Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema: *AcEta* (effiziente Hydrolyse und Acidogenese): Bioprozesstechnische Optimierung zweistufiger landwirtschaftlicher Biogasanlagen

Teilvorhaben 1: Bioprozessführung
Teilvorhaben 2: Populationsanalyse

Zuwendungsempfänger:

TV 1: **ttz Bremerhaven, Cordes+Winterberg GbR**

TV 2: **Hochschule Anhalt (FH)**

Förderkennzeichen:

22015412 (TV 1) und **22011413 (TV 2)**

Laufzeit:

01.09.2014 bis **31.10.2017 (TV 1)**

01.12.2014 bis **31.08.2017 (TV 2)**

Monat der Erstellung:

05/2018

Veröffentlichkeitsdatum: **17.10.2018**

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

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

Verbundprojekt

AcEta (effiziente Hydrolyse und Acidogenese): Bioprozesstechnische Optimierung zweistufiger landwirtschaftlicher Biogasanlagen

Projektförderung

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Projektträger

Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V.
Hofplatz 1
18276 Gülzow

Koordinator, Verbundpartner und Auftraggeber des Unterauftrags

ttz Bremerhaven
Wasser-, Energie- und Landschaftsmanagement
Am Lunedeich 12
27572 Bremerhaven

Unterauftragnehmer

Büro CORDES+WINTERBERG Technische Bioprozesse Biogas/Energie

CORDES+WINTERBERG GbR
Seestraße 2A
39175 Biederitz

Projektpartner

Hochschule Anhalt (FH)
Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik
Strenzfelder Allee 28
06406 Bernburg

FKZ

FKZ 22015412 und 22011413

Autoren

Prof. Dr.-Ing. Gerhard Schories
Prof. Dr. Christiana Cordes
Dr. Ralf Winterberg

Ort und Datum

Bremerhaven, Bernburg und Biederitz

25.05.2018

Adresse und Ansprechpartner

ttz Bremerhaven
Verein zur Förderung des Technologietransfers an der Hochschule Bremerhaven e. V.

Am Lunedeich 12
27572 Bremerhaven
www.ttz-bremerhaven.de

Ansprechpartner	Prof. Dr.-Ing. Gerhard Schories
Fon	04 71 / 80934 102
Fax	04 71 / 80934 299
Mobil	01 60/97 26 25 77
E-Mail	gschories@ttz-bremerhaven.de

Hochschule Anhalt (FH)
Fachbereich Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik

Strenzfelder Allee 28
06406 Bernburg
www.hs-anhalt.de

Ansprechpartnerin	Prof. Dr. rer. nat. Christiana Cordes
Fon	0 34 71 / 3 55 – 35 37
Mobil	01 71 / 7 60 02 24
E-Mail	c.cordes@bwp.hs-anhalt.de

CORDES+WINTERBERG GbR (im Unterauftrag des ttz)
Technische Bioprozesse und Bioenergie

Seestraße 2A
39175 Biederitz
www.bioprozesse.de

Ansprechpartner	Dr. rer. nat. Ralf Winterberg
Fon	03 92 92 / 66 – 3 51
Fax	03 92 92 / 66 – 9 46
Mobil	01 70 / 9 01 08 55
E-Mail	winterberg@bioprozesse.de

Dank

Die Autoren danken dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft und der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe für die Bereitstellung finanzieller Mittel zur Bearbeitung des Projekts und für die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit.

Ohne die engagierte Unterstützung der Felduntersuchungen durch die Betreiber und Fahrer der untersuchten Biogasanlagen wäre die vorliegende Studie nicht realisierbar gewesen. Auch ihnen sei daher an dieser Stelle herzlich gedankt.

Inhalt

1. Ziele 9
1.1 Aufgabenstellung, Planung und Ablauf des Projekts
ttz Bremerhaven, Hochschule Anhalt, Cordes+Winterberg 10
1.1.1 Aufgabenstellung 10
1.1.2 Planung und Ablauf des Vorhabens 10
1.1.3 Projektvoraussetzungen 11
1.2 Stand des Wissens und der Technik
Cordes+Winterberg, Hochschule Anhalt, ttz Bremerhaven 11
1.2.1 Anaerobe Nahrungskette 11
1.2.2 Population der Hydrolyse- und versäuerungsstufen 12
1.2.3 Geschwindigkeitsbestimmende Schritte 14
1.2.4 Physiologische Optima der hydrolytischen und acidogenen Bakterien 14
1.2.5 Katabolitrepression der acidogenen Bakterien 17
1.2.6 Endprodukthemmung der acidogenen Bakterien 17
1.2.7 Kinetik und Modellierung 17
1.2.8 Rezirkulation 21
1.2.9 Entwicklung zweiphasiger Systeme 21
1.2.10 Hersteller 22
1.2.11 Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte 22
1.2.12 Fachliteratur und Informationsdienste 22
1.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 24
1.3.1 ttz Bremerhaven 24
1.3.2 Cordes+Winterberg 24
1.3.3 Hochschule Anhalt 24

2. Methoden, Ergebnisse und Diskussion 25
2.1 Definitionen
Cordes+Winterberg 25
2.1.1 Phasen und Stufen 25
2.1.2 Vorstufen 25
2.2 Methoden 27
2.2.1 Methoden der Bioprozessanalyse
ttz Bremerhaven 27
2.2.2 Methoden der Populationsanalyse
Hochschule Anhalt 35
2.3 Ergebnisse und Diskussion I: Betriebsdatenanalyse von 20 Biogasanlagen
Cordes+Winterberg 39
2.4 Ergebnisse und Diskussion II: Messungen an 6 Biogasanlagen
ttz Bremerhaven, Cordes+Winterberg 44
2.4.1 Rezirkulation 45
2.4.2 Methanemissionen 46
2.4.3 Einfluss der Rührwerksaktivität auf die Biogasfreisetzung (Sonderuntersuchung BGA 18) 48
2.4.4 Wasserstoffkonzentrationen im Biogas der Vorstufen 50
2.4.5 Substratabbau und Produktbildung in den Vorstufen 52
2.4.6 Einfluss einzelner Betriebsbedingungen auf den Bioprozess 58
2.4.7 Nebenergebnisse und Erfahrungen *ttz Bremerhaven, Cordes+Winterberg* 59
2.5 Ergebnisse und Diskussion III: MALDI-TOF-MS-Analysen und quantitative PCR-Analysen
Hochschule Anhalt 60
2.5.1 Beschreibung der Ergebnisse zu den einzelnen Anlagen 60

2.5.2 Einfluss der Rezirkulation 68
2.5.3 Statistische Auswertungen 69
2.5.4 Substratabhängige Populationsüberschneidungen 69
2.5.5 Zwischenfazit 72
2.5.6 Nebenergebnisse und Erfahrungen 72
2.6 Ergebnisse und Diskussion IV: Laborversuche zur Kinetik der Hydrolyse und Versäuerung
ttz Bremerhaven 75
2.6.1 Einfluss der hydraulischen Verweilzeit 75
2.6.2 Einfluss der Rezirkulationsrate 81
2.6.3 Schlussfolgerungen aus den Technikumsversuchen 85
2.7 Ergebnisse und Diskussion V: Modellierung der Umsetzungen in Hydrolyse- und Versäuerungsstufen
ttz Bremerhaven 85
2.7.1 Hydrolyse und Versäuerung (Reaktor 1) 86
2.7.2 Fermenter (Reaktor) 2 87
2.7.3 Nachgärer (Reaktor 3) 88
2.8 Ergebnisse und Diskussion VI: Bewertung der Bioprozesseffizienz
Cordes+Winterberg 93
2.8.1 Effizienz der Hydrolyse 93
2.8.2 Effizienz der Gärproduktbildung 93
2.8.3 Neubewertung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen zur Vergärung faserreicher landwirtschaftlicher Substrate 94
2.9 Ergebnisse und Diskussion VI: Bewertung der Biogasemissionen
Cordes+Winterberg 94
2.9.1 Wirtschaftliche Bewertung der Methanverluste 94
2.9.2 Methanemissionen der Vorstufen vor dem Hintergrund des Klimaschutzes 95
2.9.3 Betriebssicherheit und Arbeitsschutz 97

3. Zusammenfassung
ttz Bremerhaven, Hochschule Anhalt, Cordes+Winterberg 99
3.1 Ergebnisse 99
3.2 Optimierungsoptionen und Empfehlungen 102
3.3 Verwertung 103
3.3.1 Verwertbarkeit der Ergebnisse 103
3.3.2 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten 104
3.3.3 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten 104
3.4 Erkenntnisse von Dritten 104
3.4.1 Teilprojekt 1 104
3.4.2 Teilprojekt 2 104
3.5 Veröffentlichungen der Projektpartner 105
3.5.1 Vorträge 105
3.5.2 Veröffentlichungen 105
3.5.3 Poster 105

4. Literatur 106
4.1 Teilvorhaben 1
ttz Bremerhaven, Cordes+Winterberg 106
4.1.1 Wissenschaftliche Literatur 106
4.1.2 Regelwerk zur Analytik 110
4.1.3 Regelwerk zur Arbeitssicherheit und zum Explosionsschutz 110
4.2 Teilvorhaben 2
Hochschule Anhalt 110

5. Anhang 114
5.1 Teilvorhaben 1: Bioprozessführung (FKZ 22015412) 114
5.1.1 Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens 114
5.1.2 Bearbeitete Arbeitspakete 114
5.1.3 Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens 115
5.2 Teilvorhaben 2: Populationsanalyse (FKZ 22011413) 115
5.2.1 Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens 115
5.2.2 Bearbeitete Arbeitspakete der Hochschule Anhalt (Stand HSA 05/2018) 116
5.2.3 Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens 116

Abkürzungen, Einheiten und Symbole

BGA	Biogasanlage
BHKW	Blockheizkraftwerk
BSB	Biochemischer Sauerstoffbedarf
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
Cell	Cellulosemassenstrom in der Modellierung
CH_4	Massenstrom Methan in der Modellierung
CO_2	Massenstrom Kohlenstoffioxid in der Modellierung
C+W	Cordes+Winterberg GbR
DBFZ	Deutsches Biomasseforschungszentrum gGmbH
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
FM	Feuchtmasse
FOS	Flüchtige organische Säuren
GPS	Ganzpflanzensilage
GRL	Gärrückstandslager
H+V-Stufe	Hydrolyse- und Versäuerungsstufe
HS Anhalt	Hochschule Anhalt
K	kinetische Konstante
kW	Kilowatt
kWh	Kilowattstunde
kW_{el}	Kilowattstunde elektrische Energie (Strom)
m^3	Kubikmeter
m^3_N	Normkubikmeter (0°C, 1,013 bar, trockenes Gas)
µ	Wachstumsrate der Mikroorganismen (h^{-1})
NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
nb	nicht bestimmt
NG	Nachgärer
nn	nicht nachweisbar
NWG	analytische Nachweisgrenze
oA	ohne Angabe
oTM	organische Trockensubstanz
oTS	organische Trockensubstanz (gleichbedeutend mit "organische Trockenmasse")
PLZ	Postleitzahl
Re	Rezirkulationsrate in der Modellierung
RT	hydraulische Verweilzeit in der Modellierung
TM	Trockenmasse
TS	Trockensubstanz (gleichbedeutend mit Trockenmasse")
ttz	ttz Bremerhaven e. V.
V	Volumen
VFA	volatile fatty acids, kurzkettige (flüchtige) organische Fettsäuren

Indizes

aero	Hydrolyse und Versäuerung
anaero	Acetogenese und Methanbildung
cell	Cellulose
destruction	Abbau
in	Zufihr
out	Abfuhr
VFA	Volatile Fatty Acids (flüchtige Fettsäuren)

Griechische Symbole

α	dimensionsloser Parameter für die Modellierung
β	dimensionsloser Parameter für die Modellierung
γ	dimensionsloser Parameter für die Modellierung
δ	dimensionsloser Parameter für die Modellierung
ε	dimensionsloser Parameter für die Modellierung
μ	Wachstumsrate der Mikroorganismen (h^{-1}), globale Wachstumsrate der Mikroorganismen in der Modellierung
ζ	dimensionsloser Parameter für die Modellierung

1. Ziele

Seit den frühen 1970er Jahren wird im Bereich der Biogaserzeugung aus komplexen Substraten die bioprozesstechnische Trennung der Hydrolyse und Acidogenese von der Aceto- und Methanogenese empfohlen. Bis heute werden die Argumente der frühen Autoren (Pohland and Gosh, 1971) wiederholt: das Ziel ist die separate Optimierung beider Phasen, um insgesamt eine höhere Produktivität und Umsatzeffizienz erreichen zu können. Zudem soll die Separation der Phasen die empfindlichen Methanbakterien vor unkontrollierten Erhöhungen der Konzentration organischer Säuren schützen (Preißler, 2008, Preißler et al., 2008).

Heute erfahren Hydrolyse- und Versäuerungsstufen als Komponenten großtechnischer Biogasanlagen eine zunehmende Verbreitung. Der Anteil der deutschen landwirtschaftlichen Biogasanlagen, die mit einer Hydrolyse- und Versäuerungsstufe ausgestattet sind, dürfte zurzeit bei ca. 8 % liegen. Regional sind höhere Anteile möglich (s. folgende Tabelle).

Tabelle 1: Anteil der landwirtschaftlichen Biogasanlage mit Anmaischer oder Hydrolyse- und Versäuerungsstufe nach Ergebnissen verschiedener Studien

Studie	Anzahl der untersuchten Biogasanlagen	davon mit		Bezugsjahr	erfasste Region
		Vorgrube/ Anmaischer (%)	Hydrolyse- und Versäuerungs-stufe (%)		
FNR, 2005	61	n. b.	8	2001	Deutschland
FNR, 2009	63	8	8	2005	Deutschland
Winterberg, 2013	44	n. b.	20	2010	Sachsen-Anhalt
Winterberg et al., 2012	18	n. b.	17	2010	Altmark

n. b.: nicht bestimmt

Angesichts eines aktuellen Gesamtbestandes der deutschen Biogasanlagen von ca. 9.200 Anlagen (Stand: Mai 2018) wird die Relevanz eines wirtschaftlich und prozesstechnisch optimalen Betriebs dieser Anlagenkomponenten für die Landwirtschaft und die Umwelt (vor allem das Klima) deutlich.

Praxisuntersuchungen haben allerdings gezeigt, dass eine fehlerhafte Auslegung der Hydrolyse- und Versäuerungsstufen sehr weit verbreitet ist. Energieverluste (Wasserstoff- und Methanemissionen), hohe Betriebsaufwendungen und unnötige Klimagasemissionen (Methan) sind häufige Folgen. Wesentliche Ursache dieser unerwünschten Entwicklung ist das Fehlen geeigneter Planungsgrundlagen: ideologische Auffassungen dominieren anstelle einer soliden Prozessauslegung.

Mit dem Verbundprojekt *AcEta* sollten durch Felduntersuchungen an großtechnischen Hydrolyse- und Versäuerungsstufen, molekularbiologische Populationsanalysen, kinetische Untersuchungen im Labor, die Zusammenstellung von Faustzahlen für die Hydrolyse/Versäuerung und die Erarbeitung von Auslegungsempfehlungen die dringend benötigten Grundlagen für die fundierte Auslegung und den effizienten Betrieb von Hydrolyse- und Versäuerungen geschaffen werden.

Die am Markt bestehende Unsicherheit verdeutlichen die folgenden Zitate:

- "Ich würde diese Anlage auch heute wieder so bauen. Die niedrigen Wartungskosten und die hohe Betriebssicherheit überzeugen mich". (Betreiber der Biogasanlage 16, 14.10.2015)
- "Nie wieder würde ich mich für eine zweistufige Anlage entscheiden. Die enormen Energieverluste und die hohen Investitionskosten machen das System unwirtschaftlich". (Betreiber der Biogasanlage 4, 14.10.2015)

Zwei Betreiber, zwei gegensätzliche Erfahrungen mit zweiphasigen Biogasanlagen, deren Verfahrenskonzepte sehr ähnlich sind. Besser als durch diese Stellungnahmen, die im Rahmen zweier Telefoninterviews im Oktober 2015 im Abstand von wenigen Minuten erfolgten, konnte das Motiv der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

1.1 Aufgabenstellung, Planung und Ablauf des Projekts

ttz Bremerhaven, Hochschule Anhalt, Cordes+Winterberg

1.1.1 Aufgabenstellung

Die Bedeutung der Biogastechnologie als Baustein zukünftiger Energiesysteme nimmt beständig zu: In Deutschland werden zurzeit mehr als 9.200 Biogasanlagen betrieben, vor allem im landwirtschaftlichen Bereich. Trotz der mittlerweile jahrzehntelangen Nutzung der Biogastechnologie erfolgt die Auslegung der Anlagenkonfigurationen hinsichtlich der Bioprozesstechnik immer noch weitgehend auf empirischer Basis. Die Bioprozessplanung kann die Anforderungen an eine moderne Projektplanung so nicht erfüllen. Gravierende Effizienzdefizite zahlreicher Biogasanlagen sind die Folge.

Dies gilt auch für die zurzeit von vielen Beratern, Planern, Herstellern und Betreibern propagierte vorgeschaltete Hydrolyse- und Versäuerungsstufe, die die Effizienz von Biogasanlagen steigern soll. Vor allem wegen der energie- und umweltpolitisch angestrebten Umstellung auf Mais-Alternativen sowie die Zunahme der Rest- und Abfallstoffnutzung wird die zweistufige Bioprozessführung mit Hydrolyse- und Versäuerungsstufe eine zunehmende Bedeutung erhalten. Eine wissensbasierte Auslegung dieser Prozessstufe wird also dringend benötigt.

Mit dem Projekt *AcEta* sollte diese Grundlage für die Auslegung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen geschaffen werden. Das Projekt gliedert sich in zwei Teilvorhaben:

- TV 1: Bioprozessführung (FKZ 22015412)
  Bearbeiter: *ttz Bremerhaven e. V*. (ttz), Cordes+Winterberg GbR (C+W), 38 Monate Laufzeit
- TV 2: Populationsanalyse (FKZ 22011413)
  Bearbeiter: Hochschule Anhalt (HS Anhalt), 33 Monate Laufzeit

Die Hauptaufgaben des Vorhabens *AcEta* können wie folgt untergliedert werden:

1. Auswertung und Bilanzierung der Betriebsdaten von ca. 20 Hydrolyse- und Versäuerungsstufen (und der nachgeschalteten Methanstufen; Feldstudie: C+W)
2. Analysen des Substratumsatzes an ca. 5 repräsentativen großtechnischen Hydrolyse- und Versäuerungsstufen (Feldstudie: ttz, C+W)
3. molekularbiologische Analysen der Population dieser Hydrolyse- und Versäuerungsstufen (HS Anhalt)
4. Charakterisierung der mikrobiellen Umsetzungen bzw. Gärungstypen dieser Hydrolyse- und Versäuerungsstufen (alle Partner)
5. weitergehende Bilanzierung und Untersuchung der Kinetik des Substratumsatzes ausgewählter Substrate an kontinuierlich betriebenen Technikumsanlagen (Labor/ Technikum: ttz; Populationsanalysen: HS Anhalt)
6. Analyse des Zusammenhangs zwischen Betriebsbedingungen der Technikums- und Großanlagen und den erreichten Umsatzleistungen (C+W, ttz)
7. Ermittlung der Wirtschaftlichkeit verfahrenstechnischer Lösungen (C+W)

Auf der Basis der beschriebenen Punkte werden unter Berücksichtigung des Wissenstandes Auslegungsempfehlungen erarbeitet, die eine fundierte Auslegung der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe ermöglichen.

Das übergeordnete Ziel des Projekts *AcEta* ist es, auf der Basis einer systematischen technisch-wissenschaftlichen Arbeit zur Mikrobiologie der Hydrolyse und der Versäuerung die Effizienzsteigerung landwirtschaftlicher Biogasanlagen und somit die Steigerung der Ressourceneffizienz und der Anlagenwirtschaftlichkeit sowie außerdem die Verbesserung der Klimaschutzwirkung zu ermöglichen.

1.1.2 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Planung und die Durchführung des Vorhabens erfolgte entsprechend dem Projektantrag. Die folgende Tabelle zeigt die Arbeitspakete in der Übersicht.

Tabelle 2: Arbeitspakete des Verbundprojekts AcEta (Quelle: Projektantrag)

AP	Arbeitspakete	Bearbeiter
1	Entwurf, Bau und Erprobung des Gas-Probenahmesystems für offene Verfahrensstufen	ttz C+W
2	Methodenentwicklung Populationsanalyse	HS Anhalt
3	Analyse großtechnischer zweistufiger Biogasanlagen I – Vorauswahl von 20 Biogasanlagen, vor Ort-Termine und Auswertung der Betreiberdaten	C+W
4	Analyse großtechnischer zweistufiger Biogasanlagen II – Felduntersuchungen an 5 landwirtschaftlichen Anlagen	ttz C+W
5	Chemische Untersuchung der Feldproben	ttz
6	Populationsanalyse der Feldproben	HS Anhalt
7	Auswertungen der Felduntersuchungen	ttz HS Anhalt C+W
8	Auswertung der Betreiberdaten der 5 untersuchten Biogasanlagen	C+W
9	Technikumsuntersuchungen zur Umsatzbilanz und Kinetik sowie Entwicklung eines Bemessungsmodells	ttz C+W
10	Abschätzung der Wirtschaftlichkeit von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen	C+W
11	Abschlussbericht	ttz HS Anhalt C+W
12	Auslegungsempfehlungen mit Faustzahlen/Richtwerten (Broschüre)	ttz C+W HS Anhalt
13	Fachgespräch	ttz HS Anhalt C+W

1.1.3 Projektvoraussetzungen

Aufgrund der hohen Komplexität des Projekts und aufgrund eines Laborumzugs des Projektkoordinators ergaben sich zeitliche Verzögerungen, die auch dazu führten, dass die Auslegungsempfehlungen (Broschüre) und das Fachgespräch nach Abgabe des Abschlussberichtes fertiggestellt bzw. durchgeführt werden. Die Projektvoraussetzungen entsprachen ansonsten den Erwartungen.

1.2 Stand des Wissens und der Technik

Cordes+Winterberg, Hochschule Anhalt, ttz Bremerhaven

1.2.1 Anaerobe Nahrungskette

1.2.1.1 Substratabbau in vier Schritten

Dass der Abbau organischer Verbindungen unter anaeroben Bedingungen eine Nahrungskette darstellt, an der Mikroorganismen mehrerer trophischer Gruppen beteiligt sind, ist seit Langem bekannt. In den frühen 1960er Jahren ging man noch von zwei trophischen Gruppen aus: von der Hydrolyse und Vergärung komplexer organischer Substrate durch "saprophytische" Mikroorganismen zu kurzkettigen Carbonsäuren (volatile fatty acids, VFA) einerseits und von der anschließenden Verwertung dieser Säuren durch methanbildenden Mikroorganismen zu Methan und Kohlendioxid andererseits (McCarty, 1962). Die Gruppe der acetogenen Bakterien war noch nicht bekannt. Die Rede war dementsprechend von einem zweiphasigen oder auch zweistufigen Abbauprozess (McCarty, 1964). Zu dieser Zeit begann auch die systematische Entwicklung zweiphasiger technischer Anaerobsysteme. Mit der Entdeckung, dass der Ethanol-verwertende *Methanobacillus omelianskii* eine syntrophe Mischkultur aus zwei Arten ist, die Ethanol über Acetat zum Methan umsetzt (Bryant et al.,1967), begann die Erforschung der acetogenen Bakterien. Diese Bakterien stellen eine eigene trophische Gruppe dar, die für die Umsetzung von Fettsäuren und Alkoholen zur Essigsäure verantwortlich ist

und damit eine zentrale Rolle in der anaeroben Nahrungskette einnimmt. Heute gliedert man die anaerobe Nahrungskette in vier Schritte, die Hydrolyse, die Acidogenese, die Acetogenese und die Methanogenese, an der drei metabolische Gruppen von Mikroorganismen beteiligt sind:

1. die acidogenen Bakterien, die zum Teil hydrolytisch aktiv sind
2. die acetogenen Bakterien
3. die methanogenen Bakterien

Der Ablauf der mikrobiellen Verwertung organischer Substrate in den vier Schritten ist vielfach und detailliert beschrieben worden. Der aktuelle Wissensstand wurde in der jüngeren Vergangenheit mehrfach zusammengefasst (Schnürer and Jarvis, 2010, Weiland, 2010, Ali Shah et al., 2014, Lebuhn et al., 2014, Gallert und Winter, 2015). Durch moderne Methoden der Mikrobiom-Analyse der aktuellen Forschung werden zurzeit nicht nur Populationen analysiert, sondern auch neue Stoffwechselwege beschrieben, deren zusammengefasste Darstellung noch aussteht.

1.2.1.2 Milchsäurebildung und -verwertung

Eine nicht unbedeutende Rolle in landwirtschaftlichen Biogasanlagen spielen auch die Milchsäure-bildenden und die Milchsäure-verwertenden Bakterien. Als Metabolit der anaeroben Nahrungskette wurde die Milchsäure zunächst vernachlässigt, da sie in Biogasreaktoren in der Regel nur in geringen Konzentrationen nachweisbar ist (Batstone et al., 2002). Im Falle hoher Raumbelastungen, niedriger pH-Werte oder Kohlenhydrat-reicher Substrate kann Milchsäure allerdings als Metabolit relevant werden (Garcia 1982, Batstone et al., 2002). Jüngst wurden Umsetzungen der Milchsäure in Biogasreaktoren mit Hilfe des *Anaerobic Digestion Model No. 1* (ADM1) modelliert (Satpathy et al., 2016).

Milchsäurebakterien (Ordnung *Lactobacillales*). Für die Bildung der konservierend wirkenden Milchsäure in Silagen sind Milchsäurebakterien verantwortlich. Milchsäurebakterien verwerten Monosaccharide. Sie sind aerotolerant und meso- oder thermophil, sie sind säuretolerant und können, z. B. in Silagen, auch bei pH-Werten um 4 Zucker metabolisieren. Ihr pH-Optimum liegt jedoch in der Regel im leicht sauren Bereich, bei pH-Werten um 6,0 bis 6,5 (Adamberg et al., 2003). Unter geeigneten Bedingungen wachsen Milchsäurebakterien mit Generationszeiten von 2 bis 3 Stunden.

In H+V-Stufen kann mit der Anwesenheit von Milchsäurebakterien gerechnet werden, die mit Pflanzensilagen in die Vorstufe eingetragen werden. Allerdings ist die Konzentration der aktiven Zellen aufgrund der niedrigen pH-Werte der Silagen gering: Nur noch 0,1 % der maximalen Zellkonzentration während der Hauptgärphase der Silagebereitung lassen sich in der Entnahmephase nachweisen. Dies entspricht ca. 1 x 10^9 Milchsäurebakterien/g Silage (Gerighausen et al., 2011).

Aufgrund der oben beschriebenen physiologischen Optima der Milchsäurebakterien können in landwirtschaftlichen Biogasanlagen nicht nur aus der Silage eingetragene, sondern auch in den Reaktoren wachsende, stoffwechselaktive Milchsäurebakterien erwartet werden.

Milchsäureverwerter. Milchsäure wird unter anaeroben Bedingungen durch Bakterien unterschiedlicher physiologischer und taxonomischer Gruppen abgebaut, darunter Arten der Gattungen *Veillonella*, *Propionibacterium* und *Clostridium* (Cibis, 2015) sowie durch Milchsäurebakterien (Cibis, 2015) oder durch heterotrophe acetogene Bakterien verwertet (Schuchmann and Muller, 2016). Als Produkte werden Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Wasserstoff und Kohlendioxid gebildet. Das Produktspektrum ist von den Fermentationsbedingungen, vor allem vom pH-Wert und dem Wasserstoffpartialdruck, abhängig (Garcia, 1982; Satpathy et al., 2016).

1.2.2 Population der Hydrolyse- und versäuerungsstufen

In den letzten zehn Jahren sind umfangreiche Untersuchungen zu mikrobiellen Populationen in Biogasanlagen durchgeführt worden, meist an Laborfermentern, in letzter Zeit aber auch vermehrt an realen landwirtschaftlichen Anlagen. Dabei wurden überwiegend einstufige Anlagen untersucht.

Bisher wurde berichtet, dass Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria als Phyla den Hauptteil der Bakterien in Biogasfermentern stellen, aber der Reichtum der Arten im einzelnen Phylum sehr unterschiedlich sein kann (De Vrieze et al., 2015 u. 2016). Ein Einfluss des Substratspektrums und eventueller Additive und der damit bedingten Fluktuation der Population wird zurzeit intensiv untersucht. Ein Zusammenhang zwischen der Substratzusammensetzung, dem Vorkommen einzelner Mikroorganismen, deren Metabolismus und der Einfluss auf die Populationszusammensetzung ist derzeit aber noch nicht generell auflösbar. Durch die Möglichkeit vieler Organismen, verschiedene Abbauwege zu nutzen, und die Tatsache, dass derzeit auch immer noch neue Gruppen und sogar Abbauwege gefunden werden, ist es derzeit auch noch nicht möglich, anhand von Markerorganismen oder Markerenzymen generelle Aussagen zu machen. Umfangreiche Arbeiten hierzu mit unterschiedlichsten Ansätzen von der Klonbibliothek, T-RFLP- oder qPCR-Analysen

über Metagenom, Metaproteom oder Metatranskriptom wurden und werden zurzeit von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt. Ein grober Querschnitt durch die vielfältigen Ansätze der letzten zehn Jahre ist in den folgenden Arbeiten zu finden (ein Ausschnitt aus der Vielzahl der Publikationen): Krause et al., 2008, Schlüter et al., 2008, Kröber et al., 2009, Jaenicke 2011, Neumann and Scherer, 2011, Zhu et al. 2011, Wirth et al., 2012, Traversi et al. 2012, Li et al., 2013, Heyer et al., 2015, Ju et al., 2016, Maus et al., 2016 u 2017, Song et al 2017., Zhao et al., 2017, Li et al., 2017, Grohmann et.al., 2018. Allerdings liegt auch hier der Schwerpunkt meistens auf der methanogenen Population und viele dieser Untersuchungen wurden in Laborfermentationen durchgeführt.

Zudem spielt das Inokulum, die Aufarbeitung des Inokulums und natürlich auch die Substratpopulation eine große Rolle bei der Entwicklung der Population im Fermenter. Es gibt zudem eine ganze Reihe von Arbeiten, in denen unterschiedlichste bakterielle Inokula eingesetzt werden. Die Untersuchungen werden hier auch wieder an Labor- und Real-Fermentern durchgeführt, wobei im Labor auch ein- und zweistufige Verfahren verglichen werden. Auch zu diesem Themenkomplex gibt es eine ganze Reihe von Untersuchungen (Lee et al, 2017, Wojcieszak et al., 2017, Koch et al., 2017, Alcantara-Hernandez et al., 2017; Torquato et al., 2017, Li et al., 2018, Mulat et al., 2018). Auch diese Arbeiten zeigen, dass es in jedem Fermenter zur Entwicklung einer angepassten Population kommt. Beschrieben werden auch hier wieder als Hauptgruppen Firmicutes, Bacteroidetes und Proteobacteria.

Trotz der Komplexität mikrobieller Populationen in Biogasanlagen sind in den letzten Jahren viele Gruppen charakterisiert und in unterschiedlichsten Zusammenhängen beschrieben worden. Anhand von Metagenomanalysen aus Weizenstroh abbauenden Kulturen wurden Mitglieder der Gruppe der *Citrobacter, Enterobacter, Acinetobacter, Pseudomonas, Flavobacterium* und *Stenotrophomonas* gefunden, die pflanzliches Lignin, Cellulose und Hemicellulose sowie Carboxymethylcellulose abbauen können. In diesen Arbeiten wurden auch *Sphingobacteria* und *Pedobacter* gefunden, die in der Lage sind, ß-Glucosidasen zu bilden und somit Oligosaccharide abzubauen (Manz et al., 1996, Jimenez et al., 2014, Jimenez et al., 2015). Acinetobacter und Pseudomonaden sekretieren auch kupferhaltige Oxidasen, die für die Oxidation eines breiten Spektrums an Kohlenhydraten verantwortlich sind, aber auch primäre Alkohole mit Sauerstoff zu Aldehyden und H_2O_2 oxidieren können. *Z*urzeit wird davon ausgegangen, dass *Sphingobacteria*, *Pedobacter* und *Flavobacterium* komplexe Substrate abbauen, während z. B. Organismen der Gattung *Klebsiella* die entstehenden Kohlenhydrate umsetzen (untersucht an Maissilage, Wang et al., 2016). *Klebsiellen* bilden auch Pullulanasen, die an der Zersetzung von z. B. Stärke, Pullulan (ein Exopolysaccharid) und weiteren alpha-glykosidisch verlinkten Polymeren mitwirken. Es ist inzwischen bekannt, dass vor allem Bacteroidetes und Firmicutes die komplexen organischen Substrate abbauen können (Wan et al., 2013, Sun et al., 2015). Eine weitere Gruppe, der cellulolytische Aktivität zugeordnet wird, ist die überwiegend aerobe Gruppe der Actinobacteria (Lynd et al., 2002).

Für den Abbau von Grassilagen sind für den Stärkeabbau zunächst als dominante Gruppe α-Amylase bildende Organismen wie *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* und *Bacillus subtilis* verantwortlich. Je nach Substratzusammensetzung wird auch *Paenibacillus xylanexedens* gefunden. *Enterococcus faecium* ist in späteren Abbauphasen präsent. Ebenso wurde die Bildung von Hemizellulasen durch *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis, B. licheniformis, B. pumilus,* und *P. xylanexedens* in dieser Phase beschrieben (Ning et al., 2017).

Schon seit längerem untersucht wird auch die Beziehung methanogener und acetogener Bakterien. Inzwischen gut charakterisiert sind die Synthrophomonadaceae, die zu den Clostridiales gezählt werden. Diese Gruppe setzt in Konsortien mit Methanbakterien Buttersäuere, Propionsäure und längerkettige Fettsäuren zu Essigsäure und Formiat unter Produktion von H_2 um (Schink et al., 1997, McInerney et al. 2009, Sieber et al., 2012 u. 2014, Morris et al., 2013, Sun et al., 2014). Zurzeit werden auch dort immer noch neue Spezies gefunden (Westerholm et al., 2017, Maus et al., 2017).

Parallel zur Suche nach der Populationszusammensetzung und den Gemeinsamkeiten wird aber auch eine generelle Diversität der Biogasanlagen diskutiert (Cirne et al., 2007, Werner et al., 2011, Wang et al., 2017).

MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) wird seit einigen Jahren vermehrt zur Identifizierung von Mikroorganismen über Proteine oder auch 16sRNA eingesetzt. Im klinischen Bereich ist dies inzwischen eine Routineanalytik (Seng et al. 2009, Bizzini and Greub 2010, Carbonnelle et al. 2011, Wieser et al., 2012). Der Einsatz im Bereich der Umweltkeime ist immer noch rudimentär und wird hauptsächlich zur Untersuchung einzelner Isolate und nicht zur Populationsanalyse durchgeführt (Santos et al., 2016). Die MALDI-TOF-MS Methode zur Untersuchung von mikrobiellen Populationen in Biogasanlagen wurde ansatzweise durchgeführt für Isolate von Stickstoffumsetzern aus den dort untersuchten Fermenter im Verbundvorhaben „Etablierung eines core-Mikrobioms für Biogasanlagen - Genom-Sequenzierung von Isolaten aus Biogasanlagen und Mapping von Metagenom-Datensätzen“ (Klocke et al., 2017). Eine erste größere Untersuchung zum Metaproteom aus Biogasanlagen, die Tandem-Massenspektrometrie nutzte, konnte über Proteinanalytik eine Korrelation zwischen metabolischen Funktionen und der mikrobiellen Populationsstruktur herstellen (Heyer et al., 2016).

1.2.3 Geschwindigkeitsbestimmende Schritte

Die Verfechter zweiphasiger Biogasanlagen sehen den wesentlichen Vorteil der Phasenseparation in der Optimierung der trophischen Gruppen, um die Gesamteffizienz des Prozesses erhöhen zu können (Andrews, 1965, Demirel and Yenigün, 2002). Diese Sichtweise liegt nahe, da die anaerobe Nahrungskette – abhängig vom Substrat - durch zwei kinetische "Engpässe" gekennzeichnet ist (Noike et al., 1985, Ali Shah et al., 2014):

1. Im Falle löslicher Substrate oder schnell hydrolysierbarer Polymere (z. B. Stärke) gilt die Methanogenese als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Gesamtumsetzung.
2. Enthält das Substrat unlösliche Polymere (z. B. Cellulose), ist in der Regel die Hydrolyse dieser Verbindungen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

Im Falle der Vergärung faserreicher Substrate ist also zu erwarten, dass die Limitierung durch die Faserhydrolyse relevant ist.

1.2.4 Physiologische Optima der hydrolytischen und acidogenen Bakterien

1.2.4.1 pH-Wert

Eines der wesentlichen Motive der Entwicklung und Realisierung zweiphasiger Anaerobsysteme ist die Option, unterschiedliche pH-Optima der trophischen Gruppen der anaeroben Nahrungskette separat einstellen zu können. Wiederholt ist beschrieben worden, dass acidogene Bakterien durch ein pH-Optimum im sauren Bereich gekennzeichnet sind (Ishida et al., 1979, Demirer and Chen, 2004) Auch Gallert und Winter (2015) geben als optimalen Bereich pH-Werte von 5,2 bis 6,3 an. Das systematische Studium von Forschungsergebnissen zu diesem Thema zeigt allerdings, dass die Annahme unterschiedlicher pH-Optima der metabolischen Gruppen nicht generell zutrifft. Dies wird im Folgenden näher erläutert.

pH-Optima der Hydrolyse komplexer Substrate. Abweichend von der häufig vertretenen Ansicht, die Hydrolyse der Biopolymere komplexer Substrate erfolge im sauren pH-Bereich optimal, ist in verschiedenen Forschungsarbeiten gezeigt worden, dass die höchsten Hydrolyseraten eher im pH-Neutralbereich erreicht werden (Veeken et al., 2000; Zhang et al., 2005, Lindner 2015). Diese Ergebnisse werden durch die Ergebnisse zur pH-Wert-abhängigen Hydrolyse der Kohlenhydrate, Proteine und Lipide bestätigt (s. u.).

Dass immer wieder gegenteilige Ergebnisse veröffentlicht wurden (z. B. Ishida et al., 1979), lässt sich – zumindest in einigen Fällen - mit der Methodik dieser Arbeiten erklären: Wird die Säurebildung als Kriterium des Abbaus komplexer Substrate herangezogen, wird die Säurebildung aus hydrolysierten Polymeren durch die Vergärung schnell abbaubarer, gelöster Substratbestandteile überlagert. So wird das pH-Optimum der Acidogenese erfasst, wenn der Anteil der leicht verwertbaren Substratbestandteile hoch ist – und nicht das pH-Optimum der Hydrolyse.

pH-Optima der Hydrolyse der Kohlenhydrat-Polymere. Auch für Kohlenhydratpolymere, die in den typischen "Biogassubstraten" in relevanten Konzentrationen häufig vorkommen (Cellulose, Hemicellulosen, Pektine und Stärke) konnte in zahlreichen Untersuchungen übereinstimmend gezeigt werden, dass die Optima der Hydrolyse im neutralen oder leicht sauren Bereich liegen (Slyter, 1986; Zverlov et al., 2010; Köllmeier et al., 2012; Marín Pérez and Weber, 2013). Eine kritische Auseinandersetzung mit der zweiphasigen Betriebsweise landwirtschaftlicher Biogasanlagen haben Lindner und Coautoren veröffentlicht. Die Autoren konnten zeigen, dass der oTM-Abbaugrad in Hydrolysestufen bei 60°C im pH-Bereich von 5,5 bis 7,5 mit steigendem pH-Wert von 21 auf 82 % zunahm (Lindner et al., 2015).

pH-Optimum der Proteinhydrolyse. Für Proteine dürfte mittlerweile als gesichert gelten, dass das Optimum der Hydrolyse im pH-Neutralbereich liegt (Breure et al., 1986, Winterberg, 1992). In zweiphasigen Systemen wird der Proteinabbau daher in den Methanreaktor verlagert, wenn der pH-Wert der ersten Stufe niedrig ist.

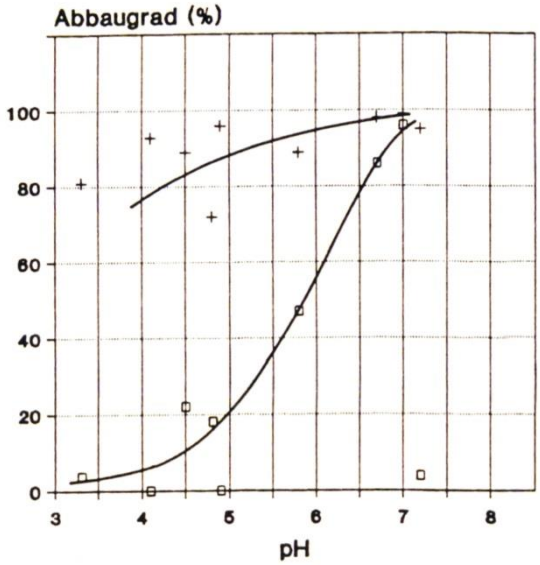


Abbildung 1: Abhängigkeit der Protein- (□-□) und der Kohlenhydrat- (+-+) Abbaugrade vom pH-Wert in 9 großtechnischen Biogasanlagen zur Reinigung agroindustrieller Abwässer. Dargestellt sind die Stoffgruppen-Summenkonzentrationen von sieben Hydrolyse- und Versäuerungsstufen zweiphasiger Systeme sowie von zwei einstufigen Biogasanlagen (Winterberg, 1992)

pH-Optimum der Lipidhydrolyse. "Rohfett" macht ca. 3 Massen-% einer durchschnittlichen Maissilage aus. Lipide spielen daher als Substratbestandteil in Substraten landwirtschaftlicher Biogasanlagen – sofern sie nicht zur Co-Vergärung fettreicher Bioabfälle verwendet werden – eine untergeordnete Rolle. Auf eine ausführliche Darstellung der komplexen Zusammenhänge der Lipidvergärung wird daher hier verzichtet.

Die Behandlung lipidreicher Substrate in Biogasanlagen ist durch einige spezifische Herausforderungen gekennzeichnet, die auch heute Gegenstand von Forschungs- und Entwicklungsarbeiten sind. Konzepte zur effizienten Lipidvergärung sind entwickelt worden (Alves et al., 2009, Long et al., 2012). Auch zweiphasige Systeme sind in diesem Zusammenhang interessant, da die beim Lipidabbau entstehenden langkettigen Fettsäuren (long chain fatty acids, LCFA) Methanbakterien hemmen können (Koster and Cramer; 1987, Alves et al., 2009; Kim and Shin, 2010, Long et al., 2012). Dennoch spielen zweiphasige Systeme, wenn es um den Lipidabbau geht, bislang eine untergeordnete Rolle. Zwar wurde mit einem Sojaöl-haltigen Modellabwasser nachgewiesen, dass Lipide auch bei niedrigen pH-Werten (4,8-5,1) zu kurzkettigen Fettsäuren umgesetzt werden können (Kunst und Mudrack, 1985), doch ließ die zweiphasige Vergärung nach Auffassung verschiedener Autoren im Vergleich zur einphasigen Lipidverwertung keine Vorteile erkennen (Mudrack und Kunst, 1987; Sanders 2001). Auch Kim und Coautoren konnten bei der zweiphasigen Behandlung eines lipidhaltigen Modellabwassers in der ersten Stufe nur bescheidene Abbaugrade erreichen (Kim and Shin, 2010).

Dass die β-Oxidation der langkettigen Fettsäuren und nicht die Lipidhydrolyse als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Gesamtreaktion gilt, spielt in diesem Zusammenhang eine wesentliche Rolle (Mudrack und Kunst, 1987). Diese syntrophe Reaktion ist von niedrigen Wasserstoffpartialdrücken, also von der Anwesenheit wasserstoffverwertender Bakterien abhängig (Sousa et al., 2009). Zudem scheint die Akkumulation des Endprodukts des Lipidmetabolismus, des Acetats, zu einer Reduzierung des tolerierten Wasserstoffpartialdrucks zu führen (Sousa et al., 2009). Ein effizienter Lipidabbau kann in landwirtschaftlichen Biogasanlagen daher vor allem unter Kultivierungsbedingungen erwartet werden, die für methanogene Bakterien günstig sind. Diese herrschen in Methanreaktoren, nicht in Hydrolyse- und Versäuerungsstufen vor. Wichtig ist allerdings eine gleichmäßige Dosierung des lipidhaltigen Substrats in den Methanreaktor, da es ansonsten zur Hemmung der Methanbakterien durch langkettige Fettsäuren (LCFA) kommen kann.

pH-Optima der Acidogenese. Im Rahmen der Optimierung zweiphasiger Anaerobsysteme haben Zoetemeyer und Coautoren die Abhängigkeit der Glucoseverwertung durch eine undefinierte Mischkultur (30°C) im Versäuerungsreaktor vom pH-Wert der pH-statischen Chemostatenkultur untersucht. Die maximale Wachstumsrate der Kultur wurde im leicht sauren Bereich, bei pH 6, erreicht (Zoetemeyer, 1982a). Ein pH-Optimum im (leicht) sauren Bereich überrascht nicht, da die bei hohen Raumbelastungen und kurzen Verweilzeiten angereicherten Bakterien in natürlichen Ökosystem in der Regel aufgrund der Säurebildung mit hohen Raten den pH-Wert ihres Lebensraumes absenken. Eine Anpassung an niedrige pH-Werte ist für die unter derartigen Bedingungen angereicherten acidogenen Bakterien daher sinnvoll.

Die Untersuchungen von Zoetemeyer und Coautoren zeigen auch eine sehr starke Abhängigkeit des Produktspektrums vom pH-Wert, insbesondere die Dominanz der Buttersäure bei niedrigen pH-Werten und die Zunahme der Essigsäurekonzentration bei höheren pH-Werten. (Zoetemeyer, 1982a). Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch andere Autoren beschrieben (Fang and Liu, 2002).

1.2.4.2 Temperatur

Die Temperaturabhängigkeit anaerober Kulturen ist intensiv untersucht worden und muss hier nicht erneut erläutert werden. Lediglich einige besondere Aspekte der Hydrolyse- und Versäuerungsstufen sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Temperaturabhängigkeit acidogener Mischkulturen. Untersuchungen der Auswirkung der Prozesstemperatur auf die Umsetzungsleistungen acidogener Mikroorganismen sind lange vernachlässigt worden. Die erste den Autoren der vorliegenden Studie bekannten Forschungsergebnisse wurden 1982 von Zoetemeyer veröffentlicht (Zoetemeyer, 1982a, Zoetemeyer, 1982b). Zoetemeyer wies durch Versuche am Modell einer Versäuerungsstufe mit Glucose bei pH 5,8 im Rührkesselreaktor nach, dass die maximale Verdünnungsrate – also die maximale Wachstumsrate der an die jeweilige Temperatur angepassten Bakterien - bei 37°C und bei 52°C Maxima aufwies). Die Untersuchung zeigt, dass sich – den methanogenen Bakterien vergleichbar – mesophile und thermophile Kulturen anreichern lassen.

Zoetemeyer wies außerdem nach, dass das Produktspektrum acidogener Bakterien im Bereich des Optimums mesophiler Mikroorganismen (37°C) relativ stabil bleibt, während das Produktspektrum der thermophilen Bakterien im Bereich ihres Aktivitätsoptimums (52°C) extreme Verschiebungen aufweist (Zoetemeyer, 1982a). Der Autor ging davon aus, dass thermophile acidogene Kulturen aufgrund der in der Praxis variierenden Kultivierungsbedingungen stark fluktuierende Produktspektren erzeugen, die wiederum zur Destabilisierung der acetogenen und methanogenen Bakterien führen können. Er empfiehlt daher für die Auslegung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen die gezielte Selektion mesophiler Kulturen.

Mesophile Kulturen werden im Vergleich mit thermophilen Kulturen außerdem stabilisiert durch ihre höhere Biodiversität, die dazu beiträgt, dass die Regeneration der Kultur nach einem stressbedingten Einbruch im Vergleich zu thermophilen Kulturen schneller erfolgen kann (Levén et al., 2007, Stiborova et al., 2015).

Diese Auffassung wird bestätigt durch die Erfahrungen zweier voneinander unabhängiger Betreiber von zwei landwirtschaftlichen Biogasanlagen mit Hydrolyse- und Versäuerungsstufen, die vom Planer für den Betrieb mit thermophilen acidogenen Bakterien vorgesehen waren. Diese Biogasanlagen waren erst stabil zu betreiben, nachdem die Prozesstemperaturen von 52-55°C auf 42-43°C abgesenkt worden waren

Substratausnutzung: Abbaugrade und Methanerträge. Höhere Wachstums- und Umsatzraten bei erhöhten Kultivierungstemperaturen lassen erwarten, dass bei identischen organischen Raumbelastungen bzw. hydraulischen Verweilzeiten die Substratabbaugrade steigen. Dies ist auch experimentell nachgewiesen worden (Golueke, 1958, Shi et al., 2013).

Dennoch steigt nicht immer auch der Methanertrag, da im Temperaturbereich thermophiler Bakterien höhere Säurekonzentrationen im Gleichgewichtszustand kontinuierlich betriebener Reaktoren nachgewiesen wurden (Golueke, 1958, Kugelman, 1989, Shi et al., 2013). Auch Zinder hat in einem Übersichtsartikel diesen Effekt beschrieben (Zinder, 1986).

Die Fachliteratur liefert daher zur Frage der besseren Substratausnutzung durch meso- bzw. thermophile Kulturen kein einheitliches Bild. Es ist sowohl die Überlegenheit mesophiler Kulturen (Kugelman, 1989; Astals et al., 2012) als auch thermophiler Bakterien (Kiyohara et al., 2000; de la Rubia Romero et al., 2002; Kim et al., 2006) beschrieben worden.

Maximaltemperatur praxisrelevanter Biogasprozesse. Frühe, systematische Untersuchungen der Abhängigkeit verschiedener Prozessparameter in Abhängigkeit von der Temperatur haben gezeigt, dass Klärschlamm oberhalb einer Temperatur von ca. 62°C nicht mehr zu Methan umgesetzt wurde (Golueke, 1958). Zinder stellte 1986 in einem Übersichtsartikel die Frage der Maximaltemperatur stabiler Systeme zur anaeroben Abfallbehandlung. Er wies darauf hin, dass oberhalb von 60°C nicht von stabilen Bedingungen auszugehen ist. Dies könne auch darauf zurückgeführt werden, dass einige methanogene Arten (z. B. Arten der Gattung *Methanosarcina*) bei Temperaturen oberhalb von 60°C nicht kultiviert werden konnten (Zinder, 1986). Kugelman und Guida erreichten mit einem System zur Vergärung von Primärschlamm einer Kläranlage keinen stabilen Bioprozess oberhalb von 50°C, da der Prozess bei höheren Temperaturen durch stark ansteigende Säurekonzentrationen gekennzeichnet war (Kugelman, 1989).

1.2.4.3 Redoxpotenzial

Das Redoxpotenzial der Vorstufen wird sehr selten ermittelt. Sind in der Vorstufe methanogene Bakterien aktiv, können die für Methanreaktoren typischen Redoxpotenziale erwartet werden. Werte im Bereich von -500 bis -400 mV hat Zoetemeyer aber auch für acidogene, Wasserstoff freisetzende Mischkulturen nachgewiesen, die keine (aktiven) Methanbakterien enthielten (Zoetemeyer, 1982a).

1.2.5 Katabolitrepression der acidogenen Bakterien

Der Abbau der Proteine kann durch leicht verwertbare Kohlenhydrate gehemmt werden. Dieser als Katabolitrepression bekannte Effekt ist an Modellsystemen, die Gelatine und Glucose enthalten, nachgewiesen worden (Breure et al., 1986; Winterberg 1992).

1.2.6 Endprodukthemmung der acidogenen Bakterien

Hinweise auf die inhibierende Wirkung kurzkettiger Fettsäuren auf Bakterien der anaeroben Nahrungskette liegen seit den 1960er Jahren vor. Die systematische Untersuchung einer Endprodukthemmung auf acidogene Bakterien erfolgte im Zusammenhang mit der bioprozesstechnischen Optimierung zweiphasiger Biogasanlagen durch Autoren der Universität Amsterdam (Zoetemeyer, 1982a).

Im Zusammenhang mit der anaeroben Reinigung kohlenhydrathaltiger Abwässer hat Zoetemeyer an einem Modellsystem mit Glucose bei pH 6,0 und einer Prozesstemperatur von 30°C den Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivitäten acidogener Bakterien untersucht (Zoetemeyer, 1982a). Die mit steigender Glucose-Konzentration im Bereich von 2,5 bis 75 kg/m³ abnehmende Wachstumsrate und die ebenfalls reduzierte spezifische Schlammaktivität der Bakterien der Versäuerungsstufe führte er auf eine Produkthemmung zurück. Er ging davon aus, dass die gebildeten Säuren (es dominierte die Buttersäure) die Zellmembran passieren. In der Zelle komme es bei höherem pH-Wert zur Dissoziation und damit zur Anreicherung von Protonen, die durch Protonen/Kalium-Pumpen unter Aufwand von Energie in das Medium gepumpt werden müssen. Mit zunehmender Säurekonzentration in der Fermentationssuspension sinkt somit die für das Zellwachstum verfügbare Energie, so dass auch die Wachstumsrate sinkt. Im Modellsystem deuteten sowohl die maximale Wachstumsrate als auch die Schlammaktivität bei Säure-Gesamtkonzentrationen von 408 mmol/l (entsprechend 24,5 g/l Essigsäure) auf einen nahen Prozesszusammenbruch hin. Den Effekt konnte Zoetemeyer auch durch die Dosierung von Buttersäure in das Fermentationsmedium einer kontinuierlichen Modellkultur bestätigen (Zoetemeyer, 1982a).

Vereinzelt wurden durch andere Autoren allerdings auch deutlich höhere Konzentrationen organischer Säuren erreicht: So stiegen bei der Hydrolyse und Acidogenese von Küchenabfällen in pH-statisch geführten Batchansätzen die Konzentrationen organischer Säuren bei pH 7 auf einen Summenwert der chromatografisch nachgewiesenen Einzelsubstanzen von 36 g l^{-1}. (Zhang et al., 2005).

Die Zusammenhänge haben Eingang in die Übersichtsliteratur gefunden (Kroiss, 2015).

1.2.7 Kinetik und Modellierung

1.2.7.1 Desintegration und Hydrolyse

Hydrolyse und Methanogenese sind die potenziell geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der mikrobiellen Biogaserzeugung: Im Falle der Vergärung löslicher und leicht verwertbarer Substrate gilt die Methanogenese als geschwindigkeitsbestimmend (Andrews, 1965). Im Falle langsam abbaubarer, nicht löslicher Polymere. z. B. Cellulose, wird die Hydrolyse als geschwindigkeitsbestimmend angesehen (Eastman and Ferguson, 1981; Noike et al., 1985). Die Substratzusammensetzung hat also wesentlichen Einfluss auf die Auslegung der Verweilzeiten der einzelnen Stufen der Biogasanlage. Sind langsam abbaubare, ungelöste Polymere wie Cellulose relevanter Substratbestandteil (dies gilt für Substratgemische mit hohem Anteil faserreicher Energiepflanzen), ist die Optimierung ihrer Hydrolyse wesentliches Motiv für die Installation einer separaten Hydrolyse- und Versäuerungsstufe. Es gilt, diese Vorstufe sowohl hinsichtlich der hydraulischen Verweilzeit als auch der Prozessbedingungen in geeigneter Weise auszulegen. Der Einfluss der Prozessbedingungen wurde in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben. Im Folgenden wird der Stand des Wissens zur Kinetik der Hydrolyse dargestellt. Die Hydrolyse partikulärer Substratbestandteile ist ein hoch komplexer Vorgang, der von folgenden Faktoren beeinflusst wird:

1. Substratkonzentration
2. Art der Moleküle und Einbindung in makromolekulare Strukturen (z. B. Lignocellulose-Komplexe)
3. Partikelgrößenverteilung/Partikeloberfläche
4. Konzentration hydrolytisch aktiver Mikroorganismen bzw. Konzentration hydrolytisch wirksamer Exoenzyme
5. Konzentration leicht verwertbarer Substratbestandteile, die eine Katabolitrepression bewirken können
6. Temperatur
7. Viskosität des Substrats/Diffusionsgeschwindigkeiten relevanter Reaktionspartner

Eine Modellierung der Hydrolysereaktionen, die die genannten Faktoren umfassend berücksichtigt, ist kaum realisierbar, da die Datengrundlage in der Regel unvollständig ist. Es ist jedoch gelungen, die Hydrolyse mit stark vereinfachten Modellen mathematisch hinreichend genau abzubilden. Ein einfaches, frühes Modell nach Eastman und Ferguson dient der Berechnung der Konzentration partikulärer Substrate in Hydrolysestufen in Abhängigkeit von der hydraulischen Verweilzeit. Das Modell beschreibt die Hydrolyse partikulärer Substratbestandteile als Reaktion erster Ordnung (Eastman and Ferguson, 1981):

$$c = \frac{c_0}{1 + k \cdot \Theta} \qquad (1)$$

für

c	*(g/l)*	:	*Konzentration der partikulären Substratkomponente im Reaktor*
c_0	*(g/l)*	:	*Konzentration der partikulären Substratkomponente in der unbehandelten Substratmischung*
k	*(1/d)*	:	*Reaktionsgeschwindigkeitskonstante*
θ	*(d)*	:	*hydraulische Verweilzeit*

Um aus dem Verhältnis von c zu c_0 die Abhängigkeit des Hydrolysegrades von der Verweilzeit darzustellen, lässt sich aus Gleichung (1) und

$$\eta = 100 - \frac{c}{c_0} \cdot 100 \qquad (2)$$

Gleichung (3) ableiten:

$$\eta = 100 - \frac{100}{1 + k \cdot \Theta} \qquad (3)$$

Das Modell nach Eastman und Ferguson ist wiederholt kritisch bewertet und bestätigt worden (Sanders 2001, Batstone et al., 2002; Vavilin et al., 2008; Hinken 2013), obwohl es weder den maximalen Abbaugrad des Substrats noch die maximale Wachstumsrate der für den Substratabbau verantwortlichen Mikroorganismen berücksichtigt.

Das entscheidende Erfolgskriterium für die korrekte Bemessung einer Hydrolysestufe nach diesem Modell ist die Kenntnis der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, die für das betrachtete Substrat gültig ist. Die Hydrolyse der Kohlenhydrate, Proteine und Lipide geht die abiotische oder mikrobielle Desintegration von Zellstrukturen und Substratagglomeraten voraus. Diese Desintegration ist in der Regel der geschwindigkeitsbestimmende erste Schritt der mikrobiellen Umsetzungen, so dass die Kenntnis der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Desintegration wichtig ist. Die "Desintegrationskonstante" wird allerdings nicht von allen Autoren separat ausgewiesen.

Insgesamt ist die Datenlage für landwirtschaftliche Substrate dürftig und teilweise auch widersprüchlich. Die Ergebnisse ausgewählter Untersuchungen zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 3: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Desintegration oder Hydrolyse landwirtschaftlicher Substrate durch mesophile Bakterien: Literaturdaten

Substrat	analysierter oder berechneter Reaktionsschritt	Reaktions-temperatur (°C)	k (1/d)		Informationsquelle
nicht spezifiziert	Desintegration	35	0,5	v	Batstone et al., 2002
	Hydrolyse	35	10	v	Batstone et al., 2002
CCM	Hydrolyse	oA (37?)	0,11/0,58	e	Hinken 2013
"Roggen"	Hydrolyse	oA (37?)	0,25	e	Hinken 2013
CCM, "Roggen"	Hydrolyse	41	0,3	m	Hinken 2013
Grassilage	Desintegration	38	0,26	m	Wichern 2010
Maissilage			0,13	e	Linke et al., 2006
Roggensilage			0,12	e	Linke et al., 2006
Hain-Rispengras	Hydrolyse	35	0,079		Tong et al., 1990
Elefantengras	Hydrolyse	35	0,09		Tong et al., 1990
Weizenstroh	Hydrolyse	35	0,087		Tong et al., 1990
"Gras"	Hydrolyse	40	0,266		Veeken et al., 1999
"Stroh"	Hydrolyse	40	0,14		Veeken et al., 1999
Cellulose	Hydrolyse	35	0,10		Vavilin et al., 1996
Cellulose	Hydrolyse	38	0,12		O´Sullivan et al., 2005
Cellulose	Hydrolyse	35	0,066		Liebetrau et al., 2004*
Pflanzen (Rückstände)	Hydrolyse	35	0,009-0,094		Lehtomaki et al., 2005*

v: vorgeschlagen
e: experimentell ermittelt
m: durch Modellierung berechnet
* zitiert in Vavilin et al., 2008

Die Tabelle macht deutlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Desintegration oder Hydrolyse landwirtschaftlicher Substrate in der Größenordnung zwischen 0,1 und 0,3 d^{-1} liegen. Setzt man diese Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten in Gleichung (3) ein, ergeben sich die in der folgenden Grafik dargestellten Graphen.

