

Schlussbericht

(gemäß BNBest-BMBF 98 (Stand: April 2006))

Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Schmitz-Streit)	Förderkennzeichen: 03SF0421B
Vorhabenbezeichnung: Analyse der prokaryotischen Populationsdynamik und Expressionsmuster in Biogasanlagen	
Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2012 – 30.6.2016, nach bereits bewilligter kostenneutraler Verlängerung	



Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren

I. Kurzdarstellung

1. Aufgabenstellung

Die Biogasproduktion ist ein mikrobiologischer Prozess, der mit den geeigneten verfahrenstechnischen Maßnahmen nutzbare Energieträger liefert. Optimierungen des Prozesses betreffen daher nicht nur die Verfahrenstechnik, sondern insbesondere auch die mikrobiologischen Prozesse bei der schrittweisen Umsetzung der Substrate von der Hydrolyse der Ausgangsstoffe (tierische und pflanzliche Polymere) bis hin zur Methanbildung im Zuge des anaeroben Abbaus. Im Mittelpunkt des geplanten Konsortiums stand daher die Gesamterfassung von biochemischen, metagenomischen und metatranskriptomischen Parametern in Biogasanlagen und deren Korrelation zur Produktionseffizienz.

Mit dem Ziel der Prozessoptimierung erfolgten eine umfassende Charakterisierung der mikrobiellen Zusammensetzung, sowie die Analyse der Expressionsprofile von Genen, welche die Schlüsselenzyme der Stoffwechselabläufe bei der biologischen Umwandlung von Polymeren zu Methan kodieren. Die so erstellte Quantifizierung der Genexpression mittels Metagenom- bzw. Metatranskriptomanalysen in Kombination mit den erfolgten biochemischen Messungen der weiteren Partner innerhalb des Verbundprojektes komplettierte die ganzheitliche Betrachtung der untersuchten Biogasanlagen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Forschungsarbeiten wurden im Institut für Allgemeine Mikrobiologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Zu Beginn des Projekts waren die mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden zur Bearbeitung der Fragestellung bereits teilweise in einem voll ausgestatteten Labor etabliert. Durch Neuanschaffungen im Rahmen des Projektes (quantitatives PCR-System der Firma ABI), sowie über etablierte Kooperationen konnte auf eine Vielzahl von Geräten zur Bearbeitung der Fragestellungen zurückgegriffen werden. Die weiterführenden Analysen zur Zusammensetzung der archaeellen Gemeinschaft im Biogasreaktor sowie die Anwendung von Shotgun Metagenomik und Metatranskriptomik erforderte die Etablierung neuer

Methoden im Verlauf des Projektes welche durch Dr. Sven Neulinger bioinformatisch unterstützt wurden (zeitweise aus anderen Mitteln (co)finanziert).

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des Verbundnetzwerks BioPara sollte an der Universität Kiel die Analyse der prokaryotischen Populationsdynamik und Expressionsmuster in Biogasanlagen erfolgen. Der zeitliche Ablauf wurde in den folgenden Meilensteinen zusammengefasst.

- Meilenstein 1: Isolierung von DNA/RNA aus Biogasproben verschiedener Anlagen.
- Meilenstein 2: Pyrosequenzierung des bakteriellen und archaeellen 16S rRNA-Gens, Konsortienzusammensetzung analysiert.
- Meilenstein 3: Pyrosequenzierung ausgewählter Metagenome. Detaillierte Konsortienanalyse und ihre Dynamik während der Prozessführung, Bestimmung der Abundanz von Schlüsselgenen.
- Meilenstein 4: Verifizierung der Konsortienanalyse mittels FISH Analyse.
- Meilenstein 5: Erstellen von Metatranskriptomdaten ausgewählter Proben und Zeitpunkte, Verifizierung von Schlüsselgenen, Validierung der Konsortienzusammensetzung mittels Metagenom- und Metatranskriptomdaten.
- Meilenstein 6: Quantitative Analyse der Expression einzelner spezifischer Schlüsselgene in Antwort auf veränderte Umweltbedingungen oder Zusätze.
- Meilenstein 7: Identifizierung der Prozess-limitierenden Schritte.
- Meilenstein 8: Identifizierung von Hydrolase-Gensequenzen zur Bereitstellung von zusätzlichen Enzymen und Validierung dieser Zusätze im Biogasprozess.

