyse-Stufe stammen. Dies hatte einen negativen Effekt bei allen Auswerteverfahren.

Die Modellgrößen der CV Regressionsmodelle für die BGA Kuhls (05) und BGA Meyer-H. (06) waren vergleichbar mit den Ergebnissen der nicht-CV Modelle. Es konnte keine deutliche Verbesserung oder eine Verschlechterung der Modellgüte durch die Kreuzvalidierung beobachtet werden.

Deutlich schlechter sind die Ergebnisse der CV-Regressionsmodelle beider Modell-Typen der BGA Erchinger (03), Eckel (04), Demes (08) und Bürger (09) ausgefallen. Hier war der RMSECV deutlich höher als bei den nicht-CV Modellen und der CV R^2 war kleiner, was auf eine Verschlechterung der Modellgüte hindeutete. Dieser negative Effekt der Kreuzvalidierung ist typisch für die Datensätze mit wenigen Messpunkten. In diesem Fall hat jeder Messpunkt einen starken Einfluss auf die Modellgüte. Im Fall der verwendeten Leave-One-Out Methode wird eine Probe aus den Datensatz entfern und anhand der restlichen Proben vorhergesagt. Es kann sein, dass die weggelassene Probe durch die restlichen Proben sehr schlecht beschrieben wird und deshalb wird der Fehler hoch.

Die Ergebnisse der berechneten Modell-Größen wurden für die Festlegung der so genannten Ausreißer benutzt. Als Ausreißer wurden die Proben mit einem verhältnismäßig hohen mittleren Fehler (RMSECV) definiert. In **Tabelle 10** sind die Anzahl der verwendeten Proben, die Anzahl der bestimmten Ausreißer und die Fehlergrenzen dargestellt.

Tabelle 10: Bestimmung der Ausreißer bei BGA 02 bis 10.

	Neumann (02)	*Erchinger (03)*	*Eckel (04)*	*Kuhls (05)*	*Meyer-H. (06)*	*Schwenker (07)*	*Demes (08)*	*Bürger (09)*	*Fuest (10)*
Anzahl der Proben	26	40	17	11	17	18	13	20	21
RMSECV-Grenze	>20 %	>20 %	>10 %	>20 %	>10 %	>20 %	>10 %	>10 %	>10 %
Anzahl der Ausreißer PLS	2	6	0	0	2	5	2	0	0
Anzahl der Ausreißer PCR	1	7	0	0	2	5	1	0	0

Die so bestimmten Ausreißer wurden aus den entsprechenden Datensätzen rausgenommen und die Regressionsmodelle neu berechnet. Die Ergebnisse der berechneten PLSR-Modelle ohne Ausreißer sind in **Tabelle 11**, die für die PCR-Modelle in **Tabelle 12** dargestellt. Die BGA Neumann (02) wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Tabelle 11: Ergebnisse der PLSR Modelle zur Vorhersage der Biogasausbeute pro Tag ohne Ausreißer.

Modell-Größen	Erchinger (03)	Meyer-H. (06)	Schwenker (07)	Demes (08)
RMSEP [%] alle Messdaten	9,77	3,94	21,41	3,25
RMSECV [%]	16,97	4,45	18,33	4,99
RMSEP [%] ohne Ausreißer	10,11	5,39	7,89	1,52
R^2 Test alle Messdaten	0,53	0,95	0,63	0,22
R^2 CV	0,66	0,93	0,88	0,48
R^2 Test ohne Ausreißer	0,68	0,89	0,90	0,93

Tabelle 12: Ergebnisse der PCR Modelle zur Vorhersage der Biogasausbeute pro Tag ohne Ausreißer.

Modell-Größen	Erchinger (03)	Meyer-H. (06)	Schwenker (07)	Demes (08)
RMSEP [%] alle Messdaten	10,58	3,28	23,26	4,27
RMSECV [%]	19,18	4,32	16,36	4,03
RMSEP [%] ohne Ausreißer	9,22	3,07	3,49	1,56
R^2 Test alle Messdaten	0,5	0,93	0,64	0,14
R^2 CV	0,39	0,88	0,86	0,44
R^2 Test ohne Ausreißer	0,52	0,91	0,98	0,91

Die verwendete Methode führte für die BGA Erchinger (03), Schwenker (07) und Demes (08) zu einer Verbesserung der Modellgüte beider Modell-Typen. Bei der BGA Erchinger (03) war der berechnete Vorhersagefehler beider Modelltypen mit den anderen berechneten Regressionsmodellen (CV, und mit allen Messdaten) zwar vergleichbar, dagegen stieg das Bestimmtheitsmaß auf 0,7 für die PLSR-Modelle und auf 0,52 für die PCR-Modelle.

Bei der BGA Schwenker (07) verringerte sich der mittlere Fehler und sank auf einen Wert von 7,89 % (PLSR) und 3,49 % (PCR). Der R^2 stieg auf 0,9 bei den PLSR-Modellen und auf 0,98 bei den PCR-Modellen. Diese Ergebnisse fielen im Vergleich zu den CV-Modellen und zu den Regressionsmodellen mit allen Messdaten am besten aus.

Der gleiche Effekt konnte bei der BGA Demes (08) erzielt werden. Hier fiel der mittlere Fehler der Vorhersage für die PLSR-Modelle auf 1,52 % und auf 1,56 % für die PCR-Modelle. Das Bestimmtheitsmaß beider Modell-Typen erreichte einen Wert von über 0,9.

Im Fall der BGA (06) bekamen nur die PCR-Modelle ein besseres Ergebnis. Hier war das Bestimmtheitsmaß der Regressionsmodelle ohne Ausreißer mit dem Ergebnis anderer Regressionsmodelle (CV, mit allen Messdaten) zwar vergleichbar, dafür verringerte sich der berechnete mittlere Fehler um ca. 2,5 %.

II.2.4 Implementierung eines Optimierungsalgorithmus

Zur Bestimmung der prozessrelevanten Größen und für eine weitere Optimierung der Regressionsmodelle wurde ein Ameisenkolonieoptimierungsalgorithmus (ACO) implementiert. Für die Auswertung wurden die aktualisierten Messdaten vom Dezember 2013 verwendet. In **Tabelle 23** im Anhang sind die verwendeten Prozessgrößen zusammengestellt. Die Anzahl der Messpunkte und der Zeitraum der durchgeführten Messungen sind in **Tabelle 24** im Anhang ersichtlich.

In **Abbildung 20** bis **29** ist der Verlauf der Pheromonkonzentration über die Prozessgrößen dargestellt. Die Pheromonkonzentration liegt zwischen 0 und 1 und beschreibt, wie oft die entsprechende Prozessgröße für die Berechnung der Vorhersage verwendet wurde. Prozessgrößen mit einer Pheromonkonzentration größer als 0,7 sind als prozessrelevant zu betrachten.

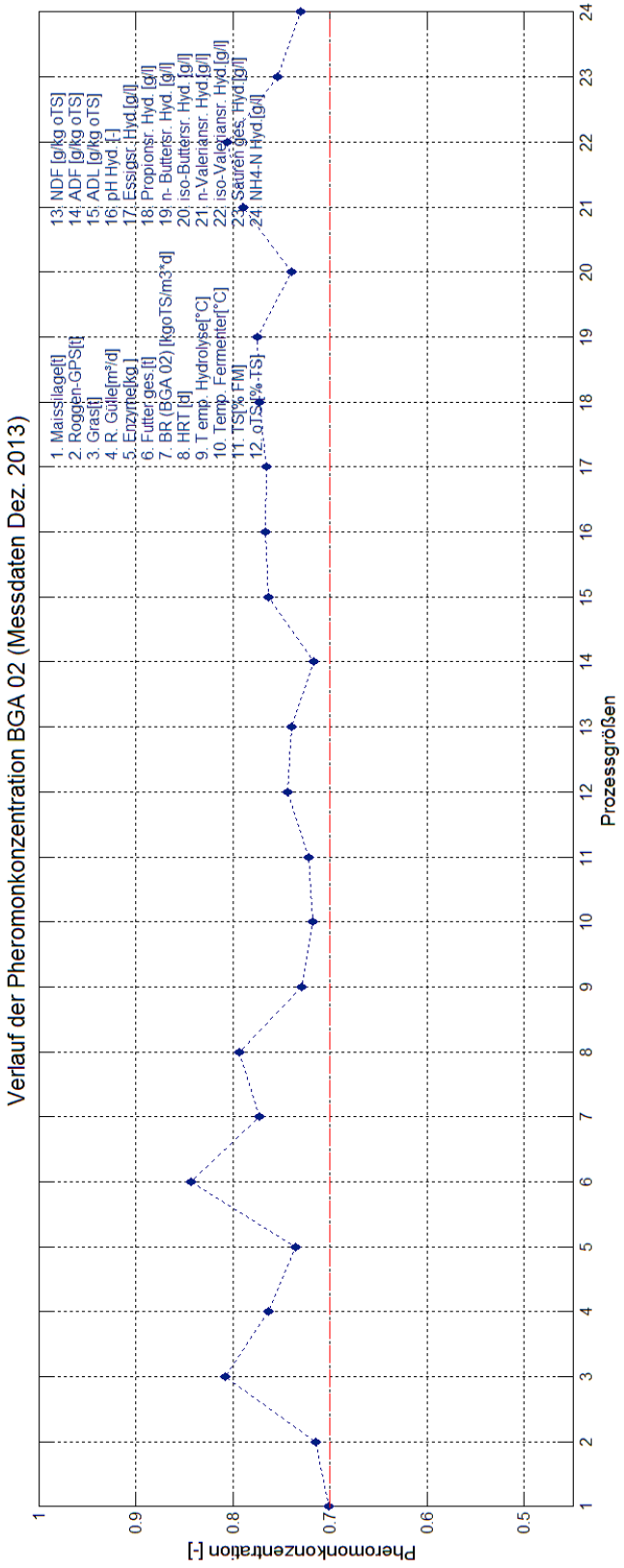


Abbildung 20: ACO Ergebnisse der BGA Neumann (02), Hydrolyse.

Laut der oben dargestellten Ergebnisse haben alle verwendeten Prozessgrößen der BGA Neumann (02) einen gleich starken Einfluss auf die Zielgröße, Biogasausbeute pro Tag. Die Pheromonkonzentration aller Prozessgrößen lag zwischen 0,7 und 0,85. Hier sind alle verwendeten Prozessgrößen als prozessrelevant zu betrachten.

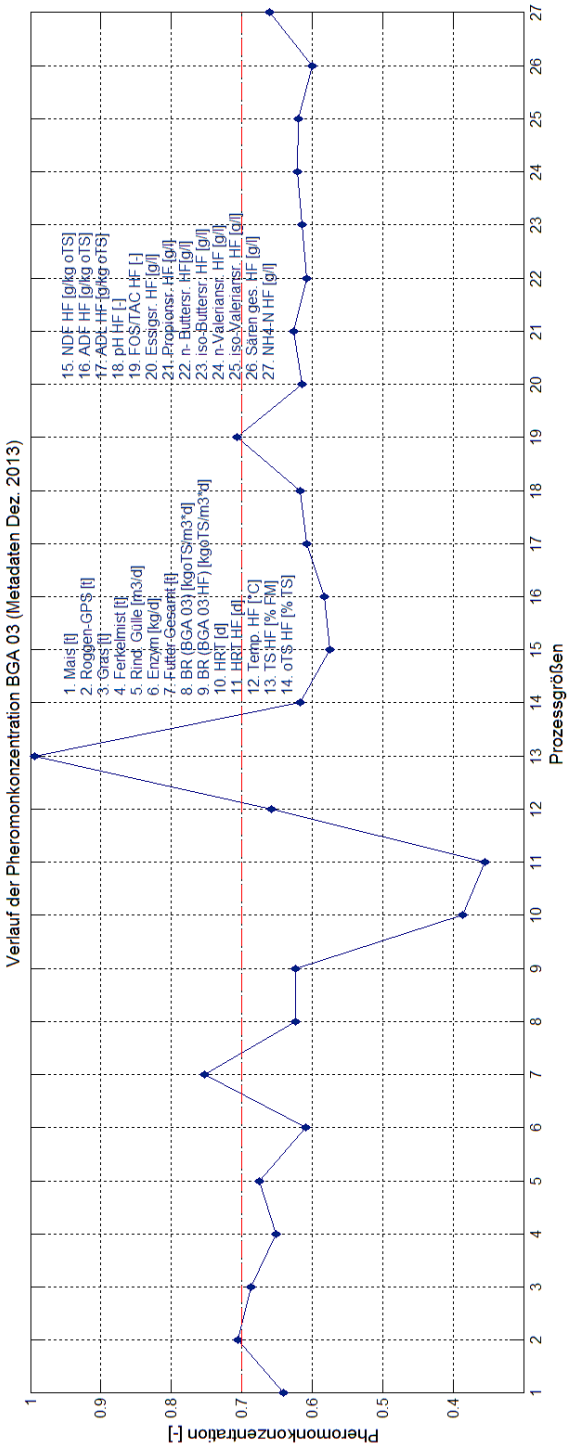


Abbildung 21: ACO Ergebnisse der BGA Erchinger (03), HF.

Bei der BGA Erchinger (03) lag die Pheromonkonzentration für alle Prozessgrößen zwischen 0,6 und 0,85. Zwei Ausnahmen stellten die PG *HRT BGA* (Hydraulische Verweilzeit der BGA) und die PG *HRT HF* (Hydraulische Verweilzeit vom Hauptfermenter) dar. Hier war die Pheromonkonzentration kleiner als 0,5. Als prozessrelevant wurden die folgenden Prozessgrößen ausgewählt:

1. Roggen (0,7);
2. Futter gesamt (0,75);
3. TS (0,99);
4. FOS/TAC (0,7).

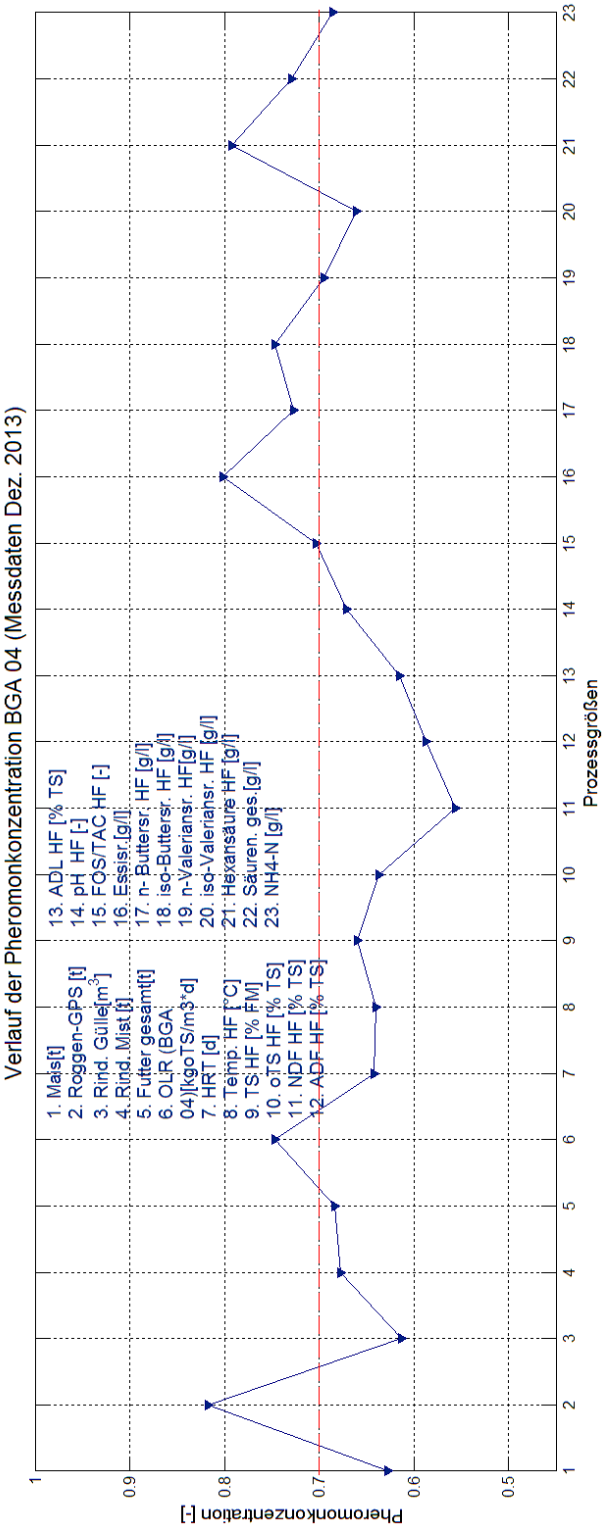


Abbildung 22: ACO Ergebnisse der BGA Eckel (04), HF.

Die Pheromonkonzentration aller Prozessgrößen der BGA Eckel (04) lag zwischen 0,6 und 0,85. Für diesen Datensatz wurden die folgenden prozessrelevanten Größen definiert:

1. Roggen-GPS (0,82);
2. OLR (0,75);
3. Essigsäure (0,8);
4. n-Buttersäure (0,74);
5. Hexansäure (0,78);
6. Säuren gesamt (0,74).

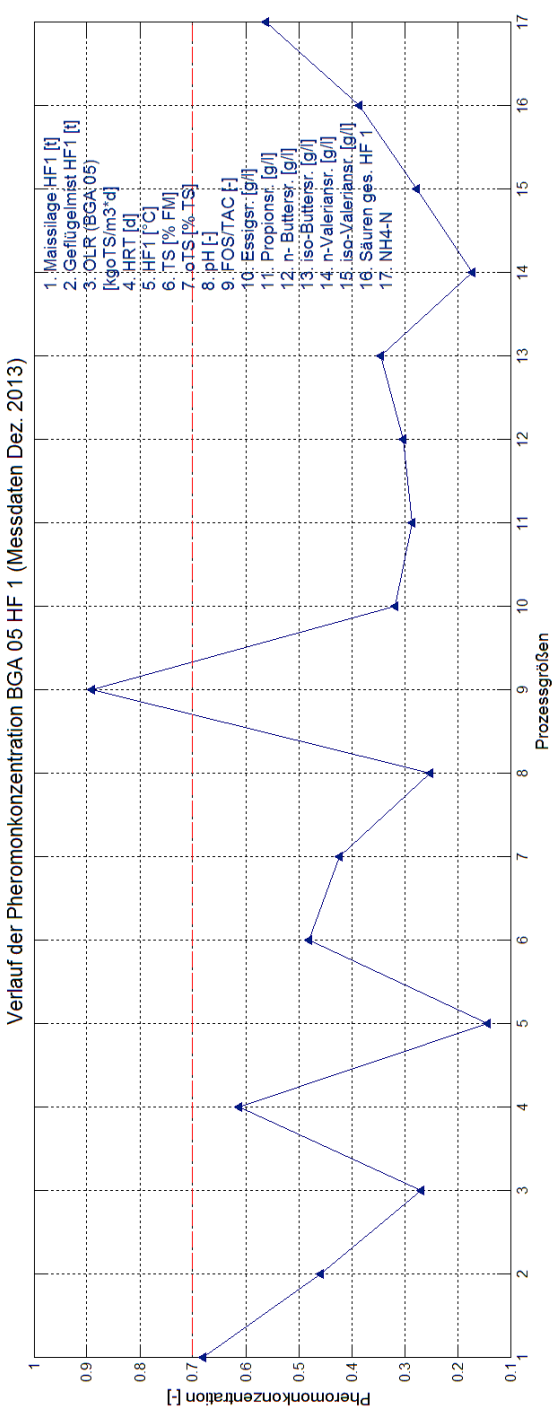


Abbildung 23: ACO Ergebnisse der BGA Kuhls (05) HF 1.

