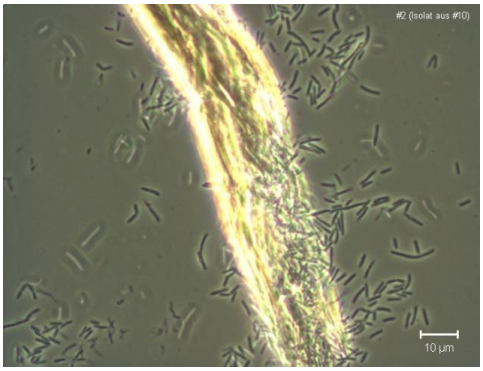
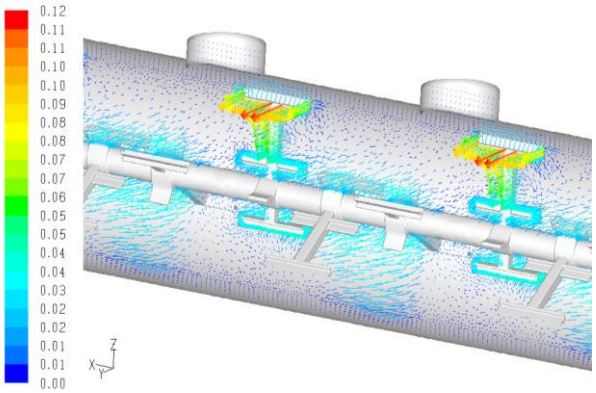
LfL Tier und Technik | Institut für Mikrobiologie | Institut für Bodenökologie | Institut für Siedlungswasserwirtschaft | Schmack VIESMANN Group

Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus NawaRo (IBMN)

Abschlussbericht





Juli 2010

IBMN-Vorwort

Die Bundesrepublik Deutschland hat im Rahmen der im August 2007 formulierten Meseberg-Beschlüsse und der aktuellen Zielsetzungen der Richtlinie zur Förderung der Nutzung von Energie aus erneuerbaren Quellen vom 23. April 2009 (Richtlinie 2009/28/EG) den weiteren Ausbau der erneuerbaren Energien (EE) beschlossen. Die verbesserten Rahmenbedingungen durch das novellierte Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) und die Gasnetzzugangsverordnung (GasNZV) sollen auch für einen weiteren Ausbau der Biogasproduktion entsprechende Anreize setzen.

Die noch relativ junge Biogasbranche hat in den letzten Jahren eine rasante Entwicklung genommen. Dennoch stehen nach wie vor viele offene Fragen im Raum, die nur interdisziplinär gelöst werden können. Aus der Praxis werden derzeit sehr klare Anforderungen an die Forschung und Entwicklung formuliert (Pellmeyer, Biogas Science 2009), die sich unter Anderem auf folgende Schlüsselthemen konzentrieren:

„Optimale Milieubedingungen für die Prozessmikrobiologie und Fermentationseffizienz“,

„Werkzeuge, um den Prozess zu kontrollieren“,

„Optimierung der Fermentertechnik“,

„Verlustarme, treibhausgasminimierte Produktion“ sowie

„Einsatz von Gärhilfsstoffen“.

Vor diesem Hintergrund wurde über das Förderprogramm „Nachwachsende Rohstoffe“ des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) und betreut durch die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger das interdisziplinäre Verbundprojekt „**I**ntensivierung des anaeroben **B**iomasseabbaus zur **M**ethanproduktion aus **N**awaRo“ am 01.10.2006 gestartet. Die bereits 2006 formulierten übergeordneten Zielsetzungen dieses Forschungsprojektes decken sich weitgehend mit den oben dargestellten aktuellen Anforderungen aus der Praxis:

- Verständnis des mikrobiologischen Prozesses und seiner Teilschritte vertiefen,
- Effizienz des Prozesses und Methanausbeute aus den Einsatzstoffen verbessern,
- Stabilität des Betriebs auf hohem Niveau sichern und
- den Prozess der Biogasproduktion besonders unter technischen und ökologischen Gesichtspunkten bewerten.

Dabei konzentrierte sich das Verbundvohabens IBMN auf die Optimierung der Methanproduktion ausschließlich aus Grassilage und Maissilage (Monovergärung) unter mesophilen und thermophilen Bedingungen, um diese Prozesse langfristig stabil zu gestalten und insbesondere die Hydrolyse der lignocellulosehaltigen Biomasse zu intensivieren.

Um sich diesen komplexen Aufgaben zu stellen, arbeiteten Mikrobiologen, Verfahrenstechniker, Agrarwissenschaftler und Ökologen im Rahmen des IBMN-Verbundes interdisziplinär zusammen. Ebenso konnte eine Verknüpfung von grundlagenorientierter und angewandter Forschung sowie mit der Praxis erreicht werden.

Im Verlauf des Verbundvorhabens ergaben sich sukzessive Erkenntnisse, die wiederholt Feinjustierungen der Projektziele erforderten. Rückblickend konnten die Arbeiten aber durch dieses flexible Projektmanagement an den aktuellen Fragestellungen ausgerichtet werden. Am Ende der dreieinhalb jährigen Projektlaufzeit kann ein wesentlicher Wissenszuwachs vor allem in den folgenden Bereichen verzeichnet werden:

- Evaluierung der Grenzen für eine langzeitstabile Mono-Vergärung von Gras- und Maissilage
- Validierung des Einsatzes von Spurenelementen zur Verbesserung der Prozessstabilität und des Methanertrags
- Möglichkeiten und Grenzen der Inokulierung mit mikrobiellen Kulturen und von Zusatz von Enzymen zur Prozessbeschleunigung und Ertragssteigerung
- Entwicklung und Validierung molekularbiologischer Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung für den Prozess relevanter Mikroorganismen
- Validierung der NIRS-Technologie zur Online-Bestimmung relevanter Prozessindikatoren im Fermenter
- Validierung verschiedener Betriebsweisen und Durchmischungstechniken im Fermenter
- Weiterentwicklung und Validierung eines mathematischen Prozessmodells zur Simulation des Gärprozesses als Grundlage für zukünftige Automatisierungstechniken
- Ausarbeitung von Handlungsempfehlungen für die Praxis
- Erweiterung des Grundlagenwissens und des Verständnisses der Prozessabläufe auf der Mikroskala

Ende 2009 wurde auch als Abschlussveranstaltung von IBMN der Stand des Wissens auf internationaler Ebene durch die Ausrichtung der Tagung Biogas Science 2009 zusammengefasst und der Allgemeinheit in Form eines dreibändigen Tagungsbandes zugänglich gemacht:

http://www.lfl.bayern.de/publikationen/daten/schriftenreihe/p_37628.pdf;
http://www.lfl.bayern.de/publikationen/daten/schriftenreihe/p_37629.pdf;
http://www.lfl.bayern.de/publikationen/daten/schriftenreihe/p_37630.pdf.

Weiterhin konnten auch die notwendigen Vorarbeiten für eine interaktive Internetplattform geleistet werden, um den Fach- und Verkehrskreisen eine für die landwirtschaftliche Biogasproduktion adäquate Informations- und Kommunikationsmöglichkeit zu bieten. Inzwischen konnte auf Basis dieser Vorarbeiten eine vielfältige Plattform (Biogas Forum Bayern) gebildet und deutlich ausgebaut werden, die nun durch die ALB Bayern e.V. auch über die Projektlaufzeit hinaus gesichert werden wird (http://www.biogas-forum-bayern.de/). Hierdurch ist die Grundlage für die kontinuierliche Fortschreibung von Beratungs- und Handlungsempfehlungen geschaffen, in die die Erkenntnisse aus IBMN einfließen.

An dieser Stelle sei dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz für die Finanzierung, der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. für die Projektträgerschaft und die konstruktive Begleitung des Verbundes, den Kolleginnen und Kollegen für die offene und kollegiale Zusammenarbeit und vor allem Herrn Dr. Michael Lebuhn für die integrative und geduldige Koordinierung des Forschungsverbunds im Namen aller Projektbeteiligten auf das Herzlichste gedankt.

Freising, den 20. Juli 2010

Dr. Andreas Gronauer

Gemeinsame Zusammenfassung des Verbundvorhaben IBMN: Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen

Unterstützt durch die Novellierungen des Erneuerbare Energien Gesetz (EEG) hat die Biogaserzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) stark an Bedeutung gewonnen. Bereits vor Beginn des Verbundvorhabens IBMN bestand großes Interesse an ausschließlich NawaRo-betriebenen Biogasanlagen, einen solchen Prozess langzeitstabil zu gestalten war aber besonders ohne Güllezusatz noch nicht Stand der Technik. Da Wirtschaftsdünger nicht überall und immer zur Verfügung stehen, ist der Betrieb ausschließlich mit NawaRo (mono-Betrieb) von hohem Interesse.

Die Biogasproduktion aus energiereichen aber stark lignocellulosehaltigen und somit schwer abbaubaren nachwachsenden Rohstoffen ist in vielen Segmenten stark verbesserungsfähig, besonders hinsichtlich eines effizienten, energieertragreichen und stabilen Betriebs. Steigende Investitions- und Rohstoffbeschaffungskosten erfordern Maßnahmen, die die Effizienz der Prozesse und die Methanausbeute optimieren, um ökonomisch wettbewerbsfähig zu sein. Mit dem Rückgang der Milchviehwirtschaft, der sich auch heute fortsetzt, kam als weitere Herausforderung hinzu, den Biomasseaufwuchs von marginalen Ertragsstandorten wie z.B. von Dauergrünland weitestgehend für die Methanproduktion zu erschließen.

Um solche lignocellulosehaltige Biomasse (LCB) wirtschaftlich zu Biogas umzusetzen, müssen die verfahrenstechnischen und die biologischen Prozesse möglichst weitgehend verstanden sein. Nur auf dieser Basis lassen sich die Substratumsetzungen optimieren. Dabei kommt besonders der mikrobiologischen Umsetzung der schwer zugänglichen Cellulosefibrillen (Lynd et al., 2002) große Bedeutung zu. Bei Intensivierung der initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Hydrolyse können pro Zeiteinheit mehr Stoffwechselzwischenprodukte der Biogasgewinnung zur Verfügung gestellt werden.

Hier setzten die Untersuchungen an, die im Rahmen des Verbundvorhabens IBMN durchgeführt wurden. Ein immens großes Feld war zu bearbeiten, das sich von der Schaffung von Basiswissen über methodische Arbeiten zum Prozessdesign erstreckte und den Transfer von praxistauglichen Entwicklungen in die Wirtschaft beinhalten sollte. Gemeinsam mit dem Projektträger wurde definiert, den mono-Betrieb mit Maissilage bzw. mit Grassilage im mesophilen (etwa 38°C) und im thermophilen (etwa 55°C) Temperaturbereich zu untersuchen. Die Arbeitsinhalte lagen im Schnittfeld von Mikro/Molekularbiologie, Verfahrenstechnik und Modellierung. Die wesentlichsten den einzelnen Fachbereichen übergeordneten Ziele zur Verbesserung der Ökonomie waren,

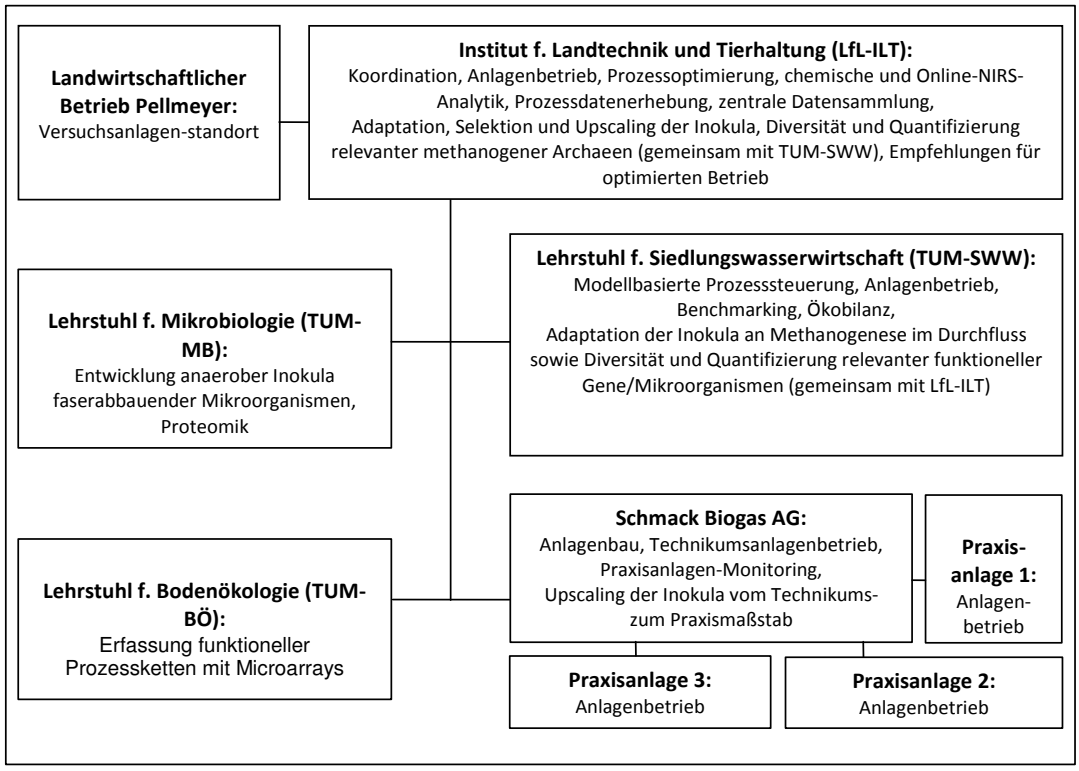
- den mono-Betrieb mit Mais- und Grassilage langzeitstabil und effizient zu gestalten,
- das dafür nötige Grundlagenwissen und Prozessverständnis zu schaffen,
- praxistaugliche Methoden für das Prozessmonitoring mit Indikatorfunktion zu erarbeiten,
- den Zusatz von Enzymen und selektierten cellulolytischen Inokula im Durchflussbetrieb zu evaluieren und effiziente Inokula im Upscaling in die Praxis zu überführen und
- die Grundlagen für eine kostengünstige Sensorik (online-Beobachter) und modellbasierte Aktorik für eine automatisierte Steuerung zu erarbeiten.

Vier Institute und ein Unternehmen der Biogasbranche aus Bayern hatten sich in IBMN zusammengeschlossen, um die Herausforderungen wissenschaftlich anzugehen, die Black-Box NawaRo-Biogasanlage zu erhellen und mit den Ergebnissen die Wirtschaftlichkeit und Wettbewerbsfähigkeit der Energieproduktion aus NawaRo zu verbessern,

- der Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München (TUM-MB),

- das Institut für Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München (TUM-SWW),
- der Lehrstuhl für Bodenökologie der Technischen Universität München (TUM-BÖ),
- das Institut für Landtechnik und Tierhaltung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL-ILT) mit dem assoziierten landwirtschaftlichen Betrieb Pellmeyer und
- die Firma Schmack Biogas AG mit assoziierten Praxisanlagen.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Struktur von IBMN mit den involvierten Partnern und ihren wesentlichen spezifischen Arbeitsinhalten



Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Teilvorhaben von IBMN zusammenfassend dargestellt. Dabei entspricht die Reihenfolge der Teilvorhaben nicht der Nummerierung, sondern dem Flussschema, in dem die Arbeiten im Upscaling durchgeführt wurden.

Teilvorhaben 3: Optimierte hydrolytische Bakterien-Kulturen für den Faserabbau in LCB-reichen NawaRo (FKZ 220-11-705)

Das am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TUM bearbeitete Teilvorhaben betrifft die mikrobiologische Hydrolyse der Biomasse-Fasern in NawaRo-Biogasanlagen in Kooperation mit den anderen Teilvorhaben.

Mit den thermophilen hydrolytischen Spezies Clostridium thermocellum und C. stercorarium sollten die im Projekt verwendeten Substrate beimpft werden. Die hydrolytische Aktivität und die gebildeten Fermentationsprodukte (Fettsäuren, Alkohole und Gase) waren zu bestimmen. Optimale Bedingungen für die Hydrolyse waren auszuarbeiten (pH, Temperatur). Eine Methode für das Monitoring der hydrolytischen Bakterien sollte ausgearbeitet und an

Fermenterproben angewendet werden. Die Kulturen waren zur Animpfung von Fermentern bereitzustellen, um die Hydrolyse unter Praxisbedingungen zu testen.

Daraufhin sollten thermophile und mesophile hydrolytische Kulturen mit herausragender Aktivität an Mais- und Grassilage angereichert werden, die dann zu untersuchen und an Fermentern anzuwenden waren. Eine Animpfmethode war dafür auszuarbeiten. Die optimalen Bedingungen für die Hydrolyse dieser Kulturen waren beispielhaft zu evaluieren.

Daraufhin sollte die Zusammensetzung dieser Kulturen mit molekularbiologischen Methoden ermittelt werden, um die Hauptvertreter der hydrolytischen Bakterien zu identifizieren. Mehrere voneinander unabhängige methodische Ansätzen waren anzuwenden: 16S rDNA-Klonierung und Sequenzierung; Isolierung von bakteriellen Reinkulturen; und Isolierung und Bestimmung der hydrolytischen Schlüssel-Enzyme durch Proteomik-Methoden.

Die für die hydrolytische Aktivität in Biogasfermentern hauptverantwortlichen Bakterien waren mit molekularbiologischen und mikrobiologischen Methoden zu identifizieren und deren optimale Wachstums- und Aktivitätsbedingungen zu eruieren.

Es wurde eine aus Reinstämmen zusammengesetzte synthetische Mischung von Clostridium thermocellum und C. stercorarium an Maissilage getestet, die ein ähnlich gutes Hydrolyseprofil hatte, wie die beste zur Verfügung stehende Biogasanlagenkultur. Diese Kultur wurde einem Labor-Fermenter bei LfL-ILT zugesetzt. Daraufhin wurden aus Umwelt- und Anlagen-Proben optimal hydrolytische Kulturen für Mais-Ganzpflanzen- und Grassilage unter mesophilen und thermophilen Bedingungen angereichert. Ihre Eigenschaften wurden analysiert. Ein neues Anreicherungsmedium in fermenternaher Zusammensetzung wurde ausgearbeitet.

Zur Bestimmung des Anteils hydrolytischer (besonders cellulolytischer) Spezies wurde eine molekulare Analyse der phylogenetischen Zugehörigkeit der Hauptvertreter der Bakterien ausgearbeitet und durchgeführt, die wiederum C. thermocellum als hauptsächlichen Cellulose-Hydrolysierer identifizierte. Mit dieser optimal hydrolytischen Kultur wurde das Optimum von pH und Temperatur bestimmt, um Hinweise auf die Bedingungen für eine optimale Hydrolyse in den Fermentern zu erhalten. Die Fermentationsprodukte wurden analysiert.

Eine PCR-Methode zur Bestimmung von C. thermocellum und C. stercorarium wurde ausgearbeitet und erfolgreich an Labor- und Fermenterproben angewendet. Eine Methode zur Sporulierung der hydrolytischen Mischkulturen wurde ausgearbeitet und auf die Konstanz der hydrolytischen Eigenschaft getestet. Diese Sporen wurden in größeren Mengen präpariert und Fermentern zugesetzt.

Durch Isolierung cellulolytischer Bakterien aus der thermophilen Kultur wurden neue Isolate von C. thermocellum isoliert, jedoch keine anderen cellulolytischen Bakterien. Die Bestimmung der Cellulose bindenden Proteine aus der optimal hydrolytischen thermophilen Kultur, eine neuartige Technik zu Bestimmung der in einer Kultur produzierten Cellulasen, enthielt Cellulasen von C. thermocellum und C. stercorarium, die damit als die Hauptvertreter der cellulolytischen Bakterien identifiziert werden konnten.

<u>Teilvorhaben 1: Optimierung der Verfahrenstechnik und Prozessautomatisierung, Prozessmonitoring und Datenmanagement (FKZ 220-115-05) zusammen mit</u>

<u>Teilvorhaben 6: Identifikation und Quantifizierung funktionell relevanter Mikroorganismen bei der Vergärung LCB-reicher nachwachsender Rohstoffe (FKZ 220-119-05b)</u>

Das Forschungsvorhaben ist Bestandteil des vom Institut für Landtechnik und Tierhaltung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL-ILT koordinierten Verbundvorhabens

IBMN. Im Forschungsvorhaben des LfL-ILT wurden Fragestellungen aus den Bereichen Verfahrenstechnik und Mikro-/Molekularbiologie zur Verbesserung der Methanproduktion bei der Mono-Vergärung von Mais- und Grassilage im Durchflussbetrieb bearbeitet.

Im Bereich Verfahrenstechnik waren Batch- und Durchflussfermenter mit unterschiedlicher Prozessführung und Dimensionierung zu betreiben, Verbundpartnern Proben für deren Vorhaben zu liefern, Entwicklungen eines Verbundpartners zu evaluieren und folgende Themen wissenschaftlich zu untersuchen:

- Kalibrierung der Nahinfrarot-Spektroskopie für die Prozessüberwachung und –steuerung,
- Test auf Prozesseffizienzverbesserung durch Gasrückführung,
- Test von Effekten unterschiedlicher Fütterungsintervalle
- Test von Effekten unterschiedlicher Thermiestufen (thermophil, mesophil) sowie
- Test eines zweistufigen Anlagenbetriebs mit Maissilage in 2-phasiger Prozessführung.

Zusammen mit dem mikrobiologischen Vorhabensteil waren Rahmenbedingungen (Spurenelementstatus) zu eruieren, zu denen die Prozesse langzeitstabil betrieben werden können. Weiterhin waren Möglichkeiten der Effizienzsteigerung durch Zusatz von Enzymen und von selektierten, speziell adaptierten cellulolytischen bakteriellen Inokula (Entwicklungen eines Verbundpartners) abzuklären. Dabei sollten leistungssteigernde Inokula im Rahmen eines Upscalings dem industriellen Verbundpartner zum Einsatz im Praxismaßstab übergeben werden.

Bei den molekularbiologischen Arbeitsinhalten galt es:

- die DNA-Extraktion für die Fermenterproben zu optimieren,
- ein PCR-basiertes System zur Identifizierung funktionell relevanter Archaeen und zur Erfassung ihrer Diversität zu entwickeln (PCR-SSCP, PCR-Direktklonierung mit Sequenzanalyse) sowie
- ein Real-Time PCR-System zur Quantifizierung der methanogenen Archaeen zu entwickeln.

Als Zielgen diente dabei mcrA/mrtA, das für eine Untereinheit des in allen methanogenen Archaeen vorkommenden Schlüsselenzyms der Methanogenese, Methyl-CoenzymM-Reduktase, codiert.

Bei unterschiedlichen Fermenterzuständen waren Proben in Zeitreihen auf methanogene Archaeen zu untersuchen und Markerorganismen für charakteristische Prozesszustände zu identifizieren.

Bei der Kalibrierung der Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS) ließen sich für die Parameter TS, oTS und NH_4-N befriedigende Vorhersagen ($r^2 > 0,9$) erstellen. Für höhere Acetat-Gehalte im Fermenter war die Prognosesicherheit bei Maissilage-Fütterung ebenfalls hoch. Weniger sicher war die Vorhersagewahrscheinlichkeit für die anderen kurzkettigen Fettsäuren und die FOS/TAC-Werte, was den Einsatzbereich der NIRS für die Erfassung des Prozessstatus und die Prozesssteuerung limitiert.

Ohne gleichzeitiges mechanisches Rühren konnte die Gasrückführung im gegebenen 3,5 m^3 Fermentersystem nicht für eine befriedigende Durchmischung sorgen. Ein verlängertes Rührintervall senkte zwar den Energieeintrag, ein zu langes Rührintervall verhinderte eine homogene Durchmischung und verursachte aber starke Schwankungen der Methanproduktion. Ein kurzes Fütterungsintervall unterstützte die Prozessstabilität. Ein langes Fütterungsintervall hatte bei hoher Raumbelastung und bei Prozessdefizienzen eine erhöhte Prozesstörungsanfälligkeit zur Folge.

Eine stabile und leistungsstarke Biogasproduktion aus Maissilage mit Methangehalten von 50 – 55 % erforderte die Einstellung einer Mindestkonzentration von Spurenelementen im Fermenter. Im Langzeit-Durchflussbetrieb wurden insbesondere Kobalt und Natrium für die methanogenen Archaeen limitierend und mussten über Zusatz auf einen Mindestgehalt von ca. 0,025 bzw. 10 mg $*$ L^{-1} eingestellt werden. Unter diesen Schwellengehalten versäuerte der Prozess und brach zusammen. Im stabilen Prozess wurden ca. 75 % des gefütterten C in die Gasphase überführt, dabei wurden annähernd 400 NL CH_4 pro kg organischer Trockenmasse produziert. Es ließ sich eine hohe organische Raumbelastung erreichen (OLR 6 kg oTS $*$ m^{-3} $*$ d^{-1}), wobei bis zu 10^{10} methanogene Archeen $*$ mL^{-1} (überwiegend Methanosarcinaceae und Methanobacteriaceae) vorlagen. Im versäuerten Prozess wurden dagegen bis zu fünf ^{10}log-Stufen weniger Methanogene nachgewiesen, wobei bestimmte Arten der Methanomicrobiales dominierten. Vorwiegend operative taxonomische Einheiten der Gattungen Methanospirillum, Methanomicrobium und Methanogenium wurden hier nachgewiesen. Neben dem verstärkten Auftreten dieser Markerorganismen eigneten sich der FOS/TAC-Wert, der Gehalt an Propionsäure und das Auftreten von iso-Fettsäuren als Frühindikatoren einer Prozessversäuerung mit Maissilage als Substrat. Über die unterschiedlichen Prozesszustände bestand ein (allerdings schwacher) Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Konzentration methanogener Archaeen und der Methanproduktivität.

Bei thermophilem Betrieb (ca. 55°C) war die Methanproduktion aus Maissilage ca. 10 % intensiver als mesophil (ca. 38°C), die Diversität der Methanogenen war aber deutlich geringer. Mit Mais- und Grassilage wurde eine ausgeprägte Dominanz von Methanothermobacter-Arten im thermophilen Betrieb festgestellt.

Der zweiphasige Betrieb mit Maissilage ergab zwar Methangehalte bis zu 75 % in der methanogenen Phase, die Effizienz war der einphasigen Prozessführung aber deutlich unterlegen. Hauptsächlich lag das am hohen Anteil verworfenen Pflanzenstrukturmaterials und an H_2-Verlusten im „Hydrolysegas“.

Der Zusatz von Enzymen (Cellulase, Xylanase) konnte die mesophile Methanproduktion um ca. 8 % steigern. Der Zusatz substratadaptierter cellulolytischer Bakterienanreicherungen blieb für beide Substrattypen und Thermiestufen ohne positiven Effekt. Im Durchflussbetrieb mit Maissilage wurden auch nach der Inokulation prioritär die leich verdaulichen Substratbestandteile umgesetzt. Die Wirkungslosigkeit ist vor dem Hintergrund der sich natürlicherweise einstellenden sehr effizienten Biomasse-Konversion zu Biogas zu sehen, der ständigen Nachlieferung einer leicht metabolisierbaren Substratfraktion und der schweren Zugänglichkeit der Zellulosefibrillen.

Eine längerfristig stabile und leistungsstarke Biogasproduktion aus Grassilage im Durchfluss war nur bis zu einer OLR von ca. 2,5 kg oTS $*$ m^{-3} $*$ d^{-1} mesophil möglich, thermophil war der Prozess noch instabiler. Ein Zusammenhang mit der Bildung von toxischem NH_3 war zu erkennen. Die Gehalte methanogener Archaeen lagen immer unter 10^9 $*$ mL^{-1}. Nicht in allen Fällen war ein zusammengebrochener Prozess auch versäuert. Gängige Prozessindikatoren wie der FOS/TAC-Wert und die Gehalte kurzkettiger Fettsäuren eignen sich also für den Betrieb mit Grassilage nicht immer zur Frühwarnung.

<u>Teilvorhaben 5: Modellierung und Prozesssteuerung, Anlagenbetrieb und mikrobiologische Analytik, Entwicklung einer modellbasierten nachhaltigen Prozesssteuerung - Ökobilanz, Benchmarking (FKZ 220-11-905a)</u>

Ziel dieses Vorhabens war es die Monofermentation von nachwachsenden Rohstoffen (Mais- und Grassilage) verfahrenstechnisch zu untersuchen und anhand der gewonnenen Daten ein auf das Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM 1) aufbauendes mathematisches Modell zu

entwickeln, zu kalibrieren und auf die untersuchten Substrate und Reaktoren anzupassen. Die mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse entwickelte Prozesssteuerung wurde in einem zweiten Schritt an Labor- und Technikumsfermentern validiert. Ein Software-Interface zur Umsetzung von Steuersignalen in die Aktorik war nicht vorgesehen.

Ein weiteres Projektziel bestand in der Festlegung von Benchmarks sowie einer Ökobilanzierung der Biogaserzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen. Die ermittelten Leistungswerte flossen in ein Regelwerk für die Auslegung von Biogasanlagen ein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Monofermentation von Mais- und Grassilage sowie deren Mischungen unter mesophilen (38°C) und thermophilen (55°C) Bedingungen untersucht. Mittels unterschiedlicher Vergärungssysteme (Rührkessel-, Pfropfenstrom- und Schlaufenreaktoren) wurden umfangreiche Datensätze generiert, die einem Benchmarking sowie der Erstellung eines Regelwerkes dienten. Anhand der gewonnenen Daten wurden außerdem auf dem Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) basierende Simulationsmodelle erstellt und kalibriert. Abschließend wurden die Erkenntnisse einer Ökobilanz unterzogen.

Die wichtigsten Erkenntnisse der Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die für die Monofermentation von Grassilage entwickelten Schlaufenreaktoren stellten ihre gute Eignung unter Beweis. Als vorteilhaft erwies sich die in den Gasraum reichende Rührschnecke, durch die die Bildung von Schwimmschichten weitestgehend unterbunden werden konnte. Die schlanke Bauart stellte sich jedoch bei der Substratzugabe in Originalschnittlänge als nachteilig heraus.

In dem liegenden Fermenter der Containeranlage stellte sich nachweislich kein Pfropfenstrom ein, wodurch eine Anmaischung des Substrates mit aktiver Biomasse (Gärrestrückführung) nicht notwendig war. Anhand einer Strömungssimulation wurde diese Erkenntnis bestätigt und eine Möglichkeit zur Annäherung an den Pfropfenstrom aufgezeigt.

Grundsätzlich waren alle getesteten Systeme verfahrenstechnisch gut geeignet. Allerdings zeigten sich bei steigendem Anteil Grassilage durch deren faserigen Eigenschaften zunehmend Verzopfungen an Rührorganen.

Die Bioverfügbarkeit von Spurenelementen muss bei hohen organischen Belastungsraten beachtet werden. Für die Monofermentation von Maissilage konnte eine ausreichende Bioverfügbarkeit von Spurenelementen bis zu einer organischen Belastungsrate von 1,9 kg oTS $*$ m^{-3} $*$ d^{-1} aufgezeigt werden. Durch die Zugabe von zwei- oder dreiwertigem Eisen kann ein stabiler Betrieb auch bei einer organischen Belastungsrate von 2,5 kg oTS $*$ m^{-3} $*$ d^{-1} gewährleisten werden. Höhere organische Belastungsraten lassen sich nur durch eine zusätzliche Dosierung von Spurenelementen realisieren.

Für die thermophile Vergärung von Grassilage, für die ein stabiler Betrieb lediglich bis zu einer Raumbelastung von 1,5 kg oTS $*$ m^{-3} $*$ d^{-1} aufrecht erhalten werden konnte, zeigte sich die mesophile Betriebsweise mit einer Raumbelastung von 3,0 kg oTS $*$ m^{-3} $*$ d^{-1} als deutlich belastbarer. Die Hauptursache dafür liegt offenbar in der temperaturbedingten Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Ammonium und hemmendem Ammoniak, das der artenärmeren Biozönose im thermophilen Temperaturbereich deutlich stärker beeinflusst. Die erzielten Methanausbeuten sind in beiden Temperaturregimen ähnlich.

Ein zu hoher Trockensubstanzgehalt im Reaktor wirkt sich negativ auf die Hydrolyse aus. Infolgedessen kommt es zu einer Akkumulation von Ammonium bzw. Ammoniak sowie organischer Säuren (v.a. Propionsäure), wodurch die Umsetzung zu Biogas schließlich ins Stocken gerät. Die Gründe dafür liegen einerseits in der Funktion von Wasser als Transportmedium für Mikroorganismen, das die Aufnahme von Nährstoffen durch

Diffusionsvorgänge ermöglicht. Zum anderen erleichtert Wasser den Stoffübergang nicht homogener oder partikulärer Stoffe. Nicht zuletzt wird Wasser in Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung des Substrates während der Hydrolyse zusätzlich verbraucht.

Zur Prozessüberwachung geeignet sind in erster Linie die Konzentration an Propionsäure sowie das Stabilitätskriterium FOS/TAC. Ein stabiler Betrieb bei der mesophilen Vergärung von Grassilage konnte bis zu einer Propionsäurekonzentration von 7 $g * L^{-1}$ bzw. bzw. einem FOS/TAC-Wert von 1,5 aufrechterhalten werden. Im thermophilen Bereich brach der Prozess bereits bei einer Propionsäurekonzentration über 2,5 $g * L^{-1}$ und einem FOS/TAC von 1,0 zusammen. Auch bei der mesophilen Vergärung von Maissilage führten erhöhte Säurekonzentrationen von über 3 $g * L^{-1}$ nicht zu kritischen Instabilitäten. In der thermophilen Versuchsdurchführung konnte jedoch sowohl für die Monofermentation von Maissilage als auch für die Fermentation der Mischung Gras/Maissilage kein stabiler Betrieb bei hohen Säuregehalten erzielt werden. Andere Parameter wie der pH-Wert oder die Essigsäurekonzentration waren zur Prozessüberwachung deutlich schlechter geeignet.

In der Praxis sind für die mesophile Monofermentation von Grassilage Methanausbeuten von 0,3 kg oTS $* m^{-3} * d^{-1}$ bei einer Raumbelastung von 3 kg oTS $* m^{-3} * d^{-1}$ und einem Abbaugrad von 70 % erstrebenswert. Der thermophile Temperaturbereich ist aufgrund der angesprochenen Ammoniakproblematik nicht zu empfehlen. Bei der mesophilen Monofermentation von Maissilage sind bei gleicher Raumbelastung ein Methanertrag von 0,4 kg oTS $* m^{-3} * d^{-1}$ und ein Abbau um 80 % möglich. Auch hier bietet sich in der Regel der mesophile Temperaturbereich an. Die Unterschiede in Gasertrag und Abbaugrad sind überwiegend mit der höheren Energiedichte bei gleichzeitig geringerem Anteil an schwer bzw. nicht abbaubaren Stoffen von Mais gegenüber Gras zu erklären.

Im Rahmen der Versuche zeigte sich, dass ein nicht unerheblicher Teil der zugegebenen Masse den Reaktor über den Gaspfad verlässt (30 % und mehr). Da dieser Massenaustrag über entstehendes Biogas bei der Modellierung bisher nicht berücksichtigt wird, wurde bereits die Zulaufmenge um die gemessene Biogasproduktion verringert und die Konzentration der jeweiligen Fraktion im gleichen Maße erhöht, damit die entsprechenden Zulauffrachten garantiert werden. Dadurch konnte der Füllstand auch vom Modell reproduziert werden.

Der vielfach in der Praxis zur Prozessüberwachung eingesetzte FOS/TAC-Wert wurde ebenfalls im Modell implementiert, wodurch auch eine Modellkalibrierung mit diesem in der Praxis sehr häufig gemessenem Parameter möglich wird.

Das ADM1 wurde auf lignocellulosehaltige Substrate angepasst. Dazu war zu allererst eine detaillierte Charakterisierung des Substrates vonnöten, wobei sich die aus der Futtermittelanalytik stammende Weenderanalyse mit van-Soest-Fraktion als geeignet herausgestellt hat. Die Überführung der Messwerte in die Bezugsgröße CSB des ADM1 kann über empirische Korrelationen oder über den theoretischen Sauerstoffbedarf (ThOD) erfolgen.

Die Kalibrierung der kinetischen Parameter erfolgte mit Unterstützung des modifizierten Nash-Sutcliffe-Koeffizienten, der eine Bewertung der Simulationsgüte ermöglicht. Anhand dessen konnte der Einfluss der kinetischen Parameter auf die Simulationsgüte gezeigt werden.

Aufbauend auf die Simulationsstudien konnte die Anzahl der angepassten Parameter auf wenige besonders sensible reduziert werden. Sowohl im mesophilen als auch im thermophilen Temperaturbereich zeigte sich, dass bei Grassilage eine Hemmung von Wasserstoff beim Abbau der organischen Säuren früher einsetzt als beim eigentlichen Referenzsubstrat des ADM1 (Faulschlamm aus der biologischen Abwasserreinigung). In beiden Fällen konnte durch eine Anpassung der maximalen Aufnahmerate für Acetat, der Halbwertskonstante für die Wasserstoffaufnahme sowie der Wasserstoffhemmkonstanten für den Propionsäure- bzw.

Butter- und Valeriansäureabbau eine gute Übereinstimmung der Simulationswerte mit den Messwerten erreicht werden.

Für die Simulation der Monofermentation von Maissilage sowie der Mischung aus Mais- und Grassilage zeigten sich die Hydrolyseraten der einzelnen Stofffraktionen für Kohlenhydrate, Proteine und Fette, die maximale Aufnahmerate für Essigsäure und die maximale Aufnahmerate für Propionsäure als besonders sensitiv. Es wird daher empfohlen, bei der Kalibrierung zuerst eine Anpassung dieser Parameter vorzunehmen.

Im Rahmen einer Ökobilanzierung wurden die Treibhausgasemissionen für die Stromerzeugung aus Mais- und Grassilage ermittelt und miteinander verglichen. Die Berechnungen haben ergeben, dass die Stromproduktion aus Maissilage, bezogen auf die Treibhausgasemissionen, umweltfreundlicher ist als die aus Grassilage. Verantwortlich für die Emissionsdifferenz sind vor allem die geringeren Ernteerträge des Grasanbaus bei gleichzeitig höherem maschinellen Aufwand (mehrere Schnitte pro Jahr) und deutlich höherem Stickstoffbedarf. Diese Nachteile des Grases können dabei auch nicht durch die Vorteile bei Saatgut, Pflanzenschutzmittel und Methanaufnahme kompensiert werden. Im Vergleich mit dem deutschen Strommix weisen beide nachwachsenden Rohstoffe erhebliche Einsparpotentiale bezüglich der CO_2-Emission auf.

Teilvorhaben 2: Effizienzsteigerung der NawaRo-Vergärung durch Übertragung der Inokulierung mit LCB-abbauenden Bakterien und von verfahrens- und steuerungstechnischen Optimierungsstrategien in den Technikums- und Praxismaßstab (FKZ 220-11-605)

Ziel des Teilprojektes war die Optimierung der Vergärung nachwachsender Rohstoffe.

In den ursprünglichen Zielsetzungen von IBMN war geplant, im Rahmen des vorliegenden Teilvorhabens 2 zwei gemeinsame Entwicklungen von Projektpartnern in die Praxis zu überführen. Dabei handelte es sich zum Einen um ein Upscaling von im Labormaßstab zu entwickelnden Inokula mit intensiver hydrolysierenden, LCB-abbauenden Bakterien, zum Anderen um eine modellbasierte Prozesssteuerung als Optimierungstool für den Betrieb von Biogasanlagen.

Aufgabe der Schmack Biogas AG im Rahmen des Verbundes war es, die im Labor- und Versuchsmaßstab erarbeiteten Strategien im Technikums- und Praxismaßstab zu verifizieren und erfolgreiche Optimierungsmaßnahmen direkt in die Praxis zu übertragen.

Der NIRS-basierte online-Beobachter kann noch nicht für den Praxiseinsatz empfohlen werden, es konnte auch kein einheitliches Modell für verschiedene Anlagentypen entwickelt werden. Eine Umsetzung in eine modellbasierte Prozesssteuerung war damit nicht möglich.

Für alle zur Untersuchung geplanten Systeme (Gras, Mais, mesophil, thermophil) wurden die Baselines ermittelt und so die versuchstechnischen Voraussetzungen zum Einsatz von Inokula geschaffen. Jodoch ergab die Evaluierung der cellulolytischen Inokula im Durchflussbetrieb durch LfL-ILT keinen Vorteil gegenüber dem natürlichen Aufwuchs. Es wurden daher von LfL-ILT keine Inokula an das vorliegende Teilvorhaben zum Upscaling weitergegeben.

Auch der direkte Zusatz einer cellulolytischen Anreicherung von Partner TUM-MB, die von der Fa. Schmack Biogas in ausreichender Menge hergestellt worden war, in einen Fermenter zeigte keinen positiven Einfluss auf den Prozess.

Das Teilprojekt wurde nach einer vorübergehenden Stilllegung ab 01.12.2008, am 01.01.2009 aufgrund hoher Unwahrscheinlichkeit des Erreichens der Projektziele vorzeitig abgebrochen (Kürzungsbescheid vom 10.12.2009).

Teilvorhaben 4: Erfassung funktioneller hydrolytischer Netzwerke in Biogasanlagen mittels Mikroarraytechnologie (FKZ 220-118-05)

Die Effizienz von Biogasanlagen, die ausschließlich mit Energiepflanzen wie Maissilage betrieben werden, hängt stark von der Hydrolyse von Zellulose, einer der wichtigsten organischen Bestandteile der Pflanzen ab. Zellulose abbauende Mikroorganismen, wurden bisher in sehr vielen unterschiedlichen Taxa nachgewiesen, allerdings ist deren Dynamik und Aktivität in Biogasanlagen bisher weitgehend unerforscht, da entsprechende Methoden fehlen. Für einen optimierten Betrieb von Biogasanlagen, insbesondere für eine gezielte Steuerung der Hydrolyseeffizienz sind solche Fragen aber essentiell. Daher war es das Ziel des vorliegenden Projektes, auf der Basis entsprechender molekularer Informationen ein Mikroarray basiertes System zu entwickeln, mit dem der hochparallele Nachweis von Zellulasen (vor allem der Familie der Glykosylhydrolasen) insbesondere im Hinblick auf deren Diversität und Aktivität in Biogasanlagen möglich ist.

Mit dem entwickelte Mikroarray ist es möglich hochparallel Gene von anaeroben Bakterien und Pilzen in Biogasanlagen zu detektieren die am Abbau von Zellulose beteiligt sind und deren Diversität und Aktivität zu erfassen. Der Mikroarray ist besonders für den Nachweis von Genen der Familien 5, 6, 9 und 48 der Glykosylhydrolasen ausgelegt. Pro Gen wurden bis zu drei Oligonukleotidsonden entwickelt. Insgesamt sind auf dem Mikroarray 756 spezifische Sonden vorhanden, die auf der Basis von Klonbibliotheken aus Amplifikaten der entsprechenden Gene aus Biogasfermentern ausgewählt wurden. Daher ist mit dem Mikroarray nicht nur der Nachweis von bisher kultivierten Zellulose abbauenden Mikroorganismen möglich, sondern auch die Detektion bisher unbekannter Organismen, die in diesem Kontext eine Rolle spielen. Zusätzlich sind auf dem Mikorarray noch die entsprechenden Positiv und Negativkontrollen vorhanden.

Der Array wurde in einem ersten Schritt mittels Reinkulturen validiert und optimiert, bevor er zum Nachweis der entsprechenden Gene in einer zweiphasigen und einphasigen Biogasanlage eingesetzt wurde. Auf der Basis der Ergebnisse konnte erstmals gezeigt werden, dass zwar alle untersuchten Familien der Glykosylhydrolasen in beiden Anlagetypen vorkommen, dass sich deren Abundanzen und Diversität aber deutlich unterschieden Die Konsequenzen für den optimierten Betrieb beider Anlagetypen müssen in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort

Zusammenfassung

Berichte

Kapitel 1: TUM-MB	**FKZ 220-117-05**
Kapitel 2: LFL-ILT	**FKZ 220-115-05** **FKZ 220-119-05b**
Kapitel 3: TUM-SWW	**FKZ 220-119-05a**
Kapitel 4: Fa. Schmack	**FKZ 220-11-605**
Kapitel 5: TUM-BÖ	**FKZ 220-118-05**

Optimierte hydrolytische Bakterien-Kulturen für den Faserabbau in LCB-reichen NaWaRo

Abschlussbericht

FKZ 220-117-05

Laufzeit 01.11.2007 – 31.05.2010

Dr. Wolfgang H. Schwarz

Technische Universität München
Lehrstuhl für Mikrobiologie
Emil-Ramann-Str. 4
D-85350 Freising-Weihenstephan
E-Mail: *wschwarz@wzw.tum.de*
Tel.: +49-89-71-5445

Auftraggeber:	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.
Auftragsdatum:	01.10.2006 FKZ: 22011705
Projektleitung:	Dr. W. H. Schwarz
Bearbeiter:	W. Hiegl, S. Cocuzza, Dr. V. V. Zverlov
Berichtsabschluss:	31.12.2009
Berichtsumfang:	55 Seiten

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis....3
Zusammenfassung....4
Summary....4
1 Ziele....5
1.1 Aufgabenstellung....5
1.2 Stand des Wissens (Stand der Technik)....7
1.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen....8
2 Material und Methoden....9
2.1 Strains and media....9
2.2 Sporulation....9
2.3 Determination of biomass....9
2.4 Recombinant DANN techniques....10
2.5 Sequence analysis....10
2.6 Preparation of cellulose binding proteins....10
3 Ergebnisse und Diskussion....11
3.1 Methodenentwicklung und Vorversuche....11
3.2 Selektion von thermophilen hydrolytischen Kulturen....24
3.3 Selektion von mesophilen hydrolytischen Kulturen....40
3.4 Verwertung....51
3.5 Erkenntnisse von Dritten....51
3.6 Veröffentlichungen....52
3.7 Schlussfolgerungen....52
3.8 Weiterführende Arbeiten....52
4 Literatur....53
5 Danksagung....55

Tabellenverzeichnis

Tab. .... Seite
1 Vergleich der hydrolytischen Aktivitäten im Kultur-Überstand 12
2 Verwendete Oligonucleotidprimer-Sequenzen.... 33
3 Sequenzanalyse der 87 Klone aus einer 16S-rDNA-Genbank 37

Abbildungsverzeichnis

Abb. ..... Seite

1 Abbau gemahlener Maissilage 13
2 Verwendetes Analysegerät der Firma Foss und FiberCaps 14
3 Abbau von Maissilage mit Clostridiengemisch 15
4 Time course for degradation of maize silage 15
5 Hydrolyse von gemahlener und gewaschener Maissilage 16
6 Gasbildung durch Bakterienkulturen auf Maissilage 17
7 Messung von Fermentationsprodukten 18
8 Abbau von Maissilage durch *C. thermocellum* (Anfangs-pH) 19
9 Gärrest aus einer NaWaRo-Anlage 20
10 Abbau von verschiedenen Mengen Maissilage 21
11 Abbau von 2 % (w/w TG) Grassilage 21
12 PCR-Verfolgung der Inokulation mit *C. stercorarium* 22
13 PCR-Verfolgung der Inokulation mit *C. thermocellum* 23
14 Zusammensetzung der verwendeten Substrate 24
15 Kulturenbilder 25
16 Beispiele für angereicherte hydrolytische Mischkulturen 27
17 Beispiele für Mischkulturen im Vergleich mit einer Reinkultur 27
18 Zeitreihe von 4 ausgewählten Kulturen 28
19 Abbau von Maissilage durch unterschiedliche Kulturen 29
20 Stoffwechselprodukte von Clostridium thermocellum 30
21 Gaschromatographische Trennung der Stoffwechselprodukte 31
22a Fermentationsprodukte auf MGS (1) 31
22b Fermentationsprodukte auf MGS (2) 32
23 PCR von Proben-DNA mit spezifischen Primern 34
24 phylogenetischer Stammbaum von 16S rDNA-Sequenzen 35
25 Einteilung der klonierten 16S rDNA-Klone mittels RFLP-Analyse 36
26 Phylogenetischer Stammbaum 37
27 Phylogenetischer Stammbaum 38
28 Dreiösenausstrich auf anaerob präparierte Agarplatten 39
29 Kolonien von C. thermocellum auf einem Hintergrund von Cellulose-Pulver 40
30 Isolierung einer thermophilen Mischkultur 42
31 Screening von mesophilen und thermophilen hydrolytischen Kulturen 42
32 Optimal hydrolytische Kulturen 43
33 Vergleich verschiedener Medien für die Sporulation 44
34 Abbaurate (5d, 55°C) von 0,5 g ungewaschener Maissilage 45
35 Ablaufschema der Präparation und Gelelektrophorese 47
36 Coomassie-Blau-gefärbtes SDS-Proteingel der Cellulose bindenden Proteine 49

Zusammenfassung

Es wurde eine aus Reinstämmen zusammengesetzte synthetische Mischung von *Clostridium thermocellum* und *Clostridium stercorarium* an Maissilage getestet, die ein ähnlich gutes Hydrolyseprofil hatte, wie die beste zur Verfügung stehende Biogasanlagenkultur. Daraufhin wurden aus Umwelt- und Anlagen-Proben optimal hydrolytische Kulturen unter mesophilen und thermophilen Bedingungen angereichert und ihre Eigenschaften analysiert. Ein neues Anreicherungsmedium wurde ausgearbeitet.

Zur Bestimmung des Anteils hydrolytischer (besonders cellulolytischer) Spezies wurde eine molekulare Analyse der phylogenetischen Zugehörigkeit der Hauptvertreter der Bakterien vorgenommen, die wiederum *C. thermocellum* als hauptsächlichen Cellulose-Hydrolysierer identifizierte. Mit der optimal-hydrolytischen Kultur wurde das Optimum von pH und Temperatur bestimmt, um Hinweise auf die Bedingungen für eine optimale Hydrolyse in den Fermentern zu erhalten. Die Fermentationsprodukte wurden analysiert. Eine PCR-Methode zur Bestimmung von *C. thermocellum* und *C. stercorarium* wurde ausgearbeitet und erfolgreich angewendet. Eine Methode zur Sporulierung der hydrolytischen Mischkulturen wurde ausgearbeitet und auf die Konstanz der hydrolytischen Eigenschaft getestet.

Durch Isolierung cellulolytischer Bakterien aus der thermophilen Kultur wurden neue Isolate von *C. thermocellum* isoliert, jedoch keine anderen cellulolytischen Bakterien. Die Bestimmung der Cellulose bindenden Proteine aus der optimal hydrolytischen thermophilen Kultur, eine neuartige Technik zu Bestimmung der in einer Kultur produzierten Cellulasen, enthielt Cellulasen von *C. thermocellum* und *C. stercorarium*, die damit als die Hauptvertreter der cellulolytischen Bakterien identifiziert werden konnten.

Summary

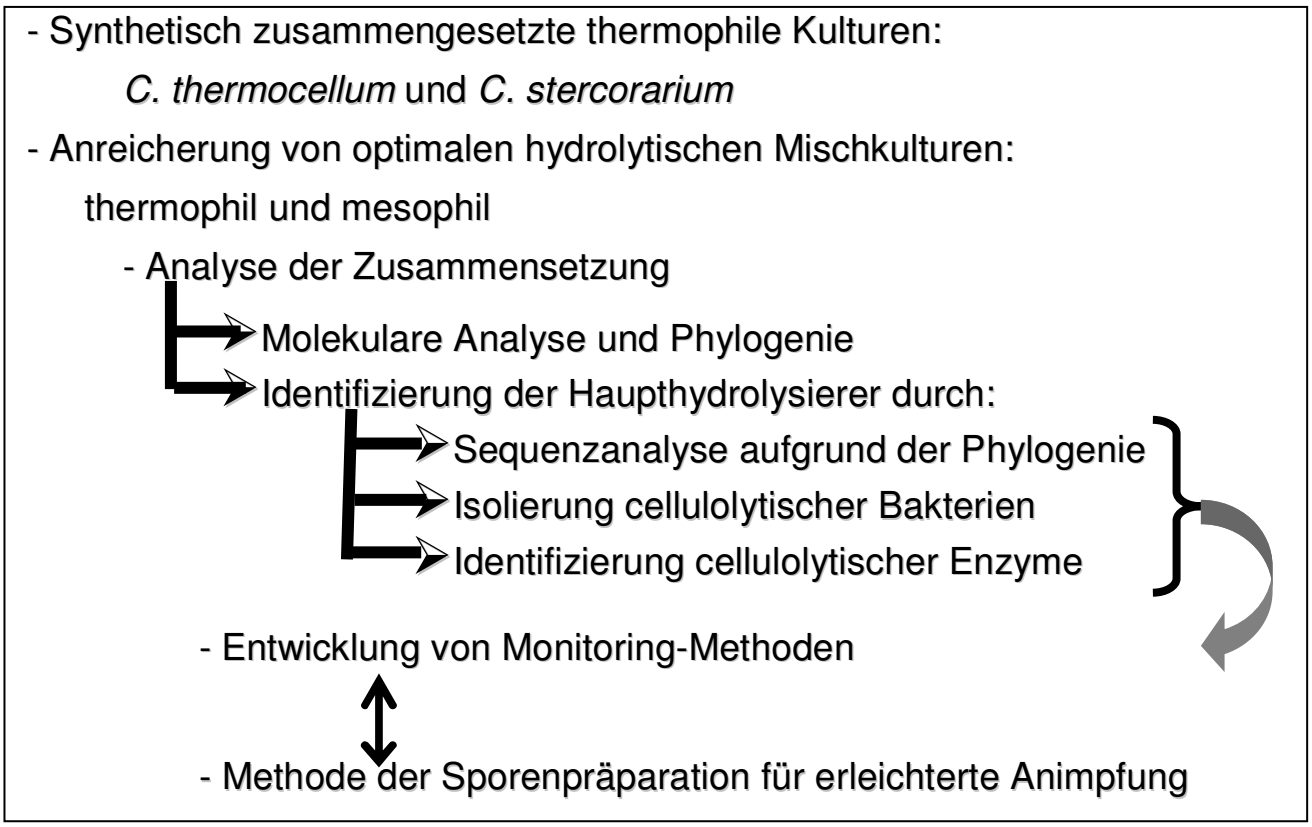
To identify the hydrolysis potential of cellulolytic bacteria, a mixture of pure type cultures of *Clostridium thermocellum* and *C. stercorarium* was tested on maize silage. This mixture showed as similarly good hydrolysis profile as the best bacterial mixed cultures from biogas plants. From samples collected from the environment and from biogas fermenters optimally hydrolytical cultures were enriched by microbiological technology under mesophilic and thermophilic conditions on grass and maize silage. Their characteristics were analyzed. Under mesophilic conditions, a sufficiently well hydrolyzing culture could not be isolated on grass silage. A medium for culture enrichment was developed for biogas cultures.

The content of the thermophilic enriched culture for hydrolytic, especially cellulolytic species was determined by phylogenetic analysis of the major species. The major hydrolytic species proved to belong to *C. thermocellum*. The pH and temperature optimum of the optimally hydrolytic culture was determined to identify the optimal hydrolytic conditions for a biogas process. The fermentation products were identified. A PCR method for detecting *C. thermocellum* and *C. stercorarium* was developed and successfully tested for monitoring. A protocol for sporulating the mixed hydrolytic culture was worked out and shown to maintain the hydrolytic ability of the culture.

By purifying cellulolytic bacteria from the thermophilic culture strains isolates of *C. thermocellum* were isolated, however no other species. The identification of cellulose binding proteins yielded protein sequences from *C. thermocellum* and *C. stercorarium*. These two species could therefore be identified as the major cellulolytic bacteria in biogas cultures.

I Ziele

I.1 Aufgabenstellung



Programmpunkte:

1.1. Auswahl und Mischung eines synthetischen Bakterienmixes aus definierten Reinstämmen;

1.1.1. Auswahl der thermophilen hydrolytischen Species *Clostridium thermocellum* und *Clostridium stercorarium* nach Literaturdaten und Voruntersuchungen der Eignung für den Abbau der im Projekt verwendeten Substrate

1.1.2. Feststellung sehr guter hydrolytischer Aktivität; Etablierung der van-Soest-Analyse im Labor; Messung von Abbaukinetiken und Fermentationsprodukten (haupts. Ethanol und Acetat)

1.1.3. pH-Abhängigkeit des Abbaus: Optimaler Abbau von Maissilage nur bei Anfangs-pH der Kultur > 6,8 (bis pH 8,0 ok); bei Anfangs-pH < 6,1 weniger als die Hälfte des Abbaus; der End-pH liegt deutlich niedriger

1.1.4. Etablierung eines geeigneten Gärrest-Mediums mit guter Pufferkapazität im Aktivitätsbereich und mit der Eigenschaft, die Kulturbedingungen in der Biogasanlage möglichst nah nachzuahmen

1.1.5. Erstellung spezifischer Oligonukleotidprimer für eine PCR-Nachweismethode von *C. thermocellum* und *C. stercorarium*; Nachweis der Kulturen im Fermenter fehlgeschlagen

1.1.6. Übergabe von Kulturen an LfL und Animpfung von Versuchsfermentern (Ergebnisse werden im Bericht der LfL dargestellt)

1.1.7. Verfolgung des Animpferfolgs auf molekularbiologischer Ebene: PCR mit spezifischen Primern: die angewendete Methode war anfangs (kurz nach Animpfung) erfolgreich, später aber zu wenig empfindlich (Ausdünnung der angeimpften Kultur)

1.2. Selektion von thermophilen hydrolytischen Kulturen mit optimaler Aktivität;

1.2.1. Anreicherungsmedium ausgetestet mit Zusatz von flüssigem Gärrest: hohe Pufferkapazität und daher pH-Stabilität, hoher Nährstoffgehalt, gutes Bakterienwachstum über einen weiten Bereich unterschiedlicher Bakterien: das Medium wie in 1.1.4. beschrieben ist geeignet

1.2.2. Proben gesammelt von Standorten mit verrottender Biomasse, bes. von Kompost und Tiermist (u.a. Tierpark), auch von Biogasanlagen; Anreicherung hydrolytischer Kulturen mit Mais- bzw. Grassilage auf 60 °C; Messung des Abbaugrades an Mais- bzw. Grassilage

1.2.3. Fermentationsprodukte der optimalen thermophilen Kultur wurden gemessen (haupts. Ethanol und Acetat, wenig Butyrat, Propionat, Isovalerat. etc.)

1.2.4. 16S-rDNA-Bank der thermophilen Anreicherungskultur wurde sequenziert: hauptsächlich sekundäre Fermentierer identifiziert, z.B. *C. thermosuccinogenes*; *C. thermocellum* als hydrolytisches Bakterium ebenfalls identifiziert

1.2.5. Isolierung thermophiler hydrolytischer Bakterien: cellulolytische Reinkulturen von *C. thermocellum* konnten gewonnen werden

1.3. Selektion von mesophilen hydrolytischen Kulturen mit optimaler Aktivität

1.3.1. Proben von 1.2.2. wurden hier ebenfalls mit Erfolg zur Selektion hydrolytischer Kulturen eingesetzt

1.3.2. Auf Grassilage konnten aus keiner der Proben befriedigend hydrolytische Kulturen angereichert werden

1.3.3. Anreicherungen auf 60 °C waren deutlich besser (vor allem mit höherer Abbaurate) als die besten Kulturen auf 37 °C; auf Maissilage konnte guter Abbau erzielt werden (mit auf Maissilage angereicherten Kulturen), nicht dagegen auf Grassilage (mit auf Grassilage angereicherten Kulturen)

1.3.4. wegen der schlechteren Ergebnisse als bei den thermophilen Kulturen wurde mit den thermophilen Kulturen weiter gearbeitet

1.4. Methode zur Konservierung der hydrolytischen Kulturen mit Sporulation

1.4.1. Austesten unterschiedlicher Sporulationsmedien für Clostridien; Verwendung des Monot-Mediums für die Präparation der Sporen

1.4.2. Animpfung von Testkulturen mit Maissilage zur Überprüfung der Abbau-Effizienz der sporulierten Kulturen – die Abbaueffizienz nimmt nicht ab; vorläufige Ergebnisse zeigen, dass sich die Zusammensetzung der Kultur durch diese Methode nicht ändert

1.4.3. Übergabe von Sporensuspensionen an die Projektpartner: durch Zugabe von konzentrierten Sporensuspensionen wird bei der Animpfung eine große Zahl lebensfähiger Hydrolysierer eingebracht und die Zusammensetzung der Testfer-

menter nicht durch das Einbringen großer Mengen Flüssigkeit, Substrat oder Puffersubstanzen geändert

1.5. Identifizierung hydrolytischer Schlüsselenzyme

1.5.1. Neuentwicklung einer Methode zur Aufreinigung von an Cellulose bindenden Proteinen (cellulolytische Enzyme); MALDI-TOF und Ansequenzierung von Einzelpeptiden mit Methoden aus der Proteomik

1.5.2. Identifizierung der Haupthydrolysierer für Cellulose: Bestimmung der Produzenten durch Ansequenzierung von Peptiden und Vergleich mit Datenbanken; Identifikation von *C. thermocellum* und *C. stercorarium* als hauptsächliche Hydrolysierer in einer ausgewählten Kultur

I.2 Stand des Wissens (Stand der Technik)

Hemicellulose und Cellulose machen bei Substraten wie Mais (Ganzpflanze), Kleegras oder Grünschnitt nahezu den gesamten potentiell vergärbaren Anteil der Biomasse aus. Da insbesondere die Cellulose, aber auch ein Großteil der Hemicellulose (incl. ß-1,3-1,4-Glucan, Arabino- und Glucuronoxylan, Xyloglucan, Glucuronan, Mannan, Pectin etc.) in pflanzlichen Zellwänden in unlöslicher Form vorliegen (gebunden oder kristallin), ist ein Aufschluss mit rein biologisch-enzymatischen Mitteln relativ schwierig und nur mit sehr langen Verweilzeiten zu erreichen. Deshalb muss die biologisch-enzymatische *in-situ*-Hydrolyse so optimiert werden, dass sie vor Ort in der Biomasse-Fermentation rentabel und effektiv eingesetzt werden kann.

Über die faser-hydrolytischen Enzymsysteme in natürlichen Mikroorganismen-Konsortien ist bisher sehr wenig bekannt, obwohl zur Gesamtzusammensetzung der Biogaskulturen im Fermenter Untersuchungen durchgeführt worden sind. Es kann vorausgesetzt werden, dass der Hauptabbau der Fasern durch ein synergistisches Zusammenspiel zwischen vielen verschiedenen, fast ausschließlich Gram-positiven anaeroben Bakterien und evtl. auch micro-aerophilen Pilzen stattfindet: ein interagierendes Netzwerk von Organismen und Enzymen ist notwendig. Auch über die phylogenetische Zusammensetzung der beteiligten Bakterien besteht noch großer Forschungsbedarf, da die Bakterien oft nicht kultivierbar sind und damit im Labor nicht in klassischer Weise untersucht werden können. Dies gilt in besonderem Maße für die güllefreie Flüssigfermentation. Besonders über die thermophilen Mikroorganismen-Gemeinschaften, ihre Zusammensetzung und die enzymatisch-hydrolytischen Aktivitäten lagen zu Beginn des Projektes noch keinerlei Informationen vor. Allerdings können aus den Untersuchungen der Enzymsysteme der mesophilen hydrolytischen Bakterien (*Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. etc.) im Pansen der Rinder, sowie aus den eigenen Untersuchungen an den thermophilen, anaeroben Bakterien *Clostridium thermocellum* und *C. stercorarium* (beide aus verrottender pflanzlicher Biomasse) für das Projekt relevante Schlüsse gezogen werden: die anaeroben Bakterien, aber auch einige anaerobe Pilze produzieren einen extracellulären, zellgebundenen Enzymkomplex, das Cellulosom, das fest auf der Substratoberfläche haftet und damit auch die Bakterien an die Oberfläche bindet. Dies erschwert einerseits die Untersuchungen aus dem substratfreien Kulturüberstand, ermöglicht aber andererseits eine Fraktionierung der hydrolytischen Bakterien und Enzyme für Untersuchungen (siehe eigenen Review-Artikel in der Literaturliste oder URL: http://www.wzw.tum.de/mbiotec/).

Der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen einzelner Bakterien-Species oder –Gruppen und ihrer Funktion für eine optimale Umsetzung angebotener NawaRos konnte aus den vor Beginn des Projektes vorliegenden Untersuchungen nicht hergestellt werden. Aufgrund der Physiologie einiger gut untersuchter Arten konnten aber begründete Vermutungen für die vorgeschlagenen Untersuchungen angestellt werden: es arbeiten immer viele verschiedene Mikroorganismen bei der Hydrolyse und Umsetzung in Stoffwechselprodukte zusammen. Mit den hier angewandten Methoden sollte einerseits die Identität der Haupt-Enzymproduzierer und andererseits deren Aktivität in Praxisfermentern untersucht werden. Dies ermöglicht im besten Fall die Entwicklung einer rationalen Steuerung des Prozesses so, dass die optimal aktiven Mikroorganismen gefördert werden und in der notwendigen Anzahl vorhanden sind, sowie evtl. störende oder hemmende Begleitflora unterdrückt wird. Die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Mikroorganismen(-gruppen) sind komplex und haben sich in dem sehr beschränkten Rahmen dieses Projektes nicht in allen Einzelheiten aufklären lassen; doch sind im Laufe des Projektes einige Schlüssel-Spezies für die Hydrolyse und die mit ihnen optimal interagierenden acidogenen und methanogenen Bakterien aufgespürt worden. Das enzymatische Zusammenspiel der Enzymkomplexe der Haupthydrolysierer mit den Exoenzymen anderer Bakterien ist noch ein völlig unbearbeitetes, aber sicher sehr lohnendes Feld der Systembiologieforschung und wird nur in einem engen Zusammenspiel zwischen enzymorientierter Biochemie und klassischer und molekularer Mikrobiologie aufgearbeitet werden können. Die hier gewonnenen Ergebnisse sind eine gute Basis für solch ein Verbundforschungsvorhaben

Die Routinemethoden zur Bestimmung von Cellulose, Hemicellulose, unlöslichem Fasergehalt, Lignin und Asche in dem eingesetzten LCB-Material über ADF- und NDF-Analytik etc. waren ausreichend, um die gewünschten Aussagen für die Effizienz der Hydrolyse im Rahmen dieses Projektes zu treffen. Sie sind durch eine neue Methode zur Proteinbestimmung cellulolytischer Enzyme ergänzt worden. Die Identifizierung der Bakterien und der hydrolytischen Enzyme, sowie die Zuordnung bestimmter Enzymklassen zu Bakteriengattungen erfolgte durch molekularbiologische, Metagenomik-, Proteomic- und Bioinformatik-Methoden.

Geschützte Verfahren und Schutzrechte wurden für die Durchführung des Vorhabens nicht benutzt.

I.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Es hat eine permanente und intensive Zusammenarbeit über die gesamte Laufzeit des Projektes mit dem LfL-ILT stattgefunden, sowohl auf der Ebene der Projektleiter wie auch der Mitarbeiter: Austausch von Proben, Substraten oder Gärrest; Projektplanung und Abstimmung der Fermenterbelegung; gemeinsame Interpretation der Ergebnisse, Analyse von Proben, Probenvorbereitung (an LfL-ILT und LfL-AQU) u.v.a.m..

Eine enge Abstimmung hat es auch mit dem Projektpartner IBÖ gegeben, insbesondere haben wir ausführliche Hilfestellung zur Planung der Genauswahl und des zentralen Organismus *C. thermocellum* als Haupthydrolysierer, sowie zur Festlegung der geeigneten Gene bzw. Genteile für die Sondenkonstruktion gegeben.

Herr Dr. Kellermann (MPI Biochemie, Martinsried) hat intensiv bei der Analyse und Identifikation der isolierten Proteine mitgewirkt.

II Material und Methoden

II.1 Strains and media:

Type cultures of *Clostridium thermocellum* (DSM 1237) and *Clostridium stercorarium* (DSM 8532) were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). They were grown in GS2 medium with 0.5 % (w/v) cellobiose as carbon source [Johnson et al., 1982]. *E. coli* clones were grown in LB-medium with the appropriate antibiotics at 37 °C in accordance with standard laboratory procedures.

In addition to samples from biogas plants from throughout the state of Bavaria, Germany, samples were collected in the area of Freising and Munich (both in Southern Bavaria) from decomposing plant material such as compost heaps, commercial compost fermenter, cattle manure, garden soil, bushes and agriculturally used plots, and biogas fermenters. Samples were pasteurized (80 °C for 20 min) to inactivate vegetative cells, fungi, nematodes, and ciliates in order to select for hyperthermophilic and spore forming bacteria, which contain the majority of the polysaccharide hydrolyzing bacteria. Bacterial mixed co-cultures were grown in GS2 medium in pre-reduced, rubber stoppered 50 ml bottles containing 2 % (dry w/v) silage (air-dried maize silage from whole plant or grass silage from permanent grassland). This mixture was ground to a final grain size of 2 mm with a cutting mill (Retsch, Germany) to ensure representative composition in each sample. The flasks were incubated at 37, 55 and 60 °C as indicated. They were not constantly shaken but degassed and shaken manually once a day.

To isolate purified bacterial cultures, samples were streaked to single colonies under strictly anaerobic conditions on GS2-agar plates with a 5ml-overlay of GS2-agar containing 2 % (w/v) of crystalline cellulose MN301 as an indicator for cellulolysis. Single colony purification was repeated 3 times.

II.2 Sporulation:

To 50 ml GS2 medium 0.2 % (w/v) filter paper Whatman No. 1 was added as carbon source. Cultures were incubated at 55 °C for 5-7 days until cellulose was degraded completely. As a reference, a non-incubated bottle was included in every series. The bottles were then placed in a cold room (4-6 °C) for 24-48 hrs. Spore formation was controlled microscopically. The bottle content was centrifuged at 4 °C, 5000 rpm for 25 min, and washed twice with 50 ml H_2O (bidest). The spore containing pellet was resuspended in 5 ml H_2O (bidest) and stored at 4°C. Spores were reactivated by incubation with substrate in a buffered medium (usually GS2) and incubation at 55 °C. Other media tested for sporulation were those described by Monot *et al.* ([1982) and Tortora *et al.* (1985), and the CAMM [Long et al., 1983] and CM3 medium [Johnson et al., 1982].

II.3 Determination of biomass:

0.5 g of finely ground air-dried silage (2 mm sieve) was dispersed in 50 ml pre-reduced medium (GS2). Bottles were sealed with butyl-rubber stoppers. After sterilization, all bottles except the control were inoculated and incubated at the respective temperature for 7 days, unless indicated otherwise. To measure the biomass content, bottles were emptied into Fibre Caps (nylon filter by Foss, Fibercap system 2023, pore width 23 µm). The caps were dried at 100 °C over night and the dry weight was determined. In accordance with the protocol of the manufacturer (Foss, Germany) the fiber material was subjected to van Soest analysis to determine neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin (ADL) (Goering et al., 1970; van Soest et al., 1991). The content of

cellulose, hemicellulose and ash+lignin was calculated from these values.

II.4 Recombinant DNA techniques:

Preparation of chromosomal and plasmid DNA, endonuclease digestion, ligation, and transformation was carried out by standard procedures or in accordance with supplier protocols. Chromosomal DNA from culture samples was prepared using the Presto Spin D Bug DNA Purification Kit (Molzym, Germany) or using the standard chloroform-phenol extraction method. Plasmid DNA was prepared with the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany). Restriction digests of DNA were performed as per manufacturer recommendations (MBI Fermentas or Boehringer Ingelheim Bioproducts).

II.5 Sequence analysis:

PCR amplification, cloning, and sequencing of the 16S rRNA gene were performed with bacteria-specific oligonucleotide primers as described in Berezina *et al.* (2008). PCR fragments of the 16S rRNA gene were digested with restriction endonucleases *Bsu*RI and *Hin*6I and the band pattern was analyzed by electrophoresis in 12 % polyacrylamide gel slabs. PCR fragments were cloned in Topo TA Cloning vector DNA (Invitrogen) and transformed in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* cells (Invitrogen). At least two clones from each PCR-RFLP group were sequenced from both ends, and manually connected and aligned with the ARB software program [Ludwig et al., 2004; Zverlov et al., 2005]. Sequences were deposited at the EMBL Nucleotide Sequence Database (successive accession numbers from FN868398 to FN868437).

II.6 Preparation of cellulose binding proteins:

500 ml bacterial culture was centrifuged (5000 g, 15 min, 4 °C) and the supernatant was incubated overnight at 4 °C with 100 mg/ml PASC (phosphoric acid swollen cellulose). After centrifugation (13.000 g, 15 min, 4 °C) the pellet was resuspended in protein loading buffer. The protein composition was analyzed by denaturing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and staining with Coomassie Brilliant Blue G-250.

Protein identification by MALDI-TOF/TOF was performed as previously described in Zverlov *et al.* [2005].

III Ergebnisse und Diskussion

III.1 Methodenentwicklung und Vorversuche

III.1.1 Auswahl und Mischung definierter hydrolytischer Species

Erste Aufgabe im Projekt war die Auswahl geeigneter hydrolytischer Bakterien, sowie die Mischung eines synthetischen Bakterienmixes aus definierten Reinstämmen, die zur effizienten Hydrolyse der Polysaccharide in Biomasse geeignet ist. Anschließend sollte diese Mischung in einem Fermenteransatz mit den im Projekt bearbeiteten Substraten getestet werden.

Als relativ leicht hydrolysierbar gelten die größtenteils hydratisierbaren Polysaccharide Arabino- und Glucuronoxylan, Pectin, Amylopektin, sowie andere teilweise sogar löslichen Hemicellulose-Arten wie Galactomannan etc.. Ihre Struktur ist irregulär und daher meist nicht kristallin. Zwar ist eine Vielzahl von Enzymen für ihre Hydrolyse notwendig, doch kann diese Mannigfaltigkeit der Enzymtypen durch eine bakterielle Biozönose, wie sie in einer Biogasanlage vorliegt, ohne Zweifel leicht bereitgestellt werden. Allerdings kann auch hier erwartet werden, dass die richtige Bakterienzusammensetzung eine Steigerung der Aktivität bewirken kann. Von einem Großteil der Hemicellulose wurde zu Anfang des Projekts jedoch erwartet, dass sie relativ rasch umgesetzt wird. Dies ist jedoch nach den Ergebnissen der hier vorgenommenen Untersuchungen nicht der Fall.

Cellulose in ihrer natürlichen, kristallinen Form ist das bei weitem am schwierigsten enzymatisch angreifbare Polysaccharid in der Pflanzenzellwand. Dies liegt trotz der chemischen Einheitlichkeit der Bindungen (ausschließlich ß-1,4-glucosidisch und damit unverzweigt) wohl hauptsächlich an ihrer Kristallinität, die zu einer sehr schlechten Zugänglichkeit der Substratmoleküle für die Enzyme führt und damit zu einer um mindestens 3 Zehnerpotenzen verringerten Umsetzungsgeschwindigkeit. Die Substratmoleküle müssen zunächst aus dem Kristallverbund herausgelöst werden und sodann in einem für Enzyme ungewöhnlichen Vorgang prozessiv abgebaut werden. Dabei ist ein starkjer Synergismus zu beobachten, d.h. dass die Summe der Aktivität der Einzelenzyme bei weitem geringer ist als die tatsächlich beobachtbare Aktivität. Die Enzyme müssen dabei in sinnvoller Weise aufeinander abgestimmt zusammenarbeiten. Dieser Synergimus der Enzyme kann bei *C. thermocellum* das bis zu 20-Fache der Einzelaktivitäten betragen. Wegen der notwendigen Zusammenarbeit der Enzyme kann auch postuliert werden, dass nicht einfach eine Vielzahl von Bakterien, die einzelne Cellulasen produzieren, zusammen eine effiziente Hydrolyse bewirken (das kann beim Hemicellulose-Abbau so sein), sondern dass einzelne Bakterien auf den Abbau von Cellulose spezialisiert sind. Dies scheint nach den Ergebnissen dieses Projektes auch so zu sein.

Wegen dieser Schwierigkeiten wurde das Schwergewicht der Untersuchungen auf die Cellulose-Hydrolyse gerichtet. Auch gibt es nur wenige Bakterien-Spezies, die Cellulose effizient hydrolysieren können. Die überwiegende Mehrzahl dieser Bakterien befindet sich in der Gruppe der Firmicutes, Gram-positive Bakterien mit relativ niedrigem GC-Gehalt in der DNA. Die Mehrzahl dieser Bakterien, insbesondere unter den anaeroben Bakterien, sind Sporenbildner. Die anaeroben und fakultativ-anaeroben Vertreter vergären Zucker unter anaeroben Bedingungen in eine Mischung aus verschiedenen Säuren und Alkoholen. In der Regel wird auch Gas (CO_2 und H_2) gebildet. Die cellulolytischen Bakterien bilden die Energie für die aufwändige Produktion der großen Menge an Exoenzymen, die für den Celluloseabbau notwendig sind, aus diesen Fermentationen. Die durch die Hydrolyse freigesetzten Zucker werden aber auch von anderen saccharolytischen Bakterien vergoren; außerdem werden die Stoffwechselprodukte dieser Bakterien durch syntrophe Bakterien unter Energiegewinnung weiter umgesetzt; diese beiden Bakteriengruppen sind nach den Ergebnissen dieser und anderer Studien bei weitem in der Überzahl. Die niedrige Anzahl der

hydrolytischen Bakterien ist es jedoch, die den Abbaugrad der Biomasse und damit die Effizienz der Biogasanlage entscheidend bestimmen.

Einige dieser Bakterien sind bekannt[1]. Die Auswahl geeigneter hydrolytischer Bakterien erfolgte aufgrund von Literaturdaten, sowie von eigener Laborerfahrung mit solchen Bakterien. Ihre hydrolytische Aktivität wurde an den im Projekt verwendeten Substraten getestet. Zudem wurden die Rahmenbedingungen für eine optimale Hydrolyse, sowie einige methodische Grundvoraussetzungen für die Analyse der Daten in diesem Projektteil erarbeitet. Die Mischung der Bakterien wurde an den Projektpartner LfL-ILT übergeben und die Versuche gemeinsam geplant und ausgewertet. Die Ergebnisse dieses Projektteils hatten auch Einfluss auf die Entwicklung der beim Projektpartner IBÖ entwickelten molekularbiologischen Sonden.

III.1.1.1 Auswahl zweier thermophiler hydrolytischer Species

Als besonders geeignet erschienen die beiden thermophilen, anaeroben Bakterien *Clostridium thermocellum* und *Clostridium stercorarium*. Diese beiden Bakterienspecies sind beide weit verbreitet und kommen hauptsächlich in Habitaten vor, in denen verrottende oder verrottete pflanzliche Biomasse zu finden ist. In der Tabelle 1 sind die extracellulären Enzymaktivitäten dieser beiden Spezies aufgelistet. Es ist deutlich zu sehen, dass die cellulolytischen Aktivitäten von *C. thermocellum* deutlich ausgeprägt sind (z.B. pNP-Cellobiosid-Hydrolase), während *C. stercorarium* mehr die hemicellulolytischen Aktivitäten ins Medium sekretiert.

Substrate	***C. thermocellum*** (mU/ml)	***C. stercorarium*** (mU/ml)
microcrist. cellulose	2	2
phosphoric acid swollen cellulose	13	10
carboxymethyl cellulose (CMC)	140	120
1,3-1,4-ß-glucan (lichenan)	6.500	12.000
arabino-xylan	3.000	20.000
*p*NP-ß-glucopyranoside	1,3	7
*p*NP-ß-cellobioside	12	1,7
*p*NP-ß-xylopyranoside	0,3	2
*p*NP-α-arabinofuranoside	1,3	21
	activity in cell free culture fluid (grown on cellobiose)	

Tabelle 1: Vergleich der hydrolytischen Aktivitäten im Kultur-Überstand der Typstämme von *C. thermocellum* und *C. stercorarium* gewachsen auf Cellobiose. Zellfreie Überstände wurden mit den genannten Substraten inkubiert und die Aktivität der Enzyme durch Bestimmung der reduzierenden Zucker mit dem Dinitrosalicylsäure-Reagenz (oberer Teil der Liste) bzw. von p-Nitrophenol (unterer Teil) gemessen.

[1] Siehe z.B. die Liste in http://www.wzw.tum.de/mbiotec/cellmo.htm

Zudem ist zu bemerken, dass *C. thermocellum* nur Cellobiose und Cellodextrine als Fermentationssubstrat verwerten kann (auch keine Glucose!), während *C. stercorarium* alle Zucker gut fermentiert. *C. thermocellum* ist also ein Spezialist für den Abbau von Cellulose, was sich auch in der Vollständigkeit des Cellulose-Abbau bemerkbar macht. *C. stercorarium* dagegen ist auf Hemicellulose spezialisiert. Im Abbau von pflanzlicher Biomasse, in der beide Substanzen vorkommen, sollten sich diese beiden Bakterienspezies also gut ergänzen.

Beide Bakterien-Reinkulturen wurden mit der im Projekt verwendeten Maissilage inkubiert. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung zu sehen. In der unbeimpften Kultur wird durch die Inkubation bei 55 °C ebenfalls ein Teil des Substrates „solubilisiert“ (ca. 38 %). Dies ist jedoch auf die Analysemethode zurückzuführen: Das durch ein 1mm-Sieb gemahlene getrocknete Substrat wird in Flüssigkeit (Bakterienmedium) aufgenommen und 5 Tage bei erhöhter Temperatur mit und ohne Bakterien inkubiert. Durch Abfiltrieren in Fibre-Caps (Fa. Foss, Nylon-Netz mit 20 µm Porenweite) und leichtes Waschen mit destilliertem Wasser gehen sowohl lösliche Substanzen wie auch einige feine Fasern durch die Maschen des Netzes verloren. Dieser „Nullwert“ muss von allen Proben abgezogen werden. Der Gewichtsverlust des Substrates (TM) durch *C. thermocellum* betrug 80%, der durch *C. stercorarium* 64%, also etwas weniger (Abb. 1).

Der hohe Anteil der löslichen und der Mikrofaser-Anteile am Substrat wurde in den meisten folgenden Versuchen durch Auswaschen des Substrates vor dem Versuchsbeginn stark verringert.

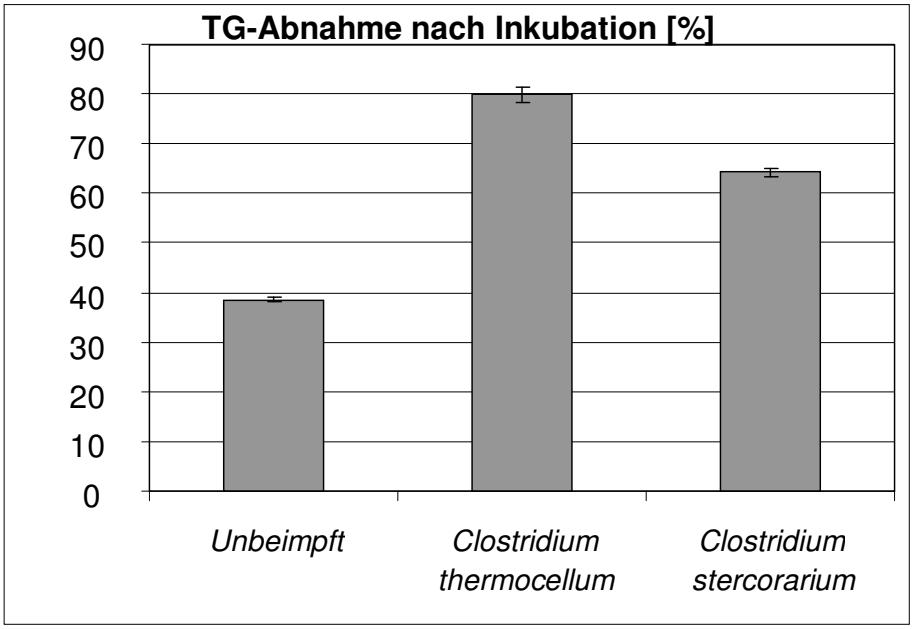


Abb. 1: Abbau gemahlener Maissilage durch *C. thermocellum* und *C. stercorarium*.

III.1.2 Messung der hydrolytischen Aktivität, Etablierung der van-Soest-Analyse

Für die Messung der Abbauaktivität wurde das Gerät FiberCap 2021/2023 der Firma Foss für die van-Soest-Analyse der Biomassefasern beschafft (Abb. 2) und die damit mögliche zugelassene Methode der Biomasse-Faseranalytik im Labor etabliert. Die gemessenen Werte für lösliche Kohlehydrate (Weender-Analyse; auch NFC, non fiber carbohydrates), NDF (neutral detergent fibre), ADF (acid detergent fibre) und ADL (acid detergent lignin) waren sehr gut reproduzierbar. Da wir die Veraschung der ADL-Fraktion nicht durchgeführt haben, ließen sich daraus die Fraktionsanteil

der Biomasse errechnen: lösliche Fraktion, Hemicellulose, Cellulose und (Lignin+Asche). Mit dieser Analytik wurden die Faser-Inhalts-Werte für das Projekt bestimmt.

FiberCapTM 2021/2023

Abb. 2: Verwendetes Analysegerät der Firma Foss und FiberCaps für die Substrat-Aufbereitung

In der folgenden Abbildung ist als Beispiel der erste Versuch mit dem Abbau von ungewaschener Maissilage durch das binäre Clostridien-Gemisch analysiert. Man sieht deutlich, dass der Anteil an löslichen Bestandteilen drastisch abgenommen hat (von 31 % auf 5 % w/w), und dass Hemicellulose und Cellulose deutlich und statistisch begründbar abgenommen haben. Der Lignin+Asche-Anteil dagegen hat kaum abgenommen.

Anschließend wurde unter optimierten Bedingungen (55 °C, 2 % w/w TG an Substrat, GR-Medium) die Abbaukinetik durch *C. thermocellum*, *C. stercorarium* und das Gemisch dieser beiden Spezies analysiert (Abb. 3). Es stellte sich heraus, dass *C. stercorarium* nach einer lag-Phase von etwas mehr als 20 Stunden sehr rasch einen hohen Abbaugrad erreicht (70 % in ca. 60 Stunden). Dies ist wahrscheinlich auf die bessere Verfügbarkeit des Hemicellulose-Anteils am Substrat zurückzuführen, was dem Bakterium ein sehr schnelles Hochwachsen ermöglicht. Dazu trägt seine Fähigkeit bei, neben den Hexosen Glucose, Fructose, Mannose und Galactose auch die in Hemi-

cellulosen häufigen Pentose-Zucker Xylose und Arabinose zu verstoffwechseln. Im Endeffekt ist der erreicht Abbau jedoch nur ca. 63 % des Substrats – eine Folge wohl des deutlich schlechteren Cellulasesystems.

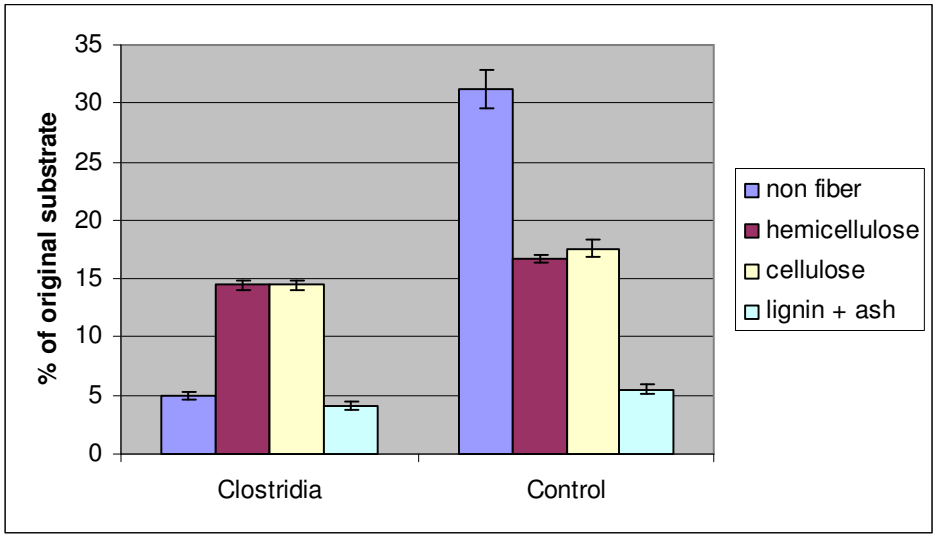


Abb. 3: Abbau von Maissilage mit Clostridiengemisch aus *C. thermocellum* und *C. stercorarium*, gemessen mit van-Soest-Analyse.

C. thermocellum dagegen baut anfangs das Substrat deutlich langsamer ab, was daran liegen könnte, dass er zwar Hemicellulase besitzt, jedoch die entstehenden Pentose-Zucker nicht zur Energiegewinnung nutzen kann – er hat damit eine deutlich längere lag-Phase und kann weniger schnell hochwachsen. Allerdings erreicht er am Ende (nach 120 Std.) einen deutlich höheren Abbaugrad von ca. 78% der Fasern (Abb. 4). Ein Gemisch der beiden Bakterien kann das Substrat sowohl schnell als auch vollständig hydrolysieren (Abb. 5).

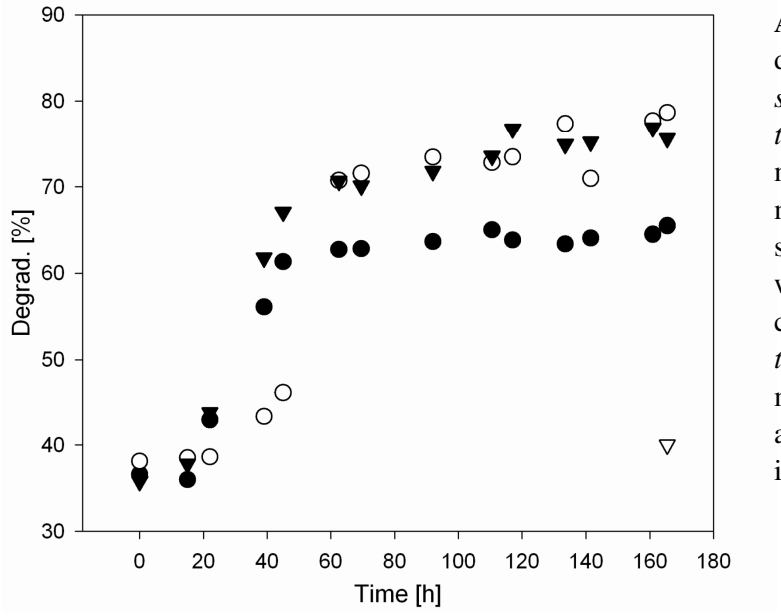


Abb. 4: Time course for degradation of maize silage by *C. stercorarium* (CST), *C. thermocellum* (CTH), and a mixture of both (MC), resp., measured as decrease of dry substance in substrate after washing (T = 60 °C). Filled circle, *C. stercorarium*; circle, *C. thermocellum*; filled triangle, mixed culture of C. *stercorarium* and *C. thermocellum*; triangle, no inoculation (control).

Die Kurven in Abb. 5 zeigen deutlich eine weitere Eigenschaft des enzymatischen Abbaus von pflanzlichen Fasern, nämlich ein biphasisches Verhalten: während nach Anwachsen der Bakterien eine sehr schnelle Abbauphase zu beobachten ist, werden nach etwa 55 Std (nach Animpfung) weitere Anteile des Substrats nur noch sehr langsam hydrolysiert. Von „Hydrolyse“ kann bei den hier gezeigten Messungen allerdings nur bedingt die Rede sein, da, bedingt durch den Waschschritt im Nylonfilter, auch ausgewaschene Mikrofasern als „Abbau“ mitgemessen werden, die strenggenommen nur eine Mobilisierung durch Faser-Disintegration darstellt. Dies wird jedoch ebenfalls unter „Faserabbau“ und „Hydrolyse“ subsummiert, da es genauso gut ein Effekt des enzymatischen Faserabbau ist – ohne enzymatische Aktivität keine solche Mobilisierung.

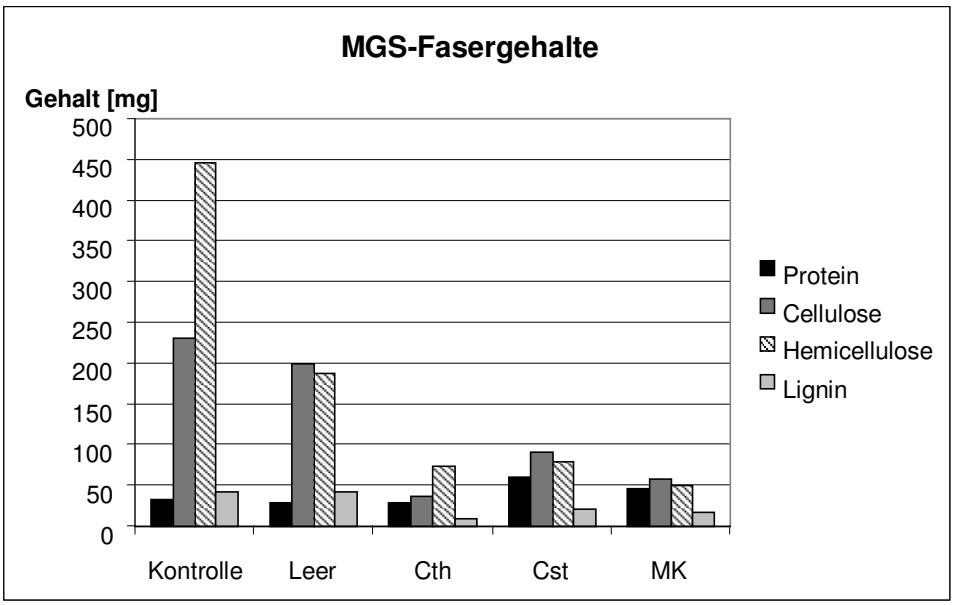


Abb. 5: Hydrolyse von gemahlener und gewaschener Maissilage. Analyse durch van-Soest-Analyse. MK, Mischkultur der beiden Clostridien-Stämme.

Das Material aus den Endpunkten der in Abb. 4 gezeigten Abbaukinetik wurde einer van-Soest-Analyse unterzogen, die nun, da das Substrat vor dem Einsatz gewaschen war, andere Werte ergab (Abb. 5). Der Unterschied zwischen Kontrolle und Leerprobe besteht darin, dass die Leerprobe identisch mit den Kulturen behandelt und damit inkubiert wurde, was bei dem Kontrollfläschchen nicht der Fall war. Dadurch ist der Anteil der Hemicellulose deutlich größer. Dieser Effekt wurde jedoch nicht immer beobachtet, sodass eine Infektion der Leerprobe durch hemicellulolytische Bakterien nicht ausgeschlossen werden kann. Der Abbau der Hemicellulose und der Cellulose Fraktion ist hier deutlich zu sehen, auch dass *C. thermocellum* den Cellulose-Anteil deutlich besser abbaut als *C. stercorarium*. Dies entspricht der Erwartung aus den bisher bekannten Daten (siehe oben).

Die Gasbildung durch hydrolytische Bakterien und Bakterienmischkulturen wurde durch Analyse von Gasproben (Dank an LfL-ILT) bestimmt (Abb. 6). Die kleinen Gasmengen aus den 50 ml-Fläschchen war dabei nur schwer zu bestimmen (mit Spritze und ungefährer Ablesung, wie weit der Spritzenstempel herausgedrückt wurde – ohne vollständigen Druckausgleich) und ist daher mit einem hohen Fehler belastet. Die Gaszusammensetzung dagegen erfolgte mit einer geeichten GC-Messung. Zusätzlich zu den Reinkulturen wurden noch gut hydrolytische Bakterienmischkulturen hinzugenommen (siehe unten), mesophile wie thermophile.

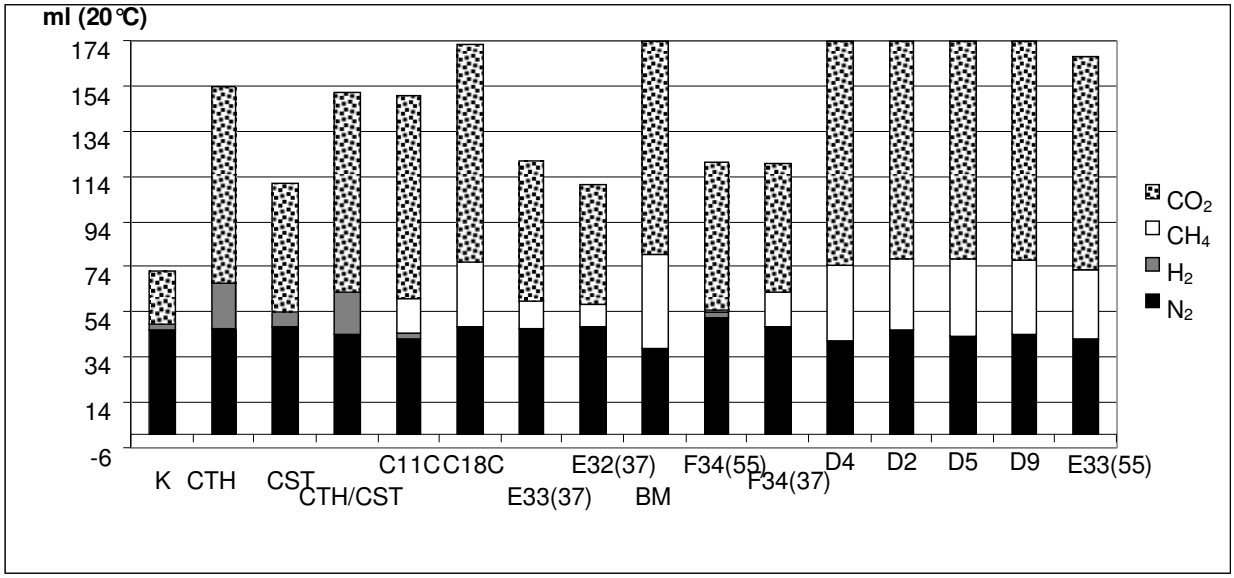


Abb. 6: Gasbildung durch Bakterienkulturen auf Maissilage. Inkubation bei 55 °C, wenn nicht anders angegeben.

Bei den natürlichen, angereicherten Bakterienmischungen ist erstaunlicherweise Methan-Bildung festzustellen, die nur durch die Anwesenheit von Archaebakterien erklärt werden kann, die hitzestabil sind – die Proben wurden vor der Anreicherung bei 80 °C pasteurisiert, um nicht-sporenbildende Bakterien abzutöten. In allen Kulturen, in denen Methanbildung nachweisbar ist wurde kein oder nur wenig Wasserstoffgas gefunden. Dies ist auch zu erwarten, da H_2 das Substrat der hydrogenotrophen Methanbakterien für die Methanbildung ist.

Es fällt auf, dass der N_2-Gehalt relativ hoch ist – er stammt wohl aus dem Headspace der Flaschen, die vor der Fermentation mit Stickstoff gespült worden waren. CO_2, CH_4 und H_2 hingegen müssen durch die Bakterien gebildet worden sein. Dabei bilden die Reinkulturen am meisten Wasserstoffgas. Dies entspricht der Erwartung an ein fermentierendes *Clostridium*.

Mit denselben Kulturen wurde auch die Bildung der Fermentationsprodukte wie Fettsäuren und Alkohole aus Maissilage gemessen (GC in Abb. 7a und 7b). Das Kulturvolumen war 50 ml. Darin wurden bei 55 °C bis zu 180 mg Essigsäure gebildet (bei Kultur C18c). Der Anteil an Propionsäure konnte bei den Clostridien-Reinkulturen nicht beobachtet werden und war ansonsten bei den 37°C Kulturen höher als bei den 55°C Kulturen, immer aber sehr gering (bis ca. 25 mg/50 ml). In den Mischkulturen wurde wenig n-Buttersäure gefunden, in den Reinkulturen und einigen Mischkulturen Ethanol.

Eine Skala für die geringeren Anteile an seltenen Fettsäuren (Abb. 7b) zeigte in einigen Kulturen die Anwesenheit von n–Butanol, i-Butanol, bei einigen Kulturen auch Hexansäure und in einer Kultur Önanthsäure. Der Anteil an Valeriansäure in vielen Kulturen und Aceton in allen ist fraglich, da auch in der Kontrolle welches gefunden wurde. Allerdings sind die Mengen sehr gering, können aber evtl. aus der Produktion einiger weniger Bakterienzellen stammen, bzw. von anderen Bakterien weiter metabolisiert worden sein. Es ist also evtl. möglich, Produzenten für n-Butanol, i-Buttersäure, Hexansäure oder Önanthsäure zu isolieren, die in Reinkultur erhebliche Mengen dieser Stoffe in das Medium ausscheiden.

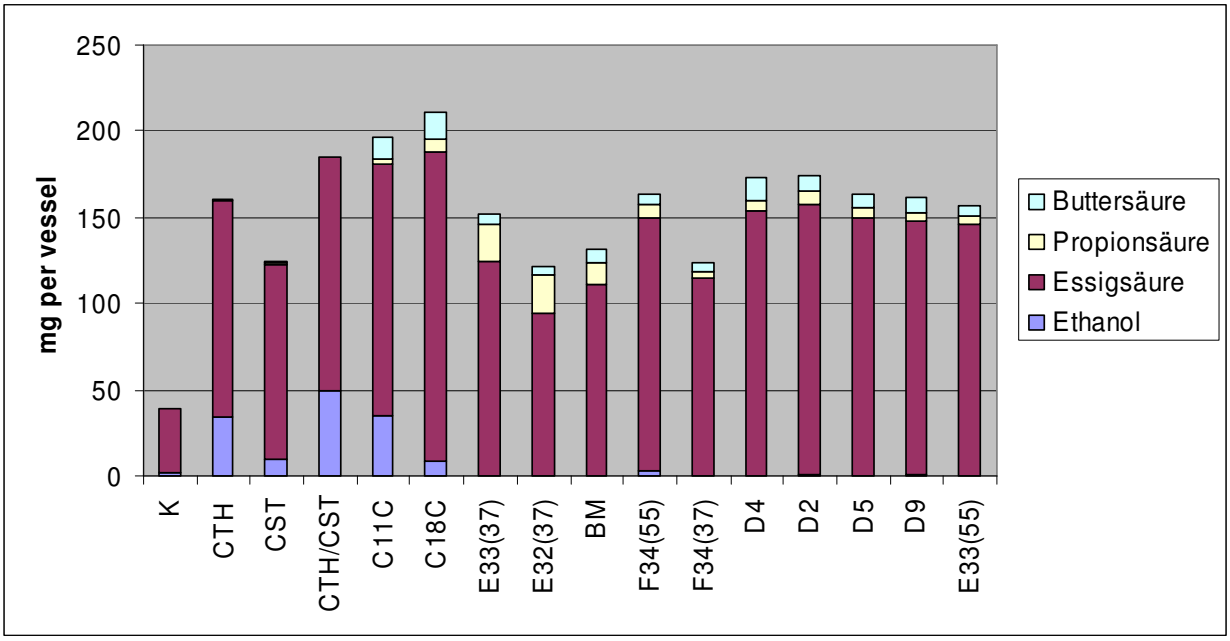


Abb. 7a: Messung von Fermentationsprodukten, Skala 1 (haupts. Ethanol und Acetat)

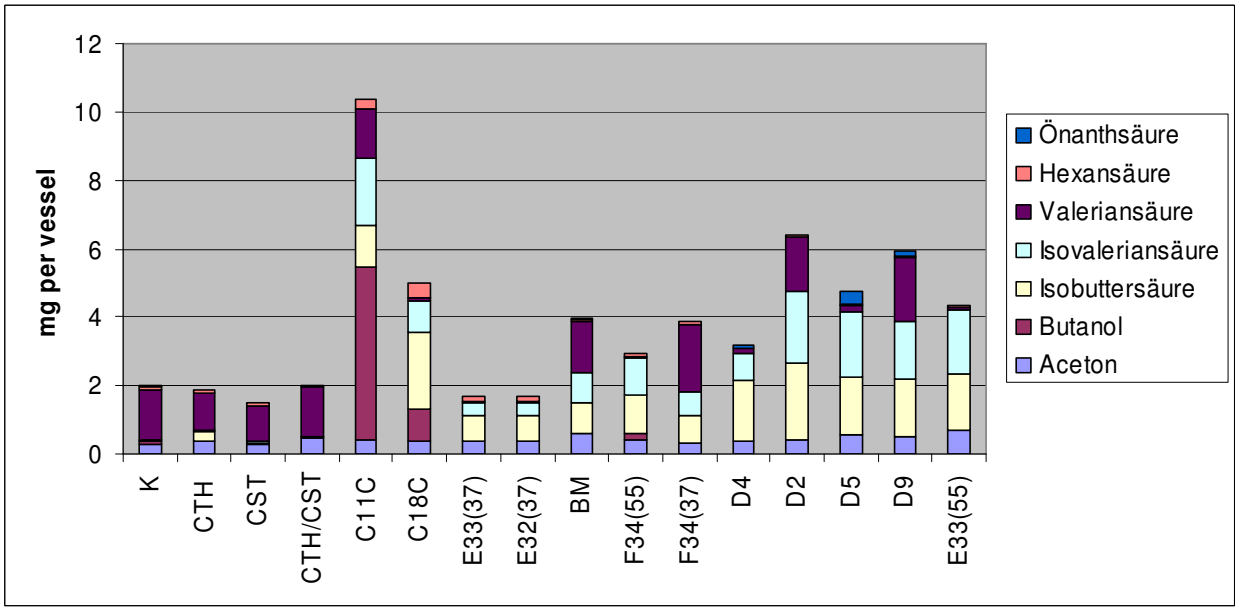


Abb. 7b: Messung von Fermentationsprodukten (Komponenten in kleinerer Menge), Skala 2

III.1.3 pH-Abhängigkeit des Abbaus

Mit einer Reinkultur von *C. thermocellum*, dem wichtigsten hydrolytischen Bakterium in anaeroben Fermentationsanlagen mit natürlich angereicherter Population, wurde die Hydrolyseeffizienz von Maisssilage ausgetestet, wobei der Anfangs-pH der Kulturflaschen auf unterschiedliche Werte eingestellt wurde. Hintergrund bei der Interpretation der Ergebnisse muss sein, dass durch die fermentative Tätigkeit des Bakteriums zwar einerseits die Energie bereitgestellt wird, um die Zellzahl zu vermehren und z.B. hydrolytische Enzyme in die Umgebung auszuschleusen, aber andererseits auch Fermentationsprodukte wie z.B. Fettsäuren ausgeschieden werden, die den pH des Mediums

erniedrigen. So wird auf der einen Seite allmählich ein pH-Bereich erreicht, an dem der Energiestoffwechsel des Bakteriums nicht mehr ausreicht für weiteres Wachstum und Proteinproduktion, und auf der anderen Seite die Enzyme, die auch ohne Zellaktivität weiterhin aktiv sind, in einen pH-Bereich geraten, in dem sie nicht mehr aktiv sind.

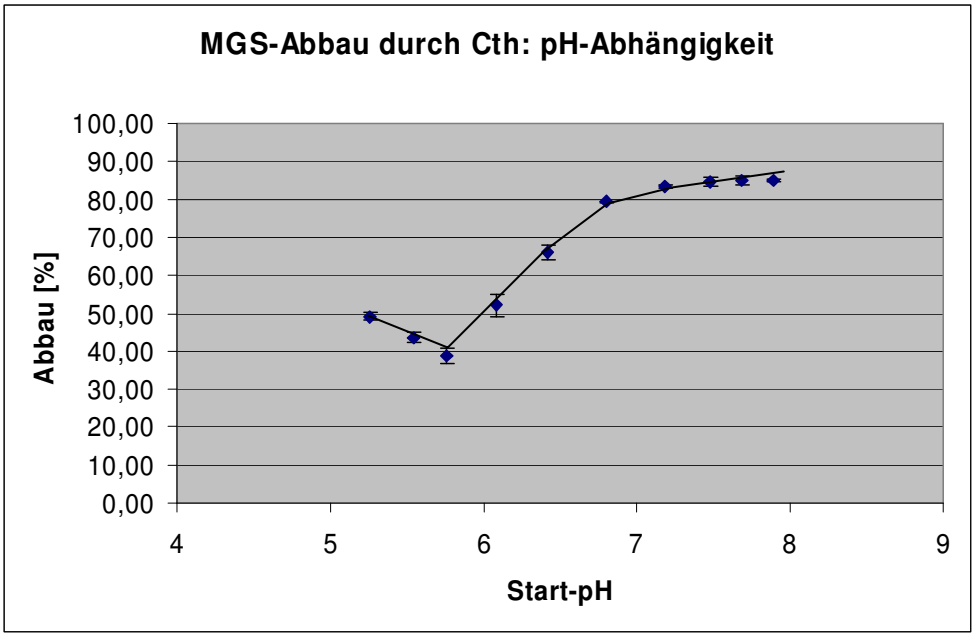


Abb. 8: Abbau von Maissilage durch *C. thermocellum* in Abhängigkeit vom Anfangs-pH der Batchkultur.

Beide Hemmprinzipien sind prinzipiell unabhängig voneinander, doch können keine Enzyme für die Aktivität gebildet werden, wenn die Zellen nicht wachsen. So ist in der in Abb. 8 abgebildeten Grafik im pH-Bereich von anfangs unter 5,8 kein Abbau erkennbar, der über den Background hinausgeht (d.h. die Faseranteile, die auch ohne enzymatischen Abbau durch die Maschen des Filters gewaschen werden). Ab pH 6,1 steigt die Aktivität langsam an und erreicht bei etwa pH 7,2 höchste Aktivität, die sich auch bis zum Ende der Messkurve bei pH 8,0 nicht verringert. Gute Aktivität ist also in einem pH-Bereich zwischen 6,5 und 8,0 oder sogar höher zu beobachten.

Es muss dabei nochmals daran erinnert werden, dass diese Werte für den Anfangs-pH in der Kultur gilt; der End-pH konnte nicht bestimmt werden. Da es sich dabei um Batchkulturen handelte, ist mit einem deutlich niedrigeren End-pH zu rechnen. Auch wurde diese Kurve mit einer Kultur von *C. thermocellum* erstellt und ist daher zunächst nur für dieses Bakterium gültig. Allerdings ist aus den Arbeiten der Arbeitsgruppe an der TUM klar geworden, dass sowohl die bekannten hydrolytischen Bakterien wie auch die bisher untersuchten cellulolytischen Enzyme ein jeweils sehr ähnliches pH-Verhalten zeigen. Es ist also davon auszugehen, dass diese Untersuchungen allgemeine Gültigkeit für bakteriellen Cellulose-Abbau besitzen.

III.1.4 Etablierung eines geeigneten Mediums für ideale Kulturbedingungen

Für die Versuche war es notwendig, ein Medium zu finden, das für den geplanten Einsatz ideal geeignet ist. Ausgehend von der Überlegung, dass alle beim Biogasprozess wichtigen Bakterien darin wachsen müssen, dass dies aber auf im Labor etablierten Medien, wie GS2 oder RCM (rein-

forced clostridial medium) für *Clostridium*, nur ein kleiner Teil der beteiligten Bakterien zu tun in der Lage ist, haben wir Versuche unternommen, den Flüssiggärrest aus einer NaWaRo-Biogas-Anlage nach Abtrennung der festen, fasrigen Bestandteile als Medium zu verwenden. Anfängliche Versuche mit dem Standard-Medium GS2, das mit unterschiedlichen Anteilen Flüssiggärrest (fGR) versetzt war, sind sehr zufriedenstellend verlaufen.

Weitere Versuche haben jedoch gezeigt, dass allein fGR versetzt mit Freisinger Leitungswasser (wegen der Spurenelemente) ebenso gut geeignet ist. Daher für die meisten Versuchen fGR 1:1 mit Leitungswasser gemischt und autoklaviert als Medium verwendet (GR-Medium). Dieses Medium hat eine sehr gute Pufferkapazität mit einem pK von ca. 6,8, der für die durchgeführten Versuche ideal ist (siehe pH-Versuch in 1.3.). Außerdem werden so die Bedingungen der Biogasanlage weitestgehend auf die Fläschchen übertragen, wie sie im Labor wegen der großen Stückzahlen an Proben notwenig sind. (Abb. 9) Dieses Medium ist allerdings trüb und daher nicht für alle weitergehenden Versuche geeignet. Teilweise wurde daher in den nachfolgenden Versuchen das Standard-GS2-Medium für Clostridien verwendet. Zu allen Nährmedien muss eine geeignete Kohlenstoffquelle zugegeben werden, wie z.B. Cellobiose oder Cellulose (Avicel oder Filterpapier).

Abb. 9: Gärrest aus einer NaWaRo-Anlage, durch Zentrifugation weitgehend geklärt und 1:1 mit Leitungswasser vermischt ohne zugesetzte Puffersubstanzen oder Nährstoffe.

In diesem Medium wurden im weiteren Projektverlauf Anreicherungen und Abbauversuche durchgeführt. So wurde z.B. die Abhängigkeit des Abbaugrades von der Menge der Substratzugabe, also der optimale Gehalt an Maissilage in den Batchversuchen ausgetestet. Bei 2 % (w/v, TG) wurde Maissilage durch *C. thermocellum* weitestgehend abgebaut (zu 89 % Trockengewichtsverlust). Auch bei 9,5 % Substratzugabe (w/v, TG) wurde noch ca. 65 % abgebaut.

Die Messung des pH-Wertes ergab bei höheren Substratgaben (über 3 % w/w TG) einen Endwert von bis zu 5,8, was darauf schließen lässt, dass sowohl das Wachstum der Bakterien, deren Proteinproduktion als auch die Aktivität der ausgeschiedenen Cellulasen im Hemmbereich liegen (Abb. 10, 11). Vermutlich könnte also ein höherer Abbau erreicht werden, wenn die gebildeten Fettsäuren durch methanogene Bakterien aus dem Gleichgewicht entfernt werden würden.

Die Versuche zeigen, dass sowohl Mais- als auch Grassilage durch die verschiedenen Bakterien sehr gut abgebaut werden kann. Die ist u.a. auf die gute Pufferkapazität des GR-Mediums zurückzuführen, die bei den Batchversuchen ohne gleichzeitige Anwesenheit von Methangasbakterien benötigt wird, um die entstehenden Fettsäuren wegzupuffern.

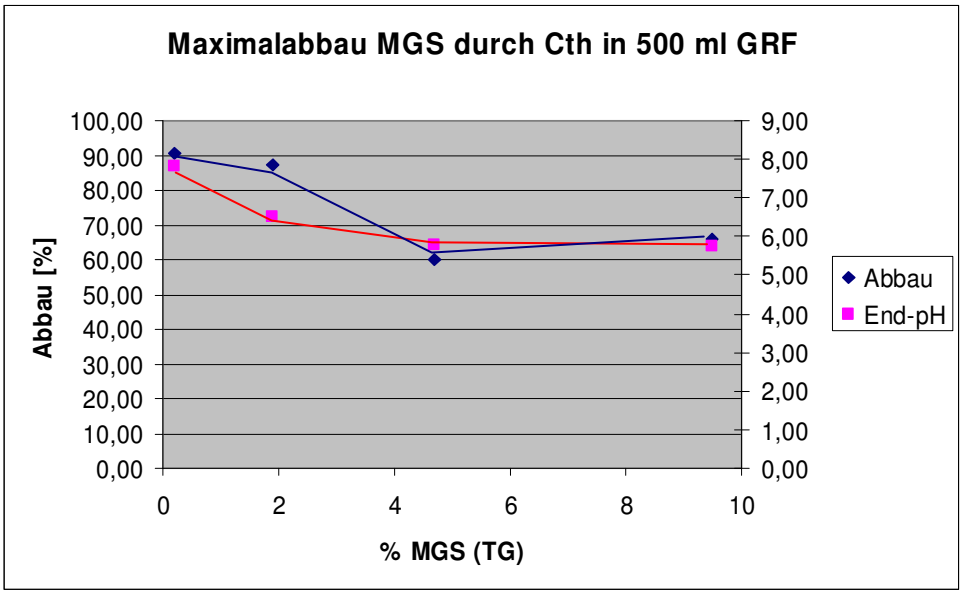


Abb. 10: Abbau von verschiedenen Mengen Maissilage in 500 ml GR-Medium.

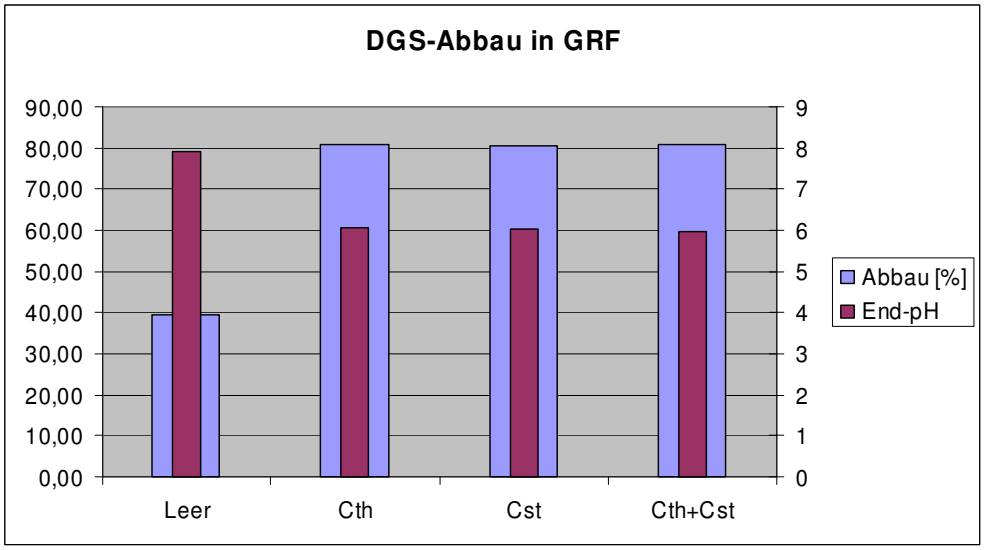


Abb. 11: Abbau von 2 % (w/w TG) Grassilage durch verschiedene Bakterien in GR-Medium.

III.1.5 PCR-Nachweismethode für *C. thermocellum* und *C. stercorarium*

Für den PCR-Nachweis von *C. thermocellum* (CTH) und *C. stercorarium* (CST) wurden spezifische Oligonukleotidprimer ausgearbeitet und in PCR-Ansätzen mit genomischer DNA aus Reinkulturen getestet. Die PCR-Bedingungen wurden so optimiert, dass jetzt reproduzierbar gute Ergebnisse erzielt werden können.

Diese PCR-Methode wurde auf die Bakterienmischung aus *C. thermocellum* und *C. stercorarium* , und auch auf die Animpfung des Versuchsfermenters bei der LfL angewandt (siehe 1.6.). Hierzu wurde aus der Vielzahl der inzwischen auch kommerziell angebotenen DNA-Isolierungprozeduren eine gut geeignete ausgewählt, an die speziellen Anforderungen bei Proben aus Biogasanlagen angepasst und mit verschiedenen Fermenterproben ausgetestet.

Mit den CST-Primern konnte im Fermenter vor der Inokulation keine Reaktion nachgewiesen werden: *C. stercorarium* war also in den Fermentern unter der Nachweisgrenze oder nicht vorhanden (siehe Abb. 12, A1 und A2-1). Am Tag nach der Inokulation mit dem Bakteriengemisch war eine starke Reaktion mit dem CST-Primer nachweisbar, nach 1 Monat kontinuierlicher Betriebsweise (mit Fütterung = Verdünnung) immer noch eine gut sichtbare Reaktion. *C. stercorarium* war also stabil in der Kultur vorhanden. Als Kontrolle diente ein mit einer autoklavierten Mischkultur aus *C. thermocellum* und *C. stercorarium* „beimpfter", parallel (und ansonsten identisch) betriebener Fermenter. Die Ergebnisse der Gasbildung sind im Bericht der LfL beschrieben.

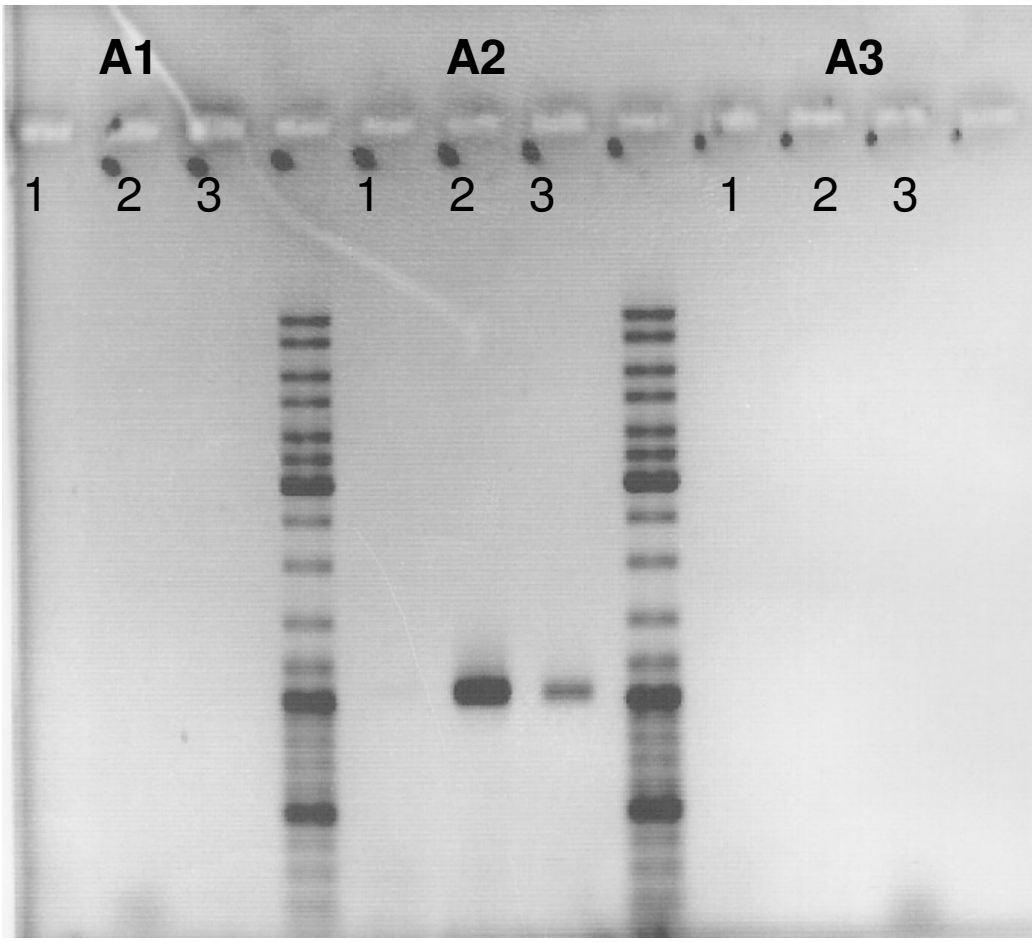


Abb. 12: PCR-Verfolgung der Inokulation mit *C. stercorarium*. A1 – Kontrolle, A2 – Clostridien-Mix, A3 – angereicherte Kultur. Jeweils: 1 – vor Inokulation, 2 –1 Tag nach Inokulation, 3 – nach 1 Monat

Die Verfolgung der *C. thermocellum*-Animpfung zeigte kein so klares Ergebnis. Zwar waren in dem Kontrollfermenter (mit autoklavierter Kultur beimpft) keine Reaktionsprodukte sichtbar (A1 in der folgenden Abb. 13), aber 1 Tag nach der Beimpfung war ebenfalls keine Reaktion sichtbar (A2-2). Auch in der angereicherten Kultur, die dem Fermenter zugesetzt wurde, war nur 1 Tag nach der Beimpfung eine schwache Reaktion sichtbar. Das Ergebnis scheint also nicht gut reproduzierbar zu sein, oder die Probennahme ist problematisch und das Ergebnis deute auf eine nicht vollständige Durchmischung der Fermenter hin.

Im Prinzip ist die Methode der PCR auf den Nachweis und die Verfolgung der Kulturen in der Biogasanlage anwendbar, aber im Detail noch verbesserungswürdig. Auch in der Praxis ist eine

PCR keine exotische Methode mehr und kann vor allem (z.B. aus gekühlten Proben) auch in darauf spezialisierten Labors problemlos, mittlerweile preiswert und im Hochdurchsatzverfahren angewendet werden. Es ist jedoch in weiteren Untersuchungen auszutesten, welchen weiteren Bakterienspezies oder –gruppen in den Nachweise einbezogen werden sollten. Hierzu sollten die weiter unten unter 2. beschriebenen Versuche Aufschluss geben.

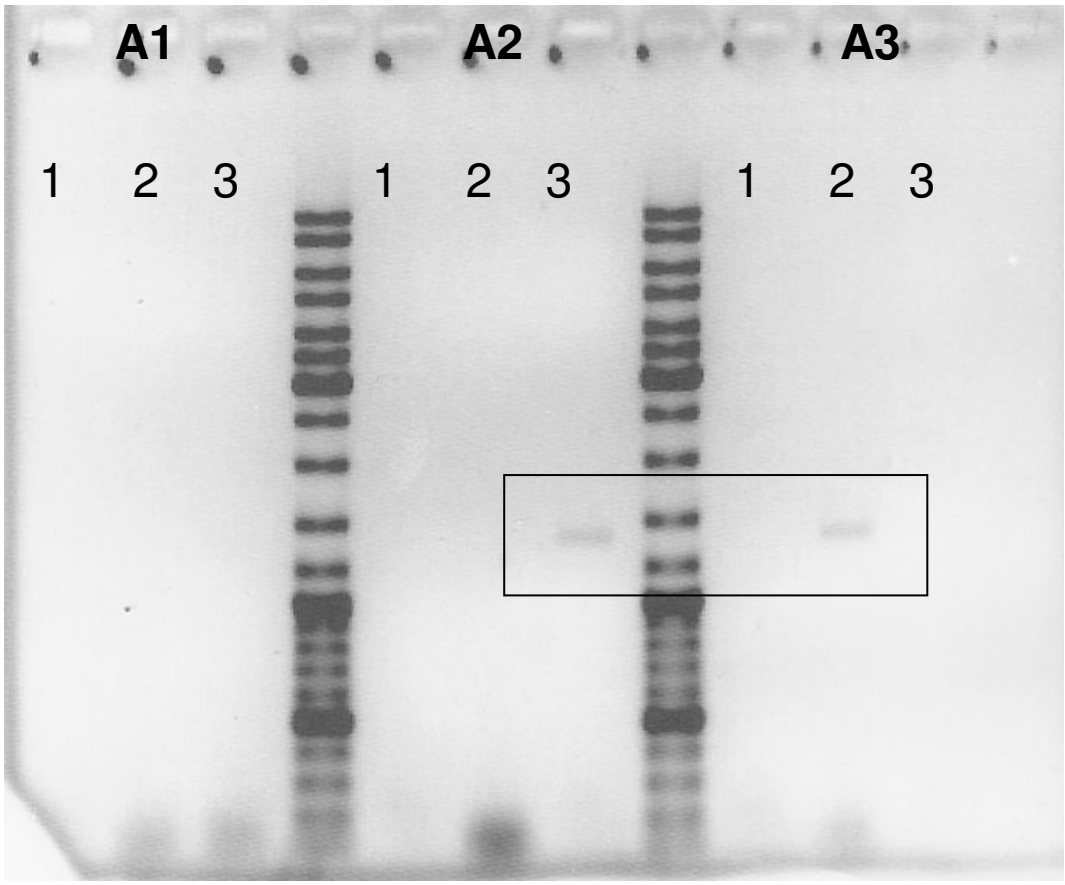


Abb. 13: PCR-Verfolgung der Inokulation mit *C. thermocellum*. A1 – Kontrolle, A2 – Clostridien-Mix, A3 – angereicherte Kultur. Jeweils: 1 – vor Inokulation, 2 –1 Tag nach Inokulation, 3 – nach 1 Monat

III.1.6 Animpfung von Versuchsfermentern

Die oben beschriebenen Misch-Kulturen wurden an die LfL übergeben und dort nach einer gemeinsam entwickelten Strategie auf Versuchsfermenter angeimpft (Ergebnisse werden im Bericht der LfL dargestellt). Dabei war insbesondere die Anaerobiosis (möglichst wenig Luftzutritt) und die Verfälschung der Fermenterergebnisse durch die mit der Animpfkultur eingebrachten Nährstoffe ein Thema. Die bei diesen Diskussionen und der nachfolgenden experimentellen Durchführung entstandenen Erfahrungen haben zu dem Schluss geführt, dass es z.B. unbedingt notwendig ist, eine Sporensuspension zur Animpfung zu verwenden, da hierdurch die Flüssigkeitsmenge durch eine Konzentrierung (Abzentrifugieren der Sporen) auf ein Minimum beschränkt werden kann. Da durch die Zentrifugation ein dichtes Pellet mit Sporen entsteht, kann die nachfolgende Verflüssigung mit einer nährstofffreien Pufferlösung erfolgen, die auch gleichzeitig der Sporenstabilitsation und damit der Verbesserung der Lagerfähigkeit dient. Siehe Versuche unten.

III.1.7 Verfolgung des Animpferfolgs auf molekularbiologischer Ebene

Wie in 1.5. bereits dargestellt, wurden zur mikrobiologischen Molekularanalyse wiederum aus den angeimpften Fermentern zur DNA-Isolierung Proben genommen (siehe 1.5.). Die Verfolgung der Bakterien erfolgte mit einer PCR-basierten Methode, dem Nachweis der 16S-rDNA der Bakterien *C. thermocellum* und *C. stercorarium* (getrennt). Weitere Methoden des Monitorings angeimpfter hydrolytischer Bakterienkulturen, sowie Nachweise für andere Bakterien können erst in Nachfolgeprojekten entwickelt werden.

Mit der PCR-Methode konnten die beiden Bakterienin den angeimpften Fermentern nachgewiesen werden (siehe oben). Allerdings ist noch eine Verfeinerung der Technik für eine höhere Nachweisgrenze notwendig: die PCR-Methode mit den Spezies-spezifischen Primern war anfangs (kurz nach Animpfung) erfolgreich, später aber zu wenig empfindlich. Dafür kommen mehrere Fehlerquellen in Betracht: Ausdünnung der angeimpften Kultur, Inhomogenität der Verteilung im Fermenter oder bei den entnommenen Aliquots, die DNA-Präparationsmethode aus Biogasmaterial, die sehr empfindlich und schwierig anzuwenden ist, oder auch noch andere Gründe.

Die Notwendigkeit für einen hochempfindlichen Nachweis geringer Bakterienzahlen oder Bakterienanteile an der Gesamtpopulation war unerwartet. Es war eigentlich anfangs eine höhere Anzahl an hydrolytischen Bakterien in der natürlichen Mischkultur der Biogaspopulation erwartet worden. Doch die gefundenen Anteile an hydrolytische Bakterien waren sehr gering – siehe unten.

III.2 Selektion von thermophilen hydrolytischen Kulturen mit optimaler Aktivität

	odS [%]	Protein [%]	Lipids [%]	Starch [%]	Cellulose [%]	Hemicellulose [%]	Lignin [%]
Maize silage	~ 95	~ 7	~ 5	~ 34	~ 19	~ 24	~ 3
Clover-grass silage	~ 90	~ 16	~ 4	< 1	~ 32	~ 20	~ 9

Abb. 14: Zusammensetzung der verwendeten Substrate (nach Amon et al., 2006)

Die durchschnittliche Zusammensetzung der verwendeten Substrate ist in Daten der Literatur beschrieben (Abb. 14). Die im ersten Projektjahr aufgebaute und etablierte Analytik wurde für die Charakterisierung der (parallel) angereicherten Bakterienkulturen und anschließend für die Selektion der Kulturen mit den besten hydrolytischen Eigenschaften eingesetzt.

Zwei Kulturen, für jede der beiden gewählten Betriebstemperaturen eine, waren aus mehr als einem Dutzend Kandidaten-Kulturen ausgewählt worden; sie wurden in weiterführenden Versu-

chen bei uns und den Projektpartnern eingesetzt: ein thermophile Kultur bei 55 °C und eine mesophile Kultur bei 37 °C. Dabei haben wir uns vorerst auf das Substrat Maisganzpflanzensilage (MGS) konzentriert. Insbesondere die (bessere Ergebnisse zeigende) thermophile Mischkultur wurde im Anschluss verschiedenen Analysen unterworfen und mit der als optimal getesteten mesophilen Kultur verglichen.

III.2.1 Definition eines geeigneten Anreicherungsmediums

Ein für einen breiten Bereich von Bakterien optimales Anreicherungsmedium wurde ausgewählt und verschiedenen Tests unterzogen. Flüssiger Gärrest als Hauptbestandteil hat sich als äußerst vorteilhaft erwiesen, insbesondere wenn er mit Leitungswasser (Freising Stadtwasser) versetzt wurde. Gärrest hat eine sehr hohe Pufferkapazität, was zu einer guten pH-Stabilität führt; dazu kommt ein hoher Nährstoffgehalt, gutes Bakterienwachstum über einen weiten Bereich unterschiedlicher Bakterien. Das Medium wie in 1.1.4. beschrieben ist insbesondere gut geeignet für die Anzucht von Mischkulturen aus Boden, Biogasanlagen und Gülle, sowie für die Anzucht von Reinkulturen aus Naturisolaten von diesen Quellen. Dies wurde allerdings nur für cellulolytische und saccharolytische Bakterien ausgetestet. Syntrophe Bacteria und methanogene Archaea mögen zumindest teilweise andere Nährstoffansprüche haben. Dies bleibt im Bedarfsfall auszutesten.

Es wurden verschiedene Versuche durchgeführt, welche die optimalen Parameter für die Hydrolyse von MGS definieren (Abb. 15):

a) Der Zusatz von Gärrest zu Wasser und Silage wurde variiert und optimiert.

b) Es wurden Versuchsreihen mit unterschiedlichem Anfangs-pH angesetzt.

c) Die bei den jeweiligen Temperaturen selektierten Kulturen wurden bei diesen Temperaturen unter ansonsten identischen Bedingungen in ihrer Abbaukinetik gemessen (siehe Fig. Im folgenden Kapitel).

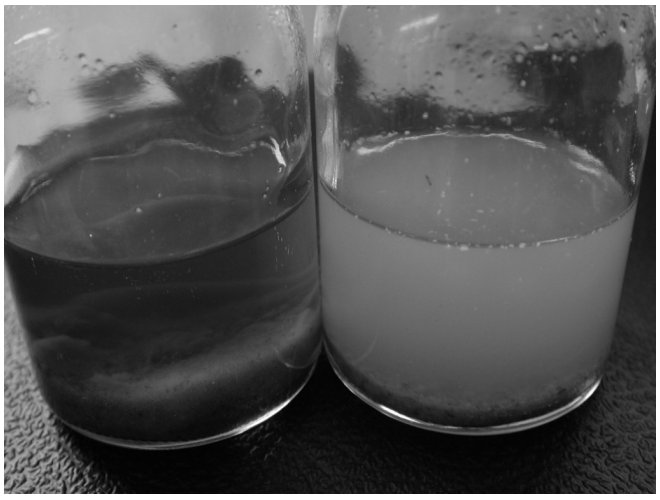


Abb. 15: Links: unbeimpfte Kontrolle mit MGS; Rechts: auf MGS gewachsene Kultur, Abbau und Gasbildung deutlich sichtbar

Da dieses Medium in der Zusammensetzung der Umgebung in einer Biogasanlage entspricht, ist davon auszugehen, dass es für die Anzucht von nahezu allen Bakterien aus diesem Milieu beeignet ist. Ausgenommen sind sicher einige syntrophe Bakterien, die spezielle Ansprüche haben, wie z.B. die Koexistenz mit bestimmten anderen Spezies. Dies kann mit der Medienzusammensetzung nicht ausgeglichen werden – diese Bakterien sind auf die gezielte Cocultur mit solchen Bakterien angewiesen.

Das Wachstum von hydrolytischen Bakterien in diesem Medium konnte gezeigt werden (Abb. 15). Wurde Maissilage in das Medium gegeben, wurde diese deutlich abgebaut. Als Produkte entstehen Zellmasse, Gas (sichtbar an den Gasbläschen am oberen Medienrand), und Stoffwechselprodukte, wie z.B. kurzkettige Fettsäuren, die sich im Medium anreichern, wenn sie nicht von anderen Bakterien weiter metabolisiert werden.

III.2.2 Anreicherung von thermophilen Kulturen aus Proben

Es wurden Proben gesammelt von ungefähr 20 Standorten mit verrottender Biomasse, bes. von Kompost und Tiermist (u.a. Tierpark), aber auch von NaWaRo-Biogasanlagen, die bei verschiedenen Temperaturen betrieben wurden. Die Proben wurden soweit wie möglich in dem oben beschriebenen Medium suspendiert, für 10 min bei 80 °C behandelt, um vegetative Zellen abzutöten (Pasteurisierung) – Sporen bildende Bakterien sollten bevorzugt werden -, und dann in eine Flaschen mit autoklaviertem Medium mit Maissilage als Substrat unter strikt anaeroben Bedingungen eingespritzt. Parallele Proben wurden auch mit Grassilage als Substrat angesetzt. Die Flaschen wurden mehrere Tage bei 55 °C inkubiert, bis deutliches Bakterienwachstum, Gasbildung und Abnahme des Substrats sichtbar wurden. Wegen der Gasbildung, des Aufbau hohen Drucks in der Flasche und der Gefahr der Explosion der Flachen wurde diese täglich durch Einstechen einer Kanülennadel entgast.

Nach diesem Prinzip der Anreicherung können nur Bakterien wachsen, die:

1. Sporen bilden oder hyperthermophil sind,
2. Wachstum und hydrolytische Aktivität bei 55 °C zeigen (thermophile Bakterien),
3. Mais-(oder Gras-)Silage hydrolysieren können,
4. Mais-(oder Gras-)Silage als Kohlenstoffquelle verwerten können,
5. entweder wenig ansäuern oder auch bei niedrigem pH noch Aktivität zeigen.

All dies sind Eigenschaften, die von einer optimalen hydrolytischen Kultur im Biogasreaktor erwartet werden. Bei den Kulturen, die deutliches Wachstum und optisch sichtbaren Abbau des Substrats gezeigt haben, wurde die Anreicherung der hydrolytischen Kulturen auf Mais- bzw. Grassilage durch Messung des Abbaugrades an Mais- bzw. Grassilage getestet. Dazu wurde das (getrocknete) Substrat in die Fläschchen exakt eingewogen (2 % w/v), mit Medium aufgefüllt, autoklaviert, inokuliert, bebrütet und anschließend durch Fiber-Caps (siehe oben) abfiltriert. Die Caps wurden nach dem Trockenen gewogen. Die Abnahme des Substrats wurde bestimmt und als % TG-Verlust in der folgenden Grafik aufgetragen.

Nicht alle Proben lieferten Kulturen, die eine deutliche Hydrolyse des Substrats hervorriefen. Es ist zudem davon auszugehen, dass die Kulturen mit Hydrolyseaktivität ein Gemisch verschiedenster Bakterien beinhalten würde. Die besten Proben werden in Abb. 16 gezeigt:

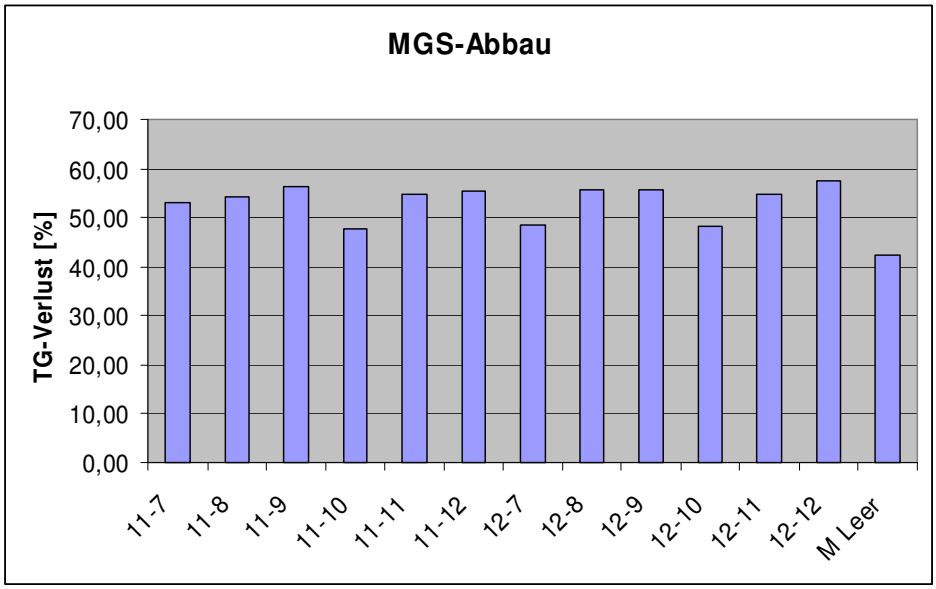


Abb. 16: Beispiele für angereicherte hydrolytische Mischkulturen auf Maissilage (bei 55 °C)

In einem optimierten Versuch wurden 3 gut hydrolysierende Kulturen mit einer Kultur von *C. thermocellum* verglichen (Abb. 17). Dabei zeigte sich, dass die Reinkultur von *C. thermocellum* zwar den tiefsten pH-Bereich erreicht (pH 7,8), also die meisten Säuren produziert, aber dabei auch den größten Teil des Substrats umzusetzen in der Lage ist (91 % vom TG). In diesem Versuch wurden 1 g Maissilage in 500 ml Medium eingesetzt, sodass die Säureproduktion durch die Fermentation der glycosidischen Produkte durch das Medium gut abgepuffert werden kann. Dadurch wird das Potential der bakteriellen Enzymsysteme für den Abbau der Biomasse deutlich sichtbar. Allerdings wurden auch mit der „schlechtesten" Kultur (#1) noch 78 % des TG des Substrats abgebaut, was ein beachtlich hoher Wert ist.

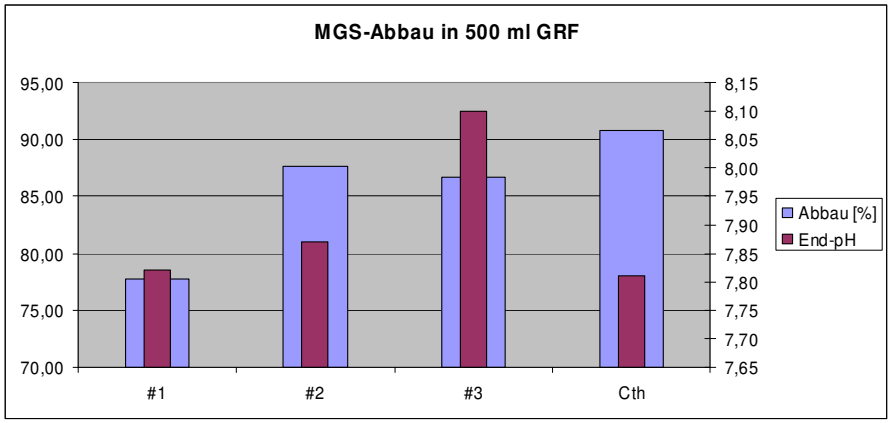


Abb. 17: Beispiele für Mischkulturen im Vergleich mit einer Reinkultur von *C. thermocellum* auf Maissilage bei 55 °C. Hier wurde 1 g Maissilage in 500 ml Medium eingesetzt.

Aus der Vielzahl der Anreicherungen (nicht alle sind in der o.g. Fig. gezeigt) wurden die vier bei 55°C am besten abbauenden ausgewählt, um sie weiter zu untersuchen. Zunächst wurden sie einer kinetischen Untersuchung unterzogen (nachfolgende Fig.). Die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere die Kulturen G40 und G41 hocheffiziente Biomasse-Abbauer sind. Sie zeigen bereits nach 3 Tagen Inkubation (55 °C) einen hohen Abbaugrad (26 bzw. 30 % Restmenge von 44 % der Kon-

trolle) und bauen nach 8 Tagen am meisten Substrat ab (13 bzw. 19 % Restmenge). Dabei ist der End-pH in einem relativ günstigen und noch tolerablen Bereich (6,8 bzw. 6,9). Der End-pH ist mit demjenigen einer Biogasanlage nicht zu vergleichen, da hier keine Acetat-verwertenden, methanbildenden Archaebakterien zu erwarten sind. (Abb. 18)

Bei diesen Kinetiken ist aufgefallen, dass der Gehalt an Cellulose und Hemicellulose in allen Kulturen (nicht nur in den hier gezeigten) in etwa parallel abgenommen hat. Der Lignin+Asche-Anteil nahm prozentual weniger ab. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Hemicelluloseabbau für den Abbau der Cellulose (Kernfaser) eine essentielle Voraussetzung darstellt. Deshalb ist dies auch bei *C. thermocellum* so, der die Hemicellulose gar nicht verwerten kann, sie aber trotzdem abbaut. Die Restfasern sind für Lignin angereichert. Obwohl Lignin mit den selektierten Organismenmischungen und unter den angewendeten anaeroben Bedingungen nicht abgebaut werden kann, ist in den Test trotzdem mit zunehmendem Hemicellulose- und Cellulose-Abbau immer weniger Lignin+Asche-Fraktion vorhanden, da das Lignin offensichtlich an Mikropartikel gebunden freigesetzt wird und teilweise durch die Maschen der FiberCap-Filter schlüpfen kann. Das Filtrat ist durch die Anwesenheit der Mikrofaserpartikel auch trüb.

Leider hat sich in weiteren Versuchen die Kultur G41 nicht als stabil erwiesen und verlor an Abbauaktivität. Deshalb wurde mit der sehr ähnlichen Kultur G40 weitergearbeitet.

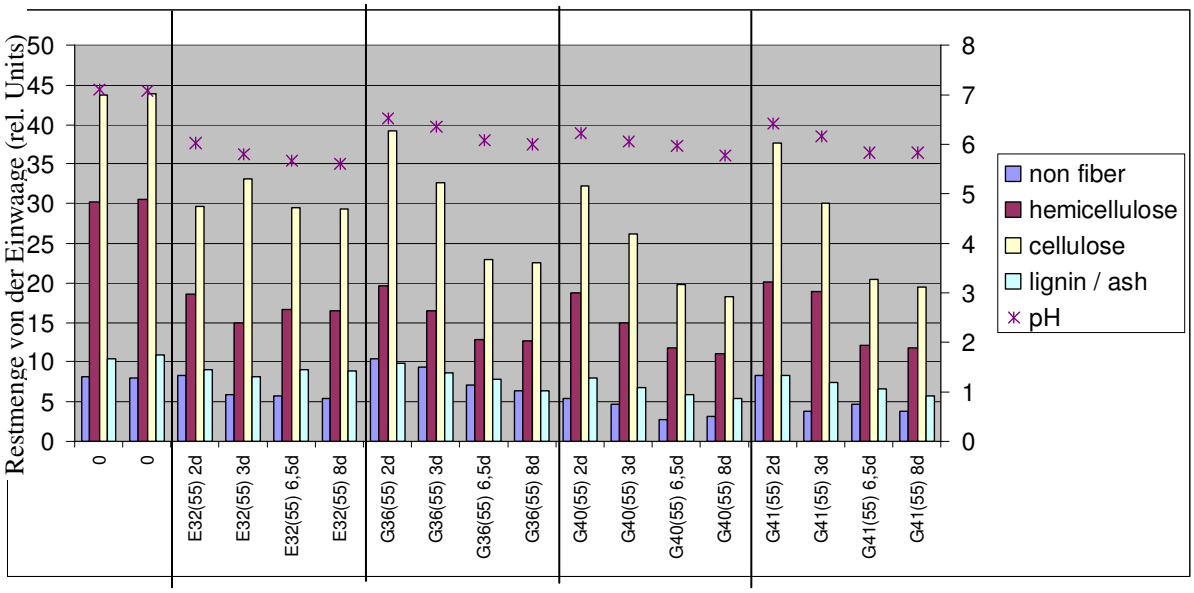


Abb. 18: Zeitreihe von 4 ausgewählten Kulturen bei 55 °C auf DGS. Tage Inkubationszeit sind angegeben. Kontrolle: keine Inokulation

Die Mischkulturen G40 und C18c zeigen auch bei 60 °C einen mit der synthetischen Mischkultur aus *C. thermocellum* und *C. stercorarium* vergleichbar guten Abbau von Maissilage (Abb. 19). Dies deutet auf eine Grenze der optimalen Hydrolyse der Maissilage hin, da aus sehr vielen Proben keine bessere Kultur angereichert werden konnte – jedenfalls nicht mit den verwendeten Methoden. Einschränkungen sind: die Verwendung von und Messung in Batchkulturen und damit verbunden das Absinken von pH und Anreicherung von Fettsäuren, Alkoholen und anderen Stoffwechselprodukten; das Medium (Spurenelementegehalt, Nährstoffe etc.); die verwendete Temperatur; die vorangegangene Pasteurisierung und evtl. noch einige andere Parameter. Allerdings muss betont werden, dass einige der Parameter das experimentell handhabbare Optimum darstellen, so z.B. die Verwendung von Gärrest als Medium; auch ist die Temperatur von 55 oder 60 °C diejenige, in der das Optimum des Abbaus erreicht wurde.

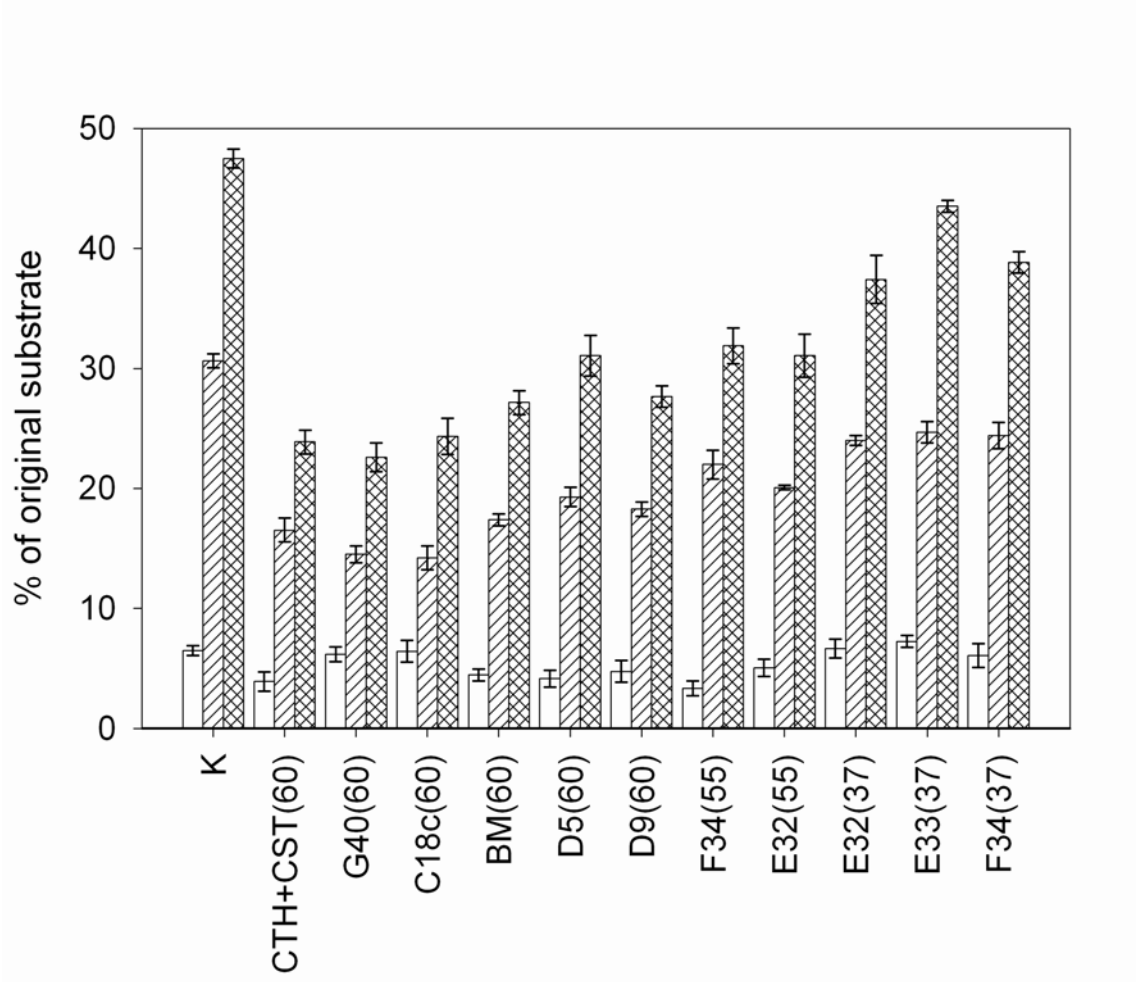


Abb. 19: Abbau von Maissilage durch unterschiedliche Kulturen (% der unlöslichen Fraktion) und Analyse der Faser-Restfraktion durch van-Soest-Fraktionierung. Weiße Box, lösliche Fraktion; gestrichelte Box, Cellulose; kreuz-schraffierte Box, Hemicellulose.

III.2.3 Fermentationsprodukte der optimalen thermophilen Kultur G40

Üblicherweise bilden fermentative Bakterien ein breites Spektrum an Alkoholen und kurzkettigen Fettsäuren, teilweise aber auch Dicarbonsäuren und andere Substanzen. Es überwiegen Acetat, Ethanol, Butyrat, Lactat und Formiat, neben den Fermentationsgasen CO_2 und H_2. Nach Dollhopf et al., 2001, sind Acetat zu 60-80 %, Propionat zu 15-25 % und Butyrat zu etwas 10 % an der Biogasbildung beteiligt – allerdings gemessen in dem dort verwendeten Güllereaktor. Die Stoffwechselprodukte der erwarteten Clostridien in den Bakterien-Mischkulturen ist in Abb. 20 am Beispiel des Stoffwechsels von *C. thermocellum* gezeigt.

Die selektierten Mischkulturen sowie einige Reinkulturen mit hydrolytischen Clostridien (Typstämme aus der DSMZ) wurden neben ihrer Abbaukinetik auch charakterisiert auf die Zusammensetzunge der produzierten Gase (siehe nachfolgende Fig.), sowie die Zusammensetzung der Fermentationsprodukte (beide mit GC-MS; Dank an LfL-ILT). Es ist auffallend, dass trotz der vor der Selektion vorgenommen Pasteurisierung bei 80°C die meisten der Mischkulturen geringe Mengen an Methangas produzieren. Der Anteil an Wasserstoffgas ist unter Umständen wegen der Undichtigkeit der verwendeten Butylgummistopfen unterschätzt; er zeigt, dass der Methanbildungsprozess durch die hydrogenotrophen Methanbakterien nicht vollständig ist. Hydrolysegas durch Clostridien sollte aus CO_2 und H_2 (etwa 50:50) bestehen. Das gemessene N_2 ist wohl auf den An-

teil in der Flaschenfüllung (head-space) zurückzuführen und entstammt nicht dem Gärprozess (siehe Abb. 6).

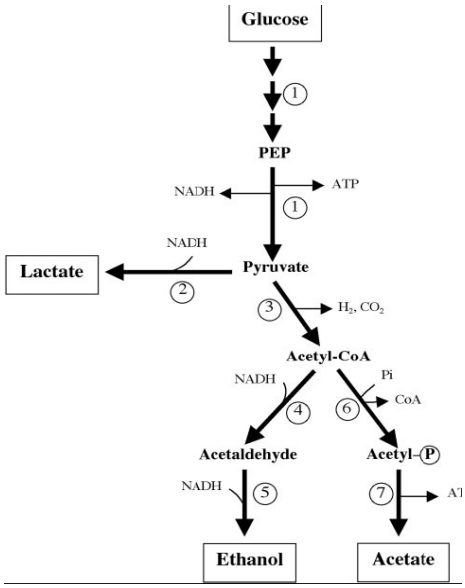


Abb. 20: Stoffwechselprodukte von *Clostridium thermocellum*: aus Arnold L. Demain, Michael Newcomb, J. H. David Wu: Cellulase, Clostridia, and Ethanol. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005, 69 (1) 124-154

In den folgenden Abbildungen 21, 22a und 22b sind die Anteile der gebildeten Fermentationsprodukte zu sehen, die durch die Hydrolyse für die nachfolgende Acetogenese und Methanogenese im vollständigen Biogasprozess zur Verfügung gestellt werden. Prominent ist das gebildete Acetat, daneben in manchen Kulturen Ethanol und Butyrat. Nicht alle diese Produkte sind vermutlich Endprodukte der hydrolytischen Bakterien, sondern stammen zumindest zum Teil Begleitbakterien, die die aus der Hydrolyse stammenden Zucker ebenfalls vergären oder die die Primärprodukte der hydrolytischen Bakterien weiter metabolisieren. Als Beispiel ist hier das HPLC-Chromatogramm einer auf Cellulose gewachsenen Kultur von *C. thermocellum* gezeigt.

Die gebildeten Fermentationsprodukte sind (mit Ausnahme des geringen Anteils an Propionsäure in einigen Kulturen) ideal geeignet, den Methanbildungsprozess zu unterstützen. Die in einigen Kulturen gefundenen Produkte Valeriansäure, i-Valeriansäure, i-Buttersäure, Hexansäure und n-Butanol deuten auf produzierende Bakterien hin, die aus dem Kulturgemisch isoliert werden könnten, um im Sinne der Kaskadennutzung (Bioraffinerie) als Reinkulturen wertvolle Stoffwechselprodukte aus Biomasse-generierten Oligo- oder Mono-Sacchariden zu produzieren. Dieser Aspekt wird in diesem Projekt nicht weiter verfolgt.

Die Fermentationsprodukte einiger mesophiler und thermophiler Kulturen wurden mittels Gaschromatographie gemessen (Abb. 21). Es sind hauptsächlich Ethanol und Acetat, wenig Butyrat, Propionat, Isovalerat. etc. (Abb. 22a un d 22b). Aus der gaschromatographischen Messung lässt sich eine Konzentration von 0,13 % (w/v) oder 0,22 mM Ethanol und 0,57 % (w/v) oder 1 mM Essigsäure errechnen. Dies sind ideale Produkte für die Weiterverwertung durch syntrophe und methanogene Bakterien zur Bildung von Methan und CO_2.

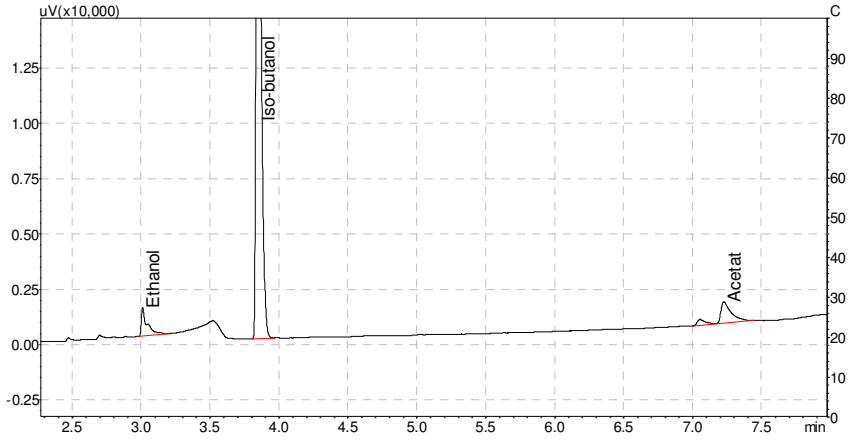


Abb. 21:

Gaschromatographische Trennung der Stoffwechselprodukte von *Clostridium thermocellum*, auf Cellulose gewachsen. iso-Butanol ist der zugegebene interne Standard

Es ist erstaunlich, dass bei vielen Kulturen kein Ethanol nachgewiesen werden konnte, obwohl dies bei Reinkulturen ein Hauptprodukt der Fermentation ist (Abb. 22a). Die gefundene Valeriansäure stammt wohl aus dem Substrat (oder aus dem Gärrest, der dem Medium zugesetzt wurde) (Abb. 22b). Dass Valeriansäure bei einigen Kulturen verschwindet, muss auf eine Umsetzung der Valeriansäure in andere Produkte zurückzuführen sein. Dass in vielen Kulturen Isovaleriansäure und Isobuttersäure und in einigen Kulturen Önanth- und Hexansäure gebildet werden (allerdings in kleinen Mengen), ist bemerkenswert (Abb. 22b). Die Bildung von nennenswerten Mengen Butanol in C11c ist ebenfalls eine weitere Verfolgung dieser Daten wert, kann aber in diesem Projekt nicht durchgeführt werden.

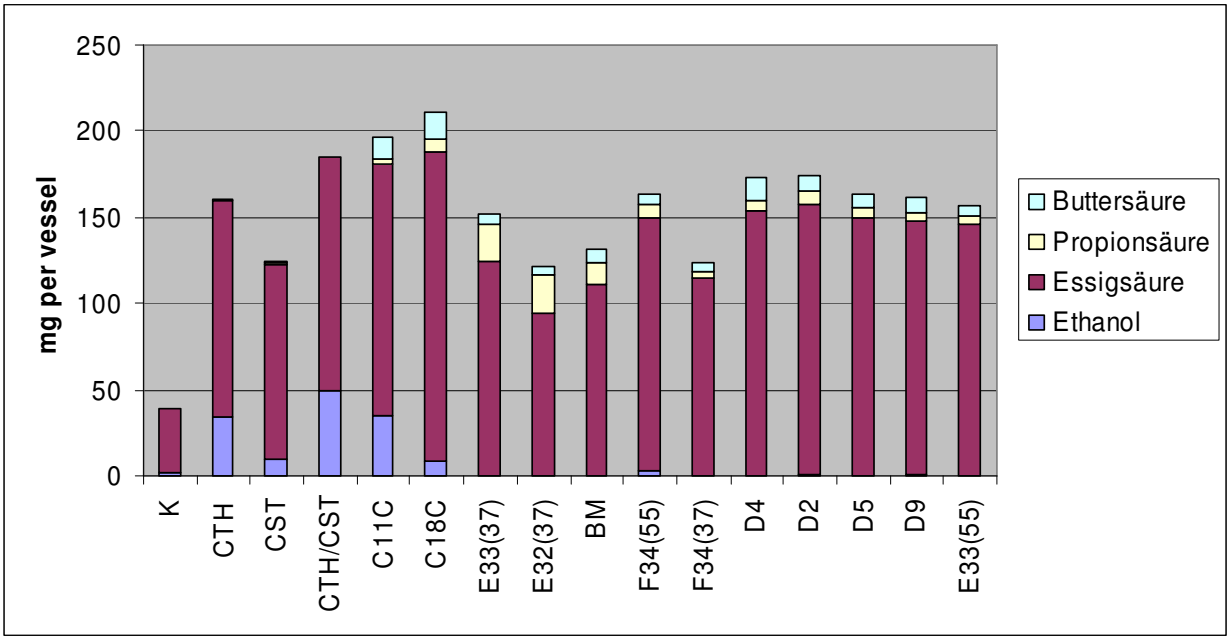


Abb. 22a: Fermentationsprodukte (1) auf MGS (mesophile und thermophile Kulturen). Messung mit GC-MS (LfL-ILT). Temperatur ist 60°C wo nicht anders angegeben.

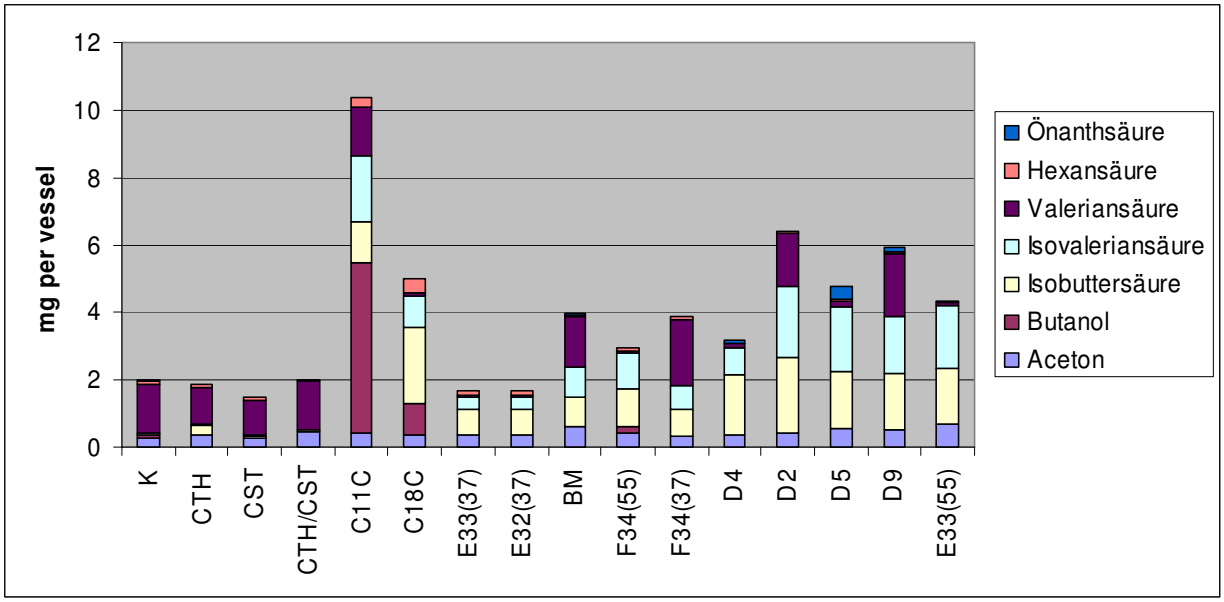


Abb. 22b: Fermentationsprodukte (2) auf MGS (anderer Maßstab als in voriger Abb.)

III.2.4 16S-rDNA-Bank der thermophilen Anreicherungskultur

Die Populationsanalyse auf molekularbiologischer Basis erlaubt eine relativ Bias-arme Bestimmung der in der Kultur vorhandenen Bakterien (Eubakterien = Bacteria in diesem Fall, da die hydrolytischen Bakterien im Zentrum des Interesses stehen), sodass auch Informationen über das Vorhandensein von nicht-kultivierbaren Bakterien gewonnen werden können. Das Auftreten von nicht-kultivierbaren Bakterien ist in dem Habitat der Biogasanlage zu erwarten, da die Bedingungen in der Anlage (Flockenbildung, Synergismus, Syntrophie etc.) in synthetischen Medien nicht annähernd nachgeahmt werden kann. Allerdings konnte durch das oben beschriebene Medium eine weitgehende Annäherung der im Medium vorhandenen Nährstoffzusammensetzung erreicht werden. Dennoch würde durch die Kultivierung (siehe unten) zumindest eine Drift der Bakterienzusammensetzung erreicht werden, wenn nicht gar der Ausschluss einiger potentiell wichtiger Bakterien(gruppen). Dies wird durch den molekularbiologischen Ansatz zumindest weitestgehend vermieden. Aber auch hier ist es möglich, dass durch präferentielle Öffnung einiger Bakterien gegenüber anderen, die schwer lysiert werden können, eine Bevorzugung (Bias) einiger Bakterien gegenüber anderen erreicht wird. Dies gilt auch für die PCR-Amplifikation, bei der die Primerbindung der generalisierten Durchschnittsprimer an einige 16S rDNA-Sequenzen besser bindet als an andere. Auch ist die Anzahl der 16S rDNA-Operons in den Genomen verschiedener Bakterien zum Teil drastisch unterschiedlich. Dies führt zu einer stärkeren Prävalenz von Bakterien, die eine größere Anzahl dieser Gene besitzt gegenüber den anderen. Doch ist dieser Unterschied auf das Ganze gesehen nicht dramatisch.

Es wird mit für die Laborpraxis überarbeiteten Methoden die Gesamt-DNA der Mikroorganismen aus den Kulturen präpariert. Die Protokolle für die Lyse der Bakterien wurden mit den Erfahrungen der LfL-ILT und der IBÖ, die auf dem Gebiet der Arbeiten mit Bakterienproben aus Naturisolaten von Boden und Gülle mehr Erfahrung besitzen, ausgearbeitet und an unsere bisher verwendeten Labormethoden angepasst. Mit gut etablierten PCR-Methoden werden mit Hilfe von Bacteria-spezifischen Oligonukleotid-Primern die 16S-rDNA-Fragmente amplifiziert und anschließend zur Vereinzelung in *E. coli*-Zellen transformiert. Die Insert-DNA-Stücke werden an-

schließend einzeln sequenziert und über Datenbank-Vergleiche (BLAST oder ARB2) einzelnen Bakterien-Gruppen zugeordnet. Dabei dienen bereits charakterisierte (in Kultur gebrachte) Bakterien als Marker. In einigen der identifizierten Gruppen sind keine verwandten Bakterien vorhanden, die bereits in Reinkultur isoliert worden sind. Dies kann daran liegen, dass für diese Gruppe noch keine Kulturbedingungen gefunden wurden, unter denen sie kultiviert werden können.

Eine 16S-rDNA-Bank (Gen der ribosomalen 16S-RNA) der thermophilen Anreicherungskultur G40 wurde sequenziert: hauptsächlich sekundäre Fermentierer wurden identifiziert, z.B. *C. thermosuccinogenes*; *C. thermocellum* wurde als hydrolytisches Bakterium ebenfalls identifiziert. Siehe 2.5.

III.2.4.1 Entwicklung einer Nachweismethode für hydrolytische Bakterien

Zunächst wurden zur Evaluierung u.a. der DNA-Isolierungsmethode spezifische Oligonukleotid-Primer (Tab. 2) für einzelne, nach bisherigen Erfahrungen häufig in thermophilen Habitaten vorkommende hydrolytische Bakterien eingesetzt, nämlich für *C. thermocellum* und *C. stercorarium* (Abb. 23). Diese Methode erlaubt gleichzeitig den Nachweis, ob in bestimmten Habitaten oder Kulturen diese beiden Spezies vorhanden sind. Sie sind damit auch eine Vorstufe für die in diesem Projekt durchzuführende Aufgabe der Kulturnachweise und Kulturverfolgung. Während *C. stercorarium*, ein thermophiles, anaerobes, cellulolytisches Bakterium nur in Kulturen nachgewiesen werden konnte, zu denen es zugesetzt worden war, wurde *C. thermocellum* in einer Vielzahl von Proben aus Biogasfermentern, aber auch aus Umweltproben nachgewiesen. Die Untersuchungen hierzu sind erst vorläufig und werden weiter verfolgt, vor allem auch im Zusammenhang mit den zusammen mit der LfL-ILT auszuarbeitenden qPCR-Methoden zur Verfolgung der Kinetik einzelner Bakterien in den Fermentern. Dies wird in einem Nachfolgeprojekt durchgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Oligonucleotidprimer-Sequenzen für den Nachweis von allen Bakterien, *C. thermocellum* und *C. stercorarium* mittels PCR-Amplification:

Bacterielle (eubacterielle) allgemeine 16S Primer :

616V	AGAGTTTGATYMTGGCTC
630R	CAKAAAGGAGGTGATCC

16S Primer für *C. thermocellum* (großes Fragment)

CTHREV	AATCATCTGCCCCACCTTC
CTHVOR	TTTACCGGAAGTATATCCTAG

[2] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ bzw. http://www.arb-home.de/group.html

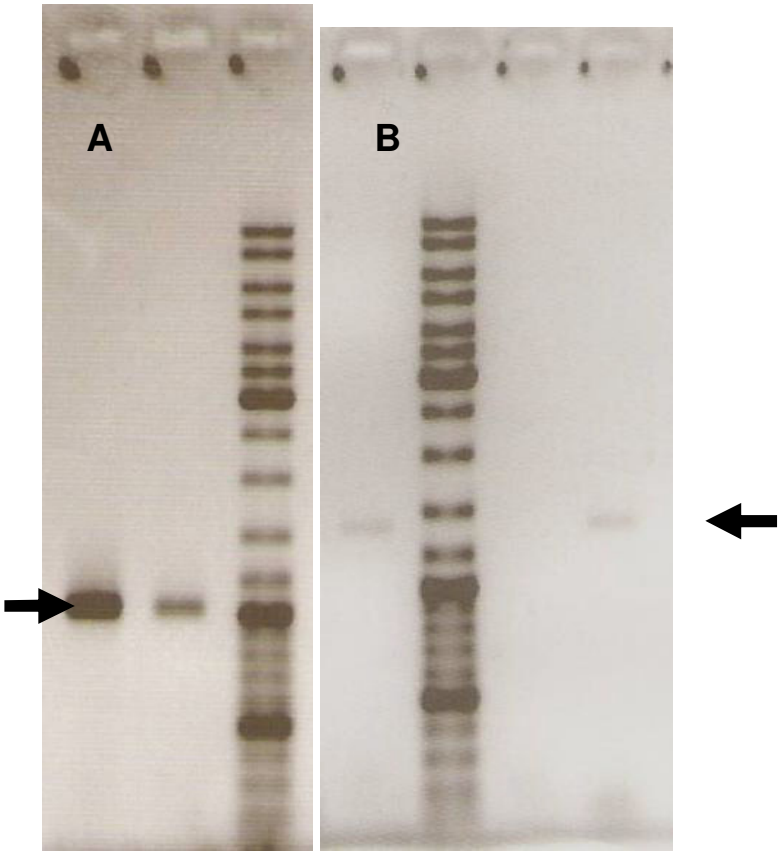


Abb. 23: PCR von Proben-DNA mit spezifischen Primern für *Clostridium stercorarium* (A) und *C. thermocellum* (B). Das Experiment in der linken Spur in jedem Bild wurde mit einer Referenzkultur durchgeführt. Die erwartete Bandengröße ist durch Pfeile gekennzeichnet.

III.2.5 Populationsanalyse der thermophilen Mischkultur

Die Ergebnisse der Kulturanalyse sind in der Tabelle dargestellt. Diese Ergebnisse aufgrund einer ersten Voruntersuchung sind vorläufig; umfangreichere und statistisch abgesicherte Daten sind in Vorbereitung. Ein phylogenetischer Stammbaum einer unbekannten Gruppe von Bakterien („Unbekannt A“) ist beispielhaft in Abb. 24 gezeigt. Er zeigt, wie weit diese in der Mischkultur vorhandenen Bakterien von allen bisher bekannten Bakterien entfernt sind.

Da zu einem Großteil der gefundenen Sequenzen keine bisher bekannten hydrolytischen Bakterien verwandt sind, kann davon ausgegangen werden, dass entweder 90% der Bakterien nicht an der Hydrolyse beteiligt sind, oder dass unter den bisher unkultivierten Bakterien noch völlig unbekannte hydrolytische Bakteriengruppen sind, die bisher nicht isoliert (und damit untersucht) werden konnten. Deshalb ist eine Isolierung hydrolytischer Bakterien mit neuen, den Bedingungen im Biogasfermenter angepassten Medien eine hervorragende und äußerst interessante Chance, neuartige hydrolytische Bakterien zu isolieren.

Es wird darauf hingewiesen, dass die Zusammensetzung der Bakterienkulturen in den Fermentern mit anderen Methoden am LfL-ILT ebenfalls durchgeführt wird. Diese Untersuchungen sind aufeinander abgestimmt und untersuchen unterschiedliche Sachverhalte und Bakterienpopulationen.

- DNA-Isolierung aus der Mischkultur
- PCR-Amplifikation der 16S rDNA

- Klonierung des Amplifikats in *E. coli*
- DNA-Isolierung von 80 Klonen
- RFLP-Analyse durch Restriktionsverdau der Plasmide (Abb. 25)
- Fragmentanalyse durch Agarose-Gelelektrophorese
- Sequenzierung ausgewählter Klone mit unterschiedlichen Fragment-Muster
- Sequenzzuordnung im Phylogenie-Programm ARB
- Zuordnung zu operationalen taxonomischen Einheiten (OTUs)

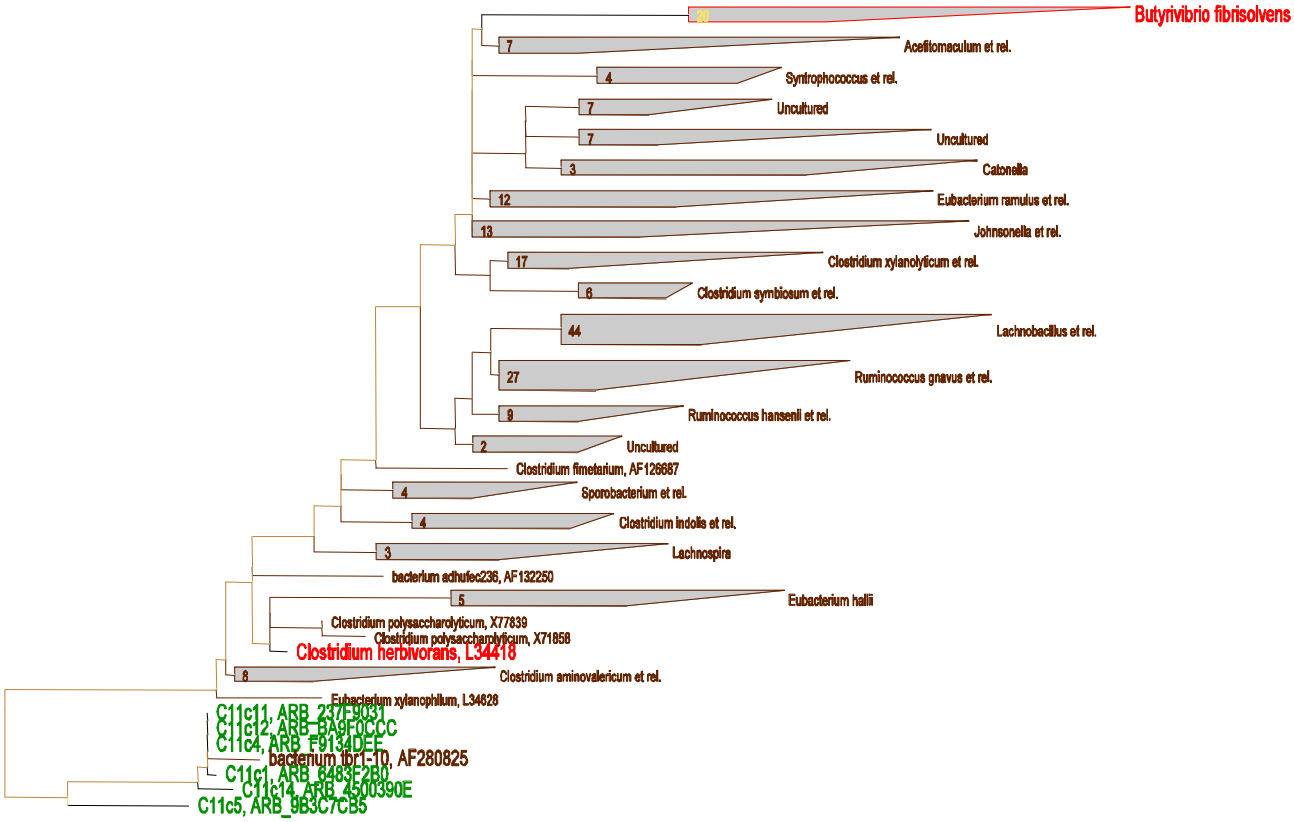


Abb. 24: Einer der angefertigten phylogenetischen Stammbäume von 16S rDNA-Sequenzen aus der thermophilen Mischkultur (grün): hier mit Sequenzen der unbekannten (=unkultivierbaren) Bakterien (A). Rot: bekannte hydrolytische Spezies. (C11c)

Alle gefundenen Sequenzen gehören zum Bakterien-Phylum Firmicutes, was nicht weiter erstaunt, da durch den Pasteurisierungsschritt bei der Anreicherung der Kulturen nicht Sporen bildende Bakterien ausgeschlossen wurden. Es war allerdings auffallend, dass relativ wenige *C. thermocellum* und keine *C. stercorarium* Sequenzen gefunden wurden (Abb. 26, 27). Dafür war evtl. die Zahl der untersuchten Sequenzen zu gering, was bedeutet, dass z.B. *C. stercorarium* nur in einer Anzahl von weniger als 1 in 87 Zellen vorkommt (Tab. 3), oder aber häufiger, aber dann sich entweder schlechter DNA aus dieser Art isolieren lässt, die Anzahl der 16S rDNA Gene im Genom extrem gering ist oder die allgemeinen Bacteria-Primer schlecht an die 16S rDNA von *C. stercorarium* bindet. Das Genom von *C. stercorarium* wird derzeit sequenziert (eigene Arbeitsgruppe), so dass die Anzahl der 16S rRNA Gene bald klar sein dürfte.

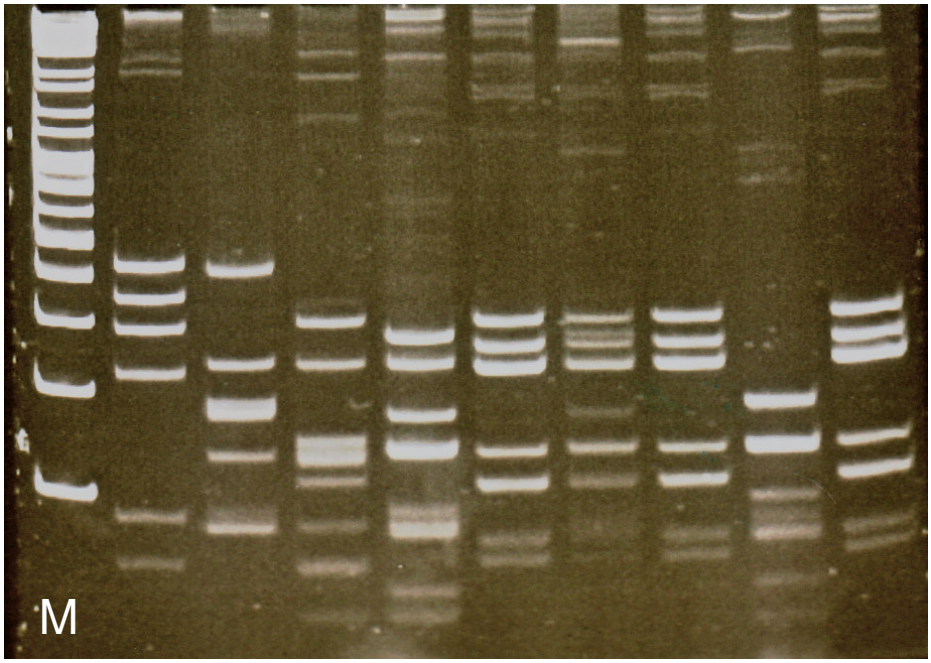


Abb. 25: Einteilung der klonierten 16S rDNA-Klone mittels RFLP-Analyse – Verdau der Plasmid-DNA mit 2 relativ häufig schneidenden Restriktionsenzymen und Einteilung nach Fragment-Pattern

Das einzige weitere cellulolytische Bakterium außer *C. thermocellum* (Abb. 27) war *C. cellulosi*, das mit einem gefundenen Klon identifiziert wurde (Tab. 3). Damit sind die bekannten cellulolytischen Bakterien(gruppen) sehr stark in der Minderzahl: 5/87 Klonen = 5,7 %. Dies ist gemessen an der doch sehr guten hydrolytischen Aktivität der Mischkultur ein sehr geringer Wert, der aber in den seit Ablauf des Projektes durchgeführten Analysen in ähnlich geringer Anzahl immer wieder in dieser Größenordnung gefunden wurde. Verglichen mit der Mischung der Reinkulturen von *C. thermocellum* und *C. stercorarium*, die keine wesentlich bessere Abbauleistung zeigten, bei der aber die hydrolytischen Bakterien mit 100 % vertreten waren, ist dies ein erstaunlich geringer Wert bei der Mischkultur.

Eine zumindest partielle Erklärung könnte darin liegen, dass ein Großteil der weiteren Bakterien, die in der Mischkultur gefunden wurden, den Abbaueffekt teils direkt und teils indirekt unterstützen: direkte Unterstützung liefern z.B. die Exoenzyme von Bakterien wie *C. thermopalmarium*, *C. thermosuccinogenes* oder den *Bacillus*-Arten, von denen bekannt ist, dass viele von ihnen Enzyme wie Amylasen, Pectinasen oder Endoglucanasen ausscheiden, die zwar allein keinen Polysaccharidabbau mit faser-degradierender Eigenschaft zustande bringen, aber durchaus lösliche Polysaccharidmoleküle weiter abbauen können, wenn sie durch die spezialisierten Enzymsysteme der polysaccharid-hydrolytischen Bakterien aus dem Faserverbund herausgelöst wurden; eine indirekte Unterstützung kommt durch Helferbakterien wie *Tepidimicrobium* (peptolytisch), oder durch die syntrophen Bakterien wie *Tepidianaerobacter* (syntroph, baut Alkohole und Lactat ab) oder *Symbiobacterium* (syntroph) zustande, die die in größerer Konzentration toxischen Stoffwechselprodukte der hydrolytischen Bakterien weiter abbauen und damit die Endprodukthemmung durch diese Stoffe verringern. Die meisten dieser Bakterien leben ebenso von den Abbauprodukten oder den Stoffwechselprodukten, die durch die Tätigkeit der hydrolytischen Bakterien entstehen.

Dies tun in einem downstream folgenden Glied der Abbaukette dann auch die methanogenen Bakterien, die in den hier untersuchten Mischkulturen nur eine kleine Nebenrolle, in vielen Anrei-

cherungen überhaupt keine Rolle spielen. Deshalb ist in den realen Fermentern, bei denen die komplette Abbaukette bis zu Methan und CO_2 erfolgt, mit einem gegenüber den hier vorgenommenen Batch-Versuchen drastisch verbesserten Abbauergebnis zu rechnen.

Nächst-verwandtes Bakterium	% identity	clones	% population
Clostridium cellulosi	91-92	1	1.1
Clostridium thermocellum	99	4	4.6
Clostridium thermopalmarium / thermobutyricum	97-99	13	14.9
Clostridium thermosuccinogenes	96-99	5	5.7
Clostridiaceae bacterium Aso3-CS349	99	26	29.9
Clostridiaceae bacterium Aso3-CS342	95	1	1.1
Tepidimicrobium sp. (Firmicutes)	98/99	2	2.3
Tepidanaerobacter sp. (Firmicutes)	95-96	10	11.5
Symbiobacterium thermophilum	97-99	6	6.9
Uncultured *Bacillus* sp. clone 96	98/99	2	2.3
Uncultured *Bacillus* sp. clone 54	95-98	17	19.5
Total		**87**	**100**

Tabelle 3: Sequenzanalyse der 87 Klone aus einer 16S-rDNA-Genbank (aus einer PCR-Amplification mit Bacteria-spezifischen Primern) und Zuordnung zu operationalen taxonomischen Einheiten (OTU)

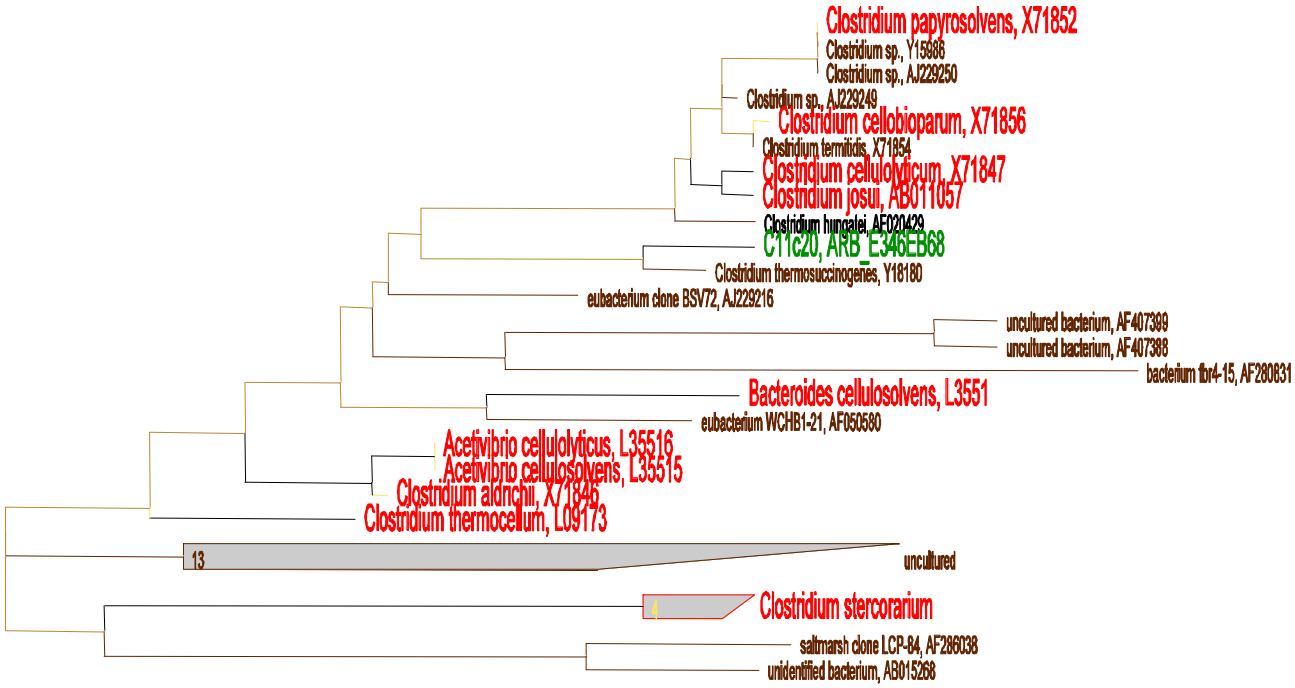


Abb. 26: Phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit dem Programm ARB. Dargestellt ist die Verwandtschaft einiger Klone (grün) zu den mesophilen cellulolytischen Clostridien (rot).

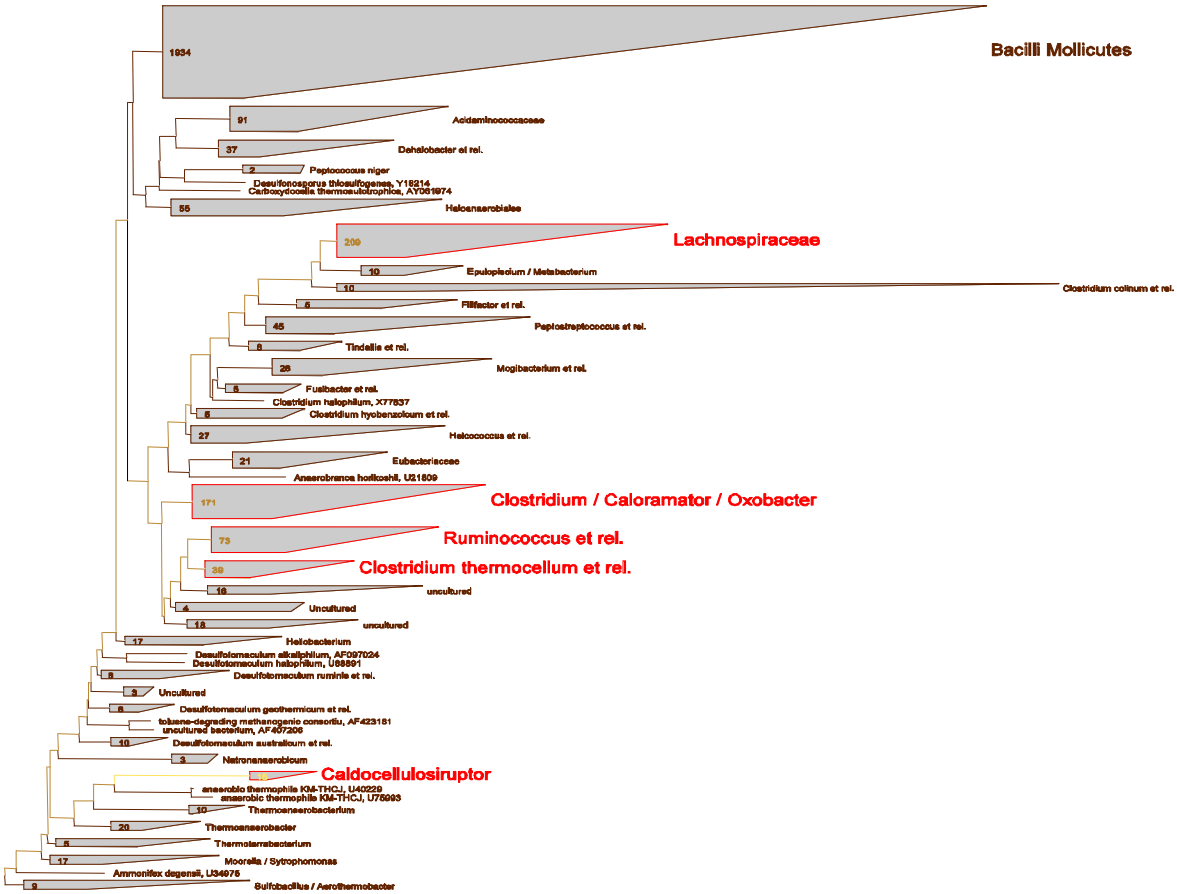


Abb. 27: phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit dem Programm ARB. Dargestellt ist die Verwandtschaft von *C. thermocellum*. Potentielle Cellulose-Abbauer sind rot markiert.