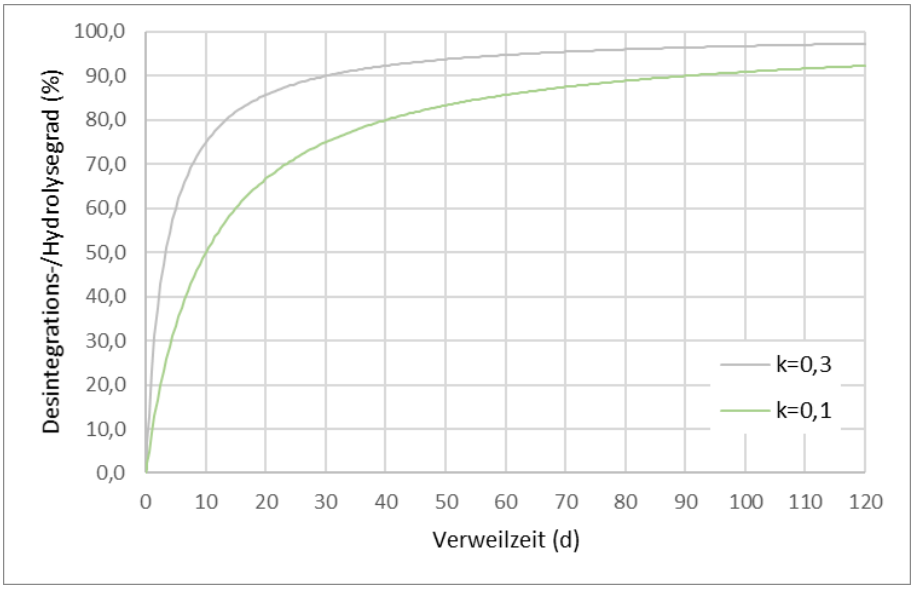


Abbildung 2: Abhängigkeit des Desintegrations- bzw. Hydrolysegrades von der Verweilzeit bei Verwertung von Substraten mit einem Reaktionsgeschwindigkeitskoeffizienten von 0,1 d^{-1} bzw. 0,3 d^{-1}. Berechnung nach dem Modell von Eastman und Ferguson (1981), dem eine Reaktion erster Ordnung zugrunde liegt. Das Modell berücksichtigt weder die kritische Verweilzeit (die maximale Wachstumsrate der für die Hydrolyse verantwortlichen Bakterien), noch den maximalen Abbaugrad des Substrats (Abbildung: Cordes+Winterberg)

Die grafische Darstellung zeigt, dass für die Desintegration bzw. Hydrolyse typischer landwirtschaftlicher Substrate (Tabelle 3) Verweilzeiten von ca. 3 bis 10 Tagen erforderlich sind, wenn Desintegrations- bzw. Hydrolysegrade von mindestens 50 % erreicht werden sollen. Es ist in diesem Zusammenhang zu beachten, dass die Rezirkulation von Nachgärerinhalten oder Gärresten eine Verkürzung der Verweilzeit bewirken

Kritische Anmerkung zur Modellierung. Eine systematisch bedingte Ungenauigkeit des Modells nach Eastman und Ferguson liegt darin, dass die maximale Wachstumsrate der für Desintegration oder Hydrolyse verantwortlichen Bakterien nicht berücksichtigt wird. Die Graphen der Abbildung 2 dürften die Abszisse nicht, wie dargestellt, beim Nullwert, sondern beim Kehrwert der maximalen Wachstumsrate, der Verdopplungszeit dieser Bakterien, schneiden. Für Cellulose-hydrolysierende Bakterien wurden maximale Wachstumsraten von 1,25 d^{-1} (Vavilin et al., 1996) bzw. 0,48 d^{-1} (Rotter et al., 2009 (zitiert in Lübken et al, 2010) beschrieben. Dies entspricht minimalen Verdopplungszeiten von 0,8 bis 2,1 Tagen. Für die Hydrolyse und Versäuerung einer Mischung aus kommunalem Primär- und Klärschlamm durch thermophile Bakterien wurde eine maximale Wachstumsrate von 0,78 d^{-1} (entsprechend einer minimalen Verdopplungszeit von 1,3 d) ermittelt (Puchajda, 2006). Bei korrekter Beschreibung des Zusammenhangs zwischen Hydrolysegrad und Verweilzeit würde der Graph die Abszisse in diesem Wertebereich der Verweilzeit bzw. der bakteriellen Verdopplungszeit schneiden, da bei kürzeren Verweilzeiten ein Auswaschen der für die Hydrolyse verantwortlichen Bakterien erfolgen würde.

Vergleich der Modellierung mit experimentellen Untersuchungen. Zur Kinetik der Hydrolyse und Versäuerung der typischen Substrate deutscher landwirtschaftlicher Biogasanlagen liegen sehr wenige Daten vor. Der Einfluss der Verweilzeit (3, 5 und 10 d) und der Temperatur (20 und 30°C) auf Hydrolysestufen wurde im Rahmen von Modellversuchen untersucht, mit denen drei großtechnische, zweiphasige Biogasanlagen nachgestellt wurden (Anonymus, ca. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die Acidogenese im gesamten Untersuchungsbereich in signifikantem Umfang abläuft, doch wurden leider keine vergleichenden Bilanzierungen durchgeführt, die die Bewertung der Effizienz der Umsetzungen gestatten würden.

Als besonders relevanter, langsam abbaubarer Bestandteil unterschiedlichster biogener Substrate ist sehr frühzeitig Cellulose identifiziert worden (Hoppe-Seyler, 1886; Boruff and Buswell, 1929). Dass die Hydrolyse der Cellulose und der cellulosehaltigen Polymerkomplexe ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Biogaserzeugung ist, wurde in den 1980er Jahren nachgewiesen (Eastman and Ferguson, 1981; Noike et al., 1985; Gijzen et al., 1986). Von entscheidender Bedeutung für die mikrobielle Umsetzung der Cellulose in Substraten landwirtschaftlicher Großanlagen ist die Art des Substrats: sowohl der Grad der "Verholzung", also der Anteil der Lignocellulosekomplexe, als auch Herkunft und Vorbehandlungen haben einen erheblichen Einfluss auf den Abbaugrad und die erzielbaren Abbauraten (Hobson et al., 1983). So wird im Vergleich zu chemisch reiner Cellulose das im Klärschlamm enthaltene Toilettenpapier aufgrund seiner Vorbehandlung deutlich schneller abgebaut, während Cellulose der nicht aufbereiteten Lignocellulosekomplexe, wie sie z. B. im Stroh vorliegen, deutlich langsamer und auch unvollständiger abgebaut wird (Hobson et al., 1983).

Noike und Coautoren konnten durch Versuche mit chemisch reiner Cellulose Aussagen zum Zusammenhang zwischen Abbaugrad und Verweilzeit machen. Die Autoren konnten zeigen, dass der Grad des Celluloseabbaus bei einer Verweilzeit von 13,7 Tagen bei 54 % lag, bei einer Verweilzeit von 1,94 Tagen jedoch nur noch bei 2 % (Noike et al., 1985).

Für die Hydrolyse und Versäuerung eines Gemischs aus kommunalem Primär- und Belebtschlamm wurde für thermophile Kulturen eine optimale Verweilzeit von 3,0-3,5 d ermittelt (Puchajda, 2006). Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante lag mit 2,36 d^{-1} allerdings deutlich über den Werten, die für verschiedene Energiepflanzen bestimmt wurden (Tabelle 3), so dass die relativ kurzen optimalen Verweilzeiten – auch unter Berücksichtigung der Verwendung thermophiler Kulturen - nicht überraschen.

Die Dimensionierung einer Hydrolyse- und Versäuerungsstufe auf Basis einer Modellierung setzt voraus, dass die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Substratumsetzung unter den Bedingungen der jeweiligen Biogasanlage bekannt ist. Dies ist bis heute in der Regel nicht der Fall, so dass Modellierungen in der Praxis der Anlagenauslegung keine erkennbare Rolle spielen.

1.2.7.2 Milchsäureverwertung

Ein wesentliches Substrat typischer landwirtschaftlicher Biogasfermenter ist die Milchsäure, die mit Silagen zunächst in die Vorstufen gelangt. Bildung und Verwertung der Milchsäure wurde in Kapitel 1.2.1 kurz beschrieben. Wichtig für das Verständnis der Umsatzbilanzen sind die kinetischen Kennwerte der Milchsäureverwertung, die bisher in nur geringer Zahl veröffentlicht wurden. Zurzeit ergeben die vorliegenden Daten kein eindeutiges Bild (Tabelle 4).

Tabelle 4: Kinetische Kennwerte der Milchsäureverwertung unter Bedingungen der Biogasbildung (Literaturdaten, zwecks Vergleichbarkeit teilweise modifiziert)

Ks (g/l)	k_M $g/g_{Biomasse}$ d	μ_{max} (1/d)	g_{min} (d)	Art des untersuchten Systems	Informationsquelle
0,393	oA	0,136	7,4	Lactat, Raumtemperatur	Chen, 2010
	oA	0,05	20	Lactat, 37°C	Yang et al., 2015
0,047	12,2	oA	oA	Bioethanol- u. Brauereiabwässer	Hinken, 2013
0,075	12,2	oA	oA	Lactat, 38°C	Satpathy et al., 2016

Aufgrund der relativ geringen maximalen Wachstumsraten der Milchsäure-verwertenden Bakterien kann ein signifikanter Milchsäureabbau in Vorstufen nur erfolgen, wenn der Vorstufe aktive Milchsäureverwerter in höheren Konzentrationen über das Rezirkulat zugeführt werden. In diesem Fall sind aufgrund des niedrigen Ks-Wertes, der mit denjenigen der Kohlenhydratmonomere vergleichbar ist (Batstone et al., 2002), niedrige Lactatkonzentrationen in den Maischen der Vorstufen zu erwarten.

1.2.8 Rezirkulation

Die Rezirkulation von Fermenterinhalt zur kostengünstigen Erzeugung von Maischen feststoffreicher landwirtschaftlicher Substrate in Vorstufen der Biogasanlagen wurde bereits vorgeschlagen, bevor das EEG in Deutschland die Energiepflanzenverwertung in Biogasanlagen wirtschaftlich machte (Gijzen et al., 1988, Jarvis et al., 1995). Nachdem die Vergärung von Energiepflanzen etabliert worden war, wurde die Rezirkulation weitergehend untersucht (Dandikas et al., 2012). Die Untersuchungen lieferten folgende (ausgewählte) Ergebnisse:

1. Die Rezirkulation führte zum Anstieg der Konzentrationen einzelner Inhaltsstoffe in der Vorstufe, da Produkte des Substratabbaus (z. B. anorganische Ionen wie NH_4^+) im Methanfermenter oder im Gärrestlager in höherer Konzentration vorliegen als in der Vorstufe. Bei konstanten Substratzusammensetzungen und Massenströmen stellt sich durch die Rezirkulation ein neues Gleichgewicht ein. Mit dem Anstieg der Konzentration einzelner Komponenten der Maische (z. B. NH_4^+) können toxische Effekte verbunden sein (Jarvis 1995).
2. Durch die Rezirkulation wurde Methan in erheblichem Umfang in der Vorstufe gebildet (Gijzen et al., 1988, Jarvis et al., 1995).
3. Der Celluloseanteil einer Gras/Klee-Silage wurde in der Vorstufe bei 37°C und einer Verweilzeit von 7 Tagen nur in geringem Umfang abgebaut (Jarvis et al., 1995)
4. Die Abbaugrade anderer Inhaltsstoffe (Mannitol, Lactat) sowie die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren stiegen in der Vorstufe durch die Rezirkulation an (Jarvis et al., 1995, Dandikas et al., 2012).
5. Trotz hoher Rezirkulationsraten von bis zu 8:1 wurden in einem zweiphasigen Laborsystem zur Vergärung von Maissilage im Hydrolyse- und Versäuerungsreaktor pH-Werte von maximal 5,7 gemessen. Die niedrigen pH-Werte führten zur Bildung eines Wasserstoff-reichen Biogases. Methan spielte nur bei der höchsten Rezirkulationsrate von 8:1 eine Rolle (Dandikas et al., 2012).

1.2.9 Entwicklung zweiphasiger Systeme

Die Entwicklung zweiphasiger technischer Biogasprozesse hat ihren Ursprung in der Zuckerindustrie. Dort wurden bereits am Ende des 19. Jahrhunderts zweiphasige Systeme entwickelt, zunächst ohne energetische Nutzung des Biogases. In der Landwirtschaft wurden sowohl in der BRD (ab 1981) als auch in der DDR (ab 1987) zunächst nur vereinzelte großtechnische zweiphasige Forschungsanlagen realisiert, bevor mit dem Jahr 2004 die Zahl zweiphasiger landwirtschaftlicher BGA deutlich zunahm. Der Auslöser war der sogenannte "NawaRo-Bonus" des EEG, der erstmals eine kostendeckende energetische Verwertung von Energiepflanzen in BGA ermöglichte.

Heute zielt die technische Innovation auf zweiphasige Systeme mit Vorstufen, die der Gewinnung organischer Säuren dienen sollen, oder auf zweiphasige Systeme mit Druck-Methanreaktoren, die eine direkte Einspeisung des Methans in das Erdgasnetz ermöglichen sollen (*AG-HiPreFer, Karlsruhe Institute of Technology* und *Universität Hohenheim*).

1.2.10 Hersteller

Auf der Basis verfügbarer Datenbanken, Referenzlisten und Fachveröffentlichungen wurden 26 Unternehmen, die Hydrolyse- und Versäuerungsstufen anbieten, erfasst. Zu den angebotenen Verfahren wurden verfügbare Informationen zusammengetragen und ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Analyse floss in die Auswahl der BGA ein, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden.

Tabelle 5 fasst die am Markt identifizierten Unternehmen zusammen. Die Darstellung umfasst auch Anbieter, die heute nicht mehr aktiv sind, deren H+V-Stufen aber noch Bestandteil des aktuellen deutschen Anlagenparks sind oder die technikgeschichtlich bedeutsam waren.

1.2.11 Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte

Externe Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte wurden für die Projektdurchführung nicht benötigt.

1.2.12 Fachliteratur und Informationsdienste

Die Fachliteratur ist als eigenständiges Kapitel am Ende des Berichts aufgeführt.

1.2.12.1 ttz Bremerhaven (Auswahl):

- FIZ Karlsruhe, Förderkompass Energie – BINE Datenbank
- ScienceDirect: https://www.sciencedirect.com/
- Staats- und Universitätsbibliothek Bremen

1.2.12.2 Cordes+Winterberg (Auswahl):

- *GVK Plus* und *OPAC* der wissenschaftlichen Bibliotheken im Internet
- Zugänge der Universitätsbibliothek Magdeburg
- Internet-Literaturdatenbanken: *NCBI, Google Scholar, Researchgate*
- Literaturdatenbanken der Wissenschaftsverlage
- wissenschaftliche Literaturdatenbank des Büros *Cordes+Winterberg*
- Datenbanken des *DPMA*
- *Google patents*
- *Unternehmensregister*

Das Management der Informationsquellen und die Erstellung der Bibliographie wurde mit Hilfe des Programms *EndNote X7.7.1* durchgeführt.

1.2.12.3 Hochschule Anhalt (Auswahl):

Literaturdatenbanken:

- SCOPUS: https://www.scopus.com/home.uri
- ScienceDirect: https://www.sciencedirect.com/
- Die NCBI Datenbank Pubmed: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
- Web of Science Core collection, Zugang über Endnote

Tabelle 5: Hersteller, Planer und Vertriebe, die Hydrolyse- und Versäuerungsstufen für landwirtschaftliche BGA anbieten (Stand: 2016)

	Unternehmensname	Unternehmenssitz		Status	Geschäftsfeld
1	Atec Automatisierungstechnik GmbH	89231	Neu-Ulm	aktiv	Vertrieb
2	Avantec	27374	Visselhövede	liquidiert	Planer/Hersteller
3	Bebra Biogas GmbH	20095	Hamburg	aktiv	Planer/Hersteller
4	Bigatec	46519	Alpen	aktiv	Vertrieb
5	Biogas Nord AG	33719	Bielefeld	insolvent/liquidiert	Vertrieb
6	Bionova Biogas GmbH	15713	Königs-Wusterhausen	aktiv	Planer/Hersteller
7	bioteg Biogas-Systems GmbH	95349	Thurnau	aktiv	Planer/Hersteller
8	Bioconstruct	49328	Melle	aktiv	Planer/Hersteller
9	BME Biomasse Energie GmbH	84329	Wurmannsquick	liquidiert	Planer/Hersteller
10	BTN Biotechnologie Nordhausen GmbH	99734	Nordhausen	aktiv	Planer/Hersteller
11	BUE Anlagentechnik GmbH	06259	Braunsbedra	aktiv	Planer/Hersteller
12	Gicon Bioenergie GmbH	01219	Dresden	aktiv	Planer/Hersteller
13	Innovas GbR	80939	München	aktiv	Planer/Hersteller
14	Lipp GmbH	73947	Tannhausen	aktiv	Planer/Hersteller
15	Markert (Ingenieurbüro Dr. Markert)	36452	Kaltennordheim	aktiv	Vertrieb
16	MBB Messerschmidt-Bölkow-Blohm GmbH	CH 8001	Zürich	Geschäftsfeld eingestellt	Planer/Hersteller
17	PKM Leipzig		Leipzig	insolvent/liquidiert	Planer/Hersteller
18	Regio Biogas AG	26135	Oldenburg	insolvent/liquidiert	Planer/Hersteller
19	Rohn Werksvertretungen GmbH	91619	Insingen	aktiv	Planer/Hersteller
20	Planungsbüro Rossow GmbH	17033	Neubrandenburg	aktiv	Planer
21	Snow Leopard Projects GmbH	94419	Reisbach	aktiv	Planer/Hersteller
22	Schwarting Biosystem GmbH	24941	Flensburg	aktiv	Planer/Hersteller
23	SKET Schwermaschinenbau Magdeburg GmbH	39120	Magdeburg	Geschäftsfeld eingestellt	Planer/Hersteller
24	Stolberg Ingenieure	25873	Oldersbek	aktiv	Vertrieb
25	Strabag Umwelttechnik GmbH (ehemals Linde)	01031	Dresden	aktiv	Hersteller
26	4biogas GmbH & Co. KG	44229	Dortmund	insolvent/liquidiert	Planer/Hersteller

blau: Hersteller/Planer, dessen Anlagen im Rahmen der Feldstudie aufgesucht wurden

Informations- und Dokumentationsdienste:

- GenBank: BENSON, D. A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., OSTELL, J., PRUITT, K. D. & SAYERS, E. W. 2018. GenBank. *Nucleic Acids Res,* 46**,** D41-D47; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
- MALDI-Biotyper Microflex Database, Bruker, 2017
- BLAST: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (2015-2018)
- BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams *T. Hulsen, J. de Vlieg and W. Alkema*, BMC Genomics 2008, **9** (1): 488: http://www.biovenn.nl/index.php
- Past3, Version 3.20: Hammer, Øyvind, Harper, David A.T., and Paul D. Ryan, 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica, vol. 4, issue 1: https://folk.uio.no/ohammer/past/
- R-statistische Software: A language and environment for statistical computing; https://www.r-project.org/

1.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

1.3.1 ttz Bremerhaven

Für die Laborversuche des Verbundprojekts wurden wiederholt Proben und Inokula der zweiphasigen Biogasanlage des Landwirtschaftsbetriebs Grimm (Worpswede) verwendet. Diese Biogasanlage gehörte nicht zur Gruppe der 6 experimentell untersuchten Biogasanlagen, war diesen jedoch ähnlich.

1.3.2 Cordes+Winterberg

Die Begleitung der Emissionsmessungen sowie die Auswertung der Betreiberdaten erfolgte mit Unterstützung der jeweiligen Betreiber der Biogasanlagen. Darüber hinaus wurden folgende Zusammenarbeiten durchgeführt:

1. Weender-Analyse ausgewählter Reaktorinhalte der Biogasanlage 18, durchgeführt durch die *WATTRIX GmbH* (Jever)
2. Wasserstoffanalysen zu ausgewählten Biogasproben der Vorstufen, durchgeführt durch das *Deutsche Biomasseforschungszentrum gGmbH* (Leipzig)
3. Die Bewertung der Emissionen der offenen Vorstufen erfolgte im Austausch mit dem *Deutschen Biomasseforschungszentrum* sowie dem *Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V.* (Darmstadt). Diese Zusammenarbeit wird fortgesetzt und führt zu mindestens einer Fachpublikation (s. dort).

1.3.3 Hochschule Anhalt

Die Sequenzierungen wurden durch *Seqlab* (Göttingen) durchgeführt: (https://www.microsynth.seqlab.de/home-de.html). Die Synthese des qPCR-Standards erfolgte durch *Eurofins Deutschland* (www.eurofins.de).

2. Methoden, Ergebnisse und Diskussion

2.1 Definitionen

Cordes+Winterberg

2.1.1 Phasen und Stufen

Technische Anlagen, in denen organische Substanzen in zwei seriell betriebenen Reaktoren mit dem Ziel der Entsorgung oder der Energiegewinnung mikrobiell umgesetzt werden, sind bereits vor mehr als 100 Jahren realisiert worden. Mit diesen Systemen ist eine anhaltende Begriffsverwirrung verbunden, da von zweistufigen und/oder zweiphasigen Anlagen gesprochen wird, ohne dass sich bislang eine allgemein gültige Definition dieser Begriffe durchgesetzt hat.

Im Folgenden wird der Begriff „Stufe“ für einen Reaktor verwendet, der in eine seriell geschaltete Reaktorkaskade integriert ist, und zwar unabhängig von der Art der Reaktion, die in ihm abläuft. Der Begriff „Phase“ steht dagegen für den biochemischen Reaktionstypus innerhalb der anaeroben Nahrungskette, also die Schritte Hydrolyse, Säurebildung und Methanbildung. Diese Definition folgt Verstraete (1981).

Definition: Stufen und Phasen

Der Begriff „Stufe“ wird im Rahmen der vorliegenden Studie für einen Reaktor verwendet, der in eine seriell geschaltete Reaktorkaskade integriert ist, und zwar unabhängig von der Art der Reaktion, die in ihm abläuft.

Der Begriff „Phase“ steht dagegen für den biochemischen Reaktionstypus innerhalb der anaeroben Nahrungskette, also für die Schritte Hydrolyse, Säurebildung und Methanbildung.

2.1.2 Vorstufen

Für die Realisierung von Biogasanlagen, die mit zwei oder mehr seriell geschalteten Reaktoren ausgestattet sind, sprechen folgende Gründe:

1. Schaffung von Puffervolumen und/oder Vergleichmäßigung der Zulaufrate und der Zusammensetzung des Substrates, des Abwassers oder des Bioabfalls
2. Anmaischung von Substraten mit hohem Feststoffanteil in einer vorgeschalteten Stufe
3. Aufheizung der Substrate auf die angestrebte Fermentationstemperatur
4. Hygienisierung des Substrats (in der Regel auf die Bioabfallbehandlung beschränkt und daher hier nicht weiter berücksichtigt)
5. Erweiterung des Anlagenvolumens durch Hinzufügung eines weiteren Reaktors zur Entlastung der bestehenden Anlage (z. B. in der Form eines Haupt- und Nachgärersystems) oder zur Nutzung des Kaskadeneffektes
6. Etablierung von 2 bioprozesstechnischen Phasen (Hydrolyse- und Versäuerungsstufe einerseits sowie Methanstufe andererseits) mit dem Ziel, die Prozesseffizienz zu erhöhen

Weitere, speziellere Motive hat Langhans (1999) zusammengefasst. Die verschiedenen, dem Hauptfermenter vorgeschalteten Substratbehälter lassen sich als Vorstufen zusammenfassen (Abbildung 3).

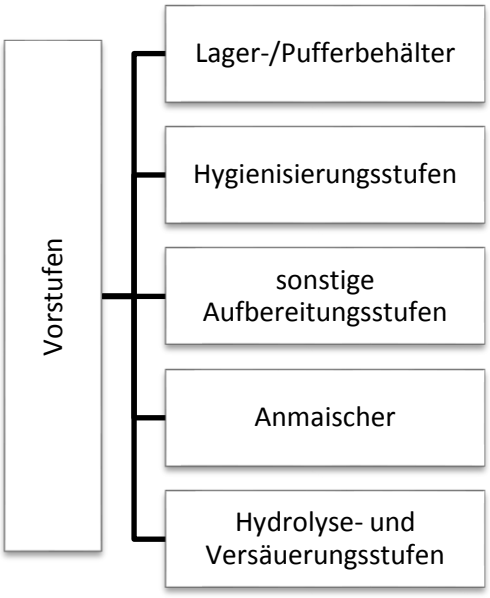


Abbildung 3: Verschiedene Formen der Vorstufen landwirtschaftlicher Biogasanlagen (Grafik: Cordes+Winterberg 2016)

Definition: Vorstufen

Als Vorstufen werden alle substratführenden Behälter zusammengefasst, die dem Fermenter oder den Fermentern einer Biogasanlage vorgeschaltet sind. Vorstufen können offen oder gasdicht geschlossen sein.

Die Speicher- und Pufferbehälter, Anmaischer sowie Hydrolyse- und Versäuerungsstufen lassen sich hinsichtlich ihrer bioprozesstechnischen Charakteristika nicht eindeutig voneinander unterscheiden, da ihre jeweiligen Funktionen in der Regel Nebeneffekte verursachen, die über die Kernfunktion hinausgehen (Tabelle 6):

1. So kommt es in der Regel in allen Vorstufen zu mikrobiellen Hydrolyse- und Versäuerungsreaktionen.
2. Auch die Beheizung des Behälterinhalts, typisches Charakteristikum vieler Hydrolyse- und Versäuerungsstufen, ermöglicht keine sichere begriffliche Abgrenzung gegenüber Anmaischern, wenn diese mit erwärmtem Rezirkulat betrieben werden, das aus einem Nachgärer stammt.
3. Die in der Fachpresse immer wieder als typisches Merkmal der H+V-Stufen erwähnte "kontrollierte" Versäuerung setzt ein regelmäßiges Monitoring des Bioprozesses voraus. Dieses ist aber nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie allerdings in der Praxis eine seltene Ausnahme.
4. Lediglich die Belüftung, Charakteristikum bestimmter Herstellerkonzepte, ist nahezu ausschließlich den Hydrolyse- und Versäuerungsstufen vorbehalten.

Die Prozessmerkmale der verschiedenen Vorstufen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 6: Prozessmerkmale der Substratspeicher, Anmaischer sowie Hydrolyse- und Versäuerungsstufen

	Behälter		
	Speicher	Anmaischer	Hydrolyse- und Versäuerungs-Stufe
Funktion			
Speicherung	+	+	o
Anmaischen	-	+	(+)
Hydrolyse/Versäuerung	o	o	+
Prozesstechnische Maßnahmen			
Rezirkulation	-	(+)	(+)
Temperierung	-	-	(+)
pH-Regulation	-	-	(+)
Belüftung	-	-	(+)
kinetische Prozesssteuerung (Verweilzeit)	-	-	+

+ obligatorisch
(+) optional
o Nebeneffekt
- nicht erwünscht/spielt keine Rolle

In Ermangelung eindeutiger Abgrenzungskriterien wird im Rahmen der vorliegenden Studie die *Hydrolyse- und Versäuerungsstufe* als ein Reaktor bezeichnet, der vom Planer oder Hersteller installiert wurde, um die Phasen der Hydrolyse und der Versäuerung räumlich möglichst weitgehend von der nachfolgenden Aceto- und Methanogenese zu trennen. Die Mindestvoraussetzung für die reaktionstechnische Trennung der Hydrolyse und der Acidogenese einerseits und der Aceto- und Methanogenese andererseits ist eine kinetische Prozesssteuerung: Die Verweilzeit des Substrats in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe muss kürzer sein als die Generationszeit der im System aktiven acetogenen und methanogenen Bakterien, um die Etablierung einer stabilen Population dieser Bakterien in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe zu verhindern.

Definition: Hydrolyse- und Versäuerungsstufe

Als Hydrolyse- und Versäuerungsstufe wird in Abgrenzung gegenüber anderen Vorstufen ein Reaktor bezeichnet, der vom Planer oder Hersteller installiert wurde, um die Phasen der Hydrolyse und der Versäuerung räumlich möglichst weitgehend von der nachfolgenden Aceto- und Methanogenese zu trennen.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Bioprozessanalyse
ttz Bremerhaven

2.2.1.1 Entwicklung und Bau der Gassammelhaube

Zur Erfassung der Gasbildungsrate und zur Entnahme von Gasproben in den Hydrolyse- und Versäuerungsstufen musste zunächst eine flexible, an die jeweiligen Bedingungen vor Ort anpassbare Gasentnahmevorrichtung entwickelt und konstruiert werden. Abbildung 4 zeigt die erste Konstruktion. Auf Basis erster Praxistests in der BGA 18 wurde das System weiterentwickelt und optimiert.

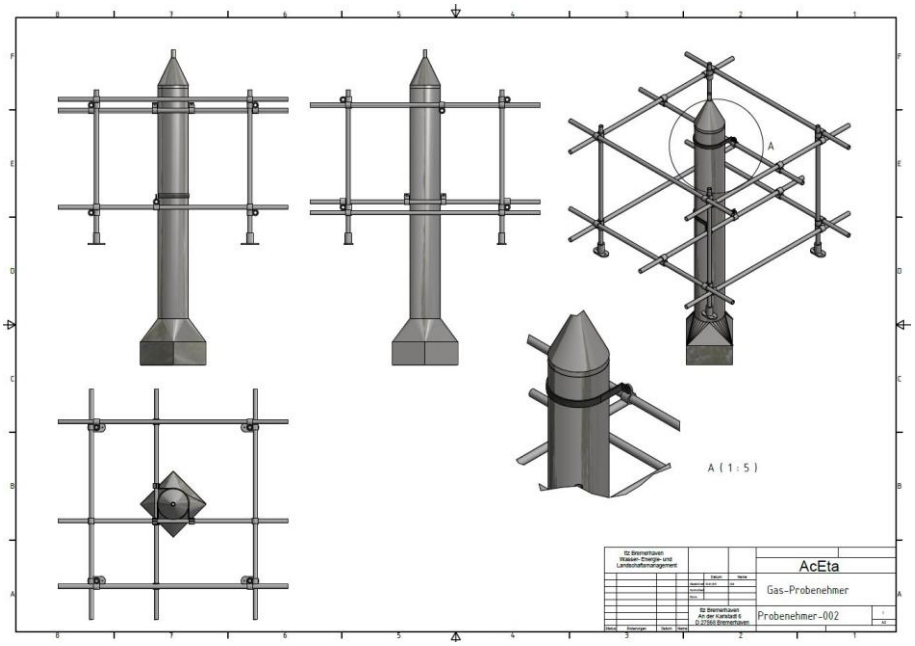


Abbildung 4: Konstruktionszeichnung des ersten Gas-Probennehmers

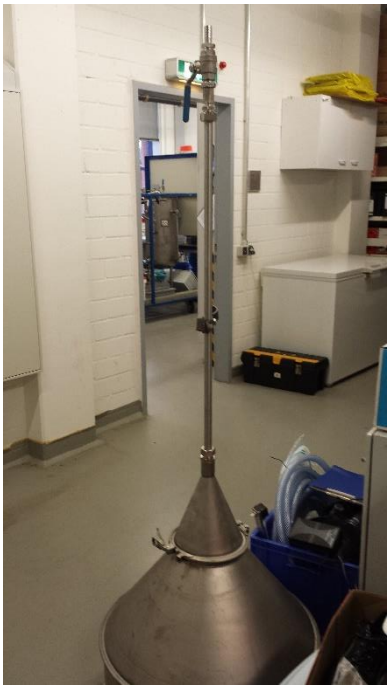
Bei den ersten Tests stellte sich heraus, dass der Flüssigkeitsfüllstand in den Hydrolyse- und Versäuerungsstufen aufgrund der Befüll- und Entleerungsvorgänge starken Schwankungen unterliegt. Dies erschwerte reproduzierbare Probenahmen ebenso wie die starke Strömung, hervorgerufen durch die Rührwerke (Abbildung 5). Des Weiteren dauerte es sehr lange bis das Luftvolumen im Rohr durch das in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe gebildete Gas ausgetauscht wurde, welches die Messung der Gaszusammensetzung stark verzögerte.

Abbildung 5: Tiefeintauchende Haube, BGA 18

Auf Grund dieser Effekte wurde zunächst die Haube um 20 cm verlängert, um die Eintauchtiefe zu erhöhen. Um den Druck im Rohr zu erhöhen und den Austausch der nach dem Einbringen in das Substrat darin befindlichen Luft zu beschleunigen, wurde ein Hahn an der kleinen Haube sowie ein Auslass am Rohr zur Druckmessung mittels U-Rohrmanometer installiert und mittels Druckluft getestet (Abbildung 6).

Abbildung 6: (a) Verlängerung der Haube; (b) Hahn an Auslass und U-Rohrmanometer (Abbildung: ttz Bremerhaven 2015)

Die modifizierte Haube wurde dann an der BGA 18 erfolgreich erprobt. Da es trotz dieser Modifikationen längere Zeit in Anspruch nahm, das Rohr vollständig sauerstofffrei zu bekommen, wurde der lange zylindrische Schuss mit 20 cm Durchmesser durch ein Rohr mit 4 cm Durchmesser ausgetauscht, welches direkt in die kleine Haube eingeschraubt wurde. Die kleine Haube wurde dann direkt auf der großen Haube befestigt (Abbildungen 7 und 10). Mit dieser Konstruktion wurden dann die Probenahmen bei den BGA 2, 3, 12, 17 und 16 durchgeführt.



Die Durchführung der Probenahmen verlief gut, jedoch musste noch das Gestell optimiert werden. Hierfür wurde ein eine selbsttragende und flexibel an die jeweiligen Bedingungen vor Ort adaptierbare Krankonstruktion gebaut und erfolgreich eingesetzt (Abbildungen 8 und 9). Der Kran ist auf dem Gestell schwenkbar. Für schwerer zugängliche Öffnungen bzw. weniger Bewegungsfreiraum (BGA 17) wurde eine schmalere Variante angefertigt, bei der dann ein Gegengewicht auf den Schenkeln des Gestells platziert wird (Abbildung 11).

Abbildung 7: Haube mit Rohr geringeren Querschnitts (Abbildung: ttz Bremerhaven 2015)

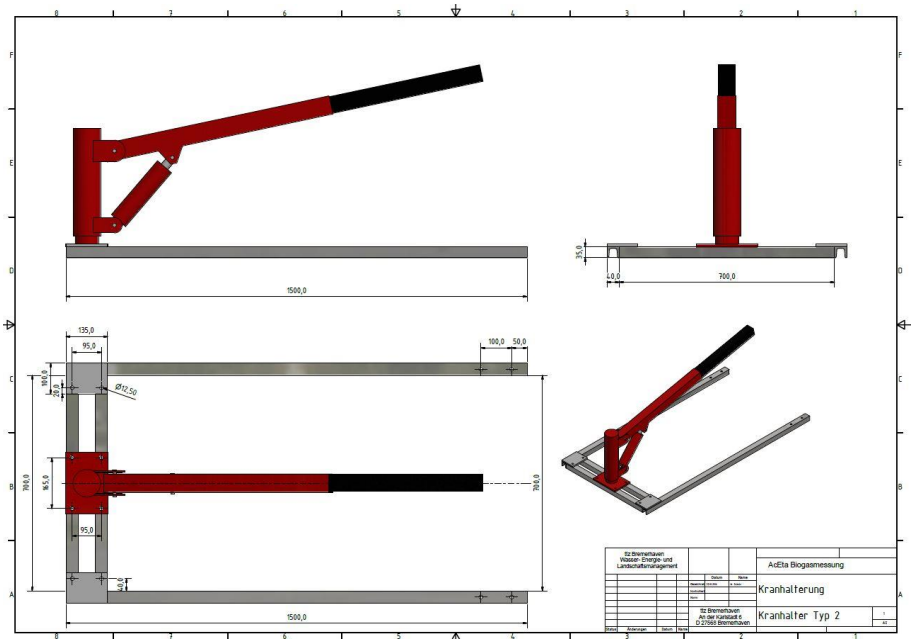


Abbildung 8: Kran auf Gestell für gut zugängliche Öffnungen (Abbildung: ttz Bremerhaven 2016)

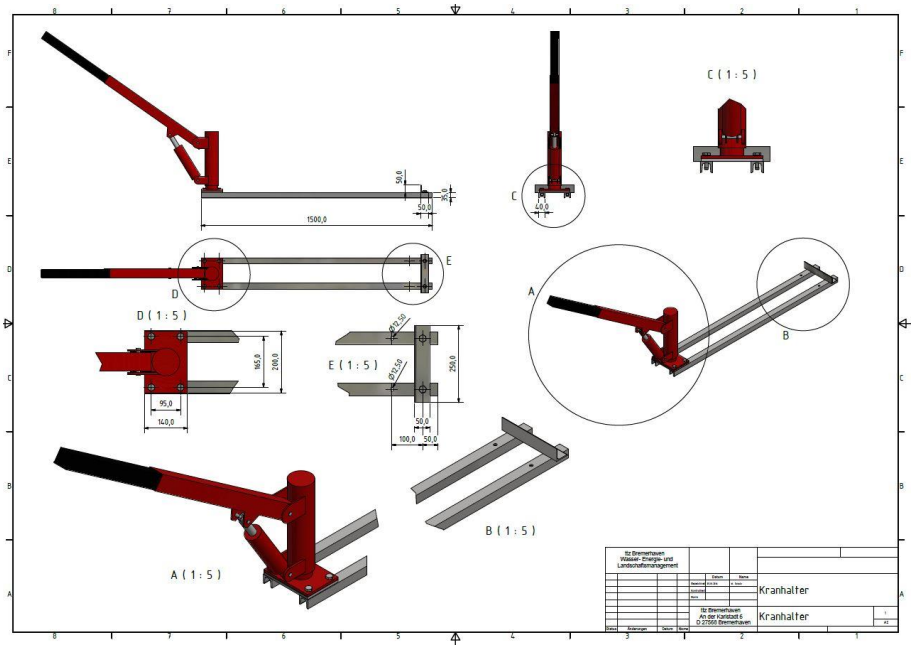


Abbildung 9: Kran auf Gestell für schwerer zugängliche Öffnungen (Abbildung: ttz Bremerhaven 2016)

2.2.1.2 Messung der Gasbildungsraten und der Gaszusammensetzung

Methoden. Das Biogas der offenen Vorstufen wurde durch einen 100 l-Gassammler aus Edelstahl (ttz Bremerhaven, Abbildungen 10 und 11) aufgefangen, der auf die Flüssigkeitsoberfläche der Maischen aufgesetzt wurde. Das aufgefangene Gas wurde über einen Trommelgaszähler (TG 3, Ausführung 5 (PVC) der *Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG* (Bochum)) geleitet, die die Bestimmung der Gasbildungsrate gestattete. Die Dauer der Gasflussmessung wurde nicht standardisiert, sondern war von den Rahmenbedingungen abhängig, die der Betrieb der Biogasanlage vorgab. In der Regel betrug die Messdauer 1-2 Stunden. Nach Abschluss der Gasflussmessung wurde Trommelgaszähler durch ein Biogas-Feldmessgerät (*MRU Optima 7 Biogas* der *MRU Instruments Inc.*, Houston, USA) ersetzt, mit dem die Biogaszusammensetzung ermittelt wurde.

Für jede Anlage wurde außerdem die Wasserstoffkonzentration der Biogasproben bestimmt. Dazu wurde nach der qualitativen Biogasuntersuchung Biogas in Gasbeuteln (*Supel*-Bags, *Supelco*, Bellefonte, USA; Vertrieb: *Sigma-Aldrich*

Chemie GmbH, München) gesammelt und im Labor des DBFZ (Leipzig) gaschromatografisch (Micro-GC der *SLS Micro Technology GmbH*, Hamburg, ausgestattet mit einer *Carbosphere*-Trennsäule) untersucht. Einzelne Gasproben wurden dem Gassammler mit Hilfe einer Gaspumpe entnommen.

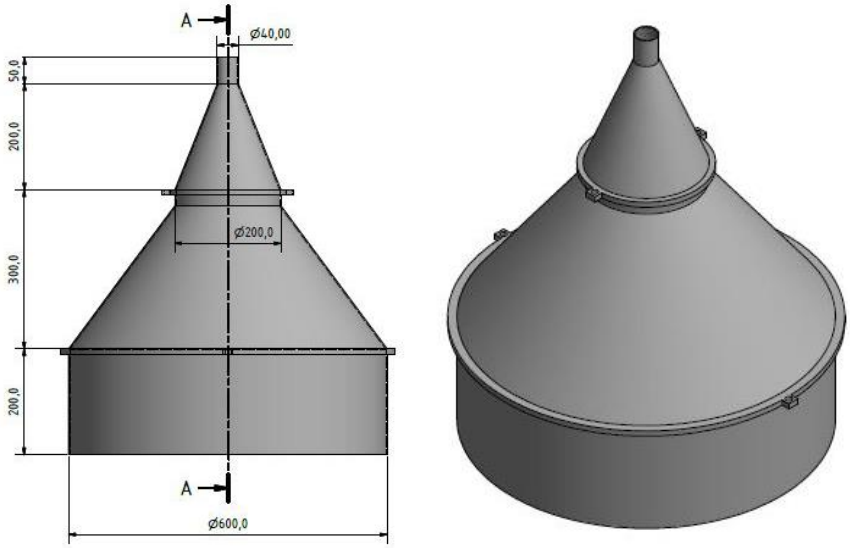


Abbildung 10: Gassammler des ttz Bremerhaven aus Edelstahl (Abbildung: ttz Bremerhaven 2017)

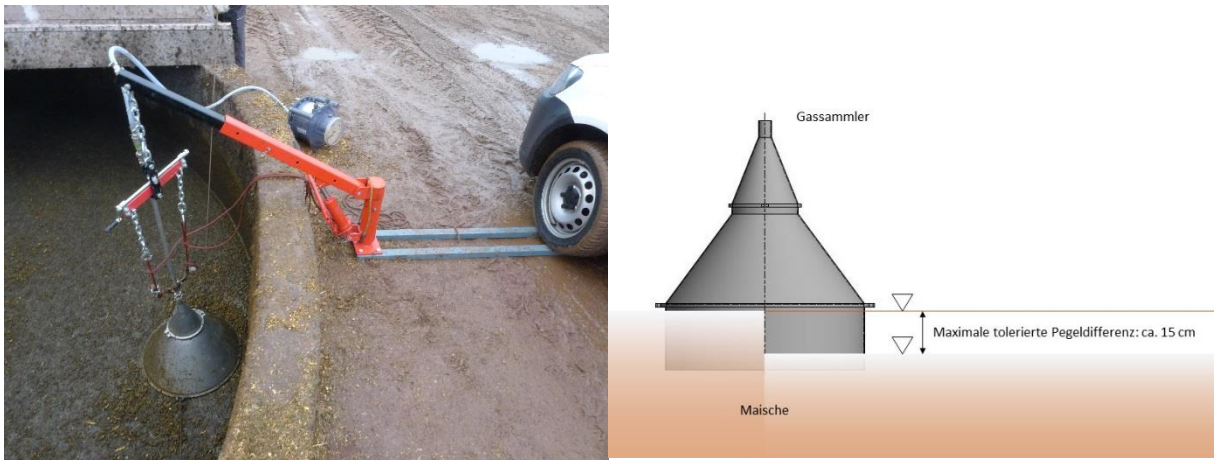


Abbildung 11: Gassammler im Einsatz an einer offenen Vorstufe. Die Skizze zeigt die maximal tolerierte Pegeldifferenz von 15 cm. Größere Differenzen wurden durch Anheben oder Absenken der Haube ausgeglichen (Foto und Skizze: Cordes+Winterberg 2017)

Normierung und Korrekturen. Lufteinträge wurden mit dem Feldmessgerät über den Sauerstoffgehalt des Biogases erfasst. Sie wurden grundsätzlich als messtechnisches Artefakt gewertet und daher durch rechnerische Korrektur eliminiert. Für das Wasserdampfvolumen wurde vereinfachend und einheitlich ein Anteil von 3 Vol.-% angenommen. Aufgrund der ausgeprägten Variationen der Prozessbedingungen der untersuchten Vorstufen (aktuelle Substratmischung, Zeitpunkt und Taktfrequenz der Substratdosierung während der Messung, Schwimmschichten, Betriebsstörungen vor oder während der Messung) wurden Luftdruck und Lufttemperatur als nicht Ergebnis-entscheidend bewertet. Eine Korrektur der ermittelten Gasflussraten unter Berücksichtigung dieser beiden Faktoren wurde daher nicht vorgenommen, zumal sich die Lufttemperatur vom Emissionsort bis zum Trommel-Gaszähler, vor allem bei niedrigen Außentemperaturen, bei dem verwendeten Verfahren verändert.

2.2.1.3 Chemische Untersuchung von flüssigen Reaktorinhalten

Proben für die chemische Analyse im Labor des ttz Bremerhaven wurden von folgenden Biogasanlagen entnommen: BGA 2, 3, 12, 16, 17 und 18. Die Konzentrationen folgender Parameter wurden im Labor bestimmt: CSB, Rohprotein, Fett, Kohlenhydrate, Cellulose, Lignin, NH_4-N / NH_3-N, Milchsäure, Ethanol, TS und oTS bzw. Aschegehalt.

Der pH Wert sowie die Probentemperatur wurden direkt bei der Probennahme bestimmt. Die Bestimmung des Trockenrückstandes erfolgte nach DIN EN 12880 Teil 2a „Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts“, die Bestimmung des Glührückstandes nach DIN EN 12879 Teil 3a „Bestimmung des Glührückstandes und des Glühverlustes der Trockenmasse eines Schlammes“, der „Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“. Der gesamte CSB sowie NH4-N/NH3-N wurden mittels Küvettentest bestimmt (HACH LANGE, LCK 914 bzw. LCK 304). D-Milchsäure und L-Milchsäure wurden unter Verwendung der UV-Methode (BOEHRINGER Mannheim/R-Biopharm, Enzymatic BioAnalysis, Cat. No. 11 112 821 035) bestimmt. Die Ethanolkonzentration wurde ebenfalls mittels einer UV-Methode ermittelt (*BOEHRINGER* Mannheim/*R-Biopharm, Enzymatic BioAnalysis*, Cat. No. 10 176 290 035).

Für die Analysen zur Bestimmung des Protein-, Fett-, Cellulose- und Lignin-Gehalts wurden die Proben zunächst getrocknet, gemahlen und in der Mühle homogenisiert. Anschließend wurden im Einzelnen nachfolgende Methoden verwendet.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde die titrimetrische Methode nach Kjeldahl, in Anlehnung an „Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB“, durchgeführt. Der organisch gebundene Stickstoff wird durch Aufschluss der Probe mit konzentrierter Schwefelsäure in Ammoniumsulfat übergeführt. Nach Versetzen mit Natronlauge im Überschuss wird durch Destillation das freigesetzte Ammoniak übergetrieben, in Borsäurelösung aufgefangen und anschließend titriert. In Abhängigkeit des Aminosäurespektrums wurde zur Berechnung des Rohproteingehalts der Faktor 6.25 (Mais) verwendet.

Zur Bestimmung des Gesamtfettgehalts wurde das gravimetrische Verfahren nach Weilbull-Stodlt, in Anlehnung an „Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB“, angewendet. Die Probe wird mit Salzsäure aufgeschlossen und die Aufschlussflüssigkeit filtriert. Der Filter mit dem Aufschlussrückstand wird neutral gewaschen, getrocknet und mit Petroleumbenzin extrahiert. Das Extraktionsmittel wird abdestilliert, der Rückstand bei 103°C +/- 2°C getrocknet und gewogen. Das Gewicht entspricht dem Gesamtfettgehalt in der Probeneinwaage.

Zur Bestimmung des Cellulose-Gehalts der zu untersuchenden Probe wurde eine erweiterte Weender-Analyse durchgeführt. Die Probe wird hierbei zunächst in einer schwefelsauren ADS-Lösung heißextrahiert und darauf erfolgt eine Kaltextraktion mit Aceton. Der Rückstand entspricht nun dem Anteil von Cellulose und Lignin. Der Cellulose-Gehalt wird nach erfolgter Lignin-Gehaltsbestimmung durch Differenzbildung berechnet (siehe Lignin).

Zur Bestimmung des Lignin-Gehalts der zu untersuchenden Probe wurde eine erweiterte Weender-Analyse durchgeführt. Die Probe wird hierbei zunächst in einer schwefelsauren ADS-Lösung heißextrahiert und darauf erfolgen zwei Kaltextraktionen mit Aceton (vgl. Cellulose) und 72% Schwefelsäure. Anschließend wird der Rückstand bei 525°C verascht und der Lignin-Gehalt berechnet.

Der Kohlenhydrat-Gehalt der Probe wurde berechnet. Der Kohlenhydrat-Anteil der Probe wird indirekt aus der Differenz der ermittelten Gehalte für Protein, Fett, Cellulose, Lignin und der Asche berechnet. Der Wert beschreibt dabei alle in der Probe enthaltenen Kohlenhydrate, ausgenommen Cellulose und Lignin.

2.2.1.4 Bestimmung der flüchtigen organischen Säuren

Die Konzentrationen flüchtiger organischer Säuren wurden mittels Gaschromatographie / Massenspektroskopie (GC-MS, Typ Agilent 7890 GC mit 5973 MS) ermittelt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Aufbereitungs- und Analyseverfahren verwendet. Vor der Analyse mussten die Proben zunächst aufbereitet werden. Problematisch für die GC Analytik ist Wasser in den Proben, was zu starkem Verschleiß im bzw. zu vorzeitiger Alterung des Ionenmultipliers führt. Suspendierte Partikel in der Probe wurden durch Zentrifugation entfernt. Auf eine Abtrennung der Proteine und Fette wurde verzichtet, nachdem festgestellt wurde, dass durch die üblicherweise dazu angewendete Methode (Kühlung auf unter 5 °C und Phasentrennung) auch langkettige organische Säuren fest geworden und ausgefallen sind, was die Analytik des Spektrums und der Konzentrationen organischer Säuren verfälscht hätte.

Im zuerst angewendeten Verfahren wurden die organischen Säuren zunächst auf einer 30 m ZB-Wax Kapillarsäule mit 0,25 mm Innendurchmesser und 0,25 µm Polyethylen-Glykol-Phase von Phenomenex nach Extraktion aus den Proben mittels Twistern® der Firma Gerstel analysiert. Zuvor wurde eine Kalibrierung mit dem Standardmix für flüchtige organische Säuren von Supelco durchgeführt. Die Analysenergebnisse zeigten jedoch Säurespektren, die z.T. ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Essigsäure in den Proben ausweisen. Es besteht die Vermutung, dass die gewählte Methode der Twister-Extraktion, eigentlich Adsorption und anschließende thermische Desorption, hier das Ergebnis beeinfluss hat (Adsorption mehrerer Verbindungen in hoher Konzentration, Sättigung des Sorbens, etc.).

Um das Problem zu umgehen, wurden in einem zweiten Verfahrensansatz die Proben direkt und ohne zwischengeschaltete Twister-Extraktion zunächst mit Ethanol im Verhältnis 1:10 verdünnt, um die Wasserphase zurückzudrängen. Suspendierte Partikel in der Probe wurden durch Zentrifugation entfernt. Als Trennsäule wurde

erneut die Phenomenex Zebron ZB-WAX eingesetzt. Zur Kalibrierung wurde der Standard „Volatile Free Acid Mix" CRM46975 von Supelco eingesetzt. Da es sich bei dem Standard um eine wässrige Lösung aller für die Anwendung relevanten organischen Säuren handelte, wurde – analog zur Aufbereitung der Analysenproben – auch der Standard zunächst mit Ethanol im Verhältnis 1:10 verdünnt.

2.2.1.5 Technikumsuntersuchungen zur Kinetik des Substratabbaus

In ergänzenden Technikumsversuchen wurde untersucht, in wie weit die Verweilzeit und die Rezirkulation einen Einfluss auf die Prozesse in der Hydrolyse und Versäuerung haben. Für die Versuche wurden zwei baugleiche Glasreaktoren mit einem gesamten Volumen von ca. 20 L und einem beheizbaren Mantel aufgebaut. Vom Gesamtvolumen wurden ca. 8 L als Flüssigkeits-Nutzvolumen für die Versuche genutzt, das übrige Volumen bildete den Gasraum. Die Reaktoren waren als klassische Rührkessel ausgeführt. Als Substrate wurden Mais- und Grassilage eingesetzt. Die Versuche mit Maissilage und Grassilage (jeweils mit Rezirkulat angesetzt) liefen parallel wie in einer Hydrolyse ohne Belüftung (gasdichte, geschlossene Hydrolysestufe).

Als Modellsubstanz bzw. Inokulum zum Start der Reaktoren wurde Substrat aus der Hydrolyse einer Biogasanlage in Worpswede verwendet (http://www.biogas-grimm.de). Diese Biogasanlage, die nicht zu den kontinuierlich beprobten sechs Anlagen gehörte, wurde deswegen ausgewählt, da sie deutlich näher an Bremerhaven liegt als die anderen Anlagen und die Transportwege, insbesondere bei höheren Außentemperaturen, mit ca. 54 km kurz genug waren, signifikante Veränderungen in Substraten und Rezirkulat während des Transports zu vermeiden. Die Transportwege zu den kontinuierlich beprobten Anlagen hätten hingegen ca. 400 – 500 km betragen. Zusätzlich wurde zum Ansetzen der Mais- und Grassilage wurde Rezirkulat der Anlage Worpswede verwendet. Nach Abschluss der Untersuchungen im Labormaßstab wurde die Anlage umgebaut.

Untersuchung des Einflusses der Verweilzeit in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe. Zur Variation der Verweilzeiten wurden Versuche mit 10 Tagen, 8 Tage, 6 Tagen, 4 Tagen, 2 Tagen und einem Tag durchgeführt. Der Start erfolgt mit einer Verweilzeit von 10 Tagen. Für jede Verweilzeit erfolgt ein Neustart mit dem Substrat aus der Hydrolysestufe der BGA Worpswede. Jede Verweilzeit sollte jeweils für einen Zeitraum von 5 Verweilzeiten betrieben werden. Ausnahmen bildeten lediglich die Versuche zur Verweilzeit von 8 und 10 Tagen, die jeweils nur über den Zeitraum von 3 Verweilzeiten durchgeführt wurden.

Die Rezirkulatmenge wurde in allen Versuchen auf 74 % eingestellt. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht der Fütterungshäufigkeit und Zusammensetzung.

Tabelle 7: Füttermatrix, genutzte Flüssigkeitsvolumen 8 L

HRT [Tag]	Häufigkeit der Fütterung	Probe-nahme	Reaktor 1 (Mais) Maissilage	Rezirkulat	Probe-nahme	Reaktor 2 (Gras) Grassilage	Rezirkulat
10	2/Woche	2,8 L	0,67 kg	1,9 L	2,9 L	0,57 kg	1,7 L
8	2/Woche	3,5 L	0,882 kg	2,559 L	3,5 L	0,913 kg	2,569 L
6	2/Woche	4,6 L	1,19 kg	3,4 L	4,6 L	1,22 kg	3,4 L
4	2/Woche	3,5 L	0,896 kg	2,6 L	3,5 L	0,91 kg	3,5 L
2	4/Woche	3,92 L	1,008 kg	3,0 L	4,0 L	1,02 kg	2,96 L
1	täglich	3,94 L	1,04 kg	2,90 L	4,02 L	1,02 kg	3,0 L

Es wurden für die einzelnen Verweilzeiten je 54,8 kg Maissilage und 47,5 kg Grassilage sowie nachfolgende Volumina Rezirkulat benötigt: HRT 10: 30,4 L, HRT 8: 56,8 L, HRT 6: 50,6 L, HRT 4: 50,6 L, HRT 2: 51,0 L, HRT 1: 50,6 L.

Das Substrat in den Reaktoren wurde kontinuierlich gerührt. Der Reaktorinhalt wurde mittels Umwälzthermostat über den Reaktormantel auf ca. 30 °C erwärmt, was etwa den in den beprobten Großanlagen ermittelten Temperaturen entsprach. Zur Gasmengenmessung war jeweils ein *Red-y*- Gasflussmessgerät von *Vögtlin, GSM-A9SS-BN00*, an den Gasauslass der Reaktoren angeschlossen. Die Daten des *red-y* Gasflow-Messgerätes wurden mittels *easyHTK* Software über einen PC umgewandelt und anschließend ausgelesen (Abbildung 13 links). Die Reaktoren waren über Magnetventile an einen Infrarot-Gasanalysator, Deponiegasmonitor *Geotechnical Instruments*, *Modell GA 94*, angeschlossen und wurden, wie in Abbildung 13 rechts dargestellt, nacheinander im Viertel-Stunden-Takt angesteuert, um die jeweilige Gaszusammensetzung zu analysieren.

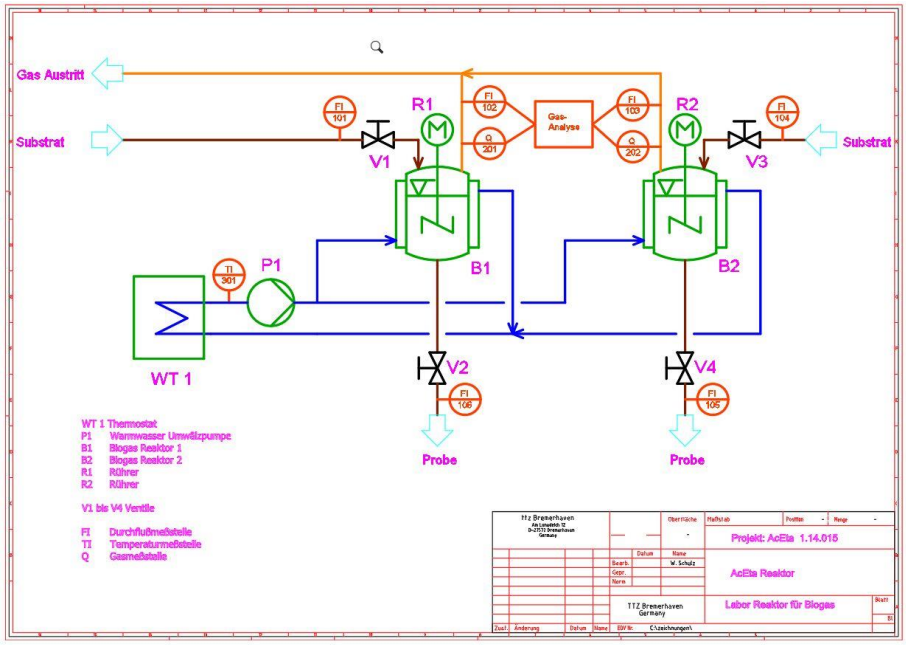


Abbildung 12: R&I Fließbild der Technikumsanlage

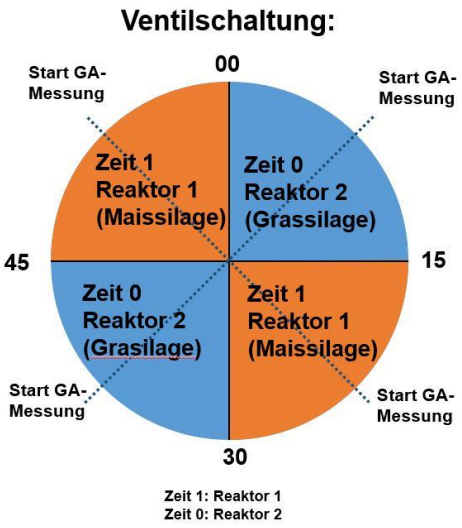


Abbildung 13: Versuchsanlage im Labor (links) und Ventilschaltung für die Gasanalyse (rechts)

Untersuchung des Einflusses der Rezirkulation in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe. Das Rezirkulationsverhältnis ist als Massenstrom Flüssigphase bezogen auf den Massenstrom Substrat berechnet. Die Bestimmung des Einflusses der Rezirkulationsintensität auf den Stoffumsatz erfolgte mittels der Variation des Verhältnisses an Mais- bzw. Grassilage zu Rezirkulat. Die Versuche wurden ebenfalls parallel mit Mais- und Grassilage durchgeführt.

Die Fütterungsmengen sind in der Tabelle 8 aufgelistet, die hydraulische Verweilzeit wurde auf 8 Tage eingestellt, da in den vorangegangenen Versuchen zur Verweilzeit bei einem Rezirkulationsverhältnis von 74 % längere Verweilzeiten (HRT 6 und mehr) deutlichere Ergebnisse gezeigt hatten.

Tabelle 8: Füttermatrix Flüssigkeitsvolumen 8 L/ Fütterung 2 mal pro Woche, HRT 8 Tage.