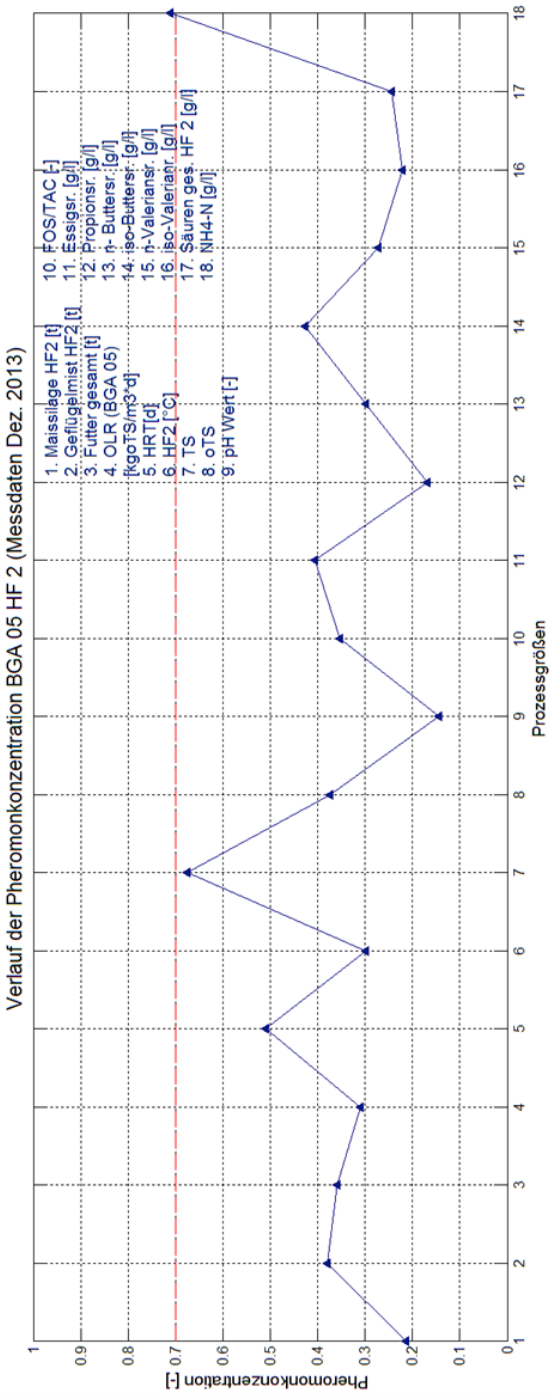


Abbildung 24: ACO Ergebnisse der BGA Kuhls (05) HF 2.

Für die BGA Kuhls (05) wurden die Datensätze beider Fermenter (HF1 und HF2) ausgewertet. Die Ergebnisse beider Hauptfermenter waren vergleichbar, was auf einen gleichen Prozessverlauf in beiden Fermenter hindeutete. Für beide Fermenter war die berechnete Pheromonkonzentration der meisten Prozessgrößen kleiner als 0,5. Als prozessrelevant wurden die folgenden Prozessgrößen ausgesucht:

<u>HF 1:</u>

1. Maissilage (0,68);
2. FOS/TAC (0,99);

<u>HF 2:</u>

1. TS (0,68);
2. NH4-N (0,71).

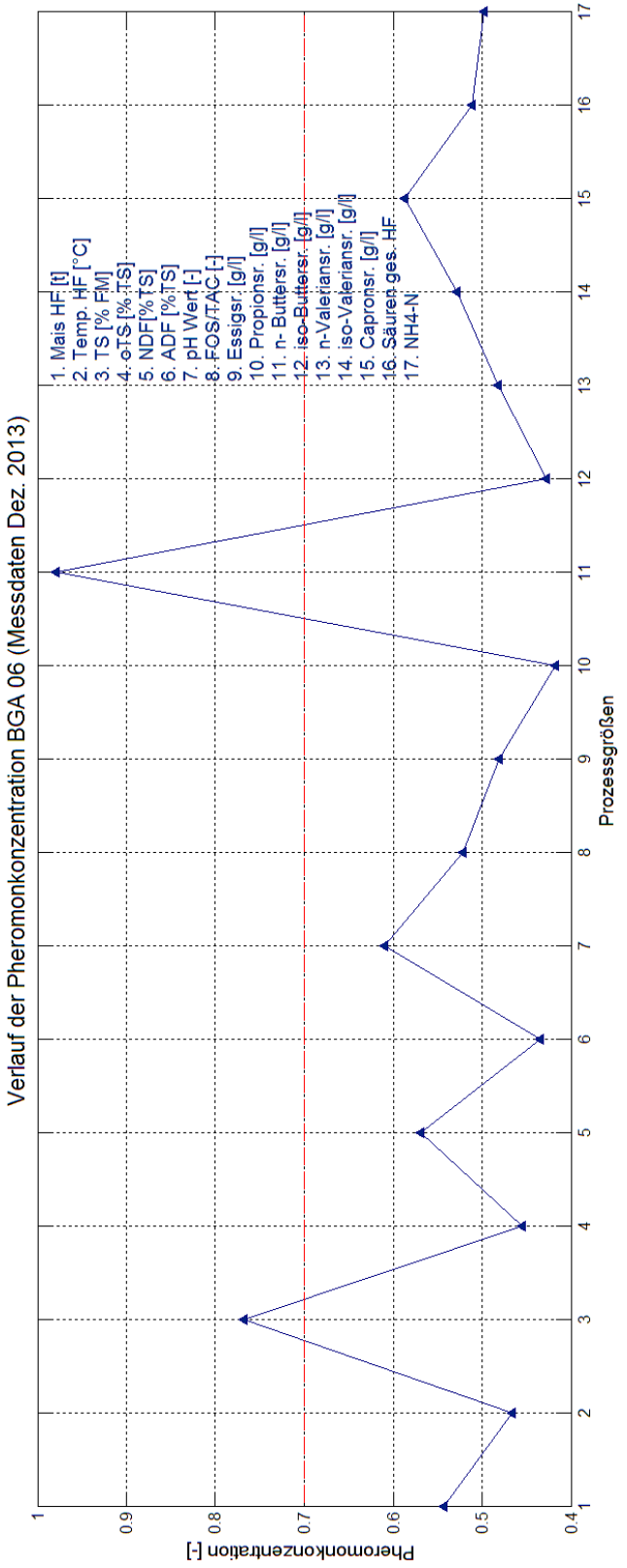


Abbildung 25: ACO Ergebnisse der BGA Meyer-H. (06), HF.

Die Pheromonkonzentration für die meisten Prozessgrößen der BGA Meyer-H. (06) lag zwischen 0,45 und 0,6. Den höchsten Wert von 0,97 hatte die PG n-Buttersäure. Die folgenden Prozessgrößen sind als prozessrelevant zu betrachten:

1. TS (0,77); 2. n-Buttersäure (0,97);

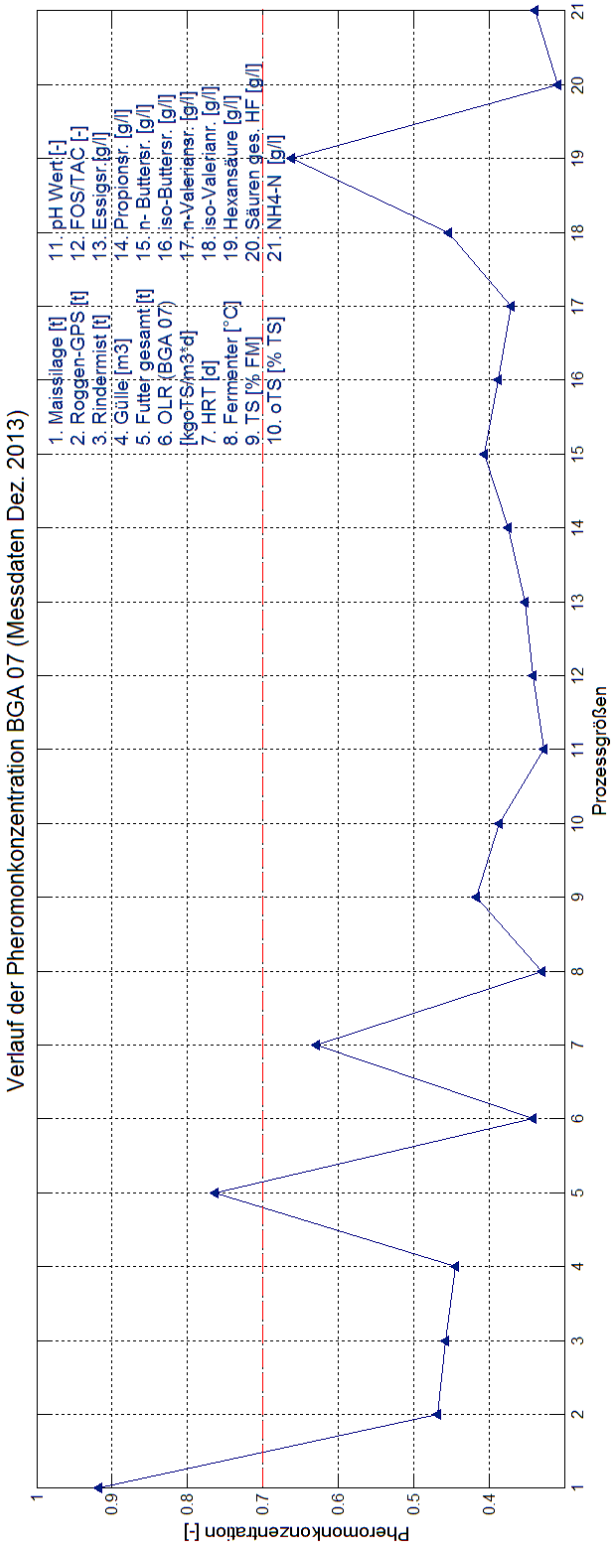


Abbildung 26: ACO Ergebnisse der BGA Schwenker (07), HF.

Die meisten Prozessgrößen der BGA Schwenker (07) hatten eine niedrige Pheromonkonzentration, welche unter dem Wert von 0,5 lag. Die Ausnahmen waren die PG Hexansäure, Maissilage, Futter gesamt und HRT. Als prozessrelevant wurden jedoch nur die folgenden Prozessgrößen ausgewählt:

1. Maissilage (0,91); 2. OLR (0,76);

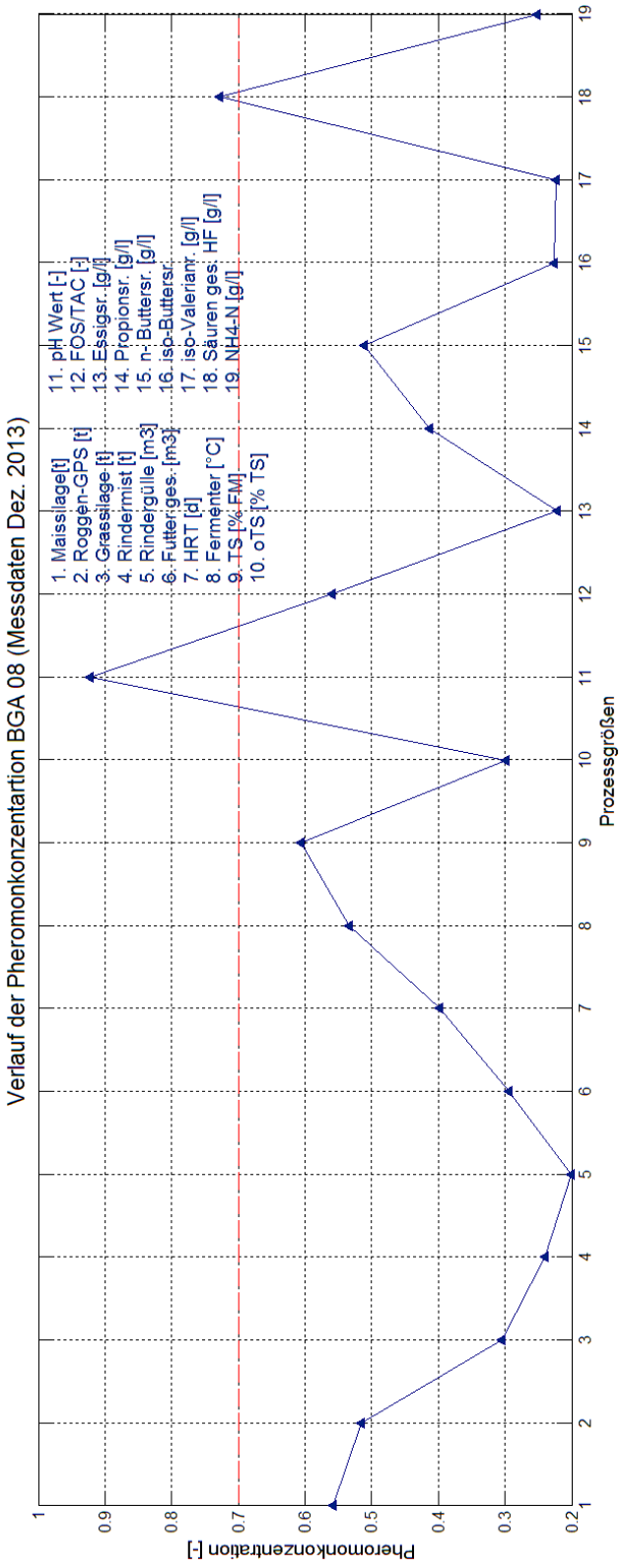


Abbildung 27: ACO Ergebnisse der BGA Demes (08), HF.

Bei der BGA Demes (08) hatte die PG Rindergülle den niedrigsten Wert für die Pheromonkonzentration. Dieser lag bei 0,21. Der höchste Wert (0,93) wurde für die PG pH-Wert berechnet. Die folgenden Prozessgroßen wurden als prozessrelevant definiert:

1. pH (0,93); 2. Säuren gesamt (0,73).

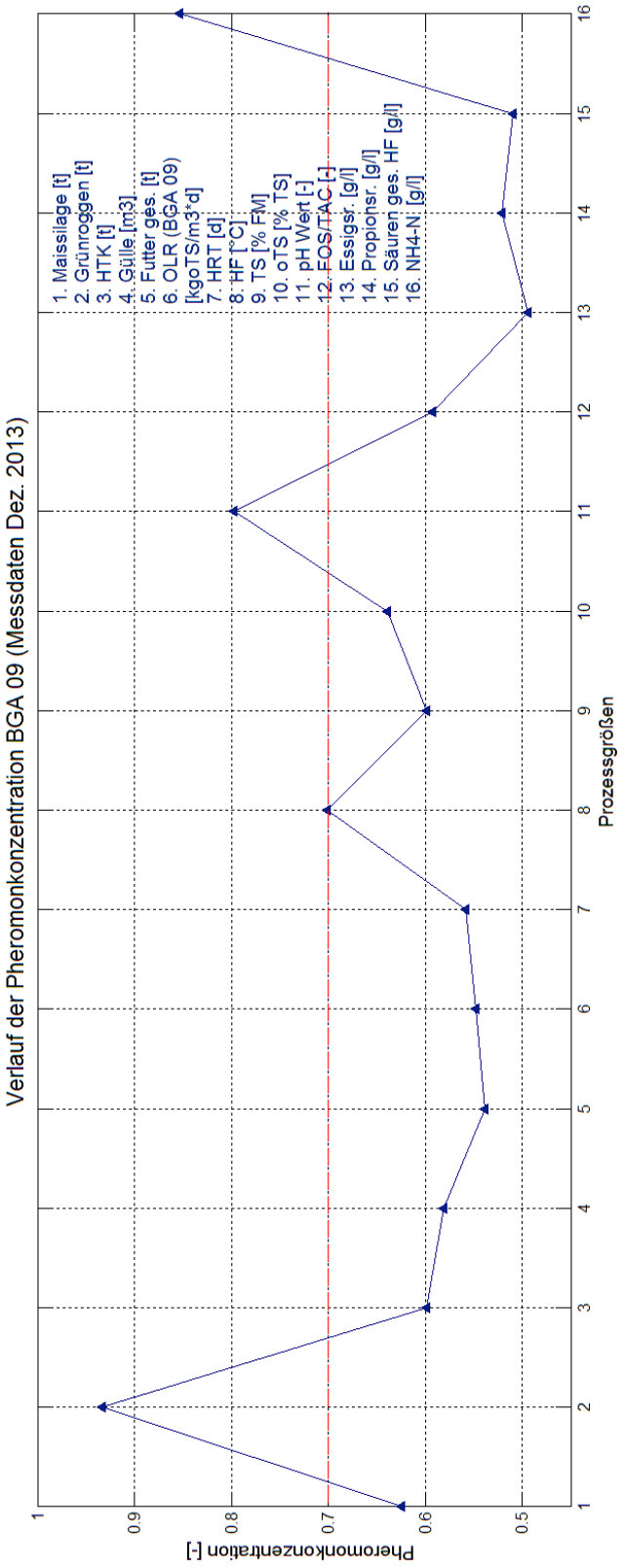


Abbildung 28: ACO Ergebnisse der BGA Bürger (09), HF.