Bei Abschluss der experimentellen Arbeiten Ende Juni 2016 waren alle Meilensteine (MS) bis auf MS 4 und MS 8 abgeschlossen (Siehe II, Punkt 1).

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

In Biogasanlagen laufen komplexe mikrobiologische Prozesse ab, deren Gesamtdynamik entscheidend durch die vorhandene mikrobielle Gemeinschaft begründet ist. Der im Biogasreaktor ablaufende vierstufige Prozess aus Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese stand in den vergangenen Jahren im Fokus verschiedener wissenschaftlicher Arbeiten. Die Abhängigkeit der Mikrobiota von den unterschiedlichen Prozessparametern und der Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Zusammensetzung und der Effizienz der Biogasbildung waren hierbei von besonderem Interesse. Durch vorangegangene Projekten innerhalb der AG Schmitz-Streit an der Universität Kiel waren bereits Techniken zur 16S rRNA Gen basierten Hochdurchsatzanalyse von bakteriellen Gemeinschaften vorhanden. Aufbauend auf diesen erfolgte im Rahmen des Projekts die Evaluierung verschiedener 16S Primer für eine vergleichbare Analyse der archaeellen Gemeinschaft. In diesem Zuge erfolgte ebenso die Umstellung der Sequenziertechnik von der bisher verwendeten Roche 454 Pyrosequenzierung auf Illumina Technologie, welche einen deutlich höheren Durchsatz bei ähnlichen Kosten für die darauffolgenden Experimente ermöglichte.

Neben den 16S rRNA-Gen basierten Methoden zur Bestimmung der Zusammensetzung wurde die Methodik der Shotgun Sequenzierung (Metagenomsequenzierung) im Rahmen des Projektes etabliert. Diese bietet über die Analyse der Zusammensetzung der Mikrobiota hinaus einen Einblick in das genetische Potential der vorhandenen Organismen. Zusätzlich zu der DNA-basierten Analyse (Metagenom) erfolgte auch die Analyse der transkribierten Gene auf der RNA-Ebene (Metatranskriptom), was einen genaueren Einblick in die transkriptionelle Aktivität und hierüber indirekt Expressionslevel von Enzymen innerhalb der Gemeinschaft erlaubte.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Eine enge und erfolgreiche Zusammenarbeit erfolgte vor allem mit den Partnern innerhalb des Verbundprojekts an der Universität Hamburg (AG Streit), der Universität Dresden (AG Rother), der Universität Bonn (AG Deppenmeier) sowie mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. John Baines am Max-Planck-Institut Plön. Die Kooperation mit der AG Baines am Max-Planck Institut für Evolutionsbiologie in Plön war aufgrund der