	Probenahme	Reaktor 1 (Maissilage)		Reaktor 2 (Grassilage)	
Rezirkulations-verhältnis		Maissilage	Rezirkulat	Grassilage	Rezirkulat
80 %	3,5 L	0,68 kg	2,76 L	0,68	2,8

Auch in diesen Versuchen wurde das Substrat in den Reaktoren kontinuierlich gerührt und der Reaktorinhalt auf ca. 30 °C temperiert. Gasmengenmessung und Analyse der Gaszusammensetzung erfolgte analog zu den Versuchen zur Variation der Verweilzeit.

2.2.1.6 Berechnungsverfahren

Substratzusammensetzung. Die Zusammensetzung der Mischsubstrate mit/ohne Rezirkulat wurde algebraisch auf Basis der Massenströme der einzelnen Substrate (Betriebsdaten) und ihrer Zusammensetzung nach Literaturdaten (vor allem DLG, 1997; Reinhold und Mumdey, 2012; Reinhold, 2014) berechnet.

oTM-Raumbelastungen und Abbaugrade. Die Berechnung der oTM-Raumbelastungen berücksichtigt die oTM der Rezirkulate nicht, da diese vereinfachend als "ausgefault" betrachtet werden. Die Berechnung der Abbaugrade berücksichtigt nicht die Masseverluste der Suspensionen durch den mikrobiologischen Abbau. Unter Berücksichtigung der branchentypischen, erheblichen Heterogenitäten der Stoffflüsse, Substrat- und Probenzusammensetzungen sowie Betriebsbedingungen sind diese in Vorstufen vernachlässigbar.

2.2.2 Methoden der Populationsanalyse
Hochschule Anhalt

Im Rahmen des dreijährigen Projektes wurde eine Populationsanalyse mit MALDI-TOF-MS und quantitativer PCR in sechs Anlagen durchgeführt. Im Berichtszeitraum wurden 38 Proben gezogen und aus diesen Proben ca. 10.000 MALDI-TOF-MS Messungen durchgeführt, zusätzlich Kolonie-PCR und Sequenzierungen (ca. 3000 Proben).

Zunächst wurde im Arbeitspaket 2 die gesamte Methodik, angefangen von der Probenahme über die Probenaufarbeitung bis hin zur MALDI-TOF-MS-Analyse, optimiert bzw. entwickelt. Zu den in diesem Projekt verwendeten Methoden wurden jeweils Arbeitsanweisungen (AAM's) erstellt. Eine Liste der erarbeiteten Anweisungen ist dem Berichtstext angefügt.

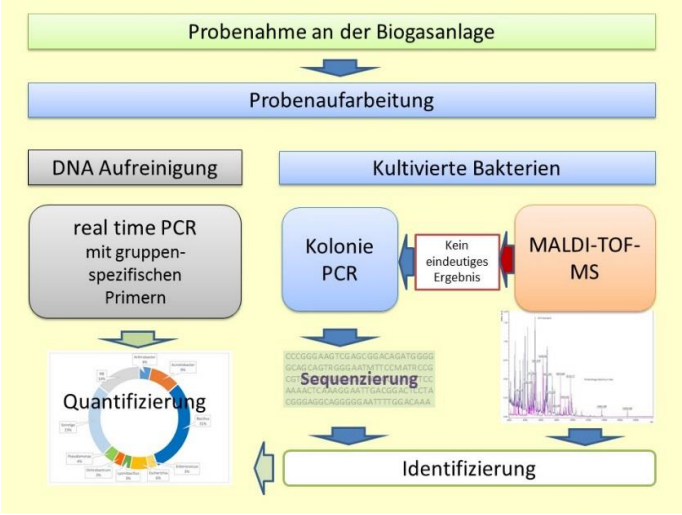


Abbildung 14: Schema der Vorgehensweise bei der Untersuchung von Proben aus Hydrolyse- und Versäuerungsstufen mit MALDI-TOF-MS

Begonnen wurde mit der Optimierung der Probenaufarbeitung anhand einiger Realproben (AAM26). Im Zuge dieser Untersuchungen wurden auch einige unterschiedliche Agarnährböden ausgetestet. Letztlich fiel die Entscheidung für PC-Agar. Dies bedingt natürlich, dass das Keimspektrum begrenzt wird auf Keime, die auf diesem Agar wachsen können. Dieser Punkt wird noch in der Diskussion erläutert.

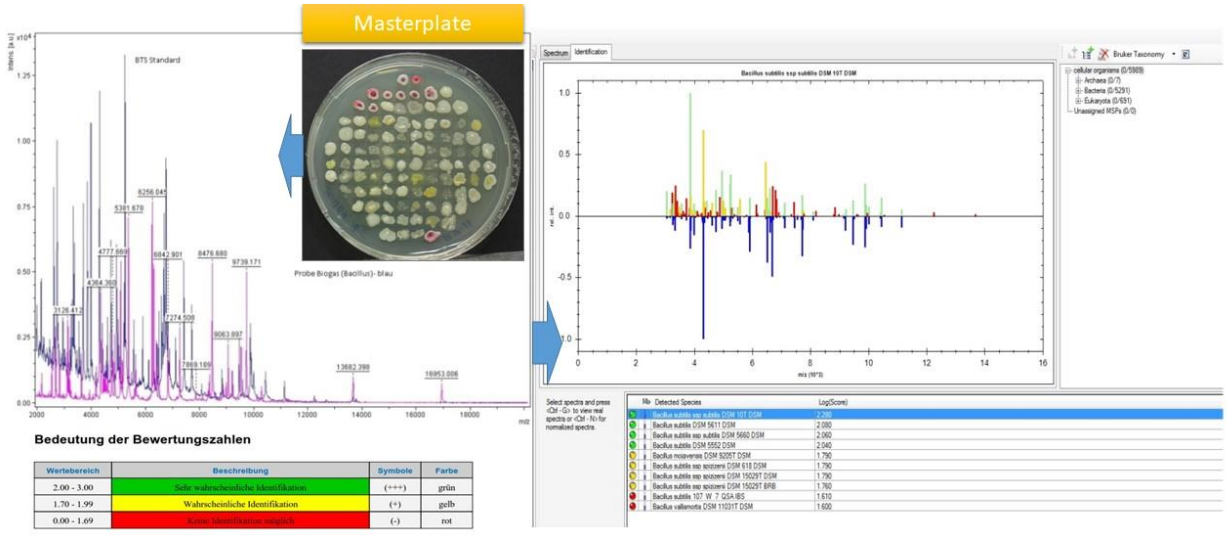
Nach Optimierung aller Schritte wurden die Biogasproben direkt nach Eingang im Labor aufgeteilt:

A) Rückstellproben: die frische Biogasprobe wird jeweils in 6 Falcon-Tubes abgefüllt und bei -20 °C gelagert. Damit können später z.B. noch DNA-Isolierungen durchgeführt werden.

B) Analyse der aerob kultivierten Keime: zur Analyse der aeroben werden 10 g Biogasprobe abgewogen und in 90 ml 1x PBS-Puffer gelöst. Das Gemisch wird 10 min bei 300 rpm mit Raumtemperatur geschüttelt, um die Mikroorganismen von den Feststoffpartikeln zu lösen. Anschließend wird von der flüssigen Phase des Gemischs eine 1:10 Verdünnung (bis zur Verdünnungsstufe 10^{-5}) ebenfalls mit sterilem PBS-Puffer angesetzt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-5} werden jeweils 100 µL in Doppelbestimmung auf eine PC-Agar-Platte gegeben und mit einem Spatel ausplattiert. Die Kultivierung der aeroben Keime erfolgt in einem Brutschrank bei der Temperatur, die in der jeweiligen Hydrolysestufe bei Probenahme herrschte, für mindestens 24 Stunden. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl (KBE/ml) wurden anschließend 100 ausgewählte Kolonien auf eine PC-Masterplate überimpft. Diese Kolonien werden dann zur MALDI-TOF-MS-Analyse genutzt.

Parallel wurden für einige Proben die Kulturen auch im Anaerobentopf angezogen.

Für das MALDI-TOF-MS-Verfahren sind frische Kolonien (max. 24-48h nach Inkubation) nötig. Daher wurden die Analysen zeitnah zur Probenahme durchgeführt. In den untersuchten Proben sind neben sofort identifizierbaren Keimen auch Keime mit sehr gutem Spektrum aber ohne Identifizierung über die Software gefunden worden. Keime, die in der MALDI-Analyse ein den Kriterien entsprechendes Spektrum zeigen, aber nicht identifiziert werden können, wurden daher parallel durch molekularbiologische Untersuchungen verifiziert. Dies erfolgt durch Kombination von Kolonie-PCR und Sequenzierungsanalyse.



Ein Bespiel für eine Auswertung: rechts: der Standard BTS ist in pink dargestellt, die Proben blau. Hier wurde der untersuchte Spot als *Bacillus subtilis* identifiziert; links: Auswertung der Probe mit Bewertung Log(Score); die Güte der Identifizierung ist mit den Ampelfarben rot, gelb und grün wiedergegeben (Bruker, Flex Analysis, Version 3.4). Ab einem Log Score von 2,00 liegt eine eindeutige Identifizierung vor.

Abbildung 15: Auswertung der MALDI-TOF-MS-Daten durch die Software *Flex Analysis*

Bei der Identifizierung über MALDI-TOF-MS Zunächst erfolgt zunächst eine Kalibrierung mit dem „Bacterial Test Standard“ (BTS). Der BTS ist ein von Bruker käuflich zu erwerbender *E.coli*-Extrakt versetzt mit zwei hochmolekularen Proteinen, der eine Autokalibrierung des Systems ermöglicht. Bei Messung der Proben erfolgt nach Aufnahme eines Summenspektrums ein Abgleich mit der internen Datenbank Flex Control (ca. 6000 Einträge) unter Einbeziehung des internen Standards BTS. Je nach Übereinstimmung mit einer Spezies mit dem hinterlegten sogenannten Superspektrum wird eine sogenannte Bewertungszahl ermittelt. Je höher diese Zahl ist, desto wahrscheinlicher ist die Identifizierung und somit Übereinstimmung des Probenspektrums mit einem Treffer in der Datenbank. Bei Erreichen einer

Bewertungszahl von >2,00 mit dem hinterlegten Superspektrum kann der Spot eindeutig identifiziert werden (siehe Abbildung 15).

c) DNA Extraktion zur qPCR-Analyse: Von den gewonnenen Biogasproben wurde eine Extraktion mikrobieller DNA durchgeführt zur begleitenden qPCR-Analyse (diese Analyse war nicht Bestandteil des Projektes, sondern ein ad on, s.u.). Dafür wurden 20 g Biogasprobe abgewogen und in 200 ml 1x PBS-Puffer gelöst. Das Gemisch wird 10 Minuten mit 300 rpm bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Mikroorganismen von den Feststoffpartikeln zu lösen. In Vorversuchen wurde die Eignung von Faltenfilter und verschiedenen Sieben mit unterschiedlichen Porendurchmessern zur Abtrennung der festen groben Bestandteile getestet. Im Ergebnis konnte die Siebung für diese Fragestellung als gut geeignet erachtet werden. Letztendlich wurde zur Abtrennung der groben Bestandteile ein Sieb (Firma Retsch) mit der Maschenweite von 2mm verwendet. Danach wurde der Durchfluss zentrifugiert (4700U/min, für 30 Minuten). Somit wurden Pellets gewonnen, die in weiteren Untersuchungen mit unterschiedlichen Kits zur DNA- Isolierung aufgearbeitet wurden. Bei der Extraktion der DNA wurden unterschiedliche Lysing Matrices zum Zellaufschluss auf ihre Eignung hin getestet. Anschließend wurden die vier Parameter Menge, Reinheit, Scherung und PCR-Fähigkeit der erhaltenen DNA untersucht. (AAM25). Eine Bewertung der PCR-Fähigkeit der verwendeten Aufschlussmethode wurde mit universellen Bakterienprimern wurden durchgeführt (63f/1387r) (Marchesi et al. 1998) (AAM13; AAM24).

Es wird davon ausgegangen, dass immer Bakterien in den Biogasproben sind, auf deren DNA diese Primer annealen können. Dieses Primerpaar wurde nach Optimierung der PCR-Bedingungen in dieser Arbeit auch als Kontroll-Primerpaar für weitere Analysen eingesetzt. Es wurden weitere gruppenspezifische Primerpaare zur Identifizierung verschiedener Keime optimiert (s.u.) und zur qPCR Analyse eingesetzt.

d) qPCR-Analyse: diese Analysen wurden durchgeführt, um einen Überblick über die großen mikrobiellen Gruppen in den hier untersuchten Proben zu bekommen. Sie waren nicht Bestandteil des Projektes und wurden zusätzlich durchgeführt. Diese Analysen sollen zum einen dazu dienen, den Vergleich mit Literaturwerten zu bekommen, zum anderen einzuschätzen, wie viel (in %) wir von der Population durch MALDI-Analytik überhaupt finden können. Es wurden daher die großen Gruppen Archaea und Bacteria untersucht, sowie eine Vielzahl von Gruppen, die aufgrund unserer Untersuchungen und laut Literatur (s.a. oben) in einer Biogasanlage zu erwarten sind (s. Tabelle 9).

Als qPCR Standard wurden zunächst ein Kunst-Standard nach May et al. (May et al., 2015) verwendet, der für das vorliegende Projekt durch die Firma Eurofins synthetisiert wurde. Auf dem Fragment befinden sich Primerbindestellen für verschiedene bakterielle Gruppen, auch die für unsere Analysen verwendeten Oligonukleotide BAC338F/BAC805R (Yu et al., 2005), PCT-C1F/PCT-C1R (Li et al., 2013) und 931F/M1100R (Einen et al., 2008).

Als zweites wurde ein eigener Kunststandard (AcEta_St_01) in diesem Projekt entwickelt und für die qPCR der in Tabelle 1 aufgeführten Gruppen eingesetzt (s. Abbildung 16). Dieser Standard wurde ebenfalls durch die Firma *Eurofins* synthetisiert.

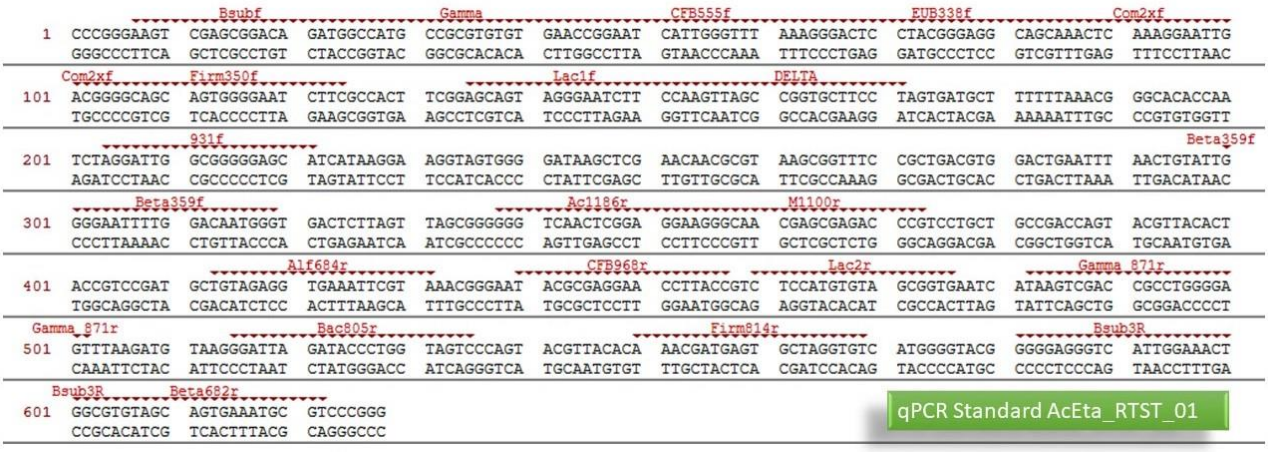


Abbildung 16: Sequenz des in diesem Projekt hergestellten künstlichen Standards zur qPCR-Messung bakterieller Gruppen

Tabelle 9: Untersuchte bakterielle Gruppen mit real time PCR

Primer-Paar	Gruppe	Größe (ca.)	Literatur
Bsub5F	Bacillus subtilis Gruppe	595	Wattiau et al., 2001
Bsub3R			Wattiau et al., 2002
EUB338F (Bac338F)	Bacteria	468	Amann, 1990 (EUB338)
bac805R			Yu et al. 2005
Firm350f	Firmicutes	464	Mühling et al.,2008; f mod. Thomas, 2011
Firm814r			Mühling et al., 2008
CFB555f	Bacteroidetes	413	Mühling et al., 2008
CFB968r			Mühling et al., 2009
Com2xf	Actinobacteria	270	Schwieger & Tebbe (1998), reverse complement
Ac1186r			Schäfer, 2010
Gamma395f	Gammaproteobacteria	476	Mühling et al, 2008; f mod. Thomas, 2011
Gamma871r			Mühling et al, 2008
EUB338F	Alphaproteobacteria	364	Amman. 1990
Alf684r			Mühling et al, 2008
Beta359f	Betaproteobacteria	321	Mühling et al, 2008
Beta682r			Mühling et al, 2008
Lac1f	Lactobacillus spp.	341	Walter, 2001
Lac2r (S-G-Lab-0677-a-A-17)			Heilig, 2002
931F	Archea	169	Jackson et al., 2001
M1100r			Einen, 2008
DELTA495a-c		310	Loy, 2002
DELTA495a	für Vector most Deltaprot.		(Lane, 1991 ev. 1392r)
als reverse bac805R			
pct-C1F	Propionsäurebakterien; Propionat CoA Transferase (pct)	229	Li et al., 2013; s. May-Standard A
pct-C1R	Synthrophobacter		
B-K1-F	Bacillus sp	1114	Wu et al., 2006
B-K1-R			Wu et al., 2007
BLS342F	Bacilli	1050	Blackwood, 2005
1392R			Blackwood, 2006
pct-F	propionat ox. Bacteria including synthrophic acetogenes; Propionat CoA Transferase (pct)	1300	Li et al., 2013
pct-R			Li et al., 2013
3-SAOfhs-fw	Acetogene	635	Müller,B., 2013
3-SAOfhs-rev			Müller,B., 2013

Durch Messung der Konzentration der isolierten Standard-Fragmente im *Nanodrop* (AAM24) und Berechnung der Kopienanzahl kann eine Standardreihe erstellt werden, die es im Experiment ermöglicht, die Kopienanzahl unbekannter Proben zu bestimmen (s. Abbildung 17).3332

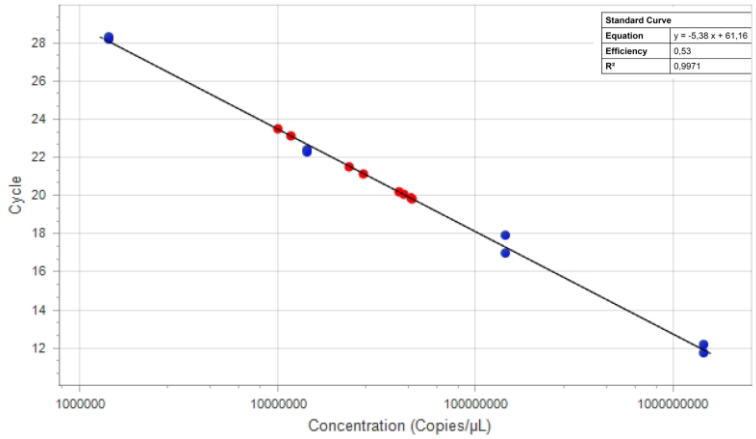


Abbildung 17: Abbildung 4: Beispielhaft eine Eichkurven (blau) im quantitativen PCR-Assay mit dem AcEta_RTST_01 Standard mit DNA aus vier Biogasproben (je n=2) und dem Primerpaar SAOfhs (rote Punkte)

Die BGA-Proben wurden pro Primerpaar im Doppelansatz vermessen. Zum Vorgehen bei der Messung wurde wiederum eine Arbeitsanweisung erarbeitet (AAM27). Mit diesem Standardverfahren als Grundlage wurden nun die prozentualen Anteile der verschiedenen bakteriellen Gruppen bestimmt.

e) Zur Sequenzierung wurde

- eine **Kolonie-PCR** von ausplattierten und nicht durch MALDI-TOF-MS eindeutig zu identifizierenden Keimen durchgeführt mit den oben genannten Primern (AAM13). Das resultierende Fragment hat eine Länge von 1050 Basenpaaren oder
- eine **Klonbibliothek** angelegt (AAM25) und die resultierenden Plasmide anschließend sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma *Seqlab*, Göttingen, mittels Sanger-Sequenzierung

durchgeführt.

2.3 Ergebnisse und Diskussion I: Betriebsdatenanalyse von 20 Biogasanlagen
Cordes+Winterberg

In der ersten Phase der Untersuchung von landwirtschaftlichen Biogasanlagen wurden aus dem deutschen Bestand landwirtschaftlicher Biogasanlagen zunächst 20 Biogasanlagen für einen Ortstermin mit dem Betreiber sowie für eine Betriebsdatenauswertung ausgewählt. Dazu wurden die Datenbanken der Autoren herangezogen. Ergänzt wurden die Datenbanken durch Internetrecherchen und die Kontaktaufnahme zu verschiedenen Marktteilnehmern. Auf diese Weise wurden 56 zweiphasige Biogasanlagen zusammengestellt (Ergebnisse nicht dargestellt), aus denen 20 Biogasanlagen nach den folgenden Kriterien ausgewählt wurden:

1. repräsentative Abbildung des technologischen Spektrums sowie der Hersteller der Anmaischer und Hydrolyse- und Versäuerungsstufen
2. repräsentative Abbildung der typischen Substratmischungen der landwirtschaftlichen Biogasanlagen
3. repräsentative Abbildung der Effizienz der Vorstufen sowie der Zufriedenheitsausprägung der Betreiber
4. Kooperationsbereitschaft der Betreiber

Abbildung 18 zeigt beispielhaft die Konfiguration einer der untersuchten Biogasanlagen.

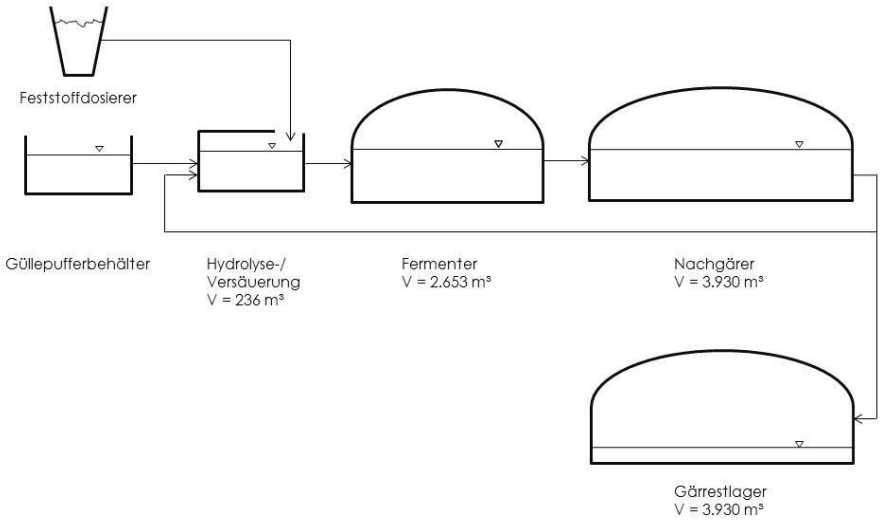


Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung der Anlagenkonfiguration einer zweiphasigen landwirtschaftlichen Biogasanlage

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft jeweils Aspekte einer nicht gasdichten und einer gasdicht geschlossenen Hydrolyse- und Versäuerungsstufe.

Abbildung 19: Aspekte zweier beispielhaft ausgewählter Hydrolyse- und Versäuerungsstufen mit nicht gasdicher (links) und gasdichter (rechts) Abdeckung (Fotos: Cordes+Winterberg)

Die Berechnung der Prozesskenndaten beruhte möglichst auf der Auswertung eines mindestens 3-monatigen Betriebszeitraums. Zeiträume mit Prozessstörungen wurden ausgeblendet. Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft die Substratdosierung und den relativen Methanertrag einer der untersuchten Biogasanlagen (BGA 2).

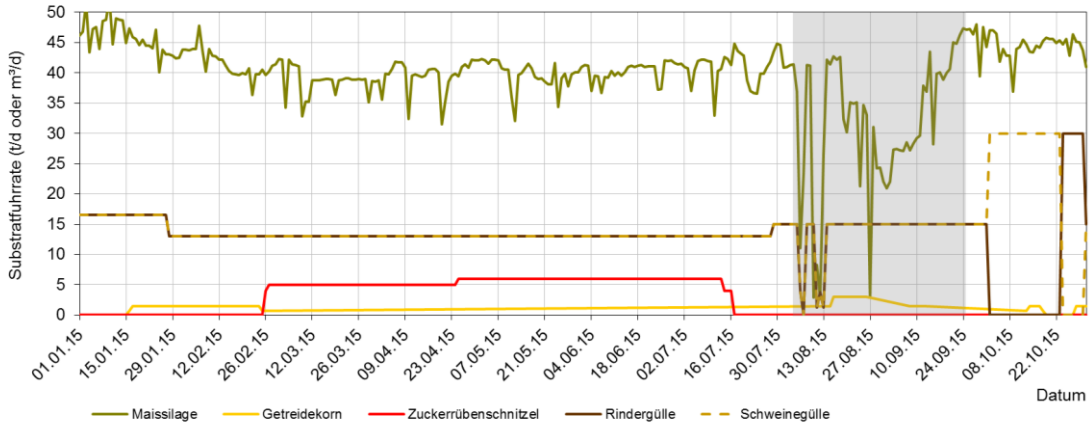


Abbildung 20: Substratzufuhrraten der Biogasanlage 3 im Zeitraum vom 01.01.-31.10.2015; der graue Bereich markiert eine Phase mit komplexer Betriebsstörung (nicht ausgewertet)

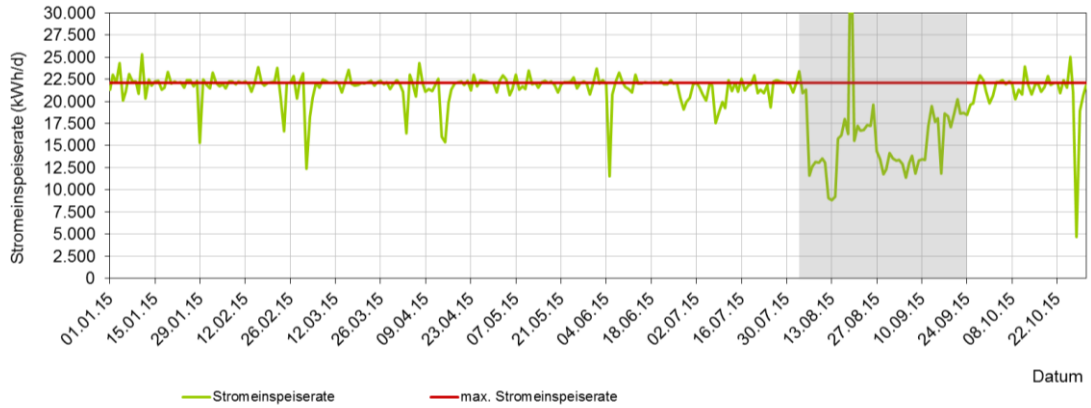


Abbildung 21: Nach KTBL (2015) erwarteter und realisierter Methanertrag der Biogasanlage 3 im Zeitraum vom 01.01.-31.10.2015; der graue Bereich markiert eine Phase mit komplexer Betriebsstörung (nicht ausgewertet)

Tabelle 10 fasst die wesentlichen Charakteristika und Prozesskenndaten der ausgewählten Biogasanlagen und ihrer Vorstufen zusammen.

Tabelle 10: Übersicht der 20 Biogasanlagen der Vorauswahl (Phase I: Ortstermin, Betriebsdatenanalyse); blau markiert sind die 6 BGA der Phase II (Emissionsanalyse)

BGA	Inbetrieb-nahme-jahr	Anlageneinheit	Volumen	Temperatur	wichtigste Substrate	Substrat-masse	Rezirkulat/ Substrat-Quotient	Rezirkulat-entnahme aus	BR	θ	YCH4 (relativ, KTBL 2015)	BHKW-Leistung	Anmerkung
			m³	°C		m³/a			kg oTS/m³ d	d	%	kW_{el}	
1	2003/2011	Anmaischer	130	nd	Rindergülle Maissilage Grassilage Rinderfestmist	29.600	1,4	Fermenter	4,3	36,7	91	550	
		H+V-Stufe	650	31									
		Fermenter	2.000	38									
2	2009	H+V-Stufe	190	35 ± 4	Maissilage Schweinegülle Rindergülle	26.400	1,8	GRL, NG	2,3	98,4	103	920	
		2 Fermenter	3.300	44									
		Nachgärer	3.600	36-44									
3	2011	Anmaischer	150	33 ± 5	Maissilage Grassilage	8.500	3,4	GRL	2,2	160	106	510	Separator zur Rezirkulat-Behandlung
		H+V-Stufe	250	32 ± 4									
		Fermenter	1.500	40									
		(Nachgärer)	1.700	39									
4	2008	2 H+V-Stufen (seriell)	150+250	48	Maissilage Grassilage Futterreste	11.400	3,5	NG	3,5	96,0	92	580	
		2 Fermenter	1.700	48									
		2 Nachgärer	1.900	48									
5	2012	2 H+V-Stufen	240	42	Maissilage Rindergülle	13.100	4,2	GRL	5,3	42,7	103	600	1. H+V-Stufe im Batch-Modus
		(seriell)	240	42									
		Fermenter	1.100	42									
6	2011	2 H+V-Stufen	380	42-44	Maissilage Rindermist Hühnermist	15.500	6,6	GRL	4,3	62,6	102	850	1. H+V-Stufe im Batch-Modus
		(seriell)	380	unbeheizt									
		Fermenter	2.300	42									
7	2011	2 H+V-Stufen	400	43	Grassilage (Landschaftspflege) Rindergülle Maissilage	14.300	0,61	Fermenter	4,0	60,3	100	600	1. H+V-Stufe im Batch-Modus
		(seriell)	400	43									
		Fermenter	1.540	41									
8	2005/nd	H+V-Stufe		28-40	Maissilage Grassilage	18.400	4,8		3,2	54,9	95	500	
		Fermenter		38-41									
		2 Nachgärer		43-44									
9	2010	H+V	235	nd	Rindergülle Maissilage	35.700	0,11	-	5,1	23,5	75	390	Wasser statt Rezirkulat
		Fermenter	2.000	41									
10	2011	H+V-Stufe	160	29-33	Rindergülle Maissilage Rinderfestmist	10.200	2,5	Fermenter,GRL	3,2	79	108	530	BHKW mit Gasturbine
		Fermenter	2.100	39									

BGA	Inbetrieb-nahme-jahr	Anlageneinheit	Volumen	Temperatur	wichtigste Substrate	Substrat-masse	Rezirkulat/ Substrat-Quotient	Rezirkulat-entnahme aus	BR	θ	YCH4 (relativ, KTBL 2015)	BHKW-Leistung	Anmerkung
			m³	°C		m³/a			kg oTS/m³ d	d	%	kW_{el}	
11	2013	Fermenter mit Hydrolysezone			Maissilage Grassilage Zuckerrübenschnitzel	27.900	0,08	NG	3,2	99,3	84	Gasein-speisung: 350 m³N/h	Plug Flow-Fermenter
		Nachgärer	2.200	53									
			5.200	42									
12	2011	H+V	140	33 ± 6	Rindergülle Maissilage	10.300	1,4	GRL	3,8	47,0	92	380	
		Fermenter	1.200	41									
13	2004/2015	H+V-Stufe	310	nd	Maissilage Schweinegülle	16.400	4,7	GRL,	3,5	68,4	76	500	
		Fermenter	2.800	43				Fermenter					
14	2012	H+V	290	25-29	Rindergülle Maissilage Rinderfestmist	21.600	0,7	GRL	2,6	52,5	100	390	Separator zur Rezirkulat-Behandlung
		Fermenter	2.700	40									
15	2005	H+V-Stufe	250	nd	Rindergülle Maissilage GPS	12.100	7,3	NG, GRL	2,5	86,1	107	450	
		Fermenter	1.300	40									
		Nachgärer	1.300	40									
16	2010	Anmaischer	110	ca, 35	Rindergülle Maissilage Grassilage Rinderfestmist	36.500	2,5	NG	3,2	52,5	81	740	schlechte Substratqualität
		H+V	190	nd									
		Fermenter	2.400	42									
		Nachgärer	2.400	44									
17	2010	Anmaischer	135	36 ± 3	Rindergülle Maissilage Grassilage	21.900	0,75	NG	3,3	67,1	93	760	
		H+V	190	34									
		Fermenter	2.100	37-42									
		Nachgärer	1.600	37-40									
18	2009	H+V	235	30 ± 3	Schweinegülle Grassilage Maissilage	28.500	2,5	GRL	3,7	42,8	99	600	
		Fermenter	2.700	38-40									
		(Nachgärer/GRL)	3.900	nd									
19	2005	H+V	250	nd	Rindergülle Maissilage	28.900	0,13		3,4	32,3	95	350	
		Fermenter	2.300	38-40									
20	2011	3 Hydrolyse-rohre	ges. 1,4	< 53	Schweinegülle Maissilage	ca. 5.000	0	-	6,7	24	70	150	Hydrolyserohr
		3 Fermenter	ges. 330	53									

NG: Nachgärer; GRL: Gärrestlager; nd: nicht dokumentiert

Die auf der Basis der Betriebsdaten berechneten relativen Methanerträge (bezogen auf KTBL-Richtwerte, KTBL, 2015) der zweiphasigen BGA reichten von 76 bis 108 % (Sonderkonstruktionen nicht berücksichtigt). Wie zu erwarten war, besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen hydraulischer Verweilzeit bzw. organischer Raumbelastung und dem Methanertrag. (Abbildung 22).

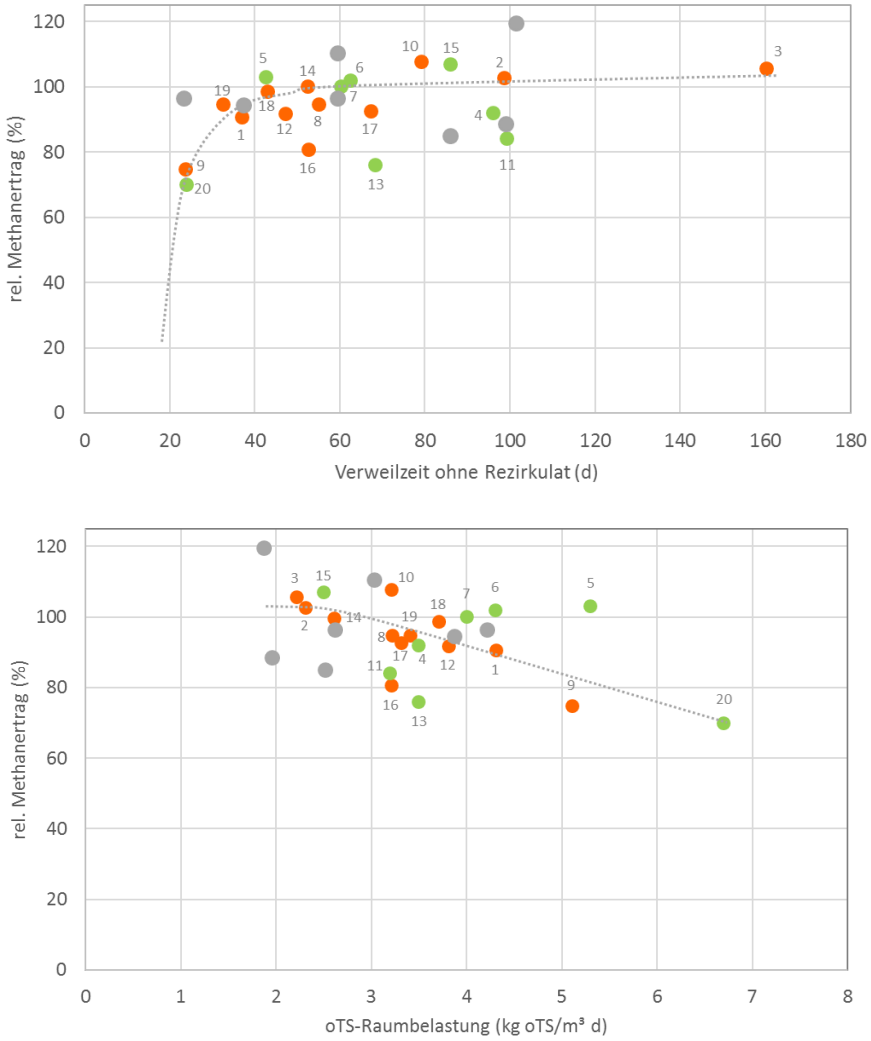


Abbildung 22: Abhängigkeit der relativen Methanerträge (bezogen auf KTBL 2015) der untersuchten Biogasanlagen von der Substratverweilzeit und der oTM-Raumbelastung (grün: zweiphasige BGA mit gasdichter Vorstufe; orange: zweiphasige BGA mit nicht gasdichter Vorstufe (Daten dieser Studie); grau: einphasige BGA (Daten: Cordes+Winterberg)

Übereinstimmend mit anderen vergleichenden Untersuchungen (FNR, 2009) kann abgeleitet werden, dass hydraulische Verweilzeiten im Fermentationssystem (ohne Gärrestlager) unterhalb von 50 Tagen und oTM-Raumbelastungen von mehr als 3 kg oTM/m³ d zu einer signifikanten Reduzierung des Methanertrags führen. Ein signifikanter Effizienzunterschied zweiphasiger und einphasiger Biogasanlagen (deren Leistungsdaten den Datenbanken der Autoren entnommen wurden) und auch zwischen zweiphasigen BGA mit oder ohne gasdichten Abschluss der Vorstufe ist nicht erkennbar.

Die Ortstermine zeigten, was die Zufriedenheit der Betreiber mit ihrer Vorstufe betrifft, ein heterogenes Bild (Abbildung 23, links). Als vorteilhaft wurden folgende Aspekte empfunden:

1. spürbar erhöhter Methanertrag (vor allem BGA 1 und 3)
2. geringe Wartungskosten durch geringe Abrasion der Anmaischer (vor allem BGA 16) im Vergleich zu Schneckensystemen und anderen Direktzufuhrsystemen
3. Absetzerfunktion der Vorstufe (Steine, Metallteile)

Als wesentliche Kritikpunkte wurden genannt:

1. hohe Kosten der Vorstufe ohne erkennbare Effizienzsteigerung; Dieser Punkt führte in einigen Fällen zur "Degradierung" der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe zum Güllepuffer (vor allem BGA 4, gegen Ende der vorliegenden Untersuchung auch BGA 16 und 17)
2. Gasverluste offener Stufen; Einige Betreiber ließen offene Stufen daher gasdicht abdecken (BGA 4, 16 und 17).
3. Als anspruchsvoll zeigte sich bei zahlreichen vor-Ort-Terminen die Einbringung der schüttbaren Substrate in die Maische. Vor allem schnell laufende Propellerrührwerke zeigten wenig Wirkung. Mehrere Betreiber ließen während der Studienlaufzeit derartige Rührer mit durch langsam laufende Rührwerke (Langsamläufer mit Propeller oder Paddelrührwerke mit horizontaler Achse) austauschen (BGA 13, 16 und 17). Dieser Austausch erhöhte- beurteilt auf Basis der Beobachtung des Mischvorgangs - in allen Fällen die Durchmischungseffizienz.

Nur 11 der 18 Vorstufen (BGA mit integrierter H+V-Zone wurden in diesem Zusammenhang ausgenommen) waren bis zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht wesentlich verändert worden. Drei Stufen waren vor Beginn der Studie wesentlich erweitert (n=2) oder nachträglich errichtet (n=1) worden. Ebenfalls jeweils drei H+V-Stufen waren wieder außer Betrieb genommen oder nachträglich gasdicht abgedeckt worden (Abbildung 23, rechts).

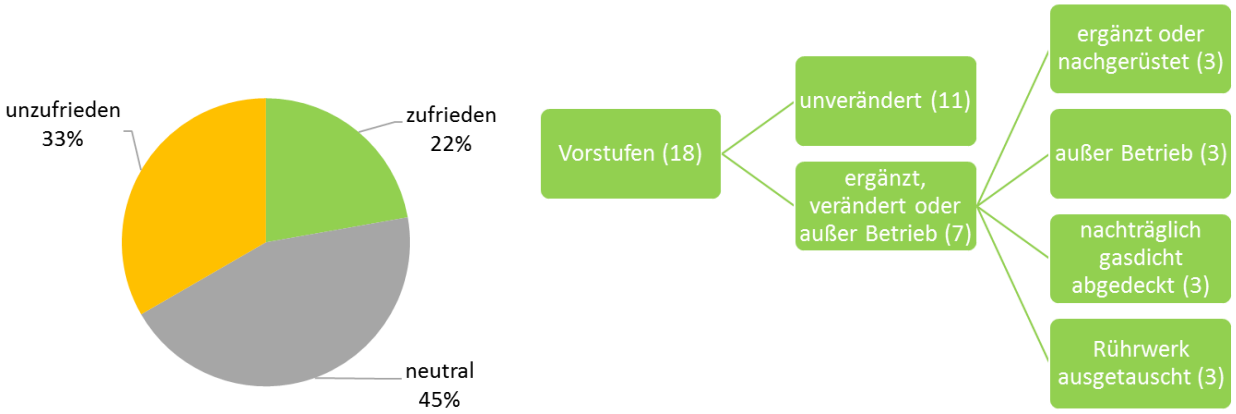


Abbildung 23: Beurteilung der Anmaischer und H+V-Stufen durch ihre Betreiber (n=18, links) und prozesstechnische Anpassungen im Bereich der Vorstufen vor oder während der Untersuchung (n=18/Mehrfachnennungen möglich, rechts)

Unterlagen der Planer oder Hersteller mit Aussagen zur bioprozesstechnischen Leistungsfähigkeit der H+V-Stufen lagen in keinem der untersuchten Fälle vor. Auch Untersuchungen der Betreiber zur Prozesseffizienz waren eine seltene Ausnahme. Zu den bioprozesstechnischen Leistungen der Vorstufen der 20 BGA der Phase I der Feldstudien sind daher keine vergleichenden Aussagen möglich.

Die Untersuchungen der Phase I der Fallstudien zeigen deutlich, dass sowohl die H+V-Stufen als auch die Anmaischer noch nicht als ausgereift bezeichnet werden können. Auslegung und Betrieb erfolgen vorwiegend empirisch. Die hohe Vielfalt der realisierten technischen Lösungen weist auf eine frühe Phase der technologischen Entwicklung hin.

2.4 Ergebnisse und Diskussion II: Messungen an 6 Biogasanlagen

ttz Bremerhaven, Cordes+Winterberg

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Ortstermine und der Betriebsdaten der 20 BGA der Phase I der Fallstudien wurden für die experimentellen Untersuchungen die sechs Biogasanlagen 2, 3, 12, 16, 17 und 18 ausgewählt. Alle ausgewählten BGA waren mit mindestens einer nicht gasdichten Vorstufe ausgestattet.

Tabelle 11: Übersicht der Vorstufen der 6 zur experimentellen Untersuchung ausgewählten Biogasanlagen

BGA Nr.	Art der Vorstufe (A: Anmaischer, H: Hydrolyse)	Temperatur (°C)	Flüssigkeitsverweilzeit Substrat+Rezirkulat (d)	oTS-Raumbelastung (kg/m³ d)	pH	Rezirkulat-/Substrat-Verhältnis	Herkunft des Rezirkulats	Rührertyp (L: Langsamläufer; S: Schnellläufer)	Belüftung
2	H	35 ± 4	0,9	85	6,3 ± 0,5	1,8	GRL (Sommer) NG (Winter)	L, S	ja
3	A H	33 ± 5 32 ± 4	1,6 2,6[2]	53 32[2]	6,9 ± 0,5 6,4 ± 0,6	3,4	GRL (Separator)	L L	ja* ja
12	H	33 ± 6	2,1	34	6,1 ± 0,4	1,4	GRL	S	nein
16	A H[1]	35 ± 3 36-42	0,32 0,55[2]	150 85[2]	7,0 ± 0,2 6,9	2,5	NG	S → L S	nein nein
17	A H	36 ± 3 40	1,3 1,8[2]	98 69[2]	6,9 ± 0,4 7,1	0,75	NG	S → L S	nein ja
18	H	30 ± 3	1,0	50	6,4 ± 0,2	2,5	GRL	S	nein

NG: Nachgärer
GRL: Gärrestlager
[1] ohne Prozesssteuerung (Temperierung, Belüftung)
[2] Substratabbau in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe nicht berücksichtigt
* Option nicht genutzt

Im Verlauf von 5 Messkampagnen, die jeweils zwischen April und Dezember der Jahre 2015 bis 2017 stattfanden, wurden flüssige Fermenterinhalte und Biogase untersucht. Die Untersuchungsergebnisse werden in den folgenden Kapiteln erläutert und diskutiert.

2.4.1 Rezirkulation

Das Anmaischen schüttbarer Substrate in Vorstufen landwirtschaftlicher Biogasanlagen macht die Nutzung von Rezirkulaten erforderlich, wenn das Volumen der verfügbaren Gülle nicht ausreicht. Dies trifft für alle sechs untersuchten BGA zu: Mit TM-Konzentrationen von 15-38 % sind die Substrate ohne Anmaischung mit TM-ärmeren Stoffströmen nicht rühr- und pumpbar (Tabelle 12).

Tabelle 12: Betriebsdaten und Messergebnisse zur Rezirkulation von Fermenterinhalten oder Gärrest in den 6 untersuchten BGA

BGA-Nr	Masseanteil schüttbarer Substrate	TM des Substrat-Gemischs ohne Rezirkulat (berechnet)	Rezirkulat-/Substrat-Quotient	Herkunft des Rezirkulats	TM des Substrat-Gemischs mit Rezirkulat (berechnet)	TM des Substrat-Gemischs mit Rezirkulat (gemessen)
	(%)	(%)			(%)	(%)
2	62	26	1,8	NG, GRL	13	9,8
3	100	38	3,4	GRL, Separator	13	15
12	35	20	1,4	GRL	12	11
16	36	18	2,5	NG	9,5	9,5
17	58	24	0,75	NG	16	15
18	34	15	2,5	GRL	8,9	(4,0)*

NG Nachgärer
GRL Gärrestlager
* nicht repräsentative Probe

Die Rezirkulation wird von den Betreibern so eingestellt, dass in der (ersten) Vorstufe unter Berücksichtigung der mikrobiellen Abbauvorgänge TM-Konzentrationen von 10-15 % zu bewältigen sind. Wie die Ortstermine gezeigt haben, ist auch dies noch eine verfahrenstechnische Herausforderung. Vor allem das Untermischen der aufschwimmenden schüttbaren Substrate benötigt viel Zeit.

Die Rezirkulation führt kontinuierlich acetogene und methanogene Bakterien in die Anmaischer und/oder Hydrolysestufen zurück, die sich aufgrund der kurzen hydraulischen Verweilzeiten in diesen Vorstufen ohne Rezirkulation nicht halten könnten, da ihre Wachstumsraten zu gering sind. Die konsequente Phasentrennung von Hydrolyse und Versäuerung einerseits und Acetogenese und Methanogenese andererseits, wie sie zahlreichen Forschungsarbeiten zugrunde gelegt wurde, wird in der landwirtschaftlichen Praxis durch die Rezirkulation aufgegeben. Stattdessen nehmen die Hydrolysestufen, was relevante bioprozesstechnische Bedingungen angeht (pH-Wert, Temperatur, Populationszusammensetzung), weitgehend den Charakter von Methanstufen an. So kann unter günstigen Lebensbedingungen für acetogene und methanogene Bakterien mit messbaren Umsetzungen dieser Organismen gerechnet werden, also mit Methanbildung.

Die kurzen hydraulischen Verweilzeiten der Vorstufen verhindern allerdings die vollständige Umsetzung der frisch zugeführten Substrate zu Methan und Kohlendioxid, so dass die Säurekonzentrationen hoch sind, die pH-Werte der Maischen (mit Ausnahmen) im leicht sauren Bereich liegen und die Methankonzentrationen im Vergleich zu denen der Methanstufen niedrig sind (folgende Kapitel).

2.4.2 Methanemissionen

Was bereits die Blasenbildung der Maischen angezeigt hatte, wurde durch die Untersuchungen bestätigt: Alle untersuchten Anmaischer und H+V-Stufen emittierten Biogase in erheblichem Umfang. Diese setzten sich vor allem aus Kohlendioxid und Methan zusammen. Die Methankonzentrationen der trockenen Biogase lagen im Bereich von 9,2 bis 35,3 %. Wasserstoff spielte dagegen mit Konzentrationen von 0,018 bis 0,91 % eine untergeordnete Rolle.

Dieser Befund weicht von den Ergebnissen zahlreicher Technikumsuntersuchungen zur Hydrolyse und Versäuerung landwirtschaftlicher Substrate ab, die vor allem Wasserstoff als energiereiche Komponente des Biogases beschrieben haben (Preißler et al., 2008, Lindner et al., 2015). Die Bildung eines methanreichen Biogases ist auf die hohen Rezirkulationsraten der untersuchten Biogasanlagen zurückzuführen (s. Kapitel 2.4.1).

2.4.2.1 Einfluss des Vorstufenvolumens auf den Methanverlust

Die relativen Methanverluste der 6 untersuchten Biogasanlagen liegen im Bereich zwischen 2,4 und 11 % des im BHKW verstromten Methans. Gut erkennbar ist die Korrelation des relativen Methanverlustes mit dem Anteil offener Stufen am gesamten Reaktorvolumen (Abbildung 24).

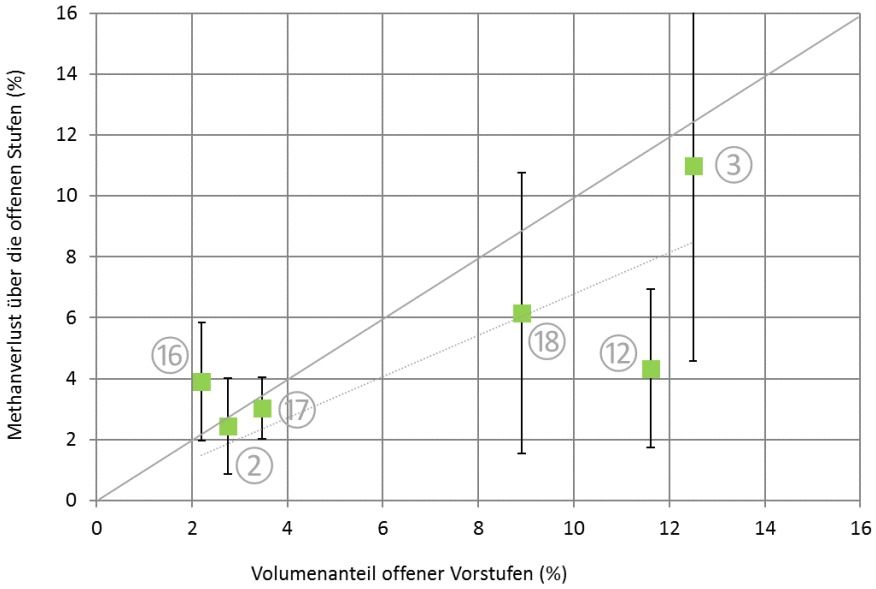


Abbildung 24: Zusammenhang zwischen dem relativen Methanverlust (bezogen auf das verstromte Methan) und dem Volumenanteil offener Stufen am gesamten Reaktorvolumen (gasdicht geschlossene Vorstufen, Haupt- und Nachgärer) der untersuchten Biogasanlagen (gekennzeichnet entsprechend ihrer Nummern)

Es ist zu erwarten, dass über den dargestellten Zusammenhang hinaus weitere Faktoren auf die Methanemissionen der offenen Vorstufen Einfluss nehmen. Dazu gehören die Substratzusammensetzung, der pH-Wert, die Temperatur, die Rezirkulationsrate, Art und Aufbereitung des Rezirkulats sowie Rührtechnik und Rührwerkstaktung. Einige dieser Einflüsse werden im Folgenden dargestellt und diskutiert.

2.4.2.2 Einfluss der Betriebsbedingungen auf die Methanemission

Man kann erwarten, dass die Bioprozessbedingungen der Vorstufen vor allem durch folgende Faktoren beeinflusst werden:

1. Rezirkulat/Substrat-Quotient und pH-Wert
2. hydraulische Verweilzeit und organische Raumbelastung
3. Prozesstemperatur
4. Substratzusammensetzung

Mit steigendem Rezirkulat/Substrat-Quotienten steigt die Konzentration der aus Nachgärern oder Gärrestlagern zurückgeführten acetogenen und methanogenen Bakterien in der Maische an. Damit wird zunächst auch die potentielle Methanbildungsrate der Mischkultur der Vorstufe erhöht, die im Falle der Verfügbarkeit von gut abbaubaren Substratbestandteilen auch zur Steigerung der aktuellen Methanbildungsrate führt. Wird der Rezirkulat/Substrat-Quotient weiter erhöht, sinkt der Anteil des verfügbaren Substrats zugunsten des "ausgefaulten" Rezirkulats ab, so dass die Methanbildungsraten wieder reduziert werden. Dieser Zusammenhang ist bei den hier untersuchten Vorstufen erkennbar. Bei einem Rezirkulat/Substrat-Quotienten von 2,5 wurde die maximale volumenspezifische Methanbildungsrate nachgewiesen (Daten nicht dargestellt).

Dass der pH-Wert der Maische in der Vorstufe mit steigendem Rezirkulat/Substrat-Quotienten erwartungsgemäß ansteigt, ist zumindest bei Substratmischungen mit geringem Wirtschaftsdüngeranteil erkennbar (Daten nicht dargestellt). Es kann erwartet werden, dass Methanbildungsraten und pH-Werte im untersuchten Bereich positiv korrelieren. Dies wird durch die Messergebnisse bestätigt (Abbildung 25).

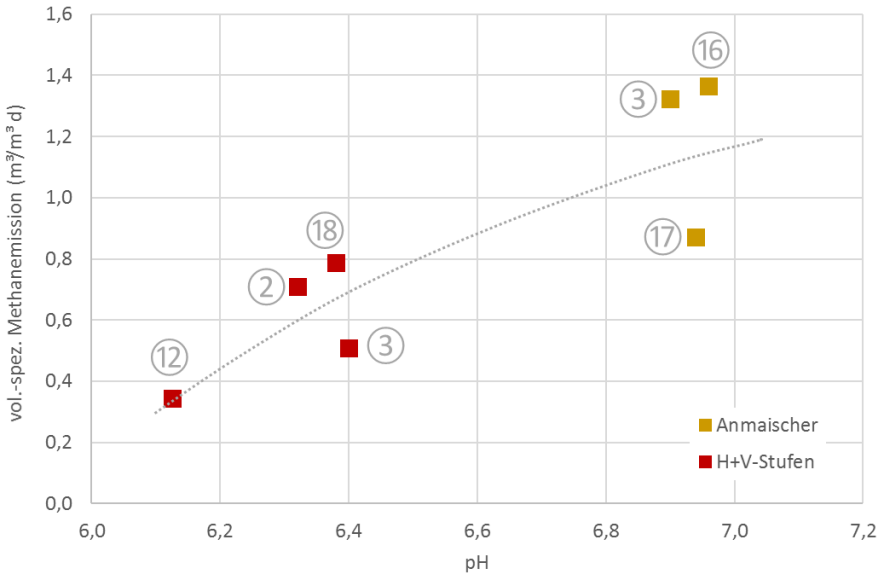


Abbildung 25: Abhängigkeit der volumenspezifischen Methanbildungsraten der Maischen in Anmaischern und H+V-Stufen vom pH-Wert dieser Maischen (links) sowie von pH-Wert und Temperatur (rechts; die Kreisflächen sind der Methanbildungsrate proportional); die Nummern kennzeichnen die untersuchten Biogasanlagen

Die Rezirkulation und der von ihr beeinflusste pH-Wert dominieren den Einfluss der Betriebsparameter auf die Methanemission der Vorstufen. Der direkte Einfluss der Verweilzeit und Raumbelastung auf die Methanbildung ist im untersuchten Bereich nicht erkennbar, da beide Werte durch den Rezirkulat/Substrat-Quotienten maßgeblich beeinflusst werden. Lediglich der Einfluss der Fermentationstemperatur auf die Methanbildungsrate ist tendenziell erkennbar (Daten nicht dargestellt).

Die dargestellten Untersuchungen haben somit gezeigt, dass die Rezirkulat/Substrat-Quotienten nicht nur die Verweilzeit des Substrats verkürzen, sondern auch maßgeblich die Methanbildung beeinflussen. Da die Rezirkulationsraten bzw. -quotienten aber durch die TM-Konzentrationen der verfügbaren oder eingesetzten Substratmischungen vorgegeben wird, sind die Möglichkeiten der Beeinflussung der Methanemissionen gering. Nur über die Temperatur der flüssigen Reaktorinhalte lässt sich die Methanemission beeinflussen: Es gilt die allgemein bekannte Abhängigkeit der Umsatzraten von der Temperatur.

Eine Bewertung der Methanemissionen hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit sowie des Arbeits- und Klimaschutzes erfolgt in Kapitel 2.9.

2.4.3 Einfluss der Rührwerksaktivität auf die Biogasfreisetzung (Sonderuntersuchung BGA 18)

Die ersten 3 Messkampagnen hatten jeweils stark voneinander abweichende Methanemissionsraten für alle untersuchten Biogasanlagen geliefert. Während der Messungen war bereits deutlich geworden, dass vor allem die Rührwerksaktivität einen erheblichen Einfluss auf die Biogasfreisetzung hatte. Dies war zwar erwartet worden, doch nicht in dieser Deutlichkeit. Um den Einfluss der Rührwerksaktivität auf die Biogasfreisetzung zu bestätigen und zu dokumentieren, wurden längerfristige Messungen der Biogasfreisetzung an der Biogasanlage 18 durchgeführt.

Die H+V-Stufe dieser Biogasanlage ist mit zwei Tauchmotorrührwerken ausgestattet. Am Schacht des einen dieser beiden Rührwerke wurden sämtliche Messungen durchgeführt. Kurz vor Beginn der Untersuchungen war das BHKW der Biogasanlage ausgefallen, so dass die Substratdosierung durch den Betreiber reduziert worden war. Zudem hatte der Betreiber vor Beginn der Messungen eine modifizierte Rührwerks-Taktfrequenz gewählt (beide Rührwerke: 2 min ein/8 min aus). Um 12:20 wurde die Taktfrequenz beider Rührwerke wieder auf die Standardeinstellung (2 min ein/5 min aus) umgestellt. Jeweils zur vollen Stunde wurden, parallel zur Substratdosierung, die Rührwerke ca. 33 Minuten lang betrieben.

Die Biogaszusammensetzung wurde einmalig, nach Abschluss der Bestimmung der Biogas-Emissionsraten, bestimmt. Der so ermittelte Methangehalt des Biogases wurde zur Berechnung der Methanemissionsraten herangezogen. Die Ergebnisse der ca. 6-stündigen Messungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die mittlere Methanemissionsrate der H+V-Stufe lag im Untersuchungszeitraum bei 317 m³/d. Dies entspricht 10 % der Methanbildungsrate der Biogasanlage. Dieser Wert liegt oberhalb des Durchschnittswertes von 6,2 %, der im Rahmen der 5-fachen Felduntersuchung ermittelt wurde.
2. Der Methangehalt des emittierten Biogases betrug zum Ende der Emissionsmessungen 21,4 %.
3. Die Biogasemissionen im Bereich des Rührwerks unterliegen starken Fluktuationen (Abbildungen 26 und 27). Signifikant ist der Einfluss der Rührwerksaktivitäten auf die Höhe der Emissionen. Deutlich erkennbar ist, dass die Methanemissionen nach dem Abschalten der Rührwerke innerhalb von 5-8 Minuten im Durchschnitt auf ca. 1/3 der mittleren täglichen Methanemissionsrate reduziert wurde. Nach dem Einschalten der Rührwerke kam es mit einer Verzögerung von ca. 1-3 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der Methanemissionen.
4. Trotz der unter Punkt 3 beschriebenen Zusammenhänge ist ein signifikanter Einfluss der Taktfrequenz der Rührwerke auf die Methanemissionsrate nicht erkennbar (Tabelle 13). Entweder werden Differenzen aufgrund der Messwertfluktuationen aus statistischen Gründen nicht sichtbar, oder die Methanemissionen bleiben tatsächlich – trotz der veränderten Rührwerks-Taktfrequenz – in der Summe gleich.