Die Pheromonkonzentration für die Prozessgrößen der BGA Bürger (09) lag insgesamt über dem Wert von 0,5. Eine Ausnahme stellte die PG Essigsäure (0,48) dar. Eine Pheromonkonzentration größer als 0,7 hatten die folgenden Prozessgrößen:

1. Grünroggen (0,94); 2. pH-Wert (0,8); 3. NH4-N (0,85).

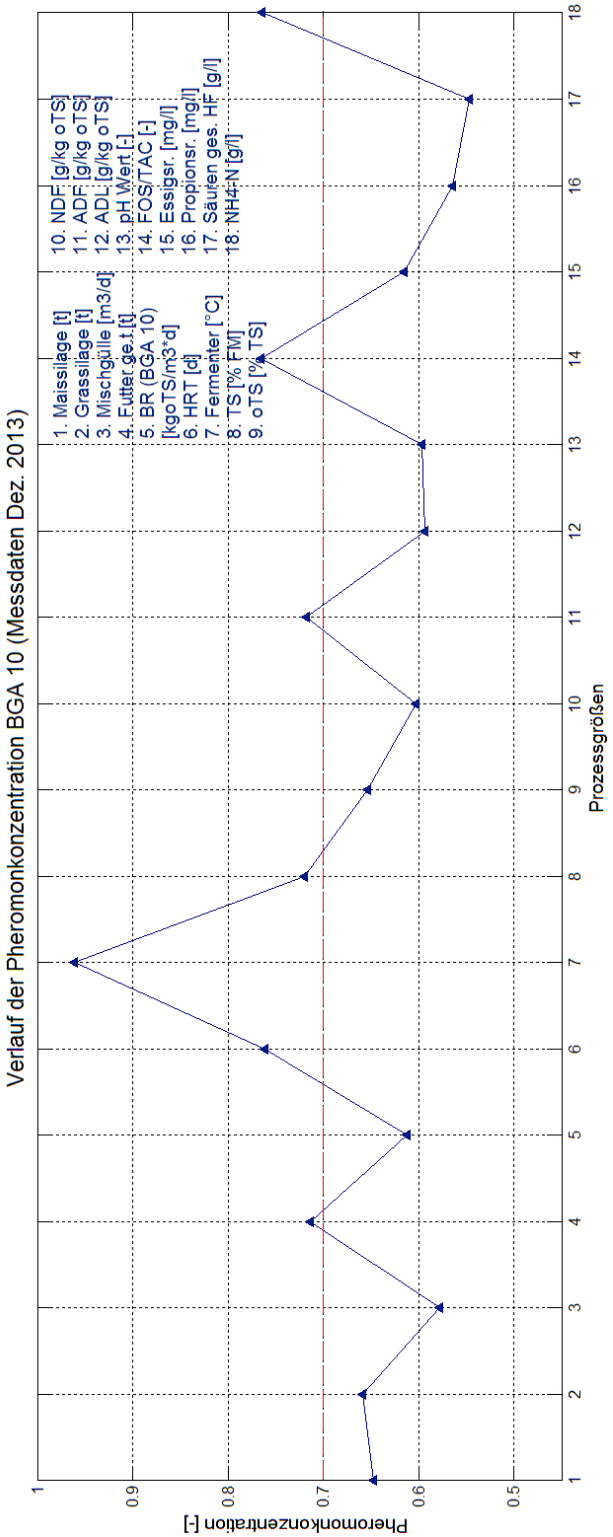


Abbildung 29: ACO Ergebnisse der BGA Fuest (10), HF.

Bei der BGA Fuest (10) erreichte die Pheromonkonzentration aller Prozessgrößen einen Wert höher als 0,5. Als prozessrelevant sind die folgenden Prozessgrößen zu betrachten:

1. Futter gesamt (0,72);
2. HRT (0,77);
3. Temperatur Fermenter (0,96);
4. TS (0,73);
5. ADF (0,72);
6. FOS/TAC (0,76);
7 NH4-N (0,77).

In **Tabelle 13** (a, b) sind die prozessrelevanten Größen, die berechnete Pheromonkonzentration und dazu gehörigen Korrelationskoeffizienten (Korrelation mit der Zielgröße Biogasausbeute pro Tag) dargestellt.

Tabelle 13 (a, b): Prozessrelevante Messgrößen BGA 02 bis 10.
a. BGA Neumann (02)

	Maissilage	*Roggen-GPS*	*Gras*	*R. Gülle*	*Enzyme*	*Futter ges.*	*BR (BGA 02)*	*HRT*	*T emp. Hyd-*	*Temp. Fer-*	*TS[% FM]*	*oTS [% TS]*	*NDF*	*ADF*	*ADL*	*pH*	*Essigsr.*	*Propionsr.*	*n- Buttersr.*	*iso-Buttersr.*	*n-Valeriansr.*	*iso-*	*Säuren ges.*	*NH4-N Hyd.*
Pheromokonzentration [-]	*0,7*	*0,73*	*0,82*	*0,76*	*0,74*	*0,84*	*0,77*	*0,79*	*0,74*	*0,73*	*0,73*	*0,75*	*0,73*	*0,71*	*0,76*	*0,77*	*0,77*	*0,78*	*0,78*	*0,74*	*0,78*	*0,81*	*0,75*	*0,73*
Korr. [-] bezüglich der Biogasausbeute pro Tag	0,10	0,20	0,21	0,20	0,19	0,29	0,38	-0,29	0,09	0,14	-0,14	-0,19	-0,23	-0,22	-0,11	-0,25	-0,13	-0,19	-0,01	0,00	0,13	-0,27	-0,13	-0,19

b. BGA 03 bis 10

Biogasanlage (Nr.)	*Prozessgrößen*	*Pheromonkonzentration [-]*	*Korr.[-]bezüglich der Biogasausbeute pro Tag*
Erchinger (03)	Roggen-GPS	0,70	0,26
	Futter gesamt	0,75	0,6
	TS [% FM]	0,99	0,89
	FOS/TAC	0,70	-0,43
Eckel (04)	Roggen-GPS	0,82	-0,26
	OLR	0,75	0,16
	Essigsäure	0,80	-0,52
	n-Buttersäure	0,74	-0,54
	Hexansäure	0,78	-0,55
	Säuren gesamt	0,74	-0,52
Kuhls (05)	Maissilage	0,68	0,9
	FOS/TAC	0,99	-0,84
	TS	0,68	-0,71
	NH4-N	0,71	-0,95
Meyer-H. (06)	TS	0,77	-0,78
	n-Buttersäure	0,97	-0,93
Schwenker (07)	Maissilage	0,91	0,92
	OLR	0,76	0,75
Demes (08)	pH-Wert	0,93	-0,06
	Säuren gesamt	0,73	-0,41
Bürger (09)	Grünroggen	0,94	-0,66
	pH-Wert	0,80	-0,43
	NH4-N	0,85	0,43
Fuest (10)	Futter gesamt	0,72	-0,06
	HRT	0,77	0,08
	Temperatur Fermenter	0,96	0,37
	TS	0,73	0,33
	ADF	0,72	0,19
	FOS/TAC	0,76	0,32
	NH4-N	0,77	0,16

Es ist deutlich zu sehen, dass mehrere mit ACO ausgesuchten Prozessgrößen (BGA 03 bis 10) eine starke Korrelation mit der Zielgröße haben, was auf eine starke lineare Abhängigkeit zwischen der Zielgröße und den ausgewählten Prozessgrößen und derer Signifikanz hindeutet.

In **Abbildung 30** sind die prozessrelevanten Größen und bei wie vielen Biogasanlagen sie mit ACO ausgesucht wurden aufgeführt.

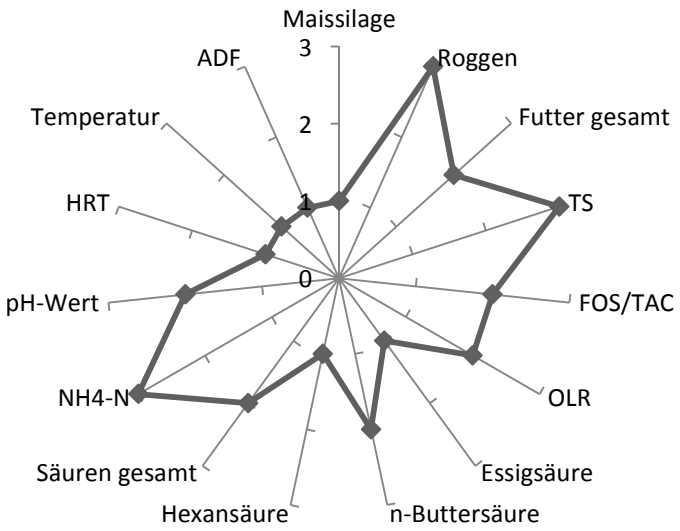


Abbildung 30: Mit ACO am häufigsten ausgesuchte prozessrelevante Messgrößen der BGA 02 bis 10.

Die PG Roggen, TS und NH_4-N wurden bei drei Biogasanalgen als prozessrelevant ausgesucht. Die PG Roggen und NH_4-N (gülle- und misthaltige Substrate) beschreiben qualitativ das Substrat. Diese Größen spielen eine entscheidende Rolle beim Verlauf der anaeroben Fermentation, da deren Zerfalls- oder Umwandlungsprodukte den Prozess stark beeinflussen können. Zum Beispiel zu hohe Anteile der zellulosehaltigen Substratbestandteile verlangsamen die Fermentation und zu hohe Konzentration an Ammoniak kann die Fermentation komplett abbrechen. Demzufolge ist das Substrat das Entscheidende für den Prozess und die Produktausbeute.

Zweimal wurden die Prozessgrößen FOS/TAC, pH-Wert, OLR, n-Buttersäure, Säuren gesamt und Futter gesamt ausgesucht. Das Verhältnis FOS/TAC (flüchtige organische Säuren/ totaler anorganischer Carbonpuffer) sagt aus, ob die Biogasanlage stabil verläuft. Eine Übersäuerung der Anlage kann fatale Folgen für die methanbildenden Mikroorganismen haben. Dieser Wert ist natürlich substratspezifisch. Der pH-Wert und die Säuren gesamt sind wichtige Parameter, die für die Aktivität der Mikroorganismen verantwortlich sind. Eine Überschreitung oder Unterschreitung des Optimums führt zur Bildung oder Freisetzung hemmender Substanzen, wie z.B. Ammoniak oder Carbondioxid (DEUBLEIN & STEINHAUSER 2011). Die Buttersäure gehört ebenfalls zu den Prozessgrößen, welche einen äußerst starken Einfluss auf die Biogasproduktion haben. Zu hohe Konzentration führt zur Hemmung der Methanbildung. Die PG OLR (Organic Loading Rate) beschreibt die Belastbarkeit eines Fermenters und spielt somit ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Fermentation.

Die so erzielten Ergebnisse wurden für eine weitere Optimierung der Regressionsmodelle verwendet. Hier wurden alle Prozessgrößen mit einer Pheromonkonzentration größer als 0,5 für eine weitere Berechnung der PLSR Modelle verwendet. Das Ziel dieses Schrittes war die Modellgüte zu verbessern. Aufgrund der kleinen Datenmengen

wurde die Regressionsmodelle ausschließlich für die BGA Erchinger (03) berechnet. Hier wurde die Biogasausbeute pro Tag anhand von vier Hauptkomponenten vorhergesagt. In **Tabelle 14** sind die Ergebnisse der neu berechneten Modellgrößen im Vergleich zu den mit allen Prozessgrößen, den CV-Modellgrößen und den Modellen ohne Ausreißer dargestellt.

Tabelle 14: Ergebnisse der PLSR-Modelle BGA Erchinger (03).

Modellgrößen	*PLSR mit allen Prozessgrößen*	*PLSR kreuzvalidiert*	*PLSR ohne Ausreißer*	*PLSR mit ACO ausgesuchten Prozessgrößen*
RMSE [%]	9,77	16,97	10,11	9,07
R^2 [-]	0,53	0,66	0,68	0,7

Die Datenreduktion der Prozessdaten durch Verwendung der Prozessgrößen mit einer Pheromonkonzentration größer als 0,5 führte im Fall der BGA Erchinger (03) zu einer besseren Modellgüte der PLSR-Modelle. Hier war der Fehler im Vergleich zu den Modellen mit allen Prozessgrößen, mit den kreuzvalidierten Modellen und mit den Regressionsmodellen ohne Ausreißer am kleinsten und lag bei 9,07 % (alle PG: 10,58 %; CV: 16,97 %; ohne Ausreißer: 10,11 %). Das Bestimmtheitsmaß stieg auf einen Wert von 0,7 (alle PG: 0,53; CV: 0,66; ohne Ausreißer: 0,68). Diese eindeutige Verbesserung der Modellgüte zeigte, dass dieses Verfahren für die Auswertung solcher Messdaten gut geeignet ist. Dieses Verfahren sollte aber auf jeden Fall mit den anderen Datensätzen getestet werden. Dies wird umgesetzt sobald die entsprechenden Messdaten zur Verfügung stehen.

II.3 Ausblick und weiteres Vorhaben

Aufgrund der zeitlichen Verzögerung der Datenveröffentlichung konnten bisher nur die chemischen und verfahrenstechnischen Prozessdaten ausgewertet werden. Mit den zur Verfügung gestellten Daten ist es gelungen die prozessrelevanten Größen für jede Biogasanlage zu bestimmen. Anhand der berechneten Regressionsmodellen (*PLSR und PCR*) konnte eine Vorhersage der Zielgröße Biogasausbeute pro Tag mit einem mittleren Fehler von unter 2 % durchgeführt werden. Anhand der erzielten Ergebnisse konnten die komplexen Zusammenhänge zwischen den Messgrößen untersucht werden. Da die mikrobiologischen Messdaten noch nicht zur Verfügung standen, konnten diese in die Auswertung nicht herangezogen werden. Die fehlenden Messdaten werden demnächst zur Verfügung gestellt und werden in die bereits implementierten Auswerteverfahren integriert. Es werden die Korrelationen zwischen den gemessenen Prozessgrößen und der Mikrobiologie genau untersucht. Es ist geplant andere Vorverarbeitungsmethoden zu testen, wie z.B. *Glättung* oder *Basislinienkorrektur*, um für jeden Datensatz eine geeignete Methode zu bestimmen. Es werden andere Methoden der *Kreuzvalidierung* getestet. Um die Modellgüte der Regressionsmodelle weiter zu ver-

bessern und die prozessrelevanten Größen zu bestimmen, werden andere Optimierungsmethoden, wie z.B. die *neuronale Netze* oder der *genetische Algorithmus* (ABU QDAIS *et al.* 2009) angewendet.

Für die Auswertung der mikrobiologischen Messdaten werden die Cluster-Methoden, wie z.B. *Hierarchical Clustering* oder *k-Mean Clustering* angewendet um die identifizierten Mikroorganismengemeinschaften nach ihrer Verteilung und Häufigkeit in Cluster zusammen zu fassen. Es ist geplant die Klassifizierungsmethoden, wie z.B. *Classification Tree* oder die Methode von *Nearest Neighbour* anzuwenden um die Verteilungsmuster zu analysieren. Diese Muster werden auf eine Korrelation mit den gemessenen Prozessgrößen überprüft. Somit können die optimale Bedingungen aber auch die Hemmfaktoren für die prozessbestimmenden Mikroorganismenarten für jeden Prozess einzeln definiert werden.

II.4 Anhang

II.4.1 Korrelation der Prozessgrößen

Tabelle1: Korrelation der Prozessgrößen BGA 02 (Neumann), Hydrolyse.

	Gas/d [m³]	*Maissilage[t]*	*Roggen-GPS[t]*	*Gras[t]*	*R. Gülle[m³/d]*	*Enzyme[kg]*	*Futter ges.[t]*	*BR (BGA 02) [kg oTS/m³*d]*	*HRT [d]*	*T emp. Hydrolyse[°C]*	*Temp. Fermenter[°C]*	*TS[% FM]*	*oTS [% TS]*	*NDF [g/kg oTS]*	*ADF [g/kg oTS]*	*ADL [g/kg oTS]*	*pH Hyd. [-]*	*Essigsr. Hyd.[g/l]*	*Propionsr. Hyd. [g/l]*	*n- Buttersr. Hyd. [g/l]*	*iso-Buttersr. Hyd. [g/l]*	*n-Valeriansr. Hyd.[g/l]*	*iso-Valeriansr. Hyd.[g/l]*	*Säuren ges. Hyd.[g/l]*	*NH4-N Hyd.[g/l]*
Gas/d [m³]	1,00																								
Maissilage[t]	0,10	1,00																							
Roggen-GPS[t]	0,20	-0,25	1,00																						
Gras[t]	0,21	0,21	-0,45	1,00																					
R. Gülle[m³/d]	0,20	-0,28	1,00	-0,45	1,00																				
Enzyme[kg]	0,19	-0,04	0,34	0,45	0,34	1,00																			
Futter ges.[t]	0,29	-0,22	0,96	-0,20	0,96	0,51	1,00																		
*BR (BGA 02) [kg oTS/m³*d]*	0,38	-0,09	0,57	0,35	0,57	0,69	0,73	1,00																	
HRT [d]	-0,29	0,21	-0,96	0,18	-0,96	-0,52	-1,00	-0,74	1,00																
T emp. Hydrolyse[°C]	0,09	-0,01	-0,02	-0,07	-0,01	-0,16	-0,04	0,18	0,04	1,00															
Temp. Fermenter[°C]	0,14	-0,20	0,37	0,19	0,38	0,38	0,46	0,63	-0,47	0,37	1,00														
TS[% FM]	-0,14	-0,14	-0,06	0,04	-0,05	-0,03	-0,05	-0,19	0,05	-0,21	-0,30	1,00													
oTS [% TS]	-0,19	-0,01	-0,29	0,17	-0,28	-0,08	-0,26	-0,31	0,26	-0,19	-0,34	0,96	1,00												
NDF [g/kg oTS]	-0,23	0,02	-0,52	0,26	-0,50	-0,19	-0,49	-0,38	0,48	0,10	0,01	0,54	0,66	1,00											
ADF [g/kg oTS]	-0,22	0,05	-0,51	0,31	-0,50	-0,14	-0,47	-0,32	0,46	0,07	0,02	0,54	0,66	0,99	1,00										
ADL [g/kg oTS]	-0,11	-0,04	-0,23	0,39	-0,22	0,11	-0,13	-0,02	0,12	-0,16	0,21	0,52	0,58	0,83	0,86	1,00									
pH Hyd. [-]	-0,25	0,09	-0,35	0,22	-0,35	-0,04	-0,32	-0,33	0,31	-0,27	-0,44	0,88	0,95	0,63	0,64	0,55	1,00								
Essigsr. Hyd.[g/l]	-0,13	-0,04	-0,62	0,22	-0,60	-0,21	-0,61	-0,40	0,61	0,28	-0,10	0,37	0,52	0,59	0,54	0,32	0,40	1,00							
Propionsr. Hyd. [g/l]	-0,19	0,09	-0,51	0,38	-0,51	0,04	-0,45	-0,27	0,44	-0,10	-0,35	0,31	0,44	0,39	0,37	0,26	0,54	0,59	1,00						
n- Buttersr. Hyd. [g/l]	-0,01	0,10	-0,35	0,12	-0,34	-0,08	-0,34	-0,14	0,34	0,26	-0,32	0,42	0,49	0,41	0,41	0,29	0,45	0,63	0,55	1,00					
iso-Buttersr. Hyd. [g/l]	0,00	-0,01	-0,45	0,43	-0,45	-0,09	-0,37	-0,05	0,36	0,22	-0,01	0,03	0,16	0,31	0,31	0,19	0,24	0,45	0,78	0,45	1,00				
n-Valeriansr. Hyd.[g/l]	0,13	0,33	-0,13	0,15	-0,14	-0,04	-0,10	-0,06	0,10	0,02	-0,52	0,23	0,27	0,00	0,01	-0,02	0,32	0,12	0,36	0,60	0,21	1,00			
iso-Valeriansr. Hyd.[g/l]	-0,27	-0,28	-0,50	0,18	-0,48	0,02	-0,49	-0,24	0,48	0,21	0,14	0,23	0,33	0,50	0,46	0,31	0,21	0,79	0,34	0,33	0,21	-0,34	1,00		
Säuren ges. Hyd.[g/l]	-0,13	0,02	-0,60	0,27	-0,59	-0,12	-0,57	-0,32	0,57	0,24	-0,24	0,42	0,56	0,57	0,54	0,34	0,50	0,93	0,75	0,84	0,59	0,37	0,66	1,00	
NH4-N Hyd.[g/l]	-0,19	0,10	-0,24	0,10	-0,24	-0,04	-0,23	-0,26	0,23	-0,10	-0,39	0,91	0,94	0,58	0,59	0,46	0,94	0,45	0,40	0,52	0,10	0,33	0,27	0,53	1,00

Tabelle 2: Korrelation der Prozessgrößen BGA 03 (Erchinger), HF.