III.2.6 Einzelisolierung thermophiler hydrolytischer Bakterien

Die Isolierung hydrolytischer Bakterien mit neuen, den Bedingungen im Biogasfermenter angepassten Medien stellt eine hervorragende und äußerst interessante Chance dar, neuartige hydrolytische Bakterien zu isolieren. Erst durch die Isolierung von Einzelkulturen besteht die Möglichkeit, die Rolle dieser Bakterien in der Abbaukette experimentell genau zu definieren. So ist es durchaus noch möglich, dass bisher wichtige hydrolytische Bakterien gar nicht bekannt sind, weil aus bestimmten Bakteriengruppen ein hydrolytisches Bakterium noch nicht untersucht worden ist – dann wäre unter Umständen eine ganz Bakteriengruppe, von der Vertreter in einer Mischkultur gefunden werden, funktionell unbekannt, und im Falle einer hydrolytischen Eigenschaft unentdeckt – dies könnte einer der Gründe sein, warum in der im vorhergehenden Kapitel vorgenommenen Untersuchung, die allein auf der Basis der Ergebnisse der Verwandtschaft zu Bakterien mit bekannten physiologischen Eigenschaften beruht, so wenig hydrolytische Bakterien identifiziert worden sind. Zwar ist durch 16S-Sequenzierung und Zuordnung zu einer OTU bei weitem noch nicht klar, ob ein bestimmtes Bakterium, geschlossen aus der Aktivität eines nahe verwandten Bakteriums, tatsächlich eine bestimmte Stoffwechselaktivität besitzt, doch ist die Wahrscheinlichkeit für bestimmte Eigenschaften sehr groß, wenn die überwiegende Zahl der damit verwandten Bakterien eine solche Eigenschaft besitzen. Ein Beispiel dafür ist die Häufung der Fähigkeit zum Celluloseabbau im phylogenetischen Baum um *Clostridium cellulosi*, der weiter oben gezeigt wurde.

Allerdings hat die Isolierung von Reinkulturen den gravierenden Nachteil, dass bei weitem nicht alle in der Natur vorkommenden Bakterien in Reinkultur überlebensfähig sind. Dies hat verschiedene Ursachen, die in der Literatur dokumentiert sind. Eine davon ist, dass für jedes Bakterium ein synthetisches Medium gefunden werden muss, das die wesentlichen, für seine Lebensansprüche notwendigen chemisch-physikalischen Voraussetzungen mitbringt: Nährstoffe, Wassergehalt, pH, Pufferwirkung, Spurenelemente, C-Quelle etc.. Durch die Einbeziehung von Gärrest ins Medium wurden dabei gute Voraussetzungen geschaffen. Es überwiegt bei der Isolierung von Reinkulturen im Zusammenhang dieses Projektes die Möglichkeit, auf neue hydrolytische Bakterien, möglichst aus neuen Bakteriengruppen zu stoßen, die bisher noch nicht bekannt sind.

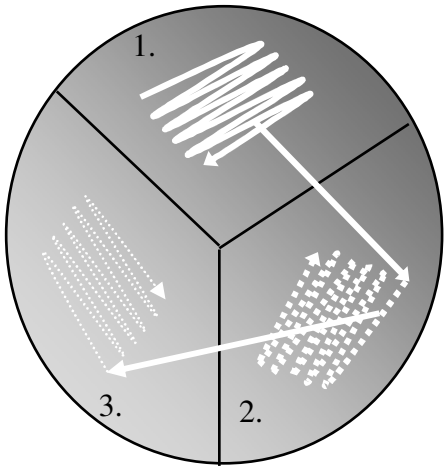


Abb. 28: Dreiösenausstrich auf anaerob präparierte Agarplatten zur Vereinzelung und Reinigung von Bakterien aus der hydrolytischen Mischkultur. Jeder Ausstrich (1 bis 3) wird mit einer ausgeglühten (sterilen) Impfnadel vorgenommen.

Die Vorgehensweise der Isolierung von Reinkulturen wird im Folgenden beschrieben. Aus der selektierten thermophilen Mischkultur G40 wurden durch Ausplattieren eines Kulturtropfens (Einzelkolonie-Ausstrich, Dreiösen-Ausstrich, Abb. 28) auf anaerob vorbereitete Agarplatten mit dem speziell für Biogasbakterien entwickelten Spezial-Medium unter strikt anaeroben Bedingungen bei 55 °C Bakterien-Einzelkolonien herangezogen. Es wurden solche Kolonien ausgewählt, die auf einer auf die Oberfläche der Agarplatte aufgebrachten Schicht kristalliner Cellulose einen Hof bilden konnten (Abb. 29). Diese Technik wurde in unserem Labor für thermophile hydrolytische Bakterien ausgearbeitet und bereits vielfach erfolgreich angewendet. Durch zwei weitere aufeinander folgende Vereinzelungsschritte im Dreiösen-Ausstrich von bereits vereinzelten Kolonien wurde versucht, zu Reinkulturen zu kommen. Dies ist wegen der immanenten Schwierigkeiten dieser Vorgehensweise nicht in allen Fällen vollständig gelungen und müsste weiter verfolgt werden.

Von den vereinzelten Kulturen wurde Gesamt-DNA isoliert, mit allgemeinen Bacteria-Primern in der PCR die 16S rDNA amplifiziert und das Amplifikat in *E. coli* kloniert. Einzelne Klone daraus wurden sequenziert. Das Ergebnis (Tab.) führte in 70 % der Fälle zu *C. thermocellum* oder nahe verwandten Arten (95-100 % Sequenzidentität). 20 % war verwandt zu bisher nicht als cellulolytisch beschriebenen Clostridien und 10% zu α-Proteobakterien, unter denen cellulolytische Arten bisher nicht bekannt sind. Die letzteren Sequenzen stammen wahrscheinlich aus Verunreinigungen der hydrolytischen Kulturen und wurden durch die DNA-Amplifizierung und die nachfolgende Vereinzelung der Plasmide aufgegriffen.

Weitere Untersuchungen sollen diese Arten näher charakterisieren. Es ist vor allem möglich, dass bei einer nicht vollständigen Reinigung der Bakterien DNA der nicht-cellulolytischen „Verunreinigung“ sequenziert wurde. Besonders interessant sind die Clostridien-Isolate, die nicht zu *C. thermocellum* gehören oder zu diesem nur entfernt verwandt sind (< 97 % Sequenzidentität). Deren cellulolytische Eigenschaften sollen noch in weiteren Arbeiten bei nachfolgenden Projekten untersucht werden – dies war in der Restlaufzeit des Projektes leider nicht mehr möglich, da dies

mikrobiologisch sehr aufwändige Arbeiten sind. Gruppen mit bekannten cellulolytischen Bakterien, die mit *C. thermocellum* weniger als 95 % identische 16S-rDNA-Sequenz haben, wurden bisher in diesen Kulturen nicht gefunden. Dies ist ein überraschendes Ergebnis. Allerdings ist noch nicht klar, ob sich unter den nicht als cellulolytisch bekannten Bakterien ein cellulolytisches befindet. Dies wäre eine Neuentdeckung.

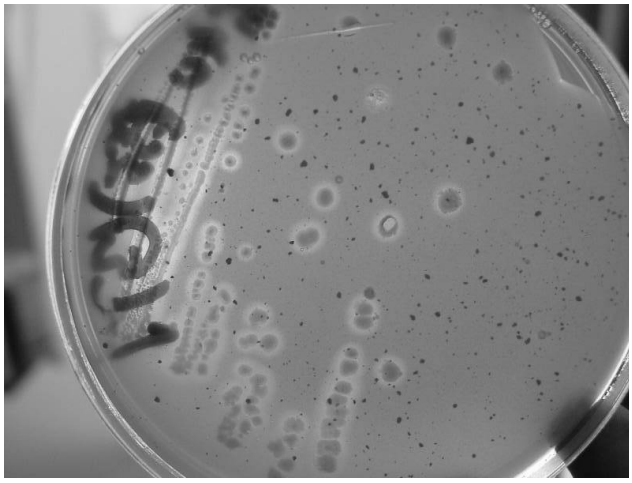


Abb. 29: Kolonien von *C. thermocellum* auf einem Hintergrund von Cellulose-Pulver (dunkle, kleine, scharfrandige Flecken). Die Kolonien sind von einem Hof hydrolysierter Cellulose umgeben. Ausstrich einer selektierten cellulolytischen Bakterienkolonie auf einer Agarplatte (55°C, anaerob). Die kristalline Cellulose wird als Overlay in Agarmedium auf die Oberfläche des klaren Mediums aufgegossen (Cellulose im Agar leicht klumpig – dunkle, scharfe Spots). Darauf werden die Bakterien ausgestrichen. Einzelne Bakterien wachsen zu Kolonien heran (hellere Flecken), die von einem Hof aufgelöster, hydrolysierter Cellulose umgeben sind.

Nach Sequenzierung der 16S-rDNA, die durch gezielte PCR mit allgemein-wirksamen Oligonukleotid-Primern gegen die Ordnung Bacteria amplifiziert wurde, konnten die einzelnen Isolate zugeordnet werden:

70 % zu *Clostridium thermocellum*

10 % zu anderen *Clostridium* sp.

10 % zu den α-Proteobakterien

10 % zu neuen, unbekannte Bakterien, nur verwandt zu noch nicht charakterisierten Isolaten.

Da es sich bei dieser Untersuchung ausschließlich um Bakterien-Isolate handelt, die auf künstlichen Medien zum Wachsen gebracht werden konnten, sind diese Prozentzahlen der Isolierungen nicht mit denen des vorigen Abschnitts 2.5. zu vergleichen.

III.3 Selektion von mesophilen hydrolytischen Kulturen mit optimaler Aktivität

Nach der Selektion thermophiler hydrolytischer Kulturen (siehe oben) wurde mit denselben Proben aus verrottendem Pflanzenmaterial auch eine Selektion unter mesophilen Bedingungen durchgeführt. Medium, Animpfung, Selektionsprinzip waren identisch, nur die Temperatur der Inkubation betrug 37 °C.

Die selektierten mesophilen Mischkulturen wurden zunächst auf das Spektrum der gebildeten Gase und der Fermentationsprodukte charakterisiert (siehe 1.2. zusammen mit den thermophilen Kulturen). An diese Untersuchungen schloss sich eine Populationsanalyse mit molekularbiologischen Methoden an, um Informationen über die an der Hydrolyse hauptsächlich beteiligten Bakterien zu erhalten (siehe 1.3.); dies beinhaltete auch die Entwicklung einer PCR-Methodik für die Bestimmung der wichtigsten hydrolytischen Vertreter; dieser Punkt wird in der Restlaufzeit des Projektes

weiter ausgearbeitet. Außerdem wurde erfolgreich versucht, aus den selektierten Mischkulturen hydrolytische Bakterien in Reinkultur zu isolieren (siehe 1.4.); diese Untersuchungen sind sehr langwierig und experimentell schwierig, waren jedoch erfolgreich. Eine Analyse der an der Hydrolyse beteiligten Proteine wird im Zusammenspiel der Projektpartner (insb. Helmholtzzentrum) Informationen über die Hauptvertreter der hydrolytischen (besonders der cellulolytischen) Enzyme ergeben, und damit indirekt Hinweise auf die wichtigsten hydrolytischen Bakterien. Voruntersuchungen haben kürzlich gezeigt, dass diese Analyse erfolgreich durchgeführt werden kann (siehe 1.5.). All diese Untersuchungen zur Bakterienzusammensetzung haben zusammengenommen bereits jetzt schon zu wichtigen Schlussfolgerungen für die Optimierung der Hydrolyse im Biogasprozess geführt, die im letzten Projektjahr noch weiter ausgebaut und verfestigt werden.

III.3.1 Selektion mesophiler hydrolytischer Kulturen

Die Proben von 2.2. wurden mit Erfolg zur Selektion hydrolytischer Kulturen bei 37 °C auf Maissilage eingesetzt. Die Ergebnisse einiger beispielhafter Kulturen sind in 2.2. abgebildet. Zum Beispiel die Kultur E32 war auf 37°C eine gut hydrolytische Kultur, allerdings merklich langsamer als die besten Kulturen bei 55 oder 60°C. Dies ist zwar aus thermodynamischen Gründen zu erwarten; allerdings setzt dies auch voraus, dass die cellulolytischen Enzymsysteme bei den erhöhten Temperaturen thermophil gefahrener Fermenter auch ausreichend aktiv sind, d.h. dass die Proteine 1. gebildet werden und 2. in aktiver Form falten, sowie 3. nicht zu denaturieren beginnen.

Die Ergebnisse zeigen im Vergleich eindeutig, dass es zumindest bei 60° (höhere Temperaturen wurden in diesem Projekt nicht untersucht) sehr aktive bakterielle Enzymsysteme gibt, die die Biomasse abzubauen in der Lage sind. Diese Enzymsysteme enthalten alle für den Faserabbau notwendigen Einzelaktivitäten. Offensichtlich jedoch sind thermophil wachsende Bakterien-Mischkulturen die aktiveren Abbauer bei 55 und 60 °C. Dies hat Konsequenzen für die verfahrenstechnische Betriebsweise von schnell-arbeitenden Biogasreaktoren mit hoher Umsatzrate. Es setzt allerdings voraus, dass die syntrophen, acetogenen und methanogenen Bakterien bei den Teilungs- und Produktionraten mithalten können, die ein höherer Materialdurchsatz durch die Fermenter mit sich bringt.

III.3.2 Hydrolytische Kulturen auf Grassilage

Auf Grassilage konnten aus keiner der Proben befriedigend hydrolytische Kulturen bei mesophilen Temperaturen (37 °C) angereichert werden. Zusammen mit den guten Ergebnissen mit Maissilage wurde dies so interpretiert, dass Grassilage ein für hydrolytische Kulturen problematisches Substrat darstellt. Der Versuch der Isolierung einer mesophilen Kultur wurde deshalb auf diesem Substrat aufgegeben.

Die Anreicherung von Mischkulturen auf Dauergrünlandsilage (DGS) war besonders zeitaufwändig und im Endeffekt nur bei der thermophilen Kultur (60°C) erfolgreich. Auch die auf Maissilage isolierten Mischkulturen wurden auf Grassilage getestet und zeigten ein teilweise recht gutes Ergebnis (Abb. 30). Dabei kamen auch die auf 37 °C isolierten Kulturen bei 60°C auf deutlich bessere Abbauraten als die originär auf 37°C isolierten Kulturen (Abb. 31). Offensichtlich enthalten solche Mischkulturen Bakterien, die sowohl bei 37 als auch bei 60°C wachsen und gut hydrolytische Enzyme produzieren können. Dies wurde für viele *Bacillus*-Arten, aber auch für Clostridien beschrieben, die Wachstum über einen sehr breiten Temperaturbereich zeigen und im allgemeinen auch bei thermophilen Temperaturen gedeihen. So ist von vielen „mesophilen“ *Bacillus*-Arten

bekannt, dass sie bis oder nahe bis 60°C wachsen können. Ähnliches wurde auch von einigen Clostridien-Arten berichtet.

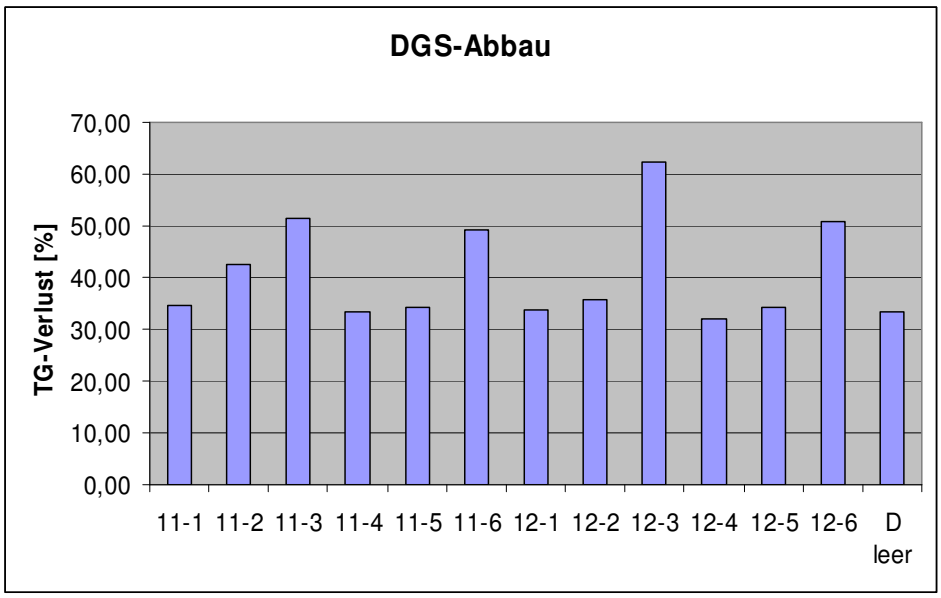


Abb. 30: Isolierung einer thermophilen Mischkultur (60 °C); Ergebnis einiger Anreicherungen.

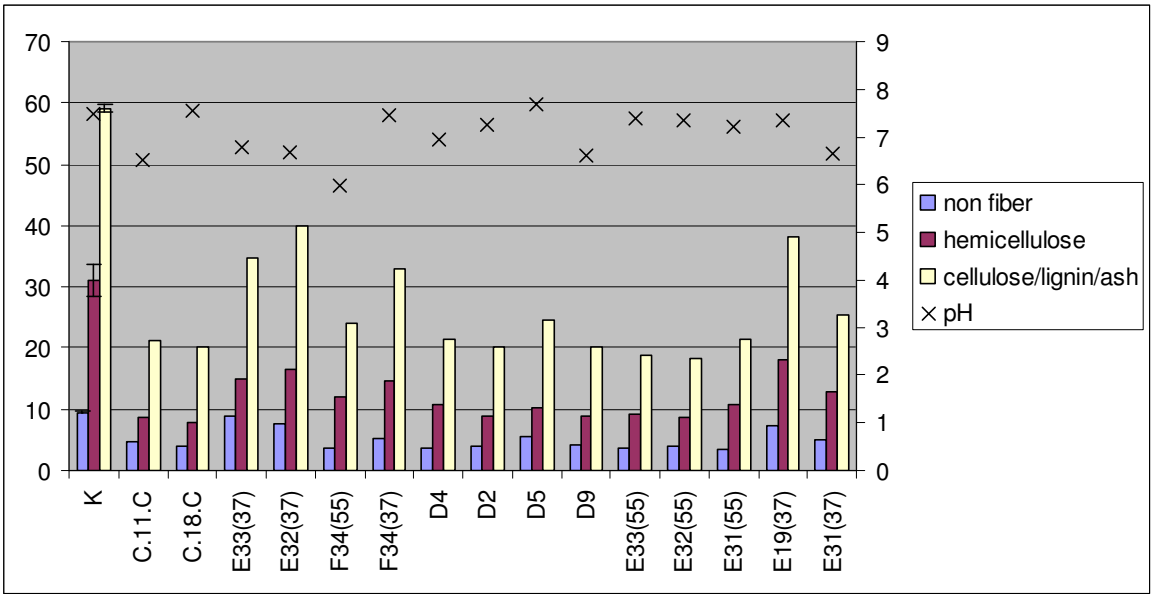


Abb. 31: Screening von mesophilen und thermophilen hydrolytischen Kulturen auf Grassilage (DGS) – 8 Tage Endpunktbestimmung. Die Kontrolle wurde ohne Inokulation beimpft. Die Temperatur ist in Klammern angegeben. Die Kulturen C und D wurden bei 55°C gezogen.

III.3.3 Vergleich hydrolytischer Kulturen bei 37°C und 60°C

Anreicherungen auf 60 °C waren deutlich besser (vor allem mit höherer Abbaurate) als die besten Kulturen auf 37 °C; auf Maissilage konnte guter Abbau erzielt werden (mit auf Maissilage ange-

reicherten Kulturen), nicht dagegen auf Grassilage (mit auf Grassilage angereicherten Kulturen). Dabei haben auf Grassilage gescreente Bakterien bei thermophilen Temperaturen nicht ganz so schlecht abgeschnitten.

Die Abbildung 32 zeigt beispielhaft ein Experiment zum Vergleich der beiden Temperaturen 37 und 55 °C. Gemessen wurde die Abnahme des Gehalts der van-Soest-Fraktionen (in etwa: non-fiber = löslich, Cellulose, Hemicellulose, Lignin+Asche), und der pH in einer Abbaukinetik von 0 bis 10 Tagen. Der Abbau insbesondere der schwer abbaubaren Cellulose ist bei 55 °C deutlich besser (und auch schneller).

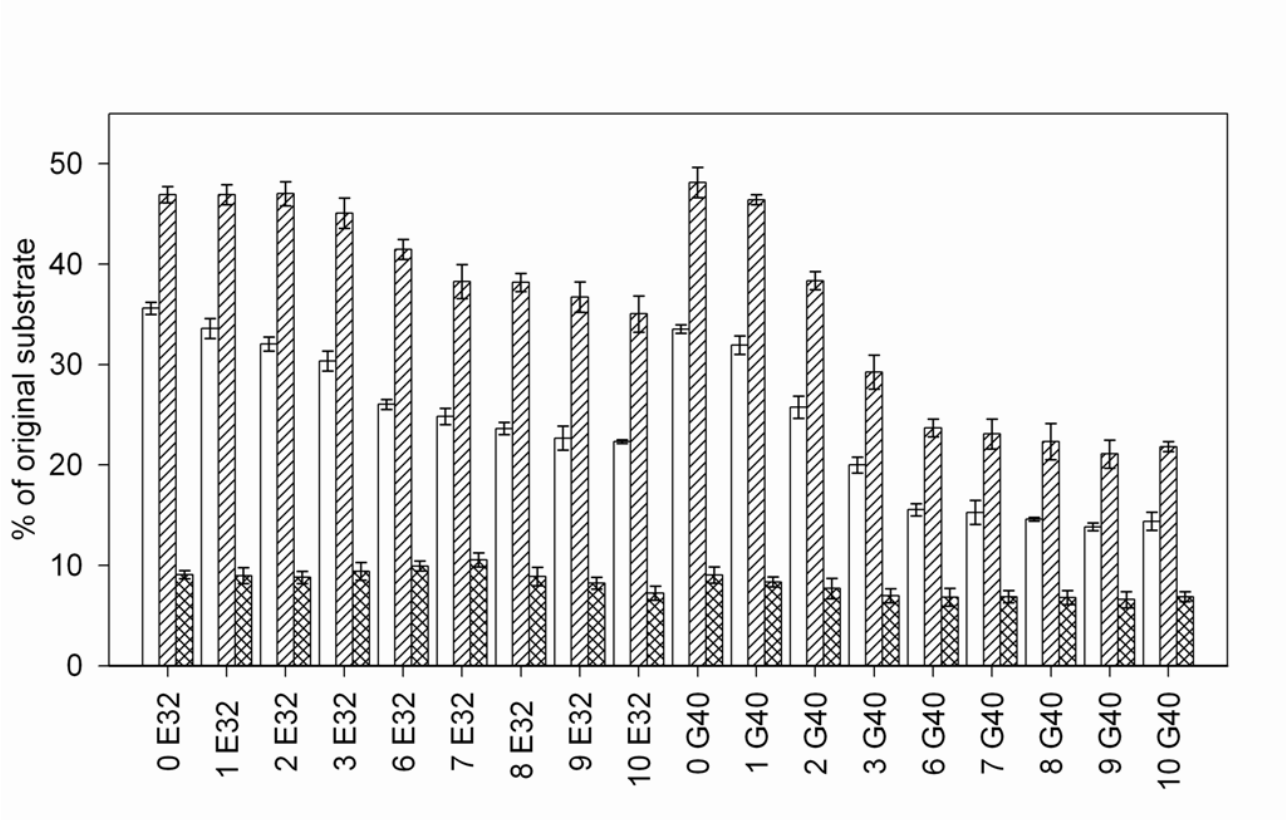


Abb. 32: Optimal hydrolytische Kulturen bei 37 °C (E32) und bei 60 °C (G40). Zeitkinetik (Tage)

III.3.4 Entscheidung für Arbeiten mit den thermophilen Kulturen

Wegen der schlechteren Ergebnisse als bei den mesophilen Kulturen wurde mit den thermophilen Kulturen weiter gearbeitet. Dies wurde mit den Partnern bei der LfL abgesprochen, die daraufhin ebenfalls einen Großteil der Versuche auf thermophile Temperaturen umgestellt haben. Zwar wurden schon in mehreren Untersuchungen thermophile Temperaturen (meist bis 55°C) vorgeschlagen und auch von einigen Anlagenbauern und –betreibern so angeboten und betrieben; doch ist, zumindest was die Hydrolyse betrifft, auch gegen höhere Temperaturen wie z.B. 60 °C nichts einzuwenden. Im Gegenteil zeigen vergleichende Untersuchungen, dass 60 °C noch leichte Vorteile gegenüber 55 °C zeigt (Daten nicht gezeigt).

Zudem ist der Hygienisierungseffekt bei 60°C stärker, so dass potentiell vorhandene pathogene Keime zuverlässiger abgetötet werden.

III.3.5 Methode zur Konservierung der hydrolytischen Kulturen mit Sporulation

Gemischte Kulturen sind schwierig auf eine solche Weise zu kultivieren, dass die Zusammensetzung der verschiedenen Bakterien in ihren Mengenverhältnissen konstant erhalten bleibt. Zudem ist diese Zusammensetzung nur aufwändig zu analysieren und damit zu kontrollieren. Deshalb wurde nach einer Methode gesucht, die es ermöglicht, eine große Zahl von Proben so zu konservieren, dass bei Anzucht die Zellen in reproduzierbaren Verhältnissen zueinander vorliegen. Eine günstige Voraussetzung dafür war, dass die Kulturen vor der Selektion pasteurisiert wurden, dass also nur Sporen bildende Bakterien vermehrt wurden. Dies ermöglichte nun die Heranziehung der Sporenbildung als Methode und damit die Entwicklung einer Sporulationsmethode, die ein gut lagerfähiges und reproduzierbar verwendbares Material liefert, das durch Sporenaktivierung (Induktion der Auskeimung) wiederum zum Wachstum gebracht werden kann.

Bakterielle Endosporen sind über Jahrzehnte fast ohne Verluste bei Raumtemperatur lagerfähig und mit einfachen Methoden aktivierbar. Die mit dieser Methode herangezogenen Kulturen wurden mit nicht-sporulierten Kulturen verglichen und die Vergleichbarkeit der Effizienz des Biomasse-Abbaus festgestellt.

III.3.5.1 Sporulationsmedien für Clostridien

Verschiedene Sporulationsmedien für Clostridien, die in der Literatur beschrieben waren, wurden hergestellt und mit der Kultur G40 beimpft (Abb. 33). Die Kulturen wurden bei 55°C drei Tage bebrütet und dann ca. 1 Woche bei Raumtemperatur zur Ausbildung der Sporen stehen gelassen. Die Anwesenheit von Sporen wurde im Phasenkontrast-Mikroskop regelmäßig überprüft. Eine spezielle Sporenfärbung ist bei Clostridien nicht notwendig, da sie stark lichtbrechend und von sehr regelmäßiger Form sind und deshalb eindeutig identifizierbar. Stark sporulierte Kulturen wurden abzentrifugiert, 3x mit sterilisiertem (autoklaviertem) entsalztem Wasser (MilliQ) gewaschen und in MilliQ-Wasser im Kühlschrank aufbewahrt. Spezielle Vorkehrungen zur Einhaltung der Anaerobiosis wurden ab dem Zentrifugationsschritt nicht getroffen.

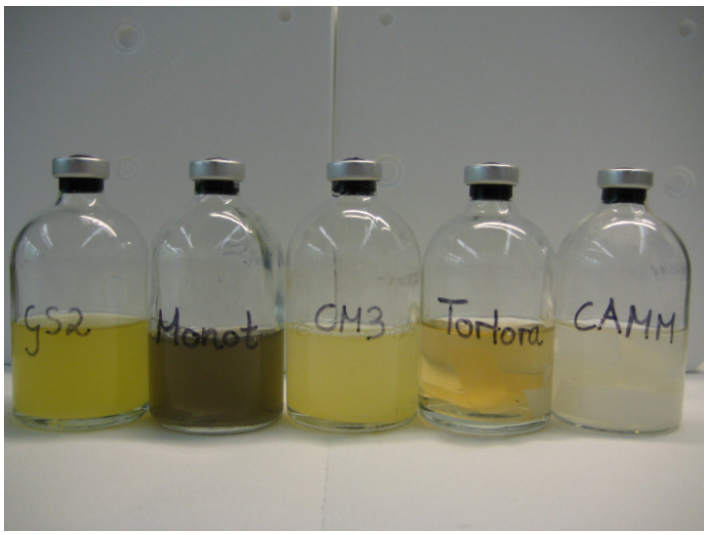


Abb. 33: Vergleich verschiedener Medien für die Sporulation der Mischkulturen. Mehrtägige Kulturen in den Medien (wie beschriftet).

Die Sporulationsrate (Sporen pro Zelle) und die Dichte der Sporen pro ml waren in GS2-Medium in mehreren Versuchsansätzen am besten. Deshalb wurden weitere Versuche unter Verwendung von GS2-Medium für die Präparation der Sporen durchgeführt. Die Reaktivierung der Sporen erfolgte durch einen Hitzeschritt in GS2 Medium mit Cellulose oder Cellobiose (meist dem Anzuchtmedium): 10 min bei 80°C. Dadurch werden eventuelle nicht-sporenbildende Kontaminanten

(auch Pilze etc.) und andere vegetative Zellen abgetötet und die Sporen zur Keimung stimuliert. Die Auskeimung erfolgt dann durch die Anwesenheit und unter Verbrauch der Nährstoffe.

III.3.6 Animpfung von Maissilage mit sporulierten Kulturen

Testkulturen wurden mit Maissilage angeimpft, um die Abbau-Effizienz der sporulierten Kulturen zu überprüfen. Es zeigte sich, dass die Abbaueffizienz im Vergleich zu einer frischen Kultur (Spuren 5 und 6) durch die dazwischen geschaltete Sporulationsprozedur nicht abnimmt. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass sich auch die Zusammensetzung der Kultur durch diese Methode nicht ändert (Daten hier nicht gezeigt).

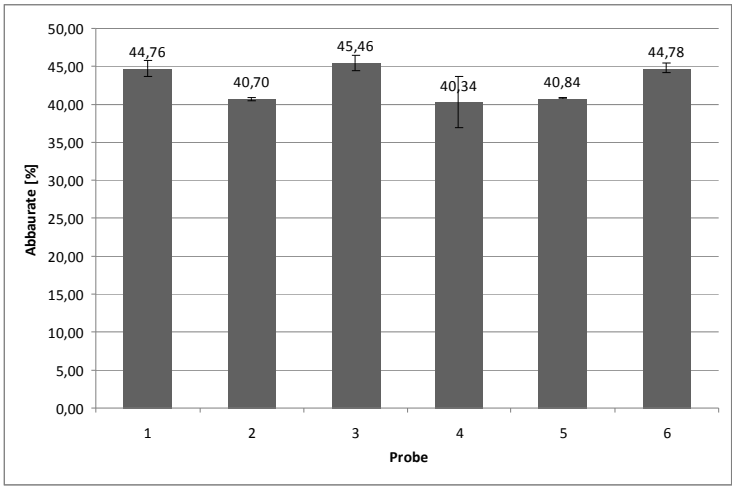


Abb. 34: Abbaurate (5d, 55°C) von 0,5 g ungewaschener Maissilage in 50 ml GS2-Medium (teilweise + 10% Gärrest) überimpft mit:

1 = 0,1 ml Sporensuspension aus Sp2 Medium

2 = 0,1 ml Sporensuspension aus Sp2 Medium +

3 = 0,5 ml Sporensuspension aus Sp2 Medium

4 = 0,5 ml Sporensuspension aus Sp2 Medium +

5 = 1 ml Frische Kultur Sp2 Medium

6 = 1 ml Frische Kultur Sp2 Medium +

Werte der Kontrollprobe wurden abgezogen.

Die Sporensuspension der Mischkultur kann nun zur Animpfung hydrolytischer Fermenter ohne Aktivitätsverlust eingesetzt werden. Dies wurde in Zusammenarbeit mit dem Projektpartner LfL durchgeführt.

III.3.7 Austestung der Sporensuspension bei Projektpartner

Sporensuspensionen wurden an den Projektpartner LfL übergeben. Durch die Zugabe von konzentrierten Sporensuspensionen in Wasser wird bei der Animpfung eine große Zahl lebensfähiger Hydrolysierer eingebracht und die Zusammensetzung der Testfermenter nicht durch das Einbringen großer Mengen Flüssigkeit, Substrat, Nährstoff- oder Puffersubstanzen geändert. Dadurch können die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Aus den Ergebnissen der Partner in Durchfluss-Fermentern wurde allerdings klar, dass die bisher angewandten (allgemein üblichen) Selektionsmethoden nach dem Stand der Technik für die hier anstehenden Fragestellungen nicht zu einer besseren Methanausbeute geführt haben. Dies mag unter anderem daran liegen, dass die bisher bei der LfL vorhandenen und in den Versuchen bereits vorgegebenen Kulturen aus optimal laufenden Prozessen stammen und daher gut optimiert und in den verschiedenen mikrobiologischen Prozessen gut aufeinander abgestimmt sind. Eine weitere Optimierung scheint durch einfache Zugabe von weiteren Bakterien nicht möglich zu sein, wenn die Kultur bereits optimiert ist. Dies kann jedoch bei Kulturen, die nicht im Gleichgewicht sind, oder bei Wechsel der Substrate anders sein und durchaus einen positiven Effekt haben.

III.3.8 Austestung der Sporensuspension bei Projektpartner

Sporensuspensionen wurden an den Projektpartner LfL übergeben. Durch die Zugabe von konzentrierten Sporensuspensionen in Wasser wird bei der Animpfung eine große Zahl lebensfähiger Hydrolysierer eingebracht und die Zusammensetzung der Testfermenter nicht durch das Einbringen großer Mengen Flüssigkeit, Substrat, Nährstoff- oder Puffersubstanzen geändert. Dadurch können die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Aus den Ergebnissen der Partner in Durchfluß-Fermentern wurde allerdings klar, dass die bisher angewandten (allgemein üblichen) Selektionsmethoden nach dem Stand der Technik für die hier anstehenden Fragestellungen nicht zu einer besseren Methanausbeute geführt haben. Dies mag unter anderem daran liegen, dass die bisher bei der LfL vorhandenen und in den Versuchen bereits vorgegebenen Kulturen aus optimal laufenden Prozessen stammen und daher gut optimiert und in den verschiedenen mikrobiologischen Prozessen gut aufeinander abgestimmt sind. Eine weitere Optimierung scheint durch einfache Zugabe von weiteren Bakterien nicht möglich zu sein, wenn die Kultur bereits optimiert ist. Dies kann jedoch bei Kulturen, die nicht im Gleichgewicht sind, oder bei Wechsel der Substrate anders sein und durchaus einen positiven Effekt haben.

III.3.9 Identifizierung hydrolytischer Schlüsselenzyme und Aufreinigung von Cellulose-bindenden Proteinen

Die Methode der Klonierung und Sequenzierung von 16S rDNA-Genen aus dem Metagenom mittels PCR, oder die Isolierung von Bakterien sind zwei voneinander unabhängige Methoden, die zur Aufklärung der hydrolytischen Bakterienflora angewendete wurden, wie weiter oben beschrieben ist. Beide Methoden haben starke Vor- und Nachteile, und bevorzugen oder benachteiligen bestimmte Bakterien (Bias). Außerdem sind beide Methoden nicht geeignet, um direkt hydrolytische (z.B. cellulolytische) Bakterien nachzuweisen bzw. direkt zu screenen. Da die phylogenetische Analyse der Gesamt-DNA keine Informationen über die hydrolytischen Eigenschaften der Bakterien enthält, und die Isolation hydrolytischer Bakterien auf die unter den jeweiligen Bedingungen kultivierbaren Arten beschränkt ist, kann eine Analyse der hydrolytischen Proteine wertvolle weitere Informationen liefern. Allerdings können die hydrolytischen Proteine nicht als solche aus der Gesamtmenge der vorhandenen Proteine heraus präpariert werden. Da aber alle bekannten wichtigen Cellulasen Bindungsmodule für das Substrat enthalten, sollte eine Anreicherung durch Adsorption an Cellulose möglich sein.

Diese dritte Methode weist direkt die cellulolytischen Enzyme in der Biogasanlage nach (Abb. 35). Auch diese Methode kann wahrscheinlich nicht alle cellulolytischen Enzyme anzeigen, insbesondere nicht, wenn sie aus Bakterien stammen, deren Cellulase-System noch nicht entdeckt oder untersucht worden ist. Allerdings ist diese Methode in der Lage, bei bekannten Enzymen zwischen stark und schwach exprimierten Enzymen zu unterscheiden: es werden also auch Enzyme von Bakterien mit sehr geringer Redundanz nachgewiesen, wenn diese stark exprimiert sind.

Dazu wurde eine Methode zur Aufreinigung von an Cellulose bindenden Proteinen (cellulolytische Enzyme) entwickelt. Mittels MALDI-TOF und Ansequenzierung von Einzelpeptiden mit Methoden aus der Proteomik werden die Einzelenzyme identifiziert; die Zahl der „hits“ gibt Auskunft über die Redundanz dieser einzelnen Proteine in der Präparation. Da ausschließlich Cellulose bindende Proteine präpariert werden, ist die Vielzahl der Proteine stark eingeschränkt und auf die cellulolytischen oder faser-hydrolytischen Enzyme spezialisiert, was die Analyse vereinfacht und auch schärft – bei hoher Trefferquote.

Prozedur:

- Mischkultur mit Cellulose-Substrat anziehen
- Kulturüberstand präparieren
- Cellulose-bindende Protein an Cellulose binden
- Waschen
- Proteine von der Cellulose ablösen
- Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE)
- mit Einzelbanden MALDI-TOF-TOF und Peptidsequenzen

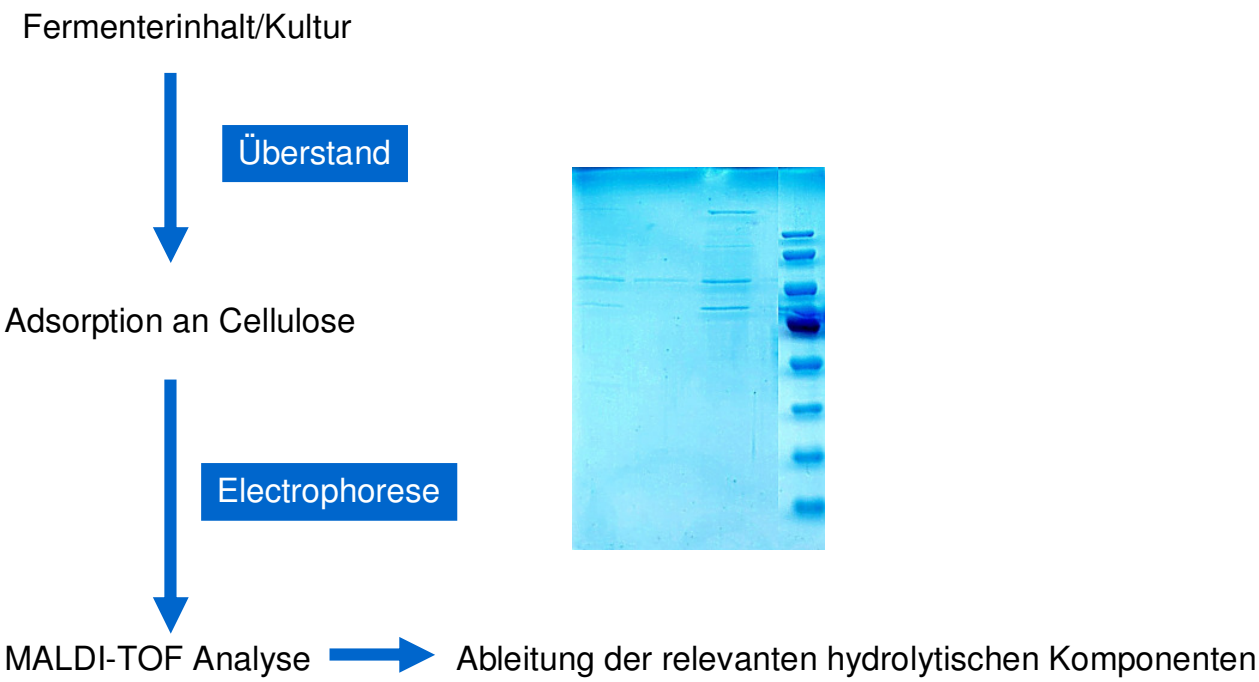


Abb. 35: Ablaufschema der Präparation und Gelelektrophorese der an Cellulose adsorbierten Proteine mit Methode A und Methode B; M=Markerproteine. 1-3: verschiedene Fraktionen.

Die MALDI-TOF Methode wurde dankenswerter Weise durch Herrn Dr. Kellermann, Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München durchgeführt. Die Ergebnisse wurden gemeinsam ausgewertet und in die unten angeführte Liste übertragen.

Das unten abgebildete Proteingel zeigt, dass relativ wenige Proteine redundant vorhanden sind. Proteinbanden von weniger stark vertretenen Enzymen wurden nicht berücksichtigt. In Koopera-

tion mit Herrn Kellermann, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, wurde anschließend die Analyse der in den Gelen aufgetrennten Proteine vorgenommen:

- Banden aus Gel ausgeschnitten
- reduziert mit DTT
- alkyliert mit Iodacetamid
- Enzymatische Spaltung üN mit 0,1 µg Trypsin in 10 µl 10 mM NH4HCO3 pH 8,5
- Aliquot zur MS und MS-MS Analyse durch TOF-TOF
- Proteomicsanalyzer 4700 Applied Biosystems
- **Alternativ**: Banden ausgeschnitten und N-terminale Sequenzanalyse nach Edman (Procise cLC Applied Biosystems)

Die Proteine in Kulturüberständen der thermophilen Mischkultur wurden an Cellulose mit zwei verschiedenen Methoden adsorbiert, abgewaschen und auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel getrennt. Die Ergebnisse sind sehr gut (siehe Abb. 36) und zeigen einzelne definierte Banden. Eine Analyse der einzelnen Proteinbanden M1 bis M10 durch MALDI-TOF und Peptid-Sequenzierung, gefolgt von Datenabgleich der gefundenen Teilsequenzen mit den Genomdaten von sequenzierten Bakterien, wurden durchgeführt. Als Ergebnis zeigte sich nach Auswertung der Daten und nur unter Heranziehung von Mehrfachtreffern (was Zufallsfunde ausschließt – Einzeltreffer wurden nicht berücksichtigt):

Bande M1	*C. thermocellum*	CipA (cellulosome anchoring protein)
Bande M2	*C. thermocellum*	Pectate lyase (cellulosomal)
	C. thermocellum	CbhA (Endoglucanase GH9)
Bande M3	*C. thermocellum*	CelK (prozessive Cellulase GH9)
Bande M4	*C. thermocellum*	CelS (prozessive Cellulase GH48)
	C. thermocellum	CelQ (Endoglucanase GH9)
	C. stercorarium	CelY (prozessive Cellulase GH48)

Die Banden M5 bis M10 ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. In den Banden M2 und M4 waren jeweils mehrere Proteine stark (mit mehr als einem Treffer pro Gen in der Datenbank) vertreten. Diese Ergebnisse wurden zur Publikation eingereicht, sind aber zum Zeitpunkt der Abgabe des Berichts noch nicht angenommen. Es fällt auf, dass fast alle identifizierten Proteine (bis auf eines) von *C. thermocellum* stammen. Darüber hinaus sind alle diese Proteine unter die Hauptkomponenten des von *C. thermocellum* produzierten Cellulosoms zu zählen, insbesondere das große Strukturprotein CipA, das die Kernkomponente des Cellulosoms ist (Scaffoldin, in Bande M1). Es ist bekannt, dass *C. thermocellum* zwar auch Cellulasen produziert, die nicht Bestandteil des Cellulosoms sind. Diese Exoenzyme werden jedoch (zumindest unter Laborbedingungen) nur in geringen Mengen produziert, würden also in diesem Test nicht auffallen, obwohl auch sie Cellulose bindende Module enthalten.

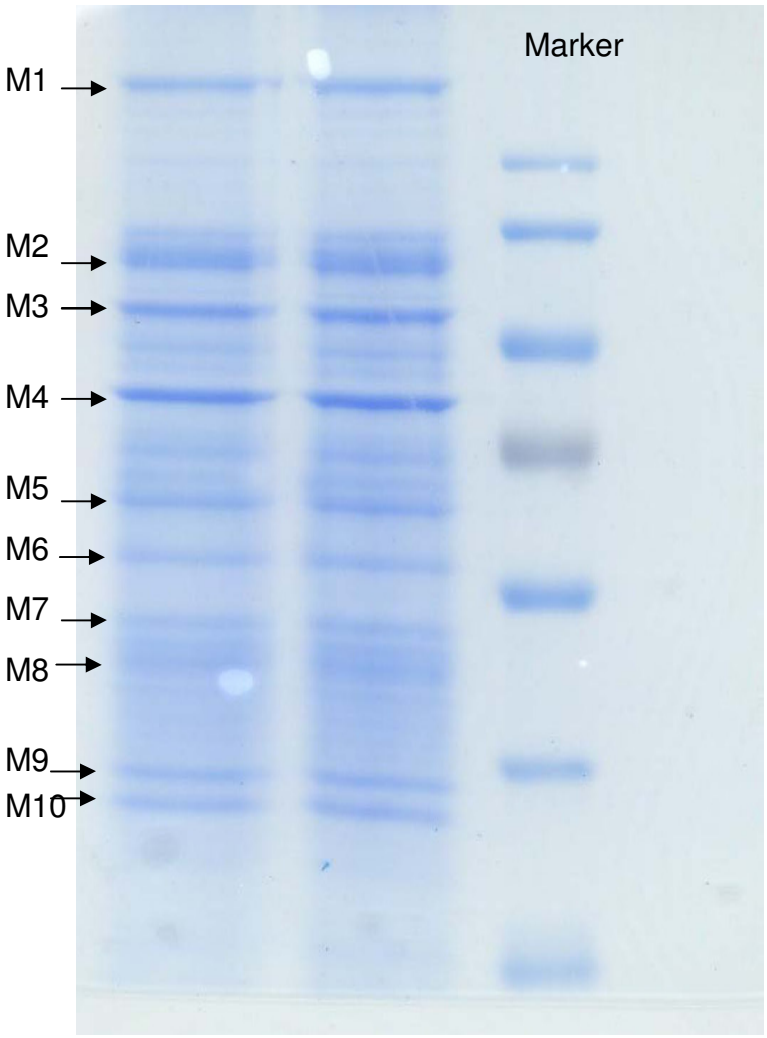


Abb. 36: Coomassie-Blau-gefärbtes SDS-Proteingel der Cellulose bindenden Proteine aus der Kultur G40. Die entnommenen und weiter analysierten Proteinbanden sind mit M1 bis M10 bezeichnet. Rechte Spur: Molekulargewichtsmarker der Fa. Sigma-Aldrich.

III.3.10 Identifizierung der Haupt-Hydrolysierer für Cellulose

Die Produzenten der hauptsächlichen Cellulose bindenden Proteine wurden durch Ansequenzierung von Peptiden und Vergleich mit Datenbanken identifiziert. Sie stammen weit überwiegend von *C. thermocellum* und *C. stercorarium,* die damit als die hauptsächlichen Hydrolysierer in der ausgewählten Kultur bestimmt werden konnten.

Das Cellulosom von *C. thermocellum* jedoch ist das effektivste bekannte Cellulase-System, insbesondere unter thermophilen Bedingungen. Es stimmt mit den Erfahrungen der Arbeitsgruppe überein, dass *C. thermocellum* sehr weit verbreitet ist und immer dort gefunden wird, wo Pflanzen-Zellmasse verrottet ist. Die sehr widerstandsfähigen Sporen ermöglichen dem Keim eine weite Verbreitung und ein gute Überdauerung von Hungerperioden, wenn keine abbaufähige Biomasse vorhanden ist. Sein Vorkommen in Biogasanlagen ist daher nicht überraschend. Seine gute Cellulose-Abbaueffizienz ist für die Anlagen hilfreich; er kann bei Temperaturen von 40 bis manchmal über 70 °C gedeihen und hat unter optimalen Wachstumsbedingungen (wie sie in der Biogasanlage vorherrschen) eine hohe Wachstumsrate, so dass er sich gut durchsetzen kann. Er ist in der Mikrobiologie der Anlage von großem Nutzen, da er nur die Cellodextrine aus dem Abbau der Cellulose

nutzt, nicht hingegen die Glukose oder die Abbauprodukte der Hemicellulosen (hauptsächlich Xylan). Diese stehen anderen Bakterien zur Verfügung. Daher ist es auch nicht überraschend, dass *C. thermocellum* mit geringer Prävalenz in der Anlage einen guten Biomasseabbau zeigt – unter den Cellulose bindenden Proteinen sind seine Proteine weit überwiegend.

Der Nachweis von Proteinen aus Cellulosomen ist ein guter Beleg dafür, dass Cellulosomen auch unter natürlichen Bedingungen eine wesentliche Rolle beim Abbau der pflanzlichen Biomasse darstellt. Bisher wurden Cellulosomen nur in Labormedien identifiziert. Auch die Zusammensetzung der Proteine scheint quantitativ ähnlich derjenigen von im Labor isolierten Cellulosomen zu sein, da exakt die Hauptproteine im Labor auch hier als die häufigsten Proteine identifiziert wurden: CipA, CbhA, CelK, CelS, und CelQ. Die Pektat-Lyase könnte unter den Bedingungen der Anzucht auf Maissilage stärker exprimiert sein, als unter Laborbedingungen. Allerdings sei kurz angemerkt, dass auch der hier vorgenommenen Präparation in gewisser Hinsicht Laborbedingungen vorherrschten, da die Anreicherung in synthetischem Medium mit Modellsubstrat vorgenommen wurde – allerdings nur für wenige Wachstumsrunden.

Das Auftreten einer Cellulase aus *C. stercorarium* zeigt die Bedeutung dieses Mikroorganismus in natürlichen Ökosystemen mit Abbau von Pflanzenbiomasse deutlich: *C. stercorarium* ist ein Spezialist für den Abbau von Hemicellulose, besitzt aber auch ein vollwertiges Cellulase-System aus zwei, miteinander synergistisch wirkenden Enzymen. Die zweite Cellulase (CelZ, GH9) hat zwar ebenfalls ein Cellulose-Bindungsmodul, konnte jedoch wahrscheinlich aus statistischen Gründen nicht entdeckt werden: es scheint nur in geringen Mengen vorzuliegen, die am Rande der Nachweisgrenze liegen. Dies wird auch der Grund dafür sein, dass keine Cellulase von weiteren Bakterien identifiziert werden konnten.

III.3.11 Aufgetretene Probleme und Bemerkungen

Folgende Probleme prinzipieller Art sind bei diesen Untersuchungen in der experimentellen Durchführung begründet: Im Labor können wegen der notwendigen hohen Parallelität der Versuchsreihen (statistische Absicherung der Werte) nur Batch-Versuche in kleinem Maßstab durchgeführt werden. Für die hier durchzuführenden hydrolytischen Bakterien-Versuche bedeutet dies insbesondere, dass die Aktivität der syntrophen und der methanogenen Bakterien unterdrückt bzw. ausgeschlossen wurde. Dadurch reichern sich die Stoffwechsel-Endprodukte der hydrolytischen Bakterien an, was letztendlich zu einer Endprodukthemmung (insbesondere zum intolerablen Absinken des pH-Wertes) führen kann. Diese Parameter wurden beim experimentellen Design mitberücksichtigt und ihre Auswirkungen untersucht, bzw. sind noch in der experimentellen Erkundungsphase im Rahmen anderer Projekte.

Ein weiteres experimentelles Problem verringert unter Umständen ein wenig die Aussagekraft der durchgeführten Versuche und die Übertragbarkeit auf die Praxis: um in kleinem Maßstab mengenmäßig und qualitativ reproduzierbare Aliquots der Substrate MGS oder DGS in die Probenfläschchen einführen zu können, war es notwendig, das Substrat stärker zu zerkleinern, als es uns von den Partner zur Verfügung gestellt und dort eingesetzt wurde. Die dafür zur Verfügung stehenden Methoden setzen aber unbedingt eine Trocknung des Substrats voraus. Feucht- oder Nassvermahlung hätte nur in sehr viel größerem Maßstab durchgeführt werden können. Allerdings verändert sowohl die Trocknung als auch die Zerkleinerung die Qualität des Substrats, was ihre enzymatische Hydrolysierbarkeit betrifft. Allerdings gibt es keinen uns bekannten anderen Weg, um diese Behandlungs-Prozedur zu vermeiden. Trotzdem konnten auf dem Hintergrund dieses experimentellen Systems prinzipielle Parameter für die Bedingungen der optimalen Hydrolyse ausgetestet werden, so wie es in diesem Bericht mitgeteilt wird. Dies sind wertvolle Hinweise für

die Praxis, da sich nur im vielfach wiederholten (und variierten) Experiment bestimmte Grundzüge des Hydrolyseprozesses herausarbeiten lassen.

Aus diesen trotz der großen Zahl an Experimenten immer noch begrenzten Versuchen konnten bisher die folgenden Parameter als optimal für die Hydrolyse im Biogasprozess abgeleitet werden:

- **pH größer 6.5, optimal ≥ 7.0**
- **Temperatur 55°C ist besser (= schneller) als 37°C, minimal besser ist 60°C**
- **Zugabe von Gärrest wirkt sich positiv aus (u.a. Pufferkapazität, Nährstoffe)**

Über andere Temperaturen als 55/60 und 37 °C können in diesen Versuchen keine Schlüsse gezogen werden. Diese Ergebnisse erlauben nun erste Rückschlüsse auf die optimalen Fermentationsparameter im Biomassefermenter. Der bessere Abbau bei 55 und 60°C wurde durch Praxisversuche bestätigt (siehe Bericht LfL-ILT 2007).

III.3.12 Am Projekt beteiligte Personen:

Projektleitung:
Dr. Wolfgang H. Schwarz

Wissenschaftler und Doktoranden:
Dr. Vladimir. V. Zverlov
Dipl. biol. Wolfgang Hiegl
Dipl. ing. Dario Cotterchio
Dipl. biol. Daniela Köck

III.4 Verwertung

- der voraussichtliche Nutzen und die wirtschaftliche Erfolgsaussichten der direkten Anwendung sind wohl eher als gering anzusehen; allerdings werden die Ergebnisse große indirekte Wirkung erfahren, weil sie weitere Untersuchungen anstoßen und dafür die Methoden an die Hand geben.
- Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende: nachdem nun feststeht, welche Bakterien hauptsächlich an der Hydrolyse beteiligt sind, wurden weitere Projekte initiiert, die die gewonnenen Erkenntnisse weiter führen (FABES-Modul). Dies erfolgt im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit, die von Studentenarbeiten (Praktikum, Bachelor, Master etc.) begleitet werden. Insbesondere ist klar geworden, dass zumindest für die Hydrolyse eine thermophile Fahrensweise deutliche Vorteile gegenüber dem mesophilen Verfahren bringt.

III.5 Erkenntnisse von Dritten

Die Ergebnisse des Pyrosequenzierungsansatzes der Arbeitsgruppe von Prof. Pühler an der Universität Bielefeld (Lst. für Genetik) unterstützt die Arbeiten durch eine Analyse der in einem bei 42 °C gefahrenen Biogasfermenter vorhandenen Biozönose. Darüber gibt es 2 Publikationen:

Schlüter et al., J. Biotechnol. (May 2008) und **Krause et al**., J. Biotechnol. (Juni 2008).

Nach diesen Analysen spielen die hydrolytischen Bakterien (haupts. *C. thermocellum*, *Caldicellulosiruptor* sp., *C. celluloyticum* und *C. phytofermentans*, die ersten drei davon cellulolytisch) aus der Gruppe der Firmicutes eine Hauptrolle unter den Bacteria. *C. thermocellum* und *C. stercorarium* (in der Aktivität ähnlich und nah verwandt zu *C. phytofermentans*) wurden von uns bei den synthetischen Bakterienmixen eingesetzt. Nur *C. thermocellum* und *Caldocellulosiruptor* sind thermophile Hydrolysierer für Cellulose. Es ist anzumerken, dass *C. thermocellum* auch bei 42 °C eine wichtige Rolle zu spielen scheint, obwohl sein Temperaturoptimum (Wachstum sowohl als auch enzymatische Aktivität) bei 60°C liegen – 42°C ist für dieses Bakterium das absolute Minimum der Aktivität.

III.6 Veröffentlichungen

- Zverlov, V.V., Hiegl, W., Köck, D.E., Kellermann, J., and Schwarz, W.H. (2009) Prevalence and role of hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic biogas reactors. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, „Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009“ Bd. 2, 16/2009, pp. 617-626. ISSN1611-4159
- Vortrag auf der Biogas Science 2009: Schwarz, W.H., Zverlov, V.V., Hiegl, W. (2009) Prevalence and role of hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic biogas reactors.
- (V.V. Zverlov, W. Hiegl, D.E. Köck, J. Kellermann & W.H. Schwarz, Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass. Submitted to: Engineering in Life Sciences) – eine Kopie des eingereichten Manuscripts liegt bei.

III.7 Schlussfolgerungen (Verfahrenstechnische Einordnung)

- *C. thermocellum* ist als der entscheidende hydrolytische Mikroorganismus identifiziert worden. Neu ist, dass *C. thermocellum* auch bei Temperaturen unter 50 °C überlebensfähig aktiv bzw. sogar hydrolytisch ist.
- Die Vermehrungsrate der hydrolytischen Bakterien ist sehr hoch, sodass die Hydrolyse nicht der limitierende Schritt zu sein scheint; andererseits wird die Hydrolyse durch die Aktivität der syntrophen und methanogenen Bakterien stimuliert.
- Bei 55 und 60 °C wurden deutlich bessere hydrolytische Kulturen isoliert als bei 37 °C.
- Entsprechend können die Bedingungen für die Hydrolyse eingegrenzt werden auf etwa pH > 6,0 bis pH 7,8, sowie auf einen Temperaturbereich größer 55 °C. Auch bei 65 °C war noch eine gute Hydrolyse zu beobachten.
- Hydrolytische Bakterien bilden in der Gesamtpopulation der Methangas-Fermenter nur einen kleinen Anteil; ihr Beitrag zum Gesamtprozess ist aber sehr hoch.

III.8 Weiterführende Arbeiten

Im Studentenarbeiten wird u.a. unter Anwendung der hier entwickelten Methoden die Verbreitung von *C. thermocellum* und *C. stercorarium* in der Natur und in Fermentern untersucht.

Die Arbeiten werden im Projekt FABES-Modul in veränderter Form und Aufgabenstellung teilweise weiter verfolgt.

IV Literatur

H. Adelsberger, C. Hertel, E. Glawischnig, V. V. Zverlov, W. H. Schwarz, Enzyme system of *Clostridium stercorarium* for hydrolysis of arabinoxylan: reconstitution of the *in vivo* system from recombinant enzymes, Microbiol. 2004, 150, 2257-2266.

T. Arai, H. Ohara, S. Karita, T. Kimura, K. Sakka, K. Ohmiya, Sequence of *celQ* and properties of CelQ, a component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome, Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001, 57, 660-666.

C. Bauer, M. Korthals, A. Gronauer, M. Lebuhn, Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach, Water Science & Technology 2008, 58, 1645-1651.

E. A. Bayer, E. Setter, R. Lamed, Organization and distribution of the cellulosome in *Clostridium thermocellum*, J. Bacteriol. 1985, 163, 552-559.

O. V. Berezina, S.P. Sineoky, G. A. Velikodvorskaya, W.H. Schwarz, V.V. Zverlov, Extracellular glycosyl hydrolase activity of the *Clostridium* strains producing acetone, butanol, and ethanol, Appl. Biochem. Microbiol. 2008, 44, 42-47.

K. Bronnenmeier, K. Kundt, K. Riedel, W. H. Schwarz, W. L. Staudenbauer, Structure of the *Clostridium stercorarium* gene *celY* encoding the exo-1,4-ß-glucanase Avicelase II, Microbiology 1997, 143, 891-898.

D. Freier, C. P. Mothershed, J. Wiegel, Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. Appl. Environ. Microbiol. 1988, 54, 204-211.

T. Fujino, P. Béguin, J. P. Aubert, Organization of a *Clostridium thermocellum* gene cluster encoding the cellulosomal scaffolding protein CipA and a protein possibly involved in attachment of the cellulosome to the cell surface, J. Bacteriol. 1993, 175, 1891-1899.

H. K. Goering, P. J. van Soest, Forage analyses, in Agricultural Research Service U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook 1970, 379.

N. D. Gold, V. J. Martin, Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis, J. Bacteriol. 2007, 189, 6787-6795.

Y. He, Y. Ding, Y. Long, Two Cellulolytic *Clostridium* Species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov., Int. J. Syst. Bacteriol. 1991, 41, 306-309.

E. A. Johnson, A. Madia, A. L. Demain, Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*, Appl. Env. Microbiol. 1982, 41, 1060-1062.

I. Kataeva, X. L. Li, H. Chen, S. K. Choi, L. G. Ljungdahl, Cloning and sequence analysis of a new cellulase gene encoding CelK, a major cellulosome component of *Clostridium thermocellum*: evidence for gene duplication and recombination, J. Bacteriol. 1999, 181, 5288-5295.

J.-J. Kim, H. N. Kim, R. Masui, S. Kuramitsu, J.-H. Seo, K. Kim, M.-H.Sung, Isolation of uncultivable anaerobic thermophiles of the family Clostridiaceae requiring growth-supporting factors, J. Microbiol. Biotechnol. 2008, 18, 611-615.

M. Lebuhn, F. Liu, H. Heuwinkel, A. Gronauer, Biogas production from mono-digestion of maize silage–long-term process stability and requirements. Water Science & Technology 2008, 58, 1645-1651.

S. Long, D. T. Jones, D.R. Woods, Sporulation of *Clostridium acetobutylicum* P262 in a defined medium, Appl. Environ. Microbiol. 1983, 45, 1389-1393.

W. Ludwig, O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Förster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lüßmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, K.-H. Schleifer, ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Res. 2004, 32, 1363-1371.

F. Monot, J. R. Martin, H. Petitdemange, R. Gay, Acetone and Butanol Production by *Clostridium acetobutylicum* in a Synthetic Medium, Appl. Environ. Microbiol. 1982, 44, 1318-1324.

E. Nettmann, I. Bergmann, K. Mundt, B. Linke, M Klocke, Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis, J. Appl. Microbiol. 2008, 105, 1835-1850.

S. Payot, E. Guedon, M. Desvaux, E. Gelhaye, H. Petitdemange, Effect of dilution rate, cellobiose and ammonium availabilities on *Clostridium cellulolyticum*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999, 52, 670-674.

F. A. Rainey, N. L. Ward, H. W. Morgan, R. Toalster, E. Stackebrandt, Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification, J. Bacteriol. 1993, 175, 4772-4779.

Y. Sekiguchi, H. Imachi, A. Susilorukmi, M. Muramatsu, A. Ohashi, H. Harada, S. Hanada, Y. Kamagata, *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006, 56, 1621-1629.

A. I. Slobodkin, T. P. Tourova, N. A. Kostrikina, A. M. Lysenko, K. E. German, E. A. Bonch-Osmolovskaya, N.-K. Birkeland, *Tepidimicrobium ferriphilum* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, Fe(III)-reducing bacterium of the order Clostridiales, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006, 56, 369–372.

A. L. L. Soh, H. Ralambotiana, B. Ollivier, G. Prensier, E. Tine, J.-L. Garcia, *Clostridium thermopalmarium* sp. nov., a moderately thermophilic butyrate-producing bacterium isolated from palm wine in Senegal, Syst. Appl. Microbiol. **1991**, 14, 135-139.

J. C. Tórtora, G. A. Costa, The suitability of Tórtora's medium for the production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* strains, Microbiol. Immunol. 1985, 29, 509-516.

K. Ueda, A. Yamashita, J. Ishikawa, M. Shimada, T. Watsuji, K. Morimura, H. Ikeda, M. Hattori, T. Beppu, Genome sequence of *Symbiobacterium thermophilum*, an uncultivable bacterium that depends on microbial commensalism, Nucleic Acids Res. **2004**, 32, 4937-4944.

E. Morag, E. A. Bayer, G. P. Hazlewood, H. J. Gilbert, R. Lamed, Cellulase Ss (CelS) is synonymous with the major cellobiohydrolase (subunit S8) from the cellulosome of *Clostridium thermocellu*m, Appl. Biochem. Biotechnol. 1993, 43, 147-151.

W. H. Schwarz, H. Adelsberger, S. Jauris, C. Hertel, B. Funk, W. L. Staudenbauer, Xylan degradation by the thermophile *Clostridium stercorarium*: Cloning and expression of xylanase, ß-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase genes in *Escherichia coli*. BBRC 1990, 170, 368-374.

W. H. Schwarz, The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria, Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001, 56, 634-649.

W. H. Schwarz, V. V. Zverlov, H. Bahl, Extracellular glycosyl hydrolases from clostridia (Eds: A. I. Laskin, J. W. Bennett, and G. M. Gadd), Adv. Appl. Microbiol. 2004, 56, 215-261

W. H. Schwarz, K. Bronnenmeier, B. Landmann, G. Wanner, W. L. Staudenbauer, N. Kurose, T. Takayama, Molecular characterization of four strains of the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*. Biosci. Biotech. Biochem. 1995, 9, 1661-1665.

P. J. van Soest, J.B. Robertson, B. A. Lewis, Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in diary cattle, J. of Diary Science 1991, 74 (10).

V.V. Zverlov, G. Velikodvorskaya, W. H. Schwarz, K. Bronnenmeier, J. Kellermann, W. Staudenbauer, Multidomain structure and cellulosomal localization of the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbhA, J. Bacteriol. 1998, 180, 3091-3099.

V. V. Zverlov, G. Velikodvorskaya, W. Schwarz, J. Kellermann, W. Staudenbauer, Duplicated *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase gene encoding cellulosomal subunits S3 and S5, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999, 51, 852-859.

V. V. Zverlov, J. Kellermann, W. H. Schwarz, Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: Identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes, Proteomics 2005, 5, 3646-3653.

V. V. Zverlov, W. H. Schwarz, Bacterial hydrolysis in anaerobic environmental subsystems – *Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fibre degraders, In Incredible Anaerobes, (Ed: J. Wiegel), Annals N. Y. Acad. Sci. 2008, 1125, 298-307.

Als Literaturquellen benutzt wurden hauptsächlich Entrez PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/) und der Bibliotheksserver der TUM (http://rzblx1.uni-regensburg.de/ezeit/fl.phtml?bibid=TUM&colors=7&lang=de&notation=ALL).

V Danksagungen

The authors were supported by grant No 22011705 from the German Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection attended by the Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR, Agency for Renewable Resources, Guelzow, Germany). The technical assistance of Sabine Dummert is gratefully acknowledged. We acknowledge samples from biogas plants in Bavaria (Germany) which were provided by LfL-ILT (Bavarian State Research Center of Agriculture, Institute for Agricultural Engineering and Animal Husbandary, Freising, Germany). T. Koellmeyer is thanked for providing preliminary results with *C. thermocellum* determination in natural environments.

Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen

Teilvorhaben 1: Optimierung der Verfahrenstechnik und Prozessautomatisierung, Prozessmonitoring und Datenmanagement

gemeinsam mit

Teilvorhaben 6: Identifikation und Quantifizierung funktionell relevanter Mikroorganismen bei der Vergärung LCB-reicher nachwachsender Rohstoffe

Abschlussbericht

M. Lebuhn, D. Andrade, C. Bauer und A. Gronauer

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
Institut für Landtechnik und Tierhaltung
Vöttinger Str. 36, 85354 Freising
E-Mail: TierundTechnik@LfL.bayern.de
Tel.: 08161/71-3450

Auftraggeber: Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe (FNR)

Auftragsdatum:	01.10.2006 FKZ 220-11-505 m. FKZ 220-119-05b
Projektleitung:	Dr. M. Lebuhn, Dr. A. Gronauer
Bearbeiter:	D. Andrade, H. Grapenthin, C. Krapf, F. Liu, C. Bauer, B. Munk, M. Lebuhn
Berichtsabschluss:	30.06.2010
Berichtsumfang:	132 Seiten

Inhaltsverzeichnis

1 Ziele 13
1.1 Aufgabenstellung 13
1.1.1 Zielsetzung 13
1.1.1.1 Verfahrenstechnik 13
1.1.1.2 Mikro- und Molekularbiologie 13
1.1.2 Planung und Ablauf des Vorhabens 13
1.2 Stand der Technik 16
1.2.1 Technische Voraussetzungen 16
1.2.2 Wissenschaftlicher Stand 16
1.2.2.1 Verfahrenstechnik 16
1.2.2.1.1 Enzymeinsatz 17
1.2.2.1.2 Prozesstemperatur 17
1.2.2.1.3 Zweistufig-zweiphasige Betriebsweise 17
1.2.2.1.4 NIRS-Kalibration 18
1.2.2.1.5 Beschickungsintervall 19
1.2.2.1.6 Gasrückführung 19
1.2.2.1.7 Langzeitstabiler Prozess 20
1.2.2.2 Mikro-/Molekularbiologiebiologie 21
1.2.2.2.1 Kenntnis der relevanten mikrobiellen Populationen 21
1.2.2.2.2 Entwicklung geeigneter molekularbiologischer Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse auf methanogene Archaeen 21
1.2.2.2.3 Untersuchung der Diversität und von Populationsveränderungen 22
1.2.2.2.4 Quantifizierung von Methanogenen 22
1.2.2.2.5 Inokulation mit hydrolytischen, cellulolytischen Bakterienanreicherungen 23
1.3 Verwendete Fachliteratur 23
1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 23
2 Material und Methoden 25
2.1 Verfahrenstechnik 25
2.1.1 Fermentersysteme 25
2.1.1.1 Batch Fermenter 25
2.1.1.2 Semikontinuierlich betriebene 6L-Fermenter 25
2.1.1.3 Einstufige Durchflussfermenter 26
2.1.1.4 Pilotfermenter SB1 und SB2 27
2.1.1.4.1 Änderungen im Substratfluss 28

2.1.1.4.2 Änderungen im Gasfluss 30
2.1.1.5 Zweistufige Fermenteranlagen 32
2.1.2 Chemische Analytik 33
2.1.2.1 TS und oTS 33
2.1.2.2 Ammoniumstickstoff 33
2.1.2.3 FOS/TAC 34
2.1.2.4 pH-Wert 34
2.1.2.5 Flüchtige Fettsäuren 34
2.1.2.6 Spurenelemente 34
2.1.2.7 Makroelemente 34
2.1.2.8 Van Soest Fraktionen 34
2.1.2.9 Gesamtzucker und Stärke 35
2.1.2.10 Rohasche und Rohfett 35
2.1.3 Berechnungen 35
2.1.3.1 Normierter Gasertrag 35
2.1.3.2 Ammoniak 35
2.1.3.3 FOS- und TAC-Werte 36
2.1.3.4 Statistik 36
2.1.4 Spurenelementzusatz 36
2.1.5 Enzymzusatz 37
2.1.6 NIRS-Kalibration 37
2.1.6.1 Probenherkunft 37
2.1.6.2 Spektrale Messung 38
2.1.6.3 Referenzanalyse 38
2.1.6.4 Modellkalibration- und Validierung 38
2.1.6.5 On-line Anwendung 39
2.2 Molekularbiologie/Mikrobiologie 40
2.2.1 DNA-Extraktion 40
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 40
2.2.3 Elektrophorese 41
2.2.3.1 Agarosegel 41
2.2.3.2 Denaturierende Gradienten-Gel Elektrophorese (DGGE) 41
2.2.3.3 Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Elektrophorese 42
2.2.4 Sequenzierung und phylogenetische Analysen 43
2.2.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) 44
2.2.5.1 Quantifizierung 44

2.2.5.2 Konstruktion eines *mcr*A-Standards 44
3 Ergebnisse und Diskussion 46
3.1 Verfahrenstechnik 46
3.1.1 Enzymeinsatz 46
3.1.1.1 Maissilage in mesophiler Monovergärung 46
3.1.1.2 Maissilage in thermophiler Monovergärung 50
3.1.1.3 Diskussion 52
3.1.2 Langzeitstabiler Prozess: Zusatz von Spurenelementen 53
3.1.2.1 Maissilage in mesophiler Monovergärung 53
3.1.2.1.1 Durchflussbetrieb 53
3.1.2.1.2 Batchversuche 59
3.1.2.2 Dynamik der Substratumsetzung 62
3.1.2.3 Maissilage thermophil 63
3.1.2.4 Grassilage mesophil 64
3.1.2.5 Grassilage thermophil 65
3.1.2.6 Diskussion: Langzeitstabilität durch Spurenelementzusatz 68
3.1.3 Thermiestufen 70
3.1.3.1 Maissilage 70
3.1.3.2 Grassilage 71
3.1.3.3 Diskussion: Thermiestufen 72
3.1.4 Zweistufig-zweiphasiger Betrieb 73
3.1.4.1 Vergleich von einstufiger mit zweistufiger Fahrweise 73
3.1.4.2 Zweiphasiger Betrieb 73
3.1.5 Gasrückführung: Effizienz pneumatischer Durchmischung bei unterschiedlichen Rührintervallen 75
3.1.6 Fütterungsintervalle 79
3.1.7 Kalibrierung der Nahinfrarotspektroskopie 81
3.1.7.1 Ergebnisse 81
3.1.7.2 Diskussion 82
3.2 Mikrobiologie und Molekularbiologie 85
3.2.1 Inokulation mit cellolytischen Inokula 85
3.2.1.1 Maissilage in thermophiler mono-Vergärung 85
3.2.1.2 Grassilage in thermophiler Monovergärung 90
3.2.1.3 Grassilage in mesophiler mono-Vergärung 90
3.2.1.4 Maissilage in mesophiler Monovergärung 92
3.2.1.5 Diskussion: Inokulation mit hydrolytisch/cellulolytischen Inokula 93

3.2.2 Molekularbiologie 94
3.2.2.1 Nukleinsäure-Extraktion und Entwicklung der Primer-/Nachweissysteme 94
3.2.2.2 Identifizierung und Diversität methanogener Archaeen 95
3.2.2.2.1 PCR-Direktklonierung, Phylogenie 102
3.2.2.2.2 Versuche mit PCR-DGGE 102
3.2.2.2.3 Versuche mit PCR-SSCP 103
3.2.2.2.3.1 Maissilage mesophil 104
3.2.2.2.3.2 Maissilage und Grassilage thermophil 108
3.2.2.2.3.3 Grassilage meso- und thermophil sowie Maissilage thermophil 108
3.2.2.2.4 Vergleich mesophil/thermophil 109
3.2.2.3 Quantifizierung methanogener Archaeen 111
3.2.2.3.1 Analytik 111
3.2.2.3.2 Quantifizierung von Fermenterproben 112
3.3 Zentrales Datenmanagement, Erstellung eines Leitfadens 118
3.3.1 Zentrales Datenmanagement 118
3.3.2 Erstellung eines Leitfadens 119
3.4 Verwertung 121
3.4.1 Enzymeinsatz 121
3.4.2 Inokulation mit hydrolytischen Organismen 121
3.4.3 Thermiestufen 121
3.4.4 Spurenelementzusatz 121
3.4.5 Nahinfrarotspektroskopie 122
3.4.6 Molekular- und Mikrobiologie 122
3.4.7 Zweiphasige Prozessführung 123
3.5 Erkenntnisse von Dritten 123
3.6 Aus FKZ 220-11-505 mit FKZ 220-11-905b entstandene Veröffentlichungen 123
3.6.1 Schriftliche Veröffentlichungen 123
3.6.2 Geplante Veröffentlichungen 124
3.6.3 Masterarbeiten 124
3.6.4 Mündliche Wissensvermittlung 124
4 Literatur 126

Abkürzungsverzeichnis

ADF	Acid detergent fibers
ADL	Acid detergent lignin
ADM1	Anaerobic Digestion Modell No 1
APS	Ammoniumpersulfat
ANME	Anaerobe Methanoxidierer
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Biogasanlagen
BHKW	Blockheizkraftwerk
CSB	Chemischer Sauerstoff-Bedarf
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DNA	Desoxyribonucleic acid
FFS	Wasserdampfflüchtige Fettsäuren
F_i	Fermenterinhalt
FNR	Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe
FOS/TAC	Verhältniss flüchtiger Fettsäuren zur Pufferkapazität
GC	Gas-Chromatograph
HAP	Hydrolyse/Acidogenese-Phase
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
IBMN	Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus NawaRo
KBE	Koloniebildende Einheiten
LB	Lysogeny Broth
LCB	Lignocellulose-Biomasse
LfL-AQU	Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung für Qualitätssicherung und Untersuchungswesen
LfL-ILT	Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung
LfU	Landesamt für Umwelt
MPN	Most Propable Number
NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
NDF	Neutral detergent fibers
NIRS	Nahinfrarotspektroskopie
NL	Norm-Liter
OLR	Organic loading rate, organische Raumbelastung
oTS	Organische Trockensubstanz

PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDH1 (4)	Pultdachhalle 1 (4), Fermenterstandorte an LfL-ILT
qPCR	Quanatitative Real-Time PCR
RNA	Ribonucleic acid
RPD	Regression Point Displacement
rpm	Rotations per minute
RT	Reverse transcription
SB	Standartbiozönose
SCFA	Scort chain fatty acids, kurzkettige Fettsäuren
SD	Standard Deviation
SEC	Standard Error of Calibration
SEV	Standard Error of Validation
sME	Spezifischer Methanertrag
sMP	Spezifische Methanproduktivität
SSCP	Single strand conformation polymorphism
TE	Trace elements, Spurenelemente
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TMR	Total mixed ration
TOC	Total organic carbon
TS	Trockensubstanz
TUM-BÖ	Technische Universität München, Lehrstuhl für Bodenökologie
TUM-MB	Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie
TUM-SWW	Technische Universität München, Institut für Siedlungswasserwirtschaft
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Batch-Versuchsanlage des LfL-ILT und wesentliche Bestandteile 25

Abbildung 2: Semikontinuierlich betriebene, thermostatisierte 6 L Fermenter 26

Abbildung 3: 32 L Durchflussfermenter des Instituts für Landtechnik und Tierhaltung ... 27

Abbildung 4: 3.500 L Pilotfermenter SB1 und SB2 vor dem Umbau 28

Abbildung 5: Fermenter SB1 (links) und Einhausung mit den beiden SB-Forschungsreaktoren (rechts) nach dem Umbau 28

Abbildung 6: Förderschnecke mit Pumpe und Mischeinheit 29

Abbildung 7: Schema des Pilotfermenters SB1 mit Temperatursonden (T_{oben}, T_{unten}) 30

Abbildung 8: Gas- und Substratfluss im Pilotfermenter SB1 31

Abbildung 9: Zweistufiges Fermentersystem (liegend, stehend) von LfL-ILT 32

Abbildung 10: Schema des Versuchsaufbaus im 2-phasigem Betrieb 33

Abbildung 11: Langzeitstabilität der mono-Vergärung von Maissilage im mesophilen Durchflussbetrieb und Wirkung des Zusatzes von Enzymen auf a) die spezifische Methanproduktion und b) den FOS/TAC-Wert 47

Abbildung 12: Wirkung des Zusatzes von Enzymen auf die spezifische Methanproduktion im mesophilen Durchflussbetrieb bei unterschiedlichen organischen Raumbelastungen 48

Abbildung 13: Enzymwirkung auf den Methanertrag, Mais mono mesophil, Durchfluss. 49

Abbildung 14: Geschätzter Hemizellulosegehalt (NDF-ADF) während des Versuchs „Enzymzusatz“ im mesophilen (Mais-) Monobetrieb. 49

Abbildung 15: Geschätzter Zellulosegehalt (ADF-ADL) während während des Versuchs „Enzymzusatz“ im mesophilen (Mais-) Monobetrieb. 50

Abbildung 16: Geschätzer Lignin Gehalt (~ADL-Gehalt) während während des Versuchs „Enzymzusatz“ im mesophilen (Mais-) Monobetrieb 50

Abbildung 17: Spezifischer Methanertrag bei unterschiedlichen Enzymzugaben (Mono-Mais, thermophil). 51

Abbildung 18: Spezifischer Methanertrag bei Zusatz unterschiedlicher Enzymcocktails . 52

Abbildung 19: Einfluss des Spurenelementzusatzes (TE, trace elements) auf den Methanertrag aus Maissilage in mesophiler Mono-Vergärung 53

Abbildung 20: Spezifischer Methanertrag aus Maissilage in mesophiler Mono-Vergärung (liegende Fermenter in PDH1) 54

Abbildung 21: Spezifischer Methanertrag aus Maissilage in mesophiler Mono-Vergärung (stehende Fermenter in Container 3) 55

Abbildung 22: Entwicklung der OLR, der Kobalt- und Propionsäuregehalte, und des FOS/TAC im Fermenter B1 56

Abbildung 23: Entwicklung der Natrium- und Nickel-Gehalte und des FOS/TAC im Fermenter B1 57

Abbildung 24: Entwicklung der OLR, der Kobalt- und Propionsäuregehalte, und des FOS/TAC im Fermenter C2 57

Abbildung 25: Entwicklung der Natrium- und Nickel-Gehalte und des FOS/TAC im Fermenter C2 58

Abbildung 26: Verteilung der FOS/TAC-Verhältnisse bei unterschiedlichen Kobaltkonzentrationen 58

Abbildung 27: Spezifischer Biogasertrag bei Zugabe des Spurenelementcocktails nach einer Aushungerungsphase (Fermenter C2, versäuert, Batch) 59

Abbildung 28: Wirkung von Spurenelementzusatz auf den Biogasertrag (Fermenter C2, Batch) 60

Abbildung 29: Spezifischer Biogas- (links) und Methanertrag (rechs) bei Zugabe unterschiedlicher Spurenelemente nach der Aushungerungsphase (Fermenter C1, Batch) 61

Abbildung 30: Spezifischer Biogasertrag nach Zugabe verschiedener Spurenelemente (Batch) 62

Abbildung 31: Vergleich der Gasproduktivitäten zweier Fermenter Mais-mesophil. a: Verlauf der Gasproduktivität bei gutem Betrieb. b: Fermenter im Übergang zur Versäuerung 63

Abbildung 32: Spezifischer Methanertrag aus Grassilage in mesophiler Mono-Vergärung (Fermenter F1 – F6, TUM-SWW) und organische Raumbelastung . 64

Abbildung 33: Spezifischer Methanertrag bei der thermophilen Mono-Vergärung von Grassilage; SpE: Zusatz von Spurenelementcocktail in 100x Dosierung (Tabelle 7) 66

Abbildung 34: Ammoniak- Ammonium- und Propionatgehalte und FOS/TAC-Werte in den Fermentern A1 - A3 bei thermophilem Betrieb mit Grassilage 67

Abbildung 35: Spezifischer Methanertrag aus Grassilage in thermophiler Mono-Vergärung (Fermenter F1 – F6, TUM-SWW, Garching) und organische Raumbelastung 68

Abbildung 36: Kobalt (links) und Natrium (rechts) -gehalte der verwendetenen Mais- und Grassilagen 69

Abbildung 37: Spezifischer Methanertrag aus Maissilage in meso- und thermophiler Mono-Vergärung (Fermenter B1 – C3, LfL-ILT) bei unterschiedlicher organischer Raumbelastung (OLR) 71

Abbildung 38: Spezifische Methanerträge bei unterschiedlichen Ammoniakkonzentrationen 72

Abbildung 39: Gasdaten und pH-Werte vom Hydrolysefermenter P1 in der Anfahrphase und im anfänglichen regulären Betrieb 74

Abbildung 40: Ausbildung von Temperaturgradienten in Abhängigkeit von der Gasrückführung und vom Rührintervall 76

Abbildung 41: Energiebilanz mit und ohne Gaseinpressung 78

Abbildung 42: Spezifischer Methanertrag des Pilotferementers SB1; Maissilage-mono, mesophil 78

Abbildung 43: Methan- und Kohlendioxidgehalt bei stündlichem (links) und 2-stündlichem (rechts) Fütterungsintervall 79

Abbildung 44: Methan- und Kohlendioxidgehalt bei halbtägigem Fütterungsintervall 80

Abbildung 45: Spezifische Methanproduktion (Differenzbetrag) im thermophilen Batch-Betrieb aus Maissilage (mono); Einfluss verschiedener cellulolytischer Inokula; a) und b) beim Ansatz unter N_2-Atmosphäre und c) beim Ansatz mit Luftzutritt 86

Abbildung 46: Differenz der Methanerträge zur Kontrolle bei Zugabe definierter Inokula in 2 L Batchversuchen; Mais Mais-mono-Betrieb, thermophil 87

Abbildung 47: Methanertrag bei Fermentern mit Zusatz der Anreicherungen 11 und 12 (32 L Durchfluss) und der autoklavierten Kontrolle vor und nach der Inokulation 88

Abbildung 48: Einfluss cellulolytischer Inokula auf die spezifische Methanproduktion im semikontinuierlichen thermophilen Betrieb aus Maissilage (mono-Vergärung) 89

Abbildung 49: Übergang von 3 mesophil Mais-mono betriebenen 32 L Durchflussfermentern in den thermophilen Betrieb und Test von 6 verschiedenen hydrolytisch/cellulolytischen Inokula 89

Abbildung 50: Verlauf des spezifischen Methanertrags und Einfluss der Anreicherung N2, 32 L Durchflussfermenter LfL-ILT, Gras mesophil 91

Abbildung 51: Einfluss der Anreicherung N2 auf den spezifischen Methanertrag, Grassilage mesophil, 32 L Durchflussfermenter LfL-ILT 91

Abbildung 52: Verlauf des spezifischen Biogasertrags im Fermenter mit Inokulation von Sporen der Anreicherung #41 gegenüber der Kontrolle (autoklavierte Kultur #41) 93

Abbildung 53: Verhältnis zwischen den spezifischen Methanerträgen des beimpften Fermenters und der Kontrolle (Reaktoren V1, V2; Mais-mesophil) 93

Abbildung 54: Mit „whole-cell-PCR“ erhaltene *mcr*A/*mrt*A-Amplifikate ausgewählter Stämme methanogener Archaeen 95

Abbildung 55: Phylogenetischer Stammbaum (Neighbour-Joining, Nukleotide) methanogener Archaeen (*mcr*A/*mrt*A) 96

Abbildung 56: Ausschnitt aus einem phylogenetischen *mcr*A/*mrt*A Stammbaum (Maximum Likelihood, Aminosäure-Ebene) 97

Abbildung 57: *mrt*A-Sequenzen und phylogenetische Position des neuen "Genus IV" der *Methanobacteriaceae* 98

Abbildung 58: Vergleich der *mcr*A-/*mrt*A-Amplifikation ohne (5 Spuren links) und mit GC-Clamp (5 Spuren rechts) 102

Abbildung 59: Schmelzkurve des *mcrA*-Amplifikats von *Methanococcus vannielli* 103

Abbildung 60: SSCP-Gel mit *mcr*A/*mrt*A-Amplikons von ausgewählten methanogenen Typ- und Referenzstämmen 104

Abbildung 61: *mcr*A/*mrt*A-PCR-SSCP-Zeitreihenanalyse von Proben aus dem mesophilen Mais-mono-Fermenter C3 mit zugehörigen FOS/TAC Werten und der organischen Raumbelastung (OLR) 105

Abbildung 62: SSCP-Zeitreihe aus Fermenter B2 106

Abbildung 63: Diversität von methanogener Archaeen bei verschiedenen Prozesszuständen 107

Abbildung 64: SSCP-Bandenprofile für Proben aus thermophilen Mais- und Grassilagefermentern im Vergleich 108

Abbildung 65: SSCP-Gel mit Mais-thermophiler, Gras-thermophiler und Gras-mesophiler Betriebsweise 109

Abbildung 66: Diversität methanogener Archaeen in mesophilen und thermophilen Fermentern (Mais-mono) 110

Abbildung 67: Diversität methanogener Archaeen in mesophilen und thermophilen Fermentern (Gras-mono) 110

Abbildung 68: Standardgerade in der qPCR-Analyse, Mais-mono mesophil 111

Abbildung 69: Optimierter *mrc*A-/*mrt*A-EvaGreen Assay. Links je drei Wiederholungen pro Verdünnung. Rechts die Schmelzkurvenanalyse 112

Abbildung 70: Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter B1 113

Abbildung 71: Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter B2 114

Abbildung 72: Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter B3 115

Abbildung 73: Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter C1 115

Abbildung 74: Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter C2 116

Abbildung 75:Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter C3 117

Abbildung 76: Scatterplot der Konzentration methanogener Zellen und der Methanproduktivität 117

Abbildung 77: Benutzeroberfläche in der Datenbank 119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablauf der Arbeitspakete im Bereich Verfahrenstechnik 14

Tabelle 2: Ablauf der Arbeitspakete im Bereich Mikrobiologie 15

Tabelle 3: Günstige Konzentration gelöster Spurenelemente im Klärschlamm-Anaerobreaktor (Mudrack und Kunst, 2003) 20

Tabelle 4: Messgenauigkeit und Messprinzip der Sensoren des Gasanalysegerätes 27

Tabelle 5: Dosierung des Spurenelement-Cocktails 30

Tabelle 6: Betriebsdaten von den Fermentern P1 und P2..... 32

Tabelle 7: Konzentration der Spurenelemente in den Cocktails..... 36

Tabelle 8: Statistische Kenngrößen des Kalibrier- und Validierdatensatzes für jeden Prozessparameter. 38

Tabelle 9: Primersequenzen für die Amplifikation des *mcr*A/*mrt*A-Gens..... 40

Tabelle 10: PCR-Ansatz für die Amplifikation mit dem *mcr*A/*mrt*A-Primersystem 40

Tabelle 11: Temperaturprofil für die *mcr*A/*mrt*A-PCR 41

Tabelle 12: 0 %ige Polyacrylamidlösung 42

Tabelle 13: 80 %ige Polyacrylamidlösung 42

Tabelle 14: Zusammensetzung der denaturierenden Lösung..... 42

Tabelle 15: Zusammensetzung des SSCP-Gels 42

Tabelle 16: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes 44

Tabelle 17: Temperaturprofil der qPCR..... 44

Tabelle 18: Konzentration der Spurenelemente (mg $*$ kg FM^{-1}) in den Fermentern A1 – A3 (Grassilage thermophil)..... 66

Tabelle 19: Rührintervalle und Stromverbrauch..... 75

Tabelle 20: Fütterungsintervalle und Gasanalysen 79

Tabelle 21: Ergebnisse der Modellerstellung und –prüfung für Mais-, Grasvergärung allein, sowie gemeinsam 81

Tabelle 22: Ergebnisse der on-line Messungen für die Parameter Trockensubstanz (TS), org. Trockensubstanz (oTS) sowie Ammonium (NH_4-N) 82

Tabelle 23: Phylogenetische Klassifizierung von *mcr*A/*mrt*A-Sequenzen aus Maissilage-Fermentern in thermophiler Betriebsweise 98

Tabelle 24: Phylogenetische Klassifizierung von *mcr*A/*mrt*A-Sequenzen aus Grassilage-Fermentern in thermophiler Betriebsweise..... 99

Tabelle 25: Phylogenetische Klassifizierung von *mcr*A/*mrt*A-Sequenzen aus Maissilage-Fermentern in mesophiler Betriebsweise 100

Tabelle 26: Phylogenetische Klassifizierung von *mcr*A/*mrt*A-Sequenzen aus Grassilage-Fermentern in mesophiler Betriebsweise..... 101

Tabelle 27: Zusammensetzung der Population methanogener Archaeen bei unterschiedlichen Fermenterzuständen, Maissilage mesophil 106

I Kurzdarstellung

1 Ziele

1.1 Aufgabenstellung

1.1.1 Zielsetzung

Die wesentliche Zielsetzung des vorliegenden Teilvorhabens war die Optimierung der Monovergärung von Mais- und Grassilage für die Biogasproduktion. Die Aufgabenstellungen betrafen dabei zwei Fachgebiete, die Verfahrenstechnik und die Mikro- und Molekularbiologie.

1.1.1.1 Verfahrenstechnik

Bei den verfahrenstechnischen Ansätzen waren Bedingungen so zu optimieren, dass ein langzeitstabiler Prozess entsteht. Dabei sollte z.B. die Bedeutung von Spurenelementen und ihr Einsatz in den Prozess geprüft werden. Weiterhin war die Zugabe von Enzymen und der Einsatz unterschiedlicher Thermiestufen (mesophiler und thermophiler Betrieb) zu untersuchen. Auch Möglichkeiten, den Prozess durch Gasrückführung, durch eine 2-stufig-2-phasige Prozessführung und durch engere Fütterungsintervalle zu verbessern, sollten geprüft werden. Schließlich sollte versucht werden, die Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS) gegen chemisch/physikalische Schlüsselparameter des Prozesses zu kalibrieren.

1.1.1.2 Mikro- und Molekularbiologie

Im Bereich Mikro- und Molekularbiologie war zu prüfen, ob der Zusatz durch Partner Technische Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie (TUM-MB, FKZ 220-11-705) selektierter hydrolytischer Mikroorganismenanreicherungen die spezifische Methanproduktion steigern kann. Inokula, die sich in Technikumsmaßstab als leistungssteigernd erwiesen haben, sollten an Partner Fa. Schmack AG (FKZ 220-11-605) geliefert und zum weiteren Upscaling bis in den Praxismaßstab geführt werden.

Weiterhin waren molekularbiologische Methoden zur qualitativen und quantitativen Erfassung der methanogenen Populationen zu entwickeln und zu evaluieren. Mit diesen sollten Populationsänderungen erfasst und „Keyplayers“ identifiziert werden. Dabei bestand die Absprache, dass Partner TUM-MB und Partner Technische Universität München, Lehrstuhl für Bodenökologie (TUM-BÖ, FKZ 220-118-05) das Segment der hydrolytisch-cellulolytischen Bakterien und das Institut für Landtechnik und Tierhaltung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL-ILT, FKZ 220-11-505 mit FKZ 220-11-905b) den Bereich der methanogenen Archaeen bearbeiten.

1.1.2 Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des von der FNR (Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe) geförderten Verbundprojektes IBMN (Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus NawaRo) war LfL-ILT (Institut für Landtechnik der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft) als Projektpartner und Koordinator tätig.

Zum wissenschaftlichen Austausch und zur strategischen und inhaltlichen Weiterausrichtung fanden jährlich Statusseminare statt. Als Ergebnis dieser Abstimmungen mussten einige Zielsetzungen in begrenztem Umfang modifiziert werden. Als essentielles Ergebnis zeigte sich beispielsweise, dass ein langzeitstabiler Betrieb mit alleiniger Maissilage Fütterung (Maismono) ohne eine Supplementierung mit Spurenelementen nicht zu gewährleisten war. Daher wurde dieser ursprünglich nicht im Programm vorgesehene Arbeitsinhalt als neues Arbeitspaket 3-4 (Tabelle 1, Tabelle 2) hinzugefügt, auf andere Arbeitsinhalte (z.B. Test verschiedener Rührintervalle und –intensitäten) wurde dafür verzichtet.

Im Winter 2009 wurde als Abschlussveranstaltung in Erding der Kongress „Biogas Science 2009“ mit internationaler Ausrichtung durchgeführt und von LfL-ILT mitorganisiert.

Nachfolgend sind die Zeitpläne der verfahrenstechnischen (Tabelle 1) und der mikrobiologischen Bereiche (Tabelle 2) des gemeinsamen Teilvorhabens innerhalb der betreffenden Arbeitspakete mit Start im Oktober 2006 und Abgabe des gemeinsamen Abschlussberichts im Juni 2010 dargestellt.

Tabelle 1: Ablauf der Arbeitspakete im Bereich Verfahrenstechnik

Arbeits-		2006	2007				2008				2009				2010	
paket	Bezeichnung	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12	Q13	Q14	Q15
AP 0-0	Koordinierung des Verbundprojektes															
AP 2-1	LCB-Organismen															
AP 2-3	Inokulation Labormaßstab															
AP 3-1	Evaluierung Inokulation und mikrobiologisches Monitoring															
AP 3-2	Effizienzsteigerg. durch Optimierung d. Verfahrenstechnik, Prozesssteuerung															
AP 3-3	modellgestützte Steuerung und Regelung															
AP 3-4	Mikrobiologische Langzeitstabilisierung des Prozesses															
AP 4-1	Validierung an Praxisanlagen und Regelwerk															
	Zwischenbericht bzw. Gemeinsamer Abschlussbericht					X				X						X
	Kongress Erding 2009													X		

gelb markierte Felder kennzeichnen die Mitarbeit des Antragstellers an den grau unterlegten Gesamtzeiten für die Arbeitspakete

Der Arbeitsinhalte des verfahrenstechnischen Teils wurden dabei im Wesentlichen an LfL-ILT durchgeführt, lediglich die semikontinuierlichen 6 L Fermenter wurden am Institut für Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München (TUM-SWW) betrieben.

Die mikro- und molekularbiologischen Inhalte (FKZ 220-11-905b) wurden am Institut für Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München (TUM-SWW) mit Betreuung durch den Projektleiter des FKZ 220-11-505 (LfL-ILT) bearbeitet.

Tabelle 2: Ablauf der Arbeitspakete im Bereich Mikrobiologie

Arbeits-paket	Bezeichnung	2006	2007				2008				2009				2010	
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12	Q13	Q14	Q15
AP 0-0	Koordination Verbundvorhaben															
AP 1-1	Monitoring Praxisanlagen															
AP 2-1	LCB-Organismen, Screening 2L Batch; Bioinformatik, Molekularbiologie															
AP 2-2	Modellentwicklung															
AP 2-3	Inokulation Labormaßstab / Prozesshilfsstoffe (6L manuell Durchfluss)															
AP 2-3	Inokulation Labormaßstab (36L Durchfluss, 2-phasiger Betrieb)															
AP 3-1	Evaluierung Inokulation und mikrobiol. Monitoring (Technikums/Pilotmaßstab)															
AP 3-2	Effizienzsteigg. durch Optimg. d. Verfahrenstechnik., Prozesssteuerg.															
AP 3-3	Modellgestützte Steuerung und Regelung															
AP 3-4	Mikrobiologische Langzeitstabilisierung d. Prozesses															
AP 4-1	Validierung an Praxisanlagen und Regelwerk															
AP 5-1	Ökobilanz, Benchmarking															
	Zwischenbericht, Gemeinsamer Abschlussbericht					X				X						X
	Kongress Erding 2009													X		

gelb markierte Felder kennzeichnen die Mitarbeit des Antragstellers an den grau unterlegten Gesamtzeiten für die Arbeitspakete

Die Arbeitsinhalte Inokulation, Evaluierung von Effekten der Inokulation und Upscaling eventuell leistungsfördernder Inokula befand sich im Schnittfeld der Bereiche Verfahrenstechnik und Mikrobiologie (Bioverfahrenstechnik, Bioaugmentation). Dieser Arbeitsbereich ist im Folgenden zusammengefasst im Arbeitsbereich Mikro- und Molekularbiologie abgehandelt.

In der Planung sollten von Partner TUM-MB auf hocheffizienten Celluloseabbau selektierte hydrolytische Mikroorganismenanreicherungen an den Durchflussbetrieb adaptiert, evaluiert und an den industriellen Partner übergeben werden. In der Evaluierung an LfL-ILT und teilweise TUM-SWW konnten jedoch keines der gelieferten Inokula die spezifische Methanproduktion gegenüber dem natürlichen mikrobiellen Aufwuchs steigern (siehe 3.2.1). Eine planungsgemäße Weitergabe von Inokula konnte daher nicht erfolgen.

Die molekularbiologischen Aufgaben des vorliegenden Teilvorhabens beschränkten sich, wie in 1.1.1.2 ausgeführt, auf Arbeiten mit methanogenen Archaeen.

1.2 Stand der Technik

1.2.1 Technische Voraussetzungen

Für die Durchführung der Versuche des FKZ 220-11-505 mit 220-11-905b waren mit Ausnahme der semikontinuierlich betriebenen 6 L Fermenter in Garching (s. unten) die benötigten Reaktoren inklusive der Mess- und Steuerungseinheit an LfL-ILT vorhanden. Dazu zählten 2 L Batchsysteme (Abbildung 1) einstufige 32 L Durchflussfermenter (Abbildung 3), 2-stufige Fermenteranlagen (Abbildung 9), und zwei 3,5 m³ Pilot-Durchflussfermenter (SB1 und SB2, Abbildung 4, Abbildung 5) auf dem Betrieb Pellmeyer (Eggertshof), die von LfL-ILT betrieben wurden. Vom Betrieb Pellmeyer wurden auch die Silagen bezogen, mit denen die Untersuchungen durchgeführt wurden.
Für die Durchführung des FKZ 220-11-505 mussten die bislang gemeinsam betriebenen Pilotfermenter SB1 und SB2 komplett voneinander getrennt werden. Dies war nötig, damit zwischen dem weiterhin aus Mastbullengülle und TMR „Standardbiozönose“ produzierenden Fermenter SB2 und dem Fermenter SB1, der im Rahmen von IBMN ausschließlich mit Mais betrieben werden sollte, keine Kreuzkantaminationen entstanden und beide Pilotfermenter unabhängig voneinander betrieben werden konnten. Dies erforderte größere Umbaumaßnahmen des Pilotfermenters SB1 mit Aufbau einer separaten Ausrüstung für das Betriebsmanagement, u.a. für die Gaserfassung, die Heizung und die Steuerung. Nach dem Umbau, der sich intermittierend bis ins Jahr 2010 fortsetzte, war eine voneinander unabhängige Betriebsweise der Fermenter SB1 und SB2 gewährleistet. Zur Durchführung der NIRS-Analytik wurde die nötige Ausrüstung geleast und ein Messcontainer eingerichtet.

Die Konstruktion der semikontinuierlich betriebenen 6 L Fermenter an TUM-SWW (Abbildung 2) erforderte wegen der Einfachheit des Systems und der teilweise bereits vorhandenen Ausrüstung keinen hohen Kosteneinsatz. Der Betrieb der Reaktoren und das Datenmanagement wurde in Zusammenarbeit zwischen LfL-ILT und TUM-SWW geregelt.

Für die mikro-/molekularbiologischen Experimente stellte TUM-SSW seine Laboratorien und Analysegeräte zur Verfügung. Für die molekularbiologischen Analysen musste lediglich ein DGGE-/SSCP-System und ein Dark Reader angeschafft werden. Die Analytik und Auswertung wurde in Zusammenarbeit zwischen TUM-SWW und LfL-ILT vollzogen. Einige molekularbiologische Analysen (insbesondere mit qPCR) konnten nicht komplett an TUM-SWW abgeschlossen werden. Die noch zu bearbeitenden Proben mussten bis ins Frühjahr 2010 hinein an der Abteilung für Qualitätssicherung und Untersuchungswesen der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL-AQU), wo ein von LfL-ILT betriebenes mikro- und molekularbiologisches eingerichtet wurde, aufbereitet und analysiert werden.

1.2.2 Wissenschaftlicher Stand

1.2.2.1 Verfahrenstechnik

Zu Beginn der Bearbeitung der wissenschaftlichen und technischen Arbeitsziele des Bereichs Verfahrenstechnik war der Stand der Wissenschaft und Technik wie folgt:

1.2.2.1.1 Enzymeinsatz

In Batch-Versuchen konnte der Gasertrag durch den Zusatz von Enzymen zur Förderung des Aufschlusses pflanzlicher Gerüstsubstanzen um 15% gesteigert werden (Kaiser, 2004). Ergebnissen von Projekten der Firmen Novozymes Biotech und Genencor International Inc. zufolge konnte der Einsatz von Enzymen Steigerungsraten der Kosteneffizienz um den Faktor 10 bewirken (Mitchinson, 2004; Xu, 2004). Unabhängige Aussagen zur Wirtschaftlichkeit solcher Präparate waren kaum zu finden. Die im Rahmen des vorliegenden Teilvorhabens durchzuführenden Versuche sollten hierzu Ergebnisse liefern.

1.2.2.1.2 Prozesstemperatur

Landwirtschaftliche Biogasanlagen werden überwiegend bei Substrattemperaturen zwischen 35 und 45°C betrieben (mesophiler Temperaturbereich). Eine thermophile Betriebsweise (ca. 50 - 60°C) wird auch zur Hygienisierung eingesetzt. Ansonsten war in Deutschland in landwirtschaftlichen Biogasanlagen keine systematische Anwendung erhöhter Prozesstemperaturen auf spezielle Einsatzstoffe zu erkennen. Mit zunehmender Prozesstemperatur steigt aber auch die Reaktionsgeschwindigkeit insbesondere der Hydrolyse als initial durchsatzlimitierender Schritt. Das kann eine Steigerung der Gasbildungsrate zur Folge haben, wodurch ggf. die Faulraumbelastung erhöht bzw. Faulraumvolumen eingespart werden kann (Dizer et al., 1986; Jakob et al., 1987).

Untersuchungen zur anaeroben Behandlung von heterogenen Substraten wie Klärschlämmen und Bioabfällen hatten gezeigt, dass durch die Kombination einer thermophilen und einer mesophilen Stufe eine bessere Abbauleistung erzielt werden kann (Dinsdale et al. 1997). Höhere Gasproduktionsraten wurden auch in 2-stufig thermophilen Systemen erreicht (Nielsen et al., 2004). Nach Untersuchungen zur Vergärung von Abwässern aus der Papierproduktion brauchten die Mikroorganismenpopulation der thermophilen Stufe aber eine längere Adaptionszeit als die mesophile Population. Nach Abschluss dieser Phase wurde bezüglich der Belastbarkeit und der Abbauleistung auch in diesen Versuchen eine erkennbar höhere Leistungsfähigkeit im thermophilen Temperaturniveau nachgewiesen (Babek et al. 2004). Die maximal mögliche Raumbelastung ist allerdings auch substratabhängig, weshalb diesbezüglich der thermophile Temperaturbereich nicht generell überlegen ist (Dinsdale et al., 1997). Vergleichbare Untersuchungen zur Vergärung landwirtschaftlicher Roh- und Reststoffe lagen zu Beginn des Vorhabens nicht vor.

1.2.2.1.3 Zweistufig-zweiphasige Betriebsweise

In der Praxis werden Biogasanlagen wegen der einfacheren Handhabung vorzugsweise einstufig betrieben. Die meisten wissenschaftlichen Untersuchungen beschäftigten sich daher mit dieser Betriebsweise. Allerdings gab es Hinweise, dass eine räumliche Trennung von Hydrolyse und Methanogenese für Stabilität und Leistung des Gesamtprozesses vorteilhaft sein kann. Dies könnte insbesondere dann zutreffen, wenn die Hydrolyseprodukte des Ausgangsmaterials eine starke Versäuerung bewirken, wie z.B. für die im Verbund eingesetzten Maissilagen zu erwarten war, da Versäuerung und hohe Konzentrationen bestimmter Fettsäuren den Methanogenese-Schritt hemmen (Ahring et al., 2002). Dementsprechend wurde auch bei Partner TUM-SWW (früher TUM-WGA) für Bioabfall ein 2-stufiger Betrieb mit erfolgversprechenden Ergebnissen etabliert (Christ, 1999; Tidden, 2003). Für NawaRo war eine Trennung von Hydrolyse und Methanogenese nicht umgesetzt. Allerdings legten Versäuerungen 1-stufiger NawaRo-Anlagen im Labor- und Praxismaßstab bereits bei relativ geringer organischer Raumbelastung eine Kompartiment-Trennung nahe.

Vor Beginn des Verbundvorhabens wurden bereits Biogasanlagen mit einer Kombination von liegenden und stehenden Fermentern in Reihe bzw. teilweise parallel angeboten (z.B. Systeme

der Firma Schmack mit liegendem Fermenter als erster Stufe und nachgeschaltetem Rührkesselfermenter, allerdings ohne echte Phasentrennung). Eine 2-phasige Betriebsweise mit Anpassung der Prozesstemperaturen an die Einsatzstoffe in einer 2-stufigen Anlage könnte jedoch gerade für die Vergärung sehr heterogener landwirtschaftlicher Substrate eine Verbesserung der Abbauleistung erbringen. Im Rahmen von IBMN sollte deshalb ein 2-stufig-2-phasiger Ansatz (thermophil-mesophil) mit Maissilage untersucht werden.

1.2.2.1.4 NIRS-Kalibration

Modelle stellen einen vereinfachten Ausschnitt der Realität auf Basis verallgemeinerbaren Prinzipen dar. Durch die Entwicklung der Rechenleistung in der Computertechnik ist es möglich geworden, auch komplexe Prozesse modellhaft darzustellen und zu simulieren. Dies dient einerseits dem Prozessverständnis und hilft andererseits, reale Untersuchungskosten einzusparen und für das System kritische oder zerstörerische Zustände aufzudecken. (Bossel, 1994). Aus dem Bereich der anaeroben Abwasserbehandlung gab es bereits einige Vorarbeiten in diesem Bereich (z.B. Siegrist et al., 1993). Folgende Entwicklungen (z.B. ADM1, Batstone et al., 2002) versuchten, den anaeroben Vergärungsprozess allgemein darzustellen und so eine allgemeingültige Ausgangsbasis für die Entwicklung und Umsetzung mathematischer Modelle zu geben.

Im Bereich landwirtschaftlicher Biogastechnologie und nachwachsende Rohstoffe kommen dynamische Modelle bisher kaum zum Einsatz, da zur Kalibrierung, Validierung und schließlich Anwendung der Modelle Versuchsdaten aus den zu simulierenden Anlagen vorhanden sein müssen, um das Modell zu parametrisieren. Längerfristige und hochauflösende Datenerhebungen mit entsprechender Messtechnik und Analytik standen bisher im Bereich landwirtschaftlicher Biogastechnologie und im Versuchswesen weitgehend im Hintergrund. Eine Einbindung von Modellen in die Online-Mess- und Steuereinrichtung der Anlagen ist im Bereich der Abwasseranlagen bereits vorhanden, bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen ist dies jedoch unüblich. Die Behebung dieses Defizits könnte zur Erhöhung der Prozesseffizienz und der Prozessstabilität beitragen und den Anlagenbetreiber entlasten, indem es automatisiert Handlungsbedarf signalisiert und Entscheidungshilfen bietet.

Im vorliegenden Teilvorhaben sollten Grundlagen für die künftige Entstehung einer automatisierten Prozesssteuerung entwickelt werden, die auf vom Partner TUM-SWW ausgearbeiteten mathematischen Modellen basiert und auf Online-Messdaten (NIRS) zugreift. Die Kalibration der NIRS-Daten anhand konventioneller physikalisch-chemischer Parameter ist dazu die Basis und war daher ein wichtiger Gegenstand des vorliegenden Teilvorhabens. Die Anwendbarkeit dieses Messverfahrens in diesem Bereich wurde von Dolud et al. (2005) an der Universität Kiel nachgewiesen. Dort wurde eine für Gülle geeignete Durchflussmesszelle entwickelt, und das NIR-Spektrometer auf Basis von Referenzanalysen im Labor zur quantitativen Bestimmung von Inhaltsstoffen der Gülle kalibriert. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass eine Online-Nutzung dieses System grundsätzlich möglich ist und beispielsweise als Bypassverfahren zur kontinuierlichen Messung bzw. Steuerung eines Biogasprozesses eingesetzt werden kann. Innerhalb der LfL wurden bereits Vorarbeiten zur Anwendung des optischen Verfahrens durchgeführt.

Auf Basis der Labordaten zu Inhaltsstoffen unterschiedlicher fester Substrate, die in verschiedenen Forschungsprojekten an LfL-ILT ermittelt wurden, wurde in der Abteilung für Qualitätssicherung bereits eine NIRS Kalibration durchgeführt. Nach Nast (2006) war dabei die Ermittlung der Inhaltsstoffe (TS, van Soest Fraktion, Weender Analyse) von Inputmaterialien durch die NIR-Spektroskopie gelungen. Der entscheidende Vorteil des Verfahrens liegt in der zeitnahen Verfügbarkeit von Analysedaten, da eine effektive Prozesssteuerung nur auf Basis

der sofortigen Kenntnis der Substrateigenschaften erfolgen kann. Eine aufwändige Probenvorbereitung bzw. der Einsatz von Chemikalien ist dabei nicht erforderlich.

Mithilfe nahinfrarotspektroskopischer Verfahren lassen sich spezifische Absorptionseigenschaften von Gärmaterial erfassen. Das Ergebnis einer Messung ist ein Spektrum für den erfassten Wellenlängenbereich welches charakteristische Informationen über Zusammensetzung und Struktur einer Probe enthält wie z.B. Angaben über Stoffkonzentrationen. Dabei wird vereinfacht auf das Lambert-Beersche Gesetzes aufgebaut, wonach sich die Absorption an einer bestimmten Wellenlänge proportional zu der Konzentration des absorbierenden Stoffes verhält. Im NIR werden allerdings nicht spezifische Inhaltsstoffe erfasst, sondern funktionelle Gruppen von Wasser und organischen Verbindungen, wie z.B. die Amino-, Carboxy- und Hydroxylgruppe. Bei Multikomponentengemischen wie Gärmaterial, kommt es dabei allerdings zu starken Interferenzen zwischen einzelnen Absorbenten. Gerade die OH-Gruppe des Wassers führt zu starken Überlagerungen mit weiteren im NIR-Bereich absorbierenden Molekülgruppen. Dies macht für das Aufzeigen möglicher funktionaler Zusammenhänge zwischen spektraler Signatur und einzelnen chemischen Inhaltsstoffen ein multivariates Vorgehen erforderlich wozu die gesamte spektrale Information verwendet wird. Für die Erstellung einer Kalibration ist dazu eine Vielzahl an Gärproben spektral zu erfassen sowie nasschemisch zu referenzieren. Die erforderliche Anzahl an Kalibrierproben ist stark abhängig von der Komplexität des zu modellierenden Stoffes bzw. Stoffgemisches. Bei zunehmender Zahl an probeeigenen bzw. externen Einflussfaktoren (u.a. Anzahl der Komponenten, Inhomogenität der Probenmatrix, Partikelgröße, Temperatureinfluss) steigt auch die Zahl der für eine robuste Kalibration erforderlichen Kalibrierproben erheblich an.

1.2.2.1.5 Beschickungsintervall

Die Beschickung wirkt sich in hohem Maße auf die Verfügbarkeit frischen Substrates für die Mikroorganismen und somit auch auf die Biogasfreisetzung aus (z.B. Scholwin et al., 2004; LfU, 2004). Eine weitergehende Quantifizierung auf Basis systematischer Untersuchungen wird nicht angegeben. In der Praxis fand oft eine stoßweise manuelle Beschickung (z.B. durch Anmaischen in einer Vorgrube ein bis 2-mal täglich) statt obwohl vermutet wird, dass Stoßbelastungen eine schädigende Wirkung auf die Mikrobiologie haben. Über den Einfluss des Beschickungsintervalls sollen Experimente im Rahmen des vorliegenden Teilvorhabens Aufschluss geben.

1.2.2.1.6 Gasrückführung

In landwirtschaftlichen Biogasanlagen kommen weitaus überwiegend mechanische Rührwerke zum Einsatz. Hydraulische und pneumatische Rührsysteme werden kaum verwendet. Das pneumatische Umwälzen kann den Vorteil einer zusätzlichen Kohlendioxid- und Wasserstoff-Verwertung durch methanbildende Archaeen mit sich bringen. Erfahrungen und Literatur hierzu beim Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen sind rar. Polomski (1998) hat in Versuchen extern gereinigtes Biogas in das Schlammbett eines Turmreaktors zurückgeführt und dabei festgestellt, dass dadurch undissoziiertes H_2S in der flüssigen Phase ausgetrieben werden konnte. Die auf die Gasproduktion hemmende Wirkung dieses Stoffes wurde reduziert und eine gesteigerte Gasproduktion beobachtet. Da die Versuche im Rahmen der Vergärung von Reststoffen aus der Lebensmittelindustrie mit sehr niedrig belasteten biologischen Systemen durchgeführt wurden sind sie nicht unmittelbar auf die Anwendung landwirtschaftlicher Produkte in volldurchmischten Rührkesselfermentern übertragbar. Ob durch Gasrückführung eine Verbesserung der Biogasproduktion (v.a. des spezifischen Methanertrags) erzielt oder die Energieeffizienz durch Gasrückführung verbessert werden kann, sollte im vorliegenden Teilvorhaben untersucht werden.

1.2.2.1.7 Langzeitstabiler Prozess

Methanogene Archaeen benötigen eine besondere Versorgung mit bestimmten Spurenelementen in bestimmten Konzentrationsbereichen zur Durchführung ihrer einzigartigen Reaktionen. Besteht hier ein Mangel, können die Methanogenen nicht wachsen bzw. aktiv sein. Die in den Prozessen zuvor gebildeten Säuren werden bei Störung der Methanogenese nicht abgebaut, und es kommt folglich zu einer Versäuerung des Prozesses. Methanogene Archaeen benötigen die Elemente Kobalt, Molybdän, Nickel und Selen. Ni, Co und Mo (alternativ auch Wolfram bei den *Methanococci*) dienen als bzw. in Co-Faktoren für verschiedene, im Stoffwechsel essentielle Reaktionen. Beispielsweise ist Nickel als Zentralatom im Cofaktor F_{430} unabdingbar zum Funktionieren der Methyl-Coenzym M-Reduktase, die den letzten Schritt der Methanogenese ausführt (Ferry, 1999), die Bildung von CH_4. Gleichzeitig ist Ni als Zentralatom im Cofaktor F_{430} unabdingbar zum Funktionieren der Methyl-Coenzym M-Reduktase und Molybdän ein entscheidender Bestandteil des Cofaktors Molybdopterin im zu Methan führenden Stoffwechsel. Im Elektronentransport ist Kobalt als zentraler Bestandteil von Corrinoiden und Cobamiden essentiell, Ni und Fe-S-Cluster sind hier ebenfalls wichtig. Für die Bildung von ATP, dem wichtigsten Energieträger im Stoffwechsel, sind neben Na^+ (Jarrell and Kalmokoff, 1988) auch Ni, Co und Se wichtig. Im Bereich der H_2-Aufnahme spielen Ni, Se und Zn eine entscheidende Rolle und bei der Aufnahme von CO_2 Mo (W), Zn, Se und Fe. Unverzichtbar für die Acetatspaltung sind Ni, Fe-S, Co und Zn und für die Nutzung von Methylgruppen Co und Zn. Entsprechende Informationen finden sich in Blaut (1994) und (Ferry, 1999).

Auch (fakultativ) anaerobe Bakterien benötigen bestimmte Spurenelemente, insbesondere sind hier Fe und Zn für den Elektronentransport zu nennen. Kobalt scheint aber auch für syntrophe Bakterien wichtig zu sein.

Zu Mindestspurenelementkonzentrationen wurde bereits in der Anaerobtechnologie beim Abbau von Klärschlamm berichtet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Günstige Konzentration gelöster Spurenelemente im Klärschlamm-Anaerobreaktor (Mudrack und Kunst, 2003)

Element	Konzentrationsbereich ($mg * L^{-1}$)
Fe	1 - 10
Ni	0,005 - 0,5
Co	0,003 - 0,06
Mo	0,005 - 0,5

Ob die diese Konzentrationsbereiche auf die Fermentation in Biogasanlagen übertragbar sind, war jedoch nicht geklärt. Jarvis et al. (1997) berichteten allerdings, dass die Vergärung von Kleegrassilage offenbar wegen C-Mangel gehemmt wurde. Als Mindestkonzentration gaben die Autoren etwa 20 µg Gesamt-Cobalt pro L Fermentervolumen an.

Die Untersuchung von geeignetem Spurenelementzusatz war nicht von Anfang an im Programm von IBMN vorgesehen. Dies ergab sich aber nach der Versäuerung von ausschließlich mit Maissilage (Mais-mono) betriebenen Fermentern (s. 3.1.2), die ein Aufsatteln von Versuchen nicht mehr erlaubte. Im vorliegenden Teilvorhaben sollte daher untersucht werden, ob und welche Spurenelemente beim Mais-mono- und beim Gras-mono-Betrieb am ehesten limitierend werden und welche Spurenelementkonzentrationen für eine langzeitstabile Vergärung der NawaRo mit effizienter Methanproduktion vorliegen sollten.

1.2.2.2 Mikro-/Molekularbiologiebiologie

1.2.2.2.1 Kenntnis der relevanten mikrobiellen Populationen

Die Biogasproduktion aus NawaRo ist auch heute noch nicht ausgereift. Bei Vergärung strukturkomponentenreichen Materials wie LCB kann die Effizienz infolge einer geringen Hydrolyserate des Strukturmaterials (v.a. Zellwandkomponenten) unzureichend sein. Wenn zudem ohne Gülle vergoren werden soll, läuft der Biogas-Prozess häufig nicht erfolgreich an oder bricht bald zusammen. Oft ist eine Versäuerung der Auslöser, in anderen Fällen sind die Ursachen nicht geklärt. Für die Betreiber bedeutet das gravierende finanzielle Einbußen, zudem schaden solche Stör- und Unfälle dem Ruf der Biogas-Technologie.

Ein wesentlicher Faktor, der die o.g. Probleme bedingt, ist die Unkenntnis der an den komplexen Reaktionsabläufen beteiligten Mikroorganismen. Nur etwa 0,1 % der Mikroorganismen sind überhaupt bekannt (Torsvik and Øvreås, 2002), kultiviert sind davon nur ein kleiner Bruchteil, und besonders im anaeroben/methanogenen Milieu war unsere Kenntnis noch geringer (Lange und Ahring, 2001). Der Biogasprozess ist hochkomplex und funktioniert als Nahrungskette nur, wenn bestimmte Produkte als Substrat von bestimmten Mikroorganismen (z.B. Syntrophe, Methanogene) aus dem Gleichgewicht gezogen werden. Unter mesophilen Bedingungen ist die Zusammensetzung dieser obligat syntrophen Biozönose wahrscheinlich anders als unter thermophilen Bedingungen, und das Substrat ist ein weiterer Einflussfaktor. Viele Befunde (z.B. Ahring et al., 2002) spechen dafür, die Vergärung von LCB thermophil zu gestalten. Die Akteure sind allerdings hier kaum bekannt, der Prozess ist damit eine Black Box und der Betrieb im Wesentlichen Trial-and-Error. Die Unkenntnis erschwert Optimierungsstrategien gravierend.

Im Rahmen des Verbundvorhabens sollten die Partner TUM-MB (FKZ 220-11-705) und Partner TUM-BÖ (FKZ 220-118-05) mit Ihren Arbeiten die Kenntnis zu den hydrolytisch/cellulolytischen Bakterien verbessern, während sich die Arbeiten des vorliegenden Teilvorhabens (FKZ 220-11-505 mit FKZ 220-11-905b) abstimmungsgemäß auf die methanogenen Archaeen konzentrierten.

1.2.2.2.2 Entwicklung geeigneter molekularbiologischer Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse auf methanogene Archaeen

Ein wichtiger Fokus des Teilvorhabens war auf die Erhellung der Black Box (s. 1.2.2.2.1) gerichtet. Kultivierungsbasierte Methoden sind hierfür viel zu langwierig und nicht für alle Fragestellungen zielführend (Hugenholtz, 2002). Deswegen werden praktisch nur noch molekularbiologische, insbesondere PCR-basierte Methoden eingesetzt.

Der Einsatz von PCR-Techniken erfordert für einen sensitiven Nachweis, dass die DNA in einer bestimmten Reinheit vorliegt, die die Amplifizierung durch die Polymerase ermöglicht. Aufbauend auf einem optimierten Protokoll zur DNA-Extraktion und -Reinigung aus Gülleproben (Lebuhn et al., 2003) sollte das Protokoll für die NawaRo-Fermenterinhalte für den Routineeinsatz weiterentwickelt und angewandt werden.

Die PCR muss auch spezifisch gestaltet werden. Die meisten PCR-Untersuchungen der Populationszusammensetzung haben konservierte Bereiche des Gens *rrs* der kleinen Untereinheit für ribosomale RNA zum Ziel. Der Nachteil dieses Ansatzes ist, dass dieses Gen nicht strikt an eine Funktion gekoppelt ist und die Ergebnisse wenig zur Aufklärung bestimmter Prozesse beitragen können. Im vorliegenden Teilvorhaben sollte deswegen ein Ansatz entwickelt werden, der auf das relevante funktionelle Gen der Methanogenese zielt (Untereinheit *mcrA*/*mrtA*) und für das Schlüsselenzym Methyl-Coenzym M-Reduktase codiert. Der Nach-

weis erlaubt eindeutige Aussagen zur Funktion (Methanogenese), und die PCR-Produkte konservierter Primer lassen sich zur phylogenetischen Rekonstruktion verwenden (Luton et al., 2002). Die Ergebnisse solcher funktionellen Ansätze mit Schlüsselenzym-Genen geben darüber Aufschluss, welche Mikroorganismen für die entscheidenden Umsetzungen in den untersuchten Systemen verantwortlich sind.

In eigenen Voruntersuchungen mit Datenbanktests *in silico* ergaben die bisher publizierten Primer Mängel in der Spezifität. Deshalb sollten neue *mcrA*/*mrtA*-Primer maßgeschneidert, evaluiert und in den PCR-Routinen eingesetzt werden. Ihr Einsatz war für qualitative und für quantitative Fragestellungen vorgesehen.

1.2.2.2.3 Untersuchung der Diversität und von Populationsveränderungen

Die qualitativen Ansätze sollten Antworten auf die Frage geben, wie sich die Zusammensetzung der Zielorganismen-Population (hier der methanogenen Archaeen) im Versuchsverlauf ändert und ob sich Markerorganismen identifizieren lassen, deren frühes Auftreten für einen bestimmten Prozesszustand charakteristisch ist, und die diesen damit indizieren können. Für solche qualitativen Ansätze mit Trennung und Visualisierung von PCR-Produkten gleicher Länge sind die meistverwendeten Methoden PCR-DGGE (Muyzer, 1999) und PCR-SSCP (Schwieger and Tebbe, 1998). Die Eignung beider Methoden zur Visualisierung von Veränderungen in Prozessverläufen und zur Gewinnung von Sequenzinformationen für anschließende phylogenetische Analysen war zu testen. Hier standen besondere methodische Herausforderungen zur Lösung an, da Primer, die gegen funktionelle Gene gerichtet sind (hier *mcrA*/*mrtA*, s. 1.2.2.2.2), typischerweise stark degeneriert werden müssen. Dies kann zu unauflösbaren Unschärfen in der Elektrophorese führen.

Zur Untersuchung der Diversität und von Populationsveränderungen waren unterschiedliche Ansätze möglich. Metagenomstudien und Ansätze ohne vorgeschaltete PCR wurden als zu aufwändig angesehen. Damit blieben i) die direkte Klonierung von *mcrA*/*mrtA*-PCR-Amplikons mit anschließender Sequenzierung und phylogenetischer Analyse sowie ii) die Trennung der *mcrA*/*mrtA*-Amplikons mit DGGE oder SSCP und Visualisierung des Bandenprofils. Änderungen von Bandenmustern sollten Änderungen der Populationszusammensetzung indizieren. Wenn solche Änderungen erkennbar waren, sollten sie über Klonierung eluierter DNA aus den Banden und anschließender Sequenzierung und phylogenetischer Analyse weiteruntersucht werden.

1.2.2.2.4 Quantifizierung von Methanogenen

Seit ihrer Einführung 1991 hat sich die Verfolgung der PCR-Reaktion in Echtzeit und Auswertung der Amplifikationskurven (Real-Time PCR) zu einer unverzichtbaren Technik in der molekularbiologischen Quantifizierung von Zielgenen (bzw. –organismen oder -organismengruppen) entwickelt (quantitative PCR, qPCR; Heid et al., 1996). Eine Reihe von Varianten waren sehr schnell daraus abgeleitet (Lie and Petropoulos, 1998), die sich für unterschiedliche Fragestellungen ein setzen lassen.

Solche qPCR-Technologien wurden in einer IBMN vorangegangenen Studie für DNA bei der meso- und thermophilen Vergärung von Gülle weiterentwickelt und dann erfolgreich in der Routine eingesetzt (Lebuhn et al., 2003; Lebuhn et al., 2004a; Lebuhn et al., 2005a). Dies war auch für die Quantifizierung von messenger-RNA mit RT-qPCR der Fall (Garcés et al., 2006), die allerdings nicht unproblematisch ist (Freeman et al., 1999). Auf Basis dieser Grundlagen sollte ein qPCR-System zur Quantifizierung von methanogenen Archaeen in den zu untersuchenden NawaRo-Fermentern weiterentwickelt, evaluiert und in der Routine für die Untersuchungen des IBMN-Teilvorhabens eingesetzt werden.

1.2.2.2.5 Inokulation mit hydrolytischen, cellulolytischen Bakterienanreicherungen

Die Inokulation von Biogasanlagen mit Material aus Fermentern, die sich typischerweise in stabilem Betrieb befinden, ist auch in der Praxis seit Langem üblich, um den Biogasprozess schneller in Gang zu bringen. Dabei wird häufig auch Gülle verwendet oder zugesetzt, da sie offenbar alle für den Biogasprozess wichtigen Mikroorganismen enthält. Die relative Konzentration der Mikroorganismen zueinander ist dabei wahrscheinlich in der Gülle und im betrachteten Prozess (hier NawaRo-Vergärung) verschieden, nach einer gewissen Adaptationszeit (für gewöhnlich 3 Wochen bis 2 Monate) stellt sich aber normalerweise ein offenbar gut aufeinander eingespieltes Konzentrationsverhältnis der Mikroorganismen ein, das eine effiziente Umwandlung der organischen Substanz in Biogas ermöglicht.

Wegen der besonderen Struktur und Abschirmung der Cellulose in den pflanzlichen Lignocellulosefasern (Lynd et al., 2002) der NawaRo kann dieser Adaptationsprozess allerdings lange dauern. Im Verbundvorhaben IBMN sollte versucht werden, diesen a priori als suboptimal verlaufend eingeschätzten Prozess über die Zugabe (Inokulation) adaptierter Biozönosen schnell zur Hochleistung zu bringen. Allerdings standen solche Inokula für die Vergärung von Lignocellulose-Biomasse (LCB) mit hohem Strukturmaterial-Anteil nicht zur Verfügung.

Im Verbundvorhaben IBMN wurden daher zwei Strategien eingeschlagen: i) Zum einen sollten durch Partner TUM-MB (vgl. 1.4) aus verschiedenen Quellen LCB-Hydrolysierer isoliert, gewonnen und angereichert werden. Die Inokula sollten dann im Rahmen der Teilvorhaben von TUM-SWW (FKZ 220-11-905b) und LfL-ILT (FKZ 220-11-505) mit Methanogenen schrittweise über Selektion an die neuen Bedingungen angepasst und in die spezifischen Gegebenheiten integriert werden, da Mikroorganismen typischerweise, wenn sie in ein artfremdes Milieu eingeführt werden, also nicht adaptiert sind, schnell absterben. ii) Zum anderen sollte versucht werden, unterschiedlichen ökologischen Ansprüchen der hydrolytischen und methanogenen Populationen Rechnung zu tragen und den Gesamtprozess räumlich und zeitlich zu trennen (2-stufig-2-phasige Fahrweise, s. 1.2.2.1.3). Es wurde erwartet, dass so spezifisch angepasste, stabile Biozönosen entstehen können, die hinsichtlich LCB-Hydrolyse und Verwertung der Abbauprodukte in der Methanogenese optimiert sind. Entsprechende Proben hydrolytisch/acidogener Fermenterinhalte wurden Partner TUM-MB zum Screening auf leistungsfähige Hydrolysierer zur Verfügung gestellt (s.a. 1.4).

In der Folge sollten die Inokula auf Verbesserung der spezifischen Methanproduktion getestet und positiv evaluierte Inokula für die Praxis (Partner Fa. Schmack, FKZ 220-11-605) propagiert werden (s.a. 1.4).

1.3 Verwendete Fachliteratur

Da im Ergebnisteil ebenfalls Fachliteratur für die Diskussion der Ergebnisse zitiert ist, wurden alle Referenzen in das Kapitel 4 transferiert und erscheinen dort zusammengefasst.

1.4 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

LfL-ILT (FKZ 220-11-505 mit FKZ 220-11-905b) arbeitete mit dem Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München (TUM-SWW, FKZ 220-11-905a) im Bereich Verfahrenstechnik im Anlagenbetrieb (semikontinuierlich betriebene 6 L Fermenter, s. 2.1.1.2) zusammen. Die Leistung der jeweils von den beiden Instituten betriebenen Fermenter wurde verglichen (spezifische Methanproduktion). Für das Fernziel, eine pro-

zessoptimierende Steuerung zu entwickeln (s. 1.2.2.1.4), wurden von TUM-SWW Daten aus dem Fermenterbetrieb bei LfL-ILT in die Modellbildung einbezogen. Im Bereich Mikro/Molekularbiologie wurden aus der 2-stufigen, von TUM-SWW betriebenen Containeranlage Proben von LfL-ILT untersucht. Der mikro/molekularbiologische Projektteil des FKZ 220-11-905b wurde in größeren Teilen beim Partner TUM-SWW durchgeführt, der die dafür nötigen Geräte und Räumlichkeiten zur Verfügung stellte.

Der Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München (TUM-MB) lieferte die selektierten cellulolytischen Bakterienanreicherungen für die Inokulationsversuche. Partner TUM-MB wurden auch Fermenterproben aus dem ein- und 2-phasigen Betrieb mit Maissilage zum Screening aus leistungsfähige Cellulose-abbauende Hydrolysierer geliefert (s. 1.2.2.2.5). Inokulierungen wurden gemeinsam abgesprochen und vor Ort gemeinsam durchgeführt.

Der Landwirtschaftliche Betrieb Pellmeyer diente als Versuchsanlagenstandort für den mit Maissilage betriebenen Pilotfermenter SB1 und den „Standardbiozönose“-produzierenden Pilotfermenter SB2 (Abbildung 4, Abbildung 5). Weiterhin stellte der Betrieb Silagen für die Versuche an LfL-ILT und TUM-SWW bereit.

Firma Schmack Biogas AG war vorgesehen, positiv evaluierte Inokula im Rahmen eines Upscalings zu propagieren und ggf. in den Markt einzuführen. Dafür stellte Firma Schmack Technikumsfermenter zur Verfügung und nahm die Basislinien auf.

Partner TUM-BÖ wurden Proben (mit den Betriebsdaten) aus dem Fermenterbetrieb mit Maissilage zum Design, Test und zur Evaluierung der funktionellen Mikroarrays geliefert.

II Eingehende Darstellung

2 Material und Methoden

2.1 Verfahrenstechnik

2.1.1 Fermentersysteme

2.1.1.1 Batch Fermenter

Die Batch-Versuchsanlage war mit einem thermostatisierten Brutschrank zur Inkubation von 12 Fermentern (2 Liter Glasflaschen) ausgerüstet. Jeder Fermenter verfügte über einen eigenen, geeichten Volumenstrom-Gaszähler (Milligascounter®) (Abbildung 1). Die vom Milligascounter® erfassten Kippimpulse wurden etwa stündlich summiert und in einer Datenbank abgelegt. Das gebildete Gas aller Wiederholungen einer Variante (n = 3) wurde in einem Gassack (mit Druckausgleichssack) zwischengespeichert und von dort der Gasanalyse (AWITE) zugeführt. Im gebildeten Biogas wurden die Gehalte an CH_4, CO_2, H_2, H_2S und O_2 analysiert (Tabelle 4).

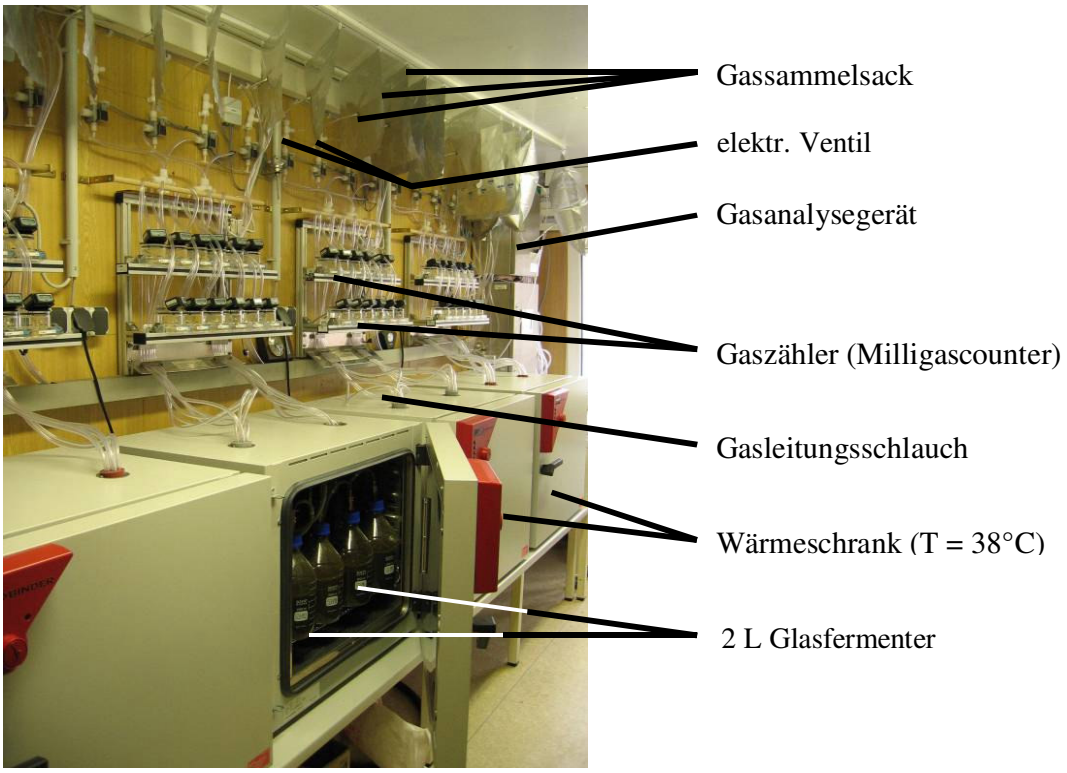


Abbildung 1: Batch-Versuchsanlage des LfL-ILT und wesentliche Bestandteile

2.1.1.2 Semikontinuierlich betriebene 6L-Fermenter

Bei den sechs semikontinuierlich betriebenen 6 L-Fermenten mit Standort an der TUM, Institut für Siedlungswasserwirtschaft, handelte es sich um Glasgefäße, die mit einem eigens dafür konstruierten Deckel versehen wurden (Abbildung 2). Dieser erlaubte neben dem Anschluss eines Gassackes die tägliche Zugabe von Substrat über ein höhenverstellbares, verschließba-

res Fütterungsrohr ohne dass ein wesentlicher Eintrag von Luft stattfand. Gleichzeitig konnte über das Fütterungsrohr Fermenterinhalt entnommen werden, wenn die Glasflaschen auf dem Kopf gestellt wurden. Der Durchflussbetrieb wurde über den Erhalt der Volumenkonstanz (ca. 3,5 L Arbeitsvolumen) in etwa 3-wöchigen Rythmus eingestellt. Zur Durchmischung des Fermenterinhalts und zur Beseitigung von Schwimmschichten wurde der Fermenter mindestens ein mal am Tag kräftig geschwenkt. Die angestrebte Betriebstemperatur von 38°C (mesophil) oder 55°C (thermophil) wurde in den Fermentern durch laufendes Umspülen mit entsprechend temperiertem Wasser in einem thermostatisierten Wasserbad erreicht (Abbildung 2). Die Messung der Gasmenge erfolgte mittels einer Gasuhr der Firma Ritter. Nach Zwischenspeicherung in einem Gassack wurden die Gehalte von Sauerstoff, Kohlendioxid und Methan infrarotspektrometrisch mit einem Gasanalysegerät der Firma Ansynco ermittelt.

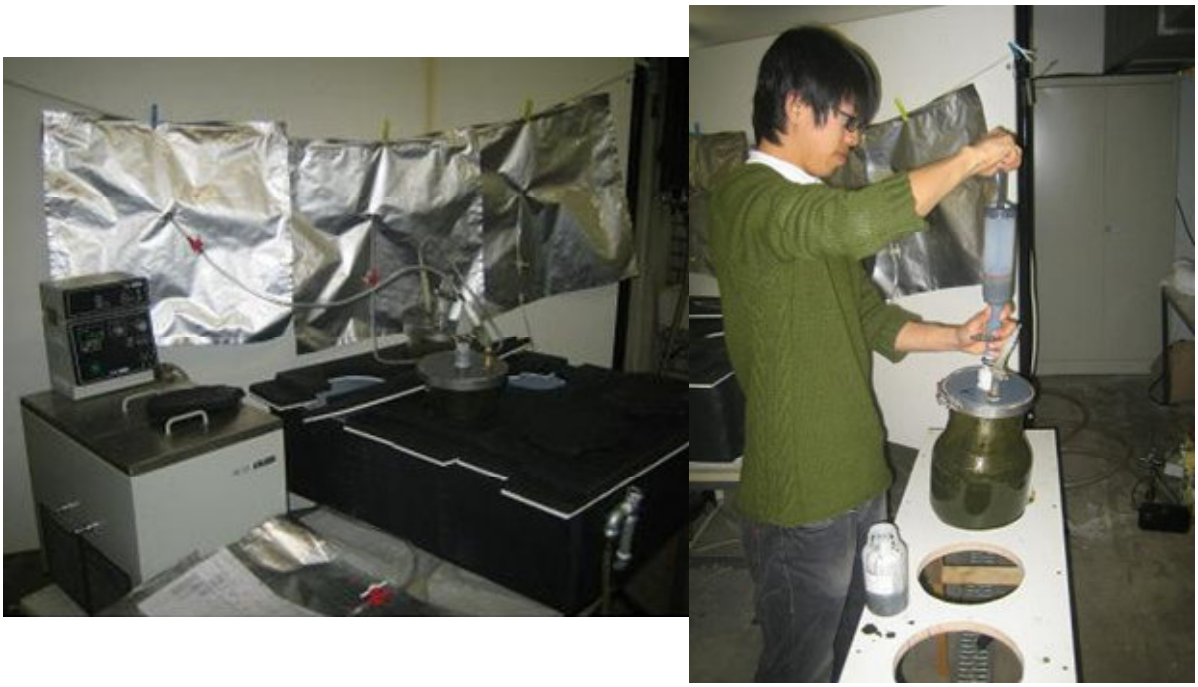


Abbildung 2: Semikontinuierlich betriebene, thermostatisierte 6 L Fermenter

2.1.1.3 Einstufige Durchflussfermenter

Die Durchflussfermenter der LfL (Abbildung 3) bestanden aus doppelwandigen zylindrischen Behältern mit einem Innendurchmesser von 250 mm und einer Innenhöhe von 750 mm. Zwischen den beiden Wänden befand sich die Wasserheizung, mit der die Fermenter auf konstanter Temperatur gehalten wurden. Die Fermenter wurden je nach Fragestellung mesophil (38°C) oder thermophil (55°C) betrieben.

Die Fermenter wurden über eine Schnecke von oben mit Substrat unter die Oberfläche des Fermenterinhalts beschickt, damit bei der Fütterung kein Gasverlust entsteht. In der Regel wurden die Fermenter täglich mit Substrat gefüttert, bei hohen Raumbelastungen zuweilen auch zwei mal täglich. Für den Durchflussbetrieb wurde über die Entnahme von Fermenterinhalt Volumenkonstanz eingestellt. An der Unterseite befand sich der Auslass für die Entleerung und die Probenahme. Im Deckel waren Rührwerksmotor und Einfüllrohr sowie die Anschlüsse zur Gasabführung und zum Druckausgleich integriert. Durchmischt wurde mit einem Gabelrührwerk. Das optimierte Rührintervall war 10 min Rühren mit 20 upm – 3 min Pause.

Abbildung 3: 32 L Durchflussfermenter des Instituts für Landtechnik und Tierhaltung

Die Gaserfassung erfolgte mit Milligascountern. Die Gasqualität (CH_4, CO_2, O_2, H_2 und H_2S, Tabelle 4) in den Gassäcken wurde automatisch nach jeweils 4 L registrierter Gasproduktion gemessen.

Tabelle 4: Messgenauigkeit und Messprinzip der Sensoren des Gasanalysegerätes

Gaskomponente	Sensorprinzip	Messbereich	Messgenauigkeit
CH_4	Infrarot	0 – 100 Vol.- %	± 2 % pro Jahr
CO_2	Infrarot	0 – 100 Vol.- %	± 2 % pro Jahr
O_2	elektrochemisch	0 – 25 Vol.- %	± 1 % relativ in Luft
H_2	elektrochemisch	0 – 500 ppm	± 2 % relativ
H_2S	elektrochemisch	0 – 5000 ppm	± 2 % relativ

2.1.1.4 Pilotfermenter SB1 und SB2

Durch den Umbau der beiden Pilotfermenter SB1 und SB2 konnten die Voraussetzungen für die geplanten Versuche Gasrückführung (1.2.2.1.6) und Fütterungsintervalle (1.2.2.1.5) geschaffen werden. Für den Pilotfermenter SB1 wurde eine Gaspumpe in die Gasleitung integriert und ein automatisches Futtereinbringsystem eingebaut. Vorausschauend wurden Maßnahmen getroffen und Einbauten verwirklicht, um eventuell aufkommende Probleme mit einer Schwimmschichtbildung, mit eigenständiger Erwärmung des Fermenters (Lindorfer et al., 2006) und mit der Einbringung der NawaRo gezielt und schnell beheben zu können. Da zur Beheizung des Fermenters die Abwärme aus einer benachbarten Biogasanlage genutzt wurde bestand hier eine Störungsanfälligkeit. Daher wurde zur Entkopplung eine Notheizung eingebaut, die das gewünschte Temperaturniveau des Systems im Bedarfsfall aufrecht erhielt. Weiterhin musste die Gasleitung für eine adäquate Gasanalyse erneuert werden, und es wurde ein

Gasspeichersack für die Substratentnahme in das Gasleitungssystem eingefügt. Für die Installationen war die vorhandene Fläche zu klein, weswegen Anbauten links und rechts neben der bestehenden Anlage errichtet werden mussten. Abbildung 4 und Abbildung 5 zeigen die Pilotfermenter vor und nach den Umbauten.

Abbildung 4: 3.500 L Pilotfermenter SB1 und SB2 vor dem Umbau

Abbildung 5: Fermenter SB1 (links) und Einhausung mit den beiden SB-Forschungsreaktoren (rechts) nach dem Umbau

2.1.1.4.1 Änderungen im Substratfluss

Um die Fütterung des Pilotfermters SB1 zu automatisieren, wurde von der LfL ein Futterdosierer entworfen und angefertigt. Ein Förderband förderte die Maissilage vom trichterförmigen Vorratsbehälter in eine Förderschnecke. Durch ein Wägesystem, bestehend aus Dehnungsmessstreifen und Datenlogger, erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung des Gewichts der Förderschnecke. Über die Gewichtszu- und abnahme wurde die Laufzeit der För-

derschnecke gesteuert. Die Maissilage wurde von der Förderschnecke zunächst in einen Anmaischbehälter und später in eine Pumpe mit Mischeinheit (Drehkolbenpumpe) gefördert (Abbildung 6, Abbildung 8). Im Anmaischbehälter bzw. in der Mischeinheit wurde die Maissilage mit Fermenterinhalt homogenisiert und in den Fermenter eingebracht. Bei größeren Mengen an Maissilage wurde dieser Vorgang entsprechend oft wiederholt.

In der Folge wurde der Anmaischbehälter durch eine Pumpe mit Mischeinheit ausgetauscht, da es nach einer gewissen Laufzeit wiederholt zu Verstopfungen der Pumpe kam. Eine Separation des gefütterten Materials in eine feste und flüssige Phase war die Folge. Das Problem konnte durch Austausch des Anmaischbehälters mit einer Drehkolbenpumpe und Mischeinheit behoben werden.

Abbildung 6: Förderschnecke mit Pumpe und Mischeinheit

Eine weitere Schwierigkeit zeigte sich bei der Langzeitstabilität der Dehnungsmessstreifen im Wägesystem. Diese mussten während der Versuche zweimal ausgetauscht werden. Der Grund für die Kurzlebigkeit konnte auch durch den Hersteller nicht gefunden werden. In der letzten Phase der Versuche musste auf einen weiteren Austausch der Dehnungsmessstreifen aus Kostengründen verzichtet werden. Die Fördermenge der Förderschnecke wurde seitdem durch die Laufzeit gesteuert. Durch das automatische Fütterungssystem konnte die Fütterungsmenge bei störungsfreiem Betrieb mit einer Messgenauigkeit von ±3 % zugegeben werden.

Der Fermenter SB1 hatte ein Betriebsvolumen von 2,7 m^3 und ein Fermentervolumen von 3,3 m^3 mit schlanker Bauform. Das Rührwerk des SB1 war ein Ankerrührwerk mit Einbauten gegen Schwimm- und Sinkschichten. In der Grundeinstellung wurde alle 10 min gerührt, anschließend erfolgte eine 10 minütige Pause. Durch zwei Temperatursensoren (Abbildung 7) wurde die Temperatur des Fermenterinhalts in zwei Höhen bestimmt. Hierdurch sollte die Ausbildung von Temperaturschichtungen registriert werden, die eine unvollständige Durchmischung des Fermenters anzeigen. Der Substrat- und der Gasfluss des SB1-Systems sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

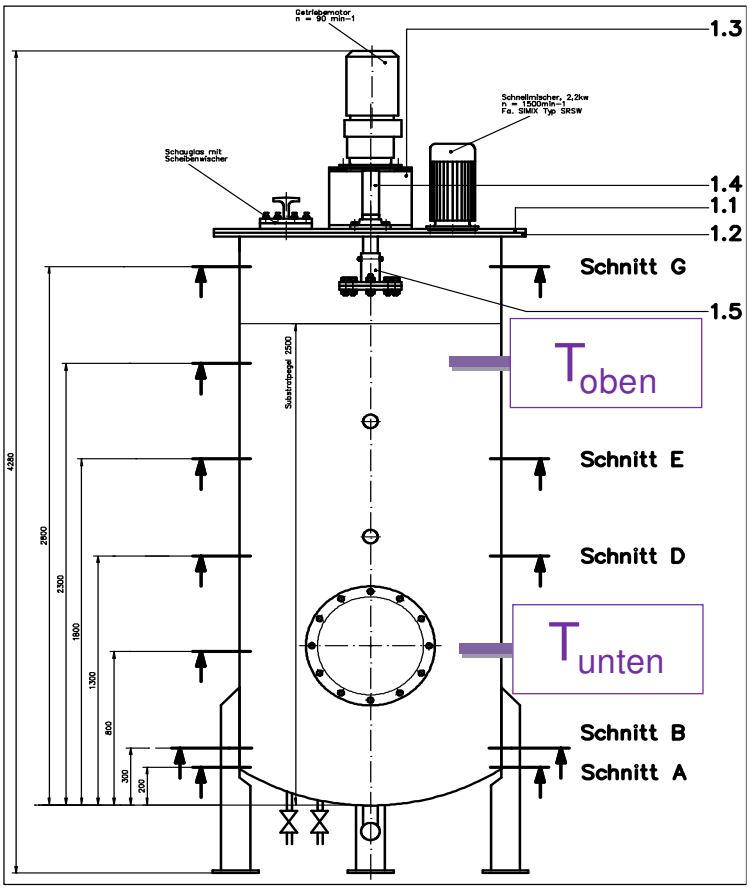


Abbildung 7: Schema des Pilotfermenters SB1 mit Temperatursonden (T_{oben}, T_{unten})

Tabelle 5: Dosierung des Spurenelement-Cocktails

	Menge	Datum
1	540 mL	23.12.2009
2	540 mL	29.12.2009
3	9,5 mL	1.1.2010
4	5,5 mL	4.1.2010
5	5,7 mL	7.1.2010
6	5,5 mL	11.1.2010
7	5,5 mL	13.1.2010

Durch Zusätze des Spurenelementcocktails (genaue Zusammensetzung des Cocktails s. Tabelle 7) entsprechend Tabelle 5 wurde einem Spurenelementmangel vorgebeugt. Die Versuche wurden mit Maissilage als einzigem Substrat durchgeführt. Die organische Raumbelastung bewegte sich zwischen (kurzzeitig) 0,35 und (überwiegend) 2,4 kg oTS $*$ m^{-3} $*$ d^{-1} (Ø 1,86 kg oTS $*$ m^{-3} $*$ d^{-1}).

2.1.1.4.2 Änderungen im Gasfluss

Der Versuch zur Evaluierung der Effizienz einer Gasrückführung wurde in Absprache mit dem Projektträger nicht mit einem 36 L Laborfermenter, sondern an dem von LfL-ILT betriebenen Technikumsfermenter SB1 (Eggertshofen, Pellmeyer) (2,7 m³ Betriebsvolumen)

durchgeführt. Dies erfolgte unter dem Gesichtspunkt, dass der Energieaufwand für die Gaspumpe relativ zum Aufwand in einer Praxisanlage unvergleichlich groß wäre.

Die Gasanalyse wurde mit einem Gerät der Firma Awite durchgeführt. Hiermit konnten H_2 und H_2S mit einer Meßgenauigkeit von ±3 %, O_2 mit einer Meßgenauigkeit von ±2 % und CH_4 sowie CO_2 mit einer Meßgenauigkeit von ±1% gemessen werden. In der Grundeinstellung erfolgte alle 2 h eine Gasanalyse.

Die Gasproduktion wurde mit einem Trommelgaszähler TG5/5 der Firma Ritter (Meßbereich 10 – 600 $L * h^{-1}$, Meßgenauigkeit ±0,09 %) bestimmt. Durch eine entsprechende Führung und Länge der Gasleitung wurde eine ausreichende Kondensation aus dem Biogas sichergestellt. Die Gastemperatur wurde im Trommelgaszähler mittels eines PT 100 erfasst und zur Normierung verwendet.

Für eine Teilrückführung des Biogases wurde eine Gaspumpe der Firma KNF Neuberger (N 726 FT.29 E) eingebaut. Die Gasrückführung erfolgte über eine ¾“ Gasringleitung (Durchmesser Ø 216 mm) am Boden des Fermenters. Eine Förderleistung der Gaspumpe von 13 $L * min^{-1}$ wurde kontinuierlich eingestellt und über die Versuchsdauer beibehalten.

Zur Veranschaulichung ist der Gas- und Substratfluss des Pilotfermenters SB1 in Abbildung 8 in einem Fließschema dargestellt.

Von der teilweisen Rückführung des Biogases erwartete man sich, dass der Eigenstromverbrauch aufgrund pneumatischer Durchmischung bei der Gaseinpressung reduziert und die Methanproduktivität bei Umsatz des residualen Wasserstoffs im Biogas nach

$$CO_2 + 4 \cdot H_2 \rightarrow CH_4 + 2 \cdot H_2O$$

etwas gesteigert werden könnte.

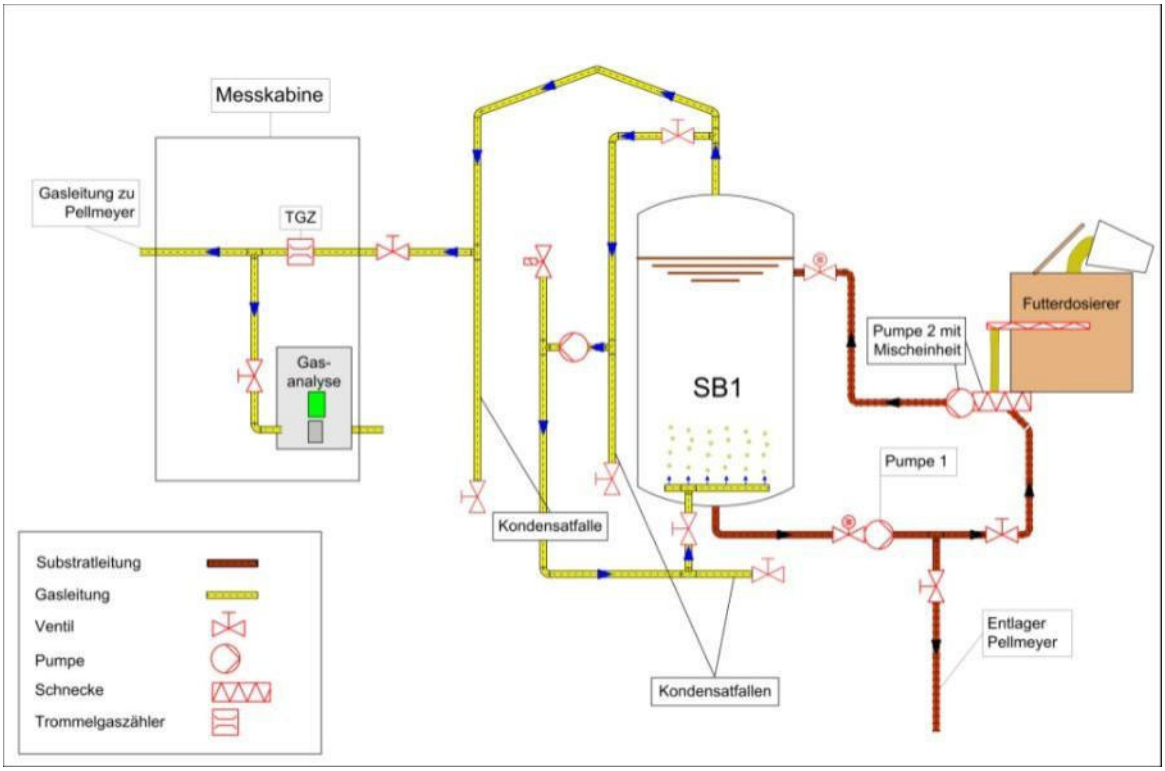


Abbildung 8: Gas- und Substratfluss im Pilotfermenter SB1

2.1.1.5 Zweistufige Fermenteranlagen

Das zweistufige Fermentersystem (Standort LfL) setzte sich aus einem liegenden 46 L (Arbeitsvolumen 33 - 35 L) und einem stehenden 72 L Fermenter (Arbeitsvolumen 60 - 63 L) zusammen (Abbildung 9).

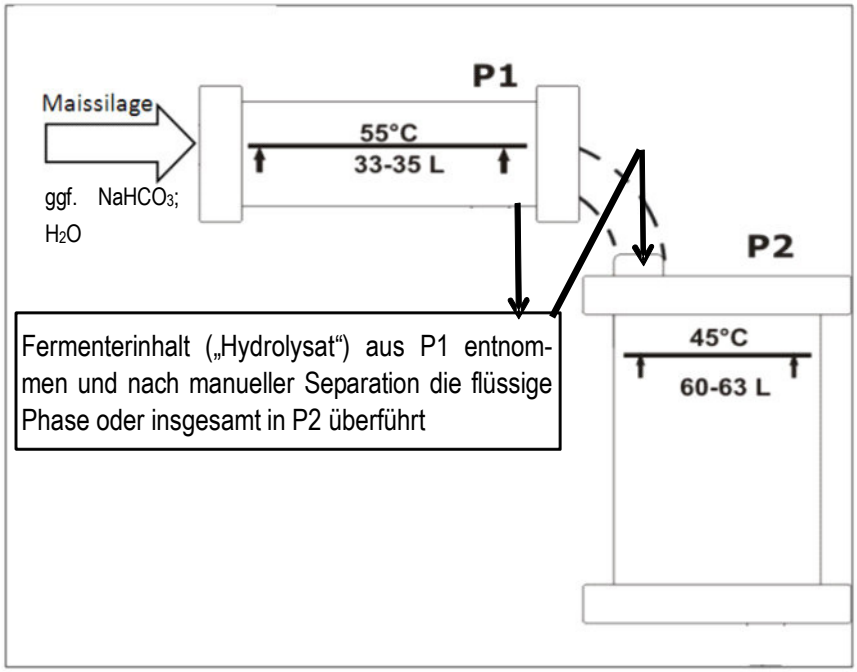
Abbildung 9: Zweistufiges Fermentersystem (liegend, stehend) von LfL-ILT

Der liegende Fermenter (P1) mit einem Paddelrührwerk diente als Hydrolysefermenter mit einer Betriebstemperatur von 55°C. Als Methanogenesephase und zweite Stufe wurde ein stehender Fermenter (P2) mit einem Gabelrührwerk bei 45°C betrieben. Weitere Betriebsdaten sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Betriebsdaten von den Fermentern P1 und P2

Parameter	P1	P2
Temperatur (°C)	55	45
Umdrehungen pro Minute	20	20
Rühren	Ja	Ja
Gesamtvolumen (L)	46	72
Arbeitsvolumen (L)	33-35	60-63
Rührintervall (min^{-1})*	10/5	10/5

*erste Zahl: laufendes Rührwerk, zweite Zahl: angehaltenes Rührwerk



Die als Überlauf konzipierte Verbindung zwischen P1 und P2 (gestrichelt) musste geschlossen werden, da sich im Dauerbetrieb mit NawaRo häufig Verstopfungen ergaben

Abbildung 10: Schema des Versuchsaufbaus im 2-phasigem Betrieb

Im täglichen Betrieb wurde Reaktor P1 über eine Futterschnecke mit Silage gefüttert. Gleichzeitig erfolgte eine Zugabe von $NaHCO_3$ und Wasser zum Einstellen des pH-Werts, des Arbeitsvolumens und der hydraulischen Verweilzeit in der ersten Phase (Hydrolyse, Acidogenese). Aus dem Hydrolysefermenter wurde täglich ein definiertes Volumen entnommen und entweder insgesamt oder die flüssige Phase nach manueller Separation in den Methanogenese-Fermenter P2 überführt. Vorab wurde zum Volumenausgleich eine äquivalente Menge aus dem Fermenter P2 entnommen.

2.1.2 Chemische Analytik

2.1.2.1 TS und oTS

TS und oTS wurden gravimetrisch nach DIN 38414-S2 bzw. DIN 38414-S3 bestimmt. Wo nicht anders vermerkt stellen die Angaben zur oTS die um die mit GC-Analytik (s. 2.1.2.5) bestimmten korrigierten Werte dar.

2.1.2.2 Ammoniumstickstoff

Die Ammoniumstickstoffkonzentration (NH_4^+-N) wird mit einer zweipunktkalibrierten ammoniakselektiven Elektrode im verdünnten Substrat gemessen. Dazu wird neben dem Ammoniak das in der Probe enthaltene Ammonium durch Zugabe von 10 M Natronlauge in Ammoniak überführt und mitgemessen. Der Meßwert gibt gemäß der Kalibration die Konzentration an Ammoniumstikstoff und Ammoniak in der Probe wieder.

2.1.2.3 FOS/TAC

Das Verhältniss von flüchtigen organischen Säuren (FOS) zur alkalinen Pufferkapazität (FOS/TAC) wurde titrimetrisch nach Nordmann (1977) und Rieger und Weiland (2006) bestimmt.

Zur Probenvorbereitung wurde die frisch entnommene Probe zentrifugiert (20 min bei 15.000 g) und ein definiertes Volumen des Überstands in ein Becherglas (50 mL) pipettiert (i.a. 5 mL). Die Probe wurde mit dest. Wasser verdünnt bis die pH-Elektrode gut in die Lösung eintauchte.

Die Gehalte an TAC und FOS wurden durch Titration mit 0,1 N Schwefelsäure bestimmt. Für den TAC wurde die Lösung vom Ausgangs-pH-Wert auf 5,0 titriert (Menge α), für den FOS-Gehalt weiter auf 4,4 (Menge β). Die Gehalte wurden mit den unter Kapitel 2.1.3.3 aufgeführten Formeln bestimmt.

2.1.2.4 pH-Wert

Der pH-Wert wurde nach DIN EN 12176-S5 mit einer pH-Elektrode bestimmt.

2.1.2.5 Flüchtige Fettsäuren

Kurzkettige aliphatische Monocarbonsäuren sind wasserdapfflüchtig (FFS) und wurden daher bei der vorliegenden Bestimmungsmethode nach Freisetzung mit *ortho*-Phosphorsäure durch Wasserdampf aus der Probe ausgetrieben und als wässrige Lösung in einer Vorlage aufgefangen. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Titration des Destillats mit Natronlauge gegen Phenolphtalein. Die Konzentrationsangabe erfolgt als Essigsäure in $mmol * L^{-1}$. Die Konzentrationen der FFS C2 – C7 wurden gaschromatrographisch bestimmt.

2.1.2.6 Spurenelemente

Die Spurenelementanalytik wurde von der Abteilung AQU der Bayerischen Landesantstalt für Landwirtschaft (LfL-AQU), sowie der Universität Heidelberg (Institut für Umweltgeochemie) durchgeführt. An der LfL erfolgte die Spurenelementextraktion mit Königswasser und die Bestimmung mit ICP-OES bzw. einem Grafitrohr (Co), an der Universität Heidelberg mit einem Mikrowellen-unterstützten HNO_3/H_2O_2Druckaufschluss und ICP-MS.

2.1.2.7 Makroelemente

Die Elemente Phosphat, Kalium, Magnesium und Calcium wurden von LfL-AQU entsprechend den Vorschriften VDLUFA MB. Bd.3, Kap. 2.2.2.6, durchgeführt.

2.1.2.8 Van Soest Fraktionen

Die Gehalte an ADF, NDF und ADL-Wert wurden von LfL-AQU nach VDLUFA MB. Bd.3, Kapitel 6.5.2, 6.5.1 beziehungsweise 6.5.3 ermittelt.

2.1.2.9 Gesamtzucker und Stärke

Der Gesamtzucker wurde von LfL-AQU nach VDLUFA MB. Bd.3, Kapitel 7.1.1, die Stärke nach VDLUFA MB. Bd.3, Kapitel 7.2.1 bestimmt.

2.1.2.10 Rohasche und Rohfett

Die Bestimmung der Rohasche beziehungsweise des Rohfetts erfolgte durch LfL-AQU nach VDLUFA MB. Bd.3, Kapitel 8.1 und 5.1.1.

2.1.3 Berechnungen

2.1.3.1 Normierter Gasertrag

Die Biogas- und Methanerträge wurden stets zu Normbedingungen angegeben. Zuerst erfolgte eine Umrechnung des Volumens auf trockenes Gas. Der Wasserdampf im Biogas wurde nach der Magnusformel berechnet:

$$p = 610{,}78\ x\ e^{\left(17{,}08\ x\ \frac{t}{234{,}18 + t}\right)}$$

p: Dampfdruck im Pascal

t: Temperatur in Grad Celsius

Der Volumenanteil des Wasserdampfs im Biogas wurde durch die Division mit dem zugehörigen Luftdruck bestimmt.

Nach VDI 4630 wurde das Trockengasvolumen auf 273,15 K und 1013,25 hPa normiert. Dafür wurde die Gleichung für ideale Gase verwendet:

$$V_n = \frac{V_{tr}\ x\ P_{tr}\ x\ T_n}{T_{tr}\ x\ P_n}$$

V_n: Volumen des normierten Gases; V_{tr}: Volumen des trockenen Gases; P_n: Normdruck; P_{tr}: Real Luftdruck; T_n: Normtemperatur; T_{tr}: Real Temperatur

2.1.3.2 Ammoniak

Die Ammoniakkonzentration wurde mit der folgenden Formel nach Hansen (1998) berechnet:

$$NH_3 - N = \frac{NH_4 - N}{1 + 10^{(pKa - pH)}}$$

$$pKa = 0.09018 \times \frac{2729{,}92}{t + 273{,}15}$$

pKa: Dissoziationskonstante für Ammonium; t: Temperatur in Grad Celsius.

2.1.3.3 FOS- und TAC-Werte

Zur Bestimmung der FOS- beziehungsweise TAC-Werte wurden folgende Berechnungen durchgeführt.

$$\text{TAC}\ [\text{mg/kg}] = \frac{20\ \text{ml}}{\text{V1}\ [\text{ml}]} \times \alpha \times 250$$

$$\text{FOS}\ [\text{mg/kg}] = (\frac{20\ \text{ml}}{\text{V2}\ [\text{ml}]} \times \beta \times 1{,}66 - 0{,}15) \times 500$$

2.1.3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programmen Excel, SAS und R.

2.1.4 Spurenelementzusatz

Für die Zugabe von Spurenelementen wurden Cocktails hergestellt, die die in Tabelle 7 genannten Elemente in angegebenen Konzentrationen enthielten.

Von den Cocktails wurden 60 µL (=1x) oder 600 µL (=10x), in Einzelfällen auch 6 mL (=100x) und zuweilen nur einzelne Elemente, in die Durchflussfermenter zugegeben. Die Zugabe von Spurenelementen in den Versuchen mit 2 L Batchfermentern ist dem Ergebnissteil (3.1.2.1) zu entnehmen. Als Konsequenz der Spurenelementanalysen der Fermenterinhalte wurde die Zusammensetzung im Projektablauf geändert. Dies ist in der Legende der Tabelle 7 vermerkt.

Tabelle 7: Konzentration der Spurenelemente in den Cocktails

Spurenelement	Konzentration (mg $*$ L^{-1})	Darreichungsform
Fe*	300	$FeCl_3{*}6H_2O$
Co	220	$CoCl_2{*}6H_2O$
Mn	260	$MnCl_2{*}4H_2O$
Mo**	115	$NaMoO_4{*}2H_2O$
Cu**	0,09	$CuCl_2{*}2H_2O$
Zn**	0,81	$ZnCl_2$
B	0,33	H_3BO_3
Se	10,4	Na_2SeO_4
Ni	161	$NiCl_2{*}6H_2O$

*: Zugabe bis 28.3.2008; **: Zugabe bis 5.3.2008;

In Einzelfällen wurde eine NaCl-Lösung eingesetzt (im Text erwähnt):

Na	50.000	NaCl

2.1.5 Enzymzusatz

Um die Wirkung des Zusatzes von Enzymen in der mesophilen und thermophilen Monovergärung von Maissilage im Durchflussbetrieb zu evaluieren, wurden vier ausgewählte, formulierte Enzyme getestet. Dabei handelte es sich um eine

Cellulase (UIB 3.2.1.4) (= E1), eine

β-Galaktosidase (UIB 3.2.1.21) (= E2), eine

besonders thermostabile Cellulase (UIB 3.2.1.4) (= E3) sowie eine

Amylase (UIB 3.2.1.1) (= E4).

Im laufenden Fermenterbetrieb erfolgte täglich eine Enzymsuspensionszugabe von 1 mL $*$ kg $oTS_{zugeführt}^{-1}$. Initial wurden 0,045 g $*$ L_{Fi}^{-1} in die Fermenter eingebracht, um die gewünschte Enzymkonzentration einzustellen.

Da der Hersteller keine Enzyme für die Vergärung von Grassilage empfehlen konnte, wurden solche Ansätze nicht getestet.

2.1.6 NIRS-Kalibration

Im Rahmen des Teilvorhabens sollten die Potentiale einer Vorhersage verschiedener Prozessparameter des anaeroben Abbaus mittels NIR-Spektroskopie für mit Mais- bzw. Grassilage betriebene Fermenter aufgezeigt werden. Dabei sollte untersucht werden, ob die Einteilung in substratspezifische bzw. substratübergreifende (globale) Modelle einen Einfluss auf die Genauigkeit der Vorhersage einzelner Kenngrößen ausübt. Im Rahmen dieser Zielsetzung wurde bewusst der Temperatureinfluss bei der NIRS-Messung in die Kalibrationen integriert, indem die Proben bei wechselnden Temperaturen vermessen wurden. Damit wird der Temperaturvariation in einer Praxisanlage ihre mögliche Bedeutung für das Spektrum genommen.

Die Untersuchungen setzten sich zusammen aus einer Laboranwendung zur Erstellung off-line basierter Vorhersagemodelle sowie einer Transformation dieser off-line Kalibrationen für die Anwendung im on-line Betrieb durch die Installation des NIRS-Spektrometers an dem mit mono-Mais betriebenen Technikumfermenter. Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf der off-line Modellierung da intermittierend technische Probleme am Technikumfermenter einen regelmäßigen Messbetrieb verhinderten.

2.1.6.1 Probenherkunft

Die für die off-line Kalibration verwendeten Gärproben entstammten aus Laborfermentern der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft in Freising. Die mesophil betriebenen Fermenter wurden mit den Substraten Mais- bzw. Grassilage gefüttert. Da für die Inokulation der Grasfermenter kein reines Grasinokulum aus stabilem Betrieb verfügbar war, wurde zum Anfahren Wirtschaftsgülle aus dem Fermenter SB2 (s. 1.2.1) verwendet. Die ersten Proben dieser Fermenter stammen daher nicht aus mono-Gras Fermentern im engeren Sinne. Dies wurde bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt. Für die Spektrenerfassung wurden regelmäßig Proben aus den Laborfermentern gezogen. Die Beprobung erfolgte dabei parallel zu unterschiedlichen Prozesszuständen. Diese reichten von einem stabilen Betrieb bis hin zu kritischen Zuständen mit einsetzender bzw. bereits fortgeschrittener Übersäuerung. Ziel war es, den Modellraum für jeden Prozessparameter gleichmäßig abzubilden und eine möglichst breite Spreizung der Konzentrationsbereiche der Zielparameter zu erhalten.

2.1.6.2 Spektrale Messung

Die Vermessung der Proben erfolgte mit einem Dioden-Array-Spektrometer (NIR-Online GmbH, Walldorf, Germany). Dieses erfasst den Wellenlängenbereich 400 bis 1800nm in 10-nm Auflösung. Im off-line Betrieb erfolgte die Messung in einer Küvette bei diffuser Reflexion. Anschließend wurden die Reflexionswerte in Absorptionsspektren ($\log[1 * \text{Reflexion}^{-1}]$) umgerechnet. Ausgewertet wurden die Daten des Bereiches 950 bis 1750 nm. Die einzelnen Proben wurden bei variierenden Temperaturen zwischen 15-40°C vermessen. Damit konnte der Temperatureffekt auf die Absorptionseigenschaften des Wassers berücksichtigt werden. Um ein repräsentatives Mittelwertspektrum jeder einzelnen Gärprobe zu erhalten, wurde diese in neunmaliger Messwiederholung aufgenommen.

2.1.6.3 Referenzanalyse

Die Referenzanalyse erfolgte nasschemisch. Die bei -18 °C gelagerte Probe wurde bei 4 °C aufgetaut und durch Schütteln homogenisiert. Die Messung von TS und oTS erfolgte über Trocknung (105 °C, 24h) bzw. Veraschung (550°C, 1h). Das Fettsäuremuster wurde gaschromatographisch ermittelt. Die Bestimmung des Gesamtessigsäureäquivalentes erfolgte ebenso titrimetrisch wie die von NH_4-N nach vorheriger Destillation.

2.1.6.4 Modellkalibration- und Validierung

Die Modellbildung erfolgte sowohl substratspezifisch als auch substratübergreifend. So wurden für die Substrate mono-Mais sowie für mono-Gras eigene Vorhersagemodelle erstellt. In einem zweiten Schritt wurde mit sämtlichen Proben eine globale Kalibrierung erstellt. Neben den mono-Mais und mono-Gras Proben umfasste diese Kalibration ebenfalls Mischproben aus beiden Substraten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Vorhersagemodelle sowohl eine Kreuzvalidierung als auch – soweit Umfang und Struktur des Probensatzes dies zuließen – eine unabhängige Test-Set Validierung durchgeführt.

Tabelle 8: Statistische Kenngrößen des Kalibrier- und Validierdatensatzes für jeden Prozessparameter.

		Mais		Gras		Mais-Gras	
		Kalibration	Validation	Kalibration	Validation	Kalibration	Validation
TS	Bereich	6,1-13,0	6,2-12,9	6,0-13,3	6,1-12,5	6,0-13,0	6,1-13,0
[% an FM]	Mittel	9,6	9,7	8,4	8,4	9,2	9,2
	SD	1,76	1,78	1,85	1,83	1,85	1,86
	n	125	42	88	29	220	73
oTS	Bereich	4,5-11,6	4,5-11,4	4,3-9,7	4,3-9,1	4,3-11,6	4,3-11,4
[% an FM]	Mittel	8,1	8,0	6,0	6,1	7,3	7,3
	SD	1,76	1,77	1,38	1,45	1,89	1,94
	n	117	39	82	28	206	69
NH_4-N	Bereich	1.200-3.410	1.210-3.350	1.790-6.410	2.000-6.290	1.200-6.410	1.300-6.290
[mg kg^{-1}]	Mittel	2.140	2.130	3.930	3.960	2.900	2.920
	SD	509	514	990	1.010	1.150	1.180
	n	117	39	90	30	221	74
Essigsäure	Bereich	400-12.390	410-10.570	421-7.250	481-6.260	500-12.700	506-12.170
[mg kg^{-1}]	Mittel	3.080	3.030	1.960	2.040	2.910	2.880
	SD	3.440	3.360	1.470	1.490	2860	2.830
	n	40	20	50	25	115	38

Propions. [mg kg^{-1}]	Bereich	202-5.069	206-5.094	103-11.680	-	202-9.390	206-9.240
	Mittel	1.502	1.582	3.530	-	2.220	2.400
	SD	1.355	1.481	3.650	-	2.000	2.290
	n	41	21	44	-	109	37
FFS ges. [mg kg^{-1}]	Bereich	508-18.070	523-16.840	-	-	620-18.070	640-16.840
	Mittel	2.8023	2.960	-	-	3.300	3.550
	SD	3.603	3.805	-	-	3.430	3.880
	n	62	31	-	-	95	32

Dargestellt sind die Werte für Mais bzw. Gras als Substrat, sowie für das globale Modell der Substrate Mais und Gras. Aufgrund des begrenzten Datensatzes mit Grasvergärung fehlen die Test-Set Validierung zu Propionsäure sowie die Modellbildung für FFS insgesamt.

Abkürzungen: TS: Trockensubstanz; oTS: org. Trockensubstanz; NH_4-N: Ammoniumstickstoff; FFS gesamt: Gesamtessigsäureäquivalent (titrimetrisch); FM: Frischmasse

Zuerst erfolgte eine Kalibration unter Verwendung aller Proben des jeweiligen Datensatz. Dieser Datensatz wurde anschließend von Ausreißern bereinigt. Mit diesem bereinigten Datensatz wurde eine erneute Kalibration mit anschließender Kreuzvalidierung (one-leave out) durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Einteilung der verwendeten Proben in einen Kalibrier- und einen Validierdatensatz. Dazu wurden die Proben nach den jeweiligen Zielgrößen aufsteigend sortiert und anschließend jede vierte Probe (bei Säureparametern jede dritte) dem Validierdatensatz zugeordnet. Dieses Verfahren stellt sicher, dass sowohl Kalibrier- als auch Validierdatensatz eine ähnliche Struktur in der Verteilung der Konzentrationswerte der Zielgrößen aufweisen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Minimum- bzw. Maximumwerte dem Kalibrierdatensatz zugeordnet wurden. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Kenngrößen der Datensätze wobei zwischen den Kalibrierproben sowie den Proben für die Test-Set Validierung unterschieden wird. Vor der eigentlichen Kalibration erfolgte eine mathematische Datenvorbehandlung mit dem Ziel, die für die einzelnen Kenngrößen relevanten spektralen Informationen gezielt hervorzuheben.

Die Bewertung der einzelnen Modelle erfolgt auf Basis verschiedener statistischer Kenngrößen: der mittlere Fehler der Kalibration (SEC), der mittlere Vorhersagefehler der Kreuzvalidierung (SECV) bzw. Test-Set Validierung (SEV) sowie das Bestimmtheitsmaß (R^2). Für die Test-Set Validierung wurde zusätzlich der RPD-Wert berechnet, dem Quotienten aus Standardabweichung (SD) der Zielgröße des Validierdatensatzes und dem mittleren Vorhersagefehler der Validierung (SEV), um eine Bewertung der Leistungsfähigkeit der erstellten Kalibrationen zu ermöglichen. Die Anzahl der Ränge entspricht der Anzahl der für die Kalibration erforderlichen PLS-Komponenten.

2.1.6.5 On-line Anwendung

Gegenstand der on-line Anwendung war es, die im Laborbetrieb erstellten off-line Kalibrierungen für mono-Mais in eine Anwendung für den on-line Betrieb zu überführen. Für diesen Zweck wurde der off-line Datensatz der mono-Mais Modelle um weitere on-line am SB1-Fermenter erhobene Proben erweitert. Mit diesem erweiterten Datensatz wurde eine erneute Kalibration für ausgewählte Prozessparameter durchgeführt. Anschließend wurde in einem kurzzeitigen Messbetrieb die Reproduzierbarkeit der Vorhersagewerte für TS, oTS sowie NH_4-N untersucht.

2.2 Molekularbiologie/Mikrobiologie

2.2.1 DNA-Extraktion

Vor der DNA-Extraktion wurden die gezogenen Fermenterproben bis zur Aufbereitung bei -20°C gefrorenen Proben mit einem Ultra-Turrax bei maximaler Leistung zerkleinert und homogenisiert. Anschließend wurden 40 µL der Probe mit einer 0,85 % KCl-Lösung versetzt, gemischt und bei 3.000 g zentrifugiert. Der Überstand, der lösliche PCR-Inhibitoren und freie DNA enthielt, wurde dekantiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt. Anschließend erfolgte eine Resuspension der Probe in 40 µL Wasser. Die DNA dieser Suspension wurde mit dem FastDNA® SPIN Kit for Soil (Bio101®) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Dabei wurde das „Bead-Beating" mit dem Homogenisator „FastPrep 24" der Firma Bio101 bei höchster Stufe für 45 s durchgeführt. Die qualitative/quantitative Analyse der extrahierten DNA erfolgte spektrometrisch durch Messung der Absorbtion bei 230, 260 und 320 nm mit einem Nanophotometer der Firma Implen.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation eines konservierten Bereichs des *mcr*A/*mrt*A-Gens der methanogenen Archaen wurden stark degenerierte Primer entwickelt, die hochspezifisch diese physiologische Mikroorganismengruppe erfassen (Bauer et al., 2008; Tabelle 9).

Neben der konventionellen PCR und der qPCR wurden auch andere PCR-Anwendungen durchgeführt, die Modifikationen des Reverse-Primers *mcr*A-R erforderlich machten.

Tabelle 9: Primersequenzen für die Amplifikation des *mcr*A/*mrt*A-Gens

*mcr*A-F (1046-1071): TAYATGWSNGGHGGNGTNGGNTTYAC
*mcr*A-R (1435-1465): TGRTCYTGNARRTCRWANCCRWAGAANCC

Bei der PCR-DGGE (Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese-PCR) wurde der Reverse-Primer mit einer GC-Klammer versehen:

CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG

Für die SSCP-PCR (Single-Strand Conformation Polymorphism-PCR) (s. 2.2.3.3) wurde der Reverse Primer am 3'-Ende phosphoryliert.

Tabelle 10: PCR-Ansatz für die Amplifikation mit dem *mcr*A/*mrt*A-Primersystem

Bestandteil	Volumen (µL)	Endkonzentration
Puffer (10x, ohne $MgCl_2$)	5	1x
$MgCl_2$ (50 mM)	6	6 mM
dNTPs (10 mM each)	1	200 µM
Primer forward (20 µM)	2,7	1,08 µM
Primer reverse (20 µM)	2,7	1,08 µM
Platinum-Taq-Pol. (5 u / µL)	0,3	1,5 u
H_2O	30,3	

DNA-Extrakt	2	

Tabelle 11: Temperaturprofil für die *mcr*A/*mrt*A-PCR

Schritt		Anzahl der Schritte
3 min	95°C	1x
20 s	95°C	12x
45 s	60,5°C	
40 s	72°C	
20 s	95°C	5x
45 s	60°C	
40 s	72°C	
20 s	95°C	5x
45 s	59,5°C	
40s	72°C	
20 s	95°C	10x
45 s	59°C	
40 s	72°C	
10-15 min	72°C	1x
für immer	4°C	1x

Die ungewöhnlich hohe Konzentration der Primer im PCR-Ansatz ist in deren hoher Degeneriertheit (Tabelle 9) begründet. Sie wurde gewählt, um auch seltenen Nukleotidkombinationen eine ausreichende Hybridisierungschance zu bieten. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 50 µL. Typischerweise wurde ein Master-Mix (ohne Primer und DNA) für mehrere Ansätze vorpittiert. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist in

Tabelle 10 aufgeführt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 50 µL.

Die Temperaturführung der PCR mit den einzelnen Schritten ist in Tabelle 11 dargestellt.

Die PCR-Produkte wurden zur Kontrolle vor der SSCP-/DGGE-Gelelektrophorese in einem Agarosegel (2.2.3.1) auf korrekte Länge kontrolliert.

2.2.3 Elektrophorese

2.2.3.1 Agarosegel

Die Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel (1,7 % Agarose in 1x TAE-Puffer) erfolgte für 45 min bei einer Spannung von 120 V. Im Anschluss wurde das Gel für 20 min in eine Ethidiumbromidlösung (1 $\mu g * mL^{-1}$) gegeben und 20 min im Wasserbad gewaschen. Die PCR-Produkte wurden daraufhin unter UV-Licht sichtbar gemacht und im Geldokumentationssystem (2.2.3.3) zur Analyse aufgenommen.

2.2.3.2 Denaturierende Gradienten-Gel Elektrophorese (DGGE)

Für das das Gießen eines DGGE-Gels mit der DGGE-Apparatur (Phor U) der Firma Ingeny, wurden eine 0 %ige sowie eine 80 %ige Acrylamidlösung nach Tabelle 12 und Tabelle 13 hergestellt.

Tabelle 12: 0 %ige Polyacrylamidlösung

Bestandteil	Volumen
40% Acrylamid (19:1)	140 mL
10x TAE-Puffer	100 mL
Wasser	ad 1000 mL

Tabelle 13: 80 %ige Polyacrylamidlösung

Bestandteil	Volumen bzw. Menge
40% Acrylamid (19:1)	140 mL
10x TAE-Puffer	100 mL
Formamid	320 mL
Urea	336 g
Wasser	ad 1000 mL

Zu jeweils 50 mL dieser Stammlösungen wurden 5 µL APS und 2 µL TEMED hinzugegeben. Sofort danach wurde das Gel mit einem Gradientenmischer gegossen. Die Elektrophorese fand für 15 h bei 150 V und 65°C mit 20 µL PCR-Produkt (2.2.2) und 10 µL Auftragspuffer statt.

2.2.3.3 Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Elektrophorese

Für die SSCP wurden 8 µL des PCR-Produkts (2.2.2) durch Inkubation mit einer Lambda-Exonuklease (Fermentas) (30 min, 37°C) zu einzelsträngiger DNA verdaut. Nach der Inkubation wurden die Proben (10 µL) in Eiswasser gegeben und sofort mit 5 µL einer denaturierenden Lösung (Tabelle 14) versetzt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der denaturierenden Lösung

Bestandteil	µL
Formamid	950
2 M NaOH	5
Wasser	45

Anschließend wurde die DNA für 3 min bei 95°C denaturiert und sofort in Eiswasser schockgekühlt. Von der Lösung mit der denaturierten DNA-wurden 14 µL auf das SSCP-Gel aufgetragen (2.2.3.3).

Tabelle 15: Zusammensetzung des SSCP-Gels

Gellösung	0,70 x MDE
MDE Gel Solution [2x]	11 mL

0,6 x TBE	1,88 mL
Wasser	ad 31,4 mL
TEMED	18,84 µL
20% APS	87,92 µL

Vor dem Gießen des SSCP-Gels wurde, um ein beidseitiges Anhaften des Gels nach der Elektrophorese zu vermeiden, eine Glasplatte mit 1 mL einer Repelsilanlösung (500 µL Ethanol, 500 µL 2,5 % Dichlordimethylsilan) und 1 mL Bindingsilan-Lösung behandelt. Die Zusammensetzung des SSCP-Gels ist in Tabelle 15 dargestellt.

Nach dem Gießen wurde das Gel 2 h zur vollständigen Polymerisierung stehen gelassen. Die Gelelektrophorese fand für 18 h bei 400 V statt.

Die DNA-Fragmente wurden durch Silberfärbung in Anlehnung an Bassam et al. (1991) sichtbar gemacht. Dazu wurde das PAA-Gel 3 mal für jeweils 10 min in 10%iger Essigsäure gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Färbung in einer Lösung mit 750 mg $AgNO_3$ und 1,5 mL Formaldehyd pro 750 mL. Danach wurde das Gel für wenige Sekunden mit Wasser gewaschen und in einer Entwicklerlösung (22,5 g Na_2CO_3, 0,75 mg $Na_2S_2O_3$ und 1,5 mL Formaldehyd in 750 mL $Wasser_{bidest.}$) geschwenkt, bis die Fragmente gut zu erkennen waren. Daraufhin wurde das Gel sofort in kalte 10%ige Essigsäurelösung gegeben. Nach 10 Minuten wurde die Essigsäure mit Wasser aus dem Gel gewaschen und das Gel getrocknet. Die Dokumentation erfolgte mit einem Biostep Geldokumentationsystem und der Auswertesoftware Argus.

2.2.4 Sequenzierung und phylogenetische Analysen

Für die phylogenetischen Analysen wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt:

A („PCR-Direktklonierung“): durch direktes Klonieren der PCR-Amplifikate einer Fermenterprobe

B („SSCP-Banden-Klonierung“): durch gezieltes Ausschneiden aller (oder ausgesuchter) Banden aus dem SSCP-Gel, Elution der DNA, Re-Amplifikation und Klonierung

Methode A: Ausgangspunkt waren die auf korrekte Länge geprüften *mcr*A/*mrt*A-Amplikons (2.2.2, 2.2.3.1).

Methode B: Die ausgeschnittenen Banden wurden für 3 h bei 60°C in 80 µL TE-Puffer unter Schütteln inkubiert. Die eluierte DNA wurde mit 80 µL Ethanol (80 %) + 2 µL Glycogen gefällt. Zur weiteren Reinigung wurden die Proben bei -20°C für mindestens 2 h gelagert und für 10 min bei 8.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das residuale Ethanol abgedampft. Das Pellet wurde in 20 µL Wasser resuspendiert und die DNA mit dem *mcr*A/*mrt*A-System erneut amplifiziert.

Die PCR-Produkte aus Methoden A und B wurden mit dem Kit „Topo TA cloning“ nach Angaben des Herstellers in *E. coli* einrekombiniert. Alle oder eine Zufallsauswahl separierter Kolonien wurden anschließendauf ein enthaltenes *mcr*A/*mrt*A-Fragment mit korrekter Länge getestet (s. 2.2.2, 2.2.3.1). Positive Klone wurden über Nacht bei 37°C in LB-Flüssigmedium vermehrt. Die davon isolierten Plasmide wurden nach Reinigung mit dem „Plasmid Purification Kit“ (Qiagen®) sequenziert (LGC Genomics).

Phylogenetische Auswertungen der Sequenzierergebnisse erfolgten über BLAST N2 Suche gegen die nr-Datenbank in NCBI sowie mit Hilfe des Bioinformatikpakets MEGA4 (Tamura et al., 2007).

2.2.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Zur Bestimmung der *mcr*A/*mrt*A-Ausgangskonzentration in den DNA-Extrakten bzw. in den Proben wurde die Real-Time PCR verwendet (s. 1.2.2.2.4). Alle Messungen wurden in 3-facher Wiederholung durchgeführt. In Einzelfällen wurden Proben mehrfach extrahiert.

2.2.5.1 Quantifizierung

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde EvaGreen® in die qPCR-Ansätze eingesetzt, das in doppelsträngige DNA bindet und bei Blaulichtanregungen fluoresziert. Die Zusammensetzung des qPCR-Ansätze kann Tabelle 16 entnommen werden.

Für die qPCR wurde das in Tabelle 17 beschriebene Temperaturprofil verwendet. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 82°C gemessen, um sich bildende Primerdimere weitgehend zu denaturieren (vgl. Abbildung 69).

Tabelle 16: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes

Bestandteil	1 Ansatz (µL)	Endkonzentration
Puffer (10x, ohne $MgCl_2$)	2,5	1x
$MgCl_2$ (50 mM)	3	6 mM
dNTPs (10 mM)	0,5	200 µM
forw.-Primer (20 µM)	0,75	0,6 µM
rev.-Primer (20 µM)	0,75	0,6 µM
Platinum Taq-Pol. (5 u / µL)	0,15	0,75 u
Eva-Green (50x)	1	2x
H_2O	15,35	
DNA	1	

Tabelle 17: Temperaturprofil der qPCR

Schritt		Anzahl der Schritte
3 min	95°C	1x
15 s 60 s 10 s	95°C 60°C 82°C	45x
4°C	für immer	1x

2.2.5.2 Konstruktion eines *mcr*A-Standards

Zur Herstellung eines Standards für die qPCR wurden *mcr*A/*mrt*A PCR-Amplikons einer Fermenterprobe mit dem Kit Topo-TA cloning von Invitrogen® nach Angaben des Herstellers

kloniert (s. 2.2.4). Durch Sequenzanalyse wurde ein Klon als *Methanosarcina* sp. identifiziert. Dieser wurde in LB-Flüssigmedium über Nacht bei 37°C vermehrt.