Tabelle 13: Methanemissionen der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe der BGA 18 am 15.09.2016 unter verschiedenen Betriebsbedingungen (gemessen am Schacht des Rührwerks 201)

Taktfrequenz der Rührwerke	Mittlere Methanemission der Gesamtmessung	mittlere Methanemission während der 30-minütigen Durchmischungen	mittlere Methanemission vor Beginn der periodischen Durchmischungen
	m³/H+V d	m³/H+V d	m³/H+V d
2 min ein/8 min aus (vormittags)	328	405	86
2 min ein/5 min aus (nachmittags)	298	367	116
ganztags	317		

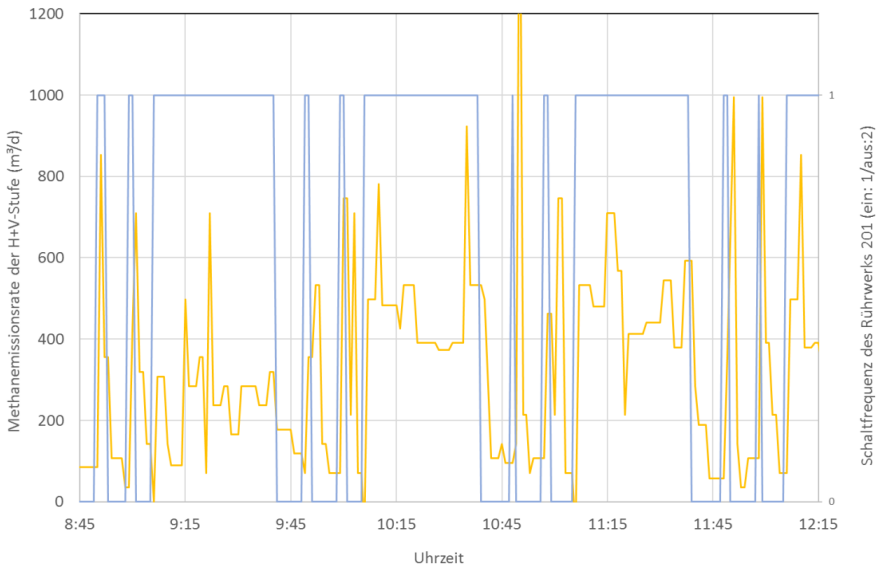


Abbildung 26: Methanemissionen am Schacht des Rührwerks der H+V-Stufe der Biogasanlage 18 am 15.09.2016 im Zeitraum von (8:45 bis 12:15 Uhr. In diesem Zeitraum wurde das Rührwerk im Wechsel 2 Minuten ein- und 8 Minuten ausgeschaltet (blaue Linie; die Ziffer 1 markiert die Einschaltung, die Ziffer = die Ausschaltung). Jeweils zur vollen Stunde wurde, parallel zur Substratdosierung, das Rührwerk ca. 33 Minuten lang betrieben. Die Methanemissionsrate ist als gelbe Linie dargestellt.

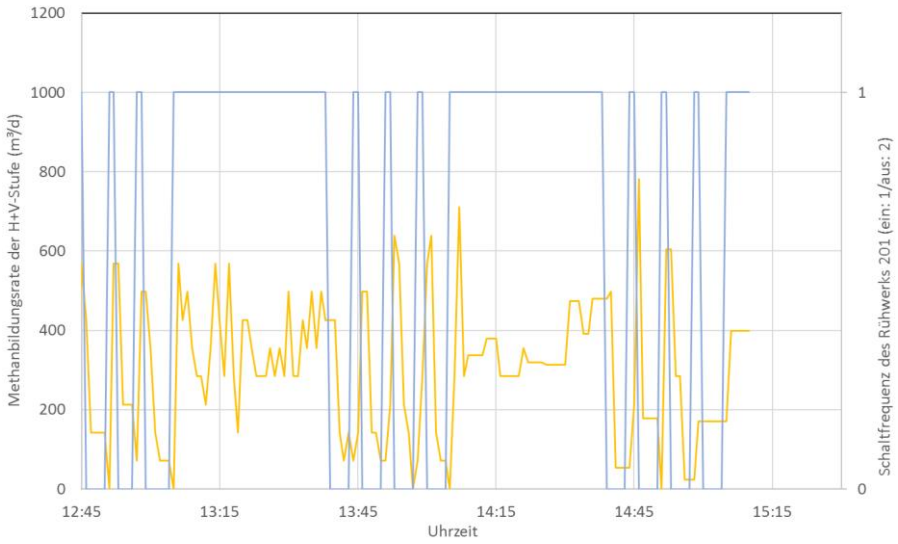


Abbildung 27: Methanemissionen am Schacht des Rührwerks der H+V-Stufe der Biogasanlage 18 am 15.09.2016 im Zeitraum von (12:45 bis 15:15 Uhr. In diesem Zeitraum wurde das Rührwerk im Wechsel 2 Minuten ein- und 5 Minuten ausgeschaltet (blaue Linie; die Ziffer 1 markiert die Einschaltung, die Ziffer = die Ausschaltung). Jeweils zur vollen Stunde wurde, parallel zur Substratdosierung, das Rührwerk ca. 33 Minuten lang betrieben. Die Methanemissionsrate ist als gelbe Linie dargestellt.

Die erzielten Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu:

1. Die am Beispiel der Biogasanlage 18 durchgeführte, 6-stündige Emissionsmessung zeigt deutlich, dass sowohl die Phasen der Durchmischung als auch die Ruhephasen repräsentativ erfasst werden müssen, wenn belastbare Aussagen zur Methanemission offener Vorstufen getroffen werden sollen.
2. Aufgrund der erheblichen Fluktuationen der Biogasemissionen auch unter konstanten Betriebsbedingungen ist es aus statistischen Gründen erforderlich, zumindest 3 repräsentative Phasen eines typischen Betriebszyklus zu erfassen. Wird z. B. – wie in der BGA 18 – stündlich Substrat dosiert und wird in diesem Zusammenhang ein wiederkehrender Rührzyklus absolviert, sollte eine solche 1-stündige Phase anlässlich eines jeden Untersuchungstermins möglichst dreimal vollständig erfasst werden.
3. Die nachgewiesene Abhängigkeit der Methanemissionsrate von der Rührwerksaktivität lässt außerdem erwarten, dass auch die Position der Messhaube in der jeweils untersuchten Vorstufe einen starken Einfluss auf die ermittelten Emissionsraten hat. Eine Standardisierung des Messverfahrens ist allerdings aufgrund der beschränkten Zugänglichkeit der Behälter und der nicht konstanten Betriebsbedingungen der Biogasanlagen nicht möglich. Möglich ist lediglich die sorgfältige Auswahl der optimalen Position der Messhaube unter den gegebenen Praxisbedingungen.

2.4.4 Wasserstoffkonzentrationen im Biogas der Vorstufen

Die während der Feldstudien durchgeführten Biogasanalysen hatten bereits erkennen lassen, dass die Wasserstoffkonzentrationen der untersuchten Biogase niedrig sein mussten: Bilanzsummen, die in der Regel zwischen 98 und 102 % lagen, ließen für weitere gasförmige Produkte keinen Raum.

Da aber der Wasserstoffpartialdruck in der Fermentationsflüssigkeit eine wesentliche Bedeutung nicht nur für die acetogenen Reaktionen, sondern auch für die Gärungspfade der acidogenen Bakterien hat, wurden ergänzend Untersuchungen der Wasserstoffkonzentrationen im Biogas durchgeführt.

Tabelle 14: Wasserstoffkonzentrationen im Biogas der Vorstufen der 6 experimentell untersuchten Biogasanlagen; Probenahme: ttz Bremerhaven/Cordes+Winterberg; Auftragsanalytik: Deutsches Biomasseforschungszentrum (DBFZ)

BGA	Vorstufe	Wasserstoffkonzentration ppm	%
2	Hydrolyse/Versäuerung	731	0,073
3	Anmaischer	9.060	0,91
	Hydrolyse/Versäuerung	4.510	0,45
12	Hydrolyse/Versäuerung	348	0,035
16	Anmaischer	3.200	0,32
17	Anmaischer	687	0,069
18	Hydrolyse/Versäuerung	183	0,018

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wasserstoffkonzentrationen im Vergleich zu denjenigen in Methanfermentern (200-600 ppm) erwartungsgemäß erhöht sind, wenn auch nur moderat. Die relativ geringen Wasserstoffkonzentrationen können auf die hohe Konzentration wasserstoffverwertender Methanbakterien zurückgeführt werden, die den Vorstufen über die Rezirkulate zugeführt werden. Die mikrobiellen Populationen der Anmaischer und H+V-Stufen sind offenbar denjenigen der Methanreaktoren sehr ähnlich, wenn mit hohen Raten rezirkuliert wird. Dies wird durch die Ergebnisse der Populationsanalysen bestätigt (vgl. Kapitel 2.5).

Es ist zu erwarten, dass die Freisetzung von Wasserstoff von einer Reihe bioprozesstechnischer Bedingungen beeinflusst wird, z. B. von der oTM-Raumbelastung, der hydraulischen Verweilzeit, der Temperatur, dem pH-Wert und der Rezirkulationsrate. Deutlich erkennbar ist der Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Wasserstoffkonzentration im Biogas. Dies veranschaulicht die folgende Abbildung.

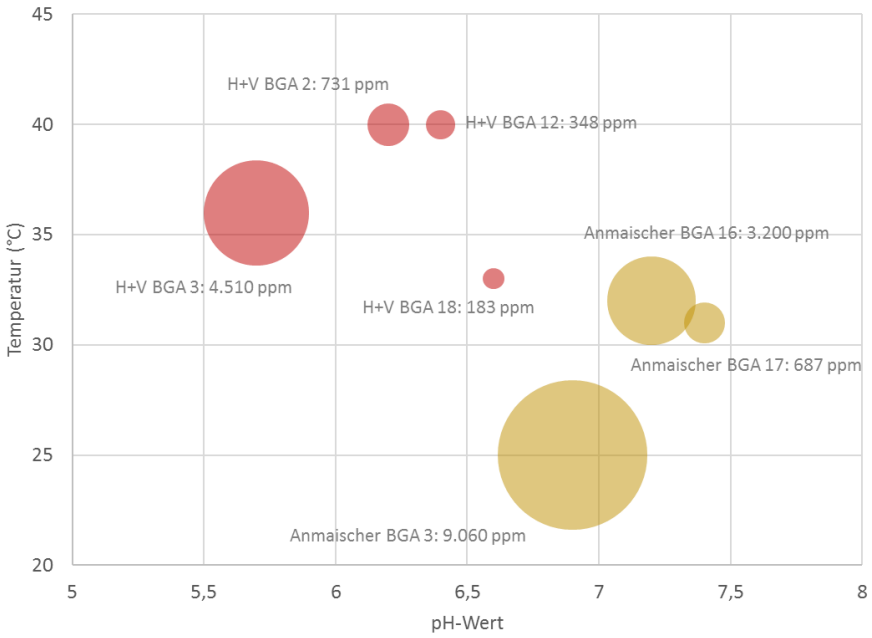


Abbildung 28: Wasserstoffkonzentrationen in Biogasproben der untersuchten Vorstufen in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert; die Kreisflächen sind der Wasserstoffkonzentration proportional (Grafik: Cordes+Winterberg)

Bei Wasserstoffkonzentrationen, die deutlich oberhalb der in Methanreaktoren üblichen 200-600 ppm liegen (hier also in den Anmaischern der BGA 3 und 16) ist aus thermodynamischen Gründen trotz der ausgeprägten Methanogenese mit der acetogenen Umsetzung von Propionsäure und auch der längerkettigen Fettsäuren nicht mehr zu rechnen. Die Verschiebung des Gärspektrums acidogener Reaktionen hin zu reduzierteren, also längerkettigen Fettsäuren, ist erkennbar (Daten nicht dargestellt).

Die Auswertung der Wasserstoffanalysen der Vorstufen zeigt, dass die Anmaischerfunktion der Vorstufen und die damit verbundene Rezirkulation aktiver methanogener Kulturen vorteilhaft sein kann: Die methanogenen Aktivitäten führen

zur Reduzierung der Wasserstoffpartialdrücke in den Reaktoren und damit aus thermodynamischen Gründen zu einer Verschiebung der Gärungsspektren hin zu weniger reduzierten Produkten – im Idealfall also hin zur Essigsäure. Die Methanogenese in den H+V-Stufen kann somit als vorteilhaft bewertet werden, sofern das gebildete Methan nicht in die Atmosphäre entweicht.

2.4.5 Substratabbau und Produktbildung in den Vorstufen

2.4.5.1 Substratabbau

Die Untersuchung des Substratabbaus, insbesondere der Polymerhydrolyse, sowie der Säurebildung betrifft die bioprozesstechnische Kernfunktion der Hydrolyse- und Versäuerungsstufen. Von zentraler Bedeutung ist die Kinetik des Abbaus der Substratkomponenten einerseits und der Substratverweilzeit in der Vorstufe andererseits. Im Zentrum dieser Untersuchungen lag der Abbau der Faserstoffe. Die Hydrolyse der Faserstoffe gilt als geschwindigkeitsbestimmender Schritt ihres Abbaus zum Methan.

Um Aussagen zu den Abbaugraden der verschiedenen Gruppen organischer Verbindungen machen zu können, wurden Untersuchungen der einzelnen Stufen der sechs ausgewählten Biogasanlagen mit Hilfe der Weender-Analyse durchgeführt. Diese Daten wurden mit den berechneten Konzentrationen dieser organischen Verbindungen im Substrat/Rezirkulat-Gemisch verglichen (Tabelle 16).

Die Daten der Tabelle 16 lassen, wie zu erwarten, geringe Abbaugrade der Substrat/Rezirkulat-Inhaltsstoffe in den Vorstufen sowie einen weitgehenden Abbau im Fermenter oder Nachgärer erkennen. Der Vergleich der Abbaugrade der organischen Verbindungen in den Vorstufen ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 15: Abbaugrade der TM, der oTM, der Milchsäure und der Weender-Stoffgruppen, erzielt in Vorstufen der sechs ausgewählten Biogasanlagen

BGA	Abbaugrad (%)							
	TM	oTM	NfE	Milchsäure	Rohfaser	Rohprotein	Rohfett	Weender-Gruppen
BGA 2	21	27	49	94	0	16	34	34,5
BGA 3	10	2,6	37	nb	0	0	19	22,3
BGA 12	5,3	1,6	20	98	0	0	12	12,1
BGA 16	0,1	0,8	35	95	0	4,1	19	20,5
BGA 17	6,7	19	44	97	0	0	47	27,4
BGA 18*	10	14	36	90	0	17	6	22,7

nb: nicht bestimmt

* wegen nicht repräsentativer Probenzusammensetzung (stark vom typischen Wert abweichender TM) wurden alle Konzentrationen der Inhaltsstoffe dieser Probe mit dem Faktor $TM_{typisch}/TM_{gemessen}$ korrigiert. Die typischen Zusammensetzungen wurden auf Basis eigener Messungen sowie der Betreiberdaten berechnet.

Die Daten machen deutlich, dass die "stickstofffreien Extraktstoffe (NfE)" mit einem Abbaugrad von 20 bis 49 % verwertet wurden. Milchsäure, die den "NfE" zuzuordnen sind, wurde mit Abbaugraden von 90-98 % nahezu vollständig abgebaut, sehr wahrscheinlich vor allem zu Essig- und Propionsäure (Satpathy et al., 2016). Die Abbaugrade der Proteine lagen bei maximal 17 %, die der Fette bei 6-47 %. Für die "Faserstoffe" konnte kein Abbau nachgewiesen werden, was angesichts der veröffentlichten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Desintegration und der Cellulose-Hydrolyse zu erwarten war.

Tabelle 16: Konzentrationen der TM, der oTM und der Weender-Stoffgruppen im Substrat, in den Vorstufen und in den Methanstufen der untersuchten sechs Biogasanlagen

Biogasanlage	Probenherkunft	Einheit	TM	oTM	NfE	Rohfaser	Rohprotein	Rohfett
BGA 2	Substrat-/Rezirkulat-Gemisch (berechnet)	% FM	13,3	11,6	7,30	2,31	1,65	0,41
	H+V-Stufe	% FM	10,5	8,48	3,69	3,14	1,38	0,27
	Fermenter	% FM	4,50	3,00	0,99	1,17	0,69	0,15
BGA 3	Substrat-/Rezirkulat-Gemisch (berechnet)	% FM	13,2	11,3	6,56	2,37	1,97	0,43
	Anmaischer	% FM	14,8	13,5	4,77	4,30	2,15	0,31
	H+V-Stufe	% FM	11,9	11,0	4,12	4,29	2,30	0,35
	Nachgärer*	% FM	8,2	6,2	1,50	3,12	1,49	0,21
BGA 12	Substrat-/Rezirkulat-Gemisch (berechnet)	% FM	11,7	9,98	5,83	2,09	1,74	0,37
	H+V-Stufe	% FM	11,1	9,82	4,66	2,99	1,85	0,32
	Fermenter	% FM	7,4	5,8	nb	2,44	1,43	nb
BGA 16	Substrat-/Rezirkulat-Gemisch (berechnet)	% FM	9,51	7,76	4,18	1,81	1,53	0,31
	Anmaischer	% FM	9,50	7,70	2,71	3,24	1,46	0,25
	Nachgärer	% FM	6,20	3,80	0,40	2,24	0,94	0,17
BGA 17	Substrat-/Rezirkulat-Gemisch (berechnet)	% FM	16,4	14,5	8,45	3,42	2,11	0,55
	Anmaischer	% FM	15,3	11,7	4,73	4,54	2,12	0,29
	Nachgärer	% FM	11,7	8,6	2,63	4,02	1,72	0,21
BGA 18	Substrat-/Rezirkulat-Gemisch (berechnet)	% FM	8,93	7,20	3,77	1,63	1,50	0,36
	H+V-Stufe*	% FM	8,00	6,20	2,41	2,22	1,24	0,34
	Nachgärer*	% FM	5,40	3,78	1,30	1,31	0,92	0,18

* wegen nicht repräsentativer Probenzusammensetzung (stark vom typischen Wert abweichender TM) wurden alle Konzentrationen der Inhaltsstoffe dieser Proben mit dem Faktor $TM_{typisch}/TM_{gemessen}$ korrigiert. Die typischen Zusammensetzungen wurden auf Basis eigener Messungen sowie der Betreiberdaten berechnet.

Der Gesamtabbaugrad der organischen Verbindungen des Substrat/Rezirkulat-Gemischs lag (unter Berücksichtigung der Massenanteile der einzelnen Weender-Stoffgruppen) im Bereich zwischen 12 und 35 %. Er korreliert erkennbar mit der Methanemission (Abbildung 29).

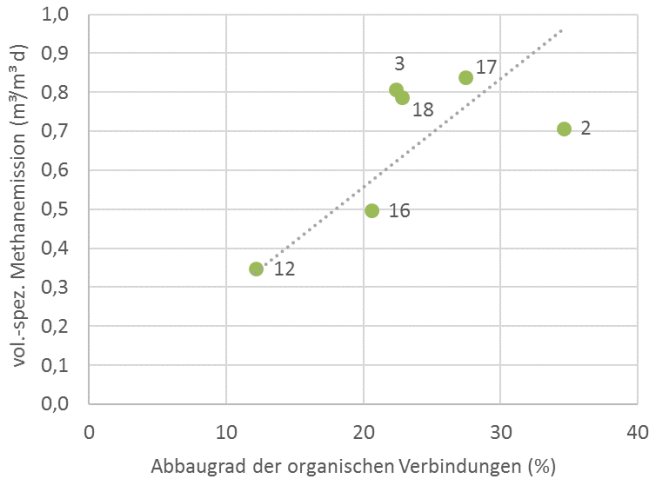


Abbildung 29: Korrelation der volumenspezifischen Methanemission und des Abbaugrades der organischen Verbindungen (gem. Weender-Analyse) der Vorstufen der sechs untersuchten Biogasanlagen; die Zahlen kennzeichnen die untersuchten BGA

Weitere Korrelationen, die erwartet werden können – z. B. zwischen dem Abbaugrad und dem pH-Wert, der Temperatur, dem Rezirkulat/Substrat-Quotienten, der Verweilzeit und der organischen Raumbelastung – sind teilweise erkennbar, aber aufgrund der großen Inhomogenitäten der Proben und der Betriebsbedingungen nur schwach ausgeprägt (Daten nicht dargestellt).

2.4.5.2 Produktbildung und Umsatzbilanz

Die Acidogenese wurde auf Basis der Betreiberdaten bewertet, die bei den BGA 2, 3, 12 und 18 auch die Konzentrationen der organischen Säuren der Flüssigproben aus den Vorstufen umfassten. Die für die sechs BGA speziell für dieses Projekt durchgeführten Untersuchungen lieferten auffallend niedrige Konzentrationen der flüchtigen organischen Säuren, so dass diese als nicht plausibel eingestuft werden mussten.

Die Bewertung der Säuregehalte der flüssigen Vorstufeninhalte muss berücksichtigen, dass den Vorstufen über die Substrate, Gärprodukte, organische Säuren, zugeführt werden. Diese stammen vor allem aus der Energiepflanzensilierung, aber auch aus Gärreaktionen, die während der Wirtschaftsdüngerlagerung ablaufen. Die Massenanteile der Gärprodukte an der oTM der Substrate betrugen 11-13 %. Mit einem Masseanteil von 48-58 % an der Masse der Gärprodukte dominierte die aus der Silierung stammende Milchsäure, gefolgt von Essigsäure, die sowohl aus der Silage als auch aus Gärreaktionen der Wirtschaftsdünger stammt. Andere kurzkettige Monocarbonsäuren und Alkohole spielten eine untergeordnete Rolle. Die Gärproduktspektren der untersuchten Mischsubstrate waren sehr ähnlich.

Die Konzentrationen der Gärprodukte der Substrate und der Vorstufen sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Konzentrationen der Gärprodukte in Substraten und Vorstufen der Biogasanlagen 2, 3, 12 und 18

Gärprodukt	BGA 2 Substrat (berechnet) g/l	H+V n=13 g/l	η %	BGA 3 Substrat (berechnet) g/l	Anmaischer n=1 g/l	η %	n=3 g/l	η %	BGA 12 Substrat (berechnet) g/l	n=3 g/l	η %	BGA 18 Substrat (berechnet) g/l	H+V n=1 g/l	η %
C_2	4,20	5,91		3,74	11,0		10,5		3,56	6,23		2,86	8,7	
C_3	0,23	1,61		0,13	1,30		3,35		0,38	2,21		0,34	1,6	
nC_4	0,11	3,23		0,06	3,50		3,90		0,19	4,63		0,15		
iC_4		0,14			0,00		0,00			0,27				
nC_5	0,03	0,41		0,02	1,60		1,08		0,04	0,45		0,05		
iC_5		0,46			0,00		0,00			0,31				
C_6	0,03	2,09		0,02	2,80		1,54		0,03	0,61		0,05		
sonstige	0,10			0,06	0,00		0,00		0,13			0,15		
Σ Fettsäuren	**4,72**	**13,8**	**294**	**4,04**	**20,2**	**500**	**20,4**	**505**	**4,33**	**14,7**	**340**	**3,59**	**16,9**	**471**
Milchsäure	8,69	0		8,28	nb		nb		5,54	0,11	2,0	4,20	nb	
Σ org. Säuren	**13,4**	**13,8**		**12,3**					**9,87**	**14,8**	**150**	**7,79**	**-**	
Alkohole	2,07	0,18		1,97					1,32	0,079	6,0	1,00	nb	
Σ org. Produkte	**15,5**	**14,0**	**90,6**	**14,3**	**20,2**	**141**	**20,4**	**143**	**11,2**	**14,9**	**133**	**8,79**	**16,9**	**192**

Analysen: ttz Bremerhaven e. V. (Milchsäure und Alkohole); Jena Bios GmbH (BGA 3); SB Biostrom GmbH (BGA 12); bue Anlagentechnik GmbH (BGA 18); Die Werte der BGA 2 wurden der elektronischen Betriebsdaten-Dokumentation entnommen

Auch die Fettsäurespektren der Maischen der Vorstufen der untersuchten Biogasanlagen weisen große Ähnlichkeiten auf, obwohl sich die Substratzusammensetzungen der Substrate (Abbildung 30) deutlich unterschieden.

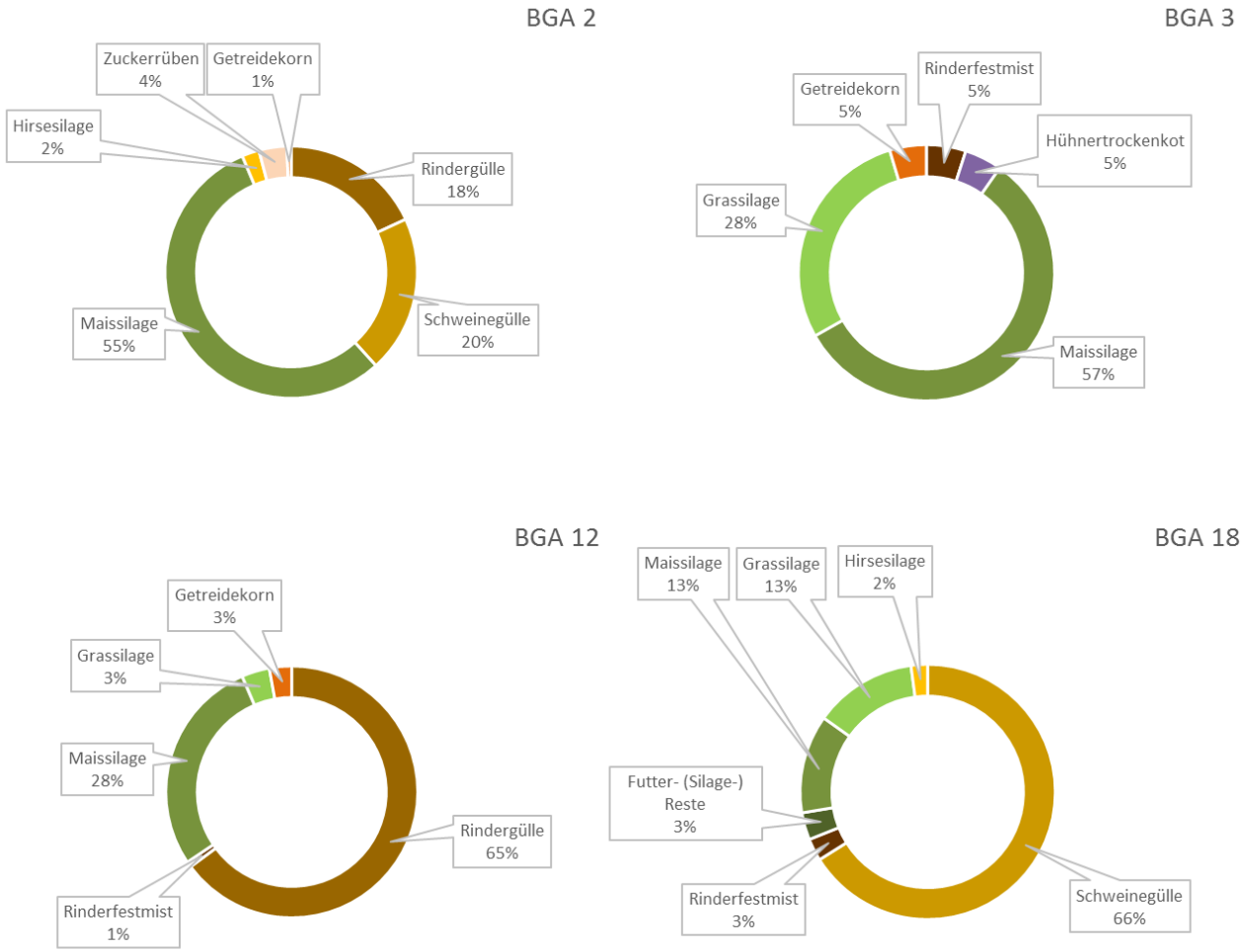


Abbildung 30: Substratzusammensetzungen (in Massen-%) der Biogasanlagen 2, 3, 12 und 18

Es dominierte Essigsäure, gefolgt von n-Buttersäure, Propionsäure, Capronsäure und n-Valeriansäure. Milchsäure war nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar oder unterschritt die Nachweisgrenze des Analyseverfahrens. Alkohole spielten eine vernachlässigbare Rolle (Abbildung 31).

+

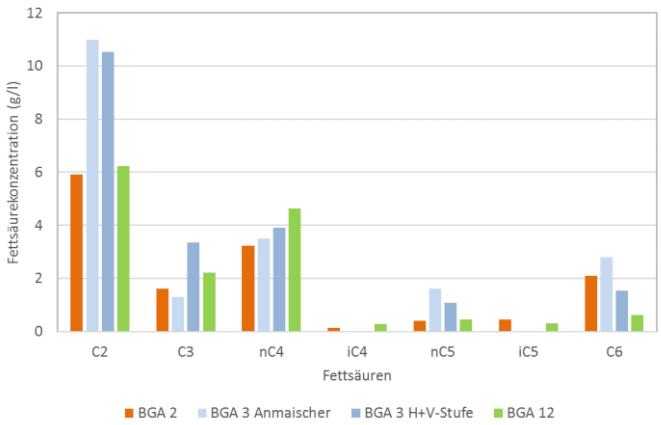


Abbildung 31: Fettsäurespektren in den Vorstufen der Biogasanlagen 2, 3 und 12

Mit Ausnahme der BGA 2 stieg die Konzentration der organischen Säuren im Vergleich zur Substratmischung in den Vorstufen an, und zwar auf 13-16 Massen-% der oTM. Bezieht man die Masse der Gärungsprodukte auf die "frisch" zugeführte oTM (und betrachtet damit die oTM des ausgefaulten Rezirkulats in grober Näherung als inert), liegen 16-25 % des oTM in der Form der Gärprodukte vor.

Tabelle 18: Masseanteil der Gärprodukte an der oTM der Maische der Vorstufen sowie an der oTM des frisch zugeführten Substrats (Maische abzüglich des "ausgefaulten" Rezirkulats); da Alkohole als Gärpodukte eine vernachlässigbare Rolle spielen, ist der Masse-Anteil der Gärprodukte nahezu identisch mit dem Masse-Anteil der organischen Säuren

Biogasanlage	Masse-Anteil der Gärprodukte an der Maische (% oTM)	Masse-Anteil der Gärprodukte am frisch zugeführten Substrat (% oTM)
2	14,7	19,8
3	15,3	19,9
12	12,5	15,6
18	15,7	25,4

Die Veränderung des Säurespektrums durch die mikrobiellen Umsetzungen in den Vorstufen wird in der folgenden Abbildung beispielhaft für die BGA 3 dargestellt.

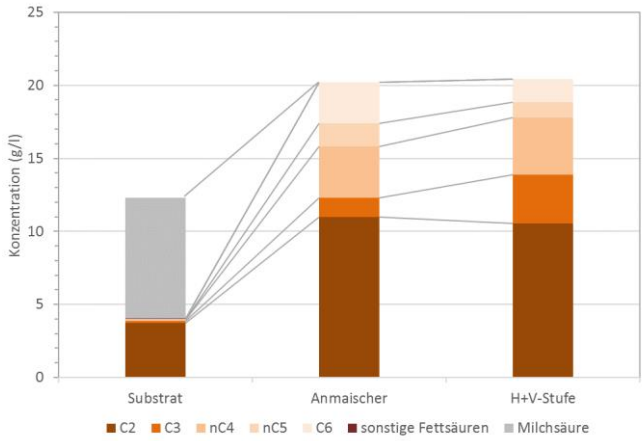


Abbildung 32: Konzentrationen der organischen Säuren im Substrat, im Anmaischer und in der H+V-Stufe der BGA 3

Die Interpretation der Umsetzungen in den Vorstufen muss folgende Reaktionen berücksichtigen:

1. Bildung von Gärprodukten aus "NfE" und, in geringerem Umfang, Proteinen und Fetten (nachgewiesen durch Weender-Analysen, s. Kapitel 2.4.5.1)
2. Nahezu vollständiger Abbau der Milchsäure. Milchsäure gilt als dominantes Produkt des Abbaus niedermolekularer Zucker. Sie wird daher als wichtiger Metabolit gewertet, der mit hohen Raten gebildet, aber auch sehr schnell abgebaut wird und daher in stabilen Methanreaktoren nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar ist. Milchsäure wurde daher bislang in Modellierungen der anaeroben Nahrungskette nur selten berücksichtigt (Batstone et al. 2002). In jüngeren Arbeiten mit einem Modellsubstrat wurde angenommen, dass Lactat vor allem zu Acetat und, in geringerem Umfang, zu Propionat umgesetzt wird (Satpathy et al., 2016).
3. Methanbildung aus Wasserstoff (nachgewiesen durch niedrige Wasserstoffkonzentrationen im Biogas der Vorstufen, s. Kapitel 2.4.4)

Ob auch die Methanbildung aus Essigsäure eine nennenswerte Rolle in den untersuchten Vorstufen spielt, kann auf Basis der vorliegenden Daten nicht belegt werden. Zwar liegt die maximale Wachstumsrate der Acetat-verwertenden Methanbakterien am oberen Rand des Verweilzeitenbereichs der untersuchten Vorstufen, doch werden diese Organismen über das Rezirkulat in die Vorstufen eingetragen. Aufgrund der geringen Halbsättigungskonstante der Acetatverwertung dürfte dieser Stoffwechselweg daher in den Vorstufen eine Rolle spielen. Allerdings muss

berücksichtigt werden, dass für BGA, die Energiepflanzen oder Energiepflanzen/Wirtschaftsdünger-Mischungen vergären, die Dominanz der hydrogenotrophen Methanbakterien vielfach nachgewiesen worden (Demirel, 2014).

Aufgrund der im Vergleich zu Methanreaktoren erhöhten Wasserstoffpartialdrücke der Vorstufen-Maischen ist zu erwarten, dass der Propionsäureabbau zu Essigsäure durch acetogene Bakterien behindert ist.

Eine Bilanzierung des Substratumsatzes durch die mikrobiellen Kulturen der Vorstufen erfolgt auf Basis des rechnerisch (nicht analytisch) ermittelten chemischen Sauerstoffbedarfs der Substratinhaltsstoffe und der Umsetzungsprodukte. Der Vorteil des Verfahrens liegt darin, dass Kohlendioxid und die mit ihm im Gleichgewicht stehenden Carbonate, deren Quantifizierung in der Flüssigphase im Rahmen der praxisnahen Standardanalytik nicht erfolgt, in der CSB-Bilanz nicht berücksichtigt werden müssen (Tabelle 19).

Tabelle 19: Produktbildung aus frisch zugeführtem Substrat ("ausgefaultes" Rezirkulat nicht berücksichtigt) auf Basis des rechnerisch ermittelten chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB)

Kenngröße (% CSB)	Biogasanlage 2	3	12	18
Substrat zu Gärprodukten der Flüssigphase (Fettsäuren u. Alkohole)	14,3	14,2	11,2	18,7
Substrat zu Methan	1,4	7,7	1,8	3,1
Substrat zu nachgewiesenen Gärprodukten	15,7	21,9	13,0	21,8
CSB-Bilanz	68	118	102	88

Eingeschränkt wird die Präzision der CSB-Bilanzen durch die geringe Zahl der verfügbaren Analysenergebnisse zur Konzentration der Inhaltsstoffe der Maischen. Deutlich wird dies vor allem bei der Berechnung der CSB-Bilanz. Dennoch lassen sich folgende Aussagen aus der Bilanzierung ableiten:

1. Der Umsetzungsgrad zu flüssigen Gärprodukten (die sich nahezu ausschließlich aus kurzkettigen Fettsäuren zusammensetzen) liegt, bezogen auf das frisch zugeführte Substrat (Rezirkulat als inert betrachtet), im Bereich von 11-19 %. Die Werte sind aufgrund des relativ hohen Sauerstoffanteils und damit niedrigen CSB-Wertes der kurzkettigen Fettsäuren niedriger als die auf oTM-Basis berechneten Umsetzungsgrade.
2. Der CSB des emittierten Methans liegt bei 1,4-7,7 % des CSB des frisch zugeführten CSB.
3. Damit liegt der Gesamt-Umsetzungsgrad des frisch zugeführten (Substrat-CSB bei 13-22 %).

Die Diskussion dieses Befunds erfolgt in Kapitel 2.8.

2.4.6 Einfluss einzelner Betriebsbedingungen auf den Bioprozess

Die Integration einer Hydrolyse- und Versäuerungsstufe erfolgt unter dem Gesichtspunkt der Bioprozessoptimierung. Diese setzt eine geeignete Prozesssteuerung voraus. So werden von Planern und Herstellern bestimmte Temperaturen, pH-Werte, Verweilzeiten und organische Raumbelastungen angestrebt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen allerdings, dass die sich aus der Anmaischerfunktion ergebende Rezirkulation die Prozessbedingungen weitgehend diktiert und auch beeinflusst.

2.4.6.1 Rezirkulation und pH-Wert

So wird zwar durch die Rezirkulation von Fermenterinhalten und Gärrest die Verweilzeit verkürzt, was die Abbaugrade der zugeführten Substrate aus kinetischen Gründen verringern müsste. Doch wird dieser Effekt offenbar überlagert durch die zu erwartende Erhöhung des pH-Wertes durch die Rezirkulation. Mit steigendem pH-Wert erhöht sich sowohl der Grad der Abbau der Verbindungen der Weender-Stoffgruppen (nicht dargestellt), als auch die Konzentration der gebildeten Gärprodukte (z. B. der Essigsäurekonzentration, Abbildung 33) und das Volumen des emittierten Methans (Abbildung 25).

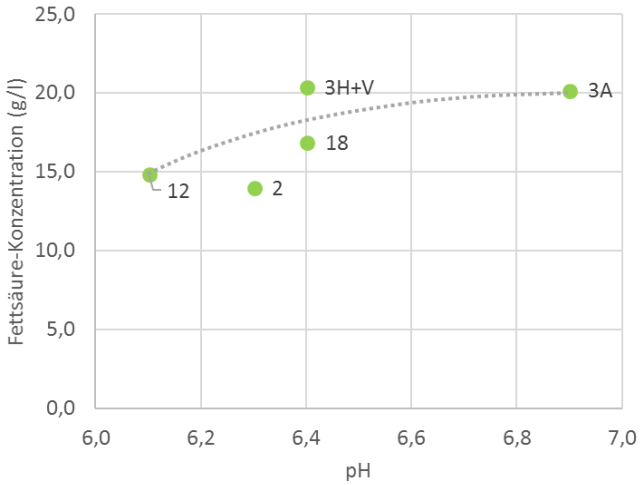


Abbildung 33: Beeinflussung der Fettsäure-Konzentration der Maischen in Vorstufen der Biogasanlagen 2, 12, 18 (jeweils H+V-Stufen) und 3 (Anmaischer und H+V-Stufe) durch den pH-Wert; die Zahlen kennzeichnen die untersuchten BGA

Es ist dargestellt worden, dass es starke Hinweise dafür gibt, dass die weitaus meisten Reaktionen der Substratverwertung aller trophischen Gruppen in Biogasanlagen im pH-Neutralbereich optimal ablaufen. Dies kann erklären, dass trotz der Verkürzung der Verweilzeit durch Rezirkulation der Abbaugrad von Substratinhaltsstoffen mit steigendem Rezirkulat/Substrat-Quotienten im untersuchten Bereich erhöht wird. Der Effekt überlagert auch die Reduzierung der Umsatzeffizienz mit steigender oTM-Raumbelastung, die in den untersuchten Systemen nicht erkennbar ist.

2.4.6.2 Temperatur

Auch der Einfluss der Temperatur auf die Substratumsätze der untersuchten mesophilen Kulturen ist erkennbar, wenn auch schwach ausgeprägt: mit steigenden Temperaturen steigen die Abbaugrade der Substrate sowie die Produktkonzentrationen im Bereich zwischen 30 und 36°C leicht an (Daten nicht dargestellt).

2.4.6.3 Belüftung

Einige der untersuchten Hydrolysestufen sind mit Belüftungseinrichtungen ausgestattet. Eine wirksame Belüftung führt dazu, dass zumindest Anteile des injizierten Sauerstoffs durch fakultativ anaerobe Bakterien für Substratumsetzungen genutzt werden. Diese Bakterien wachsen in Gegenwart von Sauerstoff schneller, doch ist das so umgesetzte Substrat für die Gewinnung eines energiereichen Gases verloren.

Der Effekt der Belüftung wurde in dieser Studie nicht gezielt untersucht, allerdings war in den untersuchten Anlagen ein Einfluss auf den Bioprozess nicht feststellbar. Dieselbe Beobachtung der Betreiber hatte bereits im Vorfeld dazu geführt, dass einige Belüftungsanlagen der untersuchten Hydrolysestufen dauerhaft oder zeitweilig abgeschaltet worden waren. Die Autoren dieser Studie konnten beobachten, dass die installierten Einrichtungen – wohl aus Gründen der Betriebssicherheit - eine grobblasige Belüftung bewirkten, deren Wirksamkeit allerdings bezweifelt werden muss.

2.4.7 Nebenergebnisse und Erfahrungen

ttz Bremerhaven, Cordes+Winterberg

Das Projekt AcEta zielte auf die Optimierung der Bioprozesstechnik zweiphasiger landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Die durchgeführten Untersuchungen berührten zwangsläufig auch Bereiche, die nicht Gegenstand des Projektes oder die zumindest nicht zu den Schwerpunkten der Bearbeitung gehörten. In diesen Bereichen konnten Beobachtungen gemacht oder sogar Ergebnisse erzielt werden, die für die Weiterentwicklung der Branche bedeutsam sind und die daher an anderer Stelle des Berichts detaillierter beschrieben wurden. Dazu gehörten folgende Themen:

- Arbeitsschutz: Explosionsschutz im Bereich offener Vorstufen
- Rührtechnik: Praxiserfahrungen zur Wirksamkeit verschiedener Durchmischungssysteme
- Methodik der Biogasanalytik im Zusammenhang mit offenen Stufen oder Behälter der Biogasanlagen

2.5 Ergebnisse und Diskussion III: MALDI-TOF-MS-Analysen und quantitative PCR-Analysen

Hochschule Anhalt

Bei der MALDI-TOF-MS-Analyse wurde in diesem Projekt ein Schwerpunkt auf die unter aeroben Bedingungen kultivierbare Mikroflora gelegt. Es wurden alle relevanten Phyla, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria und Bacteroidetes, mit MALDI-TOF-MS-Analyse gefunden. Die zusätzlich durchgeführten qPCR-Analysen bestätigen diese Ergebnisse. Diese Hauptgruppen sind in zahlreichen Literaturstellen in Zusammenhang mit der Produktion von Biogas beschrieben.

Generell ist zunächst zur MALDI-TOF-MS-Analyse festzustellen, dass mit dem gewählten Ansatz der Aufarbeitung, der aeroben Kultivierung und dem gewählten PC-Agar schon naturgemäß nur ein Ausschnitt aus der fakultativ aeroben und mikroaerophilen Population zu sehen ist. Allein die Verwendung weiterer Nährböden kann das Artenspektrum erweitern. Dies wurde in diesem Projekt nachgewiesen, indem für die erste Probenahme im Jahr 2015 die Proben auf weiteren Nährböden, nämlich MRS, LB und Chromocult, ausplattiert und auch in unregelmäßiger Folge begleitend Proben auf diesen Nährböden ausgestrichen wurden. Dies führte zu einem weiteren Spektrum an identifizierten Keimen. Aufgrund der Vielzahl der Analysen wurden die Untersuchungen dann auf den PC-Nährboden beschränkt. Im Vergleich zu den qPCR-Analysen zeigt sich, dass schwerpunktmäßig mit MADLI-TOF-MS-Analyse ein breites Artenspektrum aus dem Phylum der Proteobacteria gefunden wurde, gefolgt vom Phylum Firmicutes, Actinobacteria und schließlich Bacteroidetes. Dies entspricht erwartungsgemäß natürlich nicht den realen Gegebenheiten, was auch durch die qPCR-Analysen unterlegt wird. Trotzdem gelingt es anhand dieser Analyse, Unterschiede im Spektrum der einzelnen Anlagen zu finden, die auf die Substratzusammensetzung zurückzuführen ist.

Die qPCR Analysen ergeben ein realistisches Bild zur Zusammensetzung der gesamten Population. Trotzdem können anhand der MALDI-TOF-MS-Analyse Unterschiede zwischen den Anlagen erkannt und Aussagen zu den einzelnen Anlagen gemacht werden.

Die Ergebnisse werden im Folgenden im Detail an den einzelnen Anlagen erläutert. Generell kann vorab noch festgestellt werden, dass eine ausgeprägte Sommer- und Winterpopulation nicht festgestellt werden kann. Keine der beprobten Anlagen zeigt eine vollkommen stabile Populationszusammensetzung, was durch die natürliche Heterogenität der Substrate bedingt sein wird. Der Vergleich von Proben aus Anmaischern und Hydrolysestufen aus jeweils derselben Anlage zeigte erwartungsgemäß eine Population, die recht ähnlich war (Beispiel s. BGA 3 A und 3 H+V). Die dort parallel genommenen Proben zeigen eine weitgehende Übereinstimmung in der Populationszusammensetzung, trotzdem werden nicht alle Arten in beiden Gefäßen gefunden. Durch die teilweise hohen Raten der Rezirkulation aus dem Gärrestlager oder dem Nachfermenter kam es bei allen untersuchten Anlagen zu einem Eintrag der Hauptfermenterpopulation. Dies kann durchgängig in den MALDI-TOF-MS Analysen nachgewiesen werden. Auch der mit qPCR bestimmte Anteil an bakteriellen Gruppen ergibt dasselbe Ergebnis.

2.5.1 Beschreibung der Ergebnisse zu den einzelnen Anlagen

Die folgende Abbildung zeigt die Substratzusammensetzung der sechs experimentell untersuchten Biogasanlagen in der Übersicht.

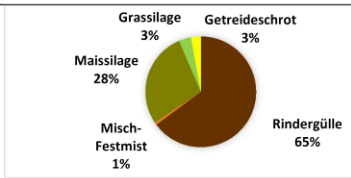
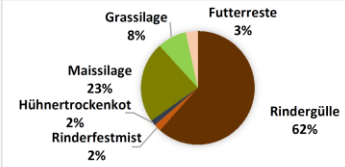
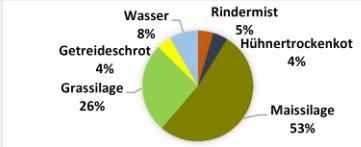
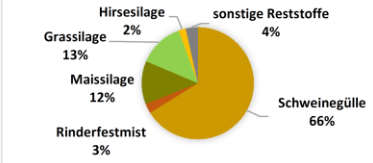
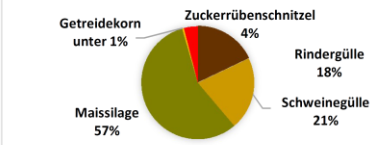
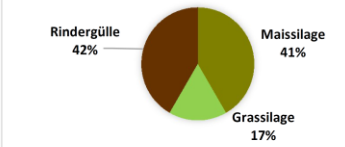
Anlagen Nr.	Typ/Hydrolyse/ Besonderheiten	Eingesetzte Substrate
12	*Typ: bue* offen Rezirkulat/Substrat Quotient 1,4	
16	*Typ: Bioconstruct* als H+V stillgelegt Rezirkulat/Substrat Quotient 2,5	
3	*Typ: Rohn* offen; Anmaischer und Hydrolyse Rezirkulat/Substrat Quotient 3,4	
18	*Typ: bue* offen Rezirkulat/Substrat Quotient 2,5	
2	*Typ: Avantec* belüftet Rezirkulat/Substrat Quotient 1,8	
17	*Typ: Bioconstruct* belüftet, gasdicht, zusätzlicher Anmaischer Rezirkulat/Substrat Quotient 0,75	

Abbildung 34: Substratspektren der sechs näher untersuchten Anlagen

2.5.1.1 Biogasanlage 2

Zu dieser Anlage muss vorab festgestellt werden, dass durch die hohe Rezirkulationsrate ein hoher Eintrag an mikrobieller Population aus dem Gärrestlager und damit auch aus dem Hauptfermenter stattgefunden hat. Sowohl die MALDI-TOF-MS-Analysen als auch die qPCR-Analysen zeigen, dass die Anlage BGA 2 recht stabil läuft. Die zu erwartenden Phyla Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes und Proteobacteria wurden sowohl mit der MALDI-TOF-MS, als auch mit der qPCR-Analyse gefunden (Abbildungen 35 und 36).

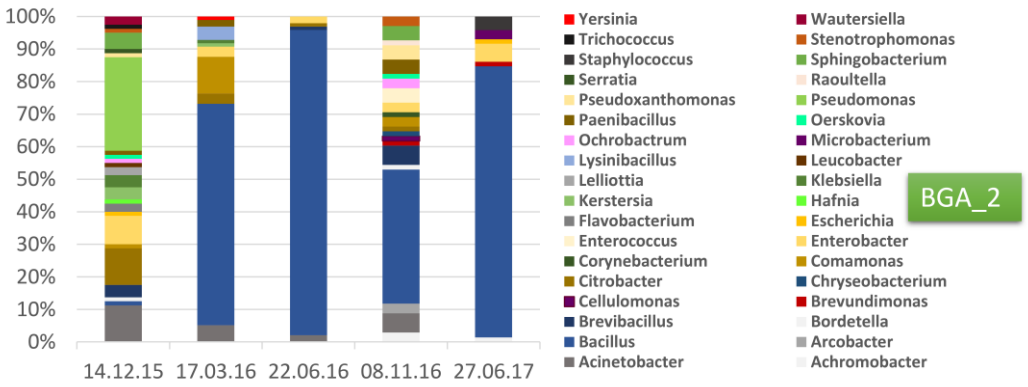


Abbildung 35: Biogasanlage 2 - Ergebnisse der Populationsanalyse mit MALDI-TOF-MS (n=100 bestimmte Keime/Probenahme)

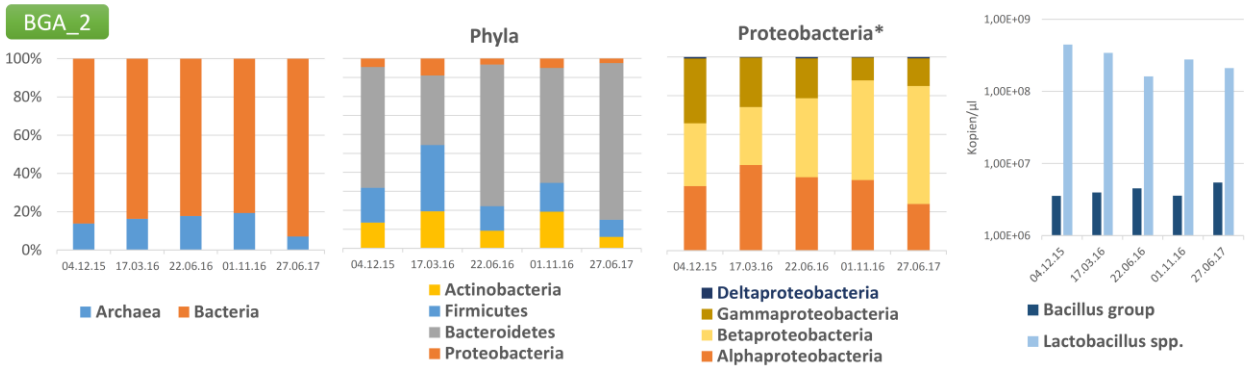


Abbildung 36: Biogasanlage 2 - Populationsanalyse mit quantitativer PCR (*ohne *Epsilonproteobacteria*)

Aufgrund des hohen Gehaltes an Maissilage (57%) sind hier Mitglieder aus der Gruppe Proteobacteria, wie *Citrobacter, Enterobacter, Acinetobacter, Pseudomonas* und Stenotrophomonas gefunden worden, die Cellulose, HemiCellulose, Carboxymethylcellulose und zu einem geringen Teil auch pflanzliches Lignin abbauen können. In dieser Anlage wurden auch Vertreter der Gattungen Bacteroidetes, wie *Sphingobacteria* und *Chryseobacteria*, gefunden, die in der Lage sind, Oligosaccharide abzubauen (s.a. Jimenez et al., 2014, Jimenez et al., 2015, Manz et al., 1996). Die nachgewiesenen *Comamonas St*ämme können organische Säuren verwerten, aber nur ein kleines Zuckerspektrum (De Vos et al., 1985b).

Unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen zeigt sich mit MALDI-TOF-MS ein Anteil der Gattung *Bacillus* (Firmicutes) von 40-60% am mit dieser Methode aufgenommenen Gesamtspektrum der Organismen. Daneben wurde noch ein breites Artenspektrum an Organismen gefunden, die alle zur Klasse der Bacilli (z.B. *Paenibacillus, Lysinibacillus*) und damit zu den Firmicutes gehören. Mit qPCR wurde der gesamte Anteil der Firmicutes mit 10-15% bestimmt. Dies zeigt, wie oben schon erwähnt, dass die MALDI-TOF-MS Analyse aufgrund des kleinen Fensters keine genaue Quantifizierung der Gruppen zueinander ermöglicht. Aus dem Phylum Bacteroidetes wurden hier z.B. Flavobacteriales und Sphingobateriales gefunden, sowie Gammaproteobacteria, Gruppen, die neben den Firmicutes für die Hydrolyse in Biogasreaktoren verantwortlich gemacht werden. Die gefundenen Flavobacteria können ein breites Spektrum an organischen Substanzen abbauen, darunter Stärke, Cellulose oder Lignin. Die Gruppe der Gammaproteobacteria war hier mit einer breiten Vielfalt an Enterobacterales vertreten, sowie verschiedene Pseudomonadales und Xanthomonadales, Polymerbildner, die mit dem Abbau von Furanen in Verbindung gebracht werden. Die in der BGA 2 mit MALDI-TOF-MS-Analyse gefundenen Betaproteobacteria zählen ausnahmslos zur Ordnung der Burkholderiales, deren Vorkommen in Biogasanlagen beschrieben ist und denen die Funktion des Lignocellulosehydrolyse zugeschrieben wird (Pandit, 2016).

Da die Gruppen der Gamma- und Betaproteobacteria sehr heterogen sind, ist die Verbindung zu einer bestimmten metabolischen Funktion in Bezug zu einem Substrat schwierig herzustellen. Dies wurde auch schon für Zuckerrüben- und Grassilage beschrieben (Cirne, 2006).

Die parallel mit qPCR gemessenen *Bacillus subtilis*-Group zeigt ebenfalls einen stabilen Verlauf. Die qPCR Analyse zeigt auch, dass ein recht hoher Anteil an Archaea, zwischen 8 bis 20%, in der Hydrolysestufe zu finden ist. Dies ist vermutlich

auf die hohe Rezirkulationsrate zurückzuführen. Mit qPCR wurde auch, wie zu erwarten ist, ein hoher Anteil an Bacteroidetes gefunden (bis zu 80%).

Die Gruppe der Proteobacteria wurde mit maximal 10% gefunden, wurde aber mit qPCR noch weiter aufgefächert. Hier zeigt sich als Tendenz über die Untersuchungszeit ein Anstieg der Betaproteobacteria und parallel ein Rückgang der Alpha- und Gammaproteobacteria.

Wie auch in den anderen untersuchten Anlagen ist der Anteil der mit qPCR bestimmten Lactobacillen und der *Bacillus*-Gruppe recht konstant.

2.5.1.2 Biogasanlage 3

Die Substratzusammensetzung in BGA 3 hat einen Anteil von 53 Masse-% Maissilage (ähnlich hoch wie BGA 2), dazu noch 26% Grassilage und einen geringen Anteil an Getreideschrot, Rindergülle und Hühnerkot. Diese Anlage arbeitet mit einem hohen Rezirkulat/Substrat-Quotienten von 3,4. Allerdings wird eine fest-flüssig Separation vor Rückführung in den Anmaischer durchgeführt.

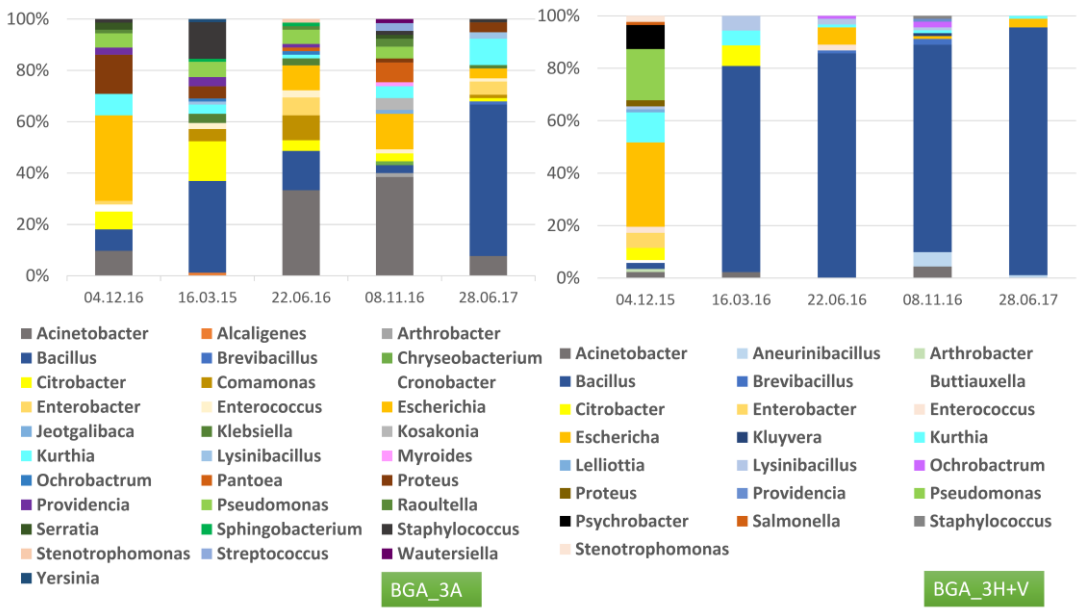


Abbildung 37: BGA 3 - Ergebnisse der Populationsanalyse mit MALDI-TOF-MS (n=100 bestimmte Keime/Probenahme)

Ähnlich wie in BGA 2 finden sich hier mit der MALDI-TOF-MS-Analyse auch wieder die Cellulose-abbauenden Gattungen *Citrobacter, Enterobacter, Acinetobacter, Pseudomonas* und *Stenotrophomonas*. Auffällig ist, dass hier in den Proben ein recht hoher Anteil von 7-25% an *Acinetobacter* zu finden ist. *Acinetobacter* sind weit verbreitet in der Umwelt und können ein weites Spektrum organischer Substanzen als Kohlenstoff- und Energiequelle abbauen. Es wird diskutiert, dass der Sauerstoffverbrauch durch diese bakterielle Gruppe in Biogasanlagen zur Einstellung des anaeroben Zustandes beiträgt. Diese Gruppe enthält Lebensmittelverderber, aber auch human-pathogene Organismen, die eine Reihe von Erkrankungen verursachen können, und häufig auch Antibiotikumsresistenzen aufweisen. Der Nachweis solcher Resistenzen wurde auch in Biogasanlagen geführt (Schaus et al., 2015). Auch die Gattung *Bacillus* ist mit bis zu 40% vertreten.

Die qPCR zeigt trotz der hohen Rezirkulation einen auffallend niedrigen stabilen Anteil an Archaea unter 5%, was durch die durchgeführte Separation zu erklären ist. Zudem zeigt die qPCR-Analyse eine hohe Ähnlichkeit der Verteilung der Phyla und der Proteobacteria zur BGA 2.

Diese Anlage läuft vergleichsweise stabil mit einer recht stabilen Verteilung der Gruppen. Auch hier wird wieder, wie in allen untersuchten Anlagen, ein relativ stabiler Anteil an Lactobacillen und Vertretern der *Bacillus*-Group gefunden. Nur die Probe vom 22.06.2016 zeigt in der Gruppe der Proteobacteria einen sehr geringen der Anteil an Alphaproteobacteria. Auch konnten in dieser Probe nur sehr wenige Lactobacillen gefunden werden. Eine Ursache dafür konnte nicht festgestellt werden.