	Gas/Tag [m³]	Mais [t]	Roggen-GPS [t]	Gras [t]	Ferkelmist [t]	Rind. Gülle [m³/d]	Enzym [kg/d]	Futter Gesamt [t]	BR (BGA 03) [kg_{oTS}/m^3*d]	BR (BGA 03 HF) [kg_{oTS}/m^3*d]	HRT [d]	HRT HF [d]	Temp. HF [°C]	TS HF [% FM]	oTS HF [% TS]	NDF HF [g/kg oTS]	ADF HF [g/kg oTS]	ADL HF [g/kg oTS]	pH HF [-]	FOS/TAC HF [-]	Essigsr. HF [g/l]	Propionsr. HF [g/l]	n- Buttersr. HF[g/l]	iso-Buttersr. HF [g/l]	n-Valeriansr. HF [g/l]	iso-Valeriansr. HF [g/l]	Sären ges. HF [g/l]	NH4-N HF [g/l]
Gas/Tag [m³]	1,00																											
Mais [t]	0,40	1,00																										
Roggen-GPS [t]	0,26	-0,18	1,00																									
Gras [t]	0,27	0,51	-0,72	1,00																								
Ferkelmist [t]	0,41	0,36	0,30	0,18	1,00																							
Rind. Gülle [m³/d]	-0,01	0,01	0,14	-0,03	0,18	1,00																						
Enzym [kg/d]	0,23	0,11	-0,61	0,54	-0,04	-0,16	1,00																					
Futter Gesamt [t]	0,84	0,60	0,13	0,39	0,37	0,10	0,14	1,00																				
BR (BGA 03) [kg_{oTS}/m^3*d]	0,74	0,83	0,19	0,35	0,63	0,11	0,00	0,84	1,00																			
BR (BGA 03 HF) [kg_{oTS}/m^3*d]	0,72	0,83	0,12	0,39	0,64	0,12	0,04	0,83	0,99	1,00																		
HRT [d]	0,13	-0,56	0,40	-0,64	-0,42	0,10	-0,48	0,37	0,27	0,24	1,00																	
HRT HF [d]	0,13	-0,56	0,40	-0,64	-0,42	0,10	-0,48	0,37	0,27	0,24	1,00	1,00																
Temp. HF [°C]	0,72	0,40	0,21	0,05	0,37	0,11	0,12	0,85	0,81	0,81	0,58	0,58	1,00															
TS HF [% FM]	0,89	0,29	0,42	-0,01	0,46	-0,17	0,13	0,89	0,78	0,76	0,40	0,40	0,88	1,00														
oTS HF [% TS]	0,64	0,10	0,25	-0,12	0,11	0,07	0,01	0,82	0,81	0,80	0,65	0,65	0,98	0,83	1,00													
NDF HF [g/kg oTS]	0,16	-0,02	-0,12	0,21	0,10	-0,10	0,15	0,17	0,10	0,11	0,04	0,04	0,14	0,15	0,18	1,00												
ADF HF [g/kg oTS]	0,15	-0,05	-0,12	0,20	0,10	-0,11	0,16	0,15	0,08	0,10	0,05	0,05	0,14	0,15	0,17	0,99	1,00											
ADL HF [g/kg oTS]	0,15	-0,05	-0,14	0,21	0,11	-0,12	0,20	0,16	0,08	0,09	0,04	0,04	0,14	0,16	0,17	0,98	0,99	1,00										
pH HF [-]	0,79	0,64	0,05	0,46	0,57	-0,03	0,17	0,88	0,86	0,85	0,47	0,47	0,98	0,91	0,95	0,14	0,13	0,14	1,00									
FOS/TAC HF [-]	-0,43	-0,58	-0,08	-0,44	-0,61	0,12	-0,29	-0,17	-0,29	-0,29	0,68	0,68	0,10	-0,15	0,17	-0,04	-0,01	-0,03	-0,07	1,00								
Essigsr. HF [g/l]	-0,30	-0,35	0,13	-0,41	-0,31	0,14	-0,43	-0,04	-0,11	-0,15	0,64	0,64	0,08	-0,07	0,15	0,05	0,07	0,07	-0,03	0,70	1,00							
Propionsr. HF [g/l]	-0,24	-0,48	-0,02	-0,34	-0,35	-0,07	-0,09	-0,15	-0,24	-0,25	0,52	0,52	0,07	-0,07	0,13	0,23	0,29	0,29	-0,05	0,67	0,68	1,00						
n- Buttersr. HF[g/l]	-0,47	-0,59	-0,19	-0,38	-0,73	-0,04	-0,13	-0,27	-0,42	-0,42	0,56	0,56	0,01	-0,25	0,06	-0,01	0,01	0,01	-0,14	0,84	0,61	0,66	1,00					
iso-Buttersr. HF [g/l]	-0,23	-0,40	0,07	-0,42	-0,37	-0,03	-0,30	-0,11	-0,22	-0,24	0,52	0,52	0,05	-0,07	0,11	0,19	0,23	0,22	-0,06	0,63	0,79	0,88	0,65	1,00				
n-Valeriansr. HF [g/l]	-0,09	-0,26	0,05	-0,27	-0,20	-0,04	-0,13	-0,08	-0,18	-0,18	0,29	0,29	0,03	-0,06	0,06	0,19	0,25	0,24	-0,03	0,27	0,35	0,69	0,46	0,80	1,00			
iso-Valeriansr. HF [g/l]	-0,22	-0,40	0,16	-0,44	-0,29	0,00	-0,33	-0,06	-0,17	-0,21	0,59	0,59	0,07	-0,02	0,13	0,16	0,22	0,21	-0,04	0,68	0,81	0,92	0,60	0,94	0,68	1,00		
Sären ges. HF [g/l]	-0,30	-0,45	0,06	-0,42	-0,40	0,04	-0,32	-0,10	-0,21	-0,24	0,64	0,64	0,07	-0,09	0,14	0,14	0,18	0,18	-0,05	0,75	0,91	0,91	0,74	0,94	0,64	0,95	1,00	
NH4-N HF [g/l]	0,35	0,17	-0,04	0,00	0,22	-0,01	0,21	0,26	0,00	0,03	-0,33	-0,33	0,08	0,30	-0,35	0,02	0,03	0,06	0,20	-0,24	-0,18	-0,21	-0,29	-0,15	-0,04	-0,16	-0,20	1,00

Tabelle 3: Korrelation der Prozessgrößen BGA 04 (Eckel), HF.

	Gas/Tag [m³]	*Mais[t]*	*Roggen-GPS [t]*	*Rind. Gülle[m³]*	*Rind. Mist [t]*	*Futter gesamt[t]*	*OLR (BGA 04)[kg oTS/m³*d]*	*HRT [d]*	*Temp. HF [°C]*	*TS HF [% FM]*	*oTS HF [% TS]*	*NDF HF [% TS]*	*ADF HF [% TS]*	*ADL HF [% TS]*	*pH HF [-]*	*FOS/TAC HF [-]*	*Essisr.[g/l]*	*n- Buttersr. HF [g/l]*	*iso-Buttersr. HF [g/l]*	*n-Valeriansr. HF[g/l]*	*iso-Valeriansr. HF [g/l]*	*Hexansr.HF [g/l]*	*Säuren ges.[g/l]*	*NH4-N [g/l]*
Gas/Tag [m³]	1,00																							
Mais[t]	0,27	1,00																						
Roggen-GPS [t]	-0,28	-0,42	1,00																					
Rind. Gülle[m³]	0,21	0,55	0,21	1,00																				
Rind. Mist [t]	-0,07	0,61	0,22	0,59	1,00																			
Futter gesamt[t]	0,21	0,94	-0,11	0,76	0,77	1,00																		
*OLR (BGA 04)[kg oTS/m³*d]*	0,16	0,79	-0,50	0,34	0,52	0,70	1,00																	
HRT [d]	-0,21	-0,94	0,10	-0,74	-0,78	-1,00	-0,71	1,00																
Temp. HF [°C]	0,09	-0,32	0,25	0,05	-0,05	-0,22	-0,21	0,20	1,00															
TS HF [% FM]	0,13	0,44	-0,53	0,23	0,13	0,33	0,61	-0,32	-0,21	1,00														
oTS HF [% TS]	-0,11	0,31	0,06	0,05	0,42	0,32	0,14	-0,31	-0,47	-0,14	1,00													
NDF HF [% TS]	-0,03	0,48	-0,40	-0,17	0,13	0,32	0,50	-0,34	-0,64	0,37	0,24	1,00												
ADF HF [% TS]	-0,10	0,41	-0,42	-0,20	0,07	0,24	0,46	-0,27	-0,52	0,39	0,01	0,93	1,00											
ADL HF [% TS]	-0,01	0,23	-0,48	-0,19	-0,10	0,06	0,43	-0,10	-0,20	0,56	-0,44	0,69	0,82	1,00										
pH HF [-]	0,06	0,22	-0,36	-0,03	-0,22	0,09	0,40	-0,11	-0,08	0,25	-0,43	0,22	0,27	0,44	1,00									
FOS/TAC HF [-]	-0,10	0,35	0,03	0,16	0,48	0,38	0,52	-0,42	0,41	-0,04	0,15	0,15	0,10	0,06	0,15	1,00								
Essisr.[g/l]	-0,52	-0,13	-0,08	-0,23	-0,09	-0,18	-0,14	0,21	-0,36	0,09	0,34	0,22	0,26	-0,01	-0,12	-0,20	1,00							
n- Buttersr. HF [g/l]	-0,54	-0,12	-0,13	-0,19	-0,11	-0,17	-0,10	0,21	-0,37	0,17	0,32	0,20	0,25	0,02	-0,04	-0,19	0,96	1,00						
iso-Buttersr. HF [g/l]	-0,46	-0,10	-0,13	-0,16	-0,10	-0,15	-0,10	0,19	-0,36	0,22	0,33	0,19	0,23	0,02	-0,10	-0,23	0,97	0,98	1,00					
n-Valeriansr. HF[g/l]	-0,49	-0,06	-0,12	-0,17	-0,08	-0,11	-0,02	0,13	-0,44	0,18	0,35	0,31	0,36	0,11	0,08	-0,16	0,96	0,98	0,97	1,00				
iso-Valeriansr. HF [g/l]	-0,50	-0,02	-0,14	-0,26	-0,07	-0,10	0,04	0,11	-0,47	0,07	0,37	0,34	0,37	0,05	0,10	-0,13	0,93	0,89	0,87	0,94	1,00			
Hexansr.HF [g/l]	-0,55	-0,02	-0,10	-0,17	-0,02	-0,07	0,07	0,09	-0,44	0,12	0,37	0,29	0,32	0,03	0,15	-0,04	0,88	0,94	0,88	0,97	0,93	1,00		
Säuren ges.[g/l]	-0,52	-0,11	-0,09	-0,23	-0,09	-0,16	-0,10	0,19	-0,39	0,10	0,35	0,24	0,28	0,00	-0,07	-0,19	1,00	0,97	0,97	0,97	0,95	0,91	1,00	
NH4-N [g/l]	-0,12	-0,44	0,33	-0,46	0,04	-0,40	-0,27	0,37	0,41	-0,35	0,18	-0,10	-0,09	-0,15	-0,35	0,41	0,14	0,10	0,10	0,08	0,04	0,07	0,12	1,00

Tabelle 4: Korrelation der Prozessgrößen BGA 05 (Kuhls), HF 1.

	Gas / Tag ges [m³]	*MaisHF1 [t]*	*Gefl. Mist HF1 [t]*	*OLR (BGA 05) [kgoTS/m3*d]*	*HRT [d]*	*HF1 [°C]*	*TS [% FM]*	*oTS [% TS]*	*pH [-]*	*FOS/TAC [-]*	*Essigsr. [g/l]*	*Propionsr. [g/l]*	*n- Buttersr. [g/l]*	*iso-Buttersr. [g/l]*	*n-Valeriansr. [g/l]*	*iso-Valeriansr. [g/l]*	*Säuren ges. HF 1 [g/l]*	*NH4-N [g/l]*
Gas / Tag ges [m³]	1,00																	
MaisHF1 [t]	0,90	1,00																
Gefl. Mist HF1 [t]	-0,85	-0,94	1,00															
*OLR (BGA 05) [kgoTS/m3*d]*	-0,36	-0,22	0,27	1,00														
HRT [d]	-0,88	-0,97	0,86	0,22	1,00													
HF1 [°C]	0,85	0,92	-0,91	-0,30	-0,92	1,00												
TS [% FM]	-0,83	-0,70	0,76	0,54	0,71	-0,81	1,00											
oTS [% TS]	0,25	0,49	-0,46	0,48	-0,44	0,28	0,12	1,00										
pH [-]	0,00	-0,12	0,05	0,41	0,10	0,01	0,12	0,27	1,00									
FOS/TAC [-]	-0,84	-0,56	0,63	0,41	0,54	-0,56	0,84	0,03	-0,11	1,00								
Essigsr. [g/l]	-0,88	-0,82	0,85	0,40	0,77	-0,73	0,85	-0,22	0,26	0,82	1,00							
Propionsr. [g/l]	-0,27	-0,49	0,29	0,00	0,55	-0,32	0,12	-0,38	0,44	-0,06	0,37	1,00						
n- Buttersr. [g/l]	-0,95	-0,88	0,85	0,37	0,85	-0,81	0,81	-0,29	-0,03	0,82	0,93	0,36	1,00					
iso-Buttersr. [g/l]	-0,83	-0,93	0,94	0,25	0,90	-0,87	0,75	-0,48	0,13	0,62	0,88	0,51	0,86	1,00				
n-Valeriansr. [g/l]	-0,20	-0,37	0,22	-0,30	0,44	-0,41	0,13	-0,32	-0,23	-0,04	0,11	0,65	0,27	0,40	1,00			
iso-Valeriansr. [g/l]	-0,84	-0,90	0,87	0,28	0,89	-0,81	0,74	-0,42	0,21	0,63	0,90	0,65	0,92	0,97	0,45	1,00		
Säuren ges. HF 1 [g/l]	-0,87	-0,86	0,86	0,37	0,82	-0,76	0,82	-0,29	0,28	0,76	0,99	0,50	0,95	0,92	0,24	0,95	1,00	
NH4-N [g/l]	-0,94	-0,86	0,91	0,42	0,80	-0,82	0,86	-0,25	0,10	0,85	0,92	0,18	0,89	0,89	0,06	0,84	0,90	1,00

Tabelle 5: Korrelation der Prozessgrößen BGA 05 (Kuhls), HF 2.

	Gas / Tag [m³]	*Maissilage HF2 [t]*	*Geflügelmist HF2 [t]*	*Futter gesamt [t]*	*OLR (BGA 05) [kgoTS/m3*d]*	*HRT[d]*	*HF2 [°C]*	*TS*	*oTS*	*pH Wert [-]*	*FOS/TAC [-]*	*Essigsr. [g/l]*	*Propionsr. [g/l]*	*n- Buttersr. [g/l]*	*iso-Buttersr. [g/l]*	*n-Valeriansr. [g/l]*	*iso-Valeriansr. [g/l]*	*Säuren ges. HF 2 [g/l]*	*NH4-N [g/l]*
Gas / Tag ges. [m³]	1,00	0,86	-0,83	0,82	-0,36	-0,83	0,72	-0,71	0,17	-0,04	-0,75	-0,89	-0,15	-0,91	-0,84	0,05	-0,80	-0,89	-0,95
Mais HF2 [t]		1,00	-0,96	0,96	-0,33	-0,96	0,84	-0,90	-0,19	-0,02	-0,73	-0,78	0,18	-0,78	-0,78	0,30	-0,62	-0,73	-0,88
Geflügelmist HF2 [t]			1,00	-0,85	0,36	0,86	-0,92	0,90	0,13	-0,05	0,77	0,81	-0,16	0,78	0,81	-0,26	0,65	0,76	0,89
Futter gesamt [t]				1,00	-0,27	-1,00	0,69	-0,83	-0,23	-0,08	-0,63	-0,68	0,18	-0,73	-0,69	0,31	-0,54	-0,64	-0,79
*OLR (BGA 05) [kgoTS/m3*d]*					1,00	0,28	-0,37	0,26	0,24	0,18	0,28	0,52	0,22	0,48	0,47	-0,10	0,48	0,53	0,41
HRT[d]						1,00	-0,70	0,84	0,23	0,07	0,65	0,70	-0,17	0,75	0,71	-0,29	0,57	0,66	0,81
HF2 [°C]							1,00	-0,84	-0,08	0,13	-0,72	-0,76	0,04	-0,76	-0,84	0,09	-0,68	-0,74	-0,83
TS								1,00	0,37	-0,03	0,81	0,79	-0,16	0,80	0,82	-0,23	0,65	0,75	0,84
oTS									1,00	-0,12	0,17	0,03	-0,42	0,06	0,01	-0,33	-0,10	-0,03	-0,03
pH Wert [-]										1,00	-0,33	0,08	0,58	0,02	0,08	0,26	0,21	0,15	0,02
FOS/TAC [-]											1,00	0,87	-0,26	0,80	0,68	-0,38	0,57	0,79	0,87
Essigsr. [g/l]												1,00	0,17	0,95	0,88	-0,09	0,85	0,98	0,97
Propionsr. [g/l]													1,00	0,27	0,35	0,85	0,58	0,34	0,10
n- Buttersr. [g/l]														1,00	0,95	0,10	0,93	0,97	0,95
iso-Buttersr. [g/l]															1,00	0,22	0,96	0,92	0,90
n-Valeriansr. [g/l]																1,00	0,40	0,09	-0,10
iso-Valeriansr. [g/l]																	1,00	0,93	0,84
Säuren ges. HF 2 [g/l]																		1,00	0,95
NH4-N [g/l]																			1,00

Tabelle 6: Korrelation der Prozessgrößen BGA 06 (Meyer-H.), HF.