umfangreichen Ausstattung essentiell für die Durchführung der unterschiedlichen Sequenzierungen und der damit verbundenen Erfüllung der Meilensteine. In Kooperation mit der AG Streit an der Uni Hamburg erfolgte die Evaluierung der 16S basierten Analysen sowie die genetische Untersuchung von Hydrolasen, welche in den Metagenomdaten identifiziert werden konnten. Beide Kooperationsprojekte wurden in Peer-reviewed Journalen publiziert (Güllert et al. 2016, Fischer et al. 2016). Im Rahmen einer Kooperation mit der AG Rother an der Universität Dresden erfolgte die Sequenzierung und Charakterisierung des Isolates E03.2 aus dem untersuchten Biogasreaktor, welches als neue Spezies *Methanosarcina flavescens* identifiziert wurde (Kern et al. 2016). Darüber hinaus wurde in Kooperation mit der AG Deppenmeier an der Universität Bonn kontinuierliche Batch-Reaktoren betrieben und die Reaktion der mikrobiellen Gemeinschaft auf drastisch erhöhten Ammoniumgehalt simuliert. Die erhaltenen Daten werden derzeit zur Publikation vorbereitet. Neben diesen Kooperationen erfolgte eine fundierte Zusammenarbeit aller Projektpartner im Rahmen der von der Bioreact durchgeführten Experimenten zur Versauerung und erhöhter Ammoniumkonzentrationen. Die hierbei erhaltenen Daten werden derzeit für die Veröffentlichung in Rahmen eines Synthesepapers unter Beteiligung aller Projektpartner vorbereitet.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die Zuwendungen wurden für die Personalkosten des Doktoranden Martin Fischer sowie zur teilweisen Finanzierung des PostDocs Dr. Sven Neuling (Bioinformatiker) aufgewendet. Ebenfalls entfiel ein großer Anteil der Zuwendungen auf die Sequenzierung zur metagenomischen und metatranskriptomischen Analyse.

Meilenstein 1: *Isolierung von DNA/RNA aus Biogasproben verschiedener Anlage.*

→ Die Isolierung von DNA und RNA aus Biogasreaktorproben wurde mit Erfolg abgeschlossen werden. Zur Isolation der DNA wurde ein im Labor etabliertes Protokoll (Weiland, N., Löscher, C., Metzger, R., & Schmitz, R. (2010). Construction and screening of marine metagenomic libraries. *Metagenomics: Methods and Protocols*, 51-65) mit geringfügigen Modifikationen verwendet. Um die verbleibenden Huminsäurekontaminationen zu entfernen, wurde zusätzlich eine säulenbasierte Aufreinigung in das Protokoll integriert. Das Protokoll wurde im Rahmen einer Publikation veröffentlicht (Güllert, S., Fischer, M. A., Turaev, D., Noebauer, B., Ilmberger, N., Wemheuer, B., Alawi, M., Rattei, T., Daniel, R., Schmitz, R. A., Grundhoff, A. & Streit, W. R. (2016)). Deep metagenome and metatranscriptome analyses of microbial communities affiliated with an industrial biogas fermenter, a cow rumen, and elephant feces reveal major differences in carbohydrate hydrolysis strategies. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1.). Für die RNA Isolation aus den Proben wurde nach dem oben beschriebenen Probenaufschluss ein Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform basiertes Protokoll verwendet, welches sich als geeignet für die Eliminierung von Huminsäurekontaminationen herausstellte. Der MS wurde demnach erfolgreich abgeschlossen.

Meilenstein 2: *Pyrosequenzierung des bakteriellen und archaeellen 16S rRNA-Gens, Konsortienzusammensetzung analysiert.*

→ Die Evaluierung von archaeellen 16S rDNA Primer zur differentiellen Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft innerhalb der Biogasanlage führte zur Etablierung eines definierten Protokolls. Die erhaltenen Ergebnisse wurden abschließend publiziert (Fischer, M. A., Güllert, S., Neuling, S. C., Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2016). Evaluation of 16S rRNA gene primer pairs for monitoring microbial community structures showed high reproducibility within and low comparability between datasets generated with multiple archaeal and bacterial primer pairs. *Frontiers in Microbiology*, 7.) und zeigen unter anderem

eine starke Abhängigkeit der Ergebnisse zur Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft von den verwendeten Primern.

Der MS wurde demnach erfolgreich abgeschlossen.