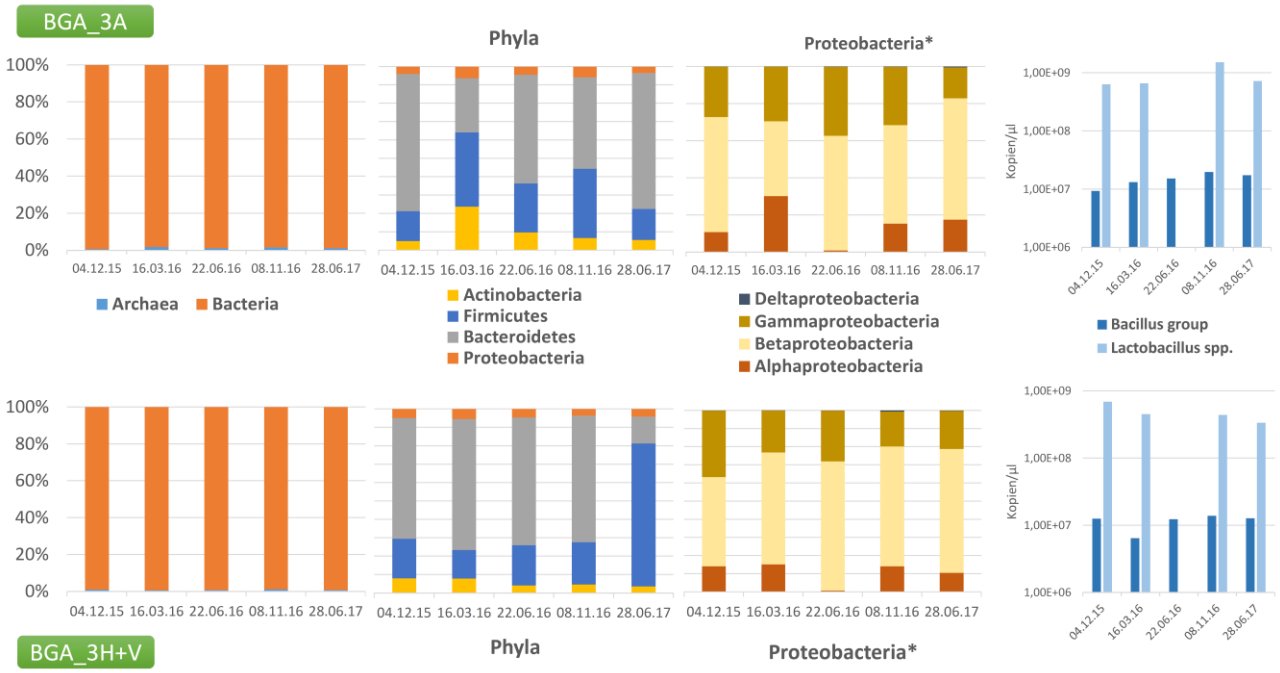


Abbildung 38: BGA 3 - Populationsanalyse mit quantitativer PCR (*ohne *Epsilonproteobacteria*)

2.5.1.3 Biogasanlage 12

Diese Anlage wurde mit einem hohen Anteil Rindergülle von 65 Masse-%, 38 % Maissilage und kleineren Anteilen Grassilage, Festmist und Getreideschrot gefahren. Der Rezirkulat/Substrat-Quotient lag bei 1,4. Dies spiegelt sich auch in dem durch qPCR bestimmten Anteil der Archaea wieder, der bei 10-15% lag. Die Ergebnisse zeigen eine relativ starke Schwankung in der Populationszusammensetzung, sowohl in der MALDI-TOF-MS-Analyse, als auch in der quantitativen PCR-Analyse. Auffällig ist ein durchgängig hoher Anteil der Gattung *Bacillus*. Es wurden auch stark schwankende Anteile an *Escherichia, Enterococcus, Ochobactrum*, Pseudomonaden, Klebsiellen, *Paenibacillus* und *Lysinibacillus* gefunden.

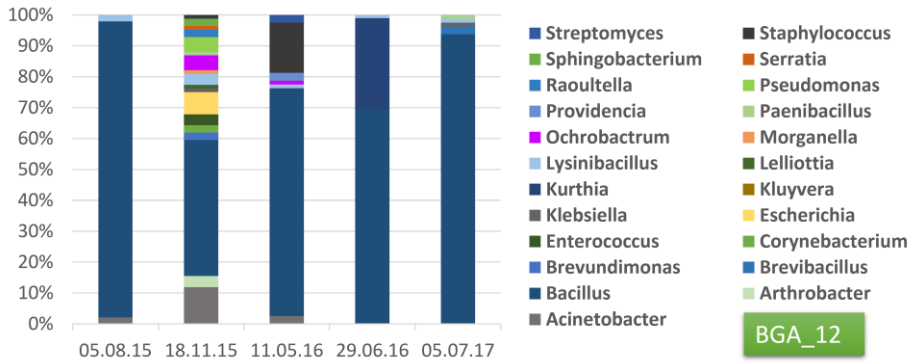


Abbildung 39: BGA 12 - Ergebnisse der Populationsanalyse mit MALDI-TOF-MS (n=100 bestimmte Keime/Probenahme)

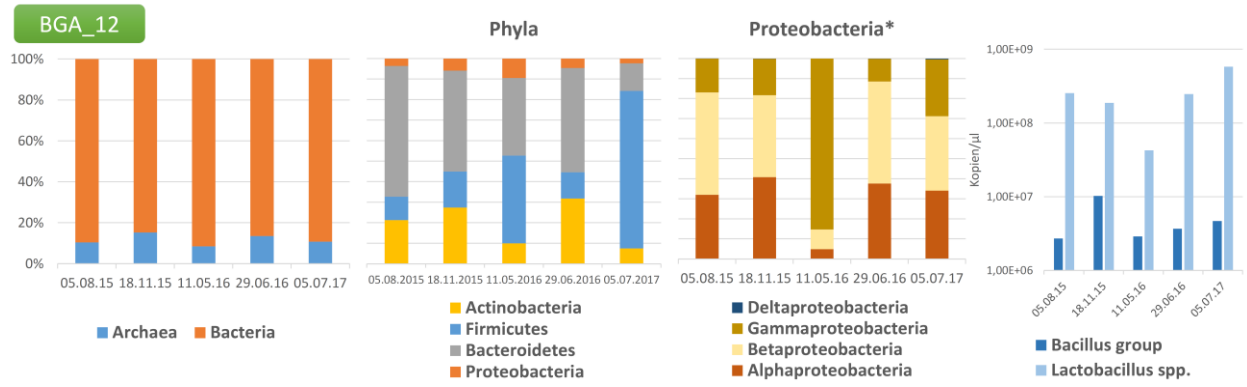


Abbildung 40: BGA 12 - Populationsanalyse mit quantitativer PCR (*ohne *Epsilonproteobacteria*)

Die Probe vom 11.05.2016 ist besonders auffällig. Es wurden mit MALDI-TOF-MS Analyse viele Mikroorganismen aus der Gattung *Staphylococcus* (Klasse Bacilli; Phylum Firmicutes) gefunden, was sich auch im Anstieg der Firmicutes im qPCR zeigt. Die qPCR-Analyse zeigt auch einen hohen Anteil an Gammaproteobacteria. Staphylococcen können unterschiedliche Resistenzen besitzen und werden häufig in Massentierhaltungsställen nachgewiesen. Ein Eintrag einer geringen Menge an Staphylococcen durch das Substrat Mist und Gülle wurde schon untersucht (Moletta-Denat et al., 2010, Schaus et al., 2015 und 2016). Der recht hohe Anteil in der oben beschriebenen Probe kann eventuell durch eine Erkrankung und eine kurzfristig intensive Behandlung der Tiere und einen Eintrag durch die Rindergülle und den Festmist bedingt sein.

Lactobacillen und die *Bacillus*-Group unterliegen in dieser Anlage keinen auffallenden Schwankungen und sind in einer ähnlichen Konzentration wie in den anderen untersuchten Anlagen zu finden.

Nach Informationen des Betreibers wurde die unter wechselhaften Bedingungen betrieben. Dies erklärt wohl auch die starken Schwankungen in der mikrobiellen Population. Dieses Beispiel zeigt, dass die MALDI-TOF-MS-Analyse in der Lage ist, Prozessschwankungen sehr gut zu erkennen.

2.5.1.4 Biogasanlage 16

Diese Anlage wird mit 62 Masse-% Rindergülle, 23% Maissilage, 8% Grassilage und geringen Anteilen an Futterresten, Hühnertrockenkot und Rindermist betrieben. Die Rezirkulation erfolgt mit einem Rezirkulat/Substrat-Quotienten von 2,5 aus dem Nachgärer. Die MALDI-TOF-MS-Analyse zeigt, abgesehen vom relativ konstanten Anteil an *Bacillus sp.*, eine recht ausgeprägte Heterogenität der mikrobiellen Population mit Vertretern der Gattung P*roteus, Enterobacter, Pseudomonas, Acinetobacter, Citrobacter, Klebsiella* und *Kurthia*.

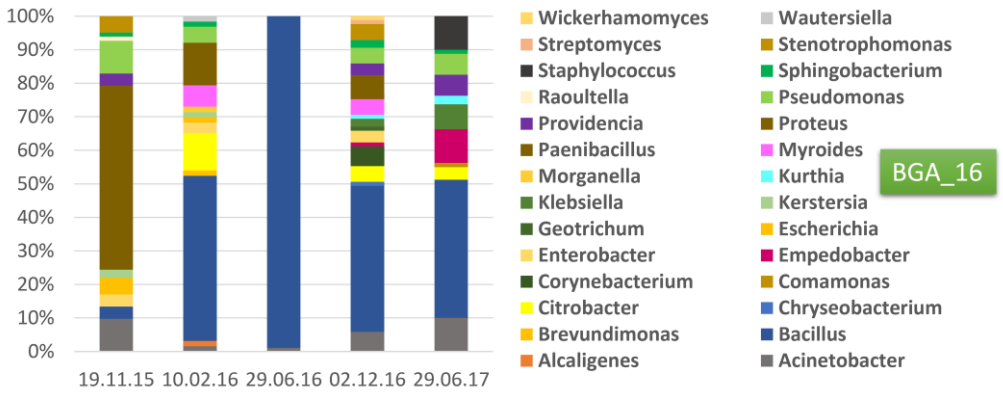


Abbildung 41: BGA 16 - Ergebnisse der Populationsanalyse mit MALDI-TOF-MS (n=100 bestimmte Keime/Probenahme)

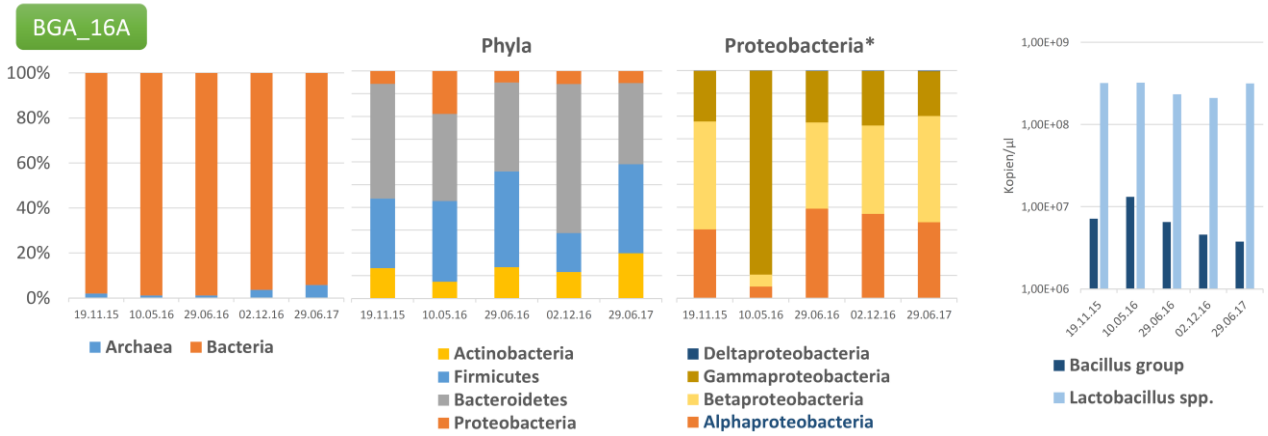


Abbildung 42: BGA 16 - Populationsanalyse mit quantitativer PCR (*ohne *Epsilonproteobacteria*)

Anhand der qPCR Analyse sieht man nur einen geringen Anteil Archaea, der im letzten Jahr der Untersuchungszeit kontinuierlich zunimmt. Bei dem relativ hohen Rezirkulat/Substrat-Quotienten von 2,5 sollte der Anteil der Archaea, die hier eingebracht werden, höher sein. Der substratspezifische relative Methanertrag von 81 % (im Vergleich zu den Richtwerten nach KTBL 2015) bestätigt suboptimale Betriebsbedingungen. Laut Aussage des Betreibers war in der Untersuchungsphase von 2015 bis Mitte 2016 eine schlechte Substratqualität dafür verantwortlich. Die Verbesserung des zugeführten Substrates wird auch durch die qPCR-Messwerte unterlegt, die zeigen, dass der Anteil der Archaea in den beiden zuletzt entnommenen Proben steigt.

2.5.1.5 Biogasanlage 17

BGA 17 ist eine Anlage, die einen hohen Substrat-Anteil an Rindergülle (42 Masse-%) und Maissilage (41 %) aufweist. Diese Anlage besitzt einen Anmaischer und eine Hydrolysestufe und wurde mit Rezirkulat/Substrat-Quotienten von 0,75 betrieben. Wie in der BGA 2 wurden die Gattungen *Stenotrophomonas, Acinetobacter* und *Pseudomonas* in beiden Stufen gefunden. Dies ist aufgrund des hohen Gehaltes an Maissilage (41 %) in Kombination mit Grassilage (17 %) zu erwarten, da es sich um Cellulose-, Hemicellulose- und Carboxymethylcellulose-Abbauer handelt. Chemoorganotrophe Gattungen wie *Serratia* und *Klebsiella* sind ebenso vertreten wie die heterotrophe Gattung *Kurthia*. Anmaischer und Hydrolysestufe zeigen in der MALDI-TOF-MS-Analyse zwar eine ähnliche, aber keine identische Verteilung der Organismen. Die Population in der Hydrolysestufe und im Anmaischer zeigen sowohl in der MALDI-TOF-MS- als auch in qPCR-Analyse eine gute Übereinstimmung.

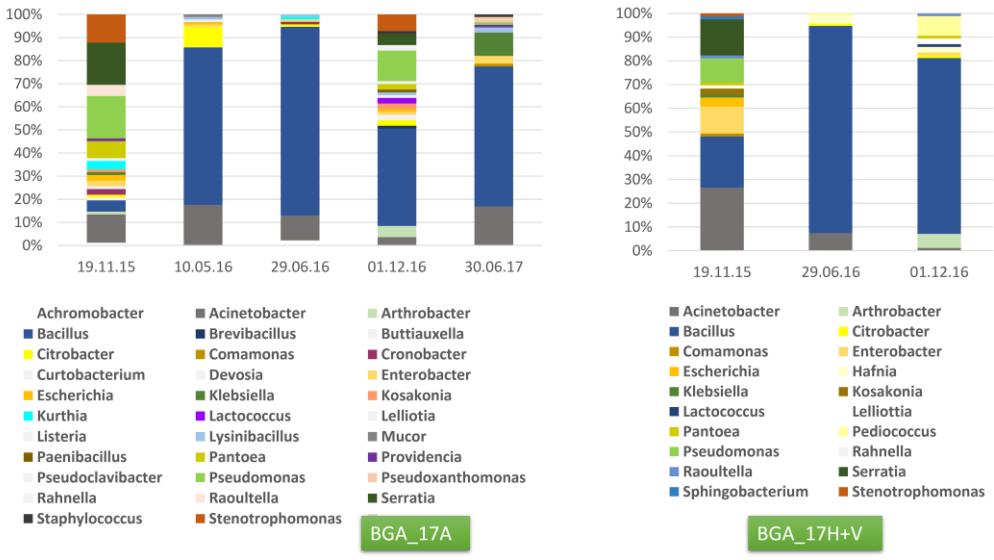


Abbildung 43: BGA 17 - Ergebnisse der Populationsanalyse mit MALDI-TOF-MS (n=100 bestimmte Keime/Probenahme)

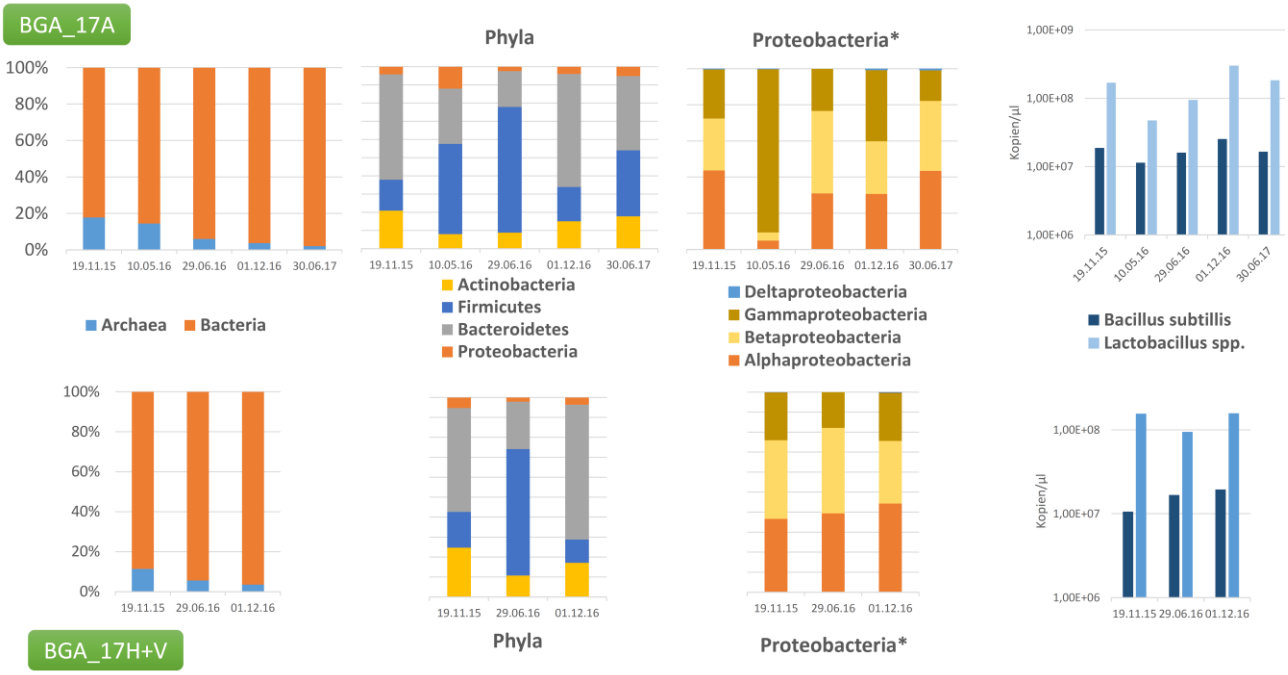


Abbildung 44: BGA 3 - Populationsanalyse mit quantitativer PCR (*ohne *Epsilonproteobacteria*)

Auffällig bei dieser Anlage ist die starke Schwankung der Populationszusammensetzung. Die qPCR-Analyse zeigt bei dieser Anlage einen stetigen Abfall der Archaea während der Untersuchungszeit. Bei der Probe vom 29.06.16 fällt sowohl bei der qPCR als auch in der MALDI-TOF-MS Analyse auf, dass ein hoher Anteil Firmicutes (bzw. Bacilli) vorhanden ist. Eine Ursache dafür konnte nicht eruiert werden. Diese Anlage wurde mehrfach im Lauf der Untersuchungszeit verändert. Auch lag der relative substratspezifische Methanertrag bei 93 % des KTBL-Richtwertes (2015), was auch auf eine ungleichmäßige Betriebsweise zurückgeführt werden kann.

2.5.1.6 Biogasanlage 18

BGA 18 ist eine Anlage, die mit einem hohen Substrat-Anteil an Schweinegülle (66 Masse-%), 12 % Maissilage, 13 % Grassilage und kleinen Anteilen Hirsesilage, Rinderfestmist und Reststoffen betrieben wird. Diese Anlage wurde mit einem Rezirkulat/Substrat-Quotienten von 2,5 betrieben.

In dieser Anlage ist mit der MALDI-TOF-MS-Analyse eine starke Schwankung der Populationszusammensetzung zu beobachten. Anhand der MALDI-TOF-MS-Analysen ist eine durchgängige Population von Citrobacter, Escherichia und Acinetobacter zu finden. Der hohe Anteil an Proteus in Probe 1 und 2 ist aus der Schweinegülle eingetragen. Vermutlich bedingt durch Eintrag von Substrat während der Probenahme kam es hier zu einer nicht homogenen Vermischung der Probe.

Bei dieser Anlage ist während der Untersuchungsperiode eine Reduzierung des Anteils der Archaea zu beobachten. Die qPCR- Analysen zeigen ebenfalls, dass die Zusammensetzung der Population in dieser Anlage relativ stark schwankt. Vermutlich gibt es hier einen Zusammenhang zur Substratzusammensetzung, die nach Aussage des Betreibers variierte und auch eine heterogene Qualität hatte. Auch die Dosierung der Substrate erfolgte sehr ungleichmäßig. Trotzdem hat diese Anlage noch einen relativen substratspezifischen Methanertrag von 96 % des KTBL-Richtwertes (2015).

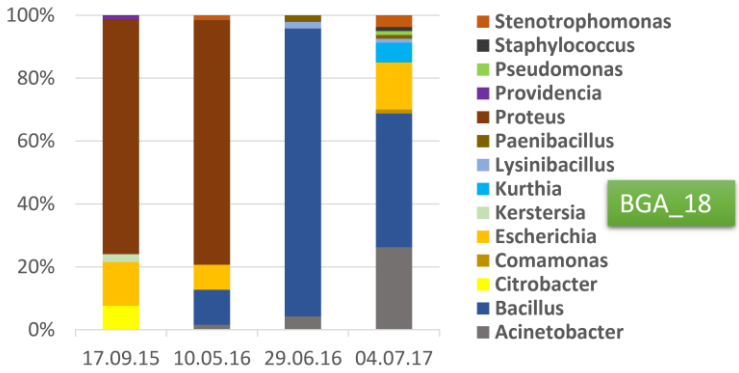


Abbildung 45: BGA 18 - Ergebnisse der Populationsanalyse mit MALDI-TOF-MS (n=100 bestimmte Keime/Probenahme)

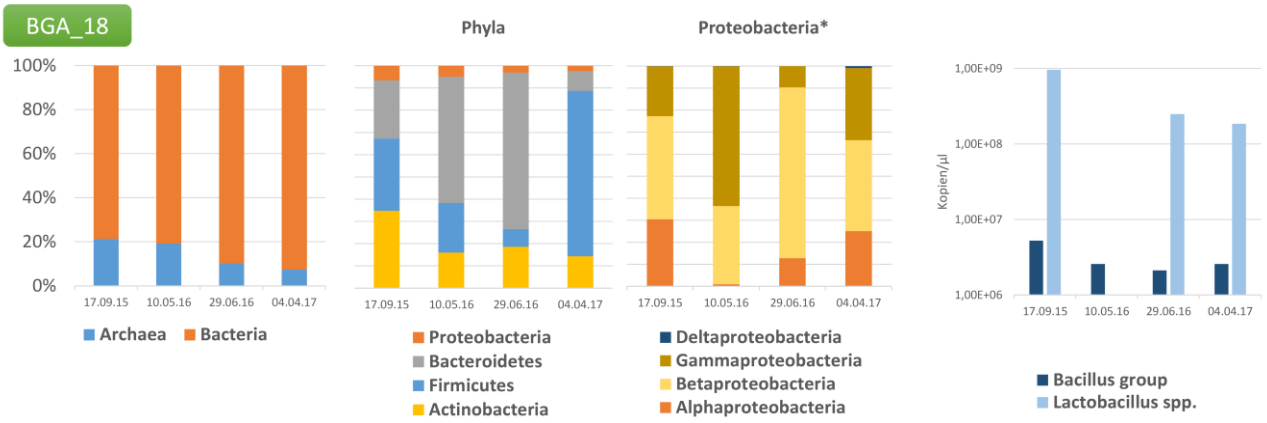


Abbildung 46: BGA 18 - Populationsanalyse mit quantitativer PCR (*ohne *Epsilonproteobacteria*)

2.5.2 Einfluss der Rezirkulation

In allen Datensätzen ist der Eintrag von mikrobieller Population in die Anmaischer sowie Versäuerungs- und Hydrolyse-stufen zu beobachten. Besonders deutlich wird dies am Anteil der mit qPCR nachgewiesenen Archaea an der Population (s. Abbildung 47).

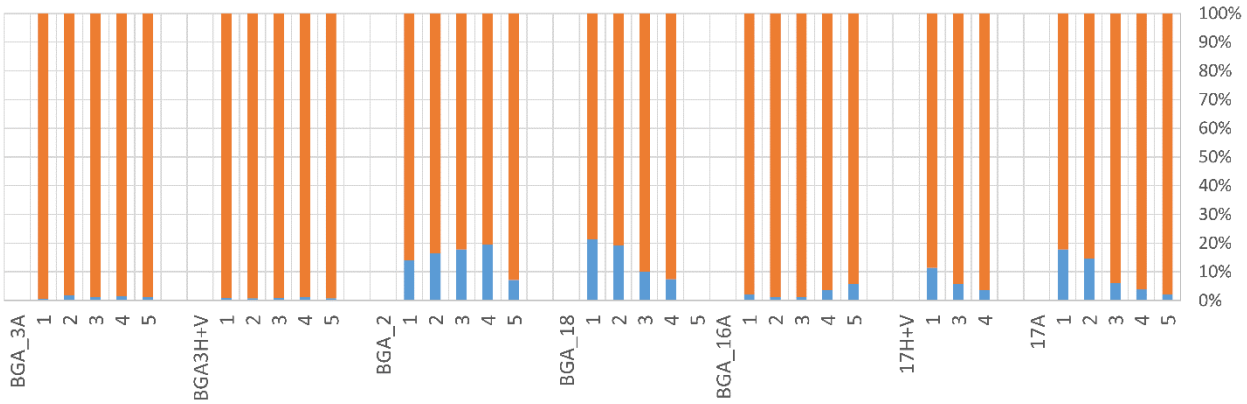


Abbildung 47: Anteil an *Archaea* in den vorgeschalteten Anlagekomponenten bestimmt mit qPCR. Der Bezug zur Rezirkulation wird im Text erklärt.

Sehr schön zu sehen ist, dass in Anlage 3 A und 3 H+V kaum Archaea zu finden sind, da sie durch die dort vorhandene fest-flüssig-Separation des Rezirkulats zum Teil mit den Feststoffen abgetrennt werden. Ebenso interessant sind BGA 18 und BGA 17 A und H+V. Hier ist ein kontinuierlicher Abfall der Archaea über die Beprobungszeit zu beobachten. In beiden Fällen wurden die Anlagen diskontinuierlich betrieben und auch Änderungen am Aufbau vorgenommen (s.a. oben).

Zusammenfassend kann hier gesagt werden, dass die untersuchten Populationen eine Mischung aus Bakterien der Nachgärer oder der Gärrestlager, aus den mit dem Substrat eingetragenen Mikroorganismen und den in der Vorstufe wachsenden Bakterien ist. Dies erklärt auch die teilweise hohen Methanbildungsraten in diesen Anlagenvorstufen (s. Daten der Partner).

2.5.3 Statistische Auswertungen

Die Proben wurden nach Substraten gruppiert und Überschneidungen auf Artebene hin untersucht mit dem Programm *BioVenn* (Ergebnisse s. unten). Des Weiteren wurde eine Unähnlichkeitsmatix nach Bray-Curtis auf Gattungsebene angefertigt. Diese Matrix wurde für eine nichtmetrische multidimensionale Skalierung (nMDS) genutzt. Diese Auswertung erfolgte mit den Computerprogrammen *R* und *PAST3*. Dieses Vorgehen wird für Proben aus Ökosystemen empfohlen, da die Daten aus Ökosystem oft keine symmetrische Verteilung zeigen. Als zweites wurde zusätzlich die als nicht so optimal, aber doch in diesem Bereich ebenfalls oft angewendete metrische multidimensionale oder auch Hauptkoordinatenanalyse (PCoA) durchgeführt. Beide Verfahren führten zum selben Gruppierungsergebnis. Es sind zwar Gruppierungen zu erkennen, diese zeigten aber keine eindeutige Korrelation weder zur Temperatur, Jahreszeit noch zur Substratmischung (s.a. unten). Das Ergebnis der statistischen Analyse ist in Abbildung 48 dargestellt. Man hätte z.B. eine Gruppierung der BGA 12 mit BGA 16 und BGA 17 aufgrund des relativ ähnlichen Substratgemisches aus den Hauptkomponenten Rindergülle und Maissilage erwarten können. BGA 16 und beide Stufen der BGA 17 liegen auch nah beieinander, BGA 12 korreliert dagegen nicht.

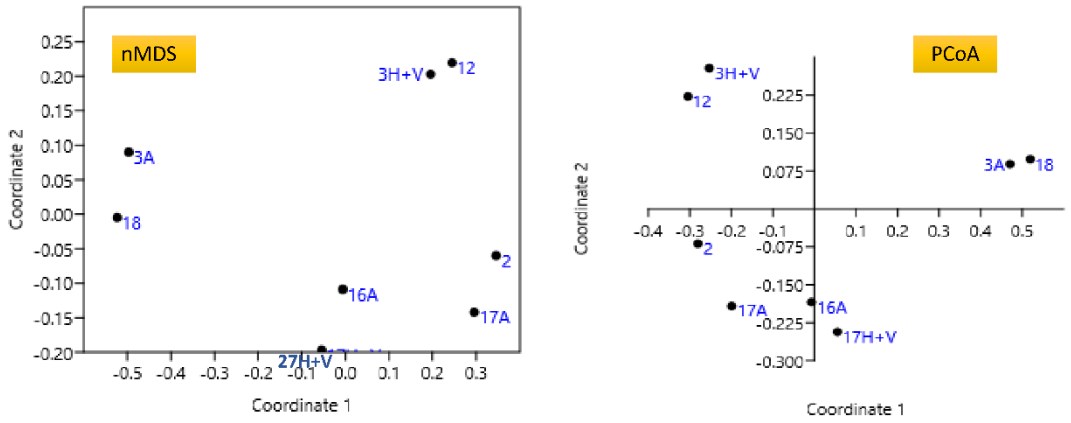


Abbildung 48: nichtmetrische multidimensionale Skalierung (nMDS) und metrische Hauptkoordinaten-Analyse (PCoA) mit 2 Dimensionen der Populationsdaten auf Gattungsebene zur Bestimmung einer Gruppierung nach Substratzusammensetzung

Auffällig ist auch die Anlage BGA 3. Im Vergleich sind die Daten der beiden Stufen BGA 3 A und 3 H+V so unterschiedlich, dass die statistische Auswertung keine enge Gruppierung ergibt. Dies zeigt sich auch anhand der vom Partner erhobenen Daten. Eine Erklärung hierfür kann derzeit nicht gegeben werden.

2.5.4 Substratabhängige Populationsüberschneidungen

Diese Arbeit zeigt, dass jede der sechs untersuchten Anlagen eine eigene Populationsstruktur hat. Bisher wurde berichtet, dass Firmicutes, Bacteroidetes und Proteobacteria als Phyla den Hauptteil der Bakterien in Biogasfermentern stellen, aber der Reichtum der Arten im einzelnen Phylum sehr unterschiedlich sein kann (De Vrieze et al., 2015 u. 2016). Dies zeigen auch die hier vorliegenden Ergebnisse. Die einzelnen Anlagen haben ein eigenes mikrobielles Spektrum, das sich hauptsächlich aus den oben genannten Gruppen zusammensetzt. Auch innerhalb einer Anlage sind Fluktuationen in der Population nachgewiesen worden, was angesichts der Schwankungen in der Substratzusammensetzung nicht verwunderlich ist.

Im Zeitraum der letzten fünf Jahre wurde intensiv untersucht, ob es möglich ist, über eine große Anzahl an Proben ein sogenanntes „core biogas microbiome“ oder Biomarker zur Populationscharakterisierung und zur Charakterisierung von Prozessstörungen zu finden und zu definieren (Shade and Handelsman, 2012, Lebuhn et al., 2014). Dazu wurde 2016 auch das vom BMBF geförderte Projekt *Biogas-Marker* (Förderkennzeichen 03SF0440) beendet. Wenn dieses „core biogas microbiome“ existieren sollte, scheint es in Biogasanlagen sehr klein zu sein. Denn in verschiedenen Studien kommen die Autoren zu dem Schluss, dass jede Biogasanlage ihre eigene Population hat (Werner et al., 2011, Heyer et al., 2016, Cirne et al., 2007). In einer aktuellen Studie von Heyer et al. (2016) konnte mit metaproteomischen Analysen (Proteotyping) gezeigt werden, dass die Übereinstimmung in den dort untersuchten 35 Biogasanlagen in einer 0,3 %-1 %-igen Übereinstimmung von Spektren für die Ordnungen Clostridiales, Enterobacteriales und Rhizobiales bestand. Dies stimmte überein mit weiteren dort erhobenen Daten, z. B. 16S-rDNA Sequenzierungsdaten und Real-Time PCR Analysen. Vorgeschlagen wird hier, in Zukunft die Anlagen nach Betriebsweise und/oder Substraten in Gruppen zusammenzufassen und innerhalb dieser Datensätze nach dem „core microbiome“ zu forschen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die erhaltenen MALDI-TOF-MS-Datensätze auf Artebene im Hinblick auf die verwendeten Substratmischungen verglichen. Dabei wurden einmal Anlagen mit einem ähnlichen Substratanteil an Maissilage (Abbildung 50), Rindergülle (Abbildung 49) und geringen Substratüberschneidungen (Abbildung 51) mit der software *BioVenn* verglichen.

Besonders interessant ist das Ergebnis für BGA 12 und BGA 16, das zeigt, dass bei sehr ähnlicher Substratmischung nur eine Überschneidung von 15 % in der mikrobiellen Population vorliegt. Vergleicht man BGA 12, 16 und 17, so liegt die Überschneidung zwischen den drei Anlagen bei nur noch 7 %.

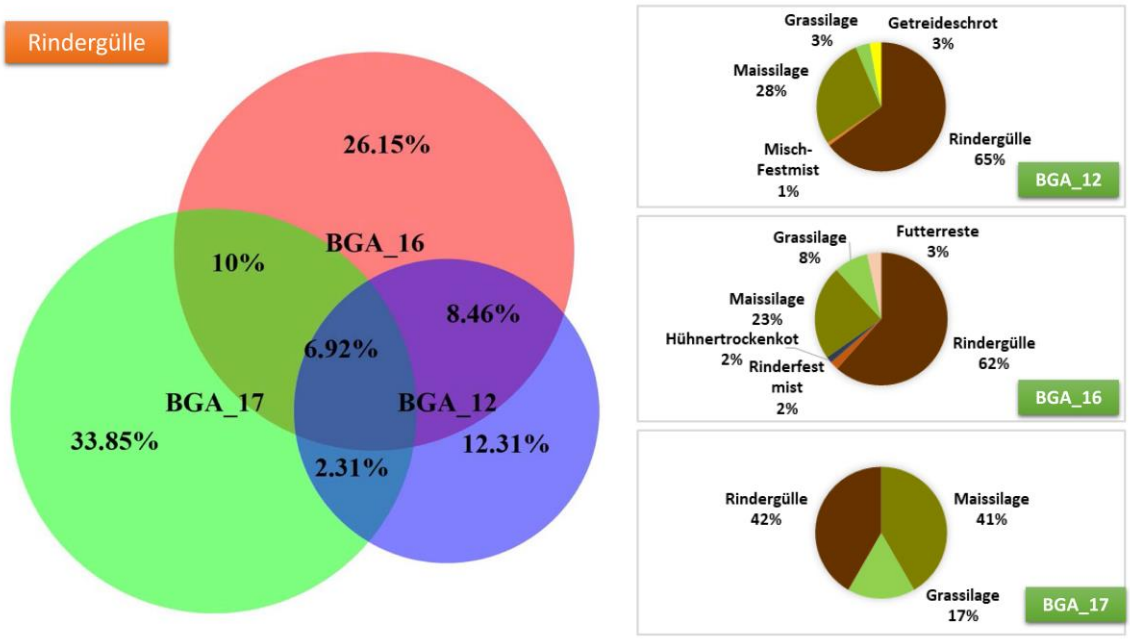


Abbildung 49: Venn-Diagramm der Anlagen BGA_12, BGA_16 und BGA_17 mit dem Hauptsubstrat Rindergülle mit erstellt mit der Software *BioVenn*

Ähnliches wird für Maissilage gefunden. Betrachtet man BGA_2 und BGA_3 dann ist 18% der Population identisch. Bei Vergleich dieser zwei mit BGA_17 hat man eine Überschneidung von 9%.

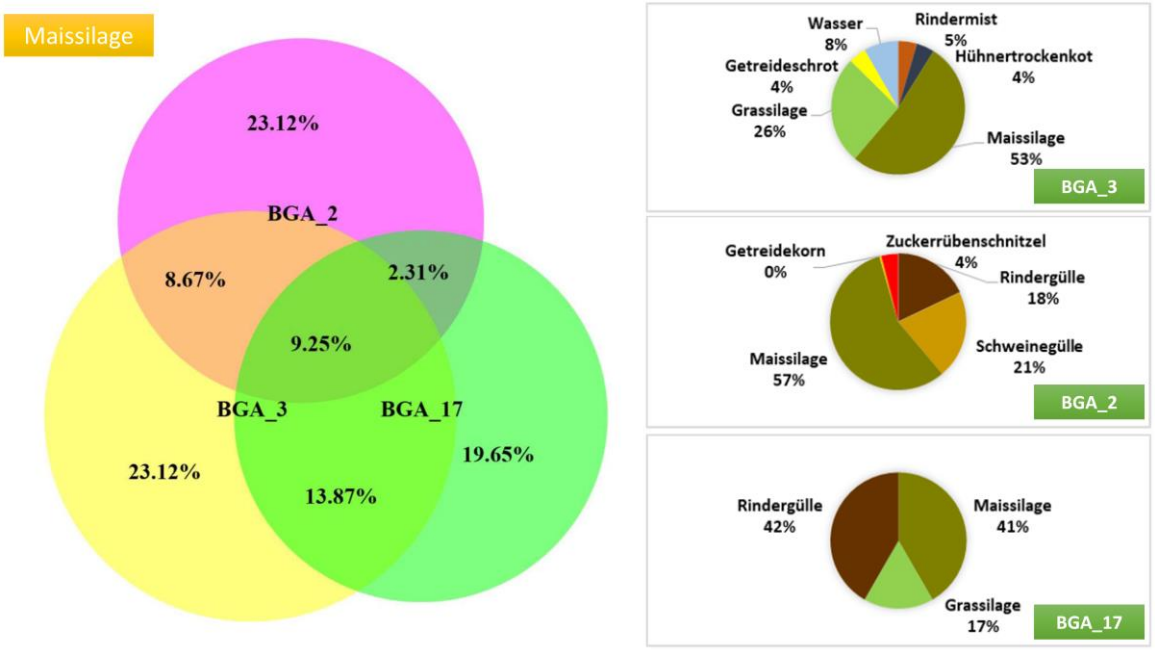


Abbildung 50: Venn-Diagramm der Anlagen BGA_ 2, BGA_3 und BGA_17 mit dem Hauptsubstrat Maissilage mit erstellt mit der Software *BioVenn*

Vergleicht man nun Anlagen mit geringer Substratüberschneidung, so erhält man eine Populationsübereinstimmung auf Artebene von 2,5 %.

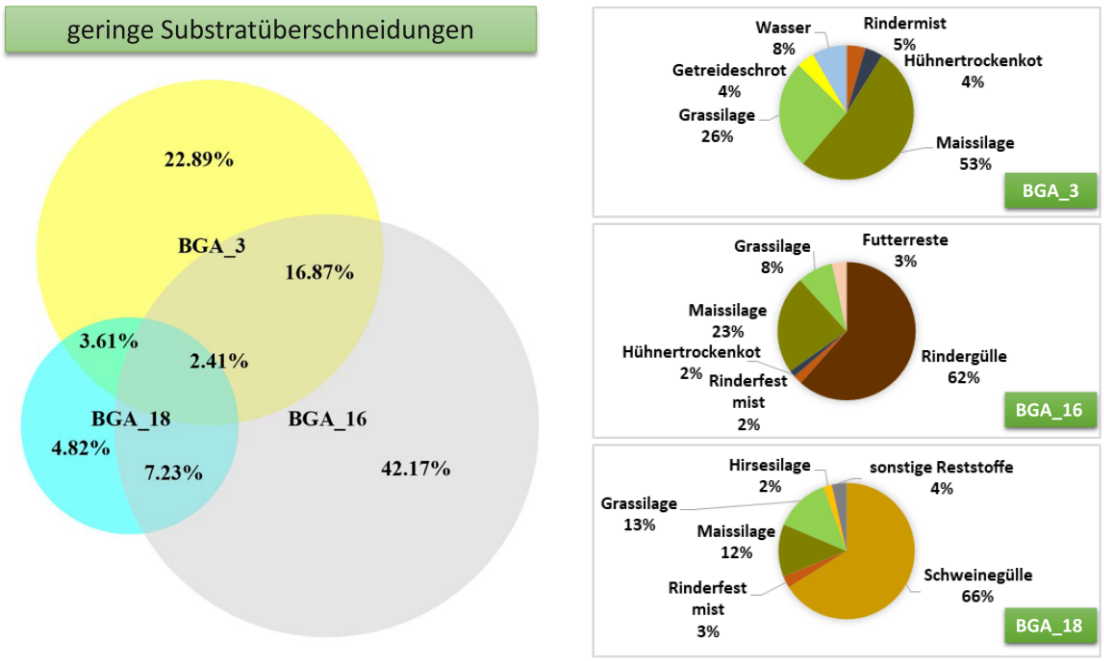


Abbildung 51: Venn-Diagramm der Anlagen BGA_ 3, BGA_16 und BGA_18 mit geringer Substratüberschneidung mit erstellt mit derSsoftware BioVenn

Auch die weitere statistische Analyse der Daten (s.o.) führte zu demselben Ergebnis. Diese Ergebnisse unterstützen somit die in der Literatur gemachten Beobachtungen zu Populationsüberschneidungen. Für eine statistische Absicherung dieser Zusammenhänge zwischen Substrat und mikrobieller Population wäre es nun sehr interessant, wie von Heyer et al. (2016) vorgeschlagen, weitere Datensätze zu gewinnen und zu vergleichen, möglichst aus Anlagen ohne Rezirkulation.

2.5.5 Zwischenfazit

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die MALDI-TOF-MS Analytik einen schnellen Einblick in die vorhandene fakultativ aerobe und mikroaerophile mikrobielle Population in Hydrolyse und Versäuerungsstufen von Biogasanlagen geben kann. Mit dieser Analytik wurden die bisher beschriebenen Phyla der aerob oder mikroaerophil wachsenden Organismen der Domäne *Bacteria* mit den vielfach beschriebenen im Biogas-Bildungsprozess wichtigen Organismen abgedeckt. Über die MALDI-TOF-MS Analyse war eine Bestimmung bis auf Artebene möglich, außerdem die Bestimmung des prozentualen (relativen) Anteils an der Population. Weitere durchgeführten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen mit 16SrDNA Klonbibliotheken und Metagenomanalysen (Ortseifen et al., 2016, Stolze et al., 2016, Bohn et al., 2017, Cibis et al., 2016) zeigen, dass die dort gefundenen Mikroorganismen auch in dieser Arbeit mittels MALDI-TOF-MS-Analyse nachgewiesen werden konnten.

Als ergänzende Maßnahme wurde die Bestimmung von größeren Gruppen der Populationen durch quantitative PCR Analyse herangezogen. Diese Zusatzanalytik kann eventuell interessant werden, wenn besonders große Anteile von bestimmten Gruppen oder starke Schwankungen in einer Gruppe in der MALDI-TOF-MS Analytik auffallen. Auch die qPCR Analyse zeigte, dass je nach Rezirkulationsrate ein größerer oder kleinerer Anteil der Hauptfermenterpopulation in die Versäuerungs -oder Hydrolysestufe eingetragen wurde.

Die hier durchgeführten Analysen haben auch sehr deutliche Unterschiede in der Abundanz der einzelnen Gruppen der Populationen über den dreijährigen Messzeitraum gezeigt. Dies korrelierte gut mit der Gleichmäßigkeit, mit der eine Anlage betrieben wird. BGA 2 ist in diesem Zusammenhang als die Anlage zu nennen, die eine stabile Fahrweise und daher eine recht ähnliche Verteilung der Population über den gesamten Messzeitraum zeigte.

Es konnte in dieser Arbeit mittels MALDI-TOF-MS-Analyse auch nachgewiesen werden, wie in der Literatur beschrieben, dass es ein generelles Mikrobiom in Biogas-Anlagen nicht gibt. Abhängig von der Substratzusammensetzung (und der Fahrweise) werden Unterschiede in den Populationen gefunden. Beim Abgleich der MALDI-TOF-MS Datensätze aus den einzelnen Anlagen in Korrelation zum Substrat zeigte sich, dass sich eine Überschneidung mit bis zu 20 % auf Artebene finden zwischen Anlagen, die eine sehr ähnliche Substratzusammensetzung besitzen. Bei voneinander deutlich abweichenden Substratzusammensetzungen kommt es nur zu einer Überschneidung von 2,5 %. Eine statistisch abgesicherte Korrelation von Populationszusammensetzung und Substrat müsste an Anlagen ohne Rezirkulation und mit einer höheren Probendichte untersucht werden. Es deutet sich aber an, dass die Überschneidungen zwischen einzelnen Anlagen im Hinblick auf die mikrobielle Population, wie auch schon beschrieben (s.o.) eher klein sein werden.

Die MALDI-TOF-MS-Analyse ist sehr gut geeignet, um einen schnellen Einblick in eine bakterielle Population zu bekommen. Die außerhalb dieses Projektes durchgeführte qPCR-Analyse deckt sich im Wesentlichen mit den mit MALDI-TOF-MS gefundenen Gruppen. Sie geht aber naturgemäß darüber hinaus, da hier auch aufwendig oder gar nicht zu kultivierende Bakterien gefunden werden und ein realistisches Verhältnis der einzelnen Gruppen in der Gesamtpopulation erstellt werden kann. Die Auflösung des Populationsspektrums in diesem Projekt mit der MALDI-TOF-MS Methode ist definitiv durch das durch den Nährboden gegebene Fenster beschränkt. Dies bietet aber auch die Möglichkeit, durch Kultivierung der Proben auf eine breite Palette von Nährböden weiter aufgestoßen zu werden und trotz der Einschränkungen eine schnelle Analytik zu einem Anlagenzustand zu bieten.

2.5.6 Nebenergebnisse und Erfahrungen

2.5.6.1 Erreichte Nebenergebnisse 1:

Als interessantes Nebenergebnis kann die nicht im Projekt vorgesehene, aber zunächst als Kontrolle und dann als schönes *ad-on* weiter ausgebaute quantitative PCR-Analyse betrachtet werden. Anhand dieser Analyse konnte ein weitgehender Überblick über die mikrobiellen Populationen gewonnen werden und ein Abgleich mit den MALDI-TOF-MS-Proben durchgeführt werden. Detaillierte Beschreibung dazu s.o. im Text.

2.5.6.2 Erreichte Nebenergebnisse 2:

Dieses Projekt bot neunzehn Studierenden die Möglichkeit Projekt- oder Bachelorarbeiten durchzuführen:

- AMTAGE, M. 2015. Optimierung der DNA-Isolierung aus Biogasproben mit unterschiedlichen DNA-Kits. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- BLÜMEL, F. 2015. Analyse der anaeroben Population in Biogasproben mit MALDI-TOF-MS. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- BRANDT, F. 2015. Molekularbiologischen Charakterisierung von mikrobiellen Populationen in zweistufigen Biogasanlagen. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- BRANDT, F. 2015. Optimierung der DNA-Isolierung aus Biogasproben mit unterschiedlichen DNA-Kits. Bachelor, Hochschule Anhalt.
- GEORGI, K. 2017. Antibiotikumsresistenzen in mikrobieller Populationen in Versäuerungsstufen mit MALDI-TOF-MS. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- GOTTFRIED, D.-G. 2017. Untersuchung von Populationen in zweistufigen Biogasanlagen. Berufspraktikum. Hochschule Anhalt.
- HEINZE, C. 2016. Untersuchung von mikrobiellen Populationen mit MALDI-TOF-MS. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- JABLONSKI, C. Statistische Auswertungen von Daten zur Zusammensetzung mikrobieller Populationen. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- MATIEBE, A. 2018. Untersuchung der pct-Gen tragenden Population aus Versäuerungsstufen von Biogasanlagen. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- MÜLLER, S. 2015. Optimierung von PCR-Ansätzen mit gruppenspezifischen Primern zur Populationsanalyse. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- PABST, R. 2016. Untersuchung von mikrobiellen Populationen in Versäuerungsstufen mit Real-time PCR Tests. Bacherlor of Science Bachelor, Hochschule Anhalt.
- SEBALD, C. 2015. Identifizierung von Acinetobacter Spezies mittels ARDRA. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- SPRINGER, K. 2015. Optimierung der DNA-Isolierung aus Biogasproben. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- SPRINGER, K. 2015. Populationsanalyse in Biogasproben mittels Klonbibliotheken. Bachelor, Hochschule Anhalt.
- THUMMERER, C. 2017. Populationsanalysen von Mikroorganismen mit Real-Time PCR Analysen. Berufspraktikum. Hochschule Anhalt.
- THUMMERER, C. 2018. Untersuchung mikrobieller Populationen aus Hydrolyse- und Versäuerungsstufen von Biogasanlagen mit real time PCR. Bachelor Bachelor Hochschule Anhalt.
- WEBER, A.-K. 2016. Quantifizierung von mikrobiellen Populationen in Versäuerungsstufen mit real-time PCR-Tests. Bachelor, Hochschule Anhalt.
- WEBER, A.-K. 2018. Untersuchung der Acetogenen Population aus Versäuerungsstufen mit real time PCR. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.
- ZHANG, Z. 2015. Entwicklung einer Methode zur Überprüfung einer Klonbibliothek mittels Restriktionsanalyse. Projektarbeit. Hochschule Anhalt.

2.5.6.3 Erreichte Nebenergebnisse 3:

Während der Laufzeit wurden im Rahmen des Projektes zehn Arbeitsanweisungen erstellt, die nun eine gute Basis für nachfolgende Arbeiten bilden.

Tabelle 20:

Übersicht zu den etablierten Methoden/Arbeitsanweisungen

	Arbeitsanweisung	Beschreibung
AAM03	Agarose-Gelelektrophorese	Auftrennung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten
AAM13	PCR Bakterien	Probenvorbereitung und Durchführung der PCR (Kolonie-PCR, PCR Gesamt DNA)
AAM14	Nährmedien	Herstellung fester und flüssiger Nährmedien
AAM24	Bestimmung der DNA Konzentration mittels Nanodrop	Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben in ng/µl
AAM25	Klonbibliothek Populationsanalyse	Probenvorbereitung Gesamt-DNA, PCR, Ligation und Transformation, Aufreinigung, Restriktionsanalyse, Sequenzierung
AAM26	Kultivierung von anaeroben und mikroaerophilen Mikroorganismen	Probenvorbereitung aerob/anaerob, Kultivierung in Bebrütungsbeuteln oder im Anaerobier-Topf
AAM27	Quantifizierung von Mikroorganismen aus Biogas-proben mit Real-time PCR	Isolierung von Gesamt-DNA, Kalibrierung und Quantifizierung der DNA-Probe
AAM28	Identifizierung von Mikro-organismen mittels Maldi-TOF-MS	Verfahren zur Bestimmung von Mikroorganismen
AAM29	Auswertung Biogasproben	Auswertung von MALDI-TOF-MS und Sequenzierungsergebnissen (Ecxel, Bioedit, Seqtrace, NCBI)
AAM30	Gradienten PCR	Durchführung einer Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur von Primern

2.5.6.4 Wesentliche gesammelte Erfahrungen

Dieses Projekt hat gezeigt, dass die MALDI-TOF-MS-Analyse zur schnellen Analyse von mikrobiellen Populationen auch aus Biogasanlagen geeignet ist, auch wenn man nur einen Ausschnitt der Population, nämlich die kultivierbaren Keime (fakultativ aerob und anaerob) sieht. Die Auswahl der Kultivierungsmethodik, vor allem auch die verwendeten Nährböden, bestimmt letztlich den Anteil der Population, den man mit MALDI-TOF-MS bestimmen kann. Dies ist im Hinblick auf die Fragestellungen und das Ziel der Analytik essentiell, birgt aber das Problem, das man bei einer unbekannten Population leicht einen wichtigen Anteil der Mikroorganismen übersehen könnte. Insofern ist es von Vorteil, wenn man eventuell zunächst begleitend qPCR Analysen durchführt. Allerdings haben auch hier in der letzten Zeit Metagenomik-Analysen gezeigt, dass neue Keime und Keimgruppen entdeckt werden, die mit beiden konventionellen Methoden übersehen worden wären (Stolze et al., 2016; Tomazetto et al., 2017; Maus et al., 2017). Als Fazit aus den hier vorliegenden Untersuchungen ist es bei Populationsanalysen mit MALDI-TOF-MS anzuraten, ein breites Spektrum an Nährböden zu verwenden. Trotz der Einschränkungen dieser Analytik (nur kultivierbare Keime) konnten deutliche Unterschiede in den mikrobiellen Populationen der untersuchten Anlagen nachgewiesen werden. Die MALDI-TOF-MS Daten erlaubten es auch festzustellen, dass eine enge Korrelationen zwischen den mikrobiellen Populationen und dem verwendeten Substratgemisch nicht nachzuweisen war. Somit liegt eine Möglichkeit vor, recht zeitnah einen Einblick in die vorhandenen Populationen zu bekommen und auch Vergleiche zwischen einzelnen Anlagen durchzuführen.

2.6 Ergebnisse und Diskussion IV: Laborversuche zur Kinetik der Hydrolyse und Versäuerung

ttz Bremerhaven

2.6.1 Einfluss der hydraulischen Verweilzeit

Eine Aufgabe der ergänzenden Technikumsversuche war es, den Einfluss der hydraulischen Verweilzeit auf die Hydrolyse- und Versäuerungsprozesse weitergehend zu Untersuchungen und zu überprüfen, ob die im großtechnischen Maßstab gewonnenen Erkenntnisse sich auch im Technikum bestätigen lassen. Als Substrate wurden Mais- und Grassilage eingesetzt. Die Versuche mit Maissilage und Grassilage liefen parallel wie in einer Hydrolyse ohne Belüftung, die Verweilzeit wurde zwischen einem und 10 Tagen variiert.

Die Temperatur sollte, analog zu den Temperaturen in der Hydrolyse und Versäuerung großtechnischen Anlagen zwischen 28 °C und 30 °C betragen. Die Reaktoren wurden jeweils über Thermostaten beheizt, die zu Beginn der Versuche jedoch zu hoch eingestellt waren. Nach Änderung der Zulauftemperatur stellte sich die richtige Temperatur in den Reaktoren ein.

Anzumerken ist weiterhin, dass die gewählte Versuchskonfiguration mit Rührkesselreaktor und von oben eingebrachtem Propellerrührer in Bezug auf die Durchmischung störanfällig war und der hohe Feststoffanteil und die dadurch bewirkte hohe Viskosität eine gute Durchmischung massiv erschwerten.

2.6.1.1 Gasvolumenstrom und kumulierte Gasmenge

Nachfolgende Abbildung 52 zeigt den Gasfluss (Gasvolumenstrom) in mL/min des Maissilage-Reaktors und des Grassilage-Reaktors. An der Sekundärachse wurde der Wert des geräteinternen Totalisators aufgetragen. Nach Start der Messungen fiel auf, dass der Totalisator-Wert GSM 1 (Maissilage) ein Offset von 1 aufwies. Dieser Wert konnte während der Messungen nicht eliminiert werden. Im Anschluss an diesen Versuch wurden beide Geräte zur Überprüfung an den Hersteller geschickt.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt zunächst auf, dass, bis auf die Ausnahmen HRT 10 und HRT 2, der (mittlere) Gasvolumenstrom und das über den Versuchszeitraum totalisierte Gasvolumen für den mit Grassilage betriebenen Reaktor höher ist, als für den mit Maissilage betriebenen Reaktor. Weiterhin ist auffallend, dass der Gasvolumenstrom bei Grassilage als Substrat deutlich konstanter ist, als bei dem Substrat Maissilage. Die täglich gebildete Gasmenge ist bei Maissilage konstant (Ausnahme HRT 2), was durch einen linearen Anstieg des totalisierten Gasvolumens deutlich wird, während bei Grassilage die täglich gebildete Gasmenge Schwankungen unterliegt, wie auch aus der Tabelle 21 hervorgeht.

Tabelle 21: Durchschnittlich pro Tag gebildete Gasmengen

HRT	Versuchsdauer [d]	insges. Gebildete Gasmenge für Grassilage [Ln]	insges. Gebildete Gasmenge für Maissilage [Ln]	durchschnittlicher Gasvolumenstrom Grassilage [l/d]	durchschnittlicher Gasvolumenstrom Maissilage [l/d]
1	8	11	7	1,38	0,88
2	12	11	10	0,92	0,83
4	22	25	12	1,14	0,55
6	32	60	40	1,88	1,25
8	27	45	30	1,67	1,11
10	42	10	70	0,24	1,67

Insgesamt lässt sich zudem festhalten, dass der gebildete Gasvolumenstrom mit steigender hydraulischer Verweilzeit zunimmt, d.h. je länger die Verweilzeit, desto stärker geht der Prozess in die Methanogenese über, insbesondere bei Grassilage als Substrat.

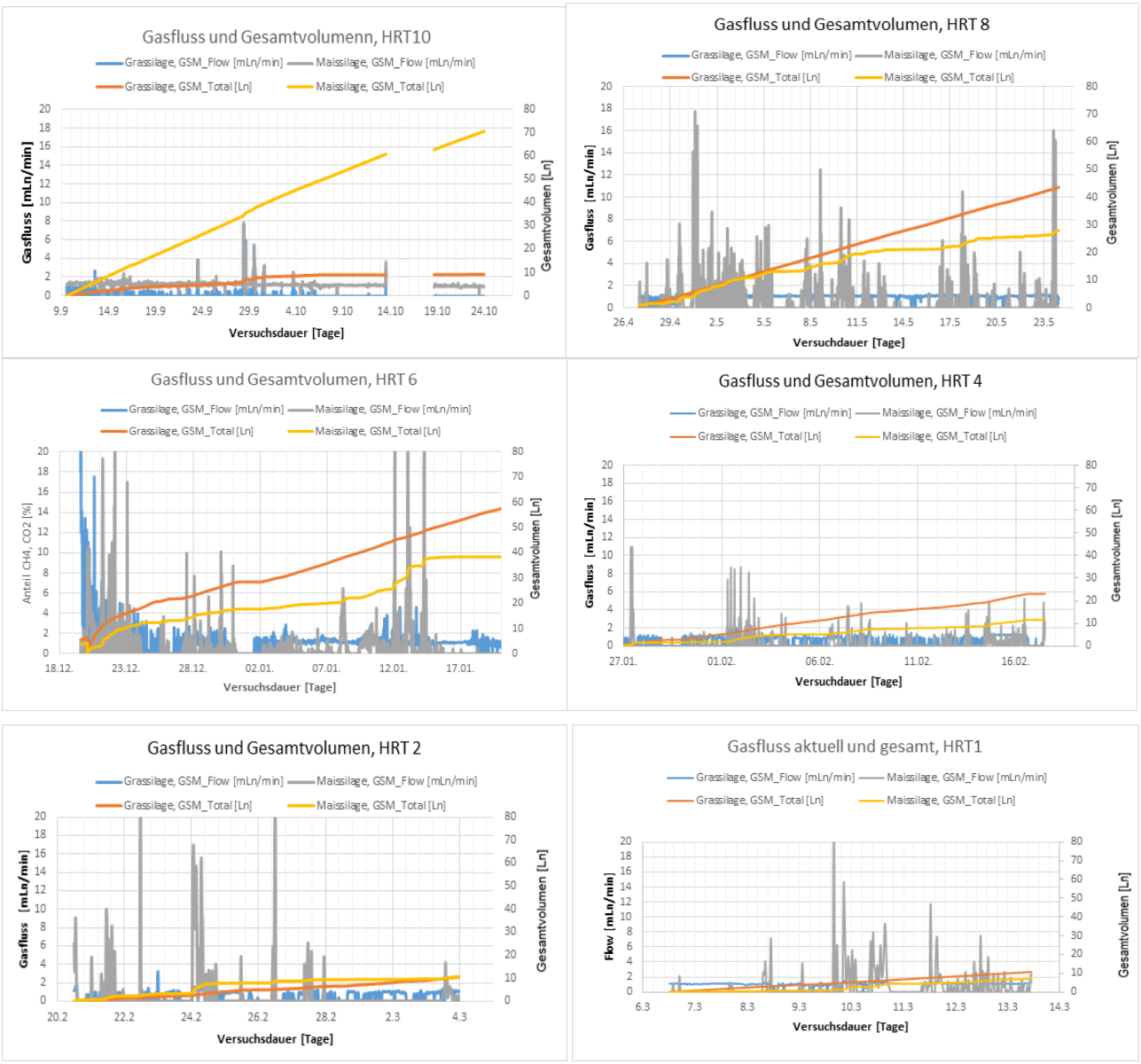


Abbildung 52: Gasfluss in mL/min und aufsummiertes Gasvolumen für die untersuchten Verweilzeiten, Rezirkulatverhältnis 74 % (Rezirkulat/Substrat-Quotient 2,85)

2.6.1.2 pH-Wert

In den Versuchen wurde bei allen Verweilzeiten eine abnehmende Tendenz für den pH Wert festgestellt. Sie war besonders ausgeprägt bei dem Substrat Maissilage. Dies deutet auf eine starke Säurebildung bei diesem Substrat hin. Auch bei Grassilage konnte bei HRT 10, 8 und 1 eine Abnahme des pH Wertes während des Versuchszeitraumes beobachtet werden, bei HRT 6, 4 und 2 blieb der pH Wert hingegen in etwa konstant, wie aus der Abbildung 53 zu erkennen ist. Die niedrigsten pH-Werte wurden i.d.R. bei kurzen Verweilzeiten festgestellt. Mit Ausnahme der Versuche bei HRT 6 (zu Beginn) und HRT 10 stellte sich im mit Maissilage betriebenen Reaktor ein deutlich niedrigerer pH Wert ein als in dem mit Grassilage betriebenen Reaktor. Dies deutet auf eine signifikante Säurebildung in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe insbesondere bei Einsatz von Maissilage hin.