	Gas pro Tag [m³]	*Mais HF [t]*	*Temp. HF [°C]*	*TS [% FM]*	*oTS [% TS]*	*NDF[%TS]*	*ADF [%TS]*	*pH Wert [-]*	*FOS/TAC [-]*	*Essigsr. [g/l]*	*Propionsr. [g/l]*	*n- Buttersr. [g/l]*	*iso-Buttersr. [g/l]*	*n-Valeriansr. [g/l]*	*iso-Valeriansr. [g/l]*	*Capronsr. [g/l]*	*Säuren ges. HF*	*NH4-N*
NH4-N [g/l]																		1,00
Säuren ges. HF [g/l]																	1,00	0,77
Capronsr. [g/l]																1,00	0,90	0,89
iso-Valerianr. [g/l]															1,00	0,54	0,76	0,37
n-Valeriansr. [g/l]														1,00	0,67	0,85	0,97	0,76
iso-Buttersr. [g/l]													1,00	0,01	0,64	-0,14	0,11	-0,19
n- Buttersr. [g/l]												1,00	-0,16	0,92	0,53	0,98	0,92	0,87
Propionsr. [g/l]											1,00	-0,36	0,84	-0,08	0,54	-0,38	-0,03	-0,40
Essigsr. [g/l]										1,00	0,14	0,75	0,18	0,91	0,74	0,70	0,93	0,59
FOS/TAC [-]									1,00	0,81	-0,27	0,94	-0,18	0,95	0,55	0,89	0,92	0,79
pH Wert [-]								1,00	-0,95	-0,79	0,33	-0,96	0,15	-0,93	-0,51	-0,89	-0,91	-0,81
ADF [%TS]							1,00	0,73	-0,80	-0,58	0,40	-0,76	0,37	-0,72	-0,26	-0,75	-0,68	-0,81
NDF [%TS]						1,00	0,93	0,80	-0,80	-0,63	0,45	-0,79	0,34	-0,74	-0,22	-0,75	-0,71	-0,80
oTS [% TS]					1,00	-0,39	-0,22	-0,57	0,47	0,37	-0,08	0,44	0,06	0,50	0,29	0,36	0,42	0,39
TS [% FM]				1,00	0,33	-0,62	-0,70	-0,89	0,92	0,75	-0,18	0,93	-0,06	0,89	0,65	0,92	0,91	0,80
Temp. HF [°C]			1,00	-0,24	-0,21	0,67	0,44	0,54	-0,43	-0,43	0,54	-0,51	0,27	-0,42	0,03	-0,50	-0,44	-0,48
Mais HF [t]		1,00	0,15	-0,78	-0,03	0,39	0,51	0,59	-0,67	-0,41	0,29	-0,70	0,15	-0,57	-0,40	-0,74	-0,61	-0,57
Gas pro Tag [m³]	1,00	0,62	0,61	-0,78	-0,54	0,81	0,72	0,91	-0,89	-0,71	0,34	-0,93	0,14	-0,86	-0,49	-0,89	-0,85	-0,75

Tabelle 7: Korrelation der Prozessgrößen BGA 07 (Schwenker), HF.

	Gas / Tag ges.[m³]	Maissilage [t]	Roggen-GPS [t]	Rindermist [t]	Gülle [m3]	Futter gesamt [t]	OLR (BGA 07) [kgoTS/m3*d]	HRT [d]	Fermenter [°C]	TS [% FM]	oTS [% TS]	pH Wert [-]	FOS/TAC [-]	Essigsr.[g/l]	Propionsr. [g/l]	n- Buttersr. [g/l]	iso-Buttersr. [g/l]	n-Valeriansr. [g/l]	iso-Valeriansr. [g/l]	Hexansäure [g/l]	Säuren ges. HF [g/l]	NH4-N [g/l]
Gas / Tag ges. [m³]	1,00																					
Maissilage [t]	0,92	1,00																				
Roggen-GPS [t]	0,40	0,24	1,00																			
Rindermist [t]	0,80	0,91	-0,08	1,00																		
Gülle [m3]	0,65	0,66	0,40	0,64	1,00																	
Futter gesamt [t]	0,91	0,96	0,31	0,91	0,83	1,00																
*OLR (BGA 07) [kgoTS/m3*d]*	0,75	0,79	0,48	0,61	0,73	0,82	1,00															
HRT [d]	-0,89	-0,93	-0,43	-0,82	-0,83	-0,97	-0,81	1,00														
Fermenter [°C]	0,31	0,22	0,37	0,20	0,65	0,39	0,40	-0,39	1,00													
TS [% FM]	0,30	0,31	0,24	0,36	0,57	0,44	0,44	-0,41	0,63	1,00												
oTS [% TS]	0,45	0,47	0,12	0,54	0,50	0,54	0,42	-0,47	0,47	0,90	1,00											
pH Wert [-]	0,08	0,01	0,03	-0,02	-0,25	-0,07	-0,10	0,04	-0,40	-0,22	-0,21	1,00										
FOS/TAC [-]	-0,17	-0,21	0,07	-0,12	-0,04	-0,14	-0,17	0,27	-0,07	0,17	0,20	-0,18	1,00									
Essigsr.[g/l]	0,10	0,05	0,27	-0,06	-0,04	0,03	0,17	-0,02	0,07	0,15	0,17	0,20	0,37	1,00								
Propionsr. [g/l]	0,18	0,16	0,26	0,02	0,02	0,12	0,25	-0,15	0,13	0,12	0,15	0,21	0,07	0,94	1,00							
n- Buttersr. [g/l]	0,15	0,13	0,23	-0,01	-0,03	0,08	0,22	-0,11	0,10	0,10	0,12	0,27	0,03	0,93	0,99	1,00						
iso-Buttersr. [g/l]	0,12	0,08	0,22	-0,03	-0,03	0,05	0,18	-0,05	0,11	0,12	0,16	0,19	0,24	0,98	0,98	0,97	1,00					
n-Valeriansr. [g/l]	0,15	0,13	0,23	-0,01	-0,03	0,08	0,22	-0,11	0,09	0,09	0,11	0,28	0,02	0,93	0,99	1,00	0,97	1,00				
iso-Valeriansr. [g/l]	-0,18	-0,26	0,03	-0,25	-0,27	-0,27	-0,14	0,38	-0,06	0,06	0,09	0,24	0,67	0,81	0,61	0,62	0,74	0,61	1,00			
Hexansäure [g/l]	0,25	0,15	0,29	-0,01	-0,09	0,08	0,23	-0,13	0,07	0,13	0,20	0,29	0,00	0,87	0,93	0,93	0,90	0,93	0,55	1,00		
Säuren ges. HF [g/l]	0,12	0,07	0,26	-0,04	-0,03	0,04	0,18	-0,04	0,08	0,14	0,16	0,21	0,30	1,00	0,97	0,96	0,99	0,96	0,77	0,90	1,00	
NH4-N [g/l]	-0,10	-0,21	0,10	-0,24	0,00	-0,17	0,12	0,11	-0,09	-0,07	-0,10	0,10	-0,20	-0,21	-0,20	-0,18	-0,21	-0,18	-0,15	-0,02	-0,21	1,00

Tabelle 8: Korrelation der Prozessgrößen BGA 08 (Demes), HF.

	Gas / Tag ges [m³]	*Maissilage[t]*	*Roggen-GPS [t]*	*Grassilage [t]*	*Rindermist [t]*	*Rindergülle [m3]*	*Futter ges. [m3]*	*HRT [d]*	*Fermenter [°C]*	*TS [% FM]*	*oTS [% TS]*	*pH Wert [-]*	*FOS/TAC [-]*	*Essigsr. [g/l]*	*Propionsr. [g/l]*	*n- Buttersr. [g/l]*	*iso-Buttersr.*	*iso-Valeriansr. [g/l]*	*Säuren ges. HF [g/l]*	*NH4-N [g/l]*
Gas / Tag ges [m³]	1,00																			
Maissilage[t]	-0,23	1,00																		
Roggen-GPS [t]	-0,30	0,35	1,00																	
Grassilage [t]	0,47	-0,76	-0,60	1,00																
Rindermist [t]	-0,34	-0,10	0,70	-0,12	1,00															
Rindergülle [m3]	-0,02	-0,66	-0,33	0,32	-0,15	1,00														
Futter ges. [m3]	-0,36	-0,04	0,64	-0,37	0,53	0,45	1,00													
HRT [d]	0,36	0,01	-0,64	0,39	-0,52	-0,44	-1,00	1,00												
Fermenter [°C]	0,51	-0,69	-0,61	0,98	-0,16	0,18	-0,49	0,51	1,00											
TS [% FM]	0,46	-0,76	-0,38	0,87	0,07	0,33	-0,17	0,18	0,85	1,00										
oTS [% TS]	0,01	0,30	0,32	-0,44	-0,26	0,18	0,45	-0,47	-0,46	-0,32	1,00									
pH Wert [-]	0,06	-0,42	-0,77	0,56	-0,64	0,38	-0,46	0,47	0,58	0,46	-0,08	1,00								
FOS/TAC [-]	-0,42	-0,08	0,72	-0,20	0,95	-0,10	0,58	-0,57	-0,26	-0,01	-0,21	-0,68	1,00							
Essigsr. [g/l]	-0,08	-0,52	0,50	0,28	0,74	0,15	0,48	-0,45	0,20	0,47	-0,14	-0,31	0,79	1,00						
Propionsr. [g/l]	-0,48	0,10	0,76	-0,38	0,94	-0,16	0,61	-0,61	-0,43	-0,17	-0,11	-0,76	0,96	0,63	1,00					
n- Buttersr. [g/l]	-0,28	0,00	0,70	-0,21	0,53	-0,09	0,52	-0,50	-0,24	-0,29	0,09	-0,45	0,52	0,47	0,46	1,00				
iso-Buttersr.	-0,40	0,14	0,71	-0,33	0,76	-0,14	0,58	-0,58	-0,38	-0,19	0,05	-0,73	0,88	0,65	0,86	0,43	1,00			
iso-Valeriansr. [g/l]	-0,32	0,15	0,40	-0,28	0,61	-0,12	0,35	-0,36	-0,31	-0,04	-0,06	-0,57	0,72	0,44	0,76	-0,12	0,83	1,00		
Säuren ges. HF [g/l]	-0,41	-0,05	0,75	-0,24	0,95	-0,09	0,63	-0,62	-0,30	-0,03	-0,10	-0,71	0,99	0,78	0,97	0,50	0,90	0,75	1,00	
NH4-N [g/l]	0,17	-0,87	-0,06	0,73	0,38	0,38	0,10	-0,07	0,70	0,82	-0,33	0,27	0,30	0,74	0,13	0,20	0,03	-0,06	0,28	1,00

Tabelle 9: Korrelation der Prozessgrößen BGA 09 (Bürger), HF.

NH4-N [g/l]																	1,00
Säuren ges. HF [g/l]																1,00	0,27
Propsr. [g/l]															1,00	0,71	0,03
Essigsr. [g/l]														1,00	0,65	1,00	0,29
FOS/TAC [-]													1,00	0,63	0,59	0,65	0,18
pH Wert [-]												1,00	0,47	0,37	0,64	0,42	0,26
oTS [% TS]											1,00	-0,31	-0,11	-0,21	-0,12	-0,21	-0,69
TS [% FM]										1,00	-0,22	0,69	0,74	0,52	0,57	0,55	0,31
HF [°C]									1,00	-0,18	0,61	-0,16	0,01	-0,36	-0,10	-0,35	-0,54
HRT [d]								1,00	-0,20	-0,40	0,28	-0,53	-0,34	-0,42	-0,47	-0,44	-0,10
*OLR (BGA 09) [kgoTS/m3*d]*							1,00	0,16	0,15	0,23	0,21	0,22	0,09	-0,25	-0,15	-0,25	0,10
Futter ges. [t]						1,00	-0,12	-0,97	0,20	0,37	-0,28	0,52	0,32	0,41	0,45	0,43	0,10
Gülle [m3]					1,00	0,94	-0,23	-0,91	0,01	0,34	-0,34	0,36	0,28	0,46	0,48	0,48	0,07
HTK [t]				1,00	-0,22	0,11	0,28	-0,10	0,25	0,08	0,18	0,25	-0,07	-0,15	-0,31	-0,18	0,18
G. Roggen [t]			1,00	0,31	0,04	0,30	0,24	-0,31	0,83	-0,04	0,43	0,21	0,09	-0,30	0,19	-0,26	-0,36
Mais [t]		1,00	-0,49	0,65	-0,24	-0,13	0,16	0,13	-0,40	0,12	-0,12	0,05	-0,07	0,09	-0,46	0,03	0,37
Gas / Tag ges. [m3]	1,00	0,33	-0,66	-0,18	-0,10	-0,32	-0,06	0,32	-0,42	-0,11	-0,26	-0,43	-0,28	-0,02	-0,32	-0,06	0,43
	Gas / Tag ges. [m3]	*Maissilage [t]*	*Grünroggen [t]*	*HTK [t]*	*Gülle [m3]*	*Futter ges. [t]*	*OLR (BGA 09) [kgoTS/m3*d]*	*HRT [d]*	*HF [°C]*	*TS [% FM]*	*oTS [% TS]*	*pH Wert [-]*	*FOS/TAC [-]*	*Essigsr. [g/l]*	*Propionsr. [g/l]*	*Säuren ges. HF [g/l]*	*NH4-N [g/l]*

Tabelle 10: Korrelation der Prozessgrößen BGA 10 (Fuest),HF.

	Gas / Tag [m³]	*Maissilage [t]*	*Grassilage [t]*	*Mischgülle [m3/d]*	*Futter ge.t [t]*	*BR (BGA 10) [kgoTS/m3*d]*	*HRT [d]*	*Fermenter [°C]*	*TS [% FM]*	*oTS [% TS]*	*NDF [g/kg oTS]*	*ADF [g/kg oTS]*	*ADL [g/kg oTS]*	*pH Wert [-]*	*FOS/TAC [-]*	*Essigsr. [mg/l]*	*Propionsr. [mg/l]*	*Säuren ges. HF [g/l]*	*NH4-N [g/l]*
Gas / Tag [m³]	1,00																		
Maissilage [t]	0,08	1,00																	
Grassilage [t]	-0,09	-0,42	1,00																
Mischgülle [m3/d]	-0,16	0,46	0,52	1,00															
Futter ge.t [t]	-0,06	0,78	0,19	0,91	1,00														
*BR (BGA 10) [kgoTS/m3*d]*	-0,07	0,52	-0,17	0,27	0,43	1,00													
HRT [d]	0,08	-0,78	-0,18	-0,91	-1,00	-0,43	1,00												
Fermenter [°C]	0,37	0,30	0,05	0,23	0,31	-0,10	-0,31	1,00											
TS [% FM]	0,33	0,32	-0,43	-0,41	-0,13	0,23	0,14	0,08	1,00										
oTS [% TS]	0,02	-0,32	0,61	0,19	0,00	-0,22	0,02	-0,10	-0,11	1,00									
NDF [g/kg oTS]	-0,02	0,01	0,57	0,57	0,42	0,05	-0,41	0,36	-0,32	0,36	1,00								
ADF [g/kg oTS]	-0,19	0,11	0,54	0,66	0,52	0,14	-0,52	0,38	-0,32	0,23	0,90	1,00							
ADL [g/kg oTS]	-0,18	-0,04	0,60	0,63	0,43	0,06	-0,42	0,16	-0,63	0,34	0,69	0,69	1,00						
pH Wert [-]	0,19	0,43	-0,43	-0,04	0,16	0,20	-0,16	0,13	0,38	-0,12	-0,15	-0,04	-0,29	1,00					
FOS/TAC [-]	0,32	-0,01	0,01	-0,13	-0,09	0,27	0,10	0,04	0,42	-0,10	0,15	0,12	-0,08	0,24	1,00				
Essigsr. [mg/l]	0,08	0,27	-0,10	-0,07	0,09	0,36	-0,08	0,29	0,61	-0,09	0,14	0,21	-0,19	0,47	0,48	1,00			
Propionsr. [mg/l]	-0,17	0,09	0,08	0,21	0,19	-0,05	-0,20	0,29	-0,27	-0,04	0,23	0,24	0,27	-0,09	0,10	-0,09	1,00		
Säuren ges. HF [g/l]	0,07	0,28	-0,10	-0,06	0,10	0,36	-0,09	0,31	0,60	-0,10	0,16	0,23	-0,17	0,47	0,48	1,00	-0,02	1,00	
NH4-N [g/l]	0,16	-0,29	-0,26	-0,35	-0,40	-0,28	0,39	-0,38	-0,40	0,07	-0,35	-0,48	-0,01	-0,05	-0,27	-0,67	-0,12	-0,68	1,00

II.4.2 Vorhersage der Zielgröße mit Hilfe von Regressionsmodellen

Tabelle 11: Prozessgrößen der BGA 02 bis 10.

Neu-mann (02)	***Erchin-ger (03)***	***Eckel (04)***	***Kuhls (05)***	***Meyer-H. (06)***	***Schwen-ker (07)***	***Demes (08)***	***Bürger (09)***	***Fuest (10)***
Gas/d [m³]	Gas/d [m³]	Gas/ [m³]	Gas/d [m³]	Gas/d [m³]	Gas/d [m³]	Gas/d [m³]	Gas/d [m³]	Gas/d [m³]
Maissilage [t]	Mais [t]	Maisilage [t]	Maissilage [t]	Maissilage 1 [t]	Maissilage [kg]	Maissilage [kg]	Maissilage [kg/d]	Maissilage [kg/d]
Gülle [m³/d]	Gras 1 [t]	Grünrog. [t]	Geflügel-mist [t]	Rezirkulat [m³]	Grünrog. [kg]	Rind. Mist [kg]	Huhn. Kot [kg/d]	Grassilage [kg/d]
Futter ges. [t]	GPS [t]	R.Gülle [m³]	Rezirkulat [m³]	Maissilage 2 [t]	Rind. Mist [kg]	Grünrog./d [kg]	Grünrog. [kg/d]	HTK, R., Schw. Gülle [kg/d]
HF [°C]	Gras 2 [t]	R. Mist [t]	Temeratur Ferm. [°C]	Futter ges. [t]	Gülle [m³]	Grassila-ge/d 1 [kg]	Gülle [m³/d]	Temp. HF [°C]
Hydrolyse [°C]	Ferkelmist [t]	Futter ges. [t]	HF1-RW [Amp]	Temp. Fer-menter [°C]	Futter ges. [kg/d]	Grassila-ge/d 2 [kg]	Temp. Ferm [°C]	Temp. EL [°C]
NF [°C]	R.Gülle [m³]	HF [°C]	Energie Ferm. [Kwh]	HF Energie v. RW [Amp]	Temp. Ferm. [°C]	Rind. Gülle/d [m³]	Temp. Nachgär. [°C]	Strom (F-SR 101) [A]
Temp. außen [°C]	Futter ges. [t]	NF [°C]	Energie/d [Kwh]	HF Energie h. RW [Amp]	Strom (BS2SR101-KSB12kW) [A]	Hafer/d [kg]	Strom (RW-NG-gesamt) [A]	Strom (F-SR102) [A]
IST-Strom HF [Kwh]	Rezirkulat [m³]	Strom HF/NF [Amp]	Energie ges. [Kwh]	HF+TD /NF [Kwh]	Strom (BS2SR102-KSB12kW) [A]	Temp. Ferm. [°C]	Wirkarbeit [MW/d]	Strom (RW-F) [A]
IST-Strom NF-RW2 [Kwh]	Temp. HF [°C]	Energie HF [Kwh]	Energie ges./d [Kwh]	HF+TD/NF /d [Kwh]	Wirkarb. [MW/d]	Strom (F-SR101) [A]	Betriebstd. [h]	Strom (NG 1) [A]
IST-Strom NF-RW1 [Kwh]	Tem. NF [°C]	Energie ges. [Kwh]	Wirkarb./d [Kwh]	Energie ges. [Kwh]	Betriebs-std./d [d]	Strom (F-SR102) [A]	pH [-]	Strom (NG 2) [A]
Gas [°C]	Strom v. HR [Amp]	Wirkungs kungs-arb. BHKW1 [Kwh]	Temp. außen. [°C]	Energie ges./d [Kwh]	pH [-]	Strom (F-SR103) [A]	LF [mS/cm]	Strom (NG 3) [A]
p Gas [mbar]	Strom h. HF/NF [Amp]	Ölver-brauch BHKW1 [KWh]	Nieder-schlag [t]	Ölver-brauch/d [L]	TM [% FM]	Strom (NG-SR101) [A]	FOS [mg/l]	Energie ges. [kWh]
Wirkarb. [KWh]	HF+Des/N F+EL [Kwh]	Betriebs-std. BHKW1 [h]	Essigsr. [mg/kgFM]	Gas Temp. [°C]	oTM [% TM]	Strom (NG-SR102)	TAC [mg/l]	Energie ges./d [kWh]
Betriebs-std. [h]	HF+Des NF+EL [Kwh]	Wirkarb. BHKW2 [Kwh]	Propionsr. [mg/kgFM]	Wirkarb./d [KWh]	oTM [% FM]	Wirkarb./d [MW]	FOS/TAC [-]	Wirkarbeit [MW/d]
Essigsr. [mg/l]	Energie ges. [Kwh]	Betriebs-std. BHKW2 [h]	n-Buttersr. [mg/kgFM]	Temp. Au-ßen [°C]	Rohasche [g/kgTS]	pH [-]	TS [%FM]	Betriebstd./d [d]

Neu-mann (02)	***Erchinger (03)***	***Eckel (04)***	***Kuhls (05)***	***Meyer-H. (06)***	***Schwen ker (07)***	***Demes (08)***	***Bürger (09)***	***Fuest (10)***
Propionsr. [mg/l]	Ölverb./d [L]	Temp. Außen [°C]	i-Buttersr. [mg/kgFM]	Essigsr. [mg/kgFM]	Leitfähig-keit [mS/cm]	Leitfähigkeit [mS/cm]	oTS [%TS]	TM [%]
n-Buttersr. [mg/l]	Gas [°C]	Nieder-schlag [mm]	n-Valeriansr. [mg/kgFM]	Propionsr. [mg/kgFM]	FOS [g/l]	FOS [mgSäure/l]	[mg NH4-N/kg]	oTM [% TM]
iso-Buttersr. [mg/l]	Wirkarb./d [Mwh]	TM 105 [%]	i-Valeriansr. [mg/kgFM]	n-Buttersr. [mg/kgFM]	gFOS/gCa CO3 [-]	TAC [mgCaCO3/l]	Essigsr. [mg/l]	Rohasche [% TM]
n-Valeriansr. [mg/l]	Betriebs-stund./d [h]	oTM [% TM]	Capronsr. [mg/kgFM]	i-Buttersr. [mg/kgFM]	Essigsr. [mg/kg]	FOS/TAC [-]	Propionsr. [mg/l]	TS [% FM]
iso-Valeriansr. [mg/l]	Temp. au-ßen [°C]	Rohasche [% TM]	NH4 [mg/kgFM]	n-Valeriansr. [mg/kgFM]	Propionsr. [mg/kg]	TS [%FM]	i-Buttersr. [mgS/l]	TM 60 [% TM 60°]
TS [%]	pH [-]	TS 60 [% FM]	TS [%FM]	i-Valeriansr. [mg/kgFM]	i-Buttersr. [mg/kg]	oTS [%TS]	n-Buttersr. [mg/l]	pH [-]
GV [% TS]	TM [% FM]	TM 60-105 [% TM 60°]	oTS [%TS]	Capronsr. [mg/kgFM]	n-Buttersr. [mg/kg]	NH4-N [mg/kg]	i-Valeri-ansr. [mg/l]	Leitfähigkeit [mS/cm]
NH4-N [mg/l]	oTM [% TM]	pH [-]	Rohasche [%TS]	NH4-N [mg/kgFM]	i-Valeriansr. [mg/kg]	Essigsr. [mg/l]	n-Valeri-ansr. [mg/l]	org. Säuren ges. [g/kg FM]
Leitfähig-keit [mS/cm]	oTM [% FM]	Leitfähig-keit [mS/cm]	pH [-]	TS [%FM]	n-Valeriansr. [mg/kg]	Propionsr. [mg/l]	Capronsr. [mg/l]	NH4 [mg/kg]
pH [-]	R.Asche [g/kgTS]	org. Säu-ren [g/kg FM]	Leitfähig-keit [mS/cm]	oTS [%TS]	Hexansr. [mg/kg]	i-Buttersr. [mg/l]	HAc [mg/l]	N ges. [mg/kg]
NDF [g/kg oTS]	Leitfähigkeit [mS/cm]	NH4 [mg/kg]	TAC [mg/L]	Rohasche [%TS]	Säuren ges. [mg/kg]	n-Buttersr. [mg/l]	-	FOS/TAC [-]
ADF [g/kg oTS]	FOS [g/l]	N [mg/kg]	FOS [mg/L]	pH [-]	NH4 [g/kg]	i-Valeriansr. [mg/l]	-	Essigsr. [g/l]
ADL [g/kg oTS] [g/kg oTS]	FOS/CaCO3 [-]	TAC [g/l]	FOS/TAC [-]	Leitfähigkeit [mS/cm]	ADF [g/kgTS]	HAc [mg/l]	-	Propionsr. [g/l]
-	Essigsr. [mg/kgOS]	FOS [g/l]	ADF [g/kgTS]	TAC [mg/L]	NDF [g/kgTS]	N [g/l FM]	-	i-Buttersr. [g/l]
-	Propionsr. [mg/kgOS]	FOS/TAC [-]	NDF [g/kgTS]	FOS [mg/L]	ADL [g/kgTS]	-	-	n-Buttersr. [g/l]
-	i-Buttersr. [mg/kgOS]	Ethanol [g/l]	ADL [g/kgTS]	FOS/TAC [-]	-	-	-	i-Valeriansr. [g/l]
-	n-Buttersr. [mg/kgOS]	Propanol [g/l]	-	-	-	-	-	n-Valeriansr. [g/l]
-	i-Valeriansr. [mg/kgOS]	Essigsr. [g/l]	-	-	-	-	-	Capronsr. [g/l]
-	n-Valeriansr. [mg/kgOS]	Propi-onsr. [g/l]	-	-	-	-	-	Säuren ges. [g/l]
-	Hexansr. [mg/kg OS]	i-Buttersr. [g/l]	-	-	-	-	-	Rohfett [%]

Neumann (02)	*Erchinger (03)*	*Eckel (04)*	*Kuhls (05)*	*Meyer-H. (06)*	*Schwenker (07)*	*Demes (08)*	*Bürger (09)*	*Fuest (10)*
-	-	n-Buttersr. [g/l]	-	-	-	-	-	Rohfett [% TM]
-	-	i-Valeriansr. [g/l]	-	-	-	-	-	Rohfaser [%]
-	-	n-Valeriansr. [g/l]	-	-	-	-	-	Rohfaser [% TM]
-	-	Capronsr. [g/l]	-	-	-	-	-	ADF [% TM]
-	-	Säuren ges. [g/l]	-	-	-	-	-	ADL [% TM]
-	-	Rohfett [% TM]	-	-	-	-	-	-
-	-	Rohfaser [% TM]	-	-	-	-	-	-
-	-	NDF [% TM]	-	-	-	-	-	-
-	-	ADF [% TM]	-	-	-	-	-	-
-	-	ADL [% TM]	-	-	-	-	-	-
-	-	N [% TM]	-	-	-	-	-	-
-	-	C [% TM]	-	-	-	-	-	-
-	-	C/N [-]	-	-	-	-	-	-
-	-	S [% TM]	-	-	-	-	-	-
-	-	H [% TM]	-	-	-	-	-	-
-	-	P [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-
-	-	Zucker [% TM]	-	-	-	-	-	-
-	-	B [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-
-	-	Ca [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-
-	-	Cd [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-
-	-	Cu [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-
-	-	Fe [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-
-	-	K [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-
-	-	Mn [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-
-	-	Na [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-
-	-	P [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-
-	-	Pb [mg/kg FM]	-	-	-	-	-	-

Tabelle 12: Messdaten der BGA 02 bis 10.

BGA (NR.)	*Zeitraum*	*Quelle*	*Anzahl der Mess-punkte*
Neumann (02)	Mai – Juni 2012 -	HF, Hydrolyse	18
Erchinger (03)	Juli 2011 Februar - Mai 2012	HF, NF	34
Eckel (04)	Juli 2011 Februar – Mai 2012	HF, NF	38
Kuhls (05)	Juli 2011 Februar – Mai 2012	HF 2, HF 1, NF	33
Meyer-H. (06)	Juli 2011 Februar – Mai 2012	HF, Methan-Stufe, NF	42
Schwenker (07)	Juli 2011 Februar – Mai 2012	HF, NF	24
Demes (08)	Juli 2011 Februar – Mai 2012	HF, NF	26
Bürger (09)	Juli 2011 Februar – Mai 2012	HF	18
Fuest (10)	Juli 2011 Februar – Mai 2012	HF	17

II.4.3 Kreuzvalidierung der Prozessdaten

Tabelle 13: Prozessgrößen der BGA 02 bis 10.

BGA (Nr.)	Neumann (02)	Erchinger (03)	Eckel (04)	Kuhls (05)	Meyer-H. (06)	Schwenker (07)	Demes (08)	Bürger (09)	Fuest (10)
Zeitraum	Juli 2011; Mai-Okt. 2012	Juli 2011; Feb.-Okt. 2012	Juli 2011; Feb.-Mai 2012	Juli 2011; Feb.-März 2012	Juli 2011; März-Mai 2012	Juli 2011; Feb.-Mai 2012	Juli 2011; Feb.-April 2012	Juli 2011; Feb.-Mai 2012	Juli 2011; Feb.-Mai 2012
Anzahl der Messungen	26	40	17	11	17	20	13	20	21
Quelle	Hydrolyse-Stufe; HF	HF	HF	HF 1 und 2	HF	HF	HF	HF	HF
Prozess-Größen	Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissila-ge	Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissilage
	Roggen-GPS	Roggen-GPS	Roggen-GPS	Geflügelm.	Temp.	Roggen-GPS	Roggen-GPS	Grünroggen	Grassilage
	Gras	Gras	Rind. Gülle	Futter ges.	TS [% FM]	Rindermist	Gras	HTK	Mischgülle
	R. Gülle	Ferkelmist	Rind. Mist	OLR (BGA)	oTS [%TS]	Gülle	Rind.Mist	Gülle	Futter ges.
	Enzyme	Rind. Gülle	Futter ges.	HRT	NDF	Futter ges.	Rind.Gülle	Futter ges.	BR (BGA)
	Futter ges.	Enzym	OLR (BGA)	Temp.	ADF	OLR (BGA)	Futter. ges.	OLR (BGA)	HRT
	BR (BGA02)	Futter ges.	HRT	TS	pH	HRT	HRT	HRT	Temp.
	HRT	BR (BGA)	Temp.	oTS	FOS/TAC	Temp.	Temp.	Temp.	TS [% FM]
	Temp.	BR	TS [% FM]	pH Wert	Essigsr.	TS [% FM]	TS [% FM]	TS [% FM]	oTS [%TS]
	Temp. HF	HRT (BGA)	oTS [%TS]	FOS/TAC	Propionsr.	oTS [%TS]	oTS [%TS]	oTS [%TS]	NDF
	TS [% FM]	HRT	NDF	Essigsr.	n- Buttersr.	pH	pHFOS/TAC	pH	ADF
	oTS [%TS]	Temp.	ADF	Propionsr.	i-Buttersr.	FOS/TAC	Essigsr.	FOS/TAC	ADL
	NDF	TS [% FM]	ADL	n- Buttersr.	n-Valsr.	Essigsr	Propionsr.	Essigsr.	pH Wert
	ADF	oTS [%TS]	pH	i-Buttersr.	i-Valr.	Propionsr.	n- Buttersr.	Propionsr.	FOS/TAC
	ADL	NDF	FOS/TAC	n-Valsr.	Capronsr.	n- Buttersr.	i-Buttersr.	Säuren ges.	Essigsr.
	pH	ADF	Essigsr.	i-Valsr.	Säuren ges.	i-Buttersr.	i-Valerianr.	NH4-N	Propionsr.
	Essigsr.	ADL	n- Buttersr.	Säuren ges.	NH4-N	n-Valsr.	Säuren ges.		Säuren ges.
	Propionsr.	pH	i-Buttersr.	NH4-N		i-Valsr. [g/l]	NH4-N		NH4-N
	n- Buttersr.	FOS/TAC	n-Valsr.			Hexansr.			
	i-Buttersr.	Essigsr.	i-Valsr.			Säuren ges.			
	n-Valsr.	Propionsr.	Hexansr.			NH4-N			
	i-Valsr.	n- Buttersr.	Säuren ges.						
	Säuren ges.	i-Buttersr.	NH4-N						
	NH4-N	n-Valsr.							
		i-Valsr.							
		Säurenges.							
		NH4-N							

Tabelle 14: Kreuzvalidierung der Prozessdaten von BGA Neumann (02) PLSR und PCR.
PLSR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1,00	0,10	4524,83	4252,91	6,01
2,00	0,14	4417,71	3741,05	15,32
3,00	0,10	4418,57	4390,65	0,63
4,00	0,08	3832,29	4381,78	14,34
5,00	0,07	3700,71	4355,11	17,68
6,00	0,09	3985,00	4228,27	6,10
7,00	0,10	4345,14	4301,54	1,00
8,00	0,13	4579,86	4306,17	5,98
9,00	0,09	4090,71	4269,63	4,37
10,00	0,13	4186,71	4578,19	9,35
11,00	0,10	4422,43	4345,70	1,74
12,00	0,10	4565,71	4389,43	3,86
13,00	0,10	4495,86	4262,61	5,19
14,00	0,10	4627,14	4366,01	5,64
15,00	0,10	4759,86	4349,71	8,62
16,00	0,10	4483,71	4472,05	0,26
17,00	0,11	4127,57	4515,54	9,40
18,00	0,14	3766,67	4521,79	20,05
19,00	0,07	4828,57	4530,85	6,17
20,00	0,12	4471,43	4766,42	6,60
21,00	0,20	5416,67	4210,34	22,27
22,00	0,11	4214,29	4408,34	4,60
23,00	0,10	4257,14	4437,60	4,24
24,00	0,13	4357,14	4619,34	6,02
25,00	0,09	4600,00	4499,88	2,18
26,00	0,16	4728,57	3903,31	17,45

PCR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1,00	0,09	4524,83	4277,40	5,47
2,00	0,13	4417,71	3746,85	15,19
3,00	0,08	4418,57	4335,47	1,88
4,00	0,06	3832,29	4366,19	13,93
5,00	0,06	3700,71	4366,19	17,98
6,00	0,06	3985,00	4355,19	9,29
7,00	0,08	4345,14	4356,55	0,26
8,00	0,08	4579,86	4363,18	4,73
9,00	0,07	4090,71	4345,08	6,22
10,00	0,07	4186,71	4369,62	4,37
11,00	0,08	4422,43	4364,51	1,31
12,00	0,08	4565,71	4401,85	3,59
13,00	0,08	4495,86	4305,34	4,24
14,00	0,08	4627,14	4353,86	5,91
15,00	0,08	4759,86	4352,93	8,55
16,00	0,08	4483,71	4412,48	1,59
17,00	0,09	4127,57	4460,67	8,07
18,00	0,11	3766,67	4475,53	18,82
19,00	0,04	4828,57	4438,17	8,09
20,00	0,09	4471,43	4792,44	7,18
21,00	0,15	5416,67	4271,54	21,14
22,00	0,08	4214,29	4396,57	4,33
23,00	0,08	4257,14	4445,89	4,43
24,00	0,09	4357,14	4705,45	7,99
25,00	0,07	4600,00	4471,65	2,79
26,00	0,10	4728,57	4227,28	10,60

Tabelle 15: Kreuzvalidierung der Prozessdaten von BGA Erchinger (03) PLSR und PCR.
PLSR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,73	1907,14	2813,00	47,50
2	0,70	1541,43	2268,79	47,19
3	0,66	629,29	1887,69	199,97
4	0,67	1455,57	1889,98	29,84
5	0,40	3000,00	2917,51	23,00
6	0,67	2275,86	2019,46	11,27
7	0,68	2435,86	2064,22	15,26
8	0,67	2342,29	2054,24	12,30
9	0,68	2426,86	1951,00	19,61
10	0,67	2265,57	1967,76	13,15
11	0,68	2611,71	2165,48	17,09
12	0,67	2340,14	2148,21	8,20
13	0,68	2500,43	2104,22	15,85
14	0,68	2352,86	1874,77	20,32
15	0,67	2306,14	2117,31	8,19
16	0,67	2318,29	2098,32	9,49
17	0,67	2299,57	2030,23	11,71
18	0,67	2248,29	2166,74	3,63
19	0,68	1711,29	2249,97	31,48
20	0,67	1876,00	2078,56	10,80
21	0,67	1951,57	2176,58	11,53
22	0,67	2024,29	2034,63	0,51
23	0,68	2264,29	1894,19	16,35
24	0,67	2241,71	2415,39	7,75
25	0,66	2306,29	2316,29	0,43
26	0,67	2085,71	2350,98	12,72
27	0,67	2375,43	2267,62	4,54
28	0,67	2294,00	2327,98	1,48
29	0,67	2188,57	2329,86	6,46
30	0,67	2228,14	2235,92	0,35
31	0,67	2168,14	2277,54	5,05
32	0,67	2522,86	2241,00	11,17
33	0,67	2379,43	2222,00	6,62
34	0,67	2164,29	2230,54	3,06
35	0,67	2017,00	2300,13	14,04
36	0,67	2224,57	2374,48	6,74
37	0,66	2415,86	2309,48	4,40
38	0,66	2432,57	2345,44	3,58
39	0,67	2276,71	2371,51	4,16
40	0,67	2171,29	2349,40	8,20

PCR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,40	1907,14	2629,89	37,90
2	0,37	1541,43	2120,57	37,57
3	0,59	629,29	2413,03	283,46
4	0,39	1455,57	2192,86	50,65
5	0,31	0,00	3074,81	Inf
6	0,36	2275,86	2305,14	1,29
7	0,36	2435,86	2155,69	11,50
8	0,36	2342,29	2142,49	8,53
9	0,36	2426,86	2150,61	11,38
10	0,36	2265,57	2320,37	2,42
11	0,36	2611,71	2136,68	18,19
12	0,36	2340,14	2143,38	8,41
13	0,36	2500,43	2162,30	13,52
14	0,36	2352,86	2062,17	12,35
15	0,36	2306,14	2150,29	6,76
16	0,36	2318,29	2151,72	7,18
17	0,36	2299,57	2171,01	5,59
18	0,37	2248,29	2382,70	5,98
19	0,39	1711,29	2346,05	37,09
20	0,36	1876,00	2167,22	15,52
21	0,37	1951,57	2297,27	17,71
22	0,36	2024,29	2166,03	7,00
23	0,36	2264,29	2185,60	3,48
24	0,35	2241,71	2196,60	2,01
25	0,40	2306,29	1817,26	21,20
26	0,36	2085,71	2165,51	3,83
27	0,36	2375,43	2182,67	8,11
28	0,36	2294,00	2040,24	11,06
29	0,36	2188,57	2070,36	5,40
30	0,36	2228,14	2037,76	8,54
31	0,36	2168,14	2046,80	5,60
32	0,36	2522,86	2162,40	14,29
33	0,37	2379,43	2052,29	13,75
34	0,36	2164,29	2035,20	5,96
35	0,36	2017,00	2022,00	0,25
36	0,36	2224,57	2199,19	1,14
37	0,37	2415,86	2016,88	16,51
38	0,37	2432,57	2020,17	16,95
39	0,36	2276,71	2057,21	9,64
40	0,36	2171,29	2176,79	0,25

Tabelle 16: Kreuzvalidierung der Prozessdaten von BGA Eckel (04), PLSR und PCR.
PLSR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,54	5644,43	5180,46	8,22
2	0,46	5183,29	5637,16	8,76
3	0,50	5352,29	5615,40	4,92
4	0,39	5196,14	5440,51	4,70
5	0,44	5505,86	5366,53	2,53
6	0,41	5741,71	5439,37	5,27
7	0,39	5573,57	5518,41	0,99
8	0,47	5506,71	5818,41	5,66
9	0,47	5495,57	5271,63	4,08
10	0,31	5163,43	5496,47	6,45
11	0,46	5617,71	5368,01	4,44
12	0,42	5536,00	5556,78	0,38
13	0,40	5579,57	5499,37	1,44
14	0,40	5512,14	5462,16	0,91
15	0,42	5614,00	5453,64	2,86
16	0,38	5615,43	5642,10	0,48
17	0,52	5374,57	5683,60	5,75

PCR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,27	5644,43	5217,66	7,56
2	0,25	5183,29	5600,85	8,06
3	0,15	5352,29	5489,41	2,56
4	0,12	5196,14	5485,02	5,56
5	0,15	5505,86	5424,81	1,47
6	0,26	5741,71	5397,04	6,00
7	0,16	5573,57	5441,35	2,37
8	0,22	5506,71	5595,75	1,62
9	0,12	5495,57	5485,59	0,18
10	0,06	5163,43	5491,08	6,35
11	0,16	5617,71	5434,94	3,25
12	0,16	5536,00	5342,72	3,49
13	0,14	5579,57	5508,86	1,27
14	0,16	5512,14	5426,24	1,56
15	0,13	5614,00	5569,84	0,79
16	0,12	5615,43	5532,93	1,47
17	0,18	5374,57	5579,36	3,81

Tabelle 17: Kreuzvalidierung der Prozessdaten von BGA Kuhls (05), PLSR und PCR.
PLSR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,95	5031,33	5949,95	18,26
2	0,93	5252,14	5431,42	3,41
3	0,91	5050,29	5091,76	0,82
4	0,93	5186,43	4600,61	11,30
5	0,94	6605,00	7348,07	11,25
6	0,98	7548,71	9010,77	19,37
7	0,96	8006,29	7974,57	0,40
8	0,92	7844,14	7690,81	1,95
9	0,93	7499,75	7448,57	0,68
10	0,94	7904,57	7171,51	9,27
11	0,96	8140,43	7040,72	13,51

PCR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,91	5031,33	6605,03	31,28
2	0,86	5252,14	6250,84	19,01
3	0,89	5050,29	5077,54	0,54
4	0,90	5186,43	4728,62	8,83
5	0,91	6605,00	6837,03	3,51
6	0,88	7548,71	7864,45	4,18
7	0,89	8006,29	8828,75	10,27
8	0,90	7844,14	7595,29	3,17
9	0,89	7499,75	7627,37	1,70
10	0,91	7904,57	7254,37	8,23
11	0,95	8140,43	6957,65	14,53

Tabelle 18: Kreuzvalidierung der Prozessdaten von BGA Meyer-H. (06), PLSR und PCR.
PLSR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Ziel-größe [m^3/d]	Biogas/d vorher-gesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,90	2170,71	2218,76	2,21
2	0,92	2352,00	2343,05	0,38
3	0,96	2613,29	2288,06	12,45
4	0,93	2307,43	2555,86	10,77
5	0,93	2780,29	2944,18	5,89
6	0,93	2776,57	2838,33	2,22
7	0,93	2978,43	2885,43	3,12
8	0,93	2853,43	2936,94	2,93
9	0,95	2836,86	3000,82	5,78
10	0,93	3062,71	2909,91	4,99
11	0,93	3007,86	2935,34	2,41
12	0,93	2997,29	2940,11	1,91
13	0,93	2975,43	2896,77	2,64
14	0,94	2748,86	2955,36	7,51
15	0,92	3129,86	3089,37	1,29
16	0,94	3082,86	2980,06	3,33
17	0,93	3111,40	3296,75	5,96

PCR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,84	2170,71	2420,33	11,50
2	0,86	2352,00	2337,28	0,63
3	0,94	2613,29	2238,47	14,34
4	0,87	2307,43	2488,62	7,85
5	0,88	2780,29	2798,37	0,65
6	0,89	2776,57	2766,63	0,36
7	0,88	2978,43	2899,67	2,64
8	0,88	2853,43	2937,28	2,94
9	0,92	2836,86	3026,63	6,69
10	0,89	3062,71	2927,97	4,40
11	0,88	3007,86	3002,71	0,17
12	0,89	2997,29	3106,99	3,66
13	0,88	2975,43	2974,62	0,03
14	0,90	2748,86	2903,35	5,62
15	0,88	3129,86	3021,02	3,48
16	0,89	3082,86	2948,72	4,35
17	0,86	3111,40	2984,69	4,07

Tabelle 19: Kreuzvalidierung der Prozessdaten von BGA Schwenker (07), PLSR und PCR.
PLSR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Ziel-größe [m^3/d]	Biogas/d vorher-gesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,88	2716,90	2642,03	2,76
2	0,89	1825,94	2817,41	54,30
3	0,88	2745,62	2696,93	1,77
4	0,88	2648,78	2840,02	7,22
5	0,88	2112,21	394,42	81,33
6	0,89	3146,19	2806,97	10,78
7	0,89	3907,28	4213,75	7,84
8	0,88	4933,79	5141,82	4,22
9	0,89	4655,92	4367,82	6,19
10	0,88	5005,92	4828,99	3,53
11	0,89	4931,95	4192,56	14,99
12	0,93	2466,99	4013,83	62,70
13	0,89	3972,69	3822,90	3,77
14	0,94	5641,58	4191,53	25,70
15	0,89	5176,65	5771,81	11,50
16	0,89	4970,52	6242,65	25,59
17	0,88	5453,51	5199,14	4,66
18	0,88	5237,66	5296,24	1,12
19	0,87	5374,85	6221,45	15,75
20	0,85	5431,21	5355,25	1,40

PCR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,85	2716,90	2675,19	1,54
2	0,86	1825,94	2797,65	53,22
3	0,85	2745,62	2700,09	1,66
4	0,85	2648,78	2827,68	6,75
5	0,87	2112,21	452,24	78,59
6	0,86	3146,19	2890,95	8,11
7	0,86	3907,28	4115,85	5,34
8	0,86	4933,79	4908,55	0,51
9	0,86	4655,92	4263,52	8,43
10	0,86	5005,92	4761,16	4,89
11	0,87	4931,95	4229,47	14,24
12	0,90	2466,99	3912,15	58,58
13	0,86	3972,69	4011,62	0,98
14	0,90	5641,58	4244,52	24,76
15	0,85	5176,65	5178,04	0,03
16	0,88	4970,52	6486,74	30,50
17	0,85	5453,51	5230,75	4,08
18	0,86	5237,66	5644,79	7,77
19	0,87	5374,85	6221,45	15,75
20	0,85	5431,21	5355,25	1,40

Tabelle 20: Kreuzvalidierung der Prozessdaten von BGA Demes (08), PLSR und PCR.
PLSR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,39	6205,71	6149,17	0,91
2	0,40	6198,86	6266,56	1,09
3	0,42	6116,64	6069,40	0,77
4	0,53	5890,35	6891,96	17,00
5	0,43	5642,44	5975,24	5,90
6	0,40	5671,62	5581,34	1,59
7	0,43	5678,35	5609,35	1,22
8	0,42	6065,16	6020,40	0,74
9	0,42	6094,10	6153,65	0,98
10	0,49	6152,60	5782,79	6,01
11	0,97	5184,28	6148,34	18,60
12	0,47	6072,06	5769,47	4,98
13	0,47	6217,54	5905,42	5,02

PCR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,36	6205,71	6109,62	1,55
2	0,37	6198,86	6245,27	0,75
3	0,39	6116,64	6055,25	1,00
4	0,42	5890,35	6380,41	8,32
5	0,37	5642,44	5854,80	3,76
6	0,36	5671,62	5628,59	0,76
7	0,37	5678,35	5587,89	1,59
8	0,39	6065,16	5956,07	1,80
9	0,40	6094,10	6113,58	0,32
10	0,42	6152,60	5890,28	4,26
11	0,97	5184,28	6151,65	18,66
12	0,45	6072,06	5801,53	4,46
13	0,44	6217,54	5899,14	5,12

Tabelle 21: Kreuzvalidierung der Prozessdaten von BGA Bürger (09), PLSR und PCR.
PLSR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Ziel-größe [m^3/d]	Biogas/d vorher-gesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,56	6000,00	6483,54	8,06
2	0,49	6100,00	6158,37	0,96
3	0,51	6150,00	5970,82	2,91
4	0,52	6170,00	5986,62	2,97
5	0,64	6204,71	6711,14	8,16
6	0,52	6342,71	6466,68	1,95
7	0,54	6437,43	6321,98	1,79
8	0,55	6333,00	6701,15	5,81
9	0,58	6211,29	6510,81	4,82
10	0,54	6594,86	6491,91	1,56
11	0,55	6338,14	6513,63	2,77
12	0,53	6525,00	6536,03	0,17
13	0,54	6570,86	6365,20	3,13
14	0,52	6538,29	6461,38	1,18
15	0,54	6558,86	6371,37	2,86
16	0,60	6292,43	6570,81	4,42
17	0,53	6552,43	6514,70	0,58
18	0,52	6622,14	6486,98	2,04
19	0,56	6611,00	6206,51	6,12
20	0,57	6845,43	6392,01	6,62

PCR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,35	6000,00	6239,78	4,00
2	0,35	6100,00	6168,29	1,12
3	0,37	6150,00	6122,67	0,44
4	0,38	6170,00	6094,46	1,22
5	0,57	6204,71	6691,28	7,84
6	0,42	6342,71	6414,75	1,14
7	0,42	6437,43	6398,01	0,61
8	0,46	6333,00	6526,44	3,05
9	0,45	6211,29	6460,42	4,01
10	0,41	6594,86	6459,23	2,06
11	0,46	6338,14	6542,16	3,22
12	0,41	6525,00	6457,75	1,03
13	0,42	6570,86	6454,95	1,76
14	0,41	6538,29	6459,63	1,20
15	0,46	6558,86	6273,68	4,35
16	0,46	6292,43	6512,30	3,49
17	0,41	6552,43	6450,24	1,56
18	0,42	6622,14	6436,40	2,80
19	0,40	6611,00	6432,53	2,70
20	0,48	6845,43	6413,77	6,31

Tabelle 22: Kreuzvalidierung der Prozessdaten von BGA Fuest (10), PLSR und PCR.
PLSR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Ziel-größe [m^3/d]	Biogas/d vorher-gesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,26	2671,17	2678,21	0,26
2	0,27	2654,64	2675,59	0,79
3	0,26	2660,57	2666,18	0,21
4	0,26	2649,09	2655,91	0,26
5	0,31	2671,02	2594,88	2,85
6	0,32	2679,05	2592,74	3,22
7	0,27	2681,24	2634,32	1,75
8	0,32	2527,37	2651,69	4,92
9	0,26	2620,21	2641,02	0,79
10	0,27	2625,00	2640,62	0,60
11	0,27	2596,85	2646,94	1,93
12	0,42	2600,30	2745,58	5,59
13	0,27	2636,35	2623,52	0,49
14	0,29	2647,42	2579,07	2,58
15	0,31	2709,62	2565,02	5,34
16	0,27	2690,14	2620,60	2,58
17	0,30	2421,66	2707,53	11,80
18	0,28	2649,67	2604,08	1,72
19	0,29	2570,39	2649,43	3,08
20	0,30	2682,27	2600,19	3,06
21	0,32	2659,96	2554,36	3,97

PCR:

Leave- one-out Nr.	R^2	Mittelwert Zielgröße [m^3/d]	Biogas/d vorhergesagt [m^3/d]	RMSECV [%]
1	0,07	2671,17	2629,63	1,55
2	0,10	2654,64	2660,86	0,23
3	0,09	2660,57	2643,02	0,66
4	0,11	2649,09	2672,23	0,87
5	0,11	2671,02	2615,17	2,09
6	0,14	2679,05	2644,65	1,28
7	0,10	2681,24	2632,10	1,83
8	0,16	2527,37	2653,79	5,00
9	0,11	2620,21	2647,43	1,04
10	0,10	2625,00	2620,08	0,19
11	0,12	2596,85	2650,06	2,05
12	0,08	2600,30	2642,99	1,64
13	0,11	2636,35	2615,96	0,77
14	0,08	2647,42	2626,20	0,80
15	0,18	2709,62	2611,45	3,62
16	0,16	2690,14	2600,04	3,35
17	0,05	2421,66	2643,27	9,15
18	0,13	2649,67	2608,48	1,55
19	0,13	2570,39	2613,95	1,69
20	0,19	2682,27	2590,42	3,42
21	0,13	2659,96	2575,40	3,18

II.4.4 Implementierung eines Optimierungsalgorithmus

Tabelle 23: Prozessgrößen der BGA 02 bis 10 (Daten Dezember 2013).

BGA (Nr.)	Neumann (02)	Erchinger (03)	Eckel (04)	Kuhls (05)	Meyer-H. (06)	Schwenker (07)	Demes (08)	Bürger (09)	Fuest (10)
Zeitraum	Juli 2011; Mai-Okt. 2012	Juli 2011; Feb.-Okt. 2012	Juli 2011; Feb.-Mai 2012	Juli 2011; Feb.-März 2012	Juli 2011; März-Mai 2012	Juli 2011; Feb.-Mai 2012	Juli 2011; Feb.-April 2012	Juli 2011; Feb.-Mai 2012	Juli 2011; Feb.-Mai 2012
Anzahl der Messungen	26	40	17	11	17	20	13	20	21
Quelle	Hydrolyse-Stufe; HF	HF	HF	HF 1 und 2	HF	HF	HF	HF	HF
Prozess-Größen	Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissilage	Maissilage
	Roggen-GPS	Roggen-GPS	Roggen-GPS	Geflügelm.	Temp.	Roggen-GPS	Roggen-GPS	Grünroggen	Grassilage
	Gras	Gras	Rind. Gülle	Futter ges.	TS [% FM]	Rindermist	Gras	HTK	Mischgülle
	R. Gülle	Ferkelmist	Rind. Mist	OLR (BGA)	oTS [%TS]	Gülle	Rind. Mist	Gülle	Futter ges.
	Enzyme	Rind. Gülle	Futter ges.	HRT	NDF	Futter ges.	Rind.Gülle	Futter ges.	BR (BGA)
	Futter ges.	Enzym	OLR (BGA)	Temp.	ADF	OLR (BGA)	Futter. ges.	OLR (BGA)	HRT
	BR (BGA02)	Futter ges.	HRT	TS	pH	HRT	HRT	HRT	Temp.
	HRT	BR (BGA)	Temp.	oTS	FOS/TAC	Temp.	Temp.	Temp.	TS [% FM]
	Temp.	BR	TS [% FM]	pH Wert	Essigsr.	TS [% FM]	TS [% FM]	TS [% FM]	oTS [%TS]
	Temp. HF	HRT(BGA)	oTS [%TS]	FOS/TAC	Propionsr.	oTS [%TS]	oTS [%TS]	oTS [%TS]	NDF
	TS[% FM]	HRT	NDF	Essigsr.	n- Buttersr.	pH	pHFOS/TAC	pH	ADF
	oTS [% TS]	Temp.	ADF	Propionsr.	i-Buttersr.	FOS/TAC	Essigsr.	FOS/TAC	ADL
	NDF	TS [% FM]	ADL	n- Buttersr.	n-Valsr.	Essigsr	Propionsr.	Essigsr.	pH Wert
	ADF	oTS [%TS]	pH	i -Buttersr.	i-Valr.	Propionsr.	n- Buttersr.	Propionsr.	FOS/TAC
	ADL	NDF	FOS/TAC	n-Valsr.	Capronsr.	n- Buttersr.	i-Buttersr.	Säuren ges.	Essigsr.
	pH	ADF	Essigsr.	i -Valsr.	Säuren ges.	i-Buttersr.	i-Valerianr.	NH4-N	Propionsr.
	Essigsr.	ADL	n- Buttersr.	Säuren ges.	NH4-N	n-Valsr.	Säuren ges.		Säuren ges.
	Propionsr.	pH	i-Buttersr.	NH4-N		i-Valsr. [g/l]	NH4-N		NH4-N
	n- Buttersr.	FOS/TAC	n-Valsr.			Hexansr.			
	i-Buttersr.	Essigsr.	i-Valsr.			Säuren ges.			
	n-Valsr.	Propionsr.	Hexansr.			NH4-N			
	i-Valsr.	n- Buttersr.	Säuren. ges.						
	Säuren ges.	i-Buttersr.	NH4-N						
	NH4-N	n-Valsr.							
		i-Valsr.							
		Säuren ges.							
		NH4-N							

Tabelle 24: Prozessdaten der BGA 02 bis 10.

BGA (NR.)	*Zeitraum*	*Quelle*	*Anzahl der Mess-punkte*
Neumann (02)	April- Oktober 2012	Hydrolyse	26
	-		
Erchinger (03)	Juli 2011	HF	40
	Februar - Oktober 2012		
Eckel (04)	Juli 2011	HF	17
	Februar – Mai 2012		
Kuhls (05)	Juli 2011	HF 2, HF 1	11
	Februar – März 2012		
Meyer-H. (06)	Juli 2011	HF	17
	Februar – Juni 2012		
Schwenker (07)	Juli 2011	HF	18
	Februar – Mai 2012		
Demes (08)	Juli 2011	HF	13
	Februar – April 2012		
Bürger (09)	Juli 2011	HF	20
	Februar – Mai 2012		
Fuest (10)	Juli 2011	HF	21
	Februar – Mai 2012		

Verzeichnis der Abkürzungen

ACO: Ant Colony Optimisation

ADF [g/kg oTS]: Säure-Detergenz-Faser

ADL [g/kg oTS]: Säure-Detergenz-Lignin

BGA: Biogasanlage

BR [kg oTS/d]: Raumbelastung eines Fermenters

C [% TS]: Kohlenstoff

C/N [-]: Verhältnis zwischen Kohlenstoff- und Stickstoffanteil

Cov (X_i,Y_j): Kovarianz der Messwerte X_i und Y_j

CV: Kreuzvalideirung

E: Residuenmatrix

EL: Endlager

FOS [mg/l]: flüchtige organische Säuren

H [% TS]: Wasserstoff

HAc [g/kg TS]: Wasserstoffacetat oder Essigsäure

HF: Hauptfermenter

HRT [d]: Hydraulic retention time (hydraulische Verweilzeit)

Korr (X_i,Y_j): Korrelationskoeffizient von X_i und Y_j

N [% TM]: Stickstoff

NDF [g/kg oTS]: Neutral-Detergenz-Faser

NF: Nachvermenter

NH_4 –N [g/kg TS]: Ammoniakanteil aus dem gesamten Stickstoffgehalt

OLR [kg oTS/d]: Organic Loading Rate

oTS [% TS]: organische Trockensubstanz

P [% TS]: Phosphor

P^T: eine transponierte Loadingsmatrix

pH-Wert [-]: der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität

PCR: Principal Component Regression (Hauptkomponentenregression)

PG: Prozessgröße

PLSR: Partial least squares regression

R^2 [-]: Bestimmtheitsmaß

RMSE: Wurzel aus mittlerem quadratischem Fehler

RMSEC: Wurzel aus mittlerem quadratischem Fehler für die Kalibration

RMSECV: Wurzel aus mittlerem quadratischem Fehler für die Kreuzvalidierung

RMSEP: Wurzel aus mittlerem quadratischem Fehler für den Test

T: Scorematrix

TAC [mg/l]: Totaler organischer Carbonatpuffer

TS [% FM]: Trockensubstanz

TSP: Traveling sales problem

S [% TS]: Schwefel

Var (X_i): Varianz der Messwerte X_i

W: Gewichtsmatrix

X: Datenmatris aus Messwerten

$X_{i,norm}$: normalisierte X_i Messwerte

X_i: Messwerte zum Zeitpunkt i

$\overline{X}$: *Mittelwert aller X_i Messwerte*

$\sigma(X_i)$: *Standardabweichung der Messwerte X_i*

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schema der Auswertemethodik von chemischen und verfahrenstechnischen Prozessdaten 112
Abbildung 2: Verlauf der chemischen Messdaten der BGA Erchinger (03). 115
Abbildung 3: Verlauf der normalisierten chemischen Messdaten der BGA Erchinger (03). 116
Abbildung 4: Ablauf der Berechnung von der Zielgröße. 117
Abbildung 5: Die Hauptkomponentenanalyse (PCA). 119
Abbildung 6: Unterschied zwischen der PCR- und PLSR- Methoden. 119
Abbildung 7: Schema eines ACO-Algorithmus. 121
Abbildung 8: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Neumann (02), Hydrolyse. 123
Abbildung 9: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Erchinger (03), HF. 124
Abbildung 10: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Eckel (04), HF. 124
Abbildung 11: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Kuhls (05), HF 1. 125
Abbildung 12: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Kuhls (05), HF 2. 125
Abbildung 13: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Meyer-H. (06), HF. 126
Abbildung 14: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Schwenker (07), HF. 127
Abbildung 15: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Demes (08), HF. 127
Abbildung 16: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Bürger (09), HF. 128
Abbildung 17: Korrelation der Biogasausbeute pro Tag mit den Prozessgrößen der BGA Fuest (10), HF. 129
Abbildung 18: RMSEC, RMSEP für PLSR und PCR-Modelle der BGA 02 bis 10. 131
Abbildung 19: R^2 Kalibration, R^2 Test für PLSR und PCR-Modelle der BGA 02 bis 10. 131
Abbildung 20: ACO Ergebnisse der BGA Neumann (02), Hydrolyse. 137
Abbildung 21: ACO Ergebnisse der BGA Erchinger (03), HF. 138
Abbildung 22: ACO Ergebnisse der BGA Eckel (04), HF. 139
Abbildung 23: ACO Ergebnisse der BGA Kuhls (05) HF 1. 140
Abbildung 24: ACO Ergebnisse der BGA Kuhls (05) HF 2. 140
Abbildung 25: ACO Ergebnisse der BGA Meyer-H. (06), HF. 141
Abbildung 26: ACO Ergebnisse der BGA Schwenker (07), HF. 142
Abbildung 27: ACO Ergebnisse der BGA Demes (08), HF. 143

Abbildung 28: ACO Ergebnisse der BGA Bürger (09), HF. 144
Abbildung 29: ACO Ergebnisse der BGA Fuest (10), HF. 145
Abbildung 30: Mit ACO am häufigsten ausgesuchte prozessrelevante Messgrößen der BGA 02 bis 10. 148

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Biogasanlagen 02 bis 10 111
Tabelle 2: Messdaten der Biogasanlagen 02 bis 10. 111
Tabelle 3: Methoden der Messdaten-Vorverarbeitung. 115
Tabelle 4: Methoden der Kreuzvalidierung. 118
Tabelle 5: Modellgrößen. 120
Tabelle 6: Messdaten der BGA 02 bis 10 (Dezember 2013). 122
Tabelle 7: Ergebnisse der Vorhersage der Biogasausbeute pro Tag BGA 2 bis 10 anhand der PCR und PLSR-Modellen. 130
Tabelle 8: Ergebnisse der PCR-Modelle zur Vorhersage der Biogasausbeute pro Tag BGA 02 bis 10. 132
Tabelle 9: Ergebnisse der PLSR-Modelle zur Vorhersage der Biogasausbeute pro Tag BGA 02 bis 10. 133
Tabelle 10: Bestimmung der Ausreißer BGA 02 bis 10. 134
Tabelle 11: Ergebnisse der PLSR Modelle zur Vorhersage der Biogasausbeute pro Tag ohne Ausreißer. 134
Tabelle 12: Ergebnisse der PCR Modelle zur Vorhersage der Biogasausbeute pro Tag ohne Ausreißer. 135
Tabelle 13(a, b): Prozessrelevante Messgrößen BGA 02 bis 10. 146
Tabelle 14: Ergebnisse der PLSR-Modelle BGA Erchinger (03). 149

Verzeichnis der Tabellen im Anhang

Tabelle 1: Korrelation der Prozessgrößen BGA 02 (Neumann), Hydrolyse.....151
Tabelle 2: Korrelation der Prozessgrößen BGA 03 (Erchinger), HF.....152
Tabelle 3: Korrelation der Prozessgrößen BGA 04 (Eckel), HF. 153
Tabelle 4: Korrelation der Prozessgrößen BGA 05 (Kuhls) , HF 1. 154
Tabelle 5: Korrelation der Prozessgrößen BGA 05 (Kuhls), HF 2. 155
Tabelle 6: Korrelation der Prozessgrößen BGA 06 (Meyer-H), HF. 156
Tabelle 7: Korrelation der Prozessgrößen BGA 07 (Schwenker), HF. 157
Tabelle 8: Korrelation der Prozessgrößen BGA 08 (Demes), HF.....158
Tabelle 9: Korrelation der Prozessgrößen BGA 09 (Bürger), HF. 159
Tabelle 10: Korrelation der Prozessgrößen BGA 10 (Fuest), HF. 160
Tabelle 11: Prozessgrößen BGA 02 bis 10. 161
Tabelle 12: Messdaten BGA 02 bis 10. 164
Tabelle 13: Prozessgrößen der BGA 02 bis 10. 165
Tabelle 14: Kreuzvalidierung der Prozessdaten der BGA Neumann (02) PLSR und PCR.....166
Tabelle 15: Kreuzvalidierung der Prozessdaten der BGA Erchinger (03) PLSR und PCR.....168
Tabelle 16: Kreuzvalidierung der Prozessdaten der BGA Eckel (04), PLSR und PCR.....170
Tabelle 17: Kreuzvalidierung der Prozessdaten der BGA Kuhls (05), PLSR und PCR.....171
Tabelle 18: Kreuzvalidierung der Prozessdaten der BGA Meyer-H. (06), PLSR und PCR.....172
Tabelle 19: Kreuzvalidierung der Prozessdaten der BGA Schwenker (07), PLSR und PCR.....174
Tabelle 20: Kreuzvalidierung der Prozessdaten der BGA Demes (08), PLSR und PCR.....176
Tabelle 21: Kreuzvalidierung der Prozessdaten der BGA Bürger (09), PLSR und PCR.....178
Tabelle 22: Kreuzvalidierung der Prozessdaten der BGA Fuest (10), PLSR und PCR.....180
Tabelle 23: Prozessgrößen der BGA 02 bis 10 (Daten Dezember 2013).....182
Tabelle 24: Prozessdaten der BAG 02 bis 10.....183

Quellen

KESSLER W. (2007A): Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik (John Wiley & Sons), S. 6-8.

KESSLER W. (2007B): Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik (John Wiley & Sons), S. 36-40.

KESSLER W. (2007C): Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik (John Wiley & Sons), S. 111-113.

DORIGO M., GAMBARDELLA L.M. (1997): Ant Colonies for the travelling salesman problem. Bio-Systems (43). p. 73-81.

DEUBLEIN D., STEINHAUSER A. (2011): Biogas from Waste and Renewable Resources. The second Edition. (John Wiley & Sons,).

ABU QDAIS H., BANI HANI K., SHATNAWI N. (2009): Modelling and optimisation of biogas production from waste digesters using artificial neural network and genetic algorithm. Resources, Conservation and Recycling.

In der Reihe
Bornimer Agrartechnische Berichte

sind bisher erschienen:

Heft 1	Technik und Verfahren der Landschaftspflege	1992
Heft 2	Beiträge zur Lagerung und Verarbeitung pflanzenbaulicher Produkte	1993
Heft 3	Technik und Verfahren in der Tierhaltung	1993
Heft 4	Technik und Verfahren der Landschaftspflege und für die Verwendung der anfallenden Materialien	1994
Heft 5	Verfahrenstechnik der Aufbereitung, Lagerung und Qualitätserhaltung pflanzlicher Produkte	1994
Heft 6	Biokonversion nachwachsender Rohstoffe und Verfahren für Reststoffbehandlung	1994
Heft 7	Preußische Versuchs- und Forschungsanstalt für Landarbeit und Schlepperprüffeld in Bornim 1927 bis 1945	1995
Heft 8	Qualitätssicherung und Direktvermarktung	1996
Heft 9	Konservierende Bodenbearbeitung auf Sandböden	1996
Heft 10	Anwendung wärme- und strömungstechnischer Grundlagen in der Landwirtschaft	1996
Heft 11	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1996	1996
Heft 12	Aufbereitung und Verwertung organischer Reststoffe im ländlichen Raum	1996
Heft 13	Wege zur Verbesserung der Kartoffelqualität durch Verminderung der mechanischen Beanspruchung	1997
Heft 14	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1997	1997
Heft 15	Technische und ökonomische Aspekte der Nutztierhaltung in großen Beständen	1997
Heft 16	11. Arbeitswissenschaftliches Seminar	1997
Heft 17	Nachwachsende Rohstoffe im Land Brandenburg Stand Aktivitäten und Perspektiven einer zukunftsfähigen und umweltgerechten Entwicklung	1998
Heft 18	Qualität von Agrarprodukten	1998
Heft 19	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1998	1998
Heft 20	Beiträge zur teilflächenspezifischen Bewirtschaftung	1998
Heft 21	Landnutzung im Spiegel der Technikbewertung – Methoden Indikatoren, Fallbeispiele	1998

Heft 22	Kriterien der Nachhaltigkeit in der Verfahrensentwicklung für die Nutztierhaltung	1999
Heft 23	Situation und Trends in der Landtechnik / Erneuerbare Energien in der Landwirtschaft	1999
Heft 24	Institut für Landtechnik der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin 1951 bis 1965	1999
Heft 25	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1999 / 2000	2000
Heft 26	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2001	2001
Heft 27	Approaching Agricultural technology and Economic Development of Central and Eastern Europe	2001
Heft 28	6th International Symposium on Fruit, Nut, and Vegetable Production Engineering	2001
Heft 29	Measurement Systems for Animal Data and their Importance for Herd Management on Dairy Cow Farms	2002
Heft 30	Produktion, Verarbeitung und Anwendung von Naturfasern	2002
Heft 31	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2002	2002
Heft 32	Biogas und Energielandwirtschaft - Potenzial, Nutzung, Grünes Gas™, Ökologie und Ökonomie	2003
Heft 33	Sozioökonomische Aspekte zu Perspektiven des Offenlandmanagements	2003
Heft 34	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2003	2003
Heft 35	Energieholzproduktion in der Landwirtschaft Potenzial, Anbau, Technologie, Ökologie und Ökonomie	2004
Heft 36	High-Tech Innovationen für Verfahrensketten der Agrarproduktion. Statusseminar 2003	2004
Heft 37	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2004	2004
Heft 38	Die Landmaschinenprüfung in der DDR 1951-1991 und ihre Vorgeschichte	2004
Heft 39	Energieverlust und Schimmelpilzentwicklung bei der Lagerung von Feldholz-Hackgut	2005
Heft 40	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2005	2005
Heft 41	Demonstration der Langzeitwirkung bedarfsorientierter Fungizidbehandlung mit dem CROP-Meter	2005
Heft 42	Biochemicals and Energy from Sustainable Utilization of herbaceous Biomass (BESUB)	2005

Heft 43	Ozontes Waschwasser zur Qualitätssicherung leichtverderblicher Produkte - Entwicklung einer *Fuzzy-Logic*-Steuerung des Waschprozesses	2005
Heft 44	Messsystem zur Bewertung des Unkrautvorkommens	2005
Heft 45	Anwendung der Thermographie zur Optimierung der Belüftungssteuerung bei der Lagerhaltung landwirtschaftlicher Produkte	2005
Heft 46	Membranbioreaktor zur Aufbereitung von Schlachthofabwässern Prozesssteuerung von Biogasanlagen mit Kofermentation	2005
Heft 47	Verschleißeinfluss auf das Förderverhalten von Drehkolbenpumpen	2005
Heft 48	Qualitätserhaltung und Qualitätssicherung von Bioobst und Biogemüse in der Nachernte	2005
Heft 49	Miniaturisiertes Datenerfassungs-System zum Implantieren in Früchte und zur Messung ihrer mechanischen Belastung durch Ernte- und Nachernteverfahren	2005
Heft 50	Prozesskontrolle der Qualität von frischem Obst und Gemüse mit Hilfe eines Multigas-Sensors	2005
Heft 51	Entwicklung eines Echtzeitsensors für die Stärkebestimmung bei Kartoffeln als funktionaler Bestandteil eines optoelektronischen Verleseautomaten	2005
Heft 52	Optimierte Steuerung von Getreide-Schachttrocknern	2005
Heft 53	Möglichkeiten und Grenzen der energetischen Nutzung von Rizinusöl	2005
Heft 54	Non-Destructive Methods for Detecting Health-Promoting Compounds COST Action 924 Working Group Meeting	2005
Heft 55	4^{th} IFAC / CIGR Workshop Control Applications in Post - Harvest and Processing Technology (CAPPT 2006) 26th - 29th March 2006, Potsdam, GERMANY	2006
Heft 56	Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2006	2006
Heft 57	Kontrolle der Frische in der Nacherntekette von Ökogemüse	2006
Heft 58	Entwicklung eines innovativen Dekontaminationsverfahrens als Technologieantwort auf zukünftiges Qualitätsmanagement im Nacherntebereich	2006
Heft 59	Experimental Studies and Mathematical Modelling of Solar Drying System for Production of High Quality Dried Tomato	2007
Heft 60	13. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft & 4. Workshop Precision Farming	2007

Heft 61	Energiepflanzen im Aufwind Wissenschaftliche Ergebnisse und praktische Erfahrungen zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz	2007
Heft 62	14. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft	2008
Heft 63	Experten-Workshop Lagerung von Holzhackschnitzeln	2008
Heft 64	Postharvest unlimited 2008	2008
Heft 65	Vom Agrarrohstoff zu neuen Produkten – Verfahrens-technische Forschung im Nacherntebereich	2009
Heft 66	16. Arbeitswissenschaftliches Kolloquium des VDI-MEG Arbeitskreises Arbeitswissenschaften im Landbau	2009
Heft 67	Monitoring der methanbildenden Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen im ländlichen Raum: Analyse des Ist-Zustandes und Entwicklung eines quantitativen Nachweis-systems	2009
Heft 68	Wieviel Biogas steckt in Pflanzen? Abschluss- Symposium des "Biogas-Crops-Network" (BCN) 7. Mai 2009 Potsdam	2009
Heft 69	Image Analysis for Agricultural Products and Processes 27 to 28. Aug. 2009 Potsdam	2009
Heft 70	5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management 31. Aug. to 02. Sept. 2009 Potsdam	2009
Heft 71	Einsatz von Biogas in PEM-Brennstoffzellen	2009
Heft 72	Teilflächenspezifische Grunddüngung	2009
Heft 73	16. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 04. Mai 2010 Braunschweig	2010
Heft 74	Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien *-Prozesskette Getreide-*	2010
Heft 75	Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien *-Prozesskette pflanzliche Frischeprodukte-*	2010
Heft 76	International Workshop The future of the quarter individual milking 14. – 15. September 2010 Potsdam	2010
Heft 77	A flow cytometric approach to monitor the effects of gentle preservation techniques in the postharvest chain	2011
Heft 78	17. und 18. Workshop Computer-Bildanalyse in der Land-wirtschaft 05. Mai 2011 Stuttgart und 09. Mai 2012 Osnabrück	2012

Heft 79	2. Öffentliches Symposium des „BCN“ BiogasPOTENZIALE Erkennen, Erforschen, Erwirtschaften	2012
Heft 80	Mechanisms of Bacillus spore germination and inactivation during high pressure processing	2013
Heft 81	19. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 2. Workshop Unbemannte autonom fliegende Systeme in der Landwirtschaft 06. – 07. Mai 2013 Berlin	2013
Heft 82	3rd Global Workshop on Proximal Soil Sensing	2013
Heft 83	19. Arbeitswissenschaftliches Kolloquium des VDI-MEG Arbeitskreises Arbeitswissenschaften im Landbau 11. – 12. März 2014 Dresden	2014
Heft 84	Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen Schlussbericht zum Forschungsverbund BIOGAS-BIOCOENOSIS	2014

Interessenten wenden sich an:

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.
Max-Eyth-Allee 100
14469 Potsdam

Tel.: (0331) 5699-820
Fax.: (0331) 5699-849
E-Mail: atb@atb-potsdam.de

Schutzgebühr: 13,- €