Meilenstein 3: *Pyrosequenzierung ausgewählter Metagenome. Detaillierte Konsortienanalyse und ihre Dynamik während der Prozessführung, Abundanz von Schlüsselgenen.*

→ Zusätzlich zur 16S rDNA basierten Methode und der Analyse der Metagenome zur Beschreibung der mikrobiellen Gemeinschaft in Bioreaktor erfolgten für ausgewählte Biogasreaktorproben erste Analysen der Transkriptionsmuster mittels Metatranskriptom-Analysen. Diese Untersuchung ist abhängig und baut auf den im Metagenom gewonnenen Daten auf. Diese Daten erlaubt die Evaluierung, welche Gene aktiv transkribiert werden und zeigt somit das Expressionsmuster der mikrobiellen Gemeinschaft auf. Durch die kontinuierliche Beprobung einer Modellanlage über nahezu den kompletten Projektzeitraum wurde so ein vielversprechender Datensatz generiert, welcher neben dem metagenomischen Einblick in die Gemeinschaft auch eine Aussage über die transkriptionelle Aktivität von Schlüsselgenen verschiedener Stoffwechselwege über die Zeit erlaubt. Von besonderem Interesse war hierbei, dass die durchgehend beprobte Biogasanlage in zwei Zeiträumen einen erhöhten Ammoniumgehalt aufwies. Dieser spiegelte sich in der Zusammensetzung der Gemeinschaft als auch in der transkriptionellen Aktivität verschiedener Markergene wieder. Die durchgeführte Langzeitbeobachtung ist in vergleichbaren Studien in diesem Umfang bisher nicht publiziert worden. Der MS wird mit der Publikation dieser Ergebnisse abgeschlossen.

Meilenstein 4: *Verifizierung der Konsortienanalyse mittels FISH Analyse.*

→ Da eine FISH-Analyse der erhaltenen Proben bereits an der Universität Dresden etabliert wurde, wird zur Verifizierung der Analyse der Konsortienanalyse ein qPCR System (TaqMan) verwendet. Die qPCR stellte sich dabei als eine schnelle und gute Alternative für die Analyse von dynamischen Veränderungen in der prokaryotischen Gemeinschaft heraus. Der MS wurde demnach in veränderter Form bearbeitet und abgeschlossen.

Meilenstein 5: *Erstellung von Metatranskriptomdaten ausgewählter Proben, Verifizierung von Schlüsselgenen, Validierung der Konsortienzusammensetzung mittels Metagenom- und Metatranskriptomdaten.*

→ In Kooperation mit der AG Deppenmeier an der Universität Bonn wurde eine Testreihe initiiert, in der eine erhöhte Ammoniakkonzentration und deren Effekte auf den Gesamt-

Prozess im Modelmaßstab (Fermentervolumen 1 L) simuliert wurden. Die unter Meilenstein 2 identifizierte 16S rRNA Gen-Primer wurden in diesem Projekt bereits erfolgreich angewendet und erlaubten einen detaillierten Einblick in die phylogenetische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft und deren Veränderung nach Erhöhung der Ammoniumkonzentration in den Versuchsfermentern. Zur Analyse der transkriptomischen Aktivität unter den gegebenen Stressbedingungen wurden zu zwei Zeitpunkten Metatranskriptome der Versuchsfermenter erstellt. Auf dieser Datengrundlage konnte die signifikante transkriptionelle Regulation verschiedener Schlüsselgene unter den gegebenen Stressbedingungen beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Experimentreihe werden zurzeit zur Veröffentlichung vorbereitet.

Der MS wird mit der Publikation dieser Ergebnisse abgeschlossen.

Meilenstein 6: *Quantitative Analyse der Expression einzelner spezifischer Schlüsselgene in Antwort auf veränderte Umweltbedingungen oder Zusätze.*

→ Zur Simulation unterschiedlicher Umweltparameter wurden vom Firmenpartner Bioreact/Bonalytic Reaktoren im Labormaßstab betrieben. In diesen wurden unterschiedliche Bedingungen wie ein oben beschriebener Ammonium-upshift (leicht/stark/Regeneration) simuliert. Im kleineren Maßstab (1 L) konnte bereits eine signifikante Regulation von bekannten Schlüsselgenen des Biogasprozesses beobachtet werden. Nach erfolgter Generierung der Metatranskriptomdaten sollen durch die Analyse der Transkriptionslevel zum einen Markergene als Frühwarnsystem identifiziert werden, sowie die von den Projektpartnern 3-8 gemessenen Enzymaktivitäten zur gegenseitigen Validierung herangezogen werden. Die generierten Metatranskriptomdaten dieser Experimente sollen zusammen mit den metagenomischen Daten der Universität Hamburg in einem gemeinsamen Manuskript aller Verbundpartner in Zukunft veröffentlicht werden.

Der experimentelle Anteil des MS sowie die Vorarbeiten der Universität Kiel in Form der Sequenzierung und Bereitstellung der Metatranskriptomdaten sind abgeschlossen.

Meilenstein 7: *Identifizierung der Prozess-limitierenden Schritte.*

→ Die gemeinsamen Analysen zu den unter Meilenstein 6 genannten Experimenten werden durchgeführt, sobald alle Daten erhoben sind. Der Beitrag des Teilprojekts wird dabei die etablierte Analyse der transkriptionellen Aktivität in den untersuchten Biogasreaktor sein. Die in Kooperation mit der AG Deppenmeier durchgeführten Experimente im kontinuierlichen Batch-Fermenter Maßstab (1 L) zeigen bereits eine Tendenz, welche auf

die signifikante Regulation verschiedener Markergene hinweisen. Der MS wird mit der Publikation dieser Ergebnisse abgeschlossen.

Meilenstein 8: *Identifizierung von Hydrolase-Gensequenzen zur Bereitstellung von zusätzlichen Enzymen und Validierung dieser Zusätze im Biogasprozess.*

→ In Kooperation mit Projektpartner 3 (AG Streit, Universität Hamburg) erfolgte eine fundierte Analyse der Hydrolasen auf Basis von Metagenom- und Metatranskriptomdaten mit dem Fokus auf hydrolytische Enzyme. Die Ergebnisse wurden im Rahmen einer Publikation veröffentlicht (Güllert, S., Fischer, M. A., Turaev, D., Noebauer, B., Ilmberger, N., Wemheuer, B., Alawi, M., Rattei, T., Daniel, R., Schmitz, R. A., Grundhoff, A. & Streit, W. R. (2016). Deep metagenome and metatranscriptome analyses of microbial communities affiliated with an industrial biogas fermenter, a cow rumen, and elephant feces reveal major differences in carbohydrate hydrolysis strategies. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1.). Vergleichend zu effizienteren natürlichen Systemen zeigte sich eine geringere Abundanz von Glykosylhydrolasen der Ordnung Bacteroidales, was ein möglicher Grund für die weniger effektive Hydrolyse innerhalb des Biogasprozesses sein könnte. Diese Erkenntnis bietet einen möglichen Ansatzpunkt für die zukünftige Optimierung von Biogasanlagen. Der MS wurde damit erfolgreich abgeschlossen.

Aufzählung der zusätzlichen wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse.

1. In Zusammenarbeit mit Projektpartner 8 (AG Rother, Universität Dresden) und 7 (AG Deppenmeier, Universität Bonn) erfolgt die genomische Analyse eines Isolates der Gattung *Methanosarcina*, das zu Beginn des Experimentes aufgrund von PCR-Analysen als hoch abundante Spezies im Bioreaktor eingestuft wurde. Neben der physiologisch-morphologischen Untersuchung des Isolates durch Projektpartner 8 erfolgt in Kiel die Genomsequenzierung und Assemblierung, sowie die erforderliche Abgrenzung von *M. barkeri* und *M. thermophila* auf genetischer Ebene. Das Isolat wurde unter dem Namen *Methanosarcina flavescens* als neuer Stamm in die Stammhaltung der DSMZ aufgenommen und die phylogenetische Beschreibung in einer Fachzeitschrift veröffentlicht (Kern, T., Fischer, M. A., Deppenmeier, U., Schmitz, R. A., & Rother, M. (2016). *Methanosarcina flavescens* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a

full-scale anaerobic digester. International journal of systematic and evolutionary microbiology, March 2016 66: 1533-1538, doi: 10.1099/ijsem.0.000894.)