Aus der logarithmischen Wachstumsphase wurde ein Aliquot auf LB-Agar in 10-er Verdünnungsstufen ausplattiert. Die gebildeten Kolonien wurden gezählt und darüber der Ausgangstiter ermittelt. Ein anderes Aliquot wurde in 0,85 % KCl-Lösung gewaschen. Mit einem Aliquot der denaturierten Suspension wurde eine quantitative PCR aus 10-er Verdünngsstufen durchgeführt. Ab einer bestimmten Verdünnungsstufe konnten nur noch teilweise oder keine Amplifikationssignale mehr detektiert werden. Über eine most propable number (MPN) Analyse wurde die wahrscheinlichste Menge der *mcr*A/*mrt*A-Ausgangskopienzahl in der unverdünnten Suspension ermittelt.

Der Bezug auf die *E. coli*-Zellzahl ergab die Anzahl der einrekombinierten *mcr*A/*mrt*A-Fragmente pro *E. coli* Zelle. Durch Zugabe eines bestimmten Volumens der Klonsuspension konnte eine definierte Anzahl an *mrc*A/*mrt*A-Kopieen in die qPCR eingesetzt werden. Über die Standardkurve aus einer Standard-Verdünnungsreihe wurde die Konzentration des Zielgens in den Extrakten unbekannter Proben ermittelt. Über die Messung von Verdünnungsreihen wurde auch evaluiert, ob eine PCR-Inhibierung vorlag. Ausgewertet wurden nur Signale nicht-inhibierter Reaktionen. Generell konnten 10^{-1} Verdünnungen der Extrakte verwendet werden, in Einzelfällen ergab sich mit unverdünnten Extrakten eine (partielle) Hemmung.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Verfahrenstechnik

3.1.1 Enzymeinsatz

Um die Wirkung des Zusatzes von Enzymen in mesophilen und thermophilen Monovergärung von Maissilage im Durchflussbetrieb zu evaluieren, wurden vier ausgewählte Enzyme getestet. Dabei handelte es sich um eine

Cellulase (UIB 3.2.1.4) (= E1), eine

β-Galaktosidase (UIB 3.2.1.21) (= E2), eine

besonders thermostabile Cellulase (UIB 3.2.1.4) (= E3) sowie eine

Amylase (UIB 3.2.1.1) (= E4).

Da der Hersteller keine Enzyme für die Vergärung von Grassilage empfehlen konnte, wurden solche Ansätze nicht getestet.

3.1.1.1 Maissilage in mesophiler Monovergärung

Die 32 L Durchflussfermentern wurden im Frühsommer 2006 mit Material aus dem Reaktor SB2 (Standard-Biozönose, Gronauer et al., 2005) inokuliert und im Folgenden auf Mais-mono-Betrieb umgestellt. Am 26.2.2007 begannen die Versuche mit Enzymzusatz (Abbildung 11a). Rechnerisch waren zu diesem Zeitpunkt 73 % der Reaktorinhalte ausgetauscht (Abbildung 11b).

Vom Hersteller wurden 3 (formulierte) Enzymsuspensionen geliefert. Empfohlen wurde, im mesophilen Temperaturbereich eine Variante mit Zusatz von 2 der 3 ("+2E") sowie der 3 Suspensionen ("+3E") zu testen. Die Zusammensetzung ist in Kapitel 2.1.5 beschrieben.

Der Zusatz von zwei Enzymen bestand aus E1 (UIB 3.2.1.4) und E4 (UIB 3.2.1.1),

der Zusatz von drei Enzymen aus E1 (UIB 3.2.1.4), E2 (UIB3.2.1.21) und E4 (UIB 3.2.1.1).

Der Versuch, der als Ansatz mit Steigerung der organischen Raumbelastung konzipiert war, musste am 11.5.2007 abgebrochen werden, da die Methanproduktion in allen Reaktoren deutlich zurückging und sich auch nach Einstellung der Fütterung nicht stabilisieren ließ (Abbildung 11a). Die Analytik der Säuren und der FOS/TAC-Werte belegte eine Prozesshemmung auf Grund von Versäuerung (Abbildung 11b). Der Kontrollreaktor C3 war am stärksten betroffen.

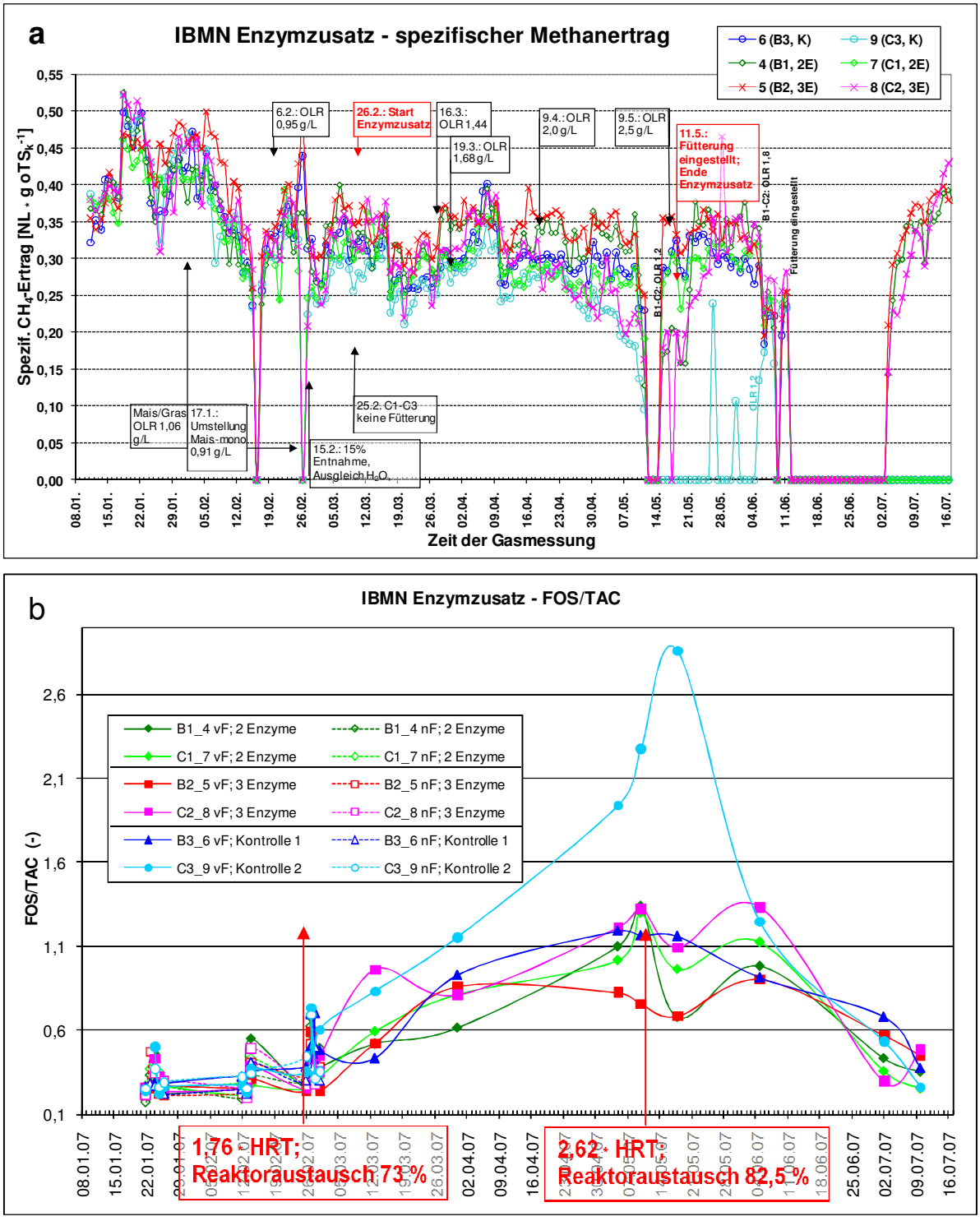


Abbildung 11: Langzeitstabilität der mono-Vergärung von Maissilage im mesophilen Durchflussbetrieb und Wirkung des Zusatzes von Enzymen auf a) die spezifische Methanproduktion und b) den FOS/TAC-Wert

Zur Evaluierung der Effekte des Enzymeinsatzes wurde daher Reaktor C3 nicht berücksichtigt. Um systematische individuelle Differenzen zu eliminieren, wurde jeweils um die Faktoren korrigiert, die aus der Betriebsphase 2 Wochen vor Beginn des Enzymzusatzes ermittelt wurden.

Abbildung 12 zeigt, dass die Varianten mit Enzymzusatz den spezifischen Methanertrag (sME) geringfügig steigerten, die sMP aber mit ca. 0,3 NL $_{Methan}$ * g oTS^{-1} suboptimal war. Es ergab sich in Abhängigkeit von der organischen Raumbelastung (OLR) und für Variante +2E eine Steigerung der spezifischen Methanproduktion um 2 – 8 % und für Variante +3E um 3 – 11 % gegenüber der Kontrolle (Abbildung 13). Die hohe Streuung bei OLR > 1,75 (Abbildung 13) ist auf die zunehmende Versäuerung der Fermenter-Parallelen zurückzuführen (Abbildung 11b).

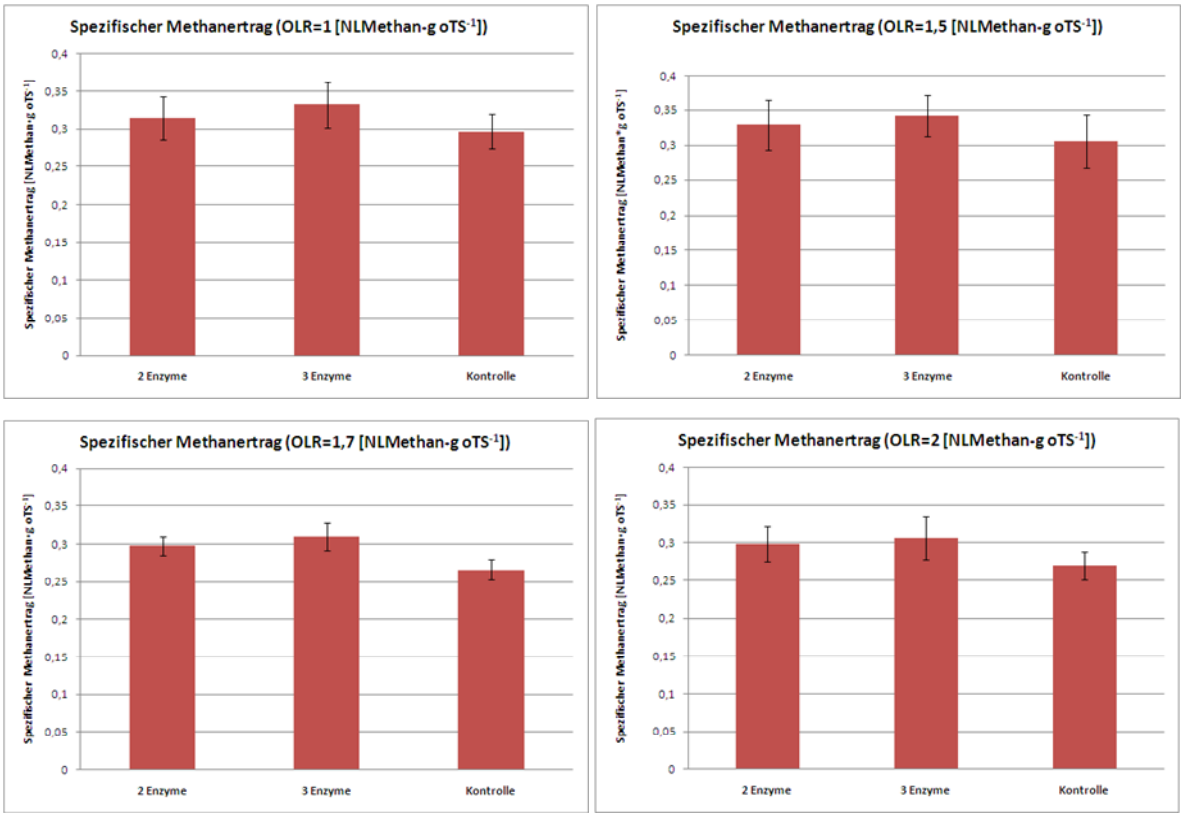


Abbildung 12: Wirkung des Zusatzes von Enzymen auf die spezifische Methanproduktion im mesophilen Durchflussbetrieb bei unterschiedlichen organischen Raumbelastungen

Mit Hilfe des Friedman- und anschließenden Nemenyi-Tests, wurden geringe, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen festgestellt.

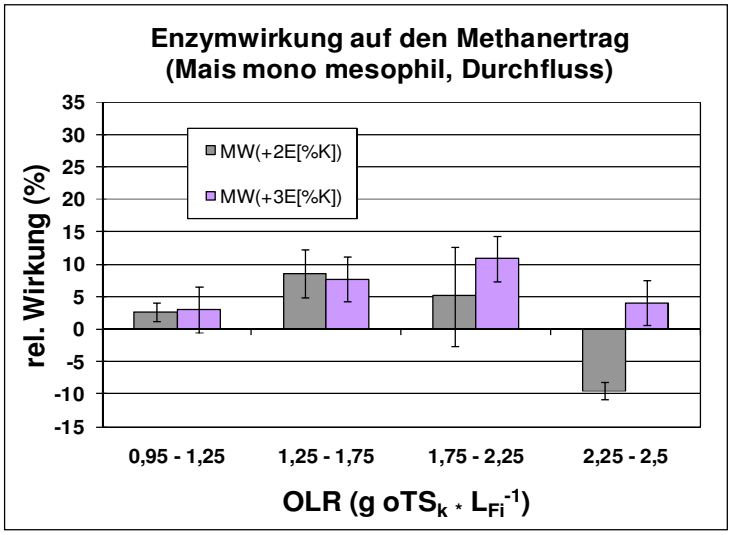


Abbildung 13: Enzymwirkung auf den Methanertrag, Mais mono mesophil, Durchfluss

Um zu prüfen, ob der Enzymzusatz den Abbau des Lignocelluloseanteils in der Lignocellulose-Biomasse (LCB) verstärkte, wurde die Fraktion NDF, ADF und ADL bestimmt. Durch die Bildung der Differenzen zwischen den NDF- und ADF-Werten wurde der Hemizellulosegehalt geschätzt. Ein Einfluss der Enzymzugaben auf den Hemizellulosegehalt konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 14).

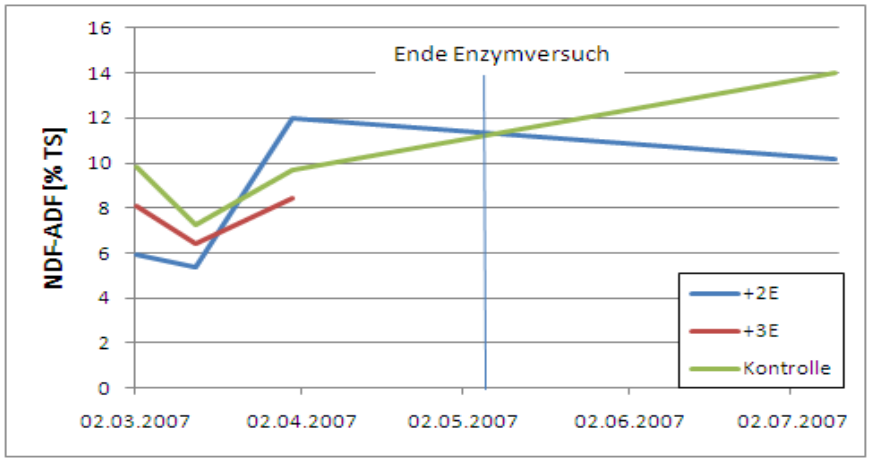


Abbildung 14: Geschätzter Hemizellulosegehalt (NDF-ADF) während des Versuchs „Enzymzusatz“ im mesophilen (Mais-) Monobetrieb.

Auch bei der Betrachtung der Zellulosegehalte durch Subtraktion der ADF-Werte mit den jeweiligen ADL-Werten war kein Einfluss der Enzymzusätze festzustellen (Abbildung 15).

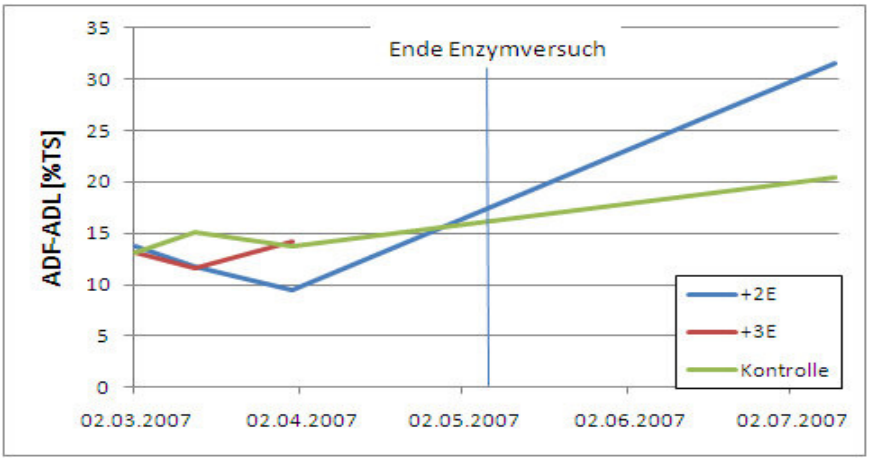


Abbildung 15: Geschätzter Zellulosegehalt (ADF-ADL) während während des Versuchs „Enzymzusatz“ im mesophilen (Mais-) Monobetrieb.

Bei einem Vergleich der ADL-Werte bei unterschiedlichen Behandlungen konnte ebenfalls kein Einfluss der Enzymzugaben nachgewiesen werden (Abbildung 16).

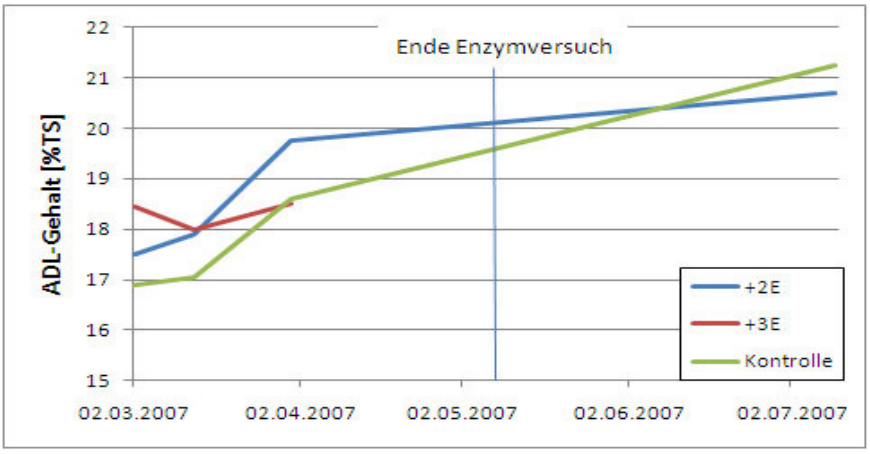


Abbildung 16: Geschätzer Lignin Gehalt (~ADL-Gehalt) während während des Versuchs „Enzymzusatz“ im mesophilen (Mais-) Monobetrieb

Aus Abbildung 14 -Abbildung 16 wird aber deutlich, dass offenbar im Zusammenhang mit der zunehmenden Versäuerung, die Fraktionen Hemicellulose, Cellulose und Lignin schwächer abgebaut wurden.

Nach Beendigung des Versuchs wurden die 32 L-Durchflussfermenter zum Abbau der angestauten Säuren ausgehungert. Es folgten Untersuchungen zur Ursache Versäuerung (siehe 3.1.2.1).

3.1.1.2 Maissilage in thermophiler Monovergärung

Die in 3.1.1.1 beschriebenen Enzymsuspensionen E1 – E4 wurden mit Maissilage im thermophilen (55°C) Durchflussbetrieb getestet. Abbildung 17 zeigt den spezifischen Methanertrag (sME), der im Versuchszeitraum erzielt wurde.

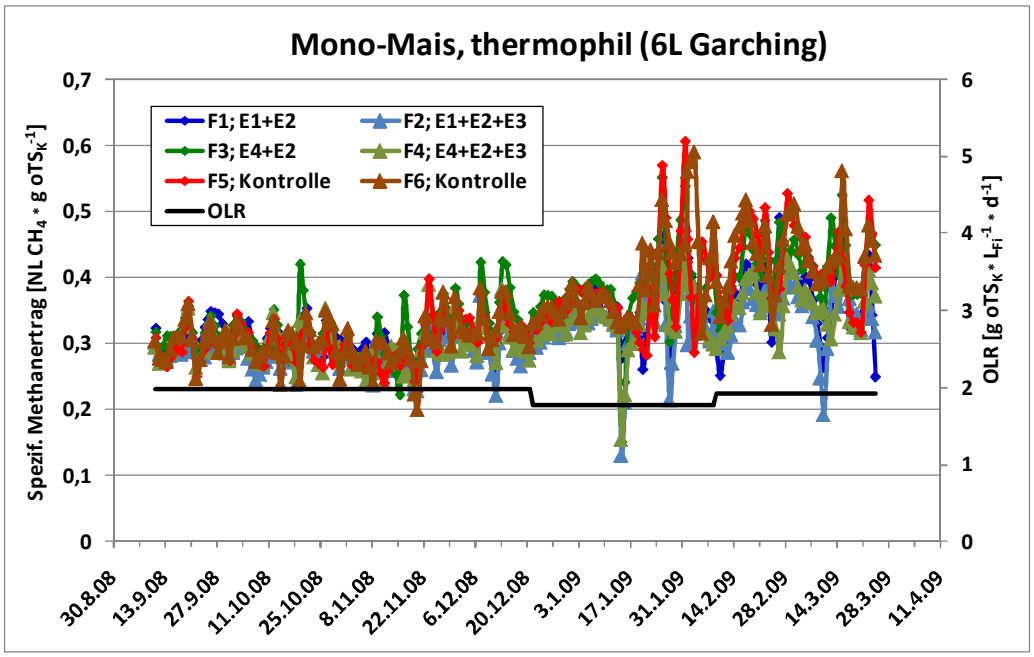


Abbildung 17: Spezifischer Methanertrag bei unterschiedlichen Enzymzugaben (Mono-Mais, thermophil).

Bis 20.12.2008 betrug der sME nur ca. 0,3 $NL_{Methan} * g\ oTS^{-1}$. Ab dem 6.1.2009 wurden die Fermenter 2x täglich geschüttelt, was offenbar eine verbesserte Methanisierung (ca. 0,35 NL Methan * g oTS^{-1}, Abbildung 17) zur Folge hatte. Die organische Raumbelastung von etwa 2 g oTS * L_{Fi}^{-1} * d^{-1} wurde nicht erhöht, um eine weitere oTS-Anreicherung in den Fermentern zu vermeiden.

Abbildung 18 zeigt auch für den thermophilen Durchflussfermenter nur geringe Unterschiede zwischen den Varianten, die am ehesten mit den relativ großen Schwankungen der Gaserträge im täglichen Betrieb zu begründen sind (Abbildung 17).

Alle Behandlungen unterschieden sich von einander auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (Friedman-Test und Nemenyi-Test).

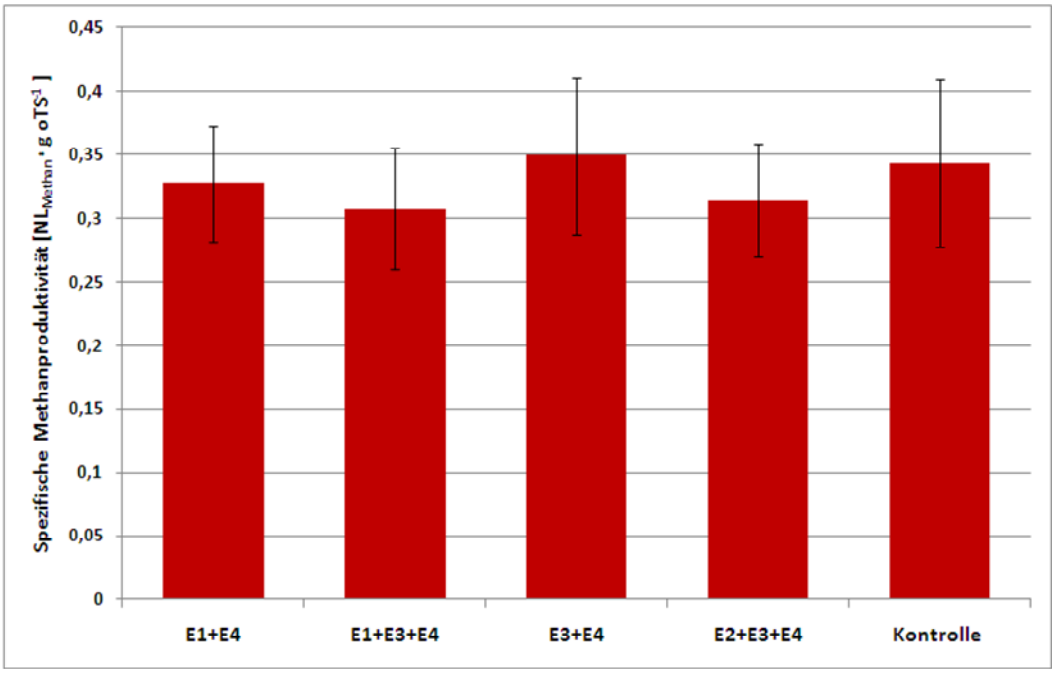


Abbildung 18: Spezifischer Methanertrag bei Zusatz unterschiedlicher Enzymcocktails

3.1.1.3 Diskussion

In einer Vielzahl von Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Zusatz spezifischer Enzyme oder Enzymmischungen den Biogas- bzw. Methanertrag steigern kann. Einige Referenzen hierzu sind in Kapitel 1.2.2.1.1 genannt. Schimpf und Valbuena (2009) stellten vor, dass mit Enzymzusatz und einer Verweilzeit von 65 d ein Methanmehrertrag von 13 % mit Roggensilage und 15 % mit Maissilage erzielt werden kann. Die meisten Untersuchungen wurden im Batchansatz durchgeführt, der in der Prozesskinetik nicht unbedingt mit einem Durchflusssystem vergleichbar ist. Die Ergebnisse stellen daher potentielle Werte dar, die im Durchfluss evaluiert werden sollten, bevor solche Prozesshilfsstoffe in den Einsatz in Biogasanlagen gelangen.

In den eigenen Untersuchungen wurde eine Kombination aus Cellulase + Amylase (E2) sowie aus Cellulase + Amylase + β-Galaktosidase (E3) in empfohlener Dosierung getestet.

Im mesophilen Durchflussbetrieb mit Maissilage ergab sich eine leichte Steigerung des spezifischen Methanertrags um etwa 8 - 10%. Hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass sich der Prozess infolge Kobaltmangel am Beginn einer Versäuerung befand (s. 3.1.2.1.1, 3.1.1.1). Obwohl versucht wurde, nur Daten aus symptomfreiem Zustand zu verrechnen, ist ein Einfluss auf die Ergebnisse nicht auszuschließen.

Ein verbesserter Abbau von Cellulose, Hemicellulose oder Lignin war nicht festustellen. Eine hohe proteolytische Aktivität im Fermenter könnte die zugegebenen Enzyme schnell verdaut und ihnen nur eine kurze Wirkungszeit gewährt haben. Hierzu kann auch der im Rührkesselsystem ausgeprägte Kurzschlussstrom beigetragen haben. Die tatsächliche Verweilzeit ist hier kürzer als die hydraulische Verweilzeit (Effenberger et al., 2006). Weiterhin ist zu bedenken, dass die Biogasbildung in den Fermentern bereits ohne Enzymzusatz ziemlich effizient war (70 – 75 % des zugeführten Kohlenstoff wurden im Versuchszeitraum in die Gasphase überführt, nicht dargestellt) und somit auch kaum eine deutliche Verbesserung durch die zugesetzten Enzyme erwartet werden konnte.

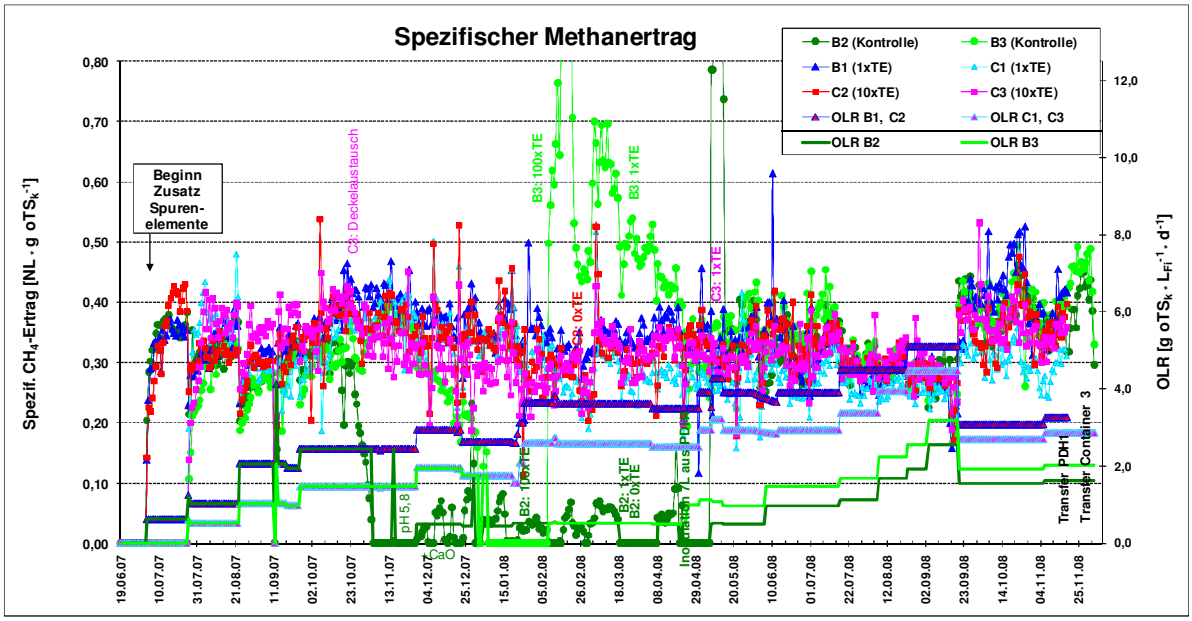
Im thermophilen Durchlussbetrieb wurden vier verschiedene Kombinationen der Enzymsuspensionen mit Maissilage getestet. Hier konnte eine allenfalls marginale Verbesserung des spezifischen Methanertrags registriert werden. Zur richtigen Einordnung des Befundes gilt im Wesentlichen das oben Gesagte, mit dem Unterschied, dass der thermophile Prozess noch effizienter verlief als der mesophile im Testzeitraum und dass in der thermophilen Testphase kein Anhalt für eine unterliegende Prozessversäuerung gegeben war.

3.1.2 Langzeitstabiler Prozess: Zusatz von Spurenelementen

3.1.2.1 Maissilage in mesophiler Monovergärung

3.1.2.1.1 Durchflussbetrieb

Nach der Versäuerung der 6 mesophilen Mais-mono-Fermenter im Zeitraum April – Juni 2007 (Abbildung 11, „erste Versäuerung“) wurden die Fermenter zum Abbau der angestauten Säuren nicht gefüttert, mit unterschiedlichen Mengen (Kontrolle, 1x, 10x, 100x) eines eigenständig definierten Spurenelementcocktails (TE, Lebuhn et al., 2008; Tabelle 7) versorgt und am 2.7. (Fermenter B1, B2, C2) bzw. 26.7.2007 (Fermenter B3, C1, C3) wieder angefahren.



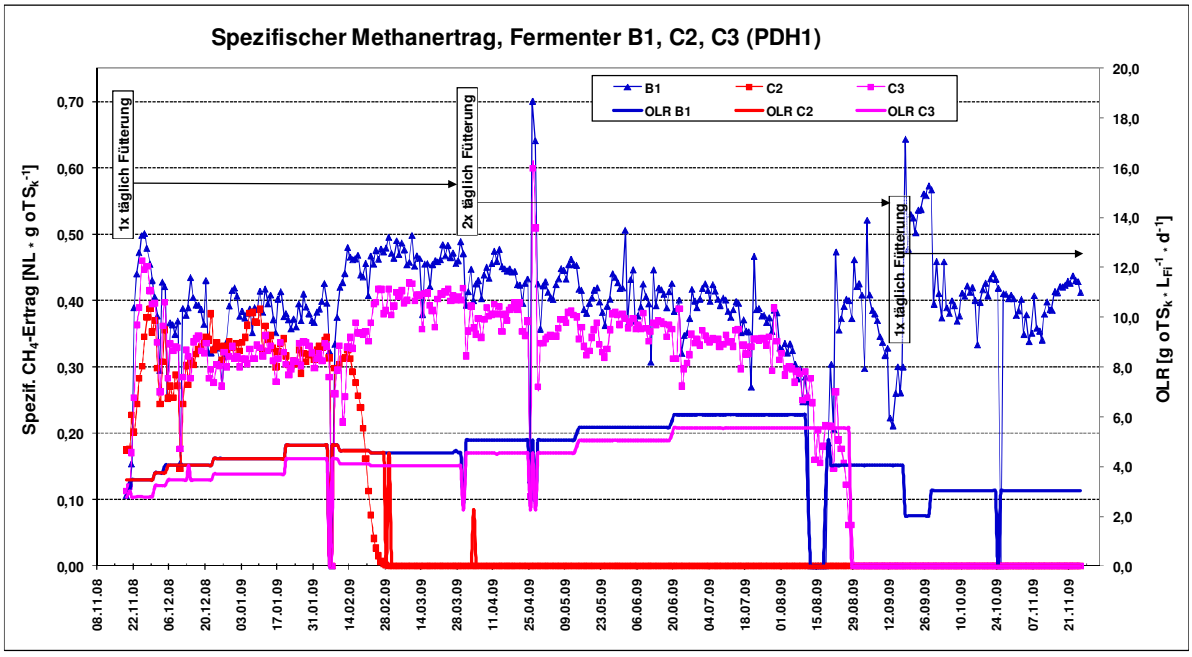
Fermenter B1 und C1 wurden im dargestellten Zeitraum durchgängig mit 1x TE versorgt,
Fermenter C2 und C3 wurden bis zum 3.3. bzw. 1.5.2008 mit 10x TE versorgt, C3 danach mit 1x TE
Fermenter B2 erhielt mehrfach im Zeitraum 14.11.2007 – 3.3.2008 100x TE.
Fermenter B3 erhielt vom 7.2. – 3.4.2008 100x und danach 1x TE.

Abbildung 19: Einfluss des Spurenelementzusatzes (TE, trace elements) auf den Methanertrag aus Maissilage in mesophiler Mono-Vergärung

Während der Prozess in den nicht-suplementierten Kontrollen (B2, B3) bald wieder zusammenbrach, waren die TE-versorgten Fermenter langzeitstabil (Abbildung 19). Ab Februar 2008 wurden die Kontrollen teilweise auch mit TE-Zusatz betrieben (Abbildung 19), um sie zu stabilisieren. Während Fermenter B3 mit 100x TE etwa 2 Monate später trotz noch relativ hoher Säuregehalte (5.2.2008: FOS/TAC 0,96; 3,7 g Propionsäure L^{-1}; 1 g Essigsäure L^{-1}) er-

folgreich wieder angefahren werden konnte, war dies mit Fermenter B2 erst 6 Monate später wieder möglich (Abbildung 19). Ursache dafür war wohl die besonders starke Versäuerung (pH-Wert teilweise 5,5), die nur mit wiederholter Kalkung kompensiert werden konnte. Auch wiederholter TE-Zusatz konnte den Fermenter in dieser Periode nicht reaktivieren. Fermenter B2 wurde daher im Zeitraum 18.4. – 24.4. 2008 mit insgesamt 7 L Inhalt eines methanogenen Fermenters aus 2-phasigem Betrieb (s. 2.1.1.5) aus PDH4 versorgt. Möglicherweise wäre dies aber nicht nötig gewesen, da die molekularbiologischen Analysen eine Erholung der Methanogenen Ende Februar 2008 andeuteten (Abbildung 62, 25.2.2008). Diese Ergebnisse standen aber zur Versuchszeit noch nicht zur Verfügung. Ab 7.5. konnte auch Fermenter B2 erfolgreich wieder angefahren werden (Abbildung 19).

Abbildung 20 zeigt die Entwicklung des spezifischen Methanertrags der Fermenter B1, C2 und C3 nach dem Transfer in liegende 35 L Fermenter (Abbildung 9) in Pultdachhalle 1 (PDH1) im November 2008. Mit diesem Transfer wurde versucht, die Leistung zu steigern, da die Gabelrührwerke der stehenden 32 L Fermenter die hohen organischen Raumbelastungen (OLR) von über 4 g oTS $L^{-1} * d^{-1}$ und die hohen TS-Gehalte von über 12 % im Fermenter teilweise nicht mehr bewältigen konnten und ausfielen. Die Fermenter B2, B3 und C1 verblieben im Container C3 in den stehenden Fermentern (Abbildung 21). Während in diesen Fermentern höchstens eine OLR von 4 g oTS $* L^{-1} * d^{-1}$ mit einem spezifischer Methanertrag (sME) von knapp 0,4 NL $*$ g oTS^{-1} erzielt wurde, konnte in den liegenden Fermentern ein sME von teilweise über 0,4 NL $*$ g oTS^{-1} bei einer OLR von 6 g oTS $* L^{-1} * d^{-1}$ und TS Gehalten von 15 % erreicht werden (Abbildung 20).



Fermenter B1 und C3 wurden im dargestellten Zeitraum durchgängig mit 1x TE versorgt, Fermenter B1 zusätzlich vom 19.8. – 23.8.2009 mit einer 100x und vom 24.8. – 15.9.2009 mit einer 10x Co-Lösung.
Fermenter C2 erhielt im dargestellten Zeitraum keinen TE-Zusatz.

Abbildung 20: Spezifischer Methanertrag aus Maissilage in mesophiler Mono-Vergärung (liegende Fermenter in PDH1)

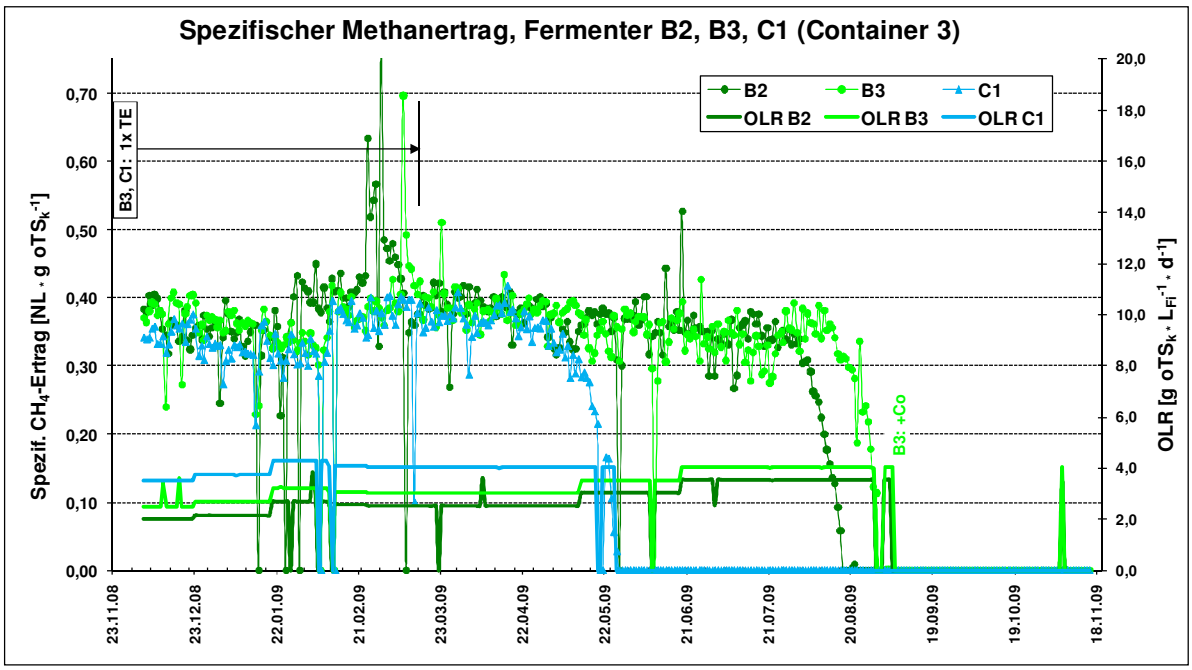


Abbildung 21: Spezifischer Methanertrag aus Maissilage in mesophiler Mono-Vergärung (stehende Fermenter in Container 3)

Auffallend waren in Abbildung 20 und Abbildung 21 der Zusammenbruch der Methanogenese im nicht TE-versorgten Fermenter C2 bereits Anfang Februar 2009, in Fermenter C1 im Juni 2009 und in Fermentern C3, B2 und B3 im August 2009. Nur Fermenter B1 konnte, allerdings mit starken Störungen im August 2009, bis zum Versuchsende mit guter spezifischer Methanproduktion (ca. 0,4 NL * g oTS^{-1}) weiterbetrieben werden.

Die Symptome Leistungszusammenbruch mit Prozessversäuerung wiesen auf eine Inhibierung primär der Methanogenese hin. Wenn in den vorhergehenden Prozessen Säuren gebildet, diese aber durch die Methanogenen nicht mehr abgebaut werden, entsteht das beobachtete Szenario mit „Säurestau“. Die molekularbiologischen Ergebnisse stützen diese Diagnose (s. 3.2).

Den bisherigen Erkenntnissen der Mikrobiologie zufolge benötigen die methanogenen Archaeen insbesondere Co, Ni, Mo, Na und Se für ihre Funktion, während W anscheinend nur für bestimmte *Methanococci* von Bedeutung ist (Blaut, 1994; Deppenmeier et al., 1999; Ferry, 1999). Auf diese Elemente konzentrierten sich daher unsere Untersuchungen. Effekte von W wurden nicht weiterverfolgt, da W-Mangel über Koinzidenzen in den Zeitreihenanalysen nicht zu plausibilisieren war. Zudem konnten in den Fermentern keine *Methanococci* nachgewiesen werden (s. 3.2.2.2). Auch für Mo, Se und Ni konnte kein Anhalt für eine monokausale Mangelsituation zu irgendeinem Zeitpunkt gefunden werden. Beispielsweise lagen Ni-Gehalte zum Zeitpunkt von Prozessinhibierung und Versäuerung meist höher als zu gutem Regelbetrieb (Abbildung 23, Abbildung 25). Unser Hauptfokus lag daher in Untersuchungen zu Kobalt und Natrium.

Der erste Prozesszusammenbruch aller 6 Fermenter etwa im März 2007 war wohl primär auf Co-Mangel zurückzuführen. Hier wurden Co-Gehalte von 0,01 – 0,025 mg * kg FM^{-1} gemessen. Abbildung 22 zeigt dies exemplarisch für Fermenter B1 und Abbildung 24 für Fermenter C2. Die Ni-Gehalte lagen mit 1,3 – 3,0 mg * kg FM^{-1} dagegen wie auch die Mo-Gehalte (0,12 – 0,14 mg * kg FM^{-1}) deutlich in einem unkritischen Bereich. Die Se-Gehalte lagen zwar mit 0,015 – 0,12 mg * kg FM^{-1} (für Fermenter B2 wurde 0,004 mg * kg FM^{-1} erhalten), allerdings

ergaben sich beispielsweise am 23.10.2008 für Fermenter C1 und C2 bei gutem Betrieb (Abbildung 19) nur ca. 0,002 mg Se * kg FM^{-1}). Ein monokausaler Se-Mangel war damit nich plausibel darzustellen, der Schwellenwert für einen Selen-Mangel sollte aber den Ergebnissen zufolge unter 0,002 mg Se * kg FM^{-1} liegen. Die Na-Gehalte wurden erst ab 3.12.2007 in den mesophilen Mais-mono-Fermentern gemessen, sie lagen aber mit 60 – 100 mg * kg FM^{-1} so hoch, dass kein Na-Mangel für den ersten Prozesszusammenbruch verantwortlich gewesen sein kann. Demzufolge wird ein Schwellenwert von etwa 0,03 mg Co * kg FM^{-1} festgemacht, dessen Unterschreitung wohl im Wesentlichen den ersten Prozesszusammenbruch verursacht hatte.

Im Gegensatz dazu konnte der Zusammenbruch im Sommer 2009 nicht allein mit Co-Mangel begründet werden, da der Schwellenwert von etwa 0,03 mg Co * kg FM^{-1} trotz absinkender Konzentration nicht erreicht wurde. Abbildung 22 zeigt dies exemplarisch für Fermenter B1 und Abbildung 24 für Fermenter C2. Das Absinken der Co-Konzentration ab Mitte Februar 2009 trotz fortgesetztem 1x TE-Zusatz (Abbildung 22) lässt sich damit begründen, dass hier die Maissilage-Charge gewechselt wurde, und die neue Silage mit 0,0039 mg Co * kg FM^{-1} nur noch 1/3 der Co-Gehalte zuvor gefütterten Silagen aufwies (vgl. Abbildung 36).

Die Analysen auf Natrium ergaben, dass hier ein Schwellenwert von etwa 10 mg Na * kg FM^{-1} unterschritten wurde (Fermenter B1, C2: Abbildung 23, Abbildung 25). Na^+ wurde ja nicht in nennenswerten Mengen mit dem TE-Cocktail (Tabelle 7) zugesetzt. Fermenter C1 wies in der zweiten Versäuerung etwa 8,6 mg und Fermenter C3 etwa 5,9 mg Na^+ * kg FM^{-1} auf. Fermenter B2 und B3, für die im Spätsommer 2009 ja schon die dritte Versäuerung vorlag, wiesen hier Na-Gehalte von 9,2 bzw. 7,3 mg Na^+ * kg FM^{-1}auf.

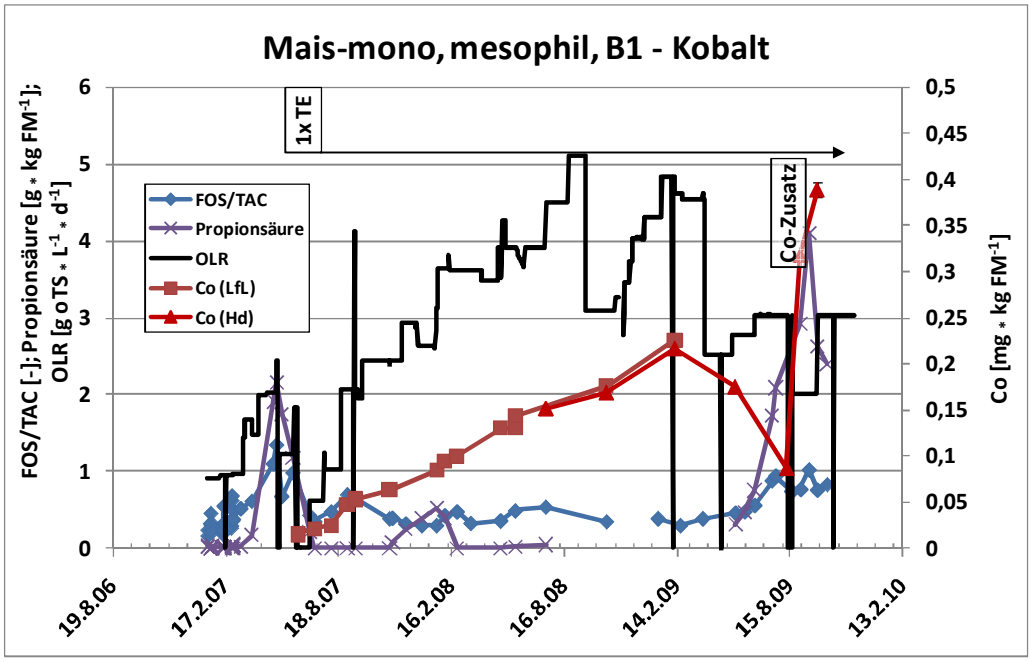


Abbildung 22: Entwicklung der OLR, der Kobalt- und Propionsäuregehalte, und des FOS/TAC im Fermenter B1

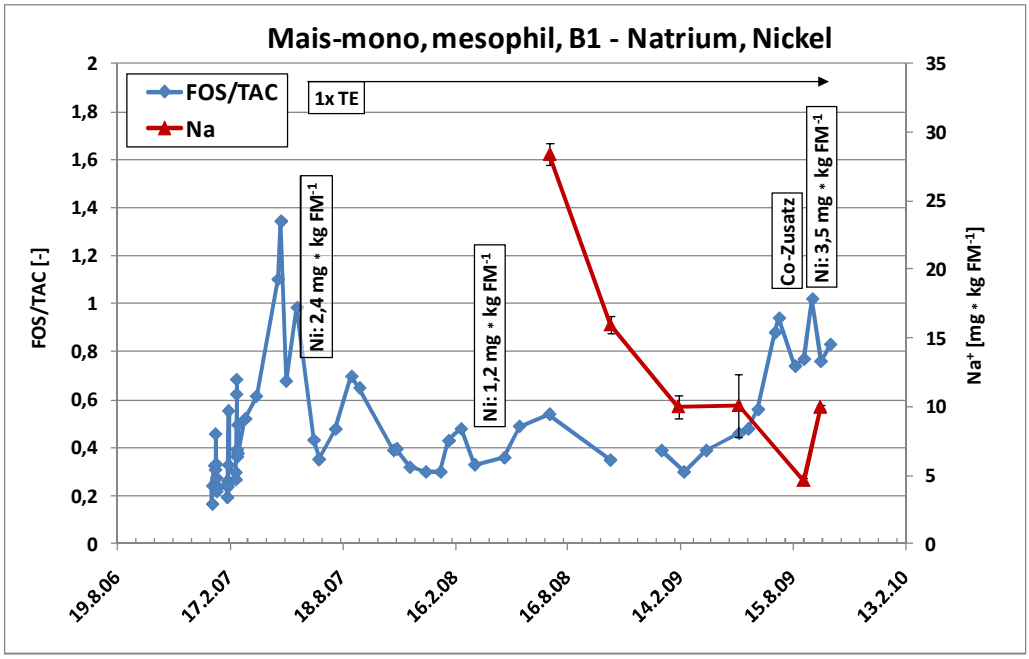


Abbildung 23: Entwicklung der Natrium- und Nickel-Gehalte und des FOS/TAC im Fermenter B1

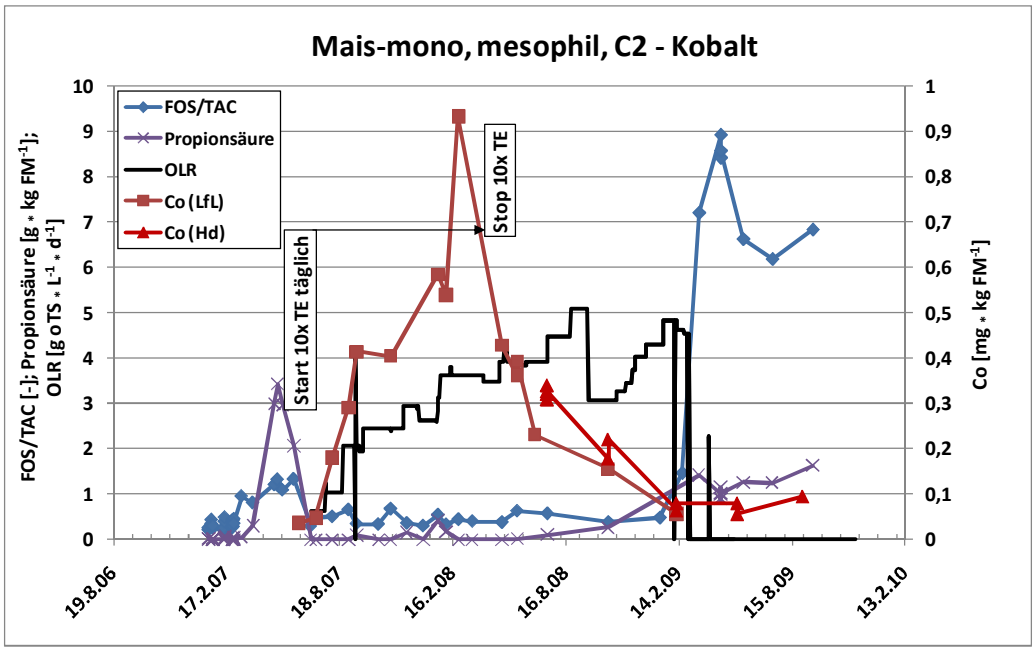


Abbildung 24: Entwicklung der OLR, der Kobalt- und Propionsäuregehalte, und des FOS/TAC im Fermenter C2

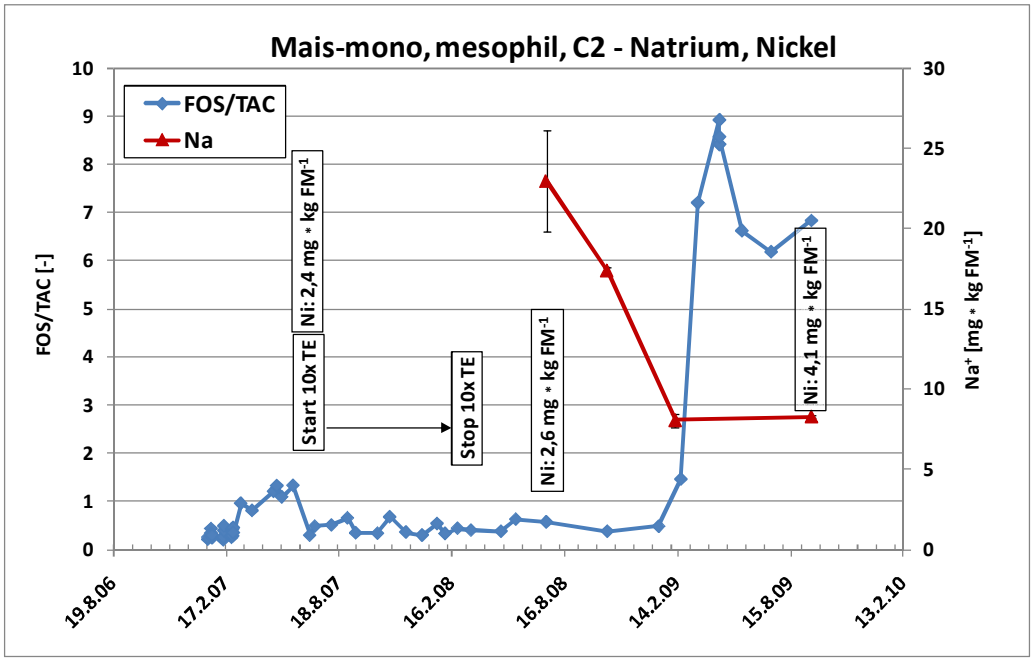


Abbildung 25: Entwicklung der Natrium- und Nickel-Gehalte und des FOS/TAC im Fermenter C2

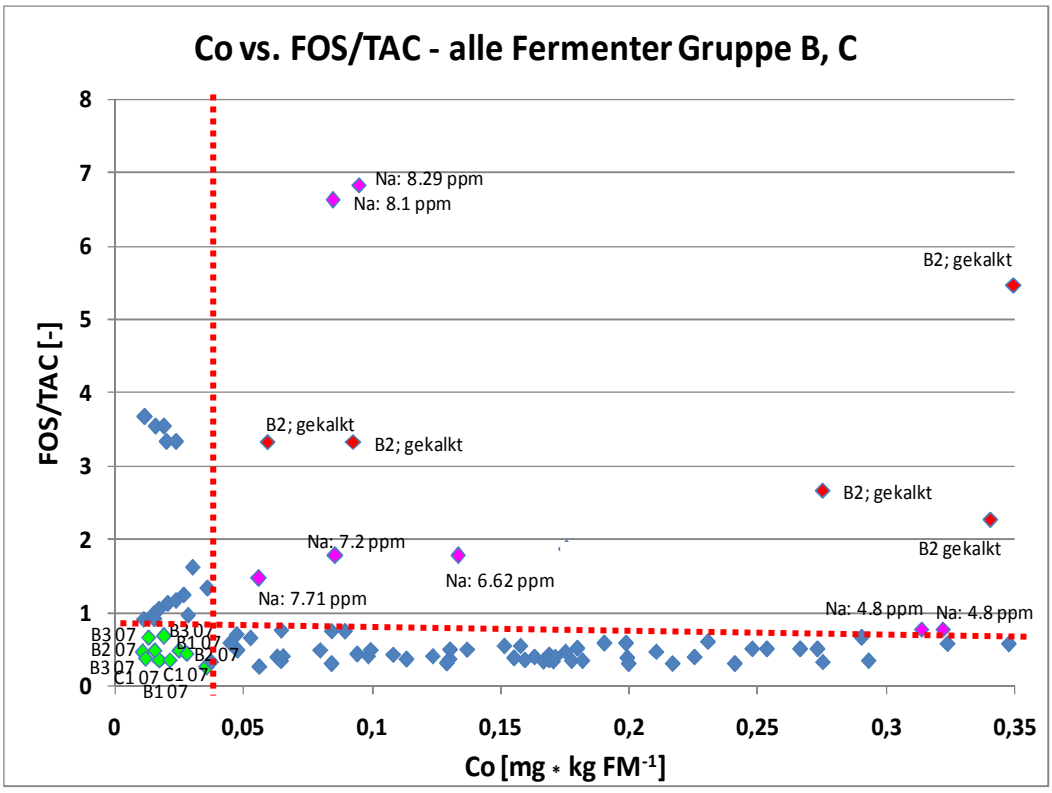


Abbildung 26: Verteilung der FOS/TAC-Verhältnisse bei unterschiedlichen Kobaltkonzentrationen

Eine Gegenüberstellung der gemessenen Kobaltkonzentrationen mit den FOS/TAC-Werten ergab, dass hohe (> 0,7) FOS/TAC-Werte immer bei Co-Gehalten unter etwa 0,03 oder Na^+-Gehalten unter etwa 10 mg * kg FM^{-1} gemessen wurden (Abbildung 26, blaue und rosa Rau-

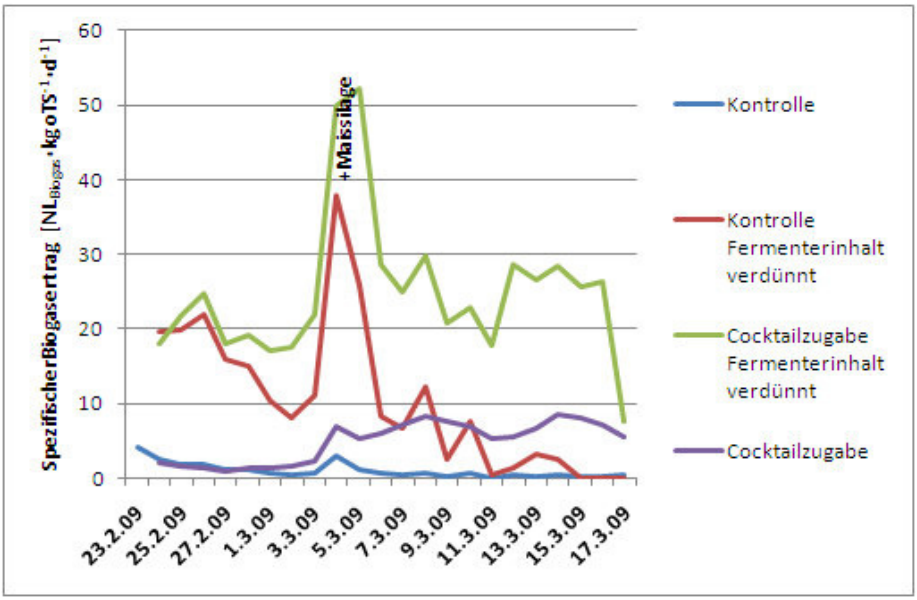
ten). Die hohen FOS/TAC-Werte bei hohen Co- (und Na-) Gehalten (Fermenter B2, rote Rauten in Abbildung 26) lassen sich durch die Kalkung erklären, die Fermenter B2 in der zweiten Versäuerung erfuhr. Hier wurde wahrscheinlich Co mit dem technischen Löschkalk zugeführt.

Niedrige FOS/TAC-Werte bei Kobaltkonzentrationen unter 0,03 mg * kg FM^{-1} konnten nur in den Proben nach der ersten Aushungerungsphase beobachtet werden (Abbildung 26, grüne Rauten), die ja die Senkung des FOS/TAC unter 0,6 bewirkte (Abbildung 11). Hierdurch wird deutlich, dass bei ausschließlicher Fütterung mit Maissilage bei der gegebenen Silagequalität primär mit einem Mangel an Kobalt und sekundär mit einem Na-Mangel zu rechnen ist. Allerdings sollte die Reihenfolge von Mangelerscheinungen stark von den Spurenelementgehalten in den Silagen abhängen.

Vor dem Hintergrund, dass Fermenter B3 etwa 2 Monate nach der ersten Versäuerung trotz noch relativ hoher Säuregehalte (5.2.2008: FOS/TAC 0,96; 3,7 g Propionsäure L^{-1} mit 100x TE wieder in stabilen Betrieb überführt werden konnte, jedoch nicht Fermenter B2, sollte die Möglichkeit des Wiederanfahrens aus einer Prozessversäuerung in Batchversuchen näher untersucht werden. Gleichzeitig sollte die beobachtete Prozesserholung durch Kobaltzusatz verifiziert werden.

3.1.2.1.2 Batchversuche

Im ersten Ansatz (Abbildung 27) wurde getestet, ob der Wiederanfahrbetrieb durch die Zugabe des Spurenelementcocktails (Tabelle 7, Fußnote zu Abbildung 27) bzw. durch Verdünnung auch im Batchversuch verbessert werden kann. Dazu wurde ein Inokulum aus dem Fermenter C2 vom 20.2.2009 verwendet. Nachträglich wurden in Fermenter C2 am 10.2.2009 relativ geringe Gehalte von Kobalt (0,075 mg * kg FM^{-1}) und Selen (0,009 mg * kg FM^{-1}) sowie sehr geringe Natriumgehalte (8 mg * kg FM^{-1}) gemessen. Der am 19.2.2009 gemessene FOS/TAC-Wert betrug 1,5.



Die Berechnung auf NL * kg oTS^{-1} * d^{-1} bezieht sich auf die im Inokulum gemessene oTS bzw. ab 4.3.2009 auf die oTS incl. Fütterung. Der Zusatz des TE-Cocktails betrug 1 mL.

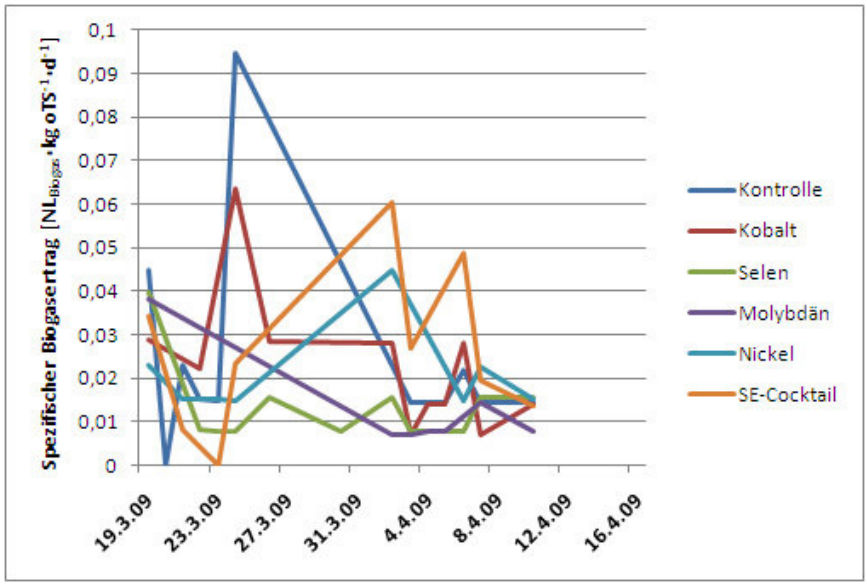
Abbildung 27: Spezifischer Biogasertrag bei Zugabe des Spurenelementcocktails nach einer Aushungerungsphase (Fermenter C2, versäuert, Batch)

Vor dem Batchtest wurde das entnommene Inokulum teilweise mit Wasser 1:1 verdünnt um die Konzentration der Säuren zu erniedrigen (Abbildung 27). Zwischen dem 23.2.2009 und 4.3.2009 wurden die Fermenter ausgehungert um Fettsäuren abzubauen. Am 4.3.2009 wurden 8 g oTS Maissilage (Raumbelastung ca. 4 g oTS $*$ L_{Fi}^{-1}) hinzugegeben und der TE-Zusatz wiederholt.

Bei den verdünnten war gegenüber den unverdünnten Proben ein erhöhter Biogasertrag zu erkennen. Dementsprechend wurde auch in der Praxis beobachtet, dass Verdünnung eine Maßnahme sein kann, die Konzentration und Wirkung von Inhibitoren zu verringern. In der Folge lag das Leistungsniveau mit TE-Cocktailzusatz und insbesondere nach der Fütterung mit Maissilage höher (Abbildung 27). Dies unterstreicht die im Durchflussbetrieb (3.1.2.1.1) beobachtete prozessunterstützende Wirkung des Spurenelementzusatzes.

Im nächsten Versuch (Abbildung 28) sollte untersucht werden, ob spezifische Zudosierung einzelner Spurenelemente ebenfalls die Prozessinhibierung aufheben konnte. Der Anfahrversuch im Batchbetrieb wurde unter Zugabe (jeweils 1 mL, Tabelle 7) der Elemente Kobalt, Selen, Molybdän, Nickel und dem Spurenelementcocktail durchgeführt. Der Silagezusatz (8 g oTS) entsprach einer Raumbelastung 4 g oTS $*$ L_{Fi}^{-1}. Für den Versuch wurde Inokulum aus dem Fermenter C2 vom 18.3.2009 verwendet. Der Prozess im war aber mit einem FOS/TAC-Wert von 7,2 und hohen Gehalten an Essigsäure (11 g $*$ kg FM^{-1}), Buttersäure (6,7 g $*$ kg_{FM}^{-1}) und Propionsäure (1,4 g $*$ kg FM^{-1}) vollkommen zusammengebrochen. Wie sich später herausstellte, lag der Co-Gehalt Mitte Februar 2009 bei 0,07 und der Na^+-Gehalt bei 8 mg $*$ kg FM^{-1}.

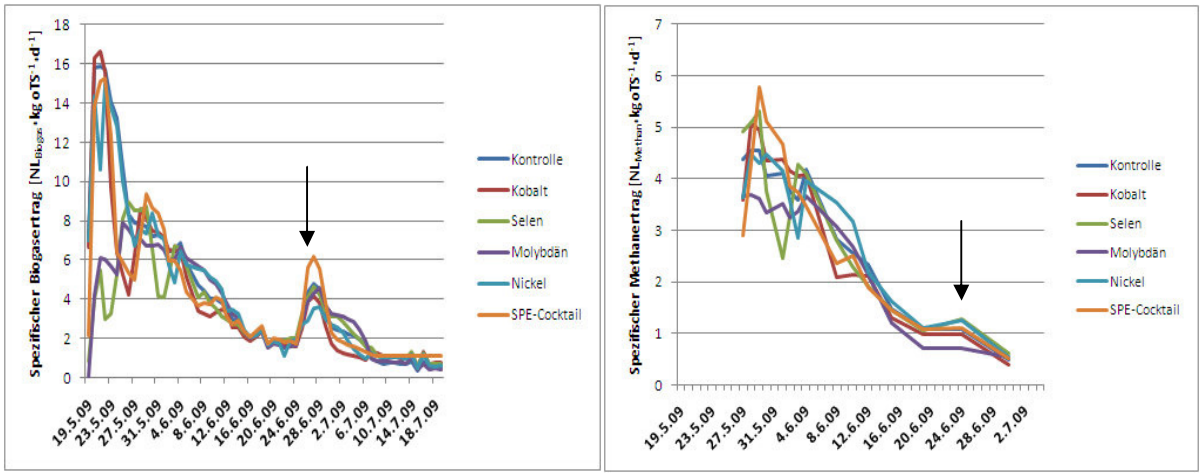
In keiner der Behandlungen konnte eine nennenswerte Biogasproduktion gemessen werden. Vermutlich war Natrium, das hier in Ermangelung der letzten Erkenntisse aus dem Durchflussbetrieb noch nicht zugesetzt wurde, primär limitierend, möglicherweise hatte aber auch die Versäuerung hier einen Inhibierungsgrad erreicht, der keine schnelle Prozesserholung mehr zuließ. Die gleiche Symptomatik wurde im stark versäuerten Fermenter B2 im Durchflussbetrieb beobachtet (3.1.2.1.1, zweite Versäuerung).



Die Berechnung auf NL $*$ kg oTS^{-1} $*$ d^{-1} bezieht sich auf die im Inokulum plus Silage gemessene oTS

Abbildung 28: Wirkung von Spurenelementzusatz auf den Biogasertrag (Fermenter C2, Batch)

Für einen weiteren Versuch (Abbildung 29) wurde Fermenter C1 gewählt, der wegen seines etwas niedrigeren FOS/TAC Werts im Mai 2009 von 1,7 eine mäßigere Prozessinhibierung vermuten ließ. Nachfolgende Messungen ergaben allerdings einen Propionsäuregehalt von 2,6 g * kg FM^{-1}, und Iso-Valeriansäure lag bei 985 mg * kg FM^{-1}. Zunächst wurde das Inokulum vom 19.5.2009 bis zum 25.6.2009 ausgehungert. Jeweils 1 mL der angegebenen Spurenelemente bzw. des Cocktails (Tabelle 7) wurden zugesetzt. Am 26.6.2009 erfolgte eine Zugabe von 8,9 g Maissilage und ein nochmaliger TE-Zusatz.



Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt des Maissilage-Zusatzes.
Die Berechnung auf NL * kg oTS^{-1} * d^{-1} bezieht sich auf die im Inokulum bzw. im Inokulum plus Silage gemessene oTS

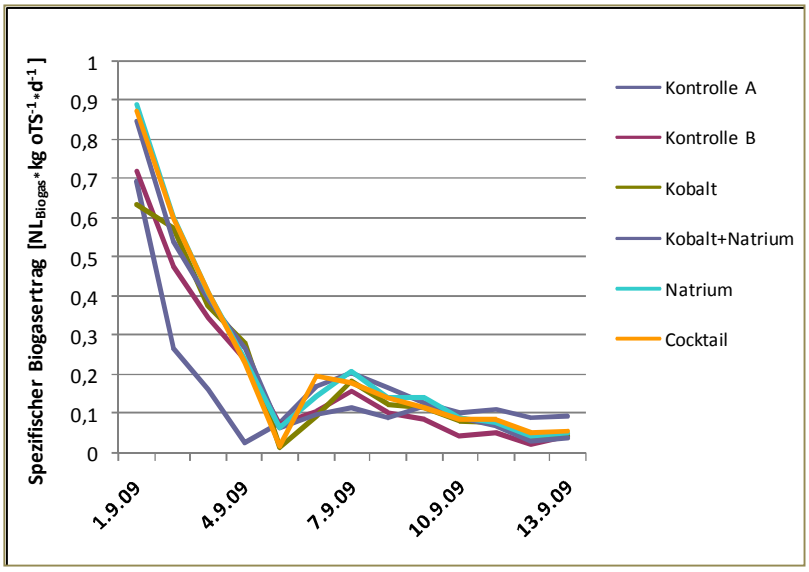
Abbildung 29: Spezifischer Biogas- (links) und Methanertrag (rechs) bei Zugabe unterschiedlicher Spurenelemente nach der Aushungerungsphase (Fermenter C1, Batch)

Der Verlauf der (geringen) Biogasproduktion war bei allen Behandlungen ähnlich. Eine Wirkung der einzelnen Spurenelemente konnte damit nicht gezeigt werden. Co sollte mit 0,1 mg * kg FM^{-1} nicht prozesslimitierend gewesen sein. Die später bestimmte Konzentration von Natrium im verwendeten Inokulum war mit 7,2 mg * kg FM^{-1} sehr niedrig. Wahrscheinlich war die Natriumkonzentration der limitierende Faktor für die Prozessaktivität. Analog zu den Biogaserträgen verlief auch der Methanertrag (Abbildung 29).

In einem weiteren Versuch wurde das Inokulum aus dem stark versäuerten Fermenter C3 (FOS/TAC 3,5, Iso-Valeriansäure 1.801 mg * kg FM^{-1}, Essigsäure 7.425 mg * kg FM^{-1}, Iso-Buttersäure 805 mg * kg FM^{-1}) entnommen. Im Batchtest wurde der Zusatz (Tabelle 7) von Kobalt allein (6 mL), von Kobalt und Natrium (6 mL + 600 µL), von Natrium allein (600 µL) sowie der Zusatz des Spurenelementcocktails (6 mL) gegenüber zwei Kontrollen geprüft (Abbildung 30). Eine Aushungerung vor dem Silagezusatz (8,9 g oTS; OLR 4 g oTS^{-1} * L^{-1}) fand nicht statt. Nachträglich wurden zwar ausreichende Co-Gehalte (0,12 mg * kg FM^{-1}) aber nur sehr geringe Na^+-Gehalte (4,4 mg * kg FM^{-1}) ermittelt.

Der spezifische Biogasertrag betrug weniger als 1 NL_{Biogas} * kg oTS^{-1} * d^{-1}. Ein Unterschied zwischen den Behandlungen konnte nicht ermittelt werden. Offenbar war auch hier die Prozessversäuerung zu stark fortgeschritten, und die Inhibitoren waren bereits zu konzentriert. Möglicherweise hätte ein vorgeschalteter Abbau der Säuren auf einen FOS/TAC um etwa 1,5

zum Abbau der Inhibitoren eine Wirkung der Varianten mit Natrium ergeben. Weitere Untersuchungen konnten zur Lösung dieser Frage nicht mehr durchgeführt werden.

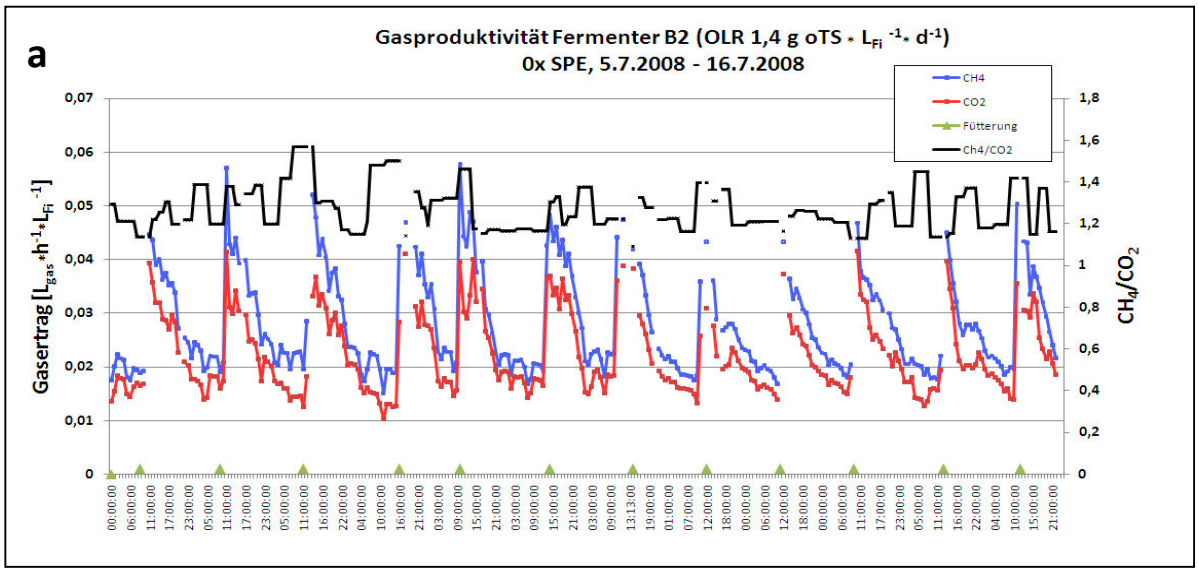


Die Berechnung auf NL * kg oTS^{-1} * d^{-1} bezieht sich auf die im Inokulum plus Silage gemessene oTS

Abbildung 30: Spezifischer Biogasertrag nach Zugabe verschiedener Spurenelemente (Batch)

3.1.2.2 Dynamik der Substratumsetzung

Bei Versäuerung war die Biogasproduktion gegenüber Regelbetrieb qualitativ verschieden (Abbildung 31). Im Regelbetrieb (Abbildung 31a) zeigte sich nach der Fütterung eine deutlich stärkere Zu- und Abnahme sowie ein länger anhaltendes Maximum der Biogasproduktion, was auf eine schnelle und intensive Umsetzung des zugeführten Substrats hindeutet.



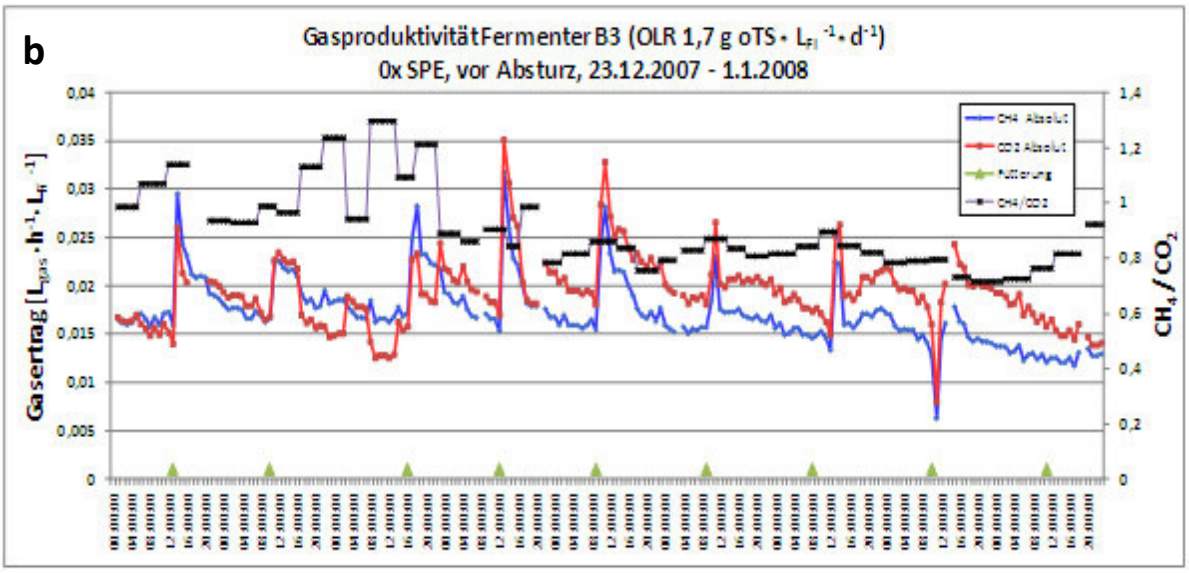


Abbildung 31: Vergleich der Gasproduktivitäten zweier Fermenter Mais-mesophil. a: Verlauf der Gasproduktivität bei gutem Betrieb. b: Fermenter im Übergang zur Versäuerung

Bei Fermenter B3, der sich in Abbildung 31b im Prozess der Versäuerung befand, war dies bereits mehrere Tage vor dem Einbruch der Gasproduktion nicht mehr der Fall. Neben der für Prozessstörungen typischen reduzierten Methankonzentration ergab sich eine Nivellierung der Biogasproduktion auf niedrigerem Niveau innerhalb eines Fütterungsintervalls. Dies beruht wahrscheinlich auf dem Anstau von nicht abgebauten Fettsäuren und möglicherweise anderen Prozessinhibitoren und hat schließlich einen reduzierten Substratabbau zur Folge.

3.1.2.3 Maissilage thermophil

Für die Versuche im thermophilen Betrieb (Fermenter A an LfL-ILT und Fermenter F an TUM-SWW), wurde aus den mesophil gefahrenen 32 L Fermentern von LfL-ILT Substrat entnommen und anschließend die Temperatur langsam erhöht (Abbildung 48, Abbildung 49). Die Verläufe der Gasproduktion sind im Kapitel 3.2.1.1 dargestellt. Wie aus Abbildung 48 und Abbildung 49 ersichtlich ist, konnte ein stabiler Betrieb aufrecht erhalten werden.

Die Spurenelementkonzentrationen von Kobalt lagen in den 32 L Fermentern A1 – A3 zwischen 0,034 und 0,10 mg * kg FM^{-1}, die Konzentrationen von Nickel und Selen lagen zwischen 0,67 und 2,86 beziehungsweise 0,02 und 0,03 mg * kg FM^{-1} und die von Na^+ lag über 90 mg * kg FM^{-1}. Da gleichzeitig mit ca. 0,4 NL CH_4 * g oTS^{-1} ein guter spezifischer Methanertrag (sME) erhalten wurde (Abbildung 49) und die FOS/TAC-Werte bis Versuchsende Ende Januar 2008 im Bereich bis 0,4 bewegten, konnte trotz der teils niedrigen Kobalt-Konzentration keine Prozesslimitierung durch Co-Mangel festgestellt werden.

Interessanterweise lagen die Co-Gehalte in den thermophil mono-Mais-betriebenen Fermentern F (6 L, TUM-SWW) bis zur initialen 2 mL TE-Supplementierung (Tabelle 7) am 24.4.2008 mit abnehmender Tendenz im Bereich 0,026 – 0,048 mg * kg FM^{-1}. Entsprechend gingen die FOS/TAC-Werte von etwa 0,9 auf unter 0,3 und die Propionsäuregehalte von etwa 1 g * kg FM^{-1} auf unter 50 mg * kg FM^{-1} zurück. Obwohl dies deutliche Anzeichen für einen Stress zu Versuchsbeginn waren, konnten keine Zeichen für eine Inhibierung der Methanogenese erkannt werden. Der sME bewegte sich zwischen 0,3 und 0,4 NL CH_4 * g oTS^{-1} (Abbildung 48).

Nach dem 24.4.2008 wurden den Fermentern F1 – F6 100 µL TE täglich mit der Silage bis zum Versuchsende am 25.3.2009 zugeführt. Entsprechend ergaben sich bei den Spurenelementgehalten keine auffällig niedrigen Werte. In dieser Periode fanden die Untersuchungen zum Zusatz von Enzymen statt. Abbildung 17 zeigt die spezifischen Methanerträge. Bis zum Versuchsende bewegte sich der sME im Bereich 0,3 - 0,4 NL CH_4 * g oTS^{-1}.

3.1.2.4 Grassilage mesophil

Die Fermenterinhalte, mit denen die semikontinuierlich betriebenen 6 L Reaktoren an TUM-SWW (Abbildung 2) angefahren wurden, stammten aus den Versuchen des „Biogas Crops Network“ an LfL-ILT (Andrade et al., 2009a; 2009b). Die Reaktoren wurden täglich mit Grassilage gefüttert und manuell geschüttelt. Abbildung 32 zeigt die Entwicklung des spezifischen Methanertrags (sME).

Mit autoklaviertem Fermenterinhalt (F1, F2 in Abbildung 32) wurde praktisch kein Methan produziert. Hierauf wird im Kapitel „Inokulation mit cellolytischen Inokula, Grassilage in mesophiler mono-Vergärung“ (3.2.1.3) näher eingegangen.

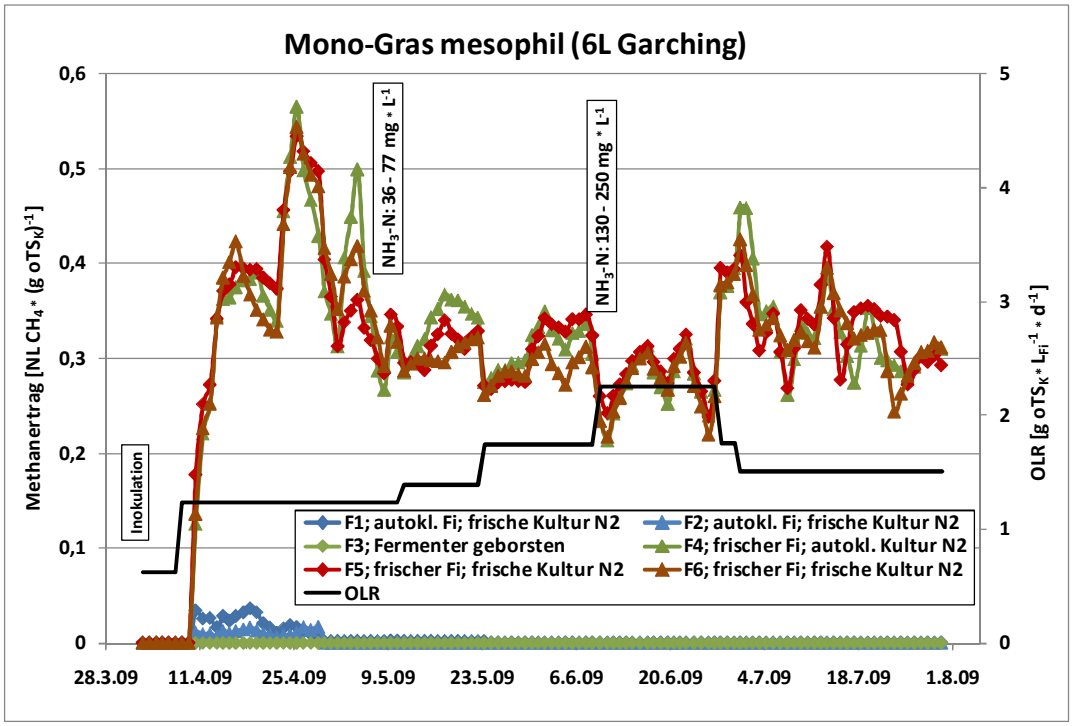


Abbildung 32: Spezifischer Methanertrag aus Grassilage in mesophiler Mono-Vergärung (Fermenter F1 – F6, TUM-SWW) und organische Raumbelastung

Auffällig waren die großen Schwankungen des sME in den 6 L Reaktoren, die teilweise auch im diskontinuierlichen manuellen Betrieb eine Ursache haben. Weiterhin konnte die organische Raumbelastung (OLR) nicht ohne Einbruch der sME über 2 g oTS * L_{Fi}^{-1} * d^{-1} gesteigert werden. Die Labilität des Prozesses fand aber nicht in den Die FOS/TAC-Werte waren mit 0,31 – 0,56 am 8.5.2009 und 0,30 – 0,33 am 9.6.2009 unauffällig, und auch die Propionat-Gehalte deuteten mit 0 – 228 bzw. 0 – 60 mg * L^{-1} keine Prozessversäuerung an. Dies ist in Zusammenhang mit dem Anstieg der pH-Werte von 7,3 – 7,6 auf 7,7 – 8,0 in diesem Zeitraum und damit verbunden dem Anstieg des (errechneten) freien Ammoniakgehalts

(Abbildung 32) auf 130 – 250 mg * L^{-1} am 9.6.2009 zu sehen. Etwa in diesem Bereich können sich der Literatur zufolge (Angelidaki and Ahring, 1993; Gallert and Winter 1997) erste Toxizitätseffekte des freien Ammoniaks zeigen.

Auch in den mesophilen 32 L Durchflussfermentern H1 und H2 von LfL-ILT wurde mit mono-Grassilage im Rahmen der Inokulationsversuche (3.2.1.3) ein Raumbelastungssteigerungsversuch durchgeführt. Die Fermenterinhalte wurden gleichfalls aus den Versuchen des „Biogas Crops Network“ an LfL-ILT (Andrade et al., 2009a; 2009b) übernommen. Die spezifische Methanproduktion und die (errechneten) NH_3-N-Gehalte sind in Abbildung 50 dargestellt. Im Vergleich zu den Schwankungen des sME, die für die 1x täglich geschüttelten 6 L Fermenter erhalten wurden (Abbildung 32), war der Betrieb in den gleichfalls 1x täglich gefütterten aber kontinuierlich in Intervallen gerührten (s. 2.1.1.3) 32 L Fermentern deutlich stabiler, und es konnte eine höhere OLR erreicht werden (Abbildung 50). Eine regelmäßige gute Durchmischung scheint demnach ein wichtiger Faktor für eine bessere Prozesseffizienz beim Betrieb mit Grassilage zu sein.

Die Spurenelementanalysen aus den Fermenterinhalten ergaben durchwegs unauffällige Gehalte im unkritischen Versorgungsbereich. Beispielsweise lag Co beständig über 0,48 mg * kg FM^{-1}, und auch für die anderen Spurenelemente (TE) inclusive Natrium ließ sich kein Hinweis für suboptimale TE-Gehalte finden. Eine Begründung findet sich in den im Vergleich zur Maissilage relativ hohen TE-Gehalten in den gefütterten Grassilagen, die in Abbildung 36 beispielhaft für Co und Na dargestellt sind. Es ergab sich damit kein Anhalt für eine Notwendigkeit von Supplementierung.

Bis zu einer Raumbelastung von 2,0 - 2,5 g oTS * L_{Fi}^{-1} * d^{-1} konnte in den Fermentern H1 und H2 mit Grassilage über etwa 4 Monate ein stabiler Betrieb erzielt werden (Abbildung 50). Nach etwa 4 Monaten ergab sich eine deutliche Abnahme der Methanproduktion. Da gleichzeitig die (errechneten) NH_3-N-Gehalte um etwa den Faktor 5 auf etwa 400 mg * kg FM^{-1} gestiegen waren (Abbildung 50), kann auch hier der Anstieg der Ammoniakkonzentration eine Ursache der Prozessinhibierung gewesen sein.

Interessanterweise war auch hier die Prozessinhibierung nicht an einem Anstieg des etablierten „Frühwarnparameters“ FOS/TAC-Wert erkennbar: Noch am 26.11.2009, im Prozesszusammenbruch, lag der FOS/TAC-Wert in beiden Fermentern bei einem pH-Wert von ca. 8,0 unter 0,5. Offenbar pufferte das Ammoniak die bei der Säurebildung freigesetzten Protonen ab. Eine Frühwarnung gaben allerdings hier die mit GC bestimmten kurzkettigen Fettsäuren ab: Während am 5.11.2009 noch jeweils < 400 mg * kg FM^{-1} Acetat und Propionat gemessen wurden, war der Gehalt dieser Säuren am 26.11.2009 auf etwa 1,4 mg * Acetat kg FM^{-1} und 2,7 g * Propionat kg FM^{-1} gestiegen.

3.1.2.5 Grassilage thermophil

Nach Beendigung der thermophilen Vergärung von Maissilage in den 32 L LfL-ILT-Fermentern A1 - A3 wurden diese geleert, gereinigt und mit Inhalt von thermophil betriebenen Grassilagefermentern des Verbundprojekts „Biogas Crop Network“ (Andrade et al, 2009a; 2009b) gefüllt und wieder in Betrieb genommen (Abbildung 33).

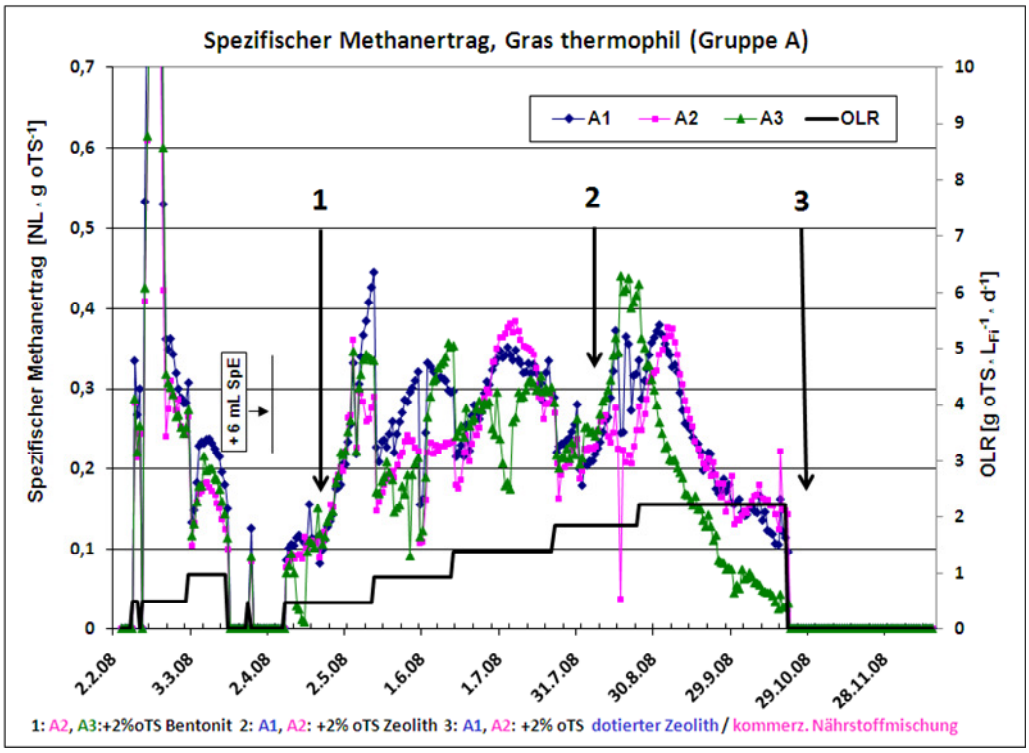


Abbildung 33: Spezifischer Methanertrag bei der thermophilen Mono-Vergärung von Grassilage; SpE: Zusatz von Spurenelementcocktail in 100x Dosierung (Tabelle 7)

Die thermophile Monovergärung mit Grassilage ließ sich über einer OLR 2 g oTS ∗ L_{Fi}^{-1} ∗ d^{-1} nicht stabil halten, der Methanertrag brach schnell zusammen. Auch bis OLR 2 g oTS ∗ L_{Fi}^{-1} ∗ d^{-1} kam es immer wieder zu ausgeprägten Leistungsschwankungen, in stabiler Prozess konnte nicht eingestellt werden (Abbildung 33). In den 6 L Fermentern konnte dagegen bei OLR 1 g oTS ∗ L_{Fi}^{-1} ∗ d^{-1} zumindest über einen Monat ein stabiler Bertrieb erreicht werden (Abbildung 35).

Tabelle 18: Konzentration der Spurenelemente (mg ∗ kg FM^{-1}) in den Fermentern A1 – A3 (Grassilage thermophil)

Datum/Fermenter	Al	B	Co	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Zn
03.03.2008 A1	84,16	1,441	0,124	7,953	71,17	6,516	0,363	2,018	0,071	8,56
03.03.2008 A2	117,6	1,451	0,139	11,83	94,1	8,312	0,393	1,52	0,022	9,15
03.03.2008 A3	105,7	1,56	0,148	8,935	91,59	7,7	0,397	1,605	0,046	8,77
13.06.2008 A1	73,75	2,210	0,642	12,638	98,150	28,073	0,618	2,560	0,0228	10,959
13.06.2008 A2	112,14	2,224	0,617	8,659	78,333	27,603	0,564	1,953	0,0419	9,262
13.06.2008 A3	101,76	2,386	0,636	12,141	78,668	28,911	0,598	2,195	0,1188	9,708

Die Analysen wurden von LfL-AQU mit den dort etablierten Methoden (s. 2.1.2.6) durchgeführt.

Den Daten in Tabelle 18 zufolge waren die Spurenelementgehalte in den Fermentern ausreichend, eine Mangelsituation war vor dem Hintergrund der Ergebnisse mit Maissilage (s. 3.1.2.1) nicht darstellbar. Der Versuch, noch in Unkenntnis der TE-Gehalte Ende März 2008

über TE-Zusatz den zusammengebrochenen Prozess zu reaktivieren, zeigte wohl dementsprechend auch keine Wirkung (Abbildung 33).

Die (berechneten) Ammoniakkonzentrationen schwankten zwischen 0,7 und 2,2 g * kg FM^{-1} und lagen somit im kritischen Bereich (Abbildung 34). Gegen Ende des Versuchszeitraumes konnte ein leichtes Absinken des Ammoniakgehaltes beobachtet werden, was mit der pH-Wert-Absenkung durch die Versäuerung (Anstieg der FOS/TAC-Werte und Propionsäuregehalte, Abbildung 34) zu erklären ist.

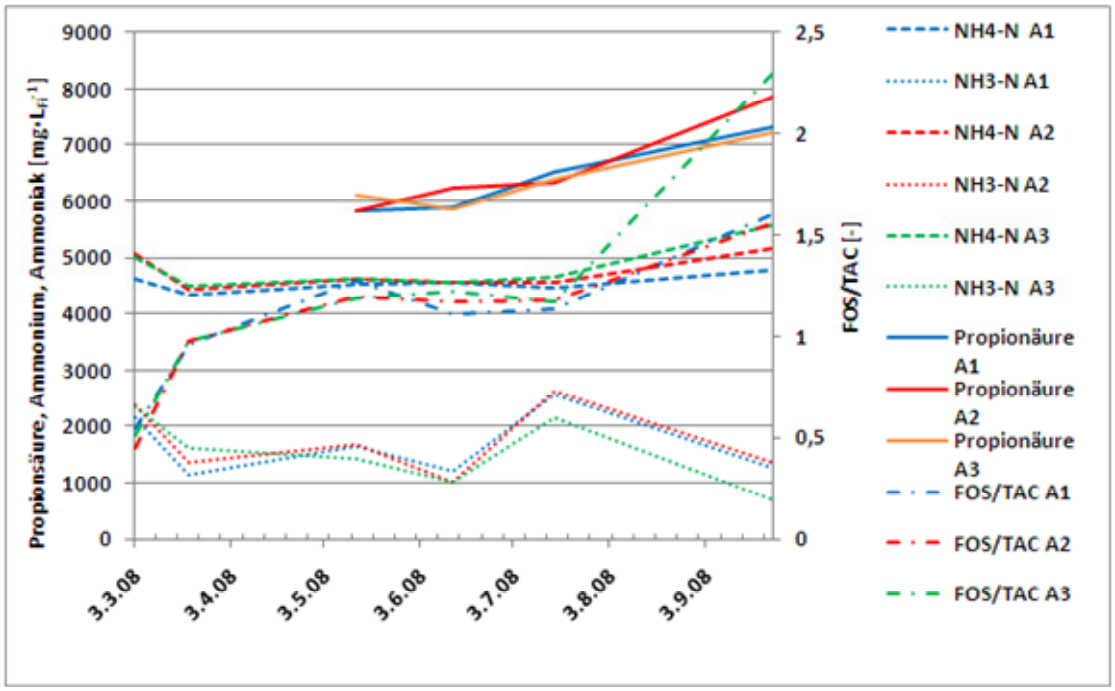


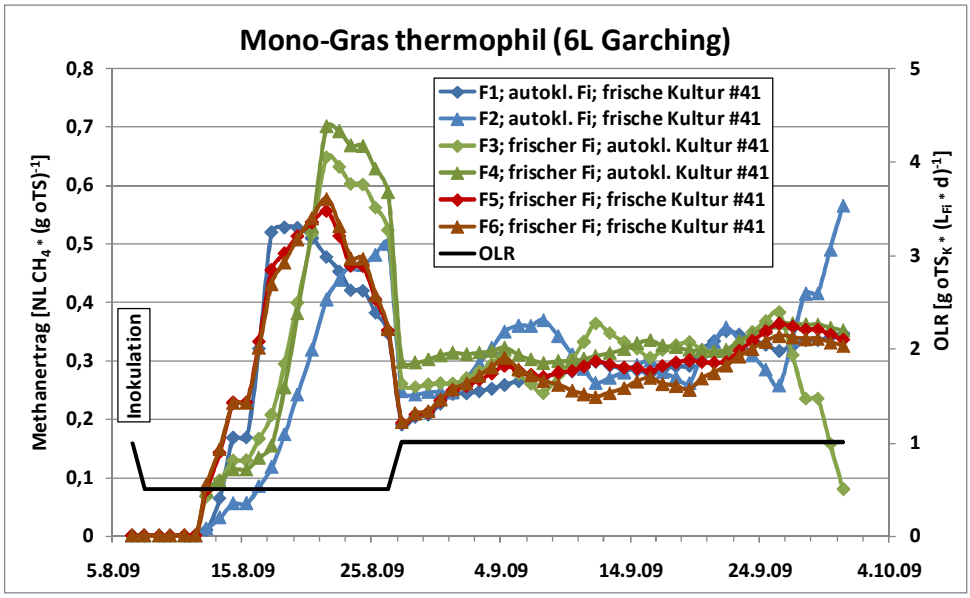
Abbildung 34: Ammoniak- Ammonium- und Propionatgehalte und FOS/TAC-Werte in den Fermentern A1 - A3 bei thermophilem Betrieb mit Grassilage

Nach Zugabe von Bentonit als NH_3-Adsorbens Mitte April 2008 konnte allerdings kein nennenswerter Unterschied zum Kontrollfermenter A1 in der Methanproduktion festgestellt werden (Abbildung 33). Nach der Zugabe von Zeolith als NH_3-Adsorbens Anfang August 2008 ließ sich gegenüber der Kontrolle zunächst eine Verbesserung des Methanertrags beobachten, der Prozess brach aber auch früher wieder zusammen (Abbildung 33). Dabei zeigte der Kontrollfermenter A3 (keine Zeolithzugabe) die höchste Ammoniumkonzentration (Abbildung 34). Die Wirkung des Zusatzes eines dotierten Zeoliths und einer kommerziell vertriebenen Nährstoffmischung Ende Oktober 2009 konnte aufgrund der bereits starken Versäuerung der Fermenter nicht beurteilt werden. Die Fermenter konnten nicht wieder angefahren werden, der Versuch musste aus Zeitgründen eingestellt werden.

Neben den Versuchen in den 32 L-Fermentern wurden Experimente zur thermophilen Grasmono-Vergärung in den 6 L Fermentern in Kombination mit Inokulationsversuchen (vgl. 3.2.1.2) durchgeführt (Abbildung 35). Die Fettsäuregehalte sanken in allen Fermentern wohl wegen der geringen OLR von höchstens 1 g oTS * L_{Fi}^{-1} * d^{-1} deutlich. Beispielsweise nahm Propionsäure von 300 – 400 mg * kg FM^{-1} auf 0 – 160 mg * kg FM^{-1} ab, gleichermaßen gingen auch die Gehalte aller anderen gemessenen Säuren sehr stark zurück, und der FOS/TAC-Wert sank von 0,9 – 1,4 auf 0,34 – 0,44.

Wegen der gestiegenen pH-Werte (7,4 – 7,8 auf 7,9 – 8,2) nahmen die Ammoniumgehalte leicht und die Ammoniakgehalte (auf 360 – 860 mg * kg FM^{-1}) bis zum Versuchsende deutlich in den „toxischen Bereich“ zu. Als Konsequenz der Prozessinhibierung nahmen auch die TS-Gehalte bis zum Versuchsende zu und stellen die Hemmung des Substratabbaus im Bereich der initialen Hydrolyse heraus.

Für die zu Versuchsende divergierende Entwicklung der Methanerträge von F2 und F3 (Abbildung 35) konnte keine Begründung aus der chemischen Analytik gefunden werden.



Varianten waren frischer bzw. autoklavierter (autokl.) Fermenterinhalt (Fi) und frisches bzw. autoklaviertes cellulolytisches Inokulum #41

Abbildung 35: Spezifischer Methanertrag aus Grassilage in thermophiler Mono-Vergärung (Fermenter F1 – F6, TUM-SWW, Garching) und organische Raumbelastung

Die eher geringen Methanerträge (ca. 0,3 NL CH_4 * g oTS^{-1}, Abbildung 35) und Umsatzraten des Kohlenstoffs aus der organischen Substanz in die Gasphase von knapp 60 % in allen Fermentern (nicht dargestellt) indizieren, dass der Prozess labil war und suboptimal verlief. Der Rückgang der Säuregehalte lässt im Zusammenhang mit der TS-Anreicherung schließen, dass sich die Störungen vor allem auf die Prozessabschnitte Hydrolyse bis Acetogenese konzentrierten.

3.1.2.6 Diskussion: Langzeitstabilität durch Spurenelementzusatz

In den Versuchen zum Arbeitspaket Langzeitstabilisierung konnten Schwellenwerte insbesondere für Natrium von und Kobalt ermittelt werden. Für die anderen kritischen Elemente (Ni, Se, Mo) lag kein Hinweis auf eine Limitierung in den Prozessen vor.

Co und Na^+ sind essenziell für die Methanogenese und somit unverzichtbar für einen Fermenterbetrieb (Jarrell and Kalmokoff, 1988; Blaut, 1994; Deppenmeier et al., 1999; Ferry, 1999). Unseren Ergebnissen zufolge muss unter einer Kobaltkonzentration von 0,03 mg * kg FM^{-1} mit einer Versäuerung des Fermenters gerechnet werden. Jarvis et al. (1997) ermittelten 0,02 mg * L^{-1} als kritische Schwelle für Co, und Pobeheim et al. (2010) gaben aus Ergebnissen

von Batchversuchen 0,015 mg * L^{-1} als Schwellenwert für Co an. Mudrack und Kunst, 2003 nannten als kritische Werte 0,003 - 0,06 mg * kg FM^{-1}. Der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Co-Schwellenwert entspricht damit den meisten Angaben aus der Literatur.

Bei Betrachtung der Kobaltwerte in den verwendeten Silagen wurde deutlich, dass in den Maissilagen eine sehr geringe Kobaltkonzentration von im Schnitt unter 0,01 mg * Kg FM^{-1} vorlag und somit unterhalb des Schwellenwerts lag (Abbildung 36). Entsprechend wichtig ist eine ausreichende zusätzliche Spurenelementversorgung bei Mais-mono Betrieb. In Grassilage hingegen wurde im Schnitt eine 5-fach höhere Konzentration gemessen (Abbildung 36). Daher ist ein Kobaltmangel bei Gras-mono-Betrieb mit einer deutlich niedrigeren Wahrscheinlichkeit zu erwarten.

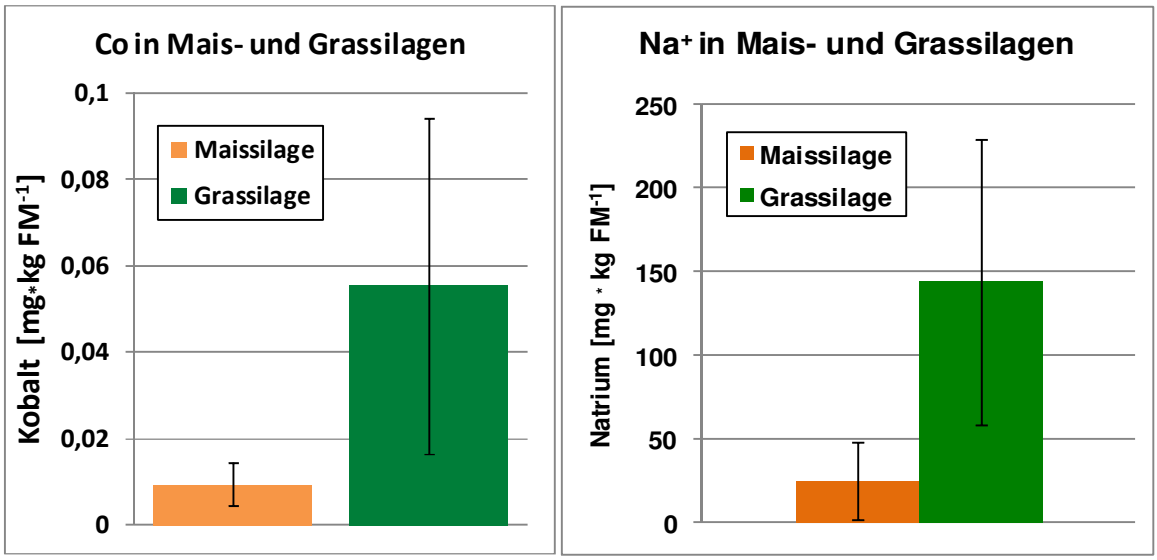


Abbildung 36: Kobalt (links) und Natrium (rechts) -gehalte der verwendetenen Mais- und Grassilagen

Auch ab einer Konzentration von Natrium unter 10 mg * kg FM^{-1} wurden Versäuerungsereignisse und Prozesszusammenbrüche registriert ohne dass andere Elemente offensichtlich limitierend waren. Deshalb werden 10 mg * kg FM^{-1} als minimale Natriumkonzentration für einem stabilen Betrieb angegeben. Auch Natrium kommt in Maissilage im Gegensatz zu Grassilage in einer deutlich niedrigeren Konzentration vor (Abbildung 36). Anlagenbetreiber sollten deshalb bei hohen Maisanteilen im Substrat oder anderen Na^+-armen Substraten für eine adäquate Natriumkonzentration im Fermenter sorgen.

Pobeheim et al. (unveröffentlicht) fanden für Nickel kürzlich einen Grenzwert von 0,06 mg * kg FM^{-1} im Durchflussbetrieb. In Batchversuchen ergab sich ein Schwellenwert in ähnlicher Höhe (Pobeheim et al., 2010). Derart niedrige Werte wurden in den eigenen Untersuchungen nicht gemessen. Es lag auch kein Hinweis in Form von Koinzidenz von geringen Ni-Gehalten und Prozessstörung vor, dass eine Ni-Limitierung vorlag und nicht besser duch Co- oder Na^+-Mangel zu erklären war.

Ein klarer Hinweis für einen monokausal durch Molybdän-Mangel verursachten Prozesszusammenbruch konnte auch in der genannten Literatur nicht gefunden werden. Der tiefste Mo-Gehalt lag in den eigenen Untersuchungen bei 0,058 mg * kg FM^{-1}. Da auch hier kein Hinweis auf Mo-Mangel in Form von Koinzidenz von geringen Mo-Gehalten und Prozessstörung vorlag, bleibt ein Schwellenwert für Mo offen.

Ähnliches gilt für Selen. Der geringste gemessene Wert lag bei 0,019 mg * kg FM^{-1}. Der Schwellenwert für einen Se- Mangel sollte darunter liegen, muss aber noch offen bleiben.

Wenn die Konzentration dieser Spurenelemente über den genannten Schwellenwerten bzw. in den genannten Bereichen liegt, kann ein Biogasprozess langzeitstabil und hocheffizient gestaltet werden. Voraussetzung ist allerdings, dass die (rechnerischen) Ammoniakgehalte nicht in einen Bereich von etwa 100 mg * kg FM^{-1} gelangen.

Aus den Batchversuchen ergab sich, dass eine Zugabe von Spurenelementen in einen stark versäuerten Fermenter keine schnelle Wirkung bringt. Wenn der FOS/TAC-Wert eine Schwelle von etwa 1,5 überschritt, war ein schnelles Wiederanfahren mit Spurenelementzusatz nicht mehr möglich. Bei pH-Werten unter etwa 5,8 können durch Lösungsmittelgärung in starkem Ausmaß toxische Verbindungen wie Alkohole und Lösungsmittel wie Aceton gebildet werden. Weiterhin liegen langkettige Fettsäuren protoniert vor und können als zellwandschädigende Detergentien wirken. Offenbar ist zunächst ein Abbau solcher Verbindungen nötig, bevor der Prozess wieder regulär in Gang kommen kann.

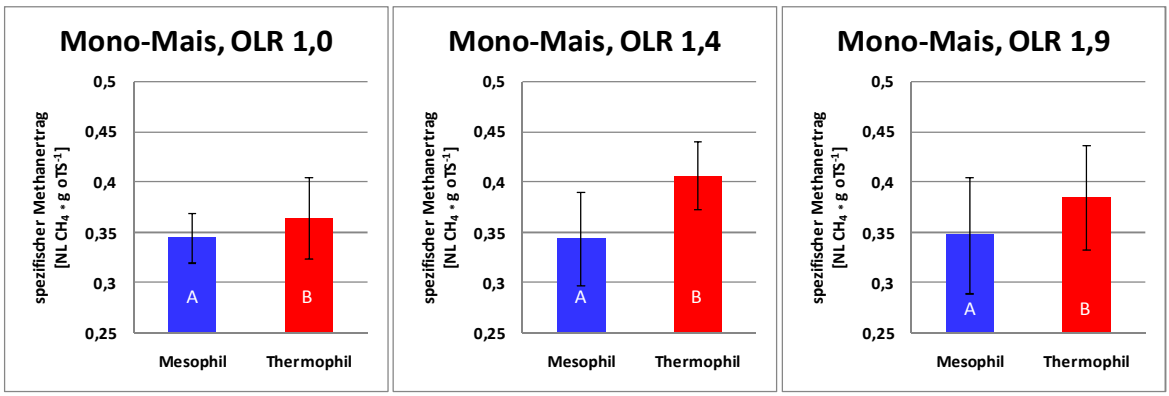
Bei der Vergärung von Grassilage können den Ergebnissen zufolge Prozesshemmungen auftreten, ohne dass der FOS/TAC-Wert die für maislastige Substrate beschriebene kritische Schwelle von ca. 0,7 überschreitet, oder der Propionsäuregehalt auf Werte über ca. 1 g * L^{-1} (Effenberger und Lebuhn, 2008) zunimmt. Diese Parameter sind, wie auch ein Acetat/Propionatverhältnis < 1, bei der mono-Vergärung von Grassilage nicht in allen Fällen als Frühwarnparameter geeignet. Da nicht immer zuerst Versäuerungserscheinungen auftraten, scheint bei der Vergärung von Grassilage auch der primär von Bakterien durchgeführte Abschnitt der Hydrolyse/Acidogenese/Acetogenese ein erster Angriffspunkt des zelltoxisch wirkenden Ammoniaks zu sein. Zu ähnlichen Schlüssen kamen Marín-Pérez et al. (2009a). Prozesshemmungen können den Ergebnissen zufolge primär auf den Ebenen Hydrolyse/Acidogenese/Acetogenese auftreten, aber auch zuerst die Methanogenese betreffen. Im ersten Fall ist primär ein reduzierter Substratabbau das Warnsignal, im zweiten Fall eine Versäuerung. Beide Erscheinungen traten auch gleichzeitig auf.

3.1.3 Thermiestufen

3.1.3.1 Maissilage

Zum Vergleich der Leistungsfähigkeit mesophilen (s. 3.1.1.1, 3.1.2.1.1) und thermophilen (s. 3.1.1.2, 3.1.2.3) Betriebs mit Maissilage wurde eine statistische Auswertung auf Signifikanz der Verschiedenheit (95 % Niveau) ohne die Daten aus versäuerten Fermentern durchgeführt. Abbildung 37 zeigt diesen Vergleich bei verschiedenen organischen Raumbelastungen.

Entsprechend der thermodynamischen Theorie war die thermophile Prozessführung der mesophilen bei Vergärung von Maissilage signifikant mit einem durchschnittlichen spezifischen Methan-Mehrertrag von ca. 35 mL * g oTS^{-1} überlegen (Abbildung 37).



unterschiedliche Buchstaben (A, B) bezeichnen signifikante Unterschiede auf 95 % Niveau

Abbildung 37: Spezifischer Methanertrag aus Maissilage in meso- und thermophiler Mono-Vergärung (Fermenter B1 – C3, LfL-ILT) bei unterschiedlicher organischer Raumbelastung (OLR)

Bei unterschiedlicher Betriebsweise und verschiedenem Prozesszustand konnte auch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Population methanogener Archaeen gemessen werden. Dies betrifft insbesondere Unterschiede in der Temperaturführung, der Verweilzeit, des Ernährungsstatus sowie in Limitierungen und der Gegenwart toxischer Agenzien. Solche Faktoren sind auch bei Demirel und Scherer (2008) angesprochen. Auffällig im Vergleich thermophil / mesophil war eine stark reduzierte Diversität methanogener Archaeen (vgl. 3.2.2) mit Dominanz von *Methanothermobacter*-Arten (Tabelle 23) bei thermophilem Betrieb. Thermophil betrug der Shannon-Index –H‘ (Shannon, 1948) zwischen 0,37 und 1,2 (Tabelle 23), mesophil zwischen 1,12 (versäuert) und 2,45 (guter Betrieb, Tabelle 25).

Die über qPCR (2.2.5) bestimmte Anzahl der methanogenen Archaeen (vgl. 3.2.2.3) lag mit $2,4 \pm 0,5 * 10^8 * mL^{-1}$ in thermophil betriebenen Mais-mono-Fermentern auf etwas niedrigerem Niveau als in den mesophil betriebenen Reaktoren mit $5,3 \pm 3,0 * 10^8 * mL^{-1}$. Demnach scheinen die *Methanothermobacter*-Arten Hochleistungs-Methanogene zu sein. Im mesophilen Temperaturbereich sind sie offenbar nicht genügend kompetitiv.

3.1.3.2 Grassilage

Ein Vergleich des spezifischen Methanertrags bei unterschiedlichen Betriebstemperaturen war nicht auf solider Basis möglich, da aufgrund von Prozessinhibierung insbesondere bei der thermophilen Vergärung nur eine niedrige Raumbelastungen (maximal 1,5 g oTS $*$ L_{Fi} $*$ d^{-1}) möglich war. Mesophil konnte mit etw 2,5 g oTS $*$ L_{Fi} $*$ d^{-1}eine eine höhere Raumbelastung erreicht werden (vgl. 3.1.3.2). Diese Ergebnisse entsprechen denen von Andrade et al. (2009a; 2009b).

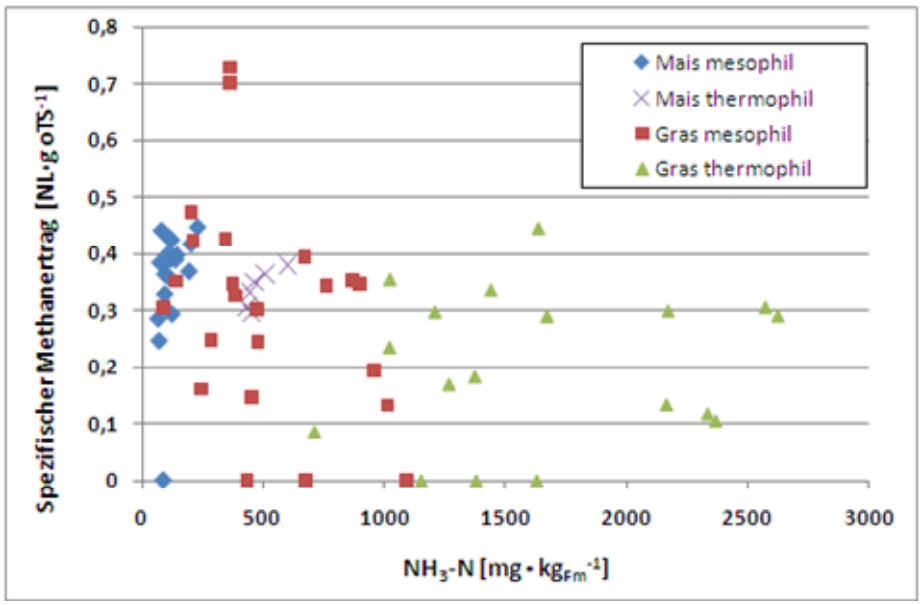
Als wesentlicher Grund für die Inhibierung des Prozesses mit Grassilage scheint in Übereinstimmung mit einer Reihe von Veröffentlichungen und den parallelen Ergebnissen von Koch et al. (2010) die Bildung von freiem Ammoniak aus dem relativ stickstoffreichen Substrat zu sein.

Analog zu den Ergebnissen der Vergärung von Maissilage (3.1.3.1) wurde mit Grassilage thermophil ebenfalls eine stark reduzierte Diversität der methanogenen Archaeen mit Dominanz der *Methanothermobacter*-Arten (Tabelle 24, Tabelle 26) beobachtet. Thermophil lag –H‘ zwischen 0 und 1,78 (Tabelle 24), mesophil zwischen 0,80 und 1,35 (Tabelle 26).

Die Anzahl der methanogenen Archaeen war thermophil mit 9,7 ± 1,8 * 10^7 * mL^{-1} ebenfalls etwas kleiner als mesophil mit 1,4 ± 0,2 * 10^8 * mL^{-1}. Dies könnte die in 3.1.3.1 geäußerte Vermutung bestätigen, dass die *Methanothermobacter*-Arten hocheffizient sind. Allerdings ist zu bedenken, dass der thermophile Prozess mit Grassilage besonders von Inhibierung betroffen war und im inhibierten Prozess die Konzentration methanogener Archaeen typischerweise reduziert ist (vgl. 3.2.2.3).

3.1.3.3 Diskussion: Thermiestufen

In der Praxis wird meist von einer höheren Stabilität des mesophilen Biogasprozesses berichtet. Dies entspricht der Beobachtung im vorliegenden Bericht, dass die Diversität der methanogenen Archaeen mesophil größer als thermophil war. Eine größere Diversität bringt in der ökosystemaren Anschauung (Finlay et al., 1997) eine bessere Stabilität und Resilienzfähigkeit mit sich, da dann Funktionen redundant sind und ein Ausfall einer Population nicht unbedingt den Zusammenbruch des Systems zur Folge hat.



Eine spezifische Methanproduktion von 0 bedeutet, dass nicht gefüttert wurde. Die Gründe können verschieden sein.

Abbildung 38: Spezifische Methanerträge bei unterschiedlichen Ammoniakkonzentrationen

Im thermophilen Mais-Mono Betrieb konnte allerdings eine höhere spezifische Methanproduktion erzielt werden als im mesophilen Betrieb. Der Anlagenbetreiber hat damit die Wahl, mesophil einen soliden und stabilen Prozess zu gestalten oder thermophil einen Hochleistungsbetrieb. Im thermophilen Betrieb darf aber insbesondere der Stickstoffgehalt des Substrats nicht zu groß sein (s. 3.1.3.2).

Mit Grassilage konnte die Raumbelastung wegen hoher Ammoniakgehalte mesophil nicht über 2,5 g * L_{Fi} * d^{-1} und thermophil nicht über 1,5 g * L_{Fi} * d^{-1} gesteigert werden. Für die Probleme mit der thermophilen Grasvergärung wird als Hauptursache die stärkere Bildung toxischen Ammoniaks bei höherer Temperatur gesehen (Abbildung 38). In thermophil mit Mono-Grassilage betriebenen Reaktoren waren (errechnete) NH_3-Gehalte > 1 g * L^{-1} keine Sel-

tenheit. Bei dieser Konzentration waren starke Prozesshemmungen praktisch die Regel. Bei mesophiler Betriebsweise lag der Methanertrag aus Grassilage wohl wegen der unterschiedlichen NH_3-Gehalte und –Toxizität im Schnitt höher als bei thermophiler, wo bis zu 2,7 g Ammoniak $*$ kg FM^{-1} errechnet wurden (Abbildung 38). Gleichzeitig bringt die geringere mikrobielle Diversität im thermophilen Betrieb (s. 3.1.3.1, 3.1.3.2, 3.2.2.2) eine größere Störungsanfälligkeit mit sich. Betreiber sollten ein noch stärkeres Augenmerk auf die Ammoniakkonzentration richten.

Um eine Prognose zu toxischen Wirkungen von Ammoniak in Biogasanlagen treffen zu können, wurden die berechneten NH_3-N-Konzentrationen gegen die Methanerträge aufgetragen (Abbildung 38). Erwartungsgemäß wurden die höchsten Ammoniakkonzentrationen in den mit Grassilage betriebenen Fermentern und vor allem thermophil errechnet. Eine klare Hemmschwelle ließ sich nicht erkennen, ab einer Ammoniakkonzentration von etwa 200 mg $*$ L^{-1} erschienen aber bei der Grasvergärung Fälle von Prozessinhibierung von ca. 50 %.

Da aktuell keine praktikable Lösung des Ammoniakproblems einfach umsetzbar ist, sollte eine thermophil betriebene Gras-mono Vergärung derzeit nur mit besonderer Vorsicht und konsequentem Monitoring betrieben werden. Ansonsten ist von der Gras-mono-Vergärung abzuraten.

3.1.4 Zweistufig-zweiphasiger Betrieb

3.1.4.1 Vergleich von einstufiger mit zweistufiger Fahrweise

In den Versuchen in mesophil-mesophiler Betriebsweise mit mono-Maissilage in der durch TUM-SWW betriebenen zweistufigen Containeranlage konnte eine Raumbelastung von 2,5 g oTS $*$ L_{Fi}^{-1} $*$ d^{-1} erreicht werden, darüber ergab sich eine Versäuerung mit Prozessstörung (Koch et al., 2010). Die Versäuerungsschwelle in der durch TUM-SWW betriebenen 2-stufigen LfL-ILT-Containeranlage lag damit deutlich tiefer als in den mit Spurenelementen supplementierten liegenden LfL-ILT Fermentern (bis zu 6 g oTS $*$ L_{Fi}^{-1} $*$ d^{-1}, Abbildung 20). Die Ursache dafür besteht wahrscheinlich darin, dass die Containeranlage nicht wie seitens LfL-ILT angeraten mit dem TE-Cocktail (Tabelle 7) versorgt wurde, sondern mit einer hohen Fe-Dosis.

Aus diesem Grund kann zwar nicht die maximale Belastbarkeit der Systeme verglichen werden aber der bei stabilem Betrieb (bei OLR = 2,0 g oTS $*$ L_{Fi}^{-1} $*$ d^{-1}) erzielte Methanertrag. Dieser lag für die 2-stufige Containeranlage und die liegenden LfL-ILT Fermenter bei 0,4 L_N CH_4 $*$ g oTS^{-1}, für die 32 L LfL-ILT-Fermenter mit 0,35 L_N CH_4 $*$ g oTS^{-1} leicht darunter. Der etwas höhere Methanertrag des 2-stufigen Systems und der liegenden Fermenter beruht höchstwahrscheinlich auf den dort geringeren Kurzschlussströmen und damit verbund einem höheren Ausfaulungsgrad. Ein Vorteil eines zweistufigen Betriebs war aus den gegebenen Daten nicht zu erkennen.

3.1.4.2 Zweiphasiger Betrieb

Das zweiphasige System sollte dazu dienen, die Energieproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen zu optimieren und die Möglichkeiten bieten, die Unterprozesse verfahrenstechnisch besser zu steuern. Diese Prozessführung wird schon seit Längerem eingesetzt, unterschiedliche Stoffströme möglichst effizient energetisch zu nutzen (Demirel and Yenigün, 2002).

Im vorliegenden Teilvorhaben traten bei der verfahrenstechnischen Umsetzung für NawaRo zunächst technische Probleme auf. Nach wiederholten Verstopfungen des Überlaufs zwischen den kommunizierenden Fermentern mit längerfaserigen Maissilagebestandteilen wurden die

zweistufigen LfL-ILT Anlagen (Abbildung 9) umgebaut und konnten erst nach dem Umbau (s. 2.1.1.5) in einen 2-stufig-2-phasigen Betrieb geführt werden. Dabei wurde eine getrennte thermophile (55°C) Hydrolyse/Acidogenese im liegenden Reaktor P1 und eine mesophile (38°C) Methanogenese im stehenden Reaktor P2 etabliert. Reaktor P1 diente auch als Reservoir für Partner TUM-MB zur Selektion hydrolytisch-cellulolytisch hochaktiver mikrobieller Anreicherungen (Schwarz, 2010) und für Partner TUM-BÖ zur Evaluierung der Microarrays (Schloter et al., 2010).

Hier ist anzumerken, dass der verfahrenstechnische Begriff „Hydrolysephase“ irreführend und von der mikrobiologischen Definition der Prozessphase verschieden ist. Eine Hydrolyse ist ohne gleichzeitige Produktion organischer Säuren nicht möglich. Es sollte daher korrekterweise der Begriff Hydrolyse/Acidogenese-Phase (HAP) verwendet werden.

Im liegenden Reaktor P1 stellte sich bei hoher OLR und sinkendem pH-Wert (bei pH 5,5 – 6,0 mit $NaHCO_3$ stabilisiert) eine „Hydrolysephase“ (HAP) mit Produktion von „Hydrolysegas“ (HAP-Gas, 0 - 5 % CH_4, 50 % CO_2, 45 - 50 % H_2) ein (Abbildung 39). GC-Messungen bestätigten die in Abbildung 39 errechneten H_2-Gehalte. Die HAP produzierte ein relativ konstantes Niveau an kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und HAP-Gas und konnte langzeitstabil betrieben werden (Liu et al., 2009; Liu, 2010). Nach fest/flüssig-Separierung produzierte der mit flüssigem „Hydrolysat“ gefütterte Methanreaktor Biogas mit 70 - 76 %-igem Methangehalt.

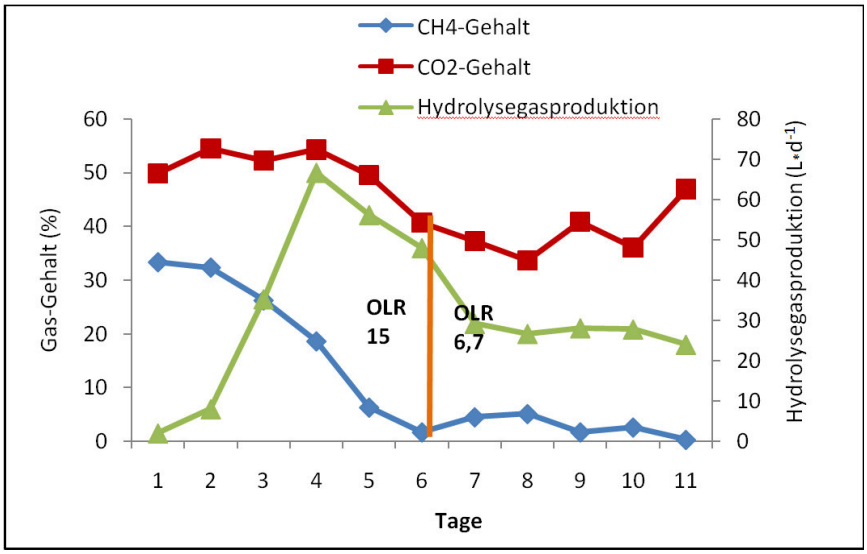


Abbildung 39: Gasdaten und pH-Werte vom Hydrolysefermenter P1 in der Anfahrphase und im anfänglichen regulären Betrieb

Die SCFA lagen im Reaktor P1 im Bereich 8 - 11 g $*$ L^{-1} (CSB 24,5 bis 29,6 mg $*$ L^{-1}). Der pH-Wert in der HAP hatte einen starken Einfluss auf die Konzentration vor allem von Essig-, Propion-, Butter und Capronsäure sowie auf die Gasamt SCFA-Konzentration. Bei etwa pH 6,0 ergab sich ein Maximum an SCFA-Produktion, während bei ca. pH 7,0 etwas mehr HAP-Gas produziert wurde. Bei steigendem pH-Wert stieg die Konzentration an Buttersäure in den SCFA an, während der prozentuale Anteil an Essigsäure sank. Liu et al. (2009) und Liu (2010) stellen die Entwicklungen detailliert dar.

CO_2 und H_2 waren die Haupt-Gasprodukte der HAP. Bei pH 5,0 – 5,5 war das Verhältnis von H_2 zu CO_2 etwa 50 % zu 50 %. Bei pH 6.0 – 6.5 lag es bei etwa 20 % zu 80 %. Der Methan-

gehalt im Biogas der methanogenen Phase (Reaktor P2) lag durchwegs zwischen 70 bis 76 %, wenn der Gärrest der HAP („Hydrolysat“) separiert und dem Reaktor P2 nur die SCFA-reiche flüssige Phase zugeführt wurde. Wenn der Gärrest der HAP ohne Separation dem Reaktor P2 zugeführt wurde, produzierte dieser ein „konventionelles“ Biogas mit 50 – 60 % Methangehalt (nicht dargestellt).

Die Ergebnisse erlauben, die Gas- und Säurezusammensetzung der HAP über den pH-Wert zu beeinflussen. Bei zwei kritischen Faktoren besteht aber noch dringender Optimierungsbedarf:

Bei Separation des Gärrests fiel im Betrieb mit Maissilage ein erheblicher Anteil ungenutzter organischer Masse an. Wird diese nicht weiterverwertet, verschlechtert sich die Umsetzung von Kohlenstoff in die Gasphase. Bei einphasigem Betrieb betrug diese bis zu 80 % (vgl. 3.1.1, 3.1.2).

Weiterhin bleibt derzeit das von der HAP produzierte, wasserstoffreiche Gas ungenutzt. Ein Versuch, dieses in der methanogenen Phase über Einpressung zu verwerten, war nur teilweise erfolgreich (nicht dargestellt). Die Nutzung des produzierten HAP-Gases ist ein wichtiger Faktor, die Ökobilanz zu verbessern.

Aufgrund der niedrigen spezifischen Methanerträge von maximal 0,2 NL $*$ g oTS^{-1} aus Maissilage (mono) ist derzeit ein zweiphasiger Betrieb mit diesem Substrat mit der Nassvergärungs-Methode im gegenwärtigen Entwicklungsstand nicht zu empfehlen. Zu ähnlichen Schlüssen kamen Marin-Perez et al. (2009b).

3.1.5 Gasrückführung: Effizienz pneumatischer Durchmischung bei unterschiedlichen Rührintervallen

Zur Evaluierung von Effekten der pneumatischen Durchmischung durch Gasrückführung wurde bei unterschiedliche Rührintervallen eine Energiebilanzierung durchgeführt. Dazu wurde die Temperatur des Fermenters in zwei Füllhöhen (T_{oben} und T_{unten}; Abbildung 7) und die Temperatur des Gases gemessen. Eine unzureichende Durchmischung des Fermenters sollte sich durch Ausbildung eines Temperaturgradienten ΔT zwischen T_{oben} und T_{unten} wiederspiegeln.

Jeweils ein Ferraris-Zähler wurde für die Gaspumpe und das Rührwerk installiert. Da im Verlauf des Versuchs keine eigenständige Erwärmung des Fermenters festzustellen war, wurde kein Wärmezähler benötigt. Das Kühlaggregat für den Maissilagevorrat im Futterdosierer wurde ebenfalls nicht benötigt, da sich die TS- und oTS-Gehalte von frischem und einen Tag altem Substrat nicht wesentlich änderten. Die Berechnung der organischen Raumbelastung und der spezifischen Methanproduktion bezieht sich hier auf den tatsächlichen oTS-Gehalt der Silage bei Fütterung ohne Korruktur um verflüchtigte Fettsäuren.

Es wurden die in Tabelle 19 aufgeführten Rührintervalle gewählt.

Tabelle 19: Rührintervalle und Stromverbrauch

	Rühren	Pause	Frequenz	Laufzeit/Tag	Stromverbrauch	Zeitspanne
1	10 min	10 min	7 U $*$ min^{-1}	720 min $*$ d^{-1}	7,3 kWh $*$ d^{-1}	bis 3.2.2010
2	10 min	20 min	7 U $*$ min^{-1}	480 min $*$ d^{-1}	4,3 kWh $*$ d^{-1}	3.2. - 9.2.2010
3	10 min	30 min	7 U $*$ min^{-1}	360 min $*$ d^{-1}	3,3 kWh $*$ d^{-1}	9.2. - 17.3.2010
4	10 min	40 min	7 U $*$ min^{-1}	288 min $*$ d^{-1}	3,0 kWh $*$ d^{-1}	17.3. - 30.3.2010
5	10 min	50 min	7 U $*$ min^{-1}	240 min $*$ d^{-1}	2,3 kWh $*$ d^{-1}	30.3. - 9.4.2010

Abbildung 40 zeigt die Entwicklung von ΔT in Abhängigkeit vom Rührintervall über die Zeit.

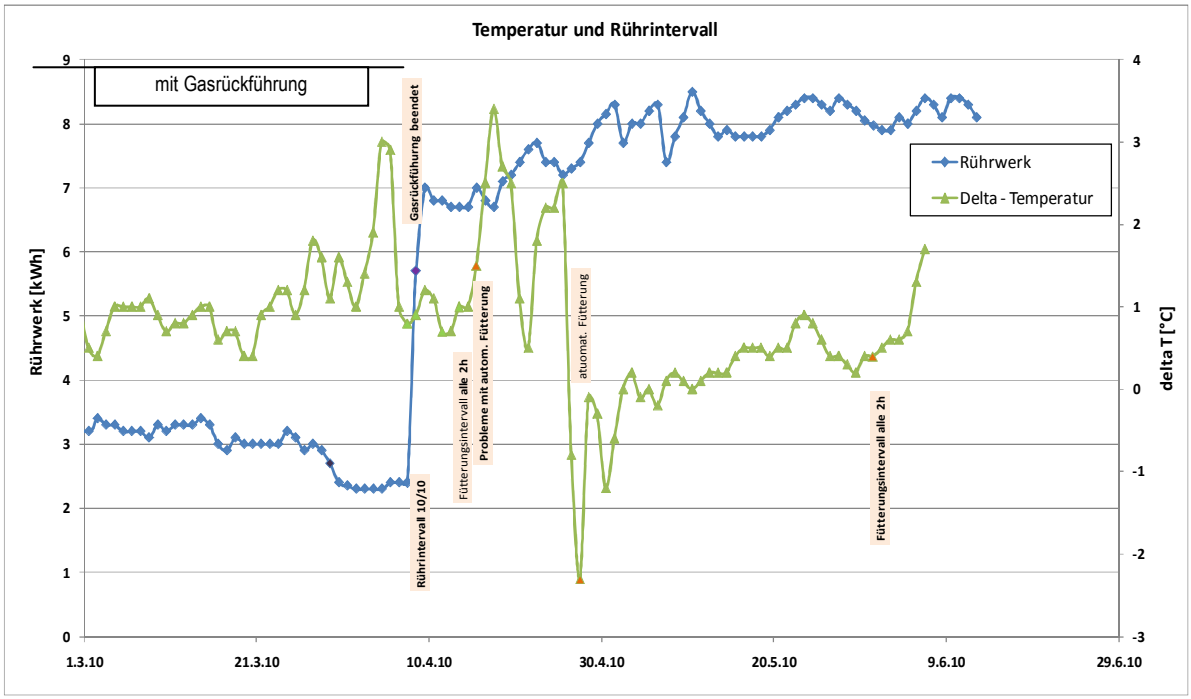


Abbildung 40: Ausbildung von Temperaturgradienten in Abhängigkeit von der Gasrückführung und vom Rührintervall

Etwa am 4.04.2010 bildete sich ein deutlich größeres ΔT von 3°C aus. Deshalb wurde angenommen, dass es zu einer Temperaturschichtung und damit zu einer unzureichenden Durchmischung gekommen ist. In der folgenden Periode verengte sich ΔT allerdings wieder. Der Versuch zu Effekten verschiedener Rührintervalle musste aber aus Zeitgründen eingestellt werden.

Für die Durchmischung spielte anscheinend nicht nur das Rührwerk und die Gaspumpe eine Rolle sondern auch die Fütterung. In der Zeitspanne vom 15.4 – 28.4.2010 (erster und letzter oranger Punkt in Abbildung 40) fand nur eine eingeschränkte oder gar keine Fütterung statt, es wurde aber programmgemäß gerührt. In dieser Periode war die Temperaturregelung in unüblichem Maß gefordert (große Schwankungen in Abbildung 40). Eine regelmäßige Fütterung hatte offenbar einen temperaturstabilisierenden Einfluß im Fermenter SB1. Dies kann auf die hohe, schlanke Fermentergeometrie und/oder auf die Einbringtechnik zurückzuführen sein, die mit der Fütterung kälteres Material im oberen Bereich, wo die Temperatur höher lag, für ein kleineres ΔT sorgt. Daraus lässt sich folgern, dass eine pneumatische Durchmischung alleine nicht für eine Volldurchmischung des Pilotfermenters SB1 reichen würde.

Das Rührwerk bzw. der Motor im Pilotfermenter SB1 waren nicht ideal für die Fermenterbedingungen ausgelegt. So ist auch der hohe Eigenstromverbrauch des Rührwerks von 2,3 - 7,3 kWh $*$ d^{-1} (Tabelle 19) zu erklären. In der Praxis übliche Werte für den Verbrauch eines Rührwerks liegen bei 2,4 - 21 kWh $*$ 100 m^{-3} $*$ d^{-1} (Kissel et al., 2010). Der Leistungsbedarf der Gaspumpe lag während des Versuchs um 1,3 kWh $*$ d^{-1}. Umgerechnet auf 100 m^3 Fermentervolumen ergaben sich daraus 46 kWh $*$ 100 m^{-3} $*$ d^{-1}.

Für die Energiebilanzierung wurde der Stromverbrauch (kWh * d^{-1}) mit dem elektrisch möglichen Energiegehalt des Methans verrechnet. Die Bilanzierung ist so aufgestellt als ob das Biogas einem Blockheizkraftwerk (BHKW) zur Stromgewinnung zugeführt worden wäre. Dieser Stromgewinn wurde dem Stromverbrauch gegenübergestellt. Daraus und aus den gemessenen Daten resultieren die nachstehenden Berechnungen.

Elektrische Wirkleistung eines BHKWs:

$$\eta = 36\ \%$$

Energiegehalt des produzierten Methans:

$$H = 9{,}97\ \frac{kWh}{m^3}$$

Stromverbauch:

$$Stromverbrauch_{gesamt} = Stromverbrauch_{Rührwerk} + Stromverbrauch_{Gaspumpe}$$

Elektrische Energie im Biogas:

$$Energiegehalt_{Biogas} = 9{,}97 \frac{kWh}{m^3} \cdot \frac{L}{h_{Biogas}} \cdot \frac{1\,m^3}{1000\,L} \cdot h_{Zeitintervall} \cdot \frac{CH_4}{100} \cdot \frac{\eta}{100}$$

Energiegewinn:

$$Energiegehalt_{Biogas}[kWh] - Stromverbrauch_{gesamt}[kWh] = Energiegewinn$$

Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Abbildung 41 dargestellt.

Abbildung 41 zeigt, dass die Gaseinpressung einen positiven Einfluss auf die Energiebilanz hatte. Dadurch konnten etwa 30 % des ursprünglichen Energieeintrags durch das Rührwerk eingespart werden.

Eine Teilrückführung des produzierten Biogases in den Fermenter führte aber unter den gegebenen Bedingungen zu keiner erkennbaren Steigerung des spezifischen Methanertrags (Abbildung 42). Ein Grund könnte sein, dass die Aufenthaltsdauer des Gases im Fermenterschlamm zu kurz war. Bei der gegebenen Gaszusammensetzung mit nur ca. 32 ppm (Vol.) H_2 war auch nur eine marginale Erhöhung des Methanertrags aufgrund mikrobiologischer Umwandlung des H_2 und CO_2 in CH_4 zu erwarten. Um eine Verweilzeit des H_2 im Fermenterschlamm zu erhöhen, hätte zwar die Förderleistung der Gaspumpe reduziert werden können, allerdings wäre dann eine Verstopfung der Lochbohrungen der Gasringleitung zu befürchten gewesen. Einbauten wie in einem UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) – Reaktor wären zwar eine Alternative, dies war aber im Rahmen des Teilvorhabens nicht realisierbar.

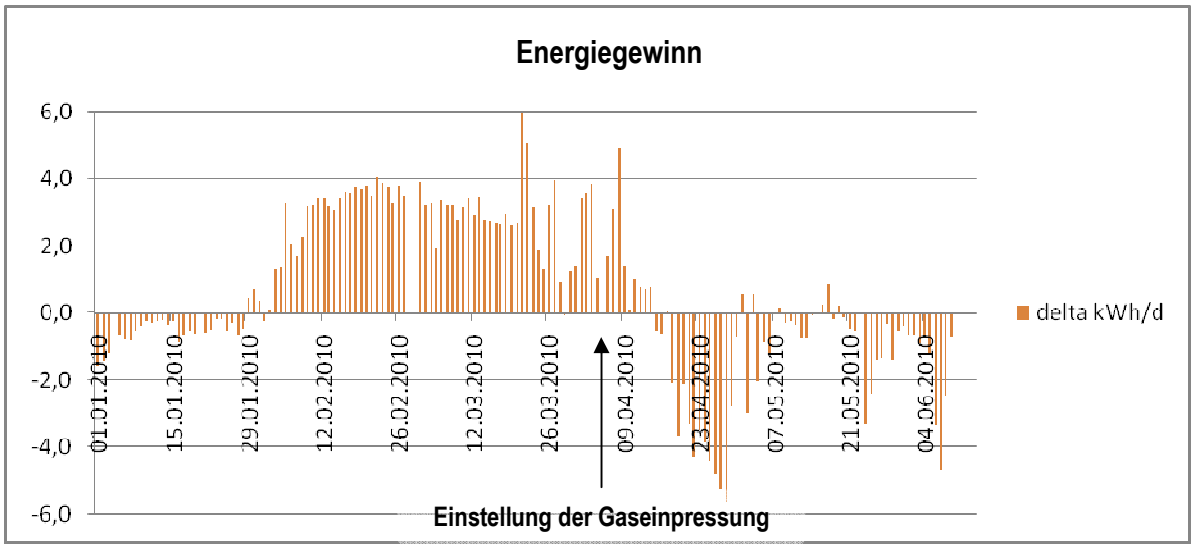


Abbildung 41: Energiebilanz mit und ohne Gaseinpressung

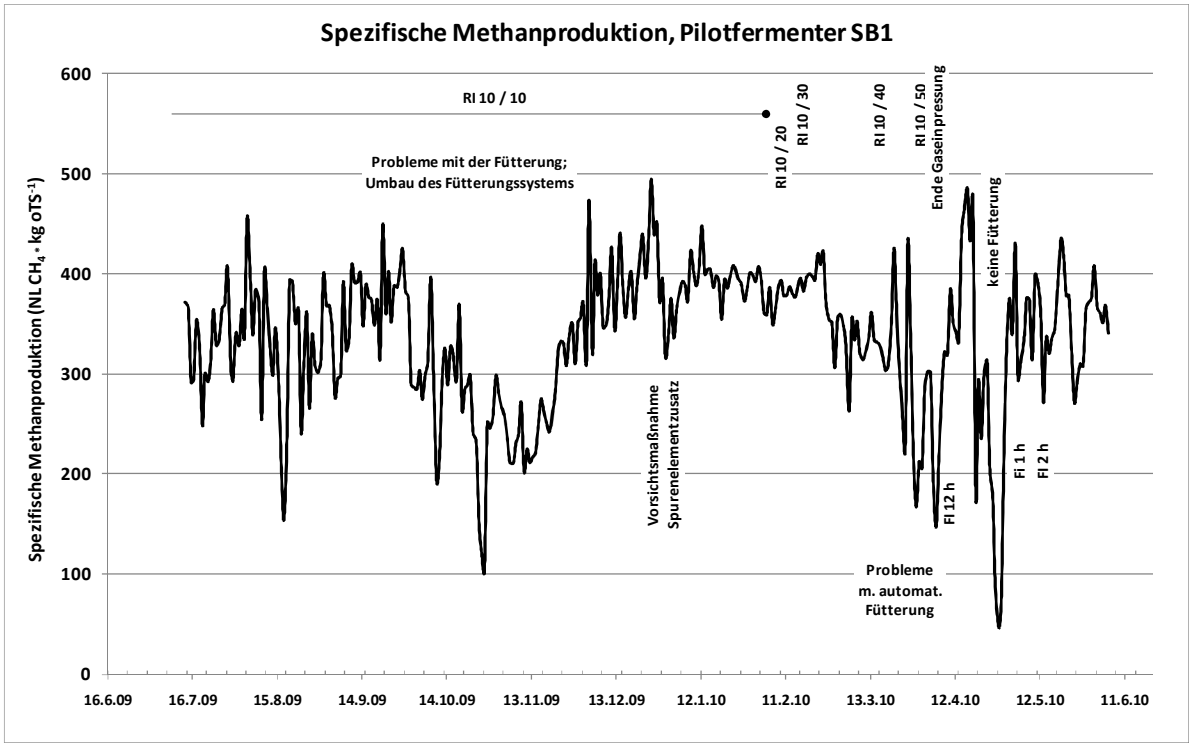


Abbildung 42: Spezifischer Methanertrag des Pilotferementers SB1; Maissilage-mono, mesophil

Ob in der Praxis eine Gasrückführung praktikabel und sinnvoll ist, ist sehr stark abhängig von der Geometrie des Fermenters und dem eingebauten Rührwerk. Je größer und höher der Fermenter ist, desto mehr Energie ist für die Gaseinpressung nötig. Dadurch kann es zu einem negativen Ergebnis bei einer Energiebilanzierung kommen. Auf jeden Fall ist zu berücksichtigen, dass die Bilanzierung, der richtige Einbau und die Wartung einer Gasrückführung einen gewissen materiellen und zeitlichen Aufwand erfordern.

3.1.6 Fütterungsintervalle

Durch die anaerobe Vergärung von Biomasse wird Biogas gebildet. Bei 1x täglicher Fütterung weist das erzeugte Gas im zeitlichen Verlauf nach der Fütterung eine unterschiedliche Zusammensetzung auf, es stellen sich verschoben periodische Maxima und Minima der CO_2- und CH_4-Gehalte ein (Abbildung 31a). Eine Änderung dieser Dynamik der Gaszusammensetzung kann ein Indiz für die Belastung des Fermenters durch die Fütterung sein.

Je ausgeprägter die Amplituden sind, desto größer ist die Stoßbelastung durch die Fütterung. Wird die Belastung zu groß (z.B. bei unterlagertem Spurenelementmangel, verbreitern sich die Schwingungen, und die Amplituden werden kleiner und gehen schließlich gegen Null (Abbildung 31b).

Daher wurde die zeitliche Änderung der CH_4- und CO_2-Gehalte für die Bewertung günstiger Fütterungsintervalle zur Hilfe genommen. Tabelle 20 stellt die getesteten Fütterungsintervalle und die Zeitpunkte der Gasanalysen dar.

Tabelle 20: Fütterungsintervalle und Gasanalysen

	Fütterungsintervalle	Gasmessung	Zeitspanne
1	Alle 12 h	2 h	9.4. - 11.4.2010
2	Alle 2 h	10 min / 50 min	12.5. - 31.5.2010
3	Alle 1 h	10 min / 50 min	1.5. - 12.5.2010

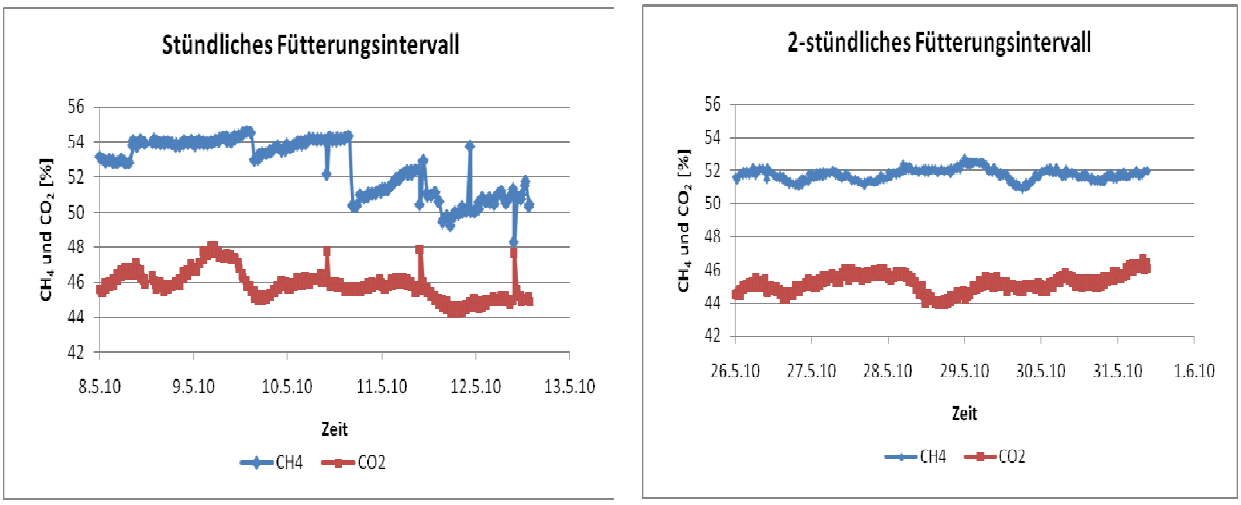
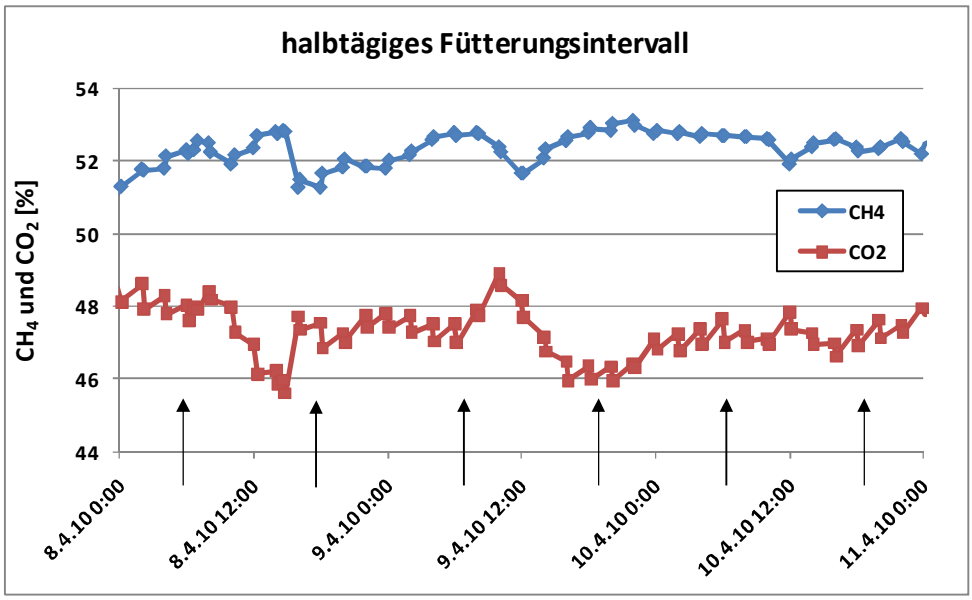


Abbildung 43: Methan- und Kohlendioxidgehalt bei stündlichem (links) und 2-stündlichem (rechts) Fütterungsintervall

Hinweisen des Herstellers des Gananalysegeräts zufolge konnten allerdings die Abstände zwischen den Gasanalysen von 10 min und 50 min aus technischen Gründen (Gefahr der Überlastung der elektrochemischen Sensoren) nur eine kurze Zeit lang aufrecht erhalten werden.

Aus den in Abbildung 43 Verläufen der Gaszusammensetzung konnte kein Unterschied zwischen den stündlichen und den 2-stündlichen Fütterungsintervallen abgelesen werden. Es ergaben sich auch keine Peaks im Verhältnis der CH_4- und CO_2-Gehalte im gebildeten Biogas und damit kein Hinweis auf eine Stoßbelastung.

Gegenüber dem 1- und 2-stündlichen Fütterungsintervall (Abbildung 43) ließ sich beim 12-stündlichen Fütterungsintervall eine angehende Periodizität der Änderung in der Gaszusammensetzung nach der Fütterung erahnen (Abbildung 44).



Pfeile bezeichnen die Fütterungszeitpunkte

Abbildung 44: Methan- und Kohlendioxidgehalt bei halbtägigem Fütterungsintervall

Eine bei täglichem Fütterungsintervall ausgeprägte fütterungsinduzierte Dynamik der CH_4- und CO_2-Gehalte wurde als Stoßbelastung für die Biozönose (Abbildung 31). Der Belastungsstress ist sicher bei einem weiten Fütterungsintervall mit zugrundeliegend hoher organischer Raumbelastung (OLR) größer als bei geringer OLR. Je kürzer das Fütterungintervall gewählt wird, desto mehr lassen sich Belastungsspitzen senken und damit die Wirkung eines Stressors klein halten.

Im Pilotfermenter SB1 (Abbildung 44) schienen sich etwa bei halbtägigem Fütterungsintervall erste Belastungsanzeichen auszubilden, die aber noch nicht als „Stress“ gewertet werden können (vgl. 3.1.2). Hier ist auch die relativ niedrige Raumbelastung von ca. 2,4 kg * oTS * m^{-3} * d^{-1} zu berücksichtigen. Die spezifische Methanproduktion lag im Regelbetrieb bei ca. 380 NL CH_4 * kg oTS^{-1}. Dies war praktisch identisch mit den Ergebnissen für die Laborfermenter (vgl. 3.1.2) und spricht dafür, dass solche Werte auch in der Praxis erzielt werden können. Bemerkenswert ist, dass der Wert 21,8 % über den Angaben in „Faustzahlen KTBL“ (KTBL, 2007) liegt.

Eine Effizienzverbesserung durch Verkürzung des Fütterungsintervalls ergab sich in Zusammenhang mit Grenzen der Materialbelastbarkeit, der Verweilzeit der Mikroorganismen und der Ausdünnung von Spurennährstoffen bei eher höheren organischen Raumbelastungen (ca. 6 kg * oTS * m^{-3} * d^{-1}, vgl. 3.1.2). Aus Zeitgründen konnte jedoch zur Verifizierung im Pilotmaßstab im Fermenter SB1 keine weitere Steigerung der Raumbelastung mehr vorgenommen werden.

3.1.7 Kalibrierung der Nahinfrarotspektroskopie

3.1.7.1 Ergebnisse

Tabelle 21: Ergebnisse der Modellerstellung und –prüfung für Mais-, Grasvergärung allein, sowie gemeinsam

			Kalibration			Kreuzvalidation			Validation			
		Vorbehandlung	Ausr.%	SEC	R^2	SECV	R^2	Rang	SEV	R^2	RPD	Rang
TS	Mais	1 Ableitung	3,4	0,46	0,93	0,52	0,91	6	0,43	0,93	4,14	6
[% an FM]	Gras	1 Ableitung	4,1	0,45	0,93	0,51	0,92	4	0,53	0,91	3,45	4
	Mais-Gras	1 Ableitung	4,9	0,45	0,93	0,47	0,93	7	0,47	0,93	3,96	7
oTS	Mais	1 Ableitung	5,5	0,41	0,94	0,47	0,92	6	0,45	0,93	3,93	7
[% an FM]	Gras	1 Ableitung	4,4	0,37	0,92	0,42	0,91	4	0,37	0,93	3,92	4
	Mais-Gras	1 Ableitung	4,5	0,46	0,93	0,50	0,93	6	0,45	0,94	4,31	6
NH4-N	Mais	1 Ableitung	3,8	145	0,91	195	0,84	8	205	0,84	2,50	8
[mg kg^{-1}]	Gras	1 Ableitung	5,5	311	0,90	364	0,86	5	358	0,86	2,82	8
	Mais-Gras	1 Ableitung	4,5	296	0,93	335	0,91	8	329	0,92	3.59	7
Essigs.	Mais	De-trend	6,3	813	0,94	1.082	0,90	7	949	0,91	3,54	5
[mg kg^{-1}]	Gras	De-trend	3,9	845	0,66	1.060	0,48	6	1065	0,47	1,39	6
	Mais-Gras	1 Ableitung	5,0	1.144	0,91	1.596	0,68	10	1572	0,68	1,80	10
Propions.	Mais	1 Ableitung	3,2	553	0,83	838	0,64	7	930	0,58	1,59	5
[mg kg^{-1}]	Gras	1 Ableitung	8,4	1.111	0,90	2.003	0,70	6	-	-	-	-
	Mais-Gras	1 Ableitung	6,5	1.124	0,80	1.430	0,52	7	1.430	0,60	1,60	7
FFS ges.	Mais	1 Ableitung	7,0	920	0,93	1494	0,83	8	1464	0,84	2,59	5
[mg kg^{-1}]	Gras	1 Ableitung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mais-Gras	1 Ableitung	7,3	1.020	0,91	1.644	0,78	10	1.665	0,81	2,33	7

Abkürzungen: TS: Trockensubstanz; oTS: org. Trockensubstanz; NH_4-N: Ammoniumstickstoff; FFS gesamt: Gesamtessigsäureäquivalent (titrimetrisch); FM: Frischmasse; SEC: Standardfehler der Kalibration; SECV: Standardfehler der Kreuzvalidierung; SEV: Standardfehler der Validierung.

Die Ergebnisse für die einzelnen Kenngrößen der Modelle Mais, Gras sowie Mais-Gras sind in

Tabelle 21 dargestellt. Für die Parameter TS und oTS in der Frischmasse ergaben sich sowohl substratspezifisch als auch mit dem globalen Mais-Gras Modell mittlere Standardfehler von 0,5 %punkten, ohne Unterschied zwischen Kalibration, Kreuzvalidierung oder Test-Set Validierung. Der Anteil der aus dem Datensatz entfernten Ausreißer lag zwischen 3 und 5 %. Das Bestimmtheitsmaß auch der Test-Set Validierung erreichte Werte >0,9, während die RPD-Werte zwischen 3,5 und 4,3 streuten.

Der mittlere Vorhersagefehler für NH_4-N betrug in der Kreuzvalidierung wie auch der Test-Set Validierung 200 und 360 mg $*$ kg^{-1} und lag immer etwas über dem der Kalibrierung. Das mono-Mais Modell wies den geringsten Vorhersagefehler auf. In der Test-Set Validierung erzielte das globale Modell mit Werten >0,9 die höchsten Bestimmtheitsmaße verglichen mit nur 0,85 für das Mais- bzw. Grasmodell. Ebenfalls war der RPD-Wert mit rund 3,6 am höchsten.

In der Kalibrierung der Säureparameter ergab sich ein differenziertes Bild. Für Essigsäure in der Maisvergärung wurden mittlere Standardfehler von 800 für die Kalibration und 1.000 mg $*$ kg^{-1} für die Validierung ermittelt. Hohe Bestimmtheitsmaße (> 0,9) in der Kalibration werden bestätigten sich in der Validierung unterstützt durch RPD-Werte um 3,5. Der Vorhersage-

fehler der Kalibration aus der Grasvergärung war ähnlich dem aus der Maisvergärung, allerdings fiel das Bestimmtheitsmaß deutlich ab, was sich in der noch verstärkte (Werte < 0,5). Die noch unzureichende Modellbildung bestätigte auch der niedrige RPD-Wert (1,4). Über beide Substrate hinweg, im globalen Modell waren die statistischen Kenngrößen wieder etwas besser als bei alleiniger Grasvergärung.

Für Propionsäure wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Mit Maisvergärung schien die Modellbildung wieder etwas besser als mit Grasvergärung zu sein. Aufgrund des ungünstig strukturierten Datensatzes ließ sich jedoch lediglich eine Kreuzvalidierung durchführen.

Schließlich wiederholten sich die Beobachtungen zur Propion- und Essigsäure für das Essigsäureäquivalent. Reine Maisvergärung ergab deutlich bessere Werte als das globale Modell. Allerdings schien das globale Modell gemessen an Bestimmtheitsmaß und RPD-Wert etwas besser als das zu den Einzelsäuren zu sein.

Die Ergebnisse der on-line Anwendung sind in Tabelle 22 aufgezeigt. Dargestellt sind die über einen Zeitraum von ca. 30 Minuten vorhergesagten Werte der Kenngrößen TS, oTS sowie NH_4-N. Jeder Vorhersagewert (n = 69) wurde über eine Integrationszeit von rund 30 Sekunden erhoben. Die Messdaten waren über den Messzeitraum sehr stabil. Die Variationsbreite der Schätzwerte lag unterhalb der mit der Referenzmethode noch nachweisbaren Unterschiede. Verglichen mit der Referenzmethode schien TS systematisch überschätzt, oTS und NH_4-N eher unterschätzt zu werden.

Tabelle 22: Ergebnisse der on-line Messungen für die Parameter Trockensubstanz (TS), org. Trockensubstanz (oTS) sowie Ammonium (NH_4-N)

	TS [% FM]	oTS [% FM]	NH_4-N [mg kg^{-1}]
Mittelwert (n=69)	9,2	8,4	2.126
Min	9,1	8,3	2.082
Max	9,3	8,5	2.177
SD	0,1	0,1	20
Referenzwert	9,7	7,9	1.920

3.1.7.2 Diskussion

Für die eigenen Untersuchungen konnte teilweise auf bereits bestehende Erkenntnisse aus dem Bereich der Charakterisierung flüssiger Wirtschaftsdünger bzw. Biogasgüllen mittels NIRS zurückgegriffen werden, da deren chemisch-physikalische Struktur der von Gärmaterial landwirtschaftlicher Biogasfermenter ähnelt. So sind einzelne physikalisch-chemische Parameter die sich bereits erfolgreich für Wirtschaftsdünger mithilfe von NIRS-Modellen vorhersagen lassen, ebenfalls für die Prozessüberwachung eines Biogasfermenters von Bedeutung. Hierzu zählen u.a. die Trockensubstanz, die organische Trockensubstanz sowie Ammonium. Eine direkte Übertragbarkeit bestehender Vorhersagemodelle mit dem Ziel einer Prozessüberwachung von BGA ist jedoch i.d.R. nicht möglich, da es hierzu einer Neukalibration bzw. Modellerweiterung bedarf.

Mit dem Ziel einer Prozessüberwachung gelang es Lomborg et al. (2009) am Beispiel einer on-line Laboranwendung unter Verwendung des Substrates Mais, einen Zusammenhang zwischen spektralen Informationen und dem Säuremuster aufzuzeigen. Dieser Zusammenhang wurde für Prozesszustände mit vergleichsweise hohen Konzentrationen an gesamten flüchtigen Fettsäuren von bis zu 22 g L^{-1} dargestellt. Hierbei konnten für die Vorhersagen einzelner Säuren Bestimmtheitsmaße (R^2) um 0,9 erzielt werden. Holm-Nielsen et al. (2007) kamen

ebenfalls in einer on-line Laboruntersuchung bei Verwendung der Substrate Wirtschaftsdünger und Lebensmittelreste zu vergleichbaren Ergebnissen wobei die Gesamtkonzentration flüchtiger Säuren Werte von 35 g L^{-1} überstieg. Jakobi et al. (2009a) zeigten in einer ex-post Zeitreihenanalyse über 500 Tage an einem ausschließlich mit Maissilage betriebenen Praxisfermenter das Potential einer NIRS-Prozessüberwachung im on-line Betrieb auf, wobei befriedigende statistische Modellkenngrößen teilweise bereits bei geringeren Säurekonzentrationen aufgezeigt werden konnten als durch Lomborg et al. (2009) und Holm-Nielsen et al. (2007). Gleichzeitig konnten große Änderungen im Konzentrationsverlauf einzelner Säureparameter mittels NIRS dargestellt werden.

Bei den eigenen Untersuchungen bestätigte die off-line Laborprüfung bestätigte die Eignung der NIRS-Messung für die Schätzung der Parameter TS, oTS, NH_4-N sowie bedingt von Essigsäure. Nachdem für TS und oTS eine globale Kalibration verglichen mit den substratspezifischen Kalibrationen nicht zu Lasten der Genauigkeit ging, ist davon auszugehen, dass diese Parameter auch in der Praxis anlagenübergreifend dargestellt werden können. Trotz einer Erhöhung der Modellrobustheit durch die Einbeziehung beider Substrate, blieben der mittlere Vorhersagefehler sowie das Bestimmtheitsmaß gleich. In der Interpretation des Bestimmtheitsmaßes ist die Wahl des Konzentrationsbereiches zu berücksichtigen. Bei einer Erweiterung des Modellraumes kann sich r^2 erhöhen, bei gleichzeitig konstantem Vorhersagefehler. Dies ergibt sich aus dem Verhältnis der Varianz der Konzentrationsveränderungen der durch die NIRS-Vorhersage erklärt wird und der Gesamtvarianz der Konzentrationsveränderungen des Datensatzes. Der im Modell abgebildete Konzentrationsbereich für TS (6 – 13 %) und oTS (4,5 - 11,5 %) deckt in der Praxis typische Werte für Fermenter und Nachgärer ab. Wichtig ist noch der breite Temperaturbereich (15 - 40°C) für den die erstellten Kalibrationen Gültigkeit besitzen. Daraus resultiert ein breites Anwendungspotential insbesondere im off-line Betrieb, da Gärrestproben mit unterschiedlichsten Temperaturen vermessen werden können.

Obwohl auch für NH_4-N sehr gute Ergebnisse vorliegen, differenzieren diese ein wenig je nach der Größe des Modellraumes. So erzielte die Modellierung spezifisch für Maisvergärung sowohl in der Kreuzvalidierung als auch der Test-Set Validierung den geringsten Vorhersagefehler von 200 mg NH_4-N kg^{-1} FM. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine ausreichende Zahl an Proben vorhanden war, um diese Kenngröße korrekt zu kalibrieren. Für die Grasvergärung allein, und noch mehr über beide Substrate hinweg, erhöhte sich der mittlere Vorhersagefehler um bis zu 50% bei gleichzeitiger Zunahme des Bestimmtheitsmaßes. Dieser Anstieg von r^2 ist auf die Unterschiede in der Größe des Modellraumes zurückzuführen. Wie in Tabelle 1 ersichtlich, weist insbesondere das globale Modell einen im Vergleich zum Maismodell breiten Konzentrationsbereich von NH_4-N von 1,3 bis 6,3 g kg^{-1} auf. Die Erhöhung des Vorhersagefehlers im globalen Modell im Vergleich zur Maisvergärung könnte damit darauf zurückzuführen sein, dass aufgrund der inhomogeneren Matrix der Proben aus Grasvergärung, das spektrale Signal für die Vorhersage der Ammoniumkonzentration, weniger deutlich hervortrat.

Als problematisch in der Kalibrierung aller Säureparameter erwies sich der diesbezüglich stark gerichtete Probensatz. Der überwiegende Teil an Proben wies vergleichsweise geringe Säurekonzentrationen auf. Ein wichtiges Kriterium für eine erfolgversprechende Kalibration besteht jedoch darin, den zu modellierenden Vorhersagebereich gleichmäßig mit Proben abzudecken. Diesem Anspruch konnte im Rahmen dieser Arbeit nur bedingt entsprochen werden. So fehlte beispielsweise für Essigsäure eine ausreichende Anzahl von Proben im Konzentrationsbereich von 1,3 bis 6,0 g kg^{-1}. Dieser ist gerade für die spätere Praxisanwendung von Bedeutung. Die Aufteilung der Proben in einen Kalibrier- sowie Validierdatensatz zur Test-Set-Validierung, verstärkt theoretisch das Problem zusätzlich. Nachdem die Änderung

der statistischen Maßzahlen von Kreuz- zur Test-Set-Validierung für die Säureparameter aber vergleichsweise gering war (

Tabelle 21), scheint die Frage der Probenmatrix (z.B. Mais- zu Grasvergärung) insgesamt von größerer Bedeutung zu sein. Deutlich höhere Vorhersagefehler an Proben aus Grasvergärung im Vergleich zur Maisvergärung könnten damit, wie bereits angemerkt (s. 2.1.6.1), z.B. durch den stark wechselnden Anteil an Wirtschaftsdüngern in den Proben aus Grasvergärung verursacht sein. Unterschiede zwischen den statistischen Kenngrößen der Kalibration und der Kreuzvalidierung weisen darauf hin, dass die Modelle noch stark von wenigen Proben beeinflusst werden und somit bisher nicht robust sind. Insoweit bleibt festzuhalten, dass eine Kalibration der Säureparameter unbedingt die Anforderungen an eine gleichmäßige Verteilung der Kalibrierproben im Modellraum erfüllen muss. Da die Säurekonzentration sowohl in ihrer Quantität als auch ihrer qualitativen Zusammensetzung nur bedingt steuerbar ist, ist dieser Anspruch praktisch primär nur über eine ausreichende Untersuchungszeit realisierbar.

Auch mag der bewusst breit gewählte Temperaturbereich der Proben zu einer Erhöhung des Vorhersagefehlers für die Säureparameter geführt haben. Aufgrund der geringen Konzentrationen der Säuren von unter 1%, könnte sich dieser Temperatureffekt stärker negativ ausgewirkt haben, als bei den Parametern TS und oTS. Die spektralen Änderungen, hervorgerufen durch Änderungen in der Säurekonzentration sind gering verglichen mit der temperaturbedingten Variation. Anders als für den Parameter NH_4-N dessen Aminogruppe im NIR-Bereich vergleichsweise spezifisch absorbiert, könnten die Carboxylgruppen der Säuren sowie deren OH-Gruppen stärker von Überlagerungen durch die OH-Moleküle des Wassers betroffen sein. Die stark temperaturabhängige Absorption dieser funktionellen Gruppen verdeckt darüber hinaus möglicherweise bessere Zusammenhänge zwischen spektraler Signatur und dem Säuremuster.

Nichtsdestotrotz zeigt sich im Detail am Modell für Essigsäure mit r^2 >0,9 das grundsätzliche Potential und deckt sich mit dem in der Literatur berichteten Erkenntnissen (z.B. Jacobi et al. 2009a, b). Aktuell profitiert auch das hier vorgestellte Modell noch von einem für die praktische Anwendung vergleichsweise hohen Konzentrationsbereich (bis über 10 g $*$ kg^{-1} Frischmasse). Dadurch sinkt die Gesamtvarianz der Referenzwerte der Validierproben im Vergleich zu jenem Anteil an Varianz der Referenzwerte, der durch das NIRS-Modell erklärt wird, was das R^2 erhöht. Unterschiede im Bestimmtheitsmaß zwischen den einzelnen Modellen lassen sich zu guten Teilen durch eben diesen Effekt erklären.

Wie bereits aufgezeigt, wurde eine intensivere Bearbeitung der on-line Fragestellungen durch Probleme in der Messaufzeichnung verhindert. In der Zeit, in der Messungen möglich waren, musste der Fermenter SB1 unter möglichst konstanten Bedingungen betrieben werden. Insofern können die hier dargestellten Ergebnisse lediglich einen eingeschränkten Rahmen aufzeigen. Wie am Beispiel in Tabelle 3 aufgezeigt, war die Reproduzierbarkeit im kurzzeitigen Dauerbetrieb sehr gut. Zwar war im Vergleich zu dem Referenzwert ein off-Set erkennbar, jedoch spielt dieser für die Anwendbarkeit einer on-line Prozesskontrolle eine eher untergeordnete Rolle. Vielmehr ist es zuerst wichtig, die relativen Veränderungen über die Zeit mittels NIRS-Vorhersage aufzeigen zu können. Dazu bedarf es jedoch eines dynamischen Fermenterbetriebes, der hier noch nicht dargestellt werden konnte.

Zusammen mit den eigenen Ergebnissen leisten Jacobi et al. (2009b) einen anschaulichen Überblick zu bisherigen Erkenntnissen für die Vorhersage der Parameter Flüchtige Gesamtfettsäuren, Essig- sowie Propionsäure. Inwieweit damit eine der Praxis genügende Anwendung in Form eines „Frühwarsystems“ besteht, bedarf - auch unter Berücksichtigung möglicher praxisrelevanter Einflussfaktoren wie etwa einer Änderung in der Fermenterfütterung – sicherlich noch weiterer Untersuchungen.

3.2 Mikrobiologie und Molekularbiologie

3.2.1 Inokulation mit cellolytischen Inokula

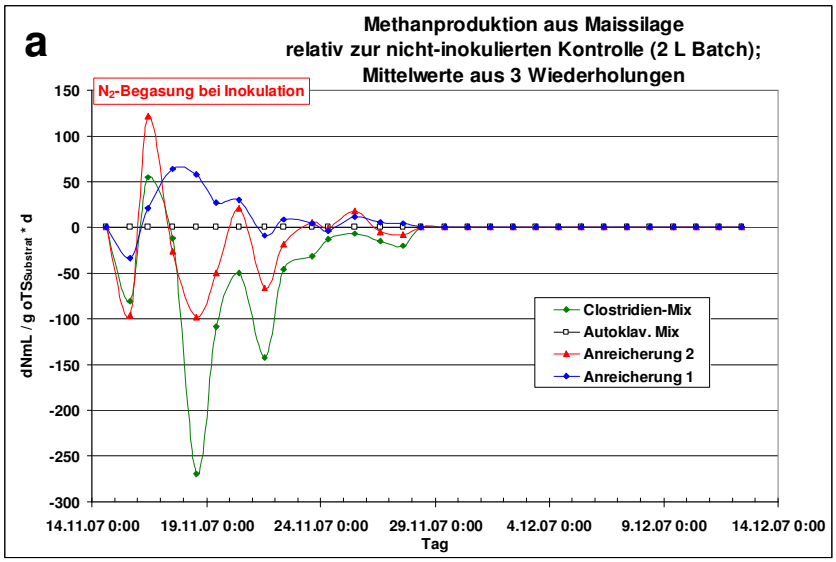
3.2.1.1 Maissilage in thermophiler mono-Vergärung

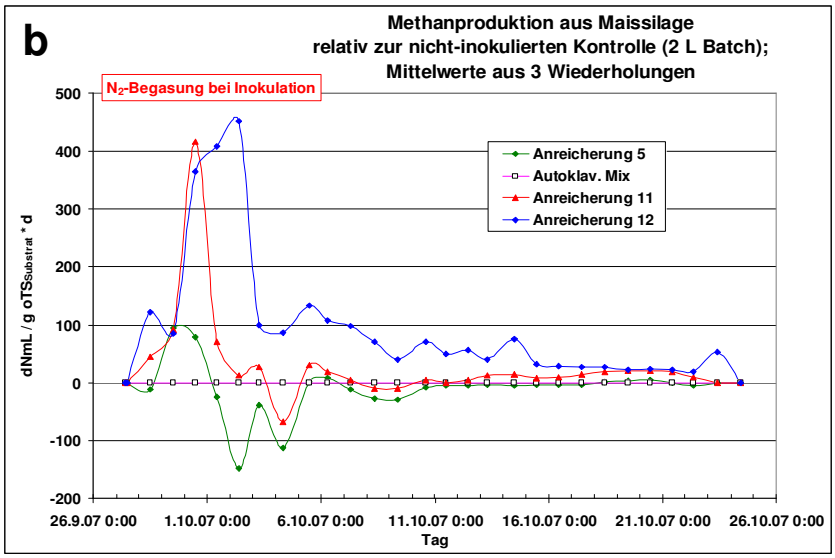
Die Versuche zur Steigerung der spezifischen Methanproduktion wurden in enger Abstimmung mit dem Partner TUM-MB durchgeführt, teilweise in direkter Zusammenarbeit am Versuchsobjekt.

Die von Partner TUM-MB gelieferten thermophilen Inokula wurden hinsichtlich Intensivierung der Methanproduktion aus Maissilage bei 55°C teilweise in 2 L Batch-Systemen des LfL-ILT gescreent (Abbildung 45), teilweise wurden sie den semikontinuierlichen 6 L Laborsystemen an TUM-SWW (Abbildung 2) und teilweise den 32 L Durchflusssystemen des LfL-ILT (Abbildung 3) zugesetzt. Dabei wurde der Zusatz so gewählt, dass sich im Fermenter etwa 10^6 KBE Inokulum $*$ mL^{-1} aktives Fermentervolumen befanden. Die Inokula waren bei der Inokulation im Status der (späten) exponentiellen Wachstumsphase. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz mit autoklaviertem Inokulum ("Autoklav. Mix").

Vorlage war 50 % Fermenterinhalt-Mischung aus den thermophilen 32 L Durchflusssystemen (s. 3.1.2.3). Zur Abklärung der Frage, ob Luftzutritt beim Inokulieren die Kultur schädigt, wurde die Inokulation ohne bzw. komplett unter Stickstoff (Abbildung 45) durchgeführt.

Die in Abbildung 45a (und Abbildung 45b) gegenüber Abbildung 45c erkennbare initial (in den ersten 4 Tagen) höhere spezifische Methanproduktion scheint auf dem Ansetzen des Tests unter N_2-Atmosphäre zu beruhen. Im Vergleich deutet sich in Abbildung 45b an, dass die Geschwindigkeit des Abbaus und die Methanausbeute aus zugeführter oTS in der Maissilage durch Inokulation mit Anreicherungen 11 und 12 unter (auch bei Inokulation) methanogenen Bedingungen gesteigert werden kann. Anreicherungen 11 und 12 wurden daher in Wiederholung (Abbildung 46) getestet.





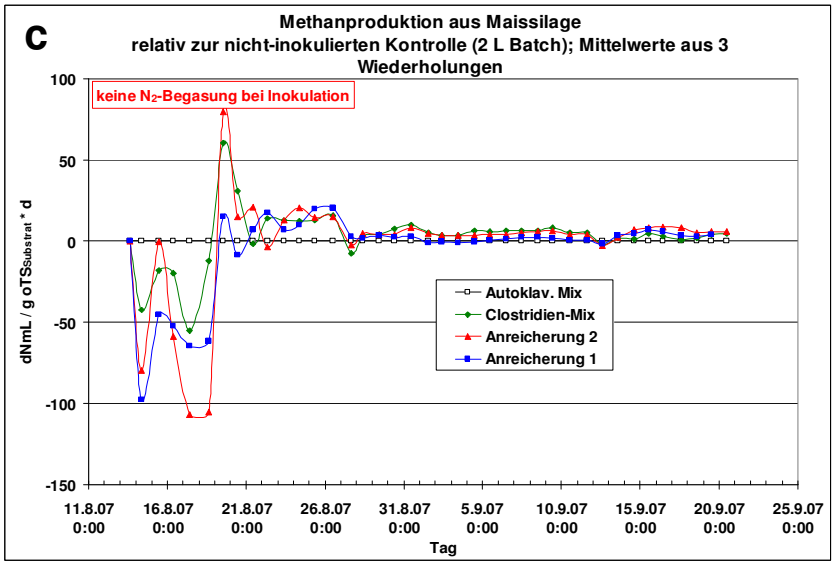


Abbildung 45: Spezifische Methanproduktion (Differenzbetrag) im thermophilen Batch-Betrieb aus Maissilage (mono); Einfluss verschiedener cellulolytischer Inokula; a) und b) beim Ansatz unter N_2-Atmosphäre und c) beim Ansatz mit Luftzutritt

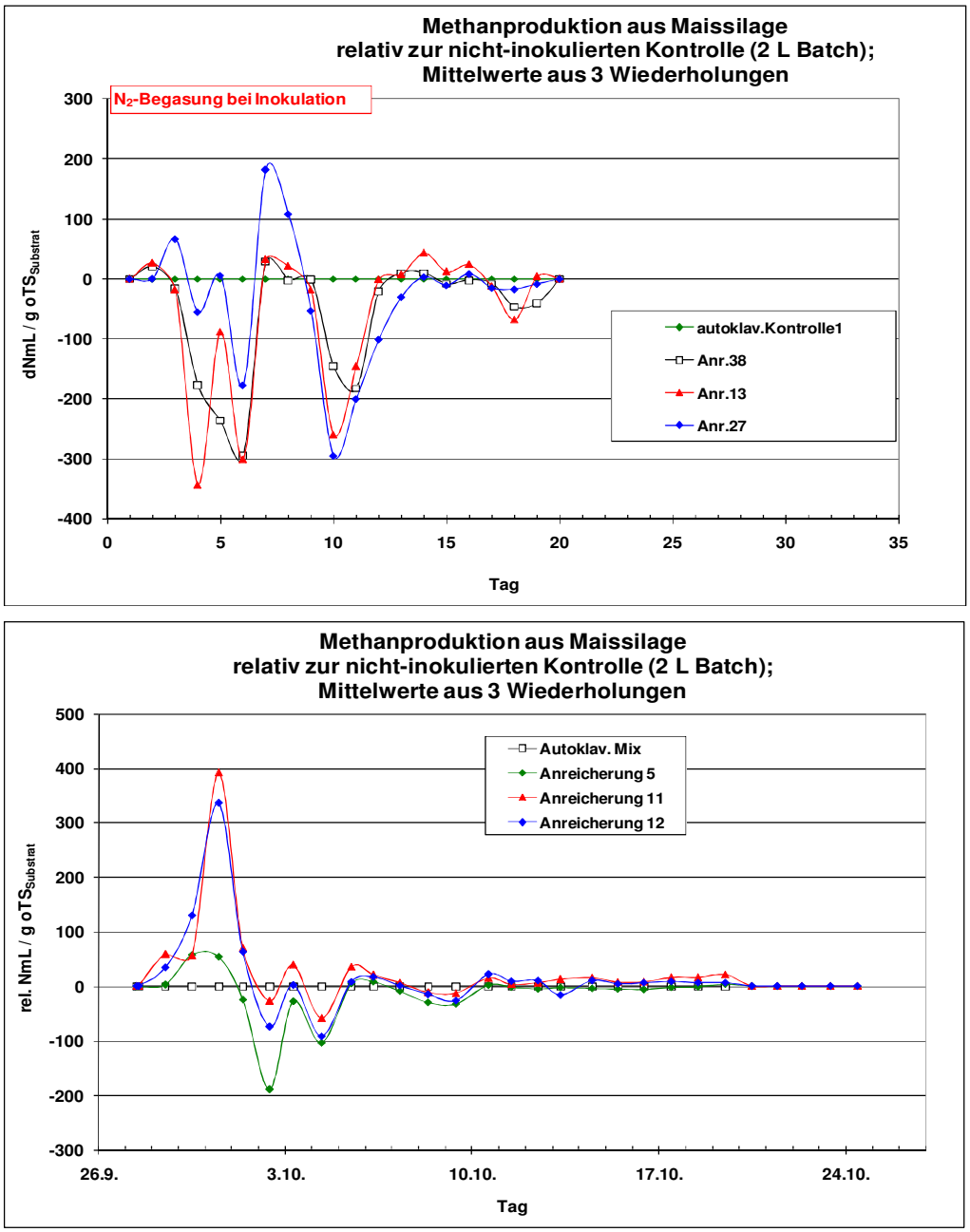


Abbildung 46: Differenz der Methanerträge zur Kontrolle bei Zugabe definierter Inokula in 2 L Batchversuchen; Mais Mais-mono-Betrieb, thermophil

Bei Inokulationsversuche mit den Anreicherungen 38, 13, 27, 27, und 5 konnten im Batchversuch keine eindeutigen Mehrerträge gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Deswegen wurden diese Inokula im Upscaling nicht weiter eingesetzt. Anreicherungen 11 und 12 wurden programmgemäß im Rahmen des Upscaling im auch im Durchfluss evaluiert (s. Abbildung 47, Abbildung 49).

Bei der Inokulation von Fermentern (Mais-thermophil) an der LfL mit Anr. 11 und Anr. 12 wurde bei inokulierten Fermentern eine signifikant stärkere Abnahme der Methanproduktivität als bei dem Kontrollfermenter festgestellt ($p < 0{,}01$).

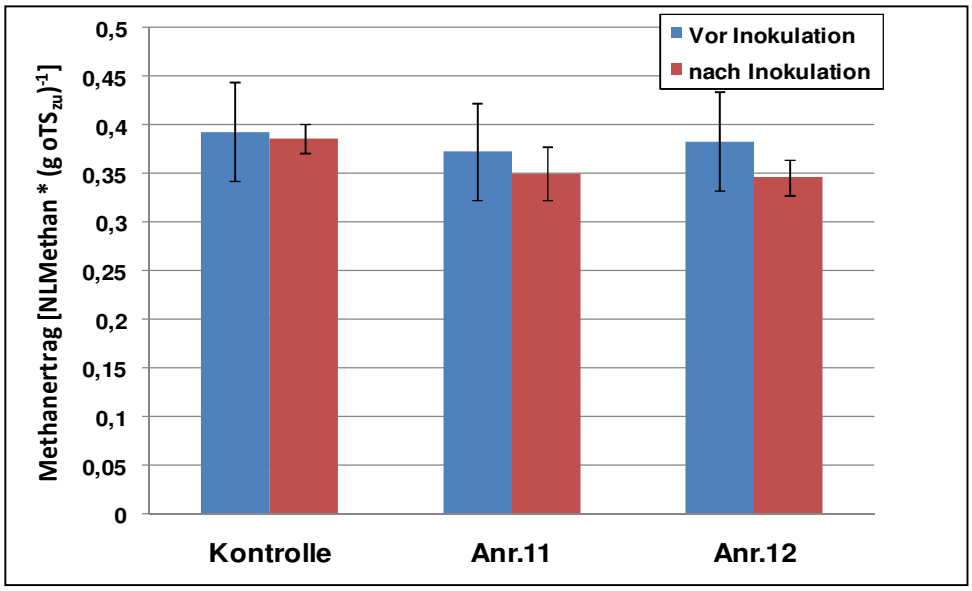
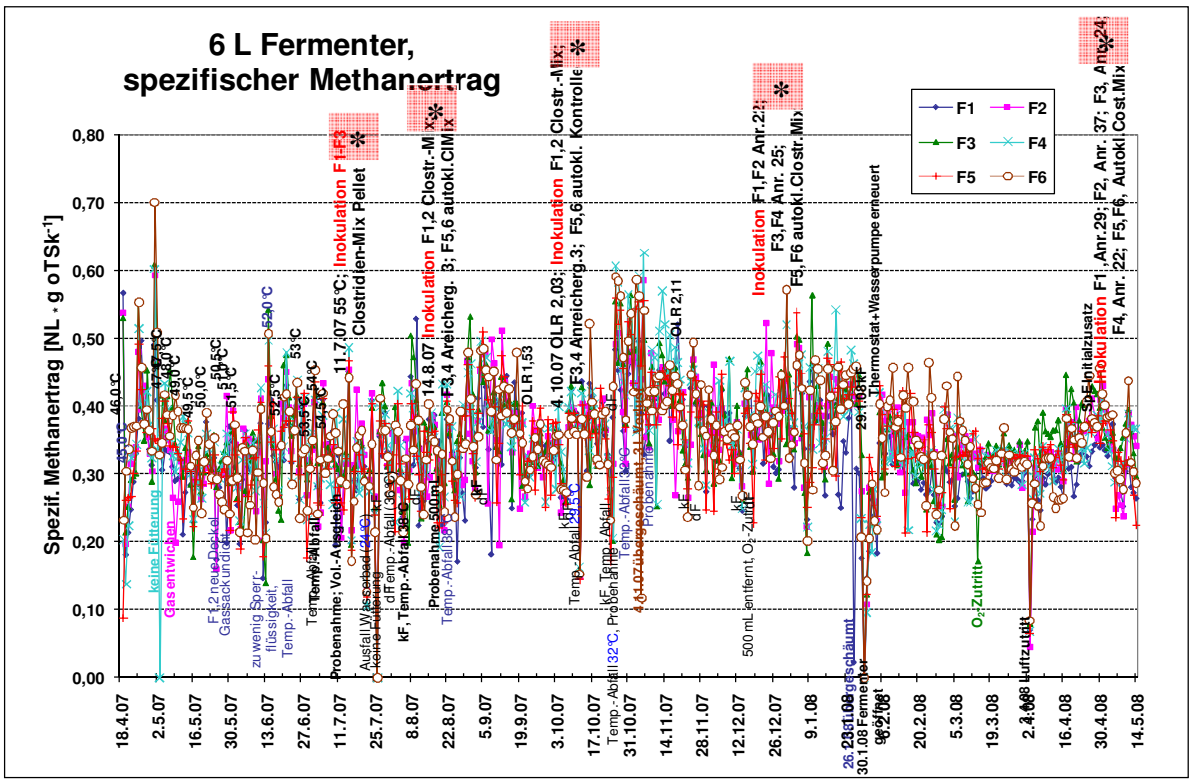


Abbildung 47: Methanertrag bei Fermentern mit Zusatz der Anreicherungen 11 und 12 (32 L Durchfluss) und der autoklavierten Kontrolle vor und nach der Inokulation

Nicht alle seitens der TU-MB gelieferten Kulturen konnten im Batch gescreent werden. Deshalb wurden auch Inokulationsversuche in den 6 L-Fermentern der TUM-SWW und/oder in den 32 L Durchflussfermentern an der LfL getestet.