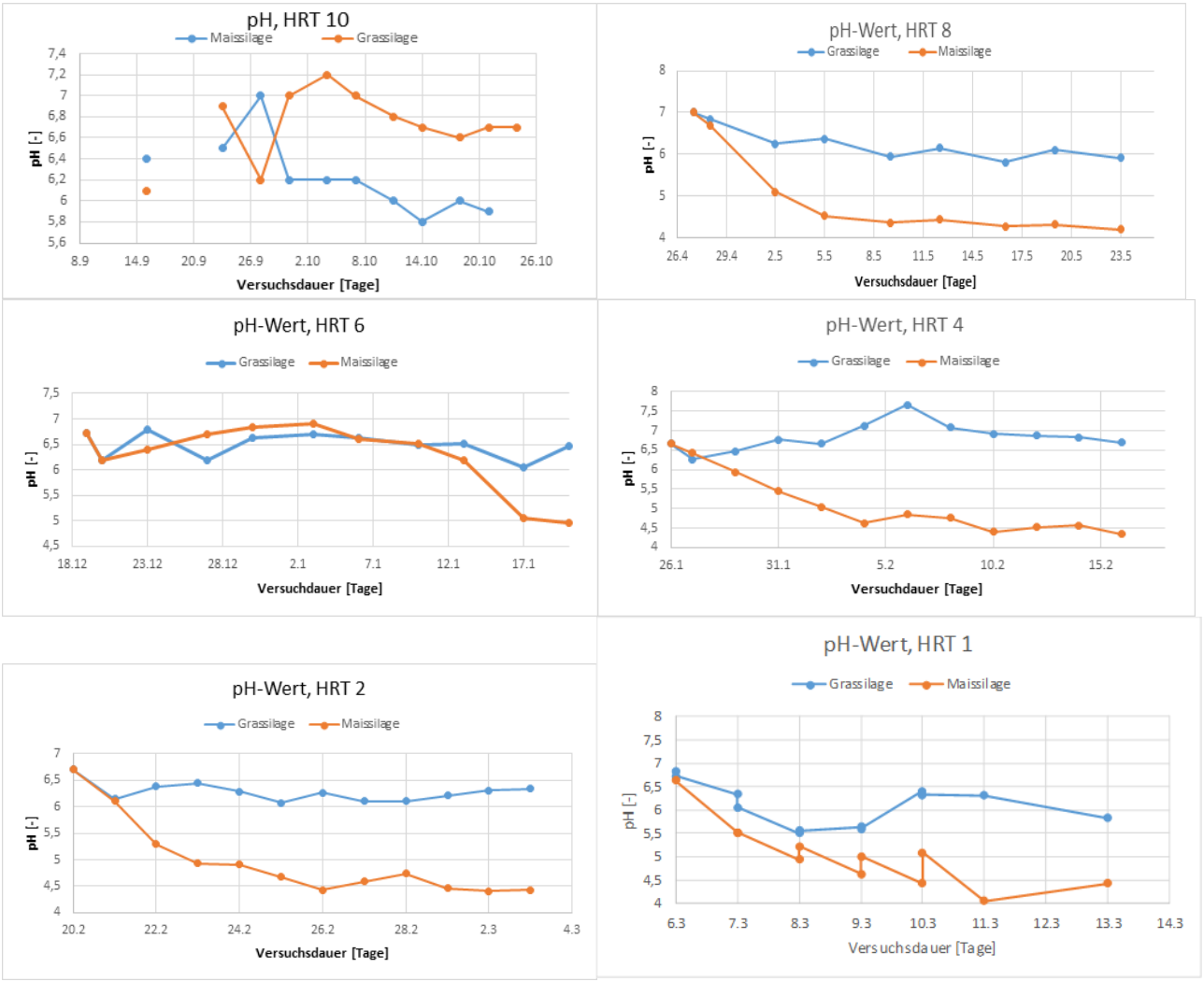


Abbildung 53: pH-Wert in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Verweilzeiten, Rezirkulationsverhältnis 74 % (R/S-Quotient 2,85)

Die anfänglichen Schwierigkeiten der Temperatureinstellung können einen Einfluss auf die pH-Werte in den Reaktoren gehabt haben. Auch eine Verdünnung des Rezirkulats in Versuch HRT 10 am 19.09.2016 kann einen Einfluss auf den pH-Wert ausüben. Bei dem Wert am 27.09.16 in dieser Versuchsreihe könnte es sich um einen Ausreißer handeln.

2.6.1.3 FOS/TAC-Wert

Eine abnehmende Tendenz bei dem pH-Wert, d.h. eine vermehrte Säurebildung, müsste sich auch bei dem FOS/TAC Wert niederschlagen. Dieser Parameter müsste eine ansteigende Tendenz aufweisen. Der FOS/TAC in den Hauptgärern einstufiger Biogasanlagen liegt bei „normalem“ Betrieb in der Regel im Bereich 0,3 – 0,4. In Hydrolyse- und Versäuerungsstufen liegt er zwangsläufig höher, da in hohem Maße Säuren als FOS (ausgedrückt als Essigsäureäquivalent) gebildet werden, aber die alkalische Pufferkapaziät TAC (ausgedrückt als Calciumkarbonat) begrenzt ist. Da die organischen Säuren in der Hydrolyse und Versäuerung nicht abgebaut werden (sollen), sind die Zahlenwerte dort vergleichsweise hoch. Auf die organischen Säuren in der Summe und im Einzelnen wird detaillierter im Rahmen der Vorstellung der Ergebnisse der Variation des Rezirkulatverhältnisses eingegangen. In den Versuchen zeigte sich, dass mit zunehmender Verweilzeit der FOS/TAC-Wert tendenziell niedriger ist als bei kurzen Verweilzeiten (Abbildung 54). Es zeigte sich aber auch, dass mit zunehmender Versuchsdauer der FOS/TAC eher anzusteigen scheint (Ausnahme HRT 6). FOS/TAC für den Versuch HRT 10 aufgrund eines Defektes des Messgerätes nicht verfügbar. Signifikante Unterschiede zwischen Mais- und Grassilage waren – mit Ausnahme der HRT 4 – nicht erkennbar, obwohl dies auf Basis der Daten zum pH Wert zu erwarten gewesen wäre. Allerdings ist anzumerken, dass für den TAC oftmals sehr niedrige Werte (oftmals Null oder zumindest nahe Null) gemessen wurden, so dass sich sehr hohe FOS/TAC-Werte außerhalb des Diagrammbereichs bzw. unendliche Werte ergeben haben. Unter Berücksichtigung dieses Aspektes

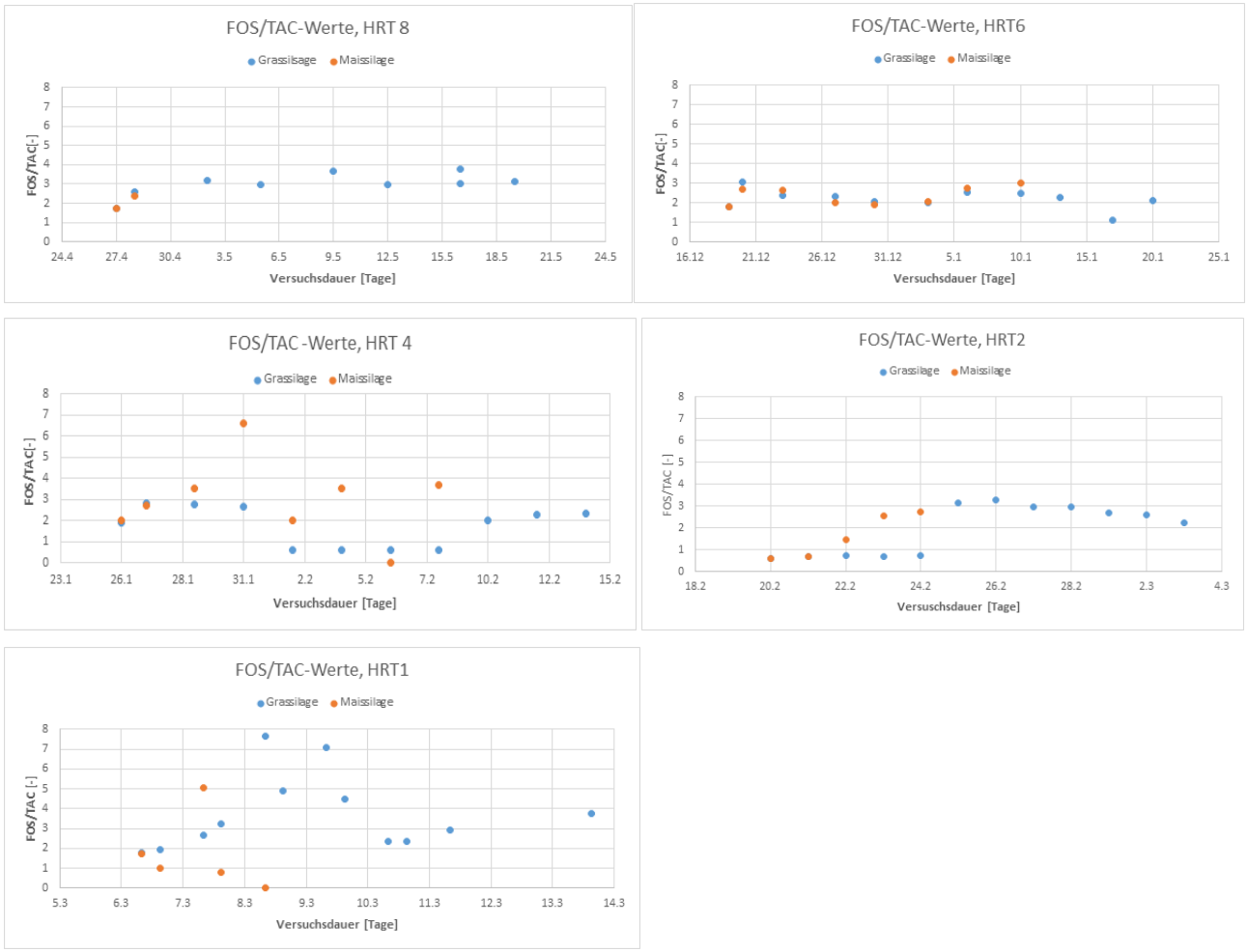


Abbildung 54: FOS/TAC Verhältnis in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Verweilzeiten, Rezirkulationsverhältnis 74 % (R/S-Quotient 2,85)

2.6.1.4 TS und oTS-Gehalt

Wenn in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe organische Substanz in flüchtige organische Säuren umgewandelt wird, was die Daten zum pH Wert indizieren, müsste dies auch an einer Verminderung der organischen Trockensubstanz (oTS) in den Reaktoren zu erkennen sein, wenn vorab auch eine Hydrolyse stattfindet. Die Abbildung 55 zeigt die experimentell gewonnenen Daten für die verschiedenen eingestellten hydraulischen Verweilzeiten. Daten für TS und oTS sind für HRT 10 jedoch leider nicht verfügbar. Bei etwa gleichen TS Konzentrationen in den Reaktoren mit Gras- und Maissilage (um 10 % TS) ist der oTS Gehalt (in % von der TS) unabhängig von der Verweilzeit in allen Versuchen in den Reaktoren mit Grassilage niedriger als in den Reaktoren mit Maissilage. Eine ausgeprägte Abnahme des oTS, also eine stattfindende Hydrolyse, ist weder für Mais- noch für Grassilage zu erkennen. Vielmehr weisen die gemessene Werte mehr oder weniger starke Schwankungen auf. Die vorab beschriebene Säurebildung ist daher wohl in erster Linie auf die Versäuerung bereits gelöster organischer Verbindungen zurückzuführen.

Abbildung 55: TS und oTS in den Reaktoren in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Verweilzeiten, Rezirkulationsverhältnis 74 % (R/S-Quotient 2,85)

2.6.1.5 Gasqualität

In Abbildung 56 sind die Gaszusammensetzungen (d.h. die Konzentrationen an CH_4, CO_2 und O_2 im gebildeten Gas) der Reaktoren für Maissilage und Grassilage für die untersuchten hydraulischen Verweilzeiten vergleichend gegenübergestellt. Der Anstieg der Sauerstoffkonzentration bzw. der Abfall der Methan- und Kohlendioxidkonzentration ist jeweils bedingt durch die Fütterung der Reaktoren. Das Gleichgewicht stellte sich nach ca. vier bis sechs Stunden wieder ein. Zunächst fällt auf, dass bei allen Verweilzeiten Methan und CO_2 gebildet werden, wobei der Methangehalt deutlich niedriger ist als der CO_2-Gehalt. Bei kurzen Verweilzeiten ist der Methangehalt zudem deutlich niedriger als bei längeren Verweilzeiten, was deutlich auf die einsetzende/stattfindende Methanogenese bei längeren Verweilzeiten hindeutet, während bei kurzen Verweilzeiten insbesondere CO_2-Bildung im Rahmen der Acidogenese zu erkennen ist. Zudem fällt auf, dass einige Zeit nach einer Fütterung CO_2 und Methankonzentration ansteigen, ein Maximum durchlaufen und wieder abfallen, bevor erneut gefüttert wird. Bei Grassilage ist dieser Effekt stärker ausgeprägt als bei Maissilage und bei längeren Verweilzeiten deutlicher erkennbar als bei kurzen Verweilzeiten.

Abbildung 56: Gasqualität in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Verweilzeiten, Rezirkulationsverhältnis 74 % (R/S-Quotient 2,85)

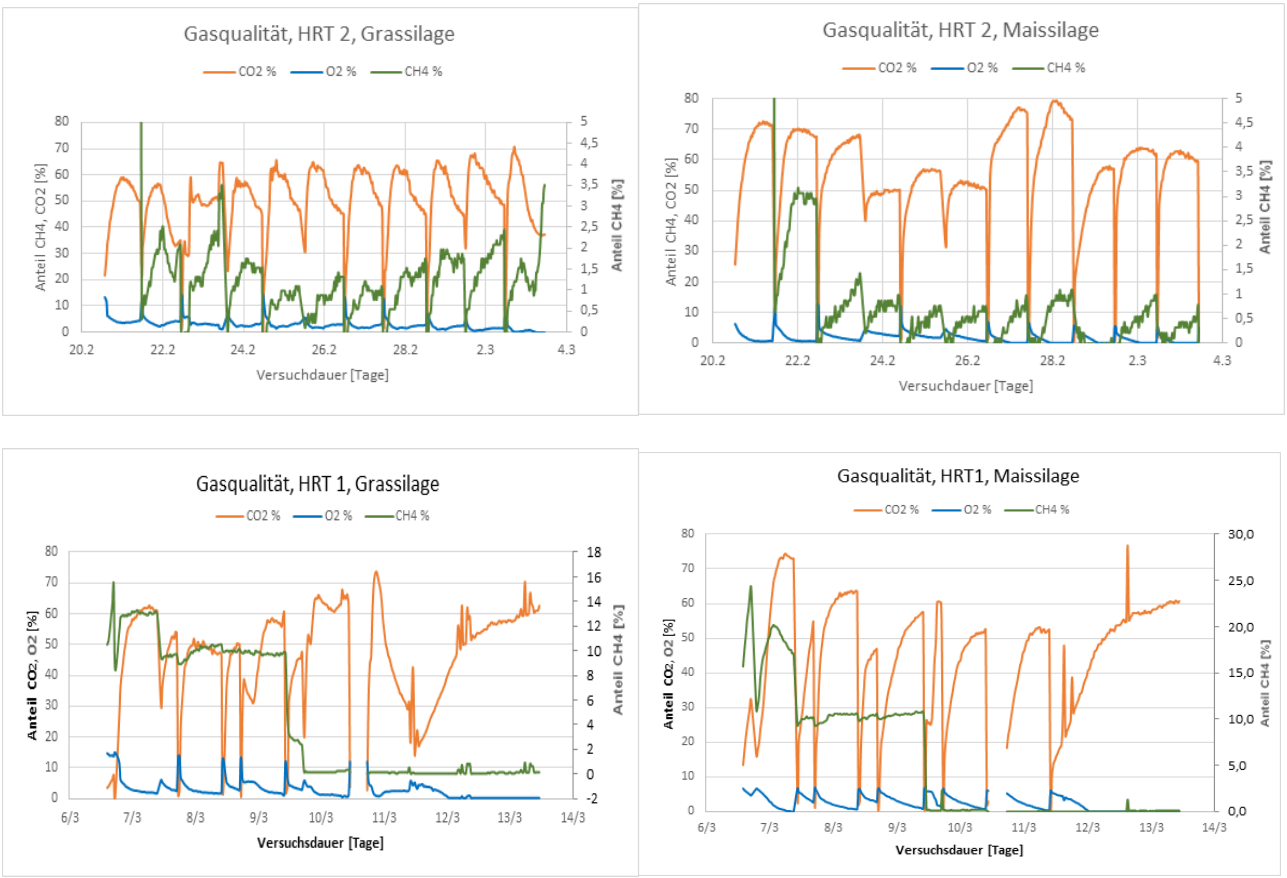


Abbildung 57: Gasqualität in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Verweilzeiten, Rezirkulationsverhältnis 74 % (R/S-Quotient 2,85) (Fortsetzung)

Anzumerken ist weiterhin, dass ein absinkender pH Wert, wie er insbesondere bei den Versuchen mit Maissilage zu beobachten ist, das Austreiben von CO2, welches im Rezirkulat gelöst sein kann, bewirken kann. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im untersuchten Bereich auch längere Verweilzeiten in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe keinen verstärkten Abbau organischer Trockensubstanz bewirken, aber insbesondere bei Mais als Substrat organische Säuren gebildet werden. Bei Verweilzeiten von mehr als einem Tag setzt Abbau der organischen Säuren zu Methan ein. Interessant dabei ist aber, dass einige Zeit nach erfolgter Fütterung die Methankonzentration ein Maximum durchläuft, was die Vermutung nahelegt, dass insbesondere organische Säuren im Substrat (d.h. Milchsäure, die von acetogenen Organismen zu Essigsäure umgesetzt wird, ggfs. auch in der Grassilage bereits enthaltene Essigsäure) von den Methanbildnern umgesetzt werden parallel zur einsetzenden Bildung organischer Säuren aus bereits gelösten organischen Verbindungen. Näheren Aufschluss werden auch die Säurespektren geben, die im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss der Rezirkulationsrate ermittelt wurden.

2.6.2 Einfluss der Rezirkulationsrate

Zur Untersuchung des Einflusses der Rezirkulationsrate (bzw. des Rezirkulat/Substrat-Quotienten) im Technikumsmaßstab wurde die Rezirkulation gegenüber den Versuchen zum Einfluss der Verweilzeit auf 80 % erhöht, was einem Rezirkulat/Susbstrat-Quotienten von 4 entspricht. Die hydraulische Verweilzeit wurde auf acht Tage eingestellt. Alle anderen Versuchsparameter bleiben gegenüber den Versuchen mit 74 % Rezirkulation (Rezirkulat/Substrat-Quotient von 2,85) unverändert. Die Variation der Rezirkulationsrate war, technisch bedingt, nur in sehr engen Grenzen möglich. Haupt-Problem war die Sicherstellung einer guten Durchmischung in den Reaktoren, was bei einer Rezirkulationsrate von 74 % bereits schwierig war. Aufgrund der hohen TS-Konzentration kam es immer wieder zu Ausfällen der Rührwerke. Eine Verringerung der Rezirkulationsrate hätte das Problem verstärkt und zu häufigeren Systemausfällen geführt. Mit einer auf 80 % erhöhten Rezirkulationsrate konnte ein annähernd stabiler Reaktorbetrieb gewährleistet werden, aber auch hier sind die Rührwerke vereinzelt vorübergehend ausgefallen.

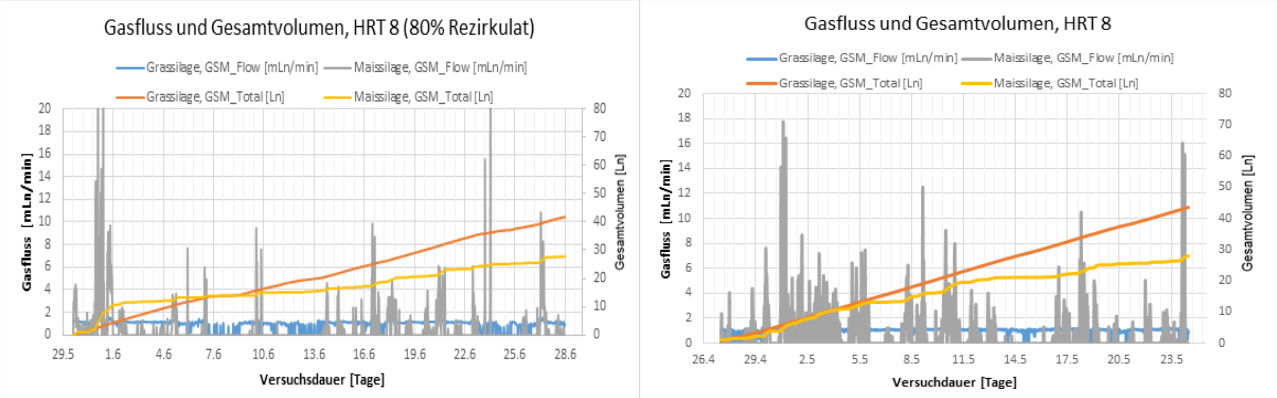


Abbildung 58: Gasfluss (Gasvolumenstrom) und gesamtes erfasstes Gasvolumen in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Verweilzeiten, REzirkulationsverhältnis 80 % (S/R-Quotient 4, links) und 74 % (S/R-Quotient 2,85, rechts), HRT 8

Hinsichtlich durchschnittlichem Gasvolumenstrom und während der Versuchsdauer insgesamt erfasste Gasmenge (Abbildung 58) gibt es keine signifikanten Unterschiede. Auffallend ist, dass bei dem Substrat Maissilage der Gasvolumenstrom gegenüber der Rezirkulationsrate 74 % sich etwas vergleichmäßigt hat.

Hinsichtlich der Gasqualität kann festgestellt werden, dass die qualitativen Verläufe sind ähnlich sind (vgl. Abbildung 59), aber für Grassilage bei einer Rezirkulationsrate von 80 % niedrigere Konzentrationen für CO_2 und Methan festgestellt wurden. Für Maissilage ergibt sich ein umgekehrtes Verhalten. Hier werden etwas höhere CO_2 und Methankonzentrationen im Versuch mit einer Rezirkulationsrate von 74 % erreicht. Da eine erhöhte Rezirkulationsrate eine geringere zugefütterte Substratmenge bedeutet (höherer Anteil an rezirkulat bei unverändertem Füllvolumen in den Reaktoren gegenüber den Versuchen bei einer Rezirkulationsrate von 74 %), lässt sich daraus schließen, dass das Methan in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe des mit Grassilage betriebenen Reaktors aus bereits hydrolysiertem bzw. versäuerten frisch zugefütterten Substrat gebildet wird während bei Maissilage die Versäuerung im Vordergrund steht. Dies wird auch aus dem Vergleich der Ergebnisse der pH-Wert-Überwachung in Abbildung 60 deutlich.

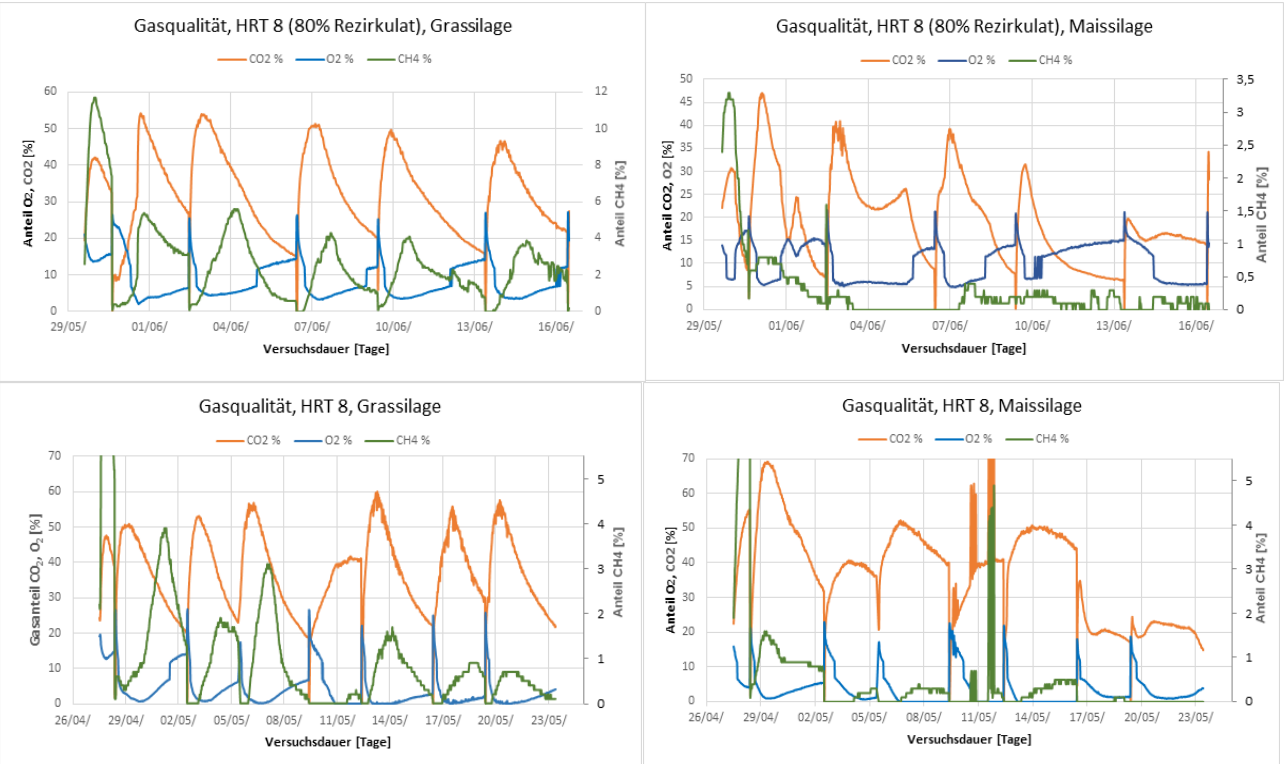


Abbildung 59: Gasqualität in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Rezirkulationsverhältnisse 80 % (S/R-Quotient 4, oben) und 74 % (S/R-Quotient 2,85, unten), HRT 8

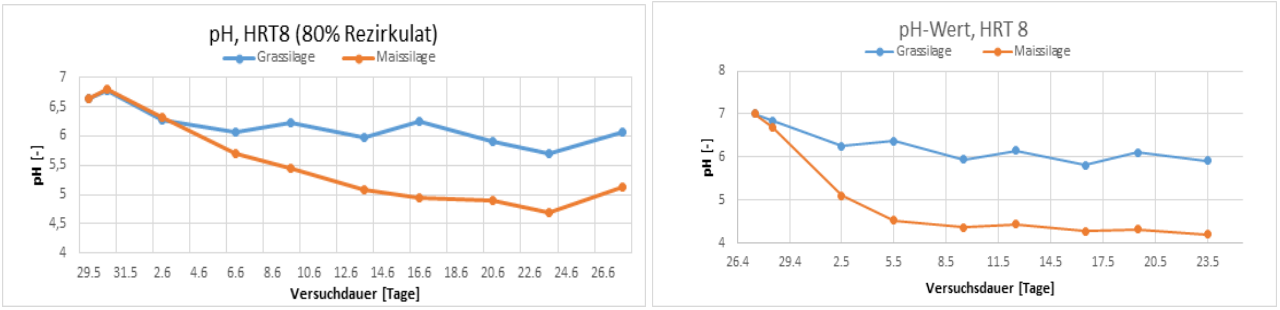


Abbildung 60: pH-Wert im Hydrolyse- und Versäuerungsreaktor in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Rezirkulationsverhältnisse 80 % (S/R-Quotient 4, links) und 74 % (S/R-Quotient 2,85, rechts), HRT 8

Der höhere Anteil des Substrats im zugefütterten Material bei einer Rezirkulationsrate von 74 % macht sich bei der Maissilage durch eine gegenüber einer Rezirkulationsrate von 80 % verstärkten Säurebildung, ausgedrückt durch einen niedrigeren pH-Wert am Ende des Versuchszeitraumes bemerkbar. Signifikante Unterschiede bei dem FOS/TAC-Wert waren nicht erkennbar (Abbildung 61). Allerdings ist auch hier anzumerken, dass für den TAC oftmals sehr niedrige Werte (oftmals Null) gemessen wurden, so dass sich sehr hohe FOS/TAC-Werte außerhalb des Diagrammbereichs bzw. unendliche Werte ergeben haben könnten. Die verstärkte Säurebildung bei einer Rezirkulationsrate von 80 % wird auch bei der Betrachtung der aufsummierten flüchtigen Fettsäuren in Abbildung 62 deutlich.

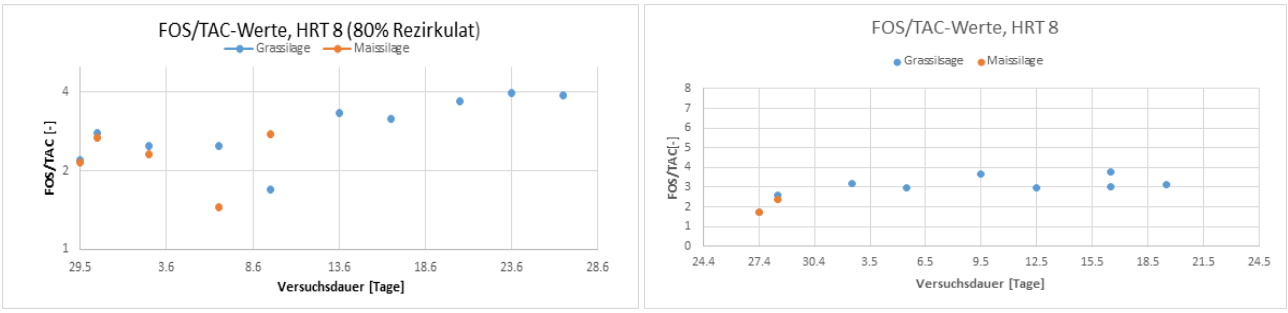


Abbildung 61: FOS/TAC-Werte im Hydrolyse- und Versäuerungsreaktor in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Rezirkulationsverhältnisse 80 % (S/R-Quotient 4, links) und 74 % (S/R-Quotient 2,85, rechts), HRT 8

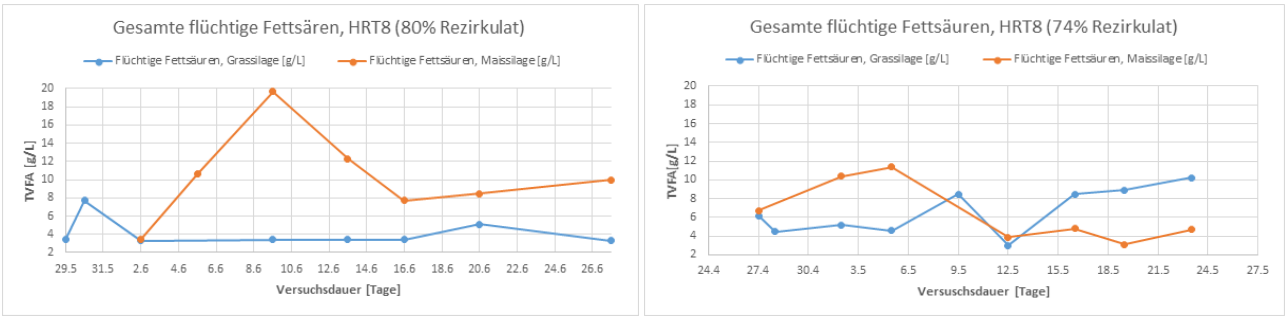


Abbildung 62: Gesamte flüchtige Fettsäuren im Hydrolyse- und Versäuerungsreaktor in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Rezirkulationsverhältnisse 80 % (S/R-Quotient 4, links) und 74 % (S/R-Quotient 2,85, rechts), HRT 8

Betrachtet man die einzelnen Fettsäuren (Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure, Hexansäure, Heptansäure, vgl. Abbildung 63), so fällt auf, dass bei der Hydrolyse von Maissilage insbesondere Hexansäure (Capronsäure) entsteht, neben weiteren Säuren aber auch Essigsäure gebildet wird, die jedoch (noch) nicht zu Methan umgesetzt wird. Demgegenüber sind auch die Konzentrationen der einzelnen Säuren bei Grassilage niedriger konzentriert als in dem mit Maissilage betriebenen Reaktor. Während bei Maissilage die Säurebildung stärker bei einer

Rezirkulationsrate von 80 % ausgebildet ist, konnten bei Grassilage bei einer Rezirkulationsrate von 74 % höhere Säurekonzentrationen festgestellt werden, insbesondere für Hexansäure, Essigsäure und Buttersäure.

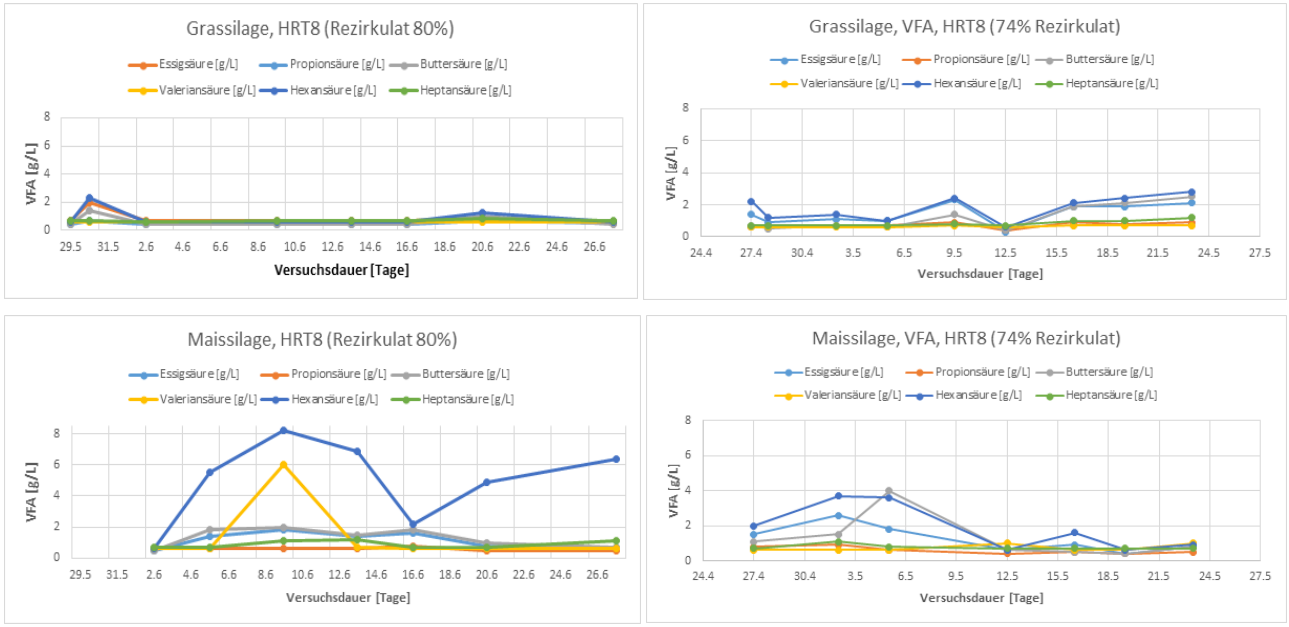


Abbildung 63: Flüchtige Fettsäuren im Hydrolyse- und Versäuerungsreaktor in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Rezirkulationsverhältnisse 80 % (S/R-Quotient 4, links) und 74 % (S/R-Quotient 2,85, rechts), HRT 8

Eine signifikante Hydrolyse organischer Substanz, d.h. Abbau organischer Trockensubstanz, konnte erneut nicht eindeutig nachgewiesen werden. Abbildung 64 zeigt zwar für Grassilage eine Verringerung der oTS und der TS über die Versuchsdauer bei einer Rezirkulatiosrate von 80 % (S/R-Quotiont 4), bei einer Rezirkulationsrate von 74 % (S/R-Quotient 2,85) ist dies aber nicht eindeutig erkennbar. Für Maissilage konnte bei einer Rezirkulatiosrate von 80 % sogar ein leichter Anstieg der oTS beobachtet werden, was evtl. aber auch auf Probenahme-/Analysenungenauigkeiten zurückzuführen sein könnte, weil die TS-Konzentration für Maissilage ebenfalls abnehmende Tendenz hat. Auch die CSB-Konzentration in den Reaktoren gibt keinen näheren Aufschluss (vgl. Abbildung 65). Man erkennt lediglich, dass der gesamte CSB (also die Summe aus partikulärem und gelöstem CSB) in den Reaktoren mit Gras- und Maissilage gleich ist. Eine separate Bestimmung des gelösten CSB war mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich, da die Proben nicht mit üblichen Labor-Filtrationsmitteln filtrierbar waren.

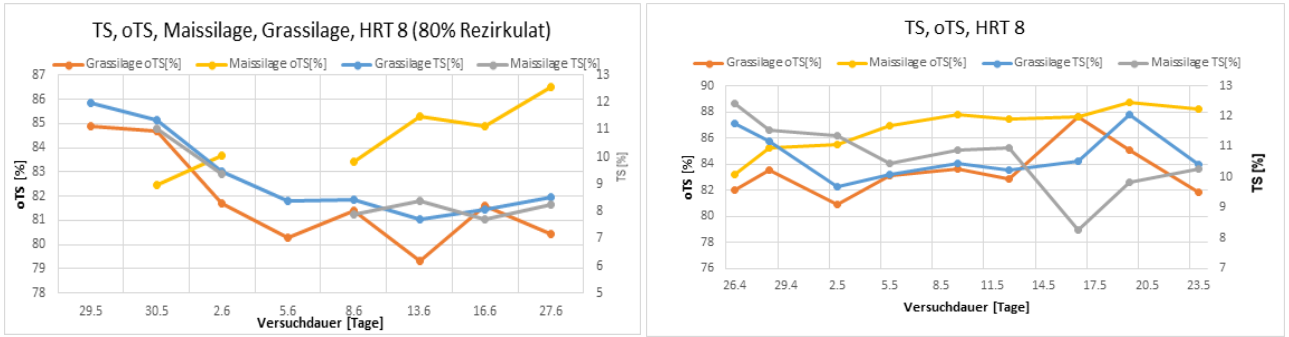


Abbildung 64: TS und oTS Gehalt im Hydrolyse- und Versäuerungsreaktor in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Rezirkulationsverhältnisse 80 % (S/R-Quotient 4, links) und 74 % (S/R-Quotient 2,85, rechts), HRT 8

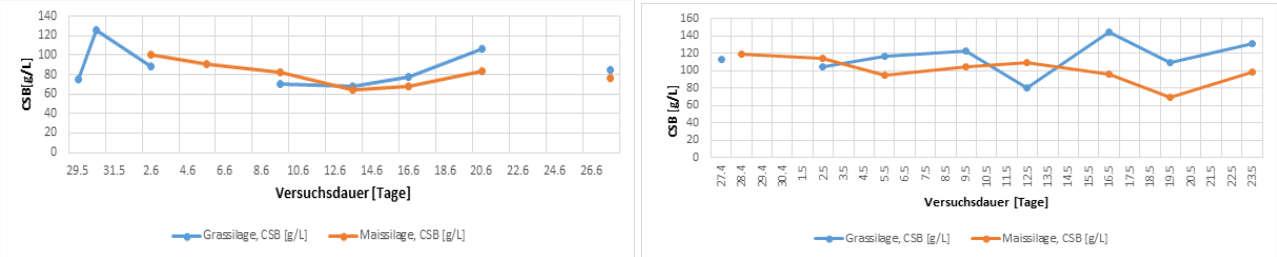


Abbildung 65: CSB Konzentration im Hydrolyse- und Versäuerungsreaktor in Abhängigkeit von der Versuchsdauer für die untersuchten Rezirkulationsverhältnisse 80 % (S/R-Quotient 4, links) und 74 % (S/R-Quotient 2,85, rechts), HRT 8

2.6.3 Schlussfolgerungen aus den Technikumsversuchen

Auf Basis der Technikumsversuche lässt sich schlussfolgern, eine Hydrolyse organischen Materials größerem Umfang nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, selbst nicht bei Verweilzeiten, die deutlich über den in der Praxis üblichen Verweilzeiten liegen. Eine Versäuerung konnte aber eindeutig für Gras- und Maissilage nachgewiesen werden, für Mais als Substrat war die Bildung organischer Säuren deutlich ausgeprägter. Die Säurebildung ist insbesondere auf die Versäuerung bereits gelöster organischer Verbindungen zurückzuführen. Eine Hydrolyse konnte nur bei dem Versuch mit einem erhöhten Rezirkulationsverhältnis, und da insbesondere für Grassilage festgestellt werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Methanemissionen in Hydrolyse- und Versäuerungsstufen auf parallel zu Hydrolyse und Versäuerung, d.h. kurz nach der Zufuhr frischem Substrat, stattfindende Methanogenese auf Basis vom im Substrat bereits enthaltener organischer Säuren (evtl. sogar Essigsäure, z.B. in Grassilage) zurückzuführen sind. Da jedoch Unterschiede im Verhalten von Gras- und Maissilage herausgearbeitet werden konnten, ist bezüglich der Methanemissionen in Hydrolyse- und Versäuerungsstufen eine Substratabhängigkeit zu berücksichtigen. Die in den Untersuchungen im Labormaßstab ermittelten volumenbezogenen Methanemissionen bei den betrachteten Rezirkulat/Substrat-Quotienten von 2,8 und 4) liegen dabei aber etwa eine Zehnerpotenz unter den im technischen Maßstab ermittelten Werten (vgl. Abschnitt 2.4.2.2).

Die Rezirkulationsrate spielt im untersuchten Bereich für die Hydrolyse und Versäuerung eine wichtige Rolle. Sie hat zwar auf den Gasvolumenstrom und das insgesamt das gebildete Gasvolumen keinen Einfluss. Bei Substraten aber, die bereits organische Säuren (insbesondere Essigsäure) enthalten können, wie z.B. Grassilage, kann eine höhere Rezirkulationsrate eine verstärkte Methanbildung in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe bewirken. Bei Maissilage hingegen wurde bei höherem Rezirkulationsverhältnis eine stärkere Säurebildung beobachtet.

2.7 Ergebnisse und Diskussion V: Modellierung der Umsetzungen in Hydrolyse- und Versäuerungsstufen

ttz Bremerhaven

Um die Umsetzungen in Hydrolyse- und Versäuerungsstufen zu modellieren muss zunächst ein vereinfachtes Prozessschema entwickelt werden. Das für die Arbeiten zugrunde gelegte Schema zeigt die Abbildung 66.

Zudem werden einige vereinfachende Annahmen getroffen. Beispielsweise wird das zu hydrolysierende und zu versäuernde Substrat auf die Substratkomponente Cellulose reduziert. Es wird unterstellt, dass das zugeführte Substrat keine bereits gelösten organischen Verbindungen enthält, die in organische Säuren umgewandelt werden. Es wird weiterhin vereinfachend unterstellt, dass das Substrat nicht bereits organische Säuren (z.B. Milch- oder Essigsäure) enthält. Anzumerken ist an dieser Stelle jedoch, dass insbesondere in den Technikumsversuchen ein abweichendes Verhalten beobachtet wurde. Zur Herausarbeitung des Anteils der Hydrolyse von Cellulose und anschließender Versäuerung der Substanzen an den im Technikum und im großtechnischen Maßstab beobachteten Effekten zur Säure- und Gasbildung sind diese getroffenen Annahmen aber sinnvoll.

Die Produkte der stattfindenden Umsetzungen werden auf flüchtige organische Säuren (VFA) und später CO_2 bzw. CH_4 reduziert. Basis für die Modellentwicklung sind Massenbilanzen für Substrat(e), Produkte und Bakterien-Zellmasse. Ziel ist es zunächst, für alle unbekannten Parameter Bestimmungsgleichungen zu erarbeiten. Die Modellierung des Prozesses erfolgt dann auf diesem Gleichungssatz mit Hilfe der Modellierungssoftware Matlab.

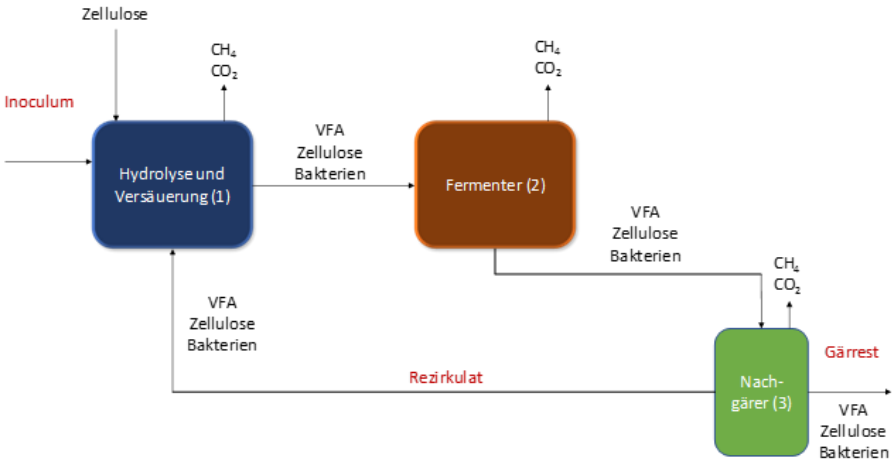


Abbildung 66: Vereinfachtes Prozessschema des Biogasprozesses zur Modellierung der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe in Biogasanlagen

Anmerkung: Die griechischen Symbole in den nachfolgenden Gleichungen bezeichnen Parameter, die Zahlenindizes bezeichnen den Reaktor (Hydrolyse und Versäuerung (1), Fermenter (2), Nachgärer (3)).

2.7.1 Hydrolyse und Versäuerung (Reaktor 1)

Die allgemeinen Massenbilanzen für die Hydrolyse- und Versäuerungsstufe lauten:

Cellulose-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}cell_{in,1} + \frac{d}{dt}cell_{re,1} - \frac{d}{dt}cell_{destruction,1} - \frac{d}{dt}cell_{out,1} = 0 \quad (4)$$

Fettsäuren-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}VFA_{re,1} + \frac{d}{dt}VFA_{creation,1} - \frac{d}{dt}VFA_{out,1} - \frac{d}{dt}VFA_{destruction,1} = 0 \quad (5)$$

Methan-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}CH_{4\,creation,1} - \frac{d}{dt}CH_{4\,out,1} = 0 \quad (6)$$

CO_2-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}CO_{2\,creation,1} - \frac{d}{dt}CO_{2\,out,1} = 0 \quad (7)$$

Die Variablen in diesen Gleichungen basieren auf absoluten Massenströmen, d.h. ihre Einheit ist g/s oder kg/d.

Die Kinetik der involvierten Mikroorganismen kann vereinfacht folgendermaßen beschrieben werden:

Hydrolytische und säurebildende Bakterien:

$$\mu_{aero,1} = \mu_{\max_aero,1}\,\frac{cell_{total,1}}{K_{cell,1}+cell_{total,1}} \quad (8)$$

Acetogene und methanogene Bakterien:

$$\mu_{anaero,1} = \mu_{\max_anaero,1}\,\frac{VFA_{total,1}}{K_{VFA,1}+VFA_{total,1}} \quad (9)$$

Wichtig ist, dass die beiden Gleichungen zur mikrobiologischen Kinetik, die auf einem Monod-Ansatz basieren, halbempirisch sind, so dass der Bakterienmassenstrom in und aus dem Reaktor berücksichtigt werden kann. Weiterhin ist es wichtig zu betonen, dass die Ausdrücke μ in diesen Gleichungen nicht spezifische, sondern globale Wachstumsraten für den betrachteten Reaktor symbolisieren. Mit anderen Worten, die Einheiten sind ebenfalls kg/s oder kg/d. Der Substratgehalt im betrachteten Reaktor wird durch die Variablen $cell_{total,1}$ (für Cellulose) und $VFA_{total,1}$ für (für die Summe der flüchtigen Fettsäuren) beschrieben. Auch diese Parameter haben globale Einheiten. Spezifische Daten müssten daher zunächst in globale Einheiten umgerechnet werden, bevor das Modell angewendet werden kann,

aber diese Vorgehensweise bewirkt eine erhebliche Vereinfachung des Modells. Die Vorgehensweise für Fermenter (Reaktor 2) und Nachgärer (Reaktor 3) wäre analog.

Unter Berücksichtigung folgender Beziehungen:

$$\frac{d}{dt}cell_{destruction,1} = \delta_1 \mu_{aero,1} \quad (10)$$

$$\frac{d}{dt}VFA_{creation,1} = \alpha_1 \frac{d}{dt}cell_{destruction,1} = \alpha_1 \delta_1 \mu_{aero,1} \quad (11)$$

$$\frac{d}{dt}VFA_{destruction,1} = \gamma_1 \mu_{anaero,1} \quad (12)$$

$$\frac{d}{dt}CH_{4\,creation,1} = \beta_1 \frac{d}{dt}VFA_{destruction,1} = \beta_1 \gamma_1 \mu_{anaero,1} \quad (13)$$

$$\frac{d}{dt}CO_{2\,creation,1} = \varepsilon_1 \frac{d}{dt}VFA_{destruction,1} = \varepsilon_1 \gamma_1 \mu_{anaero,1} \quad (14)$$

ergibt sich für die Massenbilanzen (Gl. (1) bis (4)):

Cellulose-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}cell_{in,1} + \frac{d}{dt}cell_{re,1} - \delta_1 \mu_{aero,1} - \frac{d}{dt}cell_{out,1} = 0 \quad (15)$$

Fettsäuren-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}VFA_{re,1} + \alpha_1 \delta_1 \mu_{aero,1} - \frac{d}{dt}VFA_{out,1} - \gamma_1 \mu_{anaero,1} = 0 \quad (16)$$

Methan-Massenbilanz:

$$\beta_1 \gamma_1 \mu_{anaero,1} - \frac{d}{dt}CH_{4\,out,1} = 0 \quad (17)$$

CO_2-Massenbilanz:

$$\varepsilon_1 \gamma_1 \mu_{anaero,1} - \frac{d}{dt}CO_{2\,out,1} = 0 \quad (18)$$

Wie bereits erwähnt ist für die Aufstellung der Massenbilanzen für den Fermenter (Reaktor 2, Index 2) und für den Nachgärer (Reaktor 3, Index 3) zunächst analog zu verfahren.

2.7.2 Fermenter (Reaktor) 2

Die allgemeinen Massenbilanzen für den Fermenter lauten:

Cellulose-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}cell_{out,1} - \frac{d}{dt}cell_{destruction,2} - \frac{d}{dt}cell_{post-treatment,2} = 0 \quad (19)$$

Fettsäuren-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}VFA_{out,1} + \frac{d}{dt}VFA_{creation,2} - \frac{d}{dt}VFA_{destruction,2} - \frac{d}{dt}VFA_{post-treatment,2} = 0 \quad (20)$$

Methan-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}CH_{4\,creation,2} - \frac{d}{dt}CH_{4\,out,2} = 0 \quad (21)$$

CO_2-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}CO_{2\,creation,2} - \frac{d}{dt}CO_{2\,out,2} = 0 \quad (22)$$

Die Kinetik kann beschrieben werden durch:

Hydrolytische und säurebildende Bakterien:

$$\mu_{aero,2} = \mu_{\max_aero,2} \frac{cell_{total,2}}{K_{cell,2} + cell_{total,2}} \quad (23)$$

Acetogene und methanogene Bakterien:

$$\mu_{anaero,2} = \mu_{\max_anaero,2} \frac{VFA_{total,2}}{K_{VFA,2} + VFA_{total,2}} \quad (24)$$

Unter Berücksichtigung von:

$$\frac{d}{dt} cell_{destruction,2} = \delta_2 \mu_{aero,2} \quad (25)$$

$$\frac{d}{dt} VFA_{creation,2} = \alpha_2 \frac{d}{dt} cell_{destruction,2} = \alpha_2 \delta_2 \mu_{aero,2} \quad (26)$$

$$\frac{d}{dt} VFA_{destruction,2} = \gamma_2 \mu_{anaero,2} \quad (27)$$

$$\frac{d}{dt} CH_{4\,creation,2} = \beta_2 \frac{d}{dt} VFA_{destruction,2} = \beta_2 \gamma_2 \mu_{anaero,2} \quad (28)$$

$$\frac{d}{dt} CO_{2\,creation,2} = \varepsilon_2 \frac{d}{dt} VFA_{destruction,2} = \varepsilon_2 \gamma_2 \mu_{anaero,2} \quad (29)$$

ergibt sich für die Massenbilanzen:

Cellulose-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt} cell_{out,1} - \delta_2 \mu_{aero,2} - \frac{d}{dt} cell_{post-treatment,2} = 0 \quad (30)$$

Fettsäuren-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt} VFA_{out,1} + \alpha_2 \delta_2 \mu_{aero,2} - \gamma_2 \mu_{anaero,2} - \frac{d}{dt} VFA_{post-treatment,2} = 0 \quad (31)$$

Methan-Massenbilanz:

$$\beta_2 \gamma_2 \mu_{anaero,2} - \frac{d}{dt} CH_{4\,out,2} = 0 \quad (32)$$

CO_2-Massenbilanz:

$$\varepsilon_2 \gamma_2 \mu_{anaero,2} - \frac{d}{dt} CO_{2\,out,2} = 0 \quad (33)$$

2.7.3 Nachgärer (Reaktor 3)

Die allgemeinen Massenbilanzen lauten hier:

Cellulose-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt} cell_{in,3} - \frac{d}{dt} cell_{destruction,3} - \frac{d}{dt} cell_{re,1} - \frac{d}{dt} cell_{out,3} = 0 \quad (34)$$

Fettsäuren-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt} VFA_{in,3} + \frac{d}{dt} VFA_{creation,3} - \frac{d}{dt} VFA_{re,1} - \frac{d}{dt} VFA_{destruction,3} - \frac{d}{dt} VFA_{out,3} = 0 \quad (35)$$

Methan-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt} CH_{4\,creation,3} - \frac{d}{dt} CH_{4\,out,3} = 0 \quad (36)$$

CO_2-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt} CO_{2\,creation,3} - \frac{d}{dt} CO_{2\,out,3} = 0 \quad (37)$$

Die Kinetik wird analog beschrieben durch:

$$\mu_{aero,3} = \mu_{\max_aero,3} \frac{cell_{total,3}}{K_{cell,3} + cell_{total,3}} \quad (38)$$

$$\mu_{anaero,3} = \mu_{\max_anaero,3} \frac{VFA_{total,3}}{K_{VFA,3} + VFA_{total,3}} \quad (39)$$

Unter Berücksichtigung folgender Beziehungen:

$$\frac{d}{dt} cell_{destruction,3} = \delta_3 \mu_{aero,3} \quad (40)$$

$$\frac{d}{dt} VFA_{creation,3} = \alpha_3 \frac{d}{dt} cell_{destruction,3} = \alpha_3 \delta_3 \mu_{aero,3} \quad (41)$$

$$\frac{d}{dt} VFA_{destruction,3} = \gamma_3 \mu_{anaero,3} \quad (42)$$

$$\frac{d}{dt} CH_{4\,creation,3} = \beta_3 \frac{d}{dt} VFA_{destruction,3} = \beta_3 \gamma_3 \mu_{anaero,3} \quad (43)$$

$$\frac{d}{dt} CO_{2\,creation,3} = \varepsilon_3 \frac{d}{dt} VFA_{destruction,3} = \varepsilon_3 \gamma_3 \mu_{anaero,3} \quad (44)$$

ergibt sich für die Massenbilanzen:

Cellulose-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}cell_{in,3} - \delta_3\mu_{aero,3} - \frac{d}{dt}cell_{re,1} = 0 \quad (45)$$

Fettsäuren-Massenbilanz:

$$\frac{d}{dt}VFA_{in,3} + \alpha_3\delta_3\mu_{aero,3} - \frac{d}{dt}VFA_{re,1} - \gamma_3\mu_{anaero,3} = 0 \quad (46)$$

Methan-Massenbilanz:

$$\beta_3\gamma_3\mu_{anaero,3} - \frac{d}{dt}CH_{4_{out,3}} = 0 \quad (47)$$

CO_2-Massenbilanz:

$$\varepsilon_3\gamma_3\mu_{anaero,3} - \frac{d}{dt}CO_{2_{out,3}} = 0 \quad (48)$$

Nachfolgend werden einige Annahmen zur Vereinfachung des komplizierten Modells getroffen: Der Rezirkulationsstrom enthält Cellulose und flüchtige Fettsäuren in nur geringen Mengen. Aus dem Fermenter (Reaktor 2) werden nur geringe Mengen Cellulose und flüchtig Fettsäuren in den Nachgärer ausgetragen. Die Bildung von CH_4 und CO_2 im Nachgärer (Reaktor 3) ist von untergeordneter Bedeutung. Damit ergibt sich:

Für die Hydrolyse- und Versäuerungsstufe (Reaktor 1) ergibt sich:

$$\frac{d}{dt}cell_{in,1} - \delta_1\mu_{aero,1} - \frac{d}{dt}cell_{out,1} = 0 \quad (49)$$

$$\alpha_1\delta_1\mu_{aero,1} - \frac{d}{dt}VFA_{out,1} - \gamma_1\mu_{anaero,1} = 0 \quad (50)$$

$$\beta_1\gamma_1\mu_{anaero,1} - \frac{d}{dt}CH_{4_{out,1}} = 0 \quad (51)$$

$$\varepsilon_1\gamma_1\mu_{anaero,1} - \frac{d}{dt}CO_{2_{out,1}} = 0 \quad (52)$$

$$\mu_{aero,1} = \mu_{\max_aero,1}\frac{cell_{total,1}}{K_{cell,1}+cell_{total,1}} \quad (53)$$

$$\mu_{anaero,1} = \mu_{\max_anaero,1}\frac{VFA_{total,1}}{K_{VFA,1}+VFA_{total,1}} \quad (54)$$

Wird Gleichung (51) in Gleichung (54) eingesetzt, die Verweilzeit RT und der Rezirkulationsstrom Re eingeführt, ergibt sich

$$\frac{\frac{d}{dt}CH_{4_{out,1}}}{\beta_1\gamma_1} = \mu_{\max_anaero,1}\frac{\log(RT)+\eta_1\log(Re)}{K_{VFA,1}+\log(RT)+\eta_1\log(Re)} \quad (55)$$

Diese Gleichung fußt auf der Annahme, dass im stationären Zustand die Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren nicht über einen bestimmten Wert hinaus ansteigt, eine logarithmische Abhängigkeit vorliegt und dass dies analog für den Rezirkulatstrom gilt. Hierzu wird folgender empirischer Ansatz gemacht[1]:

$$VFA_{total,1} = \log(RT) + \eta_1\log(Re) \quad (56)$$

Diese Gleichung kann weiter vereinfacht werden:

$$VFA_{total,1} = \log(RTRe^{\eta_1}) \quad (57)$$

und man erhält schließlich

$$\frac{\frac{d}{dt}CH_{4_{out,1}}}{\beta_1\gamma_1} = \mu_{\max_anaero,1}\frac{\log(RTRe^{\eta_1})}{K_{VFA,1}+\log(RTRe^{\eta_1})} \quad (58)$$

Wird diese Gleichung grafisch dargestellt (die linke Seite ist dabei die abhängige Variable und *Re* und *RT* sind unabhängige Variablen) ergibt sich die in Abbildung 67 dargestellte Situation.

[1] Dies ist eine rein empirische Abhängigkeit, die hier aus Gründen der Vereinfachung eingeführt wird.