2. Das unter Meilenstein 2 genannte System zur Amplifikation, Sequenzierung und Analyse verwendete 16S rRNA Gen basierende System wurde neben diesem BMBF geförderten Projekt ebenfalls in zwei weiteren Studien verwendet und zur Publikation gebracht (Mensch, B., Neuling, S. C., Graiff, A., Pansch, A., Künzel, S., Fischer, M. A., & Schmitz, R. A. (2016). Restructuring of epibacterial communities on *Fucus vesiculosus* forma mytili in response to elevated pCO₂ and increased temperature levels. *Frontiers in microbiology*, 7.; Löscher, C. R., Fischer, M. A., Neuling, S. C., Fiedler, B., Philippi, M., Schütte, F., Singh, A., Hauss, H., Karstensen, J., Körzinger, A., Künzel, S. & Schmitz, R.A. (2015). Hidden biosphere in an oxygen-deficient Atlantic open-ocean eddy: future implications of ocean deoxygenation on primary production in the eastern tropical North Atlantic. *Biogeosciences*, 12(24), 7467-7482.). Die BMBF Finanzierung des wissenschaftlichen Mitarbeiters und Koautors Martin Fischer durch das BMBF wurde in den Acknowledgements genannt.
3. Eine weitere Kooperation mit Projektpartner 8 (AG Rother, Dresden) initiiert. Im Rahmen dieser Kooperation wurde ein aus der Biogasanlage isolierter Phage eines abundanten Methanogenen bereits von Projektpartner 8 sequenziert. Die Analyse des Phagengenoms soll nach Abschluss des Projektes durchgeführt werden, sowie die Abundanz des Phagen in der Biogasanlage in den erstellten Metagenomen der Anlage thematisiert werden. Hierüber soll ein erster Einblick in den Einfluss von Phagen in die Biozönose der Biogasanlage gewonnen werden.

2. Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalmittel: Eine Doktorandenstelle (E13; 50%)

Eine halbe PostDoc-Stelle (E13; 50%)

Verbrauchsmittel und Dienstreisen wie beantragt

Großgeräte (ABI quantitative PCR Maschine, 50% Co-finanziert)

Sequenziermittel wie beantragt

3. Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Der Abschluss der Meilensteine und die Durchführung der hierzu notwendigen Experimente waren nur durch die finanzielle Unterstützung durch das BMBF möglich. Personal und Sachmittelkosten hätten nicht durch den universitären Haushalt erbracht werden können. Die erhaltenen Erkenntnisse zur Flexibilität der mikrobiellen Gemeinschaft in kommerziellen Biogasanlagen, sowie zu den Transkriptionsmustern unter den sich

ändernden natürlichen und simulierten Inkubationsbedingungen lieferten Hinweise zur frühzeitigen Erkennung von Störfällen und können ggf. in Zukunft für die Prävention von Reaktorausfällen genutzt werden. Diese erhaltenen Erkenntnisse rechtfertigen die aufgewendeten Mittel.

4. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Ziel des Projektes war die Analyse der prokaryotischen Gemeinschaft innerhalb des Biogasreaktors bezüglich der Zusammensetzung und der transkriptionellen Aktivität hin zu untersuchen. Hierdurch sollten die einzelnen Schritte auf mögliche Limitierungen hin untersucht und so neue Ansätze zur Optimierung der Biogasgewinnung gefunden werden. Diese Ziele wurden mit unterschiedlichen Methoden verfolgt. Zur Analyse der Zusammensetzung der prokaryotischen Gemeinschaft wurde ein 16S rRNA Gene basiertes System innerhalb des Projektes evaluiert und etabliert. Diese Studie wurde im Rahmen einer Publikation beschrieben und konnte bereits in weiteren Untersuchungen verwendet werden (s.o.). Neben der Untersuchung der Zusammensetzung stand die Analyse des genetischen Potentials und der transkriptionellen Aktivität der Gemeinschaft im Fokus der Analyse. Die Etablierung einer bioinformatischen Pipeline zur Auswertung der erstellten Metagenome und Metatranskriptome erfolgte ebenfalls im Rahmen der Förderung durch den BMBF. Die so ausgewerteten Datensätze wurden bereits, bzw. werden in zeitnah der wissenschaftlichen Gemeinschaft im Rahmen mehrerer Publikationen zugänglich gemacht und können ggf. zur Verbesserung des zukünftigen Monitorings der Mikrobiota und zur Verhinderung von Störfällen genutzt werden. Es soll zeitnah geprüft werden in Kollaboration mit dem von Industriepartnern ob ein solches Monitoring robust genug ist und im laufenden Betrieb von Biogasanlagen eingesetzt werden kann.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während der Durchführung des Projektes kam es zu zahlreichen Publikationen, welche sich mit der Thematik der mikrobiellen Gemeinschaft von verschiedenen Biogasreaktoren auseinandersetzen. Erkenntnisse und Herangehensweisen aus anderen Publikationen wurden mit in die Analyse der erhobenen Daten eingearbeitet und zur Verbesserung der Auswertung

integriert. Die Durchgeführten Experimente in Replikaten an der Universität Bonn sowie die detaillierte Langzeitbetrachtung der Modellanlage 1 über einen Zeitraum von zwei Jahren stellen im Vergleich zu bereits veröffentlichter Literatur ein Alleinstellungsmerkmale des Vorhabens dar und werden durch die zeitnahe Publikation zum wissenschaftlichen Diskurs beitragen.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichung des Ergebnisses

Fischer, M. A., Güllert, S., Neulinger, S. C., Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2016). Evaluation of 16S rRNA gene primer pairs for monitoring microbial community structures showed high reproducibility within and low comparability between datasets generated with multiple archaeal and bacterial primer pairs. *Frontiers in Microbiology*, 7; doi: 10.3389/fmicb.2016.01297.

Löscher, C. R., Fischer, M. A., Neulinger, S. C., Fiedler, B., Philippi, M., Schütte, F., Singh, A., Hauss, H., Karstensen, J., Körzinger, A., Künzel, S. & Schmitz, R. A. (2015). Hidden biosphere in an oxygen-deficient Atlantic open-ocean eddy: future implications of ocean deoxygenation on primary production in the eastern tropical North Atlantic. *Biogeosciences*, 12(24), 7467-7482; doi: 10.5194/bg-12-7467-2015.

Kern, T., Fischer, M. A., Deppenmeier, U., Schmitz, R. A., & Rother, M. (2016). *Methanosarcina flavescens* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from a full-scale anaerobic digester. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(3), 1533-1538; doi: 10.1099/ijsem.0.000894.

Mensch, B., Neulinger, S. C., Graiff, A., Pansch, A., Künzel, S., Fischer, M. A., & Schmitz, R. A. (2016). Restructuring of epibacterial communities on *Fucus vesiculosus* forma *mytili* in response to elevated pCO₂ and increased temperature levels. *Frontiers in Microbiology*, 7; doi: 10.3389/fmicb.2016.00434.

Güllert, S., Fischer, M. A., Turaev, D., Noebauer, B., Ilmberger, N., Wemheuer, B., Alawi, M., Rattei, T., Daniel, R., Schmitz, R. A., Grundhoff, A. & Streit, W. R. (2016). Deep metagenome and metatranscriptome analyses of

microbial communities affiliated with an industrial biogas fermenter, a cow rumen, and elephant feces reveal major differences in carbohydrate hydrolysis strategies. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1; doi: 10.1186/s13068-016-0534-x.