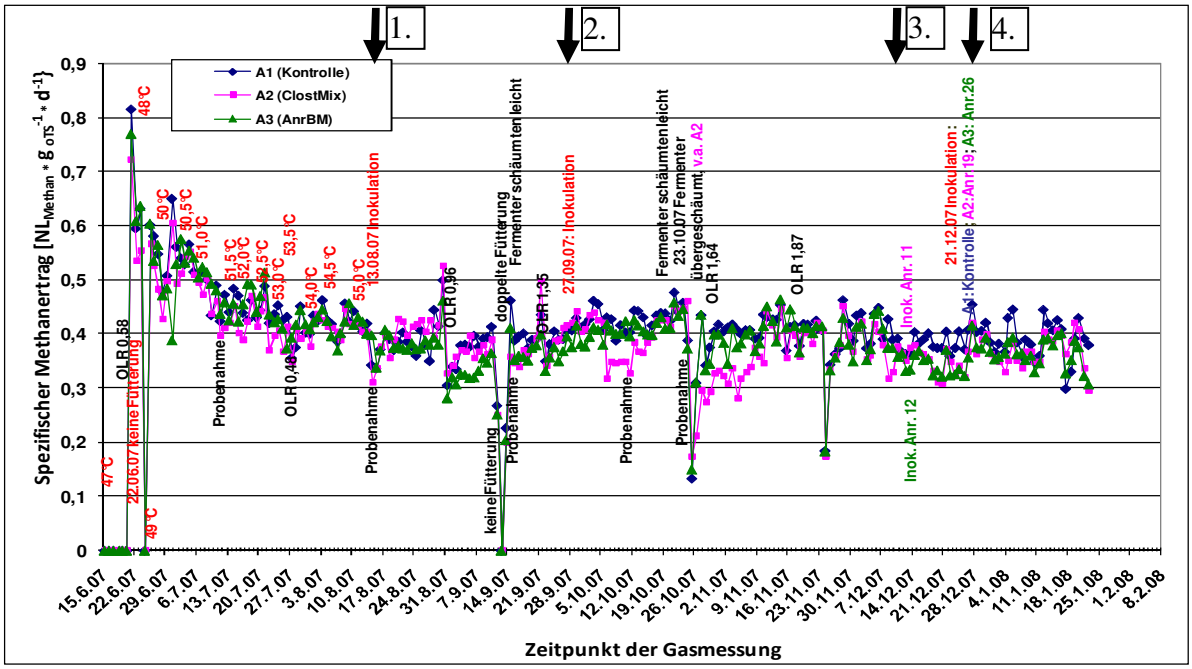
Im semikontinuierlichen Betrieb (6 L Fermenter an TUM-SWW, Abbildung 48) konnte durch Inokulation mit Anreicherung 3 und der Clostridien-Mischung (Clostr.-Mix) keine Steigerung der spezifischen Methanproduktion beobachtet werden. Die Clostridien-Mischung zeigte auch in den 32 L Durchfluss-Fermentern an LfL-ILT keine nennenswerte Steigerung der spezifischen Methanproduktion. Auch Anreicherung BM (AnrBM) ergab im Durchflussbetrieb in den 32 L Durchfluss-Fermentern an LfL-ILT keine Steigerung der spezifischen Methanproduktion (Abbildung 49). Dabei wurde vom Partner TUM-MB teilweise noch mehrere Wochen nach Inokulation DNA der Inokula nachweisen (Schwarz, 2010). Dies ist jedoch kein sicherer Beweis für das Überleben der Inokula bis zum Zeitpunkt der Messung.

Zur statistischen Absicherung von Einflüssen der Zugabe cellulolytischer Kulturen in die Fermenter A1 - A3 (thermophil Mais) wurden multiple Mittelwertsvergleiche nach Friedman, gefolgt von Nemenyj, durchgeführt. Es wurden dabei in allen Fällen gegenüber den Kontrollen zwar nur geringfügig aber signifikant niedrigere spezifische Methanerträge festgestellt ($p < 0{,}05$).



* Zusatz cellulolytischer Inokula

Abbildung 48: Einfluss cellulolytischer Inokula auf die spezifische Methanproduktion im semikontinuierlichen thermophilen Betrieb aus Maissilage (mono-Vergärung).



Nummerierte Pfeile zeigen Inokulationen an

Abbildung 49: Übergang von 3 mesophil Mais-mono betriebenen 32 L Durchflussfermentern in den thermophilen Betrieb und Test von 6 verschiedenen hydrolytisch/cellulolytischen Inokula

3.2.1.2 Grassilage in thermophiler Monovergärung

Ein weiterer Versuch wurde in den 6 thermophil semikontinuierlich mit Grassilage betriebenen 6 L Fermentern an TUM-SWW mit einer seitens Partner TUM-MB selektierten thermophilen hydrolytischen Kultur (#41) als Inokulum durchgeführt (3.1.2.3). Dabei war die Startbiozönose (Fermenterinhalt) an mesophile (38°C) mono-Gras-Vergärung angepasst und wurde übergangslos auf 55°C gebracht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt.

Der Anstieg der Methanbildung auch in den Fermentern F1 und F2, deren Inhalt autoklaviert war, kann seine Ursache darin haben, dass das Inokulum von Partner TUM-MB Methanogene mitbrachte oder dass die Autoklavierung die Fermenterinhalte nicht vollständig sterilisieren konnte. Letzteres ist allerdings als Ursache unwahrscheinlich, da in einem anderen Experiment (3.2.1.3) die gleichermaßen autoklavierten Fermenterinhalte (praktisch) keine methanogene Aktivität mehr aufwiesen.

Ein Hinweis dafür, dass der Zusatz des cellulolytischen Inokulums #41 die Leistung des Fermenterinhalts veränderte, konnte auf Basis der Bestimmung des spezifischen Methanertrags nicht gefunden werden. Eine eventuell vorliegende Hemmung der Hydrolyse (vgl. 3.1.2.6) konnte also durch die Inokulierung nicht vermindert werden.

3.2.1.3 Grassilage in mesophiler mono-Vergärung

Zunächst wurden den 6 semikontinuierlich betriebenen 6 L Fermentern an TUM-SWW ein Versuch mit einer seitens Partner TUM-MB selektierten mesophilen hydrolytischen Kultur (N2) als Inokulum in Varianten (frischer bzw. autoklavierter Fermenterinhalt und frisches bzw. autoklaviertes cellulolytisches Inokulum N2) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

Die mit frischer Kultur N2 inokulierten autoklavierten Fermenterinhalte F1 und F2 versäuerten sofort (Abfall des pH-Werts von 7,6 auf 5,3; starke Fettsäureproduktion; FOS/TAC > 6), und es fand keine nennenswerte Methanproduktion statt (Abbildung 32). Demnach war das Inokulum N2 hydrolytisch/acidogen/acetogen hochaktiv. Die (partielle) Zerstörung der Zellmatrix beim Autoklaviervorgang kann auch die Verfügbarkeit der Zellinhaltstoffe für die zugesetzte Anreicherung N2 verbessert und damit die Säurebildung weiter intensiviert haben. Da die Fermentermikroflora mit den Methanogenen aber durch das Autoklavieren offenbar abgetötet wurde, konnten die gebildeten Säuren nicht abgebaut werden und reicherten sich in den Fermentern F1 und F2 enorm stark an.

Das Inokulum steigerte aber die Methanproduktion gegenüber der Leistung des frischen Fermenterinhalts nicht, zwischen der inokulierten und der nicht-autoklavierten Kontrollvariante konnte kein Unterschied gefunden werden (F5, F6 gegenüber F4 in Abbildung 32).

Um zu evaluieren, ob der weitgehend manuelle semikontinuierliche Betrieb der 6 L Fermenter (Fütterung und Mischen 1x täglich; Füllstandskorrektur etwa 14-tägig) Grund der suboptimalen Methanisierung der organischen Substanz und der Erfolglosigkeit der Inokulierung mit Kultur N2 gewesen sein kann, wurden die Fermenterinhalte programmgemäß in 32 L Fermenter der LfL-ILT (Fermenter H1, H2) transferiert und mit dem dortigen Management (typischerweise Fütterung: 1x täglich; Rührintervall: 10 min Rühren bei 20 upm, 3 min Pause; Füllstandsüberprüfung tägl., ggf. Korrektur) weitergeführt. Fermenter H2 wurde mit aktiver Kultur N2 (4 L; $> 10^6 * \text{KBE mL}^{-1}$) und Fermenter H1 mit dergleichen Menge autoklavierter

Kultur N2 inokuliert bzw. versetzt. Abbildung 50 zeigt die Ergebnisse für den spezifischen Methanertrag und die (errechneten) freien Ammoniakgehalte.

Nach der Zugabe der Kultur N2 in den Fermenter H2 (Abbildung 50, Abbildung 51), wurde gegenüber dem Kontrollreaktor H1 nach paarweisen Vergleichen (nach Wilcoxon) ein signifikant geringerer ($p < 0{,}05$) spezifischer Methanertrag gemessen. Dabei lagen die Abweichungen zwischen dem inokulierten und nicht-inokulierten Fermenter deutlich über den üblicherweise auftretenden Unterschieden zwischen Fermentern mit gleicher Behandlung (Abbildung 50).

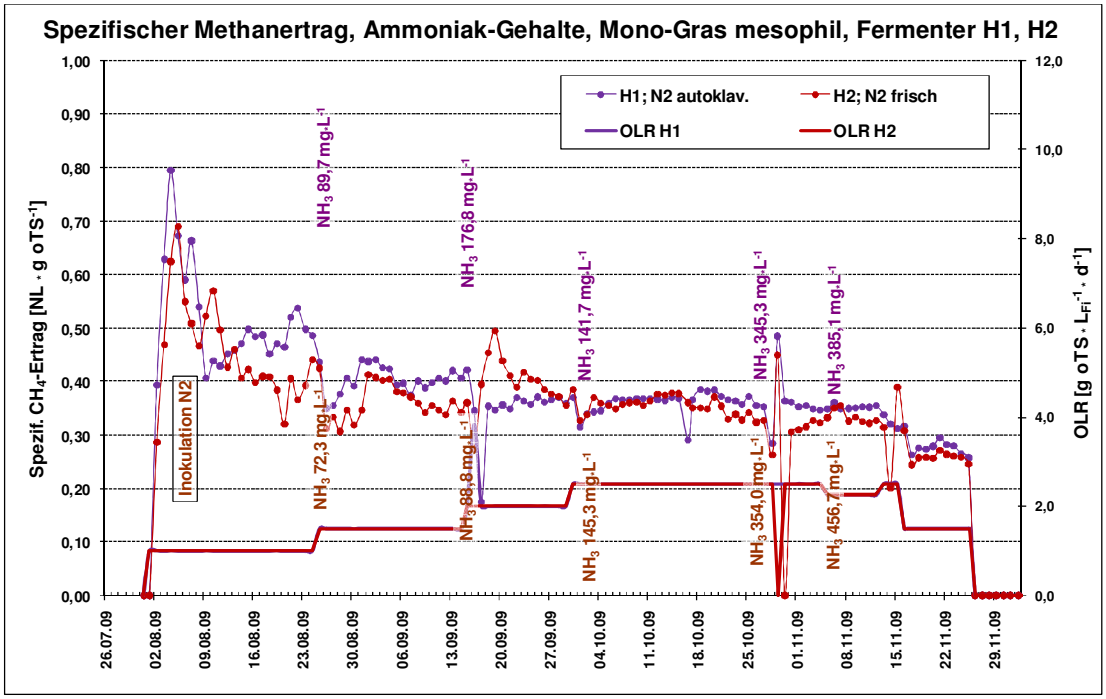


Abbildung 50: Verlauf des spezifischen Methanertrags und Einfluss der Anreicherung N2, 32 L Durchflussfermenter LfL-ILT, Gras mesophil

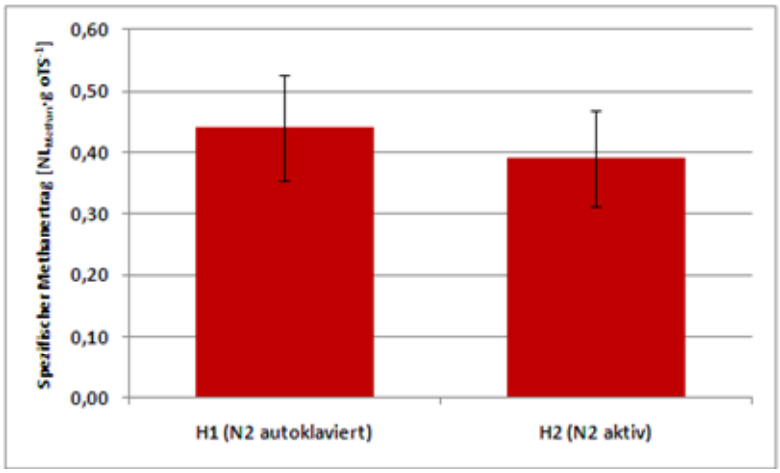


Abbildung 51: Einfluss der Anreicherung N2 auf den spezifischen Methanertrag, Grassilage mesophil, 32 L Durchflussfermenter LfL-ILT

Nach der Adaptierungsphase und Äquilibrierung stabilisierte sich der Methanertrag der Fermenter H1 und H2 auf ca. 0,35 NL Methan * g oTS^{-1} (Abbildung 50). Dabei konnte die OLR auf etwas über 2,5 g oTS * L_{Fi}^{-1} * d^{-1} gesteigert werden, allerdings nahmen auch die (errechneten) Ammoniak-Gehalte auf etwa 400 – 500 mg * L_{Fi}^{-1} zu (vergleiche Abbildung 38). Solche Werte werden in der Literatur vielfach bereits als toxisch für den Biogasprozess beschrieben. Koch et al. (2010) und Andrade et al. (2009a; 2009b) geben hier einen guten Überblick. Die Ergebnisse bestätigen, dass sich die Methanisierungseffizienz der mesophilen Mono-Gras-Vergärung durch verfahrenstechnische und Prozessmanagement-Maßnahmen etwas verbessern lässt, dass der Prozess aber labil ist. Es muss damit gerechnet werden, dass sich bei den gegebenen Rahmenbedingungen etwa nach 5 Monaten toxische Effekte einstellen.

Hinsichtlich der Prozessführung ohne weitere Eingriffe lässt sich festhalten, dass die mesophile Monovergärung von Grassilage insbesondere im Grenzlastbereich deutlich stabiler als die thermophile ist. Die Ergebnisse deuten an, dass toxische Effekte von NH_3 (Entkoppler der ATP-Synthese) bei höherer Temperatur ausgeprägter sind und alle Schritte der Biogasproduktion, also *Bacteria* und (methanogene) *Archaea*, betreffen können.

3.2.1.4 Maissilage in mesophiler Monovergärung

Wegen der bisherigen Ergebnisse, dass die gelieferten Inokula den natürlichen Prozess nicht verbessern konnten, sollte im vorliegenden Experiment eine Sporensuspension der hydrolytisch/cellulolytischen Anreicherung #41 getestet werden. Beim Vergleich das Gasertrags von mesophilen Mais-mono-Fermentern die nicht bzw. mit der cellulolytischen, sporulierten Kultur #41 inokuliert wurden, ergaben sich Unterschiede im spezifischen Biogasertrag nach paarweisen Vergleich ($p < 0{,}01$). Die Methanproduktionsrate war im inokulierten Fermenter etwas geringer (Abbildung 52).

Überlagernd (Abbildung 53) kam es im Versuchszeitraum zu einer stetigen Abnahme der Gasproduktion. Gleichzeitig stiegen in beiden Fermentern die FOS/TAC-Werte und die Fettsäuregehalte (nicht dargestellt) an. Das zugefügte Inokulum konnte somit die Biogas- und Methanbildung nicht verbessern und Versäuerung der Fermenter nicht lindern.

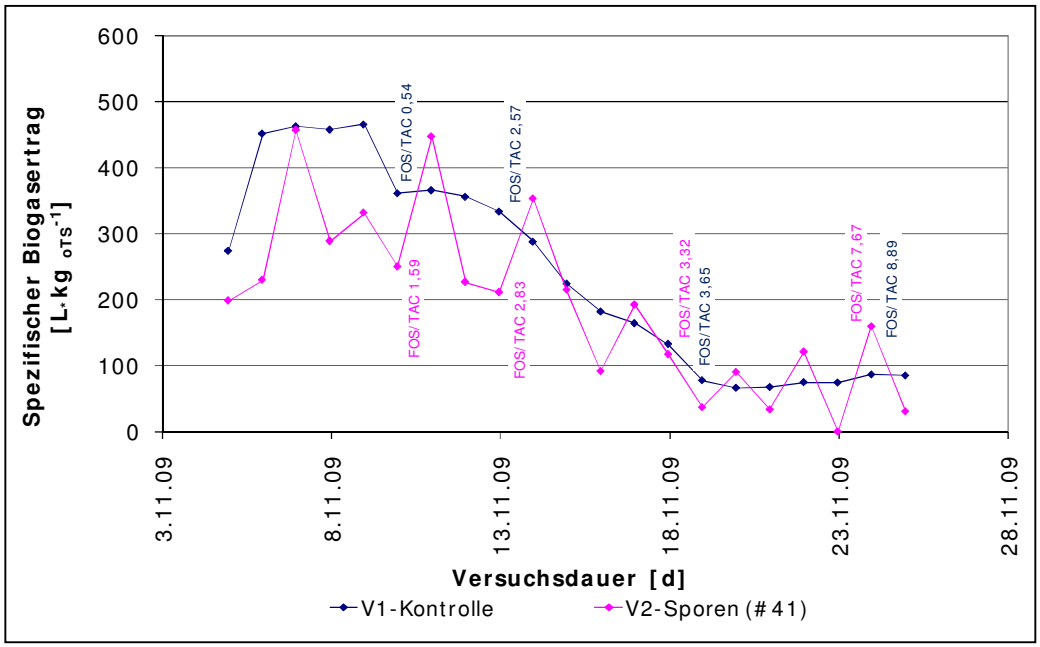


Abbildung 52: Verlauf des spezifischen Biogasertrags im Fermenter mit Inokulation von Sporen der Anreicherung #41 gegenüber der Kontrolle (autoklavierte Kultur #41)

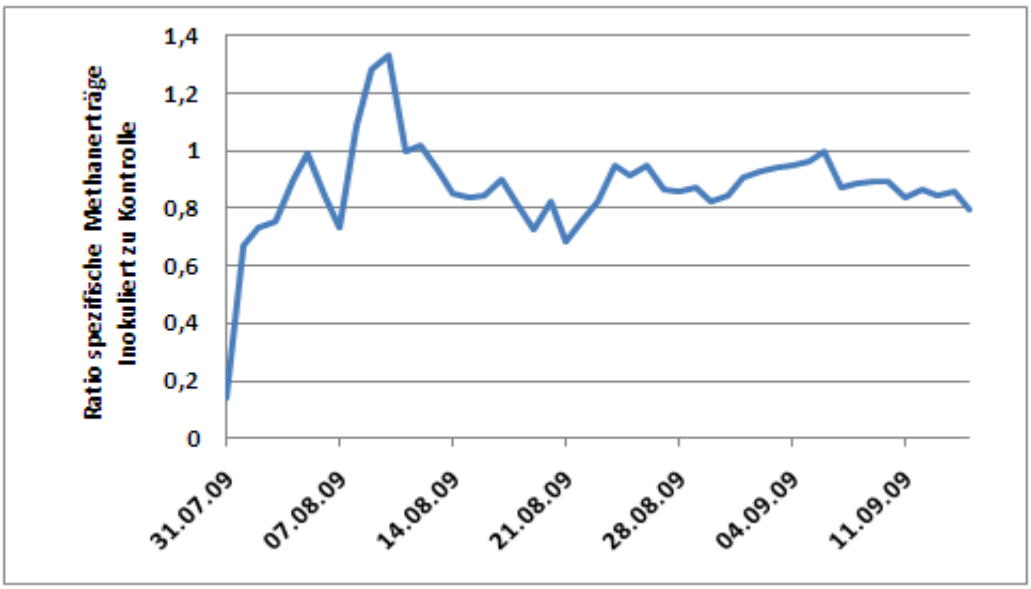


Abbildung 53: Verhältnis zwischen den spezifischen Methanerträgen des beimpften Fermenters und der Kontrolle (Reaktoren V1, V2; Mais-mesophil)

3.2.1.5 Diskussion: Inokulation mit hydrolytisch/cellulolytischen Inokula

Ergebnisse bisheriger Arbeiten (z.B. Bagi et al., 2007; Nielsen et al., 2007; Weiß et al., 2009) zur Bioaugmentation des Biogasprozesses sind sehr unterschiedlich ausgefallen. Hier besteht offenbar noch erheblicher Forschungsbedarf, die Mechanismen zu klären.

In keinem der im Rahmen dieses Teilvorhabens durchgeführten Versuche mit Zugabe von hydrolytisch/cellulolytischen Inokula konnte eine Steigerung des spezifischen Methanertrags festgestellt werden. In manchen Ansätzen ergab sich sogar eine (geringfügige) Leistungsminderung. Ein solches Ergebnis erzielten auch auch Reuter und Schmack (2010) mit einem der hydrolytisch/cellulolytischen Inokula. Dabei waren die hydrolytisch/cellulolytischen Kulturen bzw. Anreicherungen nach den Ergebnissen von Schwarz (2010) hochaktiv, und auch im Versuch mit Inokulation durch Anreicherung N2 eines totautoklavierten Fermenterinhalts (Abbildung 32, Kap. 3.1.2.4) zeigte sich deren ausgeprägte acidogene Aktivität.

Die Ergebnisse lassen schließen, dass der autochtone Prozess mit Mais- bzw. Grassilage im Durchflussbetrieb, wenn keine Inhibierung vorliegt, sehr effizient funktioniert und durch einen Zusatz von hydrolytisch/cellulolytischen Kulturen bzw. Anreicherungen praktisch nicht mehr verbessert werden kann. Eine Ursache kann sein, dass die Lignocellulosefibrillen wegen der ständigen Zufuhr leicht metabolisierbarer organischer Substanz nachrangig oder nicht angegriffen werden. Hierüber könnten Batchversuche mit spezifischem Einsatz unterschiedlich metabolisierbarer Fraktionen Aufschluss geben.

Ähnlich wie für die Ergebnisse aus den Enzymversuchen diskutiert, ist hinsichtlich einer möglichen Leistungssteigerung zu bedenken, dass bei optimiertem einphasigem Betrieb bereits 70 – 80 % des gefütterten C aus Maissilage in die Gasphase überführt wurden. Bei einem Ligninanteil von knapp 10 % ist damit eine Steigerung des Methanertrags aus Maissilage durch Inokulation mit mikrobiellen Inokula kaum noch möglich.

Damit bietet sich an, möglichst reine Substratströme zu inokulieren und ggf. in einem Kaskadensystem fraktioniert einer energetischen und/oder stofflichen Nutzung zuzuführen. Weiterhin wäre zu versuchen, sich im Prozess ergebende Limitierungen oder Toxizitäten durch Zusatz spezifisch adaptierter Biozönosen zu kompensieren. Die Selektion von Biozönosen, die beispielsweise gegen eine hohe Ammoniakkonzentration resistent sind, ist eine Herausforderung für die Biotechnologen. Beispielsweise wären solche Inokula ideal geeignet, stickstoffreiche Substrate wie Grassilage effizienter energetisch zu nutzen.

3.2.2 Molekularbiologie

3.2.2.1 Nukleinsäure-Extraktion und Entwicklung der Primer-/Nachweissysteme

Auf Grundlage eines für Gülleproben optimierten DNA-Extraktionsprotokolls (Lebuhn et al., 2003) wurde ein Protokoll für NawaRo-Fermenterproben weiterentwickelt, etabliert und mit den Kooperationspartnern kommuniziert. Es beinhaltet das Bio101 FastDNA® SPIN Kit for Soil, wobei vorgeschaltete Waschschritte mit einer 0,85 %-igen Kaliumchloridlösung nötig sind, um wasserlösliche Substanzen, insbesondere Huminsäuren, zu entfernen. Zusätzlich erfolgte ein Waschschritt der Beads nach dem Bead-beating, der die Extraktionseffizienz verbessert. Mit den Modifikationen konnte die Wiederfindungsrate auf über 90 % optimiert werden (Lebuhn et al., 2003; Garcés et al., 2005).

Die Extrakte wiesen bei 260 nm zu 280 nm ein Absorptionsverhältnis zwischen 1,5 - 2,0 auf. Das Absorptionsverhältnis von 260 zu 230 nm bewegte sich im Bereich von 0,02 - 0,03. Dies wies zwar auf eine Koelution von Guanidinium-Isothiocyanat hin, wegen der sehr guten PCR-Amplifizierbarkeit (Abbildung 68) hatte dies offenbar aber keine negativen Auswirkungen für die anschließenden Analysen. Die Absorptionsmessung bei 320 nm, wo vor allem Huminsäuren absorbieren, ergab Werte unter 0,04. Real-time PCR Analysen mit Verdünnungsreihen von Fermenterproben zeigten teilweise eine Inhibierung der PCR von unverdünnten Proben. Eine 1:10 Verdünnung der DNA führte durchwegs zu einer etwa 100 %igen Effizienz der PCR (optimale Steigung in der Verdünnungsreihe). Die Ergebnisse von unverdünnten Extrakten wurden daher nur verwendet, wenn die Verdünnungsreihenanalyse Abbildung 68) deren Verwertbarkeit bestätigt hatte.

Zur Detektion möglichst aller methanogenen Archaeen wurde ein auf dem Stand in der GenBank zu Projektstart basierendes *mcrA*-PCR-System entwickelt. Es war bioinformatisch so maßgeschneidert, dass es in silico mit allen *mcr*A-Einträgen, also auch mit Amplicons aus Umweltproben und nicht nur taxonomisch charakterisierten Isolaten, optimal hybridisierte (Tabelle 9, Bauer et al., 2008).

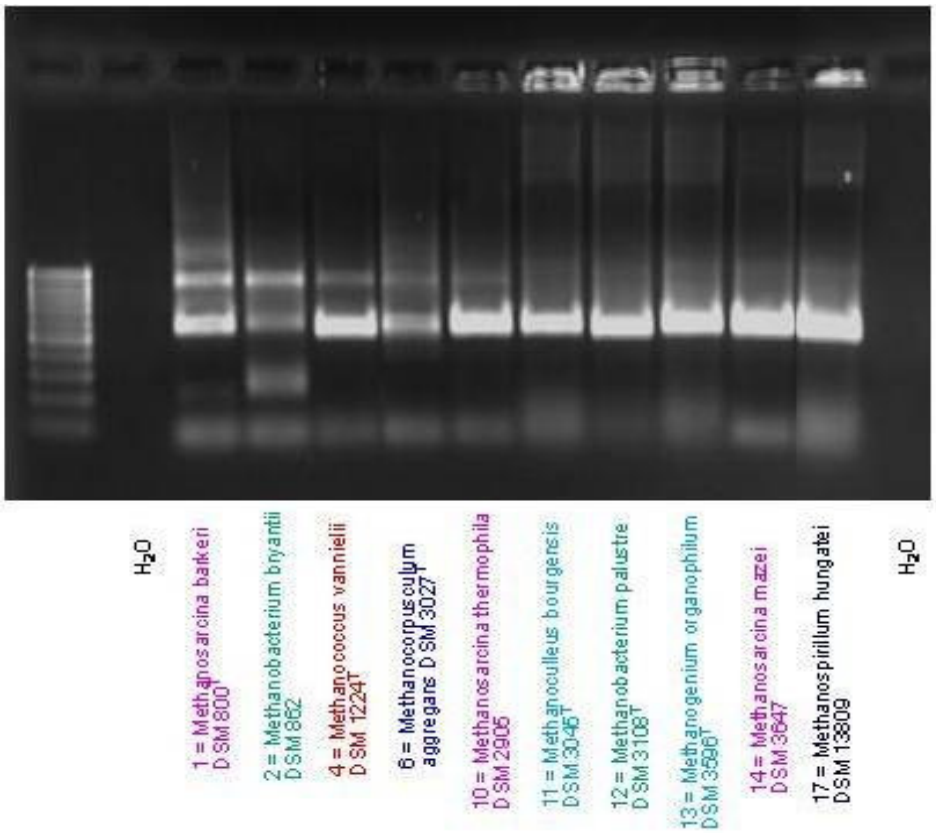


Abbildung 54: Mit „whole-cell-PCR“ erhaltene *mcr*A/*mrt*A-Amplifikate ausgewählter Stämme methanogener Archaeen

Abbildung 54 zeigt, dass in allen getesteten Stämmen ein Fragment amplifiziert werden konnte, das in der Länge dem *mcr*A-/*mrt*A-Amplifikat entsprach. Die Amplikons von *Methanobacterium bryantii* und *Methanocorpusculum aggregans* waren deutlich schwächer als die übrigen. In den gelieferten Röhrchen mit diesen Zellen wurde auch eine geringere Gasbildung beobachtet, was auf eine niedrigere Zellzahl hinweist. Weiterhin können in diesen Medien PCR-Inhibitoren wie Schwermetalle vorhanden gewesen sein, die in der „whole-cell-PCR“ inhibierend gewirkt haben können.

Der in den Biogasanlagen noch nicht nachgewiesene *Methanopyrus kandleri* wurde nicht *in vitro* getestet.

3.2.2.2 Identifizierung und Diversität methanogener Archaeen

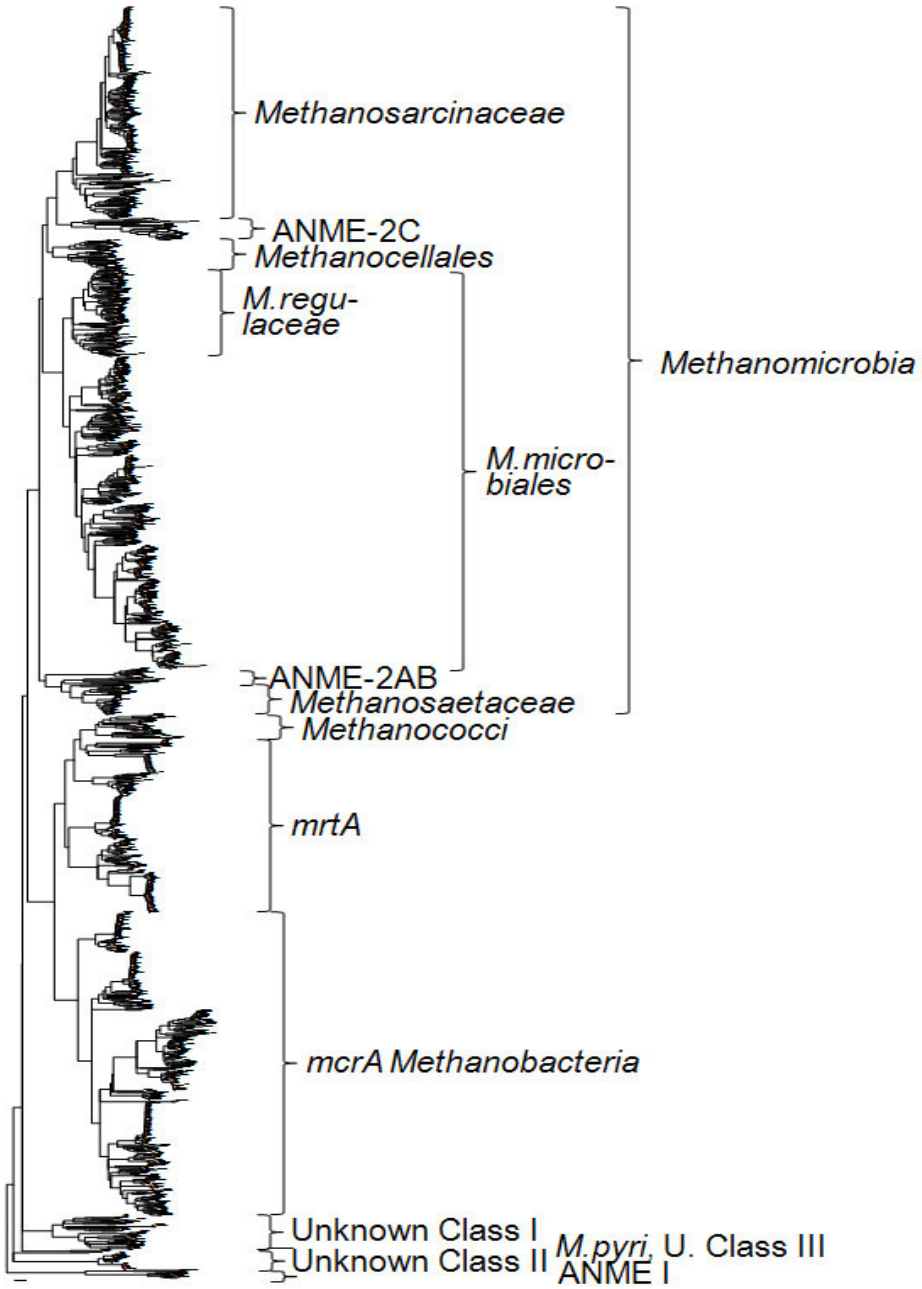


Abbildung 55: Phylogenetischer Stammbaum (Neighbour-Joining, Nukleotide) methanogener Archaeen (*mcr*A/*mrt*A)

Zur Bestimmung der relevanten Archaeen und ihrer Diversität in den unterschiedlichen Vergärungsprozessen wurde PCR-DGGE (nur versuchsweise, s. 3.2.2.2.2), PCR-SSCP (Klonierung der DNA aus den Bandens, s. 3.2.2.2.3) und PCR-Direktklonierung (s. 3.2.2.2.1) eingesetzt. Die Sequenzen wurden zusammen mit den nächsten Verwandten (BLAST-N2 Suche gegen NCBI nucleotide nr Datenbank) in ein Master-Alignment (ca. 5.000 Sequenzen) kompiliert und nach Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit (neighbour-joining) in Kladen zusamengestellt. Abbildung 55 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum von *mcr*A/*mrt*A-Fragmenten (ca. 380 bp) methanogener Archaeen, die die identifizierten Kladen repräsentieren (Auswahl von ca. 2.500 Sequenzen), und der die im Rahmen des Teilvorhabens analysierten *mcr*A-/*mrt*A-Sequenzen beinhaltet.

In keiner der Proben konnten Sequenzen gefunden werden, die den Klassen *Methanococci*, *Methanopyri* oder den anaeroben Methanoxidierern (ANME) zuzuordnen wären.

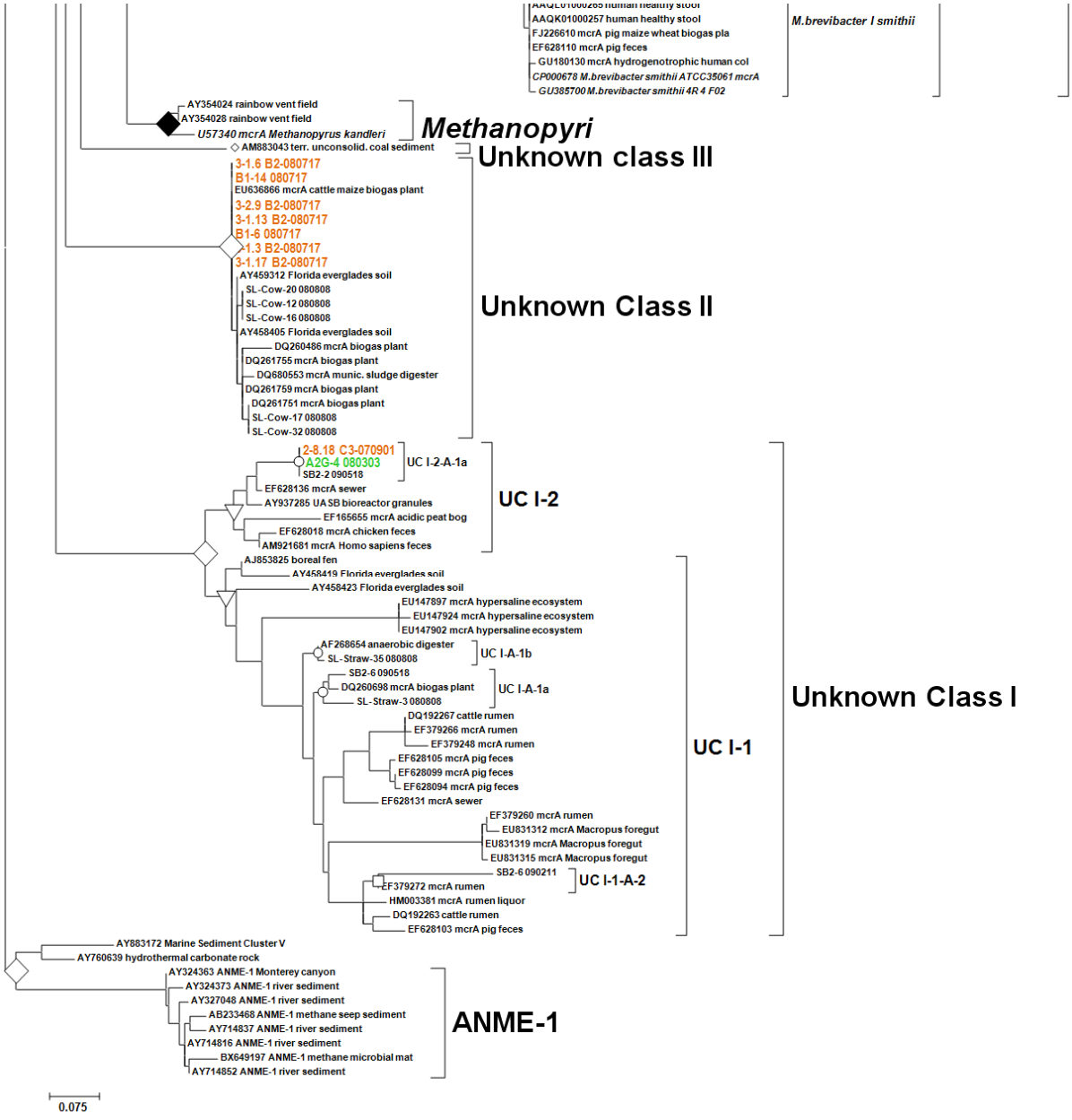


Abbildung 56: Ausschnitt aus einem phylogenetischen *mcr*A/*mrt*A Stammbaum (Maximum Likelihood, Aminosäure-Ebene)

In den mit Mais- und Grassilage betriebenen Biogasreaktoren wurden aber Sequenzen gefunden, die mit unterschiedlichen phylogenetischen Methoden (Neighbour-Joining, Minimum Evolution, Maximum Likelihood) gleichermaßen zwei bisher noch unbeschriebenen Kladen des Phylums *Euryarchaeota* zugeordnet wurden (Unknown Class I, II in Abbildung 55). Wegen der tiefen Abspaltung nahe der Wurzel müssen diese Kladen Status einer Klasse erhalten. Abbildung 56 zeigt die Sequenzen (ocker: Maissilage mesophil; grün: Grassilage thermophil) in einem Maximum-Likelihood *mcr*A/*mrt*A-Aminosäure-Stammbaum, der wegen der sonst

übergroßen Anforderung an die Rechnerleistung ohne Bootstrapping-Wahrscheinlichkeit der Knoten erstellt wurde.

Die beiden noch unbeschriebenen Klassen „Unknown Class I, II“ fallen im Vergleich in die Klade „MCR-2“, die von Castro et al. (2004) vorgestellt wurde. Über die Physiologie der Organismen, die in diese Klassen fallen, ist nichts bekannt.

Weiterhin konnte der weitaus überwiegende Teil der Sequenzen keiner beschriebenen Species zugeordnet werden. Die Sequenzen wurden in ein Genospecies Konzept aufgenommen (Schloter et al., 2000) und sind als solche in Tabelle 23 - Tabelle 26 klassifiziert.
Als ein weiteres interessantes Detail wurden insbesondere in den Grassilage betriebenen Reaktoren mrtA Sequenzen gefunden, die der Familie *Methanobacteriaceae* aber keiner der bekannten Gattungen zuzuordnen sind. Für diese dem neuen „Genus IV“ (Abbildung 57) Sequenzen konnte, ähnlich wie für *Methanosphaera* der Fall, kein *mcr*A-Isogen identifiziert werden.

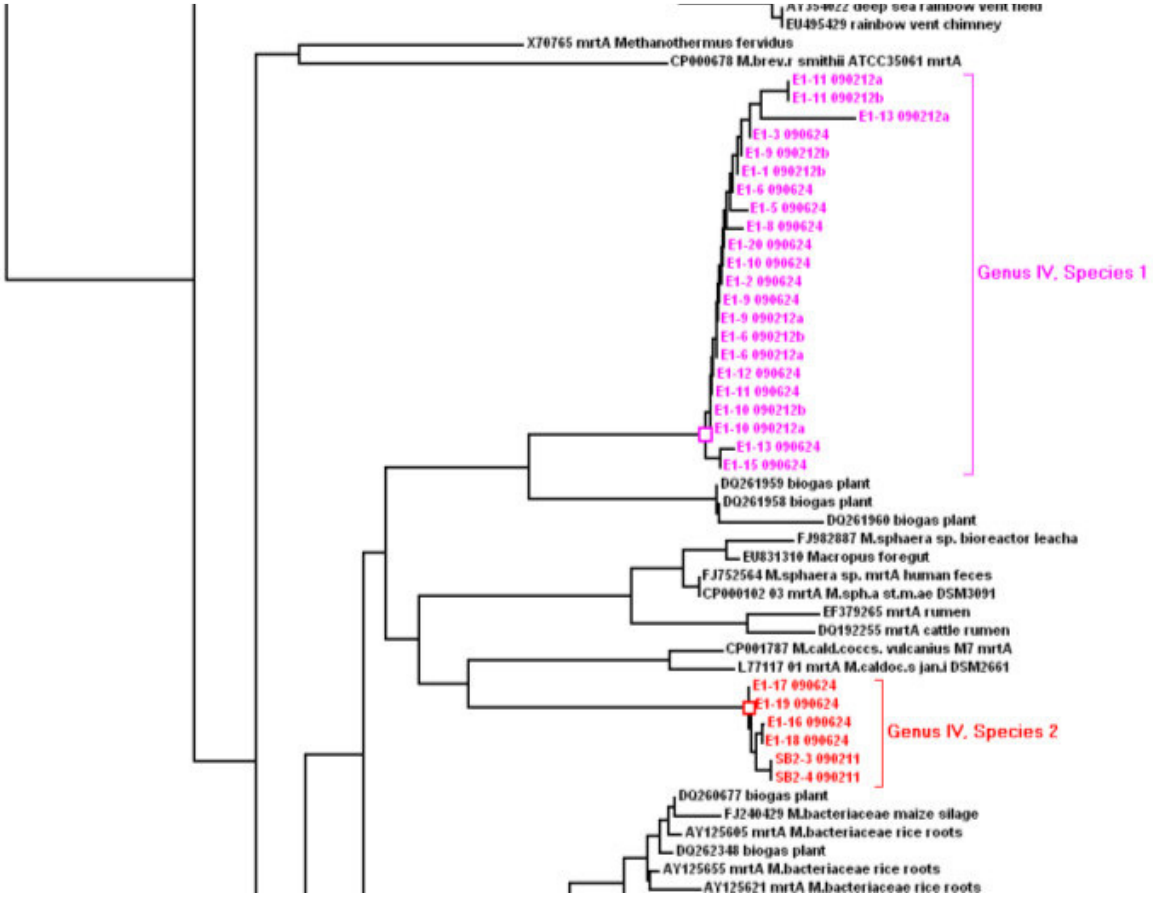


Abbildung 57: *mrt*A-Sequenzen und phylogenetische Position des neuen "Genus IV" der *Methanobacteriaceae*

Tabelle 23: Phylogenetische Klassifizierung von *mcr*A/*mrt*A-Sequenzen aus Maissilage-Fermentern in thermophiler Betriebsweise

Maissilage thermophil						Fermenter	A1	A2	A3
Klasse	Ordnung	Familie		Genus	Species	Datum	28.12.2007	14.08.2007	14.09.2007
Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	mrtA	Methanothermobacter II	sp. 1		A1-2_071228 A1-3_071228 A1-4_071228 A1-5_071228 A1-6_071228 A1-15_071228	A2-5_070814 A2-6_070814 A2-9_070814 A2-11_070814 A2-20_070814	A3-9_070914 A3-14_070914 A3-29_070914 A3-32_070914
				Methanothermobacter II	sp. 1			A2-21_070814 A2-35_070814	A3-12_070914 A3-17_070914 A3-23_070914 A3-31_070914 A3-39_070914
Methano-microbia	Metha-nomicro-biales	Metha-nomicro-biaceae	mcrA	Methanoculleus I	thermophilus			A2-8_070814	
				Methanoculleus II	sp. 2			A2-31_070814	
				Methanofollis	liminatans		A1-49_071228		
	Metha-nosar-cinales	Metha-nosarci-naceae		Methanosarcina	mazei 1			A2-33_070814	
					thermophila				A3-41_070914
						-H'	0,366204096	1,197237502	0,474139313
						J	0,528320834	0,863624303	0,684038436

Tabelle 24: Phylogenetische Klassifizierung von *mcr*A/*mrt*A-Sequenzen aus Grassilage-Fermentern in thermophiler Betriebsweise

Grassilage thermophil						Fermenter	A1		A2
Klasse	Ordnung	Familie		Genus	Species	Datum	03.03.2008	17.07.2008	03.03.2008
Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	mrtA	Methanothermobacter II	sp. 1		A1G-9_080303 A1G-15_080303	A1G-3_080717 A1G-4_080717 A1G-9b_080717 A1G-10_080717 A1G-11_080717 A1G-12_080717 A1G-13_080717 A1G-14b_080717 A1G-15b_080717 A1G-17_080717	
				Methanobacterium IB	sp. 2				A2G-7_080303 A2G-8_080303 A2G-10_080303 A2G-27_080303 A2G-29_080303 A2G-31_080303 A2G-38_080303
				Methanobrevibacter	ruminantium				A2G-15_080303
				Methanothermobacter II	sp. 1		A1G-13_080303 A1G-26_080303	A1G-5_080717 A1G-9a_080717 A1G-14a_080717 A1G-15a_080717 A1G-16_080717 A1G-18_080717	A2G-20_080303
Methanomicrobia	Metha-nomicro-biales	Metha-nomicro-biaceae	mcrA	Methanoculleus IIIA	sp. 1		A1G-14_080303		
	Methano-sarcinales	Methano-sarcinaceae		Methanosarcina	mazei 2				A2G-2_080303
					sp. 3				A2G-16_080303 A2G-35_080303
					thermophila		A1G-18_080303		A2G-22_080303 A2G-32_080303
Unknown Class I	I 2	I 2A		I 2A1	I 2A1a				A2G-4_080303
						-H'	1,039720771	0	1,778742044
						J	0,94639463	n. def.	0,914092588

Tabelle 25: Phylogenetische Klassifizierung von *mcr*A/*mrt*A-Sequenzen aus Maissilage-Fermentern in mesophiler Betriebsweise

Maissilage mesophil						Fermenter	B1		B2					C3	
Klasse	Ordnung	Familie		Genus	Species	Datum	25.02.2008	17.07.2008	26.01.2007*	13.06.2007	13.6.07*	17.07.2008	17.07.2008*	18.05.2007	23.10.2008
Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	mrtA	Methanobacterium I	formicicum			B1-8_080717							
					sp. 1								3-4.6_B2-080717 3-5.5_B2-080717 3-8.5_B2-080717 3-8.9_B2-080717		
					sp. 2b										C3-3_081023 C3-17_081023 C3-25_081023
					sp. 2c		B1-ZH3_080225	B1-17_080717	1-1-5.6_B2-070126 1-1-6.5_B2-070126 1-1-6.8_B2-070126 1-1-6.9_B2-070126	B2-7_070613	3-3.11_B2-070613 3-3.18_B2-070613 3-3.30_B2-070613 3-4.35_B2-070613 3-6.12_B2-070613 3-8.15_B2-070613	B2-4b_080717	3-5.1_B2-080717 3-6.18_B2-080717 3-7.22_B2-080717 3-7.24_B2-080717 3-8.3_B2-080717		C3-4_081023 C3-21_081023
					sp. 3a								3-2.5_B2-080717 3-2.17_B2-080717		
				Methanobacterium II	bryantii			B1-11_080717							
				Methanobacterium IB	palustre						3-6.16_B2-070613 3-8.9_B2-070613		3-3.31_B2-080717		
					sp. 2		B1-1_080225 B1-2_080225 B1-11_080225 B1-18_080225 B1-22_080225 B1-24_080225 B1-27_080225 B1-ZH4_080225 B1-ZH6_080225 B1-ZH7_080225 B1-ZH9_080225	B1-3_080717		B2-2_070613		B2-1_080717 B2-2_080717 B2-6_080717 B2-7_080717 B2-8_080717 B2-9_080717 B2-10_080717 B2-11_080717 B2-12_080717	3-2.15_B2-080717		C3-1_081023 C3-5_081023 C3-6_081023 C3-7_081023 C3-11_081023 C3-16_081023 C3-27_081023 C3-29_081023
					sp. 4								3-3.1_B2-080717 3-3.21_B2-080717 3-3.22_B2-080717 3-3.24_B2-080717		
				Methanobacterium III	sp. 3a			B1-15_080717 B1-25_080717	1-1-3.7_B2-070126 1-1-4.1_B2-070126 1-1-4.5_B2-070126	B2-22_070613	3-4.7_B2-070613 3-5.5_B2-070613 3-5.8_B2-070613 3-5.18_B2-070613 3-6.4_B2-070613 3-6.27_B2-070613 3-8.2_B2-070613 3-8.10_B2-070613		3-5.18_B2-080717		C3-20_081023 C3-30_081023 C3-31_081023 C3-35_081023
				Methanobrevibacter	ruminantium			B1-5_080717					3-4.26_B2-080717 3-6.6_B2-080717 3-6.17_B2-080717 3-6.21_B2-080717 3-6.27_B2-080717 3-6.31_B2-080717		
Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	mcrA	Methanoculleus I	bourgensis 1a						3-4.8_B2-070613				
					bourgensis 1b						3-5.11_B2-070613 3-6.24_B2-070613		3-4.24_B2-080717 3-7.23_B2-080717		
					bourgensis 1c					B2-11_070613			3-7.29_B2-080717		
					chikugoensis 1							B2-5_080717			
					chikugoensis 2								3-3.15_B2-080717		
					palmolei			B1-16_080717 B1-21_080717					3-4.2_B2-080717 3-5.7_B2-080717		
					sp. 1		B1-20_080225 B1-25_080225 B1-ZH5_080225								
				Methanoculleus IIIA	sp. 1				1-1-2.33_B2-070126	B2-40_070613				C3-1_070518 C3-12_070518	
					sp. 2					B2-36_070613				C3-9_070518 C3-34_070518 C3-36_070518 C3-46_070518	
				Methanogenium	organophilum 2						3-6.8_B2-070613			C3-3_070518 C3-17_070518 C3-43_070518	
				Methanospirillum	hungatei 2					B2-12_070613 B2-15_070613 B2-31_070613 B2-33_070613 B2-35_070613 B2-41_070613 B2-43_070613	3-3.21_B2-070613 3-3.38_B2-070613 3-4.16_B2-070613 3-4.26_B2-070613 3-8.7b_B2-070613				C3-26_081023
		Methanosaetaceae		Methanosaeta	concilii 1b		B1-26_080225 B1-30_080225 B1-ZH10_080225						3-8.13_B2-080717		
	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae		Methanosarcina	mazei 1									C3-2_070518 C3-24_070518	
					sp. 1a		B1-ZH8_080225	B1-1_080717 B1-7_080717 B1-20_080717 B1-24_080717 B1-26_080717 B1-30_080717 B1-X_080717	1-1-2.21_B2-070126 1-1-2.35_B2-070126 1-1-4.8_B2-070126		3-5.2_B2-070613 3-5.7_B2-070613	B2-18_080717 B2-20_080717 B2-28_080717	3-2.11_B2-080717 3-5.11_B2-080717 3-5.15_B2-080717 3-5.16_B2-080717 3-5.17_B2-080717 3-6.11_B2-080717	C3-44_070518	C3-14_081023 C3-28_081023 C3-34_081023
					sp. 1b			B1-2_080717							
					sp. 2			B1-12_080717	1-1-2.8_B2-070126 1-1-2.38_B2-070126 1-1-3.1_B2-070126 1-1-3.9_B2-070126 1-1-3.10_B2-070126						
					sp. 3		B1-12_080225 B1-28_080225 B1-ZH1_080225		1-1-1.8_B2-070126 1-1-1.10_B2-070126 1-1-5.4_B2-070126 1-1-5.5_B2-070126				3-7.26_B2-080717 3-7.28_B2-080717 3-7.32_B2-080717 3-7.35_B2-080717		
					thermophila		B1-19_080225	B1-4_080717 B1-9_080717 B1-10_080717 B1-22_080717 B1-27_080717 B1-29_080717					3-6.3_B2-080717 3-6.16_B2-080717 3-6.23_B2-080717	C3-25_070518	
Unknown Class I	I 1	I 1A		I 1A1	I 1A1a						3-8.7a_B2-070613				
Unknown Class II	II 1	II 1A		II 1A1	II 1A1a			B1-6_080717 B1-14_080717					3-1.3_B2-080717 3-1.6_B2-080717 3-1.13_B2-080717		
						-H'	1,720445608	1,843009226	1,514095274	1,288016822	1,814644167	1,117489959	2,451644735	1,671595278	1,248305585
						J	0,884134146	0,800408737	0,940760288	0,718855876	0,87265938	0,806098611	0,928985023	0,932935088	0,900462139

Tabelle 26: Phylogenetische Klassifizierung von *mcr*A/*mrt*A-Sequenzen aus Grassilage-Fermentern in mesophiler Betriebsweise

Grassilage mesophil						Fermenter	E1		G2
Klasse	Ordnung	Familie	Genus		Species	Datum	12.02.2009	24.06.2009	21.08.2009
Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Genus IV	mrtA	sp.1		E1-1a_090212 E1-1b_090212 E1-6a_090212 E1-6b_090212 E1-9a_090212 E1-9a_090212 E1-10a_090212 E1-10b_090212 E1-11a_090212 E1-11b_090212 E1-13a_090212	E1-2_090212 E1-3_090212 E1-4_090212 E1-5_090212 E1-6_090212 E1-7_090212 E1-8_090212 E1-9_090212 E1-10_090212 E1-11_090212 E1-12_090212 E1-13_090212 E1-15_090212 E1-20_090212	
					sp. 2			E1-16_090212 E1-17_090212 E1-18_090212 E1-19_090212	
			Methanobacterium I		sp. 2b				G2-8_090821
					sp. 2c				G2-10_090821 G2-11_090821 G2-20_090821
			Methanothermobacter II		sp. 1		E1-3a_090212 E1-18ab_090212 E1-18bb_090212		
			Methanobacterium IB		sp. 2		E1-19a_090212 E1-19b_090212		G2-5_090821 G2-7_090821 G2-13_090821 G2-17_090821 G2-18_090821
			Methanobacterium II		sp. 1				G2-6_090821 G2-15_090821
			Methanobacterium III		sp. 3a				G2-1_090821 G2-2_090821 G2-3_090821 G2-4_090821 G2-9_090821 G2-12_090821
					sp. 3b				G2-14_090821 G2-16_090821
			Methanothermobacter II	mcrA	sp. 1		E1-18aa_090212 E1-18ba_090212		
Methanomicrobia	Methano-microbiales	Methano-micro-biaceae	Methanoculleus I		bourgensis 1c		E1-14a_090212 E1-14b_090212 E1-16a_090212 E1-16b_090212		
	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	Methanosarcina		sp. 2		E1-3b_090212 E1-5a_090212 E1-5b_090212 E1-13b_090212 E1-15a_090212 E1-15b_090212 E1-17a_090212 E1-17b_090212	E1-14_090212	
						-H'	1,352115784	0,801818553	1,191903888
						J	0,840116772	0,729846699	0,859776914

Die in Tabelle 23 - Tabelle 26 enthaltene Information ist die Basis für die in den Kapiteln 3.1 und 3.2 dargestellten Ergebnisse mit mikro- bzw. molekularbiologisch/phylogenetischen Inhalten, insbesondere für die Diskussionen zu Veränderungen der Populationsstruktur.

3.2.2.2.1 PCR-Direktklonierung, Phylogenie

Bei der PCR-Direktklonierung (2.2.4) wurden die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Klone (mit den charakterisierten *mcr*A-/*mrt*A-Sequenzen) zu einander kalkuliert. Da bei der Direktklonierung ein Mindestmaß von etwa 20 Sequenzanalysen pro Probe notwendig ist, um die dominierenden Archaeen zu detektieren, wurde nur in einzelnen Fällen auf diese Technik zurückgegriffen. Die Ergebnisse der Direktklonierung entsprachen aber im Wesentlichen denen der Klonierung aus den SSCP-Profilen (Tabelle 27, Munk et al., 2010).

Die Ergebnisse des besseren Zusammenhangs wegen in das Kapitel 3.2.2.2.3 integriert und werden dort im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den SSCP-Analysen diskutiert.

3.2.2.2.2 Versuche mit PCR-DGGE

Im ersten Schritt führte der für die DGGE eingesetzte GC-Clamp zu einer deutlichen Hemmung der Amplifikation (Abbildung 58).

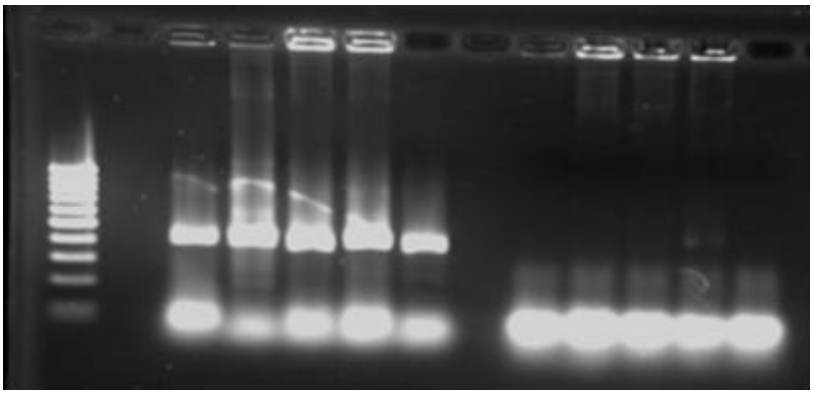


Abbildung 58: Vergleich der *mcr*A-/*mrt*A-Amplifikation ohne (5 Spuren links) und mit GC-Clamp (5 Spuren rechts)

Um die Effizienz der PCR zu erhöhen, wurden vierfach degenerierte Basenpaare mit Inosin substituiert. Dies führte bei Primerpaaren mit und ohne GC-Clamp zu einer effizienteren Amplifikation.

Bei der *mcr*A-/*mrt*A-DGGE wurden nur verschmierte Banden in den Gelen erhalten. Dies konnte auf der hohen Degeneriertheit der Primer, vor allem aber auch auf der heterogenen Schmelzeigenschaften der Amplikons beruhen (Bauer et al., 2008). Eine Erhöhung der Annealingtemperatur zur Reduktion von Mismatches, die leicht bei PCR mit degenerierten Primern auftreten, verschlechterte die PCR-Effizienz allerdings stark. Auch der Einsatz einer sehr sensitiven Polymerase (High Fidelity Polymerase, Invitrogen) führte zu keiner wesentlichen Verbesserung der Ergebnisse.

Hornek et al. (2005) berichtete von einer Erhöhung der Bandenschärfe bei der DGGE durch Substitution von degenerierten Basen mit Inosin. Aufgrund der hohen Degeneriertheit der *mcr*A/*mrt*A-Primer konnten nicht alle degenerierten Basenpaare mit Inosin ersetzt werden, da dies eine drastische Erniedrigung der Spezifität sowie der Effizienz bedeutet hätte. MELT-Analysen ergaben eine ausgeprägte Heterogenität der Schmelzeigenschaften innerhalb der PCR-Fragmente. Abbildung 59 zeigt dies im Beispiel für den Typstamm von *Methanococcus vannielli*.

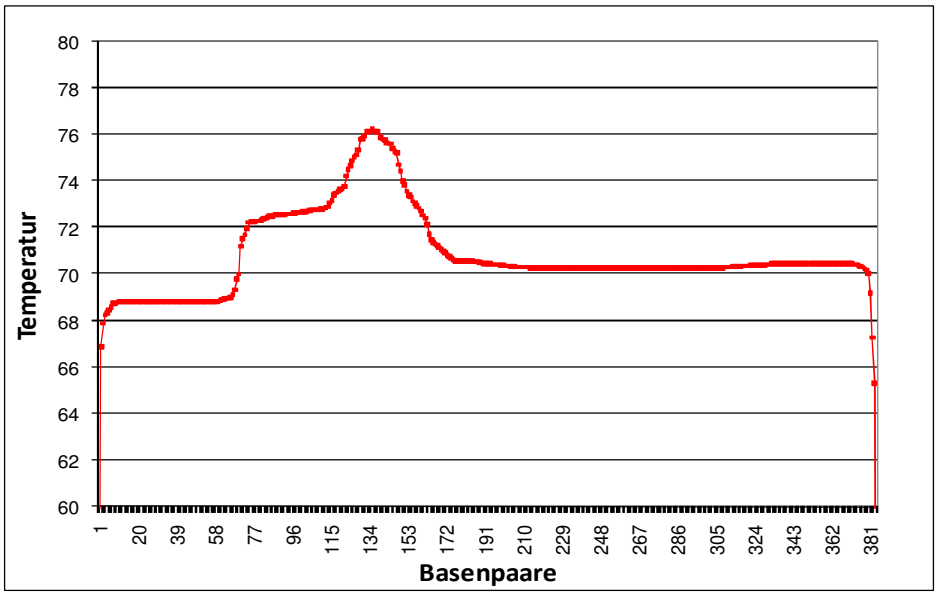


Abbildung 59: Schmelzkurve des *mcrA*-Amplifikats von *Methanococcus vannielli*

Das partielle und lokal verschiedene Aufschmelzen hat wahrscheinlich wesentlich zum Erscheinungsbild der verschmierten Banden beigetragen. Kisand and Wikner (2003) berichteten von Grenzen der DGGE-Analytik bei Fragmenten mit heterogenen Schmelzeigenschaften. Diese Heterogenität konnte in verschiedenen molekularbiologischen Ansätzen nicht verändert werden. Letztendlich wurde daraufhin die *mcr*A/*mrt*A-DGGE-Analytik eingestellt.

3.2.2.2.3 Versuche mit PCR-SSCP

Aufgrund der schlechten Bandenschärfe in der PCR-DGGE (3.2.2.2.2) wurde auf die PCR-SSCP-Analytik ausgewichen, die sich als wesentlich geeigneter für die *mcr*A/*mrt*A-Amplikons erwies. Die für die ursprünglich geplante DGGE angeschaffte Apparatur der Firma Ingeny konnte auch für die SSCP benutzt werden. Mit einer anschließenden Silberfärbung konnten ssDNA-Fragmente sensitiv getrennt detektiert (Abbildung 60) und für anschließende Sequenzierungen ausgeschnitten, gereinigt und reamplifiziert werden.

Vor der Darstellung der Ergebnisse wird hinsichtlich der Aussagekraft der PCR-SSCP-Analysen darauf hingewiesen, dass nicht alle SSCP-Banden monotypisch zusammengesetzt waren. Die phylogenetische Analyse von Klonbiblitheken aus einzelnen reamplifizierten Banden ergab häufig eine heterogene Zusammensetzung. Weiterhin wurden bestimmte Species in verschiedenen Banden gefunden. Wahrscheinlich sind die degenerierten *mcr*A/*mrt*A-Primer Ursache für ein unterschiedliches Laufverhalten.

Dies scheint sich zwar nicht auf die Reproduzierbarkeit der Bandenprofile und die Aussage zu Populationsveränderungen auszuwirkungen, zur Abklärung des Phänomens muss diesem Problem aber noch auf den Grund gegangen werden.

Abbildung 60 zeigt ein *mcr*A/*mrt*A-PCR-SSCP-Gel mit ausgewählten Referenz- oder Typstämmen methanogener Archaeen.

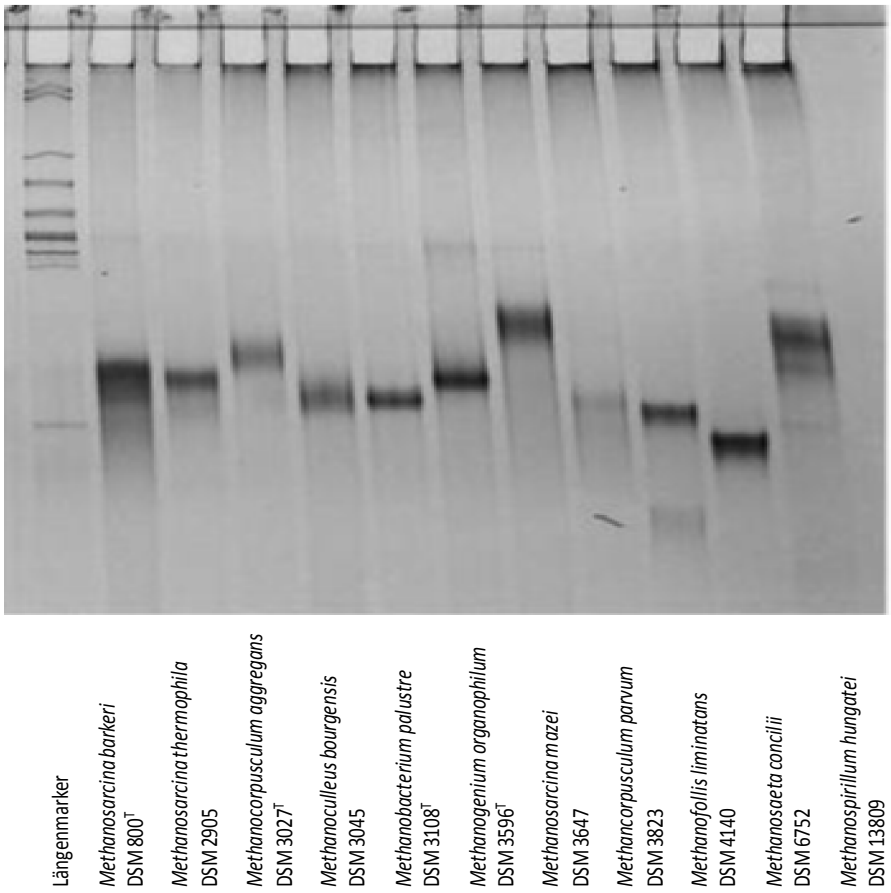
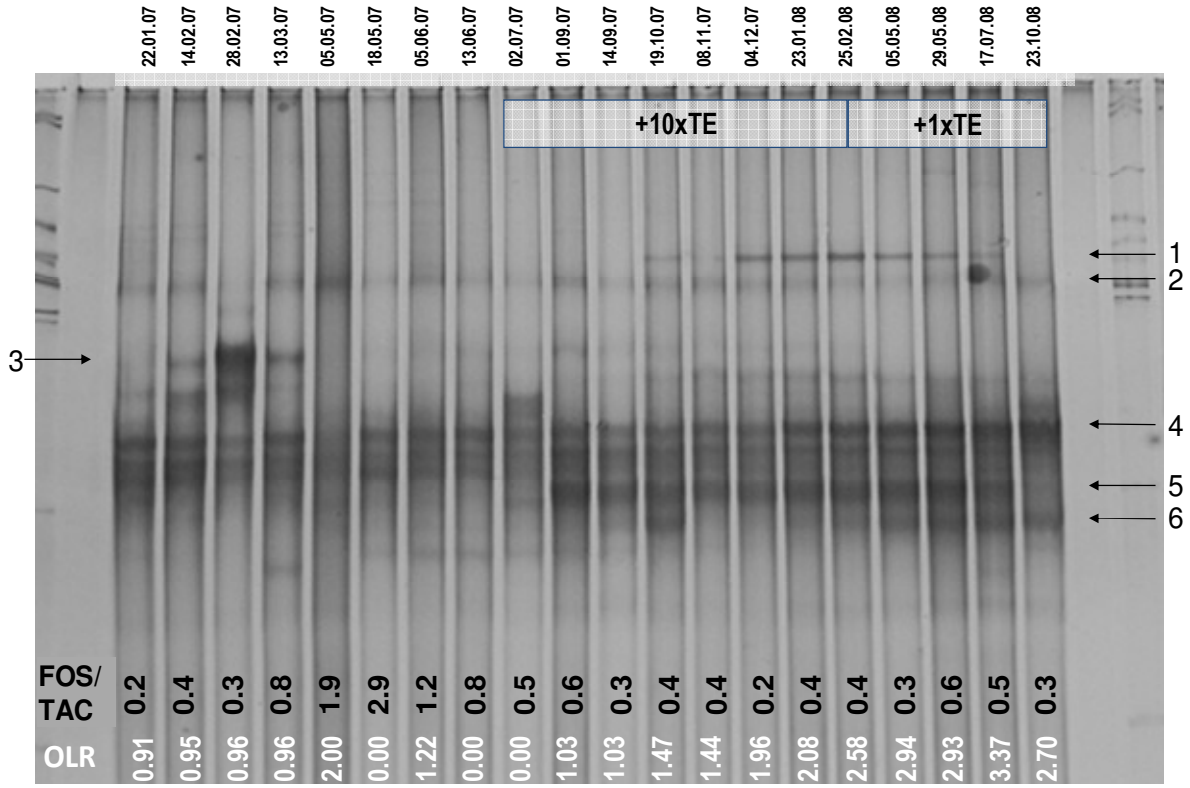


Abbildung 60: SSCP-Gel mit *mcr*A/*mrt*A-Amplikons von ausgewählten methanogenen Typ- und Referenzstämmen

3.2.2.2.3.1 Maissilage mesophil

Anhand der Veränderungen der Bandenmuster in Abbildung 61 kann nachvollzogen werden, dass sich sowohl qualitative (Banden verschwinden oder erscheinen neu, zum Beispiel Banden 1, 3) als auch quantitative Veränderungen (Bandenstärke verändert sich graduell, zum Beispiel Banden 5, 6) in der Populationszusammensetzung methanogener *Archaea* im Versuchsverlauf ergaben.

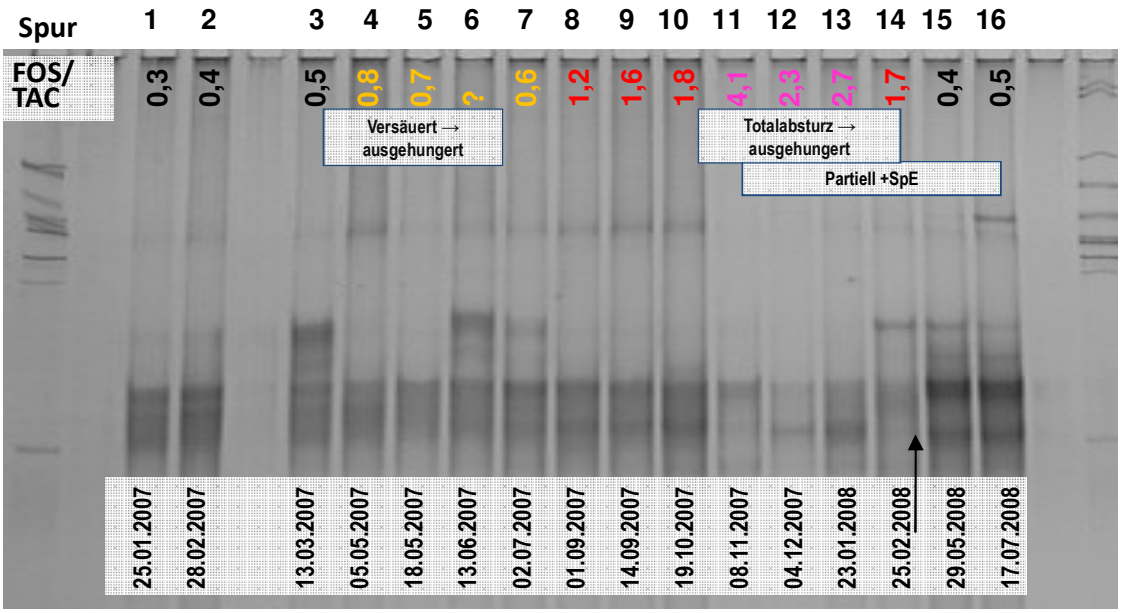
Die Banden zwei und vier blieben über den ganzen Versuchszeitraum stabil. Die Banden eins, fünf und sechs erschienen erst nach der Zugabe von Spurenelementen und der Steigerung der organischen Raumbelastung (OLR). Bei weiterer Erhöhung der OLR verschwand Bande 1 wieder (Abbildung 61). Vermutlich wachsen die entsprechenden methanogenen Archaeen relativ langsam und wurden bei der kürzeren Verweilzeit ausgedünnt. Da die Bande drei nur einmal und sehr intensiv auftrat, wird hier eine Artefaktbildung vermutet. Auffällig war das relativ schwache Bandenprofil während und kurz nach der Versäuerung, was auf eine schwache Präsenz methanogener *Archaea* in diesem Zeitraum hinweist. Die qPCR-Analysen für diesen Zeitraum (Abbildung 70 - Abbildung 75) bestätigen den Befund. Ab dem Zeitpunkt der Spurenelementzugabe und der Erhöhung der OLR wurde in Übereinstimmung mit der qPCR-Analysen generell eine eine starke Zunahme der Bandenstärke beobachtet.Insbesondere nahm aber die Stärke zweier Banden zu (Abbildung 61, Banden 5 und 6).



Pfeile und Nummerierung sind im Text angesprochen

Abbildung 61: *mcr*A/*mrt*A-PCR-SSCP-Zeitreihenanalyse von Proben aus dem mesophilen Mais-mono-Fermenter C3 mit zugehörigen FOS/TAC Werten und der organischen Raumbelastung (OLR)

Fermenter B2 war über einen langen Zeitraum teilweise stark versäuert (5.5.2007-25.2.2008, Abbildung 62). Gleichzeitig waren die Banden auf dem SSCP-Gel selbst bei einem FOS/TAC-Wert von 1,8 (19.10.2007) noch intensiv, ihre Intensität nahmen aber zum 8.11.2007 (FOS/TAC 4,1) deutlich ab. Erst nach massiven Eingriffen (Kalkung, Inokulation aus methanogenen Fermentern) nahm die Bandenstärke deutlich zu (Abbildung 62). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen der Quantifizierung der Methanogenen-DNA mittels Real-Time PCR bestätigt werden. Dieser Effekt wird in Kapitel 3.2.2.3 diskutiert.



Pfeil: Inokulation 18.4. – 24.4.2008 mit 7 L methanogenen Fermenterinhalt (vgl. 3.1.2.1.1).

Abbildung 62: SSCP-Zeitreihe aus Fermenter B2

Tabelle 27: Zusammensetzung der Population methanogener Archaeen bei unterschiedlichen Fermenterzuständen, Maissilage mesophil

Datum (Fermenter)	25.02.08 (B1)*	17.07.08 (B1)*	26.01.07 (B2)#	13.06.07 (B2)*	13.06.07 (B2)#	17.07.08 (B2)*	17.7.08 (B2)#	18.05.07 (C3)*	23.10.08 (C3)*
pH [-]	7,7	7,9	8,0	7,7		7,5		6,3	7,6
FOS/TAC [-]	0,48	0,45	0,2	**0,9**		0,5		**2,9**	0,3
OLR [g oTS * L^{-1} * d^{-1}]	3,6	4,5	0,9	0		1,1		0	2,6
Acetat [mg * L^{-1}]	n.d.	1010	207	**2900**		601		**2621**	1087
M.bacteriales [%]	35	15	22	13	38	56	30	0	68
M.microbiales [%]	18	9	7	**87**	**46**	11	16	**69**	8
M.sarcinales [%]	47	67	70	0	15	33	45	31	24
(*M.saetaceae*) [%]	(18)	(0)	(0)		(0)	(0)	(2)	(0)	(0)
Unbekannte Klasse I[%]	0	9	0	0	0,2	0	0	0	0
Unbekannte Klasse II [%]	0	0	0	0	0	0	9	0	0
Analysierte Klone	23	26	20	13	28	14	49	13	21

Unterstrichene Werte bezeichnen dominierende Populationen im Regelbetrieb. Fette Werte bezeichnen Werte aus Versäuerung;

*: Direkte PCR Klonierung; #: PCR-SSCP Klonierung; Prozentwerte wurden unter Berücksichtigung von relativen Bandenintensitäten ermittelt; n.d: nicht detektiert.

Bei der phylogenetischen Analyse von SSCP-Gelen wurden ausgewählte Banden ausgeschnitten und zur Sequenzierung in *E. coli* kloniert (2.2.4). Um die relativen Anteile der identifizierten methanogenen Archaeen zu schätzen, wurde deren prozentuale Häufigkeit in einer Bande mit der relativen Bandenstärke multipliziert. Ein Vergleich der Ergebnisse aus der PCR-Direktklonierung (3.2.2.2.1) und der Analyse der PCR-SSCP-Klone aus einer Probe zeigte im Wesentlichem eine gute Übereinstimmung (Tabelle 27). Auffallend war der erhöhte Anteil

von *Methanomicrobiales* bei höheren FOS/TAC-Werten und Essigsäurekonzentrationen. In Tabelle 23 - Tabelle 26 sind die Befunde in phylogenetischer Ausflösung bis zum Genospecies-Niveau hin aufgegliedert. Demnach dominierten in der Versäuerung bestimmte *Methanospirillum*-, *Methanoculleus*- und auch *Methanogenium*-Arten. Der Befund entspricht den Ergebnissen von Klocke et al. (2008) und Schlüter et al. (2008), die in NawaRo-Fermentern mit Versäuerungssymptomen verstärkt nachgewiesen wurden. Eine Dominanz von bestimmten *Methanosarcina*- und *Methanobacterium*-Arten (Tabelle 23 - Tabelle 26) indiziert dagegen offenbar einen gut laufenden Regelbetrieb. Die Populationsdynamik bei Versäuerung ist bei Munk et al., 2010 ausführlich besprochen.

Bei hoher Raumbelastung, hohen Gehalten an kurzkettigen Fettsäuren, bei Versäuerung und Zuständen mit Ammoniak-Toxizität (s.a. 3.2.2.2.3.2, 3.2.2.2.3.3, 3.2.2.2.4) waren insbesondere die obligat acetoklastischen *Methanosaeten* nicht mehr nachweisbar. Bei höheren Acetat-Gehalten nahmen fakultativ acetoclastische *Methanosarcina*-Arten zu. Die Befunde entsprechen denen in der Literatur (Jetten et al., 1992; Karakashev et al., 2006). Hervorzuheben ist, dass bei einem Hochlast-NawaRo-Betrieb offenbar hydrogenotrophe methanogene Archaeen im Fermenter vorherrschen. Die 70:30-Regel, die im Bereich der Abwasserreinigung etabliert ist, lässt sich diese Art der Biogasproduktion den Ergebnissen nicht bestätigen. Demirel und Scherer (2008) sprechen diesen Befund in ähnlicher Weise an.

Die oben genannten Population der methanogenen Archaeen könnten entsprechend ihrem verstärkten Auftreten zu besonderen Prozesszuständen geeignete Bioindikatoren zur Früherkennung eines Versäuerungszustands darstellen.

Für die Berechnung der Diversität der methanogenen Archaeen im mesophilen Maissilage-mono-Betrieb wurde der Shannon-Index (-H‘, Shannon, 1948) und die Evenness (J) ermittelt. Bei den SSCP-Gelen wurde die Anzahl der Banden und ihre relative Stärke als Eingangsparameter verwendet, bei Direktklonierungen die phylogenetische Information aus den Sequenzierungen.

Bei einer Raumbelastung von etwa 1,5 ergab sich die höchste Diversität (Abbildung 66). In versäuertem Zustand der Fermenter war die Diversität mit 1,1 - 1,8 im Schnitt geringer.

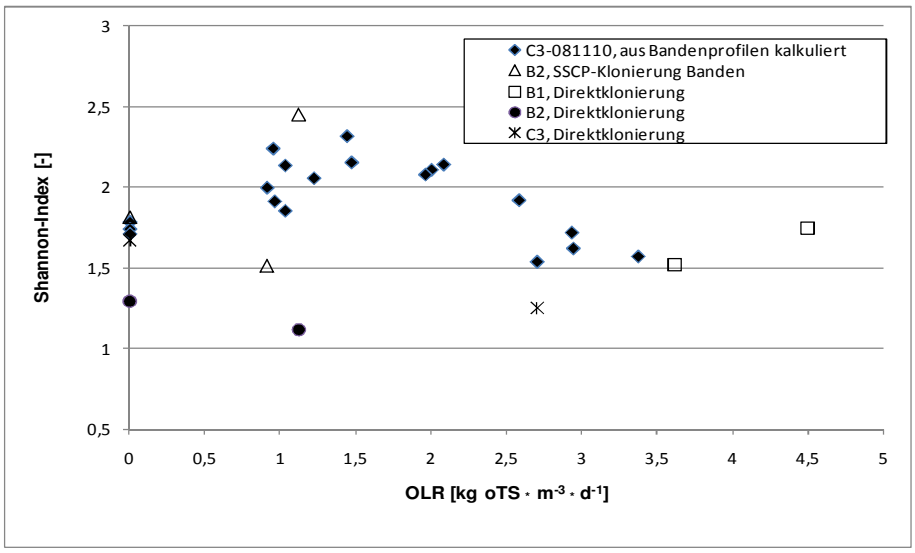


Abbildung 63: Diversität von methanogener Archaeen bei verschiedenen Prozesszuständen

3.2.2.2.3.2 Maissilage und Grassilage thermophil

Der Vergleich der SSCP-Banden zeigte erwartungsgemäß bei starker Versäuerung ein schwächeres Bandenprofil für die mit Grassilage thermophil betriebenen Fermenter. Gleichzeitig wurden mehr und intensivere Banden für die mesophilen Mais-mono-Fermenter erhalten als für die Proben aus aus dem thermophilen Gras-mono-Betrieb (Abbildung 64).

Die entspricht den Ergebnissen der Berechnung des Shannon-Index aus den Direktklonierungen für den Mais-mono-Betrieb (Tabelle 23, Tabelle 24), wo der Profilanalyse entsprechend auch eine etwas größere Diversität methanogener Archaeen festzustellen war (vgl. Abbildung 66 im Vergleich zu Abbildung 67).

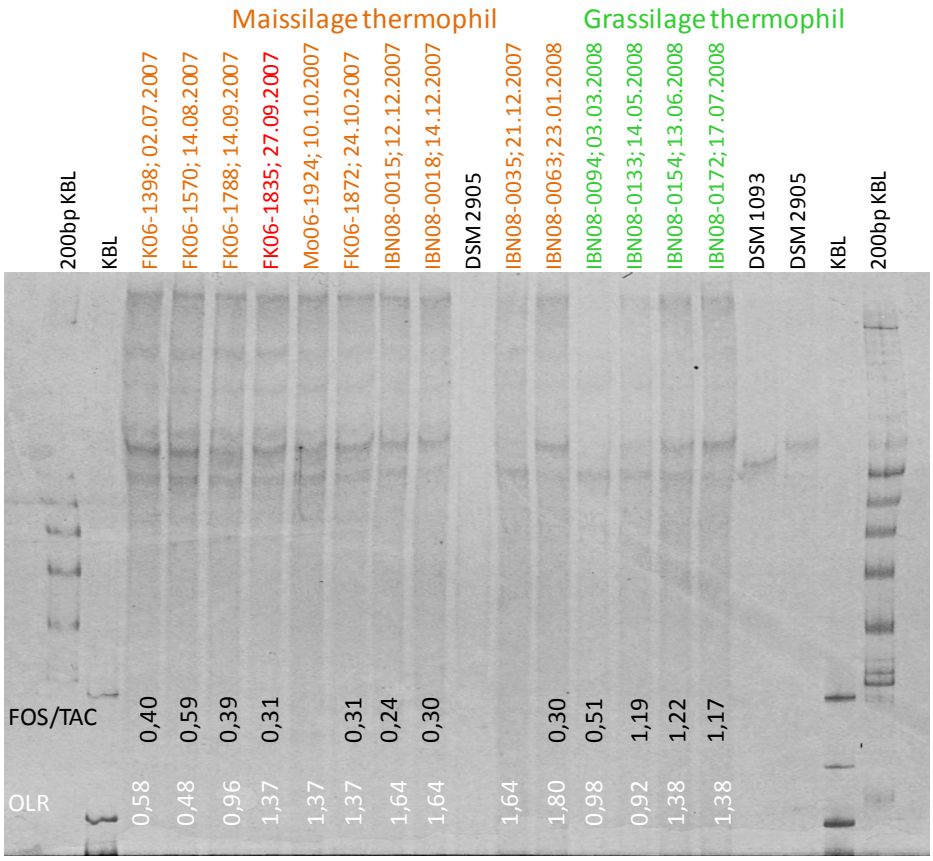


Abbildung 64: SSCP-Bandenprofile für Proben aus thermophilen Mais- und Grassilagefermentern im Vergleich

3.2.2.2.3.3 Grassilage meso- und thermophil sowie Maissilage thermophil

In einigen Fällen konnten für die thermophil mit Grassilage betriebenen Fermenter nur schwache oder gar keine Banden detektiert werden (Abbildung 65). Höchstwahrscheinlich beruht dies auf besonders starkem Vorliegen von Inhibitoren in den Fermenterproben.

Die SSCP-Profile für mesophilen und thermophilen Gras-mono-Betrieb unterschieden sich stark (Abbildung 65). In den thermophilen Grassilage-Fermentern war dabei ein stark ausgeprägtes Fragment besonders auffallend (roter Pfeil in Abbildung 65). In welchen der Banden die in den PCR-Direktklonierungen als prädominant identifizierten *Methanothermobacter*-Arten (vgl.3.1.3, 3.2.2.2.4, Tabelle 23, Tabelle 24) vorliegen, müssen kommende Analysen zeigen.

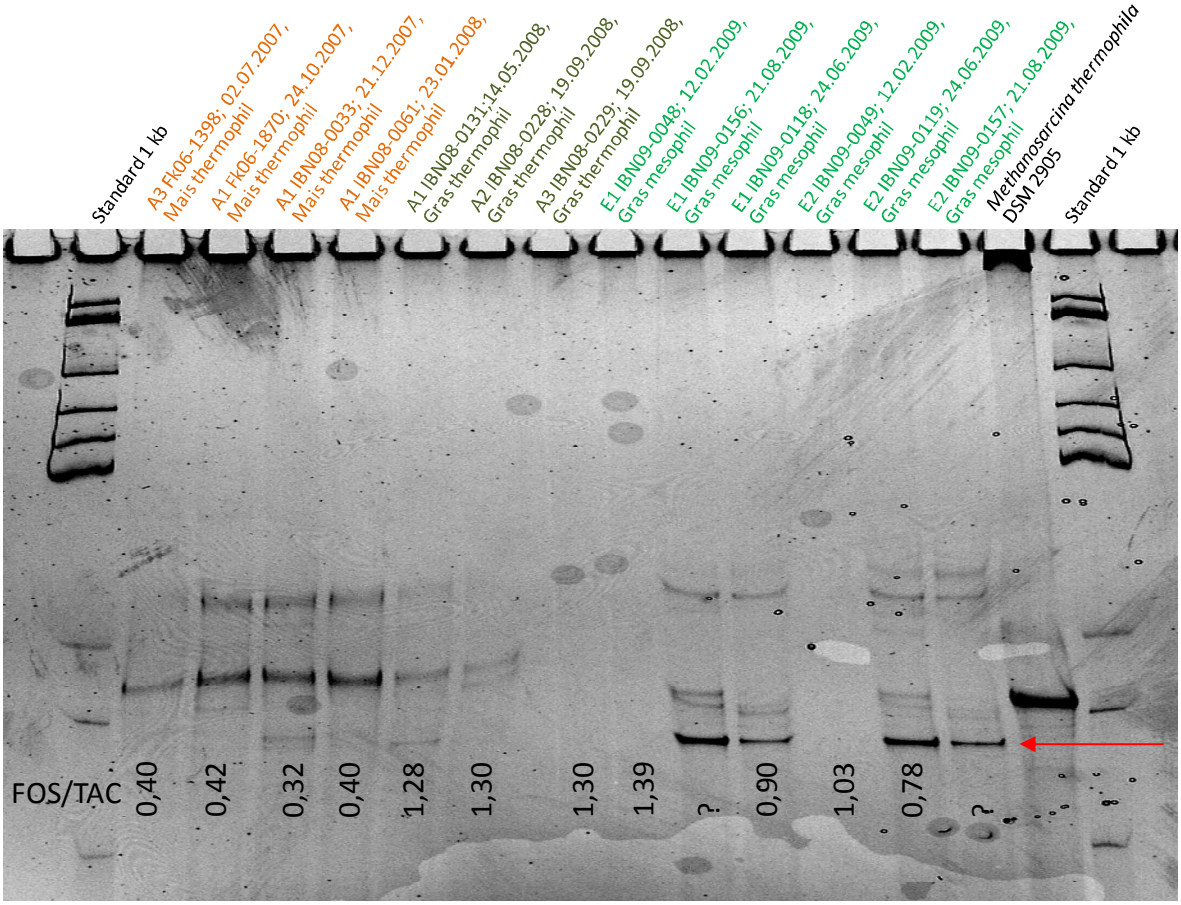


Abbildung 65: SSCP-Gel mit Mais-thermophiler, Gras-thermophiler und Gras-mesophiler Betriebsweise

3.2.2.2.4 Vergleich mesophil/thermophil

Aus den phylogenetischen Untersuchungen ergaben sich Unterschiede in der Zusammensetzung der methanogenen Archaeen bei mesophilen und thermophilen Betrieb. In den thermophilen Reaktoren wurden überwiegend Archaeen mit der Gattung *Methanothermobacter* gefunden (3.2.1.1, 3.2.1.2). Methanogene Archaeen der Gattung *Methanosarcina* wurden seltener detektiert. Der Shannon-Index betrug bei mesophilen Mais-mono-Fermentern im Schnitt etwa 1,4 während er in thermophilen Mais-mono-Reaktoren mit etwa 0,7 deutlich geringer war (Abbildung 66).

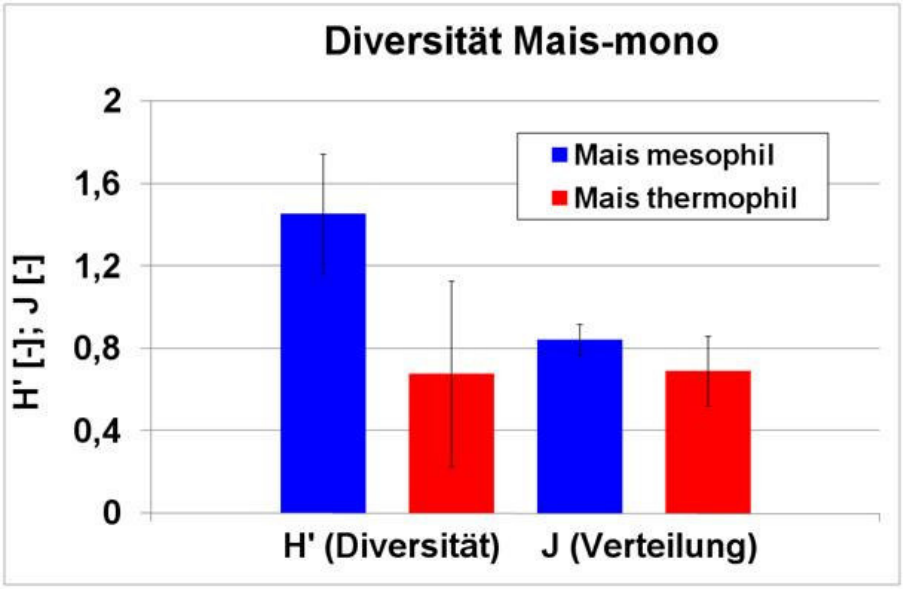
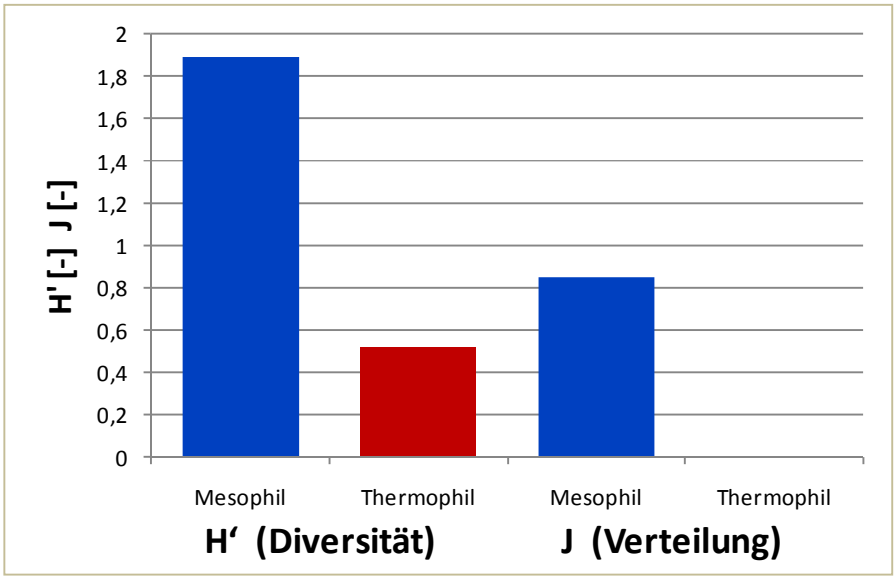


Abbildung 66: Diversität methanogener Archaeen in mesophilen und thermophilen Fermentern (Mais-mono)



Aufgrund niedriger Probenanzahl keine Standardabweichung. Evenness für die thermophilen Proben nicht definiert

Abbildung 67: Diversität methanogener Archaeen in mesophilen und thermophilen Fermentern (Gras-mono)

Azch bei der Gegenüberstellung von mesophiler und thermophiler Grassilage-mono-Betriebsweise zeigte sich bei mesophil betriebenen Fermentern eine deutlich höhere Diversität. Gleichzeitig wurde in mesophil betriebenen Reaktoren eine etwas höhere Anzahl an methanogenen Archaeen als in thermophil gefunden (3.1.3.1). Für weitere Vergleiche wird auch auf das Kapitel 3.1.3.3 verwiesen.

Für thermophil mit Grassilage betriebenen Fermentern konnte kein störungsfreier Betrieb erreicht werden. Da hier keine Daten zur mikrobiologischen Zusammensetzung in einem „Re-

gelbetrieb“ vorlagen wurde auf Fermenterproben mit möglichst geringer Versäuerung bzw. Prozesshemmung ausgewichen. Insgesamt stimmten die Diversitäten der mit Grassilage betriebenen und der mit Maissilage betriebenen Fermenter überein (Abbildung 66, Abbildung 67).

3.2.2.3 Quantifizierung methanogener Archaeen

3.2.2.3.1 Analytik

Zunächst wurde geprüft, ob sich das etablierte *mcr*A/*mrt*A-PCR-System (Bauer et al., 2008) auch als Eva-Green-qPCR Assay nutzen lässt, um alle methanogene *Archaea* in den untersuchten Proben zu quantifizieren (2.2.5). Trotz der hohen Degeneriertheit der Primer und der hohen Fragmentlänge von etwa 400 Basenpaaren lag die Effizienz der qPCR, die über die Steigung der Standardgeraden ermittelt wird, bei etwa 100 % (Abbildung 68). Auf Basis dieses positiven Ergebnisses wurde das System in die Routine-Quantifizierung für methanogene Archaeen übernommen.

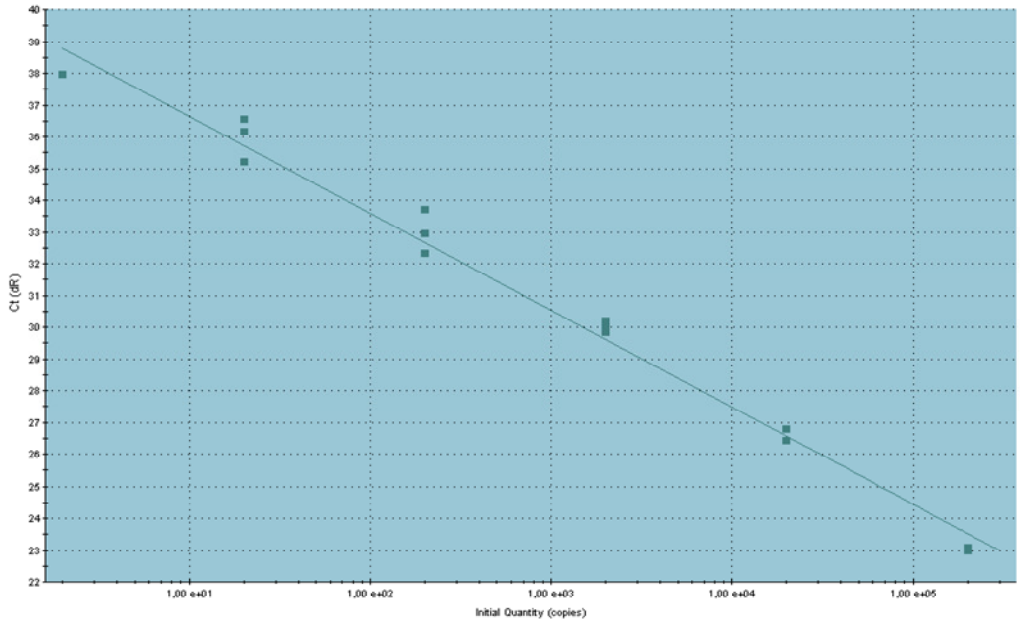


Abbildung 68: Standardgerade in der qPCR-Analyse, Mais-mono mesophil

Die im Anschluss durchgeführten Schmelzpunktanalysen ergaben zwei Peakbereiche, einen breiten Berg bei etwa 74°C sowie bei über 81°C einen bis mehrere scharfe Peaks (Abbildung 69). Der Berg bei etwa 74°C rührt wahrscheinlich von kürzeren PCR-Artefakten her, die Peaks im höheren Temperaturbereich sind die spezifischen Signale. Mit der entsprechend gestalteten Temperaturführung (s. bei 2.2.5) wird im Wesentlichen die Amplifikation der spezifischen DNA-Fragmente erreicht. Stichprobenartige Untersuchungen der Amplifikate auf dem Agarosegel ergaben dementsprechend nur eine Bande (nicht dargestellt).

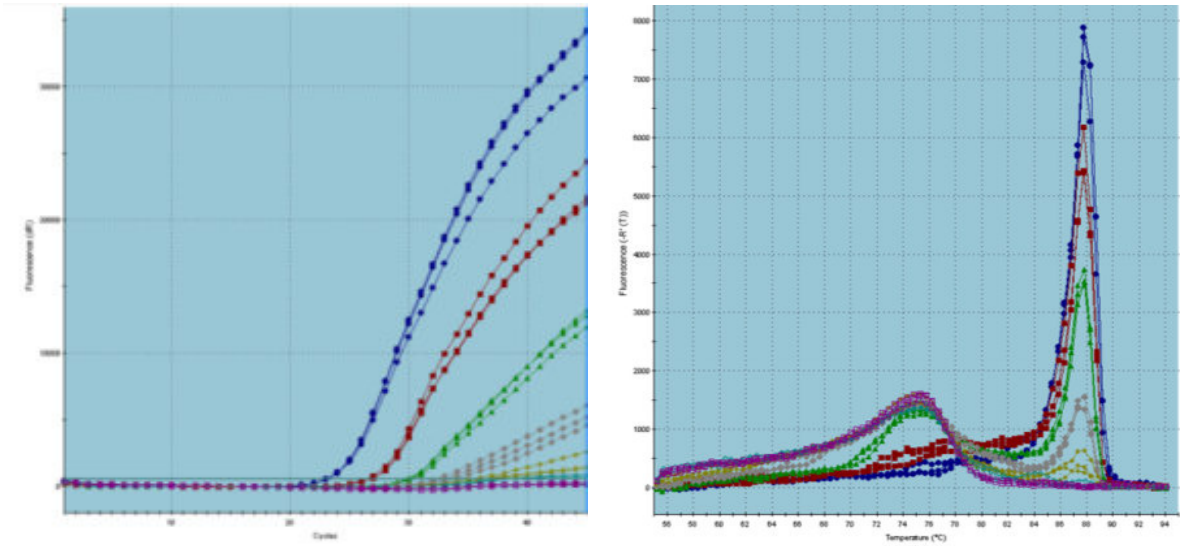


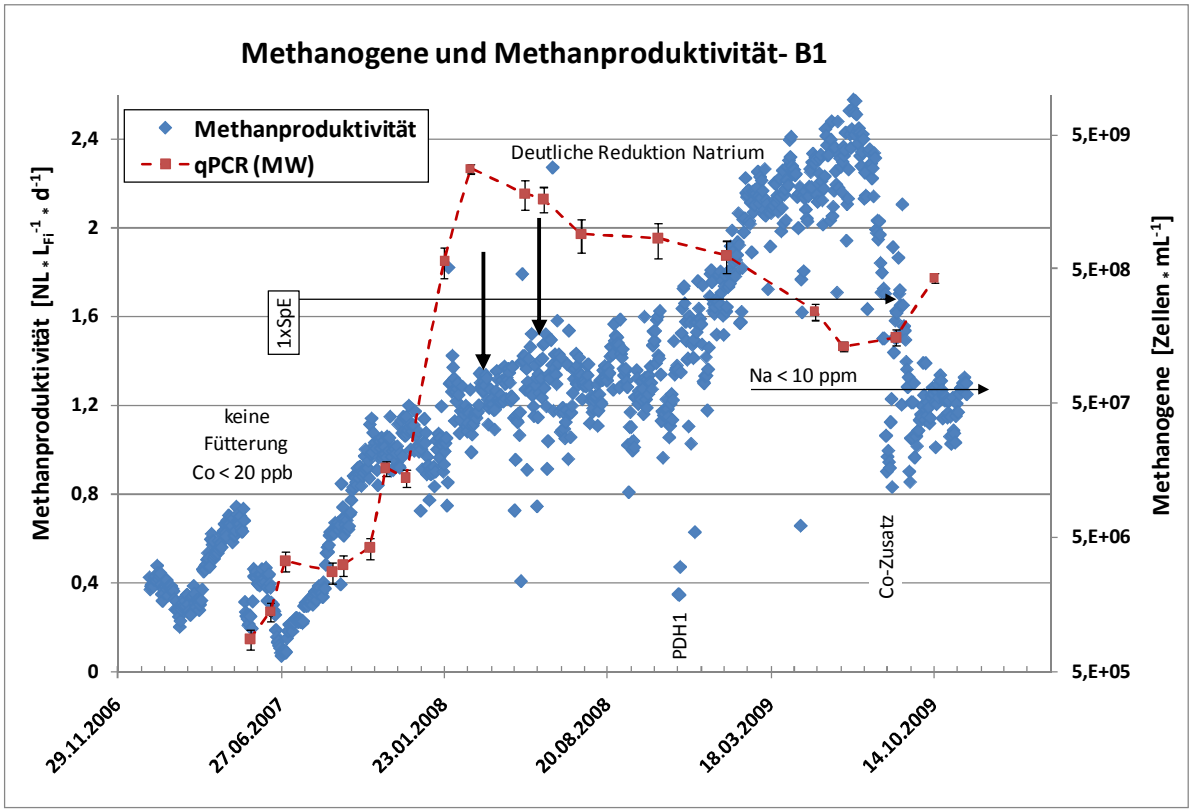
Abbildung 69: Optimierter *mrc*A-/*mrt*A-EvaGreen Assay. Links je drei Wiederholungen pro Verdünnung. Rechts die Schmelzkurvenanalyse

3.2.2.3.2 Quantifizierung von Fermenterproben

Ein Vergleich der Ergebnisse der Quantifizierung Methanogener mit der Methanproduktivität ergab einen teilweise sehr deutlichen Zusammenhang zwischen diesen Parametern (Abbildung 70 - Abbildung 76). Die maximal in den Biogasprozessen erreichten Zellzahlen lagen zwischen 10^9 und 10^{10} * mL^{-1}, was mit Berichten in der Literatur gut übereinstimmt.

Bei starker Fermenterversäuerung (z.B. Fermenter B1 Anfang Juni 2007, Abbildung 70; Fermenter B2 im Dezember 2007, Abbildung 71) wurden deutlich weniger methanogene Archaeen (teilweise im Bereich 10^5 bis 10^6 * mL^{-1}) gemessen. Inwieweit in dieser Fraktion DNA von bereits abgestorbenen oder ruhenden Methanogenen enthalten ist, muss in künftigen Untersuchungen geklärt werden.

In Fermenter B1 (Abbildung 70) wurde zunächst eine sehr niedrige Methanproduktivität, einhergehend mit einer Methanogenen-Zellzahl von weniger als 10^6 * mL^{-1} gemessen. Hier wurde auch eine extrem niedrige Co-Konzentration festgestellt (Abbildung 22). Nach Zugabe des TE-Cocktails konnte ein starker Anstieg der Zellzahl methanogener Archaeen ermittelt werden. Etwa ab Mitte Februar 2008 nahm die Anzahl der Zellen kontinuierlich ab, obwohl die Methanproduktivität stetig anstieg. Möglicherweise waren dies bereits erste Anzeichen der Na^+-Limitierung, die sich im Folgenden einstellte (Abbildung 23). Als Konsequenz der Na^+-Limitierung nahm die Methanproduktivität drastisch ab (Abbildung 70). Der Co-Zusatz gegen Versuchsende schien die limitierte Leistungsfähigkeit der methanogenen Archaeen teilweise kompensiert zu haben. Hierauf weist der leichte Anstieg der methanogenen Zellzahlen und der Methanproduktivität im Oktober 2010 hin. Dementsprechend ging auch die Konzentration der Propionsäure wieder zurück (Abbildung 22). Da sich das FOS/TAC-Verhältnis noch unter 1 bewegte, schien der Fermenter noch gut zur Resilienz fähig gewesen zu sein. Offenbar handelte es sich hier lediglich eine starke Prozessstörung.



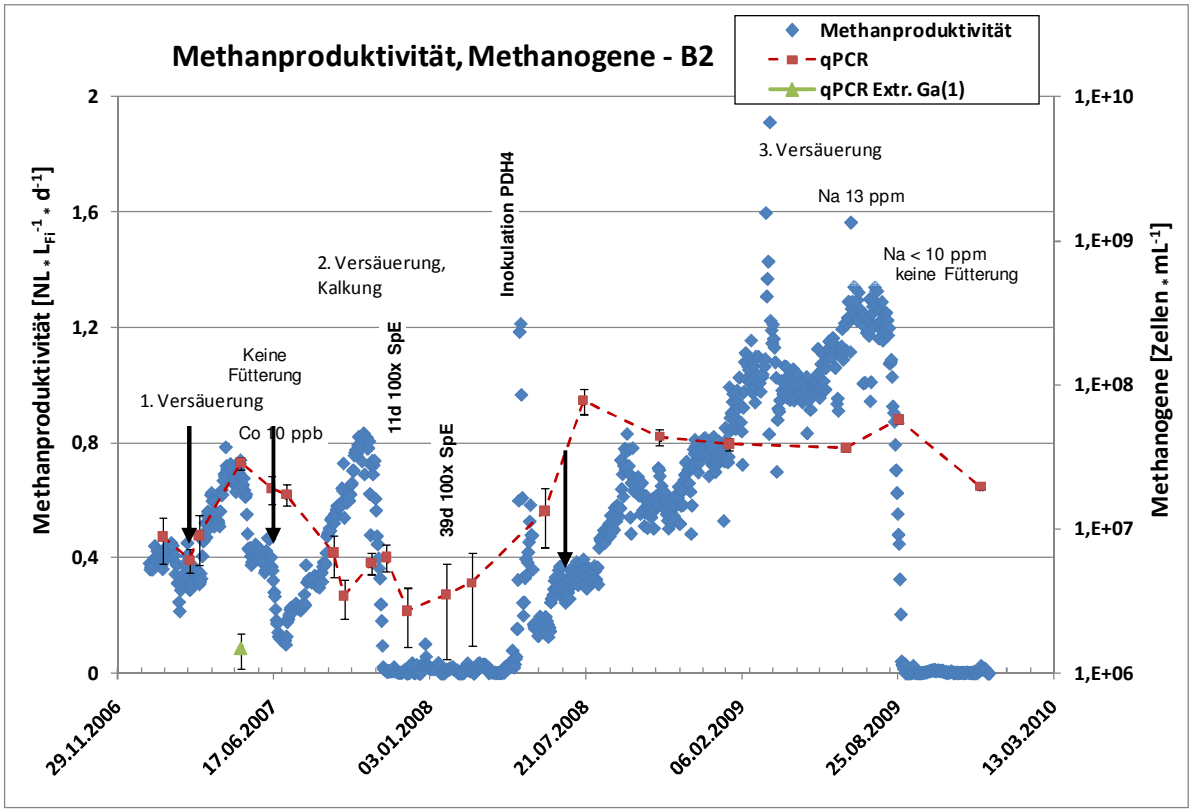
Pfeile bezeichnen Probenahmen für phylogenetische Analysen

Abbildung 70: Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter B1

In Fermenter B2 (Abbildung 71) lag die Methanproduktivität im Vergleich zu den anderen Mais-mesophil betriebenen Fermentern am niedrigsten. In diesem Fermenter war auch im Vergleich zu den anderen mesophilen Mais-mono-Fermentern die methanogene Zellzahl im Maximum am kleinsten. Möglicherweise ist dies eine Konsequenz davon, dass der Fermenter innerhalb des Versuchszeitraum dreimal versäuerte. Im Fermenter B2 wurden über einen längeren Zeitraum stark erhöhte FOS/TAC-Werte gemessen und nur schwache SSCP-Banden festgestellt (Abbildung 62).

Kurz vor und insbesondere mit der Inokulation im April 2008 stiegen die Methanproduktivität und die Konzentration methanogener Archaeen wieder an. Der wiederholt gepulste Zusatz des TE-Cocktails hatte offenbar für günstige Wachstumsbedingungen gesorgt. Mit dem Rückgang der Na^+-Konzentration sank die Konzentration der Methanogenen wieder und der Prozess brach zusammen. Ein Co-Mangel (0,09 mg $*$ L^{-1}) sollte hier nicht bestanden haben, auch für andere Spurenelemente ließ sich keine Limitierung erkennen.

Interessant war das Verhalten der qPCR-Kurven für die Fermenter B1, B2, C1 und C3. Noch bevor das Maximum der Methanproduktivität erreicht war, begann die Konzentration methanogener Archaeen abzunehmen. Für Fermenter B3 und C2 war dies allerdings in gleichem Ausmaß nicht erkennbar (Abbildung 70 - Abbildung 75). Das Maximum der Methanproduktivität scheint auf Stressmetabolismus zu beruhen, da nachfolgend der Prozess schnell zusammenbrach. Möglicherweise kann ein Rückgang der Zahl Methanogener frühzeitig Stressmetabolismus indizieren und damit ein Frühwarnsystem für Prozessstörungen darstellen.



Pfeile bezeichnen Probenahmen für phylogenetische Analysen

Abbildung 71: Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter B2

Fermenter B3 diente wie Fermenter B2 beim Experiment mit Spurenelementzusatz anfangs (3.1.2) als nicht-supplementierte Kontrolle. Analog zum Geschehen in Fermenter B2 traten auch bei Fermenter B3 drei Versäuerungsereignisse auf, die sich in Abbildung 72 nachvollziehen lassen.

Ähnlich dem Fermenter B1 (Abbildung 72) führte der (spätere) Zusatz des TE-Cocktails im Fermenter B3 zu einer Steigerung der Methanproduktivität. Parallel dazu stieg die Anzahl der Methanogenen. Bei einer Natriumkonzentration < 5 mg $*$ L^{-1} im Fermenter kam es mit der Abnahme der methanogenen Zellzahl zu einem Prozesszusammenbruch.

In den Fermentern C1 und C2 kam es zu ähnlichen Verläufen (Abbildung 73, Abbildung 74). Sie werden nicht näher angesprochen, die Interpretation der Ergebnisse entspricht dem für Fermenter B1, B2, B3 und C3 Vorgestellten.

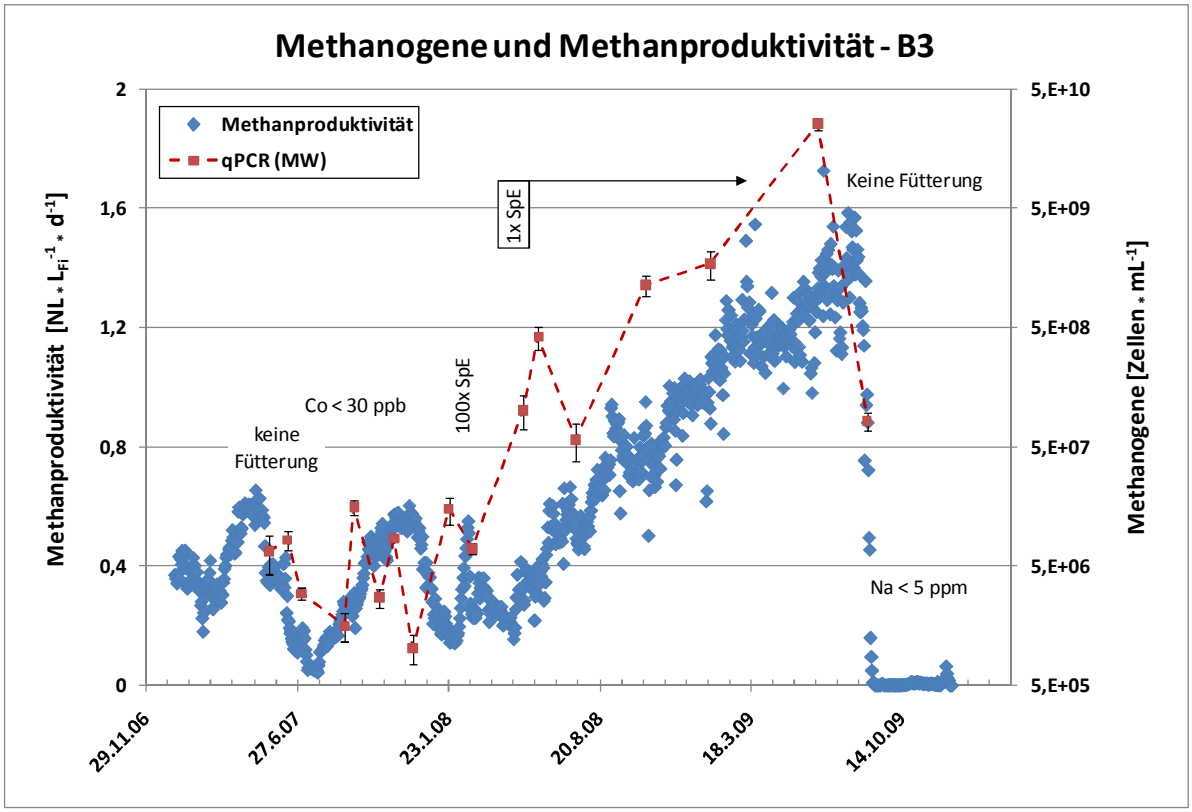


Abbildung 72: Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter B3

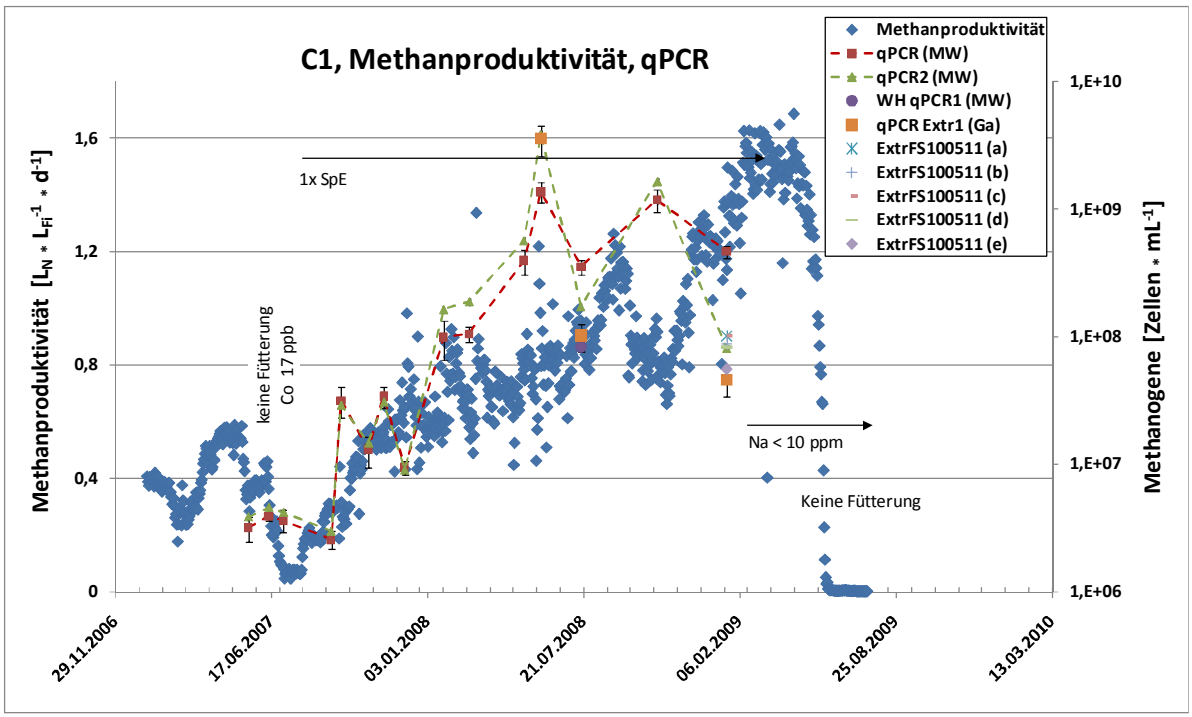


Abbildung 73: Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter C1

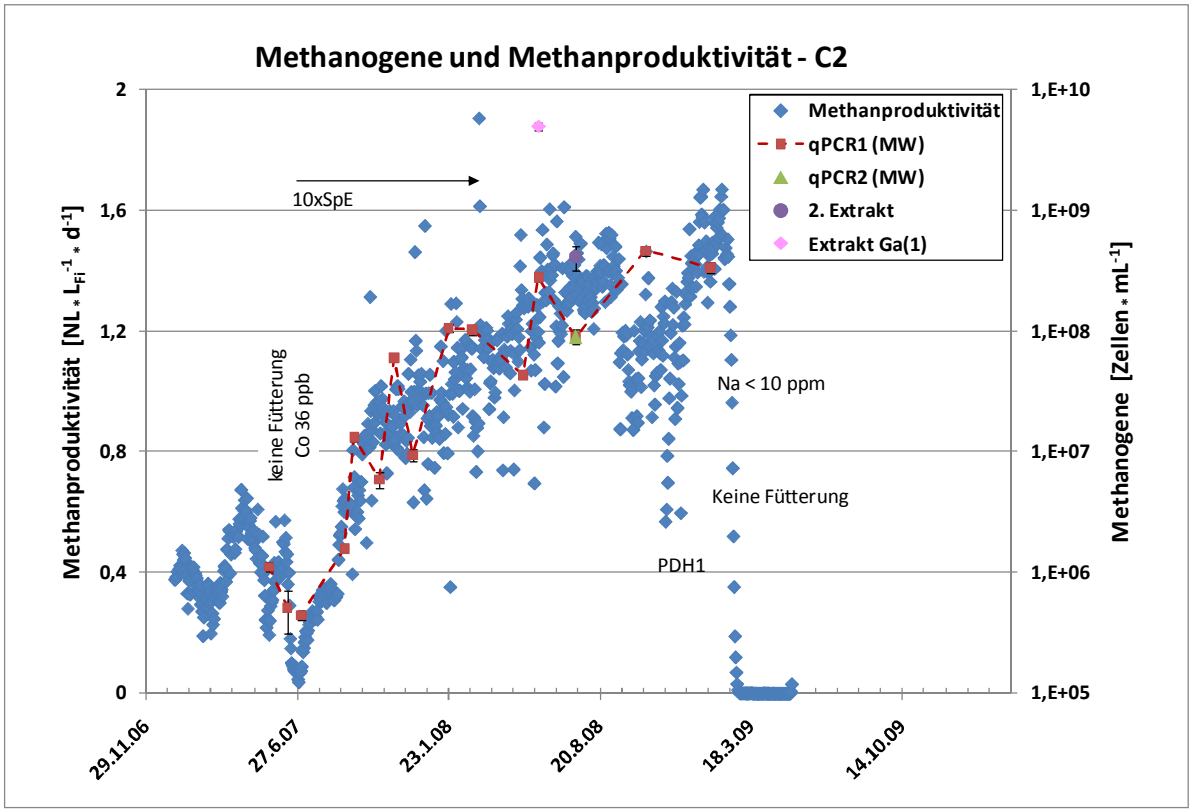
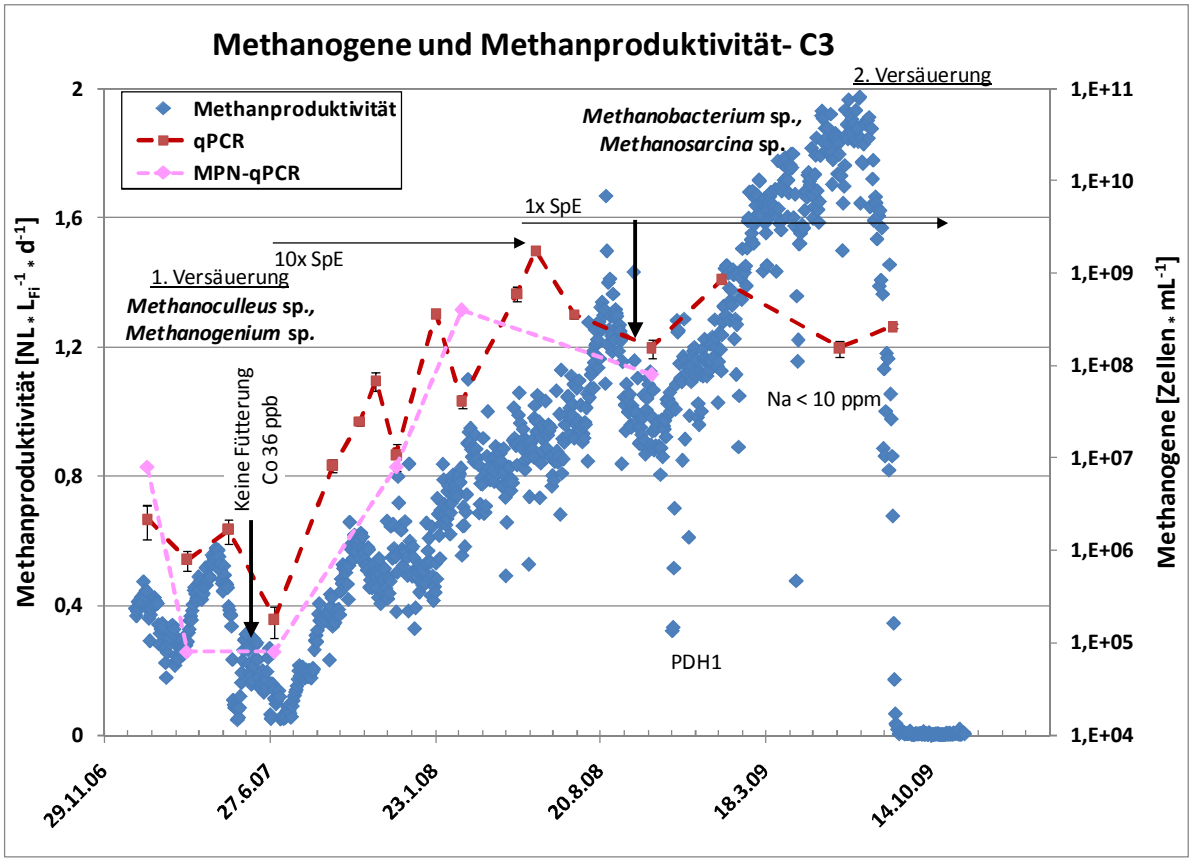


Abbildung 74: Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter C2

Auch in Fermenter C3 (Abbildung 75) stiegen nach der initialen Versäuerung und der Zugabe von Spurenelementen die Zellzahl der Methanogenen und die Methanproduktivität an. Nach einer maximalen Leistung von nahezu 2 $NL_{Methan} * L_{Fi}^{-1} * d^{-1}$, die vermutlich auf Stressmetabolismus zurückzuführen ist, kam es zur finalen Versäuerung. Auch hier betrug Na^+ weniger als 10 mg $* L^{-1}$, Co lag, wie für Fermenter B2 dargestellt, bei 0,1 mg $* L^{-1}$ und sollte daher nicht primär für den Prozesszusammenbruch Ende Februar 2009 verantwortlich gewesen sein. Allerdings kann ein latenter Co-Mangel nicht ausgeschlossen werden, der den überlagerten Stress des Na^+-Mangels verstärkt hatte.

Etwa ab Mitte August 2008 stagnierte die Zellzahl in Fermenter C3, während die Methanproduktivität immer noch stark anstieg. Populationsanalysen zeigten während des Versuchszeitraums eine Änderung in der Zusammensetzung der Population. Während in der ersten Versäuerungsphase überwiegend *Methanoculleus* sp. und *Methanogenium* sp. festgestellt wurden, waren während der hohen Methanproduktivität vor allem *Methanobacterium*-Arten dominant (vgl. Tabelle 27).



Pfeile bezeichnen Probenahmen für phylogenetische Analysen

Abbildung 75:Verlauf der Methanproduktivität und der Anzahl der Methanogenen in Fermenter C3

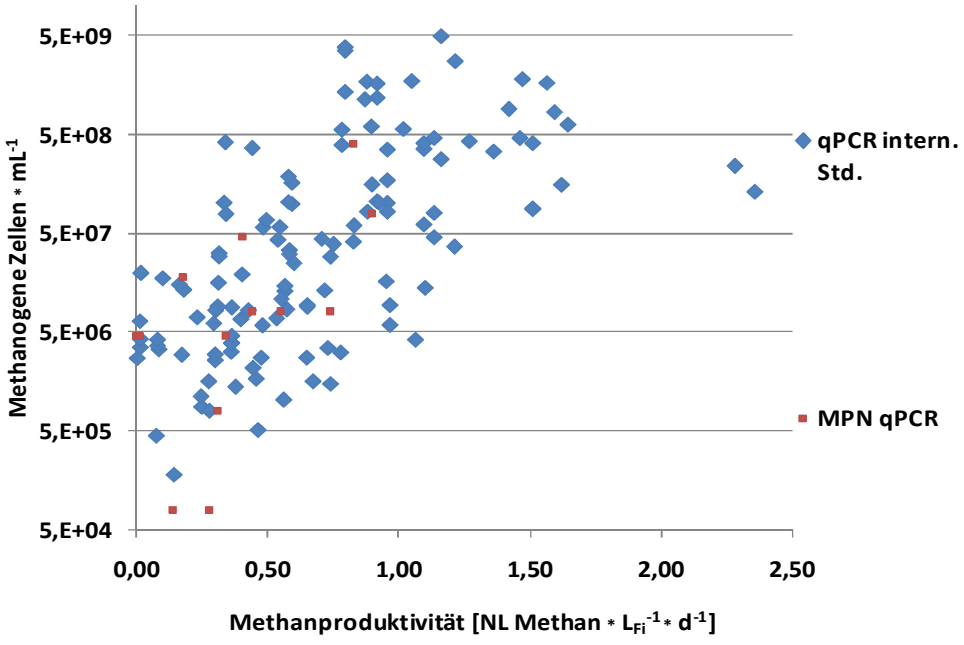


Abbildung 76: Scatterplot der Konzentration methanogener Zellen und der Methanproduktivität

Wegen des offensichtlichen Zusammenhangs zwischen der Konzentration methanogener Archaeen und der Methanproduktivität im mesophilen Mais-mono-Betrieb (Lebuhn et al., 2009) wurden diese Parameter in einem Scatterplot gegeneinander aufgetragen (Abbildung 76). Dabei zeigte sich ein guter Zusammenhang (Spearmans ρ = 0,69).

Der Verlauf der Kurve legt nahe, dass es eine Obergrenze der Konzentration methanogener Archaeen im Fermenterfaulschlamm gibt. Zwischen dieser und der Untergrenze besteht offenbar ein exponentieller Zusammenhang zwischen den Parametern.

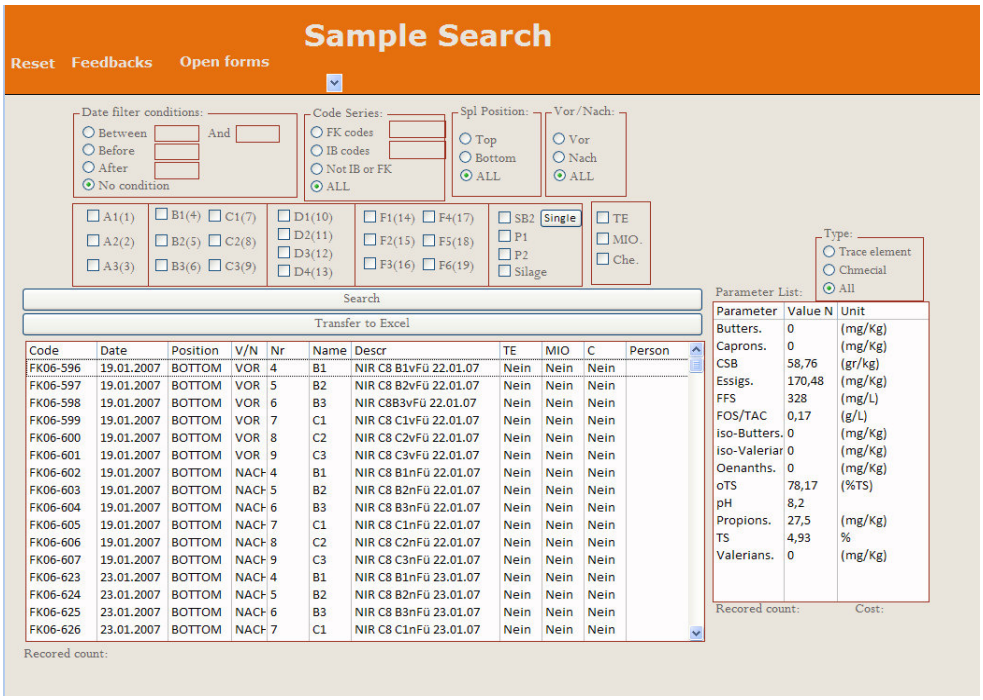
Auch bei sehr geringer Methanproduktion war noch eine beträchtliche Konzentration DNA methanogener Archaeen nachweisbar. Hier ist anzunehmen, dass ein Großteil der methanogenen in eine Dormanz übergegangen war, oder dass DNA toter Zellen gemessen wurden.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass mit der qPCR und DNA als Zielmolekül durchaus die Anzahl aktiver Organismen beschrieben werden kann, wenn das System aktiv und der metabolische Turnover groß ist. In Grenzbereichen mit letalem oder subletalem Stress kann die Bestimmung der Zellzahl durch qPCR aber zu Überschätzung führen, wenn aktive Organismen bestimmt werden sollen. Für solche Sondersituationen besteht Entwicklungsbedarf. Ab die Quantifizierung der messenger-RNA-Bildung hierzu einen wesentlichen Beitrag liefern kann, ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten.

3.3 Zentrales Datenmanagement, Erstellung eines Leitfadens

3.3.1 Zentrales Datenmanagement

Im vorliegenden Teilvorhaben war eine Verknüpfung der Datenströme aus den integrierten Disziplinen unerlässlich, um mit Kreuzabfragen eine zielführende Dateninterpretation zu erlauben.



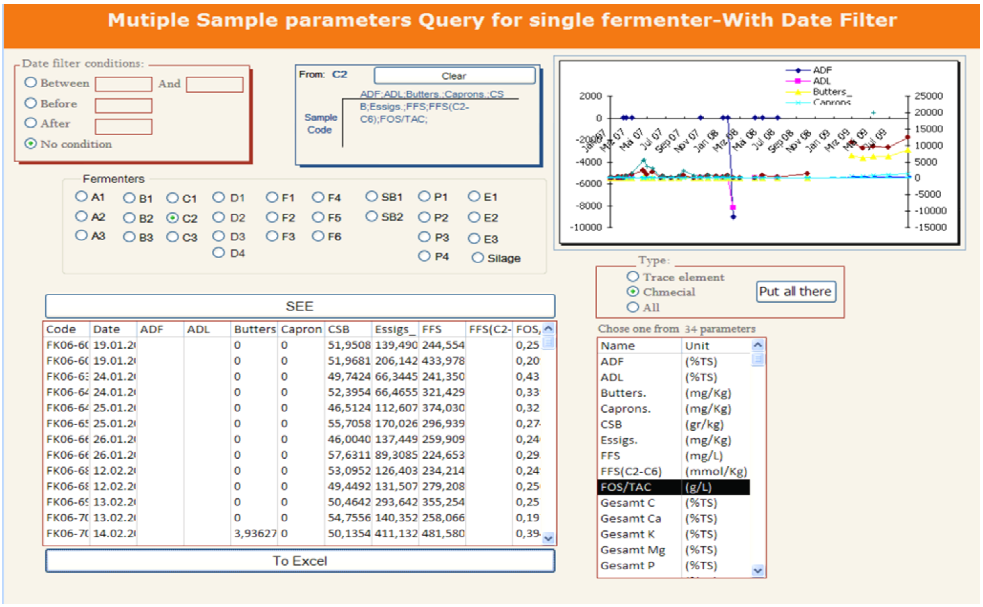


Abbildung 77: Benutzeroberfläche in der Datenbank

Es wurde deshalb auf Basis der Software Access 2007 eine Datenbank programmiert, die diese Bedürfnisse efüllte und ohne großen Zeitaufwand verschiedenste Parameter gegenüberstellen konnte. Die Datenbank umfasst eine Größe von etwa 100 Mb und enthält die im Rahmen des IBMN-Projekts erfassten Labordaten. Eine zweite Access-Datenbank wurde für das Management der Gasdaten erstellt.

Wegen der bedienungsfreundlichen Oberfläche (Abbildung 77) war es möglich, ohne große Vorkenntnisse in Access Abfragen unterschiedlicher Art durchzuführen. Das Einlesen von Daten ist in weiten Zügen automatisiert. Die Ergebnisse der Abfragen können zur weiteren Bearbeitung direkt in Excel importiert und z.B. in SAS weiterverarbeitet werden.

Der Inhalt der Datenbanken ist auch eine ideale Grundlage zur Bearbeitung von Folgevorhaben mit fachlich ähnlicher oder auf die Datenbasis aufbauender Ausrichtung.

3.3.2 Erstellung eines Leitfadens

Im Projektantrag war vorgesehen, für die Praxis einen Leitfaden aus relevanten Ergebnissen des Upscaling in den Praxismaßstab zu gestalten. Dies konnte wegen des vorzeitigen Ausscheidens des Projektpartners aus der Praxis nicht konsequent durchgeführt werden.

Dennoch sind im Rahmen der verbundenen FKZ 220-11-505 mit 220-11-905b Ergebnisse zur Mono-Vergärung von Mais- und Grassilage entstanden, die zur Vermeidung von Prozesseinbrüchen und für die Gestaltung eines effizienten Regelbetriebs in der Praxis von wesentlicher Bedeutung sind. Diese Ergebnisse und entsprechende Handlungsempfehlungen für den Anlagenbetreiber seien hier schlaglichtartig vorgestellt:

<u>Monovergärung von Maissilage</u>

Etwa nach einem halben bis einem Betriebsjahr bzw. etwa 70 % Reaktoraustausch ist mit Prozesseinbrüchen infolge Spurenelement (TE) -Mangel zu rechnen. Werden diese nicht rechtzeitig kompensiert, muss mit eienem völligen Prozesszusamenbruch gerechnet werden.

Primär ist zu beachten, dass der Kobalt- Gehalt im Fermenter einen Schwellenwert von etwa 0,03 mg $*$ L_{Fi}^{-1} nicht unterschreiten sollte.

Sekundär sollte Na^+ einen Schwellenwert von etwa 10 mg $*$ L_{Fi}^{-1} nicht unterschreiten.

Weiterhin sollte Nickel einen Schwellenwert von etwa 0,06 mg $*$ L_{Fi}^{-1} nicht unterschreiten.

Diese Elemente sind gegebenenfalls in geeigneter Form zu supplementieren.

Eine Messung der TE-Gehalte in den Silagechargen mit einer Bilanzierung der Frachten kann einen Überblick über die zu erwartenden TE-Gehalte im Fermenter liefern. Sie sollte aber durch TE-Analysen mit geeigneter Empfindlichkeit bestätigt werden. Es können standortbedingte Unterschiede in verschiedenen Silagechargen auftreten.

Durch thermophile Betriebsweise lassen sich etwas höhere spezifische Methanerträge aus Maissilage erzielen, der Prozess ist aber etwas störanfälliger als der mesophile Betrieb und erfordert intensiveres Prozessmanagement.

Die Untersuchung der methanogenen Biozönose, die Messung des TOS/TAC-Werts sowie die GC-Analyse der Fettsäurezusammensetzung sind die besten Analyseparameter zur Früherkennung von Prozessstörungen.

Monovergärung von Grassilage

Grassilage enthält mehr Spurenelemente (TE) als Maissilage. Mit einem TE-Mangel ist daher nur auf armen Standorten und qualitativ schlechter Silage zu rechnen.

Hauptfaktor für Prozesseinbrüche ist der Ammoniakgehalt. Ein Schwellenwert lässt sich nicht angeben, jedoch ist in Einzelfällen bereits bei etwa 100 mg $*$ L_{Fi}^{-1} mit Prozessstörungen zu rechnen.

Hohe organische Raumbelastungen (OLR) fördern die Ammoniakbildung. Bei mesophiler Prozessführung wird eine OLR über 2,5 kg $*$ m^{-3} $*$ d^{-1} im Monobetrieb mit Grassilage kaum erzielbar sein.

Von einer thermophilen Prozessführung mit Grassilage im Monobetrieb ist derzeit abzuraten.

Bei Prozessstörungen kann eine Fermenterverdünnung Abhilfe schaffen. Der Zusatz ammoniakbindender Hilfsstoffe ist noch entwicklungsfähig. Hilfreich ist auch die Gestaltung von Futtermischrationen mit einem ausgewogenen Maissilageanteil.

Weiterhin konnten die notwendigen Vorarbeiten für eine interaktive Internetplattform geleistet werden, um den Fach- und Verkehrskreisen eine für die landwirtschaftliche Biogasproduktion adäquate Informations- und Kommunikationsmöglichkeit zu bieten. Inzwischen konnte auf Basis dieser Vorarbeiten eine vielfältige Plattform (Biogas Forum Bayern) gebildet und deutlich ausgebaut werden, die nun durch die ALB Bayern e.V. auch über die Projektlaufzeit hinaus gesichert werden wird (http://www.biogas-forum-bayern.de/). Hierdurch ist die Grundlage für die kontinuierliche Fortschreibung von Beratungs- und Handlungsempfehlungen geschaffen, in die die Erkenntnisse aus IBMN einfließen.

Auf der homepage des Biogasforums Bayern sind bereits eine Reihe von Praxisempfehlungen aus unterschiedlichen Bereichen für Betreiber und die interessierte Öffentlichkeit abrufbar.

3.4 Verwertung

3.4.1 Enzymeinsatz

Die Zugabe von Enzymen zu effizient laufenden Biogasreaktoren ergab kaum eine nennenswerte Wirkung auf den Biogasertrag. Allenfalls ist mit einer Steigerung des spezifischen Methanertrags um 8 % zu rechnen. Eine pauschale Empfehlung, bestimmte Enzyme oder Enzymkombinationen zuzusetzen, kann deshalb nicht abgegeben werden.

Interessant könnte es sein, fraktionierte, möglichst reine und schwer metabolisierbare Substratstoffströme durch Einsatz spezifisch selektierter Enzympräparate energetisch oder/und stofflich zu nutzen. Dies könnte im Rahmen einer Kaskadennutzung des Substratabbaus geschehen.

3.4.2 Inokulation mit hydrolytischen Organismen

Der Zusatz von selektierten hydrolytisch/cellulolytischen mikrobiellen Inokula konnte ebenfalls den spezifischen Methanertrag aus Mais- oder Grassilage nicht verbessern.

Eine Ursache kann sein, dass die Lignocellulosefibrillen wegen der ständigen Zufuhr leicht metabolisierbarer organischer Substanz nachrangig oder nicht angegriffen werden. Hierüber könnten Batchversuche mit spezifischem Einsatz unterschiedlich metabolisierbarer Fraktionen Aufschluss geben.

Damit bietet sich an, möglichst reine Substratströme zu inokulieren und ggf. in einem Kaskadensystem fraktioniert einer energetischen und/oder stofflichen Nutzung zuzuführen (vgl. 3.4.1). Weiterhin wäre zu versuchen, sich im Prozess ergebende Limitierungen oder Toxizitäten durch Zusatz spezifisch adaptierter Biozönosen zu kompensieren. Die Selektion von Biozönosen, die beispielsweise gegen eine hohe Ammoniakkonzentration resistent sind, ist eine Herausforderung für die Biotechnologen. Beispielsweise wären solche Inokula ideal geeignet, stickstoffreiche Substrate wie Grassilage effizienter energetisch zu nutzen.

3.4.3 Thermiestufen

Beim Vergleich thermophil und mesophil betriebener Fermenter konnte beim Monobetrieb mit Maissilage ein etwas besserer spezifischer Methanertrag festgestellt werden. Für Grassilage gilt dies wegen der stärkeren Ammoniakbildung nur bei sehr geringen Raumbelastungen. Generell ist für den thermophilen Betrieb eine intensivere analytische Prozessbegleitung wichtig. Sinnvolle und kritische Parameter sind in Kapitel 3.3.2 genannt. Die mesophile Prozessführung ist unempfindlicher gegen Störungen und kann als Standardbetriebsweise empfohlen werden.

Eine bessere Verwertung von Grassilage oder anderen relativ stickstoffreichen Substraten ist eine Herausforderung für die Biotechnologen. Mögliche Wege, dieses Ziel zu erreichen sind in Kapitel 3.4.2 angesprochen.

3.4.4 Spurenelementzusatz

Die Zugabe von Spurenelementen in Anpassung an die Bedürfnisse des Prozesses führte zu einer deutlich verbesserten Betriebsstabilität und einem verbesserten Methanertrag. Ursache

hierfür ist die Versorgung essentieller Bedürfnisse vor allem der methanogenen Archaeen. Auf einzelne Element ist besonders zu achten. Diese sind in Kapitel 3.3.2 genannt.

Forschungsbedarf besteht insbesondere zur Essentialität der Elemente Selen, Molybdän und bedingt auch Nickel. Hier sind die Versorgungsschwellen noch unklar oder nicht sicher.

3.4.5 Nahinfrarotspektroskopie

Diese Untersuchung belegt einerseits die besonderen Schwierigkeiten für eine breite Nutzung von NIRS an nahezu beliebigen landwirtschaftlichen BGA. Andererseits bestätigt sich das große Potential unter eng definierten Randbedingungen der Fütterung und Prozessführung, wie es auch schon andere festgestellt haben.

Für eine breitere Anwendung müssen die Randbedingungen allerdings freier wählbar sein. Hier weisen die dargestellten Ergebnisse auf große Potentiale für die Parameter TS, oTS und NH_4-N hin, die noch unter Praxisbedingungen zu prüfen und gegebenenfalls zu optimieren sind. Die im Prozess kurzzeitig wichtigen Säureparameter sind dagegen erheblich schwieriger zu erfassen. Die Datenanalyse legt aber nahe, dass die hohe Reproduzierbarkeit einer NIRS-Messung mögliche absolute Abweichungen vom tatsächlichen Wert wett macht. Diese Abweichungen könnten auch in systematischen Fehlern in der Erfassung der Messgrößen mit den Referenzmethoden begründet sein.

Deshalb wäre es wichtig hier weiter zu forschen, um (1) die Bedeutung der Matrix für die Erfassung der Säureparameter mit NIRS weiter systematisch zu prüfen und (2) im On-line-Betrieb mit und ohne Störungen im Abbauprozess das Potential von NIRS zu prüfen Konzentrationsänderungen im Verlauf abzubilden und (3) die entwickelten Modelle im On-line Betrieb zu validieren und die Schätzwerte auf systematische Off-Sets zu prüfen.

3.4.6 Molekular- und Mikrobiologie

Im Bereich Molekularbiologie wurden wesentliche methodische Entwicklungen getätigt, evaluiert und für den Routinebetrieb etabliert. Insbesondere die quantitative Real-Time PCR (qPCR) mit *mcr*A/*mrt*A erlaubt im Zusammenhang mit anderen (chemischen) Parametern eine Frühdiagnose des Prozessstatus.

Mit der PCR-SSCP-Methode lassen sich Populationsveränderungen frühzeitig feststellen. Dies kann ebenfalls hilfreich zur Frühdiagnose von Prozessstörungen sein. Die Methode bietet allerdings noch Unsicherheiten, die in der Natur der hochdegenerierten Primer liegen. Hier besteht Potential zur methodischen Weiterentwicklung.

Weiterhin konnten über die phylogenetischen Untersuchungen von methanogenen Archaeen aus definierten Prozesszuständen bestimmte Vertreter identifiziert werden, die als Indikator für bestimmte Prozesszustände in Frage kommen. Der Nachweis solcher Bioindikatoren beispielsweise durch qPCR kann zur Früherkennung von Prozessstörungen (z.B. Spurenelementmangel-induzierte Versäuerung) genutzt werden.

Besonderer Forschungsbedarf besteht noch in der Analyse der der Methanogenese vorgelagerten Prozesse. Hier ist insbesondere die syntrophe und energetisch problematische Umsetzung der Fettsäuren zu nennen. Es sind kaum Vertreter bekannt, die diese Prozesse durchführen, und auch die Mechanismen bedürfen noch weitgehend der Klärung.

3.4.7 Zweiphasige Prozessführung

Eine zweiphasige Prozessführung ohne nennenswerte Methanproduktion in der ersten Phase ist machbar. Bei stark wechselnder Qualität der Substratströme kann eine solche Prozessführung durchaus sinnvoll sein, um die Prozessstabilität zu sichern. Weiterhin ist es möglich, aus der methanogenen Phase sehr methanreiches Biogas zu gewinnen.

Wegen der schlechten energetischen Ausbeute kann der zweiphasige Prozess mit Maissilage in der gegenwärtigen Entwicklungsform aber nicht mit dem einphasigen Prozess konkurrieren und kann daher derzeit nicht für die Praxis empfohlen werden.

Ohne Separation des Gärrests ergab sich gegenüber der einphasigen Prozessführung kein Vorteil. Bei Separation des Gärrests fiel im Betrieb mit Maissilage ein erheblicher Anteil ungenutzter organischer Masse an. Wird diese nicht weiterverwertet, verschlechtert sich die Umsetzung des Kohlenstoffs in die Gasphase.

Weiterhin bleibt derzeit das von der ersten Phase produzierte, wasserstoffreiche Gas ungenutzt. Hier besteht ein erhebliches Potential, den Wasserstoff im „Hydrolysegas“ (HAP-Gas) einer energetischen Nutzung z.B. in Brennstoffzellen zuzuführen. Hierzu ist allerdings eine Reinigung erforderlich. Eine praktikable Lösung wäre zu entwickeln. Die Nutzung des HAP-Gases und des in der ersten Phase anfallenden Gärrests wären bei dieser Betriebsweise die entscheidenden Faktoren, die Ökobilanz zu verbessern.

3.5 Erkenntnisse von Dritten

Da Erkenntnisse von Dritten im unmittelbaren Sachzusammenhang mit den durchgeführten Untersuchungen stehen, wurden die an jeweils passender Stelle in den Teil Ergebnisse und Diskussion (Kapitel 3) integriert. Die Erkenntnisse von Dritten zum jeweils angesprochenen Sachverhalt sind im Text adäquat kenntlich gemacht und der gängigen Praxis entsprechend im Kapitel Literatur (4) zitiert.

Auf Erkenntnisse von Dritten wird aus diesem Grund hier nicht näher eingegangen.

3.6 Aus FKZ 220-11-505 mit FKZ 220-11-905b entstandene Veröffentlichungen

3.6.1 Schriftliche Veröffentlichungen

C. Bauer, M. Korthals, A.Gronauer and M. Lebuhn (2008): Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. In: Proceedings of the Vth International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes and Energy Crops, Hammamet, Tunisia, May 25-28, 2008

C. Bauer, M. Korthals, A. Gronauer and M. Lebuhn (2008): Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. Water Sci. Tech. 58(7), 1433-1439

C. Bauer, M. Lebuhn und A. Gronauer (2009): Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. LfL-Schriftenreihe 12, ISSN 1611-4159, pp. 38

M. Lebuhn (2008): Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus NawaRo (IBMN) - Teilvorhaben: Verfahrenstechnik, Prozessautomatisierung und Mikrobio-

logie. In: Jahresbericht 2007 (Hrsg.: G. Wendl et al.), Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung, S. 28-32

M. Lebuhn, F. Liu, H. Heuwinkel and A. Gronauer (2008): Biogas production from monodigestion of maize silage – long-term process stability and requirements. Proceedings of the Vth International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes and Energy Crops, Hammamet, Tunisia, May 25-28, 2008

M. Lebuhn, F. Liu, H. Heuwinkel and A. Gronauer (2008): Biogas production from monodigestion of maize silage – long-term process stability and requirements. Water Sci. Tech. 58(8), 1645-1651

M. Lebuhn, C. Bauer und A. Gronauer (2008): Probleme und molekularbiologische Analytik der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen im Langzeitbetrieb. In: Kongressband des 120. VDLUFA Kongresses in Jena, 16.-19.9.2008, VDLUFA-Schriftenreihe 64, 118-125, ISBN978-3-941273-05-4

M. Lebuhn, C. Bauer, B. Munk and A. Gronauer (2009): Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage – a causal analysis. Proceedings of the 1st International Congress Biogas Science 2009, 2.12. – 4.12.2009, Erding, LfL-Schriftenreihe 16/2, ISSN 1611-4159, 319-332

F. Liu, M. Lebuhn and A. Gronauer (2009): Process control of an anaerobic hydrolysis-acidogenesis phase of a two-stage fermenter system treating maize silage. Proceedings of the 1st International Congress Biogas Science 2009, 2.12. – 4.12.2009, Erding, LfL-Schriftenreihe 16/3, ISSN 1611-4159, 655-662

B. Munk, C. Bauer, A. Gronauer and M. Lebuhn (2010): Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage - a causal analysis. Eng. Life Sci., in Revision.

3.6.2 Geplante Veröffentlichungen

M. Lebuhn, C. Bauer, B. Munk and A. Gronauer: Development and composition of methanogenic biocenoses in biogas fermenters fed with renewable resources.

Übermittlung der *mcr*A/*mrt*A-Sequenzen und akzessorischer Informationenan das NCBI, Sequenzannotation.

3.6.3 Masterarbeiten

F. Liu (2010): Optimization of anaerobic hydrolysis-acidogenesis phase in two-phase fermenter treating maize silage. Master thesis, Technical University of Munich, pp. 53.

3.6.4 Mündliche Wissensvermittlung

Mit den Erkenntnissen aus den verbundenen Teilvorhaben FKZ 220-11-505 und 220-11-905b wurde eine Vielzahl von Vorträgen, Seminaren und Fachgesprächen gestaltet. Diese können in ihrer Fülle hier nicht aufgeführt werden.

Zumindest seien hier aber die Koordinierungsgespräche im November 2008 in Gülzow, die jährlichen, von der Koordination veranstalteten Statusseminare und der gemeinsame, von der FNR unterstützte und mitgestaltete mehrtägige Kongress Biogas Science 2009 genannt. Hier

stellten Vertreter aller Teilvorhaben als Abschlussveranstaltung von IBMN ausgewählte Ergebnisse einem internalen Publikum vor.

Auf der Tagung Biogas Science 2009 in Erding wurde der Stand des Wissens von der Grundlagenforschung in die Praxis dargestellt, zusammengefasst und der Allgemeinheit in Form eines dreibändigen Tagungsbandes zugänglich gemacht:

http://www.lfl.bayern.de/publikationen/daten/schriftenreihe/p_37628.pdf;
http://www.lfl.bayern.de/publikationen/daten/schriftenreihe/p_37629.pdf;
http://www.lfl.bayern.de/publikationen/daten/schriftenreihe/p_37630.pdf.

4 Literatur

Ahring, B.K., Mladenovska, Z., Iranpour, R., Westermann, P. (2002): State of the art and future perspectives of thermophilic anaerobic digestion. Water Sci. Technol. 45, 293-298.

Angelidaki, I. and Ahring, B.K. (1993): Thermophilic Anaerobic-Digestion of Livestock Waste - the Effect of Ammonia. Appl. Microbiol. and Biotechnology 38 (4), 560-564.

Andrade, D., Heuwinkel, H. und Gronauer, A. (2009a): Potentiale zur alleinigen Fermentation von Grassilage: Aspekte der Silagequalität und Fermentationsbedingungen. Bornimer Agrartechnische Berichte, Heft 68, 57-68.

Andrade, D., Marin-Perez, C., Heuwinkel, H., Lebuhn, M., Gronauer, A., 2009b. Biogasgewinnung aus Grassilage: Untersuchungen zur Prozessstabilität. Proceedings of the 1st International Congress Biogas Science 2009, 2.12. – 4.12.2009, Erding, LfL-Schriftenreihe 16/3, ISSN 1611-4159, 529-538.

Babek, F. und Hamm, U. (2004): Grundlegende Untersuchungen zur Vermeidung von Betriebsproblemen bei der thermophilen anaeroben Behandlung v. Kreislaufwässern der Papierindustrie. Abschlussbericht. Universität Darmstadt. http://www.vdp-online.de/pdf/Abschlussbericht_13415.pdf.

Bagi, Z., Acs, N., Balint, B., Horvath, L., Dobo, K., Perei, K.R., Rakhely, G., Kovacs, K.L. (2007): Biotechnological intensification of biogas production. Appl. Micr. Biotec., 76, 473-482.

Bassam, B.J., Caetano-Anollés, G. and P.M. Gresshoff (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, Anal. Biochem. 196 (1), 80–83

Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H. and Vavilin, V.A. (2002): Anaerobic Digestion Model No. 1. IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes, Scientific and Technical Report No. 13. IWA Publishing.

Bauer, C., Korthals, M., Gronauer, A. and Lebuhn, M. (2008): Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. Water Sci. Tech. 58(7), 1433-1439.

Blaut, M. (1994): Metabolism of methanogens, Antonie Van Leeuwenhoek 66 (1–3), 187–208.

Bossel, H. (1994): Modellbildung und Simulation: Konzepte, Verfahren und Modelle zum Verhalten dynamischer Systeme; ein Lehr- und Arbeitsbuch. – 2. veränd. Aufl.. Braunschweig: Vieweg.

Castro, H., Ogram, A. and Reddy, K.R. (2004): Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the Florida Everglades. Appl. Environ. Microbiol. 70 (11), 6559-6568.

Christ, O. (1999): Leistungscharakteristik der ein- und zweistufigen thermophilen und mesophilen Vergärung von Bioabfällen. Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft Nr. 148, ISSN 0942-914X.

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

Demirel, B. and Yenigün, O. (2002): Two-Phase Anaerobic Digestion Processes: A Review, J. Chem. Tech. Biotech. 77, 743-55.

Deppenmeier, U., Lienard, T. and Gottschalk, G. (1999): Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. FEBS Lett. 457 (3), 291–297.

Dinsdale, R. M., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L. (1997): Comparison of mesophilic and thermophilic UASB-Reactors treating instant coffee production wastewater. Water Research 31/1, 163-169.

Dinsdale, R. M., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L. (1997): Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion with thermophilic preacedification of instant-coffee-production wastewater. Water Research 31/8, 1931-1938.

Dizer, H., Leschber, R., Lopez Pila, J.M., Seidel, K. (1986): Untersuchungen zur Entseuchung von Klärschlamm durch anaerob-thermophile Behandlung. Korrespondenz Abwasser 33/8, 703-709.

Dolud, M.; Andree, H.; Hügle, T. (2005): Kontinuierliche Analyse von Schweinegülle mit Nahinfrarotspektroskopie (NIR). Landtechnik 60/1, 32-33.

Effenberger, M., Bachmaier, J. und Gronauer, A. (2006): Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten. Abschlussbericht des StMLF-Vorhabens. PP. 122.

Effenberger, M. und Lebuhn, M. (2008): Biologie der Methangärung – die Belastungsgrenzen erkennen. mais 2/08, Sonderbeilage "Biogas", S. 4-7.

Ferry, J. G. (1999): Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. FEMS Microbiol. Rev. 23(1), 13–38.

Finlay, B.J., Maberly, S.C. and Cooper, J.I. (1997): Microbial diversity and ecosystem function. Oikos 1997, 80, 209–213.

Freeman, W.M., Walker, S.J. and Vrana, K.E. (1999): Quantitative RT-PCR: potential and pitfalls. BioTechniques, 26, 112–125.

Gallert, C. and Winter, J. (1997): Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. Appl. Microbiol. Biotech. 48 (3), 405-410.

Garcés, G., Effenberger M., Najdrowski, M., Wackwitz, C., Gronauer, A., Wilderer, P.A. and Lebuhn, M. (2006): Quantification of *Cryptosporidium parvum* in anaerobic digesters treating manure by (reverse-transcription) quantitative real-time PCR, infectivity and excystation tests. Water Sci. Tech. 53/8, 195-202

Garcés, G., Effenberger, M., Najdrowski, M., Gronauer, A., Wilderer, P.A., Lebuhn, M. (2005): Quantitative real-time PCR for detecting *Cryptosporidium parvum* in cattle manure and anaerobic digester samples - Methodological advances in DNA extraction. *Proc. of the 8th Lat. Am. Workshop Symp. on Anaerobic Dig.*, Punta del Este, Uruguay, 68-73, ISBN 9974-7699-3-0.

Gronauer, A., Schlattmann, M., Speckmaier, M. und Metzner, T. (2005): Konzeptionierung, Erstellung und Betrieb einer Versuchsfermenteranlage zur Bearbeitung von Fragestellungen im Bereich Inputmaterialien und Mikrobiologie bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Abschlussbericht des BMBF Vorhabens FKZ 0330151A. http://www.lfl.bayern.de/ilt/umwelttechnik/17837/bmbf_high.pdf

Hansen, K., Angelidaki, I., Ahring, B. (1997): Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. Water Res, 32, 5-12.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M. (1996): Real time quantitative PCR. Genome Res., 6(10), 986–994.

Holm-Nielsen, J.B., Lomburg, C.J., Olescowicz-Popiel, P. and Esbensen, K.H. (2008): Online Near Infrared Monitoring of Glycerol-Boosted Anaerobic Digestion Processes: Evaluation of Process Analytical Technologies. Biotech. Bioeng., 99 (02), 302-313.

Hornek, R., Pommerening-Röser, A., Koops, H.P., Farnleitner, A.H., Kreuzinger, N., Kirschner, A., Mach, R.L. (2006): Primers containing universal bases reduce multiple amoA gene specific DGGE band patterns when analysing the diversity of beta-ammonia oxidizers in the environment. J Microbiol Meth, 66, 147-155.

Hugenholtz, P. (2002): Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. Genome Biology, 3(2), :reviews0003.1–03.8.

Jacobi, H.F., Moschner, C.R. and Hartung, E. (2009a): Überwachung von Leitparametern des Biogasprozesses mittels NIRS. Landtechnik 64, 119-122.

Jacobi, H.F., Moschner, C.R. and Hartung, E. (2009b): Use of near infrared spectroscopy in monitoring of volatile fatty acids in anaerobic digestion. Water Sci. Tech., 60 (2), 339-346.

Jakob, J., Roos, H.-J., Siekmann, K. (1987): Zweistufige anaerob-thermophil/anaerobe Verfahrenstechnik zur Stabilisierung und Entseuchung von Klärschlamm. Korrespondenz Abwasser 34/4, 331-338.

Jarrell, K.F. and Kalmokoff, M.L. (1988): Nutritional requirements of the methanogenic archaebacteria.Can. J. Microbiol. 34 (1987) 557-576.

Jarvis, Å., Nordberg, Å., Jarlsvik, T., Mathisen, B., Svensson B.H. (1997): Improvement of a grass-clover silage-fed biogas process by the addition of cobalt, Biomass Bioenergy, 12 (6), 453-460.

Jetten, M.S.M., Stams, A.J.M. and Zehnder, A.J.B. (1992): Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp., FEMS Microbiol. Lett. 88 (3-4), 181–198.

Kaiser, F. (2004): Untersuchung der Wirkung von MethaPlus S100 auf die Vergärung von Maissilage in Laborfermentern. Forschungsauftrags-Abschlussbericht an COWATEC GmbH, pp. 1-10.

Karakashev, D., Batstone, G.J., Trably, E. and Angelidaki, I. (2006): Acetate oxidation is the dominant pathway from acetate in the absence of *Methanosaetaceae*, Appl. Environ. Microbiol. 72 (7), 5138–5141.

Kisand, V. and Wikner, J. (2003): Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. J. Micr. Meth. 54, 183-191.

Kissel, R., Effenberger, M. und Herb, C. (2010): Empfehlungen für die Auswahl von Rührwerken für Gärbehälter, http://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Empfehlungen.fuer.die.Auswahl.von.Ruehrwerken.fuer.Gaerbehaelter.pdf

Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Souidi, K., Mumme, J. and Linke, B. (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. Syst. Appl. Microbiol. 2008, 31 (3), 190-205.

Koch, K., Lübken, M., Wichern, M. und Horn, H. (2010): Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen, Teilvorhaben 5: Model-

lierung und Prozesssteuerung, Anlagenbetrieb und mikrobiologische Analytik. Abschlussbericht des FNR-BMELV-Verbundvorhabens FKZ 22011905. PP. 203.

KTBL (2007): Faustzahlen Biogas. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft, ISBN 978-3-939371-46-5.

Lange, M. and Ahring, B.K. (2001): A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea. FEMS Microbiol. Rev., 25, 553-571.

Lebuhn M., Effenberger M., Garcés G., Gronauer A. and Wilderer P.A. (2005a): Hygienization by anaerobic digestion: Comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR. Water Sci. Technol. 52/1-2, 93-99.

Lebuhn, M., Effenberger, M., Garcés G., Gronauer A. and Wilderer, P. (2004a): Evaluating Real-Time PCR for the Quantification of Distinct Pathogens and Indicator Organisms in Environmental Samples. Water Sci. Technol. 50, 263-270.

Lebuhn, M., Effenberger, M., Gronauer, A. Wilderer, P. (2003): Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. Water Sci. Technol. 48, 97-103.

Lebuhn, M., Liu, F., Heuwinkel, H. and Gronauer, A. (2008): Biogas production from monodigestion of maize silage – long-term process stability and requirements. Water Sci. Tech. 58(8), 1645-1651

Lebuhn, M., Bauer, C., Munk, B. and Gronauer, A. (2009): Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage – a causal analysis. Proceedings of the 1st International Congress Biogas Science 2009, 2.12. – 4.12.2009, Erding, LfL-Schriftenreihe 16/2, ISSN 1611-4159, 319-332.

LfU (2004): Verfahrens-, Geräte und Anlagentechnik – Fördersysteme – Einbringtechnik. Bayerisches Landesamt für Umweltschutz (Hrsg.); Biogashandbuch Bayern – Materialienband S. 41. Augsburg 2004.

Lie, Y.S. and Petropoulos, C.J. (1998): Advances in quantitative PCR technology: 5′ nuclease assays. ViroLogic, Inc, South San Francisco, California, USA. Curr. Opin. Biotechnol., 9, 43–48.

Lindorfer, H., Kirchmayr, R. and Braun, R. (2006): Self-heating of anaerobic digesters using energy crops. Water Sci, Technol. 53 (8), 159-166.

Liu, F. (2010): Optimization of anaerobic hydrolysis-acidogenesis phase in two-phase fermenter treating maize silage. Master thesis, Technical University of Munich, pp. 53.

Liu, F., Lebuhn, M. and Gronauer, A. (2009): Process control of an anaerobic hydrolysis-acidogenesis phase of a two-stage fermenter system treating maize silage. Proceedings of the 1st International Congress Biogas Science 2009, 2.12. – 4.12.2009, Erding, LfL-Schriftenreihe 16/3, ISSN 1611-4159, 655-662.

Lomborg, C.J., Holm-Nielsen, J.B., Oleskowicz-Popiel, P., Esbensen, K.H. (2009): Near infrared and acoustic chemometrics monitoring system for the anaerobic process, based on headspace gas chromatography. Biores. Technol., 100(5), 1711-1719.

Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., Riley, P.W. (2002): The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. Microbiology 148, 3521-3530.

Lynd, L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H. and Pretorius I.S. (2002): Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66(3), 506-77.

Marín-Pérez, C., Lebuhn, M. und Gronauer, A. (2009a): Mehr Gas aus Gras. Biogas Journal 4, 42-75.

Marin-Perez, C., Lebuhn, M., und Gronauer, A. (2009b): Entwicklung eines neuen Biogasverfahrens zur effizienten Verwertung von NawaRo auf thermophiler Basis. Proceedings of the 1st International Congress Biogas Science 2009, 2.12. – 4.12.2009, Erding, LfL-Schriftenreihe 16/3, ISSN 1611-4159, 563-567.

Mitchinson, C. (2004): Improved Cellulases for the biorefinery. In Ohmiya, K., K. Sakka, S. Karita, T. Kimura, M. Sakka, and Y. Onishi (eds.), Proceedings of the Mie Bioforum 2003: Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization. Uni Pub. Co. Ltd., Tokyo. p. 792.

Mudrack, K. und Kunst, S. (2003): Biologie der Abwasserreinigung. Spektrum Akademischer Verlag; ISBN:3-8274-1427-X.

Muyzer, G. (1999): DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems.Curr. Opin. Microbiol. 2, 317-322.

Nast, D. (2006): Stand der Anwendung einer Nahinfrarotspektroskopie zur Ermittlung von Inhaltsstoffen landwirtschaftlicher Produkte. LfL-AQU, mündliche Mitteilung.

Nielsen, H.B., Mladenovska, Z., Ahring, B.K. (2007): Bioaugmentation of a two-stage thermophilic (68° C/55° C) anaerobic digestion concept for improvement of the methane yield from cattle manure. Biotec. Bioeng., 97, 1638-1643.

Nielsen, H.B., Mladenovska, Z., Westermann, P., Ahring, B.K. (2004): Comparison of two-stage thermophilic (68°C/55°C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55°C) digestion of cattle manure. Biotechnol. Bioeng. 86/3, 291-300.

Nordmann, W. (1977): Die Überwachung der Schlammfaulung. Informationen für das Betriebspersonal. 3/77, Beilage zur Korrespondenz Abwasser.

Pobeheim, H., Munk, B., Johansson, J., Guebitz, G.M. (2010): Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage. Bioresource technology 101, 836-839.

Polomski, A. (1998): Einfluss des Stofftransports auf die Methanbildung in Biogas-Reaktoren. Dissertation am Institut für Bioprozess und Bioverfahrenstechnik – Universität Hamburg-Harburg. VDI-Verlag GmbH – Düsseldorf; ISBN: 3-18-356903-5.

Reuter, M. und Schmack, D. (2010): Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen, Teilvorhaben 2: Effizienzsteigerung der NawaRo-Vergärung durch Übertragung der Inokulierung mit LCB-abbauenden Bakterien und von verfahrens- und steuerungstechnischen Optimierungsstrategien in den Technikums- und Praxismaßstab.Abschlussbericht des FNR-BMELV-Verbundvorhabens FKZ 220-11-605.

Rieger, C. und Weiland, P. (2006): Prozessstörungen frühzeitig erkennen. Biogas Journal 4/06, 18-20.

Schimpf, U. und Valbuena, R. (2009): Effizienzsteigerung der Biomethanisierung durch Enzymzusätze. Bornimer Agrartechnische Berichte, Heft 68, 44-56.

Schloter, M., Lebuhn, M., Heulin T. and Hartmann, A. (2000): Ecology and evolution of bacterial microdiversity. FEMS Microbiol. Rev. 24, 647-660.

Schloter, M., Engel, M., Dong, X. and Munch, J.C. (2010): Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen, Teilvorhaben 4: Er-

fassung funktioneller hydrolytischer Netzwerke in Biogasanlagen mittels Mikroarraytechnologie. Abschlussbericht des FNR-BMELV-Verbundvorhabens FKZ 220-118-05.

Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N.N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.H., Krahn, I., Krause, L., Krömeke, H., Kruse, O., Mussgnug, J.H., Neuweger, H., Niehaus, K., Pühler, A., Runte, K.J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Tilker, A., Viehöver, P. and Goesmann, A. (2008): The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology, J. Biotechnol. 136 (1-2), 77-90.

Scholwin, F., Weidele, T., Gattermann, H., Schattauer, A., Weiland, P. (2004): Anlagentechnik zur Biogasbereitstellung. In: Handreichung Biogasgewinnung und –nutzung, S. 50. Fachagentur nachwachsende Rohstoffe (Hrsg.).

Schwarz, W. (2010): Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen, Teilvorhaben 3: Optimierte hydrolytische Bakterien-Kulturen für den Faserabbau in LCB-reichen NawaRo. Abschlussbericht des FNR-BMELV-Verbundvorhabens FKZ 220-118-05.

Schwieger, F. and Tebbe, C.C. (1998): A new approach to utilize PCR single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA genebased microbial community analysis. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4870–4876.

Shannon, C.E .(1948): A mathematical theory of communication". Bell System Technical Journal 27; 379–423.

Siegrist, H., Renggli, D. and Gujer, W. (1993): Mathematical Modelling of anaerobic mesophilic sewage sludge treatment. Water Science Technology 27/2, 25-36.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24 (8), 1596-1599.

Tidden, F. (2003) Leistungsmerkmale und Grenzen der mehrphasigen anaeroben Behandlung kommunaler Bioabfälle. Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft 176, ISSN 0942-914X.

Torsvik, V. and Øvreås, L. (2002): Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 5, 240–245.

Weiß, S., Tauber, M., Somitsch, W., Meincke, R., Müller, H., Berg, G., Guebitz, GM (2009): Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite. Water res., 44, 1970-1980.

Xu, F. (2004): Enhancing biomass conversion to fermentable sugars: A progress report of a joint government.industrial project. Proceedings of the Mie Bioforum 2003: Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization. Uni Pub. Co. Ltd., Tokyo. pp. 793-804.

Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen

Teilvorhaben 5: Modellierung und Prozesssteuerung, Anlagenbetrieb und mikrobiologische Analytik

a. Entwicklung einer modellbasierten nachhaltigen Prozesssteuerung - Ökobilanz, Benchmarking

Abschlussbericht

Konrad Koch, Manfred Lübken, Marc Wichern und Harald Horn

Technische Universität München

Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft

Am Coulombwall, 85748 Garching

E-Mail: wga@bv.tum.de

Tel.: 089/289-13700

Auftraggeber:	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.
Auftragsdatum:	01.10.2006 FKZ: 22011905
Projektleitung:	Prof. Dr. H. Horn, Prof. Dr. M. Wichern (jetzt Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft und Umwelttechnik, Ruhr-Universität Bochum)
Bearbeiter:	K. Koch, M. Lübken (jetzt Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft und Umwelttechnik, Ruhr-Universität Bochum)
Berichtsabschluss:	31.12.2009
Berichtsumfang:	202 Seiten

Inhaltsverzeichnis

I. KURZE DARSTELLUNG 14

I.1. Aufgabenstellung 14

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde 14

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens 15

I.4. Stand der Wissenschaft und Technik 16

I.4.1. Grundlagen des anaeroben Abbaus von Biomasse 16

I.4.2. Modellentwicklung bis zum ADM1 24

I.4.3. Wissensdefizite 31

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen 32

II. EINGEHENDE DARSTELLUNG 33

II.1. Einleitung 33

II.2. Material und Methoden 35

II.2.1. Versuchsfermenteranlagen 35
II.2.1.1. Container-Anlage 35
II.2.1.2. Schlaufenreaktoren 36
II.2.2. Mess- und Regeltechnik 38
II.2.3. Probenahme und Analytik 38
II.2.4. Berechnungen 41
II.2.5. Charakterisierung der eingesetzten Substrate 42
II.2.6. Simulationsmodelle 46

II.3. Ergebnisse und Diskussion 49

II.3.1. Verfahrenstechnische Erkenntnisse der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen 49
II.3.1.1. Container-Anlage 49
II.3.1.2. Schlaufenreaktoren 58
II.3.1.2.1. Mesophile Vergärung von Grassilage 58
II.3.1.2.2. Übergang vom mesophilen zum thermophilen Temperaturbereich 64
II.3.1.2.3. Thermophile Vergärung von Grassilage 65
II.3.1.3. Abschätzung des sich im Reaktor einstellenden Trockensubstanzgehaltes 71
II.3.2. Modellierung der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen 72
II.3.2.1. Zulauffraktionierung 72
II.3.2.2. Effekt des "Massenverlustes" über entstehendes Biogas 77
II.3.2.3. Einbindung von Zerfallbiomasse 80
II.3.2.4. Einfluss des Trockensubstanzgehaltes auf die Hydrolyse 81
II.3.2.5. Anpassung kinetischer Parameter 82
II.3.2.5.1. Experimentelle Bestimmung 82
II.3.2.5.2. Bestimmung mit Hilfe des Modells anhand der Messwerte 86
II.3.2.6. Simulation der Vergärung von Maissilage 91
II.3.2.6.1. Mesophile Betriebsweise mit Gärrestrückführung 95
II.3.2.6.2. Mesophile Betriebsweise ohne Gärrestrückführung 98
II.3.2.6.3. Thermophile Betriebsweise 103

II.3.2.7. Simulation der Vergärung von der Mischung Maissilage/Grassilage ... 108
II.3.2.7.1. Mesophile Betriebsweise ... 109
II.3.2.7.2. Thermophile Betriebsweise ... 112
II.3.2.8. Simulation der Vergärung von Grassilage ... 115
II.3.2.8.1. Mesophile Betriebsweise ... 115
II.3.2.8.2. Thermophile Betriebsweise ... 122
II.3.2.9. Modellvalidierung: Laborreaktoren LfL-ILT ... 127
II.3.2.10. Modellvalidierung: Pilotanlage Pellmeyer ... 134
II.3.2.11. Regelwerk zur Simulationsstudie ... 136
II.3.3. Entwicklung einer modellbasierten Prozesssteuerung ... 138
II.3.3.1. Geeignete Parameter für die Prozesssteuerung ... 138
II.3.3.1.1. CH_4/CO_2-Verhältnis ... 138
II.3.3.1.2. Methanbildungsrate ... 139
II.3.3.1.3. pH-Wert ... 139
II.3.3.1.4. Wasserstoffkonzentration ... 140
II.3.3.1.5. Gehalt an organischen Säuren ... 140
II.3.3.1.6. FOS/TAC ... 141
II.3.3.1.7. Zusammenfassung ... 142
II.3.3.2. ADM1 basierte Fuzzy Logic Steuerung (ADM1-FL) ... 142
II.3.3.2.1. Fuzzy Logic Theorie ... 142
II.3.3.2.2. Fuzzy Sets Klassifizierung ... 142
II.3.3.2.3. Logische Operatoren - Fuzzy Regeln ... 144
II.3.3.2.4. Entwickelter Fuzzy Logic Controller ... 146
II.3.3.2.5. Zugehörigkeitsfunktionen ... 148
II.3.3.2.6. Regelwerk ... 149
II.3.3.2.7. Simulationsergebnisse ... 151
II.3.4. Benchmarking der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen ... 155
II.3.5. Ökobilanzierung der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen ... 159
II.3.5.1. Vorgehen und Rahmenbedingungen ... 160
II.3.5.1.1. Systemannahmen ... 161
II.3.5.1.2. Definition der Modellbetriebe ... 163
II.3.5.1.3. Definition der Biogasanlage ... 164
II.3.5.1.4. Basisdaten ... 164
II.3.5.2. Ergebnisse und Vergleich ... 172
II.3.5.2.1. Gegenüberstellung von Mais- und Grassilage ... 173
II.3.5.2.2. Deutscher Strommix und Vergleich ... 175
II.3.5.2.3. Sensitivitätsanalyse ... 178
II.3.5.3. Zusammenfassung und Ausblick ... 179

II.4. Zusammenfassung und Ausblick ... 181

II.5. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises ... 186

II.6. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit ... 187

II.7. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans ... 188

II.8. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen ... 189

II.9. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse ... 190

II.10. Literaturverzeichnis ... 193

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitplan für die jeweiligen Arbeitspakete 16
Tabelle 2: ADM1-Prozessmatrix (gelöste Stofffraktionen)....26
Tabelle 3: ADM1-Prozessmatrix (partikuläre Stofffraktionen)....27
Tabelle 4: Standardparametersatz des ADM1 (kinetische Parameter)....28
Tabelle 5: Standardparametersatz des ADM1 (stöchiometrische Parameter) 29
Tabelle 6: Probenahmeplan....39
Tabelle 7: Analysenverfahren der ermittelten Parameter 39
Tabelle 8: Charakterisierung der verwendeten Inokula....43
Tabelle 9: Charakterisierung der verwendeten Silagen 44
Tabelle 10: Charakterisierung der verwendeten Silagen nach Weender und van Soest 44
Tabelle 11: Theoretischer Sauerstoffbedarf (ThOD) der einzelnen Fraktionen 74
Tabelle 12: Mit Biogas abgeführte Wasserdampfmengen in Abhängigkeit von der Gärtemperatur 80
Tabelle 13: Kinetische ADM1 Parameter für Maissilage....94
Tabelle 14: Stöchiometrische ADM1 Parameter 95
Tabelle 15: Betriebsdaten bei der mesophilen Monofermentation von Maissilage mit Gärrestrückführung (Daten sind ausschließlich auf den liegenden Fermenter bezogen)....96
Tabelle 16: Betriebsdaten bei der mesophilen Monofermentation von Maissilage ohne Gärrestrückführung. Daten sind ausschließlich auf den liegenden Fermenter bezogen....99
Tabelle 17: Zusammensetzung der verwendeten Spurenelementlösung 102
Tabelle 18: Betriebsdaten bei der thermophilen Monofermentation von Maissilage 104
Tabelle 19: Kinetische ADM1 Parameter für die Mischung Maissilage/Grassilage 109
Tabelle 20: Betriebsdaten bei der mesophilen Fermentation von der Mischung Maissilage/Grassilage....110
Tabelle 21: Betriebsdaten bei der thermophilen Fermentation von der Mischung Maissilage/Grassilage.....112
Tabelle 22: Zulauffraktionierung nach der Desintegration gemäß f-Faktoren (mesophil).....115
Tabelle 23: Stickstoffgehalte der beteiligten Fraktionen....116
Tabelle 24: Standardparameter des ADM1 und kalibrierte Werte für die mesophile Fermentation von Grassilage 118

Tabelle 25: Simulationsgüte (Nash-Sutcliffe-Koeffizient) gegenüber der Messwerte für Reaktor L und R 122
Tabelle 26: Zulauffraktionierung nach der Desintegration gemäß f-Faktoren (thermophil) .. 123
Tabelle 27: Standardparameter des ADM1 und kalibrierte Werte für die thermophile Fermentation von Grassilage 123
Tabelle 28: Zusammensetzung der verwendeten Maissilage 128
Tabelle 29: Beispielhaftes Regelwerk 145
Tabelle 30: Beispielhafte Zugehörigkeitswerte 145
Tabelle 31: Fuzzy Logic Regelwerk 150
Tabelle 32: Regelwerk für geringe organische Raumbelastungen 150
Tabelle 33: Literaturwerte für die Monofermentation von Grassilage 156
Tabelle 34: Literaturwerte für die Monofermentation von Maissilage 157
Tabelle 35: Wichtungsfaktoren von Treibhausgasen gemäß IPCC (Hartmann, 2006) 163
Tabelle 36: Dieselverbrauch der Arbeitsgänge für Maissilage (Fröba und Funk, 2005; Anonymous, 2006) 165
Tabelle 37: Dieselverbrauch der Arbeitsgänge für Grassilage (Fröba und Funk, 2005; Anonymous, 2006) 166
Tabelle 38: Treibhausgasemissionen aus der Bereitstellung des Dieselkraftstoffs (Anonymous, 2004) 166
Tabelle 39: Treibhausgasemissionen durch die Verbrennung des Dieselkraftstoffs (Anonymous, 2004) 167
Tabelle 40: Treibhausgasemissionen aus der CAN-Produktion (Patyk und Reinhardt, 1997) 167
Tabelle 41: Klimagasemissionen für die Bereitstellung von Pflanzenschutzmitteln (Vogt, 2008) 168
Tabelle 42: Treibhausgasemissionen aus der Saatgutproduktion (Anonymous, 2004) 168
Tabelle 43: Ernteerträge von Mais und Gras (Speckmaier et al., 2005; Anonymous, 2006) . 169
Tabelle 44: Veranschlagte Biogasausbeute (Koch et al., 2009b; Lübken, 2009) 171
Tabelle 45: Biogasdaten 174
Tabelle 46: CO_2-Äquivalenten der Prozesskette für Steinkohle (Viebahn et al., 2008) 176

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des anaeroben Abbaus (Klocke et al., 2009) 18
Abbildung 2: Energiegewinn acetogener Reaktionen in Abhängigkeit vom Wasserstoffpartialdruck (Grepmeier, 2002) 21
Abbildung 3: Flächenverteilung Energiepflanzenanbau für Biogas im Jahr 2007 34
Abbildung 4: Schematische Darstellung und Foto der Container-Anlage 36
Abbildung 5: Schematische Darstellung und Foto der Schlaufenreaktoren.....37
Abbildung 6: Bestimmung der Zusammensetzung von Substraten gemäß erweiterter Weenderanalyse nach van Soest 40
Abbildung 7: Frisch angeschnittene Mais- bzw. Grassilage.....43
Abbildung 8: Verstopfung des äußeren Ringes bei der Nutzung von Grassilage in Originalschnittlänge 45
Abbildung 9: Abbildung der Schlaufenreaktoren in SIMBA 4.2 zur mesophilen Vergärung von Grassilage.....47
Abbildung 10: Detailaufnahme des Rührwerks des liegenden Fermenters der Container-Anlage.....50
Abbildung 11: Schematische Darstellung des liegenden Fermenters der Container-Anlage mit Probenahmestellen 51
Abbildung 12: Modell des liegenden Fermenters der Container-Anlage (Ist-Zustand).....52
Abbildung 13: Geschwindigkeitsvektoren in einer Schnittebene in Modellmitte (Angaben in m/s, Ist-Zustand) 52
Abbildung 14: Pfadlinien von einer Schnittebene in Modellmitte ausgehend (Angaben in s, Ist-Zustand).....53
Abbildung 15: Tracerkonzentration in einer Schnittebene in Modellmitte nach 30 Tagen (Angaben in %, Ist-Zustand).....54
Abbildung 16: Ausschnitt der Tracerkonzentration in einer Schnittebene in Modellmitte nach 30 Tagen (Angaben in %, Ist-Zustand) 54
Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Lithiumchloridkonzentration.....55
Abbildung 18: Modell des liegenden Fermenters der Container-Anlage (Variante) 56
Abbildung 19: Geschwindigkeitsvektoren in einer Schnittebene in Modellmitte (Angaben in m/s, Variante).....56
Abbildung 20: Pfadlinien von einer Schnittebene in Modellmitte ausgehend (Angaben in s, Variante) 57

Abbildung 21: Tracerkonzentration in einer Schnittebene in Modellmitte nach 30 Tagen (Angaben in %, Variante) 57
Abbildung 22: Ausschnitt der Tracerkonzentration in einer Schnittebene in Modellmitte nach 30 Tagen (Angaben in %, Variante) 58
Abbildung 23: Entwicklung des TS-Gehaltes bei der mesophilen Vergärung von Grassilage 59
Abbildung 24: Biogasmenge und -zusammensetzung bei der mesophilen Vergärung von Grassilage 60
Abbildung 25: Entwicklung von TKN und NH_4-N bei der mesophilen Vergärung von Grassilage 61
Abbildung 26: Entwicklung von pH-Wert, FOS/TAC, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Grassilage 62
Abbildung 27: Möglichkeiten zur Temperaturanpassung vom mesophilen zum thermophilen Bereich 64
Abbildung 28: Entwicklung des TS-Gehaltes bei der thermophilen Vergärung von Grassilage 66
Abbildung 29: Entwicklung von TKN und NH_4-N bei der thermophilen Vergärung von Grassilage 67
Abbildung 30: Biogasmenge und -zusammensetzung bei der thermophilen Vergärung von Grassilage 68
Abbildung 31: Entwicklung von pH-Wert, FOS/TAC, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der thermophilen Vergärung von Grassilage 69
Abbildung 32: Beispielhafter CSB-Flux im ADM1 (Batstone et al., 2002) 73
Abbildung 33: Bilanzierung eines Faulturmes über die CSB-Fracht (Klärschlamm) 78
Abbildung 34: Bilanzierung eines Faulturmes über den Massenstrom (Klärschlamm) 78
Abbildung 35: Bilanzierung einer Biogasanlage über CSB-Fracht und Massenstrom (Maissilage) 79
Abbildung 36: Bestimmung von k_{Dis} und $F_0 \cdot G$ anhand der Methangasproduktion über 24 Stunden nach Substratzugabe 85
Abbildung 37: Gemessene und berechnete Methangasproduktion über 24 Stunden nach Substratzugabe 86
Abbildung 38: Simulations- und Messwerte von Butyrat bei der Änderung von $K_{I_H2_C4}$ 88
Abbildung 39: Nash-Sutcliffe-Koeffizient für Butyrat bei Variation von K_{S_C4}, k_{m_C4} und $K_{I_H2_C4}$ 90

Abbildung 40: Simulation des Tracerversuchs nach Zugabe von 100 g Lithiumchlorid; analytische Bestimmung der Tracersubstanz als Lithium in mg pro kg Fermenterinhalt 92
Abbildung 41: Abbildung der Containeranlage in SIMBA 93
Abbildung 42: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, spezifische Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffgehalt, sowie dem pH-Wert bei der mesophilen Vergärung von Maissilage (mit Gärrestrückführung); Nummerierung der einzelnen Betriebsperioden entsprechend Tabelle 15 97
Abbildung 43: Vergleich Simulations- und Messwerte für Essigsäure-, Propionsäure-, Buttersäurekonzentration, organischem Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff und TKN bei der mesophilen Vergärung von Maissilage (mit Gärrestrückführung); Nummerierung der einzelnen Betriebsperioden entsprechend Tabelle 15 98
Abbildung 44: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, spezifische Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffgehalt, sowie dem pH-Wert bei der mesophilen Vergärung von Maissilage (ohne Gärrestrückführung); Nummerierung der einzelnen Betriebsperioden entsprechend Tabelle 16 100
Abbildung 45: Vergleich Simulations- und Messwerte für Essigsäure-, Propionsäure-, Buttersäurekonzentration, organischem Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff und TKN bei der mesophilen Vergärung von Maissilage (ohne Gärrestrückführung); Nummerierung der einzelnen Betriebsperioden entsprechend Tabelle 16 101
Abbildung 46: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, spezifische Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffgehalt, sowie dem pH-Wert bei der thermophilen Vergärung von Maissilage 104
Abbildung 47: Vergleich Simulations- und Messwerte für Essigsäure-, Propionsäure-, Butter- und Valeriansäurekonzentration, CSB, TKN und Ammoniumstickstof bei der thermophilen Vergärung von Maissilage 105
Abbildung 48: Berechnungen die Gibbs Energie für Propionsäureoxidation 107
Abbildung 49: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion und Propionsäurekonzentration unter Berücksichtigung der HALDANE Kinetik 108
Abbildung 50: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, spezifische Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffgehalt, sowie dem

pH-Wert bei der mesophilen Vergärung von der Mischung Maissilage/Grassilage 111
Abbildung 51: Vergleich Simulations- und Messwerte für Essigsäure-, Propionsäurekonzentration, TS, TKN und Ammoniumstickstoff bei der mesophilen Vergärung von der Mischung Maissilage/Grassilage 112
Abbildung 52: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffgehalt, Trockensubstanzgehalt, sowie dem pH-Wert bei der thermophilen Vergärung von der Mischung Maissilage/Grassilage 113
Abbildung 53: Vergleich Simulations- und Messwerte für Essigsäure-, Propionsäure-, Buttersäure- und Valeriansäurekonzentration, Ammoniumstickstoff und TKN bei der thermophilen Vergärung von der Mischung Maissilage/Grassilage 114
Abbildung 54: Vergleich Simulations- und Messwerte für Gesamtstickstoff (TKN) und Ammoniumstickstoff (NH_4-N) bei der mesophilen Vergärung von Grassilage .. 117
Abbildung 55: Vergleich Simulations- und Messwerte für den Trockensubstanzgehalt (TS) bei der mesophilen Vergärung von Grassilage 117
Abbildung 56: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- sowie Wasserstoffgehalt bei der mesophilen Vergärung von Grassilage 119
Abbildung 57: Vergleich Simulations- und Messwerte für pH-Wert, FOS/TAC, Essig- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Grassilage 120
Abbildung 58: Vergleich Simulations- und Messwerte für die Buttersäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Grassilage 121
Abbildung 59: Entwicklung der Biomassekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Grassilage 121
Abbildung 60: Vergleich Simulations- und Messwerte für Gesamtstickstoff (TKN), Ammoniumstickstoff (NH_4-N) und Trockensubstanz (TS) bei der thermophilen Vergärung von Grassilage 124
Abbildung 61: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- sowie Wasserstoffgehalt bei der thermophilen Vergärung von Grassilage 125
Abbildung 62: Vergleich Simulations- und Messwerte für pH-Wert, FOS/TAC, Essig- und Propionsäurekonzentration bei der thermophilen Vergärung von Grassilage 126
Abbildung 63: Versuchsaufbau zur Monofermentation von Maissilage (LfL-ILT) 127

Abbildung 64: Raumbelastung und Simulations- und Messwerte für die spezifische Biogasproduktion bei der mesophilen Vergärung von Maissilage in den vier Laborfermentern (LF-1, LF-2, LF-3 und LF-4) 129
Abbildung 65: Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid-, und Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff, pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Maissilage für den Laborfermenter LF-1 130
Abbildung 66: Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid-, und Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff, pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Maissilage für den Laborfermenter LF-2 131
Abbildung 67: Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid-, und Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff, pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Maissilage für den Laborfermenter LF-3 132
Abbildung 68: Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid-, und Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff, pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Maissilage für den Laborfermenter LF-4 133
Abbildung 69: Verlauf der Raumbelastung für die Pilotanlage 134
Abbildung 70: Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, spezifische Biogasproduktion, Methan- und Kohlendioxidgehalt, pH-Wert sowie des Fermentervolumens bei der mesophilen Vergärung von Maissilage für die Pilotanlage 135
Abbildung 71: Regelwerk zur dynamischen Simulation der Monofermentation von Energiepflanzen 137
Abbildung 72: Exemplarische Fuzzy Set Zugehörigkeitsfunktion 143
Abbildung 73: Mehrere Fuzzy Set Zugehörigkeitsfunktion 144
Abbildung 74: Fuzzy-Logik Steuerung - Fließschema 147
Abbildung 75: Zugehörigkeitsfunktionen für mesophile Betriebsweise 148
Abbildung 76: Zugehörigkeitsfunktionen für thermophile Betriebsbedingungen 149
Abbildung 77: Fuzzy Logik Steuerungsmodell in MATLAB/SIMULINK/SIMBA 151

Abbildung 78: Messwerte und Ergebnisse der Fuzzy Logik Prozesssteuerung für die Parameter Raumbelastung, Methanproduktion, spezifische Methanproduktion und FOS bei der mesophilen Monofermentation von Grassilage - Laborreaktoren...153
Abbildung 79: Messwerte und Ergebnisse der Fuzzy Logik Prozesssteuerung für die Parameter Raumbelastung, Methanproduktion, spezifische Methanproduktion und FOS bei der mesophilen Monofermentation von Maissilage - Pilotanlage Pellmeyer 154
Abbildung 80: Messwerte und Ergebnisse der Fuzzy Logik Prozesssteuerung für die Parameter Raumbelastung, Methanproduktion, spezifische Methanproduktion und FOS bei der thermophilen Monofermentation von Maissilage - Containeranlage 155
Abbildung 81: Eingänge und Emissionen in den gewählten Systemgrenzen....162
Abbildung 82: Spezifische Emissionen beim Anbau von Mais und Gras....173
Abbildung 83: CO_2-Emissionen des deutschen Strommixes der letzten 10 Jahre (Anonymous, 2009)....175
Abbildung 84: Direkte und indirekte Emissionen von Steinkohle, Grassilage und Maissilage 177
Abbildung 85: Spezifische Aufwendungen mit Wärmegutschrift 179

Abkürzungsverzeichnis

$\sum$ FOS	Summe der flüchtigen organischen Säuren (als Essigsäureäquivalent)
θ	hydraulische Aufenthaltszeit (h)
$\%_{ab}$	Abbaugrad (%)
ADF	Säure-Detergentienfaser (Acid detergent fiber)
ADL	Säure-Detergentienlignin (Acid detergent lignin)
ADM1	Anaerobic Digestion Modell No 1
ASM1/3	Activated Sludge Model No. $^1/_3$
BGA	Biogasanlage
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
CSTR	Rührkesselreaktor (Continously stirred tank reactor)
EEG	Erneuerbare Energien Gesetz
F	Masse an abbaubarem, partikulärem CSB zu Zeit t (g)
F_0·G	maximaler Methangasertrag
FOS/TAC	Stabilitätskriterium für anaerobe Prozesse (Verhältnis flüchtiger organischer Säuren zur Pufferkapazität) vgl. FNR (2005)
f_p	stöchiometrischer Faktor (Anteil, der X_p zugeordnet wird)
G	Transfer-Faktor (0.35 l_{CH4}/g_{COD})
GBP_{max}	maximales Gasbildungspotential
HRT	Verweilzeit (Hydraulic retention time)
IWA	International Water Association
k_h	Hydrolysekonstante erster Ordnung (h^{-1})
Loop L/R	Schlaufenreaktor L bzw. R (Loop reactor L resp. R)
NDF	Neutral Detergentienfaser (Neutral detergent fiber)
NfE	stickstofffreie Extraktstoffe (Nitrogen free extracts)
n.g.	nicht gemessen
NH4-N	Ammoniumstickstoff
NSK	Nash-Sutcliffe-Koeffizient
OLR	Raumbelastung (Organic loading rate)
oTS	organische Trockensubstanz
PFR	Pfropfenstromreaktor (Plug flow reactor)
RF	Rohfaser (Raw fiber)
RL	Rohfett (Raw lipid)

RP	Rohprotein (Raw protein)
TC	Gesamtkohlenstoff (Total carbon)
ThOD	Theoretischer Sauerstoffbedarf (Theoretical oxygen demand)
TKN	Total Kjeldahl Stickstoff (Ammoniumstickstoff und organisch gebundener Stickstoff)
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoff (Total organic carbon)
TS	Trockensubstanz
Q	Zulaufstrom
V_m	molares Normvolumen (22,4 l/mol)
X_P	Konzentration an Biomassezerfallsprodukten
X_{Pr}	Konzentration an partikulären Proteinen
X_{Li}	Konzentration an partikulären Fetten
X_{CHS}	Konzentration an partikulärer Cellulose, Hemicellose, Stärke
X_L	Konzentration an partikulärem Lignin

I. Kurze Darstellung

I.1. Aufgabenstellung

Ziel dieses Vorhabens war es die Monofermentation von nachwachsenden Rohstoffen (Mais- und Grassilage) verfahrenstechnisch zu untersuchen und anhand der gewonnenen Daten ein auf das Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM 1) aufbauendes mathematisches Modell zu entwickeln, zu kalibrieren und auf die untersuchten Substrate und Reaktoren anzupassen. Die mit Hilfe der gewonnen Erkenntnisse entwickelte Prozesssteuerung wurde in einem zweiten Schritt an Labor- und Technikumsfermentern validiert.