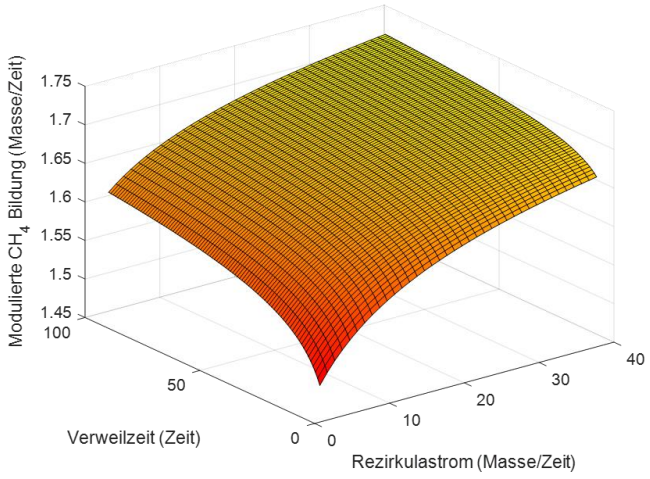


Abbildung 67: Einfluss der Verweilzeit und des Rezirkulatvolumenstroms auf die Methanbildung in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe

Analog, weil die Cellulosekonzentration von der Verweilzeit und dem Rezirkulationsstrom abhängt, gilt

$$cell_{total,1} = \log(RT) + \zeta_1 \log(Re) = \log\left(RTRe^{\zeta_1}\right) \quad (59)$$

Für die Hydrolyse von Cellulose gilt

$$\frac{d}{dt} cell_{in,1} - \frac{d}{dt} cell_{out,1} = \Delta cell_1 = \delta_1 \mu_{aero,1} \quad (60)$$

Wird die Gleichung für die bakterielle Wachstumsrate der hydrolytischen und säurebildenden Bakterien eingesetzt, ergibt sich

$$\Delta cell_1 = \delta_1 \mu_{\max_aero,1} \frac{cell_{total,1}}{K_{cell,1} + cell_{total,1}} \quad (61)$$

Wird die Beziehung für die Cellulosegehalt mit der Beziehung für die Verweilzeit und den Rezirkulationsvolumenstrom verknüpft, ergibt sich

$$\Delta cell_1 = \delta_1 \mu_{\max_aero,1} \frac{\log\left(RTRe^{\zeta_1}\right)}{K_{cell,1} + \log\left(RTRe^{\zeta_1}\right)} \quad (62)$$

Wird angenommen, dass der Rezirkulatstrom keine Bakterien enthält, die die Hydrolyserate beeinflussen (eigentlich ist genau das nicht der Fall, aber die Annahme kann für einen kontinuierlichen Betrieb der Hydrolyse- und Versäuerung (stationäere Zustand) vereinfachend angenommen werden), kann der Effekt des Rezirkulatstroms neutralisiert werden, indem ζ1=0 gesetzt wird, woraus sich dann folgende Gleichung für den Celluloseabbau ergibt:

$$\Delta cell_1 = \delta_1 \mu_{\max_aero,1} \frac{\log(RT)}{K_{cell,1} + \log(RT)} \quad (63)$$

Wird diese Gleichung grafisch dargestellt, ergibt qualitativ der in Abbildung 68 wiedergegebene Zusammenhang zwischen Celluloseabbau und Verweilzeit. Aus dieser Grafik wird klar, warum in den Technikumsversuchen und in der Beprobung der großtechnischen Anlagen kein signifikanter Abbau von Cellulose in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe nachgewiesen werden konnte.

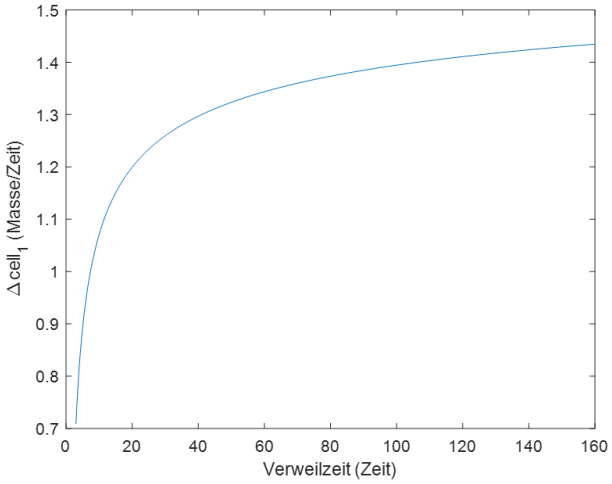


Abbildung 68: Qualitatives Modell für den Celluloseabbau in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe in Biogasanlagen

Für die Fermentation (Reaktor 2) ergibt sich analog:

$$\frac{d}{dt}cell_{out,1} - \delta_2\mu_{aero,2} = 0 \quad (64)$$

$$\frac{d}{dt}VFA_{out,1} + \alpha_2\delta_2\mu_{aero,2} - \gamma_2\mu_{anaero,2} = 0 \quad (65)$$

$$\beta_2\gamma_2\mu_{anaero,2} - \frac{d}{dt}CH_{4_{out,2}} = 0 \quad (66)$$

$$\varepsilon_2\gamma_2\mu_{anaero,2} - \frac{d}{dt}CO_{2_{out,2}} = 0 \quad (67)$$

$$\mu_{aero,2} = \mu_{\max_aero,2}\frac{cell_{total,2}}{K_{cell,2}+cell_{total,2}} \quad (68)$$

$$\mu_{anaero,2} = \mu_{\max_anaero,2}\frac{VFA_{total,2}}{K_{VFA,2}+VFA_{total,2}} \quad (69)$$

An dieser Stelle sei angemerkt, dass für den Nachgärer (Reaktor 3) keine weiteren Betrachtungen durchgeführt wurden, da aufgrund der vorgenannten Vereinfachungen angenommen wurde, dass im Nachgärer keine Prozesse zum Abbau von Cellulose, zum Abbau flüchtiger Organischer Säuren oder zur Biogasbildung ablaufen. Das Gleichungssystem reduziert sich damit auf 12 Gleichungen mit 12 unbekannten.

Die meisten Parameter, die einheitenlose Umrechnungsfaktoren sind (die Parameter mit griechischen Symbolen), können über die jeweils relevante Stöchiometrie abgeschätzt werden. Zahlenwerte für diese Parameter sind in Tabelle 22 aufgelistet.

Aus dem Modellbeziehungen kann abgeleitet werden, dass in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe (Reaktor 1) nur in untergeordnetem Umfang Celluloseabbau stattfindet.

Werden in Gleichung 60 konkrete Zahlenwerte, die in den Laboranalysen einer der vom ttz in den begutachteten Biogasanlagen entnommenen Proben entstammen (BGA 18, $cell_{in,1}$ und $cell_{out,1}$ mit 21,17 bzw. 20,8 g/d), eingesetzt ergibt sich $\mu_{aero,1}$ zu:

$$\mu_{aero,1} = \frac{\left(\frac{d}{dt}cell_{in,1} - \frac{d}{dt}cell_{out,1}\right)}{\delta_1} = \frac{21{,}77-20{,}8}{1{,}57} = 0{,}6178\ g/d \quad (70)$$

Setzt man diesen Zahlenwert sowie die abgeschätzten stöchiometrischen Parameter aus der Tabelle 22 in Gleichung (50) ein, so kann diese Gleichung geschrieben werden:

$$(0{,}125) * (1{,}57) * (0{,}6178) - \frac{d}{dt}VFA_{out,1} - 1{,}75 * \mu_{anaero,1} = 0 \quad (71)$$

Tabelle 22: Abschätzung der Zahlenwerte für verschiedene stöchiometrische Faktoren in den Gleichungssystemen des Modells

Parameter/Symbol	Bezeichnung	Zahlenwert
$\alpha_1 = \alpha_2$	Stöchiometrischer Faktor für die Konversion von Cellulose in Fettsäuren	0,125
$\beta_1 = \beta_2$	Stöchiometrischer Faktor für die Konversion von Fettsäuren in Methan	0,267
$\gamma_1 = \gamma_2$	Stöchiometrischer Faktor für das bakterielle Wachstum bei der Konversion von Fettsäuren zu Methan	1,75
$\delta_1 = \delta_2$	Stöchiometrischer Faktor für das bakterielle Wachstum bei der Konversion von Cellulose zu Fettsäuren	1,57
$\varepsilon_1 = \varepsilon_2$	Stöchiometrischer Faktor für die Konversion von Fettsäuren in CO_2	0,735

Gleichung (71) liefert eine lineare Beziehung zwischen der Fettsäurekonzentration in der Hydrolyse- und Versäuerung und der Wachstumsrate der hydrolytischen/versäuernden Bakterien. Wird die gebildete Menge an flüchtigen Fettsäuren (als Summenparameter) über der Wachstumsrate der hydrolytischen/versäuernden Bakterien aufgetragen ergibt sich die Situation in Abbildung 69. Die Grafik zeigt, dass die (theoretisch unter den getroffenen Annahmen) maximal gebildete Menge an flüchtigen Fettsäuren aus Cellulose ca. 0,125 g/d beträgt, wenn Celluloseabbau die einzige „Quelle“ für die Methanproduktion sein sollte.

In der Realität beträgt die täglich die Hydrolyse- und Versäuerung verlassende Menge Fettsäuren aber 8,4 g/d, was auf das Vorhandensein von flüchtigen Fettsäuren im Substrat (insbes. Milchsäure, aber vermutlich auch bereits etwas Essigsäure) oder auf die Konversion anderer Substratbestandteil ein Fettsäuren zurückzuführen sein muss. Da die Methanbildung auch in dieser Stufe durch die Umsetzung von Essigsäure erfolgt, ist daraus abzuleiten, dass die Substratverweilzeit (3,5 Tage) in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe zu kurz für eine weitgehende Umsetzung der Cellulose in flüchtige Fettsäuren ist.

Dieser Sachverhalt kann auch über den Weg der Methanproduktion auf Basis der Massenbilanz der flüchtigen Fettsäuren gezeigt werden.

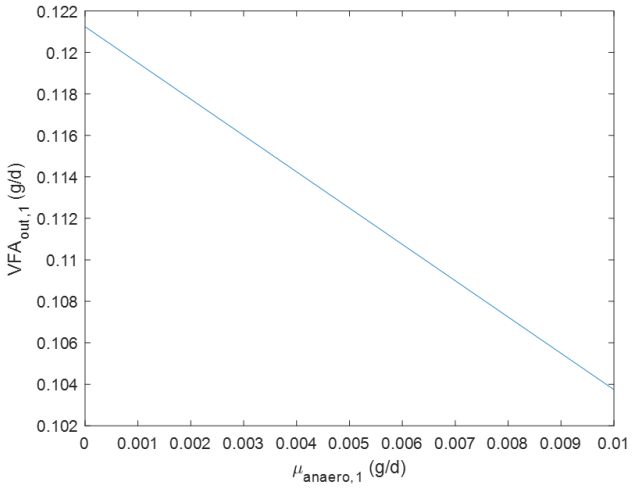


Abbildung 69: Qualitatives Modell für den Celluloseabbau in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe in Biogasanlagen

$$\alpha_1\delta_1\mu_{aero,1} + \frac{d}{dt}VFA_{in,1} - \frac{d}{dt}VFA_{out,1} - \gamma_1\mu_{anaero,1} = 0 \quad (72)$$

Der Zufluss an flüchtigen Fettsäuren zur Hydrolyse und Versäuerungsstufe kann mit ca. 45 g/d angesetzt werden, damit ergibt sich für $\mu_{anaero,1}$.

$$\mu_{anaero,1} = \frac{(0{,}125)*(1{,}57)*(0{,}6178)+45-8.4}{1{,}75} = 20{,}98\ g/d \quad (73)$$

Die Methanbildungsrate in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe ergibt sich aus Gleichung (13) zu:

$$\beta_1\gamma_1\mu_{anaero,1} - \frac{d}{dt}CH_{4_{out,1}} = 0 \quad (74)$$

Damit kann die zu erwartende Methanproduktion in der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe abgeschätzt werden zu:

$$\frac{d}{dt}CH_{4_{out,1}} = 0{,}267 * (1{,}75) * 20{,}98 = \ 9{,}8\ g/d \quad (75)$$

Dies ist deutlich weniger als die tatsächlich festgestellte Methanbildungsrate von1.382,4 g/d. Dies deutet darauf hin, dass es noch einen anderen Mechanismus der Methanbildung geben muss. Am wahrscheinlichsten erscheint die Methanbildung aus freiem Wasserstoff und nicht ausschließlich durch Abbau flüchtiger Fettsäuren, die aus hydrolysiertem Material gebildet wurden.

2.8 Ergebnisse und Diskussion VI: Bewertung der Bioprozesseffizienz

Cordes+Winterberg

Die Bewertung der Bioprozesseffizienz beschränkt sich auf diejenigen Vorstufen, die als Hydrolyse- und Versäuerungsstufen geplant und realisiert wurden. Und sie konzentriert sich auf die namengebenden Funktionen dieser Stufen, die Hydrolyse (vor allem der Faserstoffe) und die Gärpoduktbildung (vor allem die Bildung organischer Säuren).

2.8.1 Effizienz der Hydrolyse

Die Weender-Stoffgruppenanalyse hat übereinstimmend für keine der untersuchten Vorstufen einen Hinweis auf eine "Rohfaser"-Hydrolyse geliefert. Dieses Ergebnis bestätigt die Erwartungshaltung, die sich aus den in der Fachliteratur veröffentlichten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Feststoffdesintegration und der Cellulosehydrolyse ableiten ließ: Aufgrund der sehr kurzen Substratverweilzeiten konnte mit einem signifikanten Abbau von Faserstoffen nicht gerechnet werden.

Das Ziel, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der anaeroben Nahrungskette landwirtschaftlicher Biogasanlagen, die Faserstoffhydrolyse, mit einer separaten Hydrolyse- und Versäuerungsstufe signifikant zu beschleunigen und somit den Gesamtprozess spürbar zu beschleunigen, kann so nicht erreicht werden. Was die Faserstoffhydrolyse betrifft, tragen Hydrolysestufen ihren Namen also zu Unrecht.

Eine deutliche Verlängerung der Substratverweilzeit in Hydrolysestufen würde allerdings zwangsläufig aus der Versäuerungsstufe eine Stufe mit dem Charakter einer Methanstufe machen, so dass die Gesamtanlage zu einer zweistufen, einphasigen Biogasanlage würde, also zu einer Haupt-/Nachgäreranlage.

Die Hydrolyse der polymeren Kohlenhydrate, die nicht der "Rohfaser"-Fraktion zuzuordnen sind, der Proteine und der Fette erfolgt in den untersuchten Vorstufen partiell. Eine umfangreiche Literaturrecherche hat gezeigt hat, dass die Bedingungen des Methanreaktors für diese Reaktionen vorteilhaft sind. Dies wurde auch durch die Untersuchungen dieser Studie bestätigt. Zur Erhöhung der Umsatzraten dieser Stoffgruppen ist eine separate Vorstufe daher nicht erforderlich.

2.8.2 Effizienz der Gärproduktbildung

Das zweite Ziel der Installation einer Hydrolyse- und Versäuerungsstufe ist die gleichmäßige Bereitstellung der Substratmoleküle der acetogenen und der methanogenen Bakterien. Dieses Ziel wird teilweise erreicht: Die Versäuerungsgrade der untersuchten Vorstufen lagen, bezieht man sie ausschließlich auf die oTM des frisch zugeführten Substrat (also unter rechnerischem Ausschluss der "ausgefaulten", rezirkulierten oTM), im Bereich von 16-25 %. Da die CSB-Bilanz gezeigt hat, dass 1,4 bis maximal 7,7 % des CSB zu Methan umgesetzt wird, kann die Methanbildung nicht als Grund für die limitierte Säurebildung angeführt werden. Zudem ist zu berücksichtigen, dass in BGA, die Energiepflanzen vergären, das Methan vorwiegend durch hydrogenotrophe Methanbakterien gebildet wird.

Ob ein weiterer Anstieg der Konzentration der organischen Säuren auf eine Endprodukthemmung oder auf eine kinetische Limitierung zurückzuführen ist, konnte hier nicht geklärt werden. Es ist allerdings auffällig, dass Konzentrationen organischer Säuren im Bereich von ca. 15-30 g/l sehr typisch für Versäuerungsreaktoren sind – unabhängig von der eingestellten Verweilzeit. Dies spräche für eine Endprodukthemmung als Ursache unvollständiger Umsetzung zu organischen Säuren.

2.8.3 Neubewertung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen zur Vergärung faserreicher landwirtschaftlicher Substrate

Im Hinblick auf die Hydrolyse von Faserstoffen und einen hohen Versäuerungsgrad sind Hydrolyse- und Versäuerungsstufen aus den oben genannten Gründen in Frage zu stellen. Nicht bezweifelt wird dagegen die Funktion dieser Stufen als Anmaischer. Als solche bewirken sie:

1. das Aufbrechen von großen Feststoffagglomeraten, die – direkt in den Methanreaktor eingebracht – zu langfristigem Aufschwimmen neigen können
2. die intensive Homogenisierung von Substratgemischen
3. den Ausgleich von Inhomogenitäten der Substratzusammensetzung und -konzentration
4. eine hydraulische Pufferung, die zur besseren Steuerung der Substratdosierung genutzt werden kann.

Eine Kosten-/Nutzen-Analyse der Installation oder des Betriebs eines Anmaischers müsste Gegenstand einer speziellen Untersuchung sein. Viele Betreiber sind von den genannten Vorteilen überzeugt, und keine der untersuchten Anmaischer ist bisher außer Betrieb genommen worden.

Kostenintensive Maßnahmen der Steigerung der Bioprozesseffizienz - wie Beheizung und Belüftung –sollten allerdings auf Basis der beschriebenen Zusammenhänge kritisch geprüft werden.

Auf Basis einer früheren Bewertungsgrundlage hat auch das *Biogas Forum Bayern* den Betrieb von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen zur Behandlung Lignocellulose-reicher Substrate sehr kritisch bewertet. Im Hinblick auf die Bioprozesseffizienz wurde vor allem kritisiert, dass die Verweilzeiten der in der Praxis realisierten Vorstufen für eine effiziente Lignocellulose-Hydrolyse wesentlich zu kurz sind (Effenberger et al., 2010).

2.9 Ergebnisse und Diskussion VI: Bewertung der Biogasemissionen

Cordes+Winterberg

2.9.1 Wirtschaftliche Bewertung der Methanverluste

Die wirtschaftliche Bedeutung der Emissionen der Vorstufen ist erheblich: Geht man von der Verstromung des Methans mit einem durchschnittlichen elektrischen Wirkungsgrad von 40 %, 8.000 Betriebsstunden/Jahr und einer durchschnittlichen Vergütung des eingespeisten Stroms von 0,20 €/kWh aus, verursachen die Methanemissionen der offenen Stufen im Bereich von 2-11 % des verstromten Methans Erlösminderungen von ca. 20.000-100.000 €/Jahr (Wärmeerlöse nicht berücksichtigt). Diese Summe steht zur Finanzierung eines gasdichten Abschlusses der offenen Stufen zur Verfügung.

Vergleicht man die substratspezifischen Methanerträge der 20 im Projekt bewerteten Biogasanlagen mit denjenigen einphasiger Biogasanlagen, ist allerdings eine signifikante Reduzierung des Ertrags durch offene Vorstufen nicht erkennbar (Abbildung 22). Offenbar werden die Methanverluste der offenen Stufen durch systembedingte Vorteile der zweiphasigen Anlagen (z. B. den Kaskadeneffekt seriell angeordneter Prozessstufen und die gleichmäßigere Substratversorgung der Methanstufen) ausgeglichen.

Dennoch sollte das Ziel ein minimierter Methanverlust sein. Die allgemeingültige Wirtschaftlichkeitsberechnung einer nachträglich realisierten gasdichten Abdeckung ist aufgrund der Vielfalt der Systeme, des Fehlens der Detailkenntnisse zu den materialtechnischen und statischen Rahmenbedingungen und aufgrund fehlender Referenzen kaum möglich. Dennoch kann angesichts von Gesamtkosten einer offenen Hydrolysestufe von ca. 100.000 – 120.000 € (ohne Planungs- und Finanzierungskosten, Betreiberdaten BGA 14) davon ausgegangen werden, dass eine nachträgliche gasdichte Abdeckung mit einem Gesamtkostenaufwand von nicht mehr als 125.000 € realisierbar sein sollte (Tabelle 23).

Tabelle 23: Wirtschaftlichkeitsabschätzung für die Nachrüstung einer gasdichten Vorstufenabdeckung

Komponenten	Kosten inkl. Montage (€, netto)
Planung und Genehmigung	10.000
Betondecke	20.000
2 Rührwerke für die Deckenmontage	40.000
Anpassung der Substratdosierung (Stopfschnecke)	15.000
gasführendes System	15.000
Finanzierung	25.000
Gesamtkosten	*125.000*

Im Falle einer Restlaufzeit von 10 Jahren stehen dann, grob geschätzt, jährliche Kosten in Höhe von 12.500 € Mehreinnahmen in Höhe von 20.000-100.000 € (s. o.) gegenüber. Das Ergebnis ist daher eindeutig: Eine Nachrüstung kann sich, sofern sie technisch machbar ist, rechnen. Entscheidende Faktoren sind der relative Methanverlust vor dem Repowering und die Restlaufzeit der Anlage.

2.9.2 Methanemissionen der Vorstufen vor dem Hintergrund des Klimaschutzes

2.9.2.1 Methanemissionen der Vorstufen in Relation zu den Gesamtemissionen der Biogasanlage

Die Auswertung der Messung der Biogasbildungsraten der 6 untersuchten Vorstufen landwirtschaftlicher Biogasanlagen hat gezeigt, dass ein Methanvolumen emittiert wurde, das 2,4-11 % des im BHKW verwerteten Methans entspricht. Der Mittelwert der Methanemissionen lag bei 5,1 % des im BHKW verwerteten Methans.

Methan wird nicht nur durch offene Vorstufen, sondern auch durch Güllepuffertanks, Überdruckventile, offene Gärrestlager, Leckagen und den BHKW-Schlupf emittiert. Diese Emissionen wurden im Rahmen des hier beschriebenen Projekts nicht bestimmt, doch liegen Daten aus der Untersuchung von 10 deutschen landwirtschaftlichen Biogasanlagen vor (Liebetrau et al., 2011). Diese Anlagen waren ausnahmslos nicht mit offenen Anmaischern oder Hydrolyse- und Versäuerungsstufen ausgestattet, so dass sich die Daten der beiden Projekte sinnvoll ergänzen. Ein Vergleich der Emissionen der Prozessstufen der untersuchten Biogasanlagen ist Tabelle 24 zu entnehmen.

Tabelle 24: Mittlere Methanemissionen einzelner Prozessstufen landwirtschaftlicher Biogasanlagen: Vergleich der Daten einer Studie des DBFZ mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie

Prozessstufe	mittlere relative Methanemission (%) *	Informationsquelle
Silagelagerung	0,00069	DBFZ 2011
Beschickung	0,086	DBFZ 2011
offene Vorstufen (Anmaischer, H+V-Stufen)	**5,1**	**vorliegende Studie**
Fermenter mit Folienabdeckung	0,0064	DBFZ 2011
Fermenter mit Betonabdeckung	0,015	DBFZ 2011
Überdrucksicherung	nb	
Fackel	nb	
Separator	0,07	DBFZ 2011
Gärrückstandslager	**3,5**	**DBFZ 2011**
BHKW	**1,7**	**DBFZ 2011**

* Bezug: Die Daten des DBFZ beziehen sich auf den maximalen Stromertrag des BHKW, der Wert der vorliegenden Studie auf den Stromertrag, der während der ausgewerteten Referenz-Betriebsphase tatsächlich erreicht wurde. Dieser Wert liegt in der Regel geringfügig unterhalb des maximalen Stromertrags.

Aus Sicht der Statistik besteht sicherlich die Notwendigkeit, die zurzeit verfügbaren Daten zu den Methanemissionen zu vertiefen und zu ergänzen. Dennoch machen die vorliegenden Daten die wesentlichen Emissionsquellen landwirtschaftlicher Biogasanlagen deutlich erkennbar: Die offenen Vorstufen tragen wesentlich zu den Methanemissionen einer Biogasanlage bei. Dazu kommen zwei weitere Quellen von Methanverlusten, deren Bedeutung als erheblich eingeschätzt wird, zu denen aber zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Berichts noch geforscht wurde: die Überdruckventile und die Gasfackeln.

Die Bewertung dieser Ergebnisse aus Sicht des Klimaschutzes muss berücksichtigen, dass nur ca. 12 % der deutschen landwirtschaftlichen Biogasanlagen mit offenen Vorstufen ausgestattet sind (s. u.) so dass die Relevanz für den Klimaschutz mit derjenigen der offenen Gärrestlager nicht zu vergleichen ist (s. folgendes Kapitel).

2.9.2.2 Methanemissionen der Vorstufen in Relation zu den Gesamtemissionen des deutschen Biogasanlagenbestands und der deutschen Viehhaltung

Geht man davon aus, dass 16 % der deutschen Biogasanlagen mit Anmaischern oder H+V-Stufen ausgestattet sind (Tabelle 1) und nimmt man außerdem an, dass alle Vorgruben und Anmaischer offen, aber 50 % der H+V-Stufen gasdicht ausgelegt sind (Ergebnis dieser Studie), dann sind ca. 12 % der deutschen landwirtschaftlichen Biogasanlagen mit offenen Vorstufen ausgestattet.

Der hier ermittelte durchschnittliche Methanverlust der BGA mit offenen Vorstufen von 5,1 % des energetisch verwerteten Methans verursacht dann, bezogen auf den gesamten landwirtschaftlichen Anlagenbestand, einen durchschnittlichen Methanverlust, der ca. 0,6 % des energetisch verwerteten Methans ausmacht. Dies entspricht 46.000 t Methan/Jahr (Berechnung nicht dargestellt).

Die nachfolgende Tabelle ermöglicht den Vergleich der Methanemissionen der Vorstufen mit den gesamten Methanemissionen des deutschen Biogasanlagen-Bestands sowie mit den Methanemissionen der deutschen Viehhaltung. Der Vergleich sollte allerdings unter Berücksichtigung der Tatsache gewertet werden, dass die komplexen Zusammenhänge, die die Emission klimarelevanter Gase beeinflussen, bislang nicht hinreichend genau beschreibbar sind (Memmler et al., 2014). Zudem erscheint die Gesamtemission offener Vorstufen im Vergleich zur Emission des deutschen Biogasanlagenbestands überhöht. Insgesamt erscheint eine Neubewertung des Emissionsverhaltens der Biogasanlagen auf Basis der aktuellen Forschungsprojekte sinnvoll zu sein.

Tabelle 25: Methanemissionen der Anmaischer und Hydrolyse- und Versäuerungsstufen der deutschen landwirtschaftlichen Biogasanlagen im Vergleich zu den Methanemissionen der deutschen Tierhaltung

Methanquelle	Emissionen	Einheit	Informationsquelle
deutsche Tierhaltung	1.239.300	t/a	UBA, 2017
deutscher Biogasanlagenbestand [1]	302.571	t/a	Memmler et al., 2014
	241.920	t/a	Memmler, et al. 2017
Anmaischer und H+V-Stufen der deutschen landwirtschaftlichen Biogasanlagen [2]	46.000	t/a	vorliegende Studie

[1] BGA zur Verwertung von Bioabfällen und landwirtschaftlichen Biomassen
[2] Annahme: 8.000 BGA, davon 12 % (entsprechend 960 BGA) mit offenen Vorstufen (vgl. Text)

Die Methanemissionen der offenen Vorstufen der landwirtschaftlichen Biogasanlagen liegen, berechnet auf Basis der beschriebenen Annahmen, bei 3,7 % der Methanemissionen der deutschen Viehhaltung. Dieses Ergebnis muss aber vor dem Hintergrund bewertet werden, dass Biogasanlagen in signifikantem Umfang zur Minderung von Treibhausgasen beitragen.

Da der Einfluss der offenen Vorstufen auf die gesamten Methanemissionen der deutschen Viehhaltung relativ gering ist, und da - auch aus politischer Sicht - Planungssicherheit der Betriebe ein hohes Gut sein sollte, ist ein nachträglicher ordnungsrechtlicher Eingriff in bestehende Anlagen aus Klimaschutzgründen nicht gerechtfertigt. Regelungen zur zukünftig gasdichten Ausführung von Vorstufen erscheinen jedoch geboten.

2.9.3 Betriebssicherheit und Arbeitsschutz

Im Bereich offener Vorstufen können Risiken auftreten, die für Biogasanlagen im Allgemeinen typisch sind und die daher im einschlägigen Sicherheits- und Arbeitsschutzregelwerk berücksichtigt worden sind. Unterschätzt werden allerdings die Gefahren, die durch die gasförmigen Emissionen offener Vorstufen verursacht werden können. Dies sind vor allem:

1. Explosion eines zündfähigen Gemischs
2. Toxische Wirkung des Biogases, vor allem durch Schwefelwasserstoff
3. Erstickungsgefahr durch Kohlendioxid
4. Infektionsrisiken durch Mikroorganismen (*biologische Arbeitsstoffe*) in Aerosolen

Unfälle, die den oben genannten Risikobereichen zugeordnet werden müssen, sind den Autoren der vorliegenden Studie zwar nicht bekannt, doch sollten vor allem Unwägbarkeiten im Bereich des Explosionsschutzes näher betrachtet werden, da im Falle der Nichtbeachtung dieses Risikos fatale Folgen ausgelöst werden könnten.

2.9.3.1 Regelwerk

Die übergeordneten Regelungen zur Betriebssicherheit im Allgemeinen sind in der Betriebssicherheitsverordnung definiert worden (BetrSichV 2015). Eine Zusammenfassung der für Biogasanlagen relevanten Festsetzungen wurde durch den Fachverband Biogas erarbeitet (Fachverband Biogas 2015). In diesem Zusammenhang weist der Fachverband darauf hin, dass nicht alle Regelungen, die für Biogasanlagen Bedeutung haben, eindeutig geregelt sind. Die Klärung von Auslegungsfragen ist daher erforderlich (Fachverband Biogas 2015).

Explosionsschutz. Ein wesentliches Thema der Betriebssicherheitsverordnung ist die Gefährdungsbeurteilung (§ 3 BetrSichV), die auch den Explosionsschutz umfassen muss. Dieses Thema ist, abweichend von früheren Fassungen der Betriebssicherheitsverordnung, nun in der Gefahrstoffverordnung geregelt worden (GefStoffV 2015). Die Gefahrstoffverordnung regelt mit dem § 1.6 die *Mindestvorschriften für den Explosionsschutz bei Tätigkeiten in Bereichen mit gefährlichen explosionsfähigen Gemischen*. Paragraph 1.7 definiert Zonen explosionsgefährdeter Bereiche.

Die aus der Betriebssicherheits- und der Gefahrstoffverordnung abgeleiteten Anforderungen an Biogasanlagen sind mit der *Technischen Regel für Gefahrstoffe* zu *Tätigkeiten bei der Herstellung von Biogas - TRGS 529* (AGS 2015) konkretisiert worden. Detaillierte Regelungen zum Explosionsschutz sind Gegenstand dieser technischen Regel. Die Technische Regel TRGS 529 nimmt daher eine zentrale Position innerhalb des Regelwerks an, was die Sicherheit und den Arbeitsschutz beim Umgang mit Biogasen angeht.

Im Hinblick auf den Explosionsschutz werden die bereits in der Gefahrstoffverordnung formulierten Regelungen durch die folgenden Technischen Regeln detailliert ausgeführt:

1. Technische Regeln für Betriebssicherheit TRBS 2152, zugleich Technische Regeln für Gefahrstoffe TRGS 720: Gefährliche explosionsfähige Atmosphäre - Allgemeines
2. Technische Regeln für Betriebssicherheit TRBS 2152 Teil 1, zugleich Technische Regeln für Gefahrstoffe TRGS 721: Gefährliche explosionsfähige Atmosphäre - Beurteilung der Explosionsgefährdung (2006)
3. Technische Regeln für Betriebssicherheit TRBS 2152 Teil 2, zugleich Technische Regeln für Gefahrstoffe TRGS 722: Vermeidung oder Einschränkung gefährlicher explosionsfähiger Atmosphäre (2012)
4. Technische Regeln für Betriebssicherheit TRBS 2152 Teil 3: Gefährliche explosionsfähige Atmosphäre – Vermeidung der Entzündung gefährlicher explosionsfähiger Atmosphäre (2009)
5. Technische Regeln für Betriebssicherheit TRBS 2152 Teil 4: Gefährliche explosionsfähige Atmosphäre - Maßnahmen des konstruktiven Explosionsschutzes, welche die Auswirkung einer Explosion auf ein unbedenkliches Maß beschränken (2012)
6. Technische Regeln für Betriebssicherheit TRBS 2153: Vermeidung von Zündgefahren infolge elektrostatischer Aufladungen (2009)

Das gesamte berufsgenossenschaftliche Regelwerk zum Explosionsschutz ist zur DGUV- Explosionsschutz-Regel 113-001 (DGUV 2015) zusammengefasst worden.

Die für den Betrieb von Biogasanlagen relevanten Bestimmungen des insgesamt sehr komplexen Regelwerks zur Betriebssicherheit und zum Arbeitsschutz hat die Landwirtschaftliche Berufsgenossenschaft zu einer Broschüre zusammengefasst (LBG 2015).

Andere Gefährdungen. Zu den Gefährdungen durch andere Bestandteile des Biogases (toxische Wirkung des Schwefelwasserstoffs, erstickende Wirkung des Kohlendioxids und allergene oder infektiöse Wirkung biologischer Arbeitsstoffe) wird auf das einschlägige Regelwerk verwiesen.

2.9.3.2 Explosionsgefährdungen durch Biogase offener Vorstufen: Stand des Wissens

Die typischen Biogase offener Vorstufen, die sich in der Regel deutlich vom Biogas der Hauptfermenter, Nachgärer und Gärrestlager unterscheiden, sind bislang von den Regelungen zum Explosionsschutz bestenfalls am Rande behandelt worden. Dies steht im Widerspruch zur weiten Verbreitung offener Vorstufen.

Die Bundesanstalt für Materialprüfung (BAM) hat verschiedene Gasgemische, die auch Methan und/oder Wasserstoff enthielten, hinsichtlich der unteren und der oberen Explosionsgrenzen untersucht (Schröder, 2002, 2013). Folgende Gasgemische wurden u. a. untersucht:

1. Methan/Kohlendioxid/Luft (Biogas/Luft)
2. Methan/Wasserstoff/Luft
3. Wasserstoff/Luft

Geht man davon aus, dass die Biogase der Vorstufen

1. Methan/Kohlendioxid/Luft-,
2. Wasserstoff/Kohlendioxid/Luft- oder
3. Methan/Wasserstoff/Kohlendioxid-

Gemische sind, stehen für die Szenarien (2) und (3) keine Untersuchungsergebnisse zur Verfügung. Die Explosionsgrenzen der Methan/Kohlendioxid/Luft-Gemische hängen wesentlich von den Konzentrationen der einzelnen Gase ab. Diese wurden im Rahmen der Versuche der BAM auf Biogase der Fermenter, Nachgärer und Gärrestlager abgestimmt, so dass hinsichtlich der Explosionsgrenzen der Methan/Kohlendioxid/Luft-Gemische der Vorstufen erhebliche Unsicherheiten bestehen.

Immerhin sind für Methan/Kohlendioxid-Gemische in Luft Ergebnisse veröffentlicht worden (Molnarne, 2007), die zeigen, dass auch Biogase mit einem geringen Methan- und einem hohen Kohlendioxidanteil in bestimmten Mischungsverhältnissen mit Luft explosionsfähig sind. So sind Biogase der Vorstufen mit einem typischen Methan/Kohlendioxidverhältnis von ca. 30/70 bis 20/80 explosionsfähig, wenn die Methankonzentration im Biogas/Luft-Gemisch bei ca. 5-9 % liegt.

Diese Daten zeigen, dass im Umfeld offener Vorstufen mit dem Auftreten explosiver Gasgemische gerechnet werden muss. Diese Auffassung wurde auch durch die *Kommission für Anlagensicherheit* vertreten (KAS 2009). Ergänzungen des Regelwerks sind daher erforderlich.

3. Zusammenfassung

ttz Bremerhaven, Hochschule Anhalt, Cordes+Winterberg

3.1 Ergebnisse

Kernaussagen auf einen Blick

Die vorliegende Studie liefert Beiträge zur Neubewertung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen im Bereich der landwirtschaftlichen Biogasanlagen:

1. Die vorliegende Studie stellt die erste Hersteller-unabhängige Untersuchung landwirtschaftlicher Hydrolyse- und Versäuerungsstufen in Deutschland dar. Die ermittelten Betriebsbedingungen der Großanlagen weichen signifikant von denjenigen ab, die für zahlreiche Labor- und Technikumsstudien zur Hydrolyse und Acidogenese gewählt wurden.
2. Die angestrebte Optimierung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen wird eingeschränkt durch die Anmaischerfunktion und ihre Anforderung an die Prozessführung.
3. Die substratspezifischen Methanerträge der untersuchten ein- und zweiphasigen Biogasanlagen unterschieden sich bei vergleichbarer hydraulischer Verweilzeit nicht signifikant. Dies gilt auch für den Vergleich von Biogasanlagen mit offenen und gasdichten Vorstufen.
4. Die Methanemissionen der untersuchten, nicht gasdichten Anmaischer und Hydrolysestufen machten 2,4 bis 11 % des verstromten Methans aus und sind daher relevant für Betriebswirtschaft sowie Klima- und Arbeitsschutz.
5. Eine signifikante Hydrolyse von Faserstoffen konnte in den untersuchten Hydrolysestufen nicht nachgewiesen werden. Eine vom Methanreaktor getrennte Reaktionsstufe bringt daher hinsichtlich der zentralen Funktion der Faserstoff-Hydrolyse keine spürbaren Vorteile.
6. Der häufiger beobachtete Leistungsvorteil zweiphasiger Biogasanlagen gegenüber einphasigen Systemen dürfte bei vergleichbarem Faulraumvolumen vor allem auf die intensive Homogenisierung des Substratgemischs im Anmaischer und auf den Kaskadeneffekt seriell betriebener Reaktoren zurückzuführen sein.

In der Summe wird die Leistungsfähigkeit von Anmaischern und zweistufigen Reaktorkonfigurationen bestätigt. Die Wirksamkeit kleinvolumiger Hydrolysestufen mit kurzen Verweilzeiten muss allerdings, vor allem hinsichtlich der Hydrolyse von Faserstoffen, bezweifelt werden.

Die erzielten Ergebnisse sind nur bedingt auf zweiphasige Biogasanlagen in anderen Technologiesektoren (vor allem Abwasserreinigung, Bioabfallbehandlung) übertragbar, da dort andere Anforderungen an Hydrolyse- und Versäuerungsreaktoren gestellt werden.

1. Feldstudie mit Alleinstellungsmerkmal. Die vorliegende Studie stellt die erste Hersteller-unabhängige Untersuchung landwirtschaftlicher Hydrolyse- und Versäuerungsstufen in Deutschland dar. Die ermittelten Betriebsbedingungen der Großanlagen weichen signifikant von denjenigen ab, die für zahlreiche Labor- und Technikumsstudien zur Hydrolyse und Acidogenese gewählt wurden.
2. Anlagenanbieter und Betreiber. Die 27 wesentlichen Anbieter von Vorstufen zur Realisierung zweiphasiger landwirtschaftlicher Biogasanlagen und 60 Betreiber solcher Anlagen wurden ermittelt. Das erfasste Spektrum kann als repräsentativ gewertet werden. 20 ausgewählte zweiphasige Biogasanlagen wurden besucht, die Betriebsdaten wurden ausgewertet. Aus dieser Gruppe wurden 6 Biogasanlagen für die experimentelle Untersuchung ausgewählt.
3. Verfahrensvarianten. Das Spektrum der angewandten Verfahrenstechniken zweiphasiger Biogasanlagen ist sehr weit: es umfasst separate Vorstufen und in die Methanstufe integrierte Versäuerungszonen, offene und gasdicht geschlossene Stufen, belüftete Hydrolyse- und Versäuerungsreaktoren und unterschiedlichste Durchmischungstechniken. Am Markt zeichnet sich eine dominante Technik noch nicht ab. Dies zeigt, dass sich zweiphasige landwirtschaftliche Biogasanlagen noch in einer frühen Entwicklungsphase befinden. Dafür

spricht auch, dass 39 % der untersuchten Vorstufen nach dem Bau wesentlich modifiziert oder sogar außer Betrieb genommen wurden. Die oTM-Raumbelastugen der 6 untersuchten Vorstufen lagen im Bereich von 32-150 kg oTM/m³ d, die Substratverweilzeiten betrugen 0,32-2,6 d.

4. Anmaischer oder Hydrolysestufe? Die angestrebte Optimierung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen wurde erheblich eingeschränkt durch die Anmaischerfunktion und ihre Anforderung an die Prozessführung. Hydrolyse- und Versäuerungsstufen sind in landwirtschaftlichen Biogasanlagen primär Anmaischer: Aus technischen und ökonomischen Gründen lässt sich in der landwirtschaftlichen Praxis eine separate Hydrolyse und Versäuerung nur durch eine entsprechende Prozesskinetik erreichen, d. h. durch hinreichend kleine Vorstufen. Dies führt bei NawaRo-Anlagen zu einem sehr hohen TS-Gehalt in der Vorstufe, der pump- und rührtechnisch nur beherrscht werden kann, wenn die Feststoffe mit Flüssigkeiten angemaischt werden. In Ermangelung ausreichender Güllemassen kommt in den untersuchten Anlagen ausnahmslos und vor allem Rezirkulat von Fermenterinhalt oder Gärrest zum Einsatz (Rezirkulat/Substrat-Quotienten von 0,75-3,4), so dass der H+V-Stufe aktive methanogene Kulturen zugeführt werden, die trotz der kurzen Verweilzeiten nennenswerte Aktivitäten entwickeln. Dies konnte durch Populationsanalysen bestätigt werden. Das Rezirkulat/Substrat-Massenverhältnis hat einen sehr ausgeprägten Einfluss auf die bioprozesstechnischen Rahmenbedingungen.

5. Polymerhydrolyse optimal im pH-Neutralbereich. Eine kritische Literaturanalyse zu den bioprozesstechnischen Optima der Polymerhydrolyse hat gezeigt, dass neutrale pH-Werte für die Hydrolyse vorteilhaft sind. Dies gilt für Proteine, Fette und Kohlenhydrate, also auch für die geschwindigkeitsbestimmende Hydrolyse der Cellulose. Auch die in dieser Studie ermittelten Abbaugrade der organischen Verbindungen (gemäß Weender Analyse) zeigen ein Optimum bei den höchsten untersuchten pH-Werten (6,9 und 7,0). Die Rezirkulation von ausgefaultem Material kommt dieser Anforderung entgegen.

6. Abbau der Faserstoffe. Ein signifikanter Abbau der "Faserstoffe" konnte in keiner der untersuchten Hydrolysestufen und Anmaischer nachgewiesen werden. Dies kann mit den sehr kurzen Verweilzeiten der Substrate einerseits und den Desintegrations- und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von 0,1-0,3 d^{-1} (für Cellulose) erklärt werden.

7. Abbau der Proteine, Fette und "NfE". Die in den Vorstufen erreichten Abbaugrade der Proteine, Fette und stickstofffreien Extraktstoffe (NfE) lagen durchschnittlich bei 6 %, 23 % und 37 %. Milchsäure wurde nahezu vollständig umgesetzt. Der Abbaugrad der organischen Substratbestandteile stieg mit erhöhtem Rezirkulat/Substrat-Quotienten an. Dies kann auf die positive Korrelation des Quotienten und des pH-Werts erklärt werden.

8. Säurebildung. Die Umsatzbilanzierung hat gezeigt, dass, gemessen an der oTM, 15,6-25,4 Masse-% des frisch zugeführten Substrats zu Gärprodukten, vor allem Essig-, n-Butter- und Propionsäure umgesetzt werden. Auch die Säurebildung korreliert positiv mit dem Rezirkulat/Substrat-Quotienten und somit auch dem pH-Wert.

9. Produkthemmung oder kinetische Limitierung der Säurebildung? Es fällt auf, dass die Gesamtkonzentration der organischen Säuren in den untersuchten Vorstufen im Bereich um 20 g/l liegt. Studien anderer Autoren weisen für Versäuerungsstufen vergleichbare Summenkonzentrationen aus. Dies gilt auch dann, wenn – wie für die hier untersuchten Vorstufen nachgewiesen – der Versäuerungsgrad niedrig ist. Als Erklärung kann eine Produkthemmung angenommen werden, da einschlägige Untersuchungen anderer Autorengruppen gezeigt haben, dass die Acidogenese aufgrund einer Endprodukthemmung im genannten Konzentrationsbereich zum Erliegen kommt. Alternativ kann der relativ niedrige Versäuerungsgrad auf eine kinetische Limitierung zurückgeführt werden.

10. Methanemissionen. Die Methanemissionen der offenen Vorstufen sind relevant: Sie lagen bei den untersuchten Vorstufen im Bereich zwischen 2,4 und 11 % des verstromten Methans. Einen wesentlichen Einfluss auf die Höhe der Methanemissionen hat der relative Volumenanteil der offenen Vorstufe am gesamten Fermentervolumen.

11. Wasserstoffemissionen. Exemplarisch durchgeführte Bestimmungen der Wasserstoffkonzentration im Biogas der Vorstufen zeigen, dass die Wasserstoffkonzentrationen aufgrund der Rezirkulation methanogener Kulturen mit Konzentrationen von 183-9.060 ppm gering sind. Sie werden erwartungsgemäß durch die Prozessbedingungen (Rezirkulat/Substrat-Quotient, pH, Temperatur) beeinflusst. Da der Wasserstoffpartialdruck in der Suspension Einfluss auf das Gärungsspektrum hat, lassen sich durch die Wahl geeigneter Prozessbedingungen Hydrolyse und Acidogenese optimieren. Die Rezirkulation methanogener Mikroorganismen wirkt sich positiv auf das Gärungsspektrum aus, da die Methanbildner niedrige Wasserstoffpartialdrücke verursachen und damit das Gärungsspektrum zugunsten der Essigsäure verschieben.

12. Wirtschaftlichkeit einer gasdichten Abdeckung. Die Kosten eines nachträglichen gasdichten Abschlusses offener Vorstufen lässt sich aufgrund der heterogenen technischen und betrieblichen Strukturen nicht präzise benennen. Eine Abschätzung der zu erwartende Kosten zeigt jedoch, dass unter durchschnittlichen Bedingungen ein Umbau durch den erhöhten Methan- und damit Stromertrag refinanziert werden kann. Dies gilt vorbehaltlich der technischen Eignung der Vorstufe für einen Umbau. Neubauten sollten grundsätzlich gasdicht ausgeführt werden.

13. Arbeitsschutz. Der Fachliteratur kann entnommen werden, dass Biogase der Vorstufen mit einem typischen Methan/Kohlendioxidverhältnis von ca. 30/70 bis 20/80 explosionsfähig sind, wenn die Methankonzentration im Biogas/Luft-Gemisch bei ca. 5-9 % liegt. Derartige Gasgemische konnten in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Von nicht gasdicht abgeschlossenen Vorstufen kann daher eine Explosionsgefahr ausgehen.

14. Klimaschutz. Mit Methanemissionen, die 2,4-11 % (durchschnittlich 5,1 %) des verstromten Methans einer landwirtschaftlichen Biogasanlage ausmachen, gehören die nicht gasdicht abgeschlossenen Vorstufen zu den wesentlichen methanemissionsquellen einer Biogasanlage. Da nur ca. 12 % der deutschen landwirtschaftlichen Biogasanlagen mit einer nicht gasdichten Vorstufe ausgestattet sind, entspricht dies ca. 0,6 % des verstromten Methans des deutschen landwirtschaftlichen Biogasanlagenbestands.

15. Bakterienpopulation der Vorstufen. Die Bakterienpopulation der Vorstufen setzt sich zusammen aus den über die Substrate sowie das Rezirkulat eingetragenen Bakterien. Aufgrund der hohen Rezirkulationsraten sind die Vorstufen durch Populationszusammensetzungen gekennzeichnet, die denen der Methanfermenter, Nachgärer und Gärrestlager sehr ähnlich ist. Spezifische Ausprägungen der acidogenen Populationen sind aufgrund dieser Überlagerung nicht erkennbar. Auch ein Einfluss der Substrate, der Jahreszeit oder Vorstufenfunktion (Anmaischer oder Hydrolyse/Versäuerung) auf die Populationszusammensetzung ist nicht erkennbar. Sichtbar sind dagegen ungleichmäßige Dosierungsraten, die zu variablen Populationszusammensetzungen führen sowie die fest/flüssig-Separation des Gärrests, die zu einer Verringerung des Anteils methanogener Bakterien an der Gesamtpopulation führt.

16. Technikumsversuchen des ttz. Die Technikumsversuche haben sich als besondere Herausforderung in Bezug auf ein Down-Scaling aus dem großtechnischen Maßstab erwiesen. Insbesondere die Mischtechnik, die Fütterung sowie die Entnahme repräsentativer Proben gestaltete sich aufgrund der Materialeigenschaften schwieriger als geplant.

17. Hydrolyse in den Technikumsversuchen des ttz. Die Technikumsversuche haben gezeigt, dass auch unter Laborbedingungen und in kleinem Maßstab unter den gewählten Bedingungen (Verweilzeiten 1 – 10 Tage, Rezirkulat/Substrat-Quotient 2,85) keine signifikante Hydrolyse nachgewiesen werden konnte. Erst bei einer Erhöhung des Rezirkulatanteils (R/S-Quotient 4) konnte bei Verweilzeiten von 8 Tagen ein Abbau von TS bzw. oTS (zumindest für Grassilage) wahrgenommen werden, was auf Hydrolysevorgänge hindeutet.

18. Bildung flüchtiger organischer Säuren in den Technikumsversuchen des ttz. Anhand der Verringerung des pH Wertes mit zunehmender Versuchsdauer (besonders ausgeprägt bei Maissilage als Substrat) konnte die Bildung von Säuren nachgewiesen werden. Eine detaillierte Untersuchung der flüchtigen Fettsäuren ergab, dass ein breites Spektrum organischer Säuren nachgewiesen werden konnte, insbesondere Hexansäure (Capronsäure) war bei dem mit Maissilage betriebenen Reaktor in auffallend hoher Konzentration detektierbar.

19. Gasbildung in den Technikumsversuchen des ttz. Die Technikumsversuche haben weiterhin gezeigt, dass signifikante Mengen an Gas (CO_2 in höheren Konzentrationen, CH_4 in geringen Konzentrationen) bereits kurz nach Substratzufuhr gebildet werden. Die Tatsache, dass CH_4 gebildet wird, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in den zugefütterten Substraten bereits organische Säuren enthalten gewesen sein müssen (Milchsäure, evtl. Essigsäure).

20. Modellierung des ttz. Anhand der Modellierung konnte auf Basis des verwendeten, auf einer Monod-Kinetik basierenden Modells unter bestimmten Annahmen auch mathematisch gezeigt werden, dass eine signifikante Hydrolyse von Cellulose bei den üblicherweise eingestellten Verweilzeiten in der Hydrolyse und Versäuerung nicht in nennenswerten Umfang erfolgt.

21. Zweistufige vs. einstufige Biogasanlagen. Ein signifikanter Effizienzunterschied zweiphasiger und einphasiger Biogasanlagen (deren Leistungsdaten den Datenbanken der Autoren entnommen wurden), ist nicht erkennbar (n=27). Stattdessen konnte bestätigt werden, dass der spezifische Methanertrag – unabhängig von der Anlagenkonfiguration – massgeblich durch die oTM-Raumbelastung und die Substratverweilzeit bestimmt wird. Ein signifikanter Rückgang des spezifischen Methanertrags konnte beim Überschreiten einer oTM-Raumbelastung von 3 kg oTM/m³ d sowie beim Unterschreiten einer Substratverweilzeit von 50 d beobachtet

werden.

22. Gasdichte vs. offene Vorstufen. Ein signifikanter Unterschied der substratspezifischen Methanerträge zweiphasiger Biogasanlagen mit offenen und gasdichtdicht geschlossenen Vorstufen ist nicht erkennbar (n=20). Unter der Voraussetzung, dass die gasdicht ausgelegten Stufen tatsächlich gasdicht sind, liegt die Erklärung in der stark ausgeprägten, systemtypischen Messwertstreuung, die die Im Bereich von ca. 2-10 % liegenden Methanverluste offener Vorstufen überlagert. Es ist davon auszugehen, dass gasdicht ausgelegte Vorstufen im Vergleich zu offenen Vorstufen einen signifikant höheren substratspezifischen Methanertrag erzielen.

23. Praxistauglichkeit gasdichter Vorstufen. Der Betrieb gasdichter Vorstufen ist machbar. Betreiber offener Vorstufen argumentieren häufig, aufgrund der hohen technischen Anforderungen an das Anmaischen der schüttbaren Substrate sei der freie Zugang zum Inneren der Vorstufe essentiell, so dass auf den gasdichten Verschluss verzichtet werden müsse. Die Feldstudie zur Analyse landwirtschaftlicher zweiphasiger Biogasanlagen hat jedoch gezeigt, dass gasdicht geschlossene Vorstufen beherrschbar sind. Dies gilt auch für schwierige Substrate, z. B. solche mit sehr hohem Grasanteil.

24. Durchmischungskonzept. Langsam laufende Propeller- oder Paddelrührwerke mit vertikaler, diagonal angeordneter oder horizontaler Achse scheinen die anzumaischenden Schüttgüter besonders effizient einzumischen. Auch Vorstufen mit schnelllaufenden Rührwerken sind beherrschbar, setzen aber einen hohen Betreuungsaufwand voraus.

25. Option für "schwierige" Substrate. Zweiphasige Biogasanlagen haben den Vorteil, dass durch die intensive Durchmischung in der Vorstufe auch "schwierige" Substrate wie Grassilage und Festmist, homogen in den Fermenter eingebracht werden können. In Verbindung mit gasdichtem Abschluss der Vorstufe und Kaskadeneffekt lassen sich z. B. auf der Basis von "Landschaftspflegegras" Biogasanlagen erfolgreich betreiben. Dies kann für Konzepte einer nachhaltigen Grünlandbewirtschaftung wichtig sein: Im Zusammenhang mit dem aktuellen Rückgang von Viehbeständen planen viele Landwirtschaftsbetriebe die Verwertung des überschüssigen Grünlandaufwuchses durch ihre Biogasanlage. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass zweiphasige Biogasanlagen mit gasdichter Vorstufe und leistungsfähiger Rührtechnik erhöhte Investitionskosten aufweisen.

26. Resumee: Hydrolysestufen zu klein für wirksame Faserstoffhydrolyse. Zusammenfassend wird die Leistungsfähigkeit von Anmaischern (Basis: Feldbeobachtungen und Betreibergespräche) und zweistufigen Reaktorkonfigurationen (Basis: Betriebsdatenauswertungen) bestätigt. Die Wirksamkeit kleinvolumiger Hydrolysestufen mit kurzen Verweilzeiten muss allerdings im Zusammenhang mit der Energiepflanzenvergärung, vor allem hinsichtlich der Hydrolyse von Faserstoffen, bezweifelt werden.

27. Zweiphasensysteme in anderen Wirtschaftsbranchen. Die erzielten Ergebnisse sind nur bedingt auf zweiphasige Biogasanlagen in anderen Technologiesektoren (vor allem Abwasserreinigung, Bioabfallbehandlung) übertragbar, da dort andere Anforderungen an Hydrolyse- und Versäuerungsreaktoren gestellt werden.

3.2 Optimierungsoptionen und Empfehlungen

Vorstufen, die dem Anmaischen und/oder der Substrathydrolyse dienen, verursachen zusätzliche Kosten, die durch die Reduzierung von Betriebskosten oder die Erhöhung der bioprozesstechnischen Anlageneffizienz mindestens ausgeglichen werden müssen. Zweifellos sind zweiphasige Biogasanlagen im Vergleich mit eistufigen Systemen durch folgende Vorteile gekennzeichnet:

1. Intensive Homogenisierung der Substratmischung außerhalb des Fermenters und damit gleichmäßigere Substratdosierung sowie Reduzierung der Bildung ungleichmäßiger Schwimmschichten im Fermenter
2. Kaskadeneffekt, der den Direktaustrag nicht vergorenen Materials, die sogenannte "Kurzschlussströmung", signifikant verringert

Ist die Investition bereits erfolgt, ist die Nutzung der Vorstufe – eine effiziente Rührtechnik vorausgesetzt – also sinnvoll. Für bestehende Anmaischer oder Hydrolyse- und Versäuerungsstufen bestehen folgende Optimierungsmöglichkeiten:

1. Gasdichte Ausführung der Vorstufe. Für zukünftige Biogasanlagen wird eine gasdichte Auslegung der Vorstufen dringend empfohlen, um den Anforderungen der Anlageneffizienz, des Arbeitsschutzes und des Klimaschutzes zu entsprechen. Auch für bestehende, nicht gasdichte Vorstufen kann sich die nachträgliche gasdichte Abdeckung lohnen, sofern der Umbau aus technischer Sicht möglich ist. Wesentlich beeinflusst wird die

Wirtschaftlichkeit einer Umbaumaßnahme vom Ausmaß der Methanemission sowie von der Restlaufzeit der Anlage.

2. Rührtechnik. Ein Nebenergebnis dieser Studie, das nicht durch systematische Untersuchungen, sondern durch die Beobachtungen während der Messkampagnen an den Großanlagen abgeleitet werden kann, betrifft die Rührwerkstechnik: Es war deutlich erkennbar, dass langsam laufende Propeller- oder Paddelrührwerke eine überzeugende Durchmischungsleistung zeigten, während schnell laufende Propellerrührwerke in den Maischen mit TM-Konzentrationen um 10 % nicht sehr wirksam zu sein schienen, auch nicht in der Form eines Zwangsmischers. Die beobachtete Mindereffizienz dieser Rührwerke konnte von den Anlagenfahrern durch geschickte Handhabung ausgeglichen werden, doch nahm diese viel Zeit und elektrische Energie in Anspruch. Langsam laufende Rührwerke sind daher in Anmaischern und Hydrolysestufen der Energiepflanzen-BGA zu bevorzugen.

3. Rezirkulationsrate. Zur Anmaischung der schüttbaren Substrate landwirtschaftlicher Biogasanlagen reicht die verfügbare Gülle in der Regel nicht aus. Daher muss zusätzlich Fermenter- oder Gärrückstandslager-Inhalt rezirkuliert werden. Je geringer die Feststoff-Konzentration des Rezirkulats ist, desto wirksamer kann die Feststoffkonzentration in der Vorstufe abgesenkt werden. Eine fest/flüssig-Trennung des Rezirkulats ist daher aus bioprozesstechnischer Sicht sinnvoll, muss aber auch unter Berücksichtigung der Investitions- und Betriebskosten bewertet werden. Vor allem im Falle knapp bemessener Gärrestlager lässt sich die optimierte Rezirkulation mit der Reduzierung des Gärrestvolumens verknüpfen.

   Die Rezirkulation von Gärrest, also von ausgefaultem Material, verkürzt die Verweilzeit des frisch zugeführten Substrats in der Vorstufe und beeinflusst die Abbaugrade aus kinetischen Gründen negativ. Bakterien, deren minimale Generationszeit oberhalb der Verweilzeit liegt, können sich in der Vorstufe nicht vermehren – sie werden aber, sofern sie in den Methanreaktoren geeignete Lebensbedingungen finden, über das Rezirkulat in die Vorstufe eingetragen. Zudem nähern sich die Kultivierungsbedingungen der Vorstufe mit steigendem Rezirkulat/Substrat-Quotienten denjenigen der Methanstufe an. Dies wirkt sich positiv auf die Substratumsatzraten und -grade aus.

4. pH-Wert. Vor allem der durch die Rezirkulation steigende pH-Wert bewirkt nachweisbar erhöhte Umsatzleistungen, da das pH-Optimum aller relevanten heterotrophen Mikroorganismen der Biogasanlage mit Ausnahme der auf gut abbaubaren Substraten wachsenden acidogenen Bakterien im Neutralbereich liegt.

5. Temperatur. Offene Vorstufen sollten mit möglichst niedrigen Temperaturen betrieben werden, um Energieverluste durch Methan- (und ggf. Wasserstoff-) Emissionen zu minimieren. Soll die bioprozesstechnische Effizienz gasdichter Vorstufen optimiert werden, gelten die bekannten Temperaturoptima der meso- und der thermophilen Mikroorganismen.

6. Belüftung. Einige Planer und Hersteller empfehlen die Belüftung der Hydrolysestufen. Der Effekt der Belüftung wurde in dieser Studie nicht gezielt untersucht, so dass zur Frage der Belüftung keine Empfehlung gegeben wird. Ein signifikanter Effekt der Belüftung war allerdings in den untersuchten Anlagen nicht feststellbar.

7. Additive. Dass landwirtschaftliche Biogasanlagen, vor allem im Falle der Verwertung von Energiepflanzen, Spurenelemente benötigen, ist allgemein bekannt. Zur Wirksamkeit weiterer Additive liegen zahlreiche Untersuchungen mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen vor. Das Thema wird in der Branche intensiv und kontrovers diskutiert. Auch die in die Studie eingebundenen Betreiber hatten unterschiedlichste Auffassungen zu diesem Thema. Das Thema wurde im Rahmen der vorliegenden Studie nicht untersucht. Ein Nebenergebnis ist allerdings die Feststellung, dass der Verzicht auf Additive in den untersuchten Vorstufen keine erkennbaren Leistungseinbußen bewirkte.