Ein weiteres Projektziel bestand in der Festlegung von Benchmarks sowie einer Ökobilanzierung der Biogaserzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen. Die ermittelten Leistungswerte flossen in ein Regelwerk für die Auslegung von Biogasanlagen ein.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Projekt durchgeführt wurde

Das Projekt lag im Zeitraum der Erstellung und Genehmigung des Antrages aufgrund seiner modellbasierten Herangehensweise zur Optimierung der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen im Kernbereich des von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft - Institut für Landtechnik und Tierhaltung im Auftrag der FNR gegebenen Themas „Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus NawaRo“ des Förderschwerpunktes "Prozessoptimierung bei der Biogaserzeugung im Bereich Prozessregelung und Mikrobiologie". Der Aktualitätsbezug ist auch weiterhin gegeben, da zur Erreichung der ambitionierten umweltpolitischen Ziele der Bundesregierung ein diversifizierter Mix an verschiedenen erneuerbaren Energien notwendig ist und die Landwirtschaft in Deutschland mit einem großen Anteil brachliegender Flächen einen maßgeblichen Anteil dazu leisten kann. Obgleich durch die Novellierung des EEG im Jahr 2009, die zuvor forcierte Förderung von Monofermentationsanlagen durch die Einführung des sogenannten Güllebonus eingeschränkt wurde, kann die Biogasbranche nur noch bei Anbau und Nutzung von Energiepflanzen weiter wachsen, da anfallende Rest- und Abfallstoffe mittlerweile sämtlich in die vorhandenen Anlagenkapazitäten integriert sind.

Wissensdefizite bezüglich der komplexen Vorgänge beim anaeroben Abbau können anhand von mathematischen Modellen verstanden und Optimierungspotenzial ohne zeit- und

arbeitsaufwendige Experimente aufgezeigt werden. Letztlich können mangelnde aber absolut notwendige Erfahrungen im Betrieb einer Biogasanlage dem zum Energiewirt gewandelten Landwirt in Form kalibrierter Modelle zur Verfügung gestellt werden, die ihn nicht ersetzen sondern in seinen Entscheidungen unterstützen sollen.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Zur Vorbereitung des Projektes galt es geeignete Materialien und Geräte für den Anlagenbau im eigenen Haus ausfindig zu machen und die Versuchsanlagen gemäß den Vorgaben zu gestalten.
Ein sich im Besitz der Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung (LfL-ILT) befindlicher Versuchscontainer, der bereits aufgrund einem vorangegangenen Projekt auf dem Gelände der Technischen Universität, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft (TUM-SWW) aufgestellt worden war, konnte entsprechend der neuen Versuchsvorgaben modifiziert werden. Die Versuchsanlage besteht aus einem liegenden Fermenter (sog. Pfropfenströmer) und einem stehenden Fermenter (sog. Rührkessel), die als Kaskade aber auch separat betrieben werden können.
Ein dritter Fermentertyp, der während des Projektes auf seine Eignung zur Vergärung nachwachsender Rohstoffe getestet wurde, ist der sogenannte Schlaufenreaktor. Nach einigen Umbauarbeiten konnten zwei Fermenter dieser Bauart ihrer Bestimmung übergeben werden.
Die für die Versuche benötigten Silagen wurden von einem landwirtschaftlichen Betrieb (Biogasanlage Eggertshofen, Joseph Pellmeyer) in der Nähe bezogen. Da es für die Vergleichbarkeit von Versuchsreihen von entscheidender Bedeutung ist, dass das Grundsubstrat möglichst geringen Schwankungen hinsichtlich seiner Zusammensetzung unterliegt, wurde jede Charge gründlich homogenisiert und portioniert eingefroren. Zudem wurde darauf geachtet, dass innerhalb des Projektes nur wenige verschieden Chargen zu Einsatz kamen.

Zur Bearbeitung der Fragestellungen wurde der Projektablauf in Arbeitspakete gemäß folgendem Zeitplan (Tabelle 1) untergliedert.

Tabelle 1: Zeitplan für die jeweiligen Arbeitspakete

Arbeitspaket	Bezeichnung	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	Q11	Q12
AP 2-2	Modellentwicklung												
AP 3-2	Effizienzsteigerung durch Optimierung der Verfahrenstechnik und Prozesssteuerung												
AP 3-3	Entwicklung modellbasierter Prozesssteuerung												
AP 4-1	Validierung an Praxisanlagen und Regelwerk												
AP 5-1	Ökobilanz, Benchmarking												
	Zwischenberichte												
	Endbericht												

I.4. Stand der Wissenschaft und Technik

Um dem weltweit steigendem Energiebedarf bei gleichzeitig rückläufigen Reserven an fossilen Energieträgern begegnen zu können, bedarf es einer starken Umorientierung der Branche. Ein diversifizierter Mix aus den verschiedenen, regenerativen Energiequellen ist insbesondere unter dem Gesichtspunkt der standortangepassten Technologien empfehlenswert. Der Biogasbranche kommt aufgrund der Möglichkeit, auch Rest- und Abfallstoffe in nutzbare Energie umsetzen zu können, eine Schlüsselrolle zu. Hierzu zählen nicht nur tierische Exkremente, Klärschlamm und Bioabfälle, sondern insbesondere landwirtschaftliche Substrate, die aus Überproduktionen stammen oder beispielsweise bei der Landschaftspflege anfallen. Für einen wirtschaftlich rentablen Einsatz lignocellulosehaltiger Energiepflanzen bedarf es fundierter Kenntnisse über die ablaufenden Prozesse und die möglicherweise auftretenden Schwierigkeiten.

I.4.1. Grundlagen des anaeroben Abbaus von Biomasse

Ziel der Anaerobtechnik ist die Verwertung von Biomasse zur Gewinnung von Biogas, welches in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat und den Fermentationsbedingungen aus unterschiedlichen Anteilen der beiden Hauptkomponenten Methan (CH_4) und Kohlendioxid (CO_2) besteht. Daneben befinden sich im Biogas noch geringere Mengen an Wasserstoff, Schwefelwasserstoff, Ammoniak und anderer Spurengase. Die zuvor in der Biomasse gespeicherte Energie wird dabei zu einem großen Teil in das Biogas überführt, welches

anschließend energetisch genutzt werden kann. Da es sich für die Mikroorganismen in Abhängigkeit des Wasserstoffpartialdruckes um einen energetisch grenzwertigen Prozess handelt (Grepmeier, 2002), sind optimale Bedingungen für deren Entwicklung unabdingbar. Als zentrale verfahrenstechnische Rahmenbedingung gilt die Temperatur, wobei für die Vergärung von landwirtschaftlicher Biomasse in der Regel nur der mesophile (30°C-40°C) und der thermophile Bereich (50°C-60°C) interessant sind.

Der Abbau vollzieht sich dabei in den vier in Abbildung 1 dargestellten Teilschritten Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese. Während der Hydrolyse werden hochmolekulare organische Substanzen wie Eiweiße, Kohlenhydrate oder Cellulose durch extrazelluläre Enzyme von Bakterien in wasserlösliche niedermolekulare Verbindungen (wie Aminosäuren, Zucker, niedere Fettsäuren, Alkohole usw.) umgeformt. Erst dieser Vorgang ermöglicht die Aufnahme von Substanzen über die Zellmembranen der Mikroorganismen (Sahm, 1981). Die Hydrolyse von lignocellulosehaltiger Biomasse ist ein langsamer Prozess, der sowohl von der Aktivität der extrazellulären Enzyme wie Cellulasen, Amylasen, Proteasen und Lipasen, als auch von den Umgebungsparametern (Art des Substrates, Temperatur, Durchmischung u.ä.) abhängig ist (Besgen, 2005). Die entstehenden niedermolekularen Bruchstücke können anschließend durch Diffusion, Osmose und enzymgesteuerte Transportvorgänge in das Innere der Zellen gelangen, wo sie bis zu ihren monomeren Bausteinen weiter hydrolysiert werden (Madigan, 2001). Im zweiten Schritt, der so genannten Acidogenese, werden die Reaktionsprodukte der ersten Phase in Vorläufersubstanzen von Biogas, nämlich vor allem in kurzkettige Säuren (u.a. Essigsäure, Ameisensäure, Milchsäure, Buttersäure, Propionsäure), Alkohole (z.B. Ethanol) und auch in Gase wie Wasserstoff, Kohlendioxid, Schwefelwasserstoff und Ammoniak umgewandelt. Dem Wasserstoff kommt dabei eine Schlüsselrolle zu, denn nur bei sehr geringem Wasserstoffpartialdruck können beispielsweise Reaktionsprodukte wie Propion- und Buttersäure noch mit einem kleinen Energiegewinn umgesetzt werden (Edelmann, 2001).
Als Acetatbildung (Acetogenese) wird die Umwandlung von flüchtigen und langkettigen Fettsäuren sowie der übrigen Zwischenprodukte der Versäuerungsphase in methanogen nutzbare Substanzen, d.h. überwiegend Acetat und Wasserstoff, aber auch Kohlendioxid und Wasser bezeichnet. Die Methanbakterien sind für den letzten Schritt des anaeroben Abbaus verantwortlich. Jedoch sind sie auf die „Vorarbeit“ der ersten drei Stufen angewiesen, welche erst durch ihren Metabolismus Substrate für die Methanbildner liefern. Aufgrund ihrer Substratspezifität werden die methanogenen Mikroorganismen in zwei Hauptgruppen

unterteilt: die acetatverwertenden, sog. acetoklastischen Bakterien und die hydrogenotrophen, H_2/CO_2-abhängigen Organismen (Kunst, 2005).

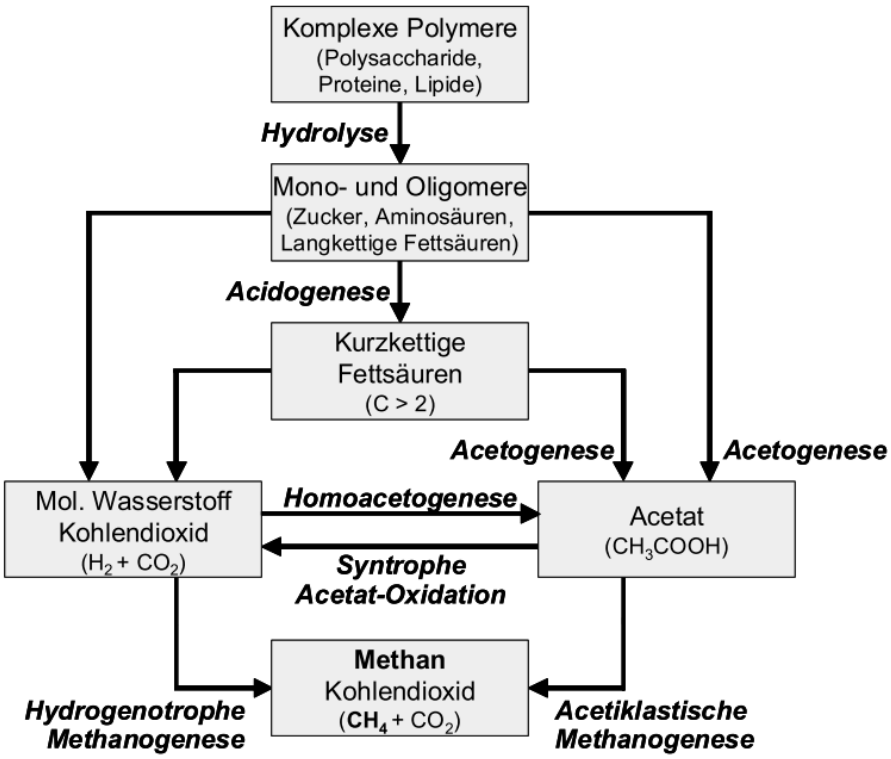


Abbildung 1: Schematische Darstellung des anaeroben Abbaus (Klocke et al., 2009)

Nur wenn diese Symbiose reibungslos kooperiert, kann ein effizienter Umsatz der Biomasse zu Biogas erfolgen. Allerdings gibt es eine Vielzahl von Einflussfaktoren, die zur Störung eines Teilschrittes und letztendlich zum Erliegen des Gesamtprozess führen können. Zu diesen hemmenden bzw. toxischen Stoffen gehören u.a. Ammoniak, Sauerstoff und Schwefelwasserstoff, aber auch organische Säuren und Wasserstoff, die während des Abbaus zwar zwangsläufig entstehen, deren Anreicherung aber zu einer negativen Beeinflussung führen kann (Schmelz, 2000).

Die anaerob lebenden Mikroorganismen stammen aus einer Zeit, lange bevor sich die Zusammensetzung der Atmosphäre, so wie wir sie kennen, eingestellt hat. Diese Bakterien sind auch heute noch auf eine Lebensumgebung angewiesen, in der kein Sauerstoff vorkommt. Oft lässt sich aber ein Sauerstoffeintrag in den Fermenter nicht vollkommen vermeiden. Der Grund dafür, dass die Methanbakterien nicht sofort in ihrer Aktivität gehemmt werden oder sogar ganz absterben, liegt darin, dass sie in Gemeinschaft mit anderen Bakterien leben. Einige von ihnen sind fakultativ anaerob lebende Bakterien, das heißt, sie können sowohl unter Sauerstoffeinfluss als auch vollkommen ohne Sauerstoff überleben. Solange der Sauerstoffeintrag nicht zu groß ist, können diese Bakterien den Sauerstoff

verbrauchen, bevor er die Bakterien schädigt, die auf eine sauerstofffreie Umgebung zwingend angewiesen sind (FNR, 2006). Ein Großteil der versäuernden Bakterien zählt zu den fakultativ anaeroben Organismen, die sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Sauerstoff zu wachsen vermögen. Die Anwesenheit von geringen Mengen Sauerstoff spielt daher für die ersten beiden Schritte des anaeroben Abbaus, die Hydrolyse und die Versäuerung, keine große Rolle. Die Methanbakterien zählen jedoch zu den obligat anaeroben Organismen, für die Sauerstoff toxisch wirkt. Bei einstufigen Verfahren, wie im vorliegenden Fall, bei denen alle vier Stufen des anaeroben Abbaus in einem Behälter ablaufen, muss daher der Kontakt mit Sauerstoff so gut es geht vermieden werden (Schmelz, 2000).

Auch Schwefelwasserstoff wirkt hemmend auf die Mikroorganismen. Schwefelwasserstoff entsteht bei der Vergärung zum einen durch den Abbau schwefelhaltiger Verbindungen, zum anderen durch Reduktion von Sulfat. Wie auch viele andere Elemente besitzt Schwefel eine essenzielle Funktion für die Biosynthese; bei höheren Konzentrationen wird jedoch der Gärprozess gehemmt (Madigan, 2001). In Abhängigkeit vom pH-Wert dissoziiert der entstandene Schwefelwasserstoff in der Flüssigkeit und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gelöstem und dissoziiertem Schwefelwasserstoff ein. Darüber hinaus befindet sich der gelöste H_2S in einem weiteren Gleichgewicht mit jenem in der Gasphase. Ähnlich wie bei einer Reihe von anderen Stoffen wirkt nur der undissoziierte gelöste Schwefelwasserstoff hemmend auf den anaeroben Abbau - insbesondere auf die acetoklastischen Methanbakterien. Eine Hemmung der Methanbakterien führt meist dazu, dass sich organische Säuren im Reaktor anreichern. Dies bewirkt einerseits einen Abfall des pH-Wertes und andererseits einen weiteren Rückgang der Gasproduktion. Ein Abfall des pH-Wertes verursacht eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung steigenden Anteils undissoziierten Schwefelwasserstoffs, was die Hemmung der Methanogenese verstärkt. In Folge des geringeren Gasanfalls steigt gleichzeitig der Anteil des H_2S im Gas. Gemäß Henry-Gesetz wird dadurch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten des undissoziierten H_2S im Wasser bewirkt. Daraus wird ersichtlich, dass mit einer beginnenden Hemmung der Methanbakterien ein sich selbst verstärkender Prozess der Hemmung in Gang gesetzt wird, der sehr rasch zu einer totalen Blockierung der Methanogenese führen kann (Kroiss, 1985). Die pauschale Angabe eines Grenzwertes der Toxizität ist in diesem Fall aufgrund der bereits geschilderten Wechselwirkung kaum möglich. Die Literaturangaben bezüglich kritischer Werte reichen allerdings von 1 bzw. 2 Vol.-% H_2S im Biogas über 100 mg/l als HS^- bis hin zu 400 mg/l als H_2S (Schmelz, 2000; Edelmann, 2001).

Während eine hohe Konzentration an Schwefelwasserstoff eine Ursache für Prozessinstabilität sein kann, ist eine Anreicherung organischer Säuren eine Folge negativer Einflüsse. In den ersten beiden Stufen der Vergärung entstehen niedermolekulare Fettsäuren, insbesondere Essig-, Propion-, Butter- und Valeriansäure. Normalerweise ist ein stabiler Faulprozess durch ein Gleichgewicht zwischen Säurebildung und -abbau charakterisiert. Wenn sich jedoch organische Säuren im Anaerobreaktor anreichern, sind meist die acetogenen und/oder methanogenen Bakterien im Reaktor gehemmt. Liegt eine solche beginnende Hemmung im Reaktor vor, kommt es zunächst zu einer langsamen Aufkonzentrierung von Propionsäure, da diese beim Abbau weniger Energie freisetzt als Essigsäure. Das Ansteigen des Propionsäuregehaltes ist meist ein Zeichen für einen nicht optimal laufenden Biogasprozess und wird deshalb gern zur Erkennung von Prozessinstabilitäten genutzt (Nielsen et al., 2007). Alle organischen Säuren liegen in einem Gleichgewicht vor, wobei erneut vorwiegend der undissoziierte Anteil toxisch wirkt. Nielsen et al. (2007) haben gezeigt, dass bereits bei Propionsäurekonzentrationen ab 40 mg/l eine Hemmung der Abbauleistung zu beobachten ist. Bei der Essigsäure verursacht erst eine Konzentration von ca. 1.000 mg/l den gleichen Hemmeffekt. Allerdings sind auch Gärprozesse bekannt, wo bei sehr hohen Propionsäurekonzentrationen noch ein guter Abbau erzielt wurde. Effenberger et al. (2007) etwa legen einen Grenzwert von 1.000 mg/l Propionsäure bei der Vergärung nachwachsender Rohstoffe fest. Andrade et al. (2009a) dagegen konnten auch bei Konzentration jenseits von 4.000 mg/l noch einen stabilen Betrieb bei der Vergärung von Grassilage aufrecht erhalten. Der Abbau von Essig- und Buttersäure ist gegenüber Propionsäure wesentlich stabiler, sodass Hemmungen in der Praxis kaum zu erwarten sind (Kroiss und Svardal, 2005).

Ähnlich den organischen Säuren spielt auch Wasserstoff innerhalb des anaeroben Abbaus eine zentrale Rolle. Die Art der Gärprodukte wird durch die Konzentration des intermediär gebildeten Wasserstoffes bestimmt. Je höher der Wasserstoffpartialdruck ist, desto weniger Produkte, wie Essigsäure und eben Wasserstoff, werden gebildet. Da der weitere Abbau zu Methan und Kohlendioxid über die beiden Zwischenprodukte Essigsäure und Wasserstoff abläuft, ist für die Methanproduktion folglich eine enge Symbiose zwischen den H_2-produzierenden, acetogenen und den H_2-verbrauchenden, methanogenen Bakterien notwendig (Klocke et al., 2009). Die Gesamtheit der wichtigsten acetogenen Reaktionen kann thermodynamisch dann mit Energiegewinn ablaufen, wenn der Wasserstoffpartialdruck bei 10^{-4} bar oder niedriger liegt (thermodynamisches Fenster). Auch wird anhand von Abbildung 2 deutlich, dass der Energiegewinn der acetogenen Reaktionen substratabhängig ist. Ethanol

kann beispielsweise noch bei einem Wasserstoffpartialdruck von 10^{-2} atm mit einem Energiegewinn umgesetzt werden, während das Propionat (das Salz der Propionsäure) bei > 10^{-4} bar nicht mehr mit Energiegewinn vergoren werden kann. Dies erklärt auch die angesprochene Propionsäureanreicherung als Vorbote weit reichender Störungen der anaeroben Methanogenese (Kunst, 2005).

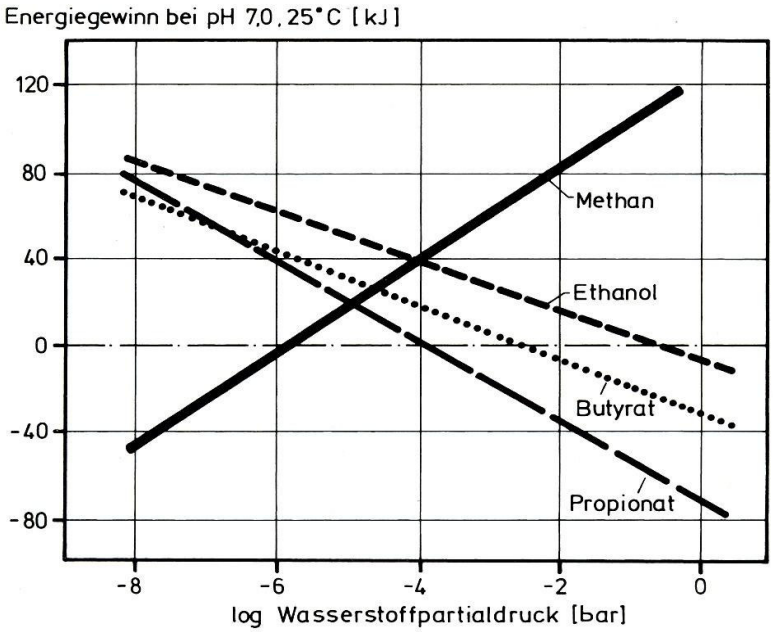


Abbildung 2: Energiegewinn acetogener Reaktionen in Abhängigkeit vom Wasserstoffpartialdruck (Grepmeier, 2002)

Kritisch ist bereits eine Wasserstoffkonzentration im Gärmedium von 1 µmol/l; für die mesophile Fermentation beispielsweise ergibt sich daraus ein Schwellenwert von etwa 1.300 ppm Wasserstoff im Biogas (Whitmore et al., 1987). Abweichend davon gibt es aber auch Untersuchungen, die belegen, dass ein reduzierter Wasserstoffpartialdruck keine Auswirkungen auf den Abbau von Propionsäure und Buttersäure hat (Inanc et al., 1999).

Eine negative Beeinflussung durch hemmende Substanzen kann mitunter auch im Vorfeld abgeleitet werden. Die Mikroorganismen benötigen für ihr Wachstum Nährstoffe und Spurenelemente. In der aktiven Zellsubstanz sind die Proportionen zwischen diesen Elementen verhältnismäßig konstant - unabhängig von den betrachteten Arten. Substanzen können nur dann vollständig abgebaut werden, wenn die Proportionen in Bezug auf Kohlenstoff dem Bedarf entsprechen (Madigan, 2001). Zur ersten Charakterisierung eines Substrates wird häufig das Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis, kurz C/N-Verhältnis, angegeben. Die säurebildenden Bakterien sind dabei mit einem Verhältnis von 10 bis 45

weniger anspruchsvoll als die Methanbildner mit einem engen Bereich von 20 bis 30 (Weiland, 2001). In Abhängigkeit der dominanten Grassorten und dem Erntezeitpunkt schwankt das C/N-Verhältnis von Maissilage im Bereich von 30 bis 40, jenes von Grassilage im Bereich von 11 bis 18 (Ohly, 2006; Andrade et al., 2009a). Damit kann bei der Nutzung von Grassilage, mit einem Rohproteinanteil von bis zu 20 % der Trockenmasse, die Bildung von Ammoniak einen entscheidenden Einfluss auf den Prozess haben. Die Menge an Ammoniak, die beim biologischen Abbau frei wird, kann anhand folgender stöchiometrischer Gleichung ermittelt werden (Boyle, 1977):

$$C_aH_bO_cN_d + \left(a - \frac{b}{4} - \frac{c}{2} + \frac{3d}{4}\right)H_2O \rightarrow \left(\frac{a}{2} + \frac{b}{8} - \frac{c}{4} - \frac{3d}{8}\right)CH_4 + \left(\frac{a}{2} - \frac{b}{8} + \frac{c}{4} + \frac{3d}{8}\right)CO_2 + dNH_3 \quad (1)$$

Die Gründe für die Hemmung sind bisher noch nicht vollständig verstanden, vermutlich spielt eine Änderung des intrazellulären pH-Wertes, die Erhöhung des Energiebedarfes zu Aufrechterhaltung des Stoffwechsels und die Inhibierung eines speziellen Enzyms eine Rolle (Wittmann et al., 1995; Chen et al., 2008). In wässrigen Lösungen kann anorganischer Stickstoff prinzipiell in den beiden Formen Ammonium (NH_4^+) und freies Ammoniak (NH_3) vorliegen. Ähnlich wie beim Schwefelwasserstoff und den organischen Säuren wirkt besonders der nicht dissoziierte Anteil toxisch, da dieser membrangängig ist (Kroiss, 1985; Gallert et al., 1998). Das Gleichgewicht zwischen Ammonium und Ammoniak ist eine Funktion des pH-Wertes sowie der Temperatur gemäß folgender Gleichung (Anthonisen et al., 1976):

$$FAN = \frac{TAN}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad (2)$$

mit

$$pK_a = 0{,}09018 + \frac{2729{,}92}{T + 273{,}15} \quad (3)$$

FAN	Free ammonia nitrogen [g/l]
TAN	Total ammonia nitrogen [g/l]
pK_a	Dissoziationskonstante des Ammoniumions [-]
pH	pH-Wert im Reaktor [-]
T	Temperatur [°C]

Hafner und Bisogni (2009) kritisierten zwar, dass bei hohen Feststoffkonzentrationen eine Korrektur aufgrund des nicht idealen Verhaltens der Ionen nötig sei und deshalb statt der Konzentration die Aktivität der Ionen berücksichtigt werden sollte. Der Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf das Gleichgewicht bleibt davon aber unberührt. Allein durch die Temperaturerhöhung vom mesophilen (38 °C) in den thermophilen Temperaturbereich (55 °C) bei einem identischem pH-Wert von 8,0 ergibt sich entsprechend des Gleichgewichtes eine Erhöhung des hemmenden Ammoniakanteils um den Faktor 2,3 (von 12 % auf 28 %). Dagegen besitzt die thermophile Kultur auch eine höhere Toleranz gegenüber Ammoniak, die Gallert und Winter (1997) auf etwa doppelt so hoch wie jene der mesophilen Kultur schätzten. Das hydrophobe Ammoniakmolekül kann in die Zelle diffundieren und ein Protonenungleichgewicht bzw. je nach Organismus, durch Wechselwirkungen mit Ca^{2+} oder Na^{+}, eine entsprechende Unterversorgung hervorrufen (Sprott und Patel, 1986).

Von den vier Typen der am anaeroben Abbau beteiligten Mikroorganismengruppen sind offenbar die methanogenen am wenigsten resistent gegen Ammonium (Koster und Lettinga, 1988; Kayhanian, 1994). Von diesen wiederum zeigen die acetoclastischen Bakterien eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber Ammoniak als die hydrogenotrophen (Angelidaki und Ahring, 1993). Die prozesstoxische Wirkung von Ammoniak wurde bereits vielfach untersucht. Gallert und Winter (1997) weisen eine 50 prozentige Hemmung der Methanogenese ab einer Ammoniakkonzentration (FAN) von 0,22 g/l (37 °C) bzw. 0,68 g/l (55 °C) nach. Angelidaki und Ahring (1993) belegten um 50 % gesunkene Wachstumsraten im thermophilen Bereich für FAN-Konzentrationen von 0,25 g/l für die acetatverwertenden bzw. von 0,50 g/l für die hydrogenotrophen Bakterien. In einer Literaturstudie zeigten Poggi-Varaldo et al. (1997), dass die Bandbreite der dokumentierten toxischen FAN-Konzentrationen stark schwankt und neben der Temperatur von einer Reihe weiterer Faktoren (z.B. Substrat) abhängt. Die Werte reichen im mesophilen Bereich von 2,8 g/l bis 8,0 g/l FAN und im thermophilen Bereich von 2,5 g/l bis 3,8 g/l FAN. Dem stehen aber Untersuchungen von Sung und Liu (2003) gegenüber, die im thermophilen Bereich einen totalen Zusammenbruch der Methanproduktion erst bei FAN-Konzentrationen von 13 g/l beobachteten. Generell herrscht darüber Konsens, dass bei allmählicher Anpassung an vermeintlich toxische Substanzen ein hohes Maß an Adaptionsfähigkeit besteht. Nichtsdestotrotz gilt bei der Monofermentation von Grassilage Ammoniak als Hauptverursacher von Prozessinstabilitäten, insbesondere im thermophilen Bereich.

Bei der Monofermentation von Energiepflanzen ohne die Zugabe von Gülle spielt auch die Frage nach Vorhandensein und Verfügbarkeit von Spurenelementen eine wichtige Rolle. Im

Gegensatz zur Monofermentation von Maissilage, wo die Zugabe zum Erreichen hoher Raumbelastungen obligatorisch ist (Lebuhn et al., 2008; Lübken, 2009), führte dies aufgrund der Mischung verschiedenster Pflanzen in der Grassilage zu keinem messbaren Verbesserungen (Abdoun und Weiland, 2009; Preißler et al., 2009).

Im Rahmen des zweiten bundesweiten Biogasmessprogrammes (FNR, 2009) wurden 61 Biogasanlagen untersucht und verglichen. Dabei zeigte sich, dass ein Großteil der bestehenden Anlagen Wirtschaftsdünger als Grundsubstrat nutzen (85 %). Kommen dagegen nur nachwachsende Rohstoffe zum Einsatz, ist Maissilage mit 76 % Massenanteil sehr dominant. Gras und Grassilage spielen mit einem Anteil von 8 % eher eine untergeordnete Rolle, zumal in Abhängigkeit des Substratangebotes immer eine Mischung verschiedenster Gärgüter zum Einsatz kommt. Aufgrund des Einsatzes von Wirtschaftsdüngern ist in der Regel die Nassfermentation die Betriebsweise der Wahl (88 %). Einstufig werden nur 30 % geführt, 62 % der Anlagen sind dagegen zusätzlich mit einem sogenannten Nachgärer ausgestattet und werden damit zweistufig betrieben. Die Anlagen werden zu 86 % im mesophilen Temperaturbereich mit Temperaturen zwischen 37 °C und 43 °C betrieben.

I.4.2. Modellentwicklung bis zum ADM1

Mit Hilfe mathematischer Modelle kann das Verständnis der ablaufenden Prozesse vertieft werden. Modelle, die den anaeroben Abbau beschreiben, liegen in großer Zahl vor. Die meisten Modelle basieren auf voll durchmischten Reaktoren, wobei davon ausgegangen wird, dass alle Stoffe im Reaktor gradientenfrei verteilt sind und der Ablauf repräsentativ für den Reaktorinhalt ist. Der große Vorteil bei der Modellierung eines Rührkessels gegenüber anderen Reaktortypen liegt dabei in der geringeren Anzahl der nötigen Eingangsgrößen und in der Übertragbarkeit auch auf andere Verfahrensweisen und Substrate.

Verschiedene Forschungsarbeiten beschäftigten sich mit der dynamischen Simulation anaerober Prozesse in volldurchmischten Reaktoren, wobei die Modelle von Andrews (1969) und Hill (1983) als Pionierarbeiten gelten. Siegrist (Siegrist et al., 1993; 1995; Siegrist et al., 2002) beschäftigte sich eingehend mit der anaeroben Behandlung von Faulschlamm und lieferte mit seinen Modellen wertvolle Hinweise zur Hydrolyse, die als geschwindigkeitslimitierender Schritt im Vergärungsprozess identifiziert und sehr genau untersucht wurde. Die Kinetik der Hydrolyse beim anaeroben Abbau haben sowohl Eastman und Ferguson (1981) als auch Pavlovstatis und Giraldo-Gomez (1991) zum Thema. Beide Arbeitsgruppen sprechen sich für den Einsatz von Kinetiken erster Ordnung aus. Vavilin et al.

(1996) dagegen stellten Unterschiede bei ihren Untersuchungen fest und empfahlen eine detailliertere Beschreibung der Kinetiken. Ferner wurden die verschiedenen Abbauwege von Protein (Ramsay und Pullammanappallil, 2001), von Glucose (Madigan, 2001), von Lactat (Costello et al., 1991) und der Abbau über die Zwischenprodukte Buttersäure, Acetat, Ethanol sowie Propionat im Modell berücksichtigt. Eine Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse zur dynamischen Simulation ist in Batstone (2006) zu finden. Zusätzlich zu den volldurchmischten Reaktoren gibt es auch Modelle für Biofilm- (Saravanan und Sreekrishnan, 2006), Wirbelschicht- (Buffière et al., 1998), UASB- (Wu und Hickey, 1997; Singh et al., 2010), Festbett- (Gupta et al., 1997) und Hybridreaktoren (Ramsay und Pullammanappallil, 2005).

Das Anaerobic Digestion Model No. 1 (Batstone et al., 2002) ging aus der im Jahre 1997 gegründeten IWA-Task-Group on Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes hervor. Ziel der Arbeit der Task Group war die Erarbeitung eines einheitlich strukturierten Modells für unterschiedliche Substrate und Reaktortypen, das nach erfolgreicher Kalibrierung auch für die Prozesssteuerung von Anlagen eingesetzt werden kann. Ergebnis der Arbeitsgruppe ist ein komplexes Modell, das u.a. durch 24 dynamische Zustandsvariablen und 19 biochemische Stoffumwandlungsprozesse charakterisiert ist. Des Weiteren sind 6 Prozesse berücksichtigt, die die Dissoziationsgleichgewichte der organischen Säuren, des Acetats, des Ammoniumstickstoffs und des Wasserstoffs beschreiben. Weitere drei Variablen beschreiben den Stoffaustausch zwischen Flüssigkeit und Gasphase, anhand derer die Ausstrippung von Methan, Kohlendioxid und Wasserstoff errechnet wird. Mit Hilfe einer Ladungsbilanz kann letztendlich der pH-Wert in der flüssigen Phase bestimmt werden.

Insbesondere bei der Beschreibung der Umsatzprozesse zu organischen Säuren (Essig-, Propion-, Butter- und Valeriansäure) zeichnet sich das ADM1 durch eine hohe Detailgenauigkeit aus, weshalb es schon oft erfolgreich für die unterschiedlichsten Substrate eingesetzt worden ist. Der Ansatz des ADM1 folgt dem des Activated Sludge Modelle No. 1 (ASM1) nach Henze et al. (1987) und dessen Weiterentwicklungen und ist deshalb CSB-basiert. In Anlehnung daran werden CSB-, Stickstoff- und Kohlenstofffrachten bilanziert, welche u.a. maßgebend für die Berechnung der ausgestrippten Mengen an Gasen sind. Alles in allem bietet sich das ADM1 aufgrund seiner offenen Struktur für die Abbildung verschiedenster Substrate und Verfahrensbedingungen an. Ferner ist es möglich, definierte Prozesse zu deaktivieren und neue zu integrieren (vgl. Kapitel II.3.2.3). Dies bietet sich insbesondere dann an, wenn etwa nur der Gasertrag und die Gaszusammensetzung errechnet

(vereinfachtes Modell) oder beispielsweise die Abbildung des Stabilitätskriteriums FOS/TAC (vgl. Kapitel II.2.6) in das Modell aufgenommen werden soll.

Aufgrund der Vielzahl der zu berücksichtigenden Vorgänge, die wiederum untereinander vernetzt sind, ergibt sich ein sehr komplexes Gleichungssystem. Zur besseren Strukturierung hat sich bereits bei anderen mathematischen Modellen die Peterson-Matrix durchgesetzt, wie sie auch in Tabelle 2 und Tabelle 3 zu sehen ist. Die stöchiometrische Matrix ist das Bindeglied zwischen Stoffgruppen, Prozessen und kinetischen Parametern. In der Matrix ist definiert, welche Konzentrationen der Stoffgruppen bei einem bestimmten Prozess ansteigen und welche dabei reduziert werden. Die Matrix setzt sich aus stöchiometrischen Koeffizienten zusammen, die zum einen aus den negativen reziproken Werten der Ertragskoeffizienten bestehen. Zum anderen werden Kontinuitätsbeziehungen von CSB, Stickstoff, Kohlenstoff und der elektrischen Ladung in die Matrix integriert.

Tabelle 2: ADM1-Prozessmatrix (gelöste Stofffraktionen)

Component	i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Rate (ρ_j, $kg_{COD}\ m^{-3}\ d^{-1}$)
j	Process	S_{su}	S_{aa}	S_{fa}	S_{va}	S_{bu}	S_{pro}	S_{ac}	S_{h2}	S_{ch4}	S_{IC}	S_{IN}	S_I	
1	Disintegration												$f_{SI,Xc}$	$k_{dis}X_c$
2	Hydrolysis of Carbohydrates	1												$k_{hyd,ch}X_{ch}$
3	Hydrolysis of Proteins		1											$k_{hyd,pr}X_{pr}$
4	Hydrolysis of Lipids	$1-f_{fa,li}$		$f_{fa,li}$										$k_{hyd,li}X_{li}$
5	Uptake of Sugars	-1				$(1-Y_{su})\ f_{bu,su}$	$(1-Y_{su})\ f_{pro,su}$	$(1-Y_{su})\ f_{ac,su}$	$(1-Y_{su})\ f_{h2,su}$		$-\sum_{i=1-9,11-24} C_i\nu_{i,5}$	$-(Y_{su})\ N_{bac}$		$k_{m,su}\frac{S_{su}}{K_S+S_{su}}X_{su}\ I_1$
6	Uptake of Amino Acids		-1		$(1-Y_{aa})\ f_{va,aa}$	$(1-Y_{aa})\ f_{bu,aa}$	$(1-Y_{aa})\ f_{pro,aa}$	$(1-Y_{aa})\ f_{ac,aa}$	$(1-Y_{aa})\ f_{h2,aa}$		$-\sum_{i=1-9,11-24} C_i\nu_{i,6}$	$N_{aa}-(Y_{aa})\ N_{bac}$		$k_{m,aa}\frac{S_{aa}}{K_S+S_{aa}}X_{aa}\ I_1$
7	Uptake of LCFA			-1				$(1-Y_{fa})\ 0.7$	$(1-Y_{fa})\ 0.3$			$-(Y_{fa})\ N_{bac}$		$k_{m,fa}\frac{S_{fa}}{K_S+S_{fa}}X_{fa}\ I_2$
8	Uptake of Valerate				-1		$(1-Y_{c4})\ 0.54$	$(1-Y_{c4})\ 0.31$	$(1-Y_{c4})\ 0.15$			$-(Y_{c4})\ N_{bac}$		$k_{m,c4}\frac{S_{va}}{K_S+S_{va}}X_{c4}\frac{1}{1+S_{bu}/S_{va}}\ I_2$
9	Uptake of Butyrate					-1		$(1-Y_{c4})\ 0.8$	$(1-Y_{c4})\ 0.2$			$-(Y_{c4})\ N_{bac}$		$k_{m,c4}\frac{S_{bu}}{K_S+S_{bu}}X_{c4}\frac{1}{1+S_{va}/S_{bu}}\ I_2$
10	Uptake of Propionate						-1	$(1-Y_{pro})\ 0.57$	$(1-Y_{pro})\ 0.43$		$-\sum_{i=1-9,11-24} C_i\nu_{i,10}$	$-(Y_{pro})\ N_{bac}$		$k_{m,pro}\frac{S_{pro}}{K_S+S_{pro}}X_{pro}\ I_2$
11	Uptake of Acetate							-1		$(1-Y_{ac})$	$-\sum_{i=1-9,11-24} C_i\nu_{i,11}$	$-(Y_{ac})\ N_{bac}$		$k_{m,ac}\frac{S_{ac}}{K_S+S_{ac}}X_{ac}\ I_3$
12	Uptake of Hydrogen								-1	$(1-Y_{h2})$	$-\sum_{i=1-9,11-24} C_i\nu_{i,12}$	$-(Y_{h2})\ N_{bac}$		$k_{m,h2}\frac{S_{h2}}{K_S+S_{h2}}X_{h2}\ I_1$
13	Decay of X_{su}													$k_{dec,Xsu}X_{su}$
14	Decay of X_{aa}													$k_{dec,Xaa}X_{aa}$
15	Decay of X_{fa}													$k_{dec,Xfa}X_{fa}$
16	Decay of X_{C4}													$k_{dec,Xc4}X_{c4}$
17	Decay of X_{pro}													$k_{dec,Xpro}X_{pro}$
18	Decay of X_{ac}													$k_{dec,Xac}X_{ac}$
19	Decay of X_{h2}													$k_{dec,Xh2}X_{h2}$

Tabelle 3: ADM1-Prozessmatrix (partikuläre Stofffraktionen)

Component	i	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Rate (ρ_j, $kg_{COD}\ m^{-3}\ d^{-1}$)
j	Process	X_c	X_{ch}	X_{pr}	X_{li}	X_{su}	X_{aa}	X_{fa}	X_{c4}	X_{pro}	X_{ac}	X_{h2}	X_I	
1	Disintegration	-1	$f_{ch,xc}$	$f_{pr,xc}$	$f_{li,xc}$								$f_{xI,xc}$	$k_{dis}X_c$
2	Hydrolysis of Carbohydrates		-1											$k_{hyd,ch}X_{ch}$
3	Hydrolysis of Proteins			-1										$k_{hyd,pr}X_{pr}$
4	Hydrolysis of Lipids				-1									$k_{hyd,li}X_{li}$
5	Uptake of Sugars					Y_{su}								$k_{m,su}\frac{S_{su}}{K_S + S_{su}} X_{su} I_3$
6	Uptake of Amino Acids						Y_{aa}							$k_{m,aa}\frac{S_{aa}}{K_S + S_{aa}} X_{aa} I_1$
7	Uptake of LCFA							Y_{fa}						$k_{m,fa}\frac{S_{fa}}{K_S + S_{fa}} X_{fa} I_2$
8	Uptake of Valerate								Y_{c4}					$k_{m,c4}\frac{S_{va}}{K_S + S_{va}} X_{c4}\frac{1}{1 + S_{bu}/S_{va}} I_2$
9	Uptake of Butyrate								Y_{c4}					$k_{m,c4}\frac{S_{bu}}{K_S + S_{bu}} X_{c4}\frac{1}{1 + S_{va}/S_{bu}} I_2$
10	Uptake of Propionate									Y_{pro}				$k_{m,pro}\frac{S_{pro}}{K_S + S_{pro}} X_{pro} I_2$
11	Uptake of Acetate										Y_{ac}			$k_{m,ac}\frac{S_{ac}}{K_S + S_{ac}} X_{ac} I_3$
12	Uptake of Hydrogen											Y_{h2}		$k_{m,h2}\frac{S_{h2}}{K_S + S_{h2}} X_{h2} I_1$
13	Decay of X_{su}	1				-1								$k_{dec,Xsu}X_{su}$
14	Decay of X_{aa}	1					-1							$k_{dec,Xaa}X_{aa}$
15	Decay of X_{fa}	1						-1						$k_{dec,Xfa}X_{fa}$
16	Decay of X_{C4}	1							-1					$k_{dec,Xc4}X_{c4}$
17	Decay of X_{pro}	1								-1				$k_{dec,Xpro}X_{pro}$
18	Decay of X_{ac}	1									-1			$k_{dec,Xac}X_{ac}$
19	Decay of X_{h2}	1										-1		$k_{dec,Xh2}X_{h2}$

Bei der Erstellung des ADM1 wurde darauf geachtet, dass die Parameter für zukünftige Anwendungen variabel sind. Dadurch ist es möglich, dass auch grundverschiedene Substrate und Biozönosen durch eine entsprechende Anpassung der jeweiligen Parameter mit dem Modell abgebildet werden können. Als Grundlage dient in der Regel der Standardparametersatz, der von Batstone et al. (2002) für Klärschlamm erstellt wurde. Häufig kann die Anpassung trotz verändertem Substrat (z.B. nachwachsende Rohstoffe) auf wenige sensible Parameter beschränkt werden. Während einige kinetische Parameter (Tabelle 4) von einer Temperaturänderung beeinflusst werden, ist das bei den stöchiometrischen Parametern (Tabelle 5) nicht der Fall.

Tabelle 4: Standardparametersatz des ADM1 (kinetische Parameter)

Parameter	Einheit	mesophil (35 °C)	thermophil (55 °C)	Prozess
Hydrolyse & Desintegration				
k_{dis}	d^{-1}	0,5	1	Desintegration
k_{hyd_ch}	d^{-1}	10	10	Hydrolyse Kohlenhydrate
k_{hyd_pr}	d^{-1}	10	10	Hydrolyse Proteine
k_{hyd_li}	d^{-1}	10	10	Hydrolyse Fette
Sonstiges				
k_{dec}	d^{-1}	0,02	0,04	Zerfallsrate der Biomassen
K_{S_IN}	kmol/m³	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	Halbsättigungskonzentration NH_3
pH_{UL_a}	-	5,5	5,5	Obere pH-Grenze für Prozesse 5-10
pH_{LL_a}	-	4	4	Untere pH-Grenze für Prozesse 5-10
Zuckerfermentation				
k_{m_su}	$kg_{CSB}/(kg_{CSB} \cdot d)$	30	70	Aufnahmerate
K_{S_su}	kg_{CSB}/m^3	0,5	1	Halbsättigungskonzentration
Y_{su}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,10	0,10	Ertragskoeffizient
Aminosäurenfermentation				
k_{m_aa}	$kg_{CSB}/(kg_{CSB} \cdot d)$	50	70	Aufnahmerate
K_{S_aa}	kg_{CSB}/m^3	0,3	0,3	Halbsättigungskonzentration
Y_{aa}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,08	0,08	Ertragskoeffizient
Fettsäurenoxidation				
k_{m_fa}	$kg_{CSB}/(kg_{CSB} \cdot d)$	6	10	Aufnahmerate
K_{S_fa}	kg_{CSB}/m^3	0,4	0,4	Halbsättigungskonzentration
Y_{fa}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,06	0,06	Ertragskoeffizient
$K_{I_H2_fa}$	kg_{CSB}/m^3	$5 \cdot 10^{-6}$	k.A.	Inhibitionskonstante H_2
Butter-/Valeriansäurenoxidation				
k_{m_c4}	$kg_{CSB}/(kg_{CSB} \cdot d)$	20	30	Aufnahmerate
K_{S_c4}	kg_{CSB}/m^3	0,2	0,4	Halbsättigungskonzentration
Y_{c4}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,06	0,06	Ertragskoeffizient
$K_{I_H2_c4}$	kg_{CSB}/m^3	$1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$	Inhibitionskonstante H_2
Propionsäurenoxidation				
k_{m_pro}	$kg_{CSB}/(kg_{CSB} \cdot d)$	13	20	Aufnahmerate
K_{S_pro}	kg_{CSB}/m^3	0,1	0,3	Halbsättigungskonzentration
Y_{pro}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,04	0,05	Ertragskoeffizient
$K_{I,H2,pro}$	kg_{CSB}/m^3	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	Inhibitionskonstante H_2
Acetoclastische Methanogenese				
k_{m_ac}	$kg_{CSB}/(kg_{CSB} \cdot d)$	8	16	Aufnahmerate
K_{S_ac}	kg_{CSB}/m^3	0,15	0,3	Halbsättigungskonzentration
Y_{ac}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,05	0,05	Ertragskoeffizient
pH_{UL_ac}	-	7	7	Obere pH-Grenze für Prozess 11
pH_{LL_ac}	-	6	6	Untere pH-Grenze für Prozess 11
K_{I_NH3}	kmol/m³	0,0018	0,011	Inhibitionskonstante NH_3
Hydrogenotrophe Methanogenese				
k_{m_h2}	$kg_{CSB}/(kg_{CSB} \cdot d)$	35	35	Aufnahmerate
K_{S_h2}	kg_{CSB}/m^3	$7 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-5}$	Halbsättigungskonzentration
Y_{h2}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,06	0,06	Ertragskoeffizient
pH_{UL_h2}	-	6	6	Obere pH-Grenze für Prozess 12
pH_{LL_h2}	-	5	5	Untere pH-Grenze für Prozess 12

Tabelle 5: Standardparametersatz des ADM1 (stöchiometrische Parameter)

Parameter	Einheit	ADM1	Beschreibung
Stöchiometrische Faktoren			
f_{SI_Xc}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,1	Gelöst inertes Kompositmaterial
f_{XI_Xc}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,25	Partikulär inertes Kompositmaterial
f_{ch_Xc}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,20	Kohlenhydrate aus Kompositmaterial
f_{pr_Xc}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,20	Proteine aus Kompositmaterial
f_{li_Xc}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,25	Fette aus Kompositmaterial
f_{fa_li}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,95	Fettsäuren aus Fetten
f_{h2_su}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,19	Wasserstoff aus Zucker
f_{bu_su}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,13	Buttersäure aus Zucker
f_{pro_su}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,27	Propionsäure aus Zucker
f_{ac_su}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,41	Essigsäure aus Zucker
f_{h2_aa}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,06	Wasserstoff aus Aminosäuren
f_{va_aa}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,23	Valeriansäure aus Aminosäuren
f_{bu_aa}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,26	Buttersäure aus Aminosäuren
f_{pro_aa}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,05	Propionsäure aus Aminosäuren
f_{ac_aa}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,40	Essigsäure aus Aminosäuren
f_{h2_fa}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,30	Wasserstoff aus Fettsäuren
f_{ac_fa}	kg_{CSB}/kg_{CSB}	0,70	Essigsäure aus Fettsäuren
Stickstoffgehalte			
N_{Xc}	$kmol_N/kg_{CSB}$	0,002	Kompositmaterial
N_{XI}, N_{SI}	$kmol_N/kg_{CSB}$	0	Partikuläres und gelöstes Inertmaterial
N_{Xpr}, N_{aa}	$kmol_N/kg_{CSB}$	0,007	Proteine und Aminosäuren
N_{Xch}, N_{Xli}	$kmol_N/kg_{CSB}$	0	Kohlenhydrate und Fette
N_{XB}	$kmol_N/kg_{CSB}$	0,00625	Biomasse
Kohlenstoffgehalte			
C_{Xc}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,03	Kompositmaterial
C_{XI}, C_{SI}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,03	Partikuläres und gelöstes Inertmaterial
C_{Xpr}, C_{aa}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,03	Proteine und Aminosäuren
C_{Xch}, C_{su}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,0313	Kohlenhydrate und Zucker
C_{Xli}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,022	Fette
C_{fa}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,0217	Fettsäuren
C_{pro}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,0268	Propionsäure
C_{va}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,024	Valeriansäure
C_{bu}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,025	Buttersäure
C_{ac}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,0313	Acetat
C_{me}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,0156	Methan
C_{XB}	$kmol_C/kg_{CSB}$	0,0313	Biomasse

Für die Lösung der Modellgleichungen wurde auf die auf Matlab/Simulink basierende Simulationssoftware SIMBA 4.2 (2005) zurückgegriffen, welche bereits durch eine internationale Arbeitsgruppe der IWA für Kläranlagenmodelle (Task Group on Benchmarking of Control Strategies for WWTPs) gebenchmarkt wurde. SIMBA ist neben AQUASIM (2001) die international am weitesten verbreitete Simulationssoftware für dieses Anwendungsgebiet und Grundlage umfangreicher Publikationen.

Anhand der bisherigen Erfahrungen mit der Vergärung von Grassilage ergeben sich auch für die Modellierung substratspezifische Fragestellungen. Aufgrund des hohen Trockensubstanzgehaltes der eingesetzten Grassilage ist fraglich, ob durch die im ADM1 festgelegten konstanten Hydrolyseraten die Vorgänge im Reaktor ausreichend beschrieben werden. Denn ein zu hoher Gehalt an partikulären Stoffen wirkt sich negativ auf deren Hydrolyse und damit auf deren Umsetzung in Biogas aus (Vavilin et al., 2008). Ähnliche Effekte wurden auch für die Vergärung von Rinderfestmist festgestellt, wobei sich ein Wert von 7 - 9 % TS als optimal erwies (Zennaki-Bensouda et al., 1996; Budiyono et al., 2010). Sadaka und Engler (2003) dagegen zeigten in Versuchen mit verschiedenem Tierdung, dass ein steigender TS-Gehalt den Biogasertrag stetig verringert. Die Einflussnahme von Wasser auf den Abbauprozess wird zwei Gründen zugeschrieben (Yadvika et al., 2007). Einerseits dient Wasser als Transportmedium für Mikroorganismen und ermöglicht die Aufnahme von Nährstoffen durch Diffusionsvorgänge. Zum anderen erleichtert Wasser den Stoffübergang nicht homogener oder partikulärer Stoffe. Nicht zuletzt wird Wasser in Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung des Substrates während der Hydrolyse verbraucht. Damit kann bei Wassermangel die Hydrolyse von partikulärem Material als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt angesehen werden (Qu et al., 2009). Im Gegensatz zum ursprünglichen Modellsubstrat Klärschlamm muss bei Substraten mit hohen Feststoffgehalten der Einfluss des Trockensubstanzgehaltes auf die Hydrolyse berücksichtigt werden.

Eine weitere Besonderheit der Grassilage ist der hohe Proteingehalt und das damit verbundene, ungünstig enge C/N-Verhältnis. Während des Abbaus entsteht daraus Ammonium bzw. Ammoniak, welches hemmend auf die Bakterien wirken kann. Folglich ist eine detaillierte Beschreibung der Stickstoffströme im System für die Modellierung von großer Bedeutung. Im ADM1 wird abgestorbene Biomasse einfach wieder der Kompositfraktion zugeordnet, wodurch dieses Material wie frisches Substrat behandelt wird. Dieses Vorgehen führt allerdings dazu, dass der Stickstoffgehalt der Zerfallsprodukte mit dem des Zulaufs gleichgesetzt wird, was problematisch sein kann. Aus diesem Grund haben Wett et al. (2006) vorgeschlagen, einen Teil der abgestorbenen Biomasse einer neuen Variablen der Biomassezerfallsprodukte zuzuordnen, wodurch eine Entkopplung stattfindet (Lyseansatz). Nicht zuletzt aufgrund der hohen Verweilzeiten im Reaktor bei gleichzeitig geringerem Massedurchsatz im Vergleich zur Klärschlammbehandlung kommt dem Einfluss der Zerfallsbiomasse eine deutlich höhere Bedeutung zu.

Ferner zeigten bisherige Veröffentlichungen, dass teils stark unterschiedliche Ansätze bei der Auswahl der zu kalibrierenden Parameter (Sensitivitätsanalyse) sowie der anschließenden

Bewertung der Simulationsgüte gewählt wurden. Häufig wurden mutmaßlich sensitive Parameter anhand von Erfahrungen ausgewählt und die Parameteranpassung erfolgte bisher zumeist nur durch einen visuellen Vergleich zwischen Simulations- und Messwerten (Boubaker und Ridha, 2008; Qu et al., 2009; Ramirez et al., 2009; Schoen et al., 2009). Dieses Vorgehen ist allerdings subjektiv und hängt im starken Maße von den Erfahrungen des Anwenders ab. Unterschiedlich angepasste Parameter sind folglich trotz identischer Datenbasis nicht unwahrscheinlich. Kann ein verhältnismäßig objektives Kriterium zur Beurteilung der Simulationsgüte gegenüber den Messwerten gefunden werden, ist auch die Identifizierung sensitiver Parameter möglich.

I.4.3. Wissensdefizite

Im Zeitraum der Erstellung und Genehmigung des Antrages lag durch die Formulierungen des EEG in der Fassung aus dem Jahr 2004 ein starker Fokus auf der Monofermentation von Biomasse. Bis dato bestehende Anlagen galten überwiegend der Behandlung tierischer Exkremente zur anschließenden Nutzung als Wirtschaftsdünger. Die Zugabe von etwaigen landwirtschaftlichen Überproduktionen oder Reststoffen dienten zwar der Aufwertung des Biogasertrages, der Zugewinn an Energie durch die Nutzung des Biogases blieb aber lediglich ein angenehmer Nebeneffekt. Folglich gab es keinerlei Erfahrungen auf die die Anlagenbetreiber bei der alleinigen Verwendung von Energiepflanzen zurückgreifen konnten. Lebuhn et al. (2008) konnten beispielsweise im Langzeitversuch zeigen, dass es bei der alleinigen Vergärung von Maissilage zu Mangelerscheinungen kommt, die durch das Fehlen diverser Spurenelemente verursacht werden. Solche Probleme waren bei Anwesenheit von Gülle bisher unbekannt. Eine weitere Herausforderung bei der Monofermentation besteht in dem relativ hohen Trockensubstanzgehalt der zugeführten Silagen, wodurch im Reaktor eine höhere Viskosität und folglich Probleme bei der Durchmischung sowie etwaige nachteilige Auswirkungen auf die Rührorgane erwartet werden. Insbesondere bei der Vergärung von Grassilage werden aufgrund des hohen Proteingehaltes von bis zu 20 % der Trockenmasse während der Hydrolyse große Mengen an Ammonium frei, welches hemmend bzw. toxisch auf methanogene Bakterienstämme wirken kann. Außerdem sollten verschiedene Reaktorkonfigurationen auf ihre jeweilige Eignung für die Vergärung lignocellulosehaltiger Substrate untersucht werden.

Neben den verfahrenstechnischen Untersuchungen der Vergärung von Mais- und Grasssilage, stand insbesondere die Erstellung und Kalibrierung eines ADM1-basierten Modells im

Vordergrund. Damit sollte erstmals eine Modellanpassung für lignocellulosehaltige Substrate vorgenommen werden. Die Herausforderung bestand einerseits darin, ein geeignetes Analysenverfahren zur Charakterisierung des Zulaufes zu finden, da die aus der Abwasserreinigung bekannten, nasschemischen Analysen nur bedingt für die Silagen angewandt werden können. Die Zulauffraktionierung ist insofern von großer Bedeutung, als dass das Modell natürlich immer nur dann zuverlässig arbeiten kann, wenn es mit repräsentativen Daten gespeist wird (garbage in - garbage out). Andererseits war fraglich, ob das ADM1 überhaupt zu Abbildung lignocellulosehaltiger Substrate geeignet ist, da eine anders zusammengesetzte Biozönose vermutet wird und möglicherweise Prozesse einen dominanten Einfluss auf dem Gärprozess haben, die in der Behandlung flüssiger Substrate kaum in Erscheinung treten und deshalb nicht ins Modell Eingang fanden.
Während das Modell mittlerweile von internationalen Forschergruppen sehr häufig verwendet wird, ist dessen Anwendung in Deutschland insbesondere in der Praxis kaum verbreitet. Zur Steigerung der Popularität des ADM1 wurden im Rahmen dieses Vorhabens mehrere Vorträge auf verschieden Biogastagungen in Deutschland gehalten, die insbesondere den großen Nutzen für die Praxis aufgezeigt haben (Koch et al., 2008b; Wichern et al., 2008; Koch et al., 2009a; Lübken et al., 2009).

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Verbundprojekt wurde in Zusammenarbeit mit der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft - Institut für Landtechnik und Tierhaltung (LfL-ILT), dem Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München (TUM-MB), dem Lehrstuhl für Bodenökologie der TU München (TUM-BÖ) sowie der Firma Schmack Biogas AG durchgeführt. Der LfL-ILT oblag die Koordination des Verbundes sowie die Aufgaben Anlagenbetrieb, Prozessoptimierung, chemische und Online-NIRS-Analytik, Prozessdatenerhebung, zentrale Datensammlung, Adaption, Selektion und Upscaling der Inokula, Diversität und Quantifizierung relevanter funktioneller Gene/Mikroorganismen (gemeinsam mit TUM-SWW Teilvorhaben b) und Benchmarking. Am TUM-MB wurden anaerobe Inokula faserabbauender Mikroorganismen entwickelt und die Proteinzusammensetzung der entsprechenden Zellen untersucht (Proteomik). Der TUM-BÖ beschäftigte sich mit der Erfassung funktioneller Prozessketten mittels Mikroarrays. Die Fa. Schmack schließlich hat Technikumsanlagen betrieben, die zum Upscaling der Inokula zum Praxismaßstab dienten und parallel dazu Praxisanlagen-Monitoring betrieben. Die vier Projektpartner werden ihre Ergebnisse in eigenen Abschlussberichten präsentieren.

II. Eingehende Darstellung

Im Folgenden erfolgt eine kurze Einleitung in die Problematik und danach wird auf die verwendeten Materialien und Methoden (eingesetzte Substrate, Versuchsanlagen, Messtechnik und Analytik) eingegangen. Im Anschluss daran erfolgt dann die Darstellung der verfahrenstechnischen Ergebnisse mit den sich für die Modellierung ergebenden Erkenntnisse sowie die eigentliche Simulationsstudie.

II.1. Einleitung

Die Erzeugung von Biogas aus landwirtschaftlichen Substraten hat in den letzten Jahren eine rasante Entwicklung erfahren. Steigende Preise für nicht erneuerbare Energieträger wie z.B. Erdöl und Kohle trugen zu dieser Entwicklung maßgeblich bei. Die Novellierung des Erneuerbare-Energien-Gesetzes im Jahr 2004 führte zu einem verstärkten Bau von Biogasanlagen, die lignocellulosehaltige Substrate verwendeten. Anlagen für die alleinige Vergärung von Energiepflanzen ohne Gülle als Co-Substrat waren zu diesem Zeitpunkt technologisch jedoch noch nicht ausgereift. Vor diesem Hintergrund waren technische Entwicklungsarbeiten vor allem hinsichtlich der Prozessstabilität dringend notwendig. Kommt es zu Störungsfällen auf einer Biogasanlage, ist es wichtig, auf die Störung schnell und angemessen zu reagieren, um möglichst zeitnah einen stabilen Betrieb der Anlage wieder erreichen zu können. Ein Ausfall der Anlage über einen längeren Zeitraum oder unangemessene, kontraproduktive Maßnahmen würden zu signifikanten Kosten führen, die die gesamte Wirtschaftlichkeit einer Anlage in Frage stellen können. Sollen nachwachsende Rohstoffe in einem anaeroben Verfahren großflächig zur Energiegewinnung eingesetzt werden, sind daher besonders ein stabiler Betrieb und die Optimierung der Biogasproduktion von Bedeutung.

Der Fokus bei der Auswahl geeigneter Substrate sollte in erster Linie auf ohnehin anfallende landwirtschaftliche Neben- und Koppelprodukte, wie Gülle und Festmist, Schlempen, Trebern und Trestern sowie Bioabfällen, liegen. Da diese Stoffe quasi ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand anfallen, ist deren Nutzung sowohl ökonomisch als auch ökologisch attraktiv. Die zur Verfügung stehenden Mengen sind jedoch sehr begrenzt. Trotz der häufig geführten "Teller oder Tank"-Diskussion, kann der gezielte Anbau von Energiepflanzen zur Biogasproduktion in Deutschland ökologisch sinnvoll und richtig sein (detaillierte Betrachtungen dazu in Kapitel II.3.5). Mit über 90 % Gesamtanteil dominiert derzeit der

Mais den Anbau und wird vor allem als Silomais, aber auch als Körnermais genutzt (Abbildung 3). Andere landwirtschaftliche Erzeugnisse wie Getreide oder Rüben weisen geringere Hektarerträge auf, benötigen eine intensivere Bewirtschaftung, haben höhere Ansprüche an den Boden oder können nicht so häufig kultiviert werden. An der Mais-Dominanz wird sich wohl auf absehbare Zeit auch nichts ändern, da Mais einen vergleichsweise hohen Methanertrag (als m^3 CH_4 pro Hektar und Jahr) liefert und die Produktionskosten relativ gering sind. Die herkömmliche Anbau- und Erntetechnik ist auch für die Verwertung als Energiepflanze völlig ausreichend. Silomais ist leicht konservierbar und damit nach Bedarf kontinuierlich verfügbar.

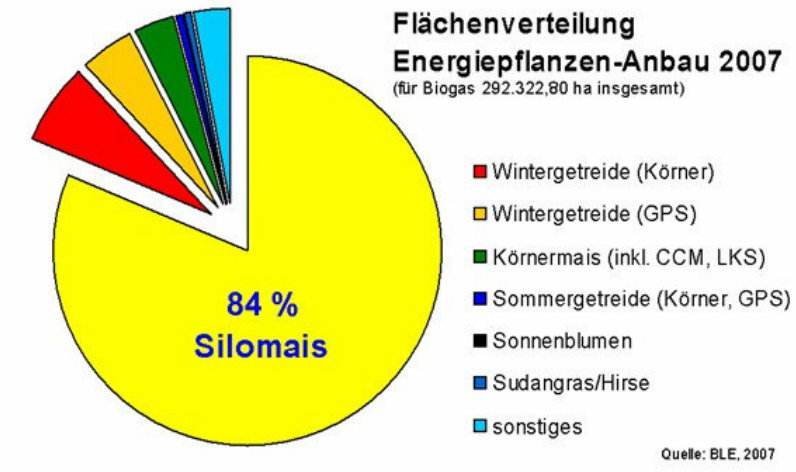


Abbildung 3: Flächenverteilung Energiepflanzenanbau für Biogas im Jahr 2007

Während Mais sich vor allem durch das günstige Kosten-Nutzen-Verhältnis und die hohen Hektarerträge auszeichnet, liegt der Vorteil von Gras im geringen Produktionsaufwand, da es quasi ohne jedwede Art von Ansaat und Düngung und damit bis auf die Ernte ohne Arbeitseinsatz auskommt. Gras wird ohnehin als Futtermittel entweder siliert oder in Form von Heu konserviert. Entsprechende Überkapazitäten können der Biogasgewinnung zur Verfügung gestellt werden. Großes Potenzial liegt außerdem im Einsatz von sogenanntem Landschaftspflegematerial, dessen Nutzung seit der Novellierung des EEG im Jahre 2009 besonders gefördert wird. Wird Gras aus Parks, Landschaftschutzgebieten, Brachen etc. eingesetzt, welches andernfalls einer Kompostierung zugeführt und damit die gebundene Energie ungenutzt emittiert worden wäre, entzieht man sich auch der Debatte um eine Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion.

II.2. Material und Methoden

II.2.1. Versuchsfermenteranlagen

Die verwendeten Versuchsfermenter unterscheiden sich aufgrund ihres Arbeitsvolumens, ihrer Geometrie und den installierten Rührorganen. Durch die Nutzung verschiedenster Ansätze zur Durchmischung, sollten Vor- bzw. Nachteile der jeweiligen Bauart herausgestellt werden. Grundlegend wird zwischen voll durchmischten Reaktoren (gradientenfreie Verteilung innerhalb des Reaktors) und Pfropfenstromreaktoren (Zustand des Inhaltes variiert in Strömungsrichtung) unterschieden. Alle beschriebenen Reaktoren verfügten standardmäßig über permanent laufende Rühraggregate, waren über Temperatursensoren rückgekoppelt beheizbar und voll isoliert.

II.2.1.1. Container-Anlage

Die Versuchsanlage besteht aus einem Pfropfenstromfermenter (Nutzvolumen: 240 l) und einem voll durchmischten Reaktor (Nutzvolumen: 500 l), die optional in Reihe geschaltet, aber auch als jeweils autarkes System betrieben werden können (Abbildung 4). Der auch als liegender Fermenter bezeichnete Pfropfenströmer (PFR) verfügt über eine spezielle Förderschnecke zur Substratzugabe, mehrere getrennt beheizbare Bereiche sowie über jeweils vier separate Gasfassungs- und Probenahmestellen entlang der Strömungsachse. Der Rührkessel (CSTR) kann entweder als Nachgärer über den Überlauf des liegenden Fermenters oder über ein Fallrohr mit frischem Substrat gespeist werden. Auch dieser Reaktor ist beheizbar und verfügt über Gasfassung und Möglichkeit zur Probennahme. Beide Reaktoren verfügen über zwei konduktive Füllstandssensoren (minimaler und maximaler Füllstand) und Ausgleichsbeuteln, mit deren Hilfe durch etwaige Füllstandsschwankungen (z.B. bei Probenahme) hervorgerufenen Druckdifferenzen ausgeglichen werden können. Außerdem ist der Gasraum der jeweiligen Reaktoren derart mit einer Wasservorlage verbunden, dass unplanmäßig entstehender Druck im Fermenter (beispielsweise durch eine Verstopfung des Gasauslasses) darüber abgeschlagen wird. Der für das Anspringen der Überdrucksicherung nötige Gegendruck wird durch den Füllstand der Wasservorlage bzw. die Eintauchtiefe des Rohres geregelt und lag in der Regel bei etwa 20 cm Wassersäule (entspricht 20 mbar).

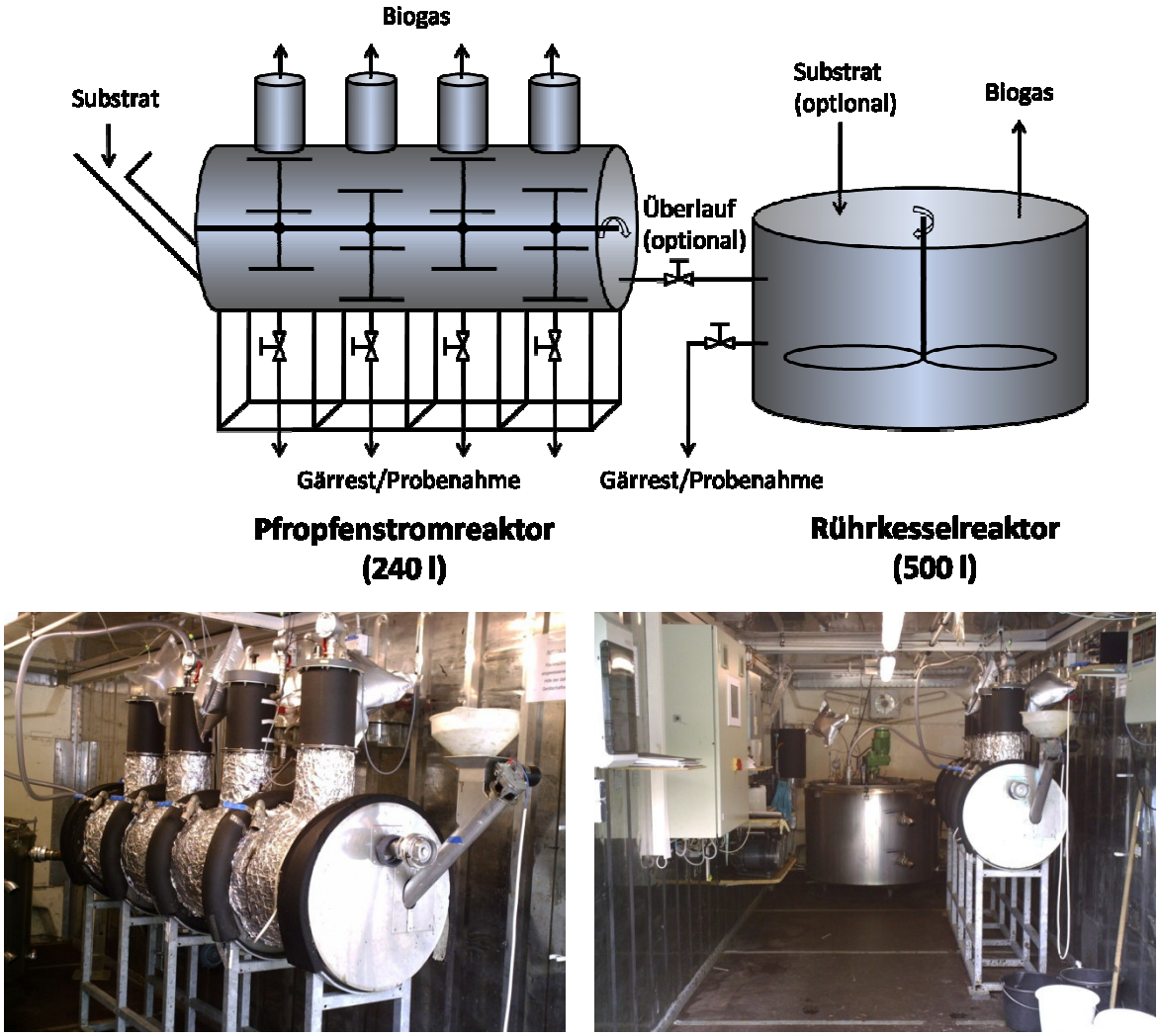


Abbildung 4: Schematische Darstellung und Foto der Container-Anlage

II.2.1.2. Schlaufenreaktoren

Eine Sonderform des voll durchmischten Reaktors stellt der Schlaufenreaktor dar. Diese Fermenterart zeichnet sich durch ihre schlanke, hohe Bauform (Höhe:Durchmesser-Verhältnis 5:1 und größer) aus. In den Reaktor ist ein zweites Rohr derart eingelassen, dass sich zwei abgetrennte Strömungsbereiche in Form eines äußeren Hohlzylinders und eines inneren Zylinders ergeben, die lediglich im unteren und im oberen Teil des Reaktors miteinander kommunizieren. Durch die gegenläufige Strömungsrichtung in den beiden Bereichen ergibt sich die für die Bezeichnung maßgebliche schlaufenartige Strömung (siehe Abbildung 5).

Diese aus der chemischen Reaktionstechnik stammende Bauart (Räbiger und Vogelpohl, 1983) wird bereits zur Vergärung von Gülle bzw. Bioabfällen eingesetzt (Dornack, 2001), wobei die Durchmischung durch die Einpressung von erzeugtem Biogas am Boden erreicht

wird (Mammutpumpeneffekt). Bei der Vergärung von Substraten mit hohem Feststoffanteil wird jedoch häufig von Schwimmschichtenbildung berichtet (z.B. in Koller (2004)). Dieser Flotationseffekt, bei dem sich kleine Gasbläschen am Material anlagern und es dadurch zum Aufstieg zwingen, führt zur unerwünschten Phasentrennung, die durch die Einpressung des Biogases noch verstärkt wird. Den sich in der flüssigen Phase befindlichen Mikroorganismen wird dadurch das Substrat entzogen und der Abbauprozess gerät ins Stocken. Ganz abgesehen von den negativen Effekten der Schaumbildung auf die Prozesstechnik, wie Verstopfung von Gasleitungen oder frühzeitiges Auslösen von Füllstandswächtern.

In Anbetracht der insbesondere für Grassilage typischen Schwimmschichtenbildung wurde die Umwälzung des Substrates statt mit Hilfe des Gasliftes mit einer in den Gasraum hineinreichenden Schnecke bewerkstelligt. Dadurch werden die flotierten Stoffe derart agitiert, dass durch die Bewegung Gas ausgestrippt und die Stoffe wieder in den Abwärtsstrom gezwungen werden. Entsprechend der Rohrdurchmesser stellt sich ein turbulenter Abwärtsstrom im inneren Rohr und schließlich ein gemächlicher Aufwärtsstrom im äußeren Ring ein. Eine technische Zeichnung der entworfenen Schlaufenreaktoren ist in Koch (2010) zu finden. Inwiefern die verminderte Schwimmschichtenbildung durch die gezielte Agitation den höheren apparativen Aufwand gegenüber dem klassischen Rührkessel rechtfertigt, wird in den folgenden Versuchen geklärt werden (Koch et al., 2008a).

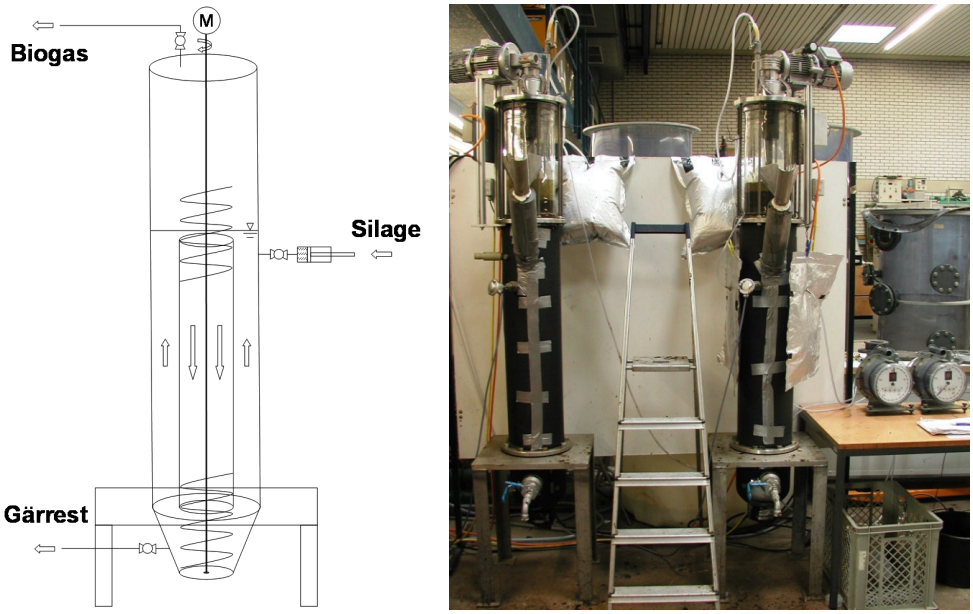


Abbildung 5: Schematische Darstellung und Foto der Schlaufenreaktoren

II.2.2. Mess- und Regeltechnik

Die Container-Anlage verfügte über eine computergesteuerte Regelung, die von der Fa. Awite (Langenbach, Deutschland) installiert und gewartet wurde. Die Steuerung umfasste den Betrieb der Rührorgane, die über Temperatursensoren rückgekoppelte Beheizung der Fermenter sowie die voll automatische Gasmengenerfassung und Zusammensetzungsbestimmung - lediglich die Fütterung und die Probenahme erfolgte manuell. Anfallendes Biogas wurde zunächst durch einen Kondensatabscheider (Fa. AGT Thermotechnik, Erkelenz, Deutschland) auf 0°C gekühlt, danach durch Trommelgaszähler TG05 der Fa. Ritter (Bochum, Deutschland) mengenmäßig erfasst und anschließend über eine Messstellenumschaltung gemäß der Vorgaben der SPS in einem Gasbeutel bis zur Analyse gesammelt. Das Gasanalysensystem wurde mitsamt den dazugehörigen Messkanälen für Methan, Kohlendioxid, Sauerstoff, Wasserstoff und Schwefelwasserstoff ebenfalls von der Fa. Awite zur Verfügung gestellt. Die quantitative Erfassung der Komponenten erfolgte mit einem Zweikanal-Infrarot-Sensor (CH_4 und CO_2) sowie mittels elektrochemischer Sensoren (O_2, H_2, H_2S). Sämtliche Messwerte wurden mit einem Datenlogger in Bibliotheken abgelegt und konnten über einen ftp-Server direkt abgefragt werden.
Die Rührorgane und die rückgekoppelte Beheizung der Schlaufenreaktoren wurden über einen einfachen Schaltschrank gesteuert. Anfallendes Biogas wurde hier ebenfalls über Trommelgaszähler des Typs TG05 der Fa. Ritter mengenmäßig erfasst und anschließend einmal täglich über eine separate Messstelle für Laborbeutel vom Gasanalysensystem im Container hinsichtlich der Zusammensetzung analysiert.

II.2.3. Probenahme und Analytik

Um qualitative und quantitative Aussagen zum Verlauf der Gärprozesse treffen zu können, müssen regelmäßig repräsentative Proben genommen werden und nach einheitlichen Vorgaben analysiert werden. Für die Probenahme galt der in Tabelle 6 dargestellte Probenahmeplan.

Tabelle 6: Probenahmeplan

Probenbezeichnung	Häufigkeit	untersuchte Parameter
Gras-/Maissilage	bei neuen Chargen	TS, oTS, pH-Wert, organ. Säuren*, TKN, NH_4-N, CSB, TC, TOC sowie erweiterte Weenderanalyse
Gärrest PFR/CSTR	gerade Woche ungerade Woche	TS, oTS, pH-Wert, FOS/TAC, organ. Säuren* zusätzlich noch TKN, NH_4-N, CSB
Gärrest Schlaufe L/R	ungerade Woche	TS, oTS, pH-Wert, FOS/TAC, organ. Säuren*, TKN, NH_4-N, CSB
Biogas PFR/CSTR	mehrmals täglich	CH_4, CO_2, O_2, H_2, H_2S
Biogas Schlaufe L/R	wochentags täglich	CH_4, CO_2, O_2, H_2, H_2S

* umfasst Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure und Hexansäure

Aus Kostengründen wurde bei der Gärrestanalyse der Containerkaskade dazu übergegangen, Parameter, die nur über größere Zeiträume schwanken, lediglich alle zwei Wochen zu messen. Die Bestimmung grundlegender Parameter, wie etwa des Gehaltes an organischen Säuren oder des FOS/TACs erfolgte selbstverständlich wöchentlich. Beim FOS/TAC handelt es sich um ein weit verbreitetes Stabilitätskriterium zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit anaerober Biozönosen, wo mit Hilfe einer einfachen Titration ein Quotient aus dem Gehalt an flüchtigen organischen Säuren (FOS) und der Pufferkapazität (TAC) gebildet wird. Berechnungsformel und weiterführende Interpretationen sind beispielsweise in Ohly (2006) oder Voß et al. (2009) zu finden. Die jeweiligen, den Analysen zugrundegelegten Vorschriften des Deutschen Einheitsverfahrens zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV) sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Komponenten des Biogases wurden regelmäßig über die beschriebene Gasanalyse-Einheit überwacht.

Tabelle 7: Analysenverfahren der ermittelten Parameter

Parameter	Analysenverfahren
TS	DIN 38 414-S2
oTS	DIN 38 409-H1
pH-Wert	DIN 38 404-C5
organ. Säuren*	DIN 38 414-S19 (GC/FID)
FOS/TAC	gemäß FNR (2005)
TKN	DIN 38 409-H12
NH_4-N	DIN 38 409-H11
CSB	DIN 38 414-S9
TC, TOC	Elementaranalytisch
RP, RL, RF, NDF, ADF, ADL	gemäß Naumann und Bassler (1993)
Lithium*	mittels Atomabsorptionsspektrometrie

* diente als Tracer

Wie bereits erwähnt, lag ein Ziel der Untersuchungen darin, das ursprünglich für die Abwasserreinigung konzipierte Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) auf lignocellulosehaltige Substrate anzupassen. Der verwendete Ansatz zur Charakterisierung der Silagen folgt dabei einem aus der Futtermittelanalyse bekannten Verfahren. Bei der analytischen Rohfaserbestimmung stellt die sogenannte Weender Futtermittelanalyse - beschrieben in Naumann und Bassler (1993) - einen Kompromiss zwischen analytischer Gründlichkeit und Zweckmäßigkeit dar. Diese über 100 Jahre alte Analysetechnik wurde von Henneberg und Strohmann Ende des 19. Jahrhunderts in Weende bei Göttingen erarbeitet. Analytisch werden die Trockensubstanz (TS), die Rohasche (TS-oTS), die Rohfaser (RF), das Rohprotein (RP) und das Rohfett (RL) bestimmt. Die Fraktion der stickstofffreien Extraktstoffe (NfE) wird rechnerisch ermittelt. Aus der Bestrebung heraus, die Kohlenhydratanalytik weiterzuentwickeln, hat van Soest (1967) die Detergenzienmethode entwickelt, wobei neben den genannten Fraktionen auch der Anteil an Säure-Detergentienfaser (Acid detergent fiber, ADF), Säure-Detergentienlignin (Acid detergent lignin, ADL) und Neutral Detergentienfaser (Neutral detergent fiber, NDF) bestimmt wird. Diese erweiterte Weenderanalyse nach van Soest (Abbildung 6) ermöglicht die Aufteilung der Rohfaserfraktion in die Bestandteile Stärke (RF+NfE-NDF), Cellulose (ADF-ADL), Hemicellulose (NDF-ADF) und Lignin (ADL), deren Unterscheidung in der Anaerobtechnik aufgrund der unterschiedlichen Abbaubarkeit wichtig ist.

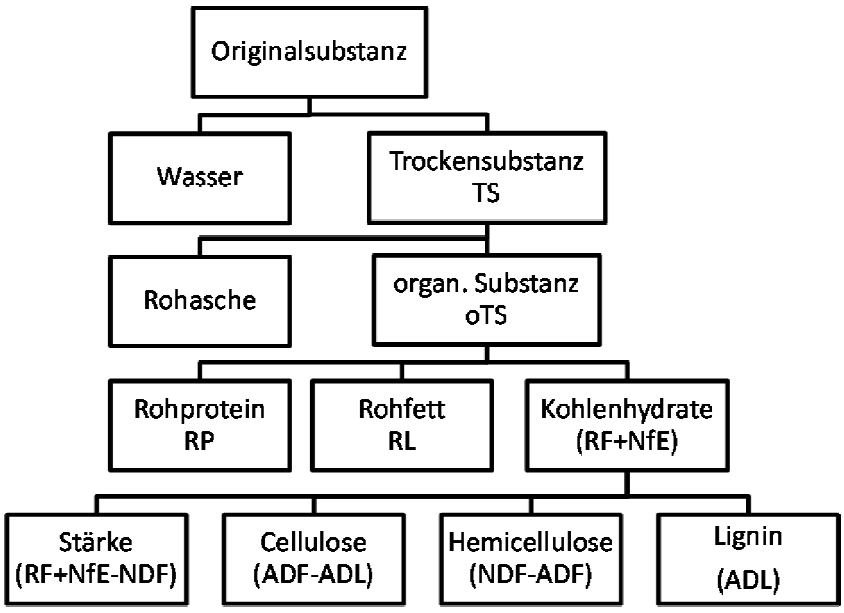


Abbildung 6: Bestimmung der Zusammensetzung von Substraten gemäß erweiterter Weenderanalyse nach van Soest

II.2.4. Berechnungen

Alle angegebenen Gasvolumina sind auf trockenes Gas bezogen und auf 0 °C und 101,325 kPa standardisiert. Biogas- und Methanerträge sind in m³ pro kg zugeführter organischer Trockensubstanz (oTS) angegeben, wobei die daran gekoppelte Raumbelastung durch die Gegenüberstellung von täglicher Zugabemenge (kg oTS pro Tag) und Reaktorarbeitsvolumen (m³) errechnet wird.

Der Abbaugrad bezüglich des CSBs wurde auf Basis folgender Formel ermittelt, die der Effektivität des Prozesses durch eine Gegenüberstellung von abgebautem zu zugegebenem CSB gleichkommt:

$$\text{Abbaugrad}_{CSB} = \frac{CSB_{abgebaut}}{CSB_{Substrat}} = \frac{CSB_{Substrat} - CSB_{Gärrest}}{CSB_{Substrat}} \quad \textbf{(4)}$$

$CSB_{Substrat}$ CSB des Substrates [g_{CSB}/kg]

$CSB_{Gärrest}$ CSB des Gärrestes [g_{CSB}/kg]

Die Berechnung des Abbaugrades auf oTS-Basis ist allerdings gängiger, da dieser Parameter im Gegensatz zum CSB in der Regel häufiger erfasst wird. Problematisch an der Bilanzierung ist hingegen die Tatsache, dass sich nicht nur der oTS sondern auch der TS als Bezugsgröße während des Abbaus verändert. Der Sachverhalt wird anhand eines einfachen Beispiels verdeutlicht:

Es soll der Abbaugrad eines Prozesses ermittelt werden, der durch einen oTS im Zulauf oTS_{Input} = 90 % (bzw. 90 g_{oTS}/g_{TS}) und einen oTS im Gärrest oTS_{Output} = 75 % (bzw. 75 g_{oTS}/g_{TS}) charakterisiert wird.

100 g TS als Input enthalten 90 g oTS und 10 g Asche bzw. anorganische Trockensubstanz (aTS). Während der Vergärung wird ein Teil des oTS abgebaut. Damit eine Bilanzierung überhaupt möglich ist, wird angenommen, dass aTS weder abgebaut noch gebildet wird und diese Größe damit als konstant angesehen. Somit bilden nach erfolgtem oTS-Abbau die 10 g aTS 25 % (100 % - 75 %) des gesamten noch vorhandenen TS. Wenn 10 g 25 % sind, dann sind 100 % 40 g. Folglich wurden von den anfänglichen 100 g TS 60 g umgesetzt. Nun kann der Abbaugrad errechnet werden:

$$\text{Abbaugrad}_{oTS} = \frac{\text{Input} - \text{Output}}{\text{Input}} = \frac{0{,}90 \cdot 100\text{g} - 0{,}75 \cdot 40\text{g}}{0{,}90 \cdot 100\text{g}} = \frac{90\text{g} - 30\text{g}}{90\text{g}} = 67\% \quad (5)$$

Ausgehend von den Zahlenwerten kann eine allgemeingültige Formel hergeleitet werden:

$$\text{Abbaugrad}_{oTS} = \frac{0{,}90 \cdot 100\text{g} - 0{,}75 \cdot 40\text{g}}{0{,}90 \cdot 100\text{g}} = \frac{0{,}90 \cdot 100\text{g} - 0{,}75 \cdot \frac{10\text{g}}{0{,}25}}{0{,}90 \cdot 100\text{g}} = 1 - \frac{0{,}75 \cdot 10\text{g}}{0{,}25 \cdot 0{,}90 \cdot 100\text{g}} = 1 - \frac{0{,}75 \cdot 0{,}10}{0{,}25 \cdot 0{,}90} \quad (6)$$

Unter der Annahme, dass die Menge an anorganischer Substanz während der Vergärung konstant ist, kann der Abbaugrad eines beliebigen Prozesses mit der folgenden Formel berechnet werden:

$$\text{Abbaugrad}_{oTS} = 1 - \frac{oTS_{Output} \cdot (1 - oTS_{Input})}{(1 - oTS_{Output}) \cdot oTS_{Input}} \quad (7)$$

oTS_{Input} oTS-Gehalt des Inputs [% bzw. g_{oTS}/g_{TS}]

oTS_{Output} oTS-Gehalt der Outputs [% bzw. g_{oTS}/g_{TS}]

II.2.5. Charakterisierung der eingesetzten Substrate

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden alle Reaktoren mit ausgewähltem Inokulum angeimpft, um das Vorhandsein einer leistungsfähigen Biozönose zu gewährleisten. Bei der Auswahl des Impfmaterials wurde darauf geachtet, dass die jeweilige Anlage unter möglichst gleichen Bedingungen betrieben wird und möglichst ähnliche Substrate verwendet. Die beiden Reaktoren des Containers wurden mit Gärrest der Biogasanlage Pliening, die beiden Schlaufenreaktoren mit Gärrest der Biogasanlage Schmiechen angeimpft. Eine Zusammenstellung grundlegender Parameter zur Charakterisierung der Inokula ist Tabelle 8 zu entnehmen. Verwendete Abkürzungen sind im Text und im Abkürzungsverzeichnis erklärt.

Tabelle 8: Charakterisierung der verwendeten Inokula

Parameter	Einheit	BGA Pliening	BGA Schmiechen
TS	%	8,3	14,6
oTS	% TS	69,3	77,4
pH-Wert	-	7,9	7,9
∑ FOS	g/kg	0,2	7,4
FOS/TAC	-	n.g.	0,6
TKN	g/kg	5,1	7,7
NH_4-N	g/kg	3,0	4,0
CSB	g/kg	71	149
TC	% TS	36,6	41,9
TOC	% TS	34,3	38,3

n.g. nicht gemessen

Die verwendeten Silagen (vgl. Abbildung 7) wurden von der Biogasanlage Eggertshofen (Freising) zu Verfügung gestellt. Die Maissilage bestand aus gehäckselten Mais-Ganzpflanzen, die in einem Fahrsilo einsiliert wurden. Die Grassilage bestand aus gehäckseltem Kleegras, das als Haufwerk unter mehreren Folien zum Luftabschluss einsiliert wurde.

Abbildung 7: Frisch angeschnittene Mais- bzw. Grassilage

Da sich die Versuche über einen Zeitraum von zweieinhalb Jahren erstreckten und je nach Raumbelastung durchschnittlich etwa zwei Kilogramm Silage täglich verbraucht wurden, war es nicht möglich den gesamten Bedarf aus einer Charge zu decken. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass nur eine minimale Anzahl unterschiedlicher Chargen zu Einsatz kommt. Jede Charge wurde vor Ort homogenisiert, entsprechend repräsentativ beprobt, anschließend portionsweise verpackt und bis zum Bedarf in Tiefkühlzellen bei -20°C gelagert. Trotz unterschiedlicher Zeitpunkte der Beschaffung des Substrates zeigte sich in den Analysen, dass nur mäßige Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen bestehen. Tabelle 9 ist die durchschnittliche Charakterisierung der Silagen zu entnehmen.

Tabelle 9: Charakterisierung der verwendeten Silagen

Parameter	Einheit	Maissilage	Grassilage
TS	%	36,8	50,0
oTS	% TS	97,5	90,4
pH-Wert	-	3,9	4,1
∑ FOS	g/kg	5,3	4,4
TKN	g/kg	4,8	4,1
NH_4-N	g/kg	0,8	1,0
CSB	g/kg	460	605
TC	% TS	45,7	45,9
TOC	% TS	43,9	45,5

n.g. nicht gemessen

Tabelle 10 zeigt die durchschnittliche Zusammensetzung der verwendeten Mais- und Grassilage nach Weender und van Soest. Der geringe Wassergehalt der Grassilage ist der Tatsache geschuldet, dass es sich um angedörrte Silage handelt.

Tabelle 10: Charakterisierung der verwendeten Silagen nach Weender und van Soest

Parameter	Einheit	Maissilage	Grassilage
TS	%	36,8	50,6
oTS	% TS	97,5	91,2
Rohprotein RP	% TS	8,0	17,1
Rohfaser RF	% TS	17,7	26,4
Rohfett RL	% TS	2,6	3,0
NfE*	% TS	69,2	44,7
NDF	% TS	44,0	54,0
ADF	% TS	21,9	32,3
ADL	% TS	3,2	5,3

* berechneter Wert

In Abhängigkeit des Gehaltes an organischer Trockensubstanz der aktuellen Charge, wurde jeden Morgen die entsprechende Menge an Gras- bzw. Maissilage verwogen und den Reaktoren pur oder nach Anmaischung mit Wasser (Schlaufenreaktoren) oder Gärrest (PFR, Versuchsphase mit Gärrestrückführung) zugeführt.

Aufgrund der bereits in Kapitel II.2.1.2 angesprochenen Schwimmschichtproblematik bei der Fermentation von Grassilage, wurden jene Versuche mit Hilfe der Schlaufenreaktoren durchgeführt. Während es bei den Versuchen kaum zur Ausbildung von Schwimmschichten kam und sich das System in dieser Hinsicht als gut geeignet zeigte, erwies sich dagegen die schlanke Bauform der Reaktoren insofern als nachteilig, als dass es bei der Nutzung von Grassilage in der Originalschnittlänge nach kurzer Zeit zur Verstopfung des äußeren Ringes kam. Abbildung 8 zeigt einen Blick von unten in den zugesetzten Reaktor. Der Fermenter

hatte einen Innendurchmesser von 20 cm und das innere Rohr von 10 cm, wodurch sich ein Abstand zwischen innerem und äußerem Rohr von lediglich 5 cm ergab.

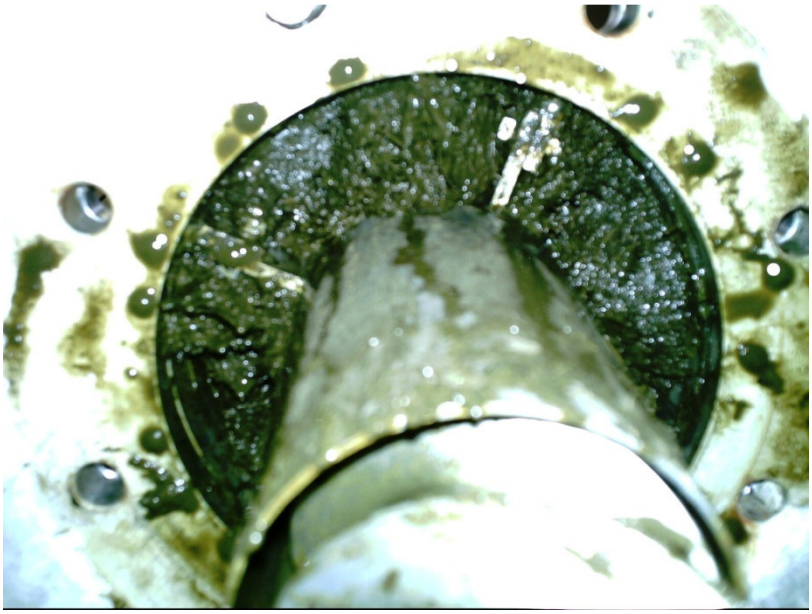


Abbildung 8: Verstopfung des äußeren Ringes bei der Nutzung von Grassilage in Originalschnittlänge

Versuche zur Zerkleinerung der Grassilage im feuchten Zustand scheiterten. Da es sich um angedörrte Silage mit einem ohnehin geringen Wassergehalt handelte, wurde das Substrat zunächst schonend bei 60 °C getrocknet und dann mit einer Schneidmühle (SM1, Fa. Retsch, Haan) auf eine maximale Schnittlänge von 6 mm zerkleinert. Vor der Zugabe wurde der Originalwassergehalt mit Leitungswasser wieder eingestellt.

Bei der Trocknung werden nicht nur Wasser, sondern auch organische Säuren sowie Alkohole verdampft, welche der Biogasproduktion nachher nicht mehr zur Verfügung stehen. Um deren relativen Einfluss auf die absolute Gasproduktion abschätzen zu können, wird angenommen, dass der in Tabelle 9 angegebene durchschnittliche Gehalt der Grassilage an flüchtigen organischen Säuren (FOS) von 4,4 g Essigsäureäquivalent pro kg Frischmasse (FM) komplett gemäß folgender Formel (Buswell und Mueller, 1952) zu Biogas (BG) umgesetzt wird (der Gehalt an Alkoholen wurde nicht bestimmt):

$$C_aH_bO_c + \left(a - \frac{b}{4} - \frac{c}{2}\right)H_2O \rightarrow \left(\frac{a}{2} + \frac{b}{8} - \frac{c}{4}\right)CH_4 + \left(\frac{a}{2} - \frac{b}{8} + \frac{c}{4}\right)CO_2 \qquad (8)$$

Das maximale Gasbildungspotenzial GBP_{max} für Essigsäure (HAc) bei 38 °C kann nun mit Hilfe der folgenden aus obiger Gleichung abgeleiteten Formel berechnet werden (Koch, 2007):

$$GBP_{max} = \frac{V_m \cdot a}{a \cdot M_C + b \cdot M_H + c \cdot M_O} = \frac{25{,}53 l_{BG} \cdot 2}{(2 \cdot 12 + 4 \cdot 1 + 2 \cdot 16) \cdot g_{HAc}} = 0{,}85 \frac{l_{BG}}{g_{HAc}} \quad (9)$$

V_m molares Volumen bei 38 °C [25,53 l/mol]

M_x Molmasse des jeweiligen Elementes [g/mol]

Mit 4,4 g_{HAc}/kg_{FM} ergibt sich ein Gasbildungspotenzial aus den organischen Säuren von 3,7 l_{BG}/kg_{FM}. Im Gegensatz dazu liefert 1 kg Frischmasse 450 g organische Trockensubstanz (Tabelle 9), die wiederum etwa 500 l Biogas pro kg oTS liefert (FNR, 2006), was einem mittleren Gasertrag von 230 l_{BG}/kg_{FM} entspricht. Der Einfluss der bereits in der Grassilage enthaltenen Fettsäuren kann also mit weniger als 2 % vernachlässigt werden.

Weißbach und Strubelt (2008) untersuchten diese Stoffverluste, die sich aus dem direkten Vergleich der Gehalte an Gärprodukten im Frischmaterial und im jeweiligen Trockenrückstand ergaben und bezifferten diese mit durchschnittlich 4 %. Im Grunde genommen ist deswegen auch die Angabe der spezifischen Biogaserträge in m³ Biogas pro kg oTS problematisch, da die flüchtigen Substanzen zwar einerseits zur Gasbildung beitragen, andererseits aber bei der Bestimmung des oTS nicht mit bilanziert werden.

Dieser Verlust an Alkoholen und organischen Säuren während der Trocknung kann sich möglicherweise auch auf die Prozessstabilität auswirken. Da es sich jedoch aufgrund des durch die $CO_2/HCO_3^-/H_2CO_3^{2-}$- sowie NH_3/NH_4^+-Gleichgewichte um ein sehr gut gepuffertes System handelt und folglich der pH-Wert auch bei sehr hohen Säuregehalten während der Gärung kaum abfällt, ist die oben formulierte Einflussnahme auf die Prozessstabilität wohl eher gering.

II.2.6. Simulationsmodelle

Die Reaktoren wurden als vollständig durchmischte Reaktoren (CSTR) mit variablem Zulauf abgebildet. Die Zulaufdaten wurden mittels einer Textdatei mit täglicher Auflösung eingelesen. Hinter dem Gaskonverter verbirgt sich das eigentliche Modell, welches auf Grundlage des aktuellen Zulaufes und den gewählten Parametern die Ergebnisse generiert. In

Abbildung 9 ist exemplarisch das Simulationsmodell zu Abbildung der Schlaufenreaktoren gezeigt.

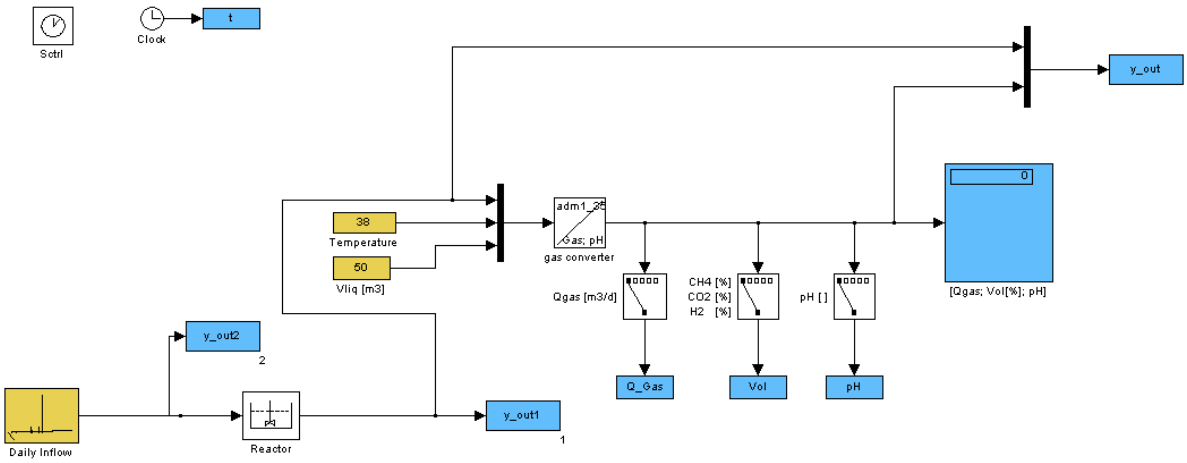


Abbildung 9: Abbildung der Schlaufenreaktoren in SIMBA 4.2 zur mesophilen Vergärung von Grassilage

Zur Beschreibung der aktuellen Prozessstabilität hat sich der bereits erwähnte FOS/TAC-Wert in der Praxis bewährt, der über die von Schoen et al. (2009) vorgeschlagenen Formeln im Modell etabliert wurde. Analytisch wird der TAC-Wert durch die Titration vom Ausgangs-pH-Wert bis 5,0 erhalten. Der auch als Alkalinität bezeichnete Wert wird überwiegend durch Bicarbonat (HCO_3^-) sowie die deprotonierten organischen Säuren Valerian- (Va), Butter- (Bu), Propion- (Pro) und Essigsäure (Ac) hervorgerufen. Andere mögliche Puffersubstanzen werden über die Ladungsbilanz von Anionen (An) und Kationen (Cat) erfasst. Das Ammonium/Ammoniak-Gleichgewicht spielt mit einem pK_S-Wert von 9,25 keine Rolle. Im Modell ist die Bezugsgröße der organischen Säuren der CSB, weshalb eine entsprechende Umrechnung in Konzentrationen notwendig ist. Durch die anschließende Multiplikation mit der Molmasse von Calciumcarbonat erhält man $CaCO_3$-Äquivalente:

$$TAC = \left(S_{An} + S_{HCO_3^-} + \frac{S_{Ac}}{64} + \frac{S_{Pro}}{112} + \frac{S_{Bu}}{160} + \frac{S_{Va}}{208} - S_{Cat} \right) \cdot 50 \qquad [g_{CaCO_3-Äq}/l] \qquad (10)$$

TAC	Alkalinität [$g_{CaCO3\text{-}Äq}$/l]
S_{An}	Anionenkonzentration [kmol/m³]
S_{HCO3-}	Hydrogencarbonatkonzentration [$kmol_C$/m³]
S_{Ac}	Acetatkonzentration [kg_{CSB}/m³]
S_{Pro}	Propionatkonzentration [kg_{CSB}/m³]
S_{Bu}	Butyratkonzentration [kg_{CSB}/m³]
S_{Va}	Valeriatkonzentration [kg_{CSB}/m³]
S_{Cat}	Kationenkonzentration [kmol/m³]

Der FOS-Wert wird bei der anschließenden Titration von 5,0 bis 4,4 ermittelt und beinhaltet die Summe der organischen Säuren in ihrer protonierten Form. Durch die Division durch den eigenen CSB und anschließende Multiplikation mit der Molmasse von Essigsäure erhält man HAc-Äquivalente:

$$FOS = \left(\frac{S_{HAc}}{64} + \frac{S_{HPro}}{112} + \frac{S_{HBu}}{160} + \frac{S_{HVa}}{208} \right) \cdot 60 \qquad [g_{HAc-Äq}/l] \qquad (11)$$

FOS	Flüchtige organische Säuren [$g_{HAc\text{-}Äq}$/l]
S_{HAc}	Essigsäurenkonzentration [kg_{CSB}/m³]
S_{HPro}	Propionsäurenkonzentration [kg_{CSB}/m³]
S_{HBu}	Buttersäurenkonzentration [kg_{CSB}/m³]
S_{HVa}	Valeriansäurenkonzentration [kg_{CSB}/m³]

Mit Hilfe der beiden Formeln ist es möglich, aus den Simulationsergebnissen den entsprechenden FOS/TAC-Wert zu ermitteln und mit den gemessenen Werten zu vergleichen. Damit kann die im Gegensatz zu den organischen Säuren einfache und schnelle Bestimmung des FOS/TAC der Modellkalibrierung dienen.

II.3. Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel sind die im Verlauf des Vorhabens erzielten Ergebnisse zusammengefasst. Die Darstellung ist derart strukturiert, dass zunächst die verfahrenstechnischen Erkenntnisse aus den Versuchen vorgestellt werden. Im Anschluss daran wird auf das Vorgehen bei der Erstellung und Kalibrierung der Simulationsmodelle eingegangen, deren Basis die ermittelten Messwerte bildet. Anhand eines Vergleichs zwischen gemessenen und simulierten Werten erfolgt die Beurteilung der Anwendbarkeit der mathematischen Modellierung. Abschließend werden Benchmarks (Leistungswerte, die unter äquivalenten Bedingungen erreicht werden können) für die Biogaserzeugung aus Mais- und Grassilage festgelegt und beide Substrate einer Ökobilanzierung unterzogen.

II.3.1. Verfahrenstechnische Erkenntnisse der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen

Im Rahmen des Projektes wurden Versuche zur Vergärung von Mais-, Grassilage und deren Mischungen durchgeführt. Da es sich um einen komplexen mikrobiologischen Prozess handelt, ist eine intensive Betreuung der Reaktoren bei Raumbelastungssteigerungen und Substratwechsel unbedingt erforderlich. Um innerhalb der Projektlaufzeit möglichst viele Daten erheben zu können, wurden die beiden in Kapitel II.2.1 beschriebenen Systeme Container-Anlage und Schlaufenreaktoren parallel betrieben. Auf die ursprünglich geplante Versuchsdurchführung mit Gärrestrückführung in der Containerkaskade wurde aufgrund der Erkenntnisse mit der mesophilen Vergärung von Maissilage bei allen weiteren Versuchen verzichtet. Mit Hilfe von Messungen und anhand einer Computersimulation konnte nämlich gezeigt werden, dass sich im liegenden Fermenter wider Erwarten kein Pfropfenstrom ausbildet und folglich die Inokulierung mit Bakterienmasse aufgrund der Rückvermischung nicht notwendig ist.

II.3.1.1. Container-Anlage

Die Container-Anlage bestand neben dem volldurchmischten Reaktor (CSTR) aus einem liegenden Fermenter, in dem sich ein Pfropfenstrom ausbilden kann, da der Stofftransport nur aufgrund der Substratzugabe auf der einen Seite und Gärrestentnahme auf der anderen Seite ergibt. Die in Abbildung 10 dargestellten, installierten Rührorgane sollten lediglich eine Durchmischung in der Ebene orthogonal zur Strömungsrichtung (parallel zur Rührwelle)

bewirken und dadurch eine etwaige Schichtung im Fermenter vermeiden, den Gasaustrag verbessern sowie die Temperatur vergleichmäßigen.

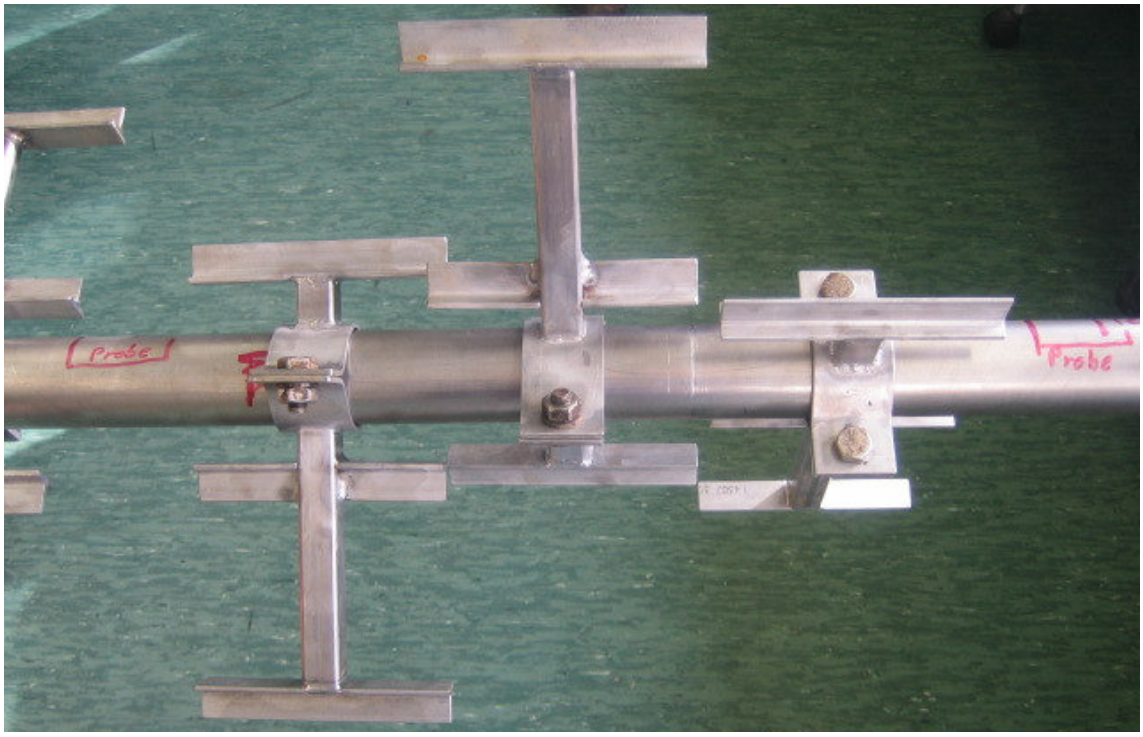


Abbildung 10: Detailaufnahme des Rührwerks des liegenden Fermenters der Container-Anlage

Die Frage inwiefern sich im Reaktor ein Pfropfenstrom ausbildet, ist sowohl für die Betriebsweise als auch für die Simulation von entscheidender Bedeutung. Nur wenn es innerhalb des Reaktors zu keiner Rückvermischung kommt, ist ein Anmaischen des frischen Substrates mit ausgefaultem Material zur Inokulation (Gärrestrückführung) notwendig. Ferner sollte eine sinnvolle Einteilung in einzelne Kompartimente für das ADM1 gefunden werden, da die Modellimplementierung in SIMBA auf volldurchmischte Reaktoren bezogen ist. Ein Pfropfenstromreaktor wird dann als Kette mehrerer vollständig durchmischter Reaktoren abgebildet, wobei der jeweilige Ablauf den Zulauf des nächsten darstellt.

Erste Messungen von sowohl Biogasmenge und -zusammensetzung als auch chemischer Parameter zeigten, dass sich offenbar kein vollständiger Pfropfenstrom ausbildet, da die Unterschiede der Ergebnisse der einzelnen Gasdome bzw. Probenahmestelle längs der Strömungsachse auffallend gering waren. Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung des liegenden Fermenters mit den jeweiligen Probenahmestellen, die eine Beprobung sowohl im oberen als auch im unteren Bereich ermöglichten.

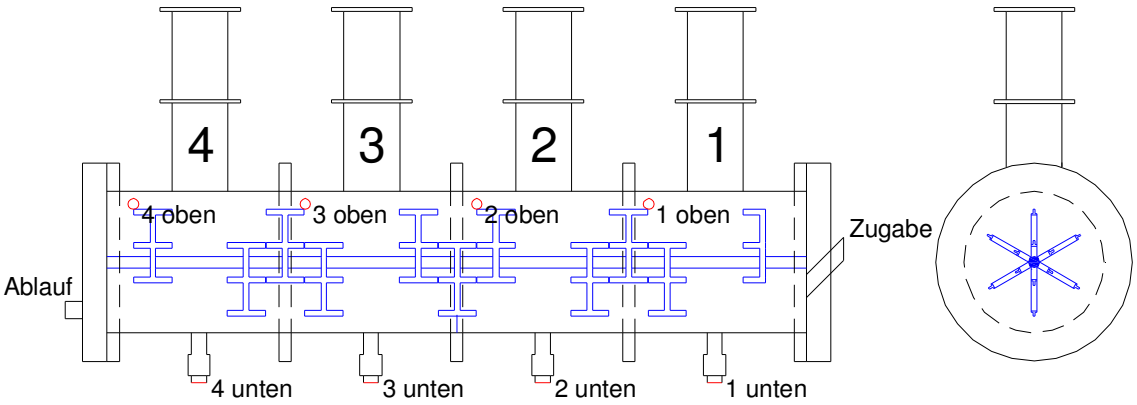


Abbildung 11: Schematische Darstellung des liegenden Fermenters der Container-Anlage mit Probenahmestellen

Anhand umfangreicher Dichte- und Viskositätsmessungen sowie mittels Tracerversuche wurde ein Modell der numerischen Strömungsmechanik (Computational Fluid Dynamics, CFD) erstellt und kalibriert (Klauke, 2008). Das numerische Modell wurde entsprechend der Geometrie der Versuchsanlage aufgebaut. Für den Zulauf wurde vereinfachend von einer kontinuierlichen Substratzufuhr ausgegangen, auch wenn in der Realität nur einmal täglich gefüttert wurde. Je nach TS-Gehalt und Raumbelastung betrug das Volumen zwischen 4 und 7 Litern pro Tag, im Mittel wurde daher von einem Volumen von 5 Litern pro Tag ausgegangen. Der Ablauf zum Nachgärer wurde vereinfachend mit demselben Wert belegt, auch wenn aufgrund der Abbauvorgänge in der Realität ein geringeres Volumen in den Nachgärer abgegeben wird (vgl. Ausführungen in Kapitel II.3.2.2). Die genannten Vereinfachungen beeinflussen das Strömungsgeschehen nicht wesentlich. Die Rührerdrehzahl wurde entsprechend der Versuchsanlage mit 7 min^{-1} vorgegeben.

Da aufgrund des erforderlichen Zeitschrittes von maximal 0,1 s bis zum Erreichen eines quasistationären Zustandes ein erheblicher Rechenaufwand erforderlich ist, sollten nur eine niedrige (1,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$) und eine hohe Raumbelastung (3,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$) nachgebildet werden. Nach einiger Zeit stellte sich ein sehr ähnliches Verhalten der beiden Berechnungen heraus und die Ergebnisdarstellungen ähnelten sich sehr. Auf eine getrennte Darstellung wird aus diesem Grund verzichtet. Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse entstammen aus der Berechnung mit 3,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$. Abbildung 12 zeigt das Modell des Ist-Zustandes. Die dem Betrachter zugewandten Flächen (outer faces) sind aus Darstellungsgründen ausgeblendet.

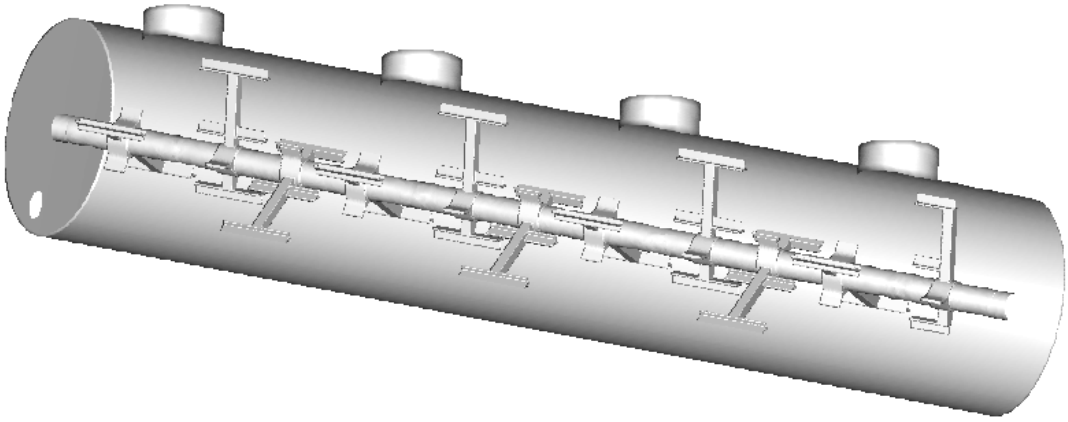


Abbildung 12: Modell des liegenden Fermenters der Container-Anlage (Ist-Zustand)

Die Vektoren in Abbildung 13 geben einen Eindruck der Strömung in einer vertikalen Ebene in Modellmitte. Zu erkennen ist nicht nur die durch das Rührwerk hervorgerufene Drehbewegung und eine gewisse Umströmung, sondern auch eine deutliche axiale Komponente zwischen den Rührelementen.

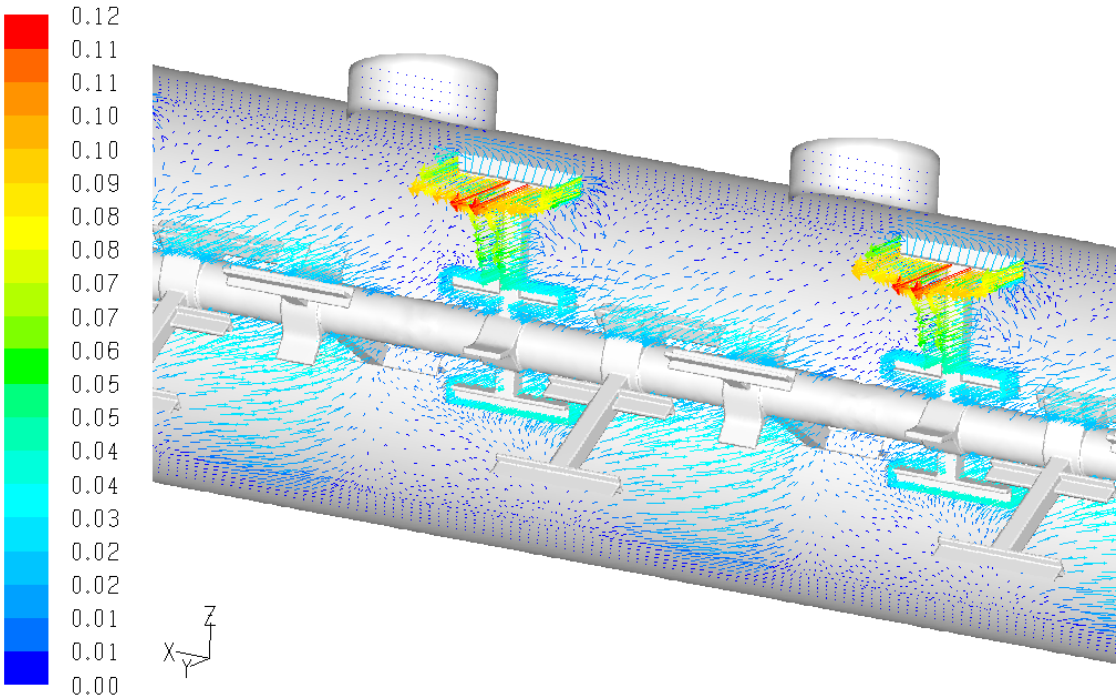


Abbildung 13: Geschwindigkeitsvektoren in einer Schnittebene in Modellmitte (Angaben in m/s, Ist-Zustand)

Offensichtlich kommt es durch die Verdrängungswirkung der um 120° versetzt angeordneten Rührelemente zu einer erzwungenen Bewegung in Richtung der Rührerachse. Die Abbildung 14 stellt die Pfadlinien ausgehend von einer (fiktiven) Ebene in Modellmitte dar. Bereits nach

wenigen Sekunden erreichen die „Flüssigkeitsteilchen“ das benachbarte Rührelement. Damit findet in axialer Richtung eine deutliche Vermischung statt.

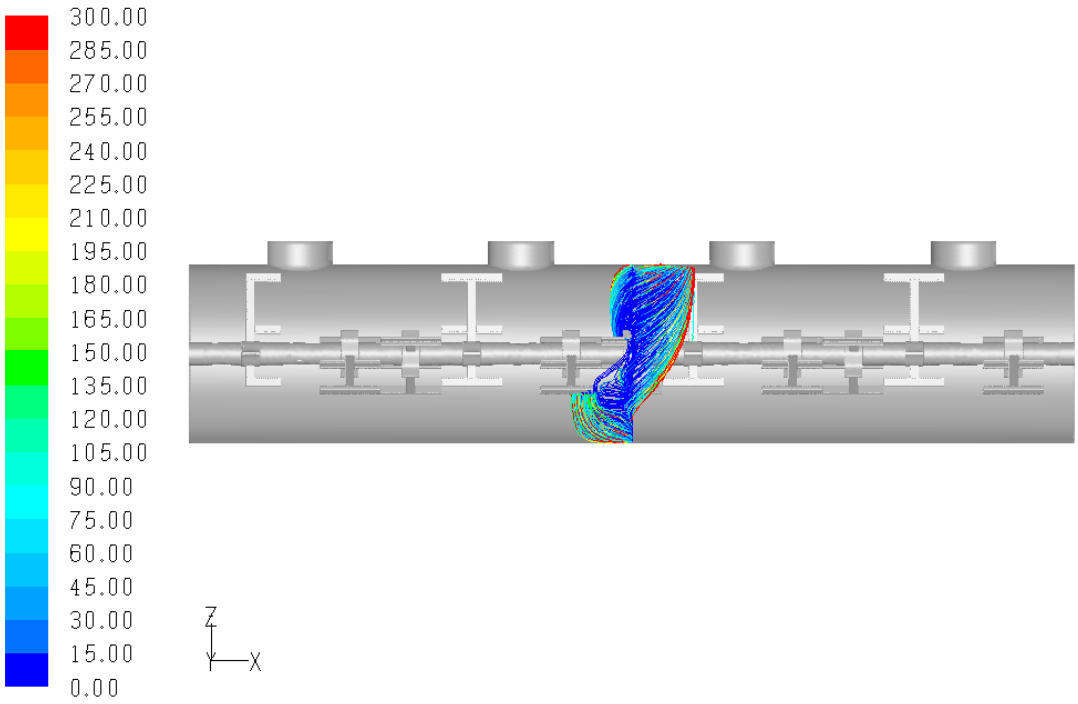


Abbildung 14: Pfadlinien von einer Schnittebene in Modellmitte ausgehend (Angaben in s, Ist-Zustand)

Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde eine Tracerberechnung durchgeführt. Da aus Gründen der Rechenzeit nicht mehrere Tage oder gar Wochen in Echtzeit abgebildet werden können, wurde, wie hier geschehen, ein quasistationäres Strömungsfeld verwendet, das die Drehbewegung sowie die Strömungsberechnung ausschaltet und den Tracer dann über die „eingefrorene“ Strömung berechnet. Dadurch konnte in diesen Untersuchungen ein Zeitraum von 30 Tagen betrachtet werden. Der Tracer wurde mit einem Wert von 100 (also 100 %) als sogenannter „Step input“ nach Levenspiel (1999) am Zulauf vorgegeben. Die Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen die Konzentration im Fermenter nach 30 Tagen.

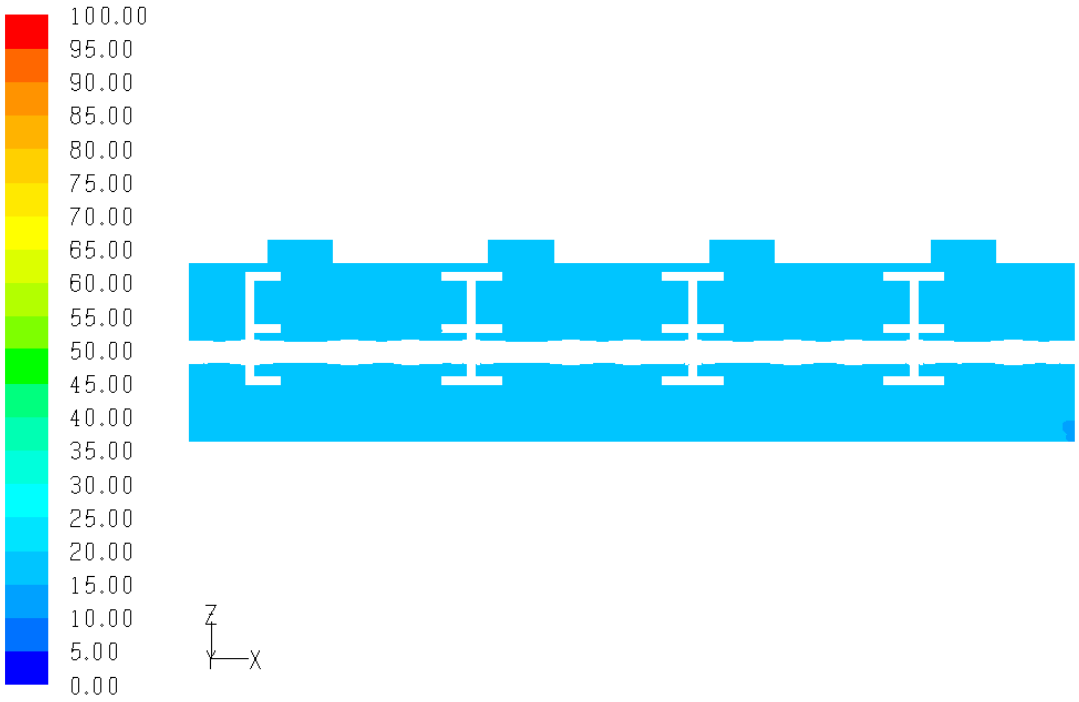


Abbildung 15: Tracerkonzentration in einer Schnittebene in Modellmitte nach 30 Tagen (Angaben in %, Ist-Zustand)

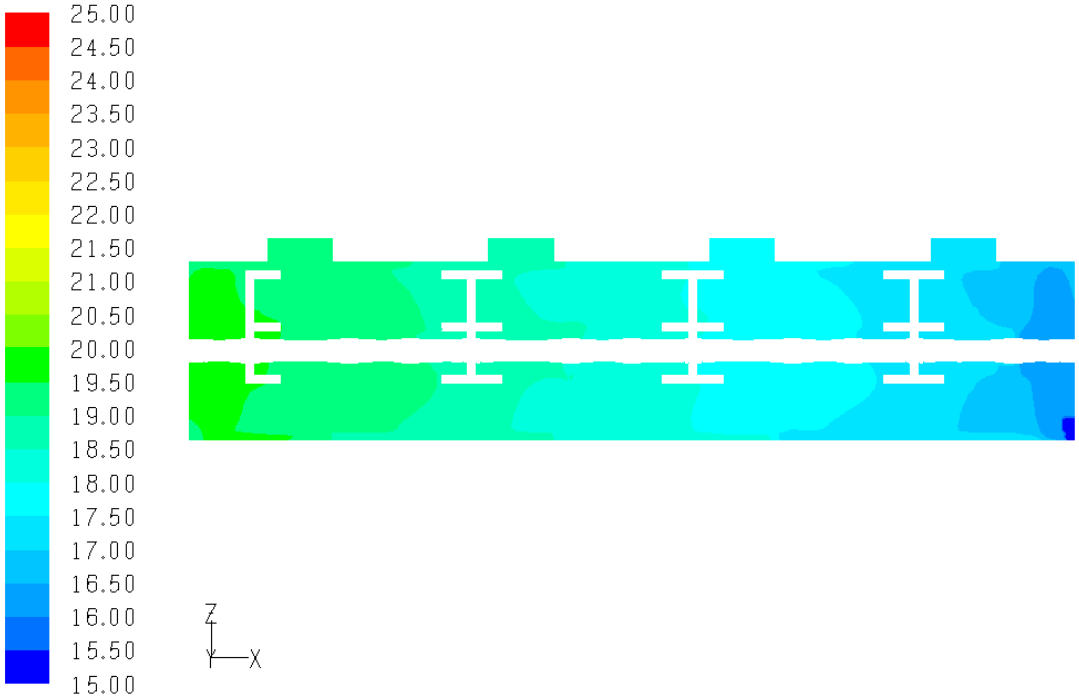


Abbildung 16: Ausschnitt der Tracerkonzentration in einer Schnittebene in Modellmitte nach 30 Tagen (Angaben in %, Ist-Zustand)

Bei einer Skalierung von 0 bis 100 % ist kaum ein Konzentrationsverlauf erkennbar (Abbildung 15), erst bei einem Bereich von 10 % (15 bis 25 %) ist ein Verlauf zu sehen (Abbildung 16). Ein ausgeprägter Pfropfenstrom ist damit nicht erkennbar.

Ähnlich fällt auch ein mit Lithiumchlorid durchgeführter Tracerversuch aus (Abbildung 17). Zu Beginn liegt die Konzentration in allen Probenahmestellen im Bereich der natürlichen Hintergrundbelastung und steigt in den beiden vorderen Kompartimenten zunächst deutlich an, während die beiden hinteren einen allmählichen Anstieg erfahren. Bereits nach 30 Stunden haben sich die Konzentrationen auf ein gleiches Niveau angenähert, weshalb auch anhand dieser Messwerte die Hypothese des Pfropfenstromes nicht länger aufrecht erhalten werden kann.

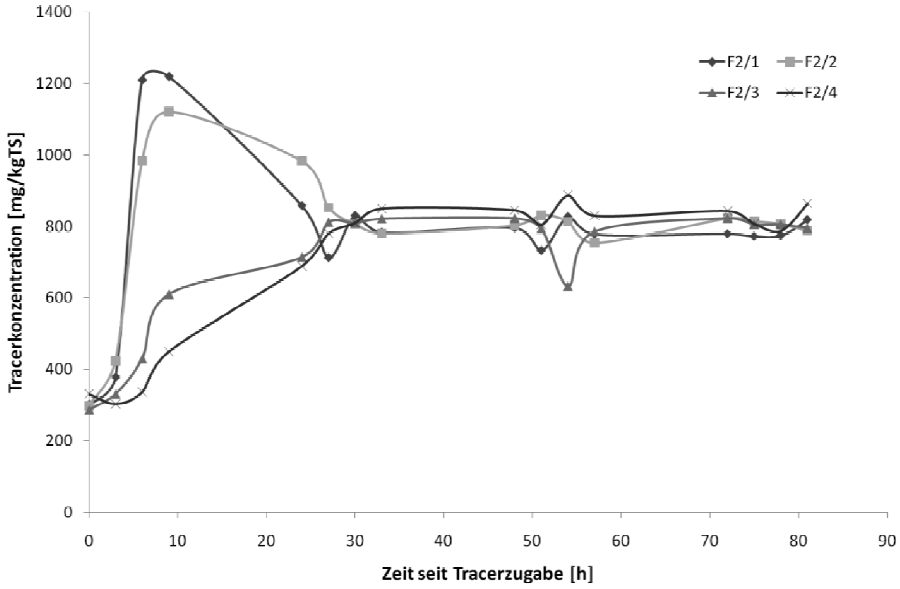


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Lithiumchloridkonzentration

Obgleich ein Eingriff in die laufenden Versuche nicht möglich war, sollte mittels des CFD-Modells eine geeignete Variante gefunden werden, die das Strömungsverhalten einem Pfropfenstrom zumindest annähert. Als Variante wurde das Modell daher derart umgebaut, dass die Querstreben entfernt wurden, beide Rührerseiten erhielten die gleiche Länge und sie wurden in einer Ebene angeordnet, um die axiale Verdrängung zu vermindern. Die Abbildung 18 zeigt das so entstandene Modell. Anzumerken ist, dass hier lediglich aus Sicht der Strömung modifiziert wurde. Eine Eignung hinsichtlich Gasaustrag oder Vermeidung von Schwimmschichten wurde nicht berücksichtigt.

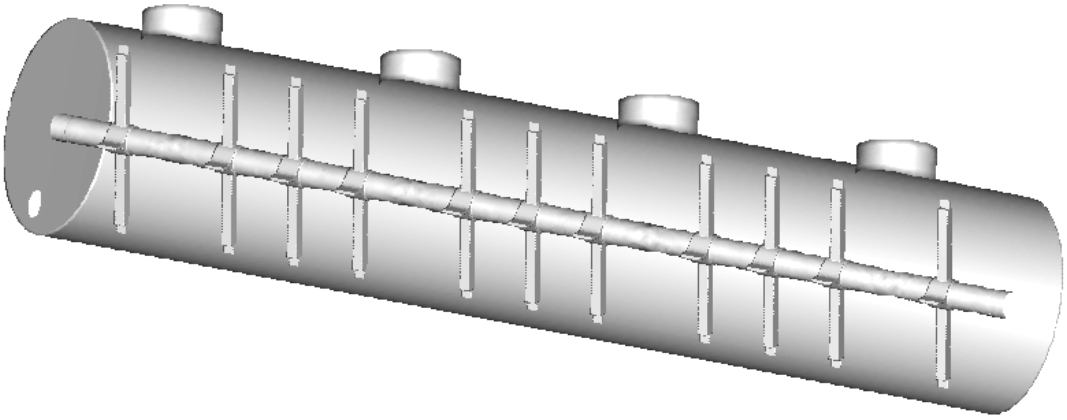


Abbildung 18: Modell des liegenden Fermenters der Container-Anlage (Variante)

Die folgenden Darstellungen zeigen in Analogie zu den Untersuchungen des Ist-Zustandes die Strömungsverhältnisse der Variante. Die Vektordarstellung in Abbildung 19 zeigt bei gleicher Skalierung deutlich geringere Geschwindigkeitskomponenten in axialer Richtung. Noch deutlicher fällt der Unterschied bei der Darstellung der Pfadlinien in Abbildung 20 auf, die betrachteten „Flüssigkeitsteilchen“ bleiben sehr nah an der Ursprungsebene.

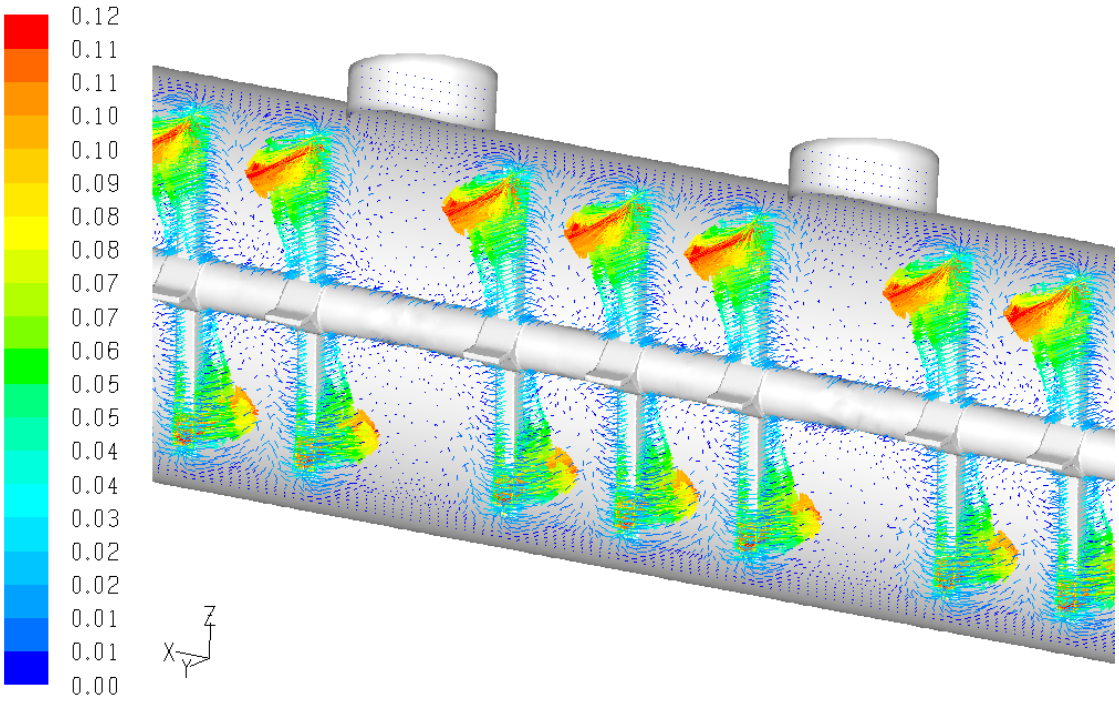


Abbildung 19: Geschwindigkeitsvektoren in einer Schnittebene in Modellmitte (Angaben in m/s, Variante)

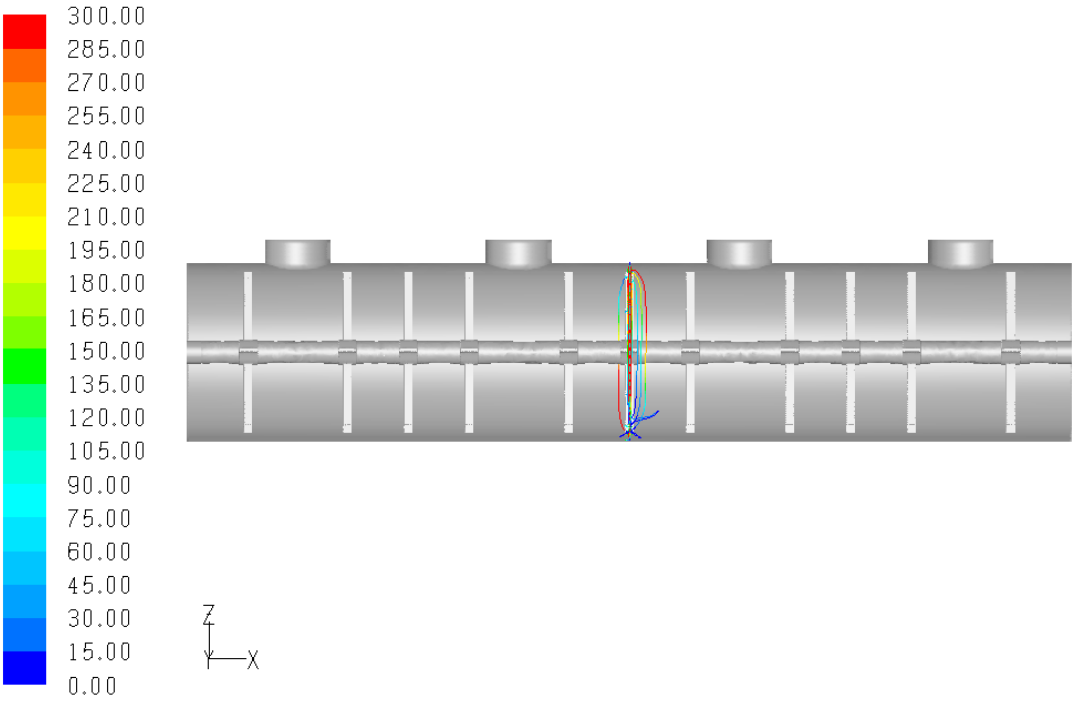


Abbildung 20: Pfadlinien von einer Schnittebene in Modellmitte ausgehend (Angaben in s, Variante)

Die Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen die Tracerkonzentration nach 30 Tagen. Dort fällt eine gegenüber dem Ist-Zustand deutlich höhere Konzentration auf.

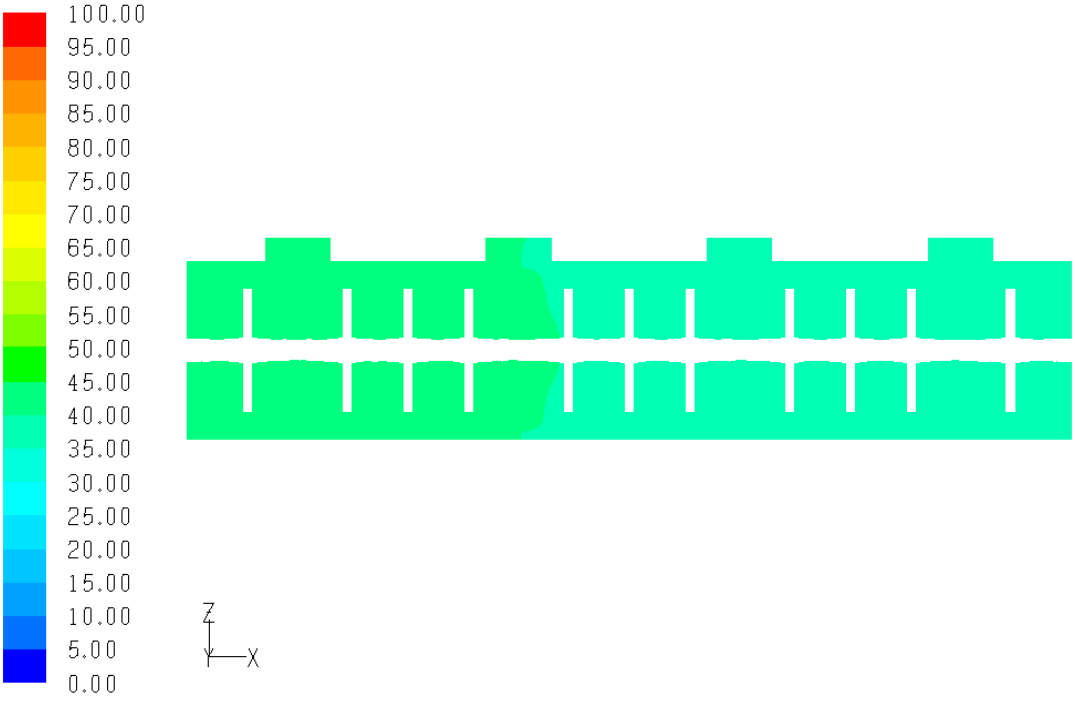


Abbildung 21: Tracerkonzentration in einer Schnittebene in Modellmitte nach 30 Tagen (Angaben in %, Variante)

Der 10 % Ausschnitt (hier bereits bei 35 bis 45 %) zeigt weiterhin einen deutlich höheren Konzentrationsgradienten. Damit nähert sich die Strömung im Fermenter einem Pfropfenstrom zumindest an.

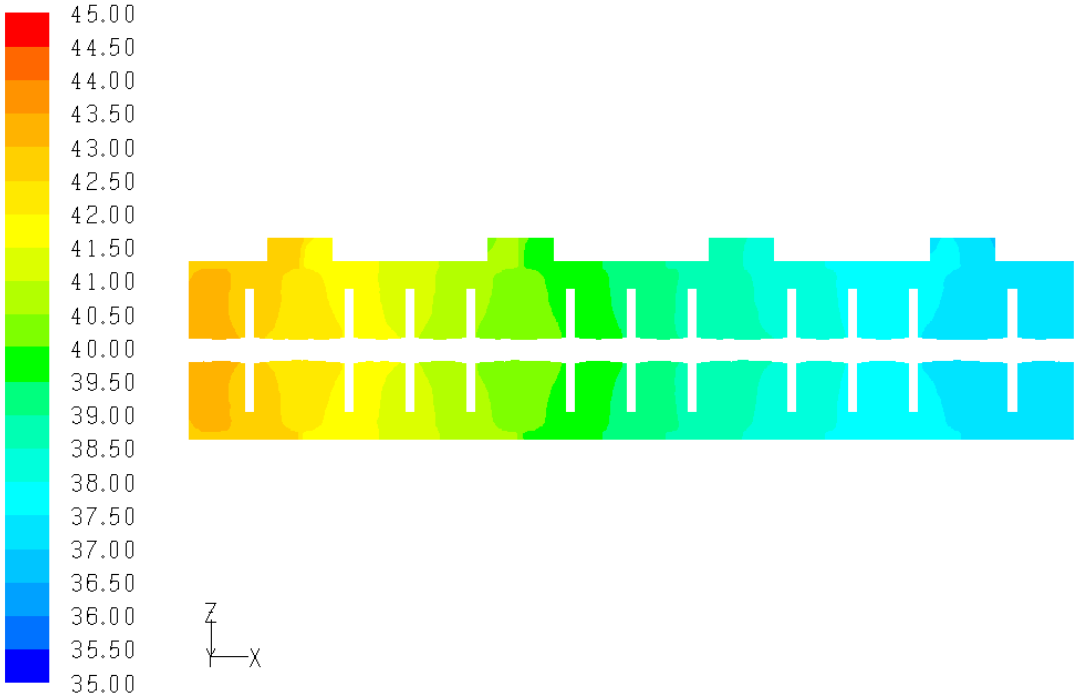


Abbildung 22: Ausschnitt der Tracerkonzentration in einer Schnittebene in Modellmitte nach 30 Tagen (Angaben in %, Variante)

Leider war es innerhalb der Projektlaufzeit nicht möglich, die Erkenntnisse zur Optimierung der Rührorgane zu nutzen und unter Praxisbedingungen zu verifizieren. Nichtsdestotrotz zeigt dieses Beispiel inwiefern die Modellierung und Simulation als ein wichtigstes Werkzeug zur Erhöhung des Verständnisses und der Optimierung bestehender Anlagen genutzt werden kann.

II.3.1.2. Schlaufenreaktoren

II.3.1.2.1. Mesophile Vergärung von Grassilage

Die Versuchsreihe zur mesophilen Vergärung (38 °C) von Grassilage wurde über einen Zeitraum von 345 Tagen als Duplikat (x Reaktor L, o Reaktor R) durchgeführt. Bis zum Tag 175 wurde die Grassilage mit dem Originalwassergehalt von 50 % (getrocknete, zerkleinerte

Silage und Wasser im Verhältnis 1:1) zugegeben. Dies führte anfangs zu einem stetigen Anstieg des Trockensubstanzgehaltes im Reaktor (vgl. Abbildung 23).

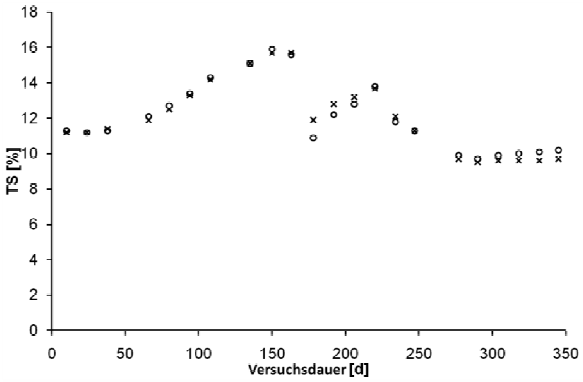


Abbildung 23: Entwicklung des TS-Gehaltes bei der mesophilen Vergärung von Grassilage

Ein zu hoher Gehalt an partikulären Stoffen wirkt sich jedoch negativ auf deren Hydrolyse und damit auf deren Umsetzung in Biogas aus (vgl. Kapitel I.4.1). In Abbildung 24 sind Biogasmenge und -zusammensetzung über den gesamten Zeitraum dargestellt. Die Raumbelastung wurde schrittweise gemäß VDI 4630 (2004) auf 3,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ gesteigert, wobei ein stabiler Betrieb bis zu einer Belastung von 3,0 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ aufrechterhalten werden konnte (Tag 210 bis 290).

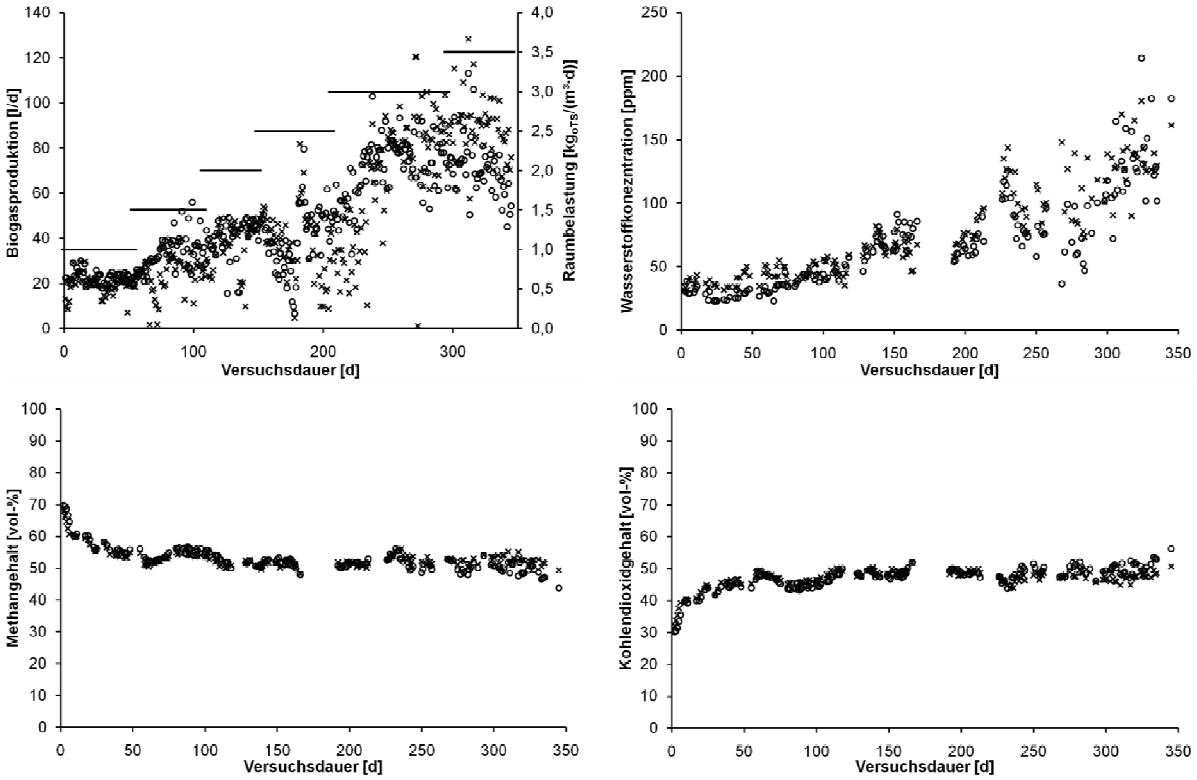


Abbildung 24: Biogasmenge und -zusammensetzung bei der mesophilen Vergärung von Grassilage

Ab Tag 145 bricht die Biogasproduktion in beiden Reaktoren deutlich ein. Auch die Fließfähigkeit des Reaktorinhaltes wurde sichtbar schlechter, wobei es teilweise zu Agglomerationen kam. An dieser Stelle ist der Schlaufenreaktor mit den beiden Zonen turbulenter und gemächlicher Strömung einem volldurchmischten Reaktor unterlegen, der bei entsprechender Rührleistung sicherlich noch weit höhere Trockensubstanzgehalte verkraftet hätte. Daneben spielt wohl vor allem der negative Einfluss partikulärer Stoffe auf die Hydrolyse eine entscheidende Rolle, die bei der Vergärung lignocellulosehaltiger Substrate als geschwindigkeitslimitierend anzusehen ist (Qu et al., 2009). Damit verbunden ist auch ein Anstieg der Ammoniumkonzentration (Abbildung 25) sowie die Akkumulation von Essigsäure (Abbildung 26), die aber eher eine Wirkung darstellen und nicht primär ursächlich sind.

Um dieser nachteiligen Entwicklung entgegenzuwirken, wurde am Tag 176 ein Teil des Reaktorinhaltes entnommen und durch Wasser ersetzt, was sich positiv auf die Gasproduktion auswirkte (Abbildung 24). Das Fütterungsverhältnis von getrockneter Grassilage zu Wasser wurde zunächst auf 1:2 eingestellt und aufgrund des neuerlich steigenden TS (Abbildung 23) ab Tag 234 auf 1:4 erhöht. Eine Erörterung der Gründe für den Anstieg des

Trockensubstanzgehaltes sowie die Kalkulation der Fütterungsverhältnisse ist Kapitel II.3.1.3 zu entnehmen.

Obgleich die beiden Reaktoren als Duplikat betrieben wurden, sind insbesondere bei der Gasproduktion Unterschiede erkennbar. Aus diesem Grund wurde, wie bereits einleitend erwähnt, auf die ursprünglich geplante unterschiedliche Betriebsweise verzichtet, da Änderungen beispielsweise in der Gasproduktion nicht eindeutig einer Ursache zugeordnet werden könnten. Der Wasserstoffgehalt verhält sich bei steigender Raumbelastung erwartungsgemäß. Methan- und Kohlendioxidgehalt pendelten sich nach einer anfänglichen Startphase bei etwa 52 % bzw. 47 % ein.

Wie aus Abbildung 25 hervorgeht, stieg parallel zum Gehalt an partikulären Stoffen die Konzentration an Gesamtstickstoff (TKN) und Ammonium (NH_4-N). Letzteres steht in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert im Gleichgewicht mit dem für viele Mikroorganismen hemmenden Ammoniak (vgl. Kapitel I.4.1). Die erreichte Ammonium-konzentration von 4 g/l entspricht unter mesophilen Bedingungen und bei einem pH-Wert von 8,0 gemäß Gleichung (2) und (3) einer Konzentration an freien Ammoniak von 0,5 g/l. Die von Gallert und Winter (1997) angegebene Konzentration für eine 50-prozentige Hemmung von 0,22 g/l wird somit deutlich überschritten und eine Hemmung in Folge der hohen Ammoniakkonzentration ist durchaus wahrscheinlich.

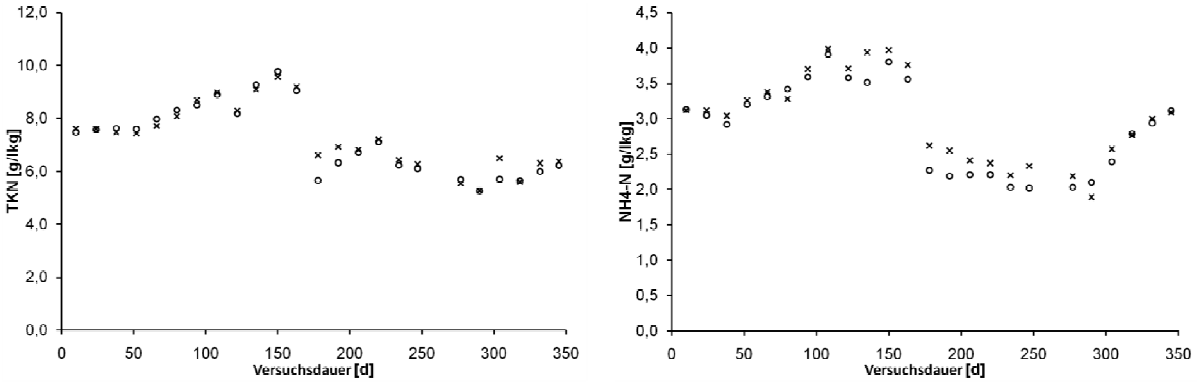


Abbildung 25: Entwicklung von TKN und NH_4-N bei der mesophilen Vergärung von Grassilage

Dass vor allem die acetoclastischen Methanbakterien durch die erhöhten Ammoniakkonzentrationen in ihrer Aktivität gehemmt sind, zeigt sich im parallelen Anstieg der Essigsäurekonzentration. Demgegenüber korreliert der Anstieg der Propionsäurekonzentration lediglich mit der Steigerung der Raumbelastung (Abbildung 26). Während es bei nahezu allen Parametern durch die Wasserzugabe zu einem

Verdünnungseffekt kommt, ist dieser bei Propionsäure nur minimal ausgeprägt. Der Grund dafür liegt in der Auswaschung der propionsäureabbauenden Bakterien durch die Wasserzugabe und die im Anschluss daran verkürzten Verweilzeiten durch die Anpassung der Wasser-Substrat-Verhältnisse. Anhand der Simulationsergebnisse in Kapitel II.3.2.8.1 wird dieses Phänomen nochmal ausführlicher diskutiert.

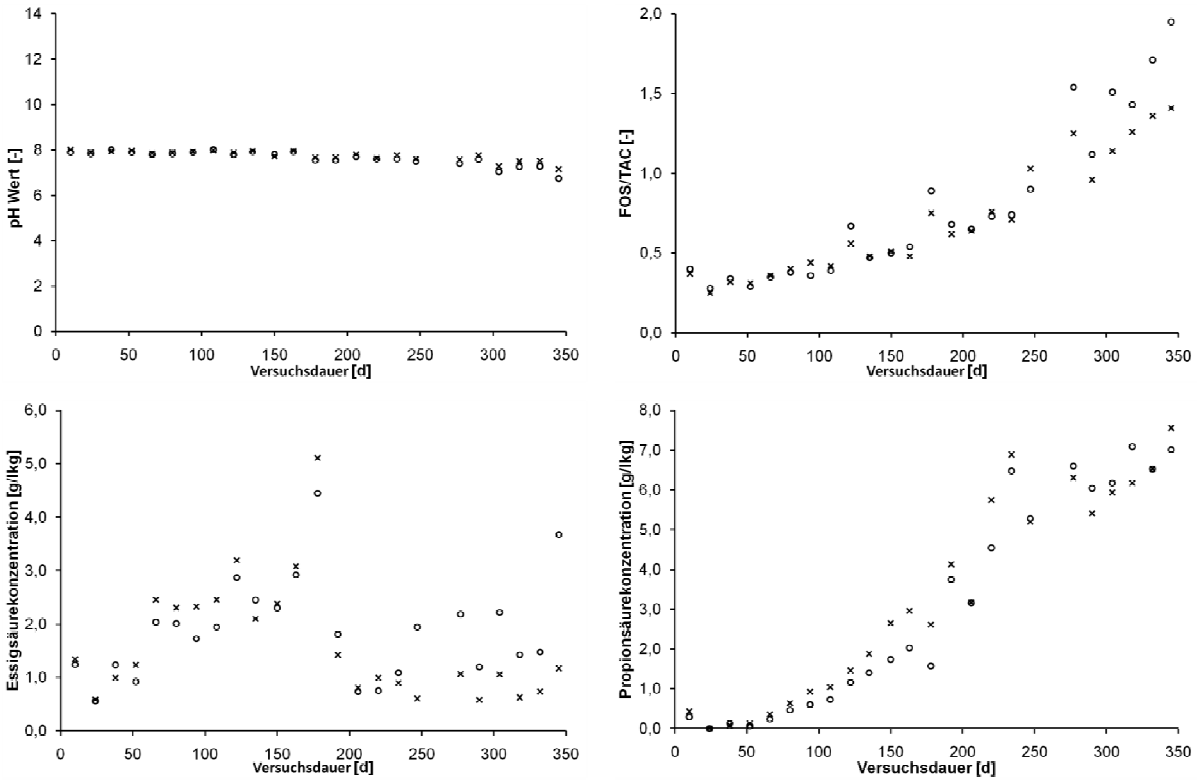


Abbildung 26: Entwicklung von pH-Wert, FOS/TAC, Essigsäure- und Propionsäure-konzentration bei der mesophilen Vergärung von Grassilage

Um eine mögliche Hemmung frühzeitig zu erkennen, ist die objektive Beurteilung der Prozessstabilität mit Hilfe schnell und kostengünstig bestimmbarer Parameter ein wichtiges Anliegen des Anlagenbetreibers. In Abbildung 26 sind noch zwei weitere Parameter dargestellt, die häufig zur Charakterisierung des Prozesses herangezogen werden. Gänzlich ungeeignet ist der pH-Wert, da dieser aufgrund des durch Kohlensäure und Ammonium gut gepufferten Systems sehr träge reagiert. Auch die Essigsäurekonzentration verhält sich eher indifferent und zeigt die anfängliche Prozessstörung durch Ammoniak gut an, die Überlastung des Systems am Ende der Versuchsreihe bei einer Raumbelastung von 3,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ jedoch nicht. Genau umgekehrt verhält es sich mit dem Gehalt an Propionsäure, welcher schon häufiger als geeigneter Überwachungsparameter bezeichnet wurde (Nielsen et al., 2007). Die beiden Säuren haben im Gegensatz zum pH-Wert noch das große Manko, dass eine zeitnahe

oder gar online-Bestimmung bisher nicht Stand der Technik ist. Der FOS/TAC-Wert vereint die Vorteile der schnellen Bestimmung bei gleichzeitig hoher Sensitivität und ist deshalb gut zur Beurteilung der Prozessstabilität geeignet. Prinzipiell sollte allerdings stets eine Auswahl verschiedener Parameter zur Beurteilung herangezogen werden, da Dafür bieten sich neben den hier vorgestellten Parametern u.a. das CH_4/CO_2-Verhältnis und die spezifische Methanbildungsrate an (Wichern et al., 2008).

Neben der spezifischen Biogasproduktion ist der Abbaugrad ein weiterer Parameter zur Beurteilung der Effizienz des Prozesses. Gängig sind die Bilanzierung von Zulauf und Ablauf über CSB und oTS, wobei sich die Berechnung des Abbaugrades auf Basis des oTS aufgrund des Bezuges auf Trocken- bzw. Frischmasse, deren Gewicht sich während des Abbaus durch den Massenverlust über den Gaspfad (vgl. Kapitel II.3.2.2) ändert, schwierig gestaltet. Eine mögliche Berechnungsvariante, mit deren Hilfe auch die folgenden Werte berechnet worden sind, ist in Kapitel II.2.4 zu finden. Der Abbaugrad korreliert mit der Raumbelastung und mit der Verweilzeit und erreichte bei den vorgestellten Versuchen auch bei hohen Raumbelastungen Werte von 70 %.

Nach der Raumbelastungssteigerung auf 3,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ am Tag 296 verläuft der Prozess nicht mehr stabil, was sich in einer weiteren Akkumulation organischer Säuren (z.B. Propionsäure) und damit einem Anstieg des FOS/TAC-Wertes sowie schließlich im Abfall der Biogasproduktion bemerkbar macht. Im Gegensatz zur Literatur werden deutlich höhere Propionsäurekonzentrationen bis etwa bis 7 g/l bzw. ein FOS/TAC von bis zu 1,5 toleriert, bevor es schließlich zum Zusammenbruch des Prozesses kommt. Aus diesem Grund wurde die Versuchsreihe zur Monofermentation von Grassilage im mesophilen Temperaturbereich nach 345 Tagen beendet.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass der Schlaufenreaktor als ein geeignetes Vergärungssystem für die mesophile Monofermentation von Grassilage angesehen werden kann. Die wichtigsten verfahrenstechnischen Erkenntnisse aus den Versuchen sind:

- der durchschnittliche Biogasertrag bei einer Raumbelastung von 3,0 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ lag bei 0,50 m^3/kg_{oTS} mit einem Methangehalt von 52 % (Methanertrag von 0,26 m^3/kg_{oTS}),
- bis zu einer Raumbelastung von 3,0 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ war ein stabiler Betrieb möglich,
- der Abbaugrad auf oTS-Basis bei einer Raumbelastung von 3,0 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ betrug durchschnittlich 70 %,

- ein zu hoher Trockensubstanzgehalt führt zu einem Anstieg der Ammoniumkonzentration, die wiederum den Abbau von Acetat hemmt, weshalb es schließlich zu einem Abfall in der Gasproduktion kommt,
- auftretende Prozessinstabilitäten bei der Vergärung von Grassilage korrelieren generell mit steigenden Konzentrationen an Ammonium bzw. Ammoniak,
- bis zu einer Propionsäurekonzentration von 7 g/l und einem FOS/TAC von 1,5 lief der Prozess stabil.

II.3.1.2.2. Übergang vom mesophilen zum thermophilen Temperaturbereich

Um einen Reaktor vom mesophilen in den thermophilen Temperaturbereich zu überführen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Steht geeignetes Inokulum zur Verfügung, bietet sich zu allererst eine Animpfung mit dieser Biozönose an. Da dies in der Regel nicht der Fall ist, bleibt nur die Temperaturerhöhung mit der bestehenden Kultur in der Hoffnung, dass bereits entsprechende Sporen thermophiler Spezies vorhanden sind bzw. anwesende Spezies auch fakultativ thermophil leben können. Die Vorgehensweise zur Temperaturanpassung variiert dabei von einem, über mehrere Schritte bis hin zur allmählichen Anpassung (Abbildung 27).

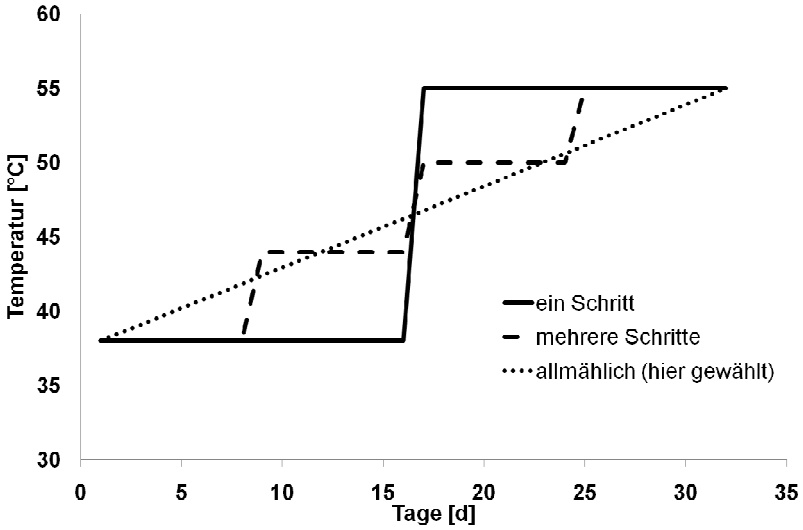


Abbildung 27: Möglichkeiten zur Temperaturanpassung vom mesophilen zum thermophilen Bereich

Bei der abrupten Temperaturerhöhung hängt die Zeit bis zur Zieltemperaturerreichung lediglich von der Leistungsfähigkeit des Heizaggregates ab. Je nach Art der Rückkopplung der Heizung mit dem Temperaturfühler im Reaktor kann es jedoch zu lokalen

Temperaturspitzen und damit zu Anbackungen kommen. Bei der Anpassung in mehreren Schritten ist das zwar unwahrscheinlich, allerdings besitzt diese Methode den Nachteil, dass zeitweise in Temperaturniveaus mit verminderter mikrobiologischer Aktivität verweilt wird. Bei einer abrupten Temperaturerhöhung kann außerdem davon ausgegangen werden, dass die Mikroorganismen zunächst in eine Art Schockzustand verfallen, weshalb eine gewisse Erholungszeit im Anschluss vonnöten wird, die die Zeitersparnis gegenüber der allmählichen Variante kompensiert (Palatsi et al., 2009). Aus diesen Überlegungen heraus erschien die allmähliche Anpassung als am besten geeignet.

Nach Beendigung der mesophilen Versuchsreihe aufgrund signifikanter Prozessinstabilitäten wurde die Substratzufuhr der beiden Schlaufenreaktoren zunächst ausgesetzt, damit akkumulierte Säuren und partikuläre Stoffe abgebaut und sich wieder ein stabiler Prozess etablieren konnte. Die Hungerphase wurde bis zum Erreichen einer Gesamtsäurekonzentration (gemessen als Essigsäureäquivalent) von weniger als 5 g/l durchgeführt und dauerte 36 Tage. Im Anschluss daran wurde eine Raumbelastung von 0,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ eingestellt und parallel dazu die Temperatur in den Reaktoren schrittweise um 0,5 °C pro Tag bis zum thermophilen Temperaturbereich (55 °C) erhöht. Die Übergangsphase dauerte insgesamt 34 Tage und ist in den folgenden Abbildungen bereits enthalten.

II.3.1.2.3. Thermophile Vergärung von Grassilage

Aufgrund der Erkenntnisse aus der mesophilen Vergärung, wurde die getrocknete Grassilage von Anfang an im Verhältnis 1:4 mit Wasser angemaischt, wodurch sich ein relativ konstanter Trockensubstanzgehalt von etwa 8 % im Reaktor einstellte (Abbildung 28). Erst zum Ende des Versuches als die Biogasproduktion zurückgeht und der Abbauprozess zum Erliegen kommt, steigt demzufolge auch der TS-Gehalt.

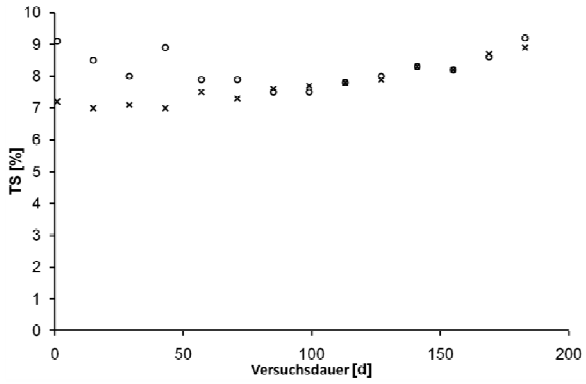


Abbildung 28: Entwicklung des TS-Gehaltes bei der thermophilen Vergärung von Grassilage

Der anfänglich leicht erhöhte Trockensubstanzgehalt in Reaktor R ist auf die Zugabe des Vulkanminerals Klinoptilolith zurückzuführen. Dieses Zeolith findet aufgrund seiner guten Eigenschaften als Ionenaustauscher beispielsweise bei der Eliminierung von Ammonium aus Prozesswässern Anwendung (Thornton et al., 2007). Auch bei der Vergärung von Grassilage wurde einem Zusatzstoff auf Zeolithbasis eine potentiell positive Wirkung bescheinigt (Andrade et al., 2009b). Anhand der chemischen Zusammensetzung wird von Athanasiadis und Helmreich (2005) eine theoretische Austauschkapazität von 2,23 mol-Äquivalenten pro kg Klinoptilolith angegeben. Wird angenommen, dass nur Ammonium gebunden wird, entspräche das einer Austauschkapazität von 38 g NH4-N pro kg Klinoptilolith. Während der Hungerphase wurden Reaktor R portionsweise insgesamt 800 g getrocknetes und gemahlenes Klinoptilolith zugegeben. Diese Menge könnte etwa 30 g Ammonium und damit ein Fünftel dessen, was sich zu dieser Zeit in Reaktor befand, binden. Die erhoffte Bindung von schädlichem Ammoniak durch Klinoptilolith fällt allerdings minimal aus, wie Abbildung 29 zeigt. Mögliche Gründe dafür sind wohl, dass neben Ammonium auch viele andere Stoffe sorbieren, gebundenes Ammonium aufgrund der Gleichgewichtsverschiebung zügig nachgebildet wird und die Rührleistung vermutlich nicht ausreicht, um das Zeolith für einen aktiven Austausch in der Schwebe zu halten. Zu einer weitreichenderen Entfernung von Ammonium wären folglich große Mengen an Klinoptilolith nötig, die einen Einsatz an dieser Stelle nicht sinnvoll erscheinen lassen.

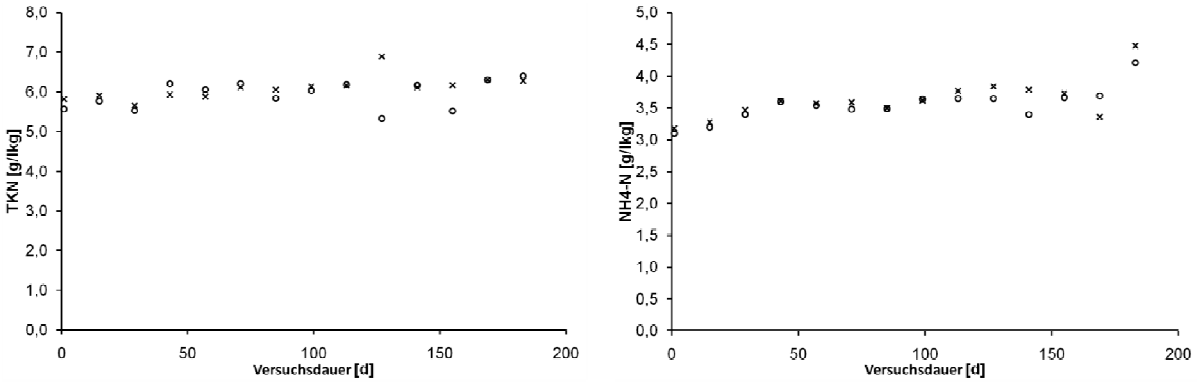


Abbildung 29: Entwicklung von TKN und NH_4-N bei der thermophilen Vergärung von Grassilage

Gegenüber dem mesophilen Bereich wird im thermophilen Bereich eine höhere Ammoniumkonzentration von über 3,5 g/l erreicht, was der besseren Hydrolyse bei höheren Temperaturen zuzuschreiben ist. Wie in Kapitel I.4.1 erörtert, verschiebt sich durch die Temperaturerhöhung zudem noch das Gleichgewicht zugunsten des hemmenden Ammoniaks. Gemäß den Gleichungen (2) und (3) liegt bei einem pH-Wert von 8,0 im thermophilen Temperaturbereich der Anteil von Ammoniak am Gesamtammoniumstickstoff (NH_4-N) bei 28 %. Dementsprechend ergibt sich eine freie Ammoniakkonzentration (FAN) von 1,0 g/l, die ähnlich wie schon im mesophilen Bereich deutlich über der von Gallert und Winter (1997) angegebenen Konzentration für eine 50-prozentige Hemmung von 0,68 g/l. Ammoniakbedingte Prozessstörungen sind daher auch bzw. insbesondere im thermophilen Bereich zu erwarten. Das ist nicht zuletzt der Tatsache geschuldet, dass das Spektrum aktiver Mikroorganismen im thermophilen Temperaturbereich deutlich ärmer als im mesophilen ist (Weiland, 2001) und folglich gegenüber Stressfaktoren weitaus sensibler reagiert.

Mit der Zugabe von Klinoptilolith können auch keine positiven Langzeiteffekte, beispielsweise die Versorgung mit benötigten Spurenelementen, erzielt werden. Doch auch dies ist offensichtlich nicht der Fall. Entwickelte sich die Gasproduktion beider Reaktoren zuerst nahezu identisch, stürzt diese in Reaktor R nach der Raumbelastungserhöhung auf 2,0 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ deutlich eher ab (Abbildung 30). Ähnlich dem mesophilen Temperaturbereich wurde eine Raumbelastungserhöhung immer dann durchgeführt, wenn die Gasproduktion über einige Tage relativ konstant blieb, was meistens nach etwa 50 Tagen der Fall war. Unter thermophilen Bedingungen war ein stabiler Betrieb nur bis zu einer Raumbelastung von 1,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ möglich.

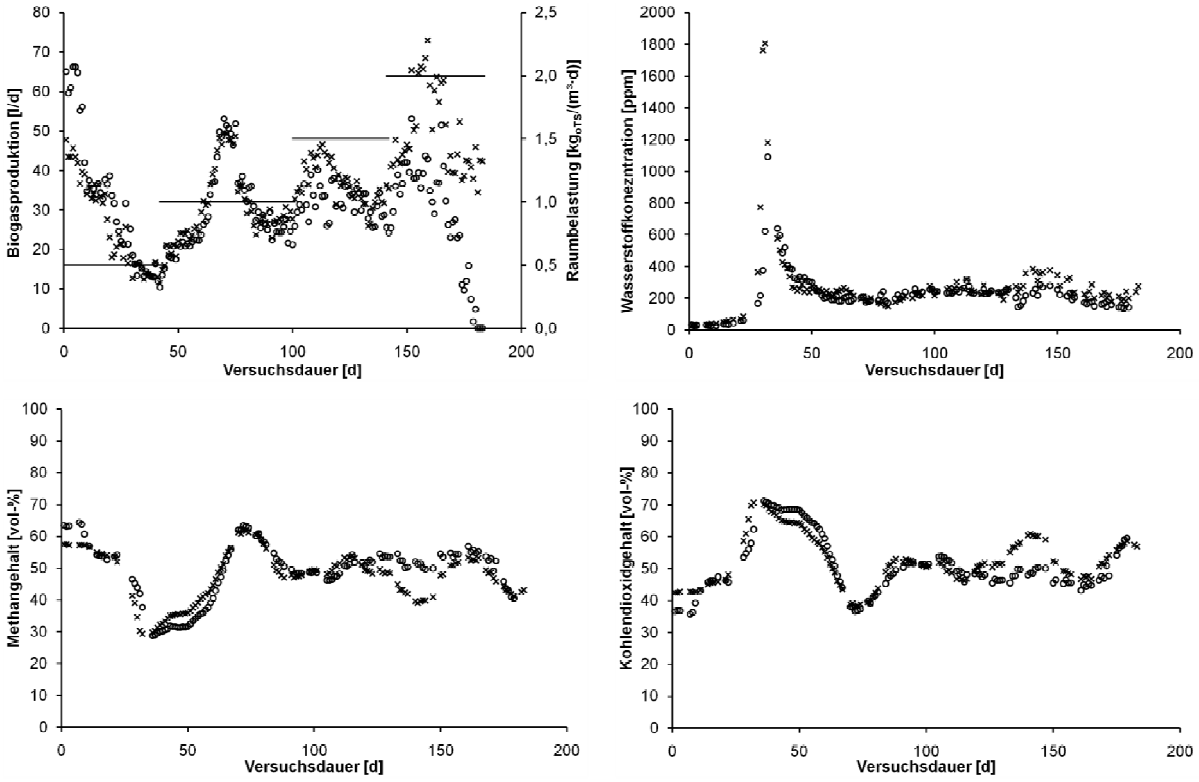


Abbildung 30: Biogasmenge und -zusammensetzung bei der thermophilen Vergärung von Grassilage

Es ist zu beachten, dass die ersten 36 Tage der Abbildungen noch die Temperaturübergangsphase beinhalten, wodurch sich die Extrema in den Wasserstoff-, Methan- und Kohlendioxidkonzentrationen. erklären. Offenbar sind die hydrolytischen Kulturen unabhängig von der Temperaturänderung weiterhin aktiv, während die Methanbakterien eine gewisse Lag-Phase aufweisen. Blendet man die Übergangsphase aus, wird trotzdem nur ein durchschnittlicher Methangehalt von 47 % erreicht. Lediglich nach der Adaptionsphase bei einer Raumbelastung von 1,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ und kann ein Wert von 50 % erreicht werden. Zu den anderen Zeiten sorgen der Übergang aus dem mesophilen Temperaturbereich oder der beginnende Zusammenbruch des Prozesses für entsprechend geringe Methangehalte. Aufgrund der geringeren Löslichkeit von CO_2 bei höheren Temperaturen und der damit verbundenen höheren Präsenz im Biogas, lässt sich der um 2 % unter dem Methangehalt des mesophilen Bereiches liegende Wert unter stabilen Fermentationsbedingungen erklären.

Mit einer Raumbelastung von 1,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ wird im thermophilen Temperaturbereich nur die Hälfte der Belastung des mesophilen Bereiches (3,0 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$) erreicht. Dies ist auf eine Reihe verschiedener Faktoren zurückzuführen. Der Hauptgrund liegt in der geringeren bakteriellen Artenvielfalt im thermophilen Bereich (Weiland, 2001), wodurch die Anfälligkeit

gegenüber Störeinflüssen steigt. Die temperaturbedingt höheren Ammoniakkonzentrationen versetzen die Biozönose bereits in einen Stresszustand. Die Anhebung der Raumbelastung und die damit verbundene verkürzte Verweilzeit setzt den Mikroorganismen schließlich verstärkt zu, was sich zunächst in der Akkumulation organischer Säuren wiederspiegelt. Dadurch wird der Prozess zusätzlich gehemmt und kommt schließlich bereits bei geringen Raumbelastungen zum Erliegen.

Analog zu den Betrachtungen im vorangegangenen Kapitel werden an dieser Stelle wieder die vier Parameter zur Beurteilung der Prozessstabilität bewertet. Wie aus Abbildung 31 hervorgeht, ist der pH-Wert erneut ein denkbar schlechtes Bewertungsinstrument und auch die Streuung bei der Essigsäurekonzentration erschwert die Ableitung eines klaren Trends. Die Propionsäure stellt wiederholt ihre Eignung zur Prozessüberwachung unter Beweis und zeigt die negative Beeinflussung des Abbauprozesses bei steigender Raumbelastung an. Der zuvor als besonders geeignet bezeichnete FOS/TAC schneidet im thermophilen Bereich deutlich schlechter ab. Der Grund für das Sinken des Wertes am Ende trotz Akkumulation an organischen Säuren (steigender FOS-Wert) ist wohl im gleichzeitigen Anstieg des CO_2-Anteiles im Gas (steigender TAC-Wert) zu suchen.

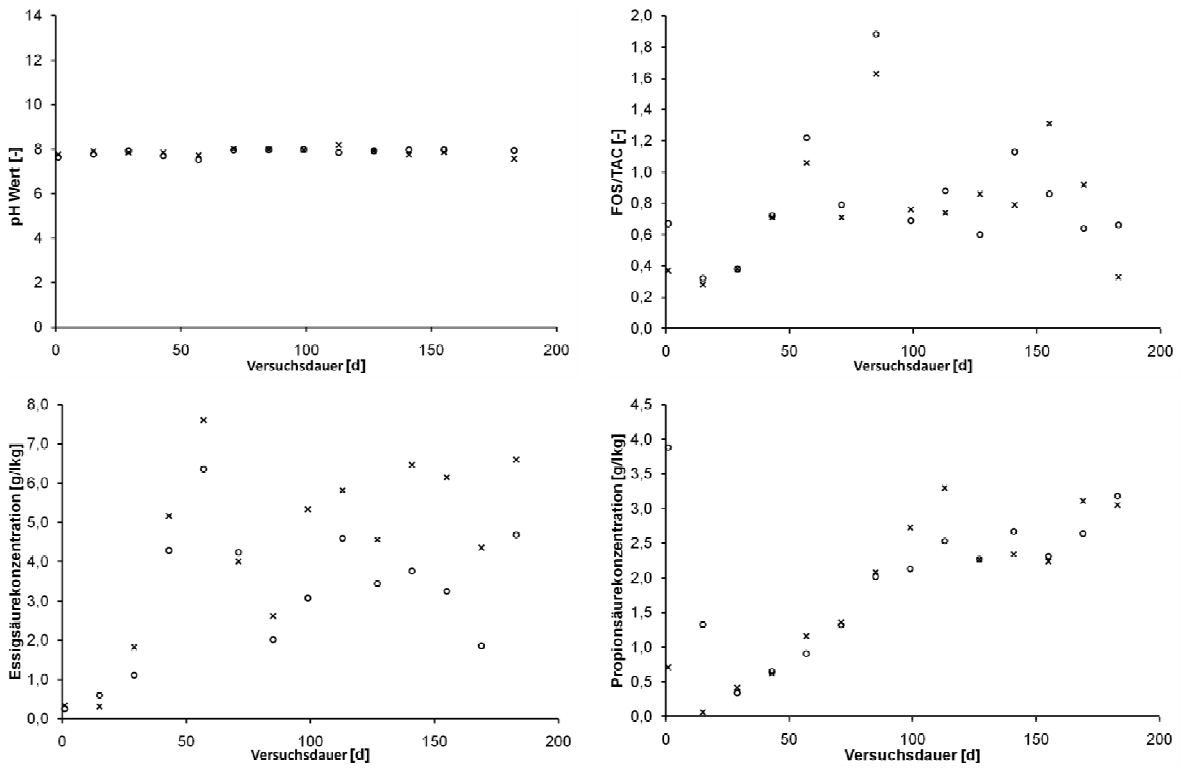


Abbildung 31: Entwicklung von pH-Wert, FOS/TAC, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der thermophilen Vergärung von Grassilage

Die Angabe von Grenzwerten für die Propionsäurekonzentration und den FOS/TAC für einen stabilen Betrieb analog dem mesophilen Bereich fällt deutlich schwerer. Seit der Raumbelastungssteigerung auf 2,0 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ am Tag 152 verläuft der Prozess nicht mehr stabil, was sich in erster Linie durch den Abfall der Gasproduktion bemerkbar macht. Dementsprechend kann eine noch tolerierbare Propionsäurekonzentration von maximal 2,5 g/l abgeleitet werden. Für den FOS/TAC kann nur schwer eine Grenze festgelegt werden, da dieser zum Ende wieder absinkt, jenseits von 1,0 aber scheint kein stabiler Betrieb mehr möglich zu sein. Beide Werte liegen deutlich unter jenen des mesophilen Bereiches.

Abschließend lässt sich sagen, dass im Vergleich zum mesophilen Temperaturbereich die thermophile Monofermentation von Grassilage eher ungeeignet zu sein scheint. Die wichtigsten verfahrenstechnischen Erkenntnisse aus den Versuchen sind:

- der durchschnittliche Biogasertrag bei einer Raumbelastung von 1,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ lag bei 0,50 m^3/kg_{oTS} mit einem Methangehalt von 50 % (Methanertrag von 0,25 m^3/kg_{oTS}),
- lediglich bis zu einer Raumbelastung von 1,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ ist ein stabiler Betrieb möglich,
- Versuche zur Stabilisierung mittels Zugabe des Zeoliths Klinoptilolith waren nicht erfolgreich,
- der Abbaugrad betrug bei einer Raumbelastung von 1,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ etwa 75 % (die höheren Abbaugrade sind auf die längeren Aufenthaltszeiten bei niedrigeren Raumbelastungen zurückzuführen),
- die schon bei niedrigen Raumbelastungen auftretenden Prozessinstabilitäten korrelieren mit den hohen Konzentrationen an Ammoniak,
- der zusätzlich mit der steigenden Raumbelastung (und der damit verkürzten Verweilzeit) verbundene Stress setzt der Biozönose aufgrund der geringeren bakteriellen Artenvielfalt im thermophilen Bereich stärker zu,
- die Akkumulation organischer Säuren führt aufgrund der deutlich höheren Wasserstoffkonzentrationen im Vergleich zum mesophilen Bereich bereits bei geringeren Säurekonzentrationen zum Erliegen des gesamten Prozesses,
- bis zu einer Propionsäurekonzentration von 2,5 g/l und einem FOS/TAC-Wert von 1,0 lief der Prozess weitestgehend stabil.

II.3.1.3. Abschätzung des sich im Reaktor einstellenden Trockensubstanzgehaltes

Eine überschlägige Abschätzung des sich unter bestimmten Bedingungen im Reaktor einstellenden Trockensubstanzgehaltes ist im Vorfeld insofern von großer Bedeutung, als dass davon die hydraulischen Verhältnisse und damit auch die Verfahrenstechnik von den Rührorganen bis zu den Heizelementen beeinflusst werden.

Analog der induktiven Herleitung der Formel zur Berechnung des Abbaugrades auf oTS-Basis wird die Formel anhand eines praxisnahen Beispiels abgeleitet:

Einem Reaktor wird 1 kg Grassilage, bestehend aus 500 g Wasser und 500 g Trockensubstanz zugeführt. Die Trockensubstanz wiederum besteht aus 450 g oTS (90 %) und 50 g anorganischer Trockensubstanz (aTS). Die Erfahrungen haben gezeigt, dass ein oTS-Abbau von 70 % realistisch ist. Demzufolge werden 315 g oTS abgebaut, während 185 g TS (135 g oTS sowie 50 g aTS) zurückbleiben. Wird ferner angenommen, dass kein Wasser zur Hydrolyse benötigt wird oder in Form von Wasserdampf mit dem Biogas den Reaktor verlässt (der relative Einfluss ist marginal und soll in dieser Abschätzung vernachlässigt werden), dann stellt sich im Reaktor im stationären Zustand folgender TS ein:

$$TS_{Reaktor} = \frac{m_{TS_Substrat} - m_{TS_abgebaut}}{m_{Substrat} - m_{abgebaut}} = \frac{500g - 315g}{1000g - 315g} = 27\% \qquad (12)$$

$TS_{Reaktor}$	Trockensubstanzgehalt im Reaktor [% bzw. g_{TS}/g_{FM}]
$m_{TS_Substrat}$	Trockensubstanzmasse des zugeführten Substrates [g_{TS}]
$m_{TS_abgebaut}$	abgebaute Trockensubstanzmasse [g_{TS}]
$m_{Substrat}$	Masse an zugeführtem Substrat [g_{FM}]
$m_{abgebaut}$	abgebaute Masse [g_{FM}]

Anhand dieser Überlegungen wird klar, warum der TS im Reaktor zu Beginn der mesophilen Versuchsphase, als eben diese Mischung aus getrockneter Grassilage und Wasser im Verhältnis 1:1 zugegeben wurde, so stark angestiegen ist. Ferner zeigt diese Abschätzung, dass die Monofermentation von angedörrter Grassilage in den bekannten Verfahren der Nassvergärung ohne die Zugabe von Prozesswasser oder Gülle nicht zu bewerkstelligen wäre.

Eine allgemeingültige Formel für die Abschätzung lässt sich entsprechend ableiten:

$$TS_{Reaktor} = \frac{TS_{Substrat} \cdot (1 - GV_{Substrat} \cdot D_{oTS})}{1 - TS_{Substrat} \cdot GV_{Substrat} \cdot D_{oTS}} \quad (13)$$

$GV_{Substrat}$ Glühverlust des Substrates [% TS bzw. g_{oTS}/g_{TS}]

D_{oTS} Abbaugrad bezüglich oTS [%]

Durch die Auflösung der Gleichung nach $TS_{Substrat}$ kann beispielsweise der notwendige TS des Substrates abgeschätzt werden, damit sich ein beliebiger Wert im Reaktor einstellt. Wird auf die Erkenntnis aus Kapitel II.3.1.2 zurückgegriffen, wo ein Maximalwert von 12 % TS vorgeschlagen wurde, ergibt sich für das Substrat ein Wert von etwa 23 %. Wird schließlich für die Hydrolyse sowie für den Wasserverlust über die Gasphase noch eine geringfügige Menge veranschlagt, wird das seit Mitte der mesophilen bzw. während der thermophilen Versuchsreihe angewandte Verhältnis von 1:4 (20 %) erhalten.

II.3.2. Modellierung der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen

Das ADM1 zeichnet sich besonders durch seine offene Struktur aus, wodurch es grundsätzlich möglich ist, sämtliche biologisch abbaubaren Substrate unter beliebigen Bedingungen abzubilden. Da die Monovergärung lignocellulosehaltiger Substrate bisher nicht Stand der Technik war, bestand in der Charakterisierung des Zulaufs eine erste Herausforderung. Außerdem mussten einige kinetische Parameter auf die neuen Bedingungen angepasst werden.

II.3.2.1. Zulauffraktionierung

Analog zu den Ansätzen der Activated Sludge Models (ASM), arbeitet auch das ADM1 auf Basis des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB). Insbesondere wenn Stoffgemische, wie es Abwasser und auch landwirtschaftliche Substrate sind, zum Einsatz kommen, rechtfertigt sich diese Bilanzierungsgröße. Damit ist es möglich ein Substrat über den spezifischen CSB (kg_{CSB} pro $kg_{Substrat}$) ausreichend zu charakterisieren, was beispielsweise mittels einer Masse nicht möglich wäre. Ein beispielhafter CSB-Flux sowie die im Modell berücksichtigten Prozesse sind in Abbildung 32 zu sehen.

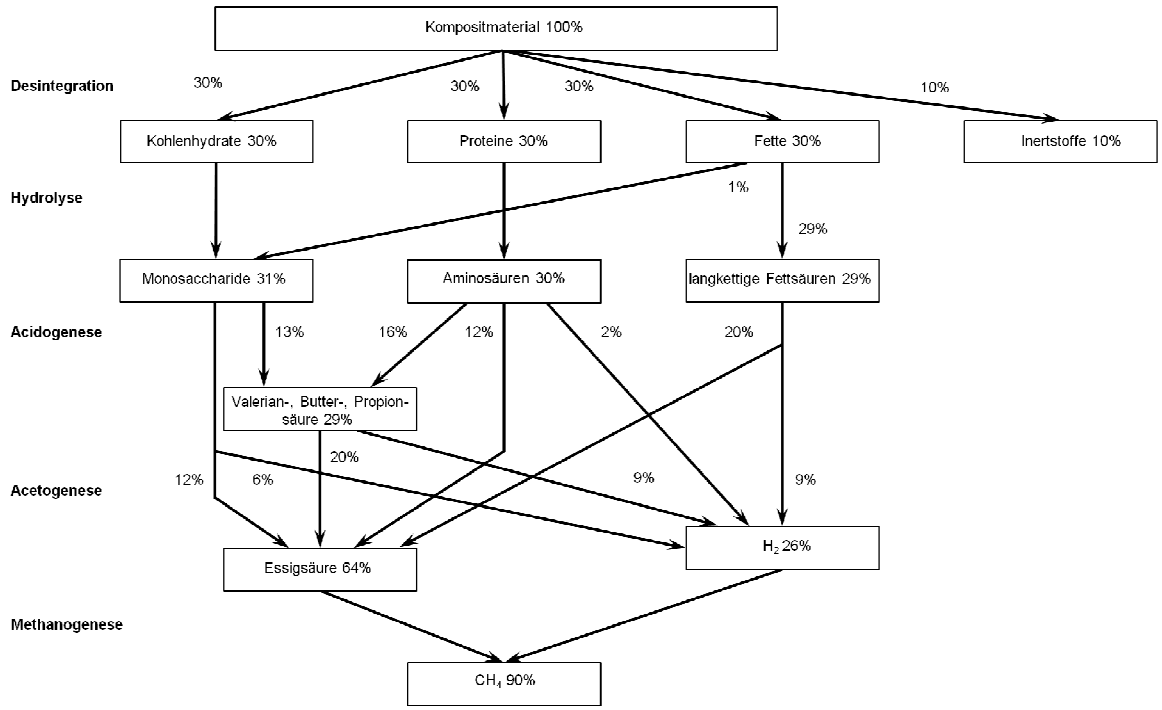


Abbildung 32: Beispielhafter CSB-Flux im ADM1 (Batstone et al., 2002)

Der große Nachteil besteht allerdings darin, dass die Bestimmung des CSBs nur in der flüssigen Probe erfolgen kann und teuer ist. Außerdem stammt dieser Parameter aus der Abwasserwirtschaft und spielt - im Gegensatz zur Futtermittelanalytik - in der Tierernährung lediglich eine untergeordnete Rolle. Silagen werden in der Regel nur über Trockensubstanz- bzw. Wassergehalt, Glühverlust und Weenderanalyse mit van-Soest-Fraktion charakterisiert. Bisherige Arbeiten haben deshalb zumeist den CSB mit dem oTS korreliert und daraus einen einheitlichen Faktor abgeleitet (Lübken et al., 2007; Wichern et al., 2009). Dieses Vorgehen stellt zwar für in der Zusammensetzung relativ gleichbleibende Substrate eine gute Näherung dar, ist hingegen die Aufteilung der Silage auf die einzelnen Fraktionen gemäß Futtermittelanalytik bekannt, kann mit Hilfe des theoretischen Sauerstoffbedarfs (ThOD) eine genauere Ermittlung stattfinden. Voraussetzung dafür sind jedoch belastbare Analysenergebnisse bezüglich der Nährstoffzusammensetzung (Futtermittelanalytik) sowie eine genaue Beschreibung aller Substanzen der jeweiligen Nährstoffgruppe (z.B. Proteine) durch eine einzige Summenformel. Die Oxidation einer beliebigen organischen Verbindung genügt der folgenden Gleichung:

$$C_aH_bO_cN_d + \left(a + \frac{b}{4} - \frac{c}{2} - \frac{3d}{4}\right) O_2 \rightarrow a\,CO_2 + \left(\frac{b}{2} - \frac{3d}{2}\right) H_2O + d\,NH_3 \qquad (14)$$

Anhand der Gegenüberstellung von theoretischem und gemessenem CSB konnte gezeigt werden, dass Stickstoff nicht nitrifiziert, sondern in Ammonium bzw. Ammoniak umgewandelt wird (Gerike, 1984). Der theoretische CSB eines Stoffes bekannter Elementarzusammensetzung kann nun mit Hilfe der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$ThOD = \frac{16 \cdot (2a + 0{,}5(b - 3d) - c)}{12a + b + 16c + 14d} \qquad \left[\frac{g_{O_2}}{g_{C_aH_bO_cN_d}}\right] \tag{15}$$

Die Fraktionierung des Zulaufs erfolgt in die Nährstoffe Kohlenhydrate, Proteine und Fette. Deren Elementarzusammensetzung und der sich daraus für die jeweilige Fraktion ergebende ThOD ist in Tabelle 11 dargestellt. Den Grundbaustein für Stärke, Cellulose und größtenteils Hemicellulose bildet Glucose, weshalb all jene in einer Gruppe zusammengefasst sind. Lignin ist ein armorphes Polymer aus aromatischen Grundbausteinen, dem keine eindeutige Struktur- oder Summenformel zugeordnet werden kann. Nadji et. al (2009) geben beispielsweise für Dioxan-Lignin aus Alfagras die Summenformel $C_{10,92}H_{14,24}O_{5,76}$ an. Die Ermittlung des ThOD für Lignin ist zwar für die Bilanzierung wichtig, hat aber auf die Ergebnisse der Simulationen nur einen untergeordneten Einfluss, da Lignin anaerob nicht abbaubar ist (Mähnert, 2007) und damit komplett der Inertfraktion zugeordnet wird. Die Elementarzusammensetzungen für Proteine und Fette sind Angelidaki und Sanders (2004) entlehnt.

Tabelle 11: Theoretischer Sauerstoffbedarf (ThOD) der einzelnen Fraktionen

Fraktion	Summenformel	Molargewicht [g/mol]	ThOD [g_{CSB}/g_{TS}]
Proteine	$C_5H_7O_2N$	113	1,42
Fette	$C_{57}H_{104}O_6$	884	2,90
Cellulose, Hemicellulose, Stärke	$(C_6H_{10}O_5)_n$	162n	1,19
Lignin	$C_{10,92}H_{14,24}O_{5,76}$	237,44	1,56

Es wird deutlich, dass sich der theoretische Sauerstoffbedarf je nach Zusammensetzung immer zwischen 1,19 und 2,90 g_{CSB}/g_{TS} bewegen wird (Tabelle 11). Da der Fettanteil der Silagen meist sehr gering ist und damit nur eine untergeordnete Rolle spielt, schränkt sich der Schwankungsbereich auf 1,2 bis etwa 1,6 g_{CSB}/g_{TS} ein. In diesem Bereich bewegen sich auch die empirisch über die Korrelation mit dem oTS ermittelten Werte mit 1,56 kg_{CSB}/kg_{TS} für ein landwirtschaftliches Mischsubstrat (Lübken, 2009) sowie 1,30 kg_{CSB}/kg_{TS} für Grassilage bzw. 1,45 kg_{CSB}/kg_{TS} für den dazugehörigen Gärrest (Wichern et al., 2009). Im Gegensatz zu dem

Ansatz über den theoretischen Sauerstoffbedarf sind diese Faktoren nicht universell anwendbar.

Das ADM1 unterscheidet zwischen partikulären (X) und gelösten (S) Stoffen, wobei partikuläre Stoffe während der Hydrolyse in gelöste Stoffe übergehen und dadurch bakterienverfügbar werden. Da die Grassilage in getrockneter Form zugegeben wurde, wird der Zulauf nur in partikuläre Stofffraktionen unterteilt. Zur Charakterisierung des Kompositmaterials X_C, welches die Grassilage im Zulauf repräsentiert, werden die Fraktionen der Proteine (RP), Fette (RL), Kohlenhydrate (RF+NfE-ADL) und Inertstoffe (ADL) nach erfolgter Umrechnung in den jeweiligen CSB gemäß Gleichung (16) summiert. Da Lignin anaerob nicht abbaubar ist (Mähnert, 2007) wird es komplett der Inertfraktion zugeordnet. Wassergehalt (1-TS) und anorganischer Anteil (TS-oTS) finden keine Berücksichtigung, da beide definitionsgemäß einen CSB von 0 haben. Unabhängig von der jeweiligen Abbaubarkeit werden Cellulose, Hemicellulose und Stärke zunächst in einer gemeinsamen Fraktion vereint. Die notwendige Aufteilung erfolgt später mit Hilfe von f-Faktoren. Da das ADM1 volumenbasiert ist, muss die Substratmasse entsprechend der Dichte überführt werden. In erster Näherung entspricht die Dichte des Substrates im Reaktor der von Wasser mit 1 kg pro Liter (Klauke, 2008).

$$X_C = \rho_{Substrat} \cdot TS \cdot \begin{pmatrix} (RP \cdot ThOD_{Pr}) + (RL \cdot ThOD_{Li}) + (ADL \cdot ThOD_{I}) \\ + (RF + NfE - ADL) \cdot ThOD_{Ch} \end{pmatrix} \qquad [kg_{CSB}/m^3] \quad (16)$$

$\rho_{Substrat}$	Dichte des Reaktorinhaltes [kg_{FM}/m^3]
TS	Trockensubstanzgehalt [% bzw. kg_{TS}/kg_{FM}]
RP	Rohprotein [% TS]
RL	Rohfett [% TS]
RF	Rohfaser [% TS]
NfE	stickstofffreie Extraktstoffe [% TS]
ADL	Säuredetergent Lignin [% TS]
$ThOD_x$	theoretischer Sauerstoffbedarf der Fraktion x [g_{O2}/g_{TS}]

Analog zu Abbildung 32 erfolgt innerhalb des ADM1 während der Desintegration die Aufspaltung des Kompositmaterials in die Einzelfraktionen für Proteine (X_{Pr}), Fette (X_{Li}), Kohlenhydrate (X_{Ch}) und Inertstoffe (X_I) gemäß den festgelegten f-Faktoren. Die Geschwindigkeit der Desintegration ist substratspezifisch und liegt im Bereich zwischen 0,4

und 1,0 d^{-1}. Die anschließende Hydrolyse von Stärke, Cellulose und Hemicellulose und damit deren Umsetzung in Biogas läuft unterschiedlich schnell ab (Myint et al., 2007). Aus diesem Grund ist es zweckmäßig, die Mischfraktion der Kohlenhydrate in zwei Teilfraktionen zu trennen. Eine Möglichkeit besteht in der Bildung einer schnell abbaubaren und einer langsam abbaubaren Komponente, wie es etwa von Myint et al. (2007) oder Lübken (2009) vorgeschlagen wurde. Es ist aber auch möglich, einen Teil dieser Mischfraktion der Inertfraktion (X_I) zuzuordnen und den Rest als reine Kohlenhydratfraktion (X_{Ch}) zu behandeln, wodurch man sich eine weitere Stoffgruppe erspart (Koch et al., 2009a). Mit der Division aller f-Faktoren durch den oTS ergeben sich als Summe immer 100%, wodurch sichergestellt wird, dass das Kompositmaterial komplett auf die Einzelfraktionen aufgeteilt wird.

$$f_{Pr_Xc} = \frac{RP}{oTS} \qquad [kg_{CSB}/kg_{CSB}] \tag{17}$$

$$f_{Li_Xc} = \frac{RL}{oTS} \qquad [kg_{CSB}/kg_{CSB}] \tag{18}$$

$$f_{Ch_Xc} = \frac{(RF + NfE - NDF) + (NDF - ADL) \cdot d}{oTS} \qquad [kg_{CSB}/kg_{CSB}] \tag{19}$$

$$f_{Xi_Xc} = \frac{ADL + (NDF - ADL) \cdot (1 - d)}{oTS} \qquad [kg_{CSB}/kg_{CSB}] \tag{20}$$

oTS	Gehalt an organischer Trockensubstanz [% TS]
NDF	Neutraldetergent Faser [% TS]
d	abbaubarer Anteil von Cellulose und Hemicellulose [%]

Der Prozentsatz d wird u.a. vom Substrat selber, von der vorhandenen Bakterienkultur und der Aufenthaltszeit im Reaktor beeinflusst und kann deshalb anhand der Gaskurve kalibriert werden. Ist der Gesamtabbaugrad bekannt, kann d auch berechnet werden. Dazu wird ein vollständiger Abbau der Stoffgruppen Fette (RL), Proteine (RP) und Stärke (RF+NfE-NDF) sowie des abbaubaren Anteils der Cellulose und Hemicellulose ((NDF-ADL)·d) postuliert und der Summe aller Fraktionen gegenübergestellt:

$$D_{oTS} = \frac{RL + RP + (RF + NfE - NDF) + (NDF - ADL) \cdot d}{RL + RP + (RF + NfE - NDF) + (NDF - ADL) + ADL} \qquad [\%] \tag{21}$$

D_{oTS}	Abbaugrad [%]

Die Auflösung nach d und die Einführung des oTS als Summe aus RP, RL, RF und NfE ergibt schließlich die Gleichung zur Berechnung des abbaubaren Anteils von Cellulose und Hemicellulose bei bekanntem Abbaugrad:

$$d = \frac{NDF - oTS \cdot (1 - D_{oTS})}{NDF - ADL} \qquad [\%] \qquad (22)$$

Die partikulären Substanzen werden in der anschließenden Hydrolyse mit substratspezifischer Geschwindigkeit in gelöste Substanzen umgewandelt und stehen schließlich dem Stoffwechsel der Mikroorganismen zur Verfügung. Mit der Kalibrierung spezieller Parameter können Abbauweg und -geschwindigkeit den Messwerten individuell angepasst werden.

Es wird deutlich, dass die Zulauffraktionierung bereits einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse der Simulation haben wird und die Übergänge zwischen Modellinput und der Modellierung selbst fließend sind. In Abhängigkeit von den Gegebenheiten der jeweiligen Versuche können Modifikationen zu dem hier aufgeführten Vorgehen notwendig sein, welches als exemplarisch zu verstehen ist. Die Nutzung der Futtermittelanalytik ermöglicht eine detaillierte Zulauffraktionierung für das ADM1. Eine weiterführende Darstellung ist den Arbeiten von Lübken et al. (2007), Lübken (2009), Wichern et al. (2009) und Wichern (2010) zu entnehmen. In den beiden Publikationen von Lübken erfolgt dabei die Zulauffraktionierung unter Nichtberücksichtigung des Kompositmaterials, wie es in dieser Arbeit für die Versuche mit Maissilage vorgenommen wurde.

II.3.2.2. Effekt des "Massenverlustes" über entstehendes Biogas

Die Bilanzierung von Systemen im Rahmen des ADM1 erfolgt über Volumenströme [m³/d], Konzentrationen [kg/m³] und Frachten [kg/d]. Vereinfachend wird bei der Bilanzierung wässriger System die Dichte aller beteiligten Stoffe auf 1 kg/l gesetzt. Diese Vereinfachung ist aber nur für jene Systeme zulässig, wo der Stoffumsatz in andere Aggregatzustände (v.a. in Gase) relativ zum Volumendurchsatz marginal ist. In diesem Fall ist eine Bilanzierung lediglich über die CSB-Fracht möglich (was bei gleichem Zeitbezug einer Energiebilanz entspricht), wie das folgende Beispiel eines Faulturms zeigt:

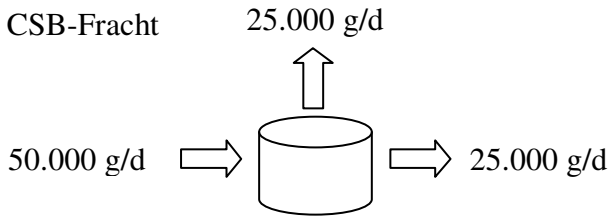


Abbildung 33: Bilanzierung eines Faulturmes über die CSB-Fracht (Klärschlamm)

Bei der für Biogasreaktoren häufig getroffenen Annahme, dass der Zulauf dem Ablauf volumenmäßig entspricht, wird ein "Massenverlust" in Form von produziertem Biogas in keiner Form berücksichtigt, was für Systeme mit geringer CSB-Belastung in erster Näherung zulässig ist, wie die Massenbilanz des Faulturmes zeigt:

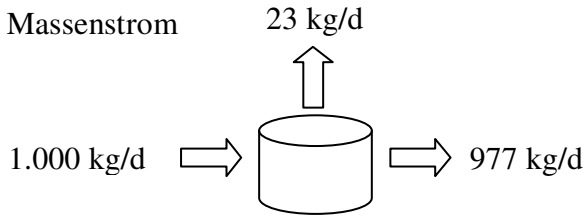


Abbildung 34: Bilanzierung eines Faulturmes über den Massenstrom (Klärschlamm)

Der Ermittlung des "Massenverlustes" durch die Biogasbildung wurden die folgenden Annahmen zugrunde gelegt:

- CSB-Konzentration des Faulschlamms: 50.000 g/m³ (vereinfachend wird für den Faulschlamm eine Dichte von 1 kg/l angesetzt),
- 50 % des CSBs (25.000 g/d) werden in Biogas umgewandelt,
- $CSB_{CH4} = 4\ g_{CSB}/g_{CH4}$ und $\rho_{CH4} = 0{,}717$ g/l,
- parallel zu CH_4 wird im gleichen Maße auch CO_2 (Volumenverhältnis 1:1) gebildet, was keinen CSB besitzt und folglich nicht in der CSB-Bilanz auftaucht ($\rho_{CO2} = 1{,}977$ g/l).

Der Massenstrom, der den Reaktor in gasförmiger Form verlässt, lässt sich folglich wie folgt quantifizieren:

$$m_{Biogas} = m_{CH4} + m_{CO2} = \frac{25.000\ {}^{g_{CSB}}/_{d}}{4\ {}^{g_{CSB}}/_{g_{CH4}}} \cdot \left(1 + \frac{1{,}977\ {}^{g}/_{l}}{0{,}717\ {}^{g}/_{l}}\right) = 23\ {}^{kg}/_{d} \qquad (23)$$

Dementsprechend ergibt sich ein "Massenverlust" durch das Biogas von gut zwei Prozent, was problemlos vernachlässigt werden kann. Ganz anders sieht es aus, wenn die

Energiedichte des eingesetzten Materials steigt und folglich sowohl die durchgesetzten Volumina pro Zeiteinheit abnehmen als auch ein höherer Abbaugrad erreicht wird. Nun möge eine Biogasanlage mit Maissilage beaufschlagt werden:

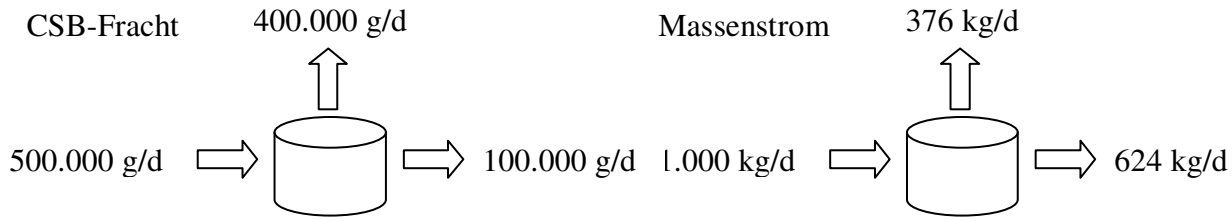


Abbildung 35: Bilanzierung einer Biogasanlage über CSB-Fracht und Massenstrom (Maissilage)

Der Berechnung wurden zusätzlich zu den obigen Angaben folgende Annahmen zu Grunde gelegt:

- CSB der Maissilage: 500 g/kg,
- 80 % des CSBs (400.000 g/d) werden in Biogas umgewandelt.

Analog ergibt sich auch die Masse an Biogas, die den Reaktor verlässt:

$$m_{Biogas} = m_{CH4} + m_{CO2} = \frac{400.000\,{}^{g_{CSB}}/_{d}}{4\,{}^{g_{CSB}}/_{g_{CH4}}} \cdot \left(1 + \frac{1{,}977\,{}^{g}/_{l}}{0{,}717\,{}^{g}/_{l}}\right) = 376\,{}^{kg}/_{d} \qquad (24)$$

Es wird deutlich, dass der "Massenverlust" bei der Vergärung von Maissilage mit etwa 38 % nicht mehr zu vernachlässigen ist. Es ist allerdings zu beachten, dass je nach Zusammensetzung des Ausgangsmaterials auch Wasser gemäß folgender Gleichung zu Biogas umgesetzt wird (Buswell und Mueller, 1952):

$$C_aH_bO_c + \left(a - \frac{b}{4} - \frac{c}{2}\right)H_2O \rightarrow \left(\frac{a}{2} + \frac{b}{8} - \frac{c}{4}\right)CH_4 + \left(\frac{a}{2} - \frac{b}{8} + \frac{c}{4}\right)CO_2 \qquad (25)$$

In der Praxis kann die Masse an Biogas recht einfach über die produzierte (wasserdampfgesättigte) Biogasmenge unter Normbedingungen und dessen Zusammensetzung abgeschätzt werden:

$$m_{Biogas} = Q_{Biogas}\left(\frac{ß_{CH4}\cdot M_{CH4} + ß_{CO2}\cdot M_{CO2}}{V_m} + m_{H2O}\right) \quad [kg/d] \quad (26)$$

Q_{Biogas}	tägliche Biogasproduktion [m³]
$ß_{CH4}$ / $ß_{CO2}$	Methan-/Kohlendioxidgehalt des Biogases [%]
M_{CH4} / M_{CO2}	Molmasse von Methan [16 kg/kmol] / Kohlendioxid [44 kg/kmol]
V_m	molares Normvolumen [22,4 m³/kmol]
m_{H2O}	Menge an Wasserdampf [kg/m³] (vgl. Tabelle 12)

In Abhängigkeit von der gewählten Gärtemperatur verlassen unterschiedliche Mengen Wasserdampf das System. Tabelle 12 enthält die sich aus der Magnus-Formel ergebenden Wasserdampfmengen für die typischen Temperaturbereiche psychrophil (10°C), mesophil (38°C) und thermophil (55°C).

Tabelle 12: Mit Biogas abgeführte Wasserdampfmengen in Abhängigkeit von der Gärtemperatur

Temperatur[°C]	**10**	**38**	**55**
Wasserdampfmenge [kg/m³]	0,009	0,046	0,104

Die Bilanzierung der Massenströme eines anaeroben Systems erfolgt im günstigsten Fall über den Zulauf (Zugabemengen werden in der Regel genau erfasst) und die gebildete Biogasmenge. Über die jeweilige Konzentration von Methan und Kohlendioxid (andere Gase sollen vereinfachend vernachlässigt werden) lässt sich die erste Hälfte des Ablaufs quantifizieren. Die Menge des Gärrestes (hier ist die Quantifizierung mitunter schwierig) ergibt sich dann aus der Differenz zur Bilanzschließung.

Deshalb ist es zwingend erforderlich, einen Ausgleichsstrom im Modell zu etablieren, welcher einen konstanten Füllstand im Reaktor gewährleistet. Aus diesem Grund wurde der Zulauf des Simulationsmodells bereits um den zu erwartenden "Massenverlust" durch die Gasphase verringert, dessen Kalkulation anhand der Messwerte vorgenommen wurde. Um trotzdem die entsprechenden Zulauffrachten zu garantieren, wurde die Konzentration der jeweiligen Fraktion im gleichen Maße erhöht wie der Zulauf verringert wurde.

II.3.2.3. Einbindung von Zerfallbiomasse

Während der anaeroben Behandlung werden etwa 7 % der abgebauten organischen Trockenmasse zur Neubildung von Bakterienmasse verwendet (Kaltschmitt et al., 2004). Im

Original-ADM1 wird abgestorbene Biomasse wieder der Kompositfraktion X_C zugeordnet, wodurch dieses Material wie frisches Substrat behandelt wird. Blumensaat und Keller (2005) wiesen bereits darauf hin, dass überschüssiger Stickstoff aus dem Sterbeprozess der Biomassen, der nicht in X_C eingelagert wird, dem Ammoniumstickstoff zugeordnete werden sollte. Wett et al. (2006) haben deshalb in Anlehnung an den Lyseansatz des ASM1 vorgeschlagen, einen Teil der abgestorbenen Biomasse einer neuen Variablen der Biomassezerfallsprodukte X_P zuzuordnen. Der dem ASM1 entlehnte stöchiometrische Faktor f_P regelt diesen Anteil, der bei 0,08 liegt (Henze et al., 1987). Um die Stickstoffbilanz einer Simulation zu schließen, können dann etwa f_P oder der Stickstoffgehalt des Kompositmaterials N_{Xc} kalibriert werden.

Insbesondere dann, wenn ein besonderes Augenmerk auf den Stickstoffverbindungen liegt, die den anaeroben Abbau entscheidend beeinflussen, ist eine detaillierte Beschreibung der Stickstoffströme im System wichtig. Dies ist insbesondere wegen des ungünstig niedrigen C/N-Verhältnisses bei der Monofermentation von Grassilage zu erwarten. Nicht zuletzt aufgrund der hohen Verweilzeiten im Reaktor bei gleichzeitig geringerem Massedurchsatz im Vergleich zur Faulschlammbehandlung, kommt dem Einfluss der Zerfallsbiomasse eine deutlich höhere Bedeutung zu.

II.3.2.4. Einfluss des Trockensubstanzgehaltes auf die Hydrolyse

Trotz der Einbindung der Zerfallsbiomasse, konnte der freiwerdende Anteil an Ammonium bei der Vergärung von Grassilage nur unzureichend durch das Modell beschrieben werden. Da ferner der Trockensubstanzgehalt im Reaktor nur bedingt abgebildet werden konnte, lag die Vermutung nahe, dass die im Modell verankerten konstanten Hydrolyseraten die ablaufenden Prozesse nur unzureichend beschreiben. Aufbauend auf die Erkenntnisse aus Kapitel I.4.1 wurde der Einfluss des Feststoffgehaltes (TS) auf die Hydrolyse aller Fraktionen ins Modell integriert. Der Ansatz ist dabei jenem vom Vavilin et al. (2004) ähnlich, die den klassischen Monod-Term zur Beschreibung der Inhibierung von Hydrolyse bzw. Methanogenese durch organische Säuren nutzten. Mit Hilfe von Gleichung (27) wird die Hydrolysegeschwindigkeit der jeweiligen Fraktion in Abhängigkeit der Feststoffkonzentration reguliert:

$$\rho_j = k_{hyd} \cdot X \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{TS}{K_{hyd}} \right)^{n_{hyd}}} \quad (27)$$

ρ_j	Prozess 2-4 (Hydrolyse der Kohlenhydrate, Proteine und Fette)
k_{hyd}	Hydrolysekonstante der jeweiligen Fraktion [d^{-1}]
X	Konzentration partikulärer Stoffe der jeweiligen Fraktion [kg_{CSB}/m^3]
TS	Gesamtfeststoffkonzentration [% bzw. kg_{TS}/kg_{FM}]
K_{hyd}	Hemmkonstante der Hydrolyse [% bzw. kg_{TS}/kg_{FM}]
n_{hyd}	Hemmindex der Hydrolyse [-]

Die Funktion erlaubt die Beschreibung der Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit vom Wasser- bzw. Trockensubstanzgehalt. Hemmkonstante und -index wurden anhand der Messwerte für Ammonium und Trockensubstanz kalibriert.

II.3.2.5. Anpassung kinetischer Parameter

Das ADM1 zeichnet sich durch eine Vielzahl verschiedener biologischer, physikalischer und chemischer Parameter zur Beschreibung der ablaufenden Prozesse aus. Grundlegend wird zwischen stöchiometrischen und kinetischen Parametern unterschieden. Im Gegensatz zu ersteren, sind die Werte der kinetischen Parameter nicht immer universell anwendbar. Eine Veränderung äußerer Einflüsse (Substrat, Temperatur etc.) kann hier eine Anpassung erforderlich machen. Die kinetischen Parameter wiederum teilen sich in eine kleine Gruppe von Parametern, deren Werte sich experimentell bestimmen lassen und eine weit größere, deren Ermittlung losgelöst von anderen nicht möglich ist. Mittlerweile sind geeignete Parameterwerte für einige Bedingungen und Substrate aus praktischen Erfahrungen bekannt und können der Literatur entnommen werden. Mit der Simulation der Monofermentation von Grassilage wurde jedoch Neuland betreten, so dass nicht auf geeignete Publikationen zurückgegriffen werden konnte.

II.3.2.5.1. Experimentelle Bestimmung

Beispielhaft für die experimentelle Bestimmung eines kinetischen Parameters wird an dieser Stelle die Bestimmung der Desintegrationskonstante k_{Dis} bei der mesophilen Vergärung von

Grassilage im kontinuierlichen Betrieb beschrieben (Koch et al., 2009b). Der Vorteil gegenüber einer Ermittlung im Batchexperiment liegt in der "in-situ"-Bestimmung des Parameters im laufenden Betrieb (der später simuliert werden soll). Nachteilig kann sich der Einfluss anderer Parameter auswirken, deren Konstanz im Batchversuch einfacher sichergestellt werden kann.

Die Desintegration von partikulärem Material wird allgemein als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Biogasbildung angesehen (Pavlovstatis und Giraldo-Gomez, 1991) und ist im ADM1 standardmäßig mit einem Wert von 0,5 d^{-1} belegt. Die anschließende Hydrolyse der Einzelfraktionen läuft dagegen deutlich schneller ab (Standardwert von 10 d^{-1}). Inwiefern diese Unterteilung in zwei Schritte notwendig und sinnvoll ist, wurde u.a. von Feng (2004), Vavilin et al. (2008) und Wichern (2010) in Frage gestellt. Im Folgenden wurde postuliert, dass die Desintegration der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und somit bestimmt wurde.

Unter konstanten Bedingungen (Temperatur, Volumen und pH-Wert) genügt die Desintegrationsrate annähernd einer Kinetik erster Ordnung, die abhängig von der verbleibenden Konzentration an partikulärem CSB ist (Eastman und Ferguson, 1981):

$$\frac{dF}{dt} = -k_{Dis} \cdot F \qquad (28)$$

F	Masse an abbaubarem, partikulärem CSB [g]
k_{Dis}	Desintegrationskonstante erster Ordnung [h^{-1}]

Unter stationären Bedingungen ergibt sich für einen Rührkesselreaktor:

$$F = \frac{F_0}{1 + k_{Dis} \cdot \theta} \quad [g] \qquad (29)$$

F_0	Masse an abbaubarem, partikulärem CSB zum Zeitpunkt t=0 [g]
θ	hydraulische Aufenthaltszeit [h]

Unter der Annahme, dass die Menge an gelöstem Material konstant ist und die Desintegration der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wird Methan nur aus Material gebildet, welches zuvor desintegriert wurde. Die Methanproduktion kann folglich als eine Abnahme des CSB angesehen werden:

$$V = G \cdot (F_0 - F) \qquad [l] \tag{30}$$

V kumulierte Methanproduktion seit Substratzugabe [l_{CH4}]

G Transfer-Faktor [0.35 l_{CH4}/g_{COD}]

Der Transfer-Faktor ist der Reziprokwert des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) von Methan und kann mit der Dichte von Methan unter Standardbedingungen (0,72 g/l) berechnet werden. Die Vereinigung der Gleichungen (29) und (30) führt schließlich zur methanproduktionsbasierten Modifikation:

$$V = \frac{F_0 \cdot G \cdot k_{Dis} \cdot \theta}{1 + k_{Dis} \cdot \theta} \qquad [l] \tag{31}$$

Zur Ermittlung der Desintegrationskonstante k_{Dis} und $F_0 \cdot G$, was als maximaler Gasertrag interpretiert werden kann, wird die Methanproduktion nach Substratzugabe über einen bestimmten Zeitraum bestimmt. Dazu geeignet sind sowohl Batchexperimente als auch kontinuierliche Versuche. Bei letzteren ist jedoch sicherzustellen, dass sich der Reaktor in einem stabilen Gleichgewichtszustand befindet und somit annähernd der getroffenen Annahme der konstanten Konzentration an desintegriertem Material genügt.

Beispielhaft ist die Bestimmung der Desintegrationskonstante bei der mesophilen Vergärung von Grassilage dargestellt. Dafür wurde die Biogasproduktion über 24 h nach der Zugabe einer bestimmten Menge Grassilage (175 g TS) gemessen. Durch Linearisierung der Gleichung (31) ergibt sich ein linearer Zusammenhang, anhand dessen die Messwerte mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate gefittet werden:

$$1/\theta = k_{Dis} \cdot F_0 \cdot G \cdot 1/V - k_{Dis} \tag{32}$$

Wird nun 1/θ gegen 1/V aufgetragen, können die beiden Konstanten anhand des Anstiegs ($k_{Dis} \cdot F_0 \cdot G$) und des Schnittpunktes mit der Ordinatenachse ($-k_{Dis}$) der Trendlinie bestimmt werden (Abbildung 36).

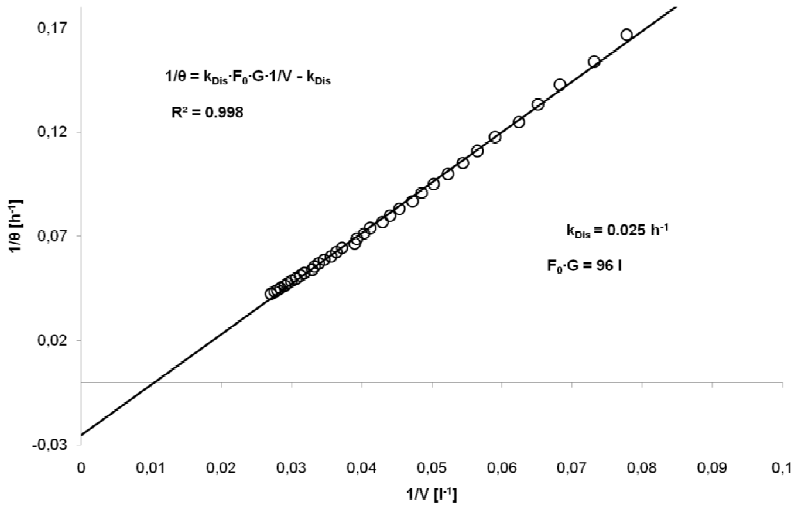


Abbildung 36: Bestimmung von k_{Dis} und $F_0 \cdot G$ anhand der Methangasproduktion über 24 Stunden nach Substratzugabe

Werden die beiden Konstanten nun in Gleichung (31) eingesetzt, lassen sich Messwerte und berechneter Verlauf der Gasproduktion gegenüberstellen (Abbildung 37). Für den konkreten Fall wird eine Desintegrationskonstante k_{Dis} von 0,6 d^{-1} (0,025 h^{-1}) und eine maximale Methanproduktion $F_0 \cdot G$ von 96 l ermittelt. Unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Zusammensetzung der verwendeten Grassilage laut Tabelle 10 und der sich aus den jeweiligen Fraktionen ergebenden Gaserträgen (Kaltschmitt et al., 2004), müsste der maximale Methanertrag für die 175 g TS Grassilage bei 73 l liegen. Damit liegt der mittels der beschriebenen Methode ermittelte Ertrag um 30 % über dem theoretischen, woraus geschlussfolgert werden kann, dass die anfänglich gemachte Annahme von der Konstanz an desintegriertem Material nicht vollständig zutrifft. Das Hauptanliegen war jedoch die Bestimmung der Desintegrationskonstante k_{Dis}, die, wie die Simulationsergebnisse in Kapitel II.3.2.8.1 und II.3.2.8.2 zeigen, die ablaufenden Vorgänge durchaus realistisch beschreibt.

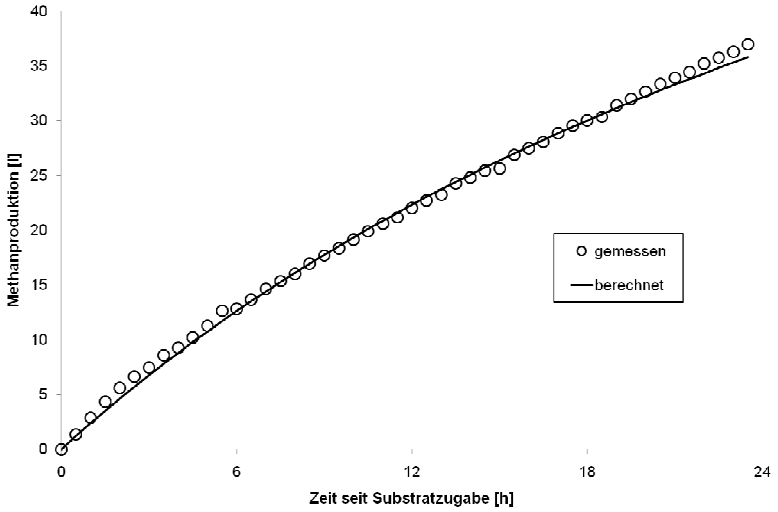


Abbildung 37: Gemessene und berechnete Methangasproduktion über 24 Stunden nach Substratzugabe

Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrolysekonstante von Grassilage anhand der Methangasproduktion auch im kontinuierlichen Betrieb ermittelt werden kann. Im Grunde genommen handelt es sich jedoch um eine Mischung aus Desintegration der Kompositmaterials und der Hydrolyse der Einzelfraktionen. Um die Hydrolyserate von Einzelfraktionen (Proteinen, Cellulose, etc.) zu bestimmen, ist man zwangsläufig auf Batchversuche angewiesen. Diese besitzen zwar den Vorteil, dass die Gasproduktion weitestgehend dem zugegebenen Material zugeschrieben werden kann. Nachteilig kann sich dagegen das notwendige vorherige "Aushungern" der Biozönose und die gegebenenfalls nicht auf das Substrat abgestimmte Bakterienkultur auswirken (Heuwinkel et al., 2009). Außerdem ist fraglich inwiefern diese Ergebnisse auf Praxisbedingungen übertragen werden können, wenn beispielsweise die Cellulose nicht in reiner kristalliner sondern in natürlicher Form mit etwaigen Inkrustierungen mit anderen Substanzen vorliegt.

II.3.2.5.2. Bestimmung mit Hilfe des Modells anhand der Messwerte

Ein Großteil der kinetischen Parameter des ADM1 kann - losgelöst von anderen - nicht bestimmt werden. Während des anaeroben Abbaus spielen neben Wasserstoff vor allem die organischen Säuren eine zentrale Rolle. Eine akkurate Abbildung der organischen Säuren ist insofern von großer Bedeutung für die gesamte Simulation, als dass die jeweilige Konzentration entscheidend auf eine Vielzahl von Prozessen einwirkt. Der Abbau von Acetat, Propionat und Butyrat bzw. Valerat wird von der Halbsättigungskonzentration K_S, der

maximalen Aufnahmerate k_m und der Inhibierungskonstante K_I gegenüber Ammoniak (Acetat) bzw. Wasserstoff (Propionat und Butyrat bzw. Valerat) beeinflusst. Gleichung (33) zeigt exemplarisch die Prozessrate für Buttersäure, wie sie im ADM1 Verwendung findet. Im Modell wird angenommen, dass Butter- und Valeriansäure durch die gleiche Mikroorganismengruppe abgebaut werden, weshalb die jeweiligen Parameter als C4 zusammengefasst wurden.

$$\rho_j = k_{m_C4} \cdot \frac{S_{Bu}}{K_{S_C4} + S_{Bu}} \cdot X_{C4} \cdot \frac{1}{1 + S_{Va}/S_{Bu}} \cdot \frac{1}{1 + S_{H2}/K_{I_H2_C4}} \cdot I_{pH} \cdot I_{IN} \qquad (33)$$

ρ_j	Rate des Prozesses j [$kg_{CSB}/(m^3 \cdot d)$]
k_{m_C4}	maximale Aufnahmerate [$kg_{CSB}/(kg_{CSB} \cdot d)$]
S_{Bu}	Konzentration an gelöster Buttersäure [kg_{CSB}/m^3]
K_{S_C4}	Halbsättigungskonzentration [kg_{CSB}/m^3]
X_{C4}	Konzentration an butter-/valeriansäureabbauender Biomasse [kg_{CSB}/m^3]
S_{Va}	Konzentration an gelöster Valeriansäure [kg_{CSB}/m^3]
S_{H2}	Konzentration an Wasserstoff [kg_{CSB}/m^3]
$K_{I_H2_C4}$	Inhibitionskonstante durch Wasserstoff [kg_{CSB}/m^3]
I_{IN} bzw. I_{pH}	Inhibitionsterme für anorganischen Stickstoff und pH-Wert

Bei Essigsäure tritt an die Stelle des Inhibitionsterms für Wasserstoff der für Ammoniak. Außerdem verschwindet der Term, der die kompetitive Hemmung durch die Konkurrenz von Butter- und Valeriansäure um C4 beschreibt. Anhand der Gleichung lassen sich in Anhängigkeit von der jeweiligen Konzentration bereits jene Parameter ableiten, die vermutlich sensitiv reagieren werden. Während eine Kalibrierung von k_m meistens einen Einfluss auf die Simulationsergebnisse hat, ist dies für K_S nur dann der Fall, wenn die Konzentration der dazugehörigen Säure S verhältnismäßig gering ist. Bei hohen Konzentrationen fällt der Einfluss von K_S weniger ins Gewicht, da der Monodterm sich 1 annähert (im Bereich von mehr als 4 K_S). Genau andersherum verhält es sich mit K_I. Hier steigt die Sensitivität des Parameters mit erhöhten Konzentrationen an Wasserstoff (bzw. an Ammoniak im Falle von Essigsäure). Neben diesen direkten Faktoren gibt es noch weitere indirekte Einflüsse, die sich ebenfalls auf die Konzentration der jeweiligen Säure innerhalb der Simulation auswirken. Dazu zählen etwa die Konzentration anderer Säure, der Wasserstoff- und Ammoniakgehalt sowie der pH-Wert.

Bei der Bestimmung dieser kinetischen Parameter war das Vorgehen wie folgt. Zunächst werden die Standardwerte des ADM1 angesetzt (vgl. Tabelle 4 und Tabelle 5). Mittels einer Sensitivitätsanalyse oder anhand von Erfahrungswerten werden sensitive Parameter ausgewählt und für die Simulation um den Standardwert variiert (z.B. von 50 % bis 200 % des Ursprungswertes). Diese Variation kann je nach Aufwand entweder rein kombinatorisch sein (jedes mögliche Parametertupel wird simuliert) oder es werden mit Hilfe eines Zufallsgenerators zufällige Wertepaare generiert (nur einige Tupel werden simuliert). Bei beiden Ansätzen wird das erzeugte Parametertupel an die Simulation übergeben und gemeinsam mit den entsprechenden Simulationsergebnissen in einer Matrix abgelegt. In Abbildung 38 sind exemplarisch zwei Simulationsergebnisse (durchgehende Linie) mit unterschiedlicher Inhibitionskonstante KI_H2_C4 den einzelnen Messwerten gegenübergestellt.

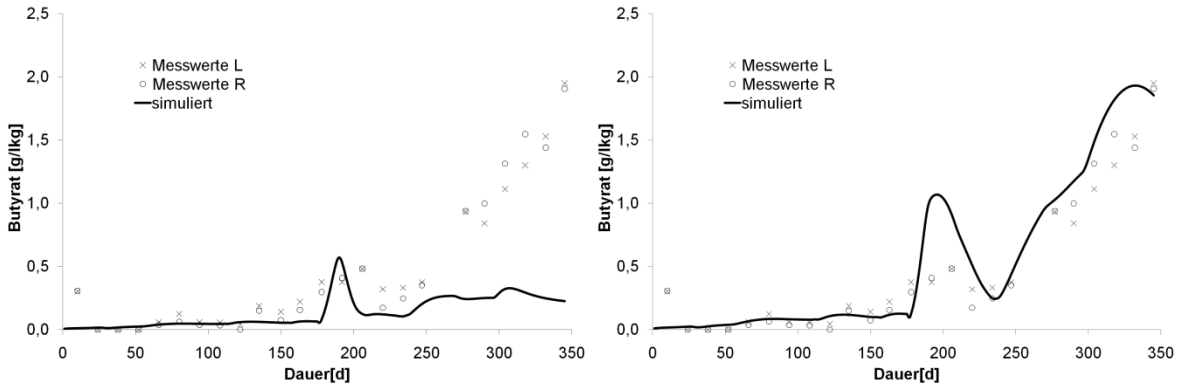


Abbildung 38: Simulations- und Messwerte von Butyrat bei der Änderung von $K_{I_H2_C4}$

Es wird deutlich, dass die Simulation in der rechten Abbildung besser die Dynamik der Messwerte trifft als in der linken. Bisher wurde die Parameteranpassung zumeist durch einen visuellen Vergleich zwischen Simulations- und Messwerten vorgenommen (Boubaker und Ridha, 2008; Qu et al., 2009; Ramirez et al., 2009; Schoen et al., 2009). Dieses Vorgehen ist allerdings subjektiv und hängt im starken Maße von den Erfahrungen des Anwenders ab. Um sich nicht auf subjektive visuelle Eindrücke verlassen zu müssen, bedarf es objektiver Kriterien zur Beschreibung der Güte einer Simulation gegenüber den Messwerten. Eine weit verbreitete Möglichkeit ist die der kleinsten Fehlerquadrate, wobei E zwischen 0 und ∞ liegt:

$$E = \sum_{i=1}^{n} \left(X_{gemessen} - X_{simuliert} \right)^2 \quad (34)$$

E	Güte der Simulation [-]
$X_{gemessen}$	Messwert an der Stelle n
$X_{simuliert}$	Simulationswert an der Stelle n

Der große Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der Quantifizierung, wobei kleine Werte für eine geringe Abweichung der Simulation von den Messwerten und damit für eine gute Anpassung stehen. Der Nachteil liegt in der mangelnden Vergleichbarkeit der Güte zweier Simulationen mit Parametern unterschiedlicher Größenordnung. Das Ergebnis wird beispielweise schon dadurch deutlich verändert, wenn eine beliebige Konzentration mit 1.000 - 5.000 mg/l statt mit 1 - 5 g/l eingeht. Außerdem werden einzelne Ausreißer durch die Quadrierung deutlich stärker bewertet als eine durchgängig geringe Diskrepanz. E besitzt in diesem Fall auch keinerlei Aussagekraft und kann nur relativ zur Bewertung einer anderen Simulation der gleichen Bezugsgröße herangezogen werden.

Die Bewertung der Güte einer Simulation anhand von Messwerten ist bei allen Modellen von Nöten. Die Möglichkeiten zur Berechnung sind ebenso zahlreich wie komplex. In der Hydrologie hat sich der sogenannte Nash-Sutcliffe-Koeffizient (Nash und Sutcliffe, 1970) durchgesetzt. Durch eine Normierung wird sichergestellt, dass eine Beurteilung unabhängig von der Größenordnung der Einheiten erfolgen kann. Damit ist es nicht nur möglich Simulationsergebnisse verschiedener Parameter miteinander zu vergleichen, sondern außerdem den Grad der Güte zu quantifizieren. In seiner modifizierten Form wurden die Quadrierungen der Differenzen durch Beträge ersetzt, um einer Anfälligkeit gegenüber Ausreißern vorzubeugen. Dadurch wird garantiert, dass eine einzelne große Differenz genauso stark eingeht wie zwei Differenzen mit dem halben Wert:

$$E_{NSK} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} \left| X_{gemessen} - X_{simuliert} \right|}{\sum_{i=1}^{n} \left| X_{gemessen} - \overline{X}_{gemessen} \right|} \quad (35)$$

$\overline{X}_{gemessen}$	Mittelwert der Messwerte

Der Nash-Sutcliffe-Koeffizient (NSK) bewegt sich immer zwischen -∞ und 1, wobei ein Wert von 1 als eine genaue Übereinstimmung mit den Messwerten zu verstehen ist. Ein Wert von 0 bedeutet, dass die Simulation so gut wie der einfache Durchschnitt der Messwerte ist.

Negative Werte bewerten das Modell schlechter als den Mittelwert. Durch die Normierung ist es möglich, die Güte der Simulation quantitativ zu bewerten. Ein NSK von 0,6 bedeutet beispielsweise, dass eine 60-prozentige Übereinstimmung mit den Messwerten erreicht wurde. Für das Beispiel aus Abbildung 38 ergibt sich für das linke Bild ein Nash-Sutcliffe-Koeffizient von 0,24 (0,15) und für das rechte von 0,67 (0,57) gegenüber den Messwerten von Reaktor L (Reaktor R). Der visuelle Eindruck konnte also mit Zahlenwerten quantifiziert werden.

Integriert man die Berechnung des Nash-Sutcliffe-Koeffizienten in die Simulation, kann man für jede Kombination aus Parametern einen Wert erhalten. Exemplarisch ist in Abbildung 39 die Entwicklung des NSK auf Basis der Messdaten für die mesophile Vergärung für Butyrat bei Variation von K_{S_C4} (Standardwert: 0,3 kg_{CSB}/m^3) und k_{m_C4} (Standardwert: 20 d^{-1}) und konstantem $K_{I_H2_C4}$ sowie bei Variation von $K_{I_H2_C4}$ (Standardwert: $5 \cdot 10^{-8}$ kg_{CSB}/m^3) und k_{m_C4} (Standardwert: 20 d^{-1}) und konstantem K_{S_C4} dargestellt. Eine Variation von 1,0 entspricht dem Standardwert (Koch et al., 2010).

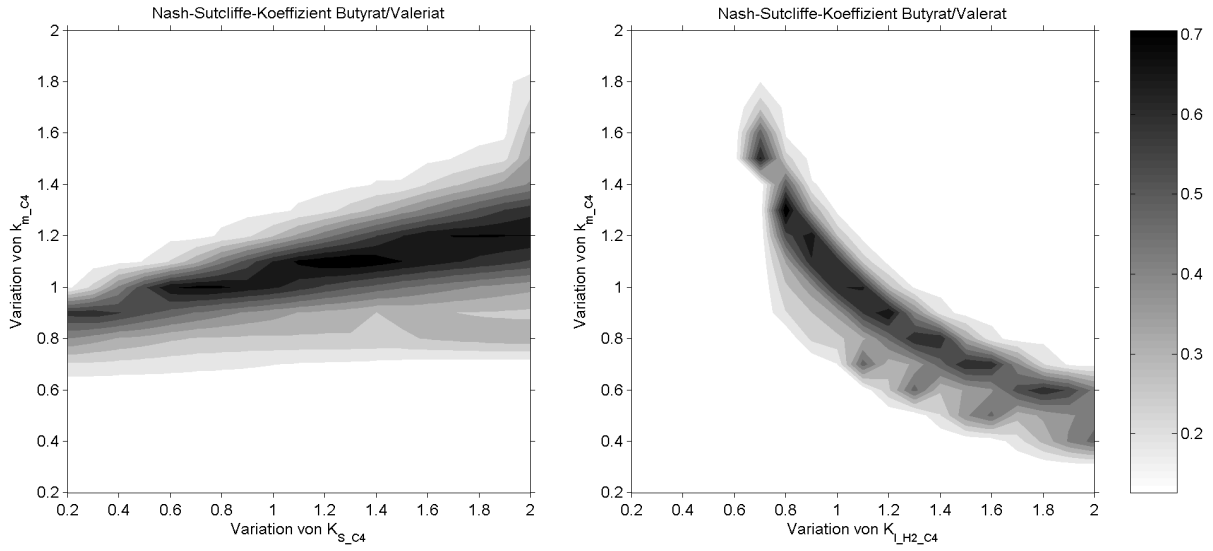


Abbildung 39: Nash-Sutcliffe-Koeffizient für Butyrat bei Variation von K_{S_C4}, k_{m_C4} und $K_{I_H2_C4}$

Die linke Grafik weist vor allem in den Randbereichen sichtbare Sensitivitäten gegenüber der Parameteränderung auf, während im mittleren Bereich ein globales Maxima verläuft. Die Einflussnahme des Halbsättigungskoeffizienten K_{S_C4} auf die Simulationsergebnisse ist außerdem deutlich geringer als jene durch die maximale Aufnahmerate k_{m_C4}. In der rechten Grafik wird deutlich, dass die Güte der Simulation mit steigendem $K_{I_H2_c4}$ und fallendem k_{m_C4} und umgekehrt steigt. Selbst durchaus unterschiedlichen Wertepaaren können teilweise

recht ähnliche Koeffizienten zugeordnet werden. Dieses Phänomen, dass man mit unterschiedlichen Parametern ähnliche Ergebnisse erhält, wird als Äquifinalität bezeichnet. Für die Simulation ist diese Erkenntnis insofern von grundlegender Bedeutung, als dass nicht immer eindeutig kalibriert werden kann. Es kann also vorkommen, dass ein Modell trotz unterschiedlicher Parametersätze vergleichbare Ergebnisse liefert. Vielfach kommt es aufgrund des überbestimmten Systems dazu, dass sich mehrere Parameter gegenseitig kompensieren. Genau aus diesem Grund wird versucht, nur so viele Parameter zu verändern wie unbedingt nötig. Durch die Nutzung des Nash-Sutcliffe-Koeffizienten muss nicht jede Simulation visuell ausgewertet werden, da das Programm selbstständig nach der Kombination mit dem höchsten Wert suchen kann. Ergänzende Betrachtungen und weiterführende Simulationsstudien zur Identifizierung des Einflusses der kinetischen Parameter k_m, K_S und K_I auf die jeweilige Simulationsgüte der Konzentrationen an Wasserstoff, Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure sind beispielsweise in Koch (2010) zu finden.

II.3.2.6. Simulation der Vergärung von Maissilage

Die Abbildung des liegenden und stehenden Fermenters der Containeranlage im Simulationsmodell erfolgte durch ideale Reaktoren. Ideale Reaktoren stellen Modellsysteme dar, für die die Durchmischungs- und Transportprozesse genau definiert sind. Der stehende Fermenter wurde dabei als ein Rührkesselreaktor (CSTR) abstrahiert, für den ein intensiv durchmischtes Volumen, in dem keine Konzentrationsgradienten auftreten, angenommen wurde. Wird der liegende Fermenter als Pfropfenstromreaktor betrachtet, wird eine vollständige Durchmischung nur quer zur Fließrichtung angenommen und als interner Transportprozess wird ausschließlich die Advektion in Fließrichtung betrachtet. Für solch ein System können Konzentrationsgradienten entlang der Längsachse auftreten, so dass ein CSTR zur mathematischen Beschreibung ungeeignet ist. Im dem verwendeten Simulationspaket SIMBA/Matlab/Simulink ist keine Modellbibliothek zur Abbildung eines Pfropfenstrom-reaktors vorhanden. Da sich durch eine Reihenschaltung unendlich vieler und unendlich kleiner CSTRs ein Pfropfenstromreaktor abbilden lässt, wurde versucht, den liegenden Fermenter durch eine Rührkesselkaskade abzubilden. Die Bestimmung der Anzahl an Rührkesseln erfolgte durch die Abbildung des Tracerversuchs, wie in Kapitel II.3.1.1 beschrieben, im Simulationsmodell.

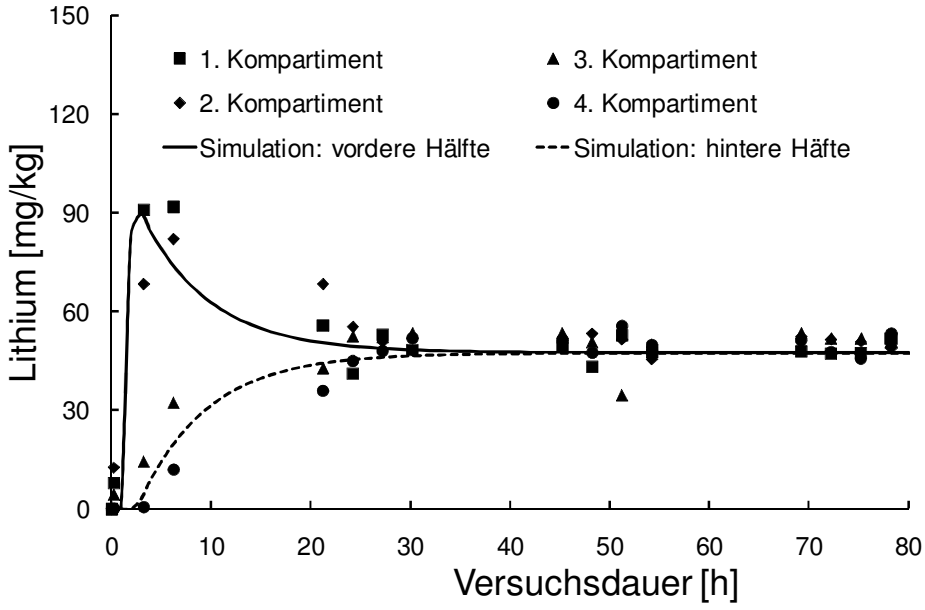


Abbildung 40: Simulation des Tracerversuchs nach Zugabe von 100 g Lithiumchlorid; analytische Bestimmung der Tracersubstanz als Lithium in mg pro kg Fermenterinhalt

Zur Darstellung des Konzentrationsverlaufs der Tracersubstanz entlang der Hauptachse des liegenden Fermenters, wurde diese nach Zugabe über einen definierten Zeitraum für die 4 einzelnen Kompartimente bestimmt. Die Ergebnisse in Abbildung 40 zeigen, dass sich die ersten beiden Kompartimente und die letzten beiden Kompartimente jeweils zusammengenommen ähnlich verhalten. Zudem ist bereits nach einem Tag die Lithiumkonzentration über alle 4 Kompartimente und somit im gesamten Reaktor gleichmäßig verteilt. Für die Simulation des Tracerversuchs wurde eine Rührkesselkaskade bestehend aus zwei gleich großen Reaktoren gewählt, die somit den vorderen und hinteren Teil des liegenden Fermenters darstellen. Zudem wurde eine Rezirkulation des Ablaufs des zweiten Modellreaktors zum ersten Modellreaktor implementiert, wodurch eine teilweise Rückmischung realisiert wurde. Der Rezirkulationsstrom entsprach dabei dem 200fachen des Zulaufstromes. Die Leistung der so implementierten Rührkesselkaskade entspricht eher derjenigen eines einzelnen Reaktors als der Leistung einer 2-Reaktor-Kaskade. Diese Ergebnisse verdeutlichen wie schon die CFD-Simulationen, dass ein Pfropfenstrom im liegenden Fermenter nicht vorlag. Abbildung 41 zeigt die Darstellung der Containeranlage als Simulationsmodell in SIMBA.

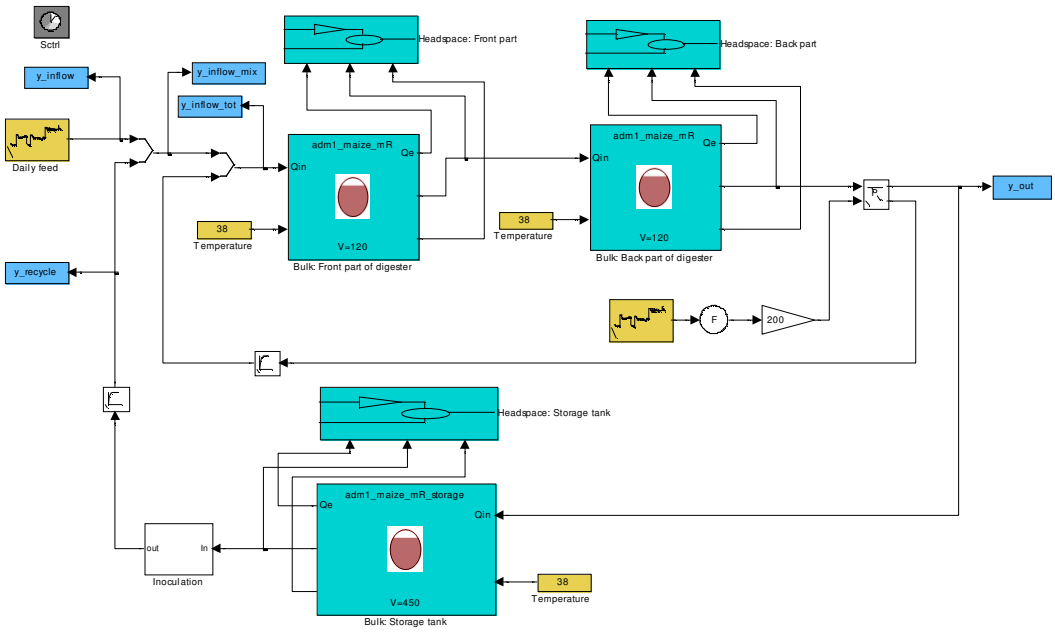


Abbildung 41: Abbildung der Containeranlage in SIMBA

Bei den Versuchen mit Maissilage wurde die ADM1-Stofffraktion des Kompositmaterials durch eine zusätzliche Stofffraktion für langsam abbaubare Kohlenhydrate ersetzt. Durch Laborexperimente wurde in der Arbeit von Lübken (2009) gezeigt, dass einzelne Fraktionen des Lignocellulosekomlexes unterschiedliche Hydrolyseraten besitzen. So wurde die Hydrolyserate von Stärke zu 1,20 d^{-1}, die Hydrolyserate von Hemicellulose zu 0,70 d^{-1} und die Hydrolyserate von Cellulose zu 0,18 d^{-1} bestimmt. Dieser Zusammenhang wurde im Simulationsmodell dahingehend berücksichtigt, dass die ADM1-Stofffraktion für die Kohlenhydrate in eine langsam (Cellulose) und eine schnell (Hemicellulose und Stärke) abbaubare Fraktion unterteilt wurde. Die Abbildung der Hydrolyse der Kohlenhydrate erfolgt im Modell zu:

$$\rho_{1a} = k_{hyd_CH_l} \cdot X_{CH_l} = 0{,}18 \cdot X_{CH_l} \qquad [kg_{CSB}/(m^3 \cdot d)] \qquad (36)$$

$$\rho_{1b} = k_{hyd_CH_s} \cdot X_{CH_s} = 0{,}70 \cdot X_{CH_s} \qquad [kg_{CSB}/(m^3 \cdot d)] \qquad (37)$$

ρ_{1a}	Prozessrate der langsam abbaubaren Kohlenhydrate ($kg_{CSB}/(m^3*d)$)
ρ_{1b}	Prozessrate der schnell abbaubaren Kohlenhydrate ($kg_{CSB}/(m^3*d)$)
$k_{hyd_CH_l}$	Hydrolyserate für Cellulose (d^{-1})
$k_{hyd_CH_s}$	Hydrolyserate für Hemicellulose (d^{-1})
X_{CH_l}	ADM1-Stofffraktion für langsam abbaubare Kohlenhydrate (kg_{CSB}/m^3)
X_{CH_s}	ADM1-Stofffraktion für schnell abbaubare Kohlenhydrate (kg_{CSB}/m^3)

Bei der Modellkalibrierung wurde versucht, eine optimale Übereinstimmung zwischen Messdaten und Simulation zu erreichen. Die Simulationsergebnisse, wie sie in den folgenden Kapiteln II.3.2.6.1 bis II.3.2.7.2 dargestellt sind, wurden mit dem in Tabelle 13 und Tabelle 14 aufgelisteten Parametersatz erreicht.

Tabelle 13: Kinetische ADM1 Parameter für Maissilage

Parameter	Einheit	Mesophil: Maissilage	Thermophil: Maissilage	Prozess
Hydrolyse				
k_{hyd,CH_s}	d^{-1}	**0,18**	**0,36**	Desintegration
k_{hyd,CH_r}	d^{-1}	**0,70**	**1,40**	Hydrolyse Kohlenhydrate
k_{hyd_PR}	d^{-1}	**0,30**	**0,60**	Hydrolyse Proteine
k_{hyd_LI}	d^{-1}	10	**2**	Hydrolyse langk. Fettsäuren
Sonstiges				
k_{dec}	d^{-1}	**0,10**	**0,20**	Decayrate der Biomassen
$K_{S,IN}$	kmol m^{-3}	$1x10^{-4}$	$1x10^{-4}$	Halbsättigungskonzentration NH_3
$pH_{ULacet/acid}$	-	5,5	5,5	Obere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$.
$pH_{LLacet/acid}$	-	4	4	Untere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$
Zuckerfermentation				
$k_{m,su}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	30	70	Aufnahmerate
$K_{S,su}$	$kg_{CSB}\ m^{-3}$	0,5	1,0	Halbsättigungskonzentration
Y_{su}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,10	0,10	Ertragskoeffizient
Aminosäurenfermentation				
$k_{m,aa}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	50	70	Aufnahmerate
$K_{S,aa}$	$kg_{CSB}\ m^{-3}$	0,3	0,3	Halbsättigungskonzentration
Y_{aa}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,08	0,08	Ertragskoeffizient
Fettsäurenoxidation				
$k_{m,fa}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	6	10	Aufnahmerate
$K_{S,fa}$	$kg_{CSB}\ m^{-3}$	0,4	0,4	Halbsättigungskonzentration
Y_{fa}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,06	0,06	Ertragskoeffizient
$K_{I,H2,fa}$	$kg_{CSB}\ m^{-3}$	$5x10^{-6}$	-	Inhibitionskonstante H_2
Butters.-/Valerians.fermentation				
$k_{m,c4+}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	20	**18**	Aufnahmerate
$K_{S,c4+}$	$kg_{CSB}\ m^{-3}$	0,2	0,4	Halbsättigungskonzentration
Y_{c4+}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,06	0,06	Ertragskoeffizient
$K_{I,H2,c4+}$	$kg_{CSB}\ m^{-3}$	$1,0x10^{-5}$	**$5.55x10^{-6}$**	Inhibitionskonstante H_2
Oxidation Propionsäure				
$k_{m,pro}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	**5,6**	**12,0**	Aufnahmerate
$K_{S,pro}$	$kg_{CSB}\ m^{-3}$	**0,12**	0,3	Halbsättigungskonzentration
Y_{pro}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,04	0,05	Ertragskoeffizient
$K_{I,H2,pro}$	$kg_{CSB}\ m^{-3}$	$3,5x10^{-6}$	$1,0x10^{-5}$	Inhibitionskonstante H_2
Acetoclastische Methanogenese				
$k_{m,ac}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	**9,50**	**17**	Aufnahmerate
$K_{S,ac}$	$kg_{CSB}\ m^{-3}$	0,15	**0,30**	Halbsättigungskonzentration
Y_{ac}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,05	0,05	Ertragskoeffizient
$pH_{UL\ ac}$	-	7	7	Obere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$
$pH_{LL\ ac}$	-	6	6	Untere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$
$K_{I,NH3}$	kmol m^{-3}	**0,0055**	0.011	Inhibitionskonstante NH_3
Hydrogenotrophe Methanogenese				
$k_{m,h2}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	**28**	35	Aufnahmerate
$K_{S,h2}$	$kg_{CSB}\ m^{-3}$	$7x10^{-6}$	**$1,16x10^{-4}$**	Halbsättigungskonzentration
Y_{h2}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,06	0,06	Ertragskoeffizient
$pH_{UL\ h2}$	-	6	6	Obere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$
$pH_{LL\ h2}$	-	5	5	Untere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$

Tabelle 14: Stöchiometrische ADM1 Parameter

Parameter	Einheit	Mesophil: Maissilage und Mischung Mais/Gras	Thermophil: Maissilage und Mischung Mais/Gras	Beschreibung
Stöchiometrische Faktoren				
$f_{FA,li}$	-	0,95	0,95	Kurzk. Fetts. aus langk. Fettsäuren
$f_{H2,su}$	-	0,19	0,19	Wasserstoff aus Zucker
$f_{BU,su}$	-	0,13	0,13	Buttersäure aus Zucker
$f_{PRO,su}$	-	0,27	0,27	Propionsäure aus Zucker
$f_{AC,su}$	-	0,41	0,41	Essigsäure aus Zucker
$f_{H2,aa}$	-	0,06	0,06	Wasserstoff aus Aminosäuren
$f_{VA,aa}$	-	0,23	0,23	Valeriansäure aus Aminosäuren
$f_{BU,aa}$	-	0,26	0,26	Buttersäure aus Aminosäuren
$f_{PRO,aa}$	-	0,05	0,05	Propionsäure aus Aminosäuren
$f_{AC,aa}$	-	0,04	0,04	Essigsäure aus Aminosäuren
$f_{H2,fa}$	-	0,30	0,30	Wasserstoff aus Fettsäuren
$f_{AC,fa}$	-	0,70	0,70	Essigsäure aus Fettsäuren
Stickstoffgehalte				
N_I	$Mol_N g_{CSB}^{-1}$	**0**	**0**	Inertmaterial
N_{XP}, N_{AA}	$Mol_N g_{CSB}^{-1}$	0,007	0,007	Aminosäuren und Proteine
N_{XP}	$Mol_N g_{CSB}^{-1}$	**0,0043**	**0,0043**	Biomassezerfallsprodukte
N_{BM}	$Mol_N g_{CSB}^{-1}$	0,00625	0,00625	Biomasse
Kohlenstoffgehalte				
C_{XI}, C_{SI}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,03	0,03	Inertmaterial
$C_{XP}^{(1)}$	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	-	-	Biomassezerfallsprodukte
C_{AA}, C_{XPR}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,03	0,03	Aminosäuren und Proteine
C_{XCH}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,0313	0,0313	Kohlenhydrate
C_{XLI}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,022	0,022	Langkettige Fettsäuren
C_{SU}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,0313	0,0313	Zucker
C_{FA}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,0217	0,0217	Kurzkettige Fettsäuren
C_{PRO}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,0268	0,0268	Propionsäure
C_{VA}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,024	0,024	Valeriansäure
C_{BU}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,025	0,025	Buttersäure
C_{AC}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,0213	0,0213	Acetat
C_{ME}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,0156	0,0156	Methan
C_{BM}	$Mol_C g_{CSB}^{-1}$	0,0313	0,0313	Biomasse

II.3.2.6.1. Mesophile Betriebsweise mit Gärrestrückführung

Die mesophile Monofermentation von Maissilage mit Gärrestrückführung wurde über einen Zeitraum von 150 Tagen durchgeführt. Eine variierende Menge an Gärrest aus dem Ablauf des stehenden Fermenters wurde dabei mit der Maissilage gemischt und einmal täglich dem liegenden Fermenter hinzugegeben. Die organische Belastungsrate OLR wurde schrittweise von 1,64 auf 3,50 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ gesteigert. Die hydraulische Aufenthaltszeit HRT variierte je nach Belastungsstufe zwischen 13 und 62 Tagen. Für den gesamten Versuchsabschnitt wurde ein spezifischer Gasertrag Y_{Gas} von 655 $L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$ erreicht, mit einem Maximum von 715 $L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$ bei niedrigster Raumbelastung und einem Minimum von 571 $L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$ bei höchster Raumbelastung. Alle Angaben beziehen sich dabei ausschließlich auf den liegenden Fermenter. Die wesentlichen Betriebsdaten sind in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Betriebsdaten bei der mesophilen Monofermentation von Maissilage mit Gärrestrückführung (Daten sind ausschließlich auf den liegenden Fermenter bezogen)

Periode (d)	Verhältnis Maissilage/Gärrest (v/v)	OLR ($kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$)	HRT (d)	Y_{Gas} ($L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$)
(1) 0-16	1:2	1,64	62	716
(2) 17-48	1:2	2,05	49	703
(3) 49-59	1:2	2,33	57	660
(4) 60-102	1:2	2,91	46	678
(5) 103-120	1:8	3,50	13	571
(6) 121-150	1:8	3,33	13	605

Abbildung 42 und Abbildung 43 zeigen einen Vergleich zwischen simulierten und gemessenen Parametern. Da der stehende Fermenter auf Grund der vergleichsweise niedrigen Belastung nur eine geringe Dynamik aufwies, sind Simulationsergebnisse nur für den liegenden Fermenter dargestellt. Obwohl einige Prozessparameter nur eine geringfügige Dynamik aufweisen wird dennoch klar deutlich, dass sich wesentliche Prozessgrößen mit dem kalibrieten ADM1 dynamisch simulieren lassen. Von besonderem Interesse ist hier der Abschnitt mit den höchsten Belastungsstufen von Tag 103 bis 150. Für diesen Zeitraum ist ein Abfall in der spezifischen Gasproduktion zu verzeichnen, während die absolute Biogasproduktion unverändert bleibt. Dieser Sachverhalt ist auf die verringerte hydraulische Verweilzeit zurückzuführen, wodurch ein größer werdender Teil des Zulaufsubstrats nicht mehr im liegenden Fermenter abgebaut wird, sondern in den stehenden Fermenter verlagert wird. Zusätzlich erfolgt in diesem Zeitabschnitt ein Anstieg der Essigsäure- und Propionsäurekonzentration. Sowohl der Zeitpunkt des Säureanstiegs als auch dessen Höhe werden im Simulationsmodell erfasst.

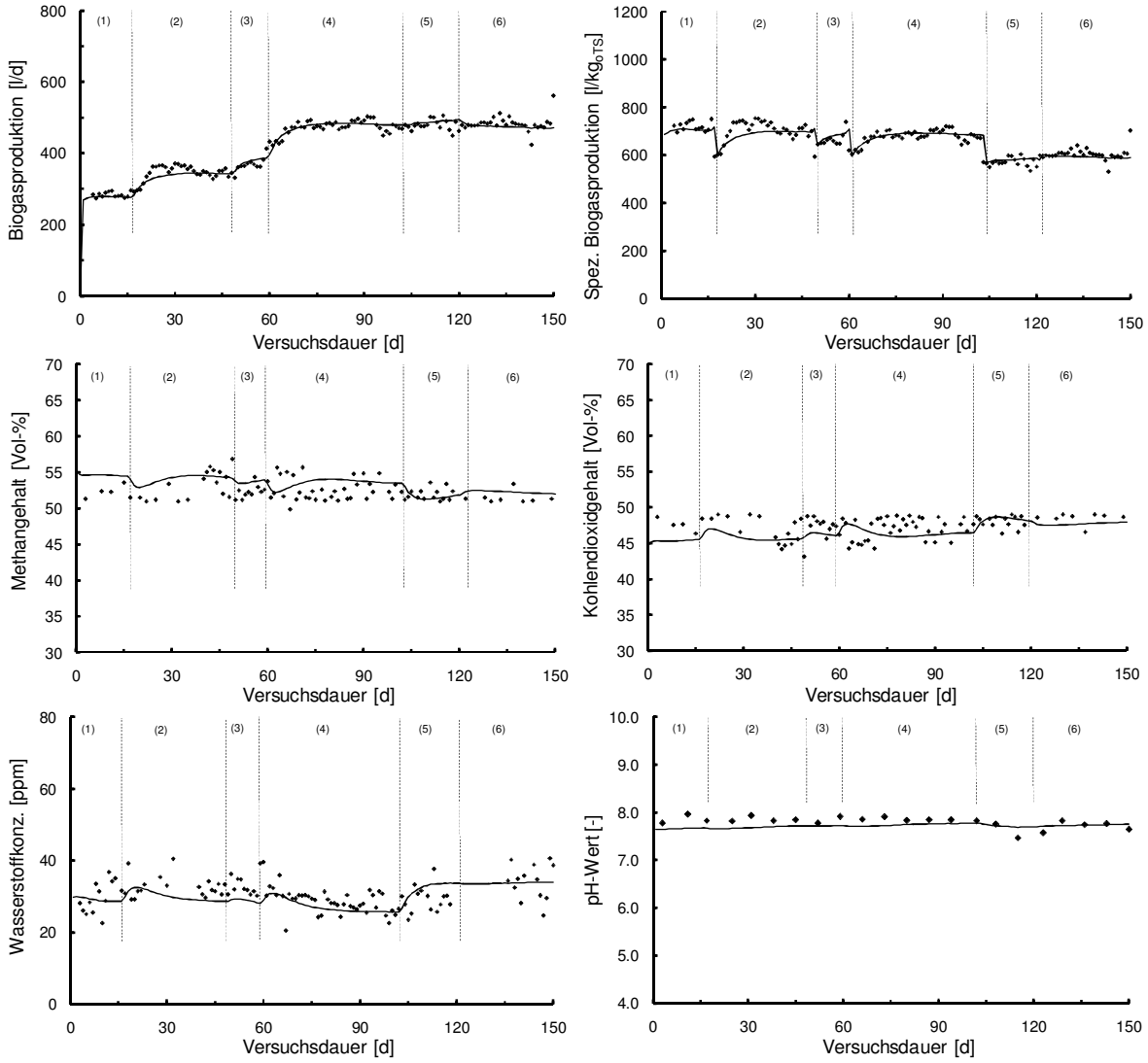


Abbildung 42: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, spezifische Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffgehalt, sowie dem pH-Wert bei der mesophilen Vergärung von Maissilage (mit Gärrestrückführung); Nummerierung der einzelnen Betriebsperioden entsprechend Tabelle 15

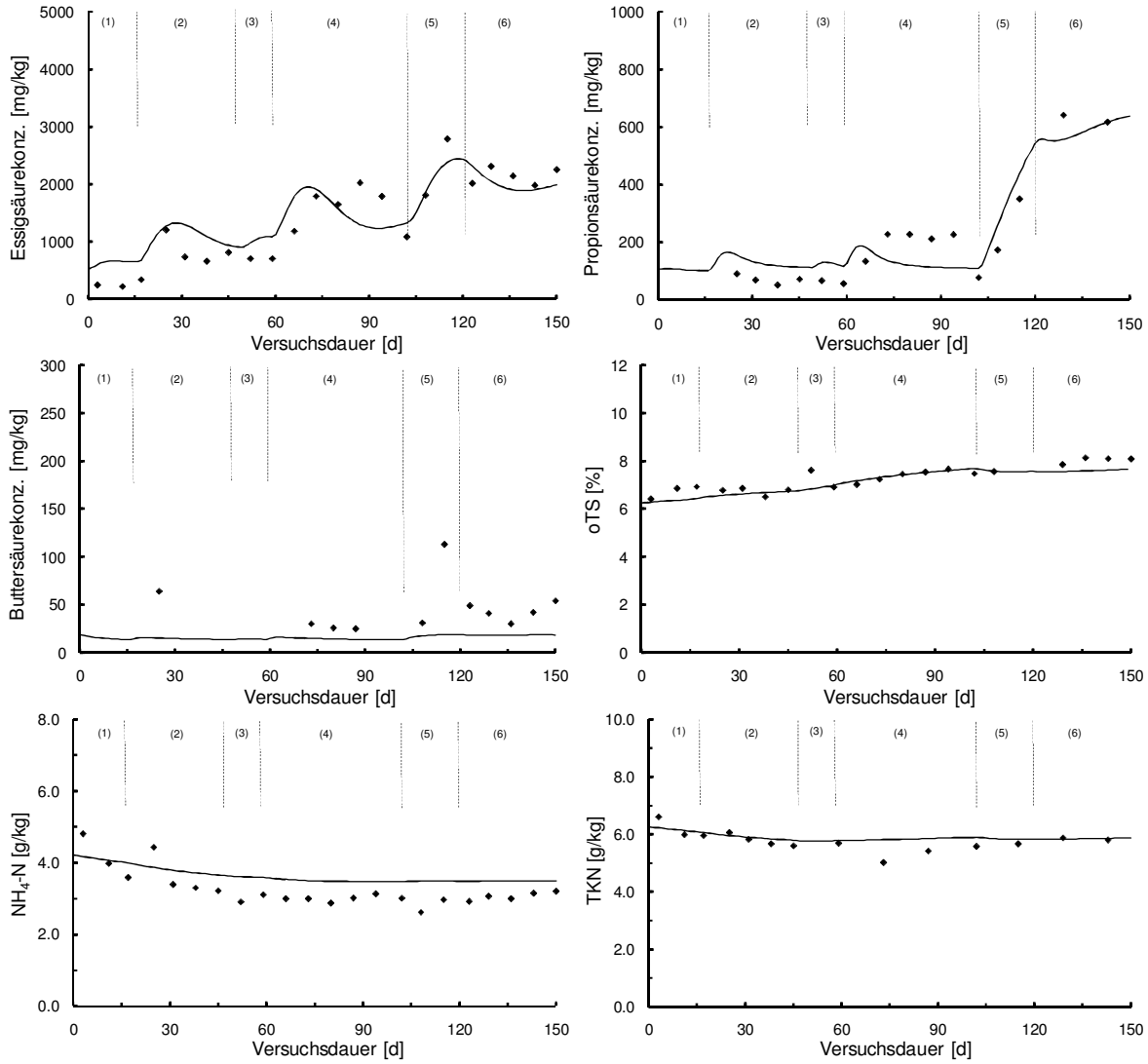


Abbildung 43: Vergleich Simulations- und Messwerte für Essigsäure-, Propionsäure-, Buttersäurekonzentration, organischem Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff und TKN bei der mesophilen Vergärung von Maissilage (mit Gärrestrückführung); Nummerierung der einzelnen Betriebsperioden entsprechend Tabelle 15

II.3.2.6.2. Mesophile Betriebsweise ohne Gärrestrückführung

Die mesophile Monofermentation von Maissilage ohne Gärrestrückführung erfolgte über einen Zeitraum von 344 Tagen. Die Betriebsdaten für diesen Zeitraum sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Betriebsdaten bei der mesophilen Monofermentation von Maissilage ohne Gärrestrückführung. Daten sind ausschließlich auf den liegenden Fermenter bezogen

Periode (d)	OLR ($kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$)	HRT (d)	Y_{Gas} ($L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$)
(1) 0-15	0,50	800	896
(2) 16-35	1,00	400	627
(3) 36-66	1,50	267	712
(4) 67-148	1,90	200	742
(5) 149-206	2,40	160	660
(6) 207-294	2,50	126	674
(7) 295-315	3,10	104	680
(8) 316-344	3,60	89	663

Der durchschnittliche spezifische Gasertrag ist mit 695 $L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$ etwas höher als im Versuchszeitraum mit Gärrestrückführung. Der sehr hohe maximale spezifische Gasertrag von 896 $L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$ wurde bei einer sehr niedrigen Raumbelastung von 0,50 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ erzielt. Hier muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Beginn dieser Versuchsperiode durch ein „Nachgasen“ nicht abgebauter organischer Substanz aus dem vorherigen Abschnitt beeinflusst worden sein konnte. Bei der höchsten Raumbelastung von 3,60 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ wurde noch ein spezifischer Gasertrag von 663 $L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$ erzielt, was 16% über dem Wert bei vergleichbarer Raumbelastung aus der vorangegangenen Versuchsperiode lag. Bei diesem Vergleich muss berücksichtigt werden, dass die hydraulischen Aufenthaltszeiten für den liegenden Fermenter in der Versuchsreihe ohne Gärrestrückführung wesentlich höher waren im Vergleich zu den Versuchen mit Gärrestrückführung. Durch die Gärrestrückführung sollte der liegende Fermenter permanent mit aktiver Biomasse neuinokuliert werden, wodurch sowohl ein höherer Abbaugrad als auch eine bessere Prozessstabilität angestrebt wurde. Vor allem die Gefahr des Auswaschens von Bakterien durch den Pfropfenstrom sollte verhindert werden. Ein Vergleich der Betriebsdaten in Tabelle 15 und Tabelle 16 zeigt jedoch auf, dass zumindest für die Gasproduktion keine Vorteile durch eine Gärrestrückführung vorhanden sind.

In Abbildung 44 und Abbildung 45 ist der Vergleich zwischen simulierten und gemessenen Parametern dargestellt.

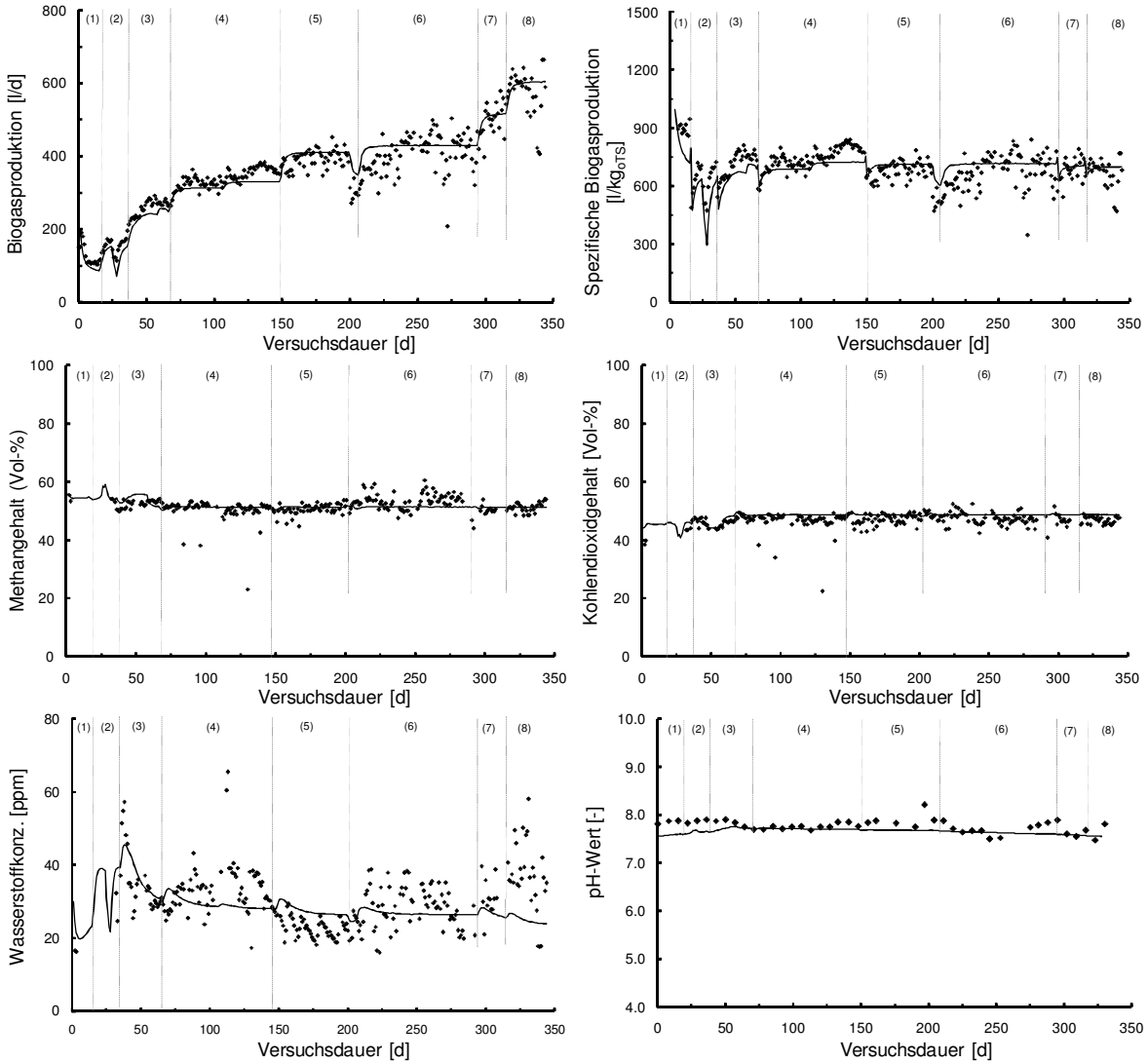


Abbildung 44: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, spezifische Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffgehalt, sowie dem pH-Wert bei der mesophilen Vergärung von Maissilage (ohne Gärrestrückführung); Nummerierung der einzelnen Betriebsperioden entsprechend Tabelle 16

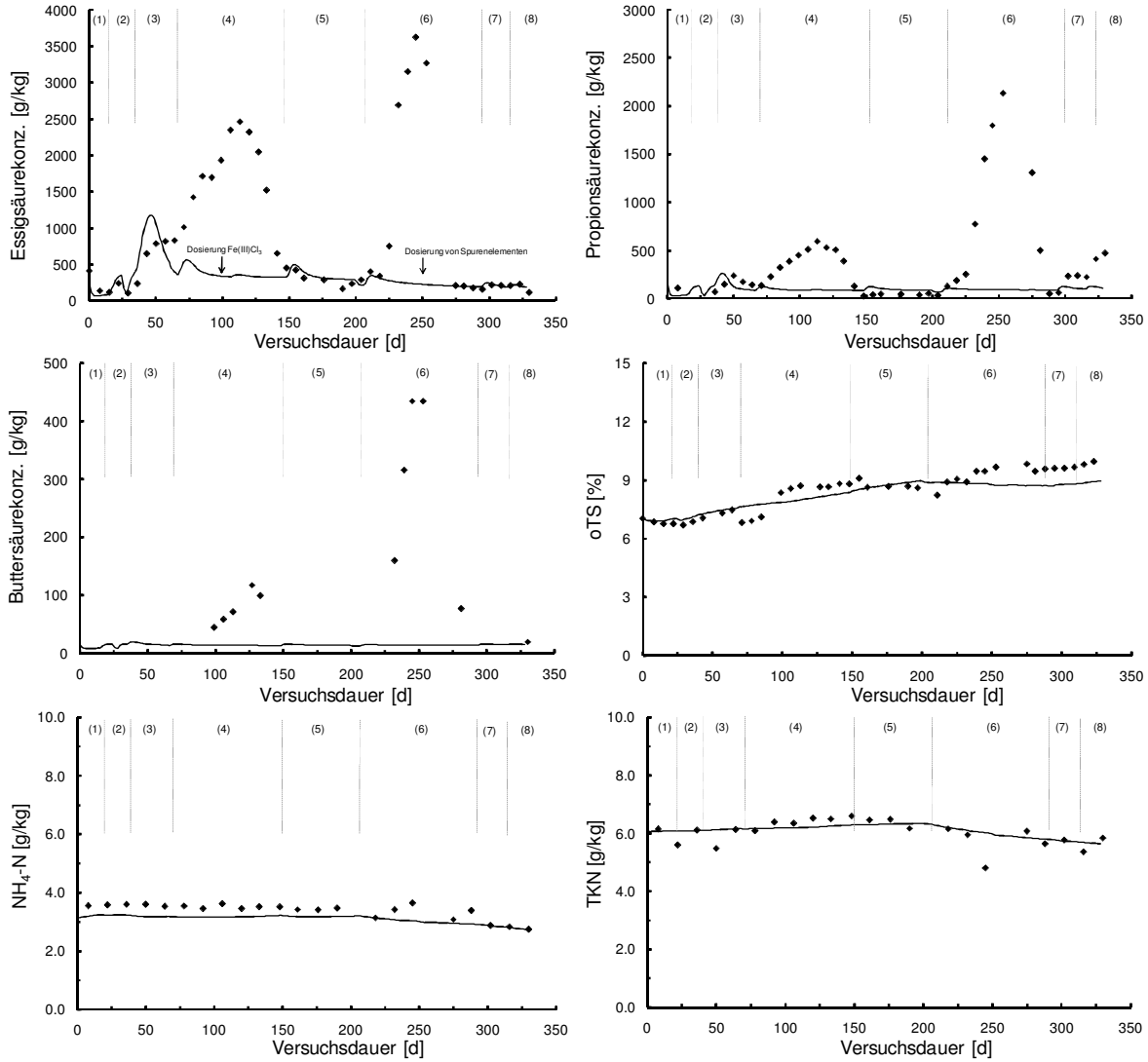


Abbildung 45: Vergleich Simulations- und Messwerte für Essigsäure-, Propionsäure-, Buttersäurekonzentration, organischem Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff und TKN bei der mesophilen Vergärung von Maissilage (ohne Gärrestrückführung); Nummerierung der einzelnen Betriebsperioden entsprechend Tabelle 16

Die Simulationsergebnisse zeigen auch für diesen Versuchszeitraum eine sehr gute Übereinstimmung mit den wesentlichen Prozessparametern. Ab dem Versuchstag 150 kommt es bei der aufgezeichneten Gasproduktion zu nennenswerten Schwankungen, was auf technische Fehler zurückzuführen ist. Die simulierten Werte befinden sich stets im Mittel der Messdaten. Starke Fluktuationen liegen auch für die Wasserstoffkonzentration vor. Hier verlaufen die simulierten Werte wesentlich gleichmäßiger und liegen im Mittel der Messdaten. Signifikante Abweichungen zwischen Modell und Messung ergeben sich für die Essigsäure-, Propionsäure- und Buttersäurekonzentrationen. Die simulierten Werte verlaufen konstant auf einem niedrigen Niveau über den gesamten Versuchszeitraum. Die Messdaten

zeigen hingegen deutliche Konzentrationsanstiege zu zwei Zeitpunkten. Der erste Säureanstieg ergibt sich bei einer relativ niedrigen organischen Belastungsrate von 1,9 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$. Als Konsequenz wurde dem Fermenter Eisen, als $Fe(III)Cl_3$, am Versuchstag 100 hinzugegeben, was in einen unmittelbaren Abfall der organischen Säurekonzentrationen resultierte. Die positive Wirkung der Eisendosierung kann dadurch erklärt werden, dass Sulfide gebunden werden. Dieses wiederum erhöht die Bioverfügbarkeit von Spurenelementen, die sonst anstelle des Eisens mit den Sulfiden reagieren. Die Metallbindungskapazität der Sulfide wird dabei als die bedeutendste für den vorliegenden Fermenter angesehen. Durch die Eisendosierung sank die Schwefelwasserstoffkonzentration in der Gasphase von 150 auf 20 ppm. Im weiteren Versuchsverlauf wurde Eisen in dem Maße dosiert, dass die Schwefelwasserstoffkonzentration in der Gasphase unterhalb von 30 ppm. lag. Bei angenommener ausreichender Bioverfügbarkeit von Spurenelementen ist ab dem Versuchstag 150 und bis zum Versuchstag 225 wieder eine Übereinstimmung zwischen Messdaten und Simulation gegeben. Ein zweiter Säureanstieg ergibt sich bei einer organischen Belastungsrate von 2,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$. Auch dieser Anstieg wird vom Simulationsmodell nicht wiedergegeben. Als Konsequenz wurde dem Reaktor eine Spurenelementlösung entsprechend Tabelle 17 ab dem Versuchstag 250 dosiert. Der Effekt war unmittelbar sichtbar durch einen Abfall der Säurekonzentrationen. Die Säurekonzentrationen stabilisieren sich zum Ende der Versuchsperiode auf dem Niveau der Simulationswerte. Die deutlichen Abweichungen zwischen Modell und Messdaten für die organischen Säuren zu den skizzierten Zeiträumen wird daher auf einen vorliegenden Mangel an Spurenelementen zurückgeführt.

Tabelle 17: Zusammensetzung der verwendeten Spurenelementlösung

Zusammensetzung	Element	Zugabe Mischung (mg/g_{oTS_input})	Zugabe Element (mg/g_{oTS_input})
$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	Fe	1,96	0,55
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	Co	0,23	0,06
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	Ni	0,24	0,06
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	Mo	0,02	0,01

Im Gegensatz zum vorherigen Versuchsabschnitt mit Gärrestrückführung konnte für die Monofermentation von Maissilage ohne Gärrestrückführung ein Mangel an Spurenelementen bei hohen organischen Belastungsraten aufgezeigt werden. Neben aktiver Biomasse werden mit dem Gärrest auch Nährstoffe und Spurenelemente zurückgeführt, wodurch sich Mangelsituationen vermeiden lassen. Es muss jedoch beachtet werden, dass sich der

Versuchsabschnitt mit Gärrestrückführung nur über einem Zeitraum von 150 Tagen erstreckte und der stehende Fermenter nur sehr niedrig belastet wurde. Es ist zu erwarten, dass eine kontinuierliche Versuchsdurchführung über einen sehr langen Zeitraum auch einen Spurenelementmangel im Gärrest zur Folge hätte. Für eine detaillierte Abbildung von Spurenelementmangelsituationen müsste das Simulationsmodell modifiziert werden, was nicht im Fokus der Aufgabenstellung lag. In den folgenden Versuchsdurchführungen wurde die Spurenelementlösung in Tabelle 17 verwendet, um Säureanstiege durch Mangelsituationen zu vermeiden, die sich nicht durch das Modell abbilden lassen.

II.3.2.6.3. Thermophile Betriebsweise

Der Übergang von der mesophilen zur thermophilen Betriebsweise erfolgte durch eine schrittweise Temperaturerhöhung. Diese Übergangsperiode lässt sich auf Grund fehlender Temperaturabhängigkeiten des kinetischen und stöchiometrischen Parametersatzes nicht im ADM1 abbilden. Der Simulationszeitraum ist daher auf die Periode beschränkt, in der ein stabiler thermophiler Betrieb vorlag. Für die thermophile Monofermentation von Maissilage wurden insgesamt drei Belastungsstufen mathematisch simuliert. Die mittleren Betriebsdaten sind in Tabelle 18 aufgeführt. Es wurden für die drei Belastungsstufen sehr hohe spezifische Gaserträge von 992 bis 1062 $L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$ erzielt, was auf einen nahezu vollständigen Umsatz der organischen Fraktion der Maissilage schließen lässt. Im Vergleich zur mesophilen Betriebsweise wurden bei der Modellkalibrierung zuerst die Hydrolyseraten verdoppelt (Tabelle 13). Die Ablaufkonzentrationen partikulärer abbaubarerer Organik betrugen im Simulationsmodell im Mittel 3,4 kg/m^3 (Inertanteil nicht einbezogen). Durch diesen Schritt konnten im Modell die absoluten Gaserträge abgebildet werden. Die Simulationsergebnisse des für die thermophile Betriebsweise kalibrierten Modells sind in Abbildung 46 und Abbildung 47 wiedergegeben. Die letzte Anlagenbeschickung mit Maissilage erfolgte am Versuchstag 131. Die grafische Darstellung erstreckt sich jedoch über 143 Tage, da die Messdatenaufzeichnung nach dem Fütterungsstopp für weitere 12 Tage aufrecht erhalten wurde.

Tabelle 18: Betriebsdaten bei der thermophilen Monofermentation von Maissilage

Periode (d)	OLR ($kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$)	HRT (d)	Y_{Gas} ($L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$)
(1) 0-35	0,51	625	992
(2) 36-61	1,02	313	976
(3) 62-131	1,53	208	1062

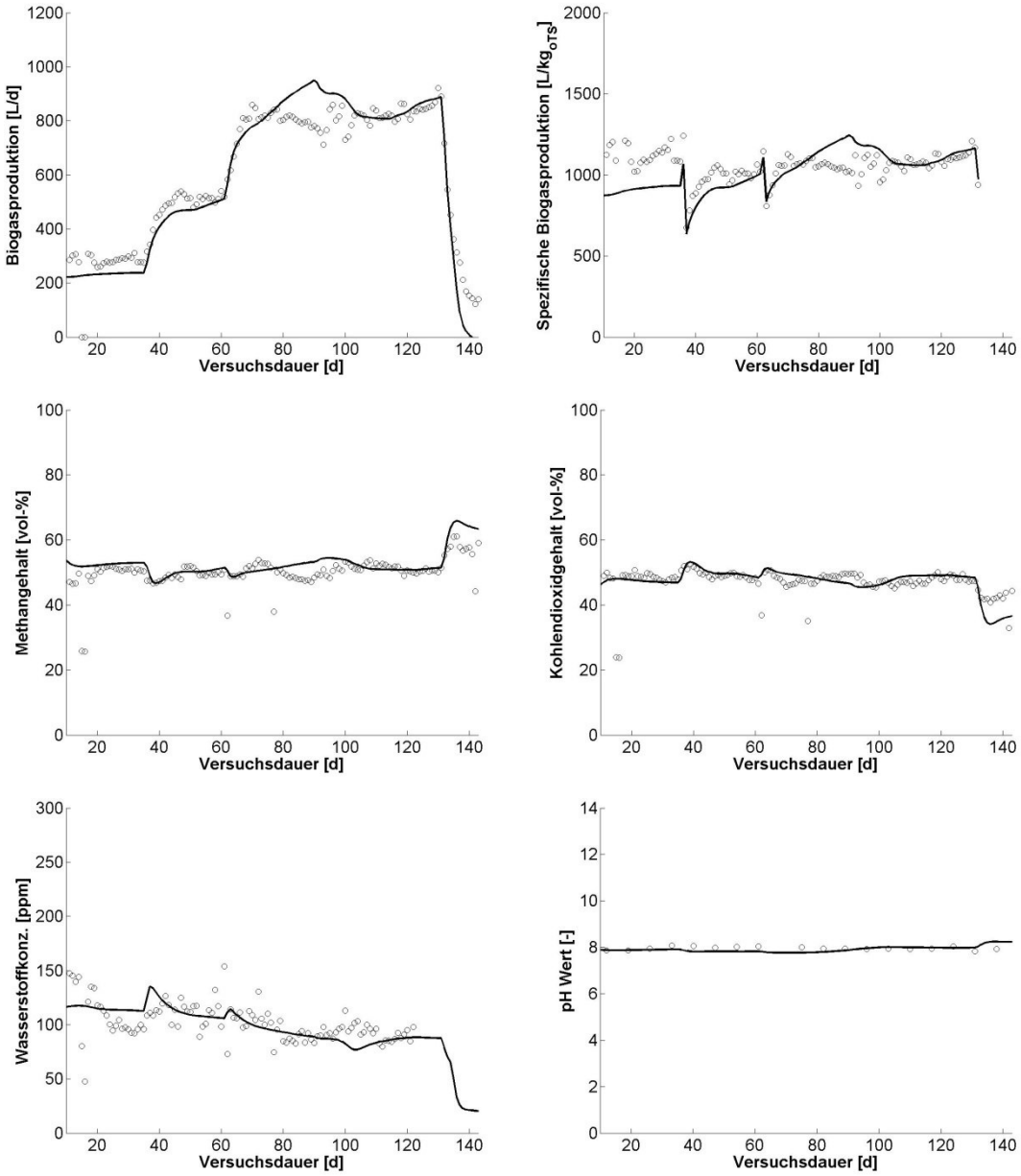


Abbildung 46: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, spezifische Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffgehalt, sowie dem pH-Wert bei der thermophilen Vergärung von Maissilage

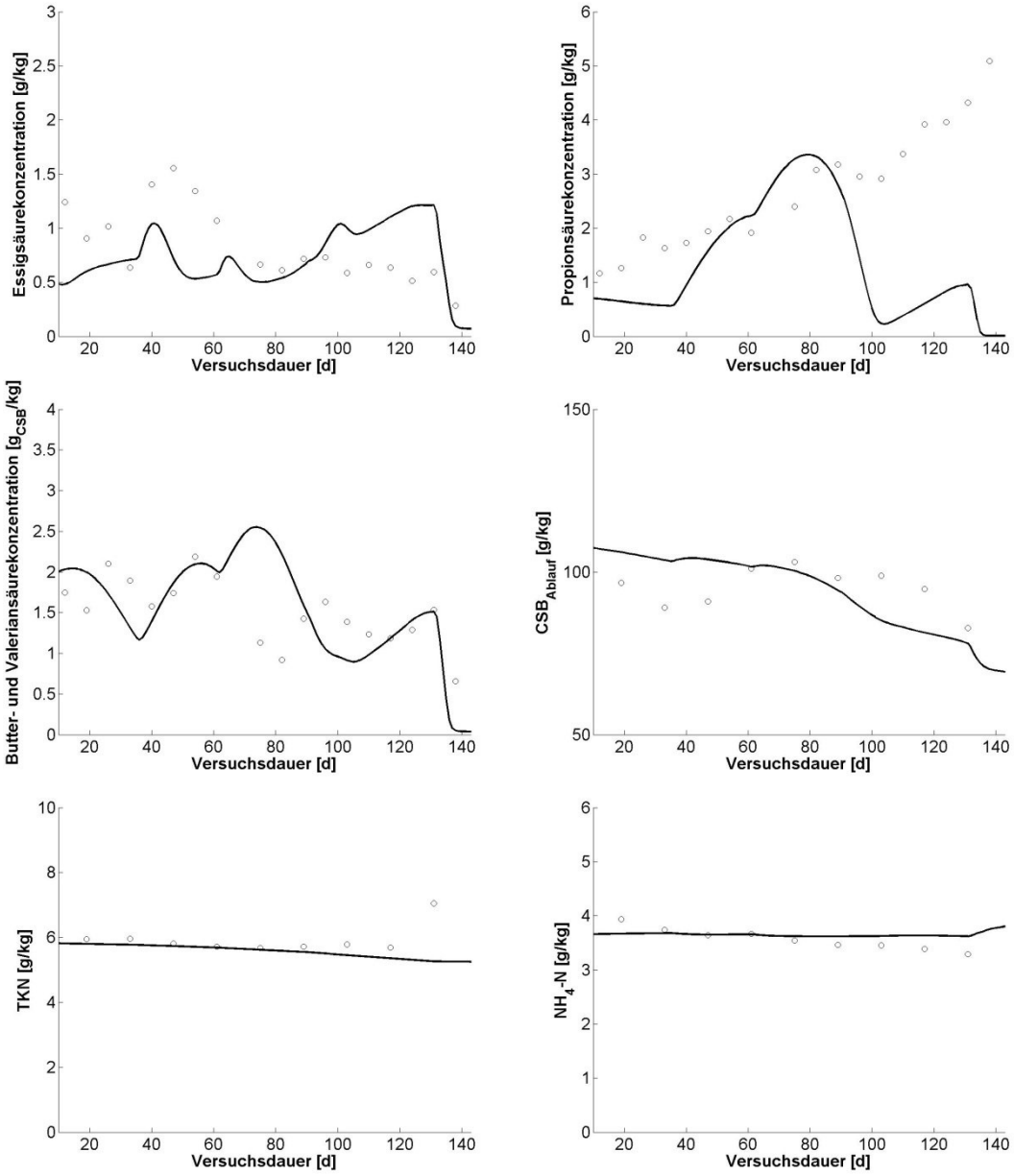


Abbildung 47: Vergleich Simulations- und Messwerte für Essigsäure-, Propionsäure-, Butter- und Valeriansäurekonzentration, CSB, TKN und Ammoniumstickstof bei der thermophilen Vergärung von Maissilage

Für die spezifische Biogasproduktion ergeben sich auch für diesen Zeitraum Diskrepanzen zwischen Modell und Messwerte zu Versuchsbeginn bei niedriger Belastungsrate. Eine Beeinflussung der Gasmessung durch „Nachgasung“ nicht abgebauter organischer Substanz aus dem vorangegangenen Versuchsabschnitt kann als Erklärung herangezogen werden. Die absolute Biogasproduktion wird im Simulationsmodell sehr gut wiedergegeben. Allerding erfolgt im Modell nach dem Fütterungsstopp ein direktes Absinken der Gasproduktion auf null, während in der Realität auch 12 Tage nach Fütterungsstopp noch eine Gasproduktion von 120 L/d aufgezeichnet wurde. Insgesamt konnte eine sehr gute Übereinstimmung

zwischen Modellrechnungen und Messwerte erzielt werden. Lediglich für die Propionsäurekonzentration ergeben sich deutliche Unterschiede. Während die Messdaten einen nahezu kontinuierlichen Anstieg der Propionsäure während der gesamten Versuchsdauer anzeigen, erfolgt im Modell ein nahezu vollständiger Abbau der Propionsäure ab dem Versuchstag 80. Der kontinuierliche Anstieg der Propionsäure konnte durch eine Anpassung der kinetischen Parameter im Modell nicht abgebildete werden.

Der Abbau der Propionsäure im ADM1 erfolgt gemäß folgendem chemischen Reaktionsschema (Gleichung ohne Biomassenneubildung):

$$CH_3CH_2COO^- + 3\,H_2O \rightarrow CH_3COO^- + 3\,H_2 + HCO_3^- + H^+ \qquad (38)$$

Im Model werden 1 kg_{CSB} Propionsäure zu 550 g_{CSB} Azetat, 410 g_{CSB} Wasserstoff, 40 g_{CSB} Biomasse und 8,42 $kmol_C$ Bikarbonat umgesetzt. Die Beschreibung der Reaktionskinetik erfolgt nach MONOD, so dass eine geringe Propionsäurekonzentration in einen niedrigen Stoffumsatz resultiert. Eine hohe Propionsäurekonzentration im Fermenter wie in Abbildung 47 dargestellt resultiert ohne Hemmeinfluss in einen hohen Stoffumsatz. Im ADM1 wird bei der Propionsäureoxidation eine mögliche Hemmung durch hohe Wasserstoffkonzentrationen, pH-Wert-Schwankungen und Stickstoffmangelsituationen berücksichtigt. Keine dieser Faktoren lässt sich jedoch zur Erklärung des kontinuierlichen Propionsäureanstiegs heranziehen.

Eine Hemmung des Stoffumsatzes scheint dennoch wahrscheinlich, da der Propionsäureabbau aus thermodynamischer Sicht günstig ist. Für die Berechnung der Reaktionsenthalpie der Gleichung (38) wird folgende Formel verwendet:

$$\Delta G' = \Delta G^0 - R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{\left[CH_3CH_2COO^-\right]}{\left[CH_3COO^-\right]\cdot\left[HCO_3^-\right]\cdot\left[H_2\right]^3}\right) \quad [kJ/mol] \qquad (39)$$

wobei $\Delta G'$ die freie Energie unter Standardbedingungen (kJ/mol), R die Gaskonstante (kJ/(mol·l)) und T die Temperatur (K) sind. Die Stoffkonzentrationen werden in mol/l berücksichtigt.

Der grafische Verlauf der freien Energie ist in Abbildung 48 dargestellt. $\Delta G`$ wurde für die Tage berechnet, an denen Messwerte für Propionsäure und Essigsäure zur Verfügung stehen. Wasserstoff- und Bikarbonatgehalte wurden anhand der jeweiligen Gaspartialdrücke

berechnet. Es wird deutlich, dass im gesamten Versuchszeitraum die freie Energie für die Propionsäureoxidation negativ verläuft.

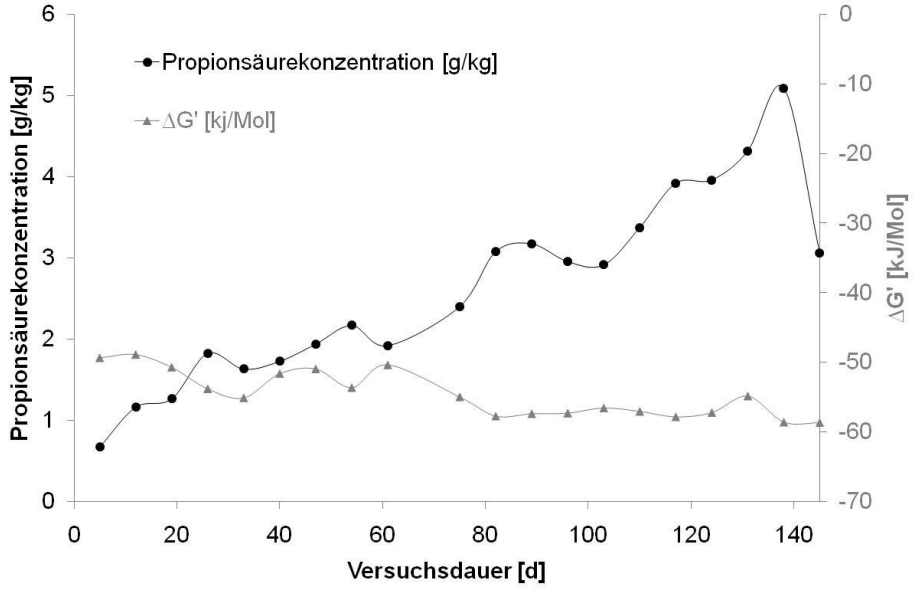


Abbildung 48: Berechnungen die Gibbs Energie für Propionsäureoxidation

Als Alternative zur MONOD Kinetik wird in der Literatur auch die HALDANE Kinetik verwendet (Lokshina et al., 2001; Vavilin und Angelidaki, 2005). Bei diesem Ansatz wird berücksichtigt, dass hohe Produktkonzentrationen des mikrobiologischen Stoffwechsels diesen selbst hemmen können. Eine stetig steigende Propionsäurekonzentration resultiert hier in eine Verringerung des Stoffumsatzes.

Die Modifikation des Propionsäureabbaus unter Berücksichtigung der HALDANE Kinetik im ADM1 erfolgte gemäß folgender Gleichung:

$$\frac{\Delta X_{pro}}{\Delta t} = X_{pro} \cdot \left(k_{m,pro} \cdot \frac{S_{pro}}{K_{S,pro} + S_{pro} + \frac{S_{pro}^{\ 2}}{K_{I,pro}}} \cdot I_{in} \cdot I_{pH} \cdot I_{H_2} - k_{dec,pro} \right) \quad \left[kg_{CSB}/(m^3 \cdot d) \right] \qquad (40)$$

Mit den Parametern $k_{m,pro}$=16 d^{-1} und $K_{I,pro}$=7,63 kg_{CSB}/m^3 wurde eine insgesamt bessere Modellkalibrierung erzielt (Abbildung 49).

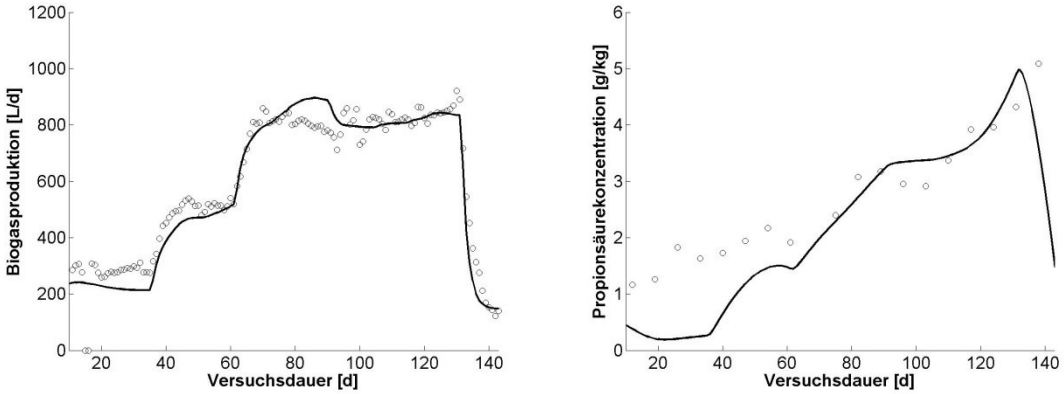


Abbildung 49: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion und Propionsäurekonzentration unter Berücksichtigung der HALDANE Kinetik

II.3.2.7. Simulation der Vergärung von der Mischung Maissilage/Grassilage

Für die mesophile Fermentation der Mischung aus Maissilage und Grassilage wurde das ADM1 neu kalibriert. Es erfolgte hier jedoch nur eine sehr geringfügige Neuanpassung. Zur Abbildung der thermophilen Betriebsweise wurde der gleiche Parametersatz wie bei der thermophilen Monofermentation von Maissilage verwendet. Bei der Versuchsdurchführung wurde für beide Temperaturstufen mit der ausschließlichen Fütterung von Maissilage begonnen. Nachdem stabile Verhältnisse im Fermenter vorlagen wurde mit der schrittweisen Erhöhung der Zugabe von Grassilage begonnen. Die Biozönose im Fermenter war daher stark auf die stoffliche Umsetzung von Maissilage adaptiert, wodurch sich die hohe Überschneidung zwischen den kalibrierten Parametern in Tabelle 13 und Tabelle 19 erklären lässt.

Tabelle 19: Kinetische ADM1 Parameter für die Mischung Maissilage/Grassilage

Parameter	Einheit	Mesophil: Mischung Maissilage/Grassilage	Thermophil: Mischung Maissilage/Grassilage	Prozess
Hydrolyse				
k_{hyd,CH_s}	d^{-1}	**0,18**	**0,36**	Desintegration
k_{hyd,CH_r}	d^{-1}	**0,70**	**1,40**	Hydrolyse Kohlenhydrate
k_{hyd_PR}	d^{-1}	**0,30**	**0,60**	Hydrolyse Proteine
k_{hyd_LI}	d^{-1}	10	**2**	Hydrolyse langk. Fettsäuren
Sonstiges				
k_{dec}	d^{-1}	**0,10**	**0,20**	Decayrate der Biomassen
$K_{S,IN}$	kmol m^{-3}	$1x10^{-4}$	$1x10^{-4}$	Halbsättigungskonzentration NH_3
$pH_{ULacet/acid}$	-	5,5	5,5	Obere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$.
$pH_{LLacet/acid}$	-	4	4	Untere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$
Zuckerfermentation				
$k_{m,su}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	30	70	Aufnahmerate
$K_{S,su}$	kg_{CSB} m^{-3}	0,5	1,0	Halbsättigungskonzentration
Y_{su}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,10	0,10	Ertragskoeffizient
Aminosäurenfermentation				
$k_{m,aa}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	50	70	Aufnahmerate
$K_{S,aa}$	kg_{CSB} m^{-3}	0,3	0,3	Halbsättigungskonzentration
Y_{aa}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,08	0,08	Ertragskoeffizient
Fettsäurenoxidation				
$k_{m,fa}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	6	10	Aufnahmerate
$K_{S,fa}$	kg_{CSB} m^{-3}	0,4	0,4	Halbsättigungskonzentration
Y_{fa}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,06	0,06	Ertragskoeffizient
$K_{I,H2,fa}$	kg_{CSB} m^{-3}	$5x10^{-6}$	-	Inhibitionskonstante H_2
Butters.-/Valerians.fermentation				
$k_{m,c4+}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	20	**18**	Aufnahmerate
$K_{S,c4+}$	kg_{CSB} m^{-3}	0,2	0,4	Halbsättigungskonzentration
Y_{c4+}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,06	0,06	Ertragskoeffizient
$K_{I,H2,c4+}$	kg_{CSB} m^{-3}	$1,0x10^{-5}$	**$5.55x10^{-6}$**	Inhibitionskonstante H_2
Oxidation Propionsäure				
$k_{m,pro}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	13	**12,0**	Aufnahmerate
$K_{S,pro}$	kg_{CSB} m^{-3}	0,10	0,3	Halbsättigungskonzentration
Y_{pro}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,04	0,05	Ertragskoeffizient
$K_{I,H2,pro}$	kg_{CSB} m^{-3}	$3,5x10^{-6}$	$1,0x10^{-5}$	Inhibitionskonstante H_2
Acetoclastische Methanogenese				
$k_{m,ac}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	**9,50**	**17**	Aufnahmerate
$K_{S,ac}$	kg_{CSB} m^{-3}	0,15	**0,30**	Halbsättigungskonzentration
Y_{ac}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,05	0,05	Ertragskoeffizient
$pH_{UL\,ac}$	-	7	7	Obere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$
$pH_{LL\,ac}$	-	6	6	Untere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$
$K_{I,NH3}$	kmol m^{-3}	**0,0055**	0.011	Inhibitionskonstante NH_3
Hydrogenotrophe Methanogenese				
$k_{m,h2}$	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}d^{-1}$	**18**	35	Aufnahmerate
$K_{S,h2}$	kg_{CSB} m^{-3}	**$7x10^{-5}$**	**$1,16x10^{-4}$**	Halbsättigungskonzentration
Y_{h2}	$g_{CSB}g_{CSB}^{-1}$	0,06	0,06	Ertragskoeffizient
$pH_{UL\,h2}$	-	6	6	Obere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$
$pH_{LL\,h2}$	-	5	5	Untere Grenze $pH_{Hemm,50\%}$

II.3.2.7.1. Mesophile Betriebsweise

Im Vorlauf diesen Versuchsabschnitts wurde der Fermenter ausschließlich mit Maissilage bei einer organischen Belastung von 2,03 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ betrieben. 8 Tage dieser Periode wurden in der Simulationsstudie berücksichtigt. Anschließend wurde schrittweise die Menge an Grassilage in der Mischung Maissilage/Grassilage erhöht. Die Betriebsdaten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 20: Betriebsdaten bei der mesophilen Fermentation von der Mischung Maissilage/Grassilage

Periode (d)	OLR_{Mais} ($kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$)	OLR_{Grass} ($kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$)	HRT (d)	Y_{Gas} ($L_N/(kg_{oTS} \cdot d)$)
(1) 0-8	2,03	0,00	157	601
(2) 9-29	1,55	0,51	149	716
(3) 30-50	1,03	0,99	146	542
(4) 51-71	0,52	1,52	140	568
(5) 72-99	0,00	2,03	136	471

Abbildung 50 und Abbildung 51 zeigen eine hohe Übereinstimmung zwischen den Messwerten und den Modellberechnungen. Nach dem erfolgten Fütterungsstopp am Versuchstag 100 wurden wie bei der thermophilen Vergärung von Maissilage für weitere 6 Tage Messdaten erhoben. Auffällig ist hier, dass die simulierte Biogasproduktion im Gegensatz zu den Messwerten nach dem Fütterungsstopp sehr schnell abfällt. Es erfolgt im Modell ein vollständiger Abbau der organischen Säuren wenige Tage nach Einstellen der Fütterung. Die Gaszusammensetzung wird für den Zeitraum ohne Fütterung nur unzureichend wiedergegeben.

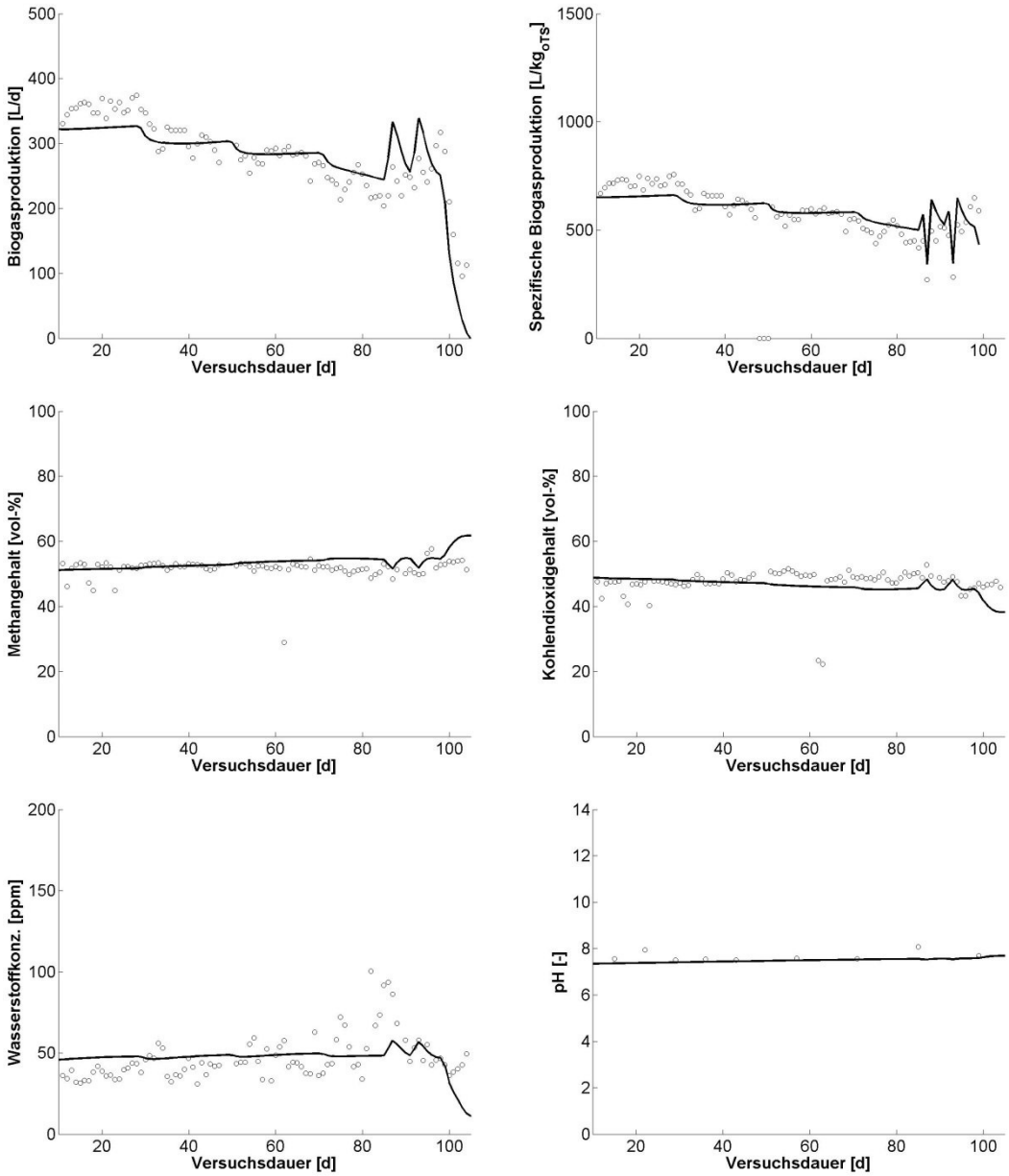


Abbildung 50: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, spezifische Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffgehalt, sowie dem pH-Wert bei der mesophilen Vergärung von der Mischung Maissilage/Grassilage

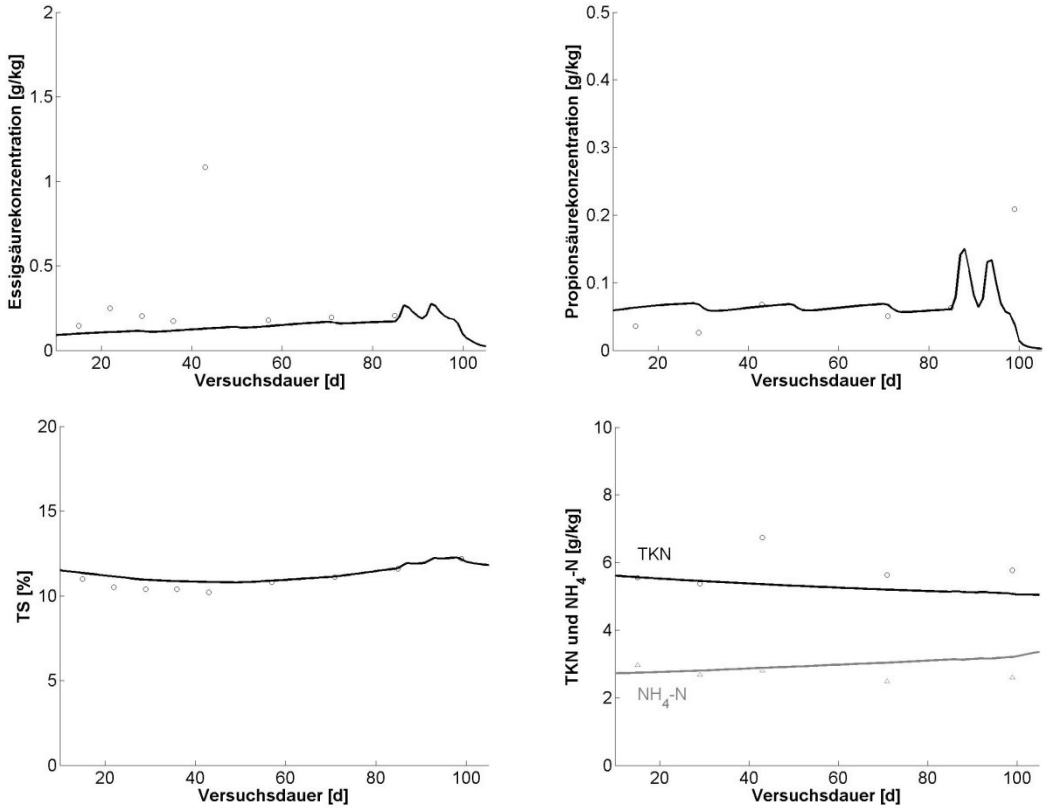


Abbildung 51: Vergleich Simulations- und Messwerte für Essigsäure-, Propionsäurekonzentration, TS, TKN und Ammoniumstickstoff bei der mesophilen Vergärung von der Mischung Maissilage/Grassilage

II.3.2.7.2. Thermophile Betriebsweise

Analog der Vorgehensweise bei der mesophilen Betriebsweise, wurde auch bei der thermophilen Vergärung der Mischung Maissilage/Grassilage der Fermenter zu Beginn ausschließlich mit Maissilage betrieben. Die organische Belastungsrate wurde hier auf 1 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ beschränkt. Anschließend erfolgte eine schrittweise Erhöhung der Zugabe von Grassilage. Die Betriebsdaten für diesen Versuchszeitraum sind in Tabelle 21 angegeben.

Tabelle 21: Betriebsdaten bei der thermophilen Fermentation von der Mischung Maissilage/Grassilage.

Periode (d)	OLR_{Mais} ($kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$)	OLR_{Grass} ($kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$)	HRT (d)
(1) 0-7	1,02	0,00	313
(2) 8-23	0,95 bis 0,09	0,03 bis 0,44	322 bis 532
(3) 24-30	0,00	0,47	588

Ein Vergleich zwischen Messdaten und Simulationsergebnissen erfolgt in Abbildung 52 und Abbildung 53.

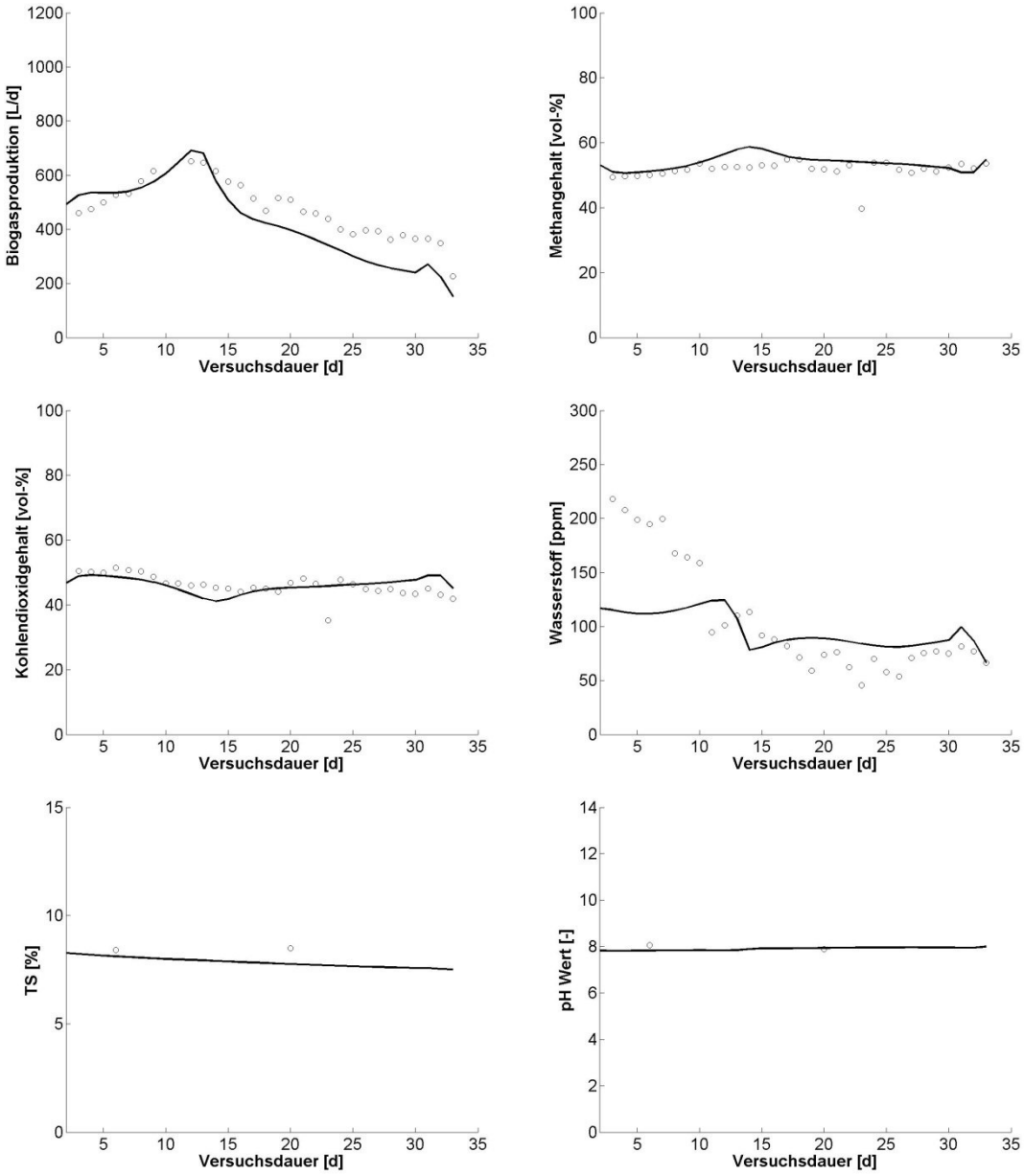


Abbildung 52: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- und Wasserstoffgehalt, Trockensubstanzgehalt, sowie dem pH-Wert bei der thermophilen Vergärung von der Mischung Maissilage/Grassilage

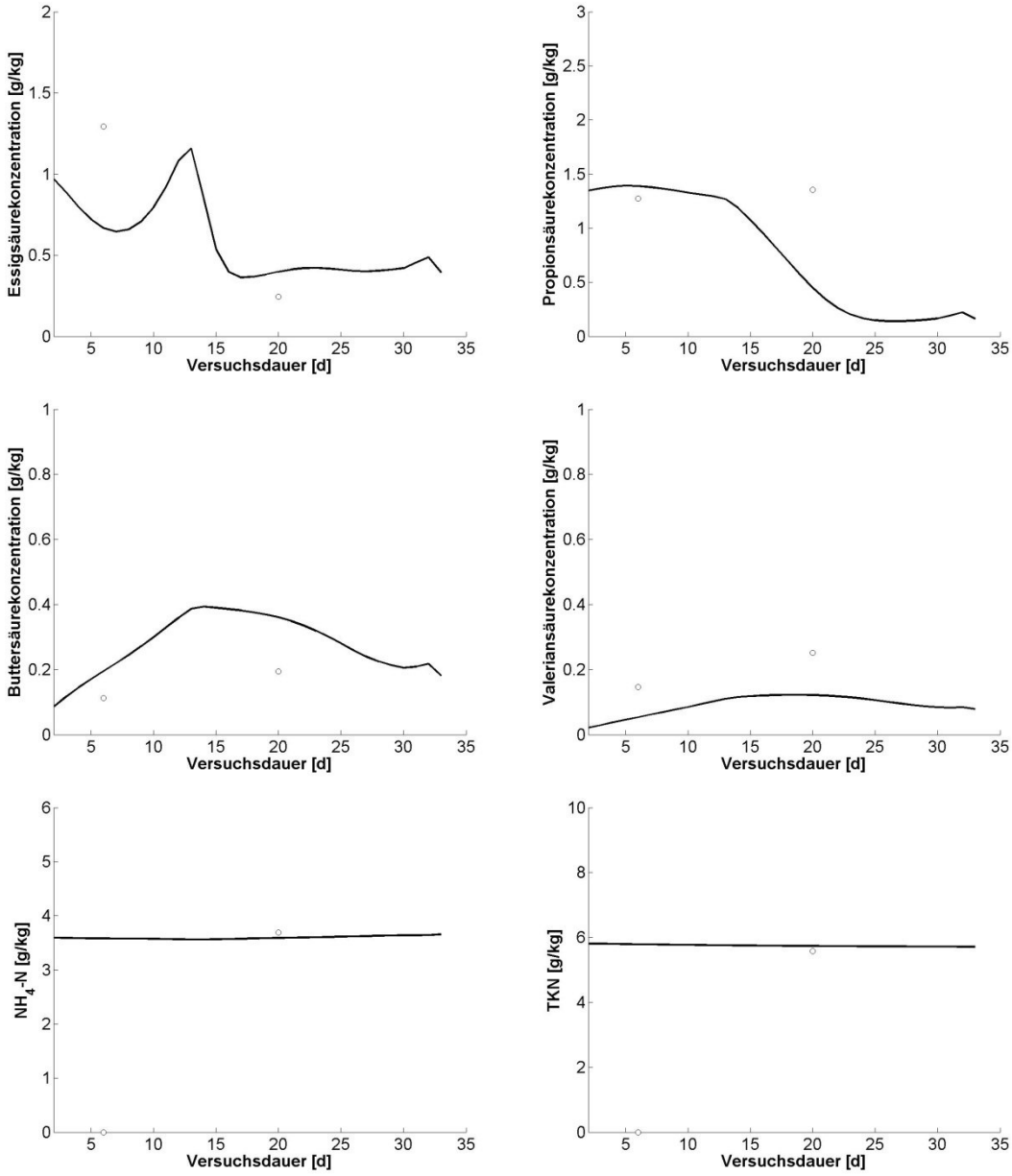


Abbildung 53: Vergleich Simulations- und Messwerte für Essigsäure-, Propionsäure-, Buttersäure- und Valeriansäurekonzentration, Ammoniumstickstoff und TKN bei der thermophilen Vergärung von der Mischung Maissilage/Grassilage

II.3.2.8. Simulation der Vergärung von Grassilage

II.3.2.8.1. Mesophile Betriebsweise

Für die Modellierung des anaeroben Abbaus von Grassilage wurde abweichend zu den Versuchen mit Maissilage die ADM1-Stofffraktion für das Kompositmaterial verwendet. Bei diesem Ansatz werden die wesentlichen partikulären ADM1-Stofffraktionen für die Zulauffraktionierung nach dem Desintegrationsschritt berechnet. Basierend auf der in Tabelle 10 aufgeführten Zusammensetzung der eingesetzten Grassilage sowie der in Kapitel II.3.2.1 beschriebenen Zulauffraktionierung wurden die in Tabelle 22 dargestellten f-Faktoren für die Aufteilung des Kompositmaterials X_C festgelegt. Die Ermittlung des abbaubaren Anteils von Cellulose und Hemicellulose d erfolgte gemäß Gleichung (22). Die manuelle Ermittlung von d anhand der Gaskurve ergab einen Wert von 0,4.

Tabelle 22: Zulauffraktionierung nach der Desintegration gemäß f-Faktoren (mesophil)

Parameter	Einheit	Beschreibung	Wert
f_{Pr_Xc}	-	Proteine aus X_c	0,187
f_{Li_Xc}	-	Fette aus X_c	0,033
f_{Ch_Xc}	-	Kohlenhydrate aus X_c	0,401
f_{XI_Xc}	-	Inertes aus X_c	0,379
D	-	Abbaubarer Anteil von Cellulose und Hemicellulose	0,36

Zur Quantifizierung des Desintegrationsprozesses wurde ein Wert von 0,6 d^{-1} angesetzt, dessen Ermittlung in Kapitel II.3.2.5.1 beschrieben ist. Da der Faktor d den jeweiligen Anteil an abbaubarem Material regelt, kann die Hydrolysekonstante k_{hyd_Ch} auf dem Standardwert von 10 d^{-1} belassen werden. Außerdem ist der Anteil von Fett vernachlässigbar klein, weshalb auch k_{hyd_Li} nicht verändert werden muss. Lediglich die Hydrolysekonstante für die Proteine k_{hyd_Pr} wurde auf 0,8 d^{-1} angepasst. Dieser Wert deckt sich auch mit typischen Literaturwerten für überwiegend proteinhaltiges Substrat (Pavlovstatis und Giraldo-Gomez, 1991).

Tabelle 23: Stickstoffgehalte der beteiligten Fraktionen

Parameter	Einheit	Beschreibung	Wert
N_{Pr}/N_{aa}	$kmol_N/kg_{CSB}$	N-Gehalt Protein/Aminosäuren	0,007[a]
N_{Xc}	$kmol_N/kg_{CSB}$	N-Gehalt Kompositmaterial	0,0013[b]
f_p	-	Stöchiometrischer Faktor	0,08[c]
N_{XB}	$kmol_N/kg_{CSB}$	N-Gehalt Biomasse	0,00625[a]
N_{Xp}	$kmol_N/kg_{CSB}$	N-Gehalt Biomassezerfallsprodukte	0,0043[d]

[a] Standardparameter ADM1
[b] berechneter Wert ($N_{aa} \cdot f_{Pr_Xc}$)
[c] aus ASM1 (Henze et al., 1987)
[d] aus Wett et al. (2006)

Ammonium bzw. Ammoniak spielt bei der Vergärung von Grassilage eine entscheidende Rolle. Um eine detaillierte Beschreibung des Stickstoffflusses zu ermöglichen, wurde die in den Kapiteln II.3.2.3 und II.3.2.4 vorgestellte Modifikation im Modell vorgenommen. Ein hohes Maß an Übereinstimmung wurde für K_{hyd} mit 2,5 % und n_{hyd} mit 2,3 erhalten. Werden diese Werte in Gleichung (27) eingesetzt, zeigt sich der Einfluss des Hemmterms in Abhängigkeit vom Feststoffgehalt (TS), der zwischen 0,05 für einen TS von 9 % und 0,014 für einen TS von 16 % variiert. Dementsprechend verringert sich bei einer geringen Einflussnahme des Feststoffgehaltes (9 %) die Hydrolysekonstante k_{hyd_Ch} und k_{hyd_Li} von 10 d^{-1} auf 0,5 d^{-1} und bei einer maximalen Beeinflussung (16 %) auf 0,14 d^{-1}. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (in Kapitell II.3.2.5.1 als Desintegrationskonstante k_{Dis} bezeichnet) wurde unter optimalen Bedingungen mit 0,6 d^{-1} bestimmt und deckt sich somit sehr gut mit der Hydrolysekonstante bei einem geringen Feststoffgehalt. Es wird deutlich, dass eine klare Trennung von Desintegration und Hydrolyse schwierig ist, wie dies bereits in anderen Untersuchungen gezeigt wurde (Feng et al., 2006; Vavilin et al., 2008; Wichern, 2010). Inwiefern eine Aufteilung in die beiden Schritte Desintegration und Hydrolyse überhaupt notwendig und sinnvoll ist, bleibt offen.

Während der Hemmterm für die Hydrolyse von Kohlenhydraten und Fetten also durchaus seine Berechtigung hat, scheint dies für Protein zunächst nicht der Fall zu sein, denn k_{hyd_Pr} wurde bereits auf 0,8 d^{-1} angepasst und verringert sich so bei einem hohem Feststoffgehalt (16 %) auf nur noch 0,012 d^{-1}. In einem Parameterreview im Rahmen der Erstellung des ADM1 zeigten Batstone et al. (2002) jedoch, dass die Hydrolysekonstante für Proteine k_{hyd_Pr} stark schwankt und unter mesophilen Bedingungen durchaus auch auf Werte von weniger als 0,01 d^{-1} sinken kann. Wie die folgenden Abbildungen zeigen, spricht die gute Übereinstimmung von Mess- und Simulationswerten für die durchgeführten Modifikationen.

Messwerte von Reaktor L sind mit einen "x" und die des Reaktors R mit einem "o" gekennzeichnet, die durchgehende Linie ist das Ergebnis der Simulation.

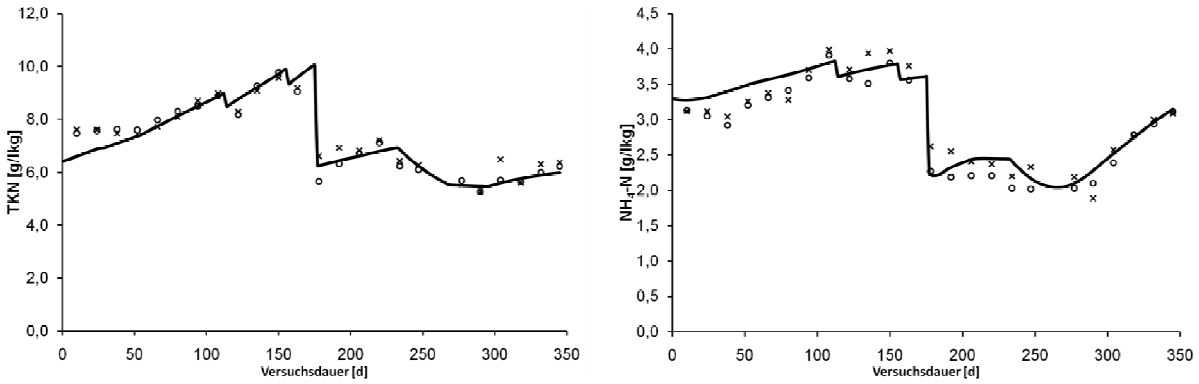


Abbildung 54: Vergleich Simulations- und Messwerte für Gesamtstickstoff (TKN) und Ammoniumstickstoff (NH_4-N) bei der mesophilen Vergärung von Grassilage

Mit Einführung der Hydrolysehemmfunktion gemäß Gleichung (27) wird auch der dynamische Verlauf des Trockensubstanzgehaltes im Reaktor durch die Simulation gut wiedergegeben. Zu Beginn und am Ende des Versuches kommt es jedoch zu kleineren Diskrepanzen, wobei für die in Abbildung 55 dargestellte Simulation der höchste Grad an Übereinstimmung erzielt wurde.

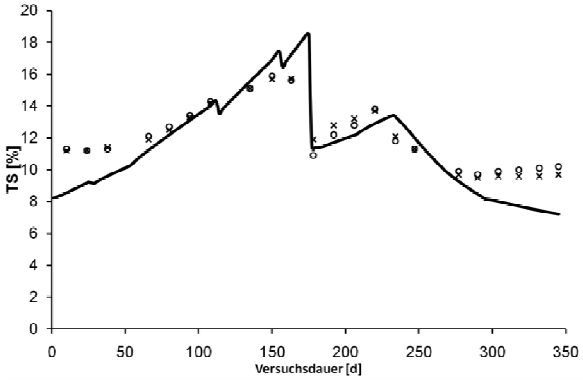


Abbildung 55: Vergleich Simulations- und Messwerte für den Trockensubstanzgehalt (TS) bei der mesophilen Vergärung von Grassilage

Mit Hilfe des in Kapitel II.3.2.5.2 beschriebenen Algorithmus zur Parameteranpassung gemäß dem Nash-Sutcliffe-Koeffizienten und mit dem Wissen um das Phänomen des Equifinalität konnte die Anzahl der kalibrierten Parameter auf wenige sensitive reduziert werden. Wie aus

Tabelle 24 hervorgeht, wurde gegenüber dem Standardparametersatz des ADM1 für die mesophile Fermentation von Feststoffen die Acetataufnahmerate vermindert und die Hemmung des Abbaus organischer Säuren durch Wasserstoff intensiviert. Die Halbsättigungskonstante für die Wasserstoffaufnahme wurde erhöht, um Wasserstoffkonzentrationen im Gas von 50 ppm abbilden zu können. Die Wasserstoffkonzentration hat entscheidenden Einfluss auf den Abbau der organischen Säuren wie Propion-, Butter- und Valeriansäure. Beide Hemmkonstanten $K_{I_H2_Pro}$ und $K_{I_H2_C4}$ wurden etwa um zwei Zehnerpotenzen verringert, mit der Folge, dass die Hemmung durch Wasserstoff beim Abbau der organischen Säuren schon früher einsetzt. Alle anderen Parameter wurden auf den Standardwerten des ADM1 für die mesophile Vergärung von Feststoffen belassen.

Die Bereiche der kalibrierten Parameter ist dabei denen von Wichern et al. (2009) sehr ähnlich, die bereits festgestellt hatten, dass die Wasserstoffinhibitionskonstanten für die Propionat- und Valerian-/Buttersäureaufnahme für Grassilage um etwa 2 Zehnerpotenzen unter jenen für die Klärschlammvergärung liegen. Außerdem wurde die maximale Aufnahmerate für Acetat von 8,0 d^{-1} auf 4,4 d^{-1} herabgesetzt, wie dies auch schon von Wichern (2010) für landwirtschaftliche Substrate vorgeschlagen wurde.

Tabelle 24: Standardparameter des ADM1 und kalibrierte Werte für die mesophile Fermentation von Grassilage

Parameter	Einheit	Beschreibung	ADM1	Wichern et al. (2009)	diese Studie
k_{m_Ac}	d^{-1}	Maximale Aufnahmerate für Acetat	8,0	8,0	4,4
K_{S_H2}	kg_{CSB}/m^3	Halbsättigungskonzentration für Wasserstoff	$7 \cdot 10^{-6}$	$4{,}2 \cdot 10^{-5}$	$5{,}6 \cdot 10^{-5}$
$K_{I_H2_Pro}$	kg_{CSB}/m^3	Wasserstoffhemmkonstante für den Propionsäureabbau	$3{,}5 \cdot 10^{-6}$	$4{,}8 \cdot 10^{-8}$	$4{,}6 \cdot 10^{-8}$
$K_{I_H2_C4}$	kg_{CSB}/m^3	Wasserstoffhemmkonstante für den Valerian- und Buttersäureabbau	$1 \cdot 10^{-5}$	$5{,}4 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-8}$

Wie bereits in Kapitel II.3.1.2.1 erwähnt, traten während der knapp einjährigen Versuchsphase einige Ereignisse auf, die die Zusammensetzung des Zulaufes entscheidend beeinflussten. So wurde das Mischungsverhältnis von getrockneter Grassilage und Wasser mehrfach angepasst und am Tag 176 ein Teil des Reaktorinhaltes durch Wasser ersetzt. An dieser Stelle rechtfertigt das ADM1 seine Komplexität, da selbst sehr dynamische Einflüsse vom Modell erfasst und dargestellt werden können. Der in Abbildung 56 gezeigte Verlauf der

simulierten Gasproduktion deckt sich gut mit den Messwerten. Auch die Wasserstoffkonzentration im Biogas kann zunächst gut abgebildet werden. Etwa ab Tag 200 wird die Wasserstoffkonzentration im Biogas seitens des Modells unterschätzt. Wasserstoffkonzentrationen können durch die Kalibrierung der Wasserstoffaufnahmerate und des Halbsättigungskoeffizienten angepasst werden. Die in Koch (2010) vorgestellte Simulationsstudie zeigten, dass eine bessere Anpassung der simulierten Wasserstoffkonzentrationen mit sinnvollen Werten nicht möglich war. Methan- und Kohlendioxidgehalt im Biogas können durchgängig gut abgebildet werden.

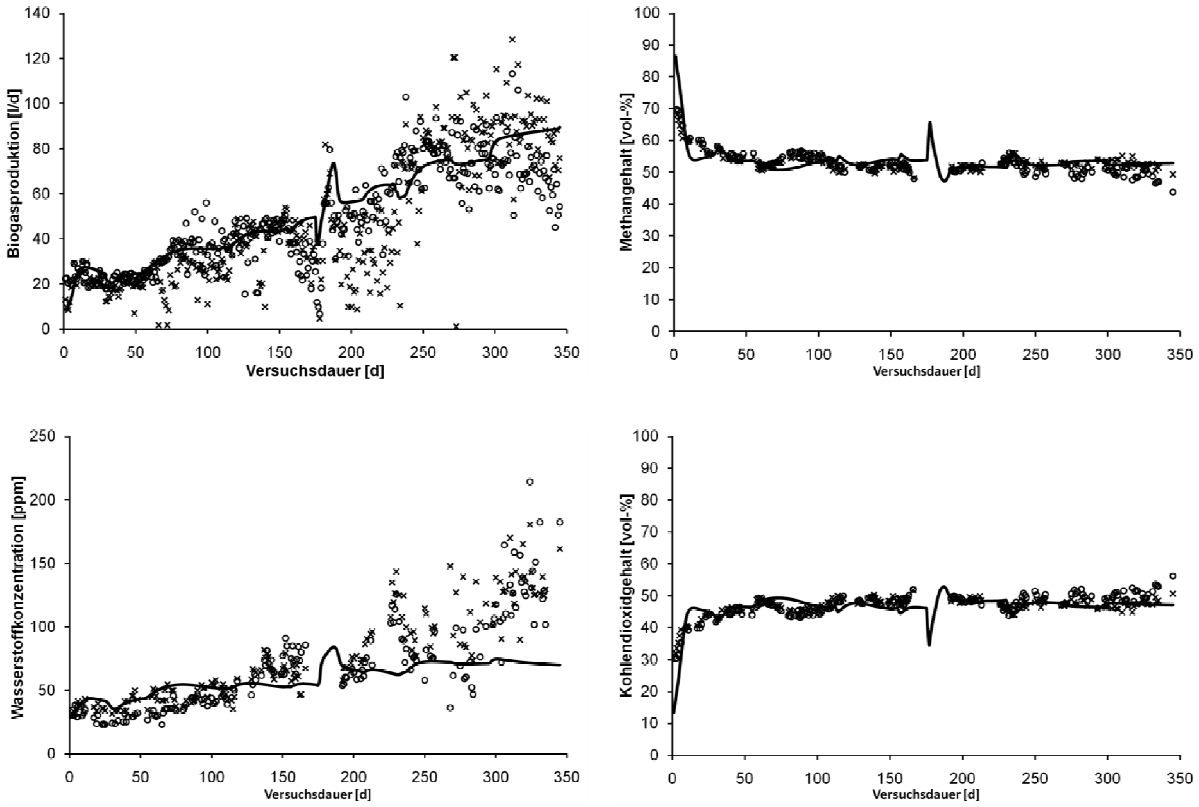


Abbildung 56: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- sowie Wasserstoffgehalt bei der mesophilen Vergärung von Grassilage

Neben einer zuverlässigen Vorhersage von Biogasproduktion und -zusammensetzung ist insbesondere die Abbildung der zur Beurteilung der aktuellen Prozessstabilität geeigneten Parameter wie der Gehalt an Essig- und Propionsäure sowie der FOS/TAC-Wert wichtig. Jener kann ähnlich gut im Modell abgebildet werden wie der pH-Wert, zeigt aber analog der Messwerte eine deutlich höhere Dynamik.

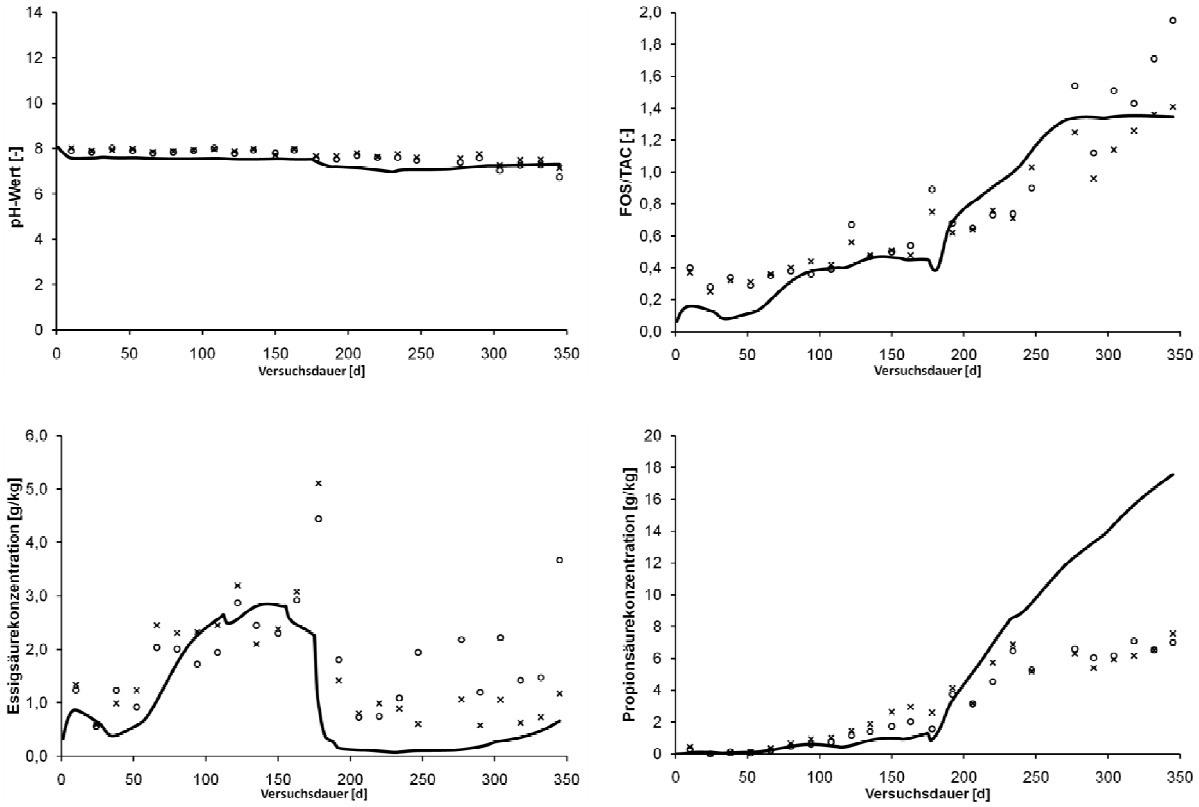


Abbildung 57: Vergleich Simulations- und Messwerte für pH-Wert, FOS/TAC, Essig- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Grassilage

Die Abbildung von Essig- und Propionsäure gelingt bis zur Wasserzugabe an Tag 176 recht gut, danach kommt es zu einer Unter- bzw. Überschätzung der jeweiligen Konzentration. Die Gründe dafür liegen einerseits in der angesprochenen Tatsache, dass die Wasserstoffkonzentrationen ab diesem Zeitpunkt durch das Modell ebenfalls unterschätzt werden. Andererseits verkürzte sich durch das höhere Wasser-Substrat-Verhältnis von da an neben der ohnehin steigenden Raumbelastung die Aufenthaltszeit auf weniger als 50 Tage. Dadurch kann es in Abhängigkeit von der Wachstumsrate der jeweiligen Bakterien, zu einer Auswaschung kommen (vgl. Abbildung 59), wodurch der Abbau der jeweiligen Verbindung ins Stocken gerät. Dieser Effekt wird durch die Simulation jedoch überschätzt. Im Gegensatz zu Essig- und Propionsäure decken sich Simulations- und Messwerte für Buttersäure verhältnismäßig gut (Abbildung 58).

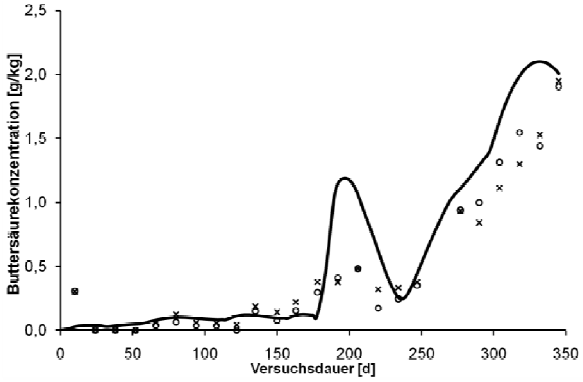


Abbildung 58: Vergleich Simulations- und Messwerte für die Buttersäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Grassilage

Wie sich die Wasserzugabe und die mit zunehmender Raumbelastung verkürzte Verweilzeit auf die Konzentration von valerian- und buttersäureabbauende (X_C4), propionsäure-abbauenden (X_Pro), acetatverwertenden (X_Ac) und hydrogenotrophen (X_H2) Mikroorganismen auswirkt, zeigt Abbildung 59. Es wird deutlich, dass die Population von Acetatverwertern stetig steigt, während jene der propionsäureabbauenden aufgrund der geringeren Wachstumsrate (13 d^{-1} gegenüber 20 d^{-1} von C4) nach der Wasserzugabe stark einbricht. Dadurch kommt es zu dem in Abbildung 57 gezeigten Propionsäurestau. Auch der Peak in der Buttersäurekonzentration in Abbildung 58 um Tag 200 kann mit der wasserzugabebedingten Ausschwemmung mit anschließender Regeneration der entsprechenden Population erklärt werden.

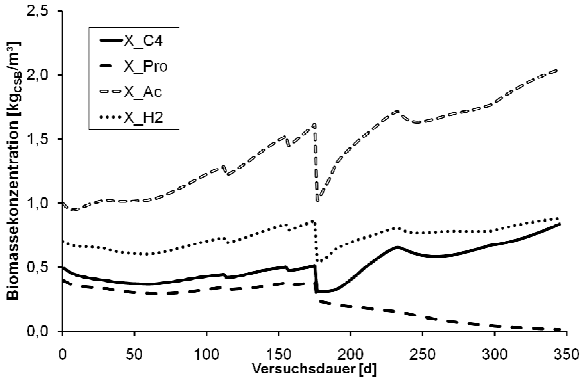


Abbildung 59: Entwicklung der Biomassekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Grassilage

Abschließend kann der zur Kalibrierung der kinetischen Parameter genutzte Nash-Sutcliffe-Koeffizient zur Quantifizierung der Übereinstimmung von Simulations- und Messwerten genutzt werden (Tabelle 25). Während die Biogasproduktion, die Gesamtstickstoff-,

Ammonium- und Buttersäurekonzentrationen sowie der FOS/TAC-Wert durchgängig ein hohes Maß an Übereinstimmung (Maximum von 75 %) erzielen, werden der Methan- und Kohlendioxidgehalt sowie der pH-Wert schlechter als der einfache Durchschnitt bewertet. Diese Abweichung ist insbesondere durch den nahezu konstanten Verlauf der Messwerte zu erklären, wodurch schon ein einfacher Durchschnitt eine gute Näherung darstellt.

Tabelle 25: Simulationsgüte (Nash-Sutcliffe-Koeffizient) gegenüber der Messwerte für Reaktor L und R

Parameter	Beschreibung	Reaktor L	Reaktor R
Q_{Gas}	Biogasproduktion	0,52	0,51
CH_4	Methan	-0,08	-0,07
CO_2	Kohlendioxid	-0,08	-0,07
H_2	Wasserstoff	0,26	0,24
TKN	Gesamtstickstoff	0,68	0,75
NH_4-N	Ammonium	0,67	0,70
S_{Ac}	Essigsäure	0,16	-0,49
S_{Pro}	Propionsäure	-0,30	-0,13
S_{Bu}	Buttersäure	0,46	0,56
pH-Wert		-1,12	-0,31
FOS/TAC		0,54	0,54
TS	Trockensubstanz	0,28	0,19

Es bleibt festzuhalten, dass der Nash-Sutcliffe Koeffizient den jeweiligen visuellen Eindruck quantifizieren lässt und damit ein wichtiges Instrument zur Beurteilung einer Simulationsgüte darstellt. Maßgeblich für hohe Koeffizienten ist neben der Simulationsgüte selbst, auch ein dynamischer Verlauf der Messwerte.

II.3.2.8.2. Thermophile Betriebsweise

Für die Simulationen des thermophilen Bereiches wurde der entsprechende Standardsatz des ADM1 für den thermophilen Temperaturbereich analog Tabelle 4 als Startwert gewählt, wobei der Einfluss der Temperatur auf Wachstumsraten u.ä. bereits berücksichtigt ist. Die sich als vorteilhaft erwiesenen Modifikationen wie die Einbindung der Zerfallsbiomasse und der zusätzliche Term zur Abbildung der Beeinflussung des Trockensubstanzgehaltes wurden ebenfalls übernommen. Das Vorgehen zur Zulauffraktionierung und Parameterkalibrierung erfolgte ebenso analog des Vorgehens für den mesophilen Bereich.

Obgleich die Zusammensetzung der Grassilage der für die mesophile Versuchsreihe entsprach, ergab sich für den thermophilen Temperaturbereich ein deutlich höherer abbaubarer Anteil an Cellulose und Hemicellulose d, wodurch sich auch die Verhältnisse von

f_{Ch_Xc} und f_{XI_Xc} verschoben haben (Tabelle 26). Der entsprechende Anteil d wurde gemäß Gleichung (22) mit einem Abbaugrad von 75 % bezüglich des oTS bestimmt und entsprach damit wieder der manuellen Anpassung über die Gaskurve, wo ein Wert von 0,6 ermittelt wurde.

Tabelle 26: Zulauffraktionierung nach der Desintegration gemäß f-Faktoren (thermophil)

Parameter	Einheit	Beschreibung	Wert
f_{Pr_Xc}	-	Proteine aus X_c	0,187
f_{Li_Xc}	-	Fette aus X_c	0,033
f_{Ch_Xc}	-	Kohlenhydrate aus X_c	0,508
f_{XI_Xc}	-	Inertes aus X_c	0,272
d	-	Abbaubarer Anteil von Cellulose und Hemicellulose	0,64

Weder die Desintegrations- und Hydrolysekonstanten noch die Stickstoffgehalte der beteiligten Komponenten bedurften einer Anpassung gegenüber dem mesophilen Bereich. Die Kalibrierung der kinetischen Parameter für den thermophilen Bereich zeigte, dass eine gute Übereinstimmung von Simulations- und Messwerten mit der Kalibrierung der gleichen Parameter wie im mesophilen Bereich erreicht werden konnte (Tabelle 27). Die Tendenz der notwendigen Anpassungen sind dabei denen von Gehring et al. (2009) ähnlich, die ebenfalls die Biogasgewinnung aus Grassilage untersuchten.

Tabelle 27: Standardparameter des ADM1 und kalibrierte Werte für die thermophile Fermentation von Grassilage

Parameter	Einheit	Beschreibung	ADM1	Gehring et al. (2009)	diese Studie
k_{m_Ac}	d^{-1}	Maximale Aufnahmerate für Acetat	16,0		3,6
K_{S_H2}	kg_{CSB}/m^3	Halbsättigungskonzentration für Wasserstoff	$5 \cdot 10^{-5}$	$7{,}75 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
$K_{I_H2_Pro}$	kg_{CSB}/m^3	Wasserstoffhemmkonstante für den Propionsäureabbau	$1 \cdot 10^{-5}$	$1{,}1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-7}$
$K_{I_H2_C4}$	kg_{CSB}/m^3	Wasserstoffhemmkonstante für den Valerian- und Buttersäureabbau	$3 \cdot 10^{-5}$	$1{,}56 \cdot 10^{-6}$	$9{,}6 \cdot 10^{-8}$

Analog dem Vorgehen zum mesophilen Bereich wurde auch in dieser Simulationsstudie auf ein hohes Maß an Übereinstimmung insbesondere für den Parameter Ammonium geachtet. Die im Folgenden dargestellten Simulationsergebnisse wurden für K_{hyd} mit 2,5 % und n_{hyd} mit 1,0 erhalten. Die gegenüber dem mesophilen Bereich von 2,3 auf 1,0 notwendige Anpassung von n_{hyd} zeigt, dass der Einfluss des Trockensubstanzgehaltes im thermophilen Bereich deutlich geringer ist.

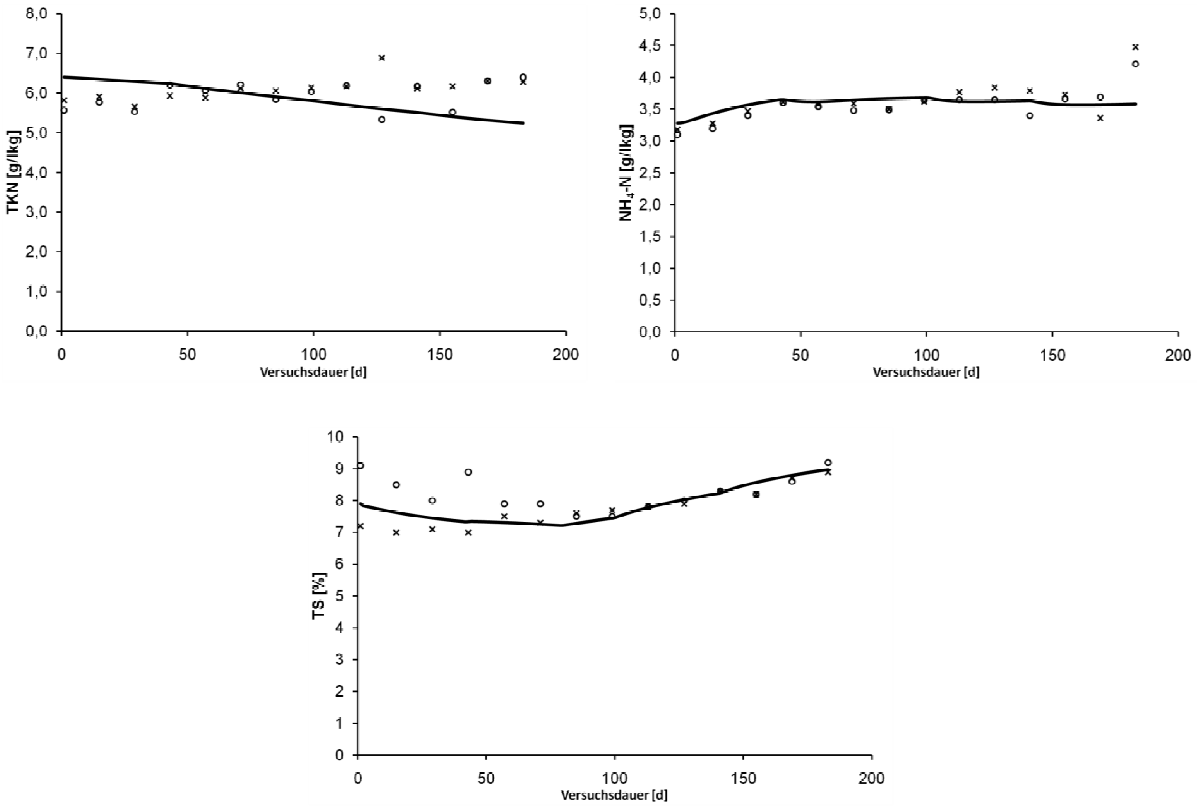


Abbildung 60: Vergleich Simulations- und Messwerte für Gesamtstickstoff (TKN), Ammoniumstickstoff (NH_4-N) und Trockensubstanz (TS) bei der thermophilen Vergärung von Grassilage

Dank der Erfahrungen aus dem mesophilen Betrieb kam es neben der sukzessiven Raumbelastungssteigerung zu keiner nennenswerten Veränderung im Zulauf bzw. den äußeren Bedingungen, wodurch sich dieser verhältnismäßig statische Verlauf der Messwerte ergibt. Während der Parameter TKN nur mittelmäßig abgebildet wird, decken sich die Simulations- und Messwerte für Ammonium- und Trockensubstanzgehalt sehr gut. Erneut rechtfertigen die guten Simulationsergebnisse die Einführung der Funktion zur Beschreibung des Einflusses des TS-Gehaltes auf die Hydrolyse (und damit auch auf die Freisetzung von Ammonium).

In den Abbildungen ist der gesamte Zeitraum von ca. 180 Tagen inklusive einer 36-tägigen Übergangsphase vom mesophilen in den thermophilen Temperaturbereich dargestellt. Offenbar wird aber danach noch eine gewisse Adaptionszeit (etwa bis zum Tag 100) benötigt, bis sich schließlich ein quasistationärer Zustand mit vergleichsweise konstanter Biogaszusammensetzung einstellt (Abbildung 61). Zur Kalibrierung wurden die ersten 50 Tage ausgeblendet. Es wird deutlich, dass die Gaszusammensetzung nach dieser Zeit recht gut

getroffen wird, während die gemessene Biogasproduktion bei höheren Raumbelastungen unter den Erwartungen des Modells zurückbleibt und bereits bei einer Raumbelastung von 2,0 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ zum Erliegen kommt. Offenbar können die temperaturbedingt hohen Ammoniakkonzentrationen nur bei geringen Raumbelastungen toleriert werden. Da sowohl Mess- als auch Simulationswerte, von der letzten Messung abgesehen, eine nahezu konstante Ammoniumkonzentration belegen, kann auch das Modell den Einbruch in der Gasproduktion nicht vorhersagen. Vermutlich ist ein Zusammenspiel weiterer Gründe wie der Anstieg des Feststoffgehaltes sowie der Akkumulation von Propionsäure für den Einbruch verantwortlich.

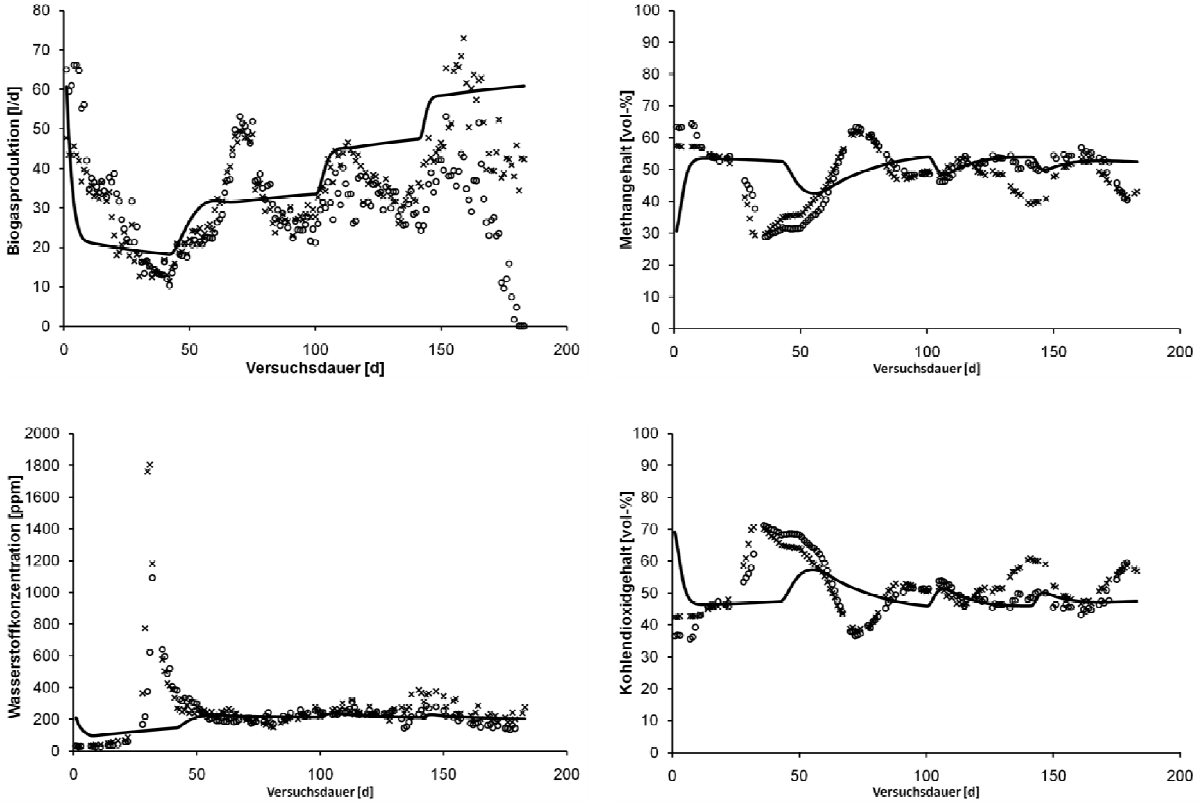


Abbildung 61: Vergleich Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid- sowie Wasserstoffgehalt bei der thermophilen Vergärung von Grassilage

Erneut zeigt sich der pH-Wert trotz zunehmender Akkumulation organischer Säuren als sehr statisch. Im Gegensatz dazu bestätigt der FOS/TAC einmal mehr seine gute Anwendbarkeit und zeigt die Raumbelastungssteigerungen deutlich an, wenngleich der Effekt später aufgrund der erfolgten Adaption geringer ausfällt. Während die Entwicklung der gemessenen und damit auch der simulierten Essigsäurekonzentration eher indifferent ausfällt, kann die zunehmende Akkumulation höherwertiger Säuren (z.B. Propionsäure) gut abgebildet werden (Abbildung 62).

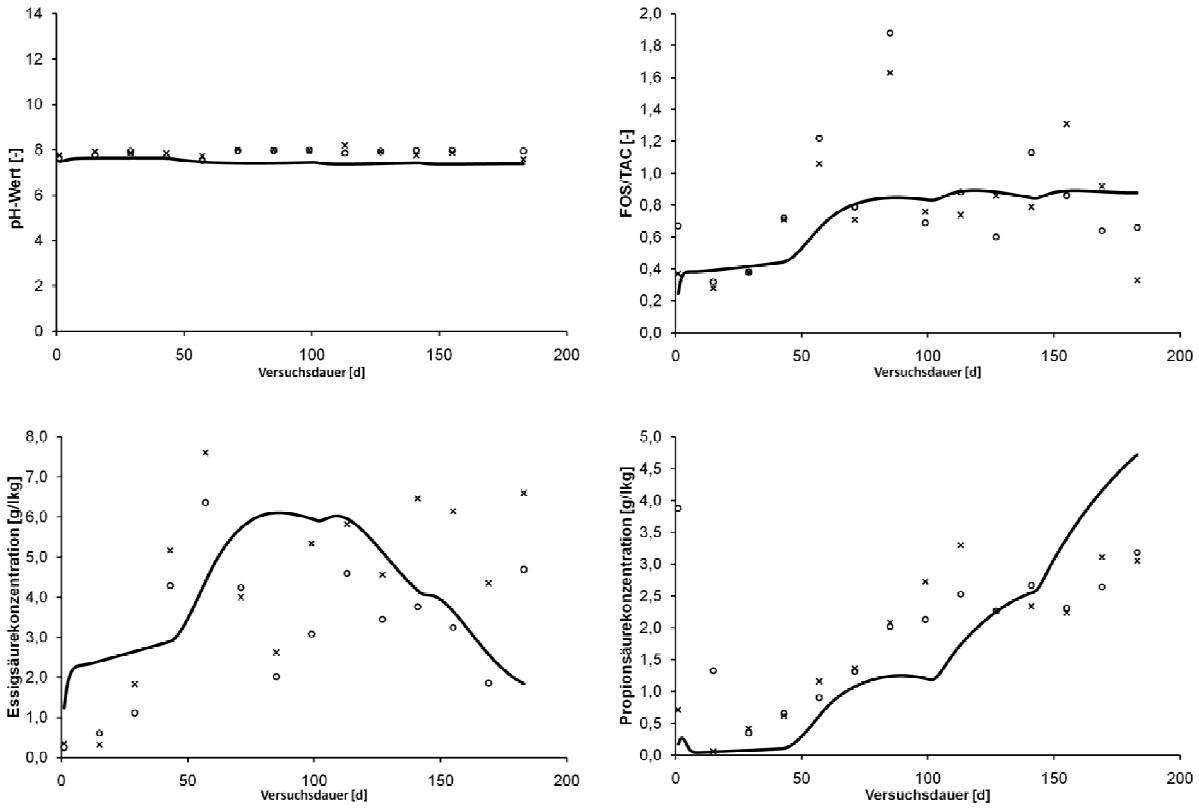


Abbildung 62: Vergleich Simulations- und Messwerte für pH-Wert, FOS/TAC, Essig- und Propionsäurekonzentration bei der thermophilen Vergärung von Grassilage

Zur Kalibrierung der kinetischen Parameter wurde erneut der Nash-Sutcliffe-eingesetzt, was schnell zu guten Simulationsergebnissen führte. Die anhand des Koeffizienten ablesbare Simulationsgüte fällt diesmal jedoch deutlich schlechter aus. Dies liegt insbesondere in dem teilweise sehr statischen Verlauf der Messwerte begründet, wodurch ein simpler Messwertdurchschnitt bereits eine gute Näherung darstellt. Dementsprechend durchwachsen sind folglich die ermittelten Nash-Sutcliffe-Koeffizienten, die sich im Bereich von -2,5 für den pH-Wert und immerhin 0,48 für den TS-Gehalt bewegen.

Ähnlich dem mesophilen Bereich war erneut eine teilweise starke Anpassung von Parametern notwendig. Es fällt besonders auf, dass die Aufnahmerate der acetoclastischen Population vermindert und gleichzeitig die Halbsättigungskonzentration der hydrogenotrophen erhöht wurde. Die Reaktionswege zur Methanbildung sind im ADM1 mit dem Verhältnis 0,3 für die hydrogenotrophe und 0,7 für die acetoclastische Methanogenese verankert (vgl. Tabelle 3 Prozess j 7). Neueste Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Methanbildung nur zu einem geringen Anteil über Acetat abläuft und der wesentliche Anteil über die hydrogenotrophe Konvertierung der vergasten Biomasse gebildet wird (Souidi et al., 2007; Klocke et al., 2008;

Laukenmann et al., 2009; Scherer et al., 2009b). Durch die starke Anpassung der Parameter zum Nachteil von Acetat und zugunsten von Wasserstoff wurde das im ADM1 verankerte Verhältnis kompensiert. Anhand der sich aus der Parameterkalibrierung ergebenden Erkenntnisse können die mikrobiologischen Erfahrungen bestätigt werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die dritte der vier Phasen der Methanbildung, die bisher nur Acetogenese genannt wird, zumindest um die Bezeichnung Dehydrierung ergänzt werden (Weiland, 2010).

II.3.2.9. Modellvalidierung: Laborreaktoren LfL-ILT

Die Analyse der Maisilage und des Fermenterinhalts wurde am Institut für Landtechnik und Tierhaltung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL-ILT) durchgeführt (Andrade et al., 2009b). Die Fermenter mit einem Fassungsvermögen von jeweils 36 Liter wurden täglich diskontinuierlich mit Maissilage beschickt. Vier Laborfermenter (LF-1, LF-2, LF-3 und LF-4) wurden parallel bei 38°C betrieben, mit jeweils einer Fütterung pro Tag. Die Raumbelastung der einzelnen Reaktoren variierte zwischen 0,5 und 5,1 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$, mit einer durchschnittlichen oTS-Fracht von etwa 70 g_{oTS}/d. Die durchschnittliche spezifische Gasproduktion betrug 590 L/kg_{oTS} mit 55% Mittelmethangehalt für die 450 ausgewählte Tage. Die Laborfermenter sind in Abbildung 63 dargestellt.

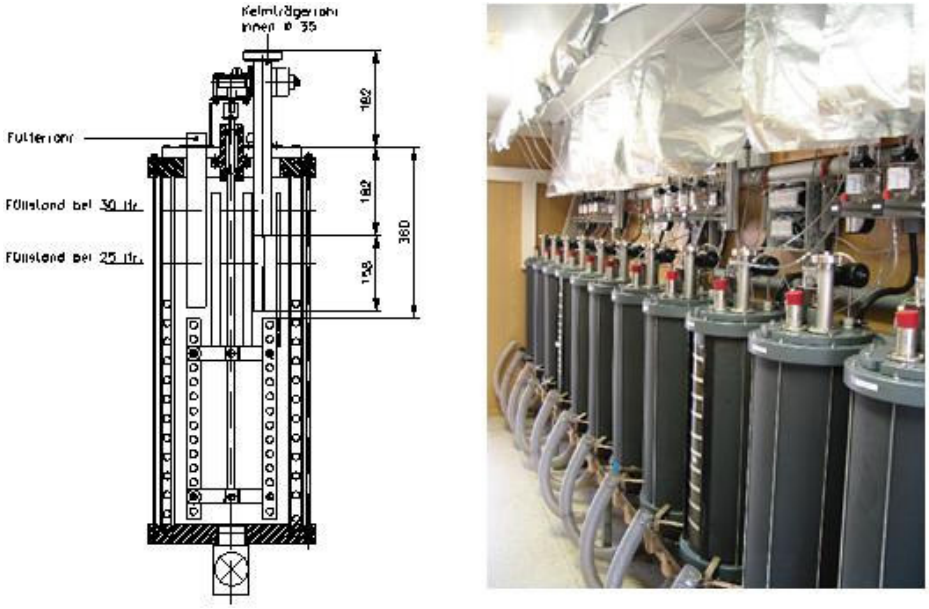


Abbildung 63: Versuchsaufbau zur Monofermentation von Maissilage (LfL-ILT)

CSB- und Stickstoffkonzentrationen wurden spektrophotometrisch (ISIS 6000, Dr.-Lange), TS und oTS wurden nach Deutschem Einheitsverfahren (DEV, 1981) bestimmt. Die organische Substanz wurde detailliert analysiert, um den Gehalt an Rohprotein, Rohfett, Rohfaser und stickstofffreien Extraktstoffen bestimmen zu können (Weender-Analyse, beschrieben in Kapitel II.2.3). Die Kohlenhydrate wurden weiter unterteilt in Hemicellulose (NDF-ADF), Cellulose (ADF-ADL) und Lignin (ADL) durch die Bestimmung der van Soest-Fraktionen. Flüchtige Fettsäuren (VFA) wurden mit einem AGILENT 6890N-Gaschromatographen gemessen. Die Gesamtbiogasproduktion wurde mit RITTER Trommelgaszählern bestimmt.

Tabelle 28 zeigt die Substratcharakteristik der verwendeten Grassilage.

Tabelle 28: Zusammensetzung der verwendeten Maissilage

Parameter	Einheit	Maissilage
TS	%	34,7
oTS	% TS	97,6
CSB	g kg^{-1}	471*
Milchsäure	g kg^{-1}	15000**
FOS	$g_{HAC_Äq}$ kg^{-1}	5360
pH-Wert	-	4
TKN	g kg^{-1}	4,5
NH_4-N	g kg^{-1}	0,55
Rohprotein	% TS	7,5
Rohfaser	% TS	19
Rohfett	% TS	2,3
NfE	% TS	68,8
NDF	% TS	48,2
ADF	% TS	23,8
ADL	% TS	3,4

*Berechnet aus den TS- und Säuremittelwerten, mit einem CSB-Gehalt von 1,3 g_{CSB} g_{TS}^{-1}
**Angenommen

Für die Simulation der erhobenen Betriebsdaten wurde der kalibrierte Parametersatz aus Tabelle 13 verwendet. Die in der Containeranlage erzielten Hydrolyseraten konnten in den Laborreaktoren der LfL-ILT nicht erreicht werden, was in einer stark überhöhten Gasproduktionsrate im Modell im Vergleich zu den Messdaten resultierte. Um eine detailliertere Übereinstimmung mit der gemessenen Biogasproduktionsrate zu bekommen, wurde die Hydrolyserate für die Stofffraktionen Kohlenhydrate, Proteine und Lipide (k_{hyd_ch}, k_{hyd_pr} und k_{hyd_li}) um 83% verringert.

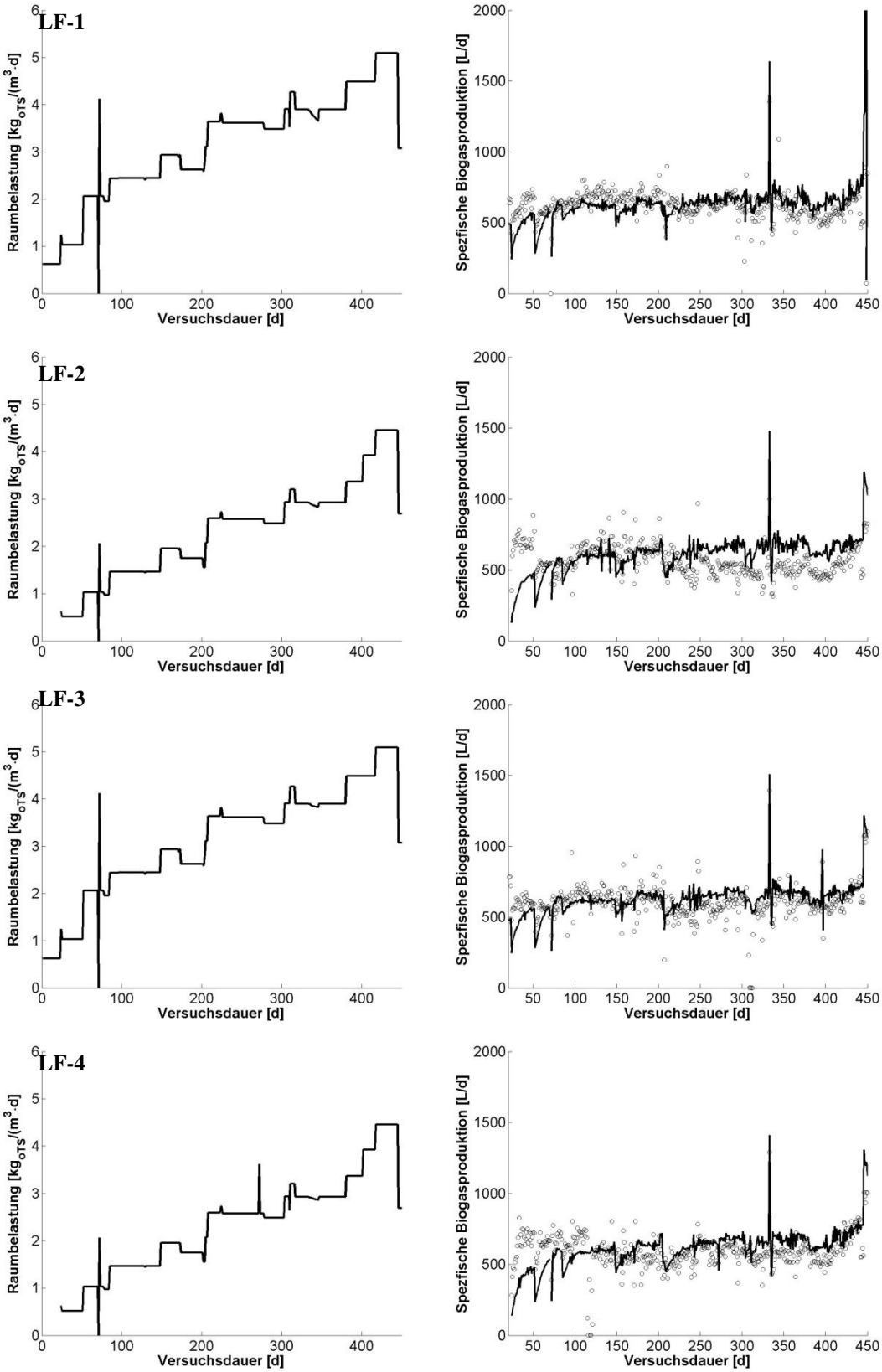


Abbildung 64: Raumbelastung und Simulations- und Messwerte für die spezifische Biogasproduktion bei der mesophilen Vergärung von Maissilage in den vier Laborfermentern (LF-1, LF-2, LF-3 und LF-4)

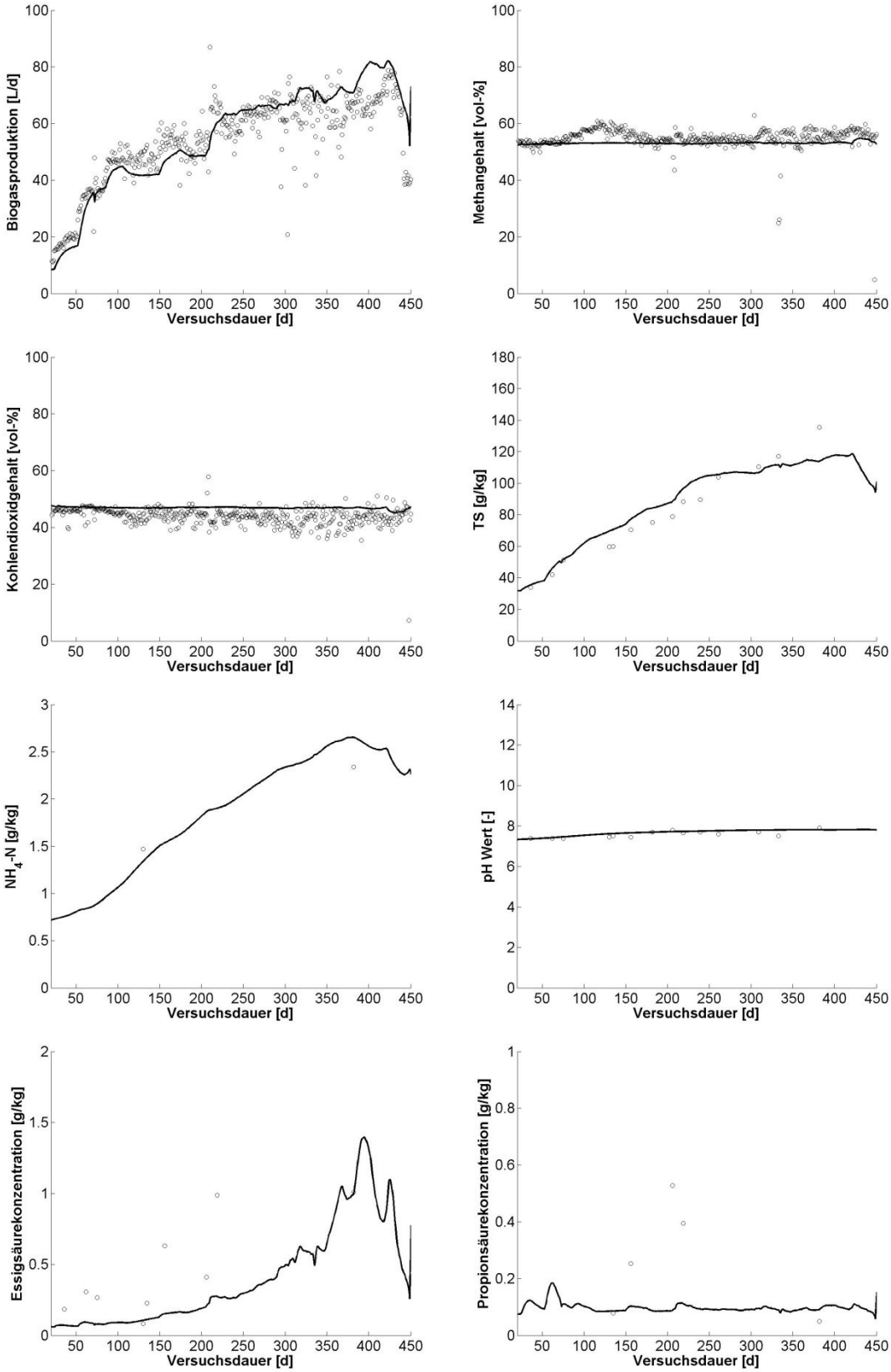


Abbildung 65: Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid-, und Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff, pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Maissilage für den Laborfermenter LF-1

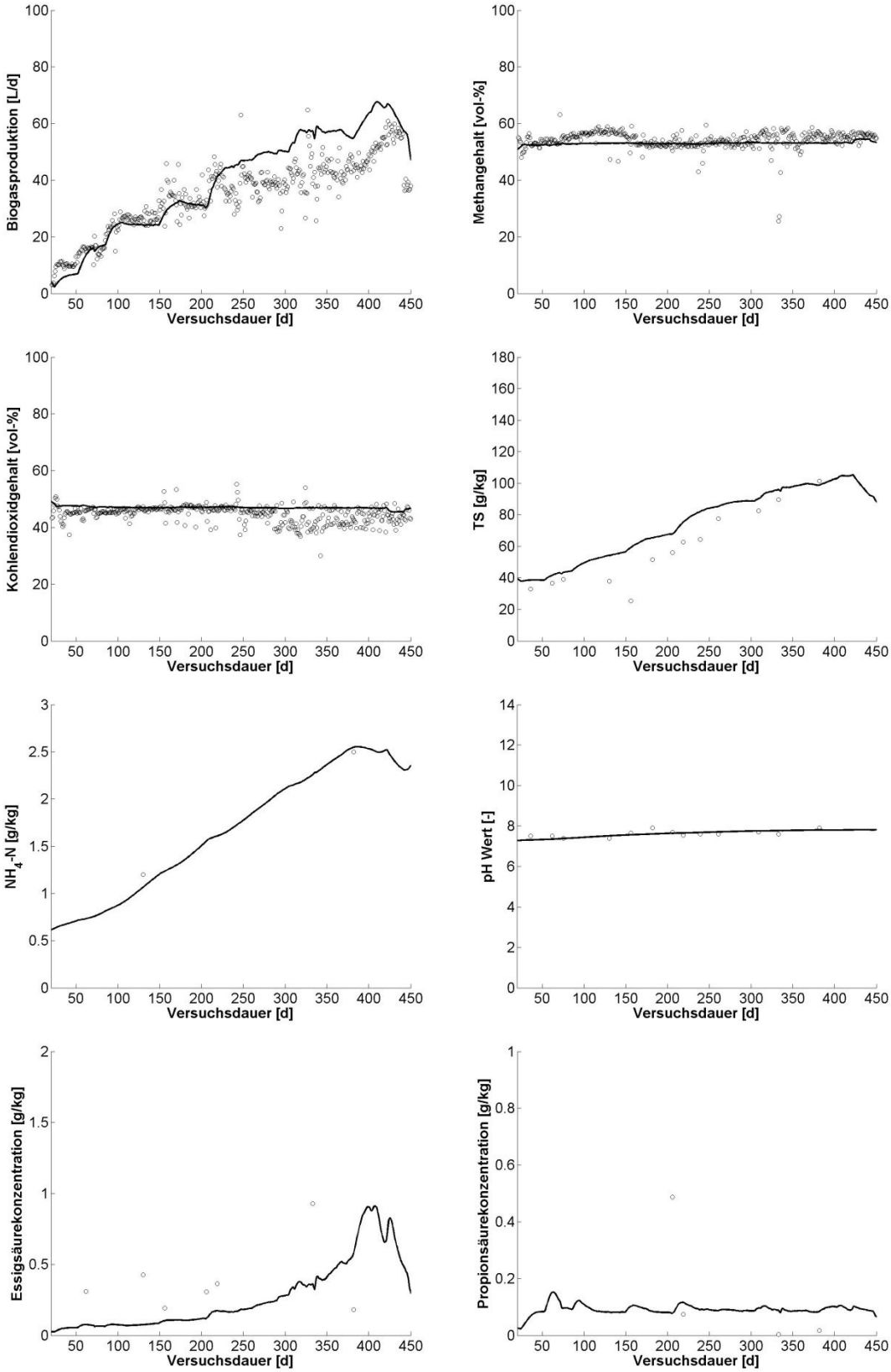


Abbildung 66: Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid-, und Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff, pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Maissilage für den Laborfermenter LF-2

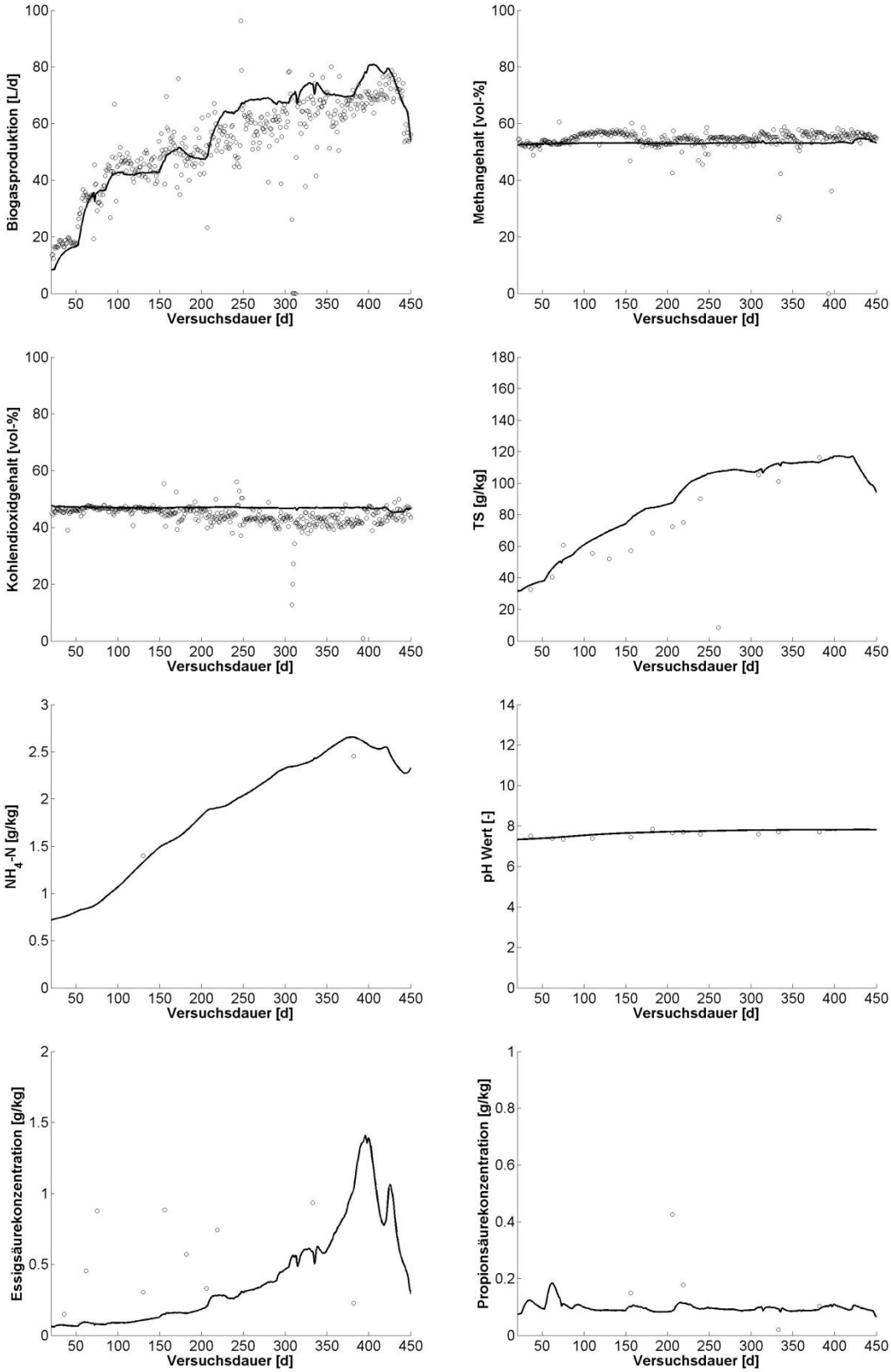


Abbildung 67: Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid-, und Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff, pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Maissilage für den Laborfermenter LF-3

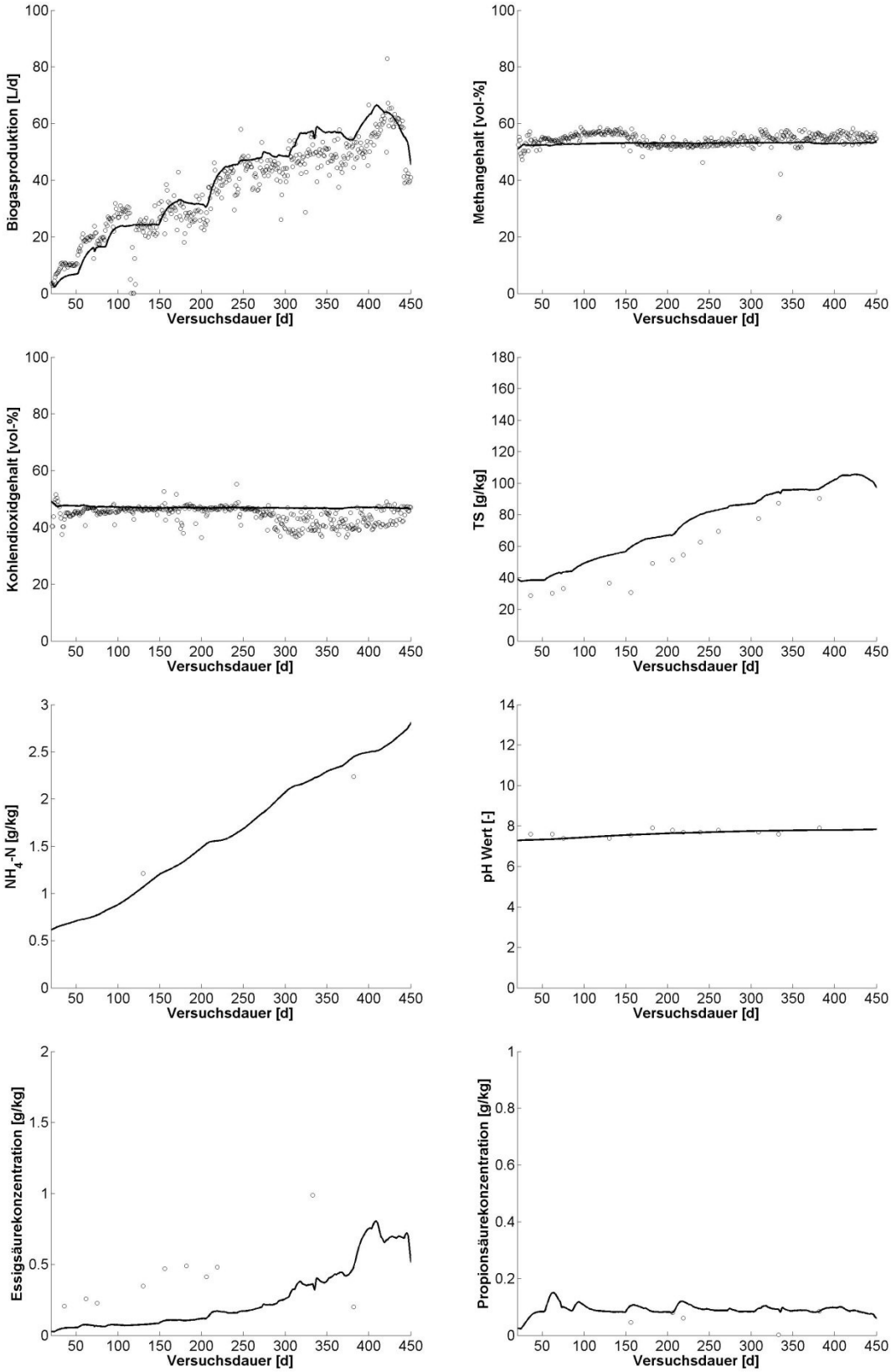


Abbildung 68: Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, Methan-, Kohlendioxid-, und Trockensubstanzgehalt, Ammoniumstickstoff, pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentration bei der mesophilen Vergärung von Maissilage für den Laborfermenter LF-4

II.3.2.10. Modellvalidierung: Pilotanlage Pellmeyer

Neben den Laborreaktoren wurden zudem die Betriebsdaten der vom Institut für Landtechnik und Tierhaltung in Freising betriebenen 3,5 m^3 Pilotanlage zur Modellvalidierung herangezogen. Die Abbildung des Fermenters im Simulationsmodell erfolgte als Rührkesselreaktor unter Berücksichtigung eines variablen Volumens. Betriebsdaten und Informationen zum Anlagenbetrieb sind dem Berichtsteil der LfL-ILT zu entnehmen. Die Darstellung der während der Versuchsdauer eingestellten Raumbelastung ist in Abbildung 69 dargestellt. Den Vergleich zwischen Simulations- und Messwerten zeigt Abbildung 70.

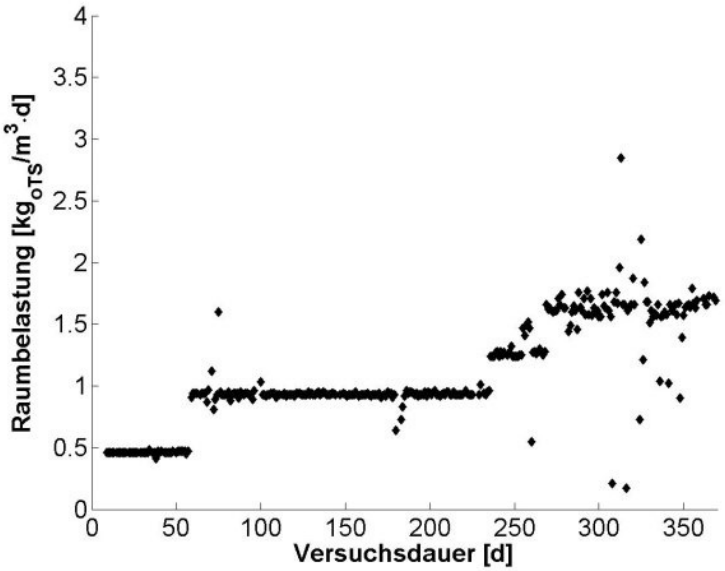


Abbildung 69: Verlauf der Raumbelastung für die Pilotanlage

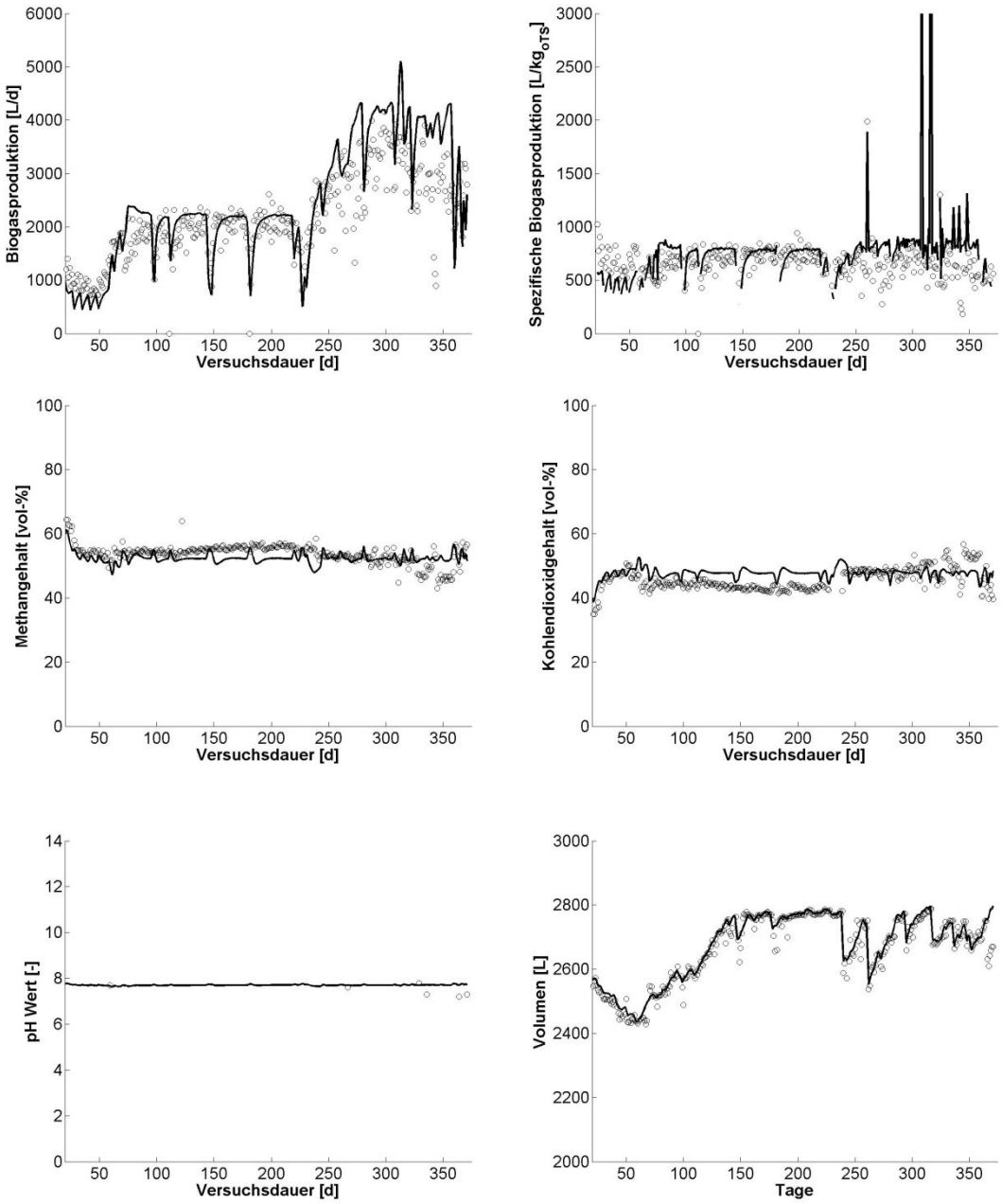


Abbildung 70: Simulations- und Messwerte für Biogasproduktion, spezifische Biogasproduktion, Methan- und Kohlendioxidgehalt, pH-Wert sowie des Fermentervolumens bei der mesophilen Vergärung von Maissilage für die Pilotanlage

II.3.2.11. Regelwerk zur Simulationsstudie

Die Simulation anaerober Prozesse hat in den letzten Jahren in der Praxis eine zunehmende Bedeutung erlangt, wodurch auch der Bedarf an effizienten Simulationsmodellen zur Beschreibung von Biogasprozessen gestiegen ist. Mit der Einführung des ADM1 wurde ein detailliertes Modell veröffentlicht, dessen Komplexität jedoch die Anwendung erschwert. Blumensaat und Keller (2005) gehörten zu den ersten Autoren, die das ADM1 für die Simulation des anaeroben Abbaus von Faulschlamm anwendeten. Das von den Autoren publizierte Regelwerk wird um die Erkenntnisse dieser Arbeit erweitert und ist in Form eines Entscheidungsbaums in folgender Grafik dargestellt.

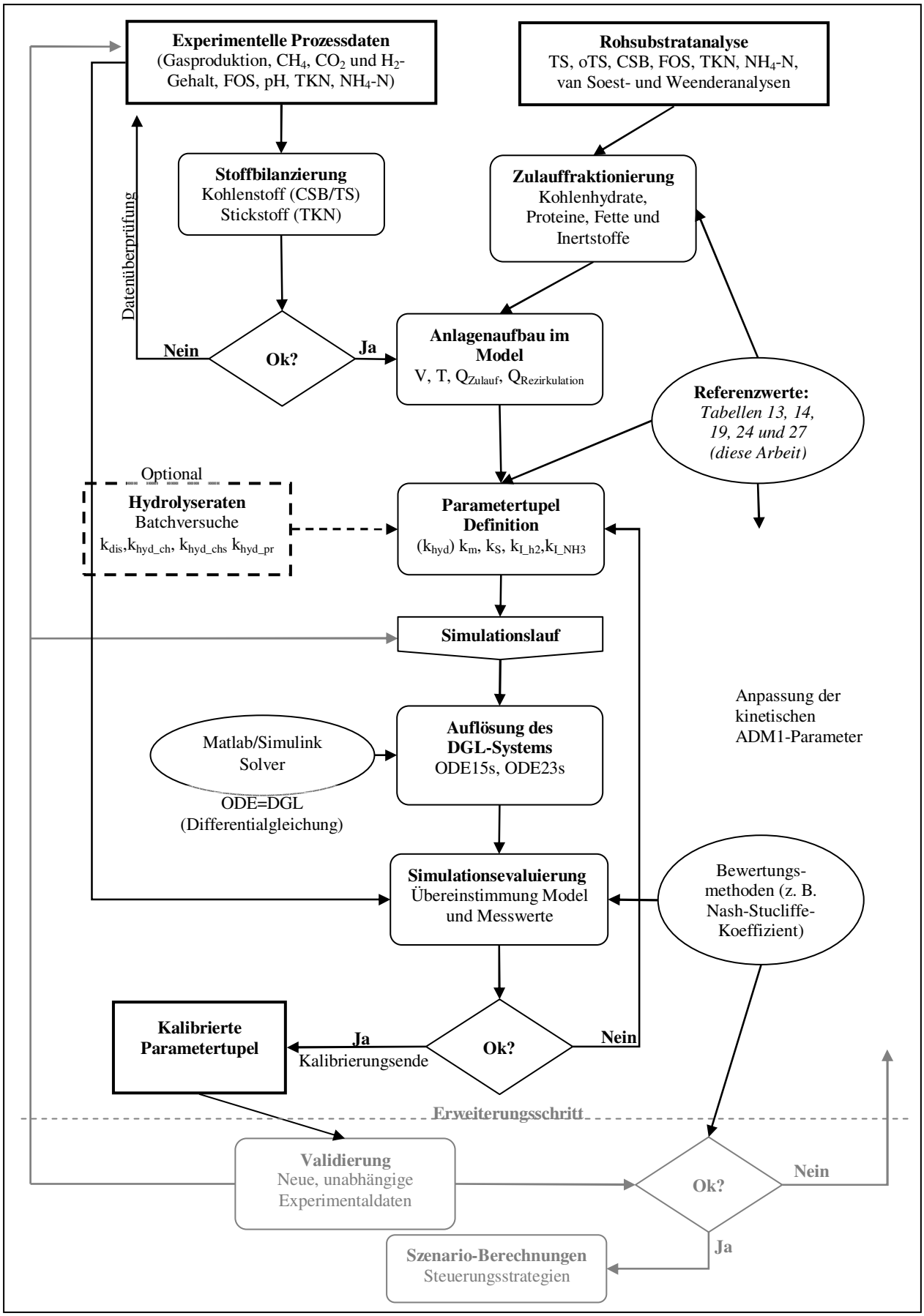


Abbildung 71: Regelwerk zur dynamischen Simulation der Monofermentation von Energiepflanzen

II.3.3. Entwicklung einer modellbasierten Prozesssteuerung

Zur Optimierung und Stabilisierung des Betriebs von landwirtschaftlichen Biogasanlagen werden effektive Steuerung- und Regelungsverfahren benötigt, die sich gut mit einem kalibrierten Modell austesten lassen. Im folgenden Abschnitt werden zunächst die gängigen Parameter, die online erfasst werden, vorgestellt und auf die jeweilige Sensitivität bezüglich der Prozessstabilität hin untersucht. Im Anschluss daran wird dann die auf Grundlage des Modells erstellte Fuzzy-Logik-Steuerung vorgestellt.

II.3.3.1. Geeignete Parameter für die Prozesssteuerung

Mathematische Modelle wie das ADM1 sind ein wertvolles Instrument zur Prozesssteuerung. Grundvorrausetzung dafür sind neben einer auf belastbarer Datenbasis zuverlässigen Kalibrierung insbesondere das Know-how zum effektiven Einsatz der gewonnenen Ergebnisse. Die seitens des Modells ausgegebenen Resultate müssen deshalb kritisch beurteilt werden und auf die jeweilige Sensitivität gegenüber der Prozessstabilität geprüft werden.

II.3.3.1.1. CH_4/CO_2-Verhältnis

In der Regel verfügt jede Biogasanlage über eine Gasanalyseeinheit, mit deren Hilfe zumindest die beiden Hauptkomponenten des Biogases, Methan und Kohlenstoffdioxid, gemessen werden. Beide Gase entstehen in unterschiedlichen Phasen des anaeroben Abbaus. Während CO_2 schon während der Zwischenschritte des anaeroben Abbaus entsteht, wird CH_4 erst als Endprodukt der Abbaukette gebildet. Kommt es zu einer Störung des Anlagenbetriebs, etwa aufgrund einer gestiegenen Raumbelastung, spiegelt sich dies schnell in einem sinkenden CH_4/CO_2-Verhältnis wider (Liebetrau und Kraft, 2004). Die Gaszusammensetzung kann mit dem ADM1 gut abgebildet werden. Grundsätzlich lässt sich das CH_4/CO_2-Verhältnis bei höheren Raumbelastungen nachbilden, wobei mit dem ADM1 bei den publizierten biochemischen Größen eher mit einer gegenüber der Realität zu frühen Hemmung des anaeroben Abbauprozesses zu rechnen ist.

Die Gaszusammensetzung kann in der Praxis schnell erfasst werden, jedoch ist es im Falle eine Prozesshemmung und sich dabei verschiebender Verhältnisse in der Gaszusammensetzung für aktives Handeln vielfach schon zu spät. Folglich ist das CH_4/CO_2-

Verhältnis als Leitparameter für die Beurteilung der Prozessstabilität für Modellrechnungen besser geeignet als die analytische Erfassung im Anlagenbetrieb.

II.3.3.1.2. Methanbildungsrate

Neben dem CH_4/CO_2-Verhältnis ist die relative Methanbildungsrate, also das Produkt aus Methangehalt des Biogases und Gasmenge pro Zeiteinheit, ein beliebter Parameter zur Überwachung der biologischen Aktivität (Polit et al., 2002; Liebetrau und Kraft, 2004). Dies liegt vor allem daran, dass die gebildete Methanmenge, bezogen auf die zugeführte Menge an organischer Substanz (m^3_{CH4}/kg_{oTS}) schließlich das entscheidende Kriterium für die Effektivität der Biogasanlage ist. Demzufolge zieht eine Störung im gesamten Abbauprozess immer eine verminderte Methanproduktion nach sich (Murnleitner et al., 2002). Ähnlich dem CH_4/CO_2-Verhältnis kann dieser Parameter nur in Kombination mit anderen Messgrößen der Überwachung dienen.

II.3.3.1.3. pH-Wert

Der pH-Wert wird in vielen verfahrenstechnischen Prozessen als ein Universalparameter angesehen, der durch fast alle biologischen Vorgänge beeinflusst wird. Infolge von Störungen kommt es bei der Vergärung häufig zu einer Akkumulation von Versäuerungsprodukten, die ab einer bestimmten Konzentration sowohl die Acetogenese als auch die Methanogenese inhibieren. Diese Versäuerung, die sich auch in einem sinkenden pH-Wert niederschlägt, kann im Extremfall zum kompletten Zusammenbrechen der anaeroben Abbauvorgänge führen. Der pH-Wert reagiert jedoch erst, wenn bereits die gesamte Pufferkapazität verbraucht worden ist. Aufgrund des verhältnismäßig hohen CO_2-Anteils im Biogas sowie des Entstehens von Ammonium aus proteinreichem Substrat bei Anlagen auf Basis von Gülle oder nachwachsenden Rohstoffen, ist stets eine hohe Pufferkapazität gewährleistet. Erfolgen Maßnahmen erst bei Auftreten eines fallenden pH-Wertes ist es in der Regel zu spät. Sowohl Messwerte als auch Simulationen zeigten, dass der pH-Wert trotz stark beeinträchtigtem Prozess nahezu konstant blieb.

Da der pH-Wert indes problemlos online erfasst werden kann, taucht er in den vielen mathematischen Modellen zur Überwachung der Prozessstabilität auf. Auf eine gute Kalibrierung dieses Parameters ist sowohl für das Zulaufsubstrat als auch für den Gärrest im

Reaktor Wert zu legen. Im ADM 1 kann die Pufferkapazität als „vorausweisender“ Leitparameter näherungsweise über die HCO_3-Konzentration mitgeführt werden.

II.3.3.1.4. Wasserstoffkonzentration

Biogas besteht zu etwa 0,1 % aus Wasserstoff. Bei sinkendem pH-Wert steigt der Gehalt deutlich, was man sich bei der gezielten Wasserstoffproduktion aus Biomasse zunutze macht. Eine niedrige Wasserstoffkonzentration steht für ein neutrales bis leicht basisches Milieu mit einer hohen Pufferkapazität. Dadurch wird ein Energiegewinn für die acetogenen Mikroorganismen garantiert, ohne den die biochemische Reaktion nicht ablaufen würde. Die Wasserstoffkonzentration wird von vielen Wissenschaftlern als eine der Schlüsselparameter angesehen, da diese sensibel auf Störungen reagiert und mit den gängigen Gasanalyseeinheiten erfasst werden kann (Furumai, 1997; Inanc et al., 1999; Huang et al., 2000; Grepmeier, 2002; Murnleitner et al., 2002). Problematisch ist bei der Bestimmung aus der Gasphase die zeitverzögernde Wirkung des Gasraumes, die je nach Verhältnis zwischen Gasbildung und Gasraum erheblich sein kann.

II.3.3.1.5. Gehalt an organischen Säuren

Eine Hemmung des anaeroben Biomasseabbaus ist fast ausschließlich während der Acetogenese und Methanogenese zu erwarten. Im Zuge der Methanbildung entsteht eine Reihe von temporären Zwischenprodukten, deren Konzentration Aussagen über die Effektivität der vorherigen und nachfolgenden Phasen zulässt. Das Bindeglied sind die organischen Säuren, deren Konzentration und Spektrum den aktuellen Prozesszustand charakterisiert. Eine Akkumulation von Säuren spiegelt immer eine Hemmung der nachfolgenden Acetogenese wider, welche unter Umständen ebenfalls durch eine ineffektive Methanogenese ihrerseits gehemmt sein könnte. Demgegenüber spricht ein niedriger Gehalt an organischen Säuren (VFA) für eine zügige Umsetzung des Substrates. In diesem Fall ist unter Berücksichtigung der Hydrolisierbarkeit des Ausgangssubstrates zu prüfen, ob eine Erhöhung der Raumbelastung empfehlenswert ist. Vielfach wird in der Praxis der Gehalt an Propionsäure als Einzelparameter der organischen Säuren zur Beurteilung der Prozessstabilität herangezogen, da sich diese bei einer beginnenden Hemmung zuerst anreichert (Nielsen et al., 2007). Bisher erfolgte die Messung des VFA-Gehaltes in der Regel nicht online, sondern via Titration im Labor. Es gibt allerdings eine Reihe von Ansätzen, die

sich mit der online-Erfassung des Gehaltes an organischen Säuren befassen (Feitkenhauer et al., 2002; von Sachs et al., 2003; Boe et al., 2007). Die Abbildung der Konzentration der organischen Säuren im Modell ist noch mit Schwierigkeiten behaftet. Ursache hierfür ist zum einen die bisher vielfach geringe Messdatendichte und bisweilen die Qualität der Analyse. Zum anderen besteht Bedarf in der Weiterentwicklung der Modelle, beispielsweise in der direkten Abbildung der Milchsäure, die bei silierten Substraten einen nicht unerheblichen Anteil der organischen Säuren ausmachen kann. Tendenzielle Entwicklungen im Prozess können mit dem ADM1 aber abgebildet werden; u.a. die mit der Anreicherung von Säuren in Verbindung stehende Verschiebung des pH-Wertes und die damit verbundene Hemmung nachfolgender Prozessschritte.

II.3.3.1.6. FOS/TAC

Die Stabilität des anaeroben Abbauprozesses kann durch die zwei nachfolgend beschriebenen Parameter genauer beschrieben werden, wenn sie zusammen betrachtet werden: Auf der einen Seite die Pufferkapazität (insbesondere das Kalk-Kohlensäure- und Ammonium-Ammoniakgleichgewicht), auf der anderen Seite die Konzentration an organischen Säuren. Im Idealfall stehen beide Parameter in Einklang und zwar derart, dass ein mittlerer VFA-Gehalt eine gute Raumbelastung kennzeichnet und eine hohe Pufferkapazität einen stabilen Prozess garantiert.

In der Praxis hat dieses Stabilitätskriterium in Form des so genannten FOS/TAC (Verhältnis des Gehaltes an organischen Säuren zur Pufferkapazität) bereits Einzug gehalten (Rieger und Weiland, 2006; Voß et al., 2009). Die meisten Biogasanlagen werden mindestens einmal täglich, in kritischen Zuständen mitunter sogar stündlich, auf ihren FOS/TAC hin untersucht. Die häufig eingesetzten Titrationsautomaten können die Ergebnisse bereits nach etwa 10 Minuten liefern. Da mittels des FOS/TAC die Pufferkapazität erfasst wird, kommt es bereits im Vorfeld einer Versäuerung zu einem Anstieg dieses Wertes, bevor die klassischen Parameter, wie etwa der pH-Wert, überhaupt reagieren. Messwerte und Simulationen zeigen hier im Gegensatz zum pH-Wert einen unter Prozessstörungen deutlich dynamischeren Verlauf.

II.3.3.1.7. Zusammenfassung

Es bleibt also festzuhalten, dass die Prozessstabilität nie an einem einzigen sondern stets an einer Kombination mehrerer Parameter festgemacht werden sollte. Bei den Parametern, die sich zeitnah oder gar online erfassen lassen, ist der FOS/TAC sowie die Methangasproduktion und der Wasserstoffgehalt als gut geeignet herauszustellen. Weniger geeignet erscheint beispielsweise der pH-Wert aufgrund seiner durch die hohe Pufferkapazität bedingte Trägheit.

II.3.3.2. ADM1 basierte Fuzzy Logic Steuerung (ADM1-FL)

II.3.3.2.1. Fuzzy Logic Theorie

Der Begriff der "Fuzzy Logic" ist erstmals von Zadeh (1965), seinerzeit Professor für Elektrotechnik, geprägt worden. Das Konzept wurde in den folgenden Jahren zu einem analytischen Ansatz komplexer Systeme weiterentwickelt (Zadeh, 1973) und auch erfolgreich als Kontrollmechanismus eingesetzt (Mamdani und Assilian, 1975). Die Idee dahinter ist, ein System mathematisch so zu beschreiben, dass es einer linguistischen Beschreibung eines Menschen ähnelt. Dadurch ergibt sich eine Methode, die eine Beschreibung eines Zustandes auch zwischen den Extrema "wahr" (1) und "falsch" (0) ermöglicht. Die Wechselwirkungen der verschiedenen Fuzzy Mengen beruhen dabei auf logischen Operatoren auf Basis des "wenn-dann"-Befehls. Bei technischen Anwendungen müssen außerdem Methoden zur Fuzzyfizierung und Defuzzyfizierung betrachtet werden, die zur Umwandlung von Angaben und Zusammenhängen in Fuzzylogic und wieder zurück dienen.

II.3.3.2.2. Fuzzy Sets Klassifizierung

In Anlehnung an Zadeh (1965) wird ein Fuzzy Set wie folgt definiert: Für eine Variable "X" weist eine Fuzzy Set Klasse "A" die Zugehörigkeitsfunktion fA(x) zu, wobei jeder Wert von x des Sets "X" einen Zugehörigkeitswert zwischen 0 und 1 besitzt. In Abbildung 72 ist exemplarisch die Klassifizierung des niedrigen pH-Wertes für einen Anaerobreaktor dargestellt.

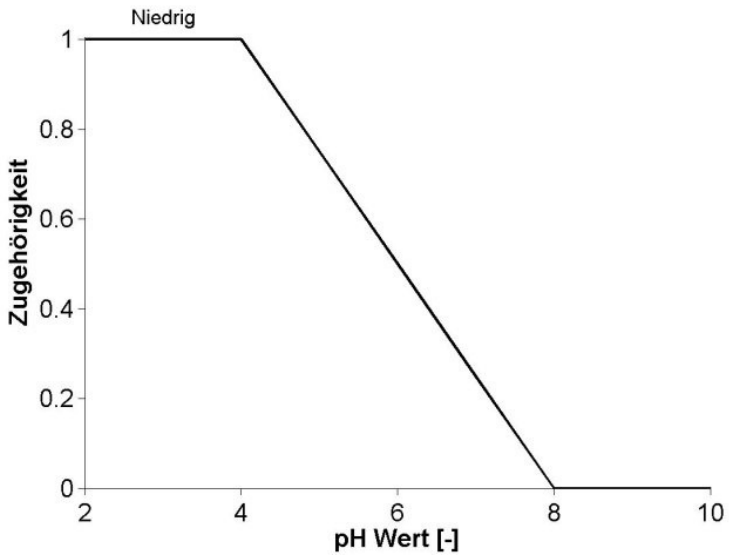


Abbildung 72: Exemplarische Fuzzy Set Zugehörigkeitsfunktion

Im zwischen dem niedrigen pH-Wert (fniedrig(x<4)=1) und dem nicht niedrigen pH-Wert (fniedrig(x>8)=0) liegende Bereich weist die Zugehörigkeitsfunktion einen mittleren Wert zu. Die Fuzzy Sets erlauben die Beschreibung linguistischer Definitionen wie niedrig, mittel und hoch in mathematischer Form. Die jeweilige Zugehörigkeitsfunktion wird, wie im Beispiel, üblicherweise durch eine Gerade, aber auch trigonometrisch oder durch eine Gauß-Funktion beschrieben.

Die Variable X kann gleichzeitig mehrere Eigenschaften haben (bzw. Fuzzy Sets angehören). Abbildung 73 zeigt erneut den pH-Wert, diesmal aber mit den Fuzzy Set Klassen "niedrig" und "mittel". Ein pH-Wert von 7,0 bedeutet z.B. eine Zugehörigkeit von $f_{Niedrig}(7,0) = 0,25$ und $f_{Mittel}(7,0) = 0,67$.

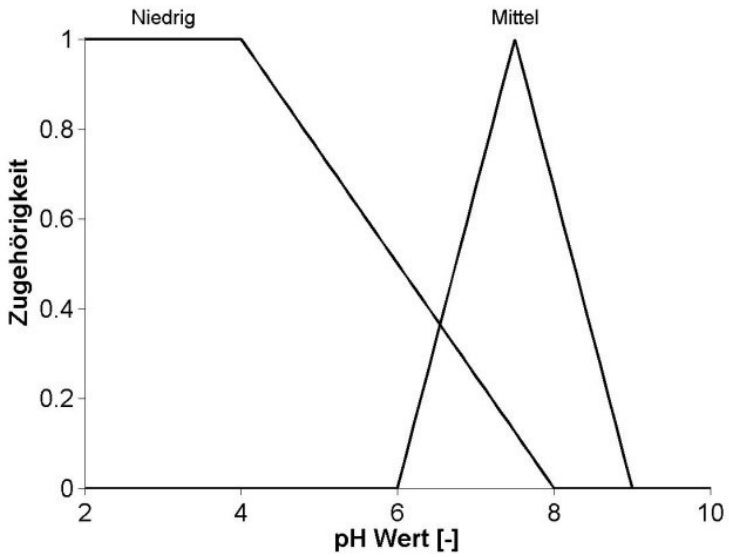


Abbildung 73: Mehrere Fuzzy Set Zugehörigkeitsfunktion

Bei der Erstellung von Controllern auf Basis der Fuzzy Logic sollte darauf geachtet werden, dass jeder Punkt mindestens einem Fuzzy Set zugeordnet werden kann. Dadurch wird eine Rückkopplung für jedes Intervall sichergestellt.

II.3.3.2.3. Logische Operatoren - Fuzzy Regeln

Eine Steuerung anhand der Fuzzy-Logic basiert auf bedingten Anweisungen, beispielsweise "*Wenn pH-Wert ist niedrig und Konzentration an organischen Säuren ist hoch, dann Fütterung aussetzen.*" In der Regel werden also mehrere Variablen zur Entscheidungsfindung beachtet. Die mathematischen Mengenoperationen wie Komplement, Durchschnitt und Vereinigung finden entsprechend Anwendung:

X ist ***nicht*** $A = 1{,}0 - f_A(x)$

X ist A ***und*** Y ist B = minimum $(f_A(x), f_B(y))$

X ist A ***oder*** Y ist B = maximum $(f_A(x), f_B(y))$

Für die beiden Fuzzy Sets X und Y ergibt sich dementsprechend ein Regelwerk, welches auch als kartesisches Produkt der beiden Stets ausgedrückt werden kann. Vielfach ist auch die Nutzung von Matrizen von Vorteil:

$$X \cdot Y = Z_{ij} = \left\lfloor \min\left\{ f_i(x), f_j(y), \right\} \right\rfloor_{m \times n} \text{ bzw. } X \cdot Y = Z_{ij} = \left\lfloor \min x_i, y_j \right\rfloor_{m \times n} \qquad (41)$$

wobei m die Anzahl an Fuzzy Sets von X und n jene von Y ist. Wenn beispielsweise für die Konzentration an organischen Säuren (FOS) und die spezifische Methanproduktion (Y_{CH4}) die drei Klassen "niedrig", "mittel" und "hoch" definiert sind, dann könnte das Regelwerk zur Regulierung der Fütterung wie folgt aussehen:

"wenn Y_{CH4} *ist A*
und FOS ist B
dann erhöhe (↑), halte (0) oder verringere (↓) die Fütterung"

Das verbal formulierte Regelwerk kann auch in Form einer Matrix (Tabelle 29) dargestellt werden.

Tabelle 29: Beispielhaftes Regelwerk

Y_{CH4} \ FOS	Niedrig	Mittel	Hoch
Niedrig	↓	↓	↓
Mittel	↑	↑	↓
Hoch	↑	0	↓

In einem Beispiel soll angenommen werden, dass FOS 0,6 "Niedrig" und 0,3 "Mittel" und Y_{CH4} 0,8 "Mittel" und 0,5 "Hoch" sei. Entsprechend der Definition für den Durchschnitt (und-Operator) ergeben sich die entsprechenden Zugehörigkeiten der Ausgangsgröße gemäß Tabelle 30.

Tabelle 30: Beispielhafte Zugehörigkeitswerte

Y_{CH4} \ FOS	Niedrig	Mittel	Hoch
Niedrig	0	0	0
Mittel	0,6	0,3	0
Hoch	0,5	0,3	0

Die Ausgangsgrößen können auf zweierlei Art definiert werden. Entweder in Form eines weiteren Fuzzy Sets oder in Form eines einfachen Skalars. Der entwickelte Fuzzy-Logic Controller arbeitet auf Basis von Skalaren, die den Vorteil besitzen, dass sie einfach zu verarbeiten sind. Allerdings erfolgt deren Festlegung eher intuitiv und in der Regel ist im Weiteren eine Feinabstimmung nötig. Der Mittelwert des Ausgangssignals beispielsweise, könnte gemäß folgender Gleichung anhand der Informationen aus Tabelle 29 und Tabelle 30 berechnet werden:

$$u = \frac{\sum_i f_{i,j}(z) \cdot z_{i,j}}{\sum_j f_{i,j}(z)} \tag{42}$$

wobei fi,j(z) der resultierende Zugehörigkeitswert für die Regel zi,j ist.

Für das vorangegangene Beispiel ergibt sich entsprechend:

$$u = \frac{0{,}6 \cdot \uparrow + 0{,}5 \cdot \uparrow + 0{,}3 \cdot \uparrow + 0{,}3 \cdot 0}{0{,}6 + 0{,}5 + 0{,}3 + 0{,}3} = \frac{1{,}4 \cdot \uparrow}{1{,}7} = 0{,}82 \cdot \uparrow \tag{43}$$

wobei ↑ für jeden beliebigen Wert stehen kann.

II.3.3.2.4. Entwickelter Fuzzy Logic Controller

Für die Prozesssteuerung der anaeroben Vergärung pflanzlicher Biomasse wurde ein Fuzzy Logic Controler entwickelt. Prozesssteuerungen für Anaerobreaktoren basierend auf den Fuzzy Logic Regeln sind in der Literatur für unterschiedliche Zielstellungen zu finden (Steyer et al., 1997; Murnleitner et al., 2002; Punal et al., 2003; Carrasco et al., 2004; Scherer et al., 2009a). Das Hauptanwendungsziel der in dieser Arbeit entwickelten Prozesssteuerung lag in dem Erreichen einer maximalen Methanproduktion unter Einhaltung eines stabilen Anlangenbetriebs bei variierenden Umweltbedingungen.

Der Fuzzy Logic Control Algorithmus wurde auf Basis der Variablen flüchtige Fettsäuren und spezifische Methanproduktion entwickelt, für die durch die Steuerung ein Optimum erzielt werden soll. Die von den Fuzzy Logic Regeln gesteuerte Variable ist in diesem Zusammenhang die Zuflussrate, die herabgesetzt, gleichbleibend gehalten oder erhöht werden kann. Die Änderung der Zuflussrate war auf einmal pro Tag begrenzt. Abbildung 74 zeigt das Fließschema des entwickelten Fuzzy Logic Controler.

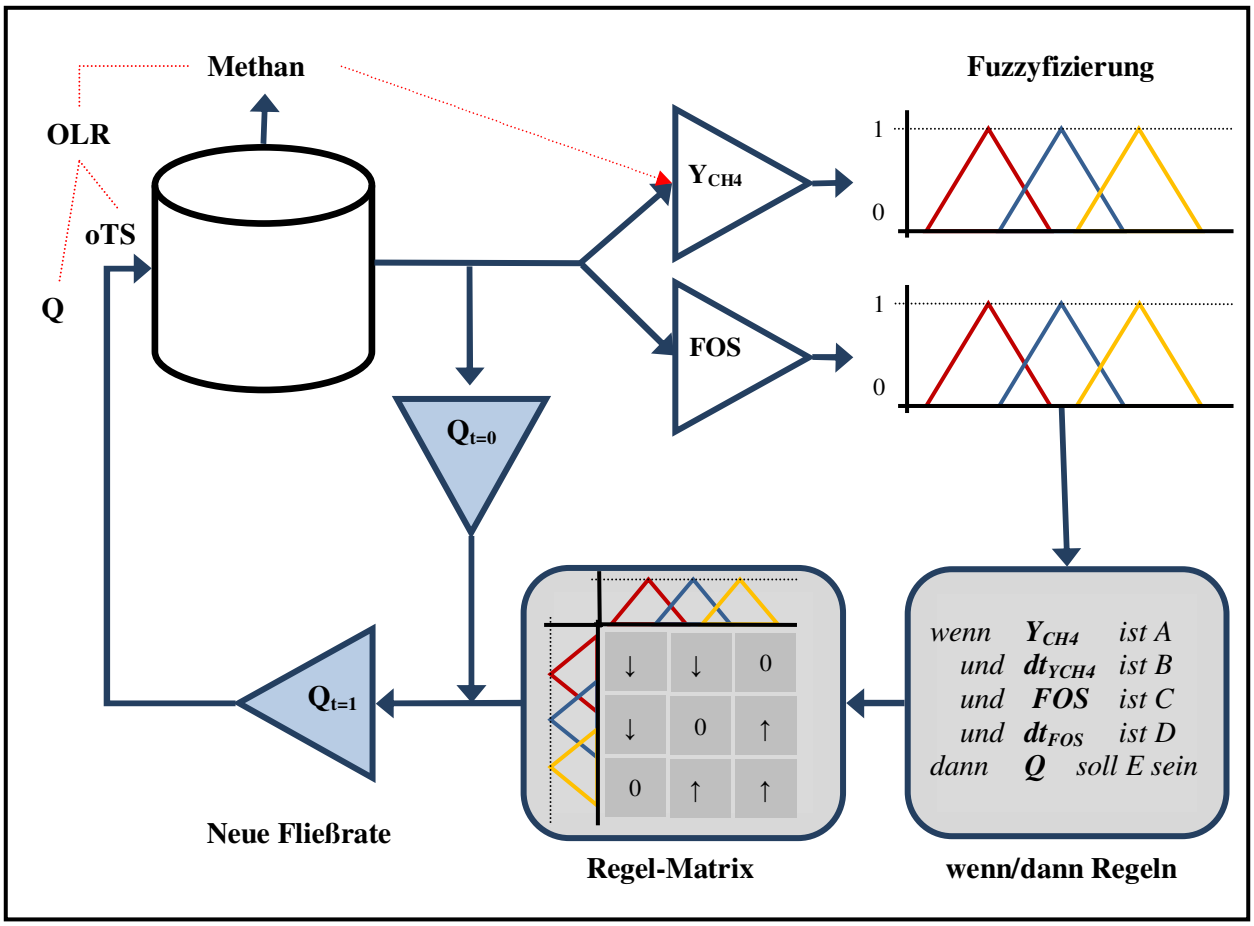


Abbildung 74: Fuzzy-Logik Steuerung - Fließschema

Da der spezifische Methangasertrag Y_{CH4} eine nicht direkt messbare Variable darstellt, erfolgt dessen Berechnung nach folgender Gleichung:

$$Y_{CH4} = \frac{Q_{gas} \cdot \%CH_4}{oTS_{Input}} [L_{CH4}/kg_{oTS}] \qquad (44)$$

wobei Q_{gas} die Biogasproduktion [L_N/d], $\%CH_4$ der Methangehalt im Biogas [Vol.-%] und oTS_{Input} die oTS-Zulauffracht [kg/d] sind. Die tägliche Änderungsrate des spezifischen Methanertrags wird berechnet zu:

$$dt_{YCH4} = \frac{Y_{CH4,t_1} - Y_{CH,t_0}}{t_1 - t_0} [L_{CH_4}/(kg_{oTS} \cdot d)] \qquad (45)$$

Die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren wird im ADM1 entsprechend der Formel (11) berechnet. Die tägliche Änderungsrate dt_{FOS} ergibt sich zu:

$$dt_{FOS} = \frac{FOS_{t_1} - FOS_{t_0}}{t_1 - t_0} [g_{HAc-Äq}/(kg \cdot d)] \quad (46)$$

II.3.3.2.5. Zugehörigkeitsfunktionen

Da für die einzelnen Temperaturstufen, mesophil und thermophil, unterschiedliche spezifische Gasproduktionsraten erzielt wurden, ergeben sich auch unterschiedliche Klassifizierungen für die Fuzzy Sets. Abbildung 75 zeigt diese für mesophile und Abbildung 76 für thermophile Bedingungen.

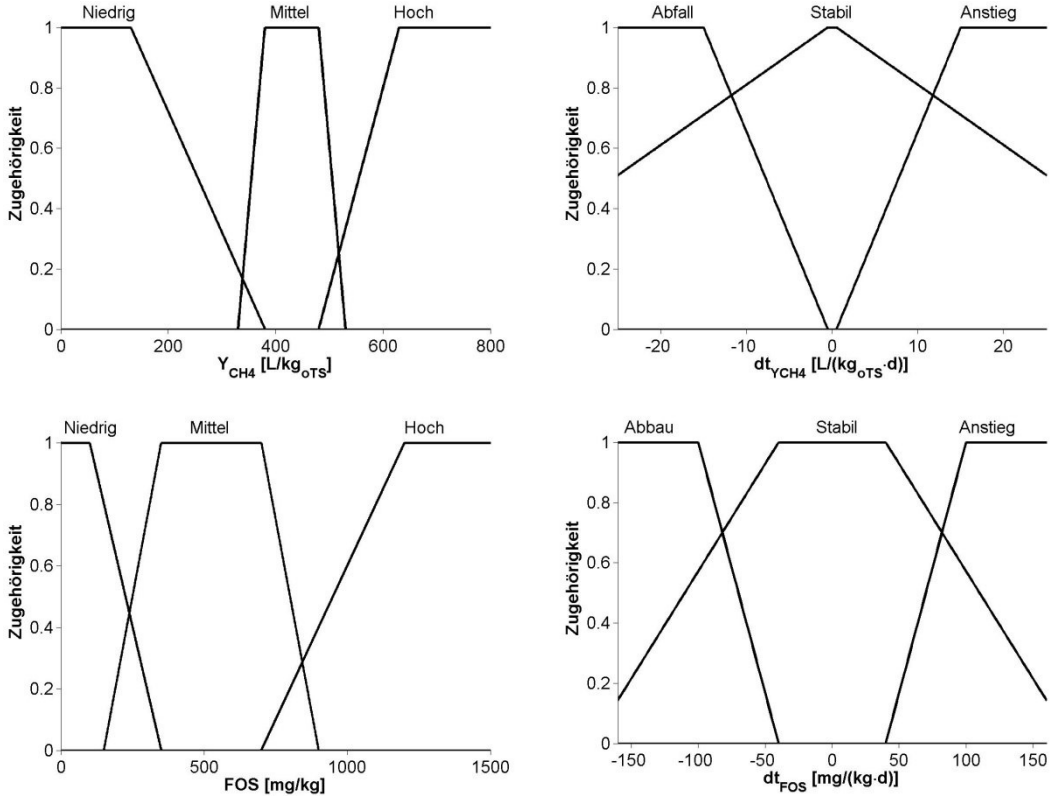


Abbildung 75: Zugehörigkeitsfunktionen für mesophile Betriebsweise

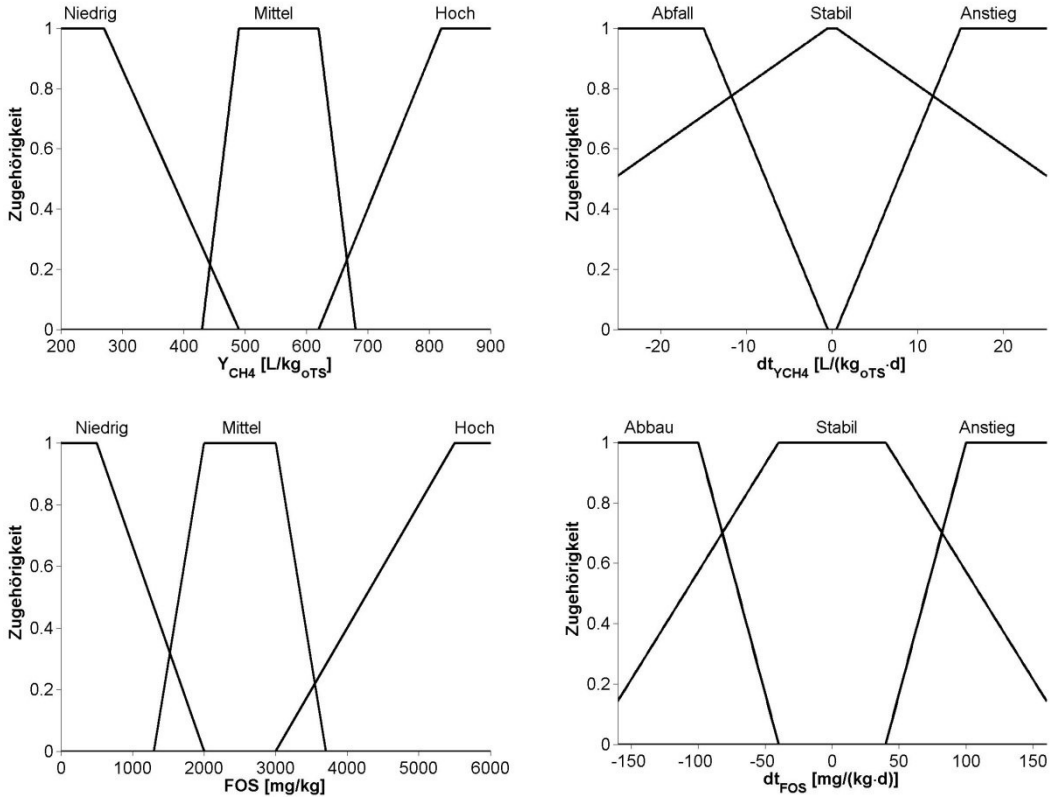


Abbildung 76: Zugehörigkeitsfunktionen für thermophile Betriebsbedingungen

II.3.3.2.6. Regelwerk

Ziel des Regelwerks ist es, das optimale Verhältnis zwischen Prozessstabilität und maximaler Gasproduktion zu finden. In der Fuzzy Logik Sprache lässt sich dieses sehr einfach ausdrücken: *„Wenn Y_{CH4} ist niedrig oder die FOS sind hoch, dann sollte die Fütterung herabgesetzt werden. Anderenfalls kann die Fütterung erhöht werden bis Y_{CH4} im optimalen Bereich ist und die FOS nicht hoch sind“*. Das resultierende Regelwerk zwischen den vier Variablen FOS, dt_{FOS}, Y_{CH4} und dt_{YCH4} besteht aus 81 individuellen Regeln (3·3·3·3) und ist in Tabelle 31 dargestellt. Durch das Regelwerk wird die Zuflussrate wie folgt variiert:

↑ = erhöhe gering
↑↑ = erhöhe mittel
↑↑↑ = erhöhe stark
0 = konstant
↓ = erniedrige gering
↓↓ = erniedrige mittel
↓↓↓ = erniedrige stark

Tabelle 31: Fuzzy Logic Regelwerk

	FOS	Niedrig			Mittel			Hoch		
Y_{CH4}	*dt*	-	*Stabil*	+	-	*Stabil*	+	-	*Stabil*	+
Niedrig	-	↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓
	Stabil	0	↓	↓	↓	↓	↓	↓↓	↓↓	↓↓↓
	+	0	0	0	0	0	0	0	↓	↓↓
Mittel	-	↑	↑↑	↑↑	0	0	↓	0	↓	↓↓
	Stabil	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑	0	0	↓	↓↓
	+	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑	0	↓	↓
Hoch	-	↑↑	↑↑	0	0	0	0	0	↓↓	↓↓↓
	Stabil	↑↑	↑↑	0	0	0	0	0	↓↓	↓↓↓
	+	↑↑	↑↑	0	0	0	0	0	↓↓	↓↓↓

Die neue Fütterungsrate wird berechnet zu:

$$Q_{t=i} = Q_{t=i-1} + \Delta Q \qquad (47)$$

wobei ΔQ die Änderung der Zuflussrate ist und aus dem Regelwerk berechnet wird.

Die Komplexität des Regelwerks kann je nach Bedarf erhöht oder erniedrigt werden. Werden für die FOS zwei zusätzliche Klassen, z.B. sehr hoch und sehr niedrig, eingeführt, ergeben sich für das Regelwerk 135 individuelle Regeln. Für die in dieser Arbeit getesteten Szenarien erwies sich das Regelsystem aus 81 individuellen Regeln jedoch als ausreichend. Bei Simulationsrechnungen traten vereinzelt numerische Instabilitäten bei sehr niedrigen Zuflussraten auf, vornehmlich bei der Berechnung der Gasproduktion. Für organische Belastungsraten unterhalb 0,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ wurde das Regelwerk daher ausschließlich für die Variablen FOS und dt_{FOS} definiert.

Tabelle 32: Regelwerk für geringe organische Raumbelastungen

dt_{FOS} \ FOS	Niedrig	Mittel	Hoch
-	↑↑↑	↑	0
Stabil	↑↑↑	↑↑	↓
+	↑↑	↑	↓↓

Das Steuerungsmodell wurde in die Simulationsumgebung MATLAB/SIMULINK/SIMBA implementiert und ist in Abbildung 77 dargestellt. Dem Modellreaktor wurde das kalibrierte ADM1 hinterlegt. Die Fütterung des Modellreaktors erfolgt durch den "Subsystem Block Zulauf". In diesem Modellbaustein werden die Zulaufcharakteristika der Maissilage

eingegeben und die Fütterungsmenge wird entsprechend der Vorgabe des Steuerungsmodells modellautonom berechnet.

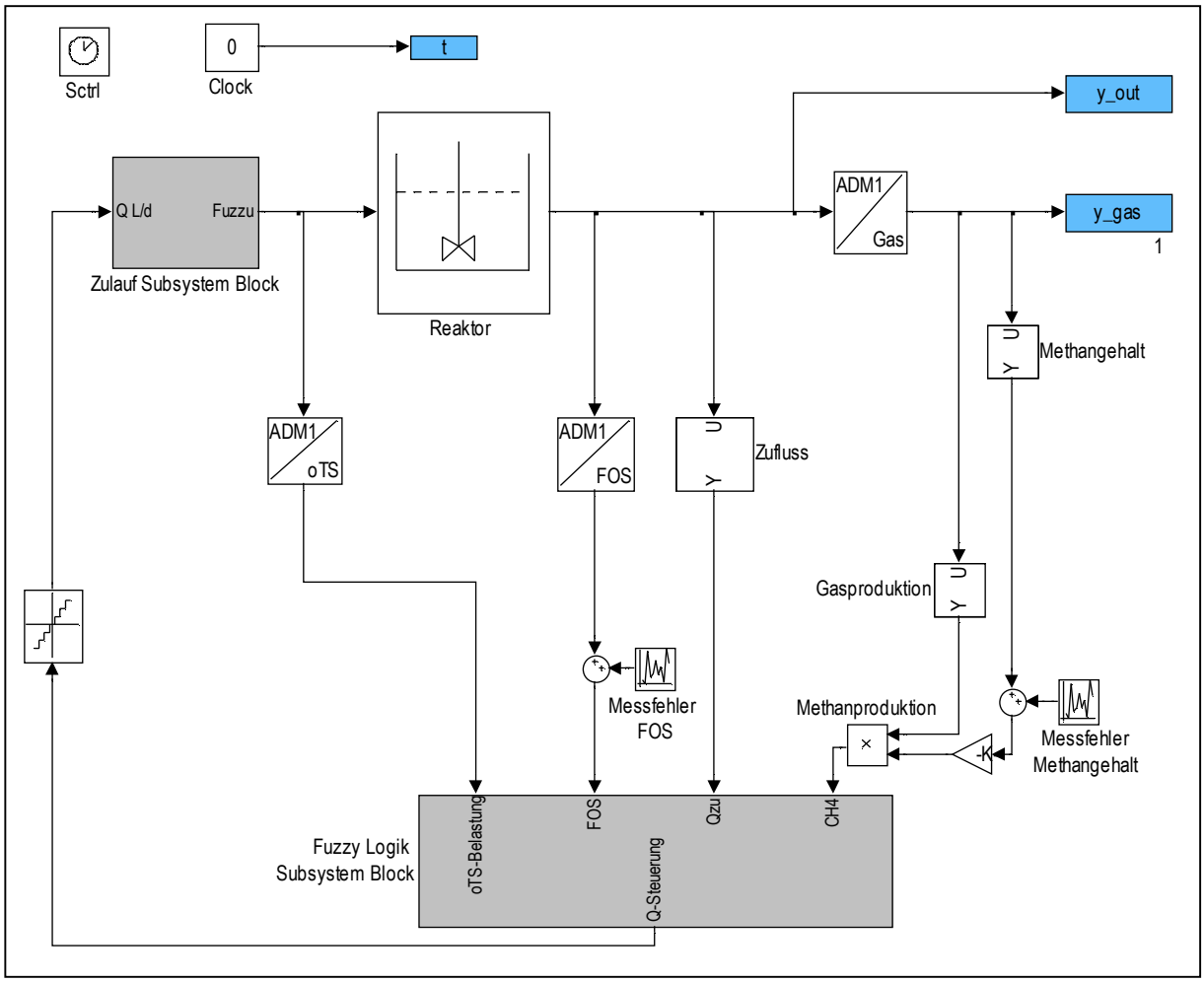


Abbildung 77: Fuzzy Logik Steuerungsmodell in MATLAB/SIMULINK/SIMBA

II.3.3.2.7. Simulationsergebnisse

Simulationsrechnungen mit dem entwickelten Fuzzy Logik Steuerungsmodell wurden für die Containeranlage, die von der LfL-ILT betriebenen Laborreaktoren sowie für die Pilotanlage Pellmeyer durchgeführt. Abbildung 78 zeigt die Simulationsergebnisse für die mesophile Monofermentation von Grassilage in den Laborreaktoren, Abbildung 79 die Simulationsergebnisse für die mesophile Monofermentation von Maissilage in der Pilotanlage Pellmeyer und Abbildung 80 die Simulationsergebnisse für die thermophile Monofermentation von Maissilage in der Containeranlage. Soll das Steuerungsmodell direkt in die praktische Versuchsdurchführung eingebunden werden, ist eine Rückkopplung von

Modellrechnungen mit online-Messdaten erstrebenswert. Da online-Messdaten entsprechend der Messungenauigkeit in der Regel Schwankungen unterworfen sind, ergeben sich Probleme hinsichtlich des direkten Vergleichs zwischen Modellrechnungen und den von Sensoren gelieferten Messdaten. Im Steuerungsmodell wurden daher Messungenauigkeiten für die Steuerungsvariablen FOS und CH_4 berücksichtigt, wodurch die Rückkopplung zwischen Modell und Sensorik vereinfacht wird. Für die FOS wird ein Messfehler von 0,7 mmol (Feitkenhauer et al., 2002) berücksichtigt, was 42 mg/kg Essigsäureäquivalente entsprechen. Im Steuerungsmodell wird die Sensorgenauigkeit überschläglich zu ± 50 mg/kg angenommen. Weiterhin wurde eine Messungenauigkeit für Methan von ± 3% berücksichtigt. Die Messungenauigkeiten wurden durch einen "Uniform Random Number Block" im Simulationsmodell generiert. Der Verlauf der Simulationsrechnungen unter Berücksichtigung von Messungenauigkeiten ist in den folgenden Abbildungen als Fuzzy Logik Sim.^{2} angegeben (Fuzzy Logik Sim.^{1} dementsprechend ohne Berücksichtigung von Messungenauigkeiten).

Jede der drei Abbildungen zeigt eindeutig, dass sich mit der Fuzzy Logik Prozesssteuerung höhere organische Belastungsraten, eine höhere Methanproduktion sowie ein niedrigerer Gehalt an organischen Säuren im Ablauf erzielen lassen. Besonders deutlich wird dieses für die mesophile Monofermentation von Maissilage in der Pilotanlage Pellmeyer und für die thermophile Monofermentation von Maissilage in der Containeranlage. Die organische Belastungsrate konnte im Steuerungsmodell mehr als doppelt so hoch gesteigert werden wie in der Realität, ohne dass es zu einer signifikanten Versäuerung kommt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass ein modellbasiertes gesteuertes System das Potential der Monofermentation stärker ausschöpfen kann.

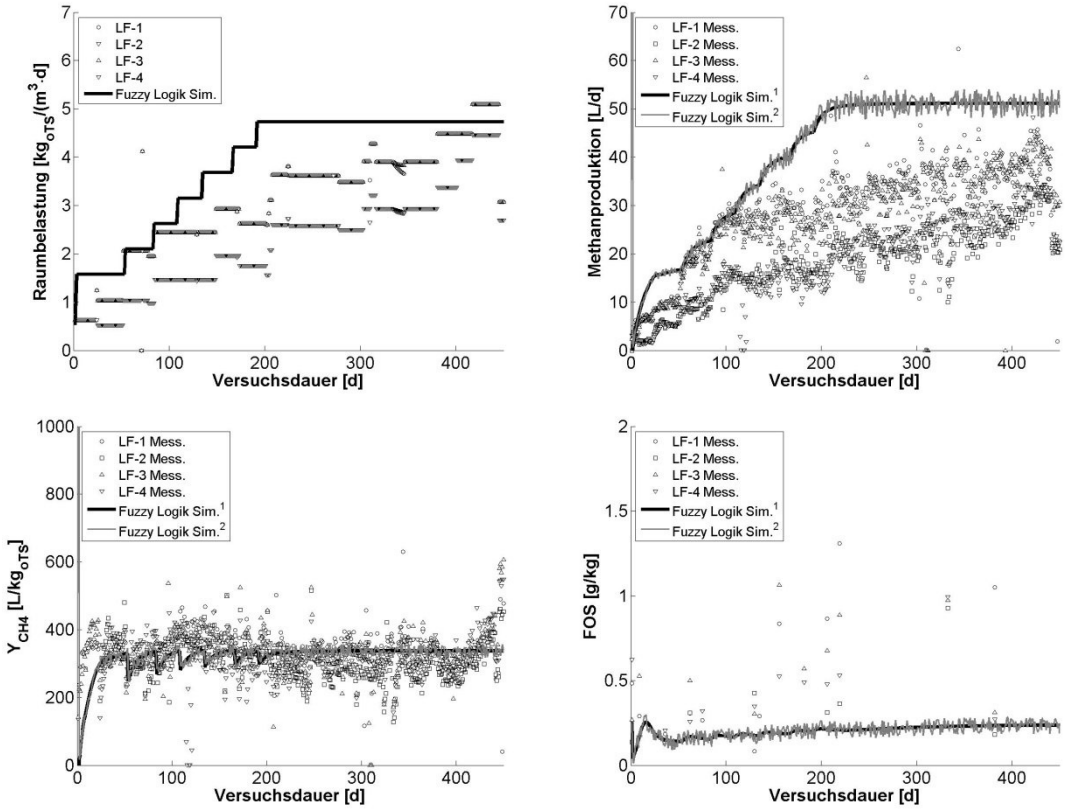


Abbildung 78: Messwerte und Ergebnisse der Fuzzy Logik Prozesssteuerung für die Parameter Raumbelastung, Methanproduktion, spezifische Methanproduktion und FOS bei der mesophilen Monofermentation von Grassilage - Laborreaktoren

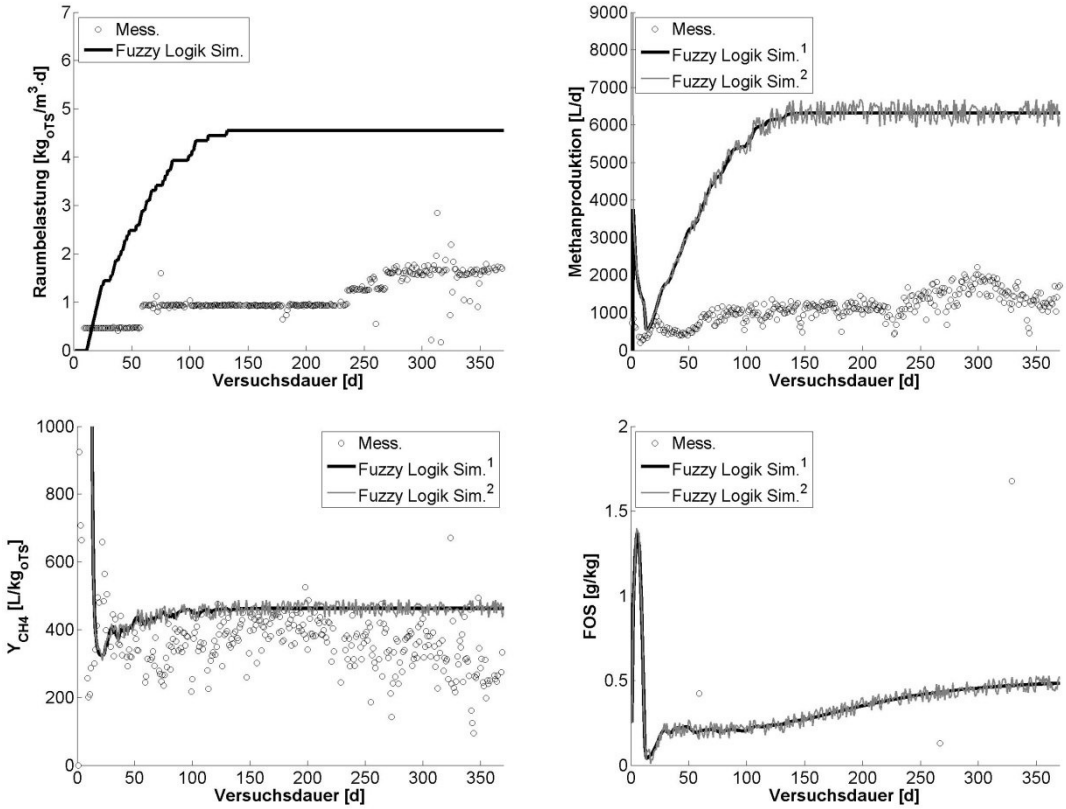


Abbildung 79: Messwerte und Ergebnisse der Fuzzy Logik Prozesssteuerung für die Parameter Raumbelastung, Methanproduktion, spezifische Methanproduktion und FOS bei der mesophilen Monofermentation von Maissilage - Pilotanlage Pellmeyer

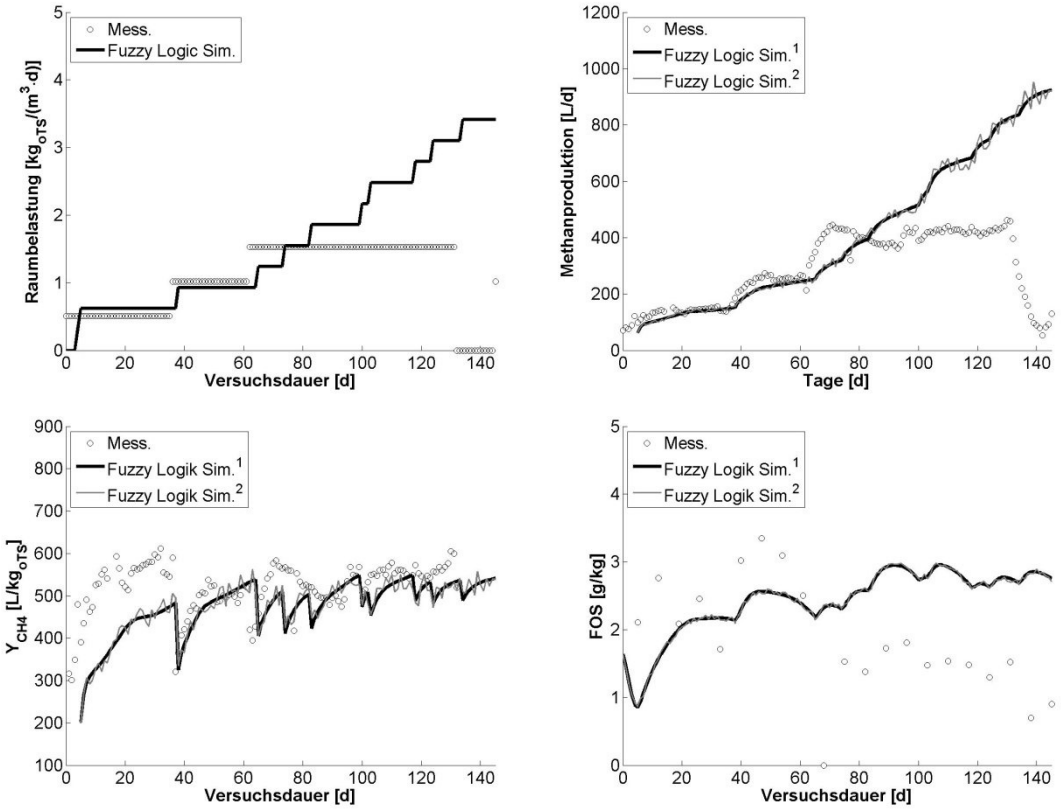


Abbildung 80: Messwerte und Ergebnisse der Fuzzy Logik Prozesssteuerung für die Parameter Raumbelastung, Methanproduktion, spezifische Methanproduktion und FOS bei der thermophilen Monofermentation von Maissilage - Containeranlage

II.3.4. Benchmarking der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen

Die Monofermentation nachwachsender Rohstoffe zur Biogasgewinnung wurde erst durch die gezielte Förderung durch das novellierte EEG im Jahr 2004 wirtschaftlich interessant. Die Bereitschaft des Gesetzgebers in Form eines Technologiebonus einen Ausgleich dafür zu zahlen, dass Betreiber gülleloser Systeme durch gegebenenfalls auftretende Mindererträge höhere finanzielle Risiken tragen müssen, hat dazu geführt, dass viele Biogasanlagen entstanden sind, die ausschließlich nachwachsende Rohstoffe einsetzen. Aufgrund der einseitigen Ernährung ist vielfach mit Mangelerscheinungen der Biologie zu rechnen, die sich in einer Akkumulation höherwertige organischer Säuren und sinkender Gasproduktion bemerkbar machen (Lebuhn et al., 2008). Ein weiteres Problem begründet sich im hohen Trockensubstanzgehalt der zugegebenen Substrate, die zu einer zähflüssigen Konsistenz des Fermenterinhaltes führt, wodurch eine vollständige Homogenisierung erschwert wird. Nicht zuletzt schlägt sich dies auch im stärkeren Verschleiß der Rührorgane bei gleichzeitig höherer

elektrischer Leistungsaufnahme nieder. Die Zugabe von Prozesswasser zur Verdünnung allerdings hätte unter Umständen den Verlust des Technologiebonus zur Folge.

In der Literatur finden sich deshalb neben den klassischen volldurchmischten Reaktor (Rührkesselreaktor) vor allem zweistufige (Hydrolysereaktor mit nachgeschaltetem Methanreaktor) und zweiphasige Systeme (Perkolationsverfahren). Die Perkolation zeichnet sich durch die räumliche Trennung von fester und flüssiger Phase (Perkolat) aus, wobei die Flüssigkeit über dem Gärgut verrieselt oder eingestaut wird und anschließend die gelösten Substanzen in einem Methanreaktor umgesetzt werden. Aufgrund der Tatsache, dass nur gelöste Stoffe den Methanreaktor erreichen, kommen hier kompakte Systeme mit Füllkörpern zur Fixierung der Mikroorganismen zum Einsatz, die nur eine geringe Verweilzeit erfordern. In Tabelle 33 und Tabelle 34 sind Literaturwerte für die Monofermentation von Gras- und Maissilage unter mesophilen und thermophilen Bedingungen zusammengefasst und nach dem erreichten spezifischen Methanertrag sortiert.

Tabelle 33: Literaturwerte für die Monofermentation von Grassilage

System	Temp.-bereich	Vol. [l]	Biogas-ertrag [m^3/kg_{oTS}]	Methan-gehalt [%]	Methan-ertrag [m^3_{CH4}/kg_{oTS}]	Raumbe-lastung [$kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$]	HRT [d]	oTS-Abbau [%]	Quelle
zweiphasiges Per-kolationsverfahren	mesophil	2	0,28	72	0,20	3,1	55	55	(Lehtomäki et al., 2008)
zweiphasiges Per-kolationsverfahren	mesophil	8.000	0,34	71	0,24	1,7	190	67	(Yu et al., 2002)
Schlaufenreaktor	**mesophil**	**50**	**0,50**	**52**	**0,26**	**3,0**	**50**	**60**	**(Koch et al., 2009b)**
zweiphasiges Per-kolationsverfahren	mesophil	1,5			0,27	4,4			(Cirne et al., 2007)
Rührkesselreaktor	mesophil	36	0,60	55	0,33	2,5			(Wichern et al., 2009)
Rührkesselreaktor	mesophil	23			0,36	4,0			(Ohly, 2006)
zweiphasiges Per-kolationsverfahren	mesophil	50	0,75	58	0,37		25	66	(Zielonka et al., 2007)
Batchversuch	mesophil	2	0,67	58-63	0,39		30		(Suárez Quinones et al., 2009)
Rührkesselreaktor	mesophil	36			0,40	2,5			(Andrade et al., 2009a)
Schlaufenreaktor	**thermophil**	**50**	**0,50**	**50**	**0,25**	**1,5**	**90**	**75**	**(Koch, 2010)**
Rührkesselreaktor	thermophil	36			0,27	1,5			(Andrade et al., 2009a)
zweiphasiges Per-kolationsverfahren	thermophil	50	0,65	72-76	0,33	2,5	25	79	(Zielonka et al., 2009)
zweiphasiges Per-kolationsverfahren	thermophil	50	0,84	57	0,43		25	76	(Zielonka et al., 2007)

Tabelle 34: Literaturwerte für die Monofermentation von Maissilage

System	Temp.-bereich	Vol. [l]	Biogas-ertrag [m^3/kg_{oTS}]	Methan-gehalt [%]	Methan-ertrag [m^3_{CH4}/kg_{oTS}]	Raumbe-lastung [$kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$]	HRT [d]	oTS-Abbau [%]	Quelle
zweiphasiges Per-kolationsverfahren	mesophil	300	0,51	55	0,28		40		(Sprenger et al., 2006)
Rührkesselreaktor	mesophil	20	0,54	55	0,30		20		(Sprenger et al., 2006)
Rührkesselreaktor	mesophil	17			0,34	2,5	40		(Preißler et al., 2007)
Pfopfenstromreaktor	**mesophil**	**240**	**0,66**	**50-55**	**0,35**	**3,6**	**90**		**(Lübken, 2009)**
Rührkesselreaktor	mesophil	8	0,67	55	0,37	3,0	98		(Linke und Mähnert, 2005)
Rührkesselreaktor	mesophil	20	0,75	53	0,40	5,0	70		(Abdoun und Weiland, 2009)
Rührkesselreaktor	mesophil	36	0,76	50-55	0,40	2,0			(Lebuhn et al., 2008)
Rührkesselreaktor	mesophil	23	0,80	53	0,42	2,0	30	74	(Ohly, 2006)
Rührkesselreaktor	mesophil	8	0,83	55	0,45	1,0	90	82	(Mähnert, 2007)
Batchversuch	mesophil	2	0,76	63	0,48		30		(Suárez Quinones et al., 2009)
Rührkesselreaktor	mesophil	25	0,91	54	0,49	3,8	19	84	(Sprenger, 2007)
Rührkesselreaktor	mesophil	20	0,77	46-66	0,50	2,0	120		(Schieder et al., 2009)
Rührkesselreaktor	thermophil	8	0,74	57	0,42*	3,0	100		(Mähnert, 2007)
Pfopfenstromreaktor	**themophil**	**240**	**1,06**	**50-55**	**0,55**	**1,5**	**208**		**(Lübken, 2009)**

Sowohl für Grassilage als auch Maissilage ist die Bandbreite an dokumentierten Werten enorm und schwankt beispielsweise beim Methanertrag jeweils um Faktor zwei. Dies ist einerseits auf die sehr unterschiedlichen Verfahren zurückzuführen, wobei ein komplexeres System nicht unbedingt mit einem höheren Ertrag korreliert. Andererseits ergibt sich aufgrund des hohen Trockensubstanzgehaltes der eingesetzten Silagen auch bei hohen Raumbelastungen zwangläufig eine längere Verweilzeit wenn weder Wasser oder Gülle zugesetzt, noch Prozesswasser rezirkuliert wird. Die Verweilzeit HRT kann gemäß folgender Formel aus dem oTS-Gehalt des Zulaufs und der Raumbelastung abgeschätzt werden:

$$HRT = \frac{\rho_{Fermenterinhalt} \cdot oTS}{OLR} = [d] \qquad (48)$$

$\rho_{Fermenterinhalt}$	Dichte des Fermenterinhaltes (kg_{FM}/m^3)
oTS	oTS-Gehalt des Substrates (kg_{oTS}/kg_{FM})
OLR	Raumbelastung ($kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$)

Untersuchungen von Klauke (2008) haben gezeigt, dass sich die Dichte der Fermentersuspension bei der Vergärung von Maissilage nur unwesentlich von der von Wasser mit 1.000 kg/m³ unterscheidet. Folglich ergibt sich beispielsweise bei einer angenommenen Raumbelastung von 3,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ und einem oTS-Gehalt des Gärgutes von 35 % eine statistische Aufenthaltszeit des Substrates von 100 Tagen. In dieser Zeit können selbst schwer abbaubare Stoffe hydrolysiert und damit den Bakterien zugängig gemacht werden, womit die hohen spezifischen Erträge erklärt werden können.

Insbesondere bei der Vergärung von Maissilage ist die Zugabe von Spurenelementen zum Erreichen hoher Raumbelastungen bei gleichzeitig gleichbleibender Prozessstabilität offenbar obligatorisch (Lebuhn et al., 2008; Abdoun und Weiland, 2009). Im Gegensatz dazu konnten Enzymzugaben bisher lediglich in Einzelfällen die Methanproduktion stimulieren, zumal fraglich ist, ob die Ergebnisse auch auf größere Anlagen übertragbar sind (Suárez Quinones et al., 2009). Auch der Einfluss kürzerer Schnittlängen bei der Ernte scheint nur marginal zu sein und rechtfertigt den Mehraufwand an Energie nicht (Neureiter et al., 2005; Andrade et al., 2009a; Schieder et al., 2009).

Die Monofermentation hat nicht nur negative Auswirkungen auf den Spurenelementhaushalt, sondern auch auf die Pufferkapazität und damit auf die Stabilität des gesamten Prozesses. In Versuchen mit der Zugabe von Gülle werden oft höhere spezifische Gaserträge bei gleichzeitig höheren Methangehalten erreicht (Ohly, 2006). Synergieeffekte konnten auch für die Co-Fermentation von nachwachsenden Rohstoffen mit Bioabfällen festgestellt werden (Kusch, 2007). Der Grund für den höheren Gasertrag der Mischung gegenüber der jeweiligen Monovergärung der Einzelfraktionen wird neben der erhöhten Prozessstabilität auch im cometabolischen Abbau vermeintlich schwer abbaubarer Substanzen gesehen. Koch (2007) zeigte ähnliche Effekte für die Co-Fermentation von Speiseresten und Abwasserkonzentrat.

Ferner bleibt festzuhalten, dass die mesophile Betriebsweise der thermophilen immer dann vorzuziehen ist, wenn ein hoher Anteil an Grassilage mitvergoren wird. Das aufgrund der höheren Temperatur zugunsten des toxischen Ammoniaks verschobene Gleichgewicht setzt den Mikroorganismen bei dem ohnehin stickstoffreichen Substrat verstärkt zu. Auch kompensieren die höheren Umsatzraten im thermophilen Bereich die Nachteile der geringeren Prozessstabilität und des höheren Energieeinsatzes zur Beheizung nicht wirklich. Selbst in Anbetracht des Selbsterhitzungseffektes von Nawaro-Anlagen, der je nach eingesetztem Substrat und Jahreszeit zu einer maximalen Temperaturerhöhung auf 45 °C führt (Lindorfer et al., 2006), kommen thermophil betriebene Anlagen nicht ohne zusätzliche Wärme aus.

Keines der genutzten Systeme sticht durch konstant hohe Methangasausbeuten hervor. Einfache Systeme erreichen durchschnittlich die gleichen Methanausbeuten wie zweistufige und zweiphasige Systeme. Der Vorteil der Perkolationsverfahren liegt allerdings in der hohen Prozessstabilität und guten Steuerbarkeit. Den Einsparungen an Fermentervolumen und Rührwerken stehen Aufwendungen für die Perkolatpumpen gegenüber. Bei zweistufigen Systemen können durch Trennung von Hydrolyse und Methanogenese die Bedingungen für die verschiedenen Bakterien optimiert und so eine maximale Aktivität erreicht werden. Inwiefern sich dieser verfahrenstechnische Mehraufwand durch höhere Ausbeuten, kürzere Verweilzeiten oder anderweitige Einsparungen rechnet, muss im Einzelfall geprüft werden.

Aufgrund der großen Schwankungsbreite an erreichten Methanausbeuten, Raumbelastungen und Abbaugraden fällt es schwer, allgemeingültige Benchmarks für die Vergärung von Mais- bzw. Grassilage festzulegen. In der Praxis scheinen für die mesophile Monofermentation von Grassilage Methanausbeuten von 0,3 m^3/kg_{oTS} bei einer Raumbelastung von 3 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ und einem Abbaugrad von 70 % erstrebenswert. Der thermophile Temperaturbereich ist aufgrund der angesprochenen Ammoniakproblematik nicht zu empfehlen. Bei der mesophilen Monofermentation von Maissilage sind bei gleicher Raumbelastung ein Methanertrag von 0,4 m^3/kg_{oTS} und ein Abbau um 80 % möglich. Auch hier bietet sich in der Regel der mesophile Temperaturbereich an. Die Unterschiede in Gasertrag und Abbaugrad sind überwiegend mit der höheren Energiedichte bei gleichzeitig geringeren Anteil an schwer bzw. nicht abbaubaren Stoffen von Mais gegenüber Gras zu erklären.

II.3.5. Ökobilanzierung der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen

In Zeiten immer knapper werdender Rohstoffe und einer rasch voranschreitenden Erderwärmung ist es erforderlicher denn je, Produkte und deren Erzeugungsprozesse genau unter die Lupe zu nehmen. Ziel muss es sein, negative Wirkungen auf die Umwelt zu reduzieren und auch den Ressourcenverbrauch zu minimieren. Wichtig ist dabei, dass man die Aufwendungen immer in Bezug auf den gesamten Lebenslauf sieht. So können beispielsweise energieintensiv hergestellte Produkte von langer Lebensdauer deutlich umweltfreundlicher sein, als kurzlebige Erzeugnisse, deren Herstellung vergleichsweise einfach ist. Es ist deshalb naheliegend, über eine systematische Analyse eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Produktionswegen herzustellen, um so Einsparpotentiale aufzuzeigen und ökologische Schwachstellen transparent zu machen. Aus diesem Grund wurde mit der Ökobilanzierung ein

genormtes Werkzeug zur vergleichenden Quantifizierung und Bewertung von Umweltwirkungen geschaffen.

Dieser Überprüfung müssen sich auch die als umweltfreundlich bekannten erneuerbaren Energien (Wind, Wasser, Geothermie, Sonne, Biomasse, etc.) stellen. Denn auch wenn die genutzten Energiequellen nach menschlichen Maßstäben regenerativ sind, so muss für die Bereitstellung oder Erfassung eine mitunter beträchtliche Energiemenge aufgewendet werden. Diese kann in Abhängigkeit der örtlichen Begebenheiten stark schwanken. Auch die Biogasgewinnung ist einer Vielzahl solcher negativer (z.B. Dieselverbauch für die Bestellung der Felder) und positiver (z.B. Gutschrift für die Verwertung von Wirtschaftsdünger) Einflüsse unterworfen. Werden beispielsweise Koppelprodukte vergoren, müssen deren Produktionsenergien nicht bilanziert werden, da sie auch ohne energetische Nutzung angefallen wären. Folglich erzielen diese Betriebsmodelle auch besonders gute Ergebnisse. Da solche Reststoffe aber nur in begrenzten Mengen zur Verfügung stehen, hat die Bundesregierung 2004 durch die Schaffung eines Vergütungsbonus im Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) für die Nutzung nachwachsender Rohstoffe einen starken Anreiz geschaffen. Allerdings werden die hierfür nötigen Energiepflanzen einzig und allein für die Energieproduktion kultiviert. Dementsprechend muss der Aufwand auch in vollem Umfang in die Ökobilanz einfließen. Weil aber auch die Biogaserzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen als wichtiges Standbein für eine nachhaltige Energieversorgung gesehen wird und gleichzeitig der sich in der Krise befindenden Landwirtschaft eine neue Perspektive bietet, gilt es den Prozess aus ökologischer Sicht zu verbessern.

In diesem Kapitel werden die Umweltaspekte einer Biogaserzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen im Zuge einer Lebenszyklusbetrachtung bilanziert und die Ergebnisse vergleichend dem deutschen Strommix gegenübergestellt. Zudem wird durch die Berechnung verschiedener Szenarien Optimierungspotenzial für die Ökobilanz aufgezeigt.

II.3.5.1. Vorgehen und Rahmenbedingungen

Die Ökobilanzierung ist ein genormtes Verfahren, das durch die internationalen Normen ISO 14040 und ISO 14044 geregelt wird und aus folgenden vier Teilschritten besteht:

- Definition von Ziel und Untersuchungsrahmen,
- Sachbilanz,
- Wirkungsabschätzung,
- Auswertung.

II.3.5.1.1. Systemannahmen

II.3.5.1.1.1. Ziel und Untersuchungsrahmen

Ziel und betrachtete Umweltbereiche. Das Ziel dieser Studie ist es, die Umweltwirkungen der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen zu analysieren. Hierbei sollen die im Rahmen des Projekts erzielten Gasbildungsraten für Gras- und Maissilage als Benchmarks dienen und exemplarisch das Potential von Biogas aus nachwachsenden Rohstoffen aufzeigen. Um eine Vergleichbarkeit mit anderen Systemen zur Energieherstellung zu gewährleisten, wird das produzierte Biogas in einem Blockheizkraftwerk energetisch umgesetzt. Hierbei wird angenommen, dass sich die Biogasanlage im ländlichen Raum befindet und es keine Infrastruktur für die Nutzung von Fernwärme gibt. Dementsprechend fließt nur der Strom der Anlage in die Bilanz ein. Die Untersuchung beschränkt sich dabei auf die Auswirkungen auf den anthropogenen Treibhauseffekt (Emissionen klimawirksamer Gase).

Festlegung der Lebenswege und Systemgrenzen. Es wird der gesamte Herstellungsprozess des Biogases berücksichtigt. Beginnend mit der Aussaat (nur bei Mais) werden alle Arbeitsgänge bis hin zur Ernte und Silierung einbezogen. Dabei wird davon ausgegangen, dass der Anbau konventionell erfolgt. Die für die Aufzucht notwendigen Betriebsmittel (Diesel) werden bis zur Förderung zurückverfolgt und entsprechend bilanziert. Auch die für Saatgut-, Dünger- und Pflanzenschutzmittelherstellung notwendigen Aufwendungen fließen in die Betrachtung mit ein. Für den Anbau werden stets mittelschwere Böden mit mittleren Erträgen angenommen. Zusätzlich wird festgelegt, dass die Biogasanlage im ländlichen Raum steht. Somit können die Transportwege der Rohstoffe zur Biogasanlage vernachlässigt werden. Aufwendungen, die durch den Bau- und Rückbau der Biogasanlage entstehen, werden auf die zu erwartende Lebensdauer umgelegt und in der Untersuchung ebenso berücksichtigt, wie der Betrieb der Anlage. Der Bezugszeitraum soll ein kalendarisches Jahr sein.

Funktionelle Einheit. Die Bezugsgröße, auf die sich die gesamten ermittelten Umweltwirkungen beziehen, wird als 1 kWh Strom frei Anlage definiert.

II.3.5.1.1.2. Sachbilanz

Entsprechend der festgelegten Lebenswege werden alle entstehenden Treibhausgasemissionen bei der Stromerzeugung aus Biogas vom Anbau der nachwachsenden Rohstoffe über die Biogaserzeugung in der Biogasanlage, bis hin zur Stromerzeugung im Blockheizkraftwerk bilanziert. Abbildung 81 veranschaulicht alle berücksichtigten Eingänge in das System und die bei jedem Schritt entstehenden Emissionen. Die zugehörigen Zahlenwerte werden im Kapitel II.3.5.1.4 vorgestellt und anschließend quantifiziert.

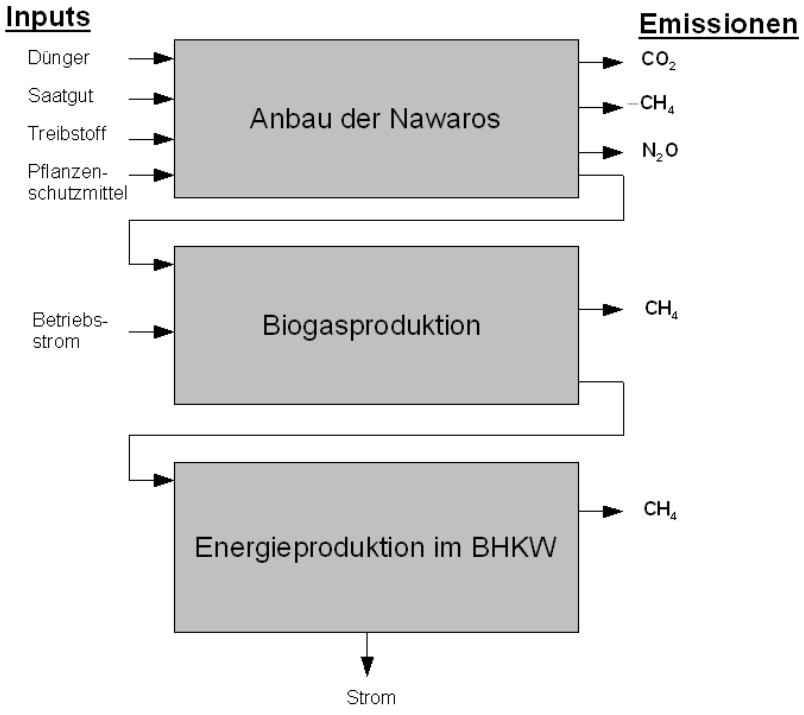


Abbildung 81: Eingänge und Emissionen in den gewählten Systemgrenzen

II.3.5.1.1.3. Wirkungsabschätzung

Gemäß der Zieldefinition wird nur die Wirkungskategorie „Anthropogener Treibhauseffekt“ betrachtet. Als Wirkungsindikator dienen hier die CO_2-Äquivalente, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Treibhausgasen zu schaffen. Das Äquivalent gibt an, wie groß die Erwärmungswirkung (Global Warming Potential) von einem Kilogramm eines bestimmten Treibhausgases im Vergleich zu einem Kilogramm Kohlenstoffdioxid ist. In Tabelle 35 sind

alle Gase, die bei der Bereitstellung von Strom aus Biogas anfallen und für das Klima relevant sind, mit ihrer Treibhauswirksamkeit aufgelistet.

Tabelle 35: Wichtungsfaktoren von Treibhausgasen gemäß IPCC (Hartmann, 2006)

Treibhausgas	Global Warming Potential [$kg_{CO2\text{-}äq}/kg_{Gas}$]
CO_2	1
CH_4	25
N_2O	298

II.3.5.1.1.4. Auswertung

Abschließend werden die aus der Sachbilanz und Wirkungsabschätzung gewonnenen Ergebnisse ausgewertet. Hinsichtlich der Zielsetzung gilt es, die verschiedenen Resultate aus Mais- und Grassilage mit dem deutschen Strommix zu vergleichen. Anhand einer Sensitivitätsanalyse werden beispielhaft die Auswirkungen einer Kraft-Wärme-Kopplung (KWK) auf die Ökobilanz untersucht.

II.3.5.1.2. Definition der Modellbetriebe

In dieser Studie werden zwei verschiedene Modellbetriebe betrachtet und miteinander verglichen. Biogasanlagen dienten in erster Linie der Verwertung landwirtschaftlicher Reststoffe, vor allem Gülle. In Folge der gezielten Förderung der erneuerbaren Energie in den letzten Jahren hat sich das Primärziel der Biogasanlage von der Reststoffverwertung zur Energiegewinnung gewandelt. Infolgedessen kommt es vermehrt zum Bau sogenannter "reiner NawaRo-Anlagen", die eine güllefreie Monofermentation von Energiepflanzen durchführen. Obgleich mit der Novellierung des EEG im Jahr 2009 und der damit verbundenen Einführung des "Güllebonus" der mit der vorherigen Fassung ungewollt provozierte Verzicht auf dem Einsatz von Wirtschaftsdüngern revidiert wurde, wird sich die vorliegende Ökobilanz stellvertretenden für die Monosubstrate Mais- und Grassilage durchgeführt. Das erste Modell stellt dabei einen Betrieb dar, der zu 100 % Maissilage vergärt. Als zweites Modell dient eine Anlage, die zu 100 % Grassilage verwendet. Der Einwand der Praxisferne ist an dieser Stelle sicherlich berechtigt, wenngleich dies als jeweils ein Extremfall dienen soll und sich reale Biogasanlagen zwischen beiden Extrema wiederfinden werden.

II.3.5.1.3. Definition der Biogasanlage

Gemäß Zielvorgabe sind die Gaserträge schon durch die bereits angeführten Ergebnisse gegeben. Dabei wird die Annahme getroffen, dass die gleichen Erträge bei einer optimierten Prozessführung auch in einer kommerziell betriebenen Anlage möglich sind. Jedoch benötigt die Vergasung in einer größeren Anlage relativ gesehen deutlich weniger Betriebsstrom als die Forschungsreaktoren im Labor, was sich positiv auf die Ökobilanz auswirkt. Deshalb sollen diese als Benchmarks dienenden Werte nun auf eine herkömmliche Biogasanlage übertragen werden, um die Umweltfolgen unter realistischen Bedingungen bewerten zu können.

Angesichts der vielen verschiedenen Anlagenkonfigurationen, die auf dem Biogasmarkt zu finden sind, muss eine bestimmte Anlage ausgewählt werden. Hierfür wird eine 190kW-Hofbiogasanlage der Firma NQ-Anlagentechnik festgelegt. Die Biogasanlage verfügt über ein geschlossenes Gärrestlager. Folglich müssen keine zusätzlichen Methan-Emissionen aus der Nachgärung berücksichtigt werden. Außerdem ist die Anlage durch seine Rührwerkstechnik für die reine Vergärung nachwachsender Rohstoffe geeignet. Die Verbrennung erfolgt mit einem Gas-Motor. Dies hat zur Folge, dass bei der Energieproduktion im BHKW keine weiteren Betriebsmittel (Zündöl) notwendig sind und daher nicht bilanziert werden müssen. Dafür ist der elektrische Wirkungsgrad der Anlage aber auch geringer als das bei Zündstrahlmotoren der Fall ist. Die verwertbare Wärme der Verbrennung soll vorerst nicht genutzt werden.

II.3.5.1.4. Basisdaten

Im Folgenden werden nun die zu Grunde gelegten Zahlenwerte vorgestellt und kurz erläutert. Als Gliederung dient die Unterteilung aus der Sachbilanz in Anbau der nachwachsenden Rohstoffe, Vergärung in der Biogasanlage und Verbrennung im Blockheizkraftwerk.

II.3.5.1.4.1. Anbau der Vergärungssubstrate

Dieselverbrauch

Sowohl für die Gewinnung der Mais- wie auch der Grassilage müssen verschiedene Arbeitsgänge durchgeführt werden, die alle des Einsatzes landwirtschaftlicher Maschinen bedürfen. Als Erstes muss der von den Maschinen benötigte Dieselkraftstoff für die

unterschiedlichen Gärsubstrate quantifiziert werden. Die KTBL-Datensammlung über Energiepflanzen bietet hierfür eine allgemein anerkannte Datenbasis, um die Arbeits- und Produktionsverfahren planen und analysieren zu können (Anonymous, 2006). Da Energiepflanzen für die Biogaserzeugung in den meisten Fällen konventionell angebaut werden, wird für alle Arten diese Anbauweise festgelegt.

In Tabelle 36 sind die notwendigen Arbeitsverfahren für Silomais mit dem spezifischen Dieselverbrauch für einen 2-ha-Schlag und mittelschweren Boden bei wendender Bodenbearbeitung (Pflug) aufgeführt. Die Arbeitsgänge für Dauergrünland zur Produktion von Grassilage werden ebenfalls für einen 2-ha-Schlag mit mittelschwerem Boden betrachtet. Der spezifische Dieselverbrauch für die Ernte mit Häcksler ist in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 36: Dieselverbrauch der Arbeitsgänge für Maissilage (Fröba und Funk, 2005; Anonymous, 2006)

Arbeitsverfahren	Häufigkeit [a^{-1}]	Dieselverbrauch [l/ha]
Pflügen	1	22,9
Gärrest ausbringen	1	4,0
Eggen mit Saatbettkombination	1	5,8
Einzelkornsaat von Mais	1	2,8
Pflanzenschutzmittel ausbringen	2	4,2
Unkrautbonitur	1	0,3
Bestandesbonitur	1	0,1
N-Dünger streuen	1	1,0
Ernte (Feldhäcksler, Transport und Festfahren)	1	22,8
Kalk streuen mit Frontlader	$^1/_3$	0,2
Stoppelgrubern	1	8,5
Silomais aus Flachsilo in Biogasanlage bringen	1	14,5
Summe		**91,2**

Tabelle 37: Dieselverbrauch der Arbeitsgänge für Grassilage (Fröba und Funk, 2005; Anonymous, 2006)

Arbeitsverfahren	Häufigkeit [a^{-1}]	Dieselverbrauch [l/ha]
Gärrest ausbringen	4	11,2
Walzen	½	2,6
Striegeln	½	2,0
Mähen	4	5,1
Wenden	4	2,7
Schwaden	4	3,2
Ernte (Feldhäcksler, Transport und Festfahren)	4	7,4
Grassilage aus Flachsilo in Biogasanlage bringen	1	11,2
Summe		**131,9**

Anschließend werden die Emissionen für die Bereitstellung ermittelt. Diese setzen sich aus den Aufwendungen für die Gewinnung des Rohöls, den Transportwegen und der Veredelung in der Raffinerie zusammen. Aufgrund der vielen verschiedenen Herkunftsländer des Rohöls, und der folglich unterschiedlichen Transportentfernungen, kann es zu sehr variierenden Emissionen für die Bereitstellung des Dieselkraftstoffs kommen. In dieser Untersuchung wird auf die Ergebnisse von ECOINVENT (2004) zurückgegriffen, die in Tabelle 38 illustriert sind (Anonymous, 2004).

Tabelle 38: Treibhausgasemissionen aus der Bereitstellung des Dieselkraftstoffs (Anonymous, 2004)

Treibhausgas	Emissionen [g/l_{Diesel}]
CO_2	366,0
CH_4	1,3
N_2O	0,01

Neben den Emissionen aus der Bereitstellung des Diesels fallen auch noch die Emissionen durch die Verbrennung des Kraftstoffes in den Motoren der Landmaschinen an. Auch hier kann man sich nur Mittelwerten bedienen, da die Emissionen abhängig von Motorisierung, Lastzustand und Treibstoffgüte sind. Es wird erneut auf Daten von ECOINVENT (2004) Bezug genommen (Tabelle 39).

Tabelle 39: Treibhausgasemissionen durch die Verbrennung des Dieselkraftstoffs (Anonymous, 2004)

Treibhausgas	Emissionen [g/l_{Diesel}]
CO_2	2.589,6
CH_4	0,1
N_2O	0,1

Mineraldüngereinsatz

Die Verfügbarkeit der Elemente Stickstoff, Phosphor und Kalium ist meist der limitierende Faktor für das Wachstum der Pflanzen. Allerdings können über natürliche Prozesse nur sehr geringe Mengen an Nährstoffen im Boden gebunden werden. In dieser Untersuchung wird vereinfachend angenommen, dass sowohl der Phosphor wie auch das Kalium in einem Stoffkreislauf geführt werden kann und über die ausgebrachten Gärreste wieder den Nutzungsflächen zugeführt wird. Deshalb wird bei dieser Betrachtung auch auf eine P- und K-Düngung verzichtet. Somit muss nur eine Stickstoffdüngung erfolgen. In dieser Studie wird dabei Calciumammoniumnitrat (CAN) verwendet. Die energieaufwendige Produktion erzeugt Treibhausgasemissionen, die in Tabelle 40 dargestellt sind.

Tabelle 40: Treibhausgasemissionen aus der CAN-Produktion (Patyk und Reinhardt, 1997)

Treibhausgas	Emissionen [kg/t_N]
CO_2	2.316
CH_4	0,1
N_2O	19,3

Erkenntnisse von Deiglmayr et al. (2009) zeigen zwar, dass insbesondere aufgrund der niedrigeren Qualitätsansprüchen bei Substratbereitstellung für die Biogasproduktion gegenüber dem Nahrungs- und Futtermittelbereich, Einsparungen bei der Stickstoffdüngung von 30 kg_N/ha bei Energiemais nur zu geringen Ertragsdepressionen führt. Ungeachtet dessen liegt die empfohlene Stickstoffdüngemenge für die Grünlandbewirtschaftung mit 240 kg Stickstoff pro ha fast doppelt so hoch wie die für den Maisanbau mit 110 kg_N/ha (Anonymous, 2006; Dierauer, 2008).

Pflanzenschutzmittel

Da die Konkurrenzkraft des Mais gegenüber Unkräutern sehr gering ist, erfordern hohe Hektarerträge zwangsläufig den Einsatz von Herbiziden. Dafür müssen in etwa drei Kilogramm Pflanzenschutzmittel pro Hektar eingesetzt werden (Vogt, 2008). Bei der Produktion der Herbizide entstehen wieder Emissionen, die Tabelle 41 entnommen werden können.

Tabelle 41: Klimagasemissionen für die Bereitstellung von Pflanzenschutzmitteln (Vogt, 2008)

Treibhausgas	Emissionen [g/kg_{PSM}]
CO_2	11.220
CH_4	31
N_2O	1,6

Anders als beim Mais verhält es sich bei der Grünlandbewirtschaftung. Dort ist der Einsatz von Unkrautbekämpfungsmitteln im Normalfall nicht erforderlich und soll deshalb in dieser Studie auch nicht berücksichtigt werden.

Saatgut

Hier gilt ebenfalls, dass diese Aufwendungen nur für den Maisanbau notwendig sind, da davon ausgegangen wird, dass das Grünland bereits existiert und somit nicht explizit für die Herstellung der Grassilage eingesät werden muss. Aus der Datenbank von ECOINVENT (2004) kann der typische Verbrauch von Saatgut auf 30 Kilogramm pro Hektar abgeschätzt werden (Anonymous, 2004). Für die Herstellung können die folgenden Emissionen angenommen werden (Tabelle 42).

Tabelle 42: Treibhausgasemissionen aus der Saatgutproduktion (Anonymous, 2004)

Treibhausgas	Emissionen [$g/kg_{Saatgut}$]
CO_2	520
CH_4	0,6
N_2O	2,8

Methanaufnahme des Bodens

Terrestrische Böden sind Methansenken. Hydromorphe Böden (Reisfelder, Sümpfe, etc.) sind nur dann Methanquellen, wenn das produzierte Methan auch tatsächlich die Atmosphäre

erreicht. Methan dient methanotrophen Bakterien als Nährstoff und Elektronenlieferant, da diese keine langkettigen Kohlenwasserstoffe abbauen können. Damit stellen auch hiesige, landwirtschaftlich genutzte Flächen Methansenken dar. Dabei korreliert das Senkenpotential vor allem mit der Feuchtigkeit des Bodens. Deshalb unterscheidet sich die Aufnahmerate auch deutlich je nach Nutzungsart und der einhergehenden Bodenbearbeitungsmaßnahmen. So kann man generell sagen, dass Ackerland weniger Methan aufnimmt als Grünland. Bei einer Modellierung für Baden-Württemberg wurde für Grünland eine durchschnittliche Methanaufnahme von 1,12 kg CH_4 pro Hektar und Jahr errechnet (Schäfer et al., 2003).

Lachgasemissionen des Bodens

Die Ausbringung von stickstoffhaltigen Düngern führt oft zur verstärkten Emission von Distickstoffoxid (N_2O). Lachgas entsteht, wenn Nitrat unter anaeroben Verhältnissen unvollständig denitrifiziert wird. Dabei wird zwischen zwei Arten von Lachgasemissionen unterschieden. Einerseits gibt es die natürlichen, sogenannten Hintergrundemissionen. Sie entstehen vor allem aufgrund von lokaler Staunässe und werden nach Neufeldt et al. (2006) mit 0,75 Kilogramm pro Hektar und Jahr für Grünland und Ackerland abgeschätzt. Andererseits wird eine beträchtliche Menge des zugegebenen Stickstoffdüngers in Lachgas umgewandelt und entweicht in die Atmosphäre. Aus den Simulationsergebnissen von Schäfer et al. (2003) können spezifische Emissionsfaktoren für Silomais (1,38 %) und Grünland (1,48 %) errechnet werden. Diese geben an, wie viel der applizierten Stickstoffmenge als Lachgas emittiert.

Ernteerträge

Die Erträge in Tabelle 43 sind nach der KTBL-Datensammlung "Energiepflanzen" abgeschätzt (Anonymous, 2006). Wie gehabt, werden dabei mittlere Ernten auf mittelschwerem Boden angenommen. Die Ernteerträge von Silomais beziehen sich auf 35 % Trockenmasse und die von Grassilage auf 50 %. Die Grasernte wurde durch vier Schnitte eingeholt.

Tabelle 43: Ernteerträge von Mais und Gras (Speckmaier et al., 2005; Anonymous, 2006)

	Ertrag [t/ha]	**oTS-Gehalt [%]**
Silomais	50	33,5
Grassilage	20	45,1

II.3.5.1.4.2. Biogasproduktion

Silierverluste

Nicht die gesamten Ernteerträge stehen in der Biogasanlage zur Biogasgewinnung bereit. Das liegt in erster Linie an den Silierverlusten bei der Lagerung im Flachsilo. Dabei werden organische Kohlenstoffverbindungen überwiegend in organische Säuren umgebaut, die insbesondere bei geringen Trockensubstanzgehalten die Miete in Form von Siliersäften verlassen. Ein kleiner Teil wird aerob abgebaut und entweicht in Form von Kohlenstoffdioxid. Allerdings müssen diese Emissionen nicht bilanziert werden, da das freigesetzte CO_2 während des Pflanzenwachstums ohne Gutschrift aus der Atmosphäre bezogen wurde und somit klimaneutral ist. Wichtig ist jedoch, dass die Massenverluste in der Bilanzierung berücksichtigt werden, da sie die Ernteerträge mindern und somit relativ die Emissionen pro erzeugten Kubikmeter Biogas erhöhen. Auf Grundlage der Untersuchung von Winkelmann (2006) werden die Verluste mit 10 Massenprozent angesetzt. Gärtner et al. (2008) kann entnommen werden, dass 10 Massenprozent auch für Grassilage ein realistischer Wert ist.

Betriebsenergiebedarf und diffuse Methanverluste

Jede Biogasanlage braucht für den optimalen Vergärungsprozess mehrere elektrische Geräte wie Pumpen, Rührwerke oder Messeinrichtungen. In einer Studien zeigten Dachs und Rehm (2006), dass die durchschnittlichen Werte für den Eigenstrombedarf einer Biogasanlage im Bereich von 5,8 % (Literaturwerte) und 8,1 % (eigene Messungen) liegen. In dieser Studie wird ein Eigenstrombedarf von 7,5 % angenommen. Neben dem Strombedarf besteht in der Biogasanlage auch ein gewisser Wärmebedarf, in erster Linie um den Fermenter auf optimaler Prozesstemperatur zu halten, aber auch für die Beheizung von Betriebsgebäuden. Dieser Wärmeeigenbedarf bei Nawaro-Anlagen wird auf etwa 20 % der erzeugten Abwärme des BHKW geschätzt (Gärtner et al., 2008). Da es sich aber sowohl bei Strom wie auch bei Wärme um Eigenprodukte handelt, sind keine Emissionen zu berechnen. Jedoch müssen die genutzten Strom- und Wärmemengen von der am Ende bereitgestellten Energie abgezogen werden.

Da die Anlage mit einem geschlossenen Nachgärbehälter ausgestattet ist, fallen nur noch diffuse Methanverluste an, die sich vor allem aus dem Überdruckventil des Fermenters und kleinen Undichtigkeiten der Anlage zusammensetzen. Die Quantifizierung der Verluste ist

äußerst schwierig und von Anlage zu Anlage verschieden. Überschlägig kann ein Wert von 1 % des produzierten Methans angesetzt werden (Vogt, 2008).

Errichtung und Rückbau der Biogasanlage

Erst durch das Inkrafttreten des EEG im Jahr 2000 wurde ein Anreiz zum Bau von güllefreien Biogasanlagen (Nawaro-Anlagen) geschaffen. Folglich gibt es derzeit noch keine Erfahrungen über die durchschnittliche Lebensdauer und den Rückbau solcher Anlagen. Untersuchungen anderer Anlagen zeigen aber, dass die größten Emissionen durch die Bereitstellung der für den Bau notwendigen Rohstoffe begründet sind. Für den Rückbau wurde dagegen nur ein untergeordneter Einfluss festgestellt (Nill, 2004). Für den Bau einer Biogasanlage mit einer Lebensdauer von 20 Jahren kann eine Belastung von 10 g CO_2 pro kWhel angenommen werden (Bachmaier et al., 2007).

Gasbildungsraten

Da die Planung einer Biogasanlage vor allem wirtschaftlichen Interessen gerecht werden muss, werden in der Regel eine hohe Raumbelastung und geringe Verweildauern angestrebt. Allerdings ist das Gesamtverfahren, bei dem mehrere syntrophe Bakterienstämme in einer Prozesskette Biomasse zu Biogas umwandeln, energetisch grenzwertig. Denn eine geringe Verweildauer, die aus ökonomischer Sicht erwünscht ist, schlägt sich in einer geringeren Gasausbeute nieder. Eine hohe Raumbelastung erhöht die Gasausbeute, birgt aber die Gefahr, den Prozess mit Zwischenprodukten zu ersticken. Die dieser Studie zugrundegelegten Gasausbeuten (Tabelle 44) wurden unter typischen Prozessparametern erzielt (Koch et al., 2009b; Lübken, 2009). Bei den einstufigen Anlagen kann realistisch von einer Raumbelastung von ungefähr 3 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ und einer hydraulischen Verweilzeit von circa 50 Tagen ausgegangen werden (FNR, 2005).

Tabelle 44: Veranschlagte Biogasausbeute (Koch et al., 2009b; Lübken, 2009)

	Biogasertrag [l/kg$_{oTS}$]	**Methangehalt [%]**
Maissilage	680	52
Grassilage	500	52

Der Energiegehalt des Biogases steckt im Methan, das einen Heizwert von 10 kWh/m³ hat (Aschmann et al., 2007). Die Gaserträge beziehen sich jeweils auf die organische

Trockensubstanz. Deshalb müssen von der Trockensubstanz noch die mineralischen Bestandteile subtrahiert werden.

II.3.5.1.4.3. Emissionen durch die Verbrennung im BHKW

Bei der energetischen Umsetzung in elektrischen Strom im Blockheizkraftwerk wird das Biogas verbrannt. Dabei entsteht in erster Linie Kohlenstoffdioxid und Wasser. Da das CO_2 aber zuerst im Zuge des Pflanzenwachstums über die Photosynthese gebunden wurde, kann es als klimaneutral angesehen werden und muss nicht bilanziert werden. Da sich diese Studie auf die Untersuchung der Auswirkungen auf den anthropogenen Treibhauseffekt beschränkt, wird beispielsweise die versauernde Wirkung von SO_2, welches bei der Verbrennung ebenfalls entsteht, verzichtet. Somit muss als einzige klimawirksame Emission der Methanschlupf betrachtet werden. Als Methanschlupf bezeichnet man Methan, das aufgrund von kleinen Ventilüberschneidungen unverbrannt das BHKW verlässt. Eine Untersuchung von Aschmann et al. (2006) zeigte, dass 0,5 % des zugeführten Methans als Methanschlupf entweicht. Vom bereitgestellten Strom muss noch der Eigenstrombedarf für die Biogaserzeugung abgezogen werden. Der elektrische Wirkungsgrad des Blockheizkraftwerks möge bei 38,6 %, der thermische Wirkungsgrad bei 49,4 % liegen (Aschmann et al., 2007).

II.3.5.2. Ergebnisse und Vergleich

Wie zu Beginn festgelegt, sollen die Ergebnisse der Klimaemissionen bezüglich der funktionellen Einheit 1 kWh bereitgestellten Stroms untersucht werden. Als Erstes erfolgt ein Vergleich der spezifischen Kohlenstoffdioxid-Emissionen von Biogas aus Mais- und Grassilage mit anschließender Verstromung im Blockheizkraftwerk. Danach werden diese Werte dem deutschen Strommix gegenüber gestellt und diskutiert. Abschließend soll über eine Sensitivitätsanalyse gezeigt werden, wie sich eine Kraft-Wärme-Kopplung auf das Ergebnis der Ökobilanz auswirkt.

II.3.5.2.1. Gegenüberstellung von Mais- und Grassilage

II.3.5.2.1.1. Anbau

Aus in Kapitel II.3.5.1.4 vorgestellten Angaben lassen sich für Mais- wie auch für Grassilage CO_2-Emissionen für die einzelnen Ein- und Ausgänge des Systems berechnen. Dabei werden Methan- und Lachgasausstöße zuerst über die Wichtungsfaktoren (GWP) in Kohlenstoffdioxid-Äquivalente umgerechnet und anschließend aufsummiert. Somit ergeben sich für jede Einwirkung spezifische Mengen an CO_2 pro Hektar. Da aber in dieser Studie der Flächenbezug irrelevant ist, werden die Emissionen in einem nächsten Schritt zum Ertrag an organischer Trockensubstanz (oTS) in Bezug gesetzt (Abbildung 82).

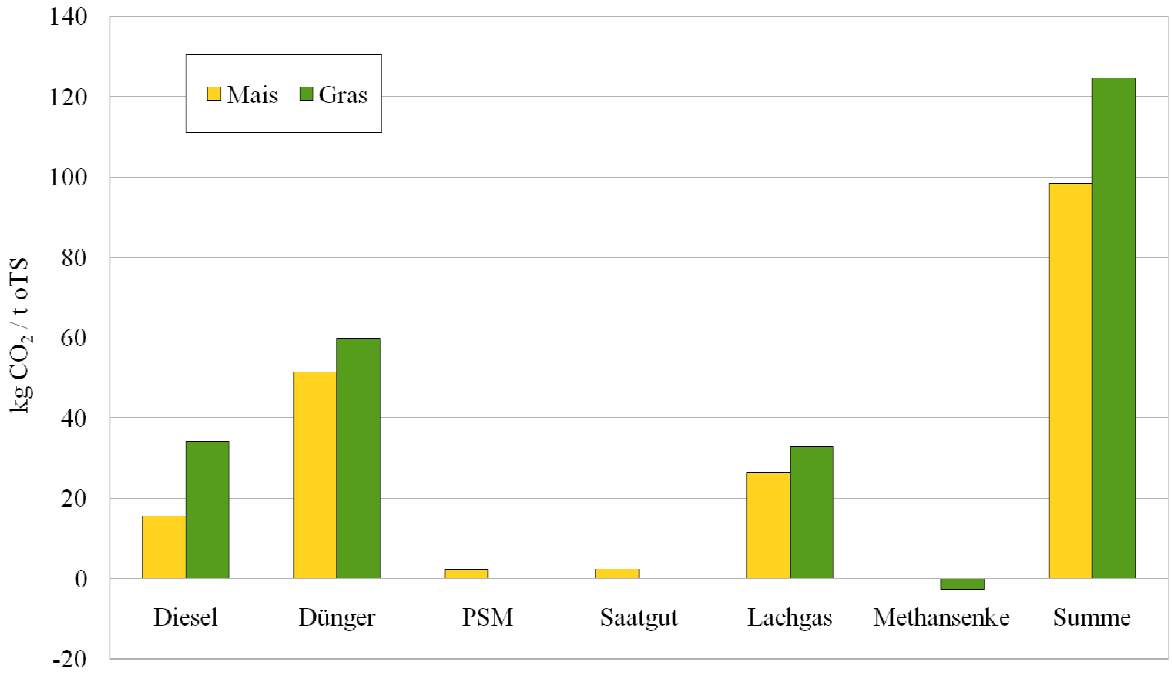


Abbildung 82: Spezifische Emissionen beim Anbau von Mais und Gras

Das Diagramm verdeutlicht, dass die Emissionen der Grassilage für den Anbau von einer Tonne organischer Trockensubstanz die der Maissilage deutlich überschreiten. Das liegt einerseits an den unterschiedlichen Hektarerträgen, die für Silomais mit ca. 18 t fast doppelt so hoch ausfallen wie bei der Grassilage (10 t). Andererseits bedarf die Grünlandbewirtschaftung einen größeren Düngemitteleinsatz (ohne Düngung sinkt der Ertrag signifikant) und einen deutlich höheren maschinellen Aufwand (insbesondere durch die Ernte in mehreren Schnitten). Addiert man die verschiedenen Einflussgrößen auf, so werden für die

Maissilage 102 Kilogramm CO_2 pro Tonne organischer Trockensubstanz emittiert und für die Grassilage 295 kg_{CO2}/t_{oTS}. Da die Unterschiede bei der Biogasproduktion nur noch marginal sind, kann bereits an dieser Stelle ein erstes relatives Fazit zugunsten der Maissilage gezogen werden.

II.3.5.2.1.2. Biogasproduktion

Zunächst müssen die Silierungsverluste von 10 % berücksichtigt werden. Da sich die Ergebnisse auf eine Kilowattstunde frei Anlage beziehen, müssen die Verluste durch Mehrproduktion kompensiert werden. So müssen 1,11 Tonnen Rohstoff hergestellt werden, um tatsächlich eine Tonne vergären zu können. Dementsprechend steigen die spezifischen Emissionen auf 114 (328) $kg/t_{vergärbare\ oTS}$.

Nun wird über den Methangehalt und den aus den Benchmarks gegebenen Gaserträgen die Methanausbeute berechnet. Mit dieser lassen sich die Emissionen auf das produzierte Methan beziehen (Tabelle 45).

Tabelle 45: Biogasdaten

	Biogasertrag [l/kg_{oTS}]	**Methangehalt [%]**	**Methanertrag [l/kg_{oTS}]**	**Emissionen [g_{CO2}/m^3_{CH4}]**
Maissilage	680	52	350	322
Grassilage	500	52	260	1.263

Unter Berücksichtigung des diffusen Methanverlustes und des Methanschlupfes, stehen der thermischen Verwertung nur noch Methanmengen von 347 l/kg_{oTS} für Maissilage bzw. 256 l/kg_{oTS} für Grassilage zur Verfügung. Das hat zur Folge, dass die CO_2-Emissionen erstens relativ steigen, da ein geringerer Nutzertrag gleichem Aufwand gegenübersteht. Zweitens müssen die direkten Umweltwirkungen des entweichenden Gases berücksichtigt werden. Somit müssen die Emissionen für Maissilage auf 413 g_{CO2}/m^3 und die von Grassilage auf 1346 g_{CO2}/m^3 Methan korrigiert werden.

II.3.5.2.1.3. Stromproduktion im BHKW

Der Heizwert des Biogases entspricht dem Energiegehalt des Methans (10 kWh/m^3_{CH4}). Über den elektrischen Wirkungsgrad des Blockheizkraftwerks lässt sich der daraus erzeugbare Strom von 3,85 kWh/m³ berechnen. Allerdings kann diese Strommenge noch nicht ins Netz

eingespeist werden, da zuvor noch der Strom für den Eigenbedarf von 7,5 Prozent abgezogen werden muss. Das bedeutet, dass nur ein Anteil von 92,5 Prozent des erzeugten Stroms bereitgestellt werden kann, welcher 3,56 Kilowattstunden pro Kubikmeter beträgt. Jetzt wird dieser Leistungswert auf die funktionelle Einheit von 1 kWh zurückgerechnet und mit den spezifischen Emissionen für Mais- und Grassilage in Bezug gesetzt. Abschließend werden noch die 10 g_{CO2}/kWh für Bau und Rückbau addiert, um die Gesamtemissionen für die Stromgewinnung aus Mais- bzw. Grassilage zu erhalten. Schließlich erhält man die Gesamtemissionen von 126 g_{CO2}/kWh für Maissilage und 388 g_{CO2}/kWh für Grassilage.

II.3.5.2.2. Deutscher Strommix und Vergleich

Jährlich untersucht das Bundesministerium für Umwelt die spezifischen Emissionsfaktoren für den deutschen Strommix (Anonymous, 2009). Diese berechnen sich aus den direkten CO_2-Emissionen, die bei der Stromerzeugung entstehen, und dem für den Endverbrauch netto zur Verfügung stehenden Strom in Deutschland (vgl. Abbildung 83).

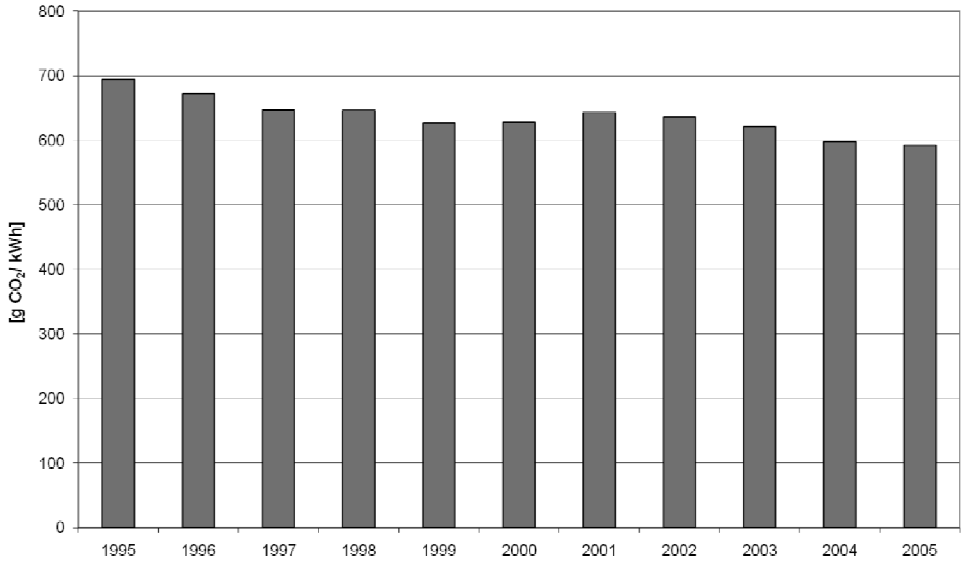


Abbildung 83: CO_2-Emissionen des deutschen Strommixes der letzten 10 Jahre (Anonymous, 2009)

Diese Zahlengrößen verdeutlichen bereits, dass sowohl der Strom aus Mais- wie auch der aus Grassilage weit weniger das Klima belastet als der deutsche Strommix. Jedoch sind diese Angaben nur begrenzt vergleichbar, da bei der Berechnung des deutschen Strommixes andere Daten zu Grunde gelegt wurden. Die Emissionsfaktoren beziehen sich dort nur auf direkte

Kohlenstoffdioxid-Emissionen (Anonymous, 2009). Das bedeutet, dass nur die Emissionen aus der Verbrennung fossiler Energieträger bilanziert werden. Eine Vorkettenbetrachtung findet in diesem Fall nämlich nicht statt.

Leider finden sich in der Literatur noch keine ganzheitlichen Berechnungen zu den Emissionsfaktoren des deutschen Strommixes mit eingehender Vorkettenuntersuchung. Aus diesem Grund soll hier anhand der Stromerzeugung durch Steinkohle aufgezeigt werden, wie sich die Emissionen im Vergleich entwickeln, wenn bei allen betrachteten Energieträgern eine Vorkette berücksichtigt wird.

Die Steinkohle stellt in Deutschland nach wie vor ein wichtiges Standbein der Energieversorgung dar. Inzwischen wird jedoch der überwiegende Teil der notwendigen Steinkohle importiert. Deshalb wird im Folgenden die Prozesskette für Kohle aus Südafrika vorgestellt. Dabei soll der gesamte Lebensweg der Steinkohle einbezogen werden. Diese Betrachtung beinhaltet neben den direkten Emissionen noch die Förderung und den Transport der Kohle, die Aufwendungen für den Bau des Kraftwerks und weiterer Anlagen (Föderanlagen, Abgasreinigungsanlagen,...), sowie die Reststoffentsorgung. Die einzelnen Emissionsfaktoren sind in Tabelle 46 aufgegliedert.

Tabelle 46: CO_2-Äquivalenten der Prozesskette für Steinkohle (Viebahn et al., 2008)

Emissionspfad	CO_2-Äquivalent [g_{CO2}/kWh]
Direkte Emissionen	821
Kohle-Förderung	82
Transport bis Kraftwerk	46
REA/DeNOx-Inputs	27
Bauvorleistung (Material zur Herstellung)	7
Entsorgung Reststoff Kraftwerk	93
Summe	**1.076**

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die Betrachtung der Prozesskette die Emissionsfaktoren deutlich in die Höhe treiben (hier um 31%). In Abbildung 84 sieht man vergleichend die spezifischen Kohlendioxid-Emissionen pro Kilowattstunde aufgeteilt in direkte und indirekte Ausstöße. Wie für erneuerbare Energieträger üblich, fallen für Gras-und Maissilage keine direkten Emissionen an (der Methanschlupf wird hier vernachlässigt).

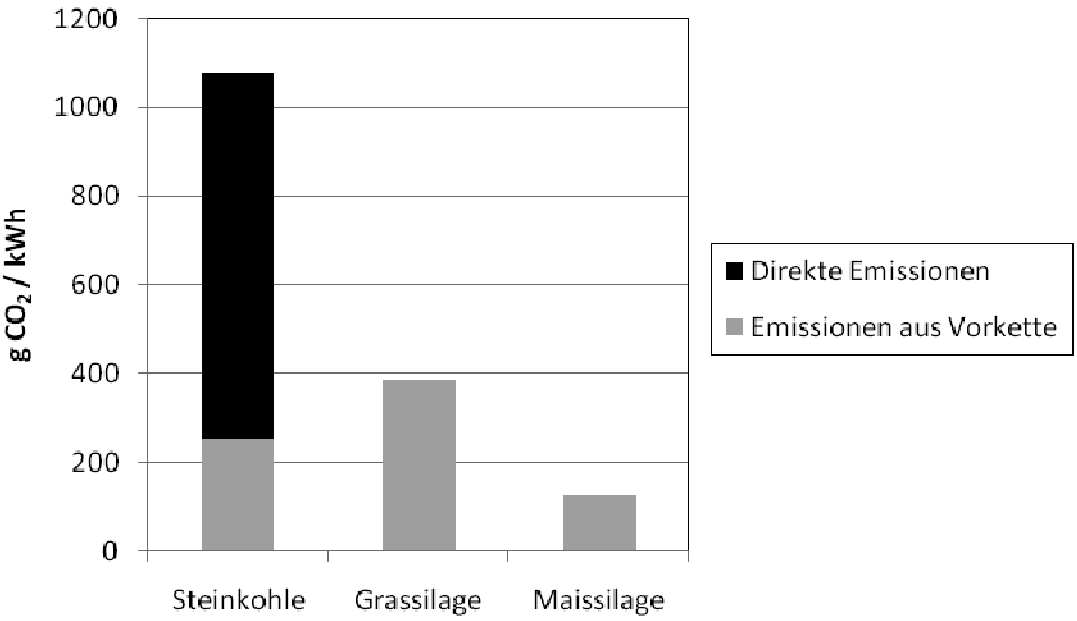


Abbildung 84: Direkte und indirekte Emissionen von Steinkohle, Grassilage und Maissilage

Hervorzuheben ist die Tatsache, dass selbst die Emissionen aus der Vorkette für die Steinkohle merklich höher ausfallen als für die Bereitstellung von Maissilage. Folglich ist elektrische Energie aus nachwachsenden Rohstoffen nicht nur beim Vergleich der indirekten Emissionen mit den direkten Emissionen des deutschen Strommixes vorteilhaft, sondern insbesondere dann, wenn die Bereitstellungsaufwendungen der fossilen Energieträger in die Betrachtung einbezogen werden. Desweiteren ist festzuhalten, dass unter umweltrelevanten Gesichtspunkten der Maisanbau dem Grasanbau vorzuziehen ist. Andere Gesichtspunkte, wie etwa die Problematik der Monokulturen (Stichwort Maiswüsten) oder die Konkurrenz zur Lebensmittelproduktion, seien an dieser Stelle explizit nicht Gegenstand der Betrachtungen. Abschließend sei noch erwähnt, dass dieser Studie eine intensive Grünlandbewirtschaftung zur Gewinnung der Grassilage zugrunde gelegt wurde. In der Landschaftspflege fällt Grünschnitt jedoch auch als Abfallprodukt an, das bisher weitestgehend kompostiert wird. Macht man diese Reststoffe der Biogasgewinnung durch Silierung zugänglich, wird deren Ökobilanz aufgrund des Charakters als Abfallprodukt deutlich günstiger ausfallen. Ähnliche Überlegungen gingen wohl auch der Einführung des sogenannten "Landschaftspflegebonus" mit der Novellierung der EEG voraus.

II.3.5.2.3. Sensitivitätsanalyse

Bisher wurde angenommen, dass nur die elektrische Energie des Blockheizkraftwerks genutzt wird. Dabei macht eine Kraft-Wärme-Kopplung nicht nur aus wirtschaftlicher Sicht Sinn. Da für die Wärmegewinnung kein zusätzlicher Aufwand betrieben wird, müssen auch keine neuen Emissionen aufsummiert werden. Zusätzlich können durch einen geeigneten Abnehmer an anderer Stelle Emissionen zur Wärmeproduktion gespart werden. Deshalb wird auf die bereitgestellte Wärme eine Gutschrift erteilt. Hierfür orientiert man sich beispielsweise an den Emissionen, die eine Ölheizung für die Produktion der gleichen Wärmemenge gebraucht hätte. Für die Berechnung wurden folgende Werte angenommen:

- Heizwert Methan: 9,97 kWh/m³,
- thermischer Wirkungsgrad des BHKW: 49,4 %,
- Eigenwärmebedarf: 20%,
- Emissionen Ölheizung: 375 g_{CO2}/kWh (Hartmann, 2006).

Im Folgenden soll ermittelt werden, wie viel thermische Energie pro bereitgestellte Kilowattstunde elektrischen Stroms zur Verfügung steht. Als Daten gehen in diese Untersuchung zuerst der Heizwert des Methans und der thermische Wirkungsgrad des Blockheizkraftwerks ein. Aus diesen beiden Werten lässt sich der theoretische Wärmeertrag pro Kubikmeter berechnen. Jedoch wird der Fermenter der gewählten Biogasanlage durch Eigenwärme erhitzt, sodass diese vom theoretischen Ertrag abgezogen werden muss. Somit verbleiben noch 3,9 kWh/m³ für die thermische Nutzung. Es wird vereinfachend angenommen, dass die gesamten 3,9 kWh/m³ verlustfrei an einen Verbraucher in der Umgebung abgegeben werden können. Da bei der Stromproduktion nur 3,6 Kilowattstunden pro Kubikmeter Methan bereitgestellt werden, ergibt sich, dass bei der Einspeisung von 1kWh Strom ins Netz 1,1 kWh Wärme zur Verfügung stehen. Um die gleiche Energiemenge zu produzieren, emittiert eine Ölheizung 415 g CO_2, die in der Bilanz gutgeschrieben werden dürfen (Bachmaier et al., 2007). Wie sich dieser Betrag auf die Ergebnisse von Mais- und Grassilage auswirkt, ist aus Abbildung 85 ersichtlich.

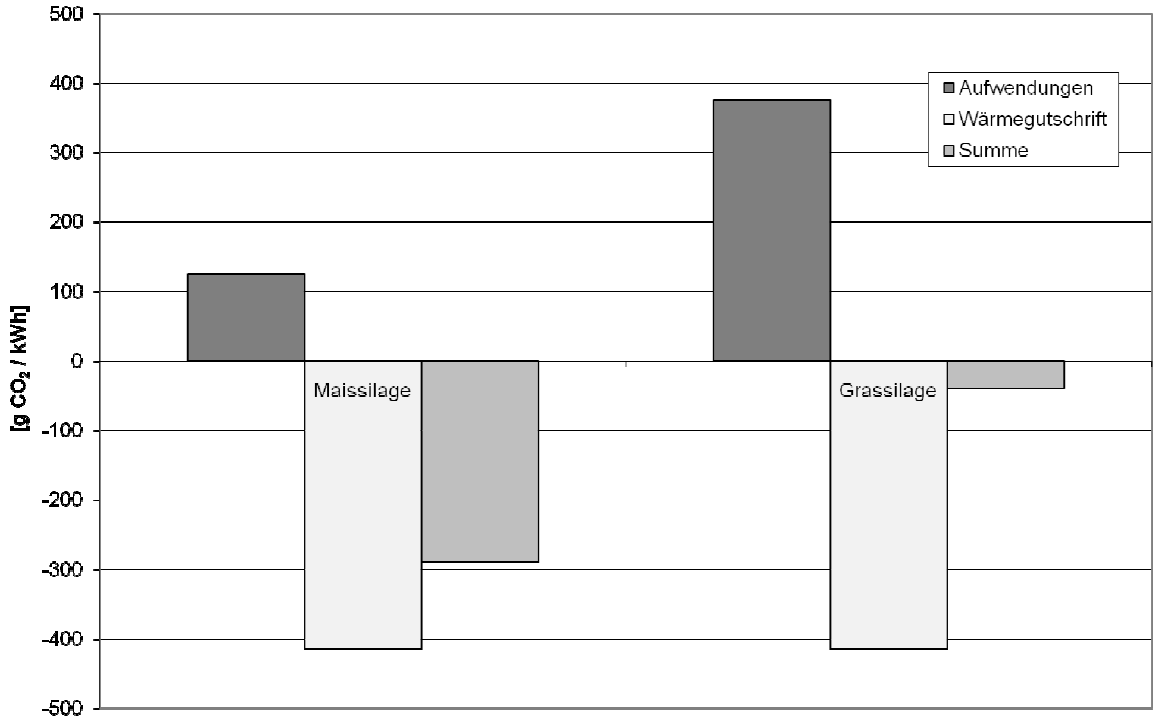


Abbildung 85: Spezifische Aufwendungen mit Wärmegutschrift

Es zeigt sich, dass eine gekoppelte Wärmenutzung einen starken Einfluss auf die Ergebnisse hat. Allerdings sind nicht immer so optimale Ergebnisse wie bei dieser Berechnung zu erwarten. Diese begründen sich hier einerseits in der Tatsache, dass der thermische Wirkungsgrad des Blockheizkraftwerks höher als der elektrische Wirkungsgrad ist. Andererseits kommt hinzu, dass der hier theoretisch verwendete Ausnutzungsgrad von 100 % über das ganze Jahr hinweg in der Praxis selten gegeben ist. Auch eine verlustarme Umwandlung der Wärme in Kälte kann potentielle Abnehmer aufzeigen. Aufgrund der Gutschrift verbessert eine Wärmenutzung aber generell die Ökobilanz und kann deshalb nur angeraten werden.

II.3.5.3. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen einer Ökobilanzierung wurden die Treibhausgasemissionen für die Stromerzeugung aus Mais- und Grassilage ermittelt und miteinander verglichen. Die Berechnungen haben ergeben, dass die Stromproduktion aus Maissilage, bezogen auf die Treibhausgasemissionen, umweltfreundlicher ist als die aus Grassilage. Verantwortlich für die Emissionsdifferenz sind vor allem die geringeren Ernteerträge des Grasanbaus bei gleichzeitig höherem maschinellen Aufwand (mehrere Schnitte pro Jahr) und deutlich höherem

Stickstoffbedarf. Diese Nachteile des Grases können dabei auch nicht durch die Vorteile bei Saatgut, Pflanzenschutzmittel und Methanaufnahme kompensiert werden. Der jeweils größte Emittent in der Prozesskette beider Anbauarten ist die Herstellung des chemischen Stickstoffdüngers, gefolgt von Dieselbereitstellung/-verbrennung und den Lachgasemissionen von den bewirtschafteten Flächen.

Im Vergleich mit dem deutschen Strommix weisen beide nachwachsenden Rohstoffe erhebliche Einsparpotentiale bezüglich der CO_2-Emission auf. Werden neben den direkten Emissionen auch noch die Emissionen der Vorkette berücksichtigt, wird die Differenz noch größer. Bei den Berechnungen dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die Emissionen der Vorkette aus importierter Steinkohle die Aufwendungen für den Anbau des Maises sogar übertraf.

Anschließend wurde in einer Sensitivitätsanalyse untersucht, wie sich eine gekoppelte Wärmenutzung auf die Ergebnisse verhält. Aus den Berechnungen konnte abgeleitet werden, dass durch die erhaltenen Gutschriften sogar ein negativer Kohlendioxidemissionsfaktor möglich ist. Neben der Kraftwärmekopplung gibt es noch eine Vielzahl weiterer Verbesserungsmöglichkeiten. So lässt sich die Bilanz durch die Cofermentation von Wirtschaftsdüngern verbessern. Dies ist einerseits dadurch begründet, dass tierische Exkremente ein Koppelprodukt sind und somit keine Aufwendungen für deren Produktion zu veranschlagen sind. Andererseits darf gleichzeitig eine Gutschrift erteilt werden, da die Vergärung eine spätere Methanemission auf der Nutzfläche verhindert. Generell kann man sagen, dass die meisten vergärbaren Reststoffe geeignet sind die Ökobilanz zu verbessern. Weitere Einsparpotentiale ergeben sich durch geringere Methanverluste. Ein geschlossenes Gärrestlager ist nicht nur zur Fassung des restlichen Methans zur energetischen Nutzung, sondern auch unter ökologischen Gesichtspunkten empfehlenswert.

Trotz der deutlich besseren Bilanz gegenüber den konventionellen Energieträgern kann Biogas aus nachwachsenden Rohstoffen wohl nur in begrenztem Maß das Energieproblem der Zukunft lösen. Schließlich stehen vergärbare Reststoffe nur in limitierten Mengen zur Verfügung und der Anbau von nachwachsenden Rohstoffen in größerem Umfang führt zu einer nicht zu unterschätzenden Naturrauminanspruchnahme. Früher oder später wird man sich deshalb der Frage stellen müssen, in wie weit die Flächenbelegung für den Anbau von Energiepflanzen angesichts des Lebensmittelbedarfs der wachsenden Weltbevölkerung noch vertretbar ist. In Anbetracht dessen, werden dagegen große Potentiale in der Nutzung von Landschaftspflegematerial gesehen.

II.4. Zusammenfassung und Ausblick

- In der vorliegenden Arbeit wurde die Monofermentation von Mais- und Grassilage sowie deren Mischungen unter mesophilen (38 °C) und thermophilen (55 °C) Bedingungen untersucht. Mittels unterschiedlicher Vergärungssysteme (Rührkessel-, Pfropfenstrom- und Schlaufenreaktoren) wurden umfangreiche Datensätze generiert, die einem Benchmarking sowie der Erstellung eines Regelwerkes dienten. Anhand der gewonnenen Daten wurden außerdem auf dem Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1) basierende Simulationsmodelle erstellt und kalibriert. Abschließend wurden die Erkenntnisse einer Ökobilanz unterzogen.

- Die wichtigsten Erkenntnisse der Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die für die Monofermentation von Grassilage entwickelten Schlaufenreaktoren stellten ihre gute Eignung unter Beweis. Als vorteilhaft erwies sich die in den Gasraum reichende Rührschnecke, durch die die Bildung von Schwimmschichten weitestgehend unterbunden werden konnte. Die schlanke Bauart stellte sich jedoch bei der Substratzugabe in Originalschnittlänge als nachteilig heraus.

- In dem liegenden Fermenter der Containeranlage stellte sich nachweislich kein Pfropfenstrom ein, wodurch eine Anmaischung des Substrates mit aktiver Biomasse (Gärrestrückführung) nicht notwendig war. Anhand einer Strömungssimulation wurde diese Erkenntnis bestätigt und eine Möglichkeit zur Annäherung an den Pfropfenstrom aufgezeigt.

- Grundsätzlich waren alle getesteten Systeme verfahrenstechnisch gut geeignet. Allerdings zeigten sich bei steigendem Anteil Grassilage durch deren faserigen Eigenschaften zunehmend Verzopfungen an Rührorganen.

- Die Bioverfügbarkeit von Spurenelementen muss bei hohen organischen Belastungsraten beachtet werden. Für die Monofermentation von Maissilage konnte eine ausreichende Bioverfügbarkeit von Spurenelementen bis zu einer organischen Belastungsrate von 1,9 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ aufgezeigt werden. Durch die Zugabe von zwei- oder dreiwertigem Eisen kann ein stabiler Betrieb auch bei einer organischen Belastungsrate von 2,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ gewährleisten werden. Höhere organische Belastungsraten lassen sich nur durch eine zusätzliche Dosierung von Spurenelementen realisieren.

- Für die thermophile Vergärung von Grassilage, für die ein stabiler Betrieb lediglich bis zu einer Raumbelastung von 1,5 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ aufrecht erhalten werden konnte, zeigte sich die mesophile Betriebsweise mit einer Raumbelastung von 3,0 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ als deutlich belastbarer. Die Hauptursache dafür liegt offenbar in der temperaturbedingten Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Ammonium und hemmendem Ammoniak, das der artenärmeren Biozönose im thermophilen Temperaturbereich deutlich stärker beeinflusst. Die erzielten Methanausbeuten sind in beiden Temperaturregimen ähnlich.

- Ein zu hoher Trockensubstanzgehalt im Reaktor wirkt sich negativ auf die Hydrolyse aus. Infolgedessen kommt es zu einer Akkumulation von Ammonium bzw. Ammoniak sowie organischer Säuren (v.a. Propionsäure), wodurch die Umsetzung zu Biogas schließlich ins Stocken gerät. Die Gründe dafür liegen einerseits in der Funktion von Wasser als Transportmedium für Mikroorganismen, das die Aufnahme von Nährstoffen durch Diffusionsvorgänge ermöglicht. Zum anderen erleichtert Wasser den Stoffübergang nicht homogener oder partikulärer Stoffe. Nicht zuletzt wird Wasser in Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung des Substrates während der Hydrolyse zusätzlich verbraucht.

- Zur Prozessüberwachung geeignet sind in erster Linie die Konzentration an Propionsäure sowie das Stabilitätskriterium FOS/TAC. Ein stabiler Betrieb bei der mesophilen Vergärung von Grassilage konnte bis zu einer Propionsäurekonzentration von 7 g/l bzw. bzw. einem FOS/TAC-Wert von 1,5 aufrechterhalten werden. Im thermophilen Bereich brach der Prozess bereits bei einer Propionsäurekonzentration über 2,5 g/l und einem FOS/TAC von 1,0 zusammen. Auch bei der mesophilen Vergärung von Maissilage führten erhöhte Säurekonzentrationen von über 3 g/l nicht zu kritischen Instabilitäten. In der thermophilen Versuchsdurchführung konnte jedoch sowohl für die Monofermentation von Maissilage als auch für die Fermentation der Mischung Gras/Maissilage kein stabiler Betrieb bei hohen Säuregehalten erzielt werden. Andere Parameter wie der pH-Wert oder die Essigsäurekonzentration waren zur Prozessüberwachung deutlich schlechter geeignet.

- In der Praxis sind für die mesophile Monofermentation von Grassilage Methanausbeuten von 0,3 m^3/kg_{oTS} bei einer Raumbelastung von 3 $kg_{oTS}/(m^3 \cdot d)$ und einem Abbaugrad von 70 % erstrebenswert. Der thermophile Temperaturbereich ist aufgrund der angesprochenen Ammoniakproblematik nicht zu empfehlen. Bei der

mesophilen Monofermentation von Maissilage sind bei gleicher Raumbelastung ein Methanertrag von 0,4 m^3/kg_{oTS} und ein Abbau um 80 % möglich. Auch hier bietet sich in der Regel der mesophile Temperaturbereich an. Die Unterschiede in Gasertrag und Abbaugrad sind überwiegend mit der höheren Energiedichte bei gleichzeitig geringerem Anteil an schwer bzw. nicht abbaubaren Stoffen von Mais gegenüber Gras zu erklären.

- Im Rahmen der Versuche zeigte sich, dass ein nicht unerheblicher Teil der zugegebenen Masse den Reaktor über den Gaspfad verlässt (30 % und mehr). Da dieser Massenaustrag über entstehendes Biogas bei der Modellierung bisher nicht berücksichtigt wird, wurde bereits die Zulaufmenge um die gemessene Biogasproduktion verringert und die Konzentration der jeweiligen Fraktion im gleichen Maße erhöht, damit die entsprechenden Zulauffrachten garantiert werden. Dadurch konnte der Füllstand auch vom Modell reproduziert werden.

- Der vielfach in der Praxis zur Prozessüberwachung eingesetzte FOS/TAC-Wert wurde ebenfalls im Modell implementiert, wodurch auch eine Modellkalibrierung mit diesem in der Praxis sehr häufig gemessenem Parameter möglich wird.

- Das ADM1 wurde auf lignocellulosehaltige Substrate angepasst. Dazu war zu allererst eine detaillierte Charakterisierung des Substrates vonnöten, wobei sich die aus der Futtermittelanalytik stammende Weenderanalyse mit van-Soest-Fraktion als geeignet herausgestellt hat. Die Überführung der Messwerte in die Bezugsgröße CSB des ADM1 kann über empirische Korrelationen oder über den theoretischen Sauerstoffbedarf (ThOD) erfolgen.

- Die Kalibrierung der kinetischen Parameter erfolgte mit Unterstützung des modifizierten Nash-Sutcliffe-Koeffizienten, der eine Bewertung der Simulationsgüte ermöglicht. Anhand dessen konnte der Einfluss der kinetischen Parameter auf die Simulationsgüte gezeigt werden.

- Aufbauend auf die Simulationsstudien konnte die Anzahl der angepassten Parameter auf wenige besonders sensible reduziert werden. Sowohl im mesophilen als auch im thermophilen Temperaturbereich zeigte sich, dass bei Grassilage eine Hemmung von Wasserstoff beim Abbau der organischen Säuren früher einsetzt als beim eigentlichen Referenzsubstrat des ADM1 (Faulschlamm aus der biologischen Abwasserreinigung). In beiden Fällen konnte durch eine Anpassung der maximalen Aufnahmerate für

Acetat, der Halbwertskonstante für die Wasserstoffaufnahme sowie der Wasserstoffhemmkonstanten für den Propionsäure- bzw. Butter- und Valeriansäureabbau eine gute Übereinstimmung der Simulationswerte mit den Messwerten erreicht werden.

- Für die Simulation der Monofermentation von Maissilage sowie der Mischung aus Mais- und Grassilage zeigten sich die Hydrolyseraten der einzelnen Stofffraktionen für Kohlenhydrate, Proteine und Fette, die maximale Aufnahmerate für Essigsäure und die maximale Aufnahmerate für Propionsäure als besonders sensitiv. Es wird daher empfohlen, bei der Kalibrierung zuerst eine Anpassung dieser Parameter vorzunehmen.

- Im Rahmen einer Ökobilanzierung wurden die Treibhausgasemissionen für die Stromerzeugung aus Mais- und Grassilage ermittelt und miteinander verglichen. Die Berechnungen haben ergeben, dass die Stromproduktion aus Maissilage, bezogen auf die Treibhausgasemissionen, umweltfreundlicher ist als die aus Grassilage. Verantwortlich für die Emissionsdifferenz sind vor allem die geringeren Ernteerträge des Grasanbaus bei gleichzeitig höherem maschinellen Aufwand (mehrere Schnitte pro Jahr) und deutlich höherem Stickstoffbedarf. Diese Nachteile des Grases können dabei auch nicht durch die Vorteile bei Saatgut, Pflanzenschutzmittel und Methanaufnahme kompensiert werden. Im Vergleich mit dem deutschen Strommix weisen beide nachwachsenden Rohstoffe erhebliche Einsparpotentiale bezüglich der CO_2-Emission auf.

Obgleich im Rahmen dieser Arbeit die Anwendbarkeit des ADM1 für lignocellulosehaltiges Substrat gezeigt werden konnte, besteht in vielen Bereichen noch weiterer Forschungsbedarf.

- Da die Qualität der Modellierung zu allererst von einer akkuraten Zulaufcharakterisierung abhängt, ist eine detaillierte Beschreibung der jeweiligen Fraktionen sehr wichtig. Der beschriebene Ansatz mittels Weender-Analyse mit van-Soest-Fraktion und der Umrechnung über den ThOD hat sich als gut geeignet gezeigt.

- Für eine saubere Bilanzierung von Biogasanlagen auf Basis nachwachsender Rohstoffe sollte im Modell die Bezugsgröße Volumen durch die Masse ersetzt werden.

- Aufgrund der Ergebnisse erscheint die Aufteilung in die zwei Stufen Desintegration und Hydrolyse weder notwendig noch sinnvoll.

- Mit der Einführung des modifizierten Nash-Sutcliffe-Koeffizienten wurde eine Möglichkeit zur Bewertung der Simulationsgüte aufgezeigt. Ob auch bei anderen Kalibrierungen ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden können, muss die weitere Anwendung zeigen.

- Die bevorzugten Reaktionswege (acetoclastisch bzw. hydrogenotroph) zur Methanbildung sollten detailliert untersucht werden und später Eingang ins Modell finden. Dadurch könnten Anzahl und Grad der Parameteranpassung reduziert werden.

- In den vorliegenden Untersuchungen wurde das ADM1 auf das Substrat Mais- und Grassilage anhand der Messwerte angepasst. In einem nächsten Schritt sollte das kalibrierte Modell seine Eignung durch eine Gegenüberstellung mit weiteren Messwerten, die unter gleichen Bedingungen erzielt, jedoch nicht Teil der Kalibrierung waren, unter Beweis stellen.

Trotz aller Kritikpunkte zeigte das ADM1 bereits in der jetzigen Form eine gute Anwendbarkeit. Ähnlich dem Belebtschlammmodell ASM1 wird das ADM1 mit der Zahl der Nutzer und deren Kritikpunkten eine weitere Optimierung erfahren.

II.5. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Arbeitsschwerpunkte dieses Forschungsvorhabens lagen neben der Gewinnung verfahrenstechnischer Erkenntnisse zur Monofermentation von nachwachsenden Rohstoffen insbesondere im Bereich der Modellierung. Eine Aufstellung der bewilligten und ausgegebenen Mittel erfolgt im Verwendungsnachweis.

II.6. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieses Forschungsvorhabens gab es nur wenige Erfahrungen mit der Monofermentation von Energiepflanzen. Die Auswirkungen, die durch die einseitige Substratbereitstellung hervorgerufen werden, waren bislang weitestgehend unbekannt. Bisherige Arbeiten zur Monofermentation beschränkten sich häufig auf Batchversuche, wodurch Erscheinungen, wie die Akkumulation von Stickstoffverbindungen und der damit verbundenen Hemmung durch Ammonium bzw. Ammoniak oder ein Mangel an Spurenelementen, der sich zumeist erst nach mehreren Verweilzeiten einstellt, nicht beobachtet werden konnten. Mit dem Mangel an experimentellen Erfahrungen ging zwangsläufig auch ein Mangel an belastbaren Daten zur Erstellung und Kalibrierung eines mathematischen Modells einher.

Die bestehenden Modelle, die auf Basis von Klärschlamm erstellt worden sind, mussten in vielen Bereichen modifiziert, eine neue Methode zur Charakterisierung der Substrate gefunden und kinetische Parameter kalibriert werden. Mittels umfangreicher Sensitivitätsanalysen, Simulationsrechnungen zur Modellkalibrierung und Szenariorechnungen konnte gezeigt werden, dass das ADM1 auch für lignocellulosehaltige Substrate angewendet werden kann. Die Erkenntnisse aus der Modellierung bilden ferner ein wichtiges Instrument der Rückkopplung für den Betrieb der Praxisfermenter. So konnte anhand von Simulationsstudien der bereits durch andere Teilprojekte vermutete Mangel an Spurenelementen bei der Monovergärung klar herausgestellt werden.

II.7. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die im Rahmen dieses Vorhabens erzielten Ergebnisse können als Grundlage zur weiteren Prozessoptimierung bei der Monovergärung von Energiepflanzen angesehen werden. Die auf das jeweilige Substrat angepassten Modelle können mit geringem Aufwand anhand künftiger Datensätze weiter kalibriert werden, um so universell einsetzbare Werkzeuge zu erhalten.

Neben wertvollen Hinweisen für die Auslegung und den stabilen Betrieb von Anlagen, bleibt ein Ziel, den „Black-Box-Prozess“ der Monovergärung von Energiepflanzen besser zu verstehen. Anhand kalibrierter Modelle ist es möglich, nur einzelne Vorgänge zu beleuchten und dadurch das Grundverständnis für den komplexen Gesamtprozess zu erhöhen.

II.8. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Berichtes wurden Erkenntnisse von dritter Stelle recherchiert, jedoch waren keine erkennbaren Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bekannt.

II.9. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Peer-reviewte Publikationen

Wichern, M.; Gehring, T.; Fischer, K.; Andrade, D.; Lübken, M.; Koch, K.; Gronauer, A.; Horn, H. (2008): Monofermentation of grass silage under mesophilic conditions: Measurements and mathematical modelling with ADM 1. Bioresource Technology 100 (4), 1675-1681.

Koch, K.; Wichern, M.; Lübken, M.; Horn, H. (2009): Monofermentation of grass silage by means of loop reactors. Bioresource Technology 100 (23), 5934-5940.

Koch, K.; Lübken, M; Gehring, T.; Wichern, M.; Horn, H. (2010): Biogas from grass silage - Measurements and modelling with ADM1. Bioresource Technology 101 (21), 8158-8165.

Lübken, M.; Koch, K.; Wichern, M.; Horn, H. (2010): Mathematical modeling of the anaerobic digestion of energy crops – I. Set-up of the simulation model. *In Vorbereitung*.

Lübken, M.; Koch, K.; Gehring, T., Horn, H., Wichern, M. (2010): Mathematical modeling of the anaerobic digestion of energy crops – II. Process simulation. *In Vorbereitung*.

Buchbeiträge

Wichern, M.; Lübken, M.; Koch, K.; Gehring, T.; Horn, H.; Fischer, K.; Schlattmann, M.; Gronauer, A. (2007): Eignung des Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM 1) zur Prozesssteuerung landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Gülzower Fachgespräche, Band 27 (Messen, Steuern, Regeln bei der Biogaserzeugung), Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) e.V., Gülzow.

Koch, K.; Wichern, M.; Lübken, M.; Schlattmann, M.; Gronauer, A.; Horn, H. (2008): Eignung des ADM 1 zur Modellierung von Biogasanlagen. Tagungsband zur 6. Fachtagung „Anaerobe biologische Abfallbehandlung“ der TU Dresden (ISBN 978-3-934253-49-0), 23.-24. September 2008, Dresden.

Koch, K.; Lübken, M; Gehring, T.; Wichern, M. (2009): Biogas from grass silage - Measurements and modelling. Schriftenreihe zur Internationalen Wissenschaftskonferenz

Biogas Science 2009 der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (ISSN 1611-4159), 02.-04. Dezember 2009, Erding

Lübken, M; Koch, K.; Wichern, M. (2009): Mathematische Modellierung der mesophilen und thermophilen anaeroben Vergärung von Maissilage. Schriftenreihe zur Internationalen Wissenschaftskonferenz Biogas Science 2009 der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (ISSN 1611-4159), 02.-04. Dezember 2009, Erding

Konferenzbeiträge

Koch, K.; Wichern, M.; Lübken, M.; Horn, H. (2008): Loop reactors as an innovative technique for biogas production from energy crops. Vth International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes and Energy Crops, 25.-28. Mai 2008, Hammamet, Tunesien.

Koch, K.; Wichern, M.; Horn, H. (2008): Nachwachsende Rohstoffe in der Energieversorgung - ein Beitrag zum Klimaschutz?!. TUM Alumni Expertenseminar „Die Verbesserung der Lebensqualität: Perspektiven für den Einsatz von regenerativen Energien in Lateinamerika“, 06.-11. Oktober 2008, Buenos Aires, Argentinien.

Wichern, M.; Koch, K.; Horn, H. (2008): Biomassenutzung in Deutschland. TUM Alumni Expertenseminar „Verbesserung der Lebensqualität durch nachhaltige Energie“, 13.-18. April 2008, Sevilla, Spanien.

Koch, K.; Horn, H. (2009): Water and wastewater technology - Facts and perspectives. KontakTUM Expert Seminar „Environmental Engineering“, 01.-04. September 2009, Singapore.

Lübken, M.; Koch, K.; Gehring, T.; Horn, H.; Wichern, M. (2010): Simulation der Monofermentation von Energiepflanzen. 17. SIMBA-Anwendertreffen, 04.-05. Mai 2010, Halberstadt.

Studentische und wissenschaftliche Arbeiten

Seeberger, T. (2008): *Entwicklung, Aufbau und Optimierung einer anaeroben Parallelbioreaktoranlage.* Projektarbeit im Studiengang Umweltplanung und Ingenieurökologie.

Klauke, L. (2008): *Simulation des Strömungsverhaltens eines Pfropfenstromfermenters zur Vergärung nachwachsender Rohstoffe.* Masterarbeit im Studiengang Wasser und Umwelt.

Seeberger, T. (2008): *Untersuchungen in anaeroben Parallelbioreaktoren zur Auswirkung unterschiedlicher Substratdosierintervalle auf Prozessstabilität und Biogasproduktion.* Masterarbeit im Studiengang Umweltplanung und Ingenieurökologie.

Lübken, M. (2009): *Mathematical modeling of anaerobic digestion processes.* Dissertation.

Schneider, F. (2010): *Ökobilanzierung von Biogas aus nachwachsenden Rohstoffen hinsichtlich Klimawirkungen und Vergleich mit dem deutschen Strommix.* Bachelorarbeit im Studiengang Umweltingenieurwesen.

Koch, K. (2010): *Verfahrenstechnische Untersuchungen und mathematische Modellierung der Prozesse bei der Vergärung von Grassilage.* Dissertation.

II.10. Literaturverzeichnis

Abdoun, E., Weiland, P., 2009. Optimierung der Monovergärung von nachwachsenden Rohstoffen durch die Zugabe von Spurenelementen. Abschluss-Symposium des Biogas Crops Network, 07.05.09, Potsdam. Bornimer Agrartechnische Berichte, Band 68.

Andrade, D., Heuwinkel, H., Gronauer, A., 2009a. Potentiale zur alleinigen Vergärung von Grassilage: Aspekte der Silagenqualität und Fermentationsbedingungen. Abschluss-Symposium des Biogas Crops Network, 07.05.09, Potsdam. Bornimer Agrartechnische Berichte, Band 68.

Andrade, D., Marin-Perez, C., Heuwinkel, H., Lebuhn, M., Gronauer, A., 2009b. Biogasgewinnung aus Grassilage: Untersuchungen zur Prozessstabilität. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Andrews, J.F., 1969. Dynamic model of the anaerobic digestion process. *Journal of the Sanitary Engineering Divison* 95 (SA 1), 95-116.

Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1993. Thermophilic Anaerobic-Digestion of Livestock Waste - the Effect of Ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (4), 560-564.

Angelidaki, I., Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 3 (2), 117-129.

Anonymous, 2004. Ecoinvent-Zentrum, http://www.ecoinvent.ch.

Anonymous, 2006. Energiepflanzen. KTBL Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (978-3-939371-21-2), Darmstadt.

Anonymous, 2009. Umweltbundesamt, http://www.umweltbundesamt.de/energie/archiv/co2-strommix.pdf.

Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control* 48 (5), 835-852.

AQUASIM 2.1, 2001. Computer Program for the Identification and Simulation of Aquatic Systems. Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (EAWAG), Zürich.

Aschmann, V., Kissel, R., Effenberger, M., Eichelser, R., Gronauer, A., 2007. Effizienzsteigerung, Emissionsminderung und CO2-Einsparung durch optimierte Motoreinstellung bei Biogas-Blockheizkraftwerken zur dezentralen Stromversorgung. Bayerisches Landesamt für Umwelt (LFU) (978-3-940009-32-6), Augsburg.

Aschmann, V., Kissel, R., Stanzel, H., 2006. Emissions- und Leistungsverhalten von Biogas-Verbrennungsmotoren in Abhängigkeit von der Motorwartung. Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, Augsburg.

Athanasiadis, K., Helmreich, B., 2005. Influence of chemical conditioning on the ion exchange capacity and on kinetic of zinc uptake by clinoptilolite. *Water Research* 39 (8), 1527-1532.

Bachmaier, J., Effenberger, M., Gronauer, A., 2007. Einflussfaktoren auf die Klimabilanz landwirtschaftlicher Biogasanlagen. *Landtechnik* 62 (6), 412-413.

Batstone, D.J., 2006. Mathematical modelling of anaerobic reactors treating domestic wastewater: rational criteria for model use. *Environmental Science and Biotechnology* 5 (1), 57-71.

Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A., 2002. Anaerobic Digestion Model No. 1. International Water Association (1-900222-78-7), London.

Besgen, S., 2005. Energie- und Stoffumsetzung in Biogasanlagen. Dissertation, Hohe Landwirtschaftliche Fakultät, Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität zu Bonn, Bonn.

Blumensaat, F., Keller, J., 2005. Modelling of two-stage anaerobic digestion using the IWA Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1). *Water Research* 39 (1), 171-183.

Boe, K., Batstone, D.J., Angelidaki, I., 2007. An innovative online VFA monitoring system for the anerobic process, based on headspace gas chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 96 (4), 712-721.

Boubaker, F., Ridha, B.C., 2008. Modelling of the mesophilic anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste using anaerobic digestion model No. 1 (ADM1). *Bioresource Technology* 99 (14), 6565-6577.

Boyle, W.C., 1977. Energy recovery from sanitary landfills - A review. Pergamon Press (ISBN: 0-08-021791-5), Oxford.

Budiyono, Widiasa, I.N., Johari, S., Sunarso, 2010. The Influence of Total Solid Contents on Biogas Yield from Cattle Manure Using Rumen Fluid Inoculum *Energy Research Journal* 1 (1), 6-11.

Buffière, P., Steyer, J.P., Fonade, C., Moletta, R., 1998. Modeling and experiments on the influence of biofilm size and mass transfer in a fluidized bed reactor for anaerobic digestion. *Water Research* 32 (3), 657-668.

Buswell, A.M., Mueller, H.F., 1952. Mechanism of methane fermentation. *Industrial and Engineering Chemistry* 44 (3), 550-552.

Carrasco, E.F., Rodríguez, J., Puñal, A., Roca, E., Lema, J.M., 2004. Diagnosis of acidification states in an anaerobic wastewater treatment plant using a fuzzy-based expert system. *Control Engineering Practice* 12 (1), 59-64.

Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99 (10), 4044-4064.

Cirne, D.G., Lehtomäki, A., Björnsson, L., Blackall, L.L., 2007. Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology* 103 (3), 209-218.

Costello, D.J., Greenfield, P.F., Lee, P.L., 1991. Dynamic modelling of a single-stage high-rate anaerobic reactor--II. Model verification. *Water Research* 25 (7), 859-871.

Dachs, G., Rehm, W., 2006. Der Eigenstromverbrauch von Biogasanlagen und Potenziale zu dessen Reduzierung. Solarenergieförderverein Bayern e. V. München.

Deiglmayr, K., Heimler, F., Fritz, M., 2009. Extensification of cropping systems in the production of biogas substrates. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Dierauer, H., 2008. Merkblatt Biomais. Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), Frick.

Dornack, C., 2001. Thermophile Vergärung von Mischsubstraten. Dissertation, Institut für Siedlungs- und Industriewasserwirtschaft, TU Dresden, Dresden.

Eastman, J.A., Ferguson, J.F., 1981. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *Journal of Water Pollution Control* 53 (3), 352-366.

Edelmann, W., 2001. Biogaserzeugung und -verwertung in: Kaltschmitt und Hartmann (Hrsg.) *Energie aus Biomasse - Grundlagen, Techniken und Verfahren*. Springer Verlag, Freising.

Effenberger, M., Lebuhn, M., Gronauer, A., 2007. Fermentermanagement – Stabiler Prozess bei NawaRo-Anlagen. Jahrestagung des Fachverbandes Biogas e.V., 31.01.-02.02., Leipzig.

Feitkenhauer, H., von Sachs, J., Meyer, U., 2002. On-line titration of volatile fatty acids for the process control of anaerobic digestion plants. *Water Research* 36 (1), 212-218.

Feng, Y., 2004. Calibration and Verification of a Mathematical Model for the Simulation of Blackwater/Biowaste Digestion. Master Thesis, Institute of Wastewater Management, Hamburg University of Technology, Hamburg.

Feng, Y., Behrendt, J., Wendland, C., Otterpohl, R., 2006. Parameter analysis of the IWA Anaerobic Digestion Model No. 1 for the anaerobic digestion of blackwater with kitchen refuse. *Water Science and Technology* 54 (4), 139-147.

FNR, 2005. Ergebnisse des Biogasmessprogramms. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow.

FNR, 2006. Handreichung Biogasgewinnung und -nutzung. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow.

FNR, 2009. Biogas-Messprogramm II. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow.

Fröba, N., Funk, M., 2005. Dieselkraftstoffbedarf bei landwirtschaftlichen Arbeiten. KTBL Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft Darmstadt.

Furumai, H., 1997. Modeling of hydrogen behavior and reduced product formation following perturbation with hydrogenic substrate in a methanogenic reactor. *Water Science and Technology* 36 (6-7), 255-262.

Gallert, C., Bauer, S., Winter, J., 1998. Effects of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (4), 495-501.

Gallert, C., Winter, J., 1997. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48 (3), 405-410.

Gärtner, S., Münch, J., Reinhardt, G., Vogt, R., 2008. Materialband E - Ökobilanzen. ifeu - Institut für Energie und Umweltforschung, Heidelberg.

Gehring, T., Lübken, M., Wichern, M., 2009. Einsatz von mathematischen Prozessmodellen zur Optimierung, Stabilisierung und Regelung des anaeroben Abbauprozesses von pflanzlicher Biomasse. Schlussbericht. Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München, München.

Gerike, P., 1984. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere* 13 (1), 169-190.

Grepmeier, M., 2002. Experimentelle Untersuchungen an einer zweistufigen fuzzy-geregelten anaeroben Abwasserreinigungsanlage mit neuartigem Festbettmaterial. Dissertation, Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie, TU München, München.

Gupta, N., Gupta, S.K., Ramachandran, K.B., 1997. Modelling and simulation of anaerobic stratified biofilm for methane production and prediction of multiple steady states. *Chemical Engineering Journal* 65 (1), 37-46.

Hafner, S.D., Bisogni, J.J., 2009. Modeling of ammonia speciation in anaerobic digesters. *Water Research* 43 (17), 4105-4114.

Hartmann, K., 2006. Life-cycle-assessment of industrial scale biogas plants. Dissertation, Fakultät Agrarwissenschaften, Georg-August-Universität, Göttingen.

Henze, M., Grady, C.P.L.J., Gujer, W., Marais, G.v.R., Matuso, T., 1987. Activated Sludge Model No. 1. IWA (1010-707X), London.

Heuwinkel, H., Aschmann, V., Gerlach, R., Gronauer, A., 2009. Die Genauigkeit der Messung des Gasertragspotentials von Substraten mit der Batchmethode. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Hill, D.T., 1983. Simplified monod kinetics of methane fermentation of animal wastes. *Agricultural Wastes* 5 (1), 1-16.

Huang, Y.H., Huang, G.H., Chou, S., Cheng, S.S., 2000. Hydrogen as a quick indicator of organic shock loading in UASB. *Water Science and Technology* 42 (3-4), 43-50.

Inanc, B., Matsui, S., Ide, S., 1999. Propionic acid accumulation in anaerobic digestion of carbohydrates: an investigation on the role of hydrogen gas. *Water Science and Technology* 40 (1), 93-100.

Kaltschmitt, M., Weiland, P., Konstantinidou, E., Rosenwinkel, K.H., 2004. Vergärung organischer Stoffe. Verein Deutscher Ingenieure Düsseldorf.

Kayhanian, M., 1994. Performance of a high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 59 (4), 349-352.

Klauke, L., 2008. Simulation des Strömungsverhaltens eines Pfropfenstromfermenters zur Vergärung nachwachsender Rohstoffe. Masterarbeit, Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik, Leibniz-Universität Hannover, Hannover.

Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., 2009. Mikrobielle Diversität in Biogasreaktoren bei der Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen. Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven, 15.-16.09.09, Gülzow. Gülzower Fachgespräche, Band 32.

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. *Systematic and Applied Microbiology* 31 (3), 190-205.

Koch, K., 2007. Optimierung einer automatisierten Technikumsanlage und Durchführung von Vergärungsversuchen zur dezentralen Abwasser- und Abfallbehandlung. Diplomarbeit, Institut für Abfallwirtschaft und Altlasten, TU Dresden, Hamburg.

Koch, K., 2010. Verfahrenstechnische Untersuchungen und mathematische Modellierung der Prozesse bei der Vergärung von Grassilage. Dissertation, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München, München.

Koch, K., Gehring, T., Lübken, M., Wichern, M., 2009a. Biogasgewinnung aus Grassilage - Verfahrenstechnik und Modellierung. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Koch, K., Lübken, M., Gehring, T., Wichern, M., Horn, H., 2010. Biogas from grass silage - Measurements and modeling with ADM1. *Bioresource Technology* 101 (21), 8158-8165.

Koch, K., Wichern, M., Lübken, M., Horn, H., 2008a. Loop reactors as an innovative technique for biogas production from energy crops. Vth International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes and Energy Crops, 25.05.-28.05.2008, Hammamet, Tunesien.

Koch, K., Wichern, M., Lübken, M., Horn, H., 2009b. Mono fermentation of grass silage by means of loop reactors. *Bioresource Technology* 100 (23), 5934-5940.

Koch, K., Wichern, M., Lübken, M., Schlattmann, M., Gronauer, A., Horn, H., 2008b. Eignung des ADM 1 zur Modellierung von Biogasanlagen. Institut für Abfallwirtschaft und Altlasten der TU Dresden (978-3-934253-49-0), Dresden.

Koller, K., 2004. Foam control in fermentation processes. *Chemical Engineering* 111 (8), 24-27.

Koster, I.W., Lettinga, G., 1988. Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. *Biological Wastes* 25 (1), 51-59.

Kroiss, H., 1985. Anaerobe Abwasserreinigung. Wiener Mitteilungen, Band 62, Technische Universität Wien, Wien.

Kroiss, H., Svardal, K., 2005. Einflussfaktoren auf die anaeroben biologischen Abbauvorgänge in: Bischofsberger, Dichtl, Rosenwinkel, Seyfried und Böhnke (Hrsg.) *Anaerobtechnik*. Springer Verlag, Heidelberg.

Kunst, S., 2005. Mikrobiologische Grundlagen in: Bischofsberger, Dichtl, Rosenwinkel, Seyfried und Böhnke (Hrsg.) *Anaerobtechnik*. Springer Verlag, Heidelberg.

Kusch, S., 2007. Vergärung von Grassilage in berieselten Feststoffschüttungen. *Wasser und Abfall* 9 (6), 40-44.

Laukenmann, S., Heuwinkel, H., Gronauer, A., Keppler, F., 2009. Stabile Kohlenstoffisotope: Eine neue Lasermethode zur Prozessanalyse und Identifikation mikrobiologischer Reaktionen im Biogasprozess. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Lebuhn, M., Liu, H., Heuwinkel, H., Gronauer, A., 2008. Biogas production from mono-digestion of maize silage–long-term process stability and requirements. *Water Science and Technology* 38 (8), 1645-1651.

Lehtomäki, A., Huttunen, S., Lehtinen, T.M., Rintala, J.A., 2008. Anaerobic digestion of grass silage in batch leach bed processes for methane production. *Bioresource Technology* 99 (8), 3267-3278.

Levenspiel, O., 1999. Chemical reaction engineering. John Wiley & Sons (0-471-25424-X), Oregon, USA.

Liebetrau, J., Kraft, E., 2004. Alles geregelt - Die Prozessstabilität und die Optimierung des Auslastung von Biogasanlagen können mit Online-Messgrößen sichergestellt werden. *Müllmagazin* 17 (2), 23-28.

Lindorfer, H., Braun, R., Kirchmayr, R., 2006. Self-heating of anaerobic digesters using energy crops. *Water Science and Technology* 53 (8), 159-166.

Linke, B., Mähnert, P., 2005. Biogasgewinnung aus Rindergülle und nachwachsenden Rohstoffen. *Landtechnik* 60 (5), 276-277.

Lokshina, L.Y., Vavilin, V.A., Kettunen, R.H., Rintala, J.A., Holliger, C., Nozhevnikova, A.N., 2001. Evaluation of kinetic coefficients using integrated monod and haldane models for low-temperature acetoclastic methanogenesis. *Water Research* 35 (12), 2913-2922.

Lübken, M., 2009. Mathematical modeling of anaerobic digestion processes. Dissertation, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München, München.

Lübken, M., Koch, K., Gehring, T., Wichern, M., 2009. Mathematische Modellierung der mesophilen und thermophilen anaeroben Vergärung von Maissilage. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Lübken, M., Wichern, M., Schlattmann, M., Gronauer, A., Horn, H., 2007. Modelling the energy balance of an anaerobic digester fed with cattle manure and renewable energy crops. *Water Research* 41 (18), 4085-4096.

Madigan, M., 2001. Stoffwechselvielfalt in: Madigan, Martinko, Parker und Goebel (Hrsg.) *Brock - Mikrobiologie*. Spektrum Akad. Verlag, Berlin.

Mähnert, P., 2007. Kinetik der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen und Gülle. Dissertation, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Humboldt-Universität Berlin, Berlin.

Mamdani, E.H., Assilian, S., 1975. An experiment in linguistic synthesis with a fuzzy logic controller. *International Journal of Man-Machine Studies* 7 (1), 1-13.

Murnleitner, E., Becker, T.M., Delgado, A., 2002. State detection and control of overloads in the anaerobic wastewater treatment using fuzzy logic. *Water Research* 36 (1), 201-211.

Myint, M., Nirmalakhandan, N., Speece, R.E., 2007. Anaerobic fermentation of cattle manure: Modeling of hydrolysis and acidogenesis. *Water Research* 41 (2), 323-332.

Nadji, H., Diouf, P.N., Benaboura, A., Bedard, Y., Riedl, B., Stevanovic, T., 2009. Comparative study of lignins isolated from Alfa grass (Stipa tenacissima L.). *Bioresource Technology* 100 (14), 3585-3592.

Nash, J.E., Sutcliffe, J.V., 1970. River flow forecasting through conceptual models part I - A discussion of principles. *Journal of Hydrology* 10 (3), 282-290.

Naumann, C., Bassler, R., 1993. Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln. VDLUFA-Verlag (3-7888-0233-2), Darmstadt.

Neufeldt, H., Schäfer, M., Angenendt, E., Li, C., Kaltschmitt, M., Zeddies, J., 2006. Disaggregated greenhouse gas emission inventories from agriculture via a coupled economic-ecosystem model. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 112 (2-3), 233-240.

Neureiter, M., Teixeira Pereira dos Santos, J., Perez Lopez, C., Pichler, H., Kirchmayr, R., Braun, R., 2005. Effect of silage preparation on methane yields from whole crop maize silages. 4th International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste, 31.08.-02.09.2005, Copenhagen.

Nielsen, H.B., Uellendahl, H., Ahring, B.K., 2007. Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. *Biomass and Bioenergy* 31 (11-12), 820-830.

Nill, M., 2004. Die zukünftige Entwicklung von Stromerzeugungstechniken - Eine ökologische Analyse vor dem Hintergrund technischer und ökonomischer Zusammenhänge. *Fortschritt-Bericht VDI Reihe 6 Nr. 518*

Ohly, N., 2006. Verfahrenstechnische Untersuchungen zur Optimierung der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen. Dissertation, Fakultät für Maschinenbau, Verfahrens- und Energietechnik, TU Bergakademie Freiberg, Freiberg.

Palatsi, J., Gimenez-Lorang, A., Ferrer, I., Flotats, X., 2009. Start-up strategies of thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Science and Technology* 59 (9), 1777-1784.

Patyk, A., Reinhardt, G., 1997. Düngemittel - Energie um Stoffstrombilanzen. Vieweg (3-528-06885-X), Wiedbaden.

Pavlovstatis, S.G., Giraldo-Gomez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. *Environmental Science and Biotechnology* 21 (5-6), 411-490.

Poggi-Varaldo, H.M., Rodríguez-Vázquez, R., Fernández-Villagómez, G., Esparza-García, F., 1997. Inhibition of mesophilic solid-substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47 (3), 284-291.

Polit, M., Estaben, M., Labat, P., 2002. A fuzzy model for an anaerobic digester, comparison with experimental results. *Engineering Applications of Artificial Intelligence* 15 (5), 385-390.

Preißler, D., Lemmer, A., Oechsner, H., Jungbluth, T., 2007. Güllefreie Vergärung von Maissilage. *Landtechnik* 62 (3), 160-161.

Preißler, D., Lemmer, A., Oechsner, H., Jungbluth, T., 2009. Die Bedeutung der Spurenelemente bei der Ertragssteigerung und Prozessstabilisierung. 18. Jahrestagung des Fachverbandes Biogas e.V., Hannover.

Punal, A., Palazzotto, L., Bouvier, J.C., Conte, T., Steyer, J.P., 2003. Automatic control of volatile fatty acids in anaerobic digestion using a fuzzy logic based approach. *Water Science and Technology* 48 (6), 103-110.

Qu, X., Vavilin, V.A., Mazéas, L., Lemunier, M., Duquennoi, C., He, P.J., Bouchez, T., 2009. Anaerobic biodegradation of cellulosic material: Batch experiments and modelling based on isotopic data and focusing on aceticlastic and non-aceticlastic methanogenesis. *Waste Management* 29 (6), 1828-1837.

Räbiger, N., Vogelpohl, A., 1983. Der Kompaktreaktor, ein neuentwickelter Schlaufenreaktor mit hoher Stoffaustauschleistung. *Chemie Ingenieur Technik* 55 (6), 486-487.

Ramirez, I., Mottet, A., Carrère, H., Déléris, S., Vedrenne, F., Steyer, J.-P., 2009. Modified ADM1 disintegration/hydrolysis structures for modeling batch thermophilic anaerobic digestion of thermally pretreated waste activated sludge. *Water Research* 43 (14), 3479-3492.

Ramsay, I.R., Pullammanappallil, P.C., 2001. Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: derivation of stoichiometry. *Biodegradation* 12 (4), 247-257.

Ramsay, I.R., Pullammanappallil, P.C., 2005. Full-scale application of a dynamic model for high-rate anaerobic wastewater treatment systems. *Journal of Environmental Engineering* 131 (7), 1030-1036.

Rieger, C., Weiland, P., 2006. Prozessstörungen frühzeitig erkennen. *Biogas Journal* 4 (1), 18-20.

Sadaka, S.S., Engler, C.R., 2003. Effects of initial total solids on composting of raw manure with biogas recovery. *Compost Science & Utilization* 11 (4), 361-369.

Sahm, H., 1981. Biologie der Methanbildung. *Chemie - Ingenieur - Technik* 53 (11), 854-863.

Saravanan, V., Sreekrishnan, T.R., 2006. Modelling anaerobic biofilm reactors - A review. *Journal of Environmental Management* 81 (1), 1-18.

Schäfer, M., Angenendt, E., Neufeldt, H., Zeddies, J., 2003. Modellierung klimarelevanter Emissionen aus der Landwirtschaft Baden-Württembergs. 43. Jahrestagung der Gesellschaft für Wirtschafts- und Sozialwissenschaften des Landbaus, Hohenheim.

Scherer, P., Lehmann, K., Schmidt, O., Demirel, B., 2009a. Application of a fuzzy logic control system for continuous anaerobic digestion of low buffered, acidic energy crops as mono-substrate. *Biotechnology and Bioengineering* 102 (3), 736-748.

Scherer, P.A., Krakat, N., Westphal, A., Satke, K., Neumann, L., 2009b. Systematic analysis of biogas plants by microbiological and genetic methods: Comparison hyper-thermophilic (60 °C) with thermophilic (55 °C). Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Schieder, D., Ellenrieder, J., Faulstich, M., 2009. Kombinierte mechanisch-enzymatische Vorbehandlung zum verbesserten Substrataufschluss bei der Vergärung nachwachsender Rohstoffe. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Schmelz, K., 2000. Co-Vergärung von Klärschlamm und Bioabfällen. Dissertation, Professur für Abfallwirtschaft, Bauhaus-Universität Weimar, Weimar.

Schoen, M., Sperl, D., Gadermaier, M., Goberna, M., Franke-Whittle, I., Insam, H., Ablinger, J., Wett, B., 2009. Population dynamics at digester overload conditions. *Bioresource Technology* 100 (23), 5648-5655.

Siegrist, H., Renggli, D., Gujer, W., 1993. Mathematical modeling of anaerobic mesophilic sewage sludge treatment. *Water Science and Technology* 27 (2), 25-36.

Siegrist, H., Renggli, D., Gujer, W., 1995. Mathematical modeling of anaerobic mesophilic processes in a digester. International meeting on anaerobic processes for bioenergy and environment, Copenhagen.

Siegrist, H., Vogt, D., Garcia-Heras, J.L., Gujer, W., 2002. Mathematical model for Meso- and Thermophilic Anaerobic Sewage Sludge Digestion. *Environmental Science and Biotechnology* 36 (5), 1113-1123.

SIMBA 4.2, 2005. Simulation der biologischen Abwasserreinigung Institut für Automation und Kommunikation (IFAK), Magdeburg.

Singh, K.P., Basant, N., Malik, A., Jain, G., 2010. Modeling the performance of "up-flow anaerobic sludge blanket" reactor based wastewater treatment plant using linear and nonlinear approaches - A case study. *Analytica Chimica Acta* 658 (1), 1-11.

Souidi, K., Mumme, J., Mundt, K., Nettmann, E., Bergmann, I., Linke, B., Klocke, M., 2007. Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure. *Agricultural Engineering Research* 13 (6), 197-206.

Speckmaier, M., Schlattmann, M., Metzner, T., Gronauer, A., 2005. Bestimmung des Biogasertrages aus Co-Substraten im diskontinuierlichen Durchflussverfahren. *Landtechnik* 60 (6), 340-341.

Sprenger, B., 2007. Biogaserzeugung durch Trockenvergärung von organischen Rückständen, Nebenprodukten und Abfällen aus der Landwirtschaft. Schlussbericht. Lehrstuhl für Verfahrenstechnik und Biotechnologie, Universität Rostock, Rostock.

Sprenger, B., Engler, N., Matzmohr, R., 2006. Laborversuche zur Trockenfermentation - Erste Ergebnisse. Trockenfermentation - Stand der Entwicklungen und weiterer Forschungs- und Entwicklungsbedarf, 04.-05.02.06, Gülzow. Gülzower Fachgespräche, Band 24.

Sprott, G.D., Patel, G.B., 1986. Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 7 (2-3), 358-363.

Steyer, J.P., Rolland, D., Bouvier, J.C., Moletta, R., 1997. Hybrid fuzzy neural network for diagnosis - Application to the anaerobic treatment of wine distillery wastewater in a fluidized bed reactor. *Water Science and Technology* 36 (6-7), 209-217.

Suárez Quinones, T., Plöchl, M., Budde, J., Heiermann, M., 2009. Do hydrolytic enzymes enhance methane fomration of agricultural feedstock? Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Sung, S., Liu, T., 2003. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere* 53 (1), 43-52.

Thornton, A., Pearce, P., Parsons, S.A., 2007. Ammonium removal from digested sludge liquors using ion exchange. *Water Research* 41 (2), 433-439.

Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 50 (1), 50–59.

Vavilin, V.A., Angelidaki, I., 2005. Anaerobic degradation of solid material: Importance of initiation centers for methanogenesis, mixing intensity, and 2D distributed model. *Biotechnology and Bioengineering* 89 (1), 113-122.

Vavilin, V.A., Fernandez, B., Palatsi, J., Flotats, X., 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management* 28 (6), 939-951.

Vavilin, V.A., Lokshina, L.Y., Jokela, J.P.Y., Rintala, J.A., 2004. Modeling solid waste decomposition. *Bioresource Technology* 94 (1), 69-81.

Vavilin, V.A., Rytov, S.V., Lokshina, L.Y., 1996. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technology* 56 (2-3), 229-237.

Viebahn, P., Patyk, A., Fritsche, U., Beer, M., Corradini, R., Ciroth, A., Blesl, M., Mayer-Spohn, O., Macharey, U., Schnettler, A., Smolka, T., Fischer, M., Schuller, O., Größe Böckmann, T., Wagner, H., Mayer, H., 2008. Erstellung der Grundlagen für einen harmonisierten und fortschreibbaren Datensatz des deutschen Strommixes. Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Technikfogenabschätzung und Systemanalyse - Zentralabteilung Technikbedingte Stoffströme, Karlsruhe.

Vogt, R., 2008. Basisdaten zu THG-Bilanzen für Biogasprozessketten und Erstellung neuer THG-Bilanzem. ifeu - Institut für Energie- und Umweltforschung, Heidelberg.

von Sachs, J., Meyer, U., Rys, P., Feitkenhauer, H., 2003. New approach to control the methanogenic reactor of a two-phase anaerobic digestion system. *Water Research* 37 (5), 973-982.

Voß, E., Weichgrebe, D., Rosenwinkel, K.H., 2009. FOS/TAC: Herleitung, Methodik, Anwendung und Aussagekraft. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Weiland, P., 2001. Grundlagen der Methangärung - Biologie und Substrate. VDI-Verlag (3-18-091620-6), Düsseldorf.

Weiland, P., 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (4), 849-860.

Weißbach, F., Strubelt, C., 2008. Die Korrektur des Trockensubstanzgehaltes von Grassilagen als Substrat für Biogasanlagen. *Landtechnik* 63 (4), 210-211.

Wett, B., Eladawy, A., Ogurek, M., 2006. Description of nitrogen incorporation and release in ADM1. *Water Science and Technology* 54 (4), 67-76.

Whitmore, T.N., Lloyd, D., Jones, G., Williams, T.N., 1987. Hydrogen-dependent control of the continuous anaerobic digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 26 (4), 383-388.

Wichern, M., 2010. Mathematische Simulation biochemischer Prozesse in der Siedlungswasserwirtschaft. Oldenbourg Industrieverlag (3835631799), München.

Wichern, M., Gehring, T., Fischer, K., Andrade, D., Lübken, M., Koch, K., Gronauer, A., Horn, H., 2009. Monofermentation of grass silage under mesophilic conditions: Measurements and mathematical modeling with ADM 1. *Bioresource Technology* 100 (4), 1675-1681.

Wichern, M., Lübken, M., Koch, K., Gehring, T., Horn, H., Fischer, K., Schlattmann, M., Gronauer, A., 2008. Eignung des Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM 1) zur Prozesssteuerung landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Messen, Steuern, Regeln bei der Biogaserzeugung, 15.11.07, Hannover. Gülzower Fachgespräche, Band 27.

Winkelmann, J., 2006. Optimierte Silagequalitäten aus unterschiedlichen Maisproduktionen für Tierernährung oder Biogasanlagen. 13. KWS-Seminar, 19./20. Januar 2006, Dresden-Kesselsdorf.

Wittmann, C., Zeng, A.P., Deckwer, W.D., 1995. Growth inhibition by ammonia and use of a pH-controlled feeding strategy for the effective cultivation of Mycobacterium chlorophenolicum. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44 (3), 519-525.

Wu, M.M., Hickey, R.F., 1997. Dynamic model for UASB reactor including reactor hydraulics, reaction, and diffusion. *Journal of Environmental Engineering* 123 (3), 244-252.

Yadvika, Sreekrishnan, T.R., Santosh, S., Kohli, S., 2007. Effect of HRT and Slurry Concentration on Biogas Production in Cattle Dung Based Anaerobic Bioreactors. *Environmental Technology* 28 (4), 433 - 442.

Yu, H.W., Samani, Z., Hanson, A., Smith, G., 2002. Energy recovery from grass using two-phase anaerobic digestion. *Waste Management* 22 (1), 1-5.

Zadeh, L.A., 1965. Fuzzy sets. *Information and Control* 8 (3), 338-353.

Zadeh, L.A., 1973. Outline of a New Approach to the Analysis of Complex Systems and Decision Processes. *IEEE Transactions on Systems Man and Cybernetics* SMC3 (1), 28-44.

Zennaki-Bensouda, Z., Zaid, A., Lamini, H., Aubineau, M., Boulif, M., 1996. Methane fermentation of cattle manure: Effects of hydraulic retention time, temperature and substrate concentration. *Tropicultura* 14 (4), 134-140.

Zielonka, S., Lemmer, A., Oechsner, H., Jungbluth, T., 2007. Zweiphasige Vergärung nachwachsender Rohstoffe. *Landtechnik* 63 (5), 338-339.

Zielonka, S., Lemmer, A., Oechsner, H., Jungbluth, T., 2009. Digestion of grass silage by a two-phase biogas process. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009,

02.12.-04.12.2009, Erding. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Band 17.

Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen

Teilvorhaben 2 (FKZ 220-11-605)

Effizienzsteigerung der NawaRo-Vergärung durch Übertragung der Inokulierung mit LCB-abbauenden Bakterien und von verfahrens- und steuerungstechnischen Optimierungsstrategien in den Technikums- und Praxismaßstab

Abschlussbericht

Schmack Biogas GmbH
Bayernwerk 8
D-92421 Schwandorf
Tel.: 09431/751-139
Fax: 09431/751-5139
Mobil: 15116153418

Auftraggeber:	FachagenturNachwachsende Rohstoffe e.V.
Auftragsdatum:	01.10.2006
Projektleitung:	Dr. Doris Schmack
Bearbeiter:	Dr. Monika Reuter
Berichtsabschluss:	30.06.2010
Berichtsumfang:	26 Seiten

zu Nr. 3.2 BNBest-BMBF 98 für AZA

bzw. zu Nr. 8.2 NKBF 98 für AZK

I. Ziele[1]

1. Aufgabenstellung

- das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen, Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Ziel des Teilprojektes war die Optimierung der Vergärung nachwachsender Rohstoffe.
Im Rahmen des Verbundprojektes IBMN sollten von den Projektpartnern zum Einen im Labormaßstab Inokula mit hydrolysierenden LCB-abbauenden Bakterien entwickelt werden, zum Anderen sollten durch Modellierung und verfahrenstechnische Untersuchungen Optimierungsstrategien für den Betrieb von Biogasanlagen erarbeitet werden.

Aufgabe der Schmack Biogas AG im Rahmen des Verbundes war es, die im Labor- und Versuchsmaßstab erarbeiteten Strategien im Technikums- und Praxismaßstab zu verifizieren und erfolgreiche Optimierungsmaßnahmen direkt in die Praxis zu übertragen.

- Planung und Ablauf des Vorhabens

Tabelle 1: Arbeitspakete und Zeitplan

		2005		2006				2007				2008	
Arbeitspaket	Bezeichnung	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2
AP 1-1	Monitoring Praxisanlagen		M1										
AP 3-2	Effizienzsteigerung durch Optimierung der Verfahrenstechnik und Prozesssteuerung		M2					M3			M4	M5	
AP 4-1	Validierung an Praxisanlagen und Regelwerk												

[1] Kurze Darstellung

2. Stand der Technik

- wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden

Bei Inbetriebnahme einer Biogasanlage ist die Inokulation mit Impfschlamm aus einer bereits bestehenden Biogasanlage der Stand der Technik. Eine gezielte Anpassung der Bakterienpopulation auf Prozessbesonderheiten, z.B. hohe Anteile von LCB-Biomasse, ist momentan nicht möglich.

Eine Modellierung des Biogasprozesses und damit frühzeitige Eingriffsmöglichkeiten bei zu erwartenden Störungen sind derzeit nicht Stand der Technik.

3. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

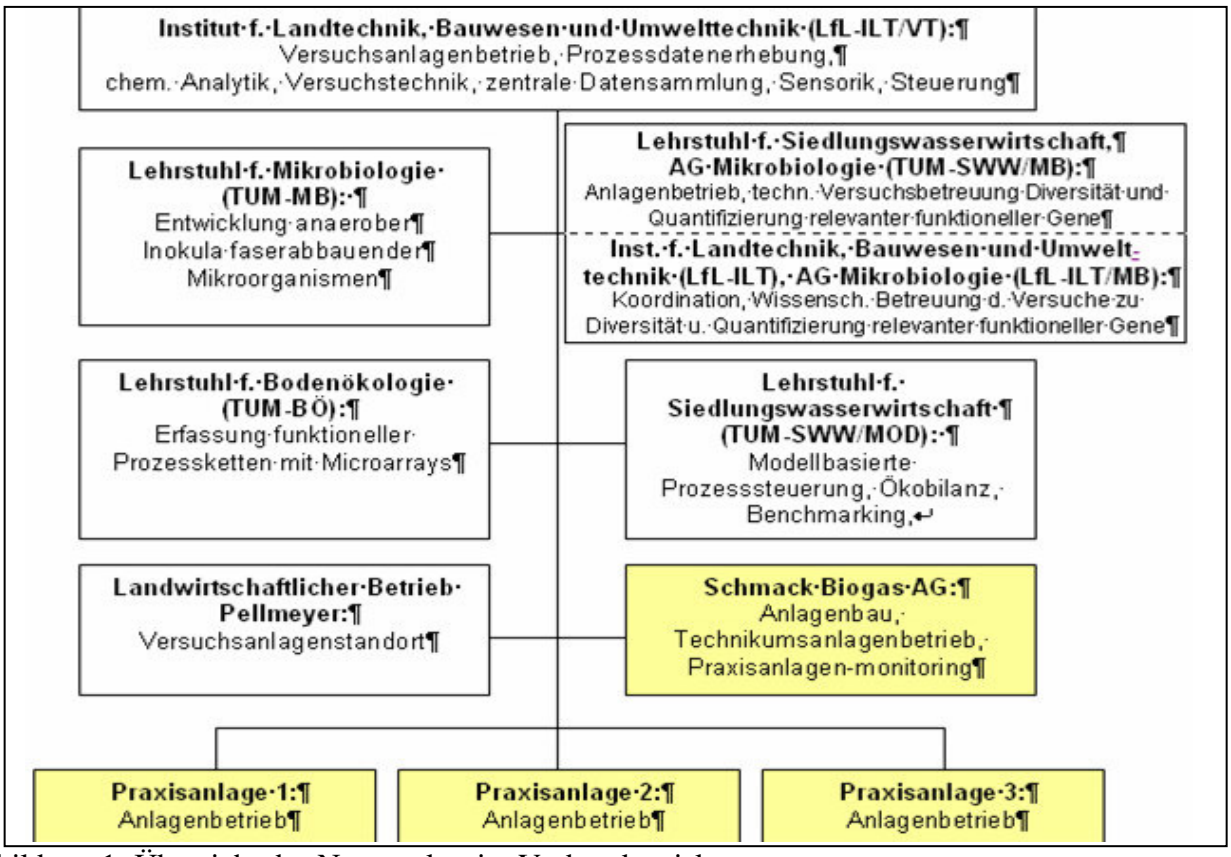


Abbildung 1: Übersicht des Netzwerkes im Verbundprojekt

II. Ergebnisse[2]

1. Erzielte Ergebnisse

- das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens

Aufbau Großtechnikum (1m³ und 25m³ Fermenter)

Die Genehmigung zu Aufstellung und Betrieb des 25m³-Fermenters wurde erteilt, der Fermenter wurde aufgestellt und sowohl elektrisch als auch steuerungstechnisch angeschlossen. Im mesophilen Temperaturbereich, bei 40°C wurde der Fermenter als Mais-Mono-Anlage angefahren (siehe Abbildung 2) und stand bereit für Inokulationsversuche.

Abbildung 2: Abgedichteter 25m³-Reaktor nach neuer Isolierung

Der 1m³-Fermenter wurde mit einer entsprechenden Fütterungseinheit zur Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen ausgestattet sowie elektrisch und steuerungstechnisch angeschlossen. Der Reaktor war betriebsbereit, wurde aber aufgrund fehlender Inokula-Lieferungen von den Projektpartnern nicht in Betrieb genommen (siehe Abbildung 3).

[2] Eingehende Darstellung

Abbildung 3: betriebsbereiter 1m³-Fermenter

Inbetriebnahme 25m³-Fermenter

Die Anlage wurde mit Material aus dem Nachgärer einer NawaRo-Anlage befüllt und im mesophilen Temperaturbereich, bei 40°C als Mais-Mono-Anlage angefahren

Monitoring der Monofermentation mit Maissilage im Großtechnikum

Während der ersten 40 Tage produzierte die Anlage unverhältnismäßig wenig Gas. Eine Dichtigkeitsprüfung ergab, dass sich im Gasraum etliche korrodierte Stellen befanden. Die Anlage wurde daraufhin neu abgedichtet. Anschließend wurde die Anlage mit einer Raumbelastung von 3,5 kg oTS/m³*d angefahren. Der Gasertrag stimmte in der Beobachtungszeit gut mit dem theoretischen Gasertrag überein. Ab Tag 100 wurde die Raumbelastung weiter gesteigert.

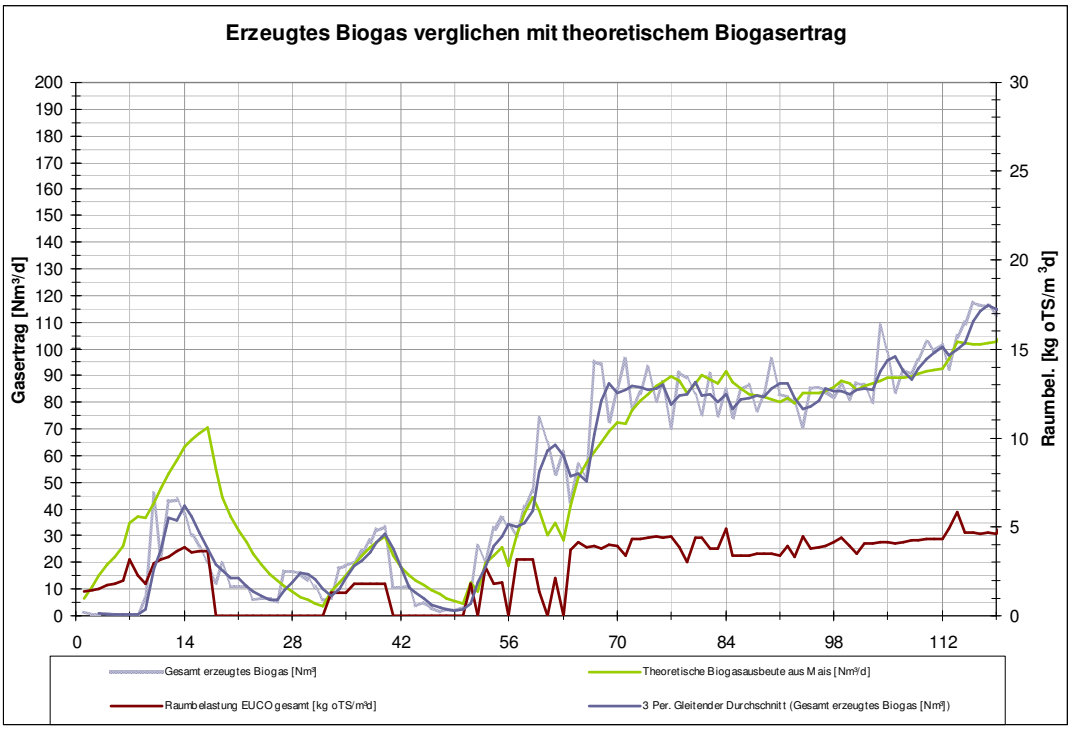


Abbildung 4: Diagramm zur Fermentation von Maissilage im großtechnischen Maßstab. Dargestellt sind dabei die Raumbelastung in kg oTS/m³*d (magenta), der tatsächliche und der theoretische Biogasertrag (blau und grüne Linie).

Das Ausgangsmaterial war sehr dünnflüssig und hatte nur einen Trockensubstanzanteil (TS) von etwa 4%. Während der Beobachtungszeit stieg der TS-Wert im Auslauf weiter an. Während der Phase mit der gleichbleibenden Raumbelastung bei 3,5 kg oTS/m³*d zeigte sich schon eine Stabilisierung bei etwa 6,5 %. Bei der weiteren Steigerung stieg auch die TS entsprechend mit an. Werte von 8,5% wurden im Auslauf ermittelt Der Carbonsäureverlauf und der pH-Wert waren im Beobachtungszeitraum wenig schwankend. Der pH-Wert bewegte sich im Bereich von 7,5 bis 7,75. Die Fettsäuren stiegen im Auslauf auf maximal 250 mg/l Originalsubstanz.

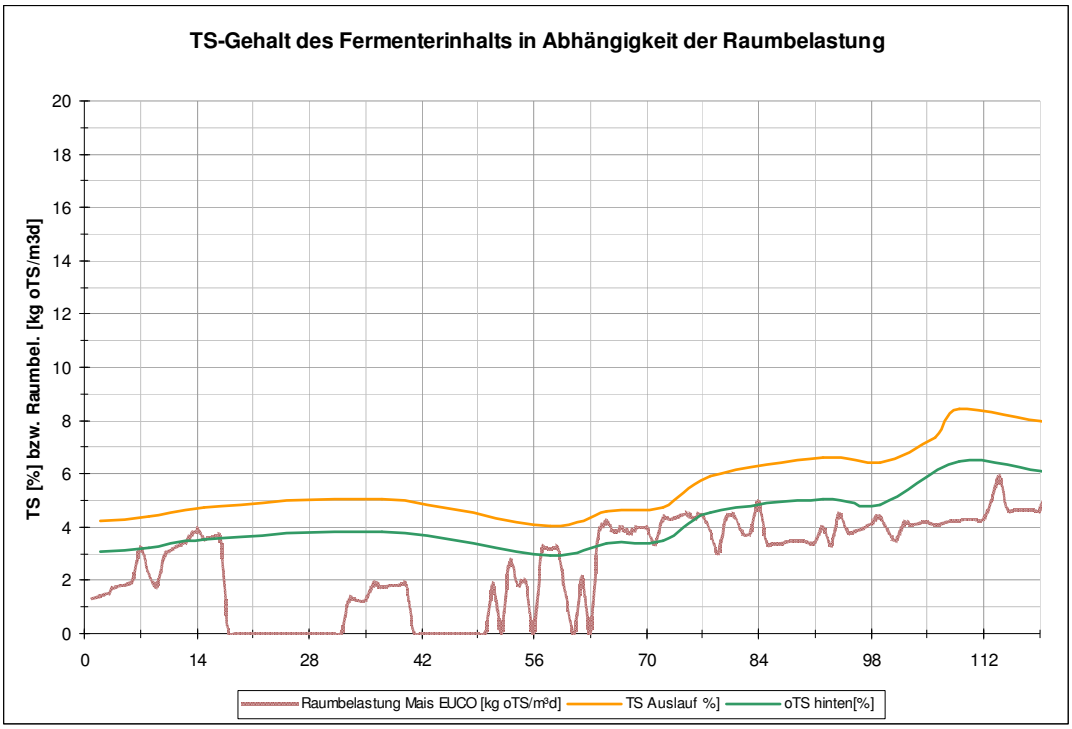


Abbildung 5: Diagramm zur Fermentation von Maissilage im großtechnischen Maßstab. Dargestellt ist die Entwicklung der Trockensubstanz, der organischen Trockensubstanz im Zusammenhang mit der Raumbelastung

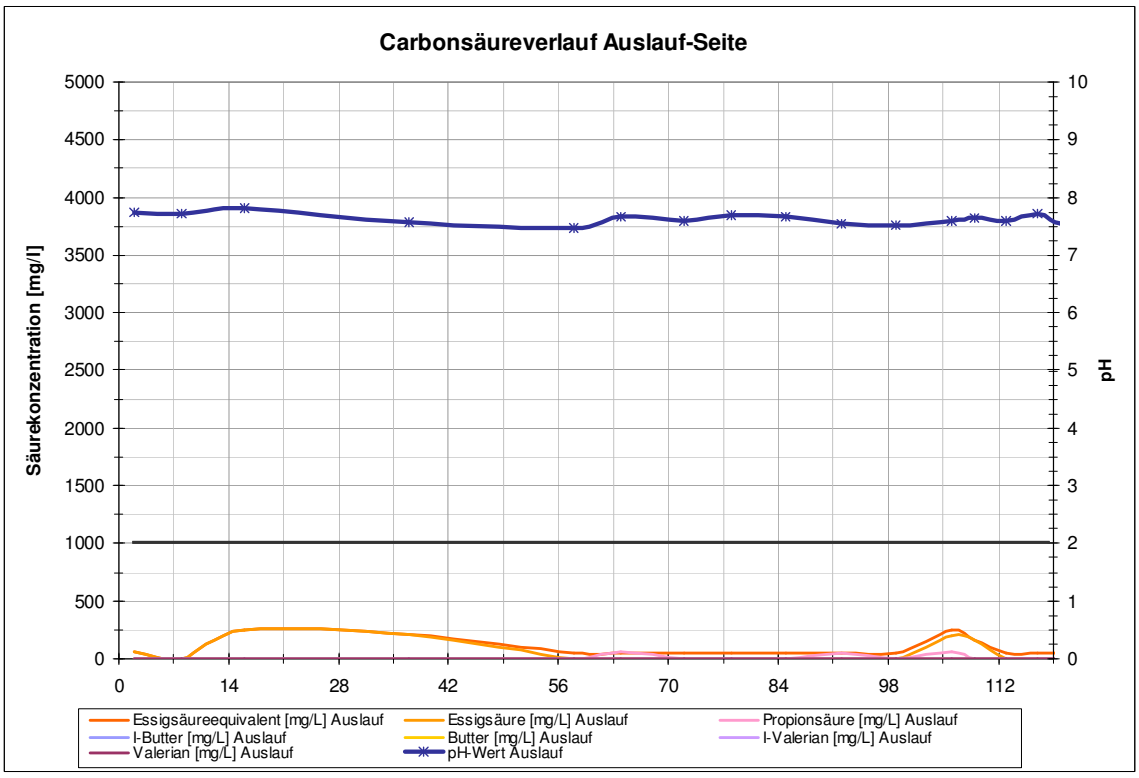


Abbildung 6: Diagramm zur Fermentation von Maissilage im großtechnischen Maßstab. Dargestellt sind pH-Wert, die Essigsäureequivalente, die Essigsäure und weitere längerkettige Säuren.

Im Gas konnte ab den Zeitpunkt der Gasdichtigkeit kontinuierlich ein Methangehalt von 53% gemessen werden. Der Wasserstoff- und der Schwefelwasserstoff-Anteil zeigten sinkende Tendenzen und Sauerstoff konnte nicht im Gas nachgewiesen werden.

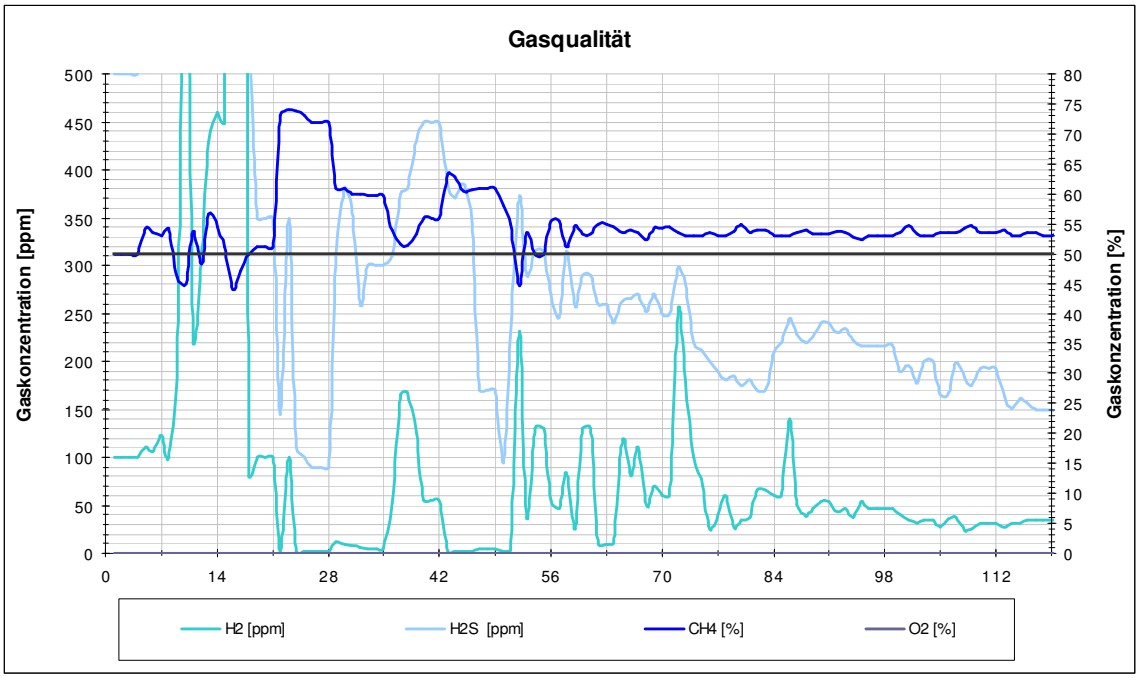


Abbildung 7: Diagramm zur Fermentation von Maissilage im großtechnischen Maßstab. Dargestellt ist die Gaszusammensetzung mit CH4-Anteil, O2-Anteil, H2-Anteil und H2S-Anteil.

Die spezifische Gasausbeute bewegte sich im Beobachtungszeitraum, bei gleichbleibender Raumbelastung von 3,5 kg oTS/m³*d zwischen 750 und 790 NL/kg oTS. Die Raum-Zeitausbeute blieb währende der stabilen Phase bei etwa 2,75 l/l Fermentervolumen. Während der Steigerungsphase stieg die Raumzeitausbeute kontinuierlich mit an auf bis zu 3,75 l/l Fermentervolumen.

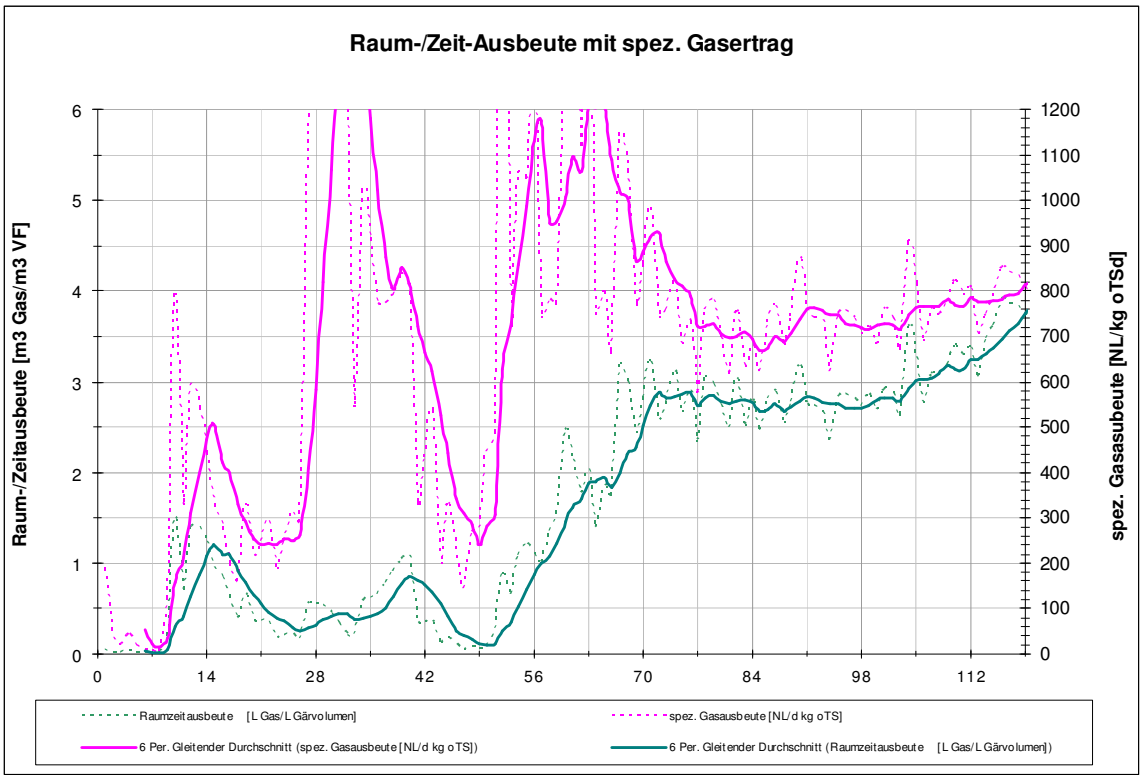


Abbildung 8: Diagramm zur Fermentation von Maissilage im großtechnischen Maßstab. Dargestellt ist die spezifische Gasausbeute und die Raum-Zeit-Ausbeute

Aufgrund fehlender Inokula wurde der Versuch an dieser Stelle abgebrochen und die Arbeiten auch nach Laufzeitverlängerung eingestellt.

Monofermentation und Kofermentation im Technikumsmaßstab

Wie im 1. Zwischenbericht angesprochen, wurde aufgrund genehmigungsrechtlicher Erfordernisse, die eine weitere Verzögerung verursacht hätten, die Untersuchung der Monofermentationen an den bereits bestehenden Technikumsfermentern mit 150l- und 240l-Fermentern durchgeführt.

Damit die gemäß Zeitplan durchzuführenden Technikumsversuche trotz der genehmigungstechnischen Verzögerung fristgerecht durchgeführt werden konnten, wurde das Monitoring der Maismonofermentation sowohl im mesophilen als auch im thermophilen Temperaturbereich in den bereits bestehenden 400l Technikumsanlagen durchgeführt. Zur Absicherung der Ergebnisse, die als Ausgangspunkt für die zu entwickelnden Optimierungs-strategien dienen, wurden die Systeme einstufig und zweistufig redundant gefahren, d.h. zwei zweifermentrige 400l Technikumsanlagen (EUCO+Coccus) mesophil und zwei thermophil sowie zwei einfermentrige 150l Anlagen (EUCO Mono) mesophil.

Abbildung 9: Technikumsanlagen

Monitoring von Monofermentation im Technikumsmaßstab

Maismonofermentation
Die Ergebnisse der redundanten Maismonovergärungsversuche im Technikum weisen eine sehr geringe Abweichung auf (im Mesophilen <2%, im Thermophilen <4%). Die erzielten Gaserträge liegen jedoch deutlich über den in der Praxis erreichten.
Es wurden verschiedene Reaktoren zur Mono-Vergärung von Maissilage verwendet. Dabei wurden sowohl einstufige, als auch zweistufige Fermentersysteme im mesophilen und thermophilen Betrieb untersucht. Die dabei ermittelten Gaserträge lagen deutlich über den Gaserträgen aus Praxisanlagen. Als mögliche Fehlerquellen wurden zum Einen die Ritter-Trommelgaszähler und zum Anderen die Genauigkeit der Waage identifiziert. Die Ritter-Trommelgaszähler wurden mit Hilfe einer haushaltsüblichen G4-Gasuhr überprüft. Dabei stellte sich ein erhöhter Fehler bei den Rittergasuhren von durchschnittlich 7% zu dem vom Gerätehersteller angegeben Fehlerwert von 0,2%, heraus. Zusätzlich dazu wurde vom Waagenhersteller ein Fehler von +/- 20 g angegeben. Bei den eingesetzten Füttermengen machte diese Abweichung einen Fehler von bis zu 3% aus. Für die weiteren Untersuchungen wurde zur Bereitstellung der Futtermenge eine genauere Waage mit einer Abweichung von +/- 0,1 g eingesetzt. Die modifizierten Gaserträge wurden in Tabelle 2 eingetragen.

Interessant ist, dass der erzielte spezifische Gasertrag im untersuchten Bereich (1 bis 8 kgoTS/m³*d) unabhängig von der Raumbelastung ist. Eine Abnahme des Abbaugrades und damit ein Sinken der Gasausbeute konnte entgegen der gängigen Expertenmeinung nicht beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit und der sehr geringen Abweichung der Einzelergebnisse untereinander in jedem Fall qualitativ belastbar.
Folgende Tabelle und die Abbildungen geben die in den Langzeitversuchen erzielten Gaserträge und Methangehalte bei Maismonofermentation wieder.

Die Gaserträge aus den parallel durchgeführten Maismono-Vergärungsversuchen liegen, trotz Korrekturfaktor, über den erzielten Gaserträgen in der Praxis, was möglicherweise an der guten Durchmischung im Kleinmaßstab liegen könnte. Anders als bei Praxisanlagen, welche

zum Teil Probleme mit Sink- und Schwimmschichten aufweisen können, ist das Material in den Kleinreaktoren vollständig durchmischt.

Tabelle 2: Monitoring Maismonofermentation mesophil und thermophil im Technikumsmaßstab (Die Gaserträge liegen trotz Korrektur der Fehler der Gasuhr und der Waage über den in der Praxis erzielten).

Temperaturbereich	Bezeichnung Technikums-Fermenter	Versuchsdatum In 2007	Spezifischer Gasertrag ø [Nl_{Biogas}/m^3*d] nach Korrektur um 10%	CH_4-Gehalt Ø [%]	Raumbelastung [kg_{oTS}/m^3*d
Mesophil	E3C8	3.4. - 14.10.	696	53,9	1 – 5
zweifermentrig	E4C7	3.4. – 5.11.	703	52,2	1 – 3
Mesophil	EVA	1.6. – 19.8.	698	53,6	5 - 8
einfermentrig	E2	1.6. – 4.11.	685	53,6	5 - 8
Thermophil	E1C6	19.9. – 5.11.	795	53,6	3,2
Zweifermentrig	E5C10	19.9- - 5.11.	821	53,1	3,2

Abbildung 10: Monitoring Maismonofermentation mesophil im Technikumsmaßstab (zweifermentrig)

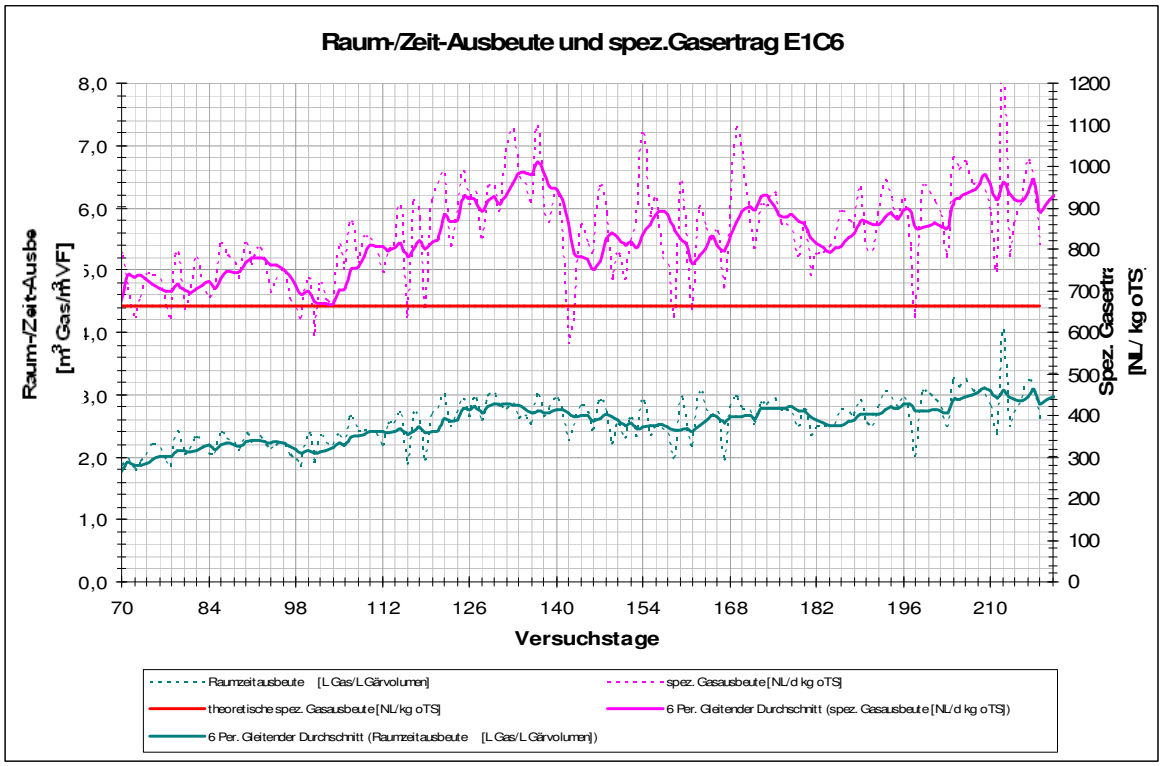


Abbildung 10: Monitoring Maismonofermentation mesophil im Technikumsmaßstab (zweifermentrig)

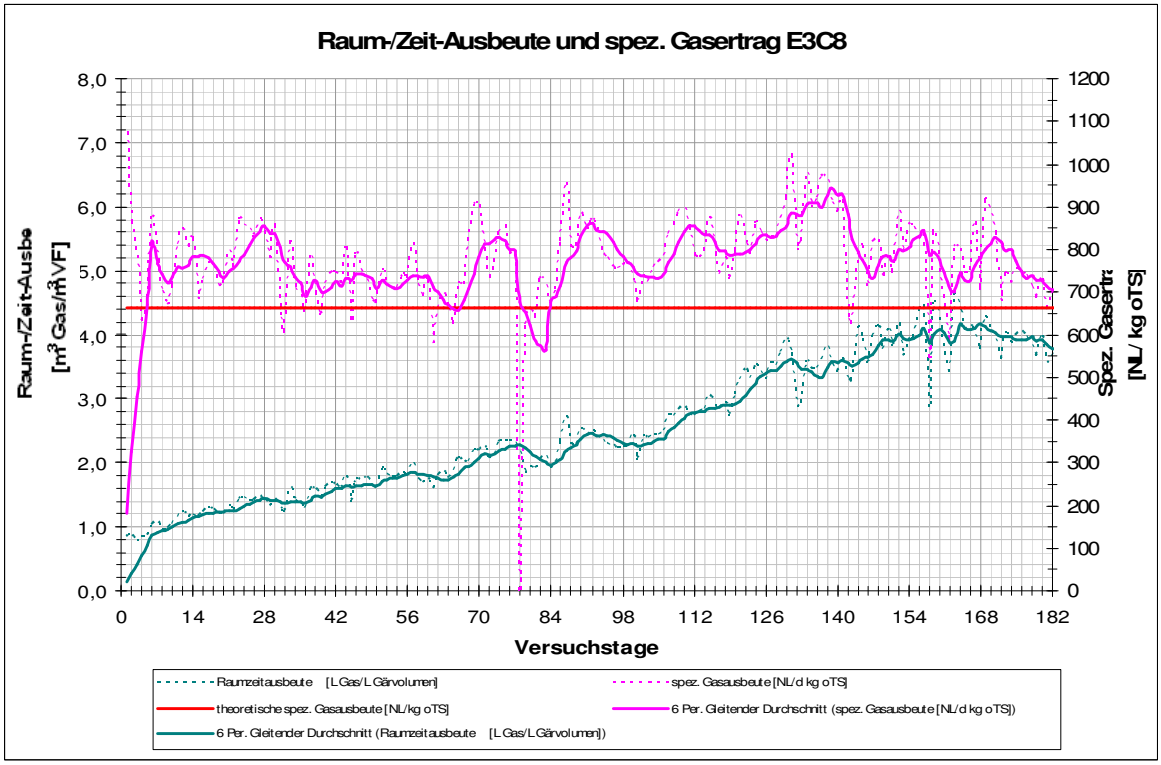


Abbildung 12: Monitoring Maismonofermentation thermophil im Technikumsmaßstab (einfermentrig)

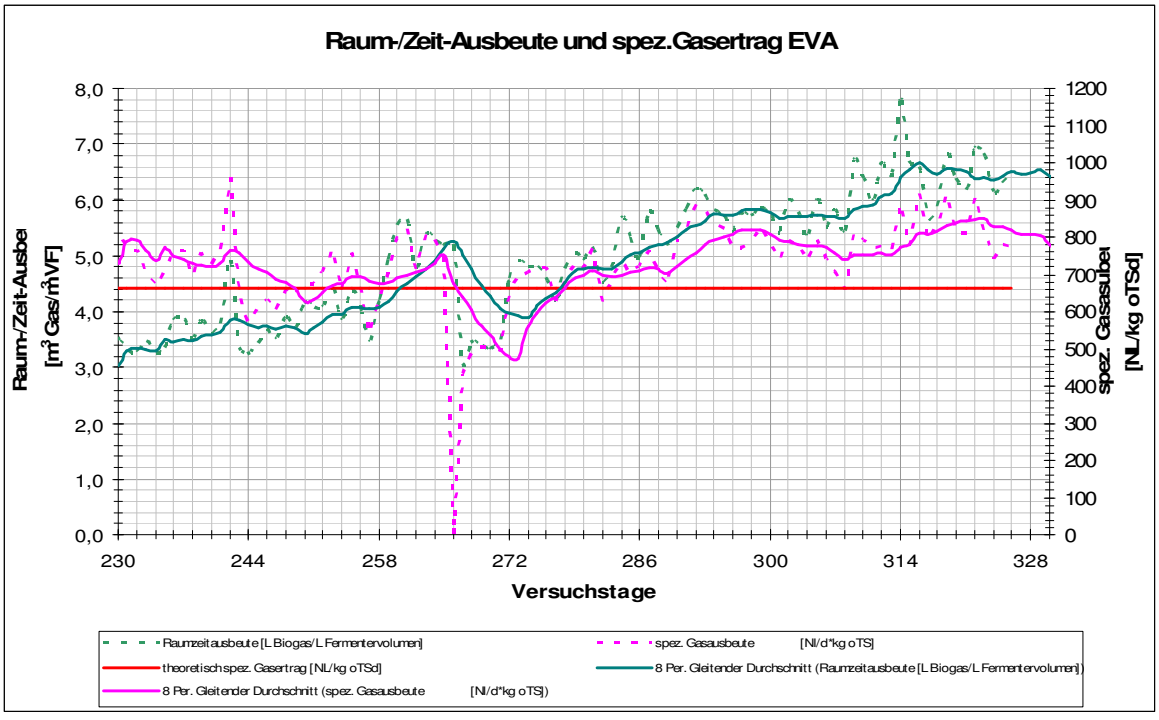


Abbildung 12: Monitoring Maismonofermentation mesophil im Technikumsmaßstab (einfermentrig)

Monitoring von Monofermentation im Praxismaßstab

Monofermentation hat sich in der Praxis nicht durchgesetzt. Nachdem auch der Anbau von Monokulturen nicht nachhaltig ist, werden normalerweise gemischte Energiepflanzen eingesetzt. Wenn vorhanden, wird oft auch Festmist eingesetzt. Trotzdem ist es zur Bestimmung der Baseline wichtig, Biogasanlagen in Monofermentationsphasen zu monitoren. Bei einer österreichischen Biogasanlage mit einer installierten Leistung von 500kWel wurde die Maismonofermentation im mesophilen Bereich über einen Zeitraum von 29 Tagen ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Leider ist die exakte Gasmengenbestimmung auf Praxisanlagen immer noch problematisch, deshalb wurde als Kennzahl die erzeugte Strommenge gewählt. Bei einem BHKW Wirkungsgrad von 37% und einem Methangehalt von 53% entsprechen die gemessenen 1326 kWh/toTS*d einer spezifischen Biogasproduktion von 676 m³Biogas/toTS*d.

Tabelle 3: Monitoring Maismonofermentation mesophil im Praxismaßstab

Erreichte Werte Maismonofermentation Praxis		
Durchschnitt Einspeisung [kWh/d]	11521	kWh/d
Auslastung [%]	96,01	%
Durchschnittliche Fütterungsmenge (oTS)	8686	kg oTS / d
	3171	t otS / a
durchschnittlicher TS	39	%
durchschnittlicher oTS	37	%
Spezifische Ausbeute ([kWh/ t oTS)	1326	kWh / t oTS

Des Weiteren wurde eine Anlage untersucht, die in geringem Umfang Hühnermist cofermentiert. Bei der Anlage mit 500 kWel Leistung wurden 88% der TS aus Mais zugeführt (ø/d 20,3t Maissilage, 2,3t CCM, 2,0t Hühnermist). Die Auslastung der Anlage im Versuchszeitraum lag bei 99,8%. Die spezifische Gasausbeute der Anlage lag bei 1650 kWh/t TS, der mittlere Methangehalt bei 50,4%.
Laut Zuwendungsbescheid ist in das Monitoring auch eine nicht von der Schmack Biogas AG errichtete Anlage mit einzubeziehen. Leider wurde keine gefunden, die zumindest zeitweise als Monofermentation betrieben wurde. Deshalb wurde eine Anlage ausgewertet, die im Zeitraum vom 27.03. – 27.05.2007 mit >75% der zugeführten TS aus Maissilage betrieben wurde (ø/d 10m³ Rindergülle, 15,9t Maissilage, 0,5t Getreideschrot). Die Anlage hat eine installierte Leistung von 250 kWel, die durchschnittliche Auslastung im Versuchszeitraum war 82%. Die spezifische Gasausbeute der Anlage lag bei 1448 kWh/toTS, der mittlere Methangehalt bei 51,5%.

Im thermophilen Praxisbetrieb wurde bei einer Anlage mit 1MW installierter elektrischer Leistung ein durchschnittlicher spezifischer Stromertrag von 1548 kWh/toTS*d erzielt. Die zugeführte TS war zu >60% aus Maissilage, der Rest aus Kleie. Das heißt, dass in der Praxis der Gasmehrertrag, der im thermophilen Technikumsbetrieb gegenüber dem mesophilen Technikumsbetrieb erzielt wird, nicht in dieser Höhe verifiziert werden kann. Zudem war die Anlage relativ unbeständig in Gärverhalten und Auslastung.

Grasmonofermentation

Zur Vorbereitung für die Grasmonofermentation wurden ebenfalls Versuche im Technikumsmaßstab durchgeführt. Dabei wurde ermittelt, welchen Anteil ein Kosubstrat maximal haben darf, welche Gräser als Kosubstrate geeignet sind und ob eine Grasmonofermentation überhaupt durchführbar ist.

1) Weizen-/Triticalesilage als Kosubstrat, mesophil

Vorversuch:

Für die Versuche wurde vor allem Weizenganzpflanzensilage und Triticaleganzpflanzensilage verwendet. Mit Weizen wird eine Reihe von Arten der Süßgräser (Poaceae) der Gattung *Triticum L.* bezeichnet (Quelle: Wikipedia). Triticale (Triticosecale) ist ein Getreide. Es ist eine Kreuzung aus Weizen (*Triticum aestivum L.*) als weiblichem und Roggen (*Secale cereale L.*) als männlichem Partner. Der Name ist aus TRITIcum und seCALE zusammengesetzt (Quelle: Wikipedia). Auch Triticale gehört zu den Süßgräsern. Als Ganzpflanzensilagen (GPS) werden Silagen von beiden oben genannten Süßgräsern bezeichnet, da bei der Ernte alle Teile der Pflanze mit verwertet werden.
In einem Vorversuch wurde ein Reaktor von reiner Maismonovergärung auf 20% GPS (Weizen/Triticale) umgestellt. Es zeigten sich eine signifikante pH-Senkung bereits am ersten Tag nach Umstellung um 0,15, sowie ein Propionsäure-Anstieg. Der Reaktor wurde daraufhin zur Regeneration der Reaktorbiologie wieder auf Maismono-Fermentation umgestellt (Abbildung 13).

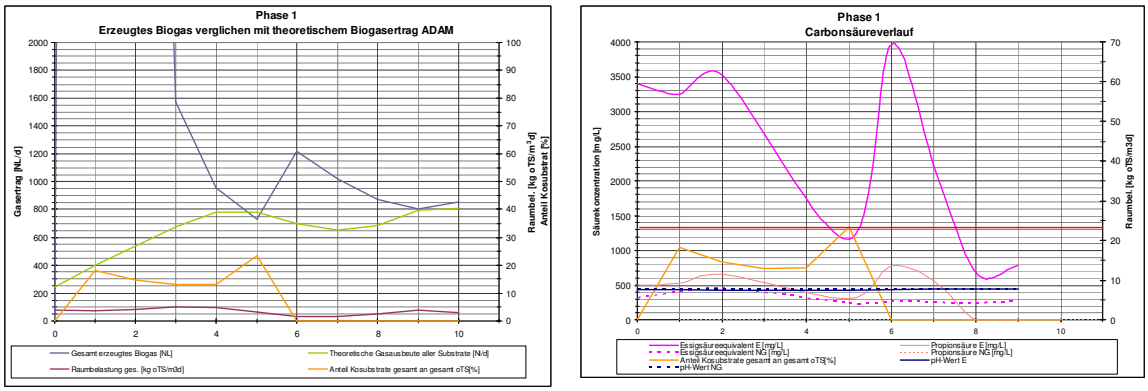


Abbildung 13: Diagramm zur schlagartigen Umstellung einer Maismono-Vergärung auf 20% GPS bei gleichbleibender Raumbelastung und weitgehend stabilem Gasertrag (links). Rechts im Diagramm ist der schlagartige Propionsäureanstieg zu erkennen

Hauptversuch:

Aufgrund des Vorversuchs wurde von einer schnellen Umstellung auf einen GPS-Anteil im zweistelligen Prozentbereich Abstand genommen.
Es wurde ein zweistufiger Reaktor, ausgehend von einem GPS-Anteil von anfangs 10%, innerhalb von 76 Tagen auf einen Anteil von 60% der gesamten zugeführten organischen Trockensubstanz bei gleichbleibender Raumbelastung von 4 kg oTS/m³*d auf erhöhte Anteile GPS umgestellt. Nach 76 Tagen wurde der Versuch beendet. Der Versuch wurde bei 40°C durchgeführt. Durchschnittlich wurde bis zu einem GPS-Anteil von 30% eine Gasausbeute von 642 NL/kg oTS ermittelt. Bei einem höheren Anteil GPS von bis zu 60% nahm im Verlauf des Versuchs der Gasertrag bis auf durchschnittlich 576 NL/kg oTS ab, was jedoch

aufgrund des niedrigeren spezifischen Gasertrages von GPS zu erwarten war (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15).

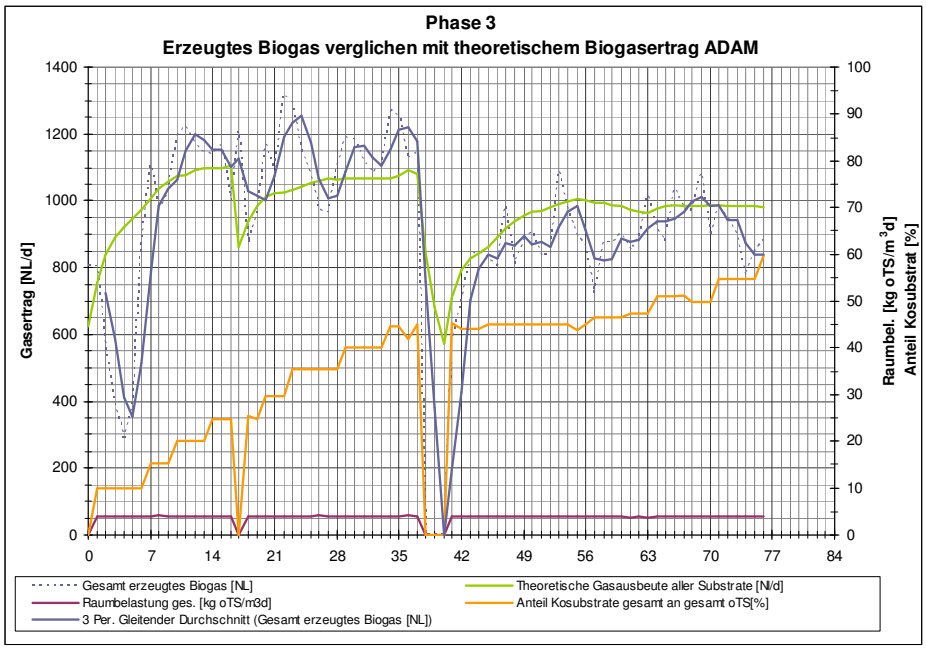


Abbildung 14: Diagramm zur moderaten Umstellung einer Maismono-Vergärung auf bis zu 60% GPS (orange Linie) bezogen auf die Gesamt-oTS bei gleichbleibender Raumbelastung (magenta). Der Gasertrag sank im Versuchsverlauf aufgrund geringerer Gasausbeuten beim GPS (grün theoretisch, blau tatsächlich). Die beiden Einbrüche in der Raumbelastung hatten ein technisches Problem als Ursache.

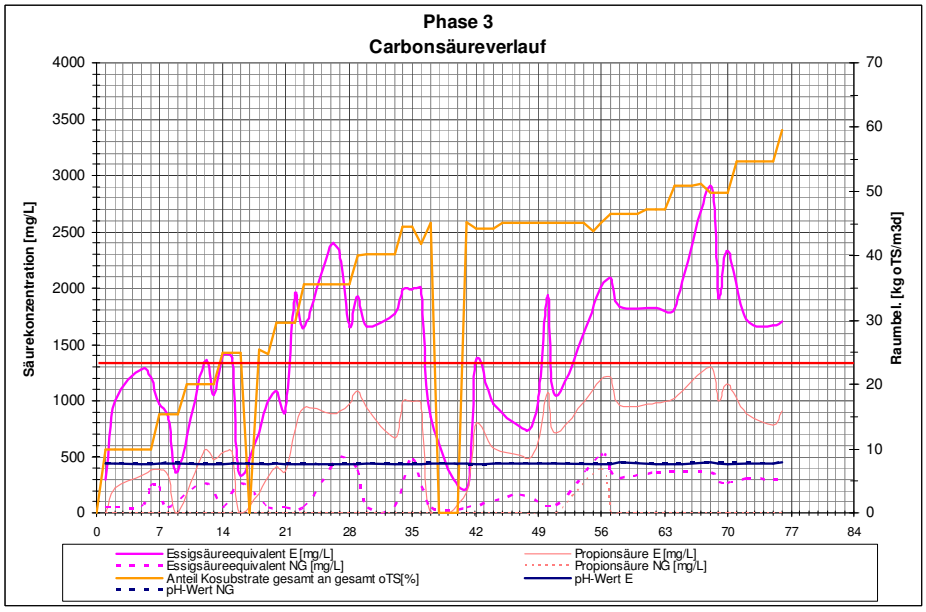


Abbildung 15: Diagramm zur moderaten Umstellung einer Maismono-Vergärung auf bis zu 60% GPS (orange Linie) bezogen auf die Gesamt-oTS bei gleichbleibender Raumbelastung. Dargestellt sind die Essigsäureequivalente, die Essigsäure und die Propionsäure jeweils in Euco und Nachgärer

Über den Versuchszeitraum schwankten die Säuren im niedrig konzentrierten Bereich (<3000 mg Essigsäureäquivalent). Das Essigsäureäquivalent war vor allem im Nachgärer auf einem sehr niedrigen Niveau, störende Propionsäure konnte dort kaum nachgewiesen werden. Auch der Verlauf der Trockensubstanz zeigte keine auffälligen Entwicklungen.
Der Gärverlauf war daher auch bei den erhöhten GPS-Anteilen stabil und es ließ sich feststellen, dass GPS als Anteil des Futters keine Probleme mit sich bringt. Mit bis zu 60% Anteil GPS konnte ein biologisch stabiler Betrieb im Technikumsfermenter durchgeführt werden.

2) GPS und Wiesengrassilage als Kosubstrat

In einem weiteren Versuch wurde in einem Euco-Mono eine Fermentation mit steigendem Anteil Wiesengrassilage und Ganzpflanzensilage zu Maissilage untersucht. Dazu wurde der Fermenter zunächst mit einer Mischung aus etwa 40% Maissilage, 40% Wiesengrassilage und 20% GPS mit einer Raumbelastung von etwa 1kg oTS/m³*d angefahren (siehe Abbildung 15). Über etwa 84 Tage wurde diese Mischung konstant beibehalten, die Raumbelastung wurde auf bis zu 3kg oTS/m³*d gesteigert. Es zeigte sich, dass das System anfangs geringe Säuremengen von bis zu maximal 1000 mg/l Essigsäure-äquivalent generierte. Das System pendelte sich danach ein, was an den sinkenden Fettsäuren (Abbildung 16) und an der stabilen Biogasausbeute (Abbildung 15) im Vergleich zur theoretisch erwarteten Biogasausbeute zu sehen war. Die Mischung von 40% Maissilage, 40% Wiesengrassilage und 20% GPS konnte bei einer Raumbelastung von 3 kg oTS/m³*d stabil vergärt werden. Bei der Entwicklung der Trockensubstanz zeigte sich in diesem Zeitraum anfangs ein starker Anstieg, die Trockensubstanz und auch die organische Trockensubstanz stabilisierten sich etwa ab Tag 72.

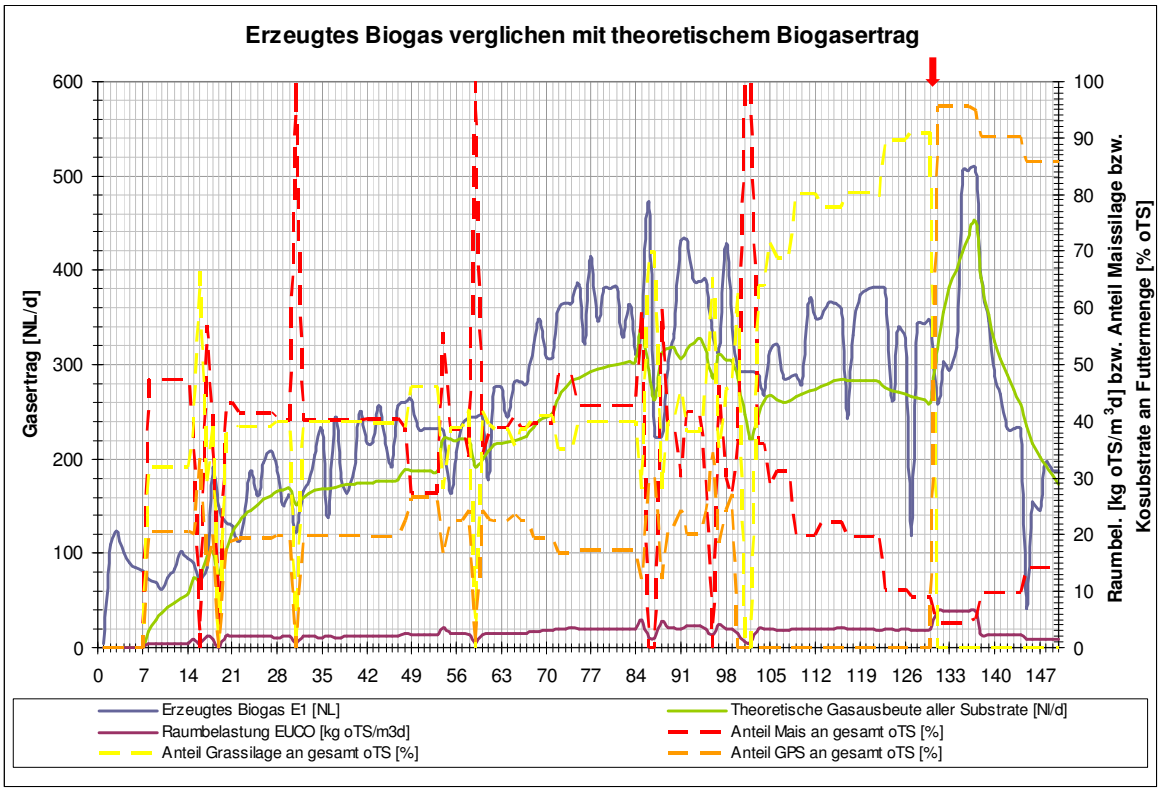


Abbildung 15: Diagramm zur Fermentation eines Maissilage/Wiesengrassilage/GPS-Gemisches mit verschiedenen Zusammensetzungen. Dargestellt sind dabei die Raumbelastung in kg oTS/m³*d (magenta), der tatsächliche und der

theoretische Biogasertrag (blau und grüne Linie), und die entsprechenden Anteile von Maissilage (rot gestrichelt), Wiesengrassilage (gelb gestrichelt) und GPS (orange gestrichelt)

Ab Tag 100 wurde die GPS bei der Fütterung weggelassen und über die folgenden 31 Tage wurde der Anteil an Wiesengras auf einen Anteil von bis zu 90% an der Gesamt-oTS bei gleichbleibender Raumbelastung stetig gesteigert. Die Konzentrationen der flüchtigen Fettsäuren blieb in einem niedrigen Bereich von unter 500 mg/l Essigsäureäquivalent. Bei dieser Betriebsweise, d.h. bei bis zu 90% Wiesengrassilage-Anteil konnte ein weiterer Anstieg in Trocksubstanz und organischer Trockensubstanz festgestellt werden (Abbildung 17).

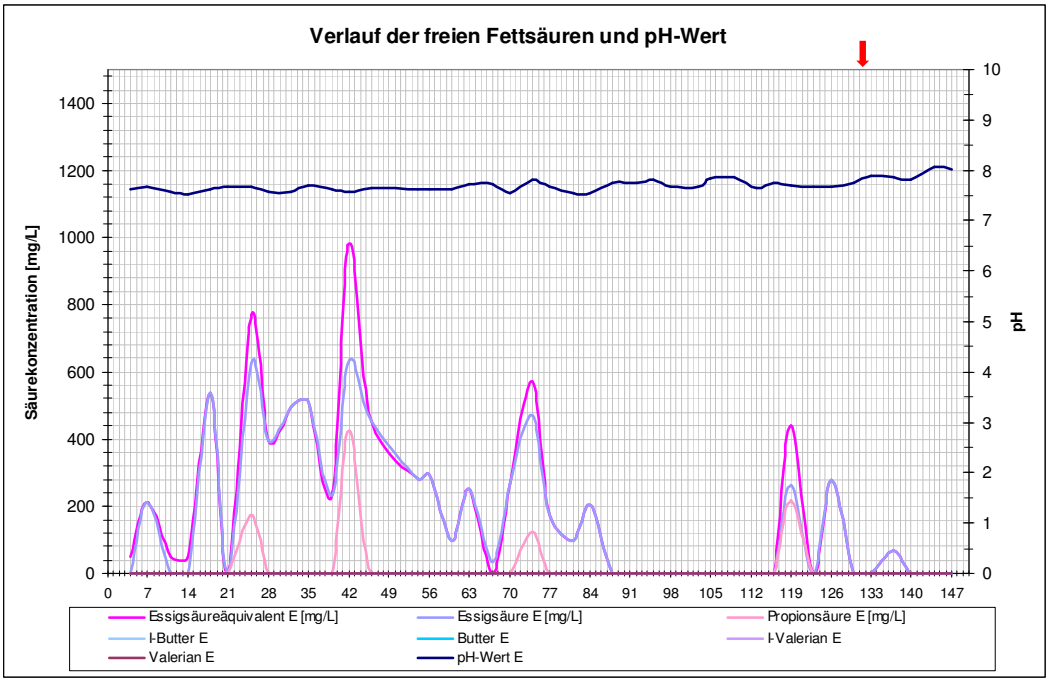


Abbildung 16: Diagramm zur Fermentation eines Maissilage/Grassilage/GPS-Gemisches mit verschiedenen Zusammensetzungen. Dargestellt sind pH-Wert, die Essigsäureequivalente, die Essigsäure und weitere längerkettige Säuren

Ab Tag 131 wurde schlagartig von Grassilage auf GPS mit einem Anteil von bis zu 99% umgestellt. Auch diese Belastung wurde vom System gut verarbeitet. Es konnte kein Anstieg in den Säuren beobachtet werden. Die TS und die oTS stiegen allerdings rapide an, weshalb dann am Tag 138 die Raumbelastung deutlich zurückgenommen werden musste, um einen Absturz zu verhindern. Die Auffälligkeit beim Einsatz von nahezu 100% GPS war, dass sich der pH-Wert langsam ins alkalischere Milieu über pH 8 verschob. Der Versuch musste dann aufgrund technischer Probleme mit der Zudosierungseinheit und wegen Undichtigkeiten am Fermenter eingestellt werden.

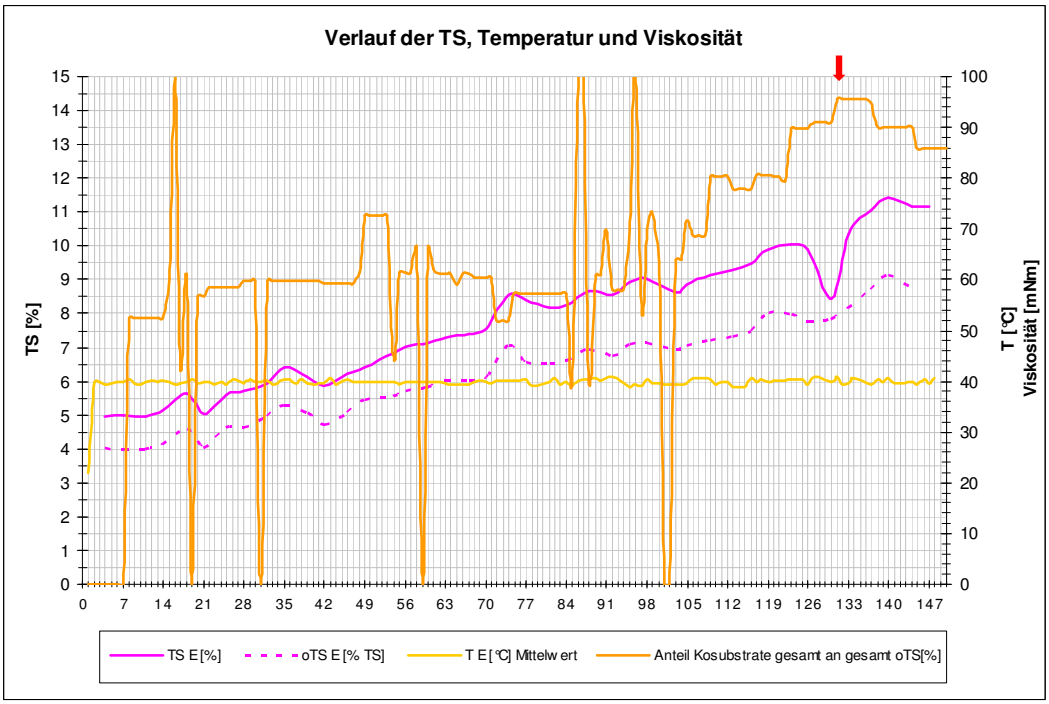


Abbildung 17: Diagramm zur Fermentation eines Maissilage/Grassilage/GPS-Gemisches mit verschiedenen Zusammensetzungen. Dargestellt sind die Entwicklung der Trockensubstanz, der organischen Trockensubstanz der Temperatur und der Anteile der Kosubstrate Grassilage und GPS neben Maissilage

3) Maissilage-Weidelgrassilage-Ko-Vergärung

In einem Parallelversuch wurde Maissilage und Weidelgrassilage in einem Verhältnis von 60 zu 40 bei einer Raumbelastung von anfangs 1,5 kg oTS/m³*d und bei 3,5 kg oTS/m³*d betrieben. Als zu erwartender Gasertrag wurde beim Weidelgras ein Gasertrag von 490 NL/kg oTS angenommen. In beiden Gärprozessen stimmte diese Annahme gut mit den tatsächlichen Gaserträgen überein (siehe Abbildung 18).

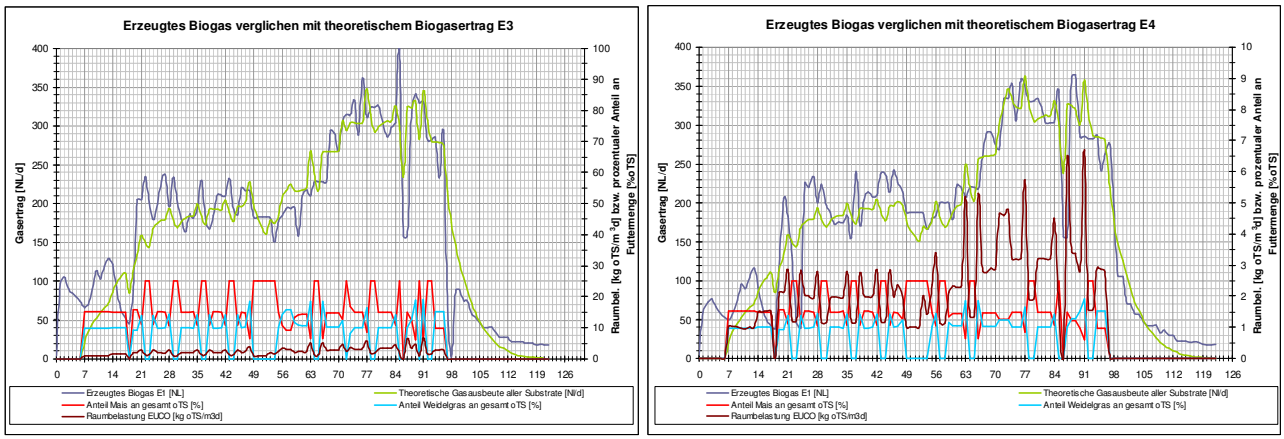


Abbildung 18: Diagramm zur Fermentation eines Maissilage/Weidelgrassilage-Gemisches in zwei verschiedenen Fermentern. Dargestellt sind dabei die Raumbelastung in kg oTS/m³*d (magenta), der tatsächliche und der theoretische Biogasertrag (blau und grüne Linie), und die entsprechenden Anteile von Maissilage (rot), Weidelgrassilage (hellblau)

Das Weidelgras machte erhebliche Probleme bei der Zudosierung. Aufgrund eines TS-Gehaltes von unter 20% konnte die Fütterung nicht über die Stopfschnecke kontinuierlich erfolgen, sondern musste über den Überlauf einmal täglich per Hand zudosiert werden. Daraus ergaben sich Spitzen in der Gasausbeute.

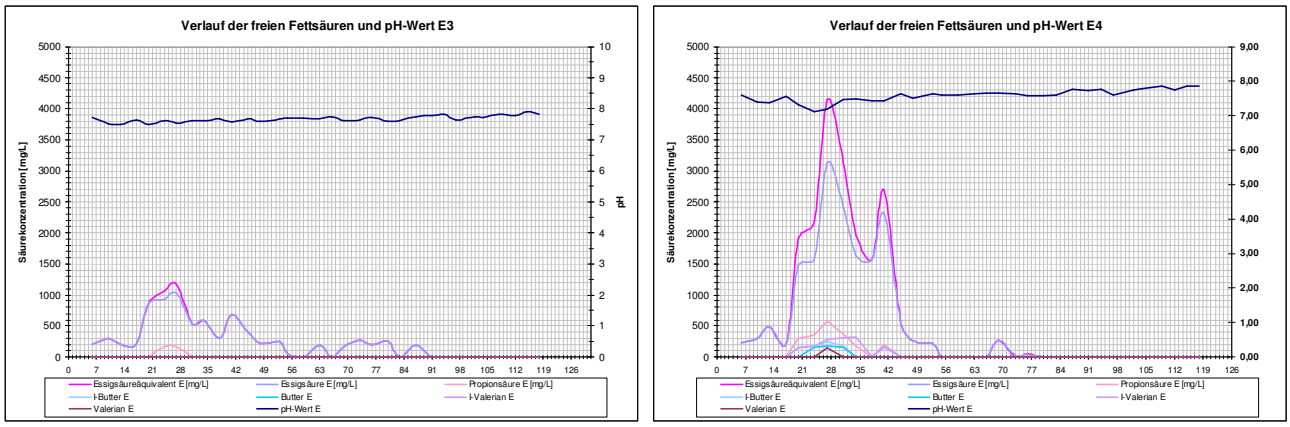


Abbildung 19: Diagramm zur Fermentation eines Maissilage/Weidelgrassilage-Gemisches in zwei verschiedenen Fermentern. Dargestellt sind pH-Wert, die Essigsäureequivalente, die Essigsäure und weitere längerkettige Säuren

Während im Fermenter E3 nur geringe Säurewerte gemessen wurden, welche sich auch nach einigen Tagen abgebaut hatten, waren in der Anfangsphase beim E4 massive Säuren aufgetreten (siehe Abbildung 19). Bei gleich-bleibender Belastung haben sich aber auch im E4 die Säuren wieder abgebaut (siehe Abbildung 19). Der pH-Wert veränderte sich in beiden Reaktoren ins alkalischere Milieu.

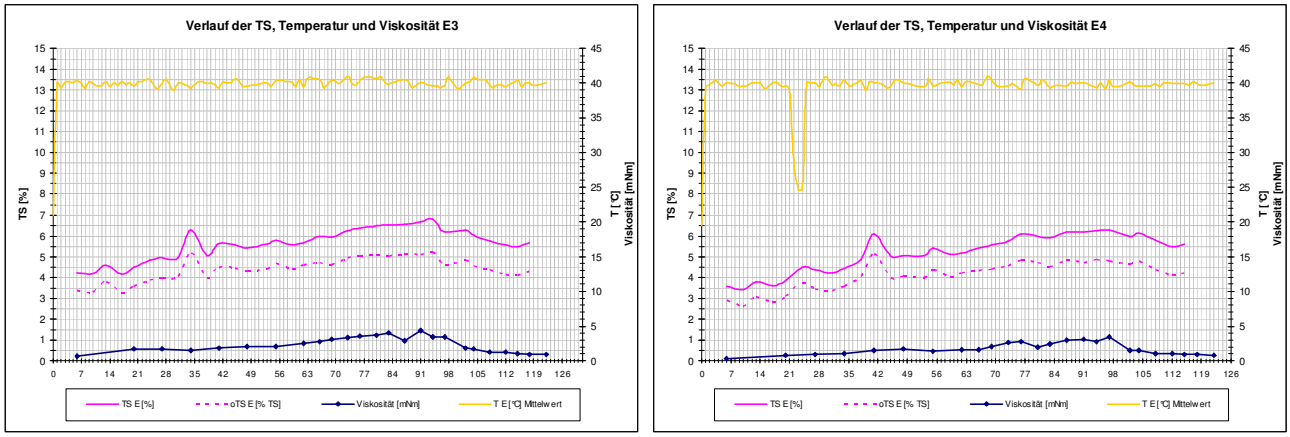


Abbildung 20: Diagramm zur Fermentation eines Maissilage/Weidelgrassilage-Gemisches in zwei verschiedenen Fermentern. Dargestellt sind die Entwicklung der Trockensubstanz, der organischen Trockensubstanz der Temperatur und die Viskosität

Der Trockensubstanzgehalt in beiden Fermentern stieg langsam an, was an der Erhöhung der Raumbelastung liegen könnte. Der Wert blieb bei beiden Fermentern auf einem sehr niedrigen Niveau von maximal 7% (siehe Abbildung 20).

4) Weidelgras-Monovergärung

In einem weiteren Versuch wurde die Monovergärung von Weidelgrassilage von Beginn an getestet. Dazu wurde ein kleiner Test-Reaktor (5l-Volumen) mit Nachgärermaterial befüllt und bei 40°C betrieben, bis kaum noch Gas produziert wurde. Danach wurde bei einer Raumbelastung von 1kg oTS/m³*d begonnen, den Reaktor mit Weidelgras zu füttern (siehe Abbildung 21). Bei diesem Reaktortyp konnte durch eine optimierte Zudosierungseinheit eine kontinuierliche Beschickung des Reaktors mit Grassilage gewährleistet werden.

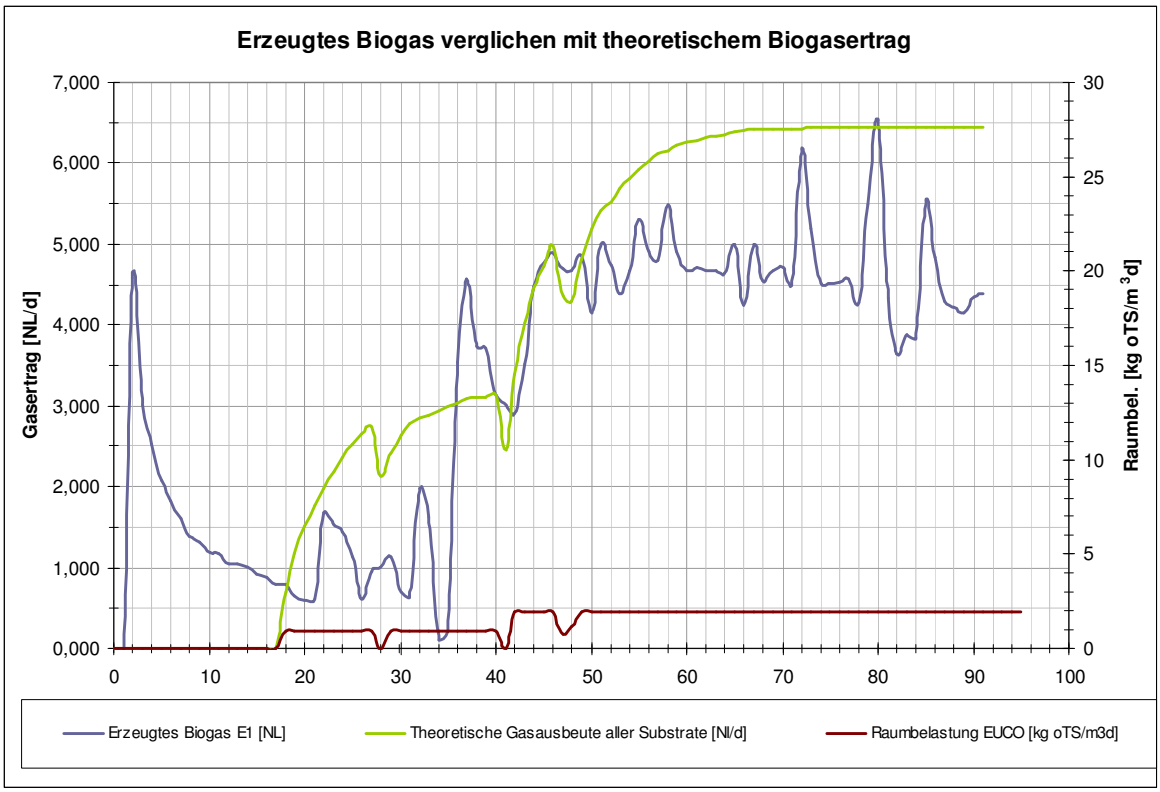


Abbildung 21: Diagramm zur Mono-Fermentation von Weidelgrassilage. Dargestellt sind dabei die Raumbelastung in kg oTS/m³*d (magenta), der tatsächliche und der theoretische Biogasertrag (blau und grüne Linie)

Innerhalb der ersten 20 Tage konnten deutliche Probleme bei der Grasmonovergärung festgestellt werden, d.h. anfangs wurde deutlich weniger Biogas produziert als theoretisch erwartet. Es wurden in dieser Zeit aufgrund mangelnder Probemenge keine Fettsäuren gemessen. Die Messung ab Tag 40 zeigte einen steigenden Verlauf des Essigsäureäquivalentes, welches aber, obwohl ab Tag 41 die Raumbelastung verdoppelt wurde, stark sank und ab dann dauerhaft unter 400 mg/l blieb (siehe Abbildung 22). Der pH-Wert blieb stabil bei pH 8 (siehe Abbildung 22), die Trockensubstanz und die organische Trockensubstanz zeigten keine Auffälligkeiten und waren bei 7% angesiedelt.

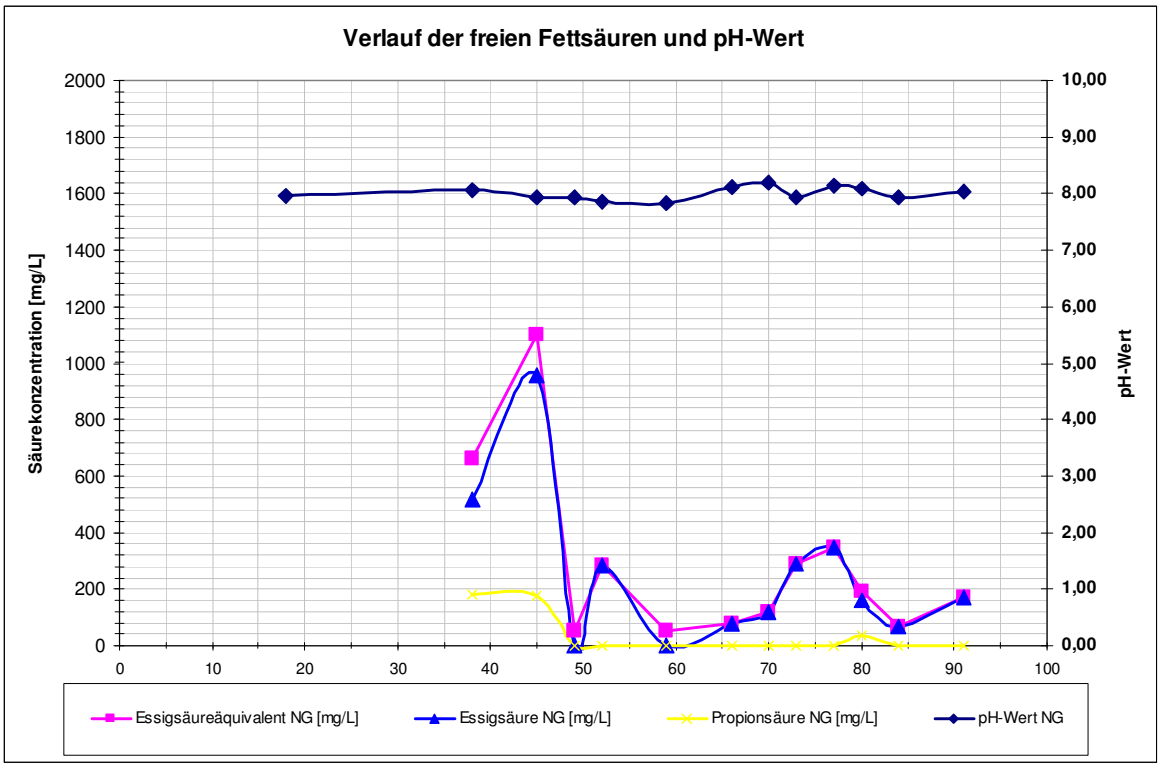


Abbildung 22: Diagramm zur Mono-Fermentation von Weidelgrassilage. Dargestellt sind pH-Wert, die Essigsäureequivalente, die Essigsäure und Propionsäure

Der Methangehalt im Biogas lag bei der Weidelgras-Vergärung durchschnittlich bei 54%. Ein spezifischer Gasertrag von etwa 578 NL/kg oTS wurde für Weidelgrassilage im kontinuierlichen Betrieb ermittelt.

Erarbeitung von Methoden zur Inokulation und zum Nachweis des Inokulates in Technikumsanlagen

Da sich die Lieferung von Inokulaten durch die TUM verzögerte, wurden bei der Schmack Biogas AG vorbereitende Versuche zu diesem Thema unternommen. Bei diesen vorbereitenden Versuchen wurde mit einem Musterorganismus gearbeitet. Es wurden entscheidende Erkenntnisse zu folgenden Punkten gewonnen:

Benötigte Inokulationsmenge

- Upscalingstufen
- Praktische Durchführung des Upscalings
- Zugabeintervalle
- Detektion der Bakterien mittels FISH-Sonden/Fluoreszenzmikroskopie
- Etablierung der Mikroorganismen in den Zielanlagen

Mit diesem Vorwissen waren die technischen Vorraussetzungen geschaffen, um sofort nach Übergabe eines Inokulates das Upscaling in den Technikumsmaßstab durchzuführen und

gegebenenfalls (wenn die FISH-Sonde von der TUM zur Verfügung gestellt wird) die Etablierung der Organismen in der Zielanlage nachzuweisen.

Anzucht Mikroorganismen vom Projektpartner TUM

Am 09.05.2008 wurde bei einer Arbeitsbesprechung zwischen LfL (Dr. Lebuhn) und TUM (Dr. Schwarz und Hiegl) die weitere Vorgehensweise besprochen. Bei den Versuchen, die an der LfL mit den neu isolierten Mikroorganismen von Wolfgang Hiegl durchgeführt worden waren, konnte aufgrund einer Batch-Fahrweise kein optimales Inokulum identifiziert werden. Ein Antrag auf programmatische Änderung im FKZ 220-11-505/905 wurde laut Auskunft des Projektkoordinators von Herrn Dr. Lebuhn (LfL) an Frau Dr. Schüsseler am 04.08.08 übersandt.

Aufgrund der Erkenntnisse von Wolfgang Hiegl wurde aus seinen potentiellen Isolaten eine Anreicherung ausgewählt, welche sich durch besonders hohe und schnelle Abbauraten auszeichnete. Wolfgang Hiegl übermittelte an Schmack zwei Kulturen zu je 500 ml. Diese Zellen wurden bei Schmack im Labor auf 10l-Maßstab nach Zubereitung von Medium nach den Vorschriften von Wolfgang Hiegl vermehrt. Gleichzeitig wurde ein 300l-Fermenter komplett entleert und mit zunächst Spülmittel und dann 70%igem Ethanol weitgehend sterilisiert. Aufgrund fehlenden Equipments für die Zubereitung von 300l Kulturmedium, wurden die Komponenten in 5l Flaschen jeweils autoklaviert. Als Anteil des Kulturmediums wurde 150l abzentrifugiertes Material aus einem Fermenter benötigt. Auch dieses Material wurde aufgrund mangelnden Equipments für die Zentrifugation größerer Volumina, mit einer Sorvall-Zentrifuge mit maximal 3l Befüllvolumen pro Lauf zubereitet und zu je 5l-Anteilen autoklaviert. Der 300l-Fermenter wurde mit 10l der Vorkultur beimpft. Die Anzucht erfolgte über 5 Tage bei 50°C unter ständigem Rühren.
Die Zellernte erwies sich als genauso aufwendig, da auch hier nur Chargen zu maximal 3l in der betriebseigenen Zentrifuge abzentrifugiert werden konnten. Dies konnte auch, aufgrund mangelnder Technik, nicht unter Sauerstoffausschluss geschehen. Die jeweiligen Zellpellets wurden dann in der Anaerobenkammer auf Eis gesammelt. Es konnte auf diese Weise fast 2 kg Zellmaterial gewonnen werden. 750g des Zellpellets wurden sofort schockgefroren und gelagert. Die andere Hälfte wurde bei 121°C und zwei Bar Druck für 40 Minuten autoklaviert und danach ebenfalls schockgefroren.

Einsatz von Zellmassen zum kontinuierlichen Prozess

Da in den Testreihen an der LFL mit den Isolaten von Wolfgang Hiegl aufgrund der Batch-Fahrweise mit einer Fütterung am Tag keine Ergebnisse über die Güte und Qualität der Inokula ermittelt werden konnten, sollte dies an einem Technikumsfermenter der Firma Schmack mit kontinuierlicher Beschickung erfolgen. Dazu wurde ein zweistufiger 400l-Fermenter mit Euco und Coccus zu 150l bzw. 250l mit Maissilage bei 50°C angefahren bis eine stabile Raumbelastung bei 3 kg oTS/m³*d und eine stabile Gasausbeute erzielt wurden.
Die eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut und mit einem Lebend-Tot-Farbstoff angefärbt. Dabei zeigte sich, dass die Mikroorganismen, welche zunächst totautoklaviert worden waren und danach eingefroren wurden, einen Totanteil von 100% aufwiesen. Die Mikroorganismen der Zellernte, welche nicht totautoklaviert worden waren, sondern nur schockgefroren wurden, wiesen einen Totanteil von 30% auf.
Über die Zudosierung wurde die Zellmasse mit den toten Mikroorganismen zugesetzt. Die Zellen wurden an einem Tag zugesetzt. Dieser Zeitpunkt wurde im Diagramm als rotes Quadrat angegeben. Es zeigte sich, dass die Gasausbeute von durchschnittlich 747 NL/kg oTS in den folgenden Tagen deutlich absackte und sich auf einen Wert von im Mittel 583 Nl/kg

oTS reduzierte. An den Fettsäuren konnte nach Zugabe der Bakterienmasse keine Auswirkung festgestellt werden. Auch bei der Trockensubstanz konnte keine Veränderung festgestellt werden. Bei der Viskosität konnte eine deutliche Zunahme ab Zugabe der Bakterienmasse festgestellt werden. Dieses Phänomen würde sich nachteilig auf die Rühreigenschaften des Fermentermaterials bei einer Praxisanlage auswirken und sollte nicht außer Acht gelassen werden.
Nach 44 Tagen, als sich die Gasausbeute augenscheinlich wieder verbesserte, wurde die Zellmasse der lebenden Mikroorganismen zum Prozess über die Fütterung an einem Tag zugesetzt. Auch hier konnte ein deutlicher Einbruch in der Biogasausbeute festgestellt werden. Der Gasertrag war bis zum Ende des Versuchs bei durchschnittlich 583 Nl/kg oTS und damit noch deutlich unter dem Gasertrag, welcher mit den toten Mikroorganismen erzielt wurde. Bei den Fettsäuren konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Auch bei der Trockensubstanz konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Bei der Viskosität konnte zunächst eine positive Veränderung in Richtung weniger viskos beobachtet werden, wobei schon bei der nächsten Probennahme eine erneute Zunahme zu verzeichnen war. Insgesamt zeigte sich daher im Prozess nach Zugabe von Mikroorganismen eine deutliche Steigerung der Viskosität.

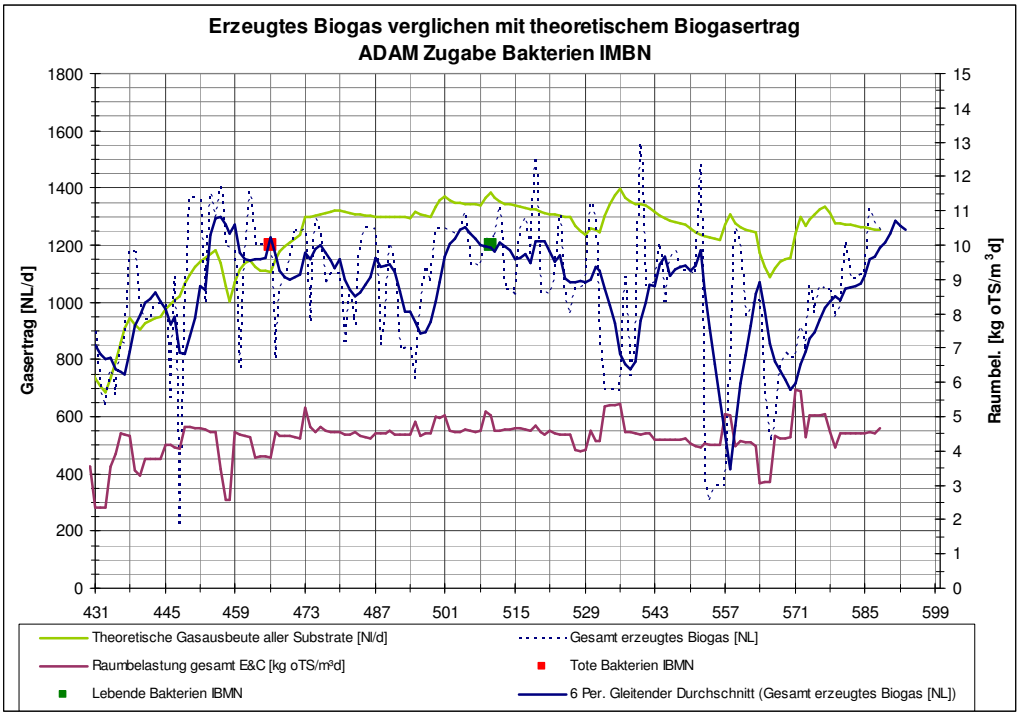


Abbildung 23: Diagramm zur Mono-Fermentation von Maissilage bei thermophilen Betriebsbedingungen. Dargestellt sind die Raumbelastung in kg oTS/m³*d (magenta), der tatsächliche und der theoretische Biogasertrag (blau und grüne Linie) und die Zugabe von toten bzw. lebenden Mikroorganismen-Zellen

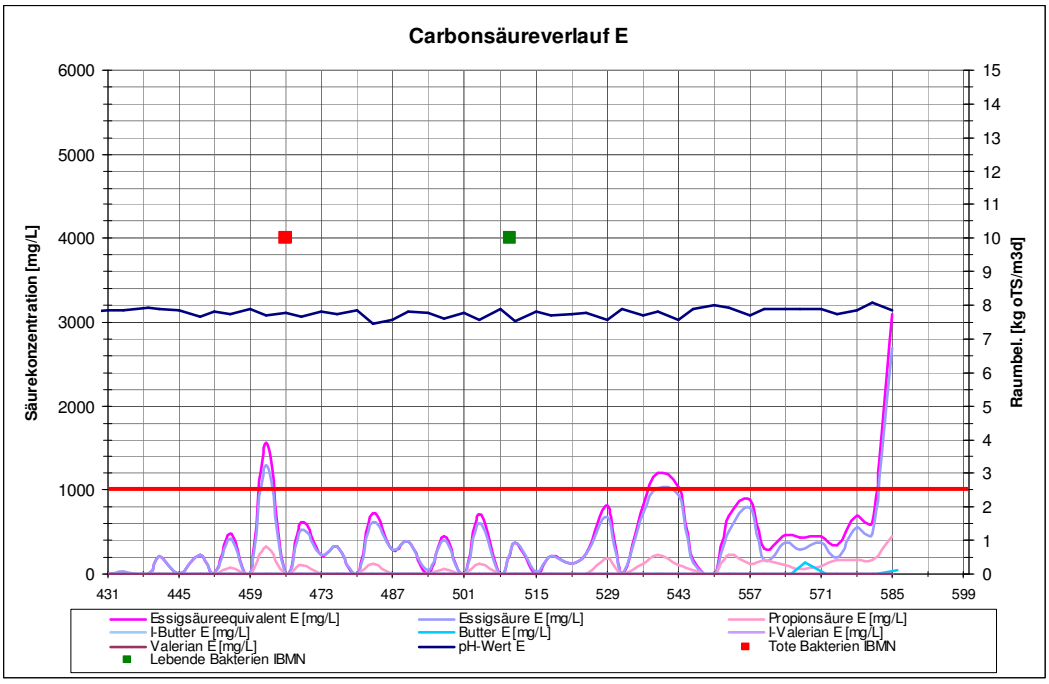


Abbildung 24: Diagramm zur Mono-Fermentation von Maissilage bei thermophilen Betriebsbedingungen. Dargestellt sind pH-Wert, die Essigsäureequivalente, die Essigsäure und längerkettige Fettsäuren und die jeweilige Zugabe von toten bzw. lebenden Mikroorganismen-Zellen

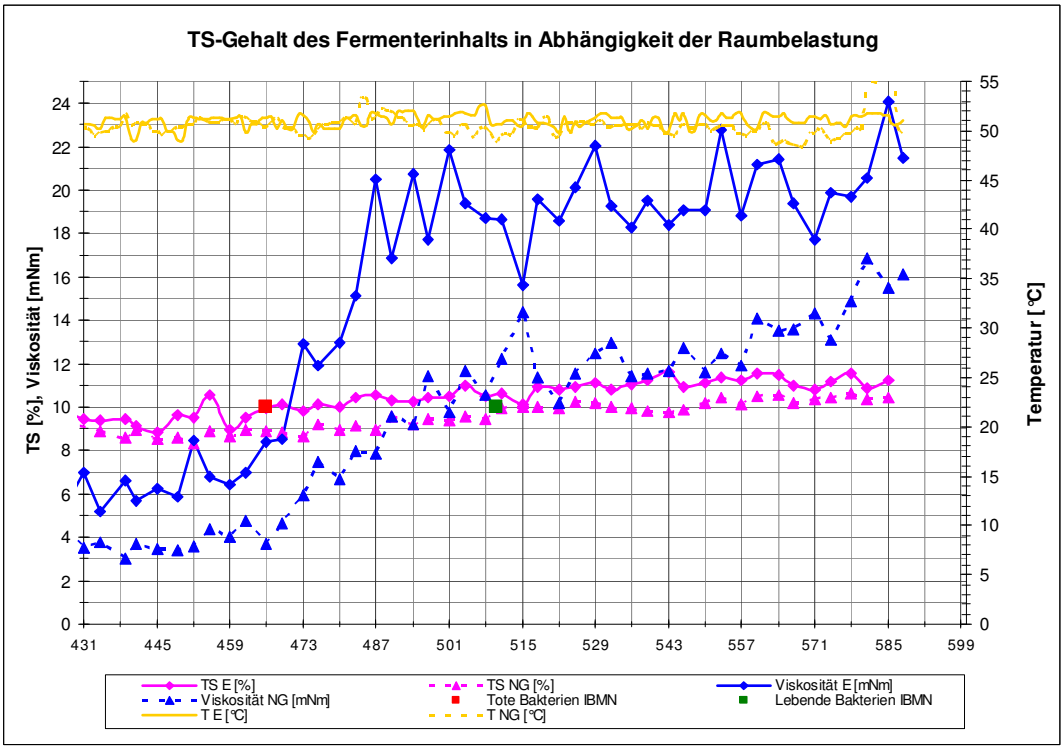


Abbildung 25: Diagramm zur Mono-Fermentation von Maissilage bei thermophilen Betriebsbedingungen. Dargestellt sind pH-Wert, die Essigsäureequivalente, die Essigsäure und Propionsäure

Zusammenfassend lässt sich aus diesem Versuch schlussfolgern, dass der Einsatz dieses Inokulums auf den bestehenden Biogasprozess keinen positiven Einfluss hatte. Dahingegen konnten sogar negative Auswirkungen auf die Prozessstabilität beobachtet werden.

Verwertung

- der voraussichtliche Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Da eine Übertragung in die Praxis aufgrund fehlender Inokula nicht stattfinden konnte, liegt aktuell kein Nutzen für die Praxis aus dem Projektteil der Schmack Biogas AG vor.

- Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende bzw. Aussichten für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. die nächsten innovatorischen Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse

Im Rahmen dieses Projektes wurden erste Erfahrungen gesammelt, wie Biogas-Biozönosen auf eine Beeinflussung reagieren. Projektfremde Schmack-interne Arbeiten, die sich ebenso mit der Suche nach effizienzsteigernden Kulturen beschäftigen, geben erste Hinweise darauf, dass eine Veränderung der Effizienz durch Veränderung der Biozönose möglich ist.

- wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Aus dem Projektpart, d.h. der Übertragung der aus anderen Projektteilen gefundenen Kulturen ergeben sich keine wirtschaftlichen Erfolgsaussichten.

2. Erkenntnisse von Dritten

- während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

keine

3. Veröffentlichungen

- die erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses (nach Nr. 6 BNBest-BMBF 98 für AZA bzw. nach Nr. 11 NKBF 98 für AZK)

keine

Wenn zur Wahrung berechtigter Interessen des ZE oder Dritter oder aus anderen sachlichen Gesichtspunkten bestimmte Einzelheiten aus dem Bericht vertraulich zu behandeln sind (z.B. zur Wahrung der Priorität bei Schutzrechtsanmeldungen), so hat der ZE den ZG ausdrücklich darauf hinzuweisen.

Technische Universität München
Lehrstuhl für Bodenökologie

Erfassung funktioneller hydrolytischer Netzwerke in Biogasanlagen mittels Mikroarraytechnologie

Abschlussbericht

FKZ 220-118-05

Laufzeit 01.11.2006 – 31.10.2009

Antragsteller: Prof. Dr. JC Munch, Prof. Dr. M Schloter

Projektmitarbeiter: Dr. Marion Engel (01.11.2006 – 31.12.2008)

Dr. Xia Dong (01.01.2009 – 31.10.2009)

Technische Universität München

Lehrstuhl für Bodenökologie

Ingolstädter Landstr. 1

D-85764 Neuherberg

E-Mail: schloter@helmholtz-muenchen.de

Tel.: +49-89-3187-2304

Inhalt:

I. Ziele	3
I.1. Aufgabenstellung	3
I.2. Stand der Technik	4
I.2.1. Phylogenetische Mikroarrays	6
I.2.2. Funktionelle Mikroarrays	7
I.3. Literatur	8
II. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	9
III. Ergebnisse	11
III.1.1. Vergleich verschiedener DNA/RNA Extraktionsprotokolle	11
III.1.2. Entwicklung eines PCR Assays zum Nachweis der Familie GHF 48	13
III.2.1. Entwicklung eines Mikroarraydesigns mit Hilfe von *in silico* Werkzeugen	17
III.2.2. Herstellung des Mikroarrays und der markierten DNA	20
III.2.3. Hybridisierung und Datenanalyse	21
III.2.4. Validierung des Mikroarrays	21
III.2.5. Anwendung des GHF Mikroarrays	25
III.2.6. Literatur	30
IV. Verwertung	31
V. Erkenntnisse von Dritten	31
VI. Veröffentlichungen	31

I. *Ziele*

I.1. Aufgabenstellung

Ausgangspunkt des Projektverbundes ist die zunehmende Bedeutung der Biogaserzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen für eine nachhaltige, umweltfreundliche Energieerzeugung. Die steigende Nachfrage nach solchen Anlagen und der stark zunehmende Investionsbedarf machen eine Effizienzsteigerung der Prozesse notwendig. Besonders der energieertragreiche und stabile Betrieb von Anlagen, die mit Silage aus Mais oder Grünland-Schnittgut ohne Zugabe von Rindergülle betrieben werden, steht dabei im Focus des Interesses. In diesem Zusammenhang ist es von übergeordnetem Interesse, schwer abbaubare Biomasse von marginalen Standorten (z.B. Dauergrünland) für die Methangasproduktion effektiv zu erschließen

Ein Problem stellt dabei die Verzahnung der unterschiedlichen mikrobiologischen Prozesse bei der Hydrolyse, der Acidogenese und der Methangasbildung dar: hierbei sind verschiedene Mikroorganismengruppen beteiligt, die aufeinander abgestimmt werden müssen, um den Abbau der Biomasse durch die Hydrolyse der schwer abbaubaren Fasern zu verbessern und damit mehr Substrat für die an der Methanogenese beteiligten Mikroorganismen zu liefern. Über ein besseres Verständnis der dabei beteiligten Prozesse hofft man, den Gesamtprozess optimieren und mit den beteiligten Firmen in die Praxis umsetzen zu können.

Da Hemicellulose und Cellulose einen großen Anteil an den vergärbaren Inhaltsstoffen der lignocellulosehaltigen Biomasse (LCB) ausmachen, ist der Nachweis der Induktion von intra- und extrazellulären Cellulasen (Endoglucanasen, Exoglucanasen, Cellobiosephosphorylase, Cellodextrinphosphorylase etc.) von besonderem Interesse. Ziel des Projektes ist es daher ein Nachweissystem für die entsprechenden Gene und Transkripte auf der Basis der so genannten Mikorarraytechnologie zu validieren und im Rahmen der geplanten gemeinsamen Beprobungen einzusetzen. Ergebnisse über die Induzierbarkeit ganzer Gencluster sind für die Steuerung eines effizienten optimierten Betriebes von Biogasanlagen eine wichtige Voraussetzung.

Die Hauptarbeit des Projektes wird in der Herstellung der Sonden und der Validierung des Arrays liegen. Mit dem etablierten Mikroarray lassen sich parallel die für die Prozessführung relevanten Parameter des mikrobiellen Potentials und der Genexpression (als Maß für die Aktivität) für die zu untersuchenden Abbauprozesse erfassen. Der Mikroarray kann dann dazu eingesetzt werden, die Entwicklung der abbauenden mikrobiellen Populationen anhand der Markergene über die verschiedenen Prozessstufen in der Biogasanlage zu verfolgen. Hierbei lassen sich insbesondere auch vergleichende Untersuchungen in Bezug auf die verschiedenen Eingangssubstrate durchführen**.** Da er einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis der mikrobiologischen Prozesse leistet, kann er auch als analytisches Mittel bei der Anlagenoptimierung eingesetzt werden. Da nach Etablierung der Methode die notwendigen DNA- und mRNA-Extraktionen, sowie die Hybridisierung für das System relativ schnell durchzuführen sind, ist eine am Prozessgeschehen zeitnahe Analyse möglich, die ggf. eine aktive Prozessteuerung ermöglicht. Prinzipiell ist es möglich, Mikroarrays ständig zu erweitern, und so auch neue Stoffwechselwege oder Genfamilien zu berücksichtigen.

Um das erforderliche Spektrum an hydrolytischen Genen abdecken zu können, sollten die Sonden zunächst durch PCR-Methoden (direkte oder inverse PCR) erzeugt werden. Dieser Ansatz ermöglicht

die Gewinnung von Sonden aus relevanten Organismen mit bekannter Funktion. Zusätzlich können aber auch Habitat-spezifisch Sonden erzeugt werden. Dazu sollten die aus der Anlage gewonnenen Isolate verwendet werden. Es sollten aber auch aus den verschiedenen Phasen des Prozesses DNA-Proben gewonnen werden und aus diesen, ebenfalls durch PCR, homologe Gene extrahiert und durch Sequenzierung identifiziert werden. Dieser Ansatz ermöglicht gleichzeitig die vor allem in der Entwicklungsphase notwendige einfache und flexible Anpassung an die durch z.B. verschiedene Inokula oder Prozessführungen bedingte Variation in der Zusammensetzung der mikrobiellen Populationen und dem sich daraus ergebenden Prozessverlauf. Da die Zahl der Sonden auf dem Array nicht limitiert ist, kann dieser diesbezüglich so variabel wie möglich gestaltet werden.

Auf der Basis der gewonnen Sequenzen sollte die Herstellung eines Mikroarrays (Biochips) zur Erfassung der mikrobiellen Abbauleistung für polymere Zucker erfolgen. In einem weiteren Schritt sollte die Validierung des Mikroarrays erfolgen. Hierbei sollte das Erkennungsspektrum der Sonden unter den verwendeten Hybridisierungsbedingungen detailliert ausgetestet werden. Es sollte auch geprüft werden, ob unter optimierten Bedingungen eine semiquantitative Auswertung möglich ist. Durch eine Korrelation der Ergebnisse aus den Mikroarray-Experimenten mit Messungen der Aktivität der Gesamtbiomasse bzw. mikrobiologischen Untersuchungen durch Isolation (Einzelnachweis) oder DNA-Profiling Methoden für Genfamilien (Populationsanalyse) lassen sich die Ergebnisse aus den Mikroarray-Experimenten verifizieren. Damit der Mikroarray als diagnostisches Werkzeug auch in einem laufenden Betrieb einer Anlage eingesetzt werden kann, sollte zudem ein Auswertemodus entwickelt werden, mit dem die aus einem Experiment erhaltene Datenfülle schnell und Ziel gerichtet interpretiert werden kann.

Im letzten Schritt sollte der Biochip in den im Gesamtverbund vorgeschlagenen Anlagen beginnend bei den einfachen Laborsystemen bis hin zur komplexen Pilotanlage eingesetzt werden und mit die Ergebnisse mit den gemessenen Effizienzparametern korreliert werden.

I.2. Stand der Technik

Die Forschung in den letzten zwei Jahrzehnten hat eine unglaubliche Vielfalt an Mikroorganismen in natürlichen und technischen Ökosystemen gezeigt. Torsvik et al. (1990, 1998, 2002), zum Beispiel haben Anfang der neunziger Jahre geschätzt, dass mehr als 10 000 Bakterienarten in einem Gramm Boden oder marinen Sedimenten vorkommen können. Neuere Arbeiten sprechen von mehr als einer Million unterschiedlicher mikrobieller Genome (Gans et al., 2005) in einem Gramm Boden. Auch in technischen Systemen wie Biogasanlagen konnten teilweise bis zu 10 000 verschiedene Spezies pro cm^3 nachgewiesen werden. Allerdings sind die Faktoren, welche diese Populationen beeinflussen, und die Kontrolle der oft extremen Heterogenität in der Umwelt, aber auch in technischen Anlagen, weitgehend unbekannt (Zhou et al., 2002). Das ultimative Ziel der mikrobiellen Ökologie ist es daher, diese Faktoren aufzuklären und insbesondere die Wechselwirkungen von Mikroorganismen untereinander sowie zwischen Mikroorganismen und ihrer biotischen und abiotischen Umwelt zu beschreiben.

Die Entwicklung von molekularen Technologien wie der Polymerase Kettenreaktion (PCR), der reverse-Transkription, der real-time PCR, von Reportergenen, oder der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH), haben es möglich gemacht, die Dynamik dominierender Populationen in komplexen mikrobiellen Gemeinschaften darzustellen. Um jedoch in vollem Umfang mikrobielle Gemeinschaften

zu verstehen, bedarf es Technologien, mit denen parallel die Dynamik und Aktivität von tausenden von verschiedenen mikrobiellen Spezies gleichzeitig erfasst werden kann. Mikroarrays haben das beispiellose Potenzial, dieses Ziel zu erreichen, und sind daher ideale Werkzeuge zur spezifischen, sensitiven, quantitativen Identifizierung und Charakterisierung mikrobieller Populationen im hohen Durchsatz. Aufgrund der raschen Fortschritte in der Herstellung kann heutzutage ein Mikroarray mehrere tausend Sonden tragen. Mikroarrays wurden zwar primär entwickelt, um komplexe Genexpressionsanalysen von Reinkulturen durchzuführen; heute ist es jedoch möglich auch einzelne Gene in komplexen mikrobiellen Gemeinschaften nachzuweisen. Wie die meisten anderen Techniken, waren Anfangs nur die dominanten Populationen aus Umweltproben nachweisbar (Denef et al., 2003; Rhee et al., 2004). Darüber hinaus war oftmals die Menge an vorhandener Biomasse zu gering, um genügend Material für den Einsatz von Mikroarray Analysen zu erhalten. Allerdings konnte durch Signalverstärker die genannten Probleme in den meisten Fällen gelöst werden. Solche Techniken können allerdings, selbst wenn sie mit größter Sorgfalt durchgeführt werden, zur Verzerrung von Analysen führen (Reysenbach et al., 1992), sodass entsprechende Kontrollen unumgänglich sind. Ein weiteres Problem waren bei der Technologieentwicklung fehlende spezifische Sonden, sodass die Bedeutung eines Organismus, obwohl dominant im Ökosystem, komplett übersehen werden konnte. Umgekehrt zeigten viele Sonden Kreuzreaktionen mit bis dato unbeschriebenen Mikroorganismen mit entsprechend irreführenden Signalen durch Bindung eines anderen Gens, sodass die Ergebnisse nur schwer zu interpretieren waren. Durch die Integration neuer Datenbanktools und –abfragemöglichkeiten sind die genannten Probleme heute aber lösbar. Allerdings ist es auch heutzutage oft eine Herausforderung, Ergebnisse aufgrund der massiven Datenmengen mit Hilfe standardisierbarer statistischer Verfahren auszuwerten.

In der mikrobiellen Ökologie werden primär folgende Mikroarrayarten unterschieden: (1) Phylogenetische Oligonukleotid-Arrays (POAs) basieren auf einem konservierten Marker wie z.B. den Genen, die für die ribosomale RNA (rRNA) kodieren, die verwendet werden, um die Phylogenie verschiedener Spezies zu vergleichen. (2) Funktionelle Gen-Arrays (FGAs) detektieren wichtige Funktionsbereiche von Genen, die für Proteine kodieren, die verschiedene biogeochemische Prozesse, wie Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelumsatz katalysieren. Ferner liefern diese Arrays auch Informationen über die Steuerung dieser Prozesse. (3) Gemeinschaft Genom-Arrays (CGA) enthalten die gesamte genomische DNA von kultivierten Organismen und beschreiben deren Dynamik in künstlichen und natürlichen Systemen. (4) Metagenomische Arrays (MGA) sind eine potenziell leistungsfähige Technik, denn anders als die anderen Arrays, enthalten sie Sonden basierend direkt aus Umwelt-DNA selbst und können ohne Expertenwissen angewendet werden. (5) Arrays, die Sonden für alle offenen Leseraster enthalten (WGA). Diese Arrays haben traditionell für die funktionelle Analyse von Einzelorganismen die größte Bedeutung, können aber auch benutzt werden für vergleichende komparative genomische Analysen oder zur Untersuchung der Wechselwirkungen von mehreren Organismen auf der Ebene von Transkripten. In dieser Zusammenfassung wird vor allem auf POAs und FGAs eingegangen, da sie die potentiell größte Bedeutung für die Anwendbarkeit in Biogasanlagen haben, wobei für die Methanogenese eher POAs einsetzbar sind, für die Hydrolyse dagegen eher FGAs von Bedeutung sein könnten.

I.2.1. Phylogenetische Mikroarrays

Hierbei dient meist die kleine ribosomale RNA-Untereinheit als phylogenetischer Marker. Obwohl eine Reihe von Biomolekülen das Potenzial als phylogenetische Marker haben, waren es die Studien von Carl Woese und Kollegen, beginnend in den 1970er Jahren, welche die rRNA Sequenz als idealen Marker beschrieben. Mehrere Faktoren spielen hierbei eine Rolle (Nieseln et al., 2003): (1) rRNAs wurden bis dato in allen Organismen gefunden. (2) Laterale Übertragung von rRNAs zwischen Organismen ist äußerst selten, sodass die evolutionäre Geschichte der rRNA die Entstehungsgeschichte des Organismus widerspiegelt. (3) rRNAs enthalten Regionen mit stark konservierten, mäßig variablen und sehr variablen Sequenzen. Während die hoch konservierten Regionen als ideale Bindungsregionen für Primer fungieren, mit deren Hilfe sich praktisch jede rRNA der entsprechenden Untereinheit amplifizieren lässt, dienen die variablen Regionen als Ziele für Gruppen- und Organismus-spezifischen Hybridisierungssonden und sind ideale Marker für phylogenetische Analysen für die Bestimmung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Organismen.

Die meisten POAs bestehen aus kurzen Oligonukleotidsonden, die komplementär zu bestimmten Regionen des rRNA-Gens sind. Die Verwendung von rRNAs für die Charakterisierung mikrobieller Gemeinschaften wurde erstmals von Pace und Mitarbeiter in den frühen 1980er Jahren (Olsen et al., 1986) konzipiert und hat seitdem unsere Sicht im Bezug auf die mikrobielle Vielfalt auf der Erde revolutioniert. Dieser Ansatz erlaubte es erstmals, mikrobielle Gemeinschaften ohne deren Kultivierung zu erfassen. Heute, mehr als 20 Jahre nach der Veröffentlichung der ersten Artikel, sind weit mehr als 130 000 unterschiedliche rRNA Sequenzen in internationalen Datenbanken beschrieben (Stahl et al., 1995). Über das Ribosomal Database Project (RDP; Cole et al., 2005) in der neunten Version 136.355 bakterielle rRNA-Sequenzen: 57.325 aus kultivierten Mikroorganismen und 79.030 aus Umwelt-Klonen. Darüber hinaus sind auch etliche Sequenzen von Archaea und Eukaryonten verfügbar. Im Jahr 2000 basierten 60 % aller publizierten Arbeiten im Bereich mikrobielle Ökologie auf dieser Methodik.

Im Gegensatz zu den meisten FGAs bieten POAs die Möglichkeit, auch Universalsonden bzw. Sonden auf unterschiedlichen phylogenetischen Ebenen in das Array Design zu integrieren. Eine der großen Herausforderungen für rRNA basierte Arrays sind die inhärenten Sekundärstrukturen. Zahlreiche Softwareprogramme können helfen, die sog. „Selfcomplementarity“ zu identifizieren; trotzdem ist es sehr schwierig, die Auswirkungen der Ziel-Sekundärstruktur auf die Hybridisierungseffizienz vorauszusagen (Ratushna et al., 2005). Mehrere Gruppen haben die Auswirkungen der sekundären Strukturen der rRNA auf die Qualität von Oligonukleotid-Microarrays untersucht (Chandler et al., 2003; Peplies et al., 2003). Generell deuten diese Arbeiten darauf hin, dass unspezifische Bindung von Oligonukleotid-Sonden an rRNA Zielsequenzen eliminiert werden. Es können durch geeignete Wahl der Hybridisierung folgende Bedingungen variiert werden: Hybridisierung bei hohen Temperaturen und / oder die Aufnahme von Formamid in den Hybridisierungspuffer. Elimination der falsch Negativen (Fälle, in denen die Sonde nicht binden als Folge der sekundären Struktur im Zielbereich des rRNA Moleküls) ist jedoch weiterhin ein Problem.

I.2.2. Funktionelle Mikroarrays

Im Gegensatz zu POAs, die in erster Linie für den Nachweis für den spezifischen Nachweis von Mikroorganismen und deren phylogenetischer Differenzierung konzipiert sind, sind FGAs primär dann von Interesse, wenn es darum geht, funktionelle Gene in ihrer Abundanz und Diversität zu erfassen, die an bestimmten Schlüsselprozessen in der Natur oder in technischen Anlagen beteiligt sind. Diese Art der Mikroarrays wurde bis dato schon erfolgreich für Untersuchungen zu biogeochemischen Stoffkreisläufen (z.B. Bodrossy et al., 2003; Cho et al., 2002; Jenkins et al., 2004) und zur Entwicklung von Strategien zur biologischen Sanierung von Kontaminationen eingesetzt [z.B. Denef et al., 2003; Dennis et al., 2003).

Ein wesentlicher Unterschied zu POAs sind die teilweise erheblichen Unterschiede in den Sequenzen der entsprechenden Sonden, da sich sogar die genetischen Codes von Genen, die für den gleichen Stoffwechselschritt kodieren teilweise erheblich unterscheiden. Dies erschwert die Validierung entsprechender Mikroarrays teilweise ganz erheblich. Darüber hinaus ist in vielen Fällen die Anzahl an Sequenzen in öffentlichen Datenbanken relativ gering, was die Konstruktion der entsprechenden Sonden erschwert. Zum Beispiel sind für das Gen *nifH*, das für eine Untereinheit der Nitrogenase kodiert und eines der sehr am häufigsten untersuchten Gene darstellt bis her knapp 1800 Sequenzen in öffentlichen Datenbanken hinterlegt, im Vergleich zu den oben beschrieben 16S rRNA Genen, eine sehr geringe Anzahl. Sucht man nach anderen Genen, z.B. *nifD*, das für eine andere Untereinheit der Nitrogenase kodiert, so findet man gerade einmal 100 Einträge in den entsprechenden Datenbanken (Schadt et al., 2005). Ein idealen Kandidaten-Gen für eine FGA (1) kodiert für ein Schlüsselenzym oder Protein für den zu untersuchenden Stoffwechselweg (2) ist evolutionär konserviert, hat aber genug Sequenz Divergenz in verschiedenen Mikroorganismen um die Konstruktion von Sonden für einzelne Arten zu ermöglichen und (3) hat erhebliche Sequenzdaten von Isolaten und Umweltproben im öffentlichen Datenbanken. Wenn nur begrenzte Sequenzdaten verfügbar sind, kann es sinnvoll sein, zunächst zu Klon Bibliotheken mittels PCR für das entsprechende Gen aus unterschiedlichen Umweltproben zu generieren, um die notwendigen Informationen für das Sonden Design eines FGAs zu erhalten. Ein großer Vorteil der „PCR derived“ Sonden ist, dass sie ohne vorherige Kenntnis der Sequenz generiert werden können, indem Primer von konservierten Regionen des Gens entwickelt werden, die dann entsprechende variable Regionen amplifizieren. Allerdings ist dies nur dann wirklich ziel führend wenn die Sequenz der variablen Region zumindest auf Aminosäureebene Sequenzhomologien von mehr als 70 % zu bekannten Genen aufweißt, da sonst die Funktion des entsprechenden Gens fraglich bleibt. Mehr noch als bei POAs bedingt daher die Auswahl der Sonden die Spezifität des Mikroarrays.

Mehrere Studien haben jüngst FGAs verwendet um die Beteiligung bestimmter Mikroorganismen an Prozessen in der Umwelt zu untersuchen Umwelt, wie zum Beispiel Stickstofffixierung, Nitrifikation, Denitrifikation und Sulfatreduktion (z.B. Steward et al., 2004; Taroncher et al., 2003; Tiquia et al., 2004); Abbau von organischen Verunreinigungen einschließlich polychlorierten Biphenylen (PCB) (Denef et al., 2003) und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) (Rhee et al., 2004) in Böden und Sedimenten oder Methanoxidation in der Deponien (Stralis-Pavese et al., 2004). Viele dieser Anwendungen waren allerdings in erster Linie als Beweise für das Konzept durchgeführt und es wurden daher nicht genügend Proben analysiert um biologisch sinnvolle Schlussfolgerungen zu ziehen.

Ein großer potenzielle Nutzen der FGAs ist, dass sie nicht nur verwendet werden, um das Vorhandensein wichtiger Gene durch Messung der DNA, zu bestimmen, sondern dass sie auch Verwendung finden, um deren Expression durch Messung der entsprechenden mRNA zu charakterisieren. Bis dato haben aber nur eine Handvoll Studien FGAs für mRNA-Analyse verwendet werden (z.B. Barnet et al., 2004; Dennis et al., 2003; Rhee et al., 2004). Dennis et al. (2003) untersuchte zum Beispiel die Expression von Genen die am 2,4-dichlorphenoxyessigsäure Säure (2,4-D)-Abbau in Anreicherungskulturen aus verschiedenen Abwasseranlagen beteiligt sind. Rhee et al. (2004) verwendete ein 50-mer Oligonukleotid FGA um die Expression von Genen zu untersuchen, die am, Naphthalin-Abbau in Anreicherungskulturen aus Boden eine Rolle spielen. Allerdings verwenden alle diese Studien relativ einfache Laborsysteme um mRNA zu analysieren. Es gibt immer noch einige Einschränkungen für die Anwendung der FGAs zur mRNA-Analyse in komplexen Umweltproben, u.a. die Schwierigkeiten bei der Gewinnung ausreichender Mengen von hochwertigen mRNA. Im Gegensatz zu eukaryontischen mRNAs, die angereichert werden kann via ihre Poly (A)-Schwanz mit kommerziell erhältlichen Kits, ist es schwer, prokaryotische mRNA anzureichern.

I.3. Literatur

Bodrossy, L, Stralis-Pavese, N, Murrell, JC, Radajewski, S, Weilharter, A, Sessitsch, A (2003) Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. Environ Microbiol 5: 566–582

Chandler, DP, Newton, GJ, Small, JA, Daly, DS (2003) Sequence versus structure for the direct detection of 16S rRNA on planar ligonucleotidemicroarrays. Appl Environ Microbiol 69: 2950–2958

Cho, JC, Tiedje, JM (2002) Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. Appl Environ Microbiol 68:1425–1430

Cole, JR, Chai, B, Farris, RJ, Wang, Q, Kulam, SA, McGarrell, DM, Garrity, GM, Tiedje, JM (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Res 33: 294–D296

Denef, VJ, Park, J, Rodrigues, JLM, Tsoi, TV, Hashsham, SA, Tiedje, JM (2003) Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional enomics studies on bacterial communities. Environ Microbiol 5: 933–943

Dennis, P, Edwards, EA, Liss, SN, Fulthorpe, R (2003) Monitoring gne expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. Appl Environ Microbiol 69: 769–778

Gans, J, Wolinsky, M, Dunbar, J (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. Science 309: 1387–1390

Jenkins, BD, Steward, GF, Short, SM, Ward, BB, Zehr, JP (2004) Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray. Appl Environ Microbiol 70: 1767–1776

Nielsen, HB, Wernersson, R, Knudsen, S (2003) Design ofoligonucleotides for microarrays and perspectives for design of multi-transcriptome arrays. Nucleic Acids Res 31: 3491–3496

Olsen, GJ, Lane, DJ, Giovannoni, SJ, Pace, NR, Stahl, DA (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach.Annu Rev Microbiol 40: 337–365

Peplies, J, Glockner, FO, Amann, R (2003) Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 69: 1397–1407

Ratushna, VG, Weller, JW, Gibas, CJ (2005) Secondary structure in the target as a confounding factor in synthetic oligomer microarray design. BMC Genomics 6: 31

Reysenbach, AL, Giver, LJ, Wickham, GS, Pace, NR (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 58: 3417–3418

Rhee, SK, Liu, X, Wu, L, Chong, SC, Wan, X, Zhou, J (2004) Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. Appl Environ Microbiol 70: 4303–4317

Schadt, CW, Liebich, J, Chong, SC, Gentry, TJ, He, Z, Pan, H, Zhou, J (2005) Chapter 11, Design and use of functional gene microarrays (FGAs) for the characterization of microbial communities. n: Savidge, T, Pothulakis, H (Eds.) Microbial Imaging, ethods in Microbiology, vol. 34. Academic Press, Inc., London,UK, pp 331–368

Stahl, DA, Lane, DJ, Olsen, GJ, Pace, NR (1985) Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S ribosomal-RNA sequences. Appl Environ Microbiol 49: 1379–1384

Steward, GF, Jenkins, BD, Ward, BB, Zehr, JP (2004) Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (nifH) gene diversity. Appl Environ Microbiol 70: 1455–1465

Stralis-Pavese, N, Sessitsch, A, Weilharter, A, Reichenauer, T, Riesing, J, Csontos, J, Murrell, JC, Bodrossy, L (2004) Optimization of diagnostic microarray for application in analysing landfill methanotroph communities under different plant covers.Environ Microbiol 6: 347–363

Taroncher-Oldenburg, G, Griner, EM, Francis, CA, Ward, BB (2003) Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. Appl Environ Microbiol 69: 1159–1171

Tiquia, SM, Wu, L, Chong, SC, Passovets, S, Xu, D, Xu, Y, Zhou, J (2004) Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. Biotechniques 36: 664–675

Torsvik, V, Goksoyr, J, Daae, FL (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. Appl Environ Microbiol 56: 782–787

Torsvik, V, Daae, FL, Sandaa, RA, Ovreas, L (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. J Biotechnol 64: 53–62

Torsvik, V, Ovreas, L, Thingstad, TF (2002) Prokaryotic diversity—magnitude, dynamics, and controlling factors. Science 296: 1064–1066

Zhou, J, Xia, B, Treves, DS, Wu, LY, Marsh, TL, O'Neill, RV, Palumbo, AV, Tiedje, JM (2002) Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. Appl Environ Microbiol 68: 326–334

II. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Projektes wurde primär mit den Verbundpartnern zusammengearbeitet (TU-MB; LfL-ILT und Schmack Biogas AG).

- TU-MB: Austausch von Stämmen für die Validierung des Mikroarrays (siehe unten)
- LfL-ILT: Nutzung von Fermenterproben; Anwendung eines gemeinsamen Extraktionsprotokolls für Nukleinsäuren aus Biogasanlagen (siehe unten)
- Schmack AG: Nutzung von Fermenterproben

III. Ergebnisse

III.1. Erzielte Ergebnisse

III.1.1. Vergleich verschiedener DNA/RNA Extraktionsprotokolle für den Einsatz in Biogasfermentoren

Mit verschiedenen DNA/RNA Extraktionsprotokolle (Tab.1) wurden Nukleinsäuren aus Proben eines Fermenters des Typs EVA einer Biogasanlage der Firma Schmack isoliert. Das Ziel war es, das am besten geeignete Protokoll für diese Umweltproben herauszufinden. An Nukleinsäuren, die als Template für Hybridisierungen mittels Mikroarray dienen sollen, werden hohe Anforderungen an ihre Reinheit gestellt. Sie werden - anders als es bei auf PCR basierenden Methoden wie DGGE oder TRFLP der Fall ist - ohne eine vorangehende Vermehrung der Zielsequenzen eingesetzt. Daher ist bei dem hier angestrebten Einsatz der Extrakte eine Verdünnung der Probe, um vorhandene Inhibitoren zu minimieren, nur mit großen Einbußen bei der Sensitivität des Mikroarrays möglich und daher dringend zu vermeiden.

	RNA (Börmann Webster)	**RNA/DNA (Griffiths et al.)**	**RNA/DNA (Griffiths et al.)**	**RNA (Oelmüller et al.)**	**DNA (Stahl et al.)**
Methode der Zelllyse	Ultraschall mit SDS (65°C), Glas-perlen + anschl. Phenol Behand-lung, Inkubation bei 65°C	Ultraschall mit CTAB, Phenol-Chloroform, Glas-perlen	Homogenisierung mit CTAB, Phenol-Chloroform, Glas-perlen BIO101	Ultraschall mit SDS, Phenol-Chloroform Lösung (65°C), Glasperlen Inkuba-tion bei 60°C	Ultraschall mit SDS, Phenol-Chloroform, Glasperlen, Inkubation bei 65°C
Inaktivierung von Nukleasen	Phenol	Phenol	Phenol	Phenol	Phenol
Zeitaufwand	3h und Fällung ÜN	3h	3h	5h	2,5h

Tabelle. 1: Einsatz verschiedener Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Fermenterproben

Die Qualität und Ausbeute von DNA/RNA aus unterschiedlichen Extraktionsmethoden lassen sich in Fig. 1 erkennen. Die Extraktion von Gesamtnukleinsäuren nach dem Protokoll von Griffiths unter Einsatz eines Homogenisators in Kombination mit Glasperlen von BIO101 ergab die höchste Ausbeute an DNS, die rel. hochmolekular war. Extraktion von RNA nach einem Protokoll von Börmann (1992; modifiziert) ergab die am wenigsten mit DNS verunreinigte RNS. Diese beiden Protokolle werden in Zukunft eingesetzt. Bei allen Extraktionen war allerdings eine hohe Verunreinigung durch Huminstoffe (nachgewiesen durch niedrigen OD 260/230 Verhältnis) und eine geringe Ausbeute an RNS auffallend. Die Verunreinigungen bewirkten eine Hemmung molekularbiologischer Prozesse, wie z.B. PCR

oder DNase Verdau. Daher mussten die bestehenden Protokolle weiter folgendermaßen modifiziert werden.

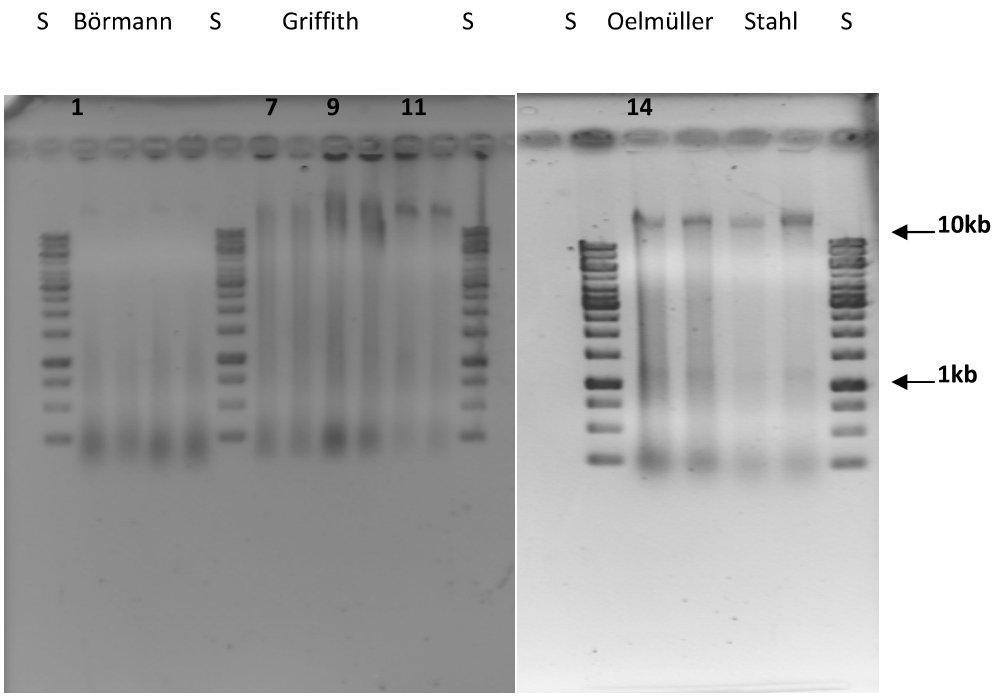


Abbildung 1: Analyse der Nukleinsäureextrakte aus Fermenterprobe nach verschiedenen Extraktionsprotokollen durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel

- Ausgehend vom Protokoll nach Griffith wurde die Probe zu Beginn mit Phosphatpuffer gewaschen
- Allen wässrigen Schritten wurde RNase Inhibitor zugesetzt um die Ausbeute an RNA zu erhöhen
- Das Rohextrakt wurde zusätzlich über eine Sepharose 2B Gelfiltration aufgereinigt (Miller, 2001)

Durch Anwendung dieser Modifikationen konnte die Ausbeute an RNS im Extrakt erhöht und die Konzentration an Huminstoffen/Hemmstoffen stark reduziert werden. Die Qualität der DNS war unverändert hochmolekular. Eine Hemmung bei Einsatz der DNS als Template für molekularbiologische Manipulationen wie PCR oder DNase Verdau war im Gegensatz zu dem nicht-modifizierten Protokoll nicht mehr feststellbar.

III.1.2. Entwicklung eines PCR Assays zum Nachweis und zur Diversitätsbestimmung von Cellulasen der Familie GHF 48 aus Fermenterproben

Folgende Fragen galt es zu Beginn des Projektes zu beantworten um einen validierbaren Mikroarray zu generieren:

- Sind die in Datenbanken hinterlegten Cellulasegensequenzen, die zum größten Teil von kultivierten Organismen stammen, repräsentativ für Cellulasegene in Fermenterproben?
- Ist die Spezifität der Oligonukleotide für einen Mikroarray geeignet, Cellulasegene in Umweltproben nachzuweisen?
- Ist ein Nachweis von mRNA der entsprechenden Gene in den Fermenterproben möglich?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde ein Familie an Glycosylhydrolasen (GHF 48) ausgewählt, um ein PCR Assay zum Nachweis und zur Diversitäts-Bestimmung dieser Gene zu erstellen.

Für die GH-Module der Cellulasegene der Familie GHF 48 wurde mit Hilfe des Softwarepackets ARB (http://www.arb-home.de/downloads.html) eine Datenbank errichtet und auf Proteinsequenzvergleichen basierende Alignments erstellt. Zur Entwicklung von Primern, mit denen auch GHF 48 Cellulasegene bisher unkultivierter Organismen amplifiziert werden können, wurden diese Alignments nach konservierten Regionen untersucht. So konnten Primer entwickelt werden, die ein Fragment der GHF 48 Cellulasegene von einem großen Teil der Gram-positiven LGC Organismen amplifizieren. Die Spezifität der Primer wurde „*in silico*“ mittels der Software Genomatix gegen den Datensatz „Bacteria“ getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt.

Die Spezifität der Primer wurde mit Reinkulturen als Positiv und Negativkontrollen bestätigt. Die Primer wurden eingesetzt, um GHF48 Genfragmente von DNA zu amplifizieren, die von einem mesophilen Biogasfermenter (EVA, Fa. Schmack) isoliert worden war. Das PCR Produkt wurde aufgereinigt, kloniert und die erhaltenen Klone einer Sequenzanalyse unterzogen. Die 38 Sequenzen der GHF 48 Fragmente wurden mittels ARB in das erstellte Sequenzalignment eingefügt und die Verwandtschaft zu Genen bisher kultivierter Organismen durch die Erstellung eines phylogenetischen Baumes mittels „Maximum likelihood“ dargestellt (Abbildung 3).

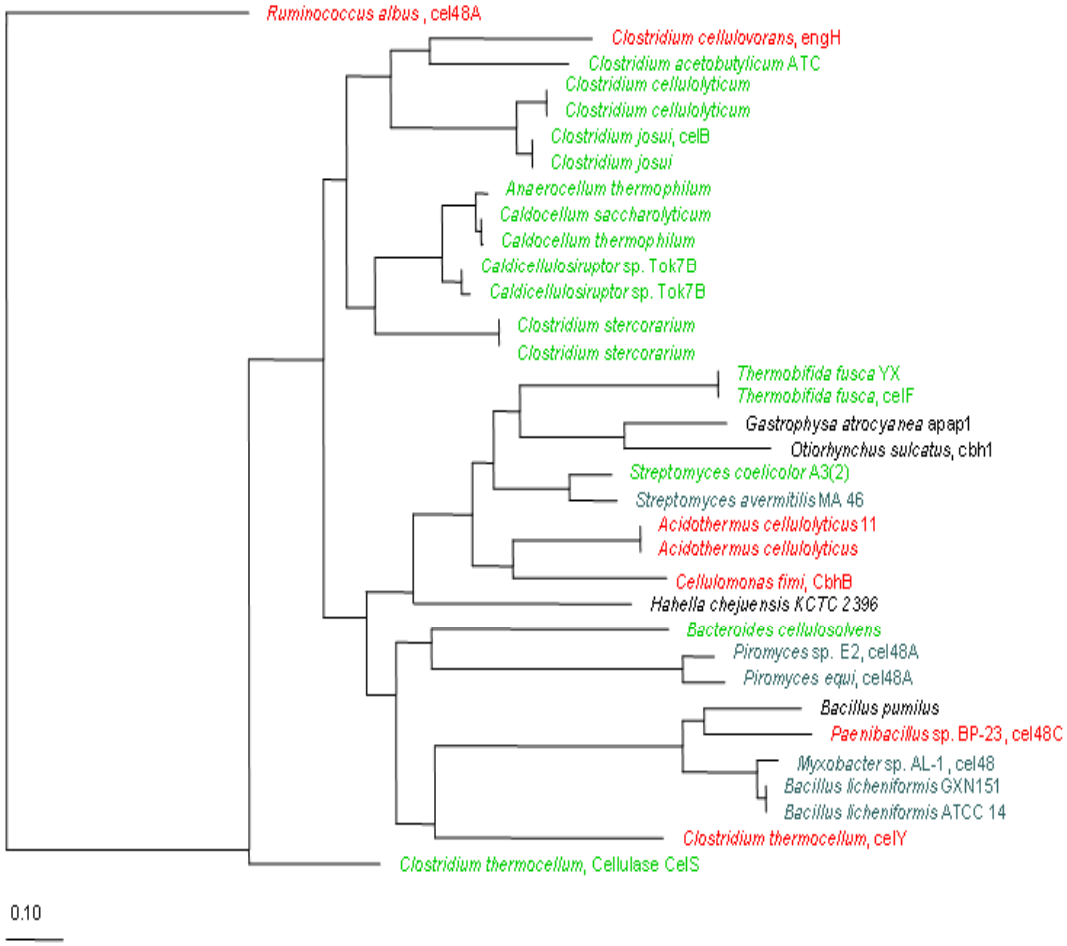


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum tree (Maximum likelihood) der GHF 48 Cellulasen kultivierter Bakterien auf der Basis von Aminosäuresequenzen **Grün**: Primer binden ohne Mismatch zu GHF48 Genen kultivierter Organismen **Rot**: Primer weist einen Missmatch in einem oder beiden Primern auf zu GHF48 Genen kultivierter Organismen **Schwarz:** Primer weisen mehr als einem Missmatch auf zu GHF48 Gene kultivierter Organismen.

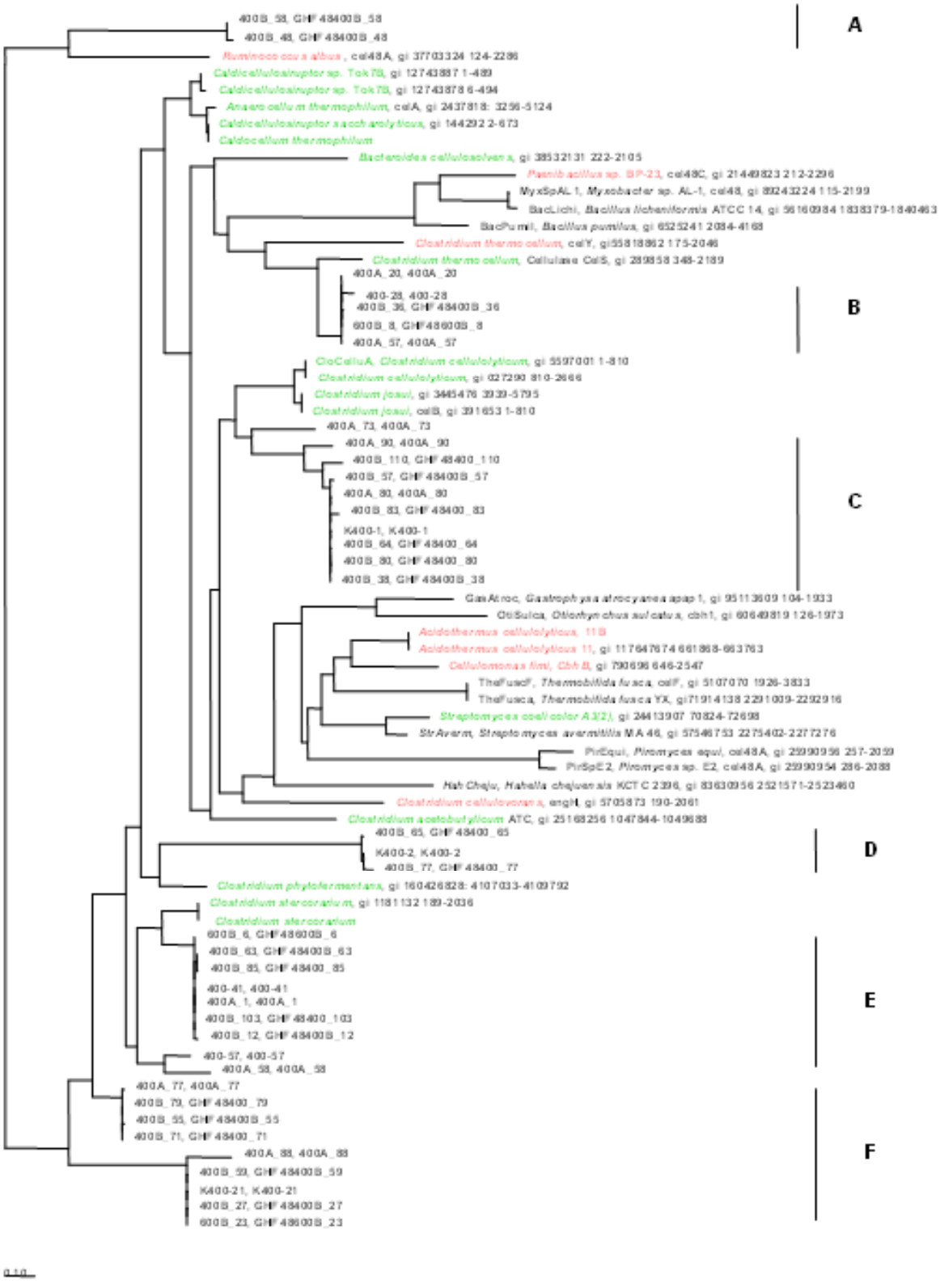

A
B
C
D
E
F
0.10

Abbildung 3: phylogenetischer Baum (Maximum likelihood) von GHF 48 Cellulasegen-Fragmenten kultivierter Organismen und Sequenzen aus der erstellten Klongenbank. **Grün**: Primer binden ohne Missmatch zu GHF48 Gene kultivierter Organismen: **Rot**: Primerbindungsstelle weist einen Missmatch in einem oder beiden Primern auf zu GHF48 Gene kultivierter Organismen.
Cluster A-F zeigen unterschiedlich Gruppen von klonierten GHF48 Genfragmentsequenzen aus der Fermenterprobe

In Abbildung 3 lässt sich erkennen, dass bei dem überwiegenden Teil der Sequenzen aus der Umweltprobe eine Zuordnung zu GHF 48 Gene bisher kultivierter Organismen erkennbar ist (Klongruppen A-E). Teilweise sind die Verwandschaftsverhältnisse aber so entfernt (Cluster A und D), dass davon auszugehen ist, dass die aus der Umweltprobe erhaltenen Sequenzen für Cellulasen von Organismen kodieren, die bisher nicht kultivierten Spezies zuzuordnen sind. Bei den 9 Sequenzen aus Cluster F sind Aussagen, welchen Organismen die entsprechenden Genen zuzuordnen sind noch schwieriger; es ist möglich dass sie einer Gattung angehören, deren Vertreter bisher nicht als Cellulaseabbauer bekannt sind und deren Einfluss auf die Hydrolyse von cellulosehaltigen Materialien daher bisher nicht bekannt ist.

Um festzustellen, ob die Diversität an GHF48 Sequenzen in der Fermenterprobe durch die 38 untersuchten Klone abgedeckt werden konnte, wurde eine Rarefactioncurve erstellt (http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php). In dieser Kurve wurde die Anzahl verschiedener GHF48 Genfragmente gegen die Anzahl analysierter Klone aufgetragen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt. Der Übergang der Kurve in den Plateaubereich deutet darauf hin, dass die für die Fermenterprobe charakteristischen GHF48 Sequenzen identifiziert werden konnten.

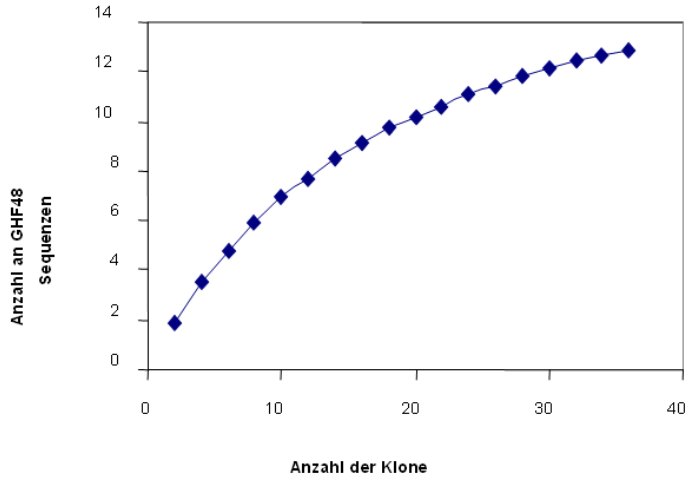


Abbildung 4: Anzahl an unterschiedlichen bakteriellen GHF48 Sequenzen aufgetragen als Funktion der Anzahl an Klonen

III.2.1. Entwicklung eines Mikroarraydesigns mit Hilfe von in silico Werkzeugen

Aus den gewonnenen Daten wurden die Sequenzen für die entsprechenden Sonden abgeleitet und sowohl für variable als auch für konservierte Bereiche Alignments durchgeführt. Hierzu wurde ein neues Verfahren (GoArray, Rimor et al., 2005) eingesetzt bei dem die Spezifität kurzer Oligonukleotide mit der Sensitivität der längeren Oligonukleotide verbunden wird. Mit Hilfe dieser Methode wurden an Hand der Alignments Gruppensonden entwickelt, die die in Abbildung 5 dargestellten sind.

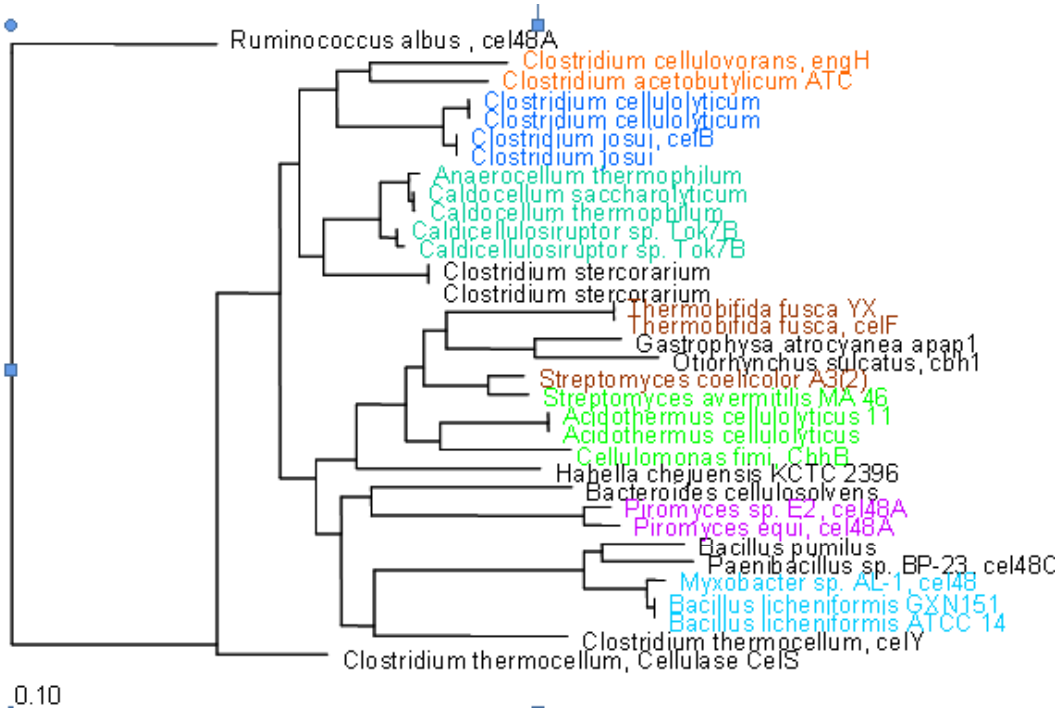


Abbildung 5: mit der GoArray Methode entwickelte Gruppensonden, die Cellulasegene (GHF 48) der in einer Farbe markierten Organismen erfassen

Analog zu den oben beschriebenen Analysen wurde auch für die Glycosyl Hydrolase Familien GHF 5, 6, und 9 verfahren, sodass nach Abschluss der Arbeiten insgesamt 1200 Sequenzen für mögliche Oligonukleotide zur Verfügung standen. Die Cellulasen aus den oben aufgeführten vier GHF Familien spielen nach heutigem Kenntnisstand eine wichtige Rolle bei dem Abbau Cellulose haltigen Materials. Die Cellulasen aus anderen GHF Familien wurden in die Analysen nicht mit einbezogen. Sie umfassen teilweise nur Cellulasen eukaryontischer Herkunft (GHF7, 45 und 61), zum Teil aber auch Familien, in denen Cellulasen nur eine untergeordnete Rolle spielen. So beispielsweise in den Familien GHF 8, 12, 44 und 51, die hauptsächlich Glycosidhydrolasen anderer Spezifitäten beinhalten wie Arabinofuranosidasen (GHF51), Xylanasen und Chitosanasen (GHF8), Xyloglucanhydrolase; ß-1,3-1,4-Glucanase und Xyloglucanendotransglycosylase (GHF12) oder Xyloglucanasen (GHF44). Cellulasen von Organismen, die in anaeroben Habitaten wie Biogasfermentern eine Rolle spielen, sind in keiner der eben aufgezählten Klassen von großer Bedeutung

Für den Mikroarray wurden 756 Sequenzen der 1200 möglichen Sequenzen auf der Basis der folgenden Kriterien ausgewählt. Die exakten Berechungen für jede Sonde wurden mit Hilfe der Software Oligoarray 2.1.3 durchgeführt:

- Die Länge der Oligonukleotide sollte im Bereich zwischen 52 und 72 Basenpaare liegen um Unterschiede in der Schmelztemperatur Tm so gering wie möglich zuhalten.
- Die Bindestelle der Oligonukleotide in den entsprechenden Zielgenen sollte in konservierten Bereichen liegen um die Bildung von stabilen sekundären Faltungen während der Hybridisierung zu vermeiden.
- Eine bestmögliche Spezifität für die Zielsequenz wird bei der Auswahl berücksichtigt
- Die Verteilung möglicher Missmatches sollte über den gesamten Bindungsbereich erfolgen und nicht auf eine Region konzentriert sein.

Jedes Zielgen wurde durch 1 – 3 Sonden repräsentiert, in Abhängigkeit der oben genannten Kriterien. So konnten die 756 ausgewählten Sequenzen insgesamt 412 unterschiedlichen Mikroorganismen Phyla zugeordnet werden. Neben den genannten Sonden wurden eine Reihe von Kontrollsonden aufgetragen, mit deren Hilfe die Qualität der Ergebnisse überprüft werden sollte (Positivkontrolle, Negativkontrolle, Spikingkontrolle; leere Spots). Jede Sonde wurde in 4-facher Wiederholung in 36 Subarrays aufgetragen, sodass sich ein Slide aus 3456 Spots zusammensetzte. Das genaue Design des Mikroarrays ist in Tabelle 2 und Abbildung 6 dargestellt.

Functional group	No. of genes	No. of probes	No. of spots
GHF 5	113	285	1140
GHF 6	23	109	436
GHF 9	208	208	832
GHF 48	68	154	616
Agilent SpotReport Alien Oligos (positive, negative and spiking controls)		5	144
Oligos with different similarity to Agilent SportReport Oligos		30	216
Empty spots			72
Total	412	761	3456

Tabelle 2: Aufbau des Mikroarrays

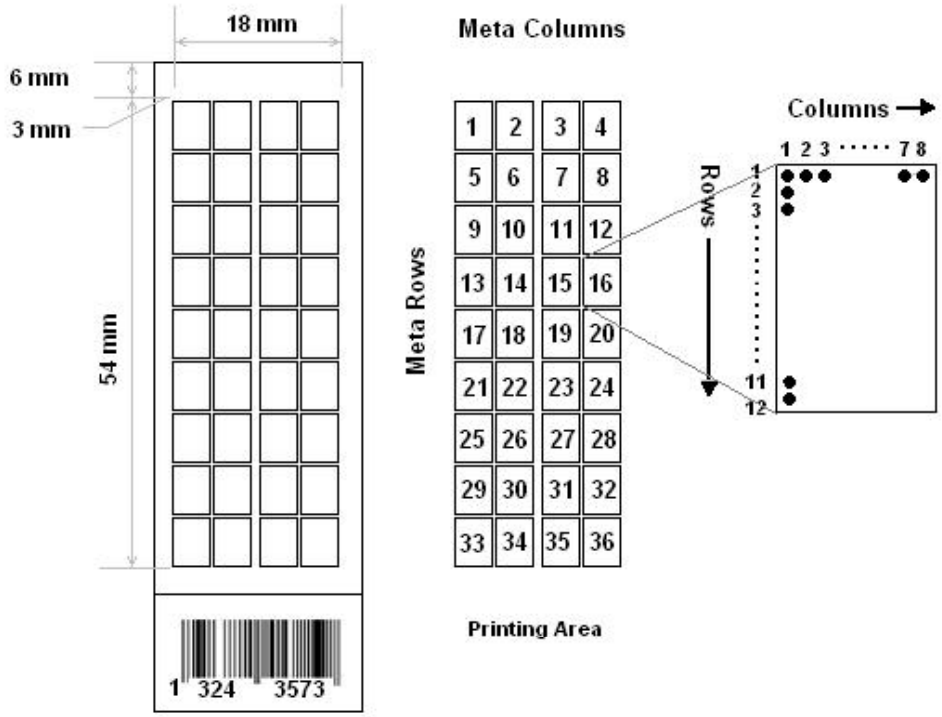


Abbildung 6: Layout des Mikroarrays

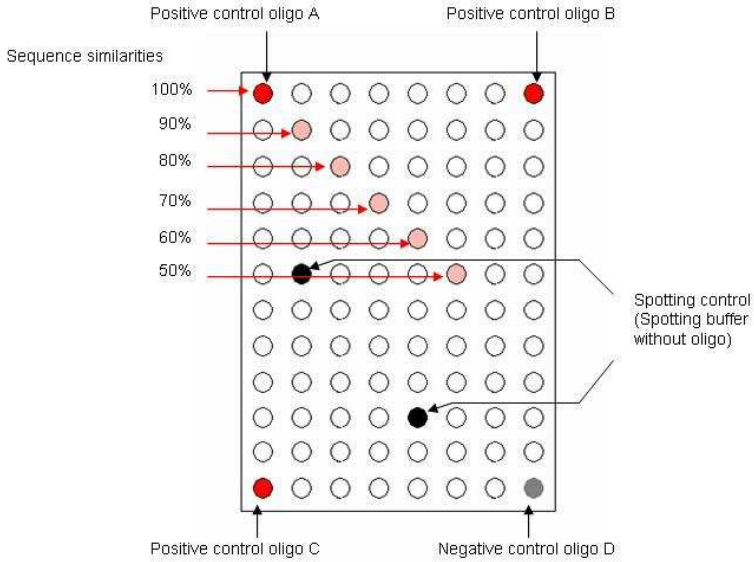


Abbildung 7: Layout eines Subarrays

In Abbildung 7 ist das Layout eines Subarrays dargestellt. In jeweils 3 Ecken wurden die entsprechenden Positivkontrollen gespottet, die vierte Ecke wurde mit der entsprechenden Negativkontrolle versehen. Diese Anordnung verhinderte mögliche Probleme mit der Orientierung während des Auswerte-

und Scanvorgangs. Zwei leere Spots, die als „Spotting Controls“ fungierten wurden nach dem Zufallsprinzip innerhalb des Subarrays verteilt. Um die Spezifität der Hybridisierung in jedem einzelnen Subarray zu kontrollieren wurden künstliche Oligonukleotidsonden mit 50 % - 90 % Ähnlichkeit zu den jeweiligen Positivkontrollen in das Arraydesign integriert.

III.2.2. Herstellung des Mikroarrays und der markierten DNA

Die entwickelten Oligonukleotidsonden wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (Deutschland) hergestellt und anschließend in 50 % DMSO so verdünnt, dass eine finale Konzentration von 40 pmol/µl erreicht wurde. Die gewählte Konzentration der Oligonukleotide basierte auf einer Publikation von Tiquia et al. (2004). Mit Hilfe des MicroGrid II Spotters (Genomic Solutions, USA) wurden jeweils 15 µl pro Spot aufgetragen. Als Slides wurden Glasobjektträger der Firma Corning (UltraGAPS, USA) verwendet. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht. Anschließend wurden die Sonden durch UV Bestrahlung (120 mJ) an die Glasoberfläche der Objektträger gebunden. Die Blockierung der Slides erfolgte nach einer Methode von Eisen und Brown (1999). Die so hergestellten Slides wurden bis zur Verwendung in einem Exsikkator im Dunklen gelagert. Um die Qualität der Slides, vor allem im Hinblick auf die Homogenität der Nukleinsäurekonzentrationen der einzelnen Spots zu überprüfen, wurde jeweils ein fertiges Slide jeder Serie bei 649 nm mit Hilfe eines Mikroarrayscanners (Agilent Technologies, USA) eingelesen. Abbildung 7 zeigt ein typisches Beispiel.

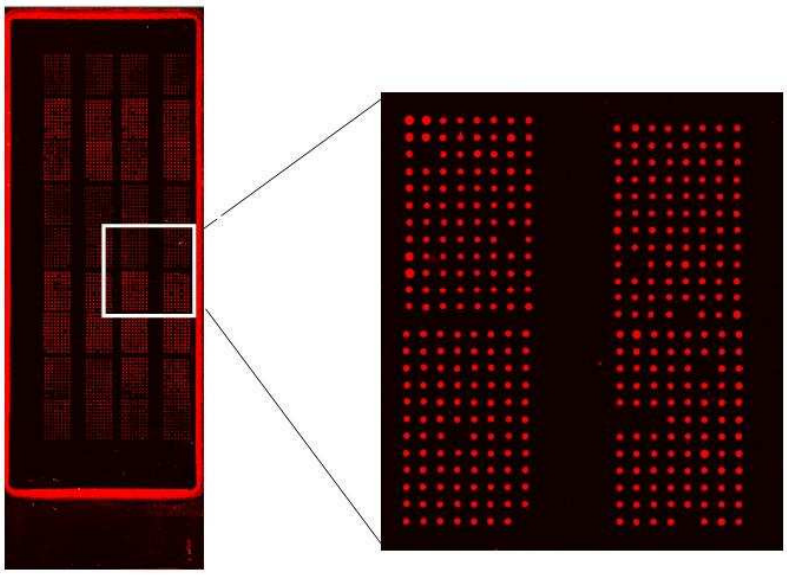


Abbildung 8: Homogenität der einzelnen Spots nach der Herstellung der Arrays und dem Blockierungsschritt

Für die Markierung der genomischen DNA stellte sich der BioPrime DNA Labeling Kit (Invitrogen, Deutschland) als am Besten geeignet heraus. Die markierte DNA wurde mittels des QiAquick Reinigungskits (Quiagen, Deutschland) auf gereinigt und mittels Vakuumrotation (1h 40 °C) auf konzentriert. Die Lagerung der markierten DNA erfolgte bei –20 °C.

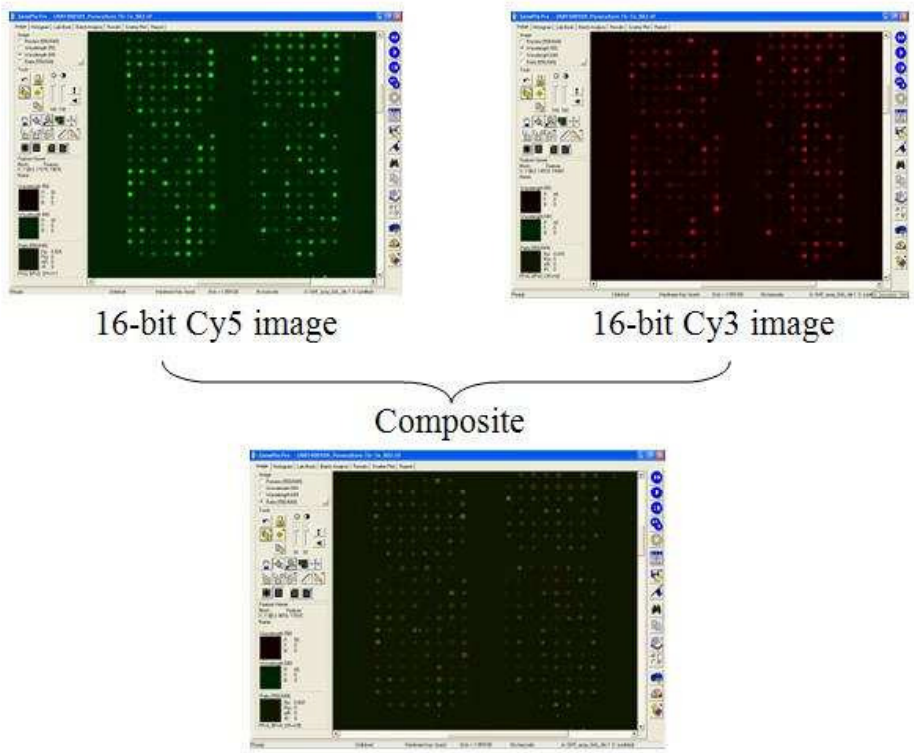


Abbildung 9: Fluoreszenzsignal der beiden Kanäle und das resultierende Bild

III.2.3. Hybridisierung und Datenanalyse

Alle Hybridisierungen wurden mittels einer HS4800 Hybridisierungsstation (Tecan, Österreich) in Triplikaten durchgeführt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 95 °C. Der Blockierungsschritt erfolgte mittels 10ng/µl nichtmarkierter DNA (Heringssperma, Promega). Als Hybridisierungslösung wurde 50 % Formamid, 0.5 xSDS, 6 x SSC und 1 % BSA verwendet. Die Hybridisierung erfolgte bei 50 °C für 16 h.

Die hybridisierten Microarrays wurden mittels eines Agilent Microarryscanners ausgelesen (Agilent Technologies) bei einer Auflösung von 10 µm. Von jedem Kanal wurden 16-bit graustufen TIFF Files erzeugt (Abbildung 9). Die Quantifizierung erfolgte an Hand der TIFF Files mittels der Software GenePix pro Version 6.0; Molecular Devices, USA). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte über ein R-basiertes Statistikmodul (LIMMA – Linear Models for Microarray data).

III.2.4. Validierung des Mikroarrays

Um die Spezifität des Arrays zu überprüfen, wurde genomische DNA von verschiedenen Reinkulturen bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen eingesetzt. Bei der niedrigsten Hybridisierungstemperatur (42 °C), welche der niedrigsten Stringenz entsprach, wurden hohe Unspezifitäten beobachtet (Abbildung (10). Mit zunehmender Hybridisierungstemperatur nahm dieses unspezifische Signal deutlich ab. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 62 °C wurde aber ein sehr schwaches

Signal der entsprechenden Positivkontrolle festgestellt. Das beste Verhältnis zwischen spezifischer Signalstärke und unspezifischen Bindungen ergab sich bei 50 °C, so dass diese Temperatur für alle weiteren Experimente verwendet wurde.

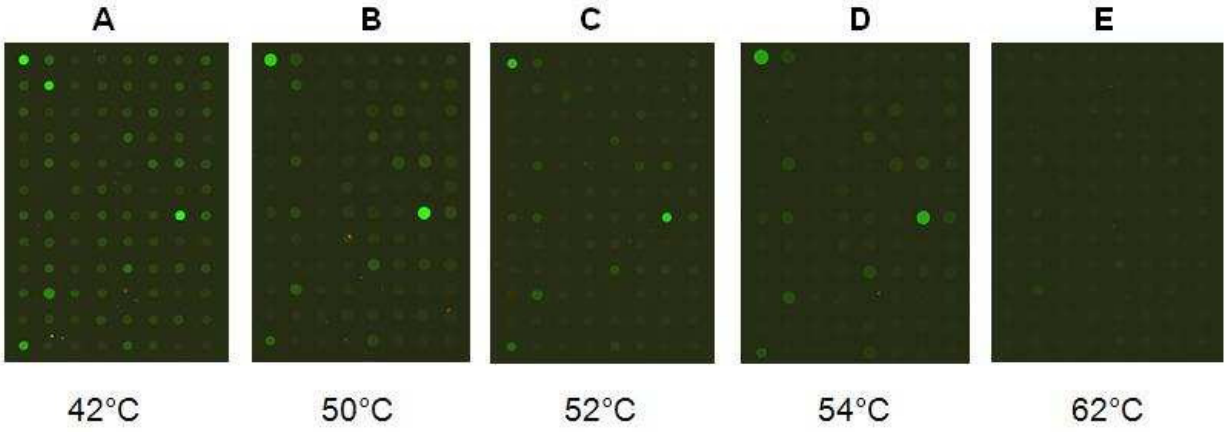


Abbildung 10: Spezifität des Mikroarrays bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen am Beispiel von genomischer DNA von *Clostridium sp*.

Um die Spezifität weiter zu untersuchen wurde eine Serie von künstlichen Oligonukleotidsonden hergestellt die 50 – 90 % Sequenzhomologie mit der entsprechenden Positivkontrolle aufwiesen. Für jede dieser Sonden wurde bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen das SNR (Signal to noise ratio) berechnet. Das Verhältnis wurde nach einer publizierten Formel berechnet (Tiquia et al., 2004).

SNR = (Signal – Hintergrund)/Standardfehler des Hintergrunds [1]

Die Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst:

Sequence similarity (%)	SNR				
	42°C	50°C	52°C	54°C	62°C
100	**25.7±7.1**	**20.6±8.3**	**16.6±6.4**	**15.8±6.1**	1.2±0.5
90	**10.4±4.5**	**3.7±0.7**	2.9±0.5	2.1±0.4	0.6±0.3
80	**3.6±1.5**	1.9±0.4	1.6±0.3	1.6±0.4	0±0.3
70	**3.9±0.9**	1.8±0.5	1.4±0.3	1.6±0.5	0±0.2
60	1.8±0.6	1.6±0.3	1.1±0.4	1.2±0.5	0±0.3
50	1.7±0.5	1.6±0.4	0.9±0.5	0.6±0.3	0±0.1

Tabelle 3: Signal – noise ratio von Sonden mit unterschiedlichen Sequenzhomologien zur jeweiligen Positivkontrolle bei unterschiedlichen Hybridisierungsbedingungen.

Das allgemein akzeptierte minimale SNR das nachweisbar ist liegt bei SNR > 3 (Tiquia et al., 2004). Spots mit einem niedrigeren SNR wurden daher von dem entsprechenden Datensatz entfernt oder als reines „Noise“ Signal gewertet. Die Daten aus Tabelle 3 zeigen sehr deutlich, dass sich das SNR (wie erwartet) mit zunehmender Hybridisierungstemperatur verringert und auch bei gleichbleibender Hybridisierungstemperatur bi reduzierten Sequenzhomologien deutlich niedriger lag. Bei 42 °C Hybridisierungstemperatur wurde das niedrigste nachweisbare Signal bei 70 % Sequenzhomologie der entsprechenden Sonden nachgewiesen. Bei 50 °C Hybridisierungstemperatur dagegen konnte nur noch bei 90 % Sequenzhomologie ein entsprechendes Signal nachgewiesen werden, was die Daten mit *Clostridium sp.* bestätigte. Bei 62 °C Hybridisierungstemperatur wurde für alle Sonden ein SNR < 3 gemessen, sodass hier kein Nachweis mehr möglich war.

Abbildung 11 zeigt das Ergebnis des optimierten Mikroarrays für genomische DNA aus verschiedenen Reinkulturen.

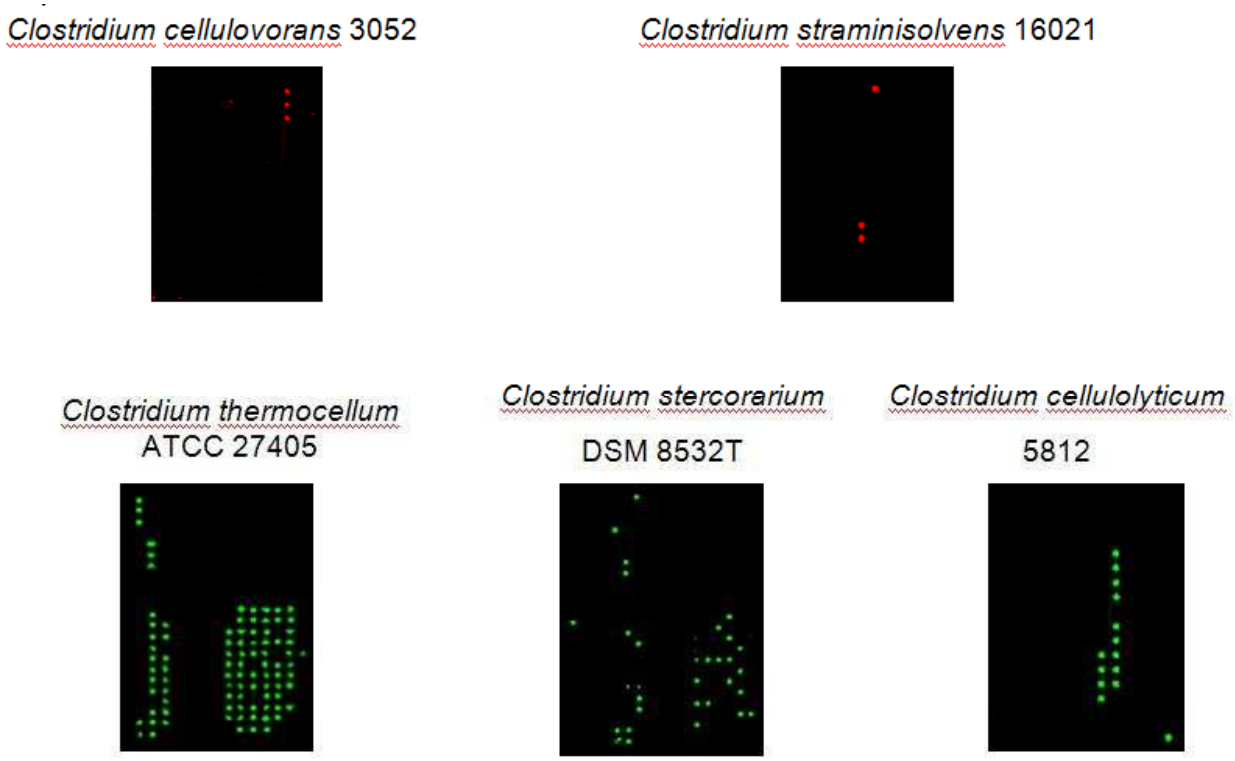


Abbildung 11: Ergebnis der Hybridisierung für genomische DNA von verschiedenen Reinkulturen der Gattung *Clostridium*.

Die Daten zeigen deutlich, dass manche der getesteten *Clostridium* Stämme mehrere Gene der entsprechenden GHF Familien besitzen. Während *C. cellulovorans* nur 1 entsprechendes Gen in seinem Genom integriert hat, konnten für *C. thermocellum* fast 20 der entsprechenden Gene nachgewiesen werden.

Die Nachweisgrenze des GHF Mikroarrays wurde mittels RNA von *Clostridium sp.* getestet. Verschiedene Mengen an Spot Report mRNA (Agilent Technologies; 1 ng, 0.5 ng, 0.05 ng) wurden zu 2

µg RNA von *Clostridium sp*. vor der reversen Transkription gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 50 °C für 16 h (siehe oben). Ein deutliches Floureszenzsignal wurde mit 1 ng der gespikten mRNA erzielt; bei 0.5 ng gespikter RNA war das Signal zwar schwächer aber durchaus erkennbar. Bei 0.05 ng gespikter RNA war kein Signal mehr erkennbar (Abbildung 12).

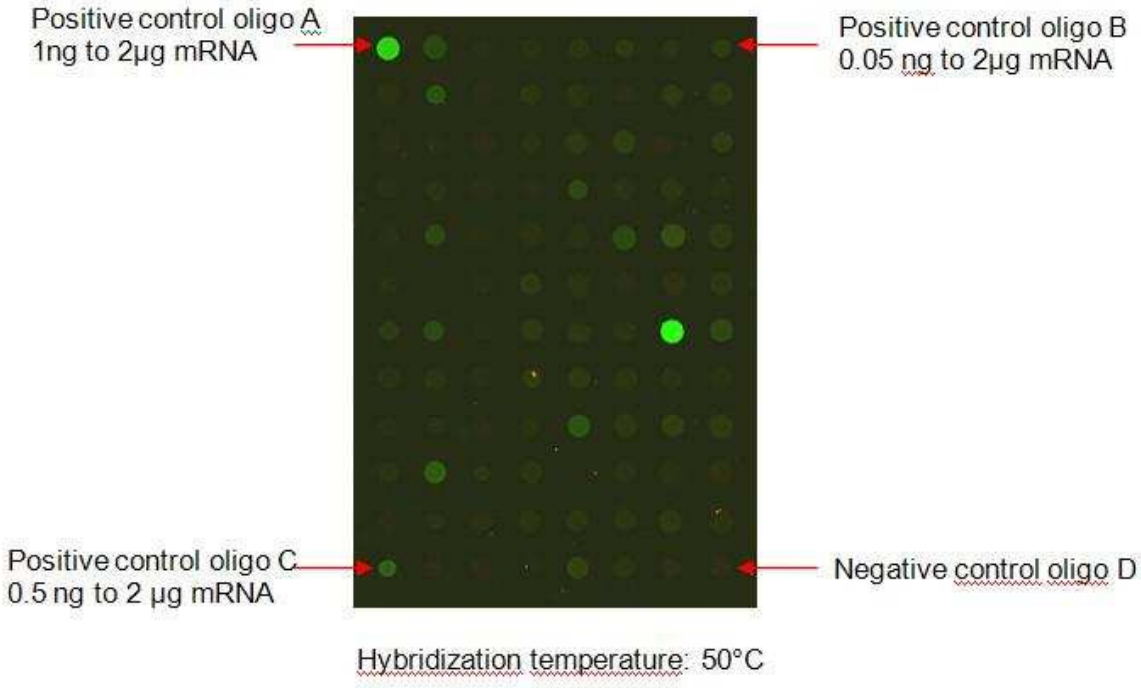


Abbildung 12: Nachweisgrenze des GHF Mikroarrays

Mittels unterschiedlicher Mengen an gespikter cDNA wurde die Quantifizierbarkeit der Daten untersucht. Dazu wurde cDNA unterschiedlicher Mengen von SpotReport mRNA (siehe oben) zu 2 µg genomischer DNA von *Clostridium sp*. (Abbildung 13a) bzw. Community DNA (Abbildung 13b) aus einem Biogasfermenter gegeben. Das Verhältnis zwischen Signalstärke und eingesetzter mRNA wurde für alle Ansätze berechnet. Es wurde sowohl für die Ansätze mit genomischer DNA aus Reinkulturen, wie auch mit den Ansätzen mit genomischer DNA aus Gemeinschaften sehr gute Korrelationen gefunden (R^2=0.98 bzw. R^2=0.90).

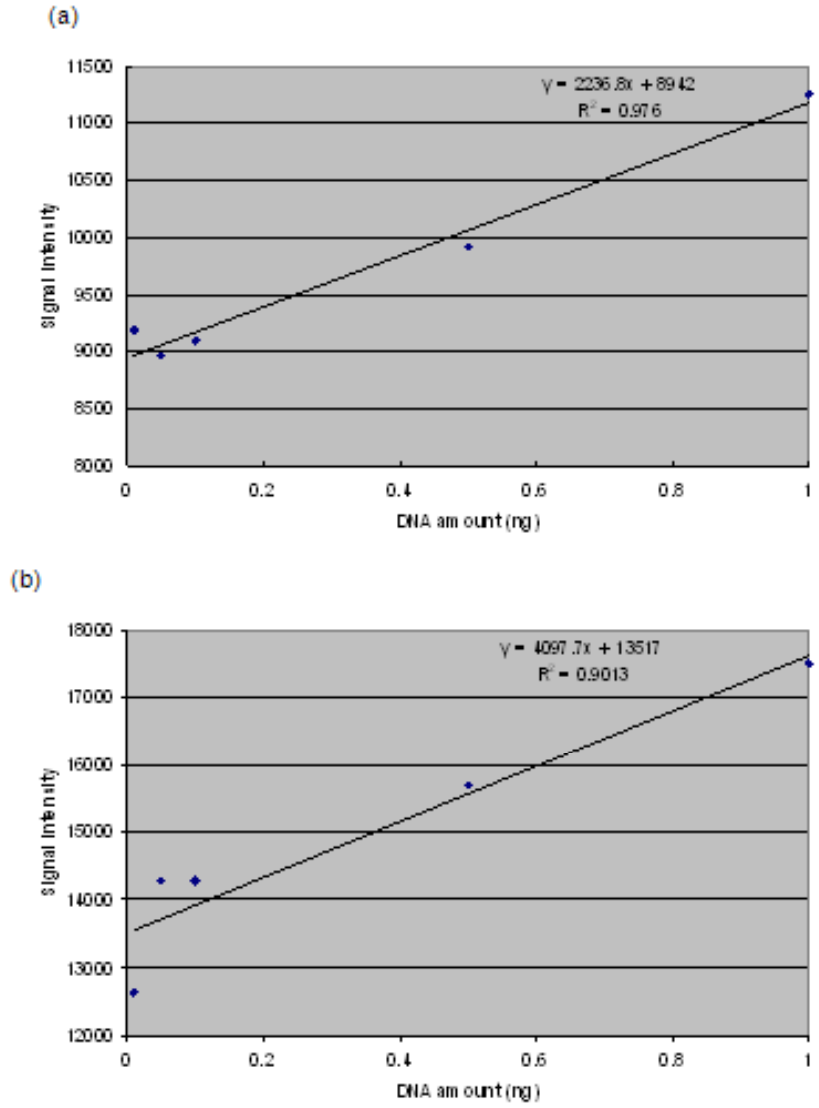


Abbildung 13: Quantitative Validierung des GHF Mikroarrays (a) mittels genomischer DNA aus einer Reinkultur von *Clostridium sp.* (b) mittels genomischer DNA aus einem Biogasreaktor durch Verwendung unterschiedlicher Mengen von SpotReporter mRNA. Die Datenpunkte basieren auf Durchschnittswerten von 3 echten Replikaten und 4fach Wiederholungen auf jedem Slide.

III.2.5. Anwendung des GHF Mikroarrays

Für die Anwendung in der Praxis wurde ein zwei Farben Design des Mikroarrays gewählt. Dieses ist in Abbildung 13 dargestellt. Wie oben beschrieben wurde DNA aus 2 Biogasanlagen (Einphasiger bzw Zweiphasiger Betrieb; Schmack Biogas) extrahiert und mittels Cy3/Cy5 nach dem Zufallsprinzip markiert. 100 pmol der markierten DNA wurden mit dem GHF Mikroarray hybridisiert und wie beschrieben ausgewertet.

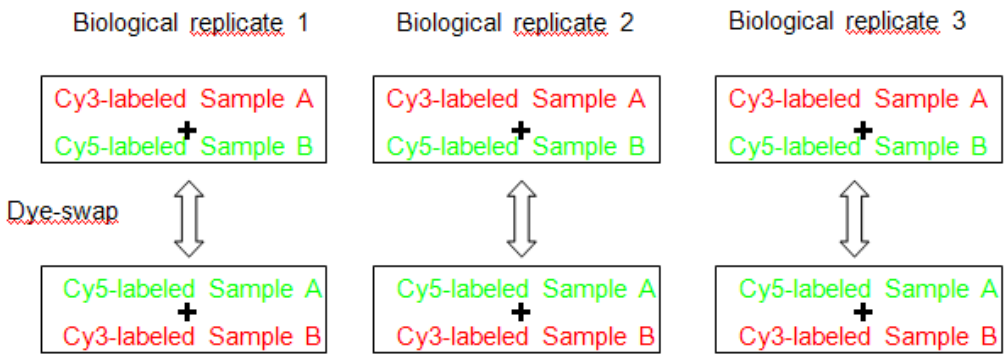


Abbildung 14: Experimentelles Design: Genomische DNA von drei biologische Replikate beider Biogasanlagen wurden jeweils mit Cy3 bzw Cy5 markiert und entsprechend kreuzweise mit dem GHF Mikroarray hybridisiert.

In der einphasigen Anlage wurden GHFs aus 15 unterschiedlichen Spezies als dominant gefunden (SNR >20); dagegen wurden in der zweistufigen Anlage nur GHFs aus 12 unterschiedlichen Spezies detektiert. Überraschenderweise wurde in beiden Anlagen, neben den zu erwartenden GHFs, die den unterschiedlichen Spezies der Gattung *Clostridium* zugeordnet werden konnten, auch GHFs eukaryontischem Ursprungs detektiert, die dem Pilz *Penicillium janthinellum* ähnlich waren. In beiden Anlagetypen wurden aber auch deutliche Unterschiede gefunden, insbesondere was die Bedeutung von GHFs der Familie 5 betraf, die in der 1 stufigen Anlage sehr häufig waren (39 %) dagegen in der zweistufigen Anlage deutlich weniger abundant waren (17 %). Dagegen waren in der zweistufigen Anlage im Verhältnis deutlich mehr GHFs der Familie 48 nachweisbar. Die Daten sind in Tabelle 4 und Abbildung 15 zusammengefasst.

Name of microorganism and enzyme	ID	Average Intensity at 550 nm	Average SNR
One-phase fermentation			
Cellulo monasfimi cenC	GHF9020	21548.5	96.1
Penicillium janthinellum	GHF5259	11098.8	93.0
Clostridium thermocellum ATCC 27405	GHF9057	28115.8	77.3
Burkholderia cenocepacia AU 1054	GHF5033	11486.3	70.7
Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406	GHF9134	18197.3	58.2
*Paenibacillus sp.*BP23	GHF9175	31116.8	41.5
Myxobacter spAL-1	GHF48CLT69	14159.3	37.7
Talaromyces emersonii	GHF5264	15243.5	31.9
Streptomyces spM23	GHF6056	45189.0	29.4
Streptomyces avermitilis MA-4680	GHF48CLT40	11853.3	26.0
Acidothermus cellulolyticus	GHF48CLT52	24514.8	23.5
Clostridium cellulovorans	GHF9041	19120.8	21.7
Prevotella ruminicola	GHF5155	9238.5	21.4
Streptomyces coelicolor	GHF48CLT36	13704.3	20.5
Mycobacterium vanbaalenii PYR-2	GHF6037	18183.3	20.0
Two-phase fermentation (hydrolysis phase)			
Fibrobacter succinogenes S85	GHF9148	54978.0	38.5
Micromonospora cellulolyticum	GHF6022	18769.8	29.7
Penicillium.janthinellum	GHF5259	14724.3	29.7
Hahella chejuensis KCTC 2396	GHF6014	26146.3	25.1
Eubacterium cellulosolvens cbpB	GHF9146	29177.8	24.1
Clostridium cellulolyticum	GHF9038	34464.8	22.9
Neocallimastix patriciarum	GHF5251	9438.5	21.6
Streptomyces coelicolor	GHF6045	24291.8	21.5
Humicola insolens	GHF6E04	18658.8	21.3
Neocallimastix frontalis	GHF5247	11998.3	21.1
Uncultured bacteriumclone RC3	GHF5232	17626.8	21.1
Fibrobacter succinogenes S85	GHF5132	50897.0	20.2

Tabelle 4: Häufigste Vertreter von Spezies mit Cellulasen der Familien GHF 5,6,9 und 48 in einer einstufigen und zweistufigen Biogasanlage (SNR>20)

Um die Unterschied zwischen beiden Anlagetypen besser herauszuarbeiten wurden die Daten statistisch ausgewertet. Eine entsprechende Vulcanoplotanalyse ist als Scatter-plot Diagramm in Abbildung 16 dargestellt. Auf dieser Basis konnten diejenigen Spezies ermittelt werden die sich am deutlichsten in ihrer Abundanz in beiden Anlagetypen unterscheiden. Von besonderem statistischen Interesse sind jene 10 Mikroorganismen Spezies, die sich in Ihren Log2 Odd Werten über – 4.15 befinden. Die deutlichsten Unterschiede fanden sich für eine *Streptomyces* Spezies. Diese 10 Spezies sind in Tabelle 5 aufgeführt. 5 dieser Spezies codieren für Gene der GHF 5 Familie, jeweils 2 für GHF Familie 9 und 48 und eine Spezies für GHF Familie 6.

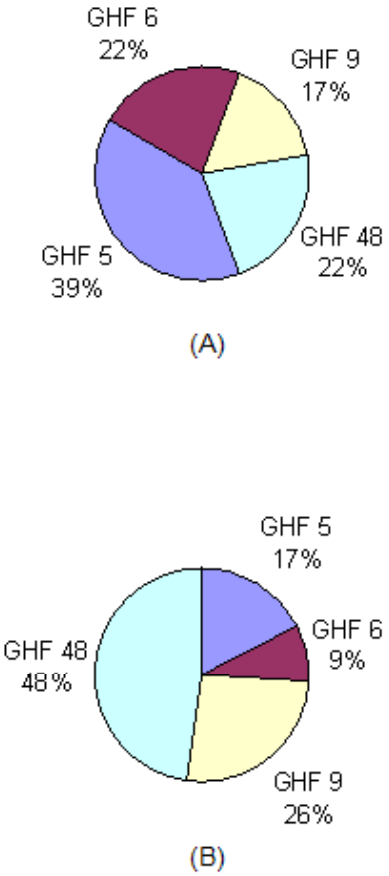


Abbildung 15: Verteilung der einzelnen GHF Familien in den beiden Biogasanlagen (A) einstufiger Betrieb; (B) zweistufiger Betrieb

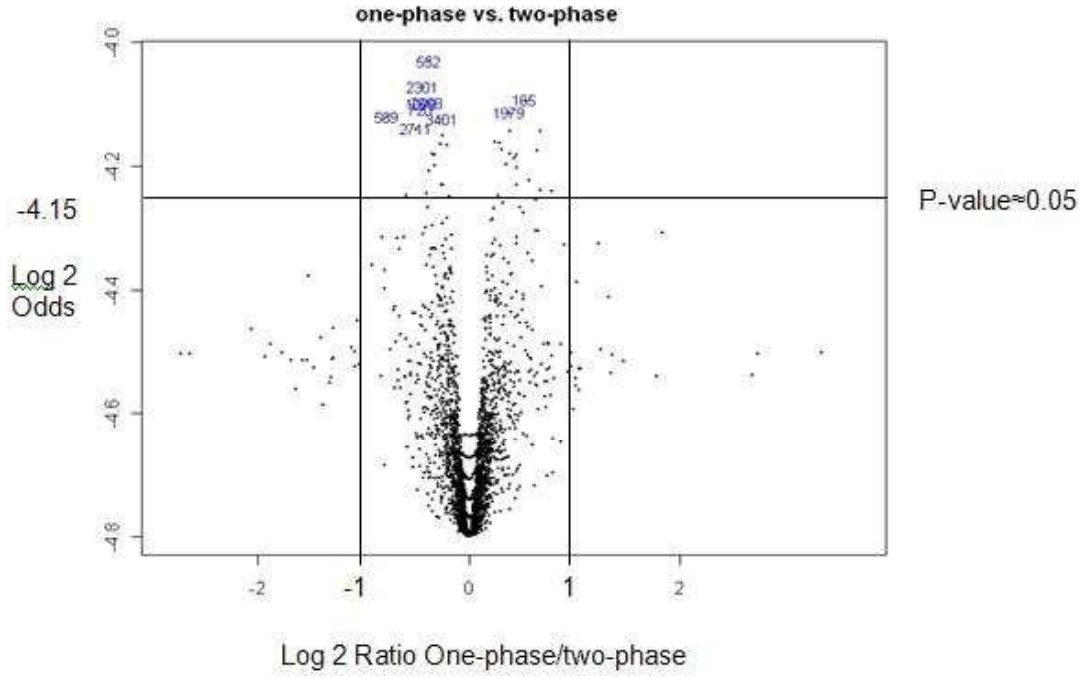


Abbildung 16: Vulcano Plot Analyse der gewonnenen Mikroarraydaten für die GHF Familien 5,6,9, und 48 im Vergleich einer ein- und zweistufigen Biogasanalage

Rank	Microorganism	ID	Log Fold Change*	P-Value	Log Odds (B)
1	*Streptomyces coelicolorA3(2)25/29*	GHF6049	-0.377	0.0279	-4.03
2	*Uncultured bacterium pGXN1044*	GHF5220	-0.436	0.0225	-4.07
3	*Leuconostoc mesenteroides ATCC 8293*	GHF5134	0.531	0.0255	-4.09
4	*Cellulomonas fimi*	GHF9017	-0.399	0.0384	-4.10
5	*Clostridium thermocellum*	GHF9092	-0.449	0.0388	-4.10
6	*Erwinia carotovora subsp carotovorac*	GHF5109	0.376	0.0414	-4.11
7	*Clostridium.stercorarium*	GHF48CLT15	-0.250	0.0434	-4.12
8	*GHF48400B_36c 2*	GHF48CLO3	0.379	0.0472	-4.14
9	*Pectobacterium carotovorum*	GHF5099	0.677	0.0344	-4.14
10	*Neocallimastix frontalis*	GHF5246	-0.256	0.0489	-4.15

Tabelle 5: Unterschiedliche Häufigkeiten der Spezies mit Cellulasen der Familien GHF 5,6,9 und 48 in einer einstufigen und zweistufigen Biogasanlage (SNR>20)

III.2.6. Literatur

Boerman S, Webster D (2005) Control of heme content in Viteroscilla by oxygen. J. Gen Appl. Microbiol **28**: 35-43.

Eisen MB, Brown PO (1999) DNA-arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* **303**:179-205.

Griffiths RL, Whizeley AS, O`Donnell G, Bailey MJ (2000) Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5488 - 5491

Oelmüller U, Krüger N, Steinbüchel A, Freidrich CG (1990) Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. *J. Microbiol. Methods* 11: 73 – 81.

Rimour S, Hill D, Militon C. (2005) GoArrays: highly dynamic and efficient microarray probe design. *Bioimformatics* 21: 1094-1103, 2005.

Stahl DA, Flesher B, Mansfield, HR, Montgomery L (1988) Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **54:**1079-1084

Tiquia SM, Wu LY, Chong SC, Passovets S, Xu D, Xu Y, Zhou J (2004) Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. *Biotechniques* **36**: 664-675.

Wu L, Kellogg L, Devol AH, Tiedje JM, Zhou, J (2008) Microarray-based characterization of microbial community functional structure and heterogeneity in marine sediments from the gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4516-4529.

Wirta, V. (2005). Analysis of DNA microarray data using the KTH-package and the R environment for statistical computing. Stockholm, Sweden, Department ofBiotechnology, Royal Institute of Technology.

IV. Verwertung

Wie im ursprünglichen Antrag beschrieben wurde im Rahmen des Projektes erfolgreich ein Mikroarray zum Nachweis wichtiger Organismengruppen entwickelt die am Celluloseabbau in Biogasanlagen beteiligt sind. Es konnte ferner gezeigt werden, dass sich unterschiedliche Anlagetypen (einstufig vs zweistufig) auch wenn sie mit dem gleichen Substrat beschickt werden sich deutlich in den genannten mikrobiellen Gemeinschaften unterscheiden.

Um den entwickelten Mikorarray aber gezielt für eine Steuerung von Biogasanlagen einsetzen zu können (Veränderung relevanter Steuerparameter bzw. Zudosierung von Mikroorganismen oder deren Enzyme) müssten allerdings noch mehrere Anlagen untersucht werden, insbesondere auch Anlagen mit einer guten- bzw. niedrigen Effizienz oder Methanproduktionsleistung des gleichen Anlagetypes um dann wichtige Populationen identifizieren zu können, die an den jeweiligen Hydrolyseschritten beteiligt sind. Entsprechende Untersuchungen sind mit der Firma DSM in Berlin (www.dsm.com) angelaufen.

Aufgrund der Komplexität der Methodik und Auswertung, wird eine wirtschaftliche Verwertung des entwickelten Mikroarrays weniger als Kit erfolgen, der kommerziell vertrieben wird und von Betreibern von Biogasanlagen in Eigenregie angewendet werden kann, sondern eher als ein Expertentool das von Ingenieurbüros und anderen an der Planung von Biogasanlagen Beteiligten bei der Projektierung bzw. in der Einlaufphase von Biogasanlagen Verwendung finden könnte.

V. Erkenntnisse von Dritten

Keine

VI. Veröffentlichungen

Engel M, Dong X. Schloter M. Development of a functional microarray for detection of selected GHF families in environmental samples; J. Microbiol. Methods: submitted

Dong X, Engel M, Schloter M. Differences in cellulose degrading communities in a one step and two step biogas reactor. ISME journal: in prep.