3.3 Verwertung

3.3.1 Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das Projekt *AcEta* ist die erste herstellerunabhängige Felduntersuchung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen landwirtschaftlicher Biogasanlagen in Deutschland. Die Ergebnisse des Projekts machen die Revision mehrerer langjährig am Markt verbreiteter Planungsansätze erforderlich. Die Berücksichtigung der Ergebnisse ermöglicht die Planung verbesserter Anlagen, die wirtschaftlicher, sicherer und umweltfreundlicher sind. Auch der Forschung liefert das Projekt Informationen, die es gestatten, zukünftige Versuchskonzepte praxisnäher zu gestalten. Die Ergebnisse wurden und werden entsprechend der Projektplanung durch Öffentlichkeitsarbeit bekannt gemacht.

3.3.2 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten

Die Ergebnisse des Projekts machen die Revision mehrerer langjährig am Markt verbreiteter Planungsansätze erforderlich. Die Berücksichtigung der Ergebnisse ermöglicht die Planung verbesserter Anlagen (Energieverluste, Rührtechnik, Bioprozesstechnik), die wirtschaftlicher, sicherer und umweltfreundlicher sind. Auch der Forschung liefert das Projekt Informationen, die es gestatten, zukünftige Versuchskonzepte praxisnäher zu gestalten.

Die Vertiefung der Bilanzierung von Stoffumsätzen in Hydrolyse- und Versäuerungsstufen empfohlen, da die statistische Absicherung der Daten dieser Studie begrenzt bleiben musste. Das Verständnis der mikrobiologischen Vorgänge in Vorstufen weist immer noch Lücken auf.

Die MALDI-TOF-MS Analyse ermöglicht es, sich einen schnellen Überblick über die Biodiversität in mikrobiellen Populationen zu verschaffen. Dies ist ein Aspekt, der in den letzten Jahren in vielen Bereichen immer interessanter geworden ist, da oftmals nur eine intakte Population in der Lage ist, ihre Aufgabe zu erfüllen (z.B. Darmflora, Bodenmikrobiologie, Biogas). Im vorliegenden Projekt wurde die Populationsanalyse mit MALDI-TOF-MS als Methodik optimiert und etabliert und nicht nur für das vorliegende, sondern auch schon für weitere Projekte angewendet (s.a. https://forschung-sachsen-anhalt.de/). Diese Arbeit hat gezeigt, dass damit ein schneller Einblick in zumindest einen Teil der vorhandenen Population in Hydrolyse- und Versäuerungsstufen möglich ist.

3.3.3 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Ein wesentliches Ergebnis der Studie ist der Nachweis signifikanter Energieverluste durch den Betrieb offener Vorstufen, so dass die Autoren sich der Forderung angeschlossen haben, Anmaischer und Hydrolysestufen zukünftig ausschließlich gasdicht auszulegen. Eine Wirtschaftlichkeitsabschätzung hat gezeigt, dass die erhöhten Investitionskosten durch die gesteigerte Effizienz mehr als ausgeglichen werden dürften. Die Autoren hoffen, für diese Verbesserung der Wirtschaftlichkeit eine maßgebliche Anregung geliefert zu haben. Neben diesem Ergebnis liegen Daten und Erfahrungen vor, die die Wahl verfahrenstechnischer Parameter, die Rührtechnik, den Arbeitsschutz und den Klimaschutz betreffen. Für die jeweiligen Bereiche sind diese Ergebnisse relevant.

3.4 Erkenntnisse von Dritten

3.4.1 Teilprojekt 1

Zu den technischen und bioprozesstechnischen Grundlagen zweiphasiger (landwirtschaftlicher) Biogasanlagen wird regelmäßig geforscht. Während der Laufzeit des Projekts sind jedoch keine Ergebnisse veröffentlicht worden, die Korrekturen der Projektplanung erforderlich gemacht hätten. Dies gilt auch für technische Entwicklungen, die dem markt präsentiert wurden. Somit blieben sämtliche Arbeitspakete uneingeschränkt relevant.

3.4.2 Teilprojekt 2

Es ist eine deutliche Zunahme der Literatur zu sehen im Hinblick auf die Charakterisierung von Populationen, vor allem auch metagenomische Ansätze werden in den letzten fünf Jahren intensiv verfolgt. Hier nur ein kleiner Auszug aus der vielfältigen Literatur (Franzosa et al., 2015, Maus et al., 2016 u. 2017, Treu et al., 2016, Campanaro et al., 2016, Ortseifen et al., 2016, Aguiar-Pulido et al., 2016, Frank et al., 2016, Stolze et al., 2016 u. 2017). Wobei auch kritische Stimmen zu den Ergebnissen dieser Analytik vorliegen (Campanaro et al., 2018). Vor allem aus China kommen sehr viele Publikationen, die sich mit unterschiedlichen Substratfütterungen und Auswirkungen auf die Biogasbildung beschäftigen (Ning et al., 2017, Wang et al., 2016, Song et al., 2017). Hier spielen allerdings vor allem die Charakterisierung der methanogen Gruppen in klassischen Fermentern (ohne Hydrolysestufe) oder Laborfermentern eine Rolle. Unabhängig davon wird nun in ersten Ansätzen versucht mit Systemmodellierungen der Zusammensetzung von Populationen auf die Spur zu kommen (Hanemaaijer et al., 2015, Weimann et al., 2016). Außerdem wird nun verstärkt in den metagenomischen Datensätzen nach biotechnologisch interessanten Genen bzw. Enzymen gesucht, auch in methanogenen Populationen (Pandit et al., 2016, Adu-Oppong et al., 2016).

Detailliertere Untersuchungen zu Populationen in Versäuerungs- und Hydrolysestufen sind weder mit qPCR noch mit MALDI-TOF-MS im Projektzeitraum (2015-2017) und auch nicht im Zeitraum bis zur Berichtsabgabe (05/2018) durchgeführt worden.

3.5 Veröffentlichungen der Projektpartner

3.5.1 Vorträge

- Schneider A: Efficient Hydrolysis and Acidogenesis: Process Optimization of Two-Stage Agricultural Biogas Plants. Interreg Deutschland – Danmark - Workshop "Large Scale Bioenergy Lab 2" am 29. und 30.1.2018 in Oeversee, https://vimeo.com/255011767.html
- Winterberg R: Emissionen offener Vorstufen zweiphasiger landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Fachgespräch "Emissionen von Biogasanlagen", *DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum, Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie Sachsen, UFZ Helmholtz Zentrum für Umweltforschung, Umweltinstitut Leipzig,* Nossen, 27.02.2018, https://www.dbfz.de/referenzen-publikationen/fachgespraeche/biogas.html
- Pabst R., D. Binder D., Cordes C.: Characterization of microbial communities from first stage reactors of two-phase agcrigultural biogas plants; Labvolution/Biotechnica 2017

3.5.2 Veröffentlichungen

- Winterberg R, Schneider A, Siddiqui A, Cordes C, Schories G: Emissionen der offenen Anmaischer und Hydrolysestufen, in: Emissionsarmer Betrieb von landwirtschaftlichen Biogasanlagen, Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (Hrsg.), Darmstadt (eingereicht)
- Winterberg R, Schneider A, Cordes C, Schories G: Biogasemissionen offener Vorstufen landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Fachveröffentlichung für *Landtechnik*, in Arbeit

3.5.3 Poster

- Binder D., A. Weber A., Cordes C.: Poster: Characterization of microbial communities from first stage reactors of two-phase agricultural biogas plants; VAAM 2016
- Winterberg R, Jahn S, Jaffke A-L, Cordes C, Schories G: Zweiphasige Biogasanlagen (I): Untersuchung der Bioprozesscharakteristik und Emissionen. Poster und Kurzvortrag, FNR/KTBL-Kongress "Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven", Bayreuth, 26.-27-09-2017
- Binder D, Pabst R, Hildebrandt P, Schories G, Cordes C: Zweiphasige Biogasanlagen (II): Populationsanalyse. Untersuchung der Bioprozesscharakteristik und Emissionen. Poster, FNR/KTBL-Kongress "Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven", Bayreuth, 26.-27-09-2017
- Cordes C: Populationsanalyse in zweistufigen landwirtschaftlichen Biogasanlagen; Labvolution/Biotechnica 2017
- Cordes C: Analyse mikrobieller Populationen mit MALDI-TOF-MS; Analytika 2018

Weitere Fachveröffentlichungen und Fachvorträge sind in Arbeit oder vorgesehen.

4. Literatur

4.1 Teilvorhaben 1

ttz Bremerhaven, Cordes+Winterberg

4.1.1 Wissenschaftliche Literatur

ADAMBERG, K., KASK, S., LAHT, T. M. & PAALME, T. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. Int J Food Microbiol, 85, 171-83

ALI SHAH, F., MAHMOOD, Q., SHAH, M. M., PERVEZ, A., ASAD, S. A. 2014. Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis The Scientific World Journal, 2014, 1-21

ALVES, M. M. P., M. A.; SOUSA, D. Z.; CAVALEIRO, A. J.; PICAVET, M.; SMIDT, H.; STAMS, A. J. 2009. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). Microb Biotechnol, 2, 538-50

ANDREWS, J. F. P., E. A. 1965. Kinetics and Characterization of Volatile Acids Production in Anaerobic Fermentation Processes. Int. J. Air Wat. Poll., 9, 439-461

ANONYMUS ca. 2014. Hydrolyseverfahren zur Erhöhung der energetischen Effizienz von Biogasanlagen. Schlussbericht der BTN Biotechnologie Nordhausen GmbH an das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (FKZ 22006711), Nordhausen

ASTALS, S., VENEGAS, C., PECES, M., JOFRE, J., LUCENA, F., MATA-ALVAREZ, J. 2012. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. Water Res, 46, 6218-27

BATSTONE, D. J., KELLER, J., ANGELIDAKI, I., KALYUZHNYI, S. V., PAVLOSTATHIS, S. G., ROZZI, A., SANDERS, W. T., SIEGRIST, H., VAVILIN, V. A. 2002. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). Water Sci Technol, 45, 65-73

BORUFF, C. S., BUSWELL, A. M. 1929. Fermentation Products of Cellulose. Industrial & Engineering Chemistry, 21, 1181-1182

BREURE, A. M., MOOIJMAN, K. A. & VAN ANDEL, J. G. 1986. Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. Applied Microbiology and Biotechnology, 24, 426-431

BRYANT, M. P., WOLIN, E. A., WOLIN, M. J., WOLFE, R. S. 1967. Methanobacillus omelianskii, a symbiotic association of two species of bacteria. Archiv für Mikrobiologie, 59, 20-31

BUŁKOWSKA, K., BIAŁOBRZEWSKI, I., GUSIATIN, Z. M., KLIMIUK, E., POKÓJ, T. 2015. ADM1-based modeling of anaerobic codigestion of maize silage and cattle manure – calibration of parameters and model verification (part II). Archives of Environmental Protection Vol. 41 no. 3. 20–27

CHEN, Q. 2010. Kinetics of Anaerobic Digestion of Selected C1 to C4 Organic Acids. Master Thesis, University of Missouri-Columbia

CIBIS, K. B. 2015. Isolierung von Essigsäure-, Propionsäure- und Buttersäure-bildenden Bakterien aus Biogasanlagen. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

DANDIKAS, V., MARÍN PÉREZ, C., KOCH, K., LEBUHN, M., GRONAUER, A. 2012. Influence of digestate recirculation on a two-phase anaerobic digestion of maize silage. International Conference of Agricultural Engineering. Valencia, Spain: CIGR-EurAgEng Valencia Spain

DE LA RUBIA ROMERO, M. A., PEREZ, M., ROMERO, L. I., SALES, D. 2002. Anaerobic mesophilic and thermophilic municipal sludge digestion. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 16, 119-124

DEMIREL, B., YENIGÜN, O. 2002. Two-phase anaerobic digestion processes: a review. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 77, 743-755

DEMIREL, B. 2014. Major Pathway of Methane Formation From Energy Crops in Agricultural Biogas Digesters. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 44, 199-222

DEMIRER, G., N., CHEN, S. 2004. Effect of retention time and organic loading rate on anaerobic acidification and biogasification of dairy manure. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 79, 1381-1387

DLG DEUTSCHE LANDWIRTSCHAFTSGESELLSCHAFT 1997. DLG-Futterwerttabellen für Wiederkäuer, 6. Auflage, DLG-Verlag, Frankfurt/Main

EFFENBERGER, M., KISSEL, R., MARÍN-PÉREZ, C., BECK, J., FRIEDRICH, F. 2010. Empfehlungen zu Verfahren der Hydrolyse in der Praxis. Biogas Forum Bayern, Nr. IV – 5/2010, Arbeitsgemeinschaft Landtechnik und landwirtschaftliches Bauwesen in Bayern e. V. (Hrsg.), Freising

EASTMAN, J. A., FERGUSON, J. F. 1981. Solubilization of Particulate Organic Carbon during the Acid Phase of Anaerobic Digestion. Journal Water Pollution Control Federation, 53, 352-366

FEDAILAINE, M., MOUSSI, K., KHITOUS, M., ABADA, S., SABER, M., TIRICHINE, N. 2015. Modeling of the Anaerobic Digestion of Organic Waste for Biogas Production Procedia Computer Science. Vol. 52, 730-737.

FNR (FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E: V, Hrsg.) 2005. Ergebnisse des Biogas-Messprogramms, Gülzow

FNR (FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E: V, Hrsg.) 2009. Biogas-Messprogramm II - 61 Biogasanlagen im Vergleich, Gülzow

GALLERT C., WINTER, J.: Mikrobielle Grundlagen der Methangärung 2015. In: ROSENWINKEL, K.-H., KROISS, H., DICHTL, N., SEYFRIED, C.-F., WEILAND, P. (Hrsg.). Anaerobtechnik, Berlin, Springer Vieweg.

GARCIA, J. L. 1982. Relations Between Acidogenesis and the Utilization of Lactate, Sulfate and Nitrate During Anaerobic Digestion. Simposio Internacional "Avances en Digestion Anaerobia". Mexico

GERIGHAUSEN, H.-G., HÜNTING, K., JÄNICKE, H. ET AL. 2011. Praxishandbuch Futter- und Substratkonservierung, DLG e. V. (Hrsg.), DLG Verlags-GmbH, Frankfurt/Main

GIJZEN, H. J., ZWART, K. B., VAN GELDER, P. T., VOGELS, G. D. 1986. Continuous cultivation of rumen microorganisms, a system with possible application to the anaerobic degradation of lignocellulosic waste materials. Applied Microbiology and Biotechnology, 25, 155-162

GIJZEN HUUB, J., ZWART KOR, B., VERHAGEN FRANK, J. M., VOGELS GODFRIED, P. 1988. High-Rate two-phase process for the anaerobic degradation of cellulose, employing rumen microorganisms for an efficient acidogenesis. Biotechnology and Bioengineering, 31, 418-425.

GOLKOWSKA, K. 2011. Anaerobic mono-digestion of maize and cellulose at different temperatures and operating modes, PhD Thesis, Luxembourg, pp. 126-128

GOLUEKE, C. G. 1958. Temperature Effects on Anaerobic Digestion of Raw Sewage Sludge. Sewage and Industrial Wastes, 30, 1225-1232.

HINKEN, L. 2013. Mathematische Modellierung von anaeroben Abbauprozessen unterschiedlicher Substrate auf Basis des "Anaerobic Digestion Model No. 1". Dissertation, Veröffentlichungen des Instituts für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik, Heft 151, Leibnitz Universität Hannover

HOBSON, P. N., BOUSFIELD, S., SUMMERS, R. 1981. Methane production from agricultural and domestic wastes, London, Applied Science Publishers Ltd

HOPPE-SEYLER, F. 1886. Ueber Gährung der Cellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure. Zeitschrift für physiologische Chemie, 10(3), S. 201-217

ISHIDA, M. O., Y.; GEJO, T.; OKUMURA, H. 1979. Biogasification of Municipal Waste. In: THOMÉ-KOZMIENSKY, K. J. (ed.) Recycling Berlin ´79. Berlin, BRD: E. Freitag - Verlag für Umwelttechnik, Berlin

JARVIS, Å., NORDBERG, Å., MATHISEN, B., SVENSSON, B. H. 1995. Stimulation of conversion rates and bacterial activity in a silage-fed two-phase biogas process by initiating liquid recirculation. Antonie van Leeuwenhoek, 68, 317-327

KIM, J. K., OH, B. R., CHUN, Y. N., KIM, S. W. 2006. Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. J Biosci Bioeng, 102, 328-32

KIM, S. H., SHIN, H. S. 2010. Enhanced lipid degradation in an upflow anaerobic sludge blanket reactor by integration with an acidogenic reactor. Water Environ Res, 82, 267-72

KIYOHARA, Y., MIYAHARA, T., MIZUNO, O., NOIKE, T., ONO, K. 2000. A Comparative Study of Thermophilic and Mesophilic Sludge Digestion. Water and Environment Journal, 14, 150-154

KÖLLMEIER, T., ZVERLOV, V. V., SCHWARZ W. H. 2012. Mikrobiologie der Hydrolyse von Pflanzenfasern in Biogasanlagen. Bornimer Agrartechnische Berichte, Heft 79: 99-113

KOSTER, I. W., CRAMER, A. 1987. Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain Fatty acids. Appl Environ Microbiol, 53, 403-9

KROISS, H. S., K. 2015. Einflussfaktoren auf die anaeroben biologischen Abbauvorgänge. In: ROSENWINKEL, K.-H. K., H.; DICHTL, N.; SEYFRIED, C.-F.; WEILAND, P. (ed.) Anaerobtechnik. Berlin: Springer Vieweg

KTBL KURATORIUM FÜR TECHNIK UND BAUWESEN IN DER LANDWIRTSCHAFT 2015. Gasausbeute in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Darmstadt

KUGELMAN, I. J. G., V. G. 1989. Comparative Evaluation of Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Digestion - Project Summary. In: AGENCY, E. U. S. E. P. (ed.). Cincinnati, USA: EPA United States Environmental Protection Agency

KUNST, S. K., W.; MUDRACK, K. 1985. Untersuchungen über die anaerobe Abbaubarkeit von fett- und eiweißhaltigen Abwässern in Festbettreaktoren. gwf-wasser/abwasser, 126, 65-75

LANGHANS, G. 1999. Welche Vorteile bringt die Vergärung mit getrennter Hydrolyse? Entsorgungspraxis, 26-31

LEBUHN, M., MUNK, B., EFFENBERGER, M. 2014. Agricultural biogas production in Germany - from practice to microbiology basics. Energy, Sustainability and Society, 4, 10

LEVÉN, L., ERIKSSON, A. R. B., SCHNÜRER, A. 2007. Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. FEMS Microbiology Ecology, 59, 683-693

LIEBETRAU, J., REUSCHEL, C., CLEMENS, J., HAFERMANN, C., FRIEHE, J., WEILAND, P. 2011. Analysis of Greenhouse Gas Emissions from 10 Biogas Plants within the Agricultural Sector. ADSW & EC, Vienna

LINDNER, J., ZIELONKA, S., OECHSNER, H., LEMMER, A. 2015. Effect of different pH-values on process parameters in two-phase anaerobic digestion of high-solid substrates. Environmental Technology, 36, 198-207

LINKE, B., VOLLMER, G.-R., MÄHNERT, P. 2006. Kinetik der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen bei kontinuierlicher Prozessführung als Grundlage für die Bemessung von landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Schlussbericht des Leibnitz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e. V. (ATB) an die Fachagentur nachwachsende Rohstoffe (Gülzow), FKZ 22011402

LI SUN 2015. Biogas Production from Lignocellulosic Materials. PhD Thesis. pp. 32-42 Uppsala, Sweden

LONG, J. H., AZIZ, T. N., REYES, F. L. D. L., DUCOSTE, J. J. 2012. Anaerobic co-digestion of fat, oil, and grease (FOG): A review of gas production and process limitations. Process Safety and Environmental Protection, 90, 231-245

LÜBKEN, M., GEHRING, T., WICHERN, M. 2010. Microbiological fermentation of lignocellulosic biomass: current state and prospects of mathematical modeling. Applied Microbiology and Biotechnology, 85, 1643-1652

MARÍN PÉREZ, C., WEBER, A. 2013. Zweiphasiges Biogasverfahren: Hydrolyse unterschiedlicher Substrattypen. Landtechnik, 68, 4

MCCARTY, P. L. V., C. A. 1962. Volatile Acids Digestion at High Loading rates. International Journal of Air and Water Pollution, 6, 65-73

MCCARTY, P. L. 1964. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals - Part One: Chemistry and Microbiology. Public Works, September 1964, 107-112

MEMMLER, M., SCHREMPF, L., HERMANN, S., SCHNEIDER, S., PABST, J., DREHER, M. 2014. Emissionsbilanz erneuerbarer Energieträger – Bestimmung der vermiedenen Emissionen 2013. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau (Hrsg.)

MEMMLER, M., LAUF, T., WOLF, K., SCHNEIDER, S. 2017. Emissionsbilanz erneuerbarer Energieträger – Bestimmung der vermiedenen Emissionen 2016. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau (Hrsg.)

MOLNARNE, M., SCHRÖDER, V. (BAM BUNDESANSTALT FÜR MATERIALFORSCHUNG UND –PRÜFUNG) 2007. Wie werden die Explosionsgrenzen von Biogasen berechnet? Vortrag, ProcessNet, Aachen, 16.10.2007

MUDRACK, K., KUNST, S. 1987. Versuche zum biochemischen Abbau von Fettsäuren bei der Abwasserreinigung. Fett Wissenschaft Technologie, 89, 288-292

NOIKE, T., ENDO, G., CHANG, J., YAGUCHI, J., MATSUMOTO, J. 1985. Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. Biotechnol. Bioeng., 27: 1482-1489

O'SULLIVAN CATHRYN, A., BURRELL PAUL, C., CLARKE WILLIAM, P., BLACKALL LINDA, L. 2005. Structure of a cellulose degrading bacterial community during anaerobic digestion. Biotechnology and Bioengineering, 92, 871-878

POHLAND, F. G., GHOSH, S. 1971. Developments in anaerobic stabilization of organic wastes--the two-phase concept. Environ Lett, 1, 255-66

PREIßLER, D. 2008. Bietet eine separate Hydrolyse zusätzliche Potentiale in NawaRo-Biogasanlagen? Vortrag, Fachtagung Biogas, Großrudestedt, 05.06.2008

PREIßLER, D., SHAH, A., ZIELONKA, S., LEMMER, A., OECHSNER, H., JUNGBLUTH, T. 2008. Untersuchungen zur Hydrolyse von Maissilage. Landtechnik, 63, 2

PUCHAJDA, B. O., JAN 2006. Thermophilic anaerobic acid digestion of biosolids: hydrolysis, acidification, and optimization of retention time of acid digestion. Journal of Environmental Engineering and Science, 5, 187-195

REINHOLD, G., MUMDEY, A. 2012. Inhaltsstoffe von Biogassubstraten und Gärresten. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena

REINHOLD, G. Besondere Eigenschaften verschiedener Gülle- und Festmistarten bei der Vergärung. FNR Tagung, 25.09.2014, Oldenburg

RUSSELL, B., MUCK, R. E., WEIMER, P. J. 2009. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. FEMS Microbiol Ecol 67, 183–197

SANDERS, W. T. M. 2001. Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates. PhD Thesis, Wageningen Universiteit

SATPATHY, P., BIERNACKI, P., UHLENHUT, F., CYPIONKA, H., STEINIGEWEG, S. 2016. Modelling anaerobic digestion in a biogas reactor: ADM1 model development with lactate as an intermediate (Part I). 51, 1-10

SCHNÜRER A., JARVIS, A. 2010. Microbiological Handbook for Biogas Plants, Avfall Sverige AB, Malmö (Sweden)

SCHUCHMANN, K. & MULLER, V. 2016. Energetics and Application of Heterotrophy in Acetogenic Bacteria. Appl Environ Microbiol, 82, 4056-69

SCHRÖDER, V. (BAM BUNDESANSTALT FÜR MATERIALFORSCHUNG UND –PRÜFUNG) 2002. Explosionsgrenzen von Wasserstoff und Wasserstoff/Methan-Gemischen. BAM-Forschungsbericht 253, Berlin 2002

SCHRÖDER, V., PAHL, R. (BAM BUNDESANSTALT FÜR MATERIALFORSCHUNG UND –PRÜFUNG) 2013. Entzündbare Gasgemische in Biogasanlagen. Tagungsbeitrag, BAM-PTB-Kolloquium, Braunschweig, 18.-19.06.2013

SHI, J., WANG, Z., STIVERSON, J. A., YU, Z., LI, Y. 2013. Reactor performance and microbial community dynamics during solid-state anaerobic digestion of corn stover at mesophilic and thermophilic conditions. Bioresource Technology, 136, 574-581

SLYTER, L. L. 1986. Ability of pH-Selected Mixed Ruminal Microbial Populations to Digest Fiber at Various pHs. Applied and Environmental Microbiology, 52, 390-1

SOUSA, D. Z. S., H.; ALVES, M. M.; STAMS, A. J. 2009. Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. FEMS Microbiol Ecol, 68, 257-72

STIBOROVA, H., WOLFRAM, J., DEMNEROVA, K., MACEK, T., UHLIK, O. 2015. Bacterial community structure in treated sewage sludge with mesophilic and thermophilic anaerobic digestion. Folia Microbiologica, 60, 531-539

TONG, X., SMITH, L. H., MCCARTY, P. L. 1990. Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. Biomass, 21, 239-255

UBA Umweltbundesamt 2017. Klimagase aus der Viehhaltung, https://www.umweltbundesamt.de/daten/land-forstwirtschaft/beitrag-der-landwirtschaft-zu-den-treibhausgas#textpart-2, Zugriff am 30.08.2017

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, 229-237

VAVILIN, V. A., FERNANDEZ, B., PALATSI, J., FLOTATS, X. 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. Waste Management, 28, 939-951

VEEKEN, A., HAMELERS, B. 1999. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. Bioresource Technology, 69, 249-254

VEEKEN, A., KALYUZHNYI, S., SCHARFF, H., HAMELERS, B. 2000. Effect of pH and VFA on Hydrolysis of Organic Solid Waste. Journal of Environmental Engineering, 126, 1076-1081

WEILAND, P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol, 85, 849-60

WICHERN, M. 2010. Simulation biochemischer Prozesse in der Siedlungswasserwirtschaft, Oldenbourg Industrieverlag, München

WINTERBERG, R. 1992. Untersuchungen zum mikrobiellen Proteinabbau bei der zweistufigen anaeroben Abwasserreinigung. In: JÜLICH, F. (Hrsg.) Berichte des Forschungszentrums Jülich. Jülich: Institut für Biotechnologie

WINTERBERG, R. F., E.; POSTEL, J.; RENSBERG, N.; DANIEL-GROMKE, J.; STINNER, W.; BÖKER, H. 2012. Repowering landwirtschaftlicher Biogasanlagen in der Altmark. Abschlussbericht der Cordes+Winterberg GbR (Biederitz) an den Regionalverein Altmark e. V., Projektbüro Bioenergieregion Altmark (Salzwedel/Stendal)

WINTERBERG, R. 2013. Biogasanlagen und Gärreste. In: DEIMER, C., HEINRICH, J., BREITSCHUH, T., WINTERBERG, R., KOSCHITZKI, T. 2013. Untersuchung zur Umsetzung des Klimaschutzprogramms 2020 für den Bereich "Wirtschaftsdünger und Gärreste aus der Biogaserzeugung. Halle/Saale: Landgesellschaft Sachsen-Anhalt

YANG, Y., CHEN, Q., GUO, J., HU, Z. 2015. Kinetics and Methane Gas Yields of Selected C1 to C5 Organic Acids in Anaerobic Digestion. Water Research, 87, 112-118

ZHANG, B., ZHANG, L. L., ZHANG, S. C., SHI, H. Z., CAI, W. M. 2005. The influence of pH on hydrolysis and acidogenesis of kitchen wastes in two-phase anaerobic digestion. Environ Technol, 26, 329-39

ZINDER, S. H. 1986. Thermophilic Waste Treatment Systems. In: BROCK, T. D. (ed.) Thermophiles - General, Molecular, and Applied Microbiology. New York: John Wiley & Sons

ZOETEMEYER, R. J. 1982a. Acidogenesis of Soluble Carbohydrate-Containing Wastewaters. Ph. D. Academisch Proefschrift, University of Amsterdam, The Netherlands

ZOETEMEYER, R. J. A., P.; COHEN, A.; BOELHOUWER, C. 1982b. Influence of temperature on the anaerobic acidification of glucose in a mixed culture forming part of a two-stage digestion process. Water Research, 16, 313-321

ZVERLOV, V. V., HIEGL, W., KÖCK D. E., KELLERMANN, J., KÖLLMEIER, T., SCHWARZ W. H. 2010. Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass. Engineering in Life Sciences, 10, 528-536

4.1.2 Regelwerk zur Analytik

DIN EN 12880 Teil 2a „Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts“

DIN EN 12879 Teil 3a „Bestimmung des Glührückstandes und des Glühverlustes der Trockenmasse eines Schlammes“, der „Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit / Bundesgesundheitsamt, Bundesrepublik . (2006). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 38 TabakerzG, § 28b GenTG / Herausgeber und Redaktion: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) ; Band 2 (B), Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Bedarfsgegenständen ; Teil 1, Beuth Verlag GmbH, Berlin; Wien; Zürich

4.1.3 Regelwerk zur Arbeitssicherheit und zum Explosionsschutz

AGS 2016	Technische Regel für Gefahrstoffe TRGS 529, Februar 2015, zuletzt geändert am 27.01.2016; Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS) der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (Hrsg.), Dortmund
BetrSichV 2015	Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Verwendung von Arbeitsmitteln (Betriebssicherheitsverordnung) vom 03.02.2015, geändert am 13.07.2015
DGUV 2015	DGUV-Regel 113-001 – Explosionsschutz-Regeln. DGUV Deutsche gesetzliche Unfallversicherung (Hrsg.), Halle (Saale) 2015
Fachverband Biogas 2015	Zusammenfassung der novellierten Fassung der Betriebssicherheitsverordnung. Fachverband Biogas e. V. (Hrsg.), Freising, 26.05.2015
GefStoffV 2015	Verordnung zum Schutz vor Gefahrstoffen (Gefahrstoffverordnung) vom 26.11.2010, zuletzt geändert am 03.02.2015
KAS 2009	Merkblatt Sicherheit in Biogasanlagen. KAS Kommission für Anlagensicherheit des BMU (Hrsg.), Bonn 2009
LBG 2015	Sicherheitsregeln für Biogasanlagen. Sozialversicherung für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau/LBG Landwirtschaftliche Berufsgenossenschaft (Hrsg.), Kassel 2015

4.2 Teilvorhaben 2
Hochschule Anhalt

ALCANTARA-HERNANDEZ, R. J., TAS, N., CARLOS-PINEDO, S., DURAN-MORENO, A. & FALCON, L. I. 2017. Microbial dynamics in anaerobic digestion reactors for treating organic urban residues during the start-up process. Lett Appl Microbiol, 64, 438-445.

BIZZINI, A. & GREUB, G. 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin. Microbiol. Infect, 16, 1614-1619.

BOHN, J., YÜKSEL-DADAK, A., DRÖGE, S. & KÖNIG, H. 2017. Isolation of lactic acid-forming bacteria from biogas plants. Journal of Biotechnology, 244, 4-15.

CARBONNELLE, E., MESQUITA, C., BILLE, E., DAY, N., DAUPHIN, B., BERETTI, J. L., FERRONI, A., GUTMANN, L. & NASSIF, X. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. Clin. Biochem, 44, 104-109.

CIBIS, K. G., GNEIPEL, A. & KÖNIG, H. 2016. Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. Journal of Biotechnology, 220, 51-63.

CIRNE, D. G., LEHTOMAKI, A., BJORNSSON, L. & BLACKALL, L. L. 2007. Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. J. Appl. Microbiol, 103, 516-527.

DE VOS, P., K. KERSTERS, E. FALSEN, B. POT, M. GILLIS, P. SEGERS, J. DE LEY 1985. Comamonas Davis and Park 1962 gen. nov., nom. rev. emend., and Comamonas terrigena Hugh 1962 sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol., 35, 443-453.

DE VRIEZE, J., RAPORT, L., ROUME, H., VILCHEZ-VARGAS, R., JÁUREGUI, R., PIEPER, D. H. & BOON, N. 2016. The full-scale anaerobic digestion microbiome is represented by specific marker populations. Water Research, 104, 101-110.

DE VRIEZE, J., SAUNDERS, A. M., HE, Y., FANG, J., NIELSEN, P. H., VERSTRAETE, W. & BOON, N. 2015. Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. Water Res, 75, 312-23.

EINEN, J., THORSETH, I. H. & OVREAS, L. 2008. Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. FEMS Microbiol. Lett, 282, 182-187.

GROHMANN, A., FEHRMANN, S., VAINSHTEIN, Y., HAAG, N. L., WIESE, F., STEVENS, P., NAEGELE, H. J., OECHSNER, H., HARTSCH, T., SOHN, K. & GRUMAZ, C. 2018. Microbiome dynamics and adaptation of expression signatures during methane production failure and process recovery. Bioresour Technol, 247, 347-356.

HEYER, R., BENNDORF, D., KOHRS, F., DE VRIEZE, J., BOON, N., HOFFMANN, M., RAPP, E., SCHLUTER, A., SCZYRBA, A. & REICHL, U. 2016. Proteotyping of biogas plant microbiomes separates biogas plants according to process temperature and reactor type. Biotechnol Biofuels, 9, 155.

HEYER, R., KOHRS, F., REICHL, U. & BENNDORF, D. 2015. Metaproteomics of complex microbial communities in biogas plants. Microb Biotechnol, 8, 749-63.

JAENICKE, S., ANDER, C., BEKEL, T., BISDORF, R., DROGE, M., GARTEMANN, K. H., JUNEMANN, S., KAISER, O., KRAUSE, L., TILLE, F., ZAKRZEWSKI, M., PUHLER, A., SCHLUTER, A. & GOESMANN, A. 2011. Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. PLoS One, 6, e14519.

JIMENEZ, D. J., DINI-ANDREOTE, F. & VAN ELSAS, J. D. 2014. Metataxonomic profiling and prediction of functional behaviour of wheat straw degrading microbial consortia. Biotechnol Biofuels, 7, 92.

JIMENEZ, D. J., MARUTHAMUTHU, M. & VAN ELSAS, J. D. 2015. Metasecretome analysis of a lignocellulolytic microbial consortium grown on wheat straw, xylan and xylose. Biotechnol Biofuels, 8, 199.

JU, F., WANG, Y., LAU, F. T., FUNG, W. C., HUANG, D., XIA, Y. & ZHANG, T. 2016. Anaerobic digestion of chemically enhanced primary treatment (CEPT) sludge and the microbial community structure. Appl Microbiol Biotechnol, 100, 8975-82.

KLOCKE, M. 2017. Etablierung eines core-Mikrobioms für Biogasanlagen. Bornimer Agrartechnische Berichte Nr.92.

KOCH, K., LIPPERT, T. & DREWES, J. E. 2017. The role of inoculum's origin on the methane yield of different substrates in biochemical methane potential (BMP) tests. Bioresour Technol, 243, 457-463.

KRAUSE, L., DIAZ, N. N., EDWARDS, R. A., GARTEMANN, K. H., KROMEKE, H., NEUWEGER, H., PUHLER, A., RUNTE, K. J., SCHLUTER, A., STOYE, J., SZCZEPANOWSKI, R., TAUCH, A. & GOESMANN, A. 2008. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. J Biotechnol, 136, 91-101.

KROBER, M., BEKEL, T., DIAZ, N. N., GOESMANN, A., JAENICKE, S., KRAUSE, L., MILLER, D., RUNTE, K. J., VIEHOVER, P., PUHLER, A. & SCHLUTER, A. 2009. Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. J. Biotechnol, 142, 38-49.

LEBUHN, M., HANREICH, A., KLOCKE, M., SCHLUTER, A., BAUER, C. & PEREZ, C. M. 2014. Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. Anaerobe, 29, 10-21.

LEE, J. T. E., HE, J. & TONG, Y. W. 2017. Acclimatization of a mixed-animal manure inoculum to the anaerobic digestion of Axonopus compressus reveals the putative importance of Mesotoga infera and Methanosaeta concilii as elucidated by DGGE and Illumina MiSeq. Bioresour Technol, 245, 1148-1154.

LI, L., CLEENWERCK, I., DE VUYST, L. & VANDAMME, P. 2017. Identification of acetic acid bacteria through matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and report of Gluconobacter nephelii Kommanee et al. 2011 and Gluconobacter uchimurae Tanasupawat et al. 2012 as later heterotypic synonyms of Gluconobacter japonicus Malimas et al. 2009 and Gluconobacter oxydans (Henneberg 1897) De Ley 1961 (Approved Lists 1980) emend. Gossele et al. 1983, respectively. Syst Appl Microbiol, 40, 123-134.

LI, Y., JIN, Y., BORRION, A. & LI, J. 2018. Influence of feed/inoculum ratios and waste cooking oil content on the mesophilic anaerobic digestion of food waste. Waste Manag, 73, 156-164.

LI, Y. F., WEI, S. & YU, Z. 2013. Feedstocks affect the diversity and distribution of propionate CoA-transferase genes (pct) in anaerobic digesters. Microb Ecol, 66, 351-62.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H. & PRETORIUS, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol Mol Biol Rev, 66, 506-77, table of contents.

MANZ, W., AMANN, R., LUDWIG, W., VANCANNEYT, M. & SCHLEIFER, K. H. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. Microbiology, 142 (Pt 5), 1097-106.

MARCHESI, J. R., SATO, T., WEIGHTMAN, A. J., MARTIN, T. A., FRY, J. C., HIOM, S. J., DYMOCK, D. & WADE, W. G. 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol, 64, 2333.

MAUS, I., BREMGES, A., STOLZE, Y., HAHNKE, S., CIBIS, K. G., KOECK, D. E., KIM, Y. S., KREUBEL, J., HASSA, J., WIBBERG, D., WEIMANN, A., OFF, S., STANTSCHEFF, R., ZVERLOV, V. V., SCHWARZ, W. H., KONIG, H., LIEBL, W., SCHERER, P., MCHARDY, A. C., SCZYRBA, A., KLOCKE, M., PUHLER, A. & SCHLUTER, A. 2017. Genomics and prevalence of bacterial and archaeal isolates from biogas-producing microbiomes. Biotechnol Biofuels, 10, 264.

MAUS, I., KOECK, D. E., CIBIS, K. G., HAHNKE, S., KIM, Y. S., LANGER, T., KREUBEL, J., ERHARD, M., BREMGES, A., OFF, S., STOLZE, Y., JAENICKE, S., GOESMANN, A., SCZYRBA, A., SCHERER, P., KONIG, H., SCHWARZ, W. H., ZVERLOV, V. V., LIEBL, W., PUHLER, A., SCHLUTER, A. & KLOCKE, M. 2016. Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. Biotechnol Biofuels, 9, 171.

MAY, T., KOCH-SINGENSTREU, M., EBLING, J., STANTSCHEFF, R., MULLER, L., JACOBI, F., POLAG, D., KEPPLER, F. & KONIG, H. 2015. Design and application of a synthetic DNA standard for real-time PCR analysis of microbial communities in a biogas digester. Appl. Microbiol. Biotechnol, 99, 6855-6863.

MCINERNEY, M. J., SIEBER, J. R. & GUNSALUS, R. P. 2009. Syntrophy in anaerobic global carbon cycles. Curr Opin Biotechnol, 20, 623-32.

MOLETTA-DENAT, M., BRU-ADAN, V., DELGENES, J. P., HAMELIN, J., WERY, N. & GODON, J. J. 2010. Selective microbial aerosolization in biogas demonstrated by quantitative PCR. Bioresour Technol, 101, 7252-7.

MORRIS, B. E., HENNEBERGER, R., HUBER, H. & MOISSL-EICHINGER, C. 2013. Microbial syntrophy: interaction for the common good. FEMS Microbiol Rev, 37, 384-406.

MULAT, D. G., HUERTA, S. G., KALYANI, D. & HORN, S. J. 2018. Enhancing methane production from lignocellulosic biomass by combined steam-explosion pretreatment and bioaugmentation with cellulolytic bacterium Caldicellulosiruptor bescii. Biotechnol Biofuels, 11, 19.

NEUMANN, L. & SCHERER, P. 2011. Impact of bioaugmentation by compost on the performance and ecology of an anaerobic digester fed with energy crops. Bioresour Technol, 102, 2931-5.

NING, T., WANG, H., ZHENG, M., NIU, D., ZUO, S. & XU, C. 2017. Effects of microbial enzymes on starch and hemicellulose degradation in total mixed ration silages. Asian-Australas J Anim Sci, 30, 171-180.

ORTSEIFEN, V., STOLZE, Y., MAUS, I., SCZYRBA, A., BREMGES, A., ALBAUM, S. P., JAENICKE, S., FRACOWIAK, J., PÜHLER, A. & SCHLÜTER, A. 2016. An integrated metagenome and -proteome analysis of the microbial community residing in a biogas production plant. Journal of Biotechnology, 231, 268-279.

PANDIT, P. D., GULHANE, M. K., KHARDENAVIS, A. A. & PUROHIT, H. J. 2016. Mining of hemicellulose and lignin degrading genes from differentially enriched methane producing microbial community. Bioresour Technol, 216, 923-30.

SANTOS, I. C., HILDENBRAND, Z. L. & SCHUG, K. A. 2016. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. Analyst, 141, 2827-2837.

SCHAUSS, T., GLAESER, S. P., GUTSCHOW, A., DOTT, W. & KAMPFER, P. 2015. Improved detection of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli in input and output samples of German biogas plants by a selective pre-enrichment procedure. PLoS One, 10, e0119791.

SCHAUSS, T., WINGS, T. K., BRUNNER, J. S., GLAESER, S. P., DOTT, W. & KAMPFER, P. 2016. Bacterial diversity and antibiotic resistances of abundant aerobic culturable bacteria in input and output samples of 15 German biogas plants. J Appl Microbiol, 121, 1673-1684.

SCHINK, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiol Mol Biol Rev, 61, 262-80.

SCHLUTER, A., BEKEL, T., DIAZ, N. N., DONDRUP, M., EICHENLAUB, R., GARTEMANN, K. H., KRAHN, I., KRAUSE, L., KROMEKE, H., KRUSE, O., MUSSGNUG, J. H., NEUWEGER, H., NIEHAUS, K., PUHLER, A., RUNTE, K. J., SZCZEPANOWSKI, R., TAUCH, A., TILKER, A., VIEHOVER, P. & GOESMANN, A. 2008. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. J Biotechnol, 136, 77-90.

SENG, P., DRANCOURT, M., GOURIET, F., LA SCOLA, B., FOURNIER, P. E., ROLAIN, J. M. & RAOULT, D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis, 49, 543-51.

SHADE, A. & HANDELSMAN, J. 2012. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. Environ Microbiol, 14, 4-12.

SIEBER, J. R., LE, H. M. & MCINERNEY, M. J. 2014. The importance of hydrogen and formate transfer for syntrophic fatty, aromatic and alicyclic metabolism. Environ Microbiol, 16, 177-88.

SIEBER, J. R., MCINERNEY, M. J. & GUNSALUS, R. P. 2012. Genomic insights into syntrophy: the paradigm for anaerobic metabolic cooperation. Annu Rev Microbiol, 66, 429-52.

SONG, L., YANG, S., LIU, H. & XU, J. 2017. Geographic and environmental sources of variation in bacterial community composition in a large-scale municipal landfill site in China. Appl Microbiol Biotechnol, 101, 761-769.

STOLZE, Y., BREMGES, A., RUMMING, M., HENKE, C., MAUS, I., PUHLER, A., SCZYRBA, A. & SCHLUTER, A. 2016. Identification and genome reconstruction of abundant distinct taxa in microbiomes from one thermophilic and three mesophilic production-scale biogas plants. Biotechnol Biofuels, 9, 156.

SUN, L., MULLER, B., WESTERHOLM, M. & SCHNURER, A. 2014. Syntrophic acetate oxidation in industrial CSTR biogas digesters. J Biotechnol, 171, 39-44.

SUN, L., POPE, P. B., EIJSINK, V. G. & SCHNURER, A. 2015. Characterization of microbial community structure during continuous anaerobic digestion of straw and cow manure. Microb Biotechnol, 8, 815-27.

TORQUATO, L. D. M., PACHIEGA, R., CRESPI, M. S., NESPECA, M. G., DE OLIVEIRA, J. E. & MAINTINGUER, S. I. 2017. Potential of biohydrogen production from effluents of citrus processing industry using anaerobic bacteria from sewage sludge. Waste Manag, 59, 181-193.

TRAVERSI, D., VILLA, S., LORENZI, E., DEGAN, R. & GILLI, G. 2012. Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity. J Environ Manage, 111, 173-7.

WAN, S., SUN, L., DOUIEB, Y., SUN, J. & LUO, W. 2013. Anaerobic digestion of municipal solid waste composed of food waste, wastepaper, and plastic in a single-stage system: performance and microbial community structure characterization. Bioresour Technol, 146, 619-27.

WANG, C., DONG, D., WANG, H., MULLER, K., QIN, Y., WANG, H. & WU, W. 2016. Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. Biotechnol Biofuels, 9, 22.

WANG, M., ZHANG, X., ZHOU, J., YUAN, Y., DAI, Y., LI, D., LI, Z., LIU, X. & YAN, Z. 2017. The dynamic changes and interactional networks of prokaryotic community between co-digestion and mono-digestions of corn stalk and pig manure. Bioresour Technol, 225, 23-33.

WERNER, J. J., KNIGHTS, D., GARCIA, M. L., SCALFONE, N. B., SMITH, S., YARASHESKI, K., CUMMINGS, T. A., BEERS, A. R., KNIGHT, R. & ANGENENT, L. T. 2011. Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. Proc Natl Acad Sci U S A, 108, 4158-63.

WESTERHOLM, M., MULLER, B., SINGH, A., KARLSSON LINDSJO, O. & SCHNURER, A. 2017. Detection of novel syntrophic acetate-oxidizing bacteria from biogas processes by continuous acetate enrichment approaches. Microb Biotechnol.

WIESER, A., SCHNEIDER, L., JUNG, J. & SCHUBERT, S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl Microbiol Biotechnol, 93, 965-74.

WIRTH, R., KOVACS, E., MAROTI, G., BAGI, Z., RAKHELY, G. & KOVACS, K. L. 2012. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. Biotechnol Biofuels, 5, 41.

WOJCIESZAK, M., PYZIK, A., POSZYTEK, K., KRAWCZYK, P. S., SOBCZAK, A., LIPINSKI, L., ROUBINEK, O., PALIGE, J., SKLODOWSKA, A. & DREWNIAK, L. 2017. Adaptation of Methanogenic Inocula to Anaerobic Digestion of Maize Silage. Front Microbiol, 8, 1881.

YU, Y., LEE, C., KIM, J. & HWANG, S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. Biotechnol. Bioeng, 89, 670-679.

ZHAO, Y., YUAN, X., WEN, B., WANG, X., ZHU, W. & CUI, Z. 2017. Methane Potential and Microbial Community Dynamics in Anaerobic Digestion of Silage and Dry Cornstalks: a Substrate Exchange Study. Appl Biochem Biotechnol, 181, 91-111.

ZHU, C., ZHANG, J., TANG, Y., ZHENGKAI, X. & SONG, R. 2011. Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by mcrA analysis. Microbiol Res, 166, 27-35.

5. Anhang

5.1 Teilvorhaben 1: Bioprozessführung (FKZ 22015412)

5.1.1 Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Mit dem Projekt AcEta sollte ein wesentlicher Beitrag zur Bewertung, Auslegung und Optimierung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufenlandwirtschaftlicher Biogasanlagen geschaffen werden. Das übergeordnete Ziel des Projekts AcEta war es, auf der Basis einer systematischen technisch-wissenschaftlichen Arbeit zur Mikrobiologie der Hydrolyse und der Versäuerung die Effizienzsteigerung landwirtschaftlicher Biogasanlagen und somit die Steigerung der Ressourceneffizienz und der Anlagenwirtschaftlichkeit sowie außerdem die Verbesserung der Klimaschutzwirkung zu ermöglichen.

Die Hauptaufgaben des Teilvorhabens 1 können wie folgt untergliedert werden:

1. Auswertung und Bilanzierung der Betriebsdaten von ca. 20 Hydrolyse- und Versäuerungsstufen (und der nachgeschalteten Methanstufen
2. Analysen des Substratumsatzes an ca. 5 repräsentativen großtechnischen Hydrolyse- und Versäuerungsstufen
3. Charakterisierung der mikrobiellen Umsetzungen bzw. Gärungstypen (TTZ, C+W) dieser Hydrolyse- und Versäuerungsstufen
4. weitergehende Bilanzierung und Untersuchung der Kinetik des Substratumsatzes ausgewählter Substrate an kontinuierlich betriebenen Technikumsanlagen
5. Analyse des Zusammenhangs zwischen Betriebsbedingungen der Technikums- und Großanlagen und den erreichten Umsatzleistungen
6. Ermittlung der Wirtschaftlichkeit verfahrenstechnischer Lösungen

Auf der Basis der beschriebenen Punkte waren unter Berücksichtigung des Wissenstandes Auslegungsempfehlungen zu erarbeiten, die eine fundierte Auslegung der Hydrolyse- und Versäuerungsstufe ermöglichen.

5.1.2 Bearbeitete Arbeitspakete

AP	Aufgabe	zuständiger Projektpartner	Stand
1	Entwurf, Bau und Erprobung des Gas-Probenahmesystems für offene Verfahrensstufen	ttz/C+W	✓
3	Analyse großtechnischer zweistufiger Biogasanlagen I: Vorauswahl von 20 Biogasanlagen, vor Ort-Termine und Auswertung der Betreiberdaten	C+W	✓
4	Analyse großtechnischer zweistufiger Biogasanlagen II: Felduntersuchungen an 5 landwirtschaftlichen Biogasanlagen	ttz/C+W	✓
5	Chemische Untersuchung der Feldproben	ttz	✓
7	Auswertungen der Felduntersuchungen	ttz/C+W/HS Anhalt	✓
8	Auswertung der Betreiberdaten der 5 untersuchten Biogasanlagen	C+W	✓
9	Technikumsuntersuchungen zur Umsatzbilanz und Kinetik sowie Entwicklung eines Bemessungsmodells	ttz	✓
10	Abschätzung der Wirtschaftlichkeit von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen	C+W	✓
11	Abschlussbericht	ttz/C+W/HS Anhalt	✓
12	Auslegungsempfehlungen mit Faustzahlen/Richtwerten (Broschüre)	ttz/C+W/HS Anhalt	*
13	Fachgespräch	ttz/C+W/HS Anhalt	*

* Fertigstellung und Veröffentlichung der Broschüre bis zum 30.06.2018, Fachgespräch zu einem für Landwirte geeigneten Zeitpunkt (2018)

5.1.3 Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

Die vorliegende Studie, im Besonderen auch Teilvorhaben 1, liefert Beiträge zur Neubewertung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen im Bereich der landwirtschaftlichen Biogasanlagen:

1. Die vorliegende Studie stellt die erste Hersteller-unabhängige Untersuchung landwirtschaftlicher Hydrolyse- und Versäuerungsstufen in Deutschland dar. Die ermittelten Betriebsbedingungen der Großanlagen weichen signifikant von denjenigen ab, die für zahlreiche Labor- und Technikumsstudien zur Hydrolyse und Acidogenese gewählt wurden.
2. Die Methanemissionen der untersuchten, nicht gasdichten Anmaischer und Hydrolysestufen machten 2 bis 11 % des verstromten Methans aus und sind daher relevant für Betriebswirtschaft sowie Klima- und Arbeitsschutz.
3. Eine signifikante Hydrolyse von Faserstoffen konnte in den untersuchten Hydrolysestufen nicht nachgewiesen werden. Eine vom Methanreaktor getrennte Reaktionsstufe bringt daher hinsichtlich der zentralen Funktion der Faserstoff-Hydrolyse keine spürbaren Vorteile.
4. Die im Rahmen dieses Vorhabens durchgeführten Technikumsuntersuchungen bestätigen die in den beprobten und überwachten Großanlagen gefundenen Erkenntnisse.
5. Ein vereinfachtes mathematisches Modell zur Hydrolyse und Versäuerung konnte die experimentell bzw. betriebstechnisch gefundenen Erkenntnisse bestätigen.
6. Die angestrebte Optimierung von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen wird eingeschränkt durch die Anmaischerfunktion und ihre Anforderung an die Prozessführung.
7. Die substratspezifischen Methanerträge der untersuchten ein- und zweiphasigen Biogasanlagen unterschieden sich bei vergleichbarer hydraulischer Verweilzeit nicht signifikant. Dies gilt auch für den Vergleich von Biogasanlagen mit offenen und gasdichten Vorstufen.
8. Der häufiger beobachtete Leistungsvorteil zweiphasiger Biogasanlagen gegenüber einphasigen Systemen dürfte bei vergleichbarem Faulraumvolumen vor allem auf die intensive Homogenisierung des Substratgemischs im Anmaischer und auf den Kaskadeneffekt seriell betriebener Reaktoren zurückzuführen sein.

In der Summe wird die Leistungsfähigkeit von Anmaischern und zweistufigen Reaktorkonfigurationen bestätigt. Die Wirksamkeit kleinvolumiger Hydrolysestufen mit kurzen Verweilzeiten muss allerdings, vor allem hinsichtlich der Hydrolyse von Faserstoffen, bezweifelt werden.

5.2 Teilvorhaben 2: Populationsanalyse (FKZ 22011413)

5.2.1 Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Im Rahmen des AcEta Projektes wurden im Teilvorhabens 2 von der Hochschule Anhalt MALDI-TOF-MS und molekularbiologischen Analysen zur Bestimmung der Population von Hydrolyse- und Versäuerungsstufen durchgeführt. Eine Langzeitanalyse realer Biogasanlagen mit MALDI-TOF-MS wurde bisher nicht durchgeführt. Dabei wurden sechs Anlagen mit Hydrolyse- und Versäuerungsstufe mit oder ohne Anmaischer intensiver untersucht und Proben über die gesamte Laufzeit des Projektes gewonnen.

In dieser Arbeit wurden MALDI-TOF-MS Analyse von 38 Proben aus sechs Hydrolyse- und Versäuerungsstufen landwirtschaftlicher Biogasanlagen untersucht, ca. 10.000 MALDI-TOF-MS Messungen durchgeführt und etwa 3000 Sequenzierungen ausgewertet. Durch mehrfache Probenahme über drei Jahre wurden die mikrobiellen Populationen untersucht. In der Literatur wird in einer Reihe von Publikationen beschrieben (Cirne et al., 2007, Wang et al., 2017), dass jede Anlage je nach Substrat und Betriebsweise eine eigene Populationsstruktur hat, die auch je nach Verschiebungen in der Substratzusammensetzung fluktuiert (Sun et al., 2015, Song et al., 2017). Dies ist in Übereinstimmung mit den Daten, die in dieser Arbeit mittels MALDI-TOF-MS-Analyse bestimmt wurden. Es ist gelungen, die bisher beschriebenen Phyla Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria und Bacteroidetes der aerob oder mikroaerophil wachsenden Organismen der Domäne Bacteria mit den vielfach beschriebenen im Biogas-Bildungsprozess wichtigen Organismen nachzuweisen. Über die MALDI-TOF-MS Analyse war zudem eine Bestimmung bis auf Artebene möglich, sowie, unter den gegebenen Bedingungen, die Bestimmung des prozentualen Anteils an der Population. Durch die in allen Anlagen durchgeführte Rezirkulation wurden Mikroorganismen detektiert, die auch in den Hauptfermentern zu finden sind. Dies konnte auch durch die zusätzlich durchgeführte qPCR-Analyse festgestellt

werden. Eine spezifische Population für Versäuerungs- und Hydrolysestufen konnte daher nicht dezidiert bestimmt werden.

Abhängig von der Substratzusammensetzung wurden Unterschiede in den Populationen gefunden, wobei allerdings eine Zuordnung einer definierten Population, die einem bestimmten Substrat zugeordnet werden kann, nicht möglich ist (Theuerl et al., 2015). Dies müsste an Anlagen ohne Rezirkulation untersucht werden. Es kann jedoch ausgesagt werden, dass in den einzelnen Anlagen sich jeweils eine spezielle Population befindet, wie auch schon andere Autoren beschrieben haben (s.o.). Nur geringe Überschneidungen mit bis zu 20% auf Artebene finden sich zwischen Anlagen, die eine sehr ähnliche Substratzusammensetzung besitzen (Analyse mit *BioVenn*). Die durchgeführte multivariate Statistik (nMDS und PCoA) betätigte dieses Ergebnis. Diese Analyse der MALDI-TOF-MS-Daten zeigte ebenfalls, dass sich anhand der Populationen keine Korrelation zum Substrat aufzeigen ließ.

Bei Langzeituntersuchungen über ein bis mehrere Jahre an realen Anlagen muss berücksichtigt werden, dass es während der Projektlaufzeit zu Substratwechsel, Wechsel der Substratqualität, Veränderungen bezüglich der Rezirkulation und auch Änderungen an den Anlagen gekommen ist, die die Bestimmung der mikrobiellen Diversität beeinflussen, da dadurch eine ständige Fluktuation innerhalb der Population stattfindet. Da im Projekt AcEta reale Anlagen untersucht wurden, konnte dies auch anhand der MALDI-TOF-MS Analysen beobachtet werden. Besonders gut zu sehen ist dies z.B. bei den Anlagen BGA_18 und BGA_17, wo es technische Änderungen an der Anlage gab (BGA-18), bzw. sehr inhomogenes und heterogen dosiertes Substrat (BGA_17) verwendet wurde.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die MALDI-TOF-MS-Methode auch für die Untersuchung von mikrobiellen Populationen aus realen Biogasanlagen geeignet ist und einen schneller Einblick in die dort vorhandene Population ermöglicht. Die Beobachtung anderer Arbeitsgruppen, dass jede Biogasanlage offensichtlich eine eigene Populationsstruktur besitzt, konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden.

5.2.2 Bearbeitete Arbeitspakete der Hochschule Anhalt (Stand HSA 05/2018)

AP	Aufgabe	zuständiger Projektpartner	Stand
2	Methodenentwicklung Populationsanalyse	HS Anhalt	✓
6	Populationsanalyse der Feldproben	HS Anhalt	✓
7	Auswertungen der Felduntersuchungen	ttz/C+W/HS Anhalt	✓
11	Abschlussbericht	ttz/C+W/HS Anhalt	✓
12	Auslegungsempfehlungen mit Faustzahlen/Richtwerten (Broschüre)	ttz/C+W/HS Anhalt	*
13	Fachgespräch	ttz/C+W/HS Anhalt	*

* Fertigstellung und Veröffentlichung der Broschüre bis zum 30.06.2018, Fachgespräch zu einem für Landwirte geeigneten Zeitpunkt (2018)

5.2.3 Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

1. Es wurde eine Probenahme und Aufarbeitung entwickelt, die geeignet ist, Proben aus Biogasanlagen mit MALDI-TOF-MS zu analysieren. Parallel wurde eine Aufarbeitung der Proben zur Messung für qPCR- Analysen entwickelt. Die entwickelten Verfahren wurden in zehn Arbeitsanweisungen festgelegt.
2. Dieses Projekt hat gezeigt, dass die MALDI-TOF-MS-Analyse sehr gut geeignet ist, um einen schnellen Einblick in eine bakterielle Population in Biogasanlagen zu bekommen. Diese Analytik kann jederzeit über Verwendung entsprechender Nährböden auf spezielle Mikroorganismengruppen angepasst werden. Auch anaerob angezogene Kulturen können problemlos vermessen werden.
3. Die außerhalb dieses Projektes durchgeführte qPCR-Analyse deckt sich im Wesentlichen mit den mit MALDI-TOF-MS gefundenen Gruppen. Sie geht aber naturgemäß darüber hinaus, da hier auch aufwendig oder gar nicht zu kultivierende Bakterien gefunden werden.
4. Die Analysen zeigen, dass durch die in allen Anlagen stattfindende Rezirkulation eine mikrobielle Population gefunden wird, die den bisher in Hauptfermentern, Gärrestlagern und Nachgären beschriebene Organismenzusammensetzungen sehr ähnlich ist.
5. Eine Abhängigkeit von Jahreszeiten ist nicht feststellbar, wohl aber das eine ungleichmäßige Fahrweise und eine heterogene Zusammensetzung der Substrate zu Populationsschwankungen führt.

6. Innerhalb der Grenzen der Untersuchung kann festgehalten werden, dass auch bei ähnlicher Substratzusammensetzung offensichtlich jede Anlage eine eigene Populationszusammensetzung hat. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeitsguppen.