Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

Entwicklung eines Biogasprozesses zur hygienisierenden Vergärung

Zuwendungsempfänger:

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Forschungsschwerpunkt „Biomassenutzung Hamburg“, Fakultät Life Sciences, Ulmenliet 20, 21033 Hamburg

Tel. 040/42875-6355, 0163/724 6059
Paul.Scherer@haw-hamburg.de

Förderkennzeichen:

22011710

Laufzeit:

01.03.2012 bis **31.12.2016**

Monat der Erstellung:

12.02.2018

Projektleiter:

Prof. Dr. Paul Scherer

Projektmitarbeiter:

Dr. Sandra Off

Weiterer wiss. Mitarbeiter Dipl. Ing Sebastian Antonczyk (Stipendiat der ersten gemeinsamen Graduierten-schule der Universität Hamburg, Fachbereich Chemie mit der HAW Hamburg)

Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.

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 bei den Autoren.

INHALT

I. ZIELE 4

I.1 Aufgabenstellung 4

I.1.1 Wie heiß ist für eine Hygienisierung nötig – Wie heiß ist möglich? 4

I.1.2 Arbeitspakete und Meilensteine 4

I.2 Stand der Technik 5

I.2.1 Verbreitung und Akzeptanz von Biogasanlagen und deren Gärresten als Wirtschaftsdünger 5

I.2.2 Auswahl an gesetzlichen Rahmenbedingungen zur Hygiene im Gewerbeverkehr 9

I.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen 11

I.3.1 Untersuchte landwirtschaftliche Biogasanlage eines Milchviehbetriebes 11

I.3.2 Weitere Kooperationen 14

II. ERGEBNISSE 15

II.1 Erzielte Ergebnisse 15

II.1.1 Analytik und Methoden 15

II.1.2 Überwachte Start-up-Phase der Biogasanlage 16

II.1.3 Einfluss der Temperatur auf die Effektivität der Biogasanlage 20

II.1.3.1 Temperaturprogramm 20

II.1.3.2 Einfluss der Temperaturerhöhung auf die Gaserträge der Biogasanlage 21

II.1.3.3 Einfluss der Temperaturerhöhung auf die Fettsäuregehalte der Biogasanlage 24

II.1.3.4 Einfluss der Temperaturerhöhung auf die Ammonium- bzw. Ammoniakkonzentrationen 26

II.1.3.5 Chemische Analysen der Spurenelemente 27

II.1.3.6 Wiederholungsphase (Wdh. des Temperaturanstiegs), Spurenelementzugaben 32

II.1.4 Projektergebnisse zur Hygienerelevanz der untersuchten Biogasanlage: Einfluss der Temperatur auf die Hygienisierung der BGA 39

II.1.4.1 Messung des Hygienestatus mittels konventioneller Plattentechnik 39

II.1.5 Projektergebnisse zur Hygienerelevanz der untersuchten Biogasanlage: Molekularbiologische Nachweistechniken 48

II.1.5.1 Allgemeine Vorgehensweise bei der Next Generation Sequencing (NGS) Technik 48

II.1.5.2 DNA-Extraktion 49

II.1.5.3 Charakteristika der verwendeten Next Generation Sequencing (NGS) 50

II.1.5.4 Einfluss der Temperatur auf die allgemeine mikrobielle Zusammensetzung 51

II.1.5.5 Next Generation Sequencing-Ergebnisse der ersten Probenserie 52

II.1.6 Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft bei erhöhten Fettsäurewerten....58

II.1.6.1 Next Generation Sequencing-Ergebnisse der zweiten Probenserie bei erhöhten Fettsäurewerten....60

II.1.6.2 Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft bei erhöhten Ammoniakwerten (dritte Probenserie)....62

II.1.6.3 Next Generation Sequencing-Ergebnisse zur Wiederholungsphase der Temperaturabhängigkeit der mikrobiellen Lebensgemeinschaft 64

II.1.7 Molekularbiologisch detektierte potenziell pathogene Bakterien 66

II.1.7.1 Neues Vorkommen von Rauschbranderregern 69

II.1.8 Völlig neuer Indikatororganismus zur Erkennung einer effektiven hygienisierenden, thermophilen Vergärung 72

II.1.8.1 Ergebnisse zum neuen Indikatororganismus aus den Next Generation Sequencing Analysen....73

II.2 Verwertung 76

II.2.1 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende 76

II.2.2 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende 76

II.2.3 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit....76

II.3 Erkenntnisse von Dritten 76

II.4 Veröffentlichungen des Zuwendungsempfängers zum Förderthema 77

II.5 Weitere Referenzen zum Förderprojekt (siehe Text) 78

II.6 Abkürzungsverzeichnis 86

II.7 Danksagung 86

III. ADDENDUM 87

III.1 Zusätzliche Diagramme und Tabellen zu den Mikrobiomanalysen 87

III.2 Zusatzdiagramm zu den Versuchswochen 90 bis 170 (Wiederholungsphase) mit den dazugehörigen Temperaturen 92

III.3 Vergleich der Messmethoden von FOS/TAC nach Nordmann und FOS/TAC neu nach HAW 93

III.4 Analysenwerte des unbeheizten Endlagers und zum Gülle-Input der untersuchten Biogasanlage 96

III.5 Zusammenfassung des Vorhabens (deutsch und englisch) 100

(104 Seiten gesamt)

I. Ziele

I.1 Aufgabenstellung

I.1.1 Wie heiß ist für eine Hygienisierung nötig – Wie heiß ist möglich?

Das Ziel des Forschungsvorhabens bestand darin, eine landwirtschaftliche, thermophile Gülle-Biogasanlage eines Milchlandwirts in der Temperatur so weit wie nötig zu erhöhen, um eine besonders intensive hygienisierende Vergärung zu erreichen. Dabei sollte eine möglichst optimale Betriebstemperatur bestimmt werden, ohne die Effizienz der Biogasanlage zu schmälern. Gleichzeitig wurden die betrieblichen und chemischen Prozessdaten sowie die Mikrobiologie über einen langen Zeitraum von drei Jahren aussagekräftig erfasst. Die untersuchte Biogasanlage hatte den Vorteil, dass sie aus drei, nicht gekoppelten identischen Biogasreaktoren mit gleicher Substratzufuhr und gleicher Beladungsrate bestand. Dadurch war eine sehr gute Vergleichbarkeit trotz unterschiedlicher Temperaturen gegeben.

Das vorliegende Projekt wurde realisiert, um eine weit über den gesetzlichen Rahmen gesteigerte Hygienisierung einer landwirtschaftlichen, thermophilen Gülle-Biogasanlage durch den Einsatz von erhöht thermophilen Gärtemperaturen (> 55 °C) ohne eine extra Hygienisierungs- bzw. Pasteurisierungsstufe zu erreichen. Dabei sollte eine Betriebstemperatur bestimmt werden, bei der die gleichhohe Effizienz der Anlage gewährleistet werden kann. Eine solche Biogasanlage könnte ggf. in Wasserschutzgebieten realisiert werden (Lebuhn et al., 2007).

I.1.2 Arbeitspakete und Meilensteine

Arbeitspaket 1: Vorbereitende Arbeiten mit Einfahren der thermophil (53 °C) betriebenen Hof-Biogasanlage des Landwirts Herrn Möller in Seth (Firma Bebra GmbH). Einhalten eines stabilen Gleichgewichtszustandes (3-fache Verweilzeit).

Arbeitspaket 2: Vorsichtiges Hochfahren des großtechnischen Testreaktors von 53 °C bis auf 59 °C in einer Gesamtzeit von etwa 24 – 28 Monaten, mit umfangreicher chemischer und biologischer Analytik (Fettsäuremuster, Quantitative Microscopic Fingerprinting: QMF, molekularbiologische Untersuchungen) sowie konventionelle, quantitative Hygieneuntersuchungen.

Arbeitspaket 3: Wiederholung einer selektierten optimierten Temperaturstufe mit vorheriger erneuter Adaption (4 – 8 Monate) und verschiedenen Beladungsraten mit chemischer und biologischer Analytik (Fettsäuremuster, molekularbiologische Untersuchungen) sowie konventionellen, quantitativen, Hygieneuntersuchungen.

Arbeitspaket 4: Schriftliche Ausarbeitung, Endbericht.

Meilenstein 1: Schrittweise Anhebung der Temperatur in dem großtechnischen Testreaktor von 53 °C auf 55 °C. Auswertung der gemessenen chemischen, mikrobiologischen und molekularbiologischen Daten vom Testreaktor und dem baugleichen Referenzreaktor mit konstanter Temperatur (53 °C) und mit identischer Substratzufuhr (der dritte Reaktor blieb ebenfalls weitgehend konstant).

Meilenstein 2: Schrittweise Anhebung der Temperatur in dem großtechnischen Testreaktor von 55 °C auf 57 °C. Auswertung der gemessenen chemischen, mikrobiologischen und molekularbiologischen Daten vom Test- und Referenzreaktor (53 °C).

Meilenstein 3: Weitere schrittweise Anhebung der Temperatur in dem großtechnischen Testreaktor von 57 °C auf 59 °C. Auswertung der gemessenen chemischen, mikrobiologischen und molekularbiologischen Daten vom Test- und Referenzreaktor (53 °C).

Meilenstein 4: Validierung der ermittelten Messdaten durch Wiederholung der schrittweisen Anhebung der Temperatur in einem großtechnischen Testreaktor von 53 °C auf 59 °C. Auswertung der erhobenen chemischen und molekularbiologischen Daten vom Testreaktor mit dem Referenzreaktor mit identischer Substratzufuhr.

Durch die Abarbeitung der Meilensteine aufgrund der einzelnen Temperaturabschnitte sind mit den Auswertungen der vielfältigen Ergebnisse während des Projektes zwei zusätzliche Betrachtungen hinzugekommen. So ist die Idee zur molekularbiologischen Untersuchung einer möglichen Korrelation der auftretenden Mikroorganismen inklusive der Pathogenen mit Hinblick auf die Varianz der Fettsäurewerte als auch mit Relation zu der Beeinflussung erhöhter Ammoniakwerte in den Biogas-Großreaktoren entstanden.

I.2 Stand der Technik

I.2.1 Verbreitung und Akzeptanz von Biogasanlagen und deren Gärresten als Wirtschaftsdünger

Es gibt in Deutschland derzeit zwischen 8.500 und 9.000 Biogasanlagen (BGAs), die jährlich über 45 Terawattstunden an Stromleistung aus Biomasse produzieren und bereits 7 % des Gesamtenergiebedarfs von Deutschland abdecken (Fachverband Biogas, 2017, Abbildung 1). Im Gegensatz zu Photovoltaik und Windenergie ist sie die einzige erneuerbare Energiegewinnungsform, welche vom täglichen Wetter unabhängig ist und somit durch Bereitstellung von etwa 4 GW Regelenergie maßgeblich zur notwendigen Netzstabilisierung beiträgt. Außerdem werden etwa 1 GW_{th} durch Biogasanlagen bereitgestellt (www.fnr.de). Biogastechnologie ist zudem als Querschnittstechnologie die einzige erneuerbare Energieform mit einem geschlossenen Nährstoffkreislauf, so dass sie keinen Fremdkörper in der Landwirtschaft darstellt und der Landflucht entgegenwirkt. Im Jahr 2013 betrug die produzierte Menge an Strom aus dem alternativen Energieträger Biomasse in Deutschland rund 41 Terawattstunden. Im Jahr 2016 waren es laut Prognose knapp 46 TWh, was etwa 7 % der Bruttostromerzeugung von Deutschland entsprach (Fachverband Biogas, 2017). Die Windenergie brachte es mit der dreifachen Anzahl Windenergieanlagen (ca. 27.000) zum Vergleich 2015 auf 79 TWh bzw.12,3 % (AGEB, 2016).

Der Trend zur Vergärung von Reststoffen aus der Viehhaltung (z. B. Gülle) sowie von Reststoffen aus der Getreideproduktion (z. B. Stroh) als Alternative zur ausschließlichen Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) für die Biogasproduktion hat sich spätestens ab dem EEG von 2012 stark weiterentwickelt. Trotz der im Jahr 2012 geänderten Fördersystematik für Strom aus Biomasse im Rahmen des EEG spielt die Energiegewinnung mit Biogasanlagen eine unverzichtbare Rolle. Die erneute Novellierung des EEG in 2014 reduzierte die Vergütung für Strom aus Biomasse durch die Streichung der Zuschüsse

allerdings erheblich. Da Güllekleinanlagen bis 75 kW_{el} weiterhin eine gesonderte Vergütungsklasse haben, wurden in der zweiten Jahreshälfte 2014 und in 2015 hauptsächlich diese neu errichtet. Die Anfang 2013 ans Netz gegangene untersuchte Biogasanlage mit 190 kW_{el} gesamt liegt mit der Leistung der drei Einzelreaktoren bereits in dieser Leistungskategorie.

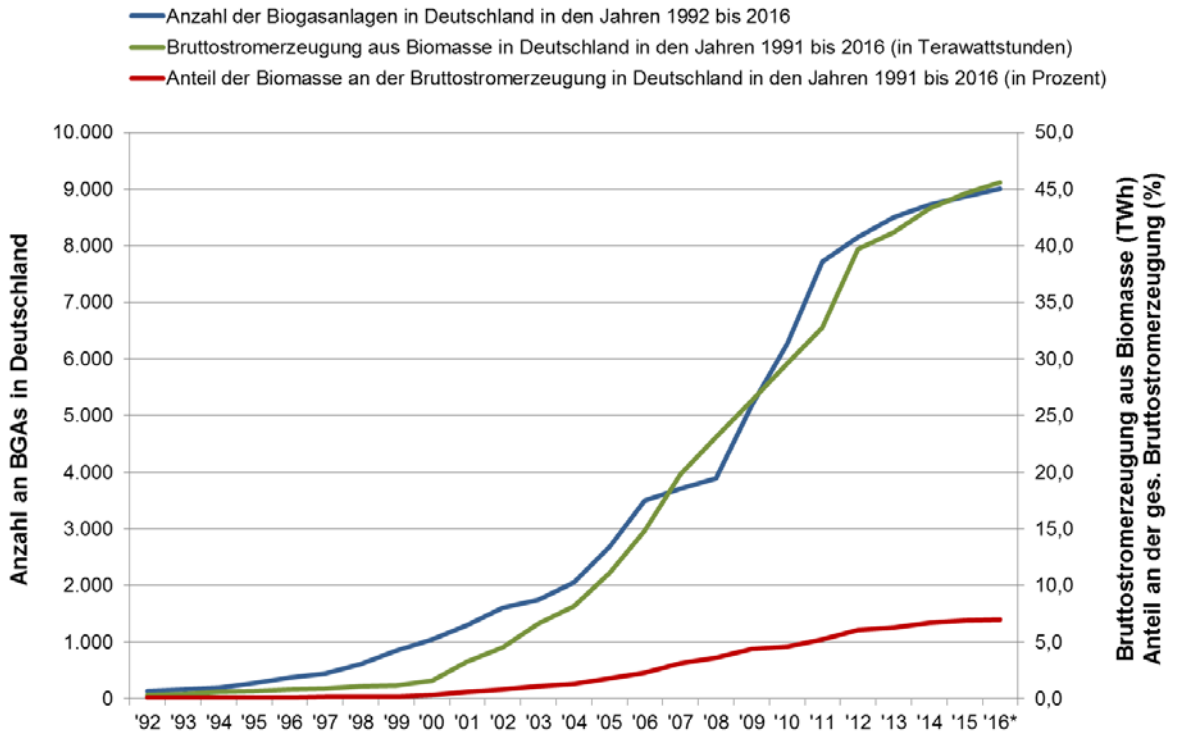


Abbildung 1: Die vorliegende Statistik zeigt die Anzahl der Biogasanlagen (BGAs) in Deutschland, die Entwicklung der Bruttostromerzeugung aus Biomasse sowie die Entwicklung des Anteils der Biomasse an der Bruttostromerzeugung in den Jahren 1992 bis 2015 und jeweils eine Prognose für 2016. Im Jahr 2013 wurden rund 8.500 Biogasanlagen in Deutschland gezählt. Bis Ende des Jahres 2016 sollten es laut Prognose circa 9.000 sein.

Die Biogastechnologie ist unter dem Aspekt der Nutzung erneuerbarer Energieträger (NawaRo-Kulturen) und des Klimaschutzes eine zukunftsweisende Technologie. Überdies ist aus ökologischer, aber auch ökonomischer Sicht die Möglichkeit bedeutsam, biologische Abfälle und Reststoffe, die in großen Mengen aus Landwirtschaft, Gartenbau und vor allen Dingen aus industrieller Verarbeitung und Produktion anfallen zu entsorgen, dabei für die Energieproduktion zu nutzen und gleichzeitig CO_2-Emissionen einzusparen.

Das Ausbringen der Gärrückstände auf landwirtschaftlich genutzte Flächen leistet einen wichtigen Beitrag zur Schonung bestehender Ressourcen, wie Phosphate, zur Aufrechterhaltung natürlicher Kreislaufprozesse. Neben Methan (> 90 % des Ausgangskohlenstoffes) und Wärme entstehen Gärreste als ein natürlicher Wirtschaftsdünger. Dieser wird in der Regel auf Ackerflächen als hochwertiger Dünger ausgebracht und kann ähnliche oder sogar bessere Ernteerträge als Mineraldünger liefern (Abubaker et al., 2012). Zusätzlich hat er auch positive Auswirkungen auf den chemischen Zustand des Bodens und die Bodenstruktur (Odlare et al., 2008). Die zunehmende Verbreitung und Kapazität der landwirtschaftlichen Biogasproduktion führten zu großen Mengen an Gärresten, die als Dünger

verwendet werden. Das deutsche statistische Bundesamt gab für 2010 eine Menge an ausgebrachten flüssigen Wirtschaftsdünger von knapp 200.000 m³ Deutschland an (im Wesentlichen Gülle). Der Anteil an Gärresten lag dabei mit rund 32.000 m³ bei etwa 16 % (Destatis, 2017).

Da alle natürlichen Düngemittel, wie z. B. unbehandelte Gülle, aber auch Gärreste, potentiell pathogene Organismen enthalten, die menschliche, tierische und pflanzliche Krankheiten hervorrufen können, besteht theoretisch die Gefahr, dass diese mit dem Aufbringen auf landwirtschaftlichen Anbauflächen verbreitet werden. Allerdings sind durch Gülle verursachte Epidemien in Deutschland nicht bekannt. Für eine allgemeine Akzeptanz der Ackernutzung von Dung und Gärresten sowie dem Aspekt von Wasserschutzgebieten ist ein hygienisch weitgehend sicheres Endprodukt jedoch zusätzlich positiv zu sehen. Ein wichtiger Aspekt dabei ist, dass im Gegensatz zum traditionellen Dünge-Management große Biogasanlagen meist von zwei oder mehr Eigentümern bzw. einer Firma betrieben werden. Gärreste können somit auf verschiedenen Feldern der Landwirte verteilt werden oder aufgrund regionaler Überschüsse über beträchtliche Entfernungen gewerblich transportiert werden.

Im Zusammenhang mit dem Bau von Biogasanlagen wurde in der Öffentlichkeit die Frage hinsichtlich des Vorkommens und der Verbreitung von Krankheitserregern in den Anlagen und den Gärresten laut, insbesondere, wenn diese zur Düngung ausgebracht werden bzw. eine BGA gebaut werden soll. In der Bevölkerung wird bisweilen diskutiert, ob sich pathogene Mikroorganismen im Gärprozess vermehren können. In diesem Zusammenhang hat der Boom des Biogassektors bei kritischen BürgerInnen einen gewissen Argwohn geweckt. Es soll hier zum ersten Mal durch ein Messprogramm über mehrere Jahre demonstriert werden, dass thermophil betriebene Biogasanlagen hygienisch einwandfrei ohne Leistungseinbußen betrieben werden können.

Dieses Hygienisierungspotenzial in Biogasanlagen ist abhängig von der Reaktorleistung, der Zusammensetzung der Güllesubstrate (viel oder wenig Ammoniak) und insbesondere von der Vergärungstemperatur und der hydraulischen Retentionszeit (HRT), aber auch den Eigenschaften der möglichen Krankheitserreger. Viele potentielle Pathogene werden an sich schon durch die anaeroben Bedingungen der Vergärung reduziert, wie *Salmonella spp*., pathogene *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* und viele mehr. Als anaerobe, bakterizide Bedingungen ist ein hoher Ammonium- bzw. Ammoniakgehalt (typischer Weise 2,5 – 6 g/L NH_4^+) bei einem alkalischen pH-Wert (8,0 – 8,3) anzusehen, der bereits bei mesophilen Bedingungen von 35 – 40 °C keimabtötend ist, ferner H_2S und kurzkettige Fettsäuren als Metabolite, um die wichtigsten Faktoren zu nennen (Kearney et al., 1993; Iwasaki et al., 2011; Beneragama et al., 2013; Fröschle et al., 2015). Allerdings sind einige in Gülle seltene Pathogene, z. B. *Clostridium perfringens, Coxielle und Mykobakterien*, relativ resistent gegen die Bedingungen in anaeroben Fermentern. Sporenbildende Clostridien gehören allerdings zur gesunden Darmflora des Menschen, allerdings nicht *Clostridium difficile* oder *C. perfringens*. Letztere Erreger werden vor allem durch die Gülle kranker Tiere eingebracht. Eine Vermehrung dieser Organismen in BGAs kann aber ausgeschlossen werden. Zu dieser Einstellung kommen alle Hygienestudien zu diesem Thema. Gängige humanpathogene Bakterien, wie Salmonellen, werden immer auch durch mesophile Bedingungen von 37 – 40 °C reduziert. Durch Gülle kranker Tiere eingebrachten Keime werden somit nicht vermehrt (Breves, 2012 und 2017; Fröschle et al., 2015; Hölzle, 2015; Insam, 2015; Pospiech, 2015). Dies betrifft auch Viren, Parasiten und Erreger von Pflanzenkrankheiten (Plöchl & Heiermann, 2014; Fröschle et al., 2015) und gegen Antibiotika multiresistente Keime, deren Gene in der Regel durch den Aufenthalt in Biogasanlage reduziert werden (Glaeser et al., 2016; Anjum et al., 2016).

Bei einem kleinen Milchhof wie hier beschrieben in Seth mit einer überschaubaren Zahl an 120 Kühen und regelmäßiger veterinärmedizinischer Überwachung kennt der Landwirt fast jedes Tier und daher bleiben Krankheitsfälle in der Regel nicht unerkannt.

Beprobungen einer genau dokumentierten Betriebsanlage über einen längeren Zeitraum mit belastbaren Zahlen wie in diesem Bericht fehlten jedoch bisher, was vor allem daran liegt, dass der Betreiber oder die bürgende Bank experimentelle Veränderungen zumeist ablehnt. Es kostete in diesem Fall sehr viel Überzeugungskraft. In Großanlagen wird in der Regel aus pumpentechnischen Gründen jede Stunde frische Gülle gepumpt, um die elektrische Anschlussleistung nicht zu stark zu erhöhen und damit den Stromeigenbedarf der BGA zu minimieren. Deshalb können im Allgemeinen Daten von Labor-Fermentern mit Standzeiten von 4, 12 oder 24 Stunden nicht ohne weiteres auf Großanlagen übertragen werden (Hölzle, 2015) und punktuelle Untersuchungen von Großanlagen sind ebenfalls nicht direkt vergleichbar.

Um ein mögliches Risiko für die Ausbreitung von Krankheiten zu minimieren, kann eine Anhebung der Gärtemperatur in den thermophilen Bereich (50 – 55 °C) dazu führen, dass eine weitreichende Pasteurisierung bereits stattfindet (Wagner et al., 2008; Pandey & Soupir, 2011). So eine echte Hygienisierung um 4 Zehnerpotenzen schaffen aber nur kontinuierlich thermophile Bedingungen, wozu die Arbeitsgruppe um Hölzle diverse Laborversuche mit 15-Liter-Fermentern bei Temperaturen von 40 °C, 51,4 °C, 52,4 °C und 57,2 °C durchführte Hölzle, 2015).

Wenn die Gärleistung eine thermophile Betriebsweise zulässt, wäre die weitgehende Hygienisierung ein weiterer Imagevorteil. Die untersuchte Biogasanlage in Seth trocknete trotz thermophiler Betriebsweise aufgrund der kurzen Reaktorverweilzeit von 11,5 Tagen und eines relativ kleinen Gärrestbehälters von 1000 m³ durch die eingesparte Wärmenergie mit der überschüssigen Wärme des BHKWs zusätzlich die Gärreste und heizte die Stallungen der 120 Milchkühe.

I.2.2 Auswahl an gesetzlichen Rahmenbedingungen zur Hygiene im Gewerbeverkehr

Als Leitlinie für Hygienevorschriften von Gülle findet man diese vor allem in der Bioabfallverordnung, weswegen diese als Quelle herangezogen wurde, auch wenn die untersuchte Biogasanlage des Milchviehbetriebes nicht unter diese Richtlinien fällt. In der Bioabfallverordnung (BioAbfV, 2013), die als Landesrecht wiederum auf die Verordnungen der Europäischen Gemeinschaft zurückgeht, ist ein großer Teil der **Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte** niedergeschrieben, die sich auf den kommerziellen Gewerbeverkehr beziehen. Das Aufführen dieser Verordnung hier hat daher nur das Ziel, den höchstmöglichen Hygienestatus zu veranschaulichen. Die deutsche Rechtsgrundlage basiert in erster Linie auf der EU-Verordnung Nr. 1069 von 2009. Diese gilt auch für gewerbemäßigen Kompost aus Gärresten, wirkt sich auf die Düngemittelverordnung (DüMV) aus und muss auch von der Bundesgütegemeinschaft Kompost e.V. beachtet werden. Die Letztgenannte erlaubt durch ein Gütesiegel, Gärreste in den Verkehr zu bringen, also über den Eigenbedarf eines Landwirtes hinaus. Dem geht allerdings immer eine Hygieneuntersuchung der Gärreste voraus.

Wirtschaftsdünger tierischer und pflanzlicher Herkunft (z. B. Gülle, Gärreste aus nachwachsenden Rohstoffen) oder betriebseigener Bioabfälle (Eigenverwertung von pflanzlichen Abfällen auf selbst bewirtschafteten Betriebsflächen) sind von den folgenden Ausführungen der BioAbfV **NICHT** betroffen. Dies wird ausdrücklich vorangestellt, um keine falschen Vermutungen auszulösen.

Gemäß der EU-Verordnung Nr. 1069 / Artikel 7 (2009) sind die tierische Nebenprodukte und ihre Folgeprodukte nach dem Grad des ausgehenden Risikos für die Gesundheit von Mensch und Tier in spezifische Kategorien eingestuft: Material der Kategorie 1 (= hohes Risiko) (Artikel 8), Material der Kategorie 2 (= mittleres Risiko) (Artikel 9), Material der Kategorie 3 (= geringes Risiko) (Artikel 10). Zum Material der Kategorie 2 (Artikel 9) gehören unter anderen Gülle, Darminhalte und tierische Nebenprodukte, die bei der Behandlung von Abwasser von Anlagen oder Betrieben, die Material der Kategorie 2 verarbeiten, eingesammelt werden.

Die **Bioabfallverordnung (BioAbfV) regelt den gewerblichen Einsatz, Verkehr und die Ausbringung von Bioabfällen** auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich oder gärtnerisch genutzten Böden. Biogasgärreste oder Gemische unterliegen nur dann der BioAbfV, wenn sie als Substrat einen gewerblichen oder kommunalen Bioabfall enthalten. Diese dürfen nur in einem hygienisch unbedenklichen Zustand gewerblich weiter verwendet werden. Deshalb sind alle gewerblichen Bioabfälle vor einer eventuellen landwirtschaftlichen Verwertung nach § 3 grundsätzlich behandlungspflichtig (z. B. thermophile Kompostierung oder Vergärung). Dabei ist die geforderte Hygienisierung durch eine der drei Möglichkeiten zu erreichen:

- Pasteurisierung (Erhitzung des gesamten Materials auf 70 °C über eine Stunde)
- Thermophile (aerobe) Kompostierung (55 °C 2 Wochen; 60 °C 6 Tage; 65 °C 3 Tage)
- Thermophile (anaerobe) Vergärung (mind. 50 °C für die anlagenspezifische Mindest-verweilzeit)

Durch eine Prozessprüfung (z. B. mittels Einlage von Pathogenen oder Unkrautsamen als Direktprüfung oder durch Feststellung der Verweilzeit) wird die Wirksamkeit des Hygienisierung-Verfahrens bei der thermischen Behandlung geprüft.

In der EU-Verordnung Nr. 142 (2011) zur Durchführung der Verordnung EU-Nr. 1069 (2009) sind die **Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte** festgelegt. Diese strenge Verordnung gilt für gewerbliche Anlagen, die Abfälle gewerblich verarbeiten und in den Verkehr bringen, also nicht für landwirtschaftliche Biogasanlagen.

Im Anhang V der Verordnung Nr. 142/2011 sind die Bestimmungen zur Umwandlung von tierischen Nebenprodukten und Folgeprodukten in Biogas, Kompostierung festgelegt. In Kapitel 1 Abschnitt 1 stehen die Anforderungen an die Biogasanlagen. Eine vorgeschriebene Pasteurisierungs-/Entseuchungsabteilung ist **NICHT** erforderlich, wenn 2. d) tierische Nebenprodukte, die gemäß Artikel 13 Buchstabe e Ziffer ii der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 und gemäß der vorliegenden Verordnung ohne Verarbeitung als Rohmaterial verwendet werden dürfen. Material der Kategorie 2 kann demnach mit oder ohne vorherige Verarbeitung kompostiert oder in Biogas umgewandelt werden, wenn es sich um Gülle, Magen und Darm und dessen Inhalt, Milch, Erzeugnisse auf Milchbasis, Kolostrum, Eier und Eiprodukte handelt, bei denen die zuständige Behörde nicht davon ausgeht, dass sie eine Gefahr der Verbreitung einer schweren übertragbaren Krankheit bergen (VO (EG) Nr. 1069/2009, Artikel 13; Buchstabe e Ziffer ii).

Sollte dem nicht von den Hygienevorschriften betroffenen Substrat-Material eines beigemischt werden, welches diesen unterliegt, so gelten folgende Normen und Grenzwerte (Kapitel III, Umwandlungsparameter, Abschnitt 3, Normen für Fermentationsrückstände und Kompost):

- 1.a) *Escherichia coli*: < 1.000 in 1 g oder *Enterococcaceae*: < 1.000 in 1 g
- 1.b) Salmonellen: in 25 g nicht nachweisbar.

Mit diesen auf Louis Pasteur und Robert Koch zurückgehenden Standards ist es gelungen, große humane Epidemien ab Mitte des 20. Jahrhunderts in Mitteleuropa nicht mehr auftreten zu lassen. Die oben aufgeführten hygienischen Maßnahmen bzw. Grenzwerte geben einen Einblick in die Voraussetzungen und Größenordnungen der bislang existierenden Hygienevorschriften für **gewerbliche** Bioabfallanlagen im Abfallmarkt. Sie gelten also ausdrücklich **NICHT** für Landwirte, die Gülle zur eigenen Düngung aufbringen.

I.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

I.3.1 Untersuchte landwirtschaftliche Biogasanlage eines Milchviehbetriebes

Es wurde während des Projektes eine gute und langjährige Zusammenarbeit mit der im Antrag beschrieben landwirtschaftlichen Biogasanlage des Milchviehwirts Herrn Bernd Möller in Seth gepflegt (Seth, Schleswig-Holstein, Deutschland).

Die großtechnische Biogasanlage verfügte über drei gleiche zylinderförmige Reaktoren mit jeweils einem Volumen von 115 m³ und einer Höhe von 14,5 m (Abbildung 2). Die Reaktoren wurden über einen gemeinsamen Substratmixer parallel mit einer identischen Substratzusammensetzung aus 70 % Gülle, Mais und Gras betrieben. Dabei wurde die Gülle erst hinter dem Substratmixer kurz vor der Anlage in geschlossenen Rohren zugeführt. Das ungeheizte Endlager hatte ein Volumen von ca. 1000 m³. Die elektrische Leistung betrug im Durchschnitt 190 kWh_{el} bei einer hydraulischen Retentionszeit (HRT) von nur 11,5 Tagen und einer organischen Beladungsrate (OLR) von 14,0 (9,5 t/d/Fermenter). Eine Biogasanlage mit solch effizienten Leistungsdaten kann man als BGA der zweiten Generation betrachten, da normale landwirtschaftliche einstufige Gülle-Biogasanlagen mit einer mittleren ORL von ca. 2 – 3 und einer Verweilzeit von etwa 30 bis 80 Tagen arbeiten (Weiland et al., 2015; Ahlberg-Eliasson et al., 2017). Siehe dazu auch den Leistungsvergleich mit einer konventionellen Biogasanlage in Tabelle 1.

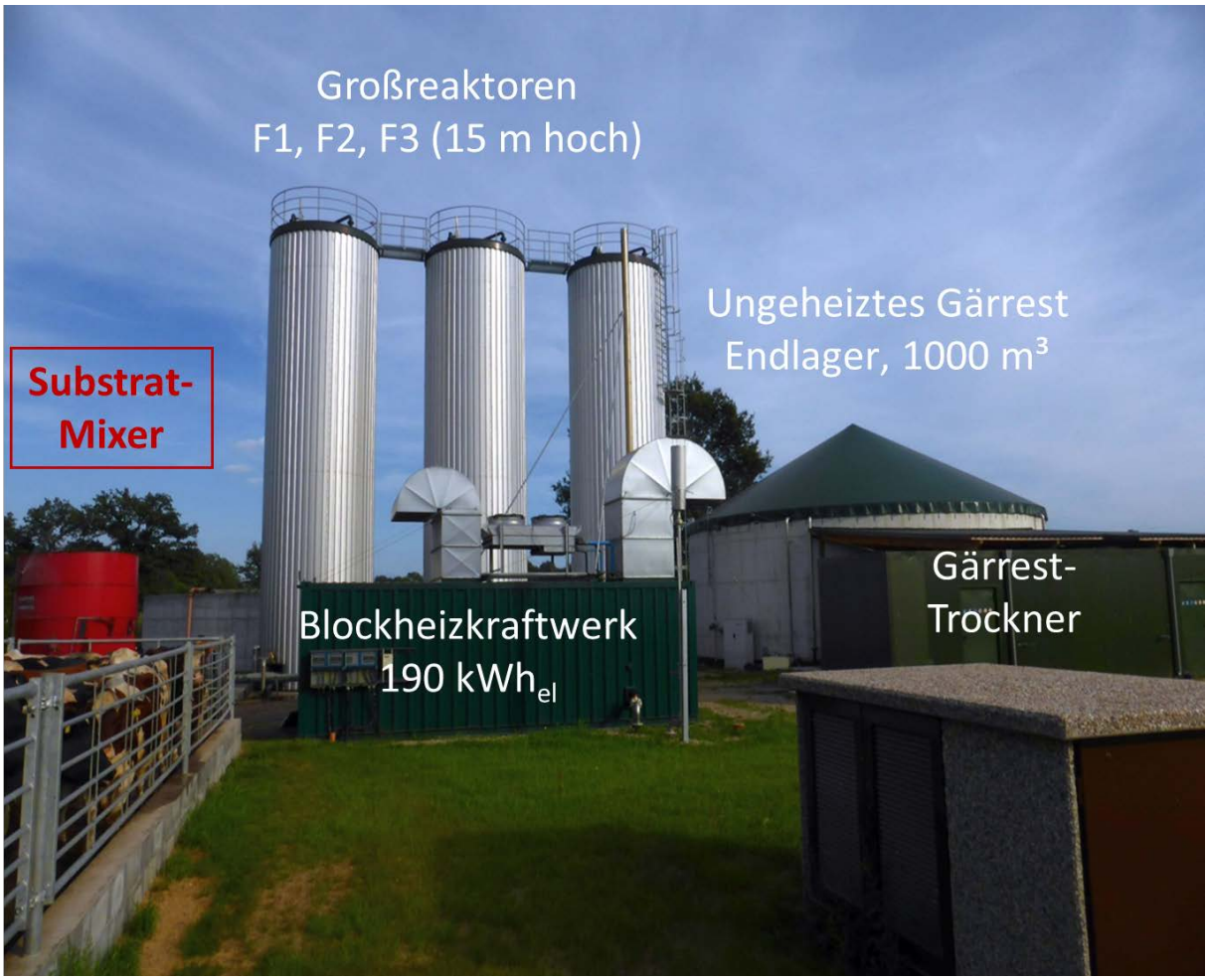


Abbildung 2: Foto der untersuchten großtechnischen Biogasanlage des Milchviehbetriebs in Seth (Nord-Deutschland) in dem Untersuchungszeitraum. Abgebildet sind der Substratmixer (links), die drei Hochzylinder-Reaktoren (mittig) und das ungeheizte Endlager für den Gärrest mit dem angeschlossenen Gärrest-Trockner (rechts).

Jeder der drei Großreaktoren wurde parallel betrieben. Die Betriebstemperaturen betrugen 51 °C in der Startphase und dann für den Referenzreaktor F2: 51 - 53 °C, für den Reservereaktor F1: konstant 53 °C und für den Testreaktor F3: 51 - 59 °C in der Hauptversuchsphase. In der Wiederholungsphase wurde die Temperatur im Reaktor F2 schrittweise von 53 °C auf 59 °C angehoben und diesmal der Reaktor F1 als Referenz bei 53 °C betrieben. Alle 3 Reaktoren wurden nacheinander in jeweils einem Stundenzyklus mit einer Mischung aus Festsubstrat und Reaktorflüssigkeit beschickt, wobei die Beschickungsdauer nur etwa 5 Minuten betrug. Die Rindergülle wurde separat in die Reaktoren durch ein Steigrohr zugeführt. Drei Pumpen waren permanent im Betrieb, um die Reaktor-Inhalte zu durchmischen. Das erzeugte Gas wurde im unbeheizten Endlager (16 - 24 °C) aufgefangen und anschließend im Blockheizkraftwerk (BHKW) zur Erzeugung von Strom- und Wärmeenergie umgesetzt. Es schloss sich ein Gärresttrockner an (Abbildung 3). Die Anlage wurde von der Bebra Biogas GmbH (Dortmund, Deutschland) erstellt. Sie ist in etwa baugleich mit den Biogasanlagen der Firma 4Biogas GmbH & Co. KG (Dortmund, Deutschland) bzw. der Nachfolgefirma KLOTZ Biogas GmbH.

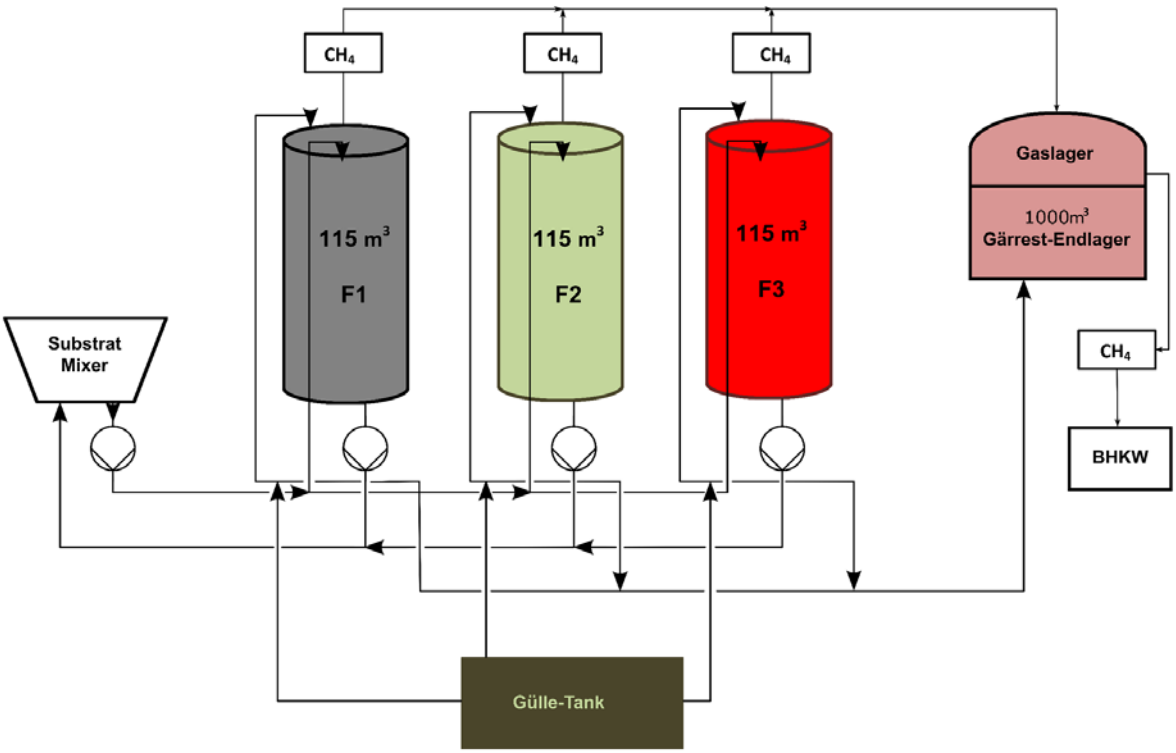


Abbildung 3: Gesamtschema der untersuchten Biogasanlage Seth (Schleswig-Holstein, Deutschland), die aus drei baugleichen, parallel geschalteten Reaktoren plus einem unbeheizten Endlager (ca. 16 – 24 °C) bestand. Alle Reaktoren liefen damit einstufig. Die Gülle des Milchviehbetriebs wurde in einem separaten Tank gesammelt und gesondert mit dem Substratgemisch den Reaktoren zugeführt. Die Biogasanlage wurde mittlerweile um einen vierten, nach dem gleichen Zylinder-Prinzip gebauten Reaktor der 4Biogas GmbH & Co. KG mit etwa 200 m³ und 19 m Höhe erweitert, ferner um ein zweites Endlager und ein zweites BHKW mit einem höheren Wirkungsgrad von 42 %.

Die Reaktoren wurden mit einem Substratgemisch aus Mais, Grassilage, fester und flüssiger Rindergülle beschickt. Die Mais- und Grassilage wurden an einem Standort in der Nähe der Biogasanlage angebaut. Die flüssige Gülle sowie der feste Mist stammten von 120 Milchkühen, welche im Stall in unmittelbarer Nachbarschaft zur Biogasanlage gehalten

wurden. Das gehäckselte Gras und der Mais wurden auf einer Betonplatte zu einem trapezförmigen Haufen aufgeschichtet und mit einer Plane bedeckt, um das Silieren sofort nach der Ernte zu garantieren. Der Feststoffdünger wurde manuell an einem separaten Ort gesammelt, um eine Kontamination des Grundwassers zu verhindern.

Bei der untersuchten Biogasanlage in Seth handelte es sich um eine moderne Hochleistungsanlage, was der direkte Vergleich mit einer konventionellen Biogasanlage belegt (Tabelle 1). Bei im Vergleich nur halbem Reaktorvolumen der Anlage und 40 % erhöhtem Substrateintrag sowie einer um den Faktor > 10 verkürzten hydraulischen Retentionszeit (HRT) liegt die elektrische Leistung der untersuchten BGA sogar knapp über der gewählten Vergleichsanlage. Damit sind geringere Investitions- aber auch weitaus niedrigere Betriebskosten verbunden. Sonst wäre es nicht möglich gewesen, bei der thermophilen Anlage und der energetisch ungünstigen Gülle noch Reserven für eine Temperaturerhöhung zu besitzen und gleichzeitig die Gärreste zu trocknen und die Stallungen zu beheizen.

Tabelle 1: Vergleich der Leistung einer konventionellen mesophilen Biogasanlage[1)] mit der untersuchten thermophilen Hochleistungsanlage bei gleichartigen Substraten

	BGA (konventionell)[1]	BGA (untersucht Seth)
Fermenter Volumen (Unbekannte Kosten für Heizen und Rühren)	Fermenter 1000 m^3 Nachgärer, beheizt 1000 m^3 Endlager 1000 m^3 Gesamt 3000 m^3	Fermenter 445 m^3 (3 x 115 m^3) Ohne Nachgärer Endlager 1000 m^3 Gesamt 1645 m^3 (50 %)
Temperatur	mesophil	thermophil
Rindergülle/d	4400 kg	6500 kg
Maissilage/d	4100 kg	2600 kg
Grassilage/d	3000 kg	500 kg
Ganzpflanzensilage (Roggen)/d	3000 kg	250 kg Rindermist
Input-Nassmasse pro Tag (kg/d)	14.500	9.850 (75 %)
Input-Masse[2] (VS (kg)/d)	3530	1547 (50 %)
Hydraulische Retentionszeit (d)	Fermenter 69 d Nachgärer 69 d [unbeheiztes Endlager] Reaktoraufenthalt **138 d (> 10-fach)**	Fermenter 11,5 d (**nur 1/6**) Ohne Nachgärer [unbeheiztes Endlager] Reaktoraufenthalt **11,5 d**
Input-Masse[2] VS (kg)/ d	3530	1547
Methangehalt im Gas (%)	52,7	53-54
OLR[3] (kg VS/m^3/d)	3.53	14,07 (4fach)
Elektrische Leistung (kWh_{el})	170	180 - 190

1) Die Daten der Vergleichs-Biogasanlage stammen aus dem Aufsatz „Mehr Strom durch Binder-Gasmessung“, In Energie aus Pflanzen 5/2012, Seiten 6 – 10

2) KTBL – Faustzahlen Biogas; Auflage 2 – 2009

3) OLR = Organic Loading Rate

I.3.2 Weitere Kooperationen

Ein starker Wissensaustausch bestand mit der molekularbiologischen Abteilung des Zentrums für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld über ein anderes FNR-Verbundvorhaben (BiogasCore), insbesondere mit dem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Andreas Schlüter und der Doktorandin Frau Irena Maus (jetzt Dr. Maus). Gemeinsam wurden die DNA-Isolationsmethoden sowie die Auswertung von bioinformatischen Datensätzen optimiert.

II. Ergebnisse

II.1 Erzielte Ergebnisse

II.1.1 Analytik und Methoden

Während des Betriebs der Biogasanlage wurden mehrere Betriebsparameter aufgezeichnet. Dazu gehörten die Menge und Art der täglichen Substratzufuhr sowie der wöchentliche Gehalt an Trockensubstanzen (TS) in den Fermentern, die organische Trockensubstanzen (oTS), Phosphat (PO_4^{3-}), Ammonium (NH_4^+), Ammoniak (NH_3), Alkalinität, Leitfähigkeit und das gesamte Spektrum der flüchtigen Fettsäuren C_2 - C_6 (Volatile Fatty Acids, VFA) einschließlich geradkettiger Alkohole (C_1 - C_4), die aber immer unter 5 % lagen und daher nicht weiter berücksichtigt wurden. Für die Fermenteranalytik siehe Scherer (2007).

Die Trockensubstanzen wurden nach dem Standardverfahren (DIN / EN12880 2001) mit Hilfe eines ED 115 Ofens (WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland) bestimmt und die flüchtigen Substanzen wurden nach dem Standardverfahren (DIN / EN12879 2001) mit Hilfe eines Heraeus M104 Muffelofen (WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland) ermittelt (Scherer & Neumann, 2013). Die wöchentlich bestimmten oTS- und TS-Werte der Reaktoren lagen in der Startphase (< 50. VW) meist bei 6 % oTS und 8 % TS, später bei 8 % und 11 %, was einem Verhältnis von 75 – 80 % von oTS zu TS entspricht. Es kamen aber auch Verhältnisse von 65 % vor. Ein niedriger oTS-Prozentsatz spricht eher für einen vollständigeren Abbau, wobei aber dieses Merkmal sehr ungenau ist.

Der pH-Wert der zahlreichen Proben wurde mit dem Calimatic 761-pH-Meter (Knick, Berlin, Deutschland) gemessen. Wie zuvor von Demirel und Scherer (2008) beschrieben, wurden die flüchtigen organischen Fettsäuren (VFA = Volatile Fatty Acids) und Alkohole unter Verwendung eines HP Gas-Chromatographen Agilent Typ 6890N mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einer BP 21-gebundenen FFAP Fused Silica Säule bestimmt. Damit konnten in den ersten 10 min die kurzkettigen VFA und Alkohole, nach 15 min Milchsäure und sogar nach 30 min Phenylessigsäure und langkettige (> C_6) Fettsäuren erfasst werden (letztere hier nicht relevant). Auch die Milchsäure mit Werten stets < 50 mg/L und die Alkohole (in der Regel im Bereich von 10 – 30 mg/L) waren nicht relevant und wurden daher nicht im Einzelnen aufgeführt. Die Phenylessigsäure als Abbauprodukt von Eiweiß (Griehl et al., 2010) war im Wesentlichen konform zum Gesamtwert der Gesamtsumme der organischen Fettsäuren (FOS = VFA) und kam deshalb ebenfalls nicht zum Tragen. Als Trägergas wurde Wasserstoff (H_2) verwendet, siehe auch dazu Raposo et al., 2013.

Ammonium und Phosphat wurden mittels Merck-Tests (Testnummern 1.00683 und 1.14729) (Merck, Darmstadt, Deutschland) bestimmt (Scherer & Neumann, 2013). Freier Ammoniak (NH_3) ist in erster Linie vom Ammonium-Gehalt abhängig. Darüber hinaus hat Hansen et al. (1998) berichtet, dass der Anteil an freiem Ammoniak in Bezug auf den gesamten Ammoniakstickstoff von pH und Temperatur, wie in der Gleichung (1) angegeben, abhängig ist.

$$NH_3(free) = TAN\ X \left(1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-(0.09018 + \frac{2729.92}{T})}} \right)^{-1} \qquad (1)$$

NH_3: Freier Ammoniak (mg L^{-1}), TAN: Gesamt-Ammonium (mg L^{-1}), T: Temperatur (K)

Die Alkalinität (TAC = Total Anorganic Carbonate) wurde durch Titration mit einer Standard-H_2SO_4-Lösung (0,1 N) unter Verwendung eines DL 15 Titrators (Mettler-Toledo GmbH, Analytical, Schwerzenbach, Schweiz) bestimmt. Das Volumen der am pH-Endpunkt 5,0 verbrauchten H_2SO_4 wurde aufgezeichnet (modifiziert nach APHA, 1992). Zu dem Vergleich von Messmethoden für FOS/TAC-Werte siehe Addendum III.3, Abbildungen A4 und A5. Wegen der höheren Aussagekraft wurden im Bericht nebst den exakt bestimmten Gesamtfettsäuren VFA nur die relevanten Fettsäuren Essigsäure und Propionsäure in den Diagrammen aufgeführt.

Das Gasvolumen an Methan (CH_4) und CO_2 sowie deren Konzentrationen (%) als auch die von H_2, H_2S und O_2 wurden mit einer separaten Gasmessstation gemessen und analysiert, die in der 29. Versuchswoche (Binder GmbH, Ulm, Deutschland) installiert wurde. Die Daten wurden telefonisch und online an das Labor in Hamburg übertragen.

II.1.2 Überwachte Start-up-Phase der Biogasanlage

Ab Beginn der Projektphase mit der ersten Versuchswoche im März 2012 wurden alle drei Großreaktoren intensiv im Wochen-Rhythmus analysiert. Gestartet wurden die Analysen bereits vorher mit dem Einlaufen der Gülle. In den ersten 5 Versuchswochen wurde dann stufenweise die Beladungsrate (OLR) von 5,3 kg oTS/m³/d auf 10,7 kg oTS/m³/d erhöht. Dabei fand eine parallele Verminderung der hydraulischen Retentionszeit (HRT) von 23 auf 13 Tage statt.

Die Gasproduktion (GPR) wurde zum einen indirekt aus der elektrischen Leistung unter Verwendung einer Umwandlungsrate bzw. einem Wirkungsgrad von 38 % berechnet, zum anderen über die direkte Gasmessstation, die in der 29. Versuchswoche installiert wurde. Die berechnete volumetrische GPR stieg zunächst in allen drei Reaktoren F1, F2 und F3 (bis zur 9. Projektwoche) stetig an, bis die OLR für 19 Wochen bei 11,4 kg oTS/m³/d gehalten wurde (Abbildung 4).

Eine weitere Erhöhung der Beladungsrate in der 28. Versuchswoche von 12,5 auf 14,0 t oTS/m³/d, also um 12 %, erbrachte im Mittel einen Stromanstieg von 160 auf 180 kW_{el} (maximal mögliche Spitzenproduktion = 191 kW_{el}), d. h. um 12,5 %, obgleich die in der 29. Versuchswoche als Maisersatz zusätzliche Grassilage zugeführt wurde. Abbildung 4 zeigt zusammen mit der OLR und der HRT das elektrische Leistungsdiagramm aller drei Fermenter über das am Ende stehende BHKW in der Start-up-Phase der Biogasanlage.

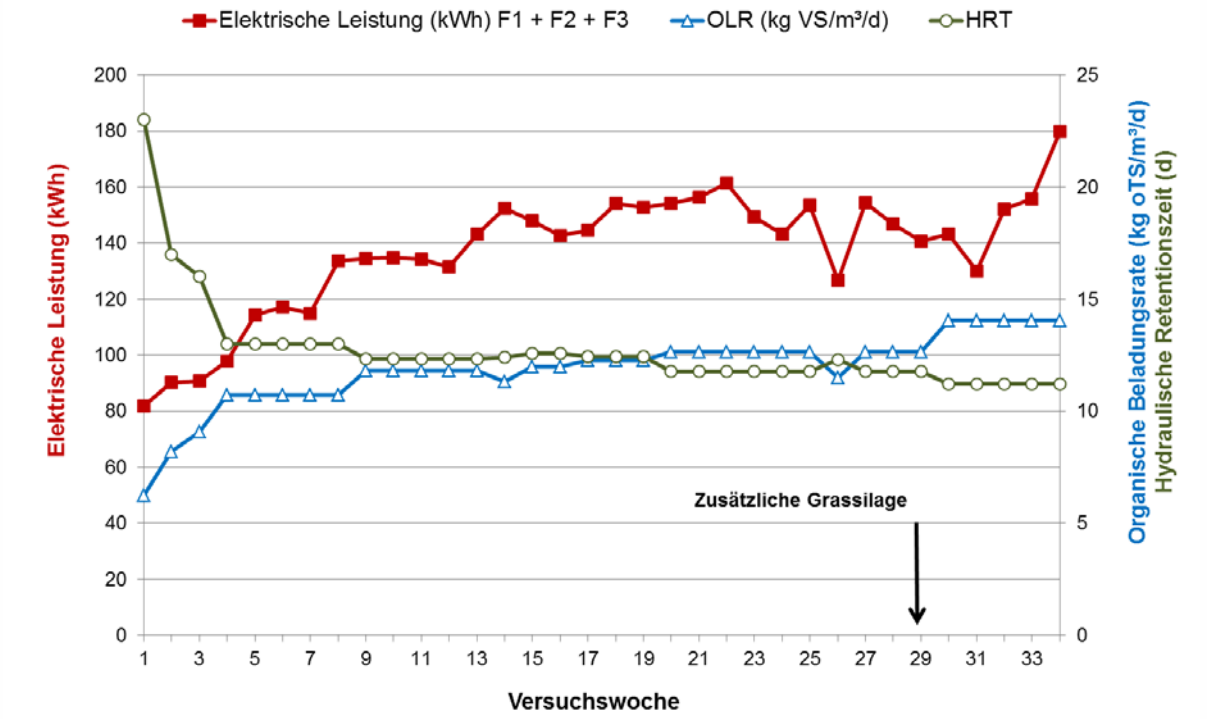


Abbildung 4: Das kumulative elektrische Leistungsdiagramm der drei parallelen Reaktoren der untersuchten Biogasanlage in Seth zeigt die Produktivität in Abhängigkeit der organischen Beladungsrate OLR. Die OLR wurde von 12,5 kg oTS/m³/d nach der Startphase auf 14 kg oTS/m³/d ab der 29. experimentellen Woche durch Zugabe von Grassilage erhöht. Infolgedessen stieg die Gas- und Stromerzeugung auf einen mittleren Maximalwert von 180 kWel der Anlage. Die entsprechende hydraulische Verweilzeit HRT stellte sich auf 11,5 Tage ein.

Während der ersten rund 30 Versuchswochen fand eine rapide Abnahme der VFA-Konzentration von anfänglich 5949 mg L^{-1} auf nur 197 mg L^{-1} im Endlager statt, gleichzeitig stieg die Temperatur von 16 °C auf 22 °C (Abbildung 5).

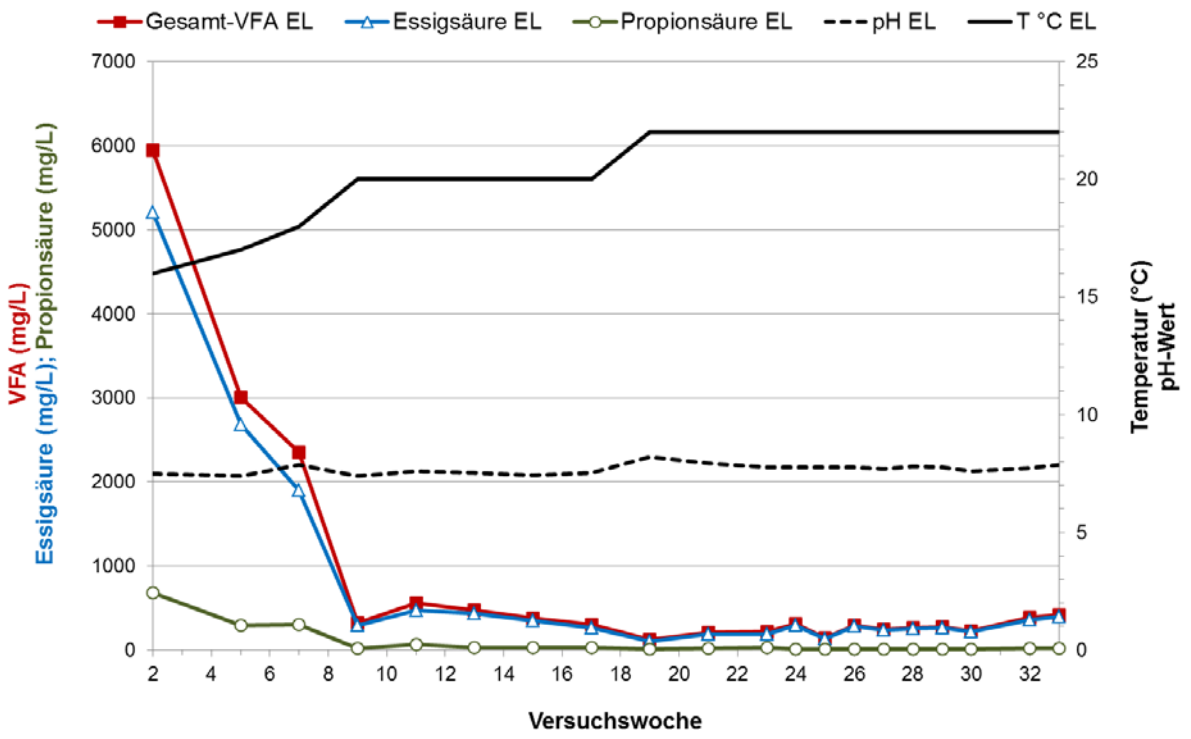


Abbildung 5: Darstellung der Gehalte an Essigsäure und Propionsäure sowie dem Gesamtgehalt an Fettsäuren inkl. den Alkoholen (< 5 %) im unbeheizten Endlager (EL) bei 16 – 22 °C während der ersten 33 Versuchswochen. Zusätzlich ist auch der pH-Wert im Endlager angegeben, der im Mittel bei 7,7 lag. Weitere Analysenwerte zum Endlager siehe im Addendum III.4, Tabelle A4.

Während der ersten neun Versuchswochen wurde die Temperatur aller drei Reaktoren F1, F2 und F3 allmählich von 42 °C auf 47 °C (ca. 1 °C pro Woche) erhöht. Im direkten Vergleich der beiden Biogasreaktoren F2 (42 – 51 °C) und F3 (42 – 51 °C) in Abbildung 6 A und B ist deutlich eine starke Ähnlichkeit der gemessenen Konzentrationen an Gesamt-Fettsäuren und Ammonium bzw. daraus berechneten Ammoniak zu erkennen, was die fast gleiche fermentative Identität der Reaktoren eindrucksvoll belegt. Nach der 5. Versuchswoche stiegen die Ammonium-Konzentrationen bis zur 11. Versuchswoche (49 °C) im Referenzreaktor F2 von 1920 mg/L auf 2250 mg/L und im Testreaktor F3 (49 °C) von 1840 mg/L auf 2240 mg/L. Bis zur 14. Versuchswoche wurde die Temperatur beider Reaktoren weiter auf 51 °C angehoben (ca. 0,5 °C pro Woche).

Die Ammonium-Konzentrationen in beiden Reaktoren F2 und F3 stiegen erneut ab der 19. Versuchswoche von ca. 1800 mg/L kontinuierlich bis auf einen Höchstwert von etwa 2300 mg/L in der 25. Versuchswoche. Die in Abbildung 6 A und B berechnete zugehörige Ammoniak-Konzentration von 460 mg/L für F2 und 410 mg/L für F3 in der 21. Versuchswoche (beide 51 °C) konnte auf die Erhöhung der VFA-Konzentration zurückgeführt werden. Überraschenderweise gab es eine scharfe Akkumulation von VFA in beiden Reaktoren in den Versuchswochen 14 bis 19, obwohl die Beladungsrate in dieser Zeit unverändert blieb. Aller Wahrscheinlichkeit nach wurde dieser Anstieg des Gehaltes an Gesamtfettsäuren durch den zu schnellen Übergang vom mesophilen Temperaturbereich (42 °C) in den thermophilen Bereich (51 °C) hervorgerufen. Während eines solchen Überganges passt sich die Population der Mikroorganismen in Art und Zusammensetzung an die neuen Bedingungen langsam an (Chen, 1983). Trotz des deutlichen VFA-Peaks blieb jedoch der pH-Wert bei 7,8 stabil und die erzeugte Stromleistung wurde ebenfalls nicht beeinflusst (Abbildung 4).

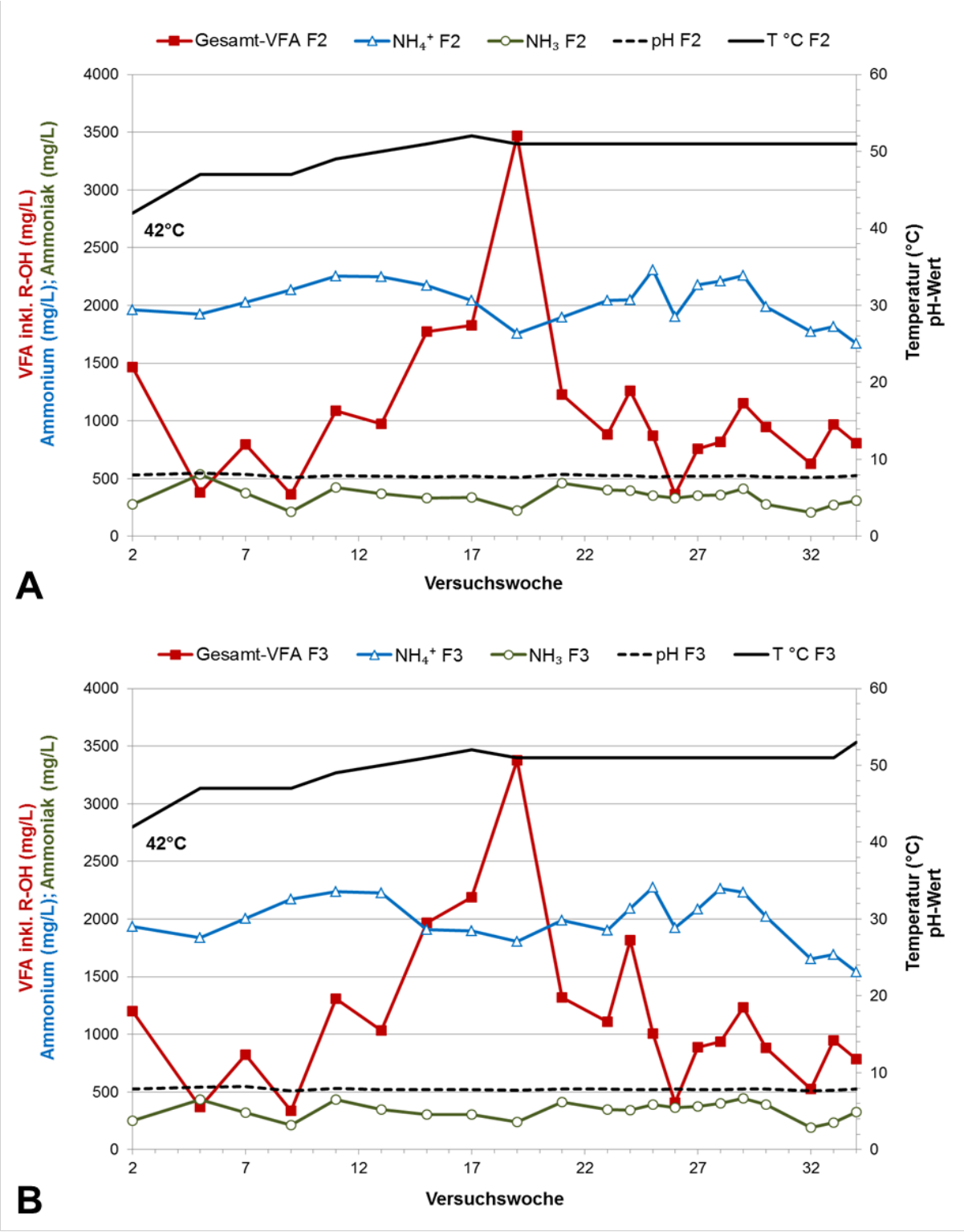


Abbildung 6 A und B: Darstellung der Startup-Phase vom Referenzreaktor F2 (42 – 51 °C, **A**) und vom Testreaktor F3 (42 – 51 °C, **B**) mit den Werten für Ammonium- und den dazugehörigen, berechneten Ammoniak-Gehalten sowie dem Gesamtgehalt an Fettsäuren (inkl. den Alkoholen; < 5 %). Der Peak an Fettsäuren in den Versuchswochen 14 – 19 hatte keinen Einfluss auf den pH-Wert (schwarz gestrichelt) und nur einen marginalen auf den berechneten Gehalt an Ammoniak (unterste grüne Kurve). Vor dem Start der Versuchswochen wurde Gülle einlaufen gelassen, danach die festen Substrate (zur Beladungsrate beim Start-up siehe Abbildung 4).

II.1.3 Einfluss der Temperatur auf die Effektivität der Biogasanlage

II.1.3.1 Temperaturprogramm

Die Temperaturen der Biogasreaktoren F1, F2 und F3 wurden anfänglich von 42 °C auf 47 °C in 1 °C-Schritten pro Woche eingestellt. Um die weiteren thermophilen Bedingungen zu erreichen, wurden die Temperaturen dann etwa alle zwei Wochen um 1 °C bis zu einer Temperatur von 51 °C erhöht und für weitere 11 Wochen (bis zur 33. Versuchswoche) aufrechterhalten. Danach wurden die Temperaturen der Referenzfermenter F1 bzw. F2 bei 53 °C bzw. 51 °C fixiert (Abbildung 6 A). Die Temperatur des Testreaktors F3 wurde schrittweise erhöht, um 53 °C, 55 °C, 57 °C und schließlich 59 °C zu erreichen, in der Regel mit 0,5 °C pro Woche, also wesentlich vorsichtiger als in der Startup-Phase (Tabelle 2).

Tabelle 2: Temperaturprogramm der drei baugleichen und parallel mit Substrat beschickten Reaktoren der Biogasanlage in Seth; Angabe der Versuchswochen, in denen die Temperatur in mind. einem der Reaktoren geändert wurde; ab 142. Versuchswoche begann die Wiederholungsphase des Temperaturprogramms, allerdings mit F2/F3 vertauscht, um technisch bedingte Reaktoreffekte auszuschließen

Versuchswoche	Referenzreaktor F1 (°C)	Zuerst Referenz- dann Testreaktor F2 (°C)	Zuerst Test- dann Referenzreaktor F3 (°C)
1	42	42	42
2	43	43	43
3	44	44	44
4	45	45	45
5	46	46	46
7	47	47	47
11	49	49	49
13	50	50	50
14	51	51	51
25	51,5	51	51
28	52	51	51
30	52,5	51	51
31	53	51	51
33	53	51	53
44	53	51	53,5
45	53	51	54
46	53	51	54,5
47	53	51	55
54	53	51	55,5
56	53	51	56,5
57	53	51	57
67	53	51	58
68	53	51	58,5
69	53	51	59

Versuchswoche	Referenzreaktor F1 (°C)	Zuerst Referenz- dann Testreaktor F2 (°C)	Zuerst Test- dann Referenzreaktor F3 (°C)
75	53	51	58
77	53	51	57
78	53	51	57,5
79	53	51	58
80	53	51	58,5
81	53	51	59
107	53	52	59
108	53	52,5	58,5
109	53	53	58
110	53	53	57,5
111	53	53	57
118	53	53	56,5
119	53	53	56
122	53	53	55
123	53	53	54,5
124	53	53	54
142	53	53	54
149	53	53,5	53
150	53	54	53
152	53	55	53
154	53	56	53
156	53	57	53
157	53	57,5	53
159	53	58,5	53
161	53	59	53
170	53	59	53

II.1.3.2 Einfluss der Temperaturerhöhung auf die Gaserträge der Biogasanlage

Die direkten einzelnen Gasmessungen in der eigenen und fernüberwachten Messstation auf dem Gelände der Biogasanalage Seth zur Ermittlung einer Steigerung der Gasproduktion je Fermenter verliefen bis zur 64. Versuchswoche einwandfrei und erbrachten permanent Volumen und Konzentrationswerte im Bereich von 54 % für CH_4, ferner komplementäre Werte für CO_2, H_2 100 – 1000 ppm, H_2S 100 – 300 ppm (max. 1400 ppm) und O_2 0,3 – 1 % (max. 3 %). So zeigt das Leistungsdiagramm der drei Fermenter eine deutlich erhöhte Gasproduktion des Referenzreaktors F2 und des Testreaktors F3 von bis zu 15 % gegenüber der theoretisch ermittelten Gasproduktion. Der Testreaktor F3 mit 57 °C schnitt gegenüber dem Referenzreaktor F2 mit 51 °C um bis zu 30 % besser ab. Im Anschluss an diese datenreiche Messphase wurde nicht nur die bereits erwähnte temporäre Substratumstellung auf Grassilage durchgeführt (wegen Mangel an Mais), sondern auch in der 66. Versuchswoche die derzeit defekte Binder Gasmessstation zur Reparatur gegeben. Es standen daher während

der Anhebung der Temperatur auf 59 °C nur lückenlose Gas-Daten bis einschließlich der 64. Versuchswoche (57 °C) zur Verfügung. Diese 35 Wochen permanenter Überwachung der einzelnen Gasproduktionsraten (GPR) jedes Fermenters reichten jedoch aus, um einen positiven Einfluss der Temperatur bei 53 – 57 °C auf die Gasproduktion und somit auf die Effektivität der Biogasanlage zu zeigen. Zumindest gab es mit Sicherheit keine Leistungseinbußen durch das Temperaturtestprogramm (Abbildung 7).

Die Spitzenproduktion betrug 0,56 m³ pro kg oTS und Tag im Referenzreaktor F1 (53 °C) in der 49. Versuchswoche. Zeitgleich wurden in den Reaktoren F2 (51 °C) und F3 (55 °C) die spezifische Gasproduktion von 0,38 bzw. 0,49 m³ pro kg oTS und Tag gemessen.

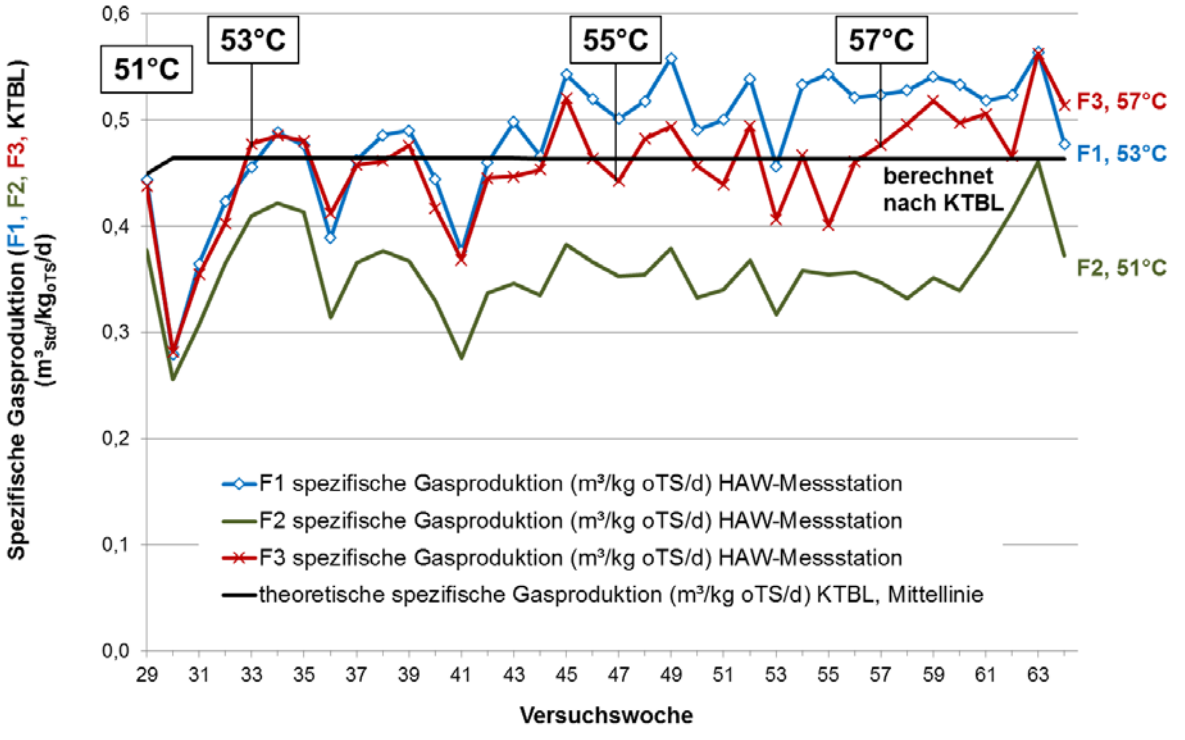


Abbildung 7: Übersicht der spezifischen Gasproduktion pro kg oTS und Tag der Referenzreaktoren F1 (53 °C konstant) und F2 (51 °C konstant) sowie des Testbiogasreaktors F3 (51 – 57 °C) im Vergleich zu der mit den Ausgangssubstraten nach KTBL berechneten Gasproduktion (Mittellinie). Die Trockensubstanz der Gülle betrug i.d.R. 5,0 %, siehe Addendum III.4, Tabelle A5. Die Gaswerte wurden mit einer eigens dazu installierten Gasstation für Volumina und in der Gaszusammensetzung online von der HAW gemessen.

In den Versuchswochen 69 – 74 und 81 – 107 konnte die Prozesstemperatur im Testreaktor F3 auf 59 °C gehalten werden. Das ermittelte Leistungsdiagramm aller drei Fermenter zeigte nach Reparatur der Gasmessstation im erneut möglichen individuellen Gas-Mess-Zeitraum ab der 102. Versuchswoche nur eine geringfügig erniedrigte Gasproduktion des Testreaktors F3 bei 59 °C (max. - 19 %) im Vergleich zu den Referenzreaktoren F1 bei konstanten 53 °C und F2 bei konstanten 51 °C bis zur 106. Versuchswoche und anschließend nach langsamer Anhebung von F2 auf 53 °C ab der 109. Versuchswoche (Abbildung 8). Aufgrund überhöhter Fettsäurewerte in allen drei Biogasreaktoren wurde die Temperatur im Testreaktor ab der 107. Versuchswoche von 59 °C auf 57 °C abgesenkt. Wie sich später herausstellte, war an den erhöhten Fettsäuren aller drei Reaktoren eine ungenügende Spurenelementmischung aus der

Tierernährung Schuld, die gemäß Richtlinien kein Nickel enthielt. Nickel ist aber für die Methanbildung essentiell (Demirel & Scherer, 2011). Die Spurenelementbildung wurde später von der Firma Schaumann BioEnergy GmbH (Pinneberg) ergänzt.

Bei der Anhebung der Reaktortemperatur in F3 wurde diese um lediglich 0,5 °C pro Woche geändert. Es schien, dass sich die mikrobielle Lebensgemeinschaft innerhalb des Testreaktors (1-stufig mit Endlager, aber ohne Nachgärer) trotz oder wegen der sehr kurzen hydraulischen Verweilzeiten von lediglich 11,5 Tagen nur langsam an neue Temperaturen anpassen konnte. Daher konnte in der Startphase bei geringerer Beladungsrate (ORL) mit höheren Temperaturanstiegen gearbeitet werden (Abbildungen 4 und 5). Zusätzlich waren die zwei in Abbildung 8 aufgeführten technischen Anlagenprobleme an der reduzierten Gasproduktion vom Testreaktor F3 beteiligt. Dieser kam offenbar bei den hohen Temperaturen von 57 – 59 °C weniger gut als die Reaktoren F1 und F2 (ab der 109. Versuchswoche beide 53 °C) mit den zusätzlichen technischen Problemen zurecht (rote Kurve, Abbildung 8). Da die Verweilzeiten nur 11,5 Tage betrugen, sind die Gasbildungsraten im annähernden Gleichgewichtszustand gemessen und daher belastbar. Sowohl die Beladungsraten als auch die Verweilzeiten durften aber nur bei stark erhöhten Fettsäurewerten erniedrigt bzw. verlängert werden, um nicht die BHKW-Leistung der Betriebsanlage dadurch zu reduzieren.

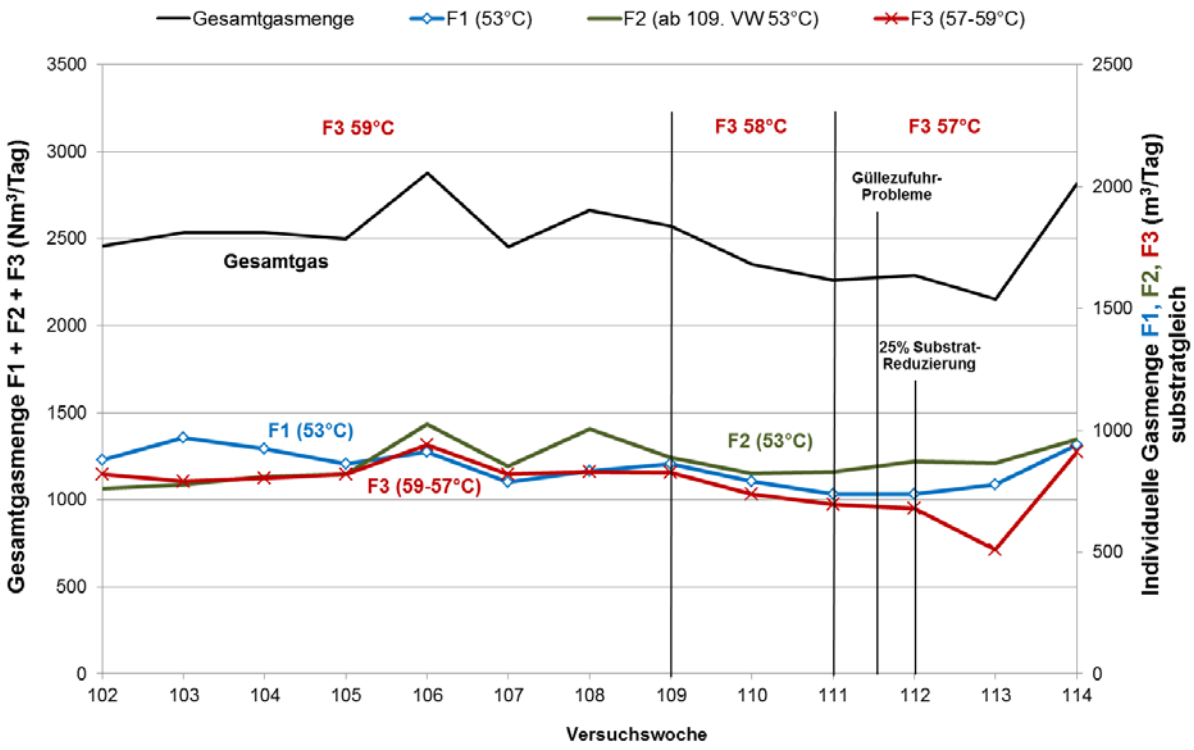


Abbildung 8: Übersicht der mittleren Wochengasmessungen der Referenzreaktoren F1 (53 °C), F2 (51 – 53 °C) und des Testreaktors F3 (hier 57 – 59 °C) im Vergleich zueinander sowie die resultierende Gesamtgasmenge (über BHKW und Wirkungsgrad 38 % errechnet) für den ausgewählten Versuchszeitraum (102. – 114. VW). Ab der 112. Versuchswoche traten erhebliche Probleme in der Güllezufuhr auf. Daher wurde die Substratzufuhr um 25 % reduziert, was dem hygienisierend thermophilen Testreaktor F3 mehr als den substratgleichen Referenzreaktoren F1 (53 °C) und F2 (51 °C bis 106. Versuchswoche, ab 109. Versuchswoche 53 °C) zusetzte. Ab der 114. Versuchswoche war aufgrund defekter Gasmessgeräte leider keine weitere individuelle direkte Gasmessung mehr möglich (nur noch indirekte kumulative Berechnung der Gasmenge über die BHKW-Leistung).

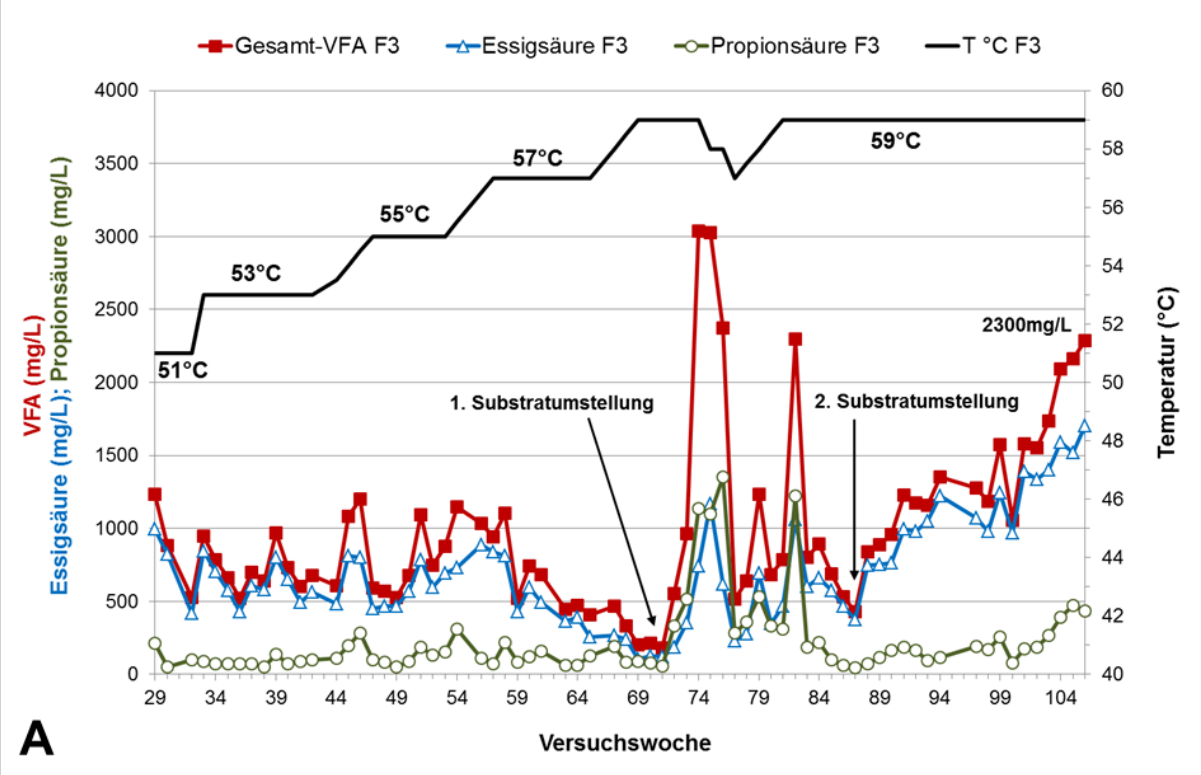
II.1.3.3 Einfluss der Temperaturerhöhung auf die Fettsäuregehalte der Biogasanlage

Das Erreichen eines stabilen Prozesszustandes wurde etwa ab der 25. Versuchswoche erreicht (Abbildung 6 A und B). Ab der 67. Versuchswoche wurde der Testreaktor F3 mit einer Prozesstemperatur von 59 °C betrieben. Die per Gaschromatographie ermittelten Werte der kurzkettigen organischen Säuren lagen im Testreaktor F3 ab diesem Zeitraum unabhängig von der erhöhten Prozesstemperatur von 59 °C bis zur 72. Versuchswoche für Essigsäure unter 1000 ppm und für Propionsäure unter 200 ppm (Abbildung 9 A). Auch die Gesamt-Fettsäuren hatten bis dahin kontinuierlich abgenommen und erreichten in der 71. Versuchswoche einen Tiefpunkt. Dieses konnte in allen drei substratgleichen Parallelreaktoren beobachtet werden (für die Reaktoren F2 und F3 in Abbildung 9 A und B dargestellt). Um die 71. Versuchswoche fand im Herbst eine Substratumstellung statt. Ab diesen Zeitpunkt waren wegen des Mangels an Maissilage die Roggen-Ganzpflanzensilage (GPS) und die Grassilage dominante Substrate (Tabelle 3). Die Substratumstellung verursachte einen Gesamt-VFA-Anstieg auf knapp 3000 ppm im Testreaktor F3 bei 59 °C und geringer auf 1700 ppm im Referenzreaktor F2 (51 °C, Abbildung 9 A und B). Sie wirkte sich demnach auf die Mikroorganismen beider Prozesstemperaturen von 59 °C sowie 51 °C bei den extrem kurzen Aufenthaltszeiten von nur 11,5 Tagen in der Anlage negativ aus. Um die Anlage nicht zu gefährden, wurde von der 73. VW bis zur 77. VW die Temperatur in F3 auf 57 °C abgesenkt, um sie dann wieder bis zur 81. VW auf 59 °C hochzufahren. Der weitere Anstieg der Gesamtfettsäuren ab der 87. Versuchswoche bei 59 °C auf Werte von 3000 ppm im Testreaktor F3 (aber auch etwas abgemildert bei 51 °C im Referenzreaktor F2) war auf die Empfindlichkeit der Reaktorkulturen aufgrund von Nickelmangel durch eine nochmalige Substratumstellung induziert (Tabelle 3). Am Ende der Hauptversuchsphase sanken bei Nickelsupplementierung die Fettsäurewerte wieder drastisch auf unter 1000 ppm (ab 139. Versuchswoche, Abbildung 13 A und B).

Im davon offenbar unberührten Endlager lag die Konzentration an VFA jedoch bei maximal 600 ppm und die von Propionsäure permanent unter 100 ppm (Abbildung 10). Weitere Analysenwerte zum Endlager siehe im Addendum III.4 Tabelle A4. Dabei bestanden die VFA überwiegend aus Essigsäure (Essigsäure-Propionsäure-Verhältnis wie 5 : 1), was einen Spurenelementmangel im Endlager indizierte, da Essigsäure normalerweise leicht abgebaut wird.

Tabelle 3: Substratzusammensetzung vor und nach den Substratumstellungen in der 71. und 87. Versuchswoche

	Menge in t/d vor der 71. VW	Anteil in % vor der 71. VW	Menge in t/d nach der 71. VW	Anteil in % Nach der 71. VW	Menge in t/d nach der 87. VW	Anteil in % nach der 87. VW
Maissilage	2,60	26,1	0,25	3,7	1,80	19,6
Roggen GPS	-	-	1,25	13,3	-	-
Grassilage	0,50	5,0	1,40	14,9	0,90	9,8
Mist	0,35	3,5	-	-	-	-
Gülle (s. III.4)	6,50	65,3	6,50	69,1	6,50	70,1
Gesamtmenge	9,95	100,0	9,40	100,0	9,20	100,0



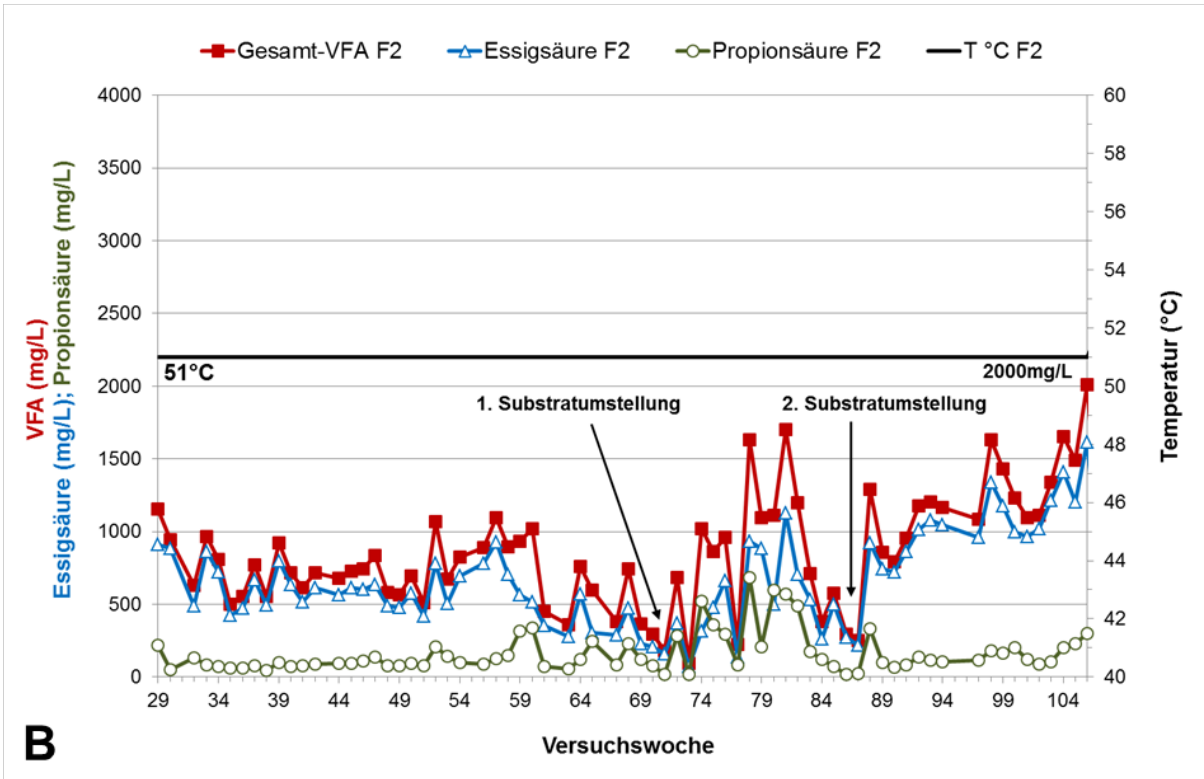


Abbildung 9 A und B: Graphische Darstellung der Konzentrationen an kurzkettigen organischen Säuren (inkl. von Alkoholen; < 5 %) im Testreaktor F3 (**A**) im Laufe der Temperaturerhöhung von 51 °C auf 59 °C sowie im Referenzreaktor F2 bei konstanten 51 °C (**B**). Ab der 71. VW kam es aber wegen Maismangel zur ersten Substratumstellung zugunsten von Roggen-GPS und Grassilage (Tabelle 3), die einen Anstieg der Fettsäuren auf 3000 mg/L im Testreaktor F3 (**A**) und auf 1700 mg/L im Referenzreaktor F2 (**B**) bewirkte. In der 87. VW wurde nochmals die Zusammensetzung des Substrates verändert, was in beiden Reaktoren einen deutlichen Anstieg der Fettsäuren zur Folge hatte (**A** und **B**).

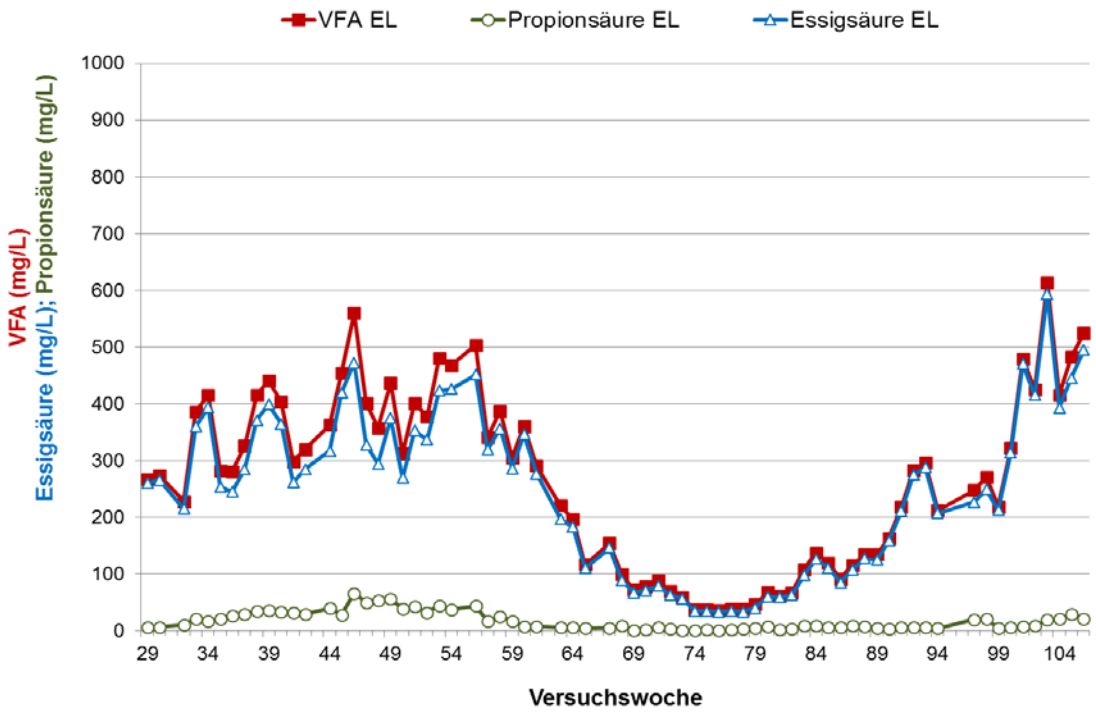


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Konzentrationen an kurzkettigen organischen Säuren (inkl. von Alkoholen; < 5 %) im unbeheiztem Endlager (≤ 24 °C) während der Hauptversuchsphase. Die Daten wurden mittels Gaschromatographie gemessen. Es zeigte sich im Endlager genau wie im Referenz- und Testreaktor eine kontinuierliche Abnahme der Fettsäuren bis zur 74. Versuchswoche (statt 71. VW in den Reaktoren, 3 Wochen zeitverzögert), um dann wegen Substratumstellungen (Tabelle 3) und Nickelmangel in den beizten Rektoren wieder anzusteigen (siehe Text zu Abbildung 9 A und B).

II.1.3.4 Einfluss der Temperaturerhöhung auf die Ammonium- bzw. Ammoniakkonzentrationen

Ammoniak bzw. Ammonium ist ein wichtiger Nährstoff für den Zellaufbau und gleichzeitig ein Produkt des anaeroben Abbaus von Eiweißverbindungen. Jedoch kann bei ungünstigen C : N Verhältnissen aufgrund des hohen Gülleanteils von 65 – 70 % in der beprobten Anlage nur ein geringer Teil des Stickstoffs in der Mikroflora durch lediglich in etwa 5 % mikrobielle Biomasseneubildung aufgenommen werden, wobei 95 % des Kohlenstoffs sich beim Komplettabbau im Biogas befinden. Vermutlich aus Angst vor instabilen Prozessen durch hohe Ammonium- bzw. Ammoniakkonzentrationen gab es bei Projektbeginn in Deutschland kaum thermophil betriebene Güllevergärungsanlagen. Neuere Schätzungen sprechen von etwa 5 % thermophile Anlagen und 90 % mesophile (Weiland et al., 2015). Bei der anaeroben Vergärung wirken sich teilweise Ammoniumgehalte über 4 g/L NH_4-N auch unter thermophilen Bedingungen hemmend auf die Biogasproduktion aus (Sung & Liu, 2003; El Hadj et al., 2009; Yenigün & Demirel 2013). Daher war eine versuchsbegleitende wöchentliche Analyse der Reaktor-Inhalte auf Ammonium/Ammoniak sinnvoll, um rechtzeitig auf eventuelle Anstiege der Ammoniumgehalte reagieren zu können. Anstiege ergaben sich durch die erhöhte Temperatur und den höheren pH-Wert.

Die Konzentrationen an Ammonium waren erwartungsgemäß in den Großreaktoren F2 und F3 relativ ähnlich (1000 – 2500 ppm) (Abbildung 11). Unabhängig von der Temperatur lagen sie damit während der ganzen Versuchsdauer unterhalb der Grenze für eine mögliche Hemmung (4 g/L NH_4-N; Sung & Liu, 2003). Durchschnittlich war die Konzentration an

Ammonium des Endlagers um ca. 0,5 g/L NH_4-N höher als die der Biogasreaktoren, erreichte damit aber immer noch nicht die oben genannte experimentell ermittelte Hemmgrenze von 4 g/L NH_4-N. Analysenwerte zum Endlager siehe in III.4 Tabelle A4.

Die erhöhte Temperatur im Testreaktor F3 von 51 °C auf 59 °C führte jedoch zu einem erhöhten Ammoniakgehalt gegenüber dem Referenzreaktor F2 (F2: dunkelblau, 200 – 400 ppm bei konstanten 51 °C; F3: hellblau, 300 – 600 ppm bei > 55 °C) (Abbildung 11). Dieser Unterschied hatte jedoch keinen messbaren negativen Einfluss auf die Gasproduktion, so dass von keiner Hemmung auszugehen ist (Abbildung 7). In der älteren Literatur existieren Werte von 150 ppm Ammoniak, die hemmend sein sollen (McCarty & McKinney, 1961). Diese Annahmen konnten selbst unter den gegebenen Hochleistungsbedingungen nicht beobachtet werden.

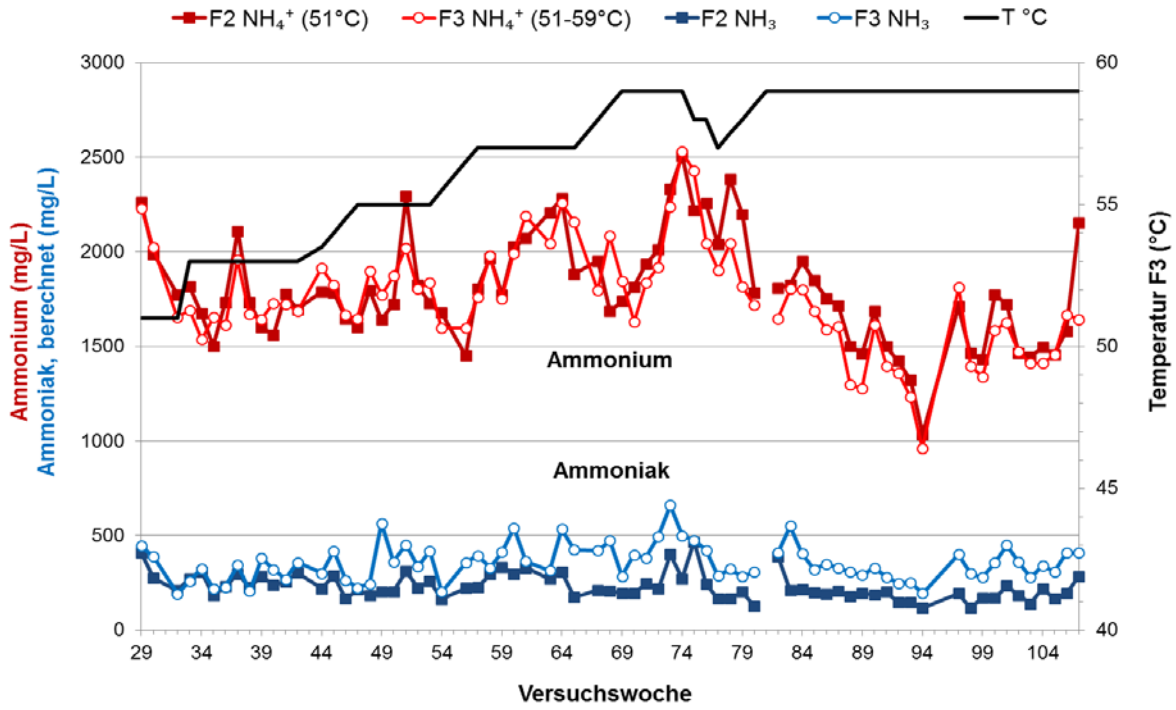


Abbildung 11: Vergleich der Konzentrationen an Ammonium (rot, NH_4^+) und Ammoniak (blau, NH_3, berechnet) in den Großreaktoren F2 (dunkelrot, 51 °C) und F3 (hellrot, 51 – 59 °C). Unabhängig von der Temperatur lagen die Konzentrationen für Ammonium während der ganzen Versuchsdauer unterhalb der Grenze für eine mögliche Hemmung (4 g/L; Sung & Liu, 2003). Der Gehalt an Ammoniak lag im Testreaktor F3 ab 55 °C (hellblau) temperaturbedingt um 100 – 200 ppm höher als im Referenzreaktor F2 bei 51 °C (dunkelblau).

II.1.3.5 Chemische Analysen der Spurenelemente

Der Anstieg der Gesamtfettsäuren auf 3000 ppm nach Substratumstellung in der 71. Versuchswoche sowie der erneute Anstieg ab der 87. VW (2. Substratumstellung) in allen drei Reaktoren (Tabelle 3) führte zu Nachforschungen bei den Spurenelementen. Allerdings gab es auch schon vor den Substratumstellungen Anstiege auf über 1000 ppm an Gesamtfettsäuren in den Reaktoren F2 und F3 (Abbildung 9 A und B). In der Startphase um die 19. Versuchswoche stiegen ebenfalls in beiden Reaktoren die Gesamtfettsäuren sogar auf über 3000 ppm, allerdings abrupt bei der Temperaturerhöhung und der damit verbundenen mikrobiellen Populationsumstellung (Abbildung 6 A und B). Eine kontinuierliche Analyse der

Spurenelemente mittels Transmission-Röntgenfluoreszenzspektroskopie (TXRF) durch das Projektlabor (HAW) deckte vor allem eine Unterversorgung an Nickel auf (Tabelle 4). Nickel gehört neben Kobalt zu den essentiellen Elementen bei der Vergärung von Biomassen (Demirel & Scherer, 2011), auch wenn mikrobielle Zellen Zink als weitaus wichtigstes Spurenelement enthalten (Scherer et al., 1983; Cameron et al., 2012), während Eisen bereits im Bereich der Makroelemente eingestuft wird.

Die Substratumstellung in der 71. Versuchswoche hatte einen großen Einfluss auf die gelösten, biologisch verfügbaren Spurenelemente in den Biogasreaktoren. Sie lagen für die wichtigen Elemente Nickel und Kobalt in der Regel bei < 0,1 ppm. Die Konzentrationen an Mangan und Zink lagen zumeist in einem ausreichenden Bereich von 1 – 6 ppm, die Gehalte an Kupfer allerdings suboptimal zwischen 0,01 und 1 ppm. Durch den Wechsel der Substratzusammensetzung stieg, wie auch schon nach der erstmaligen Zugabe von Grassilage in der 29. Versuchswoche (Abbildung 4), der Gehalt an Spurenelementen an. Nach der 71. Versuchswoche wurde die Fütterungsmenge an Maissilage weiter reduziert, Gras weiter erhöht, Mist vollständig weggelassen und stattdessen Roggen-Ganzpflanzensilage (GPS) als Substrat verwendet. Dies spiegelt sich direkt in den bioverfügbaren, gelösten Spurenelementen wieder (kräftiger Anstieg von Kobalt, grafisch nicht dargestellt). Das war in gewisser Weise nicht verwunderlich, da Wildpflanzen wesentlich höhere Mineralgehalte als Kulturpflanzen enthalten, die auf hohe Kohlenstofferträge gezüchtet sind. Der Gehalt an Nickel stieg zwar kurzfristig auch, blieb aber nach den Substratumstellungen langfristig meist auf einem sehr geringen Niveau von nur 0,05 – 0,06 ppm. Eine solche „Live-Messung“ der **bioverfügbaren, d. h. gelösten Spurenelemente** in einem Biogasreaktor über ein Jahr gibt es bisher nicht in der Literatur. Gustavsson et al. (2013) wiesen ebenfalls auf die Bedeutung von bioverfügbaren Ementen hin, insbesondere wie hier auf Nickel und Kobalt. Sie fanden aber, dass die gemessene, bioverfügbare Konzentration nicht immer einen Mangel widerspiegelt, weil offenbar selbst sulfidische Ausfällungen von Kobalt und Nickel mikrobiell rückgelöst werden können (Gustavsson et al., 2013). Wenn jedoch wie hier gleichzeitig die kurzkettigen Fettsäuren erfasst werden und das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure bei gleichzeitig hohem Essigsäurespiegel sehr groß ist, ist ein Spurelementmangel angezeigt, da Essigsäure in der Regel von Bakterien und Methanbildnern gut verstoffwechselt wird.

Tabelle 4: Gegenüberstellung von optimalen Konzentrationen an Spurenelementen in der Trockenmasse von methanbildenden Mikroorganismen und den von der HAW gemessenen gelösten Werten im Temperatur-Referenzreaktor F2 (im Analysenzeitraum konstant bei 51 °C) als Mittelwerte aus den Versuchswochen (VW) 23 – 100

Spuren-element	**Gemessene Element-Konzentration in Methanbildnern** (Rouf, 1964; Scherer et al., 1983) (mg/kg TM)	**Element-Konzentration der 1. Spalte umgerechnet mit Zellzahl** 3,5 x 10^{10}/mL im Fermenter F2	**Mit TXRF analysierte, gelöste Spurenelement-Konzentrationen** (Mittelwerte aus 23. – 100. VW) für F2 (mg/L)	**Für ein mikrobielles Kulturmedium empfohlene Spurenelemente** (Schlegel 1992, Kap. 6) (mg/L)
Eisen	2000	21	23,11	Keine Angabe
Nickel	100 - 150	**1,05 - 1,58**	**0,07**	**0,100 $NiCl_2x6H_2O$**
Kobalt	50 - 100	0,525 - 1,05	0,12	0,200 $CoCl_2x6H_2O$
Kupfer	50 - 100	0,525 - 1,05	0,23	0,020 $CuCl_2x2H_2O$
Mangan	5 - 20	0,05 – 0,21	2,46	0,100 $MnCl_2x4H_2O$
Zink	100 - 600	1,05 – 6,3	1,47	0,070 $ZnCl_2$
Selen	Nicht bestimmt		< 0,01	0,026 $Na_2SeO_3x5H_2O$
Wolfram	Nicht bestimmt		< 0,01	0,030 $Na_2WO_4x2H_2O$

Die Gegenüberstellung der Daten in Tabelle 4 von Scherer et al. (1983) und den gefundenen, gelösten, d. h. bioverfügbaren Spurenelementen zeigt, welche Elemente für die Methanbildung zwingend notwendig sind. Die gelösten und in der BGA Seth im stationären Betrieb gefundenen Konzentrationen der 3. Spalte (Tabelle 4) sind daraus nicht direkt ableitbar, jedoch aus einer davon unabhängigen Fermentationsreihe mit sechs Parallelreaktoren zur Strohvergärung ohne Gülle unter definierten Bedingungen. Diese Versuchsreihe wurde umfangreich über einen Zeitraum von über 700 Tage dokumentiert (Arthur, 2017; siehe unten).

In der Tabelle 4 wurden die aus der Literatur bekannten Zellgehalte von Elementen und Spurenelementen (Rouf, 1964; Scherer et al., 1983) mit den an der HAW bestimmten Zellzahlen in den Fermentern der BGA Seth aufsummiert, um die während des Dauerbetriebs in die Zellmasse eingebauten Spurenelemente zu errechnen (Spalte 2, Tabelle 4) und mit denen im stationären Betrieb gelösten Spurenelementen zu vergleichen (Spalte 3). Außerdem wurden typische Spurenelement-Kontentration in Tabelle 4 aufgeführt (Spalte 4), wie sie für wässrige Labor-Reinkulturen verwendet werden, um die Ähnlichkeiten aufzuzeigen. Setzt man dann die gemessenen Elementgehalte von Nickel und Kobalt von 1,0 – 1,5 mg/L (ppm Organiktrockenmasse) der Methanbildner aus Tabelle 4 ein (Spalte 1, Scherer et al., 1983), die sich mit denen anderer Mikroorganismen, die nicht-methanogen sind, decken (Rouf, 1964), und verrechnet diese mit der gemessenen Zellzahl bzw. der Organiktrockenmasse der Gülle-BGA Seth (siehe unten), so kommt man für die Mischpopulation in Seth auf die gleiche Konzentration von Nickel und Kobalt im Bereich von 1,0 –1,5 mg/L wie die von mikrobiellen Reinkulturen (Spalte 2). Das heißt, es gibt grundsätzlich keine Unterschiede bei den Spurenelementen zwischen Laborkulturen und natürlichen Mischpopulationen in der Biogasbetriebsanlage Seth.

Bei der BGA Seth lagen im Schnitt 0,75 µm^2 große Mikroorganismen vor, bei einer Konzentration von 3,5 x 10^{10} / mL (bestimmt in der BGA Seth von S. Off mittels QMF-Technik gemäß Scherer et al., 2012 und Kim et al., 2014). Davon waren sehr viele bisher für Biogasanlagen untypische mikro-kokkoide Methanosarcinen (< 1 µm), die daher vermutlich früher als Methanomicrobien (> 2 µm) eingestuft wurden (Kim et al., 2014). Wie bereits schon Baumgärtel (1924) sehr genau beschrieb, kann man ein Bakteriengewicht von 10^{-12} g annehmen, das von Schaechter et al. (1958) für *Salmonella* und von Cameron et al. (2012) für *Escherichia coli* mit 0,3 – 2,2 x 10^{-12} g Feuchtgewicht bestimmt wurden (Schaechter et al., 1958; Cameron et al., 2012), wobei man ein Trockenmassegehalt von etwa 30 % annimmt (0,15 – 0,28 x 10^{-12} g; Heldal et al., 1985). Dies ergibt dann bei der Zellzahl von 3,5 x 10^{10} / mL in der BGA Seth eine mikrobielle Feuchtmasse von etwa 3,5 % bzw. 35 g/L oder eine organische Trockenmasse von 1,05 % bzw. 10,5 g/L (Dichte von 1,1 g/mL; Bratbak & Dundas, 1984).

Parallele Strohvergärungen im Labor unter definierten Wachstumsbedingungen zeigten jedoch, dass die für eine optimale Methanbildung notwendigen Konzentrationen für Nickel im stationären Gleichgewicht lediglich bei 0,15 – 0,2 ppm gelöst lagen (HRT 10 d, OLR 7,5 kg/m^3/d). Dazu wurden die Strohvergärungen in vollautomatisierten, gerührten und kontinuierlich betriebenen Laborreaktoren ohne Gülle, dafür mit einer definierten Salzlösung, sowie einer über 300 Tage dauernden Ausdünnungsphase durchgeführt. Während der Dauerfermentation wurden alle 4 Wochen die bioverfügbaren Spurenelemente mittels einer neuen TXRF-Methode bestimmt (Arthur, 2017). Grundsätzlich ginge für die Elementbestimmung in diesem tiefen Bereich auch eine hochauflösende ICP-Methodik (Scherer et al., 1983), die mit Massenspektrometrie erweitert ist.

Beginnt man beim Animpfen des Biogasreaktors mit 90 % der späteren Endzellzahl (wie bei den Strohvergärungen im Kontimaßstab, siehe oben), dann reduziert sich der Spurenelementbedarf auf 1/10. Somit läge der absolute Bedarf bei 0,1 ppm pro Liter Reaktor am Startpunkt.

Genau diese stationär als Minimum / Optimum herausgefundenen Konzentrationen an Nickel und Kobalt von etwa 0,1 mg/L bzw. 0,1 ppm bei der Strohvergärung zeigten auch die Analysen der zentrifugierten Fermenterflüssigkeiten der BGA Seth (Tabelle 4). Die für ein klares, wässriges Kulturmedium empfohlenen Konzentrationen liegen dagegen darunter (Schlegel, 1992; Kulturmedien der DMSZ: https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms/culture-technology/list-of-media-for-microorganisms.html).

Aus den Analysedaten abgeleitete Strategie, um Minimum / Optimum Konzentrationen in Biogasanlagen einzustellen:

Nun beeinflusst die organische Beladungsrate OLR direkt die mikrobielle Biomasseneubildung. Es kann nur so viel mikrobielle Biomasse gebildet werden, wie Nährstoffe durch die OLR zugeführt werden. Aber auch die Verweilzeit HRT beeinflusst durch den ständigen Washout von Spurenelementen die notwendige Zugabe von Spurenelementen im Input.

Die permanente, täglich notwendige Zugabe von Spurenelementen wäre bei einem Fließgleichgewicht oder Kontibetrieb mit einer hydraulischen Verweilzeit von 10 Tagen (in Seth 11,5 d) nur 1/10, d. h. 0,01 ppm pro Tag. Genau diese 1/10 Konzentrationen für Nickel waren als tägliches Supplement nötig, um im stationären Gleichgewicht der Labor-Strohvergärungen die Konzentrationen von 0,15 – 0,2 ppm aufrecht zu erhalten (HRT 10 d, ähnlich wie bei der BGA Seth). Anderenfalls kam es zu stark erhöhter Säurebildung. Es ist anzumerken, dass

Lieferanten von Spurenelementen für Biogasanlagen (meist Produkte mit Handelsnamen), aber auch sonst (Literatur in Hinken et al., 2008) ihre Supplementierung auf die tägliche organische Beladung (OLR) von kg Organik TM/m³/d beziehen und nicht auf die HRT der BGA. Zur Kalkulation der Supplementierung wird häufig eine Spurenelementanalyse des kompletten Fermenterinhalts (Feststoffe plus Flüssigphase; Oechsner et al., 2011) zugrunde gelegt, ohne Rücksicht auf den Washout durch eine kurze HRT, wie beispielsweise bei der BGA Seth mit 11,5 Tagen. Bei konventionellen Analysen werden aber auch im hohen Maße sulfidische, ungelöste und ausgefällte Spurenelemente erfasst, deren Bioverfügbarkeit sehr gering ist. Wir an der HAW bevorzugten daher eine prinzipiell neue Berechnung auf Grundlage der HRT (Reaktorvolumen / Substratvolumen pro Tag), ferner aufgrund der Elementgehalte der Mikroorganismen (Tabelle 4) und der analytisch bestimmten Minimum / Optimum Konzentrationen bei unseren Konti-Fermentationen mit Stroh. Dadurch erhielten wir realistischere Ergebnisse als in Vergleich zu solchen, die lediglich auf die OLR bezogen sind. Unsere Analysen zu den Minimum / Optimum Konzentrationen deckten sich gut mit den gelösten Konzentrationen der BGA; Tabelle 4, Abbildung 13). Daher lieferte die Temperaturstudie der Großanlage Seth gleichzeitig ein neues Konzept zur Dosierung von Spurenelementen bei der Feststoffvergärung aufgrund der gelösten Konzentrationen.

Ein ähnliches Konzept wird bereits bei der anaeroben Abwasserreinigung angewendet, wo generell von gelösten organischen Stoffen ausgegangen wird, die als CSB (chemischer Sauerstoffbedarf) gemessen werden (Seyfried et al., 1990). Wenn man vereinfacht CSB als biologisch abbaubar = BSB (biologischer Sauerstoffbedarf) rechnet und dann 1 g BSB = 1 g Organik annimmt, so geben Seyfried et al. (1990) für eine OLR von 5 kg Organik TM/m³/d (zur HRT keine Angabe) die empfohlenen gelösten und somit bioverfügbaren Spurenelemente wie folgt an: Nickel 0,03 – 1,5 mg/L, Kobalt 0,03 – 1,0 mg/L, Selen 0,01 – 0,02 mg/L und Wolfram 0,01 – 0,04 mg/L, also im Bereich der BGA Seth und im Bereich der Strohvergärungen (OLR 7,5 kg Organik TM/m³/d).

Die experimentell mit Konti-Fermentationen von Stroh als Substrat gefundene Abhängigkeit der Zugabe von 0,15 – 0,2 ppm Nickel (tägliche Zugabe von 0,02 ppm bei einer HRT von 10 Tagen) liegt genau im gleichen Bereich wie bei Seth. Da andere Schwermetalle in den Zellen von Methanbildnern (Cu, Co, Mo, Mn, Zn, Se, W) naturgemäß im gleichen Größenbereich vorkommen bzw. deren Notwendigkeit aus der Literatur bekannt sind (Scherer et al., 1983, Demirel & Scherer, 2011; Oechsner et al., 2011; Rouf, 1964), muss auch für diese Mikroorganismen eine Sättigung bei der gelösten, stationären Konzentration von 0,1 – 0,2 ppm angenommen werden. Zur Aufrechterhaltung der Konzentrationen sollte daher im Fließgleichgewicht (HRT 10 d) eine Supplementierung im 1/10 Bereich bzw. einer Dosierung von 0,01 ppm ausreichend sein, um die gelöste, bioverfügbare Konzentration aufrecht zu erhalten.

Diese Betrachtung führt eindeutig zu dem Schluss, dass die untersuchte Biogasanlage in Seth einen Mangel an Nickel, aber auch an Selen hatte, da die verfügbare Menge unterhalb der Nachweisgrenze von 1 ppb (= 0,001 ppm) gelöst lag (Arthur, 2017, Abbildung 13). Bereits die Nickelzugabe mit der neuen Spurenelementmischung ab der 139. Versuchswoche (siehe Kapitel II.1.3.6) führte schon zu einem drastischen Rückgang der Fettsäuren (VFA) dauerhaft unter 1000 ppm, trotz einer Verweilzeit von nur 11,5 Tagen (Spurenelemente von der Schaumann BioEnergy GmbH bzw. ISF GmbH, Pinneberg, Deutschland).

Rezepturvorschlag der tägl. Konzentrat-Zugabe für einen Fermenter mit einer HRT von 10 d

5 µM	EDTA
0,001 ppm	HBO_3
0,01 ppm	W
0,01 ppm	Mo
0,02 ppm	**Co**
0,02 ppm	**Ni**
0,0025 ppm	Se
0,10 ppm	Fe (evtl. ganz weglassen, da bei Gülleanlagen Fe in Form von Eisenchlorid / Eisenhydroxid zur Schwefelwasserstoff-Entfernung eingebracht wird)
ad 1L	H_2O

Im Fließgleichgewicht ergibt sich eine Supplementierung im 1/10 Bereich der Leit-Konzentrationen von Kobalt und Nickel der BGA Seth, die identisch mit der gefundenen Minimum / Optimum Nickelkonzentration bei Modell-Strohvergärungen ist (Arthur, 2017) bzw. der dafür erforderlichen täglichen Dosierung von 0,015 – 0,02 ppm.

Bei Nickel wären es etwa 2 Gramm elementares Nickel pro Liter (2000 mg/L oder ppm) im 1 Liter-Konzentrat bei einem 100 m³ Reaktor. Das Konzentrat für diese Zielkonzentration von 0,2 mg/L an Nickel im Fermenter ist machbar und bezahlbar, um ökonomisch und umweltfreundlich zu handeln.

Wenn man täglich nur 1 Liter eines Spurenelementkonzentrats pro 100 m³ zugeben möchte, müssten die Konzentrationen des Rezepturvorschlags hunderttausendfach konzentrierter sein, um die obigen Zielkonzentrationen im Bereich von 0,015 – 0,02 ppm im Fermenter zu erreichen. Bei längerer Verweilzeit und kleinerem Biogasreaktor würde das Konzentrat entsprechend weniger konzentriert eingesetzt werden oder es kommen geringere Zugaben als 1 L/d in Betracht. Eine Notwendigkeit von erhöhten Stoßdosierungen ergibt sich bei dieser Applikationspraxis nicht.

II.1.3.6 Wiederholungsphase (Wdh. des Temperaturanstiegs), Spurenelementzugaben

Ein Spurenelementmangel trat erst nach der 100. Versuchswoche deutlich sichtbar anhand von stark überhöhten VFA auf (Abbildung A3 im Addendum), als mehrere technische Komplikationen (Pumpenausfall, -wartung) auftraten und für die kurze HRT zu plötzliche Substratwechsel im Herbst (Mais war aufgebraucht) durchgeführt wurden. Bis dahin wurden die Spurenelemente durch Mineralfutter für Milchkühe ersetzt, bei dem aber aus gesetzlichen Gründen das Element Nickel fehlte.

Der offensichtliche Mangel an einigen Spurenelementen, insbesondere an Nickel, trug dazu bei, dass ein langsamer aber stetiger Anstieg an Fettsäuren in der gesamten Biogasanlage stattfand, der anfangs natürlich unerklärlich war. Diese Unterversorgung konnte durch eine auf die Biogasanlage abgestimmte Spurenelementzugabe in der 139. Versuchswoche (Firma Schaumann BioEnergy GmbH, Pinneberg) offenbar ausgeglichen werden. Innerhalb von zwei Wochen (140. und 141. Versuchswoche) nach Zugabe der Spurenelemente normalisierten sich die Fettsäurewerte in dramatischer Weise auf unter 1000 ppm (Abbildung 13 A und B). Seitdem wurde die spezifische Mischung an Spurenelementen und Begleitstoffen der Firma Schaumann BioEnergy regelmäßig den Großfermentern zugegeben. Gleichzeitig wurde die zuvor eingesetzte Nickelfreie Spurenelement-Mischung für Tierkraftfutter für den Einsatz in der Biogasanlage abgesetzt.

Aus Abbildung 12 A – H sowie 13 A und B ist zu erkennen, dass der unmittelbare Rückgang der Konzentration an Gesamtfettsäuren (VFA) offenbar durch die Zugabe der neuen Mischung an Spurenelementen erzielt wurde. Die außergewöhnlich hohen Fettsäurewerte von über 7.000 ppm im Reaktor F1 bzw. 11.000 ppm im Reaktor F2 (Abbildung 13 A und B) bzw. 9.000 ppm im Reaktor F3 (Abbildung A3 im Addendum) in der 137. Versuchswoche gab es nach der Spurenelementzugabe mit Nickel ab der 139. Versuchswoche nicht mehr.

Es sind jedoch in Abbildung 12 C – F bei den gelösten Kupfer- und Manganionen zwei Anomalien zu beobachten, die herausstechen. Trotz der hohen Fettsäurepegel zeigen Kupfer und Mangan hier ein Maximum. Ein solches Maximum trat bei Nickel jedoch nicht auf (Abbildung 12 C, D), da bei den Gesamtanalysen der Reaktorinhalte (Fermentermedium inkl. Feststoffe / Ausfällungen, unzentrifugiert) ebenfalls fast kein Nickel, nämlich im Bereich 0,01 – 0,05 mg/L, nachzuweisen war. Nun wissen wir aus Abbildung 13, dass die Fettsäuren (VFA) in erster Linie aus Essigsäure bestanden, die eine nicht zu vernachlässigende komplexierende Wirkung hat, auch wenn diese schwächer ist als der bekannte Komplexbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Es kann also vermutet werden, dass im Falle der Kupfer- und Manganionen der Versäuerungsphase (Abbildung 12 C – F) ein schützender Komplexierungseffekt auftrat, der zur Rücklösung von Ionen führte und diese Ionen zugleich vermehrt in Lösung hielt.

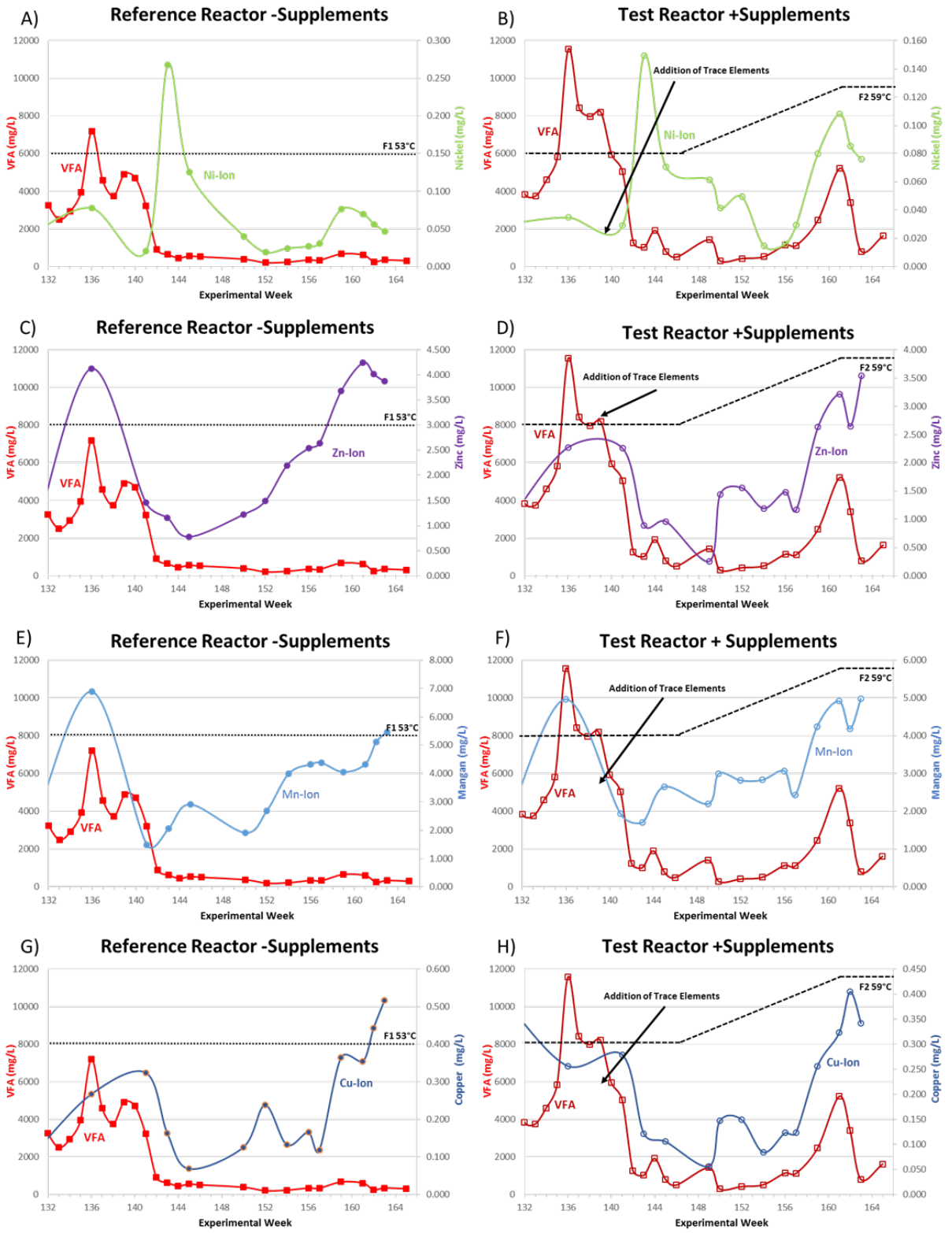
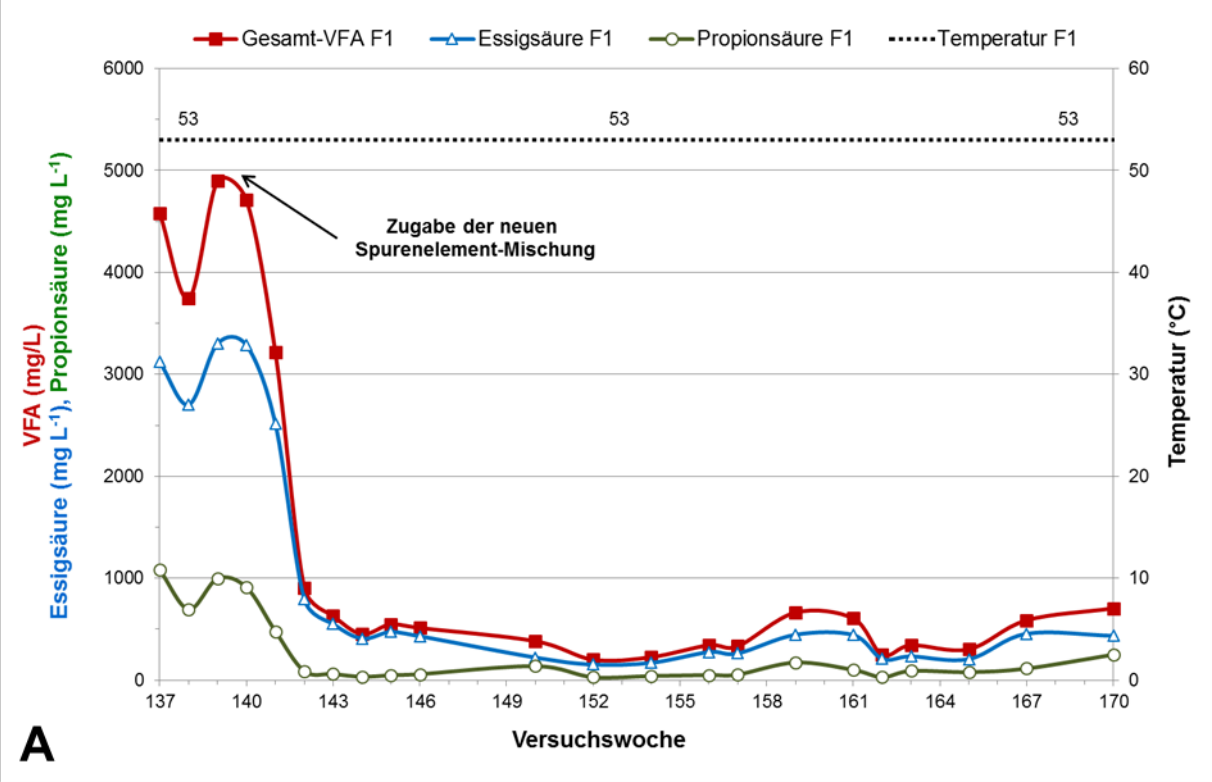


Abbildung 12 A – H: Darstellung der Menge der *in situ* über TXRF-Spektroskopie bestimmten gelösten, bioverfügbaren Spurenelemente in Korrelation zu den über GC bestimmten kurzkettigen Fettsäuren C2 – C6 (= VFA) im Fermenter bzw. Reaktor der Wiederholungsphase. Es wurden exemplarisch die Elemente Nickel (A/B), Mangan (C/D), Zink (E/F) und Kupfer (G/H) ausgewählt. Nach Zugabe von Spurenelementen sanken die Fettsäuren drastisch, stiegen dann aber kurzzeitig an, als die Temperatur des Testreaktors erhöht wurde. Im temperaturkonstanten Referenzreaktor blieben die Fettsäuren nach Spurenelementzugabe unverändert unter 1000 mg/L (1000 ppm), A, C, E und G.

Mit Abschluss der 142. Versuchswoche wurde das Haupttemperaturprogramm beendet. In einer anschließenden Wiederholungs- und Validierungsphase des Temperaturprogramms (Abbildung 13) wurden ebenfalls regelmäßige Analysen der Reaktorinhalte durchgeführt, um solide Aussagen über die Belastbarkeit der Mikroflora unter erhöht-thermophilen Bedingungen treffen zu können (bei unverändert 70 % Rindergülle als Input). Als Temperatur-Testreaktor diente für die Wiederholungsphase der Großreaktor F2 und als Referenzreaktor wurde diesmal F1 gewählt (bei konstanten 53 °C), um etwaige Fermenterbesonderheiten der drei identischen Fermenter auszuschalten. Die erste Temperaturanhebung im Testreaktor F2 auf 53,5 °C erfolgte in der 149. Versuchswoche (siehe Tabelle 2, Abbildung 13 B). Die Messergebnisse in Abbildung 14 zeigen, dass die erhöhten Temperaturen im Großreaktor F2 bis zu 57 °C erstaunlicherweise zu keinem Unterschied der Konzentration des temperaturabhängigen Ammoniaks in den Reaktoren führte (F1 und F2: 200 – 500 ppm). Erst ab einer länger andauernden Temperatur von 59 °C betrug die Differenz lediglich 150 mg/L. Ursache war evtl. ein erhöhter Ammonium- bzw. Ammoniakabbau durch die veränderte mikrobielle Flora oder eine erhöhte Verdunstung aufgrund erhöhter Temperatur.

Der Vergleich der gemessenen Fettsäurewerte VFA lässt jedoch einen deutliche, aber zeitlich begrenzte Hemmung des Temperaturanstieges auf die Aktivität der Fettsäure-abbauenden Mikroorganismen durch den Temperaturanstieg erkennen. Es kam zu einem kurzen vorübergehenden Anstieg der Gesamt-VFA, der sich jedoch ab der 163. Versuchswoche wieder normalisierte (Abbildung 13 B: ab der 159. Versuchswoche bzw. Abbildung 14: rote gegenüber braune Kurve). Die molekularbiologischen Analysen (siehe später) offenbarten den Grund: Umbau der hydrolytischen Bakterienpopulation zugunsten des ausschließlich thermophilen „Allround-Abbauers“ *Defluviitoga tunisiensis* mit bis zu 67 % der gesamten Bakterienpopulation. Bakterien mit gemischten Temperaturoptima sind bislang nicht bekannt, siehe Kapitel 1.8.1. Dieses in Zusammenhang mit Temperaturänderungen bislang ungeklärte Phänomen wird in der Literatur häufig als „Temperaturstress“ bezeichnet.



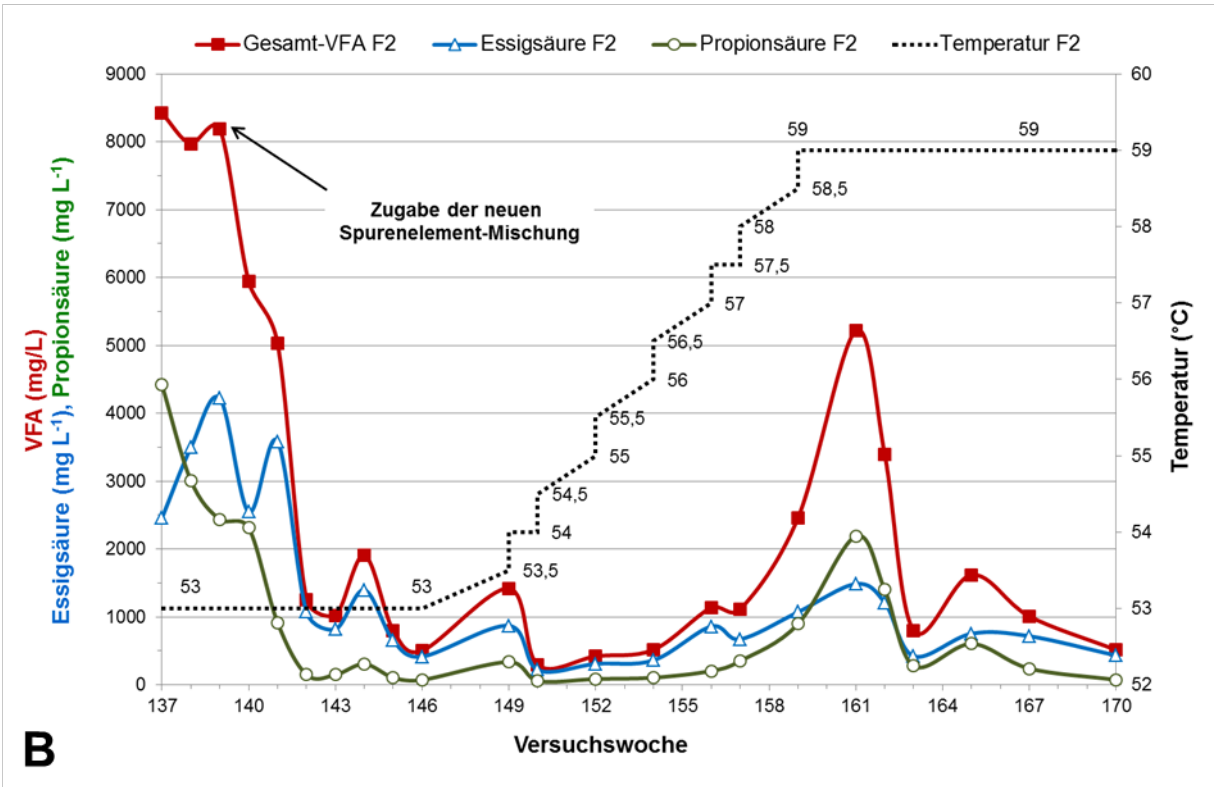


Abbildung 13 **A** und **B**: Darstellung der Gehalte an Gesamt-Fettsäuren (VFA), an Essigsäure und Propionsäure in den Reaktoren F1 und F2 in den Versuchswochen 90 bis 170 der Wiederholungsphase mit den dazugehörigen Temperaturen. Darstellung **B** bezieht sich exklusiv auf die Gehalte an Gesamt-VFA, Essigsäure und Propionsäure im Reaktor F2 sowie der dazugehörigen Temperatur. Bis zur 142. Versuchswoche galt der Reaktor F2 als Referenz, danach als Testreaktor. Abgebildet ist der Versuchszeitraum in beiden Reaktoren kurz vor und nach der Spurenelement-Zugabe in der 139. Versuchswoche. Die Fettsäurewerte normalisierten sich nach Zugabe der Spurenelemente drastisch und sehr schnell in 2 bis 3 Wochen dauerhaft unter 1000 mg/L (siehe auch Abbildung 12).

Die Fettsäurewerte stiegen proportional zur Temperatur von 59 °C in F2 bis auf 5000 ppm in der 161. Versuchswoche an, normalisierten sich aber bereits innerhalb von 2 Wochen bis zur 163. Versuchswoche wieder. Der parallel ebenfalls supplementierte Referenzreaktor F1 (ab 142. VW) ergab bei konstant 53 °C in dieser Phase der 160. Versuchswoche lediglich einen kleinen VFA-Peak von weit unter 1000 ppm Gesamt-VFA. Die im weiteren Verlauf länger andauernde Reaktor-Temperatur von 59 °C im Testreaktor war nach der Supplementierung im Vergleich zur Hauptphase mit Nickelmangel jetzt ohne Einbußen bezüglich der Fettsäurewerte möglich, d. h. bis zum Untersuchungsende in der 170. Versuchswoche. Das lässt den Schluss zu, dass die kurzzeitig in der 158. -162. Versuchswoche beobachtete Erhöhung der Fettsäuren im Testreaktor (Abbildung 13 B) allein durch die Temperaturerhöhung bzw. den dadurch bewirkten Umbau der mikrobiellen Flora bedingt wurde.

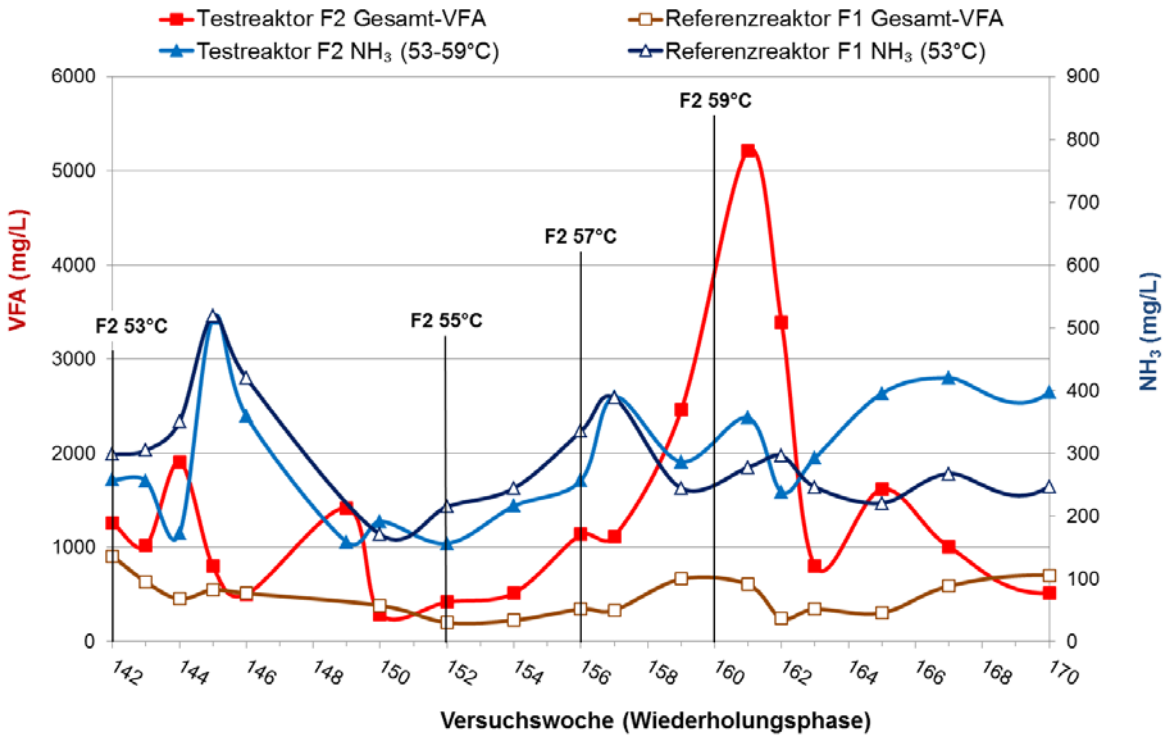


Abbildung 14: Ausschnitt der Fettsäuregesamtgehalte (**VFA**, **rot**, Einzelfettsäuren nicht abgebildet) und der Ammoniakgehalte (**NH_3**, **blau**) vom Reaktor F1 (Referenz, konstant 53 °C) im Vergleich zu F2 mit dem Temperatur-Anstieg von 53 °C auf 59 °C in der Wiederholungsphase. Trotz erhöhter Temperatur lässt sich bis 57 °C überraschend kein nennenswerter Unterschied im temperaturabhängigen Ammoniakgehalt in F2 feststellen. Erst ab der 163. Versuchswoche (59 °C) betrug die Differenz lediglich ca. 150 mg/L. Ursache war evtl. ein erhöhter Ammonium- bzw. Ammoniakabbau durch die veränderte mikrobielle Flora oder Verdunstung bei erhöhter Temperatur.

Schlussfolgerung

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Untersuchungen in der Haupt- und Wiederholungsphase bezüglich der Prozessstabilität und der ermittelten Biogas-Produktionsraten zeigten, dass Prozesstemperaturen von 59 °C im erhöht-thermophilen Bereich einer Biogasanlage durchaus zur geplanten hohen Gasproduktion führten, die Störanfälligkeit gegenüber technischen Problemen und Substratumstellungen unter Hochdurchsatzbedingungen jedoch ab einer Prozesstemperatur von 57 °C etwas stieg. Die gemessenen temperaturabhängigen Ammoniak-Konzentrationen lagen in den jeweiligen

Testreaktoren (Hauptphase: F3; Wiederholungsphase: F2) bei Prozesstemperaturen von 59 °C mit durchschnittlich 360 ppm Ammoniak lediglich um 150 ppm höher als in den entsprechenden Referenzreaktoren bei 53 °C mit 210 ppm, siehe oben (Referenz in Hauptphase: F2; Referenz in Wiederholungsphase: F1). Im Vergleich der Ammoniak-Gehalte bei Prozesstemperaturen von 55 – 57 °C in den jeweiligen Testreaktoren zu denen bei 51 – 53 °C in den Referenzreaktoren betrug die Differenz nur etwa 100 ppm (350 ppm zu 250 ppm). Die Beobachtungen wurden allesamt unter Hochdurchsatzbedingungen (Verweilzeit 11,5 Tage) gemacht, in der die beprobte Biogasanlage im Dauerbetrieb ohne elektrische Leistungseinbußen durch das Temperaturprogramm verlief und immer noch erfolgreich zum Zeitpunkt der Berichtsschreibung läuft.

Anzumerken ist, dass wir einen Teil der Fermenterkurven und fast alle Berechnungen zur Seth-Biogasanlage (Tabellen 1 und 2, Abbildungen 7, 8 und 12) dem Doktoranden Sebastian Antonczyk verdanken, der in erster Linie eine automatisierte Konti-Strohvergärung im Rührkesselmodus aufbaute und auswertete. Durch die parallel verlaufende Arbeit des Doktoranden Richard Arthur konnten in dem in Abbildung 12 dargestellten Zeitraum von der 132. bis zur 164. Versuchswoche speziell die Spurenelemente der Biogasreaktoren der Biogasanlage Seth erfasst werden, da Herr Arthur in seiner Doktorarbeit die Analytik hierzu mittels TXRF erstmals entwickelte und für Biogasanlagen anpasste. Diese Untersuchungen waren nicht Bestandteil der Arbeitspakete des hier beschriebenen Projektes. Nach Beendigung des praktischen Teils der Doktorarbeit von Herrn Arthur wurden keine zusätzlichen Messungen der Spurenelemente durchgeführt. Daher wurden die genauen Gehalte an Spurenelementen ab der 164. Versuchswoche nicht mehr ermittelt, so dass auch die langfristige Wirkung der neuen Spurenelementmischung auf die jeweiligen Element-Konzentrationen ab der 164. Versuchswoche nicht analytisch im Detail untersucht werden konnte.

II.1.4 Projektergebnisse zur Hygienerelevanz der untersuchten Biogasanlage: Einfluss der Temperatur auf die Hygienisierung der BGA

II.1.4.1 Messung des Hygienestatus mittels konventioneller Plattentechnik

Im Zusammenhang mit den gesetzlichen Richtlinien für Bioabfälle, in denen Grenzwerte für *Escherichia coli* (*E. coli*), Enterokokken und Salmonellen als Indikatororganismen für einen Hygienestatus von Biogasanlagen aufgeführt sind, orientierten sich die Hygieneuntersuchungen des Projekts ersatzweise an diesen Organismengruppen, auch wenn diese Richtlinien für eine BGA ausdrücklich NICHT gelten (kein Einsatz von Bioabfällen; siehe I.2.2).

Zur Messung des Hygienestatus der 3 Biogasreaktoren der BGA, als auch der Rindergülle und des Endlagers, kam für Hygieneprüfungen die konventionelle Plattentechnik zum Einsatz. Dabei erfolgte die Detektion der jeweiligen Organismen unter Verwendung von einem unspezifischen Vollnährmedium sowie verschiedenen Selektivmedien. Mit dem DEV-Nähragar (Vollmedium) wurde lediglich die Gesamtkeimzahl der aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien nachgewiesen (Abbildung 15 A). Dabei wurde keine besondere Klassifizierung hinsichtlich der Pathogenität der Bakterien vorgenommen. Die Detektion der gesamten Aerobier ist insofern wichtig, um die Frische der Probe zu überprüfen, andererseits um die genaue Zahl der potentiellen pathogenen Bakterien bezogen auf die aeroben / fakultativ anaeroben Bakterien beurteilen zu können.

Detektion coliformer Bakterien und *E. coli*

Der Zusatz von Chromogenen (Farbstoffen) im Chromocult® Coliformen-Agar erlaubt die Identifikation coliformer Bakterien und die Abgrenzung zu *E. coli*. Der simultane Nachweis wird durch die Kombination von zwei chromogenen Substraten ermöglicht. Das Substrat Salmon™-ß-D-GAL wird durch die für Coliforme charakteristische ß-D-Galactosidase gespalten und bewirkt eine rosa-rote Färbung der Coliformen-Kolonien. Der Nachweis der für *E. coli* charakteristischen ß-D-Glucuronidase erfolgt über das Substrat X-ß-D-Glucuronid, das eine Blaufärbung der positiven Kolonien bewirkt. Da die *E. coli*-Kolonien sowohl Salmon™-ß-D-GAL als auch X-ß-D-Glucuronid spalten, färben sie sich dunkelblau-violett und sind somit leicht von den übrigen Coliformen zu unterscheiden, die rosa-rot gefärbt sind (Abbildung 15 B).

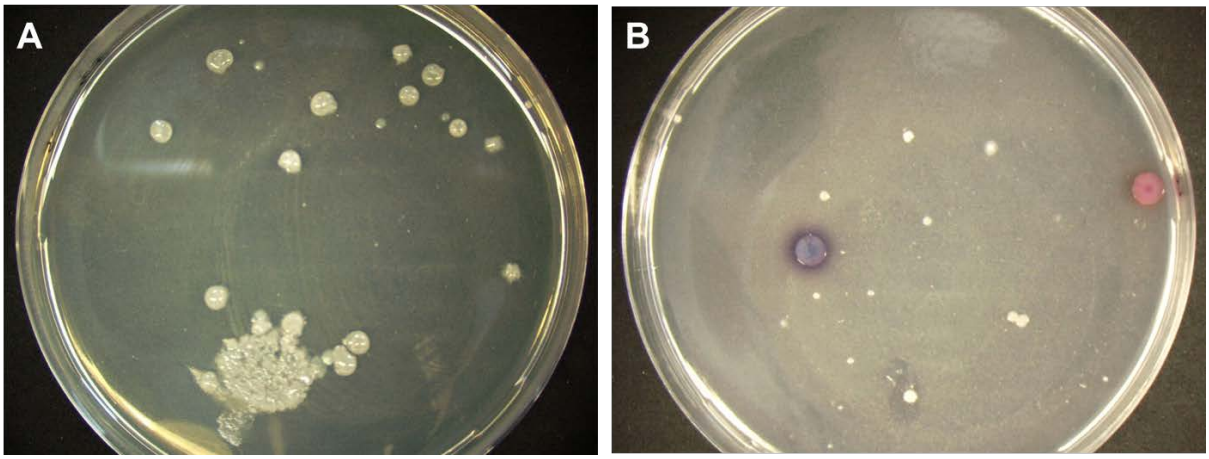


Abbildung 15 A und B: Verschiedene Erscheinungsformen der für die Hygiene bestimmten Keime auf Nährmedien. A) DEV-Nähragar, Erfassung der gesamt aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien; B) Chromocult® Coliformen-Agar, Nachweis rot erscheinender coliformer Bakterien (rechts) und von *Escherichia coli* mit dunkelblauem bis violetten Erscheinungsbild (links).

Detektion von Enterokokken

Die Zusätze des Kanamycin-Äsculin-Azid-Agars (Selektivmedium) inhibieren die Begleitbakterien der Umweltproben, wobei die detektierten Enterokokken, die man früher (vor 1980) fäkale Streptokokken nannte, weitestgehend unempfindlich gegenüber diesem Medium sind. Enterokokken-Kolonien weisen sich auf diesem Nährmedium durch einen braunschwarzen Hof aus (Abbildung 16 A). Berg und Berman zeigten, dass die Reduktion der Enterokokken mit der Reduktion von Viren bei Fermentationsprozessen korrelierbar ist (Berg & Berman, 1980), d. h. eine geringe Anzahl von Enterokokken ging mit einer ebenfalls geringen Zahl an Viren einher.

Detektion von Salmonellen

Der Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (kurz XLD-Agar) und der Salmonella-Agar HiCrome™, Improved wurden eingesetzt, um einen Indikator für eventuell vorhandene Salmonellen zur Verfügung zu haben. Einige Stämme von Salmonellen produzieren Schwefelwasserstoff (H_2S), welches mit den Eisen(II)-Ionen im XLD-Agar zu schwarzem Eisensulfid reagiert. Es bilden sich farblose Kolonien mit einem schwarzen Zentrum (Abbildung 16 B). Bei dem „Salmonella-Agar HiCrome™ Improved“ (HiCrome™) basiert hingegen der Nachweis auf einer Änderung des pH-Wertes im Medium. Salmonellen sind als leuchtend rote Kolonien erkennbar. Zusätzlich ist eine Identifikation der gesamt Coliformen möglich, welche auf dem HiCrome™ ein blau bis violettes Erscheinungsbild besitzen (Abbildung 16 C).

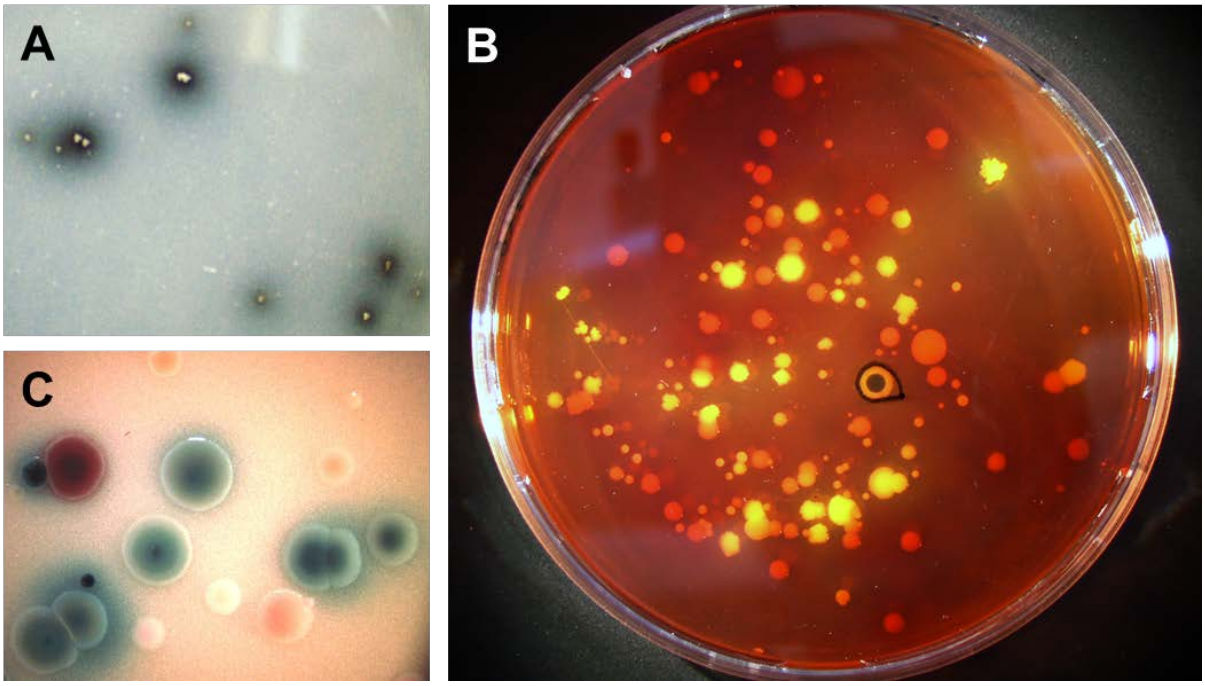


Abbildung 16 A - C: Verschiedene Erscheinungsformen von Enterokokken- und Salmonellen-Kolonien auf selektiven Nährmedien. A) Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar, Detektion von Enterokokken als Kolonien mit braunschwarzem Hof; B) Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar), Nachweis von Salmonellen als farblose Kolonien mit einem schwarzen Zentrum (Salmonellen-Kolonie im Bild mit schwarzem Strich umrundet); C) Salmonellen-Agar „HiCrome™ Improved“, Indikator zum Nachweis rotfarbiger Salmonellen (links im Bild links unten). Die blauen, farblosen und rosa Kolonien im Bild beziehen sich auf andere Enterobakterien.

Probenvorbereitung bei der Plattenkulturtechnik

Zum Nachweis hygienerelevanter Keime wurden etwa 5 g Probe eingewogen und die erste Verdünnungsstufe durch Zugabe von 45 mL Dispersionslösung (0,9 % NaCl; 0,1 % Tween 80, Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat) erzeugt. Es folgte eine Homogenisierung von 2 min im Stomacher bei 150 rpm ± 5 % (rpm = rounds per minute, Runden pro Minute). Sowohl die Zusammensetzung der Dispersionslösung als auch die Homogenisierungszeit wurden in Vorversuchen getestet und bestätigt. Die homogenisierte Probe wurde umgehend in Dekaden-Schritten bis 10^{-6} weiter verdünnt (in 0,9 % NaCl). Jeweils 100 µL einer Auswahl an Verdünnungsstufen (siehe Tabelle 5) wurden auf die Platten aufgebracht und ausgestrichen. Dabei wurde die applizierte Verdünnungsstufe so gewählt, dass die Zahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) auf der Platte quantitativ auswertbar war. Eine Übersicht der eingesetzten Medien, der gewählten Verdünnungsstufen und der Inkubations-bedingungen gibt die Tabelle 5.

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Medien, genutzte Verdünnungsstufen und Inkubationsbedingungen zum Nachweis hygienerelevanter Keime in Gülle und Biogasreaktoren; geeigneten Verdünnungsstufen wurden in Vorversuchen ermittelt

Probe	**Nachgewiesene Organismen**	**Nähragar**	**Eingesetzte Verdünnungs-stufe**	**Inkubations-bedingungen**
Rindergülle	Gesamt Aerobier	DEV-Nähragar für die Mikrobiologie (Merck Art.-Nr. 1.11471.0500)	10^{-5}; 10^{-6}	37 °C
	Enterokokken	Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar für die Mikrobiologie (Merck Art.-Nr. 1.05222.0500)	10^{-3}; 10^{-4}	35 °C
	Gesamt Coliforme, *Escherichia coli*	Chromocult® Coliformen-Agar für Mikrobiologie (Merck Art.-Nr. 1.10426.0500)	10^{-3}; 10^{-4}	35 °C
	Salmonellen	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) für die Mikrobiologie (Merck Art.-Nr. 1.05287.0500)	10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}	37 °C
	Gesamt Coliforme, Salmonellen	Salmonella-Agar HiCrome™ Improved (Fluka Art.-Nr. 05538)	10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}	37 °C
Referenz-reaktor F2 **Testreaktor F3** **Endlager**	Gesamt Aerobier	DEV-Nähragar für die Mikrobiologie (Merck Art.-Nr. 1.11471.0500)	10^{-5}; 10^{-6}	37 °C
	Enterokokken	Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar für die Mikrobiologie (Merck Art.-Nr. 1.05222.0500)	10^{-1}; 10^{-2}	35 °C
	Gesamt Coliforme, *Escherichia coli*	Chromocult® Coliformen-Agar für Mikrobiologie (Merck Art.-Nr. 1.10426.0500)	10^{-1}; 10^{-2}	35 °C
	Salmonellen	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) für die Mikrobiologie (Merck Art.-Nr. 1.05287.0500)	10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}	37 °C
	Gesamt Coliforme, Salmonellen	Salmonella-Agar HiCrome™ Improved (Fluka Art.-Nr. 05538)	10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}	37 °C

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl der aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien auf DEV-Nähragar zeigte eindeutig keine Variation, unabhängig von den unterschiedlichen Prozesstemperaturen wurde. Die Gesamtzahl an Mikroorganismen, die nach dieser Methode detektierbar waren, lag durchschnittlich zwischen 10^8 und 10^9 KBE/g oTS (KBE = Kolonie bildende Einheit). Eine signifikante Reduktion der Gesamtkeimzahl (Bebrütung bei 37 °C) fand

im Testreaktor F3 selbst bei 59 °C nicht statt. Lediglich ein Unterschied um eine halbe Dekade geringer im Vergleich zur Rindergülle konnte bei den Temperaturen der Biogasanlage festgestellt werden, egal ob 51 °C oder 59 °C (Abbildung 17). Diese Reduktion um eine halbe Zehnerpotenz lag daher in erster Linie an den veränderten Bedingungen in den Reaktoren, zum Beispiel an einer für Biogasanlagen typischen Salzfracht bzw. eines von sich aus antiseptisch wirkenden Ammoniakgehalts, nicht aber an der Temperatur.

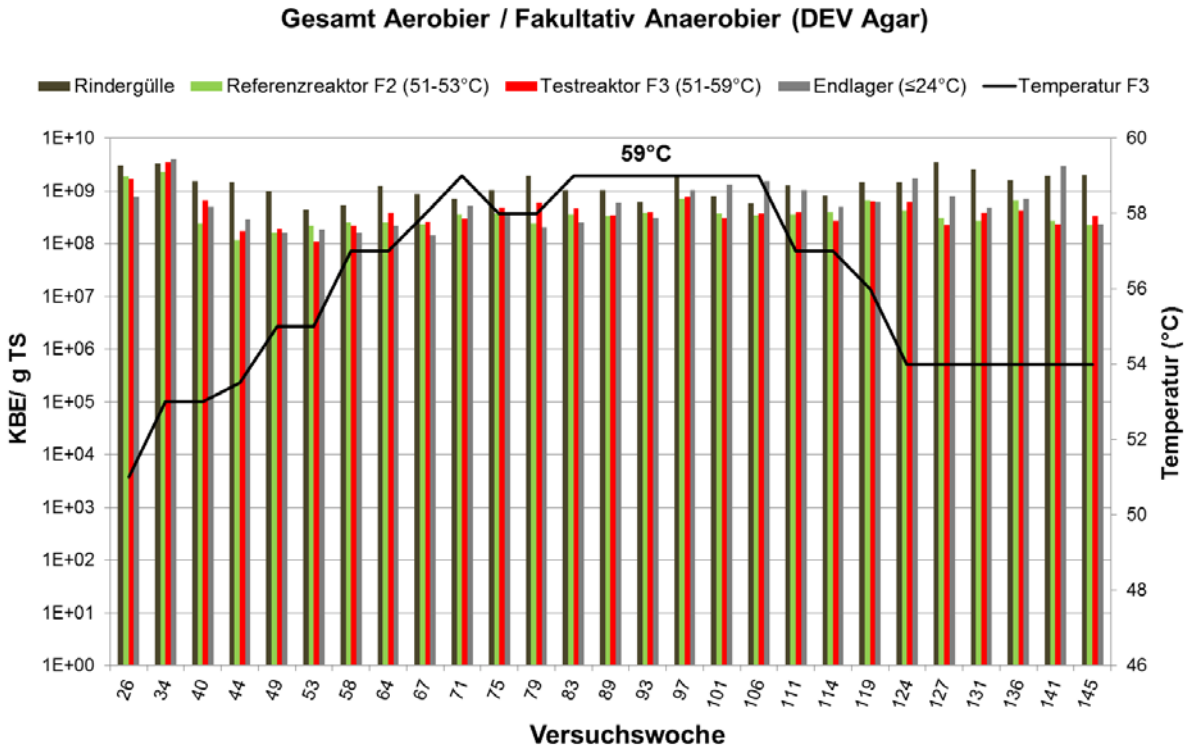


Abbildung 17: Anzahl der nachgewiesenen aeroben und fakultativ anaeroben Gesamtbakterien in den Proben der Rindergülle, des Referenzreaktors F2 (51 – 53 °C) und des Testreaktors F3 (51 – 59 °C) sowie des Endlagers (16 – 24 °C) der Biogasanlage in Seth (Versuchswochen 26 bis 145). Die Detektion erfolgte durch Auszählung der Kolonien nach Inkubation auf DEV-Nähragar.

Im Unterschied zu den aeroben und fakultativ anaeroben Keimzahlen wurden die als hygienerelevante Keime geltenden Enterokokken durch die Prozesstemperatur von 57 °C deutlich reduziert (Abbildung 18). Ab einer Prozesstemperatur von 57 °C verringerte sich die Anzahl an Enterokokken durchschnittlich um den Faktor 1 x 10^4 bzw. 10.000-fach im Vergleich zur Rindergülle. Ab einer Temperatur von 59 °C lag die Keimzellzahl im Testreaktor F3 häufig unterhalb der Nachweisgrenze von nur 100 Bakterien pro g TS. Dabei betrug die Anfangs-Enterokokken-Konzentration in der Gülle durchschnittlich 4 x 10^6 KBE/g TS. Die Enterokokken-Konzentration im Referenzreaktor F2 lag bei 3 x 10^4 KBE/g TS. Hier geschah bereits bei 51 – 53 °C ohne eine weitere Temperaturanhebung eine Hygienisierung um den Faktor 100. Die Endkonzentration der Enterokokken im unbeheizten Endlager betrug nur noch 5 x 10^3 KBE/g TS. Das bedeutet eine 1.000-fache Keimreduktion, trotz unbeheizten Endlager, indem sich bei Temperaturen unterhalb von 45 °C Enterokokken hätten vermehren können, da deren Wachstums-Temperaturbereich von 10 – 45 °C reicht. Das zeigt wiederum den abtötenden Charakter eines Gülle-Mais-Reaktormediums auf human- und tierpathogene Bakterien, nicht jedoch auf die adaptierte methanbildende Mikroorganismen-Gemeinschaft.

Enterokokken gelten als geeignete Indikator-Bakterien zu Bewertung der Hygienisierung von Bioabfall und Biogasanlagen (Sahlström, 2003; Fröschle et al., 2015; Hölzle, 2015). Damit konnte das Ziel erreicht werden, bei erhöht thermophiler Prozess-Temperatur und sehr hoher Durchsatzleistung mit stündlicher Gülle-Substratbeschickung eine Hygienisierung zu erhalten.

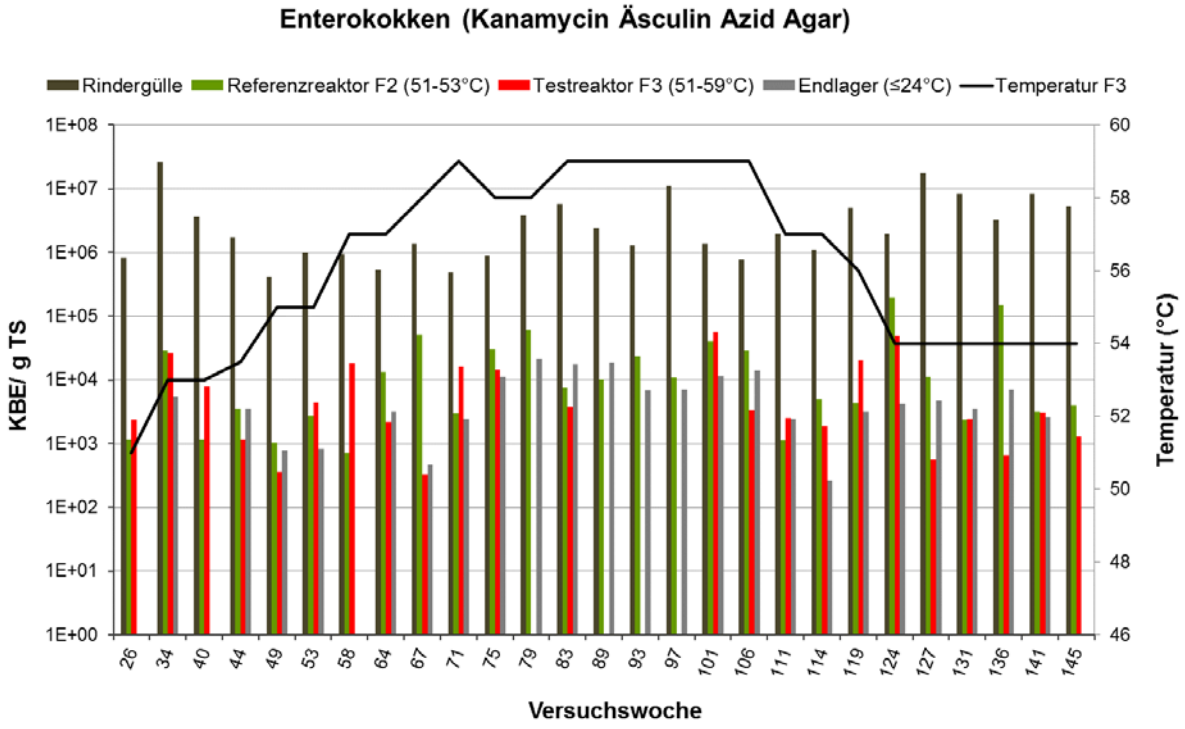


Abbildung 18: Anzahl der nachgewiesenen Enterokokken in den Proben Rindergülle, Referenzreaktor F2 (51 – 53 °C) und Testreaktor F3 (51 – 59 °C) sowie Endlager aus der Biogasanlage in Seth (Versuchswochen 26 bis 145), also kontinuierlich über zwei Jahre. Die Detektion der Enterokokken erfolgte durch Auszählung der Kolonien nach Inkubation auf Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (siehe Text).

Gemäß deutscher Hygienebestimmungen sind in erster Linie lediglich Salmonellen relevant. In mehreren Versuchswochen wurde mittels des XLD-Agars mit bis zu 5 x 10^4 KBE/g TS eine durchaus nennenswerte Anzahl von Salmonellen detektiert, aber vereinzelt nur in der Rindergülle (Abbildung 19). Um mögliche Kontaminationen von den falsch-negativen Varianten *Salmonella senftenberg* und *Salmonella arizonae* auszuschließen, da diese durch die fehlende Schwefelwasserstoff-Produktion keine schwarzen Eisensulfidhöfe in den Bakterienkolonien auf dem XLD-Agar bilden, wurde zusätzlich der sogenannte „HiCrome™ Salmonella-Agar“ eingesetzt. Auch mit diesem zweiten Salmonellen-spezifischen Agar konnten keine Salmonellen in den Biogasreaktoren gefunden werden. Es kann also festgehalten werden, dass die durch die Gülle gelegentlich eingebrachten Salmonellen in den Biogasreaktoren bei einer Temperatur von ≥ 51 °C als auch im anschließend unbeheizten Endlager ausnahmslos bis unter die hier methodisch bedingte Nachweisgrenze von 100 Salmonellen pro Gramm Trockensubstanz reduziert worden sind. Eine vollständige Reduktion bis unter die Nachweisgrenze von Salmonellen während der Fermentation in Biogasanlagen dokumentierten auch schon jeweils Wagner und Breves mit ihren Kollegen (Wagner et al., 2008; Breves et al., 2012). Siehe dazu auch Fröschle et al. (2015) und Hölzle (2015).

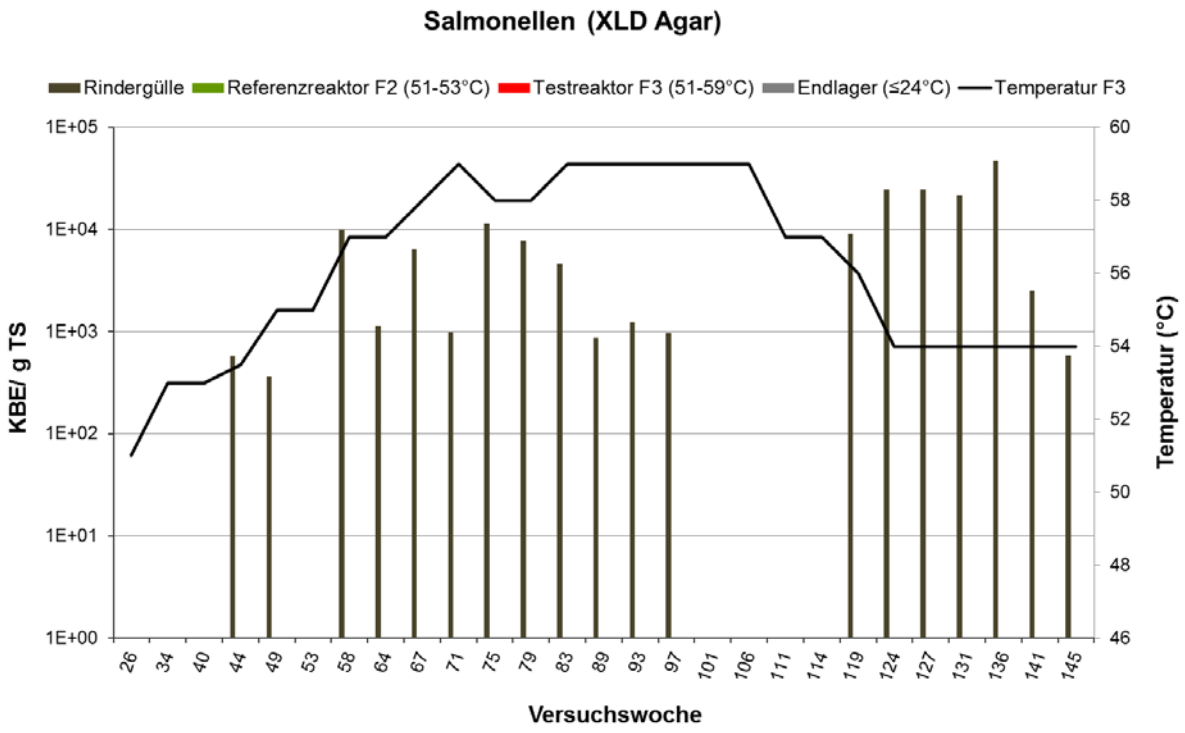


Abbildung 19: Bestimmung der Salmonellen in den Proben der Rindergülle, des Referenzreaktors F2 (51 – 53 °C), des Testreaktors F3 (51 – 59 °C) sowie des unbeheizten Endlagers der Biogasanlage in Seth (Versuchswochen 26 bis 145). Die Detektion der Salmonellen erfolgte durch Auszählung der Kolonien nach Inkubation auf XLD Agar. Positive Nachweisergebnisse, aber nicht immer, gab es lediglich für die Rindergülle, nicht jedoch für die Biogasreaktoren oder das Endlager.

Die in Abbildung 20 folgenden Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmung der coliformen Bakterien einschließlich der *E. coli* mit dem Chromocult® Coliformen-Agar zeigten in den Proben der Rindergülle eine Keimbelastung von durchschnittlich 3 x 10^6 KBE/g TS Coliformen an, im Referenzreaktor F2 (51 – 53 °C) dagegen um hundert Mal niedriger mit durchschnittlich 5 x 10^4 KBE/g TS. Bei einer Prozesstemperatur ab 58 °C lag die Anzahl an Coliformen im Testreaktor bei durchschnittlich 5 x 10^3 KBE/g TS (Abbildung 20). Häufig erreichte die Anzahl an Coliformen in den Reaktoren nicht die Nachweisgrenze von 100 Bakterien pro Milliliter (Abbildung 20, fehlende rote Balken). Auch mit dieser Bakteriengruppe zeigte sich eine drastische Hygienisierung in der Biogasanlage um den Faktor 1.000 bei erhöhter Thermophilie (58 °C). Im Referenzreaktor F2 bei 51 – 53 °C lag die Reduktion der Coliformen bei 100-fach und im unbeheizten Endlager in der Regel sogar noch darüber. Dabei ist zu bedenken, dass jede Stunde eine frische Substratzugabe und eine gute Durchmischung in den Reaktoren erfolgten. Es kann davon ausgegangen werden, dass in einer zweistufigen Biogasanlage der Hygienisierungseffekt noch weitaus höher ausgefallen wäre.

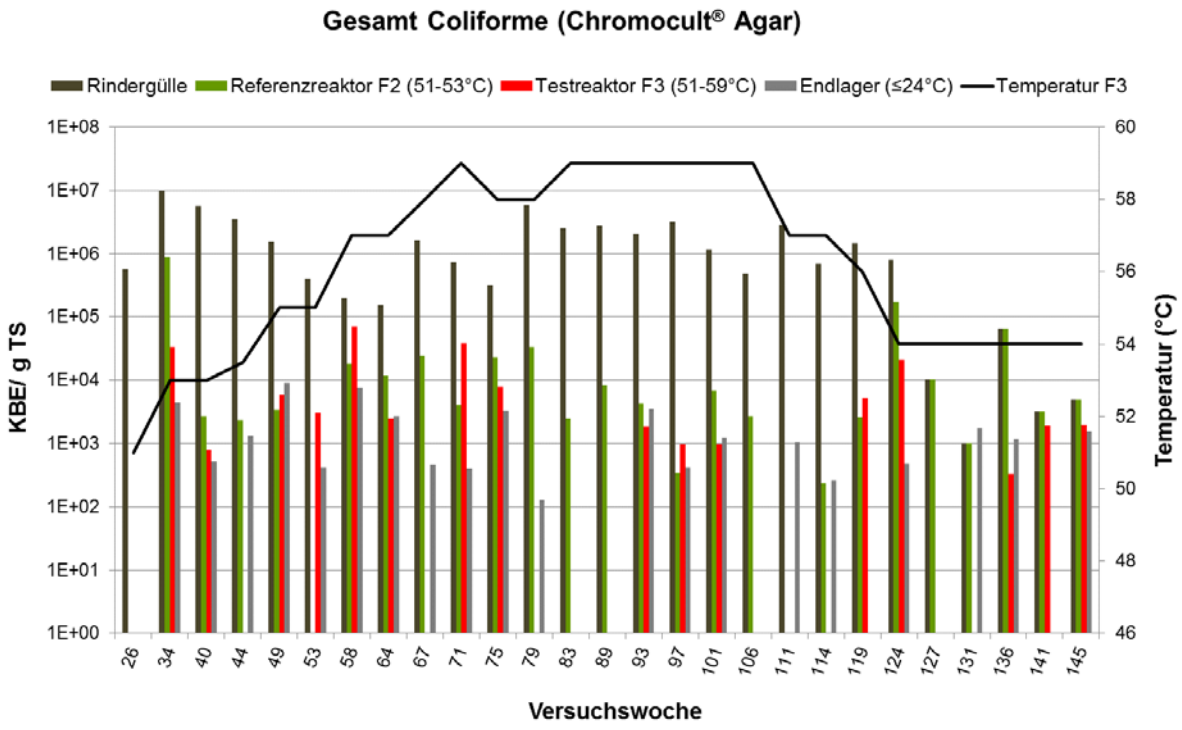


Abbildung 20: Anzahl der nachgewiesenen coliformen Bakterien einschließlich *E. coli* in den Proben der Rindergülle, Referenzreaktors F2 (51 – 53 °C), des Testreaktors F3 (51 – 59 °C) sowie des unbeheizten Endlagers der Biogasanlage in Seth (Versuchswochen 26 bis 145). Die Detektion der Coliformen erfolgte durch Auszählung der Kolonien nach Inkubation auf Chromocult® Agar.

Die Ergebnisse der konventionellen Hygieneuntersuchung mittel Plattentechnik wurden auch noch in der Temperatur-Wiederholungsphase ab der 145. Versuchswoche durchgeführt. Sie bestätigten im vollen Umfang die Ergebnisse der Hauptversuchsphase der 26. – 145. Versuchswoche. Zum Beispiel lag die Anzahl an detektierten potentiell pathogenen Mikroorganismen (Enterokokken, Coliforme/*E. coli*, Salmonellen) in der 161. Versuchswoche (Wiederholungsphase) im Testreaktor F2 bei einer Prozesstemperatur von 58,5 °C unterhalb der Nachweisgrenze von 10^2 KBE/g TS (graphisch hier nicht dargestellt). Die Vergleichszahlen des Referenzreaktors bei 53 °C lagen dagegen bei Enterokokken: 3,5 x 10^5 KBE/g TS und für Gesamt-Coliforme: 1,9 x 10^5 KBE/g TS (Tabelle 6). Auch in der 170. Versuchswoche lag die detektierte Anzahl von Gesamt-Coliformen und *E. coli* sowie die von Enterokokken im Testreaktor F2 zwar unterhalb der Nachweisgrenze.

Tabelle 6: Auflistung der nachgewiesenen Indikatororganismen zur Abschätzung des Hygienestatus in der Biogasanlage Seth in der 161. und 170. Versuchswoche (Wiederholungsphase des Temperaturprogramms), die Nachweisgrenze lag bei 10^2 KBE/g TS

VW	Detektierte Organismen	Plattenmedium	Rindergülle	F2 Testreaktor 58,5°C	F3 Referenzreaktor 53°C	Endlager 24°C
161.	Gesamt-Aerobier	DEV-Nähragar	7,05E+08	1,87E+08	1,27E+08	-
	Enterokokken	Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar	5,29E+06	3,87E+04	3,50E+05	-
	Gesamt-Coliforme	Chromocult® Coliformen-Agar	1,76E+06	0,00E+00	1,94E+05	-
	Escherichia coli	Chromocult® Coliformen-Agar	1,59E+06	0,00E+00	1,09E+05	-
	Salmonellen	HiCrome™-Agar	1,76E+04	0,00E+00	0,00E+00	-
		Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar	2,35E+04	0,00E+00	0,00E+00	-
170.	Gesamt-Aerobier	DEV-Nähragar	1,04E+09	7,30E+08	6,71E+08	6,43E+08
	Enterokokken	Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar	5,06E+06	0,00E+00	1,20E+04	6,30E+02
	Gesamt-Coliforme	Chromocult® Coliformen-Agar	6,32E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	Escherichia coli	Chromocult® Coliformen-Agar	5,20E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	Salmonellen	HiCrome™-Agar	2,94E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
		Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar	2,60E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

II.1.5 Projektergebnisse zur Hygienerelevanz der untersuchten Biogasanlage: Molekularbiologische Nachweistechniken

II.1.5.1 Allgemeine Vorgehensweise bei der Next Generation Sequencing (NGS) Technik

Zur Erforschung des mikrobiellen Konsortiums unter Einfluss unterschiedlicher Biogasreaktor-Temperaturen (51 °C bis 59 °C) im Vergleich mit dem nicht erhitzten Rohsubstrat Rindergülle bzw. dem Gärrest aus dem Endlager wurde von der ersten Probenserie mit 24 Proben die DNA nach einem optimierten Verfahren extrahiert und gereinigt. Das Extraktions- und Reinigungsverfahren wurde zusammen mit dem CeBiTec der Universität Bielefeld entwickelt. Ferner wurden die Primer ausgewählt bzw. angepasst. Die DNA aus 12 gefrorenen Rückstellmustern (Bestimmung immer in Doppelproben) wurde danach an die Firma LGC Genomics GmbH in Berlin als Sequenzierung geschickt. Diese hat die Proben mit der so genannten Next Generation Sequencing (NGS) Methode unter Verwendung des Gerätes MiSeq V3 (Illumina) analysiert (siehe auch Schema zum Ablauf der Proben-Vorbereitung und -Analyse per NGS im Informationskasten unten). Mit der hochmodernen NGS-Methode lassen sich auch kleine Veränderungen in der Populationsstruktur an methanogenen Mikroorganismen und deren Begleitbakterien inklusive potentiell pathogener Bakterien unter Einfluss verschiedener Bedingungen erkennen.

Auswahl von Proben der Biogasanlage in Seth zur Erstellung der taxonomischen Profile unterschiedlicher Prozesszustände

Entnahme von Fermentationsschlamm

DNA Isolierung (2 Replikate)

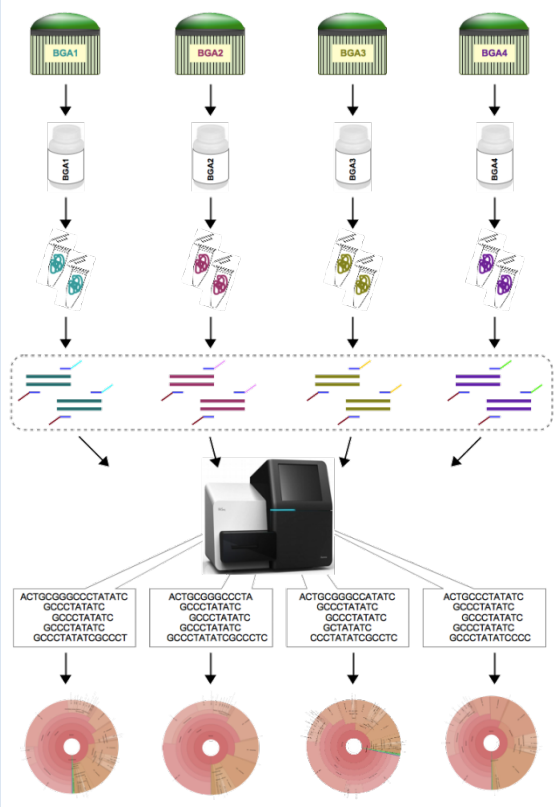
Erzeugung von 16S rRNA Gen-Amplikons mit einem angepassten universellen Primerpaar*

Sequenzierung von 16S rRNA Gen-Amplikons*

Prozessieren von Sequenzdaten*

***Durch die Firma LGC Genomic GmbH bzw. GATC Biotech AG**

Bioinformatische Erstellung von taxonomischen Profilen



Schema mit freundlicher Genehmigung aus dem Disputations-Vortrag von Dr. Irena Maus

II.1.5.2 DNA-Extraktion

Zur Extraktion des genetischen Materials (DNA) wurde ein Methodenablauf gefunden, der es ermöglicht, die schwer zu separierende negativ geladene DNA aus den Proben, welche durch die Rindergülle besonders reich an ebenfalls negativ geladenen Huminsäuren sind, selektiv zu erhalten und zu reinigen. Die DNA wurde mit Hilfe des Kits „FastDNA™ SPIN Kit for Soil DNA“ von MP Biomedicals extrahiert. Diese Methode setzt die Verwendung eines Disruptors voraus, der für einen sehr effektiven Zellaufschluss benötigt wird sowie die Benutzung von Silikat-Kügelchen unterschiedlicher Größe. Gerade die Zerstörung der Zellmembranen zum Herauslösen der DNA ist besonders wichtig für die Qualität nachfolgender Analysen. Andere Methoden verwenden häufig in erster Linie das Enzym Lysozym, welches jedoch die besondere Zellwand stäbchenförmiger Methanbildner nicht angreift (Nakamura et al., 2006). Wird nur ein Teil der Mikroorganismen aufgeschlossen, so werden die Ergebnisse der Untersuchung der Populationsstruktur stark verfälscht, pathogene Keime mit einer starken Kapsel können dadurch übersehen werden. Durch parallele mikroskopische Quantifizierungen in unserem Labor (MQI-Technik) haben wir tatsächlich Hinweise darauf gefunden, dass die Zusammensetzung an Methanbildnern durch einen unzureichenden Zellaufschluss der DNA-Extraktion falsch wiedergegeben wird.

Die Anpassung der DNA-Extraktion aus gefrorenen, zurückgestellten Proben konnte an der Universität Bielefeld am CeBiTec (Centrum für Bio-Technologie) realisiert werden. Zusammen mit Frau Dr. Irena Maus (Bielefeld) wurde die Prozedur der DNA-Extraktion optimiert. Für genauere Informationen zur Vorgehensweise der DNA-Extraktion sei hier auf das Manuskript Maus et al., 2017 verwiesen. Für die Reinigung der DNA-Proben wurde zusätzlich ein RNA- und Proteinverdau sowie eine anschließende Ethanol-Fällung durchgeführt. Zur erneuten Überprüfung der DNA-Reinheit und -Menge wurden die Proben mittels des Photometers NanoDrop1000 vermessen und im Anschluss ausgleichend verdünnt.

Siehe zum Thema der eventuellen Verfälschung von molekularbiologischen Populationsanalysen von Mikroorganismen aus Biogasanlagen auch die kürzlich erschienene Publikation von Krakat et al. (2017). Schon zur Doktorandenzeit von Herrn Krakat im gleichen Labor der HAW musste bereits die Ursprungsprozedur nach Goodfellow & Stackebrandt (1991) stark modifiziert werden, um möglichst alle Mikroorganismen erfolgreich aufzuschließen. Ein weiterer Grund des hier verwendeten DNA-Isolations-Kits als Alternative zur herkömmlichen Methode mit einem phenolischen Fällungsschritt ist die absolut toxinfreie Extraktion der DNA. Die ausschließlich chemischen Methoden zur Abtrennung der DNA von anderen Zellbestandteilen wie Proteinen, RNA, Lipide usw. verwenden entweder Phenol in der Phenol-Chloroform-Extraktion oder Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (R-Sätze (Phenol): 23/24/25-34-48/20/21/22-68: Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut - Verursacht Verätzungen - Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken - Irreversibler Schaden möglich) oder Mercaptoethanol als notwendiger Zusatz zur CTAB-Fällung (R-Sätze (Mercaptoethanol): 23/24/25-38-41-50/53: Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut - Reizt die Haut - Gefahr ernster Augenschäden - Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben). In den neueren Kits werden diese gesundheitsschädlichen Lösungen vielfach vollständig vermieden.

II.1.5.3 Charakteristika der verwendeten Next Generation Sequencing (NGS)

Neben der Extraktionsmethode stellt die Primerwahl für die genetische Untersuchung von Umweltproben eine besondere Herausforderung dar. Als Primerpaar zur Herstellung der gewünschten Amplikons der 16S rRNA-Gene wurde der modifizierte Primer Pro341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') (İnceoğlu et al., 2011) sowie der modifizierte Primer Pro806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') (Takai und Horikoshi, 2000) eingesetzt. Dieses verbesserte universelle Primerpaar bindet an die hypervariable V3 – V4 Region des 16S rRNA-Gens sowohl von Bakterien als auch von Archaeen, nicht jedoch von Eukaryoten. So ist es möglich, beide Organismengruppen zeitgleich zu erfassen. Die resultierenden Amplifikate haben eine Fragmentgröße von 466 bp (bp = Basenpaare). Die PCR zum Erhalt der gewünschten Genabschnitte wurde unter Verwendung der genannten Primer von LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Mit Hilfe individueller Barcodes je Probe konnten diese im Anschluss bei der Auswertung differenziert werden. Für die Sequenzanalyse wurden die PCR-Produkte gereinigt, äquimolar gemischt und mittels MiSeq V3 sequenziert. Die hierdurch entstandenen Ergebnisse hatten ein Datenvolumen von etwa 6 Gb, welche die Rohinformationen von über 34 Millionen Sequenzen enthielten. Nach Abzug der fehlerhaften Sequenzen (nicht kombinierbare Sequenzpaare, Chimären etc.), die technisch nicht auszuschließen sind, verblieb immer noch eine gewaltige, verwertbare Datenmenge von ca. 200.000 Sequenzpaaren pro Probe.

LGC Genomics GmbH: Laboratory steps

1. Quality control of starting material (DNA: agarose gel check / RNA: Agilent 2100 Bioanalyzer)
2. DNA extraction and quality control (if applicable)
3. Library preparation incl. indexing and quality control (Agilent 2100 Bioanalyzer)
4. Cluster generation and sequencing using Illumina MiSeq V3 instrument
5. Delivery of complete raw data: sequences of reads (FASTQ[a] format)

LGC Genomics GmbH: Bioinformatics service

1. Inline barcode demultiplexing
2. Clipping of Illumina TruSeq sequencing adapters from 3' ends of reads
3. Read pair joining with BBMerge[b]
4. Amplicon pre-processing with Mothur (quality filtering, alignment against the Mothur-Silva[c] 16S reference alignment – RDP[d] will be tried as well to determine which database result in the best sequence coverage, denoising, chimera removal)
5. OTU picking with Mothur (clustering of aligned sequences at the 98 % identity level, phylogenetic tree reconstruction with FastTree[e], taxonomy classification against the Mothur-Silva or RDP reference database), OTU = operational taxonomic unit
6. Alpha and beta diversity analyses with QIIME[f] (rarefaction plots, sample distance calculations, principal coordinate analysis)
7. Alignment of each representative OTU sequence against species-level 16S sequences from the NCBI nucleotide collection as an alternative taxonomical classification

a) FASTQ-Format ist ein textbasiertes Format für die Speicherung sowohl einer biologischen Sequenz (meist Nukleotidsequenz) als auch der entsprechenden Qualitätswerte.

b) BBMerge ist ein Hilfsprogramm, das verwendet wird, um zwei überlappende gepaarte Reads zu einem einzigen Read zusammenzuführen.

c) Mothur-Silva: SILVA ist eine ribosomale RNA-Datenbank, die in Zusammenarbeit mit der Mikrobial Genomics Group am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen, dem Fachbereich Mikrobiologie an der Technischen Universität München und Ribocon etabliert ist. Mothur ist eine open-source, plattformunabhängige, Community-unterstützte Software zum Beschreiben und Vergleichen von mikrobiellen Gemeinschaften.

d) RDP, das Ribosomal Database Project, ist eine regelmäßig aktualisierte Datenbank, die Ribosomen-bezogene Daten, Analysedienste und zugehörige Computerprogramme anbietet.

e) FastTree ist ein Hilfsprogramm zur Erstellung von phylogenetischen Bäumen aus Alignements von Nukleotid- oder Proteinsequenzen.

f) QIIME ist eine Open-Source-Bioinformatik-Pipeline (Programmpakete) zur Durchführung von Mikrobiom-Analysen aus Roh-DNA-Sequenzierungsdaten.

II.1.5.4 Einfluss der Temperatur auf die allgemeine mikrobielle Zusammensetzung

Die folgende Abbildung 21 zeigt eine Übersicht der ausgewählten Proben im Temperaturverlauf des Biogasreaktors F3 der Anlage Seth von 53 °C nach 59 °C. Es wurde darauf geachtet, dass von der Probennahme auf der Biogasanlage bis zum Einfrieren bei -20 °C höchstens 48 Stunden lagen. Pro Temperaturstufe im Testreaktor F3 wurden zwei Proben ausgewählt. Dazu kamen noch zwei Proben des Referenzreaktors, d. h. eine aus der 40. Versuchswoche und eine aus der 102. Versuchswoche sowie Proben der Rindergülle und des Endlagers.

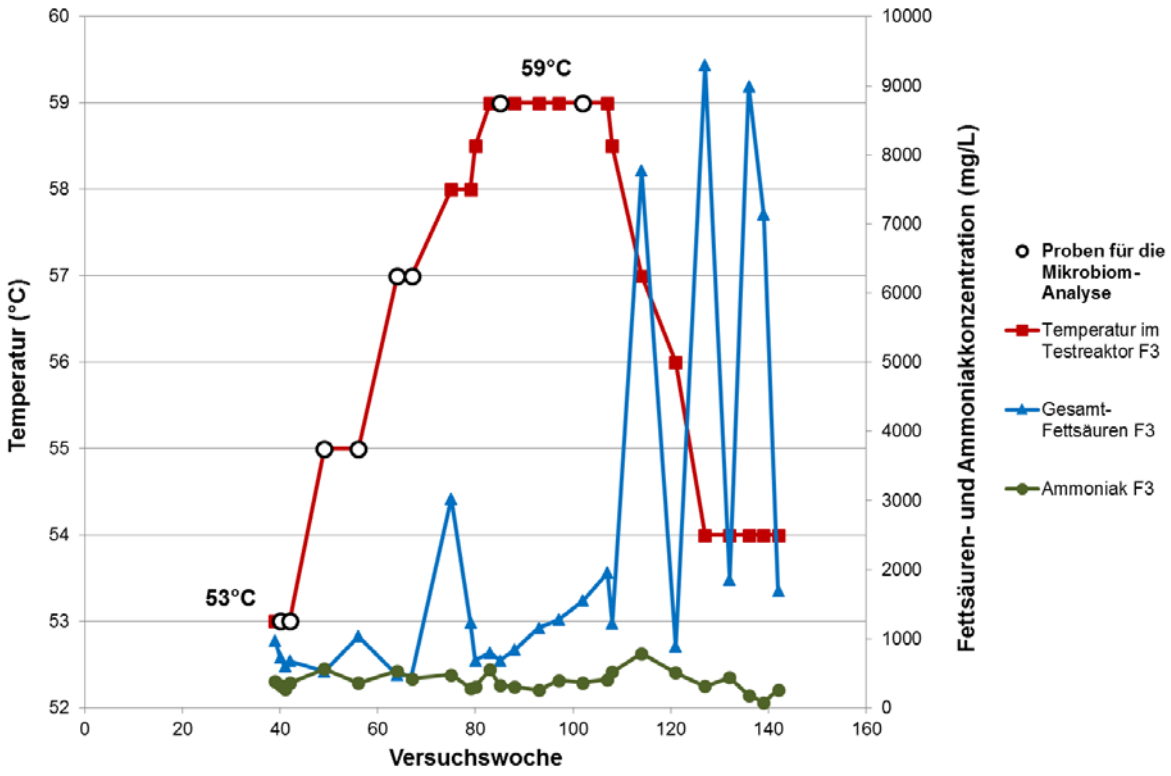


Abbildung 21: Diagramm zur Darstellung der Auswahl an Proben für die Mikrobiomanalysen (Gesamtheit der Mikroflora) zur Beantwortung der Frage nach der Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaft durch die unterschiedlich hohen Temperaturen im Testreaktor F3 (53 – 59 °C) in der Biogasanlage Seth. Proben ab der 107. Versuchswoche stehen unter dem Einfluss erhöhter Fettsäurewerte und sind zu diesem Thema im Kapitel II.1.6 erörtert worden.

II.1.5.5 Next Generation Sequencing-Ergebnisse der ersten Probenserie

Grundsätzlich konnten rund 4 % aller korrekten Sequenzpaare nach dem Filtern (Entfernung von Sequenzen mit niedriger Qualität, Chimären usw., siehe auch LGC: Bioinformatics service Nr. 4) bisher keinem Phylum zugeordnet werden (Tabelle 6). Es gibt demnach immer noch ein Feld an völlig unbekannten Mikroorganismen in Seth. Dieses Phänomen zeigt sich allerdings bei allen untersuchten mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasanlagen (Solli et al., 2014; Stolze et al., 2015; Maus et al., 2017). Je nach zugrunde liegender Abgrenzung zum „Unbekannten“ kann der Anteil an nicht zuordnungsbaren Sequenzen entsprechend größer sein. Die hier gewählte Abgrenzung war die Mindestzugehörigkeit zu einem Phylum. Wäre die Grenze dagegen bei der Mindestzugehörigkeit zu einer Gattung gesetzt worden, so hätten sich unbekannte Anteil von durchschnittlich 23 % ergeben. Nichtsdestotrotz sind die zur Verfügung stehenden Referenzdatenbanken (z. B. SILVA und RDP) in den letzten Jahren beständig erweitert worden. Auch Sequenzdaten von Biogasanlagen, wie die aus dem FNR geförderten Projekt BiogasCore (FNR 22006912), trugen dazu bei, mehr Licht in das mikrobielle Leben der „Black-Box“ Biogasreaktor zu erhalten und so die Menge an Unbekannten weiter zu dezimieren.

In den 12 Doppelproben wurden insgesamt über 26.000 verschiedene OTUs (operational taxonomic units) detektiert (bei 98 % Sequenzähnlichkeits-Abgrenzung zur nächsten OTU und mindestens 2 Sequenzen pro OTU). Diese taxonomischen Einheiten sind generell die Grundlage zur Strukturierung und phylogenetischen (stammesgeschichtlichen) Einordnung der Mikroorganismen anhand ihrer Sequenzdaten. Jede einzelne OTU steht zumeist für eine einzelne Mikroorganismenart, wobei eine Reihe von Autoren bereits ab einer Sequenzähnlichkeit von weniger als 99 % von einer neuen Art spricht. Pro Probe lag die taxonomische Vielfalt bei durchschnittlich 5700 unterschiedlichen Mikroorganismen für die Rindergülle, 3500 für die Gärfluide in den Reaktoren und 4500 für den Gärrest im Endlager. Daraus ergibt sich im Vergleich zu früheren Techniken eine gewaltige Zahl von unterschiedlichen Mikroorganismen in einer Biogasanlage (vgl. Kapitel II.1.5.3), die der besseren Handhabbarkeit auf 0,1 % Vorkommen in mindestens einer Probe bei den Archaeen und mindestens 0,3 % bei den Bakterien eingeengt wurden (siehe als zusätzliche Information Addendum III.1, Tabelle A1).

Tabelle 7: Statistik der Rohdaten, der gefilterten Sequenzen[2] und der taxonomisch einordbaren 16S rRNA-Gen Amplikon-Sequenzen der Biogasanlage in Seth für die erste Probenserie

Probenbezeichnung[1]		Kombinierte Sequenzpaare	Anzahl der Sequenzpaare nach dem Filtern[2]	OTUs[3]	Zuordnungsbare[4] Sequenzen
TR F3, 102. VW, 59°C	a	227.889	113.339	3.260	109.826
	b	433.697	230.106	3.130	225.941
TR F3, 85. VW, 59°C	a	220.433	110.869	2.350	108.399
	b	410.160	223.436	3.588	218.484
TR F3, 67. VW, 57°C	a	625.400	335.377	4.565	329.468
	b	347.590	193.173	2.384	190.768
TR F3, 64. VW, 57°C	a	261.183	142.679	2.342	140.319
	b	281.839	143.777	3.181	140.131
TR F3, 56. VW, 55°C	a	518.263	289.212	3.723	284.421
	b	579.267	313.318	4.291	307.238
TR F3, 49. VW, 55°C	a	341.388	176.646	3.525	172.929
	b	490.663	266.642	3.753	261.688
TR F3, 42. VW, 53°C	a	385.371	202.519	4.237	196.615
	b	598.445	320.653	4.362	314.653
TR F3, 40. VW, 53°C	a	255.897	118.276	3.182	114.394
	b	445.888	243.890	4.217	237.709
EL 42. VW, 24°C	a	549.554	334.332	4.539	327.018
	b	488.159	270.296	4.434	262.994
RG 42. VW	a	397.258	216.735	5.476	208.011
	b	517.275	302.394	5.847	292.827
RR F2, 102. VW, 51°C	a	364.755	185.530	4.089	179.845
	b	485.371	285.431	3.464	280.454
RR F2, 40. VW, 51°C	a	190.941	105.467	2.036	103.617
	b	444.279	233.640	4.459	227.655

1) RR: Referenzreaktor; TR: Testreaktor; RG: Rindergülle; EL: Endlager; a/b: Replikate

2) Das Filtern der Sequenzen erfolgte u. a. nach folgenden Kriterien: Sequenzen mit niedriger Qualität, Chimären und Duplikate wurden entfernt. Siehe auch LGC: Bioinformatics Service Nr. 4

3) OTUs bei 98 % Sequenzähnlichkeits-Abgrenzung zur nächsten OTU und mindestens 2 Sequenzen pro OTU; Anzahl der OTUs inklusive der insgesamt 1.960 OTUs von unbekannten Bakterien

4) Sequenzpaare, die zumindest einem Phylum zugeordnet werden konnten

Im Folgenden wird die Veränderung der Abundanz der am häufigsten vorkommenden Bakterien und Archaeen im Laufe des schrittweisen Temperaturanstiegs von 53 °C auf 59 °C dargestellt und beschrieben. Die Abbildungen 22 und 23 A bis D sowie Abbildung 24 zeigen das prozentuale Vorkommen der am häufigsten aufgetretenen bakteriellen Klassen und archaeellen Gattungen ab der Detektion von 0,1 % der gesamten verwendbaren Sequenzen. Dargestellt sind die mikrobiellen Zusammensetzungen der Rindergülle (42. Versuchswoche,

VW), des Testreaktors in den Temperaturstufen 53 °C (40/42. VW), 55 °C (49/56. VW), 57 °C (64/67. VW) und 59 °C (85/102. VW) sowie des Endlagers (42. VW). Nicht aufgezeigt ist hier das Diagramm des Referenzfermenters F2 (51 °C), das im Wesentlichen dem des substratgleichen Testreaktors bei 53 °C (Abbildung 23 A) entsprach (siehe Addendum, Abbildungen A1 und A2).

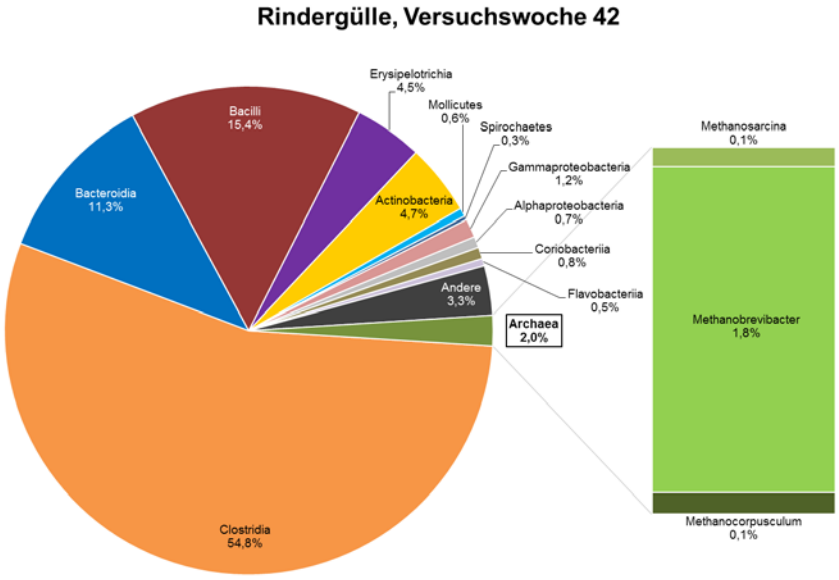
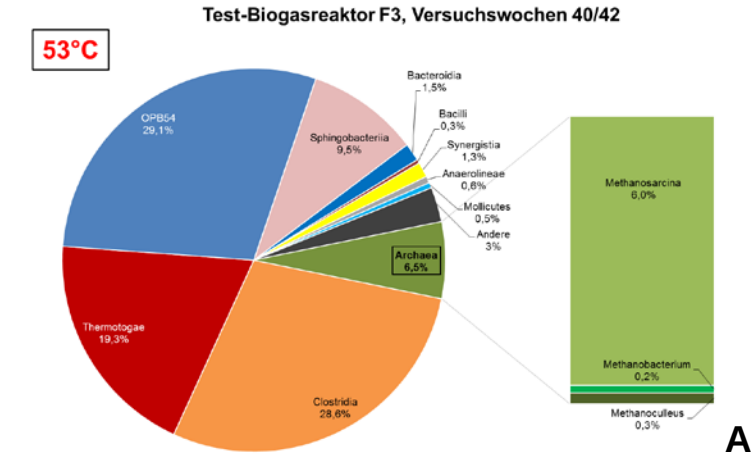
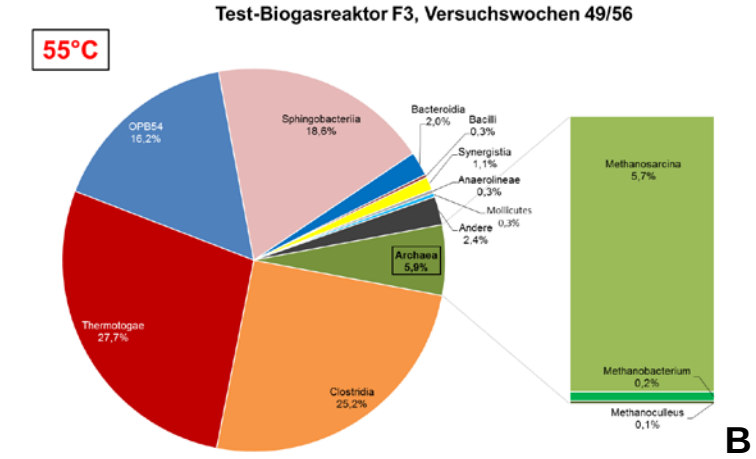


Abbildung 22: Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in der **Rindergülle** der Biogasanlage Seth in der 42. Versuchswoche. Dargestellt sind die Bakterien-Klassen (links) ab einer Menge von 0,3 % und Archaeen-Gattungen (rechts) ab einer Menge von 0,1 % in Bezug auf die Gesamtzahl an detektierten Mikroorganismen in der Doppel-Probe der Rindergülle. „Andere“ (3,3 %) bedeutet, dass diese Mikroorganismen verschiedener Gruppen zusammengefasst wurden, da sie unterhalb der gewählten Grenze von 0,3 % vorhanden waren.

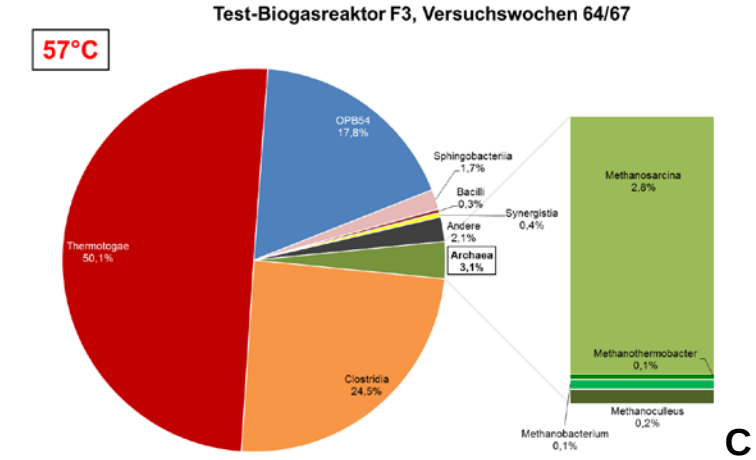
Bei der Analyse des mengenmäßig größten Inputs an Substrat mit 65 – 70 %, nämlich der Rindergülle, wird deutlich, dass die mikrobielle Zusammensetzung des Inputs, insbesondere die der Methanbildner, sich völlig von dem Gärfluid innerhalb der Biogasreaktoren unterschied, obwohl jede Stunde die Biogasanlage frische Gülle mit Substrat erhielt. Pro Tag und Reaktor bedeutete dies ein 1/12 Volumen (Dichte in etwa 1,0) pro 115 m³ Reaktor, also 9,5 Tonnen pro Reaktor (Abbildung 22 und 23). Demnach muss die „Turnover-Rate“ höher als bisher angenommen sein, um ein „Washout“ zu verhindern, da man bisher bei Methanbildnern von 3 – 7 Tagen Verdopplungszeit ausging. Bei den verschiedenen Klassen an Bakterien fällt besonders auf, dass ausschließlich bei der Rindergülle die Klasse der *Bacilli* auftritt. Grampositive *Bacilli* sind durch ihre Exoenzyme für den Abbau einer Vielzahl von Polymeren bekannt. Da einige Gattungen dieser Bakterien-Klasse aber potentielle Pathogene beinhalten können (z. B. *Bacillus anthracis*), wäre die Reduktion dieser Organismen durch die thermophile anaerobe Vergärung aus hygienischer Sicht letztlich zu begrüßen. Es ist jedoch eine selektive Reduktion nicht zu erwarten. Noch stärker als die *Bacilli* war jedoch die Klasse der ebenfalls grampositiven *Clostridia* vertreten. Sie beinhaltet zahlreiche Cellulose-Abbauer, die für die Verdauung der Wiederkäuer essentiell sind (Varel & Dehority, 1989). Auch diese Bakterien-Gruppe enthält einige pathogene Vertreter. Sie ist ebenfalls bei der menschlichen Verdauung im Enddarm dominant vertreten (nebst den *Bacteriodetes*).



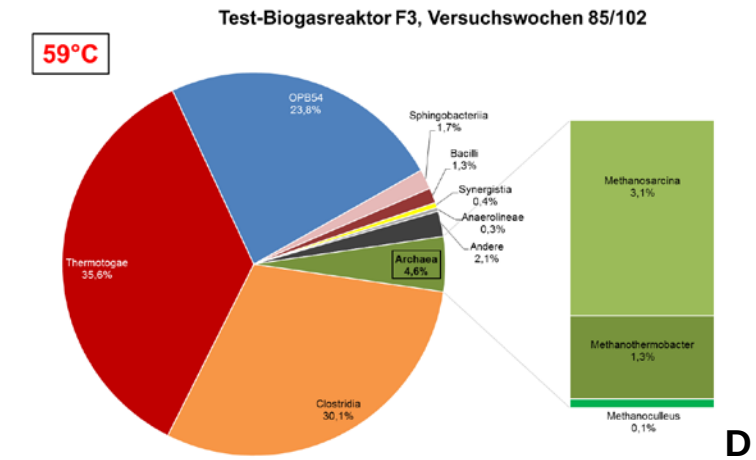
A



B



C



D

Auf Seiten der Methanogenen, (Farbe Grün) die mit 2,0 % der Gesamtpopulation in der Rindergülle detektiert wurden, nahm mengenmäßig die Gattung *Methanobrevibacter* mit 1,8 % (90 % der Archaeen-Population in der Rindergülle) den größten Raum ein. Da nur selten vereinzelt andere Archaeen (*Thaumarchaeota*) gefunden wurden, ist die Anzahl an Archaeen mit der an Methanogenen als identisch anzusehen.

In der thermophilen Biogasanlage spielt sie allerdings mit weniger als 0,1 % der Gesamtpopulation nur eine sehr untergeordnete Rolle. Sie ist damit im Vergleich zur Rindergülle (Abbildung 22) auf 5 % der Archaeen-Population abgesunken. Im Rumen von Rindern und anderen Wiederkäuern ist sie allerdings die am häufigsten detektierte Methan produzierende Gattung (King et al., 2011; Whitford et al., 2001; Wright et al., 2008).

Abbildungen 23 A – D: Darstellung der mikrobiellen Populations-struktur im Verlauf der Anhebung der Temperatur im **Biogasreaktor F3** der Hofanlage Seth während der Hauptversuchsphase von 53 °C nach 59 °C. Die Durchschnittswerte der relativen Häufigkeit detektierter Organismen sind aus je zwei Doppelbestimmungen von unter-schiedlichen Versuchswochen mit gleicher Temperatur berechnet worden. In den Kreisdiagrammen verzeichnet sind Bakterien-Klassen mit einer Abundanz von mindestens 0,3 % bzw. Archaeen-Gattungen mit mindestens 0,1 %.

Betrachtet man die Diagramme 23 A - D des nur in der Temperatur unterschiedlichen Testreaktors F3, so fallen farblich drei große Gruppen auf. Zum einen die *Clostridia* (orange) und die Gruppe OPB54 (blau), die aber zu dem altbekannten Phylum Firmicutes gehören und aufgrund von molekularbiologischer Daten als eigene Bakterien-Klasse eingestuft wurden. Dieses Bild geht konform mit molekularen Daten anderer Biogasfermenter. Beispielhaft sei auf die Literatur Schlüter et al., 2008; Krakat et al., 2010; Argyropoulos et al., 2013; Sundberg et al., 2013; Demirel, 2014; Röske et al., 2014; Theuerl et al., 2015 und Maus et al., 2017 hingewiesen.

Eine große Besonderheit tut sich jedoch bei dem großen Block der *Thermotogae*, der fast ausschließlich (zu 98%) aus der Spezies *Defluviitoga tunisiensis* bestand. Ähnlich hohe Vorkommen der Klasse *Thermotogae* fand auch Röske et al. 2014, allerdings bei der thermophilen Vergärung von Schlempe aus der Ethanolproduktion. Das dominante Vorkommen einer einzelnen Spezies im zweistelligen Prozentbereich ist jedoch beispielslos bislang im Biogasbereich. Auf *D. tunisiensis* wird nochmals näher eingegangen, siehe Abbildungen 28 sowie 29 A und B.

In den Diagrammen 23 A - D ist im Biogasreaktor F3 deutlich die Dominanz der methanogenen Gattung *Methanosarcina* gegenüber den anderen nur wenig vorkommenden Gattungen *Methanobacterium*, *Methanoculleus* und ab 57 °C auch von *Methanothermobacter* zu erkennen. Für das überwiegende Vorkommen der Gattung *Methanosarcina* spricht, dass diese Organismengruppe zum einen ein breitgefächertes Substratspektrum besitzt (Boone & Mah, 2001; De Vrieze et al., 2012; Ho et al., 2013; Illmer et al., 2014). So können die meisten Methanosarcinen nicht nur Acetat und Methanol verwerten, sondern auch H_2/CO_2 und verschiedene Methylamine. Auch gegen erhöhte Säurewerte sind sie relativ stabil (Lins et al., 2014, Langer et al., 2015). Des Weiteren können sie höhere Ammoniak-Konzentrationen tolerieren als zum Beispiel Methanogene der Gattung *Methanosaeta* (bis zu 4,1 g Ammoniak-N pro Liter, Karakashev et al., 2005; Klang et al., 2015). Daher sind Methanosarcinen besonders gut an schnell wechselnde Substrate angepasst und können auch mit erhöhten Ammoniakwerten zurechtkommen. Hohe Ammoniak-Konzentrationen waren in der Biogasanlage Seth mit Gülle als Hauptsubstrat vorhanden. Damit wird auch das dominierende Vorkommen von Methanosarcinen gegenüber anderen Methanogenen in Gülleanlagen begründet (Karakashev et al., 2005).

Bei den detektierten Methanogenen der Gattung *Methanosarcina* handelt es sich im Einzelnen um *M. thermophila* und in geringer Menge auch um *M. mazei*. Zellen der Gattung Methanosarcina liegen typischer Weise in Aggregaten vor. Sowohl *M. mazei* als auch andere Methanosarcinen disaggregieren in Reinkultur jedoch unter verschiedenen Bedingungen zu Einzelzellen (Harris, 1987; de Macario et al., 1993). Diese einzelnen Zellen haben lediglich eine Größe von bis zu 1,2 µm im Durchmesser (Robinson, 1986). Ralph Robinson hat weiter beobachtet, dass durch die Bildung kleinster Kolonien von etwa 3 – 5 µm Durchmesser sich die Größe der einzelnen in der Kolonie befindlichen Zellen auf 0,6 – 1,0 µm reduziert. Hingegen werden die Zellen der Methanosarcinen mit zunehmender Größe der Kolonien ebenfalls größer (1,5 µm). Bei der in Seth dominanten Spezies *M. thermophila* trat offenbar die Dissaggregation bei erhöhten Salzkonzentrationen ebenfalls auf, wie dies Sowers und Gunsalus (1988) bei Reinkulturen beobachteten. Sie lagen also als Einzelkokken vor, was durch die verwendete digitale Bildanalyse von fluoreszenzmikroskopischen Bildern (QMF-Technik) verifiziert wurde.

Anders als die Aggregate können die einzelnen Zellen schwächer durch Licht der Wellenlänge 420 nm angeregt werden (Harris, 1987). Dies bestätigen mikroskopische Hinweise aus anderen Versuchsreihen des Labors. Kokkoide Methanosarcinen wurden daher vermutlich bisher in Biogasanlagen übersehen, weil eine parallele mikroskopische Analyse meist nie

erfolgte. In unserem Labor fanden diese kombinierten Methoden mittels QMF-Technik regelmäßig statt (Kim et al., 2014; Maus et al., 2017). Dabei können kokkoide Methanosarcinen leicht mit kokkoiden Methanomicrobien verwechselt werden. Nur an der Größe und in gewissen Maße an der Fluoreszenzintensität sind sie morphologisch unterscheidbar. Methanomicrobien sind in der Regel > 2 µm groß und kokkoide Methanosarcinen in der Regel kaum größer als 1,0 µm.

Die Beobachtung einzel-kokkoider Methanosarcinen in einer Biogasanlage ist mit dieser Studie die erste dieser Art.

Neben Methanosarcinen trat ab einer Temperatur von 57 °C zunehmend die Gattung *Methanothermobacter* auf. Physiologische Untersuchungen dieser methanogenen Gattung beschreiben ein Temperaturoptimum von 60 – 65 °C (Boone, 2001), was die fast vollständige Abwesenheit dieser Gattung bei niedrigeren Temperaturen erklärt. So fehlt diese methanogene Gruppe erwartungsgemäß in der Rindergülle und im Endlager (Abbildungen 22 und 24). Es ist bemerkenswert, dass diese Gruppe dennoch aus der Rindergülle gekommen sein muss.

Wenn man die Population der Archaeen (hier identisch mit den Methanogenen, da nennenswert keine weiteren Archaeen nachweisbar waren) betrachtet, so fällt in den Abbildungen 22 – 24 auf, dass der Anteil der Methanbildner in der Rindergülle mit 2,0 % auf 3,1 – 6,5 % in den Biogasreaktoren anstieg, um im Endlager sensationelle 32,0 % einzunehmen. Was könnte der Grund für diese ungewöhnlich extreme Anreicherung sein? Es wird als sehr wahrscheinlich gehalten, dass die thermophilen Biogasreaktoren mit einer HRT von nur 11,5 Tagen sich kurz vor einem „Washout“ befanden, so dass sie sich im Endlager in Ruhe anreichern konnten, trotz Temperaturen von etwa 16 – 24 °C. Es wird aufgrund der Befunde daher dringend eine Rezirkulation des Endlagers in die Biogasreaktoren mit dem Substratmix empfohlen, ca. 5 %, um die Biogasreaktoren zu stabilisieren.

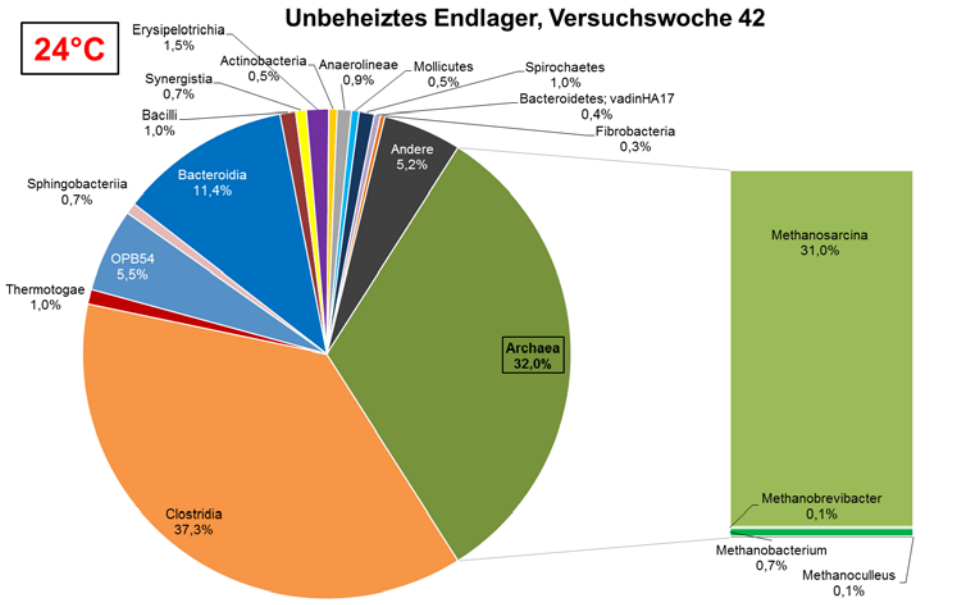


Abbildung 24: Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft im **unbeheizten Endlager** der Biogasanlage Seth in der 42. Versuchswoche (Temperatur ca. 24 °C). Dargestellt sind die Bakterien-Klassen (links) ab einer Menge von 0,3 % und Archaeen-Gattungen (rechts) ab einer Menge von 0,1 % in Bezug auf die Gesamtzahl an detektierten Mikroorganismen in der Doppel-Probe des Endlagers.

II.1.6 Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft bei erhöhten Fettsäurewerten

Die Akkumulation von Fettsäuren (VFA: Volatile Fatty Acids) in einem Fermentationsprozess führt im Allgemeinen zu einer Absenkung des pH-Wertes. Der Grad der Veränderung hängt allerdings in erster Linie von der Pufferkapazität des eingesetzten Substrates ab, die im Fall der Biogasanlage Seth durch die Rindergülle als Hauptsubstrat sehr hoch war (6890 – 14.170 mg $CaCO_3$/L). Gülle hat einen Überschuss an Alkalinität, der den pH-Wert bei einer Fettsäure-Akkumulation stabilisiert. Mehr als die flüchtigen (kurzen) Fettsäuren (VFA) hemmen langkettige Fettsäuren in hohen Konzentrationen die Methanogenese (Chen et al., 2008), die jedoch hier nicht zu erwarten waren und worauf die angewendete GC-Analytik keine Hinweise ergab. Die Hemmung von VFA ist eindeutig mit der nicht dissoziierten und daher membrangängigen Form der Säuren verbunden. Daher ist die Hemmwirkung bei Systemen mit niedrigem pH-Wert höher. Aus diesem Grund brach die hohe Produktionsrate der Anlage Seth auch bei sehr hohen Fettsäurewerten von über 8000 mg/L nicht zusammen. Der pH-Wert verringerte sich kurz nach den VFA-Spitzen auf 7,1 in der 139. Versuchswoche, stabilisierte sich jedoch kurz danach auf die sonst gemessenen Werte von 7,7 – 7,9.

Die umfangreichen Daten mit den darin enthaltenen Informationen zu dem Einfluss der Temperatur auf die mikrobielle Lebensgemeinschaft legten die Grundlage zur Auswahl der Proben für die zweite Probenserie (75. – 142. VW). Anhand dieser Proben sollten nebst dem Temperatureinfluss mögliche Einwirkungen erhöhter Fettsäurewerte auf die Zusammensetzung der Mikroben inklusive von pathogenen Vertretern untersucht werden, um eine besser fundierte Aussage über das Vorkommen einzelner Bakteriengruppen treffen zu können (siehe als zusätzliche Information Addendum Tabelle A2). Hohe Fettsäurewerte sind bei Spurenelement-Mangelzuständen sowie Überladungen und Vergiftungen durch Toxine (z. B. Senföl, Schimmelpilztoxine) allgemein bekannt. Eine bildliche Darstellung der gewählten Proben zeigt Abbildung 25.

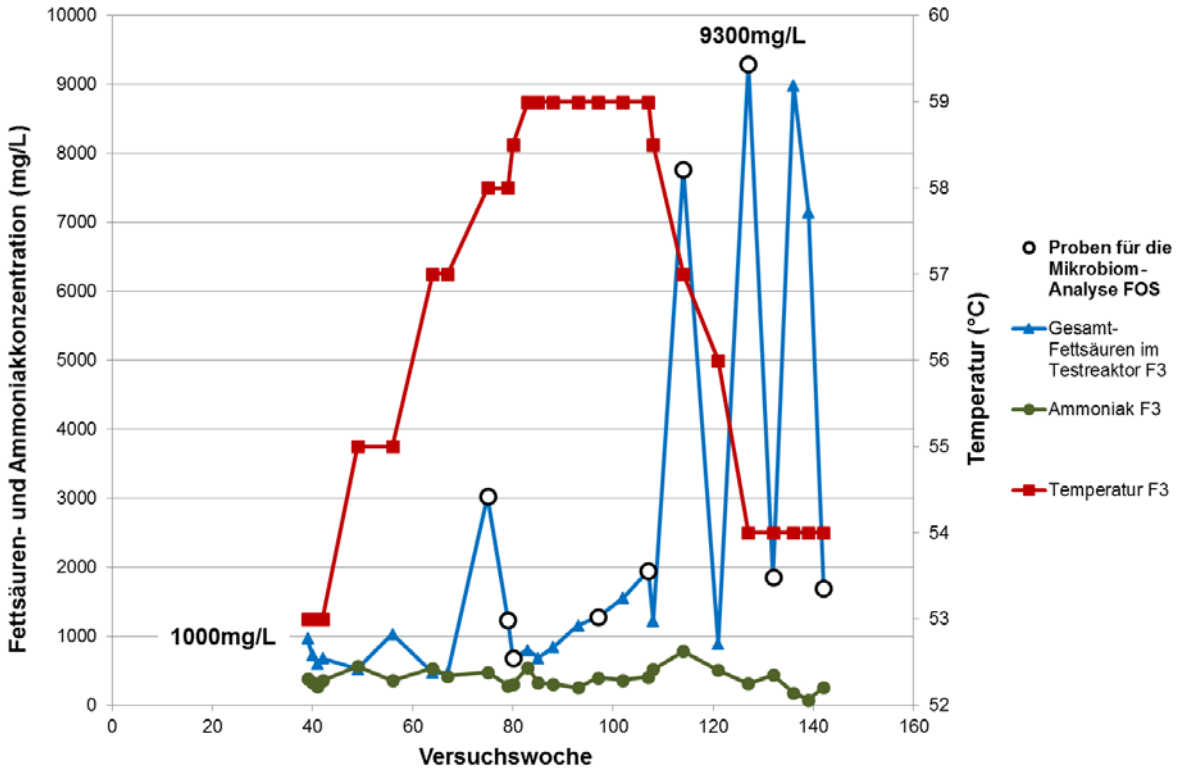


Abbildung 25: Diagramm zur Darstellung der Auswahl an Proben für die Mikrobiomanalysen (Gesamtheit der Mikroflora) zur Beantwortung der Frage nach der Beeinflussung der mikrobiellen Gemeinschaft durch unterschiedlich hohe Fettsäurewerte (VFA) im Testreaktor F3 (683 – 9296 mg/L) in der Biogasanlage Seth (vergl. Abbildung 21). Zusätzlich wurden noch relevante Proben aus dem Referenzreaktor F2 (863 – 8466 mg/L) ausgewählt (grafisch hier nicht dargestellt, siehe Tabelle 8). Die zweite Probenserie bezog sich auf die 75. – 142. VW.

Es wurden insgesamt 12 Proben aus dem Referenzreaktor F2 und dem Testreaktor F3 der Biogasanlage Seth mit unterschiedlich hohen VFA-Werten (VFA = flüchtige organische Säuren) ausgewählt. Diese reichen von 683 mg/L bis zu 9296 mg/L (Tabelle 8). Dabei wurde darauf geachtet, dass sowohl Proben mit Fettsäurewerten oberhalb von 2000 mg/L eine durchschnittliche Temperatur von 56 °C hatten, wie auch Fettsäurewerte unterhalb von 2000 mg/L. Als Ursache für den extremen Fettsäureanstieg konnte ein schleichender Nickelmangel verantwortlich gemacht werden. Dieser wurde nicht durch den Temperaturanstieg im Testreaktor induziert, da die hohen Fettsäurespiegel in allen drei Reaktoren auftraten. Die Fettsäurewerte sanken dauerhaft nach Nickelzugabe in der 139. Versuchswoche (Abbildung 13).

Bei dieser zweiten Probenserie standen nicht die Temperaturunterschiede in den Großreaktoren im Vordergrund. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt (insgesamt 24 Proben). Die durch RNA- und Proteinverdau mit anschließender Ethanolfällung gereinigten DNA-Proben wurden wie die erste Probenserie vermessen.

Das bereits bei der ersten Probenserie verwendete Primerpaar zur Erstellung der 16S rRNA-Gen-Amplifikate wurde aufgrund der guten Ergebnisse sowohl bei der Detektion der bakteriellen als auch der archaeellen Population für die zweite Serie eingesetzt. Es wurden die 24 Proben (2. Serie) zur Genomanalyse von der Firma LGC Genomics GmbH sequenziert.

Tabelle 8: Probenübersicht mit entsprechenden Fettsäurewerten und Temperaturunterschieden der zweiten Probenserie; rot markiert sind VFA-Werte oberhalb von 2000 mg/L. Angegeben sind auch die gemessenen Ammonium-Werte sowie die berechneten Ammoniak-Werte

Versuchswoche	Temperatur im Referenz-Biogasreaktor F2	Temperatur im Test-Biogasreaktor F3	Ammonium-Gehalt (mg/L)	Ammoniak-Gehalt (mg/L)	VFA (mg/L)*
75	53		2220	468	863
127	53		2242	195	8466
142	53		1553	258	1257
75		58	2430	476	3028
79		58	1815	283	1233
80		58,5	1718	308	683
97		59	1814	400	1277
107		59	1644	410	1952
114		57	3321	785	7772
127		54	2238	309	9296
132		54	2035	435	1854
142		54	1515	259	1693

* VFA = Volatile Fatty Acids; der Anteil an Alkoholen (i. d. R. Ethanol) bewegte sich immer unter 5 %, daher nicht separat angegeben.

II.1.6.1 Next Generation Sequencing-Ergebnisse der zweiten Probenserie bei erhöhten Fettsäurewerten

Die Auswertung der NGS-Ergebnisse der zweiten Probenserie ergab tatsächlich, dass einige taxonomische Organismen-Gruppen von erhöhten Fettsäurewerten oberhalb von 2000 mg/L beeinflusst wurden. Die Tabelle 9 zeigt eine Liste der 20 am häufigsten detektierten Klassen an Mikroorganismen und deren relative Zunahme oder Abnahme in Prozent, sowohl bei Fettsäurewerten unterhalb als auch oberhalb von 2000 mg/L.

Tabelle 9: Ergebnisdarstellung der unterschiedlichen relativen Vorkommen einzelner detektierter Mikroorganismen-Klassen in Abhängigkeit von Fettsäurewerten; Unterschiede von mehr als 0,5 % sind farblich markiert; Methanogene sind in fett hervorgehoben und die Veränderungen innerhalb der Methanogenen in Klammern angefügt

20 häufigsten Mikroorganismen-Klassen	< 2 g/L VFA (%)[1]	> 2 g/L VFA (%)[2]	Unterschied (%)
Thermotogae	37,6	25,2	**- 12,4**
Clostridia	30,2	40,0	**+ 9,8**
Firmicutes; OPB54	13,8	19,1	**+ 5,3**
Sphingobacteriia	3,7	2,5	**- 1,2**
Methanomicrobia (inkl. *Methanosarcina*)	**2,5 (73,9)[3]**	**2,2 (70,2)**	**- 0,3 (- 3,7)**
Bacilli	1,8	4,0	**+ 2,2**
Gammaproteobacteria	2,5	0,1	**- 2,4**
Methanobacteria	**0,9 (25,8)[3]**	**0,9 (29,4)**	**+ 0,1 (+ 3,6)**
Synergistia	0,8	1,0	+ 0,2
Bacteroidia	0,8	0,3	**- 0,5**
Firmicutes; unclassified	0,5	0,4	- 0,1
Actinobacteria	0,4	0,5	+ 0,2
Mollicutes	0,4	0,3	- 0,1
Erysipelotrichia	0,2	0,2	- 0,1
Alphaproteobacteria	0,2	0,1	- 0,1
Candidate_division_OP9; unclassified	0,1	0,2	+ 0,1
Anaerolineae	0,1	0,0	- 0,1
Betaproteobacteria	0,1	0,0	- 0,1
Bacteroidetes; unclassified	0,1	0,0	- 0,1
Flavobacteriia	0,1	0,0	- 0,1

1) Mittelwerte der einzelnen prozentualen Anteile der taxonomischen Klassen. Diese Mittelwerte wurden aus den folgenden acht ausgesuchten Proben (inkl. Doppelbestimmungen) mit Fettsäurewerten **< 2 g/L** berechnet: F2 – 75. VW; F2 – 142. VW; F3 – 79. VW; F3 – 80. VW; F3 – 97. VW; F3 – 107. VW; F3 – 132. VW und F3 – 142. VW

2) Mittelwerte der einzelnen prozentualen Anteile der taxonomischen Klassen. Diese Mittelwerte wurden aus den folgenden vier ausgesuchten Proben (inkl. Doppelbestimmungen) mit Fettsäurewerten **> 2 g/L** berechnet: F2, 127. VW; F3, 75. VW; F3, 114. VW und F3, 127. VW

3) Prozentsatz an der methanogenen Population

Signifikant wurde die sehr dominant vertretene Klasse der *Thermotogae* durch die hohen Fettsäurewerte beeinflusst. Gegenüber Proben, in denen die Fettsäuren unterhalb des hier gewählten Schwellenwertes von 2000 mg/L lagen, verringerte sich das Vorkommen dieser Klasse um 12,4 % (bezogen auf die zuordnungsbaren Sequenzen), wenn die Fettsäuren den genannten Schwellenwert überstiegen. Die Klasse *Thermotogae* mit der am stärksten vertretenden Gattung *Defluviitoga* und darin die Spezies *D. tunisiensis* (siehe auch Kapitel II.1.8) ist eine relativ neue Gattung und ist bekannt für ihr äußerst vielfältiges Substratspektrum. Aus dem Genomdaten von *Defluviitoga tunisiensis* geht hervor, dass dieses Bakterium in der Lage ist, zahlreiche Mono- und Polysaccharide zu verwerten, wie z. B. Arabinose, Galaktose, Maltose, Mannose, Fruktose, Raffinose, Cellulose, Cellobiose, Chitin, Xylose, Xylan und Laktose (Maus et al., 2015; Maus et al., 2016). Der starke Rückgang dieses vielseitigen Organismus birgt die Gefahr, dass bei erhöhtem VFA-Level der Substratabbau eingeschränkt sein könnte. Ebenfalls negativ beeinflusst wurden die *Gammaproteobacteria* und die Bakterienklasse *Sphingobacteriia*. Nur einen leichten Rückgang zeigten die *Bacteroidia*. Positiv wirkten sich erhöhte Fettsäurewerte dagegen auf Sporenbildner aus, die diese besser als Nichtsporenbildner tolerieren können, so auf die *Clostridia* (+ 9,8 %), die Gruppe *OPB54* (+ 5,3 %, gehört zum Phylum *Firmicutes*) und die *Bacilli* (+ 2,2 %). So ist es auch aus hygienischer Sicht günstig, die Fettsäurewerte unterhalb des Schwellenwertes von 2000 mg/L zu halten. Im Gegensatz zu den bakteriellen Klassen wurden die Archaeen in ihrem Vorkommen nicht durch die Fettsäurewerte beeinflusst. Zu diesem Resultat kam auch Franke-Whittle und ihre Kollegen, die den Einfluss erhöhter Fettsäurewerte auf mesophile und thermophile Reaktoren untersuchte (Franke-Whittle et al., 2014).

In Hinblick auf die Methanogenen war ein leichter Rückgang der Population an *Methanomicrobia* um 0,3 % bei erhöhten Fettsäurespiegeln > 2000 mg/L zu sehen. Dagegen war ein geringerer Anstieg der Zellzahlen von 0,1 % bei den *Methanobacteria* zu beobachten (Tabelle 9). Betrachtet man die prozentualen Anteile der Methanbildner unter sich, dann wird deutlich, dass die Methanobacterien die Methanomicrobien leicht zurückdrängten (*Methanobacteria*: + 3,6 % und *Methanomicrobia*: - 3,7 %).

II.1.6.2 Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft bei erhöhten Ammoniakwerten (dritte Probenserie)

Für die dritte und auch die vierte Probenserie wurde wie schon in den beiden vorherigen das gleiche Primerpaar zur Erstellung der 16S rRNA-Gen-Amplifikate verwendet. Im Gegensatz zur ersten und zweiten Probenserie wurden die Sequenzen von der Firma GATC Biotech AG analysiert (siehe als zusätzliche Information Addendum Tabelle A3). Es handelte sich insgesamt um 14 Doppelproben, anhand deren der Einfluss von erhöhten Ammoniak-Konzentrationen ermittelt werden sollte (dritte Probenserie). Es befanden sich unter den 28 Proben auch welche zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Prozesstemperaturen, die in der Wiederholungsphase mit den Biogas-Großreaktoren genommen worden sind (vierte Probenserie).

Eine Übersicht zu den verwendeten Proben zur Untersuchung der mikrobiellen Veränderungen unter erhöhten Ammoniak-Gehalten gibt die Tabelle 10. Als erhöhte Ammoniakwerte, die in Abhängigkeit von analytisch gemessenen Ammoniumwerten, den zugehörigen pH-Werten und der jeweiligen Reaktortemperatur berechnet worden sind, galten Konzentrationen oberhalb von 300 mg/L. Die NGS-Proben der dritten Probenserie wurden so gewählt, dass kein Einfluss von zu hohen Fettsäurewerten bestand, weshalb die VFA-

Konzentrationen aller Proben dieser Serie unter 2500 mg/L lagen. Im Durchschnitt betrugen die Prozesstemperaturen sowohl der Proben mit Ammoniak-Gehalten > 300 mg/L als auch mit < 300 mg/L 54,8 °C, siehe Tabelle 10.

Tabelle 10: Probenübersicht mit entsprechenden berechneten Ammoniakwerten und Temperaturunterschieden der dritten Probenserie; rot markiert sind NH_3-Werte oberhalb von 300 mg/L; die Fettsäurewerte der ausgesuchten Proben lagen alle unter 2500 mg/L

Versuchswoche	Biogasreaktor	Temperatur (°C)	VFA (mg/L)	NH_3 (mg/L)
64	F3	57	476	534
102	F2	51	1114	183
121	F2	53	1636	323
121	F3	56	884	507
156	F1	53	343	335
156	F2	57	1137	257
159	F2	58,5	2459	286
167	F1	53	588	267

Im Gegensatz zum Vergleich der mikrobiellen Zusammensetzung bei unterschiedlichen Konzentrationen an Fettsäuren (zweite Probenserie) war bei der Abhängigkeit des Vorkommens dominanter Organismen-Klassen bei Ammoniak-Konzentrationen oberhalb eines gewählten Grenzwertes von 300 mg/L kaum eine Veränderung zu sehen (Tabelle 11). Allerdings weisen beide Klassen der Archaeen einen Rückgang auf. Die Klasse der *Methanomicrobia* wurde um ca. ein Viertel von 2,8 % auf 2,0 % reduziert und das an sich schon geringe Vorkommen der Klasse der *Methanobacteria* um die Hälfte von 0,6 % auf 0,3 %. Betrachtet man die prozentualen Anteile der Methanogenen jedoch untereinander, so nahm die Klasse der Methanomicrobien (einschl. der Gattung *Methanosarcina*) um 6,5 % zu und verdrängten zum gleichen Teil die Methanobacterien (- 6,7 %).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Veränderungen der Bakterienpopulation bei erhöhten Fettsäurewerten > 2000 mg/L war bei erhöhten Ammoniakwerten > 300 mg/L kein Rückgang, der Klasse der *Thermotogae* zu beobachten. Ähnliches gilt auch für die Klasse der *Clostridia*. Dagegen nahmen die prozentualen Vorkommen der Klasse der *Bacteroidia* leicht ab und die der *Bacilli* dagegen um knapp 1 % zu (Tabelle 11; siehe auch im Vergleich Tabelle 9). Sowohl die Clostridien als auch die Bacillen gehören zu den Sporenbildnern, die durch ihre natürlichen Resistenzen gegen widrige Umwelteinflüsse höhere Ammoniak-Gehalte tolerieren können.

Abschließend ist zu sagen, dass die aus Ammonium-Gehalten, pH-Werten und jeweiliger Temperatur berechneten Ammoniak-Konzentrationen keinen nennenswerten Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung in den Biogasreaktoren ausübten. Sowohl unterhalb als auch oberhalb von 300 mg/L war die Populationsstruktur in etwa gleich und auch gleich produktiv (siehe Kapitel II.1.3.4).

Tabelle 11: Ergebnisdarstellung der unterschiedlichen relativen Vorkommen einzelner detektierter Mikroorganismen-Klassen in Abhängigkeit von berechneten Ammoniakwerten; Unterschiede von mehr als 0,3 % sind farblich markiert

10 häufigsten Mikroorganismen-Klassen	< 0,3 g/L NH_3 (%)[1]	> 0,3 g/L NH_3 (%)[2]	Unterschied (%)
Thermotogae	46,4	47,4	**+ 0,9**
Clostridia	44,0	44,5	**+ 0,5**
Bacteroidia	3,8	2,7	**- 1,2**
Methanomicrobia (inkl. *Methanosarcina*)	**2,8 (82,1)[3]**	**2,0 (88,5)**	**- 0,7 (+ 6,5)**
Bacilli	1,0	1,7	**+ 0,7**
Actinobacteria	0,5	0,7	**+ 0,2**
Methanobacteria	**0,6 (17,7)[3]**	**0,3 (11,0)**	**- 0,4 (- 6,7)**
Erysipelotrichia	0,4	0,3	- 0,1
Tissierellia	0,2	0,1	- 0,1
Alphaproteobacteria	0,1	0,1	+ 0,0

1) Mittelwerte der einzelnen prozentualen Anteile der taxonomischen Klassen. Diese Mittelwerte wurden aus den folgenden vier ausgesuchten Proben (inkl. Doppelbestimmungen) mit Ammoniakgehalten **< 0,3 g/L** berechnet: F2 – 102. VW; F2 – 156. VW; F2 – 159. VW und F1 – 167. VW

2) Mittelwerte der einzelnen prozentualen Anteile der taxonomischen Klassen. Diese Mittelwerte wurden aus den folgenden vier ausgesuchten Proben (inkl. Doppelbestimmungen) mit Ammoniakgehalten **> 0,3 g/L** berechnet: F3 – 64. VW; F2 – 121. VW; F3 – 121. VW und F1 – 156. VW

3) Prozentsatz an der methanogenen Population

II.1.6.3 Next Generation Sequencing-Ergebnisse zur Wiederholungsphase der Temperaturabhängigkeit der mikrobiellen Lebensgemeinschaft

Mit Hilfe der vierten Probenserie (102 – 167. VW), die im Wesentlichen aus den Proben der Wiederholungsphase bestand, konnte eine Bestätigung der molekularen Ergebnisse aus der Hauptversuchsphase gewonnen werden. Mit schrittweise steigender Prozesstemperatur im Testreaktor (dieses Mal F2) von anfangs 53 °C auf 59 °C veränderte sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Richtung der bei erhöht thermophilen Bedingungen von > 55 °C überaus dominierenden Bakterien-Klasse *Thermotogae* (Abbildung 26). Die Prozentanteile der taxonomischen Klassen der *Clostridia*, *Bacteroidia* und *Bacilli* wurden dagegen durch die *Thermotogae* entsprechend verringert, weil die Gesamtbakterienzahl gleichblieb. Anscheinend hatte aber auch die Thermophilie ganz allgemein auf die Dominanz der *Thermotogae* einen Einfluss, denn auch im Referenzreaktor F1 bei „nur“ 53 °C kamen die Bakterien dieser Klasse in der 156. Versuchswoche mit ca. 50 % vor.

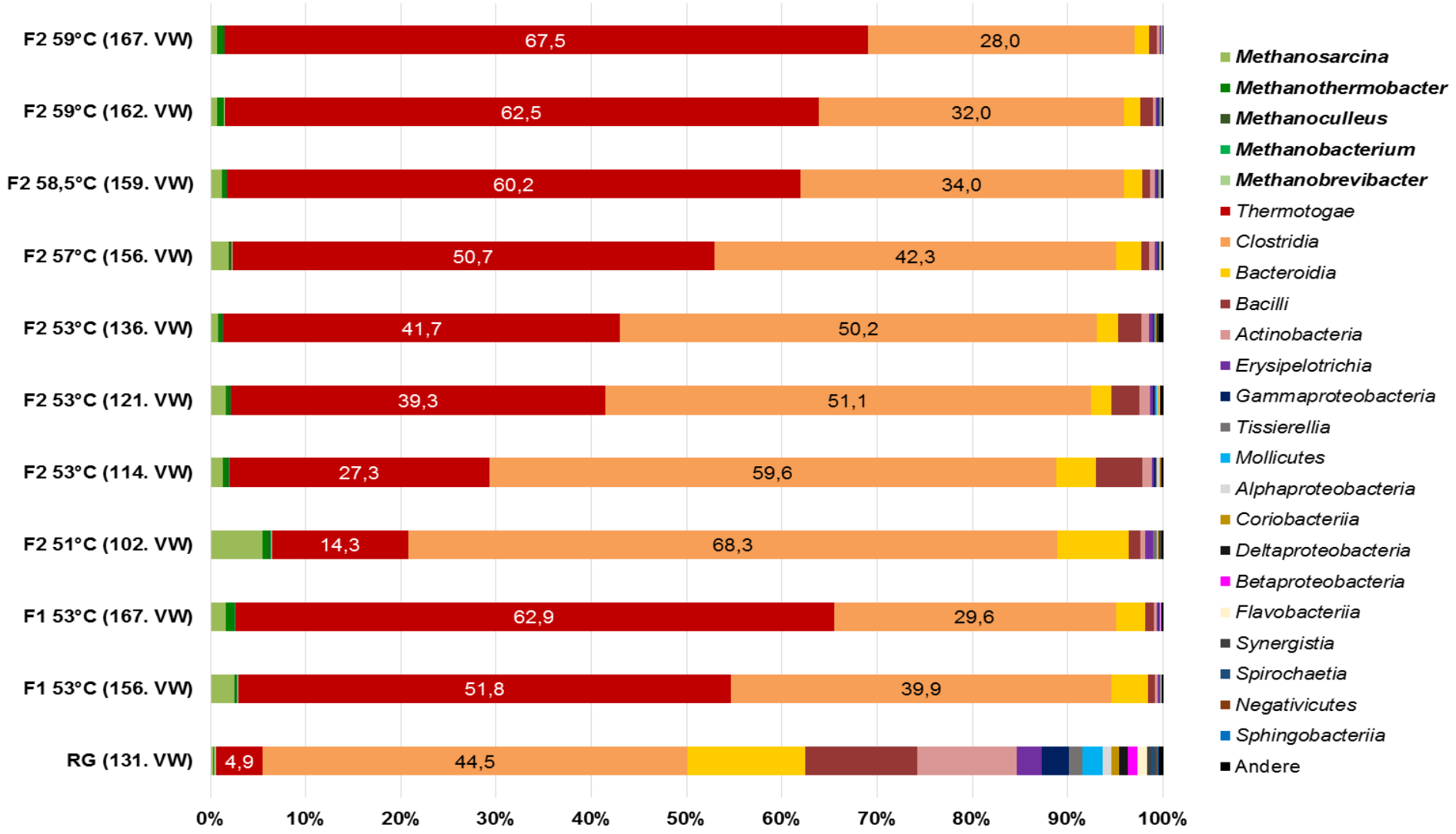


Abbildung 26: Balkendiagramm der prozentualen Vorkommen von Archaeen-Gattungen (in fett) und Bakterien-Klassen der Reaktoren F1 (Referenz) und F2 (Test) ab einer relativen Abundanz von 0,1 % bezogen auf die Gesamtzahl an detektierten Sequenzen pro Probe. RG = Rindergülle. Die zu den *Firmicutes* gehörende Gruppe OPB54 (ein noch nicht näher beschriebenes bzw. identifiziertes Taxon) aus den Abbildungen 22 - 24 sowie A1/2 aus dem Addendum taucht hier nicht auf, weil ein anderer Sequenzierdienst mit der Referenzdatenbank RDP statt Silva die Grunddaten erarbeitet hat.

II.1.7 Molekularbiologisch detektierte potenziell pathogene Bakterien

Im Folgenden soll die Bedeutung der Mikrobiomanalysen für die Hygienebetrachtung anhand eines Beispiels aus der ersten, tiefgehend sequenzierten Probenserie erläutert werden. Auch wenn diese erste Serie dazu diente, die bestmögliche Temperatur zur effektiven und gleichzeitig stabilen hygienisierenden Prozessführung zu ermitteln, offenbarten die Ergebnisse ein beachtenswertes Ergebnis bezüglich sporenbildender Bakterien (Rauschbranderreger, siehe später). Diese Bakteriengruppen gehören, wie schon erwähnt, zu den ganz normalen Darmbewohnern von Menschen und Tieren, da sie durch ihre Exoenzyme die Nahrung aufschließen und verdauen (*Bacilli* und *Clostridia*). Ihre Sporen können viele Jahre in der Umwelt überleben und werden, wenn sie in aerobe Fermenter durch kranke Tiere gelangt sind, auch durch hohe Prozesstemperaturen in anaeroben Fermentern nicht bzw. nur schwer reduziert (Bagge et al., 2005, Bagge et al., 2010). Mehrere schwere Krankheiten werden durch Clostridien verursacht, wie Tetanus (*Clostridium tetani*), Botulismus (*Cl. botulinum*) sowie der Gasbrand beim Menschen (*Cl. perfringens*). Eine in der Landwirtschaft gefürchtete durch Clostridien (*Cl. chauvoei*) verursachte Krankheit von Nutztieren ist die Rauschbrand – Sepsis ähnliche Infektionskrankheit von Rind und Schaf. Pathogene Clostridien-Sporen könnten aus kontaminierten Biogasanlagen durch die Verwendung von Gärresten als Dünger in den Nahrungskreislauf der Nutztiere zurückgelangen und theoretisch, wenn auch noch nicht praktisch geschehen, einen pathogenen Kreislauf schließen. Eine anfangs befürchtete Vermehrung von sporenbildenden Clostridien innerhalb von Biogasanlagen durch Schweine- oder Rindergülle findet jedoch nicht statt (Dohrmann et al., 2010).

Anders als bei den gut etablierten Methoden zu kultivierungsabhängigen Hygieneuntersuchungen entdeckt man mit der Molekularbiologie auch solche Organismen, die sich nur schwer kultivieren lassen (zum Beispiel langsam wachsende und / oder strikt anaerobe Sporenbildner) (Kuhnert et al., 1997). Allerdings ist die Amplikonanalyse mittels NGS durch die methodisch bedingten Fehlermöglichkeiten nicht dazu geeignet, um direkte Korrelationsvergleiche unter Zuhilfenahme von Zellzahlen, die mit anderen Methoden, z. B. Plattenkulturtechnik oder quantitative Mikroskopie, ermittelt wurden, zwischen Sequenzanzahl und konkrete Mengenangabe einer Organismenart pro Gramm Untersuchungsmaterial aufstellen zu können. Eine alleinige Hygieneuntersuchung ausschließlich anhand einer Mikrobiom-Sequenzierung ist daher nicht ausreichend und wurde deshalb hier nicht betrieben. Hinweise auf das Vorhandensein einer Gruppe von bestimmten Mikroorganismen können mittels der NGS-Methode aber durchaus qualitativ eindeutig gefunden werden. Auch der Vergleich der relativen Häufigkeit der gesuchten Mikroorganismen in Bezug auf die anderen detektierten Organismen ist durchaus möglich.

Eine weitere Methode zum Nachweis von hygienerelevanten Mikroorganismen in Biogasanlagen basiert auf das Vorhandensein bestimmter Proteine (siehe Infokasten nächste Seite). Über diese können auch Sporenproteine pathogener Clostridien nachgewiesen werden, deren Arten sich über die 16S rRNA-Gene nur sehr wenig unterscheiden. Diese zusätzlichen Untersuchungen wurden in unserem Unterauftrag über den Kontakt mit Dr. Marcel Erhard von der Firma RIPAC-Labor GmbH (Potsdam, Deutschland) durchgeführt. Es wurden Proben aus der 111. Versuchswoche an das Unternehmen versendet. Es handelte sich um eine aus dem Testreaktor F3 bei einer damaligen Prozesstemperatur von 57 °C (Abbildung 25), einer Probe aus dem unbeheizten Endlager (ca. 24 °C) sowie einer Probe der Rindergülle (mit den internen RIPAC-Nummern D14_0719-1 bis -3). Nach den Ergebnissen der RIPAC-Labor GmbH konnte *Cl. botulinum* mit seinen Neurotoxinen in allen drei Proben ausgeschlossen werden (keine Hinweise darauf). Humanpathogene Clostridien-Sporen der Spezies *Cl. perfringens* sind aber in allen drei untersuchten Proben mit der Anzahl von bis zu 10^3 Sporen pro g Probenmaterial gefunden worden. Proben des Testreaktors F3 aus der 114.

Versuchswoche, die parallel per NGS untersucht worden sind, wiesen allerdings eine verschwindend geringe Anzahl von insgesamt 9 Sequenzen von rund 113.000 Sequenzen (Summe der Gesamtsequenzen der 114. Versuchswoche vom Testreaktor F3, 2. Probenserie) also < 0,00009 %, auf, die der Spezies *Cl. perfringens* zugeordnet werden konnten. Allerdings würde eine Hochrechnung auf die Menge an Keimen pro Gramm Reaktorflüssigkeit nur in grober Näherung möglich sein und würde bei denen mit quantitativer mikroskopischer Analyse ermittelten Zellzahl von $3{,}5 \times 10^{10}$ Mikroorganismen pro Gramm Probe eine hochgerechnete Keimbelastung von *Cl. perfringens* bei 3×10^{6} ergeben, die um drei Zehnerpotenzen über der von RIPAC per Massenspektrometrie gemessenen läge (siehe oben). Dieses Rechenbeispiel deutet darauf hin, dass die NGS-Analyse bei geringem Vorkommen von Bakterien als Grundlage für eine exakte Mengenangabe von detektierten Organismen durch simples Hochrechnen nicht dienen kann.

Eine mögliche Fehlerquelle bei der MALDI ToF-MS Methode kann die notwendige Anreicherung und Vorkultivierung mit mehr oder weniger selektiven Plattenkulturtechniken darstellen, wozu für die Bestimmungen bei der RIPAC GmbH (nachgefragt) Blutagar (unspezifisch), Sabouraudagar (Pilze) sowie Vollmedium mit Gentamycin (Antibiotikum) und Vollmedium mit Neomycin (Antibiotikum) verwendet wurde. Clostridien sind im Gegensatz zu den fakultativ anaeroben *Bacilli* strikt anaerob und daher schwieriger völlig sauerstofffrei zu kultivieren. Außerdem benötigen strikte Anaerobier, um anzuwachsen, i.d.R. einen Zusatz von CO_2. Die Plattenkulturen wurden bezüglich der Freiheit von Sauerstoff mit einem OXOID-System kultiviert, was nur bedingt quantitativ standardisiert werden kann, womit jedoch die qualitative Differenzierung nicht in Frage gestellt werden soll.

Weitere molekularbiologische Methoden der Nachweise bestimmter Bakterien ergaben, dass die von der RIPAC-Labor GmbH nachgewiesenen *E. coli* keine APEC- oder EHEC-spezifischen Gene enthielten. Ebenfalls konnten ESBL-Bildner[1)] und MRSA[2)] ausgeschlossen werden. In allen drei Proben konnten keine Wurmeier gefunden werden.

1) ESBL-bildende Bakterien. Die Abkürzung ESBL steht für „Extended-Spectrum Beta-Lactamasen“ und bezeichnet Enzyme, die die Wirksamkeit verschiedener Antibiotika mindern oder sogar aufheben können.

2) MRSA bedeutet Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*. Bakterien der Art *Staphylococcus aureus* kommen auf der Haut von vielen gesunden Menschen vor. Diese Bakterien können gegen das Antibiotikum Methicillin und auch die meisten anderen Antibiotika resistent, also unempfindlich werden. Sie haben daher in der Krankenhaushygiene eine besondere Bedeutung.

Die MALDI-ToF-MS-Technologie zum Nachweis von Pathogenen

Für den Nachweis von potenziellen pathogenen Bakterien bzw. deren Toxine mittels der Maldi-Tof-MS-Technologie (**M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption / **I**onisation **T**ime **o**f **F**light **M**ass **S**pectrometry) wird eine kleine Menge nach Vorkultivierung einer Bakterien-Kolonie auf eine MALDI-Probenplatte (Targetplatte) aufgebracht. Auch Flüssignährmedien können abzentrifugiert und die Zellpellets aufgetragen werden. Auf diese Probe wird ca. ein Mikroliter einer Matrix-Lösung – meist ein Benzoesäurederivat – pipettiert. Diese ko-kristallisiert mit der Erregerprobe auf der Targetplatte. Die Targetplatte wird im MALDI-TOF-MS-Gerät positioniert, wo im Hochvakuum durch einen fokussierten Laserstrahl die Matrix mit den Bestandteilen der eingebetteten Mikroorganismen explosionsartig verdampft wird. Dabei kommt es zu einer Ionisierung der zu untersuchenden Biomoleküle (Proteine) der Erreger. Die Ionen werden in einem starken elektrischen Feld beschleunigt, das von einer Hochspannungsquelle erzeugt und durch ein Flugrohr geleitet wird. In Abhängigkeit der Masse und Ladung erreichen die geladenen Moleküle den Detektor zu unterschiedlichen Zeiten. Die Detektoreinheit errechnet aus den Flugzeiten die gemessenen Molekularmassen und erzeugt ein Massenspektrum (Abbildung Infokästchen). Der größte Teil der im Messbereich befindlichen Biomoleküle sind positiv geladene ribosomale Proteine. Ihre jeweiligen Spektren sind für einzelne Bakterien- oder Pilzspezies charakteristisch und stellen als „molekularer Fingerabdruck“ die Grundlage der MALDI-TOF-MS-Differenzierung dar. Die ermittelten Spektren werden mit einer im System integrierten Referenzdatenbank verglichen, die eine große Zahl an Spektren von zumeist humanmedizinisch relevanten Bakterien und Pilzen enthält.

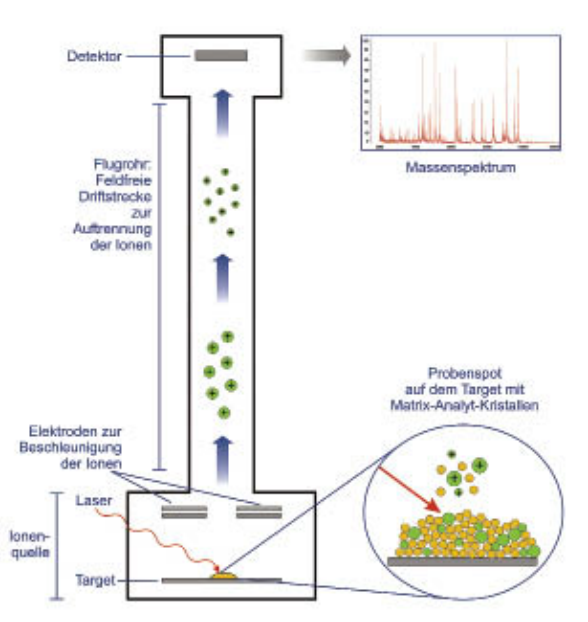


Abbildung Infokästchen: Prinzip der MALDI-TOF-MS-basierten Identifikation von Proteinen und Peptiden. Die Analytmoleküle (z. B. Proteine, grün) bilden zusammen mit den Matrixmolekülen (gelb) Kristalle auf dem Target. Die ribosomalen Proteine der Bakterien- oder Pilzkultur werden mit der Matrix nach Beschuss mit dem Laser desorbiert, ionisiert und im elektrischen Feld beschleunigt. Dabei trennen sie sich im Flugrohr entsprechend ihrer Ladung und Masse auf, und speziesspezifische Massenspektren werden erzeugt.

Bildquelle:
http://www.springermedizin.at/artikel/20050-verkuerzte-analysezeit-bei-hoeherer-genauigkeit

II.1.7.1 Neues Vorkommen von Rauschbranderregern

Clostridium chauvoie als auch *Clostridium septicum* wurden anhand der von uns durchgeführten tiefgehenden Next Generation Sequencing-Untersuchungen in der Biogasanlage Seth gefunden. Grundlage bildete die erste Probenserie, in der anders als die folgenden Versuchsreihen die Proben mit einer sehr hohen Anzahl an Reads sequenziert worden sind, so dass mindestens 100.000 verwertbare Sequenzpaare pro Probe nach dem Filtern erhalten blieben. Es handelt sich um zwei gefundene OTUs, deren Sequenzidentitäten zu 99,3 % *Cl. septicum* (OTU000031) und zu 99,5 % *Cl. chauvoei* (OTU000926) entsprechen (siehe Sequenzen weiter unten). Diese Bakterien wurden mit einer relativen Häufigkeit von bis zu 1,67 % für *Cl. septicum* (7.800 Sequenzen von 466.000 Gesamtsequenzen im Referenzreaktor F2, 102. VW, 51 °C) und nur noch bis zu 0,009 % für *Cl. chauvoei* (56 Sequenzen von 598.000 Gesamtsequenzen) im Endlager in der 42. Versuchswoche (24 °C) detektiert. Eine genauere Aufteilung der Vorkommen beider OTUs in der Rindergülle, den thermophilen Biogasreaktoren und dem unbeheiztem Endlager der Biogasanlage Seth zeigt Abbildung 27 A. Beachtenswert ist die Tatsache, dass die potenziell pathogenen Sporenbildner eindeutig nicht über die Gülle in die Biogasreaktoren gelangten. Mikroskopische Analysen der Gesamtkeimzahlen haben ergeben, dass in den Biogasreaktoren der Anlage in Seth durchschnittlich $3{,}9 \times 10^{10}$ Mikroorganismen pro Gramm Untersuchungsmaterial vorkamen. Daher sind sowohl die 1,67 % für *Cl. septicum* als auch die 0,009 % für *Cl. chauvoei* mengenmäßig immer noch von Bedeutung, auch wenn man aus den NGS-Daten keine absoluten Zellzahlen ableiten kann, wie das vorherige Rechenbeispiel mit *Cl. perfringens* (0,00009 %) gezeigt hat (II.1.8).

Zu beachten ist allerdings, dass der analysierte Genabschnitt des 16S rRNA-Gens nur 466 bp umfasst und eine artspezifische Detektion bei den nah miteinander verwandten Clostridien nur bedingt möglich ist. Da die Sequenzähnlichkeit beider detektierter Clostridienarten jedoch größer als 99 % ist, muss zumindest von einer sehr engen Verwandtschaft mit den pathogenen Bakterien ausgegangen werden. Die Frage, ob die entdeckten Mikroorganismen auch die entsprechenden Toxine von *Cl. chauvoei* bzw. *Cl. septicum* bilden, sollte in weiteren Forschungsprojekten geklärt werden.

In der 3. / 4. Probenserie (Ammoniak-Einfluss und Wiederholungsphase), deren NGS-Sequenzierung und bioinformatische Grundauswertung von einer anderen Biotechnologie-Firma ausgeführt worden ist (1. Serie LGC Genomic GmbH; 3./4. Serie GATC Biotech AG), zeigten sich ganz ähnliche prozentuale Vorkommen von *Cl. septicum* und *Cl. chauvoei*, bei den Temperatur-Wiederholungsproben der Großreaktoren: F2 51 °C, 102. VW und F3 57 °C, 64. VW (Abbildung 27 A und 27 B).

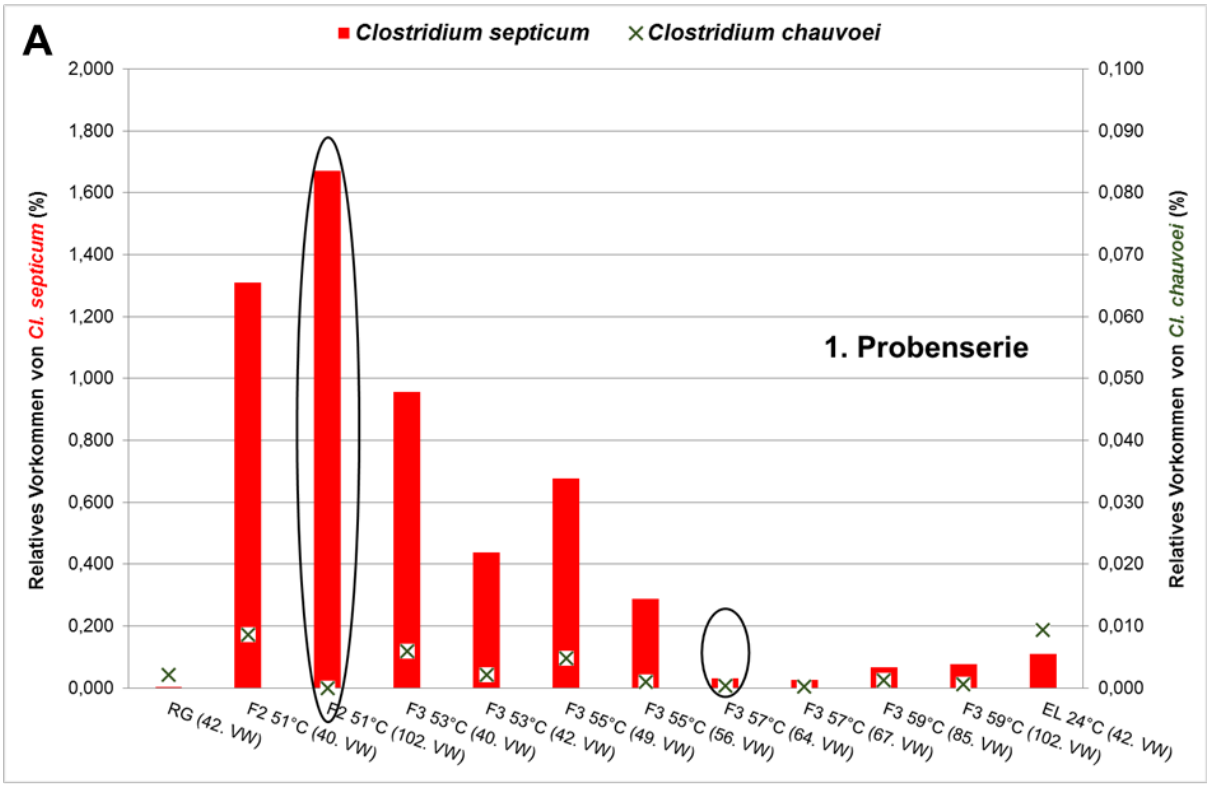
Die Proben ab der 102. Versuchswoche wiesen nur noch eine minimale Anzahl an Sequenzen auf, die den beiden Clostridienarten zugeordnet werden konnten (Abbildung 27 B). Es kann nur vermutet werden, dass ab der 102. Versuchswoche eine grundlegende Änderung wahrscheinlich in der Substratqualität bei allen drei Biogasreaktoren stattgefunden hat oder die Fettsäureanstiege von 3001 ppm im Reaktor F1, 4011 ppm im Reaktor F2 und 7772 ppm im Reaktor F3 (alle Werte aus der 114. VW) sich stark hemmend auf die beiden potenziellen pathogenen Bakterienarten ausgewirkt hatten. Die Fettsäurespiegel stiegen bis zur 139. Versuchswoche in Wellen noch weiter an. Grund hierfür war ein schleichender Mangel an Nickel, welches nach der 139. Versuchswoche mit einer neuen Spurenelementmischung dem Substrat beigemengt wurde (siehe Kapitel II.1.3.6).

Bisher wurden die Clostridien der Tierseuchen Rauschbrand bzw. Pararauschbrand (*Cl. chauvoie und Cl. septicum*), die schnell verlaufende und hoch letale Infektionen auslösen können, bisher nicht in Biogasanlagen beobachtet und gefunden. In der Untersuchung von

Bagge et al., 2010 (Schweden) wurde gezielt nach Sporen bildenden Bacillus- und Clostridienarten in Rindergüllen, Schlachtabfällen und verschiedenen Stufen von unterschiedlichen Biogasanlagen gesucht. Lediglich in unbehandelten Schlachtabfällen konnte *Cl. septicum* mit den angewendeten Methoden (nach Voranreicherung in Bakterienmedien) nachgewiesen werden. Auch Breves und seine Kollegen konnten *Cl. septicum* nur in den Rohstoffen von Biogasanlagen detektieren, nicht aber in den Gärresten (Breves et al., 2012). Fröschle et al. (2015A) untersuchten 154 Biogasanlagen und fanden keine Anzeichen für *Cl. septicum, Cl. haemolyticum und Cl. chauvoei.*

Eine Erkrankung durch *Clostridium chauvoie* gehört zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen (Amtl. Methodensammlung für anzeigepflichtige Tierseuchen, 2014). Im Falle von *Clostridium septicum* besteht zwar keine Meldepflicht nach dem Tierseuchengesetz, doch wird dieser Keim u. a. im Zusammenhang mit carcinogenen Darmerkrankungen auch für den Menschen als Auslöser letaler Infektionen gefürchtet (Larson et al., 1995, Smith-Slatas et al., 2006). Infizierte Tiere verenden zumeist innerhalb von 48 Stunden. Die Erreger kommen weit verbreitet in der Umwelt und auch im Darm gesunder Tiere vor. Eine Infektion erfolgt über Wunden, z. B. beim Enthornen, Kastrieren, bei Operationen oder anderen Verletzungen. Weiterhin ist auch eine Übertragung durch Injektionen möglich.

Hinsichtlich dieser Ergebnisse wird die Wichtigkeit der hier angewendeten Kombination klassischer mikrobieller mit molekularbiologischen Methoden zur Ermittlung des Hygienestatus einer Biogasanlage besonders deutlich. Ferner müsste wegen der aufgezeigten methodischen Schwierigkeiten eine Verifizierung in einer gesonderten Untersuchung mit weiteren Vergleichsanlagen geschehen. Solange keine Validierung des Vorkommens der beiden Clostridienarten *Cl. chauvoie* und *Cl. septicum* vorliegt, besteht lediglich ein Anfangsverdacht dieses bisher unbekannten Auftretens in Biogasanlagen.



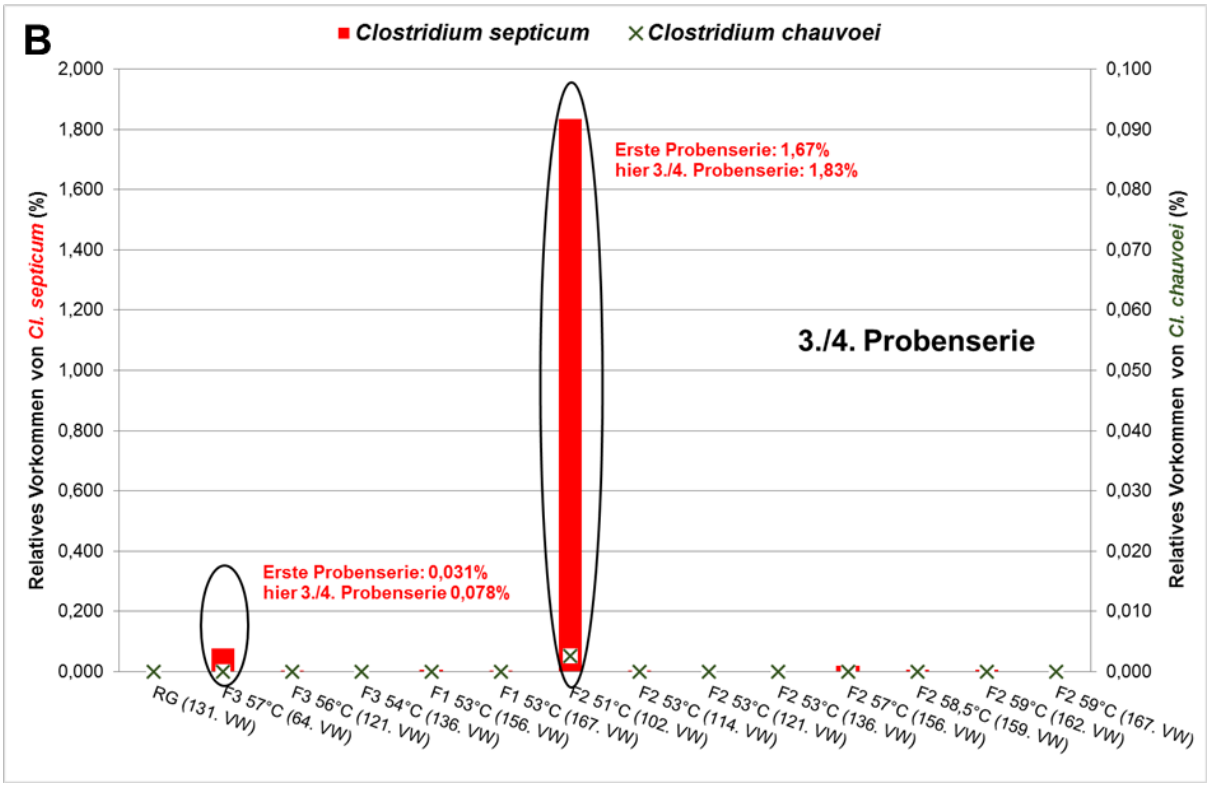


Abbildung 27 A und B: Darstellung des relativen Vorkommens der über NGS-Analysen detektierten potentiell pathogenen Spezies *Clostridia septicum* und *Cl. chauvoei* in Bezug auf die Gesamtanzahl an auswertbaren Sequenzen pro Probe in der 1. bzw. 3./4. Probenserie. Biogas-Großreaktoren F1 – F3, RG = Rindergülle, EL = unbeheiztes Endlager. Die jeweilige Reaktortemperatur und Versuchswoche (in Klammern) sind mit angegeben.

Die zwei folgenden Sequenzabschnitte sind die jeweilige V3 – V4 Region der 16S rRNA-Gene der nachgewiesenen potenziellen Rauschbranderreger aus der Biogasanlage in Seth.

Otu000031 zu 99,26 % Sequenzidentität zu *Clostridium Septicum*

TGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTCAGGGACGATAATGACGGTACCTGAGGAGGAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCC
GGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGACTTTTAAGTGAGATGTGAAATACTCG
GGCTCAACCCGGGGGCTGCATTTCAAACTGGGAGTCTAGAGTGCAGGAGAGGAGAGT
GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACTCTCTGGACTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG

Otu000926 zu 99,50 % Sequenzidentität zu *Clostridium chauvoei*

TGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAA
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTCAGGGACGATAATGACGGTACCTGAGGAGGAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCC
GGATTTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGACTTTTAAGTGAGATGTGAAATACCC
GGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTTCAAACTGGAAGTCTAGAGTGCAGGAGAGGAGAAT
GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAG
GCGATTCTCTGGACTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG

II.1.8 Völlig neuer Indikatororganismus zur Erkennung einer effektiven hygienisierenden, thermophilen Vergärung

Bioindikatoren sind Organismen oder Organismengruppen, deren Reaktionen repräsentativ beobachtet werden können, um eine Situation zu bewerten und Hinweise auf den Zustand des gesamten Ökosystems zu erhalten. Der Bioindikator hat bekannte Abhängigkeiten von physikalischen oder chemischen Variablen, so dass Veränderungen in Anwesenheit / Abwesenheit, Zahlen, Morphologie, Physiologie oder Verhalten dieser Spezies zeigen, dass die gegebenen physikalischen oder chemischen Variablen außerhalb ihrer bevorzugten Grenzen liegen. Gerade in letzter Zeit hat man Bioindikatoren bei Biogasanlagen gesucht, deren Vorkommen bzw. Abwesenheit eng mit der Prozesseffektivität der untersuchten Biogasanlage korreliert (Traversi et al., 2011; Lebuhn et al., 2014; Munk et al., 2017). Dadurch erhofft man sich ein mögliches Frühwarnsystem vor instabilen / ungünstigen Prozessen. Brauchbare Ergebnisse fehlen allerdings noch.

Mit dem hier beschriebenen neuen Indikatororganismus für eine effektive thermophile und damit auch hygienisierende Vergärung könnte künftig ein Testverfahren entwickelt werden, dass das prozentuale Vorkommen dieses Indikators zur Grundlage hat. Eine Parallele zu einer einzigen dominanten Spezies gibt es bislang nicht.

II.1.8.1 Ergebnisse zum neuen Indikatororganismus aus den Next Generation Sequencing Analysen

Bei der taxonomischen Auswertung der NGS-Analysen aus der Hauptversuchsphase dominierte mit ansteigender Temperatur bei den Bakterien ganz besonders die taxonomische Klasse der *Thermotogae*. Der dominierende Organismus in dieser Bakterien-Klasse war fast ausschließlich *Defluviitoga tunisiensis* (98 %). Diese thermophilen Organismen besitzen ein breites Temperaturspektrum von 37 °C bis zu 65 °C mit einem Optimum bei 55 °C (Hania et al., 2012).

Das weite Substratspektrum des hydrolytischen *Defluviitoga tunisiensis* beinhaltet neben verschiedenen Polysacchariden, wie z. B. Cellulose, Chitin und Xylan, auch Succinat sowie Aminosäuren-Gemische. Diese werden zu Acetat, CO_2 und H_2 umgesetzt (Cibis et al., 2016, Maus et al., 2016). Durch Milchreste, die zusammen mit der Gülle des Milchviehbetriebs in die Biogas-Reaktoren gelangt, kann ebenfalls etwas Milchsäure und Lactose eingetragen, welches weitere Substrate von *Defluviitoga tunisiensis* sind. Milchsäure wird aber offenbar so schnell abgebaut, dass sie nicht in der Fermentations- und Gülleanalytik auftaucht.

Die Abbildung 28 zeigt deutlich die überragende Dominanz der einzelnen Spezies *Defluviitoga tunisiensis* mit bis zu über 50 % (Abbildung 28) in der ersten Versuchsperiode und bis zu 67 % (Abbildung 29 B) in der Wiederholungsperiode der thermophilen Biogasanlage in Seth. Eine solche „Alleinherrschaft“ einer einzelnen Spezies mit großem Substratspektrum in einem einzigen Habitat wurde zuvor nur im Grundwasser von Tiefenbohrungen unterhalb von 1,5 km in Gold- und Platinminen in Witwatersrand (Südafrika) beobachtet. Das Gram-positive, zu den Firmicutes zählende Bakterium Candidatus *Desulforudis audaxviator* stellte als alleinige Spezies 99,9 % des gesamten mikrobiellen Lebens des extremen, von der Außenwelt abgeschlossenen Habitats dar (Chivian et al., 2008). Im Gegensatz zu der lebensfeindlichen Umgebung in der Tiefe der Erde, ist das Habitat einer Biogasanlage ein äußerst offenes und diverses Ökosystem mit etwa 3.000 – 4.000 unterschiedlichen Mikroorganismenarten (siehe Tabelle 8). Zusätzlich zu den in den Reaktoren vorkommenden Organismen werden in der Anlage in Seth durch die Substratzufuhr stündlich neue Arten in das System eingetragen. Dass sich unter diesen Umständen eine einzelne Bakterienart so dominant ansammeln konnte, war bisher in der Literatur völlig unbekannt.

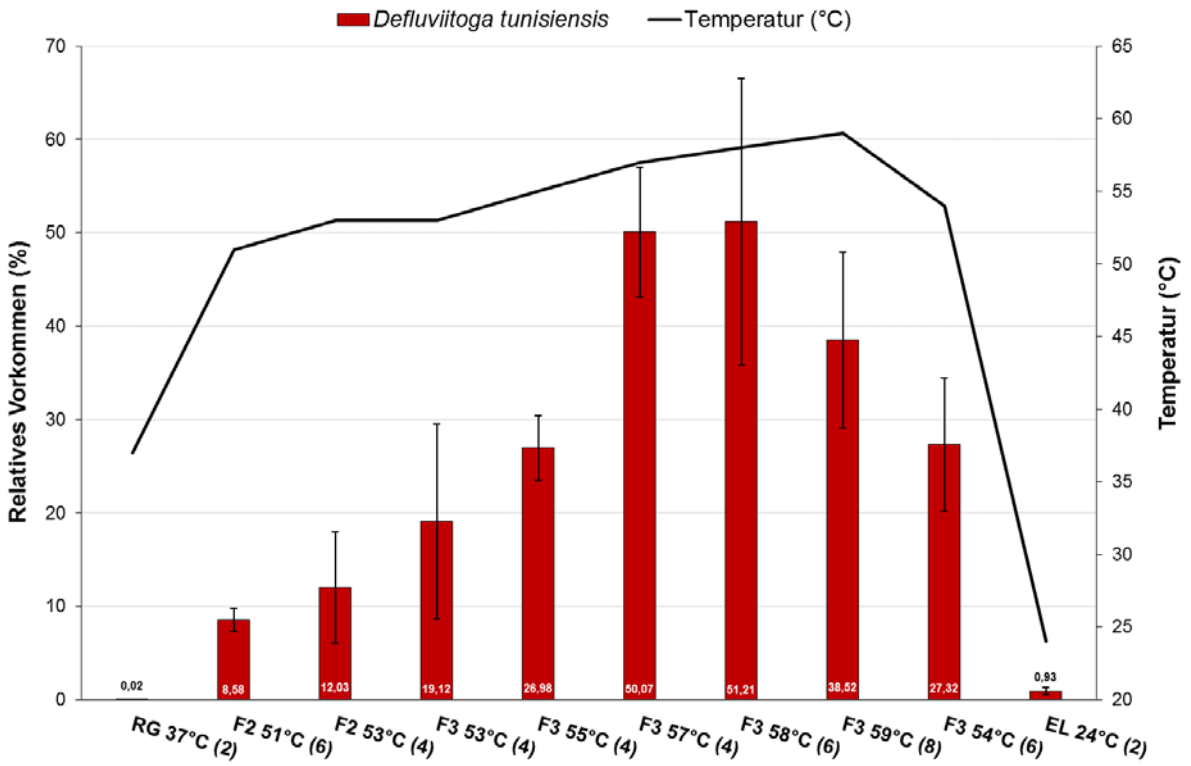


Abbildung 28: Grafische Darstellung der relativen Abundanz der bakteriellen Spezies *Defluviitoga tunisiensis* bezogen auf die Gesamtmenge an verwerteten Sequenzen. Daten-Grundlage bildeten die NGS-Analysen aus der Hauptversuchsphase (1. und 2. Probenserie). Angegeben sind die Durchschnittswerte der Proben der Rindergülle (RG) mit angenommenen 37 °C, der Biogasreaktoren F2 (Referenzreaktor) bei 51 – 53 °C und F3 (Testreaktor) bei 53 – 59 °C sowie des unbeheizten Endlagers (EL) bei gemessenen 24 °C. Die Anzahl der zur Verfügung stehenden und in die Berechnung einbezogenen Proben ist in Klammern angegeben (angegebene Anzahl dividiert durch zwei, da Doppelbestimmung). Die Fehlerbalken geben die relative Standardabweichung an. Die VWs ergeben sich aus den Tabellen A1 und A2 im Addendum. Damit kann *D. tunisiensis* als Indikatororganismus für Thermophilie angesehen werden bzw. Hygienisierung.

NGS-Daten aus der Wiederholungsphase des Temperaturprogramms vom überaus stabil bei konstant 53 °C laufenden Referenzfermenter F1 zeigten prozentual hohe Anteile von 52 % in der 156. Versuchswoche und 63 % in der 167. Versuchswoche von *Thermotogae* auf (Abbildung 26). Diese deuteten auf eine nicht alleinige Abhängigkeit des Vorkommens von *Defluviitoga tunisiensis* in Bezug auf die Prozesstemperatur. Betrachtete man die Biogasreaktoren im Einzelnen, so zeigte das prozentuale Vorkommen von *Defluviitoga tunisiensis* eine Korrelation mit den jeweiligen Fettsäurewerten (siehe auch Kapitel II.1.6). Immer dann, wenn ein so genannter Fettsäurepeak vorlag, verringerte sich zeitweise der Anteil dieser neuen Indikatorspezies. In der Abbildung 29 A und B sind die gemessenen relativen Vorkommen im Zusammenhang mit der entsprechenden Temperatur und dem Gehalt an flüchtigen Fettsäuren (VFA) in den Biogasreaktoren F2 und F3 aufgeführt (Abbildung 29 A und B). Die Datengrundlage bildeten sowohl Ergebnisse aus der Hauptversuchsphase als auch welche aus der Wiederholungsphase des Temperaturprogramms (Anhebung der Temperatur in einem Biogasreaktor von 53 °C auf 59 °C).

***Defluviitoga tunisiensis* wäre daher als neues Indikatorbakterium eines stabilen thermophilen Biogasprozesses und einer damit effektiven Hygienisierung geeignet.**

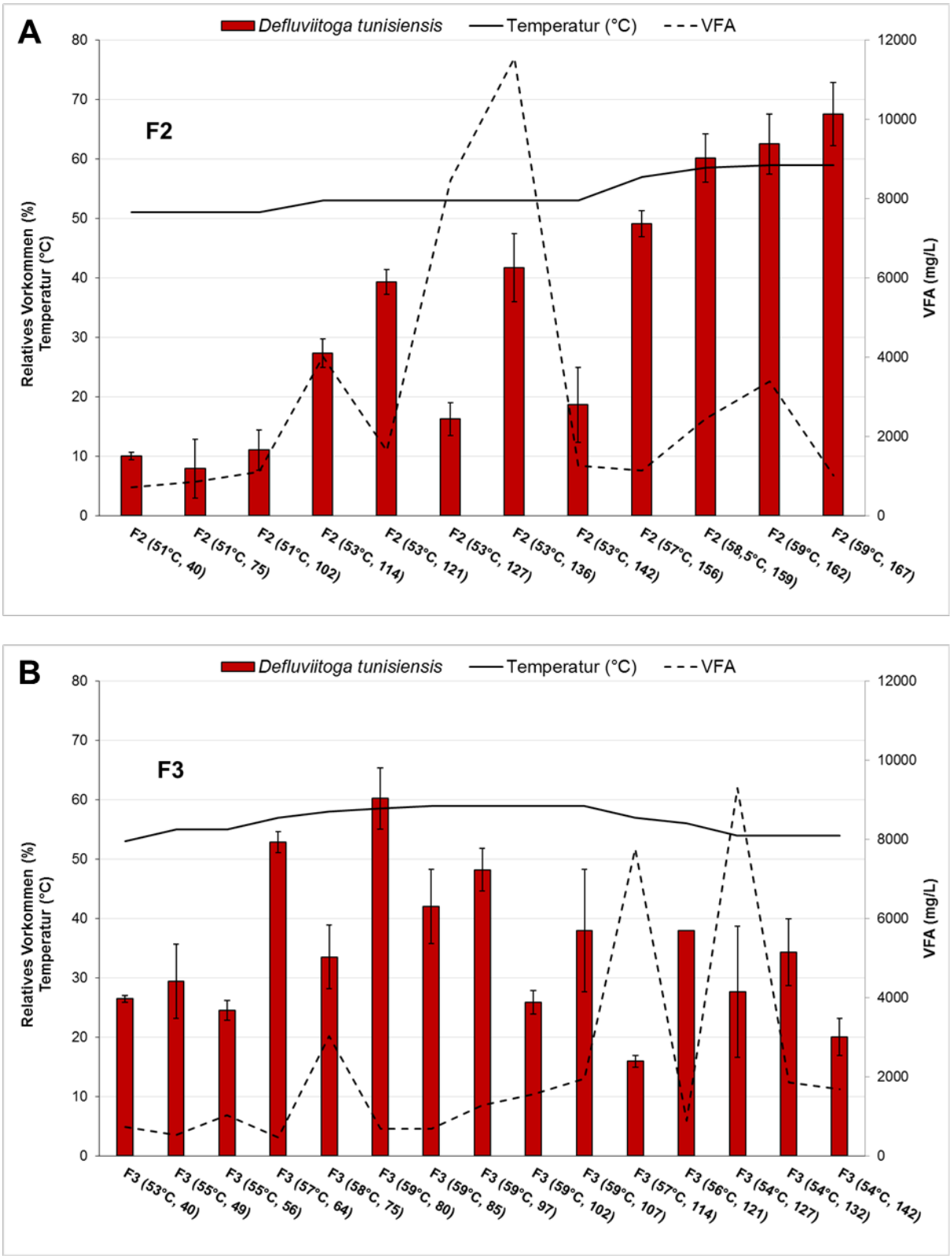


Abbildung 29 A und B: Grafische Darstellung der relativen Abundanz von *Defluviitoga tunisiensis* bezogen auf die Gesamtmenge an verwerteten Sequenzen. Daten-Grundlage bildeten die NGS-Analysen aus der Hauptversuchsphase und der Wiederholungsphase des Temperaturprogramms (Anhebung der Temperatur in einem Biogasreaktor von 53 °C auf 59 °C). Angegeben sind zusätzlich die jeweilige Prozesstemperatur in den Biogasreaktoren F2 (**A**) und F3 (**B**) sowie die dazugehörigen VFA-Werte. Die Fehlerindikatoren geben die relative Standardabweichung an. Damit kann *D. tunisiensis* als Indikatororganismus für prozessstabile Thermophilie mit einhergehender Hygienisierung angesehen werden.

II.2 Verwertung

II.2.1 Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Die Bauweise der thermophilen Biogasanlage mit vertikalen Zylindern als Großfermenter und permanenter Durchmischung mittels Pumpen und dem damit verbundenen erhöhten H_2-Partialdruck wirkt sich offenbar positiv auf die Produktivität der Methanbildung aus. Zusätzlich lässt sich dazu eine deutliche Reduktion an hygienerelevanten Keimen feststellen. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse kommen der gesamten Fachwelt, ferner der Bebra Biogas GmbH als Hersteller und der 4Biogas GmbH (im Wesentlichen baugleich mit Bebra) bzw. der Nachfolgefirma KLOTZ Biogas GmbH zugute. Solche Anlagen dienen der Nachfrage nach biologisch besonders sicheren und stabilen Biogasanlagen in Trinkwasserschutzgebieten.

Allerdings zeigte sich im Rahmen weiterer Messreihen mit Anlagen des gleichen Bautyps, dass Feststoffe wie Rindermist mit Stroh oder nicht zerkleinerte Grünroggen-Ganzpflanzensilage (GPS) für den schlanken Zylinderreaktor und der Pumpendurchmischung ungünstig sind. Grobe Feststoffe können sich unten im Reaktorkonus festsetzen. Daher schließt sich eine Nutzung gröberer Feststoffe als Substrate aus. Auch die verwendeten Güllepumpen zeigten bei der Reaktorhöhe von 14,5 m und teilweise von 19,5 m Schwächen und wurden zum Teil durch eine zweite Güllepumpe mit anderer Pumprichtung verstärkt.

II.2.2 Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Es ist nach Abschluss des Projektes geplant, weitere Ergebnisse zu publizieren und auf Fachtagungen in Vorträgen zu präsentieren.

II.2.3 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die wichtigen Befunde, dass weltweit erstmalig die Tier- und Humanseuchen *Clostridium chauvoei* und *Clostridium septicum* in nennenswerter Zahl von bis zu $10^6 – 10^8$ /g in einer Biogasanlage entdeckt wurden, könnte zu einem Messprogramm von mindestens 10 weiteren Anlagen (5 mesophil und 5 thermophil) führen, um diesen Befund abzusichern und eventuell zu bestätigen.

II.3 Erkenntnisse von Dritten

Während der Projektlaufzeit wurden mehrere Artikel zum Thema Hygiene in Gülle-Biogasanlagen veröffentlicht worden. Die wichtigsten sind die folgenden:

Fröschle, B., Heiermann, M., Lebuhn, M., Messelhäusser, U., & Plöchl, M. (2015). Hygiene and sanitation in biogas plants. In *Biogas Science and Technology* (pp. 63-99). Springer International Publishing.

Glaeser, S. P., Sowinsky, O., Brunner, J. S., Dott, W., & Kämpfer, P. (2016). Cultivation of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant staphylococci from input and output samples of German biogas plants. *FEMS microbiology ecology*, *92*(3), fiw010.

Grim, J., Malmros, P., Schnürer, A., & Nordberg, Å. (2015). Comparison of pasteurization and integrated thermophilic sanitation at a full-scale biogas plant – Heat demand and biogas production. *Energy*, *79*, 419-427.

Diese 3 Veröffentlichungen befassen sich mit dem Hygienestatus sowohl von mesophilen als auch thermophilen Biogasanlagen, wobei Grim et al. auch theoretische Berechnungen zur Grundlage haben. Allerdings handelt es sich bei allen bisher bekannten Forschungsberichten um Momentaufnahmen von Biogasanlagen. Das Neue und Einzigartige an der vorliegenden Studie war die langjährige Untersuchung einer großtechnischen Biogasanlage eines Milchlandwirtes unter reellen Prozessbedingungen. Es wurden der Verlauf bzw. die Veränderungen der hygienisierenden Bedingungen hinsichtlich des definierten Prozessparameters Temperatur sowie weiterer Parameter aufgezeigt.

II.4 Veröffentlichungen des Zuwendungsempfängers zum Förderthema

Off, S., Antonczyk, S., Scherer, P. (2013). Sanitation of liquid manure by a full-scale thermophilic biogas plant at high loading rate. International Conference on Microbiology VAAM 2013 – Bremen, Germany (poster presentation).

Scherer, P., Antonczyk, S., Off, S. (2013). Anaerobic digestion and co-sanitation of cow manure in a single process. BioGas World 2013 – Berlin, Germany (poster presentation).

Scherer, P., Antonczyk, S., Kim, Y. S., Scharfenberg, N., Rösner, C., Arthur, R., Off, S. (2013). Thermophilic anaerobic digestion at short retention time and high loading rate of cow manure in a full-scale biogas plant. BioGas World 2013 – Berlin, Germany (oral presentation).

Scherer, P., Antonczyk, S., Kim, Y. S., Scharfenberg, N., Rösner, C., Arthur, R., Off, S. (2013). Thermophilic anaerobic digestion at unusual short retention time and extreme high loading rate of cow manure in a full-scale biogas plant. AD13 (Anaerobic Digestion) 2013 – Santiago de Compostela, Spain (poster presentation).

Scherer, P., Off, S. (2014). The hygienic state of a full-scale biogas plant co-digesting cow manure with green biomass under different thermophilic process temperatures. R&R, 2014 (2nd International Conference on Recycling and Reuse 2014) – Istanbul, Turkey (oral presentation).

Off, S., Scherer, P. (2014). Efficient effluent sanitation of a full-scale biogas plant for cow manure by increased thermophilic conditions. Biogas Sciences 2014 – Vienna, Austria (oral presentation).

Off, S., Scherer, P. (2015). Hygienisierende Vergärung mit einer thermophilen Biogasgroßanlage. Wie heiß ist nötig – Wie heiß ist möglich? Biogas in der Landwirtschaft – Stand und Perspektiven 2015 – Potsdam, Germany (poster presentation).

Off, S., Scherer, P. (2017). A new indicator bacterium for sanitation and thermophilic digestion. Progress in Biogas IV – Hohenheim, Stuttgart, Germany (poster presentation).

II.5 Weitere Referenzen zum Förderprojekt (siehe Text)

Abubaker, J., Risberg, K., & Pell, M. (2012). Biogas residues as fertilisers–Effects on wheat growth and soil microbial activities. *Applied Energy*, *99*, 126-134.

AGEB, Arbeitsgemeinschaft Energiebilanzen e. V. Stromerzeugung nach Energieträgern 1990 - 2016 (Stand 16.12.2016). 20161216_brd_stromerzeugung1990-2016.pdf.

Ahlberg-Eliasson, K., Nadeau, E., Levén, L., & Schnürer, A. (2017). Production efficiency of Swedish farm-scale biogas plants. *Biomass and Bioenergy*, *97*, 27-37.

Amtliche Methodensammlung für anzeigepflichtige Tierseuchen (Stand 04.04.2014). *In*: Webseite des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI). https://openagrar.bmel-forschung.de/receive/openagrar_mods_00005529.

Anjum, R., Grohmann, E., & Krakat, N. (2017). Anaerobic digestion of nitrogen rich poultry manure: Impact of thermophilic biogas process on metal release and microbial resistances. *Chemosphere, 68*, 1637-1647.

APHA (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *APHA, AWWA, WEF, 18th Edition*, USA.

Argyropoulos, D. N., Varzakas, T. H., & andJohn, A. H. (2013). Microbial communities and their dynamics in biomethane production. In *Bioenergy Production by Anaerobic Digestion: Using Agricultural Biomass and Organic Wastes*, 261-289.

Arthur, R. (2017). *Anaerobic Degradation of Agricultural Residues with High Fibre Contents* (Doctoral dissertation, Bauhaus-Universität Weimar, Fakultät Bauingenieurwesen).

Bagge, E., Sahlström, L., & Albihn, A. (2005). The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water research, 39*(20), 4879-4886.

Bagge, E., Persson, M., & Johansson, K. E. (2010). Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *Journal of applied microbiology, 109*(5), 1549-1565.

Baumgärtel, T. (1924) Masse, Volumen und Oberfläche der Bakterienzelle. In: *Grundriss der theoretischen Bakteriologie*. *Springer Verlag Berlin*, Heidelberg.

Berg, G., & Berman, D. (1980). Destruction by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion of viruses and indicator bacteria indigenous to domestic sludges. *Applied and Environmental Microbiology*, *39*(2), 361-368.

Beneragama, N., Iwasaki, M., Lateef, S. A., Yamashiro, T., Ihara, I., & Umetsu, K. (2013). The survival of multidrug-resistant bacteria in thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of dairy manure and waste milk. *Animal Science Journal*, *84*(5), 426-433.

Boone, D. R. (2001). Genus IV. *Methanothermobacter* Wasserfallen, Nölling, Pfister, Reeve and de Macario 2000, 51VP. *Bergey's manual of systematic bacteriology, 1*, 230-233.

Boone, D. R., & Mah, R. A. (2001). Genus I. *Methanosarcina* Kluyver and van Niel 1936, 400,[AL] emend. Mah and Kuhn 1984a, 266 (Nom. Cons., Opinion 63 of the Jud. Comm. 1986b, 492). *Bergey's manual of systematic bacteriology, 1*, 268-276.

Bratbak, G., & Dundas, I. (1984) Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Applied and Environmental Microbiology*, *48*(4), 755-757.

Breves, G. (2012). Abschlussbericht — Einschätzung des Risikopotenzials der Biogastechnologie in mikrobiologischer Hinsicht. *Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover*, Hannover, Germany, 1-46.

Breves, G. (2017). Studien zur Mikrobiologie von Biogasanlagen. *BiogasJourna*l *4*, 2017, 68-69.

Burchard, C. H., Groche, D., & Zerres, H. P. (2001). ATV Handbuch einfacher Messungen und Untersuchungen auf Klärwerken, *Hirthammer Verlag München*, *10. Auflage*, 55.

Cameron, V., House, C. H., & Brantley, S. L. (2012) A first analysis of metallome biosignatures of hyperthermophilic archaea. Hindawi Publishing Corporation, *Archaea*, vol. 2012, article ID 789278, 12 pages, open access, doi:10.1155/2012/789278.

Chen, M. (1983). Adaptation of mesophilic anaerobic sewage fermentor populations to thermophilic temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*(4), 1271-1276.

Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource technology*, *99*(10), 4044-4064.

Chivian, D., Brodie, E. L., Alm, E. J., Culley, D. E., Dehal, P. S., DeSantis, T. Z., ... & Moser, D. P. (2008). Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth. *Science*, *322*(5899), 275-278.

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.

De Macario, E. C., Macario, A. J., Mok, T., & Beveridge, T. J. (1993). Immunochemistry and localization of the enzyme disaggregatase in *Methanosarcina mazei*. *Journal of bacteriology*, *175*(10), 3115-3120.

De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., & Verstraete, W. (2012). Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource technology*, *112*, 1-9.

Demirel, B. (2014). Major pathway of methane formation from energy crops in agricultural biogas digesters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *44*(3), 199-222.

Demirel, B. & Scherer, P. (2008). Production of methane from sugar beet silage without manure addition by a single-stage anaerobic digestion process. *Biomass and Bioenergy 32*(3): 203-209.

Demirel, B. & Scherer, P. (2011). "Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane." Biomass and *Bioenergy 35*(3): 992-998.

Destatis (Statistisches Bundesamt), (2017). Wirtschaftsdünger tierischer Herkunft in landwirtschaftlichen Betrieben - Erhebung zur Wirtschaftsdüngerausbringung - Fachserie 3 Reihe 2.2.2 – 2010.

DIN/EN12879 (2001). Characterization of sludges- Determination of the loss on ignition of dry mass. Deutsches Institut für Normung eV, Berlin.

DIN/EN12880 (2001). Characterization of sludges - Determination of dry residue and water content. Deutsches Institut für Normung eV, Berlin.

Dohrmann, A. B., Baumert, S., Klingebiel, L., Weiland, P., & Tebbe, C. C. (2011). Bacterial community structure in experimental methanogenic bioreactors and search for pathogenic clostridia as community members. *Applied microbiology and biotechnology*, *89*(6), 1991-2004.

El Hadj, T. B., Astals, S., Gali, A., Mace, S., & Mata-Alvarez, J. (2009). Ammonia influence in anaerobic digestion of OFMSW. *Water science and technology*, *59*(6), 1153-1158.

Fachverband Biogas. (n.d.). Anzahl der Biogasanlagen in Deutschland in den Jahren 1992 bis 2016. In Statista - Das Statistik-Portal. Zugriff am 6. Februar 2017, von https://de.statista.com/statistik/daten/studie/167671/umfrage/anzahl-der-biogasanlagen-in-deutschland-seit-1992/.

Franke-Whittle, I. H., Walter, A., Ebner, C., & Insam, H. (2014). Investigation into the effect of high concentrations of volatile fatty acids in anaerobic digestion on methanogenic communities. *Waste management*, *34*(11), 2080-2089.

Fröschle, B., Heiermann, M., Lebuhn, M., Messelhäusser, U., & Plöchl, M. (2015). Hygiene and Sanitation in Biogas Plants. *In*: Guebitz, G., Bauer, A., Bochmann, G., Gronauer, A., Weiss, S. (eds) Biogas Science and Technology. Advances in *Biochemical Engineering/Biotechnology*, *151*, 63-99.

Fröschle, B., Messelhäusser, U., Höller, C., & Lebuhn, M. (2015A). Fate of *Clostridium botulinum* and incidence of pathogenic *clostridia* in biogas processes. *Journal of applied microbiology*, *119*(4), 936-947.

Georgacakis, D., Sievers, D. M., & Iannotti, E. L. (1982). Buffer stability in manure digesters. *Agricultural Wastes*, *4*(6), 427-441.

Glaeser, S, Schauss, T., Dott, W., & Kämpfer, P. (2016) Biogasanlagen - Quelle oder Senke für Antibiotika-resistente Bakterien? *BiogasJournal 6,* 2016.

Goodfellow, M., & Stackebrandt, E. (1991). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Vol. 5). J. Wiley.

Griehl, C., Hecht, C., Streuber, S., Ganß, Y., & Kremp, H. (2010). Bestimmung von Phenylessigsäure zur Früherkennung von Prozessstörungen in Biogasanlagen. *Chemie Ingenieur Technik*, *82*(12), 2223-2229.

Gustavsson, J., Yekta, S. S., Sundberg, C., Karlsson, A., Ejlertsson, J., Skyllberg, U., & Svensson, B. H. (2013). Bioavailability of cobalt and nickel during anaerobic digestion of sulfur-rich stillage for biogas formation. *Applied energy*, *112*, 473-477.

Hania, W. B., Godbane, R., Postec, A., Hamdi, M., Ollivier, B., & Fardeau, M. L. (2012). Defluviitoga tunisiensis gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a mesothermic and anaerobic whey digester. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *62*(6), 1377-1382.

Hansen, K., Angelidaki, H. I., & Ahring, B. K. (1998). Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water research 32*(1), 5-12.

Harris, J. E. (1987). Spontaneous disaggregation of Methanosarcina mazei S-6 and its use in the development of genetic techniques for Methanosarcina spp. *Applied and environmental microbiology*, *53*(10), 2500-2504.

Heldal, M., Norland, S., & Tumyr, O. (1985) X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. *Applied and environmental microbiology, 50*, 1251-1257.

Hinken, L., Urban, I., Haun, E., Weichgrebe, D., & Rosenwinkel, K. H. (2008). The valuation of malnutrition in the mono-digestion of maize silage by anaerobic batch tests. *Water science and Technology*, *58*(7), 1453-1459.

Ho, D. P., Jensen, P. D., & Batstone, D. J. (2013). Methanosarcinaceae and acetate-oxidizing pathways dominate in high-rate thermophilic anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Applied and environmental microbiology*, *79*(20), 6491-6500.

Hölzle, L. E. (2015). Einfluss der landwirtschaftlichen Biogaserzeugung auf die Qualität von Gärresten: Bewertung des Einflusses des Biogasprozesses auf die Inaktivierung von Erregern von Bestandserkrankungen (BIOGAS-SANITATION): Teilvorhaben 2. FNR-FKZ 220 033 13

Illmer, P., Reitschuler, C., Wagner, A. O., Schwarzenauer, T., & Lins, P. (2014). Microbial succession during thermophilic digestion: the potential of Methanosarcina sp. *PloS one*, *9*(2), e86967.

İnceoğlu, Ö., Al-Soud, W. A., Salles, J. F., Semenov, A. V., & van Elsas, J. D. (2011). Comparative analysis of bacterial communities in a potato field as determined by pyrosequencing. *PLoS One*, *6*(8), e23321.

Insam, H. (2015). Wer fürchtet sich vor Gärrest? *BiogasJournal, 6*, 2015, 96-98.

Iwasaki, M., Yamashiro, T., Beneragama, N., Nishida, T., Kida, K., Ihara, I., ... & Umetsu, K. (2011). The effect of temperature on survival of pathogenic bacteria in biogas plants. *Animal science journal*, *82*(5), 707-712.

Kapp, H. (1984). Schlammfaulung mit hohem Feststoffgehalt. Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, *Oldenbourg Verlag, Band 86*.

Karakashev, D., Batstone, D. J., & Angelidaki, I. (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and environmental microbiology*, *71*(1), 331-338.

Kearney, T. E., Larkin, M. J., Frost, J. P., & Levett, P. N. (1993). Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(3), 215-219.

Kim, Y. S., Westerholm, M., & Scherer, P. (2014). Dual investigation of methanogenic processes by quantitative PCR and quantitative microscopic fingerprinting. *FEMS microbiology letters*, *360*(1), 76-84.

King, E. E., Smith, R. P., St-Pierre, B., & Wright, A. D. G. (2011). Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen. *Applied and environmental microbiology*, *77*(16), 5682-5687.

Klang, J., Theuerl, S., Szewzyk, U., Huth, M., Tölle, R., & Klocke, M. (2015). Dynamic variation of the microbial community structure during the long-time mono-fermentation of maize and sugar beet silage. *Microbial biotechnology*, *8*(5), 764-775.

Krakat, N., Anjum, R., Demirel, B., & Schröder, P. (2017). Methodological flaws introduce strong bias into molecular analysis of microbial populations. *Journal of Applied Microbiology*, *122*(2), 364-377.

Krakat, N., Westphal, A., Satke, K., Schmidt, S., & Scherer, P. (2010). The microcosm of a biogas fermenter: comparison of moderate hyperthermophilic (60 C) with thermophilic (55 C) conditions. *Engineering in Life Sciences*, *10*(6), 520-527.

Kuhnert, P., Krampe, M., Capaul, S. E., Frey, J., & Nicolet, J. (1997). Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. *Veterinary microbiology, 57*(2), 291-298.

Langer, S. G., Ahmed, S., Einfalt, D., Bengelsdorf, F. R., & Kazda, M. (2015). Functionally redundant but dissimilar microbial communities within biogas reactors treating maize silage in co-fermentation with sugar beet silage. *Microbial biotechnology*, *8*(5), 828-836.

Larson, C. M., Bubrick, M. P., Jacobs, D. M., & West, M. A. (1995). Malignancy, mortality, and medicosurgical management of *Clostridium septicum* infection. *Surgery, 118*(4), 592-598.

Lebuhn, M., Hanreich, A., Klocke, M., Schlüter, A., Bauer, C., & Pérez, C. M. (2014). Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe*, *29*, 10-21.

Lins, P., Reitschuler, C., & Illmer, P. (2014). Methanosarcina spp., the key to relieve the start-up of a thermophilic anaerobic digestion suffering from high acetic acid loads. *Bioresource technology*, *152*, 347-354.

Maus, I., Cibis, K. G., Wibberg, D., Winkler, A., Stolze, Y., König, H., ... & Schlüter, A. (2015). Complete genome sequence of the strain Defluviitoga tunisiensis L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. *Journal of biotechnology*, *203*, 17-18.

Maus, I., Cibis, K. G., Bremges, A., Stolze, Y., Wibberg, D., Tomazetto, G., ... & Schlüter, A. (2016). Genomic characterization of Defluviitoga tunisiensis L3, a key hydrolytic bacterium in a thermophilic biogas plant and its abundance as determined by metagenome fragment recruitment. *Journal of biotechnology*, *232*, 50-60.

Maus, I., Kim, Y. S., Wibberg, D., Stolze, Y., Off, S., Antonczyk, S., ... & Schlüter, A. (2017). Biphasic Study to Characterize Agricultural Biogas Plants by High-Throughput 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing and Microscopic Analysis. *Journal of microbiology and biotechnology*, *27*(2), 321.

McCarty, P. L., & McKinney, R. E. (1961). Salt toxicity in anaerobic digestion. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 399-415.

McGhee, T. J. (1968). A method for approximation of the volatile acid concentrations in anaerobic digesters. *Water Sewage Works*, *115*(4), 162-166.

Munk, B., Guebitz, G. M., & Lebuhn, M. (2017). Influence of nitrogen-rich substrates on biogas production and on the methanogenic community under mesophilic and thermophilic conditions. *Anaerobe*.

Nakamura, K., Terada, T., Sekiguchi, Y., Shinzato, N., Meng, X. Y., Enoki, M., & Kamagata, Y. (2006). Application of pseudomurein endoisopeptidase to fluorescence in situ hybridization of methanogens within the family Methanobacteriaceae. *Applied and environmental microbiology*, *72*(11), 6907-6913.

Nordmann, W. (1977). Die Überwachung der Schlammfaulung. *KA-Informationen für das Betriebspersonal, Beilage zur Korrespondenz Abwasser*, *3*(77), 77.

Odlare, M., Pell, M., & Svensson, K. (2008). Changes in soil chemical and microbiological properties during 4 years of application of various organic residues. *Waste management*, *28*(7), 1246-1253.

Oechsner, H., Lemmer, A., Ramhold, D., Mathies, E., Mayrhuber, E., & Preißler, D. (2011). Patent Nr. EP 1997 901 B1, 08.03.2008. *Process for producing biogas*.

Pandey, P. K., & Soupir, M. L. (2011). *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB express*, *1*(1), 18.

Plöchl, M., & Heiermann, M. (2014) Anaerobe Vergärung inaktiviert Erreger von Pflanzenkrankheiten. *BiogasJournal 5*, 2014, 86-90.

Pospiech, J. M. L. (2015). Untersuchung von Gärresten und Gärsubstraten aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen des Freistaates Sachsen: Auswahl und Etablierung von bakteriologischen und molekularbiologischen Verfahren zum Nachweis ausgewählter Indikatorkeime. *Thesis* Universität Leipzig.

Raposo, F., Borja, R., Cacho, J. A., Mumme, J., Orupõld, K., Esteves, S., ... & Wierinck, I. (2013). First international comparative study of volatile fatty acids in aqueous samples by chromatographic techniques: evaluating sources of error. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *51*, 127-143.

Rieger, C., & Weiland, P. (2006). Prozessstörungen frühzeitig erkennen. *Biogas J.*, *4*(06), 18-20.

Robinson, R. W. (1986). Life cycles in the methanogenic archaebacterium Methanosarcina mazei. *Applied and environmental microbiology*, *52*(1), 17-27.

Röske, I., Sabra, W., Nacke, H., Daniel, R., Zeng, A. P., Antranikian, G., & Sahm, K. (2014). Microbial community composition and dynamics in high-temperature biogas reactors using industrial bioethanol waste as substrate. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(21), 9095-9106.

Rouf, M. (1964). Spectrochemical analysis of inorganic elements in bacteria. *Journal of Bacteriology, 88*(6), 1545-1549.

Sahlström, L. (2003). A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource technology*, *87*(2), 161-166.

Schaechter, M., Maaløe, O., & Kjeldgaard, N. O. (1958). Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*, *19*(3), 592-606.

Scheftelowitz, M., Daniel-Gromke, J., Rensberg, N., Denysenko, V., Hillebrand, K., Naumann, K., ... & Witt, J. (2014). Stromerzeugung aus Biomasse (Vorhaben IIa Biomasse). *DBFZ, Leipzig Google Scholar*.

Scherer, P. (2007). Operating analytics of biogas plants to improve efficiency and to ensure process stability. *Internationale Biogaskonferenz "Progress in Biogas", Stuttgart-Hohenheim*, 77-84.

Scherer, P., Lippert, H., & Wolff, G. (1983). Composition of the major elements and trace elements of 10 methanogenic bacteria determined by inductively coupled plasma emission spectrometry. *Biological trace element research*, *5*(3), 149-163.

Scherer, P. & Neumann, L. (2013). “Methano-compost”, a booster and restoring agent for thermophilic anaerobic digestion of energy crops. *Biomass and Bioenergy 56*: 471-478.

Scherer, P. A., Neumann, L., & Kim, Y. (2012). Schnellmethode zur biologischen Aktivitätsbestimmung in Biogasanlagen: Quantitativer mikroskopischer Fingerabdruck (QMF). *Bornimer Agrartechnische Berichte*, *79*, 124-137.

Schlegel, H. G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie. Volume 7, Kapitel 6, *Georg Thieme-Verlag*, Stuttgart.

Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N. N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., ... & Mussgnug, J. H. (2008). The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of biotechnology*, *136*(1), 77-90.

Seyfried, C. F., Bode, H., Austermann-Haun, U., Brunner, G., von Hagel, G., & Kroiss, H. (1990). Anaerobe Verfahren zur Behandlung von Industrieabwässern. *Korrespondenz Abwasser*, *37*(10), 1247-1251.

Smith-Slatas, C. L., Bourque, M., & Salazar, J. C. (2006). *Clostridium septicum* infections in children: a case report and review of the literature. *Pediatrics, 117*(4), e796-e805.

Solli, L., Håvelsrud, O. E., Horn, S. J., & Rike, A. G. (2014). A metagenomic study of the microbial communities in four parallel biogas reactors. *Biotechnology for Biofuels*, *7*(1), 146.

Sowers, K. R., & Gunsalus, R. P. (1988). Adaptation for growth at various saline concentrations by the archaebacterium Methanosarcina thermophila. *Journal of bacteriology*, *170*(2), 998-1002.

Speece, R. E. (1996). Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. In *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*.

Stolze, Y., Zakrzewski, M., Maus, I., Eikmeyer, F., Jaenicke, S., Rottmann, N., ... & Schlüter, A. (2015). Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. *Biotechnology for biofuels*, *8*(1), 14.

Sundberg, C., Al-Soud, W. A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S. S., Svensson, B. H., ... & Karlsson, A. (2013). 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS microbiology ecology*, *85*(3), 612-626.

Sung, S., & Liu, T. (2003). Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere*, *53*(1), 43-52.

Takai, K., & Horikoshi, K. (2000). Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(11), 5066-5072.

Theuerl, S., Kohrs, F., Benndorf, D., Maus, I., Wibberg, D., Schlüter, A., ... & Pühler, A. (2015). Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome. *Applied microbiology and biotechnology*, *99*(18), 7791-7803.

Traversi, D., Villa, S., Acri, M., Pietrangeli, B., Degan, R., & Gilli, G. (2011). The role of different methanogen groups evaluated by Real-Time qPCR as high-efficiency bioindicators of wet anaerobic co-digestion of organic waste. *AMB express*, *1*(1), 28.

Varel, V. H., & Dehority, B. A. (1989). Ruminal cellulolytic bacteria and protozoa from bison, cattle-bison hybrids, and cattle fed three alfalfa-corn diets. *Applied and environmental microbiology*, *55*(1), 148-153.

Wagner, A. O., Gstraunthaler, G., & Illmer, P. (2008). Survival of bacterial pathogens during the thermophilic anaerobic digestion of biowaste: laboratory experiments and in situ validation. *Anaerobe, 14*(3), 181-183.

Weiland, P., Fricke, K., Heußner, C., Hüttner, A., & Turk, T. (2015). Plants for the generation of bioenergy. *In*: Rosenwinkel, K. H., Kroiss, H., Dichtl, N., Seyfried, C. F., Weiland, P., editors. *Anaerobtechnik, Berlin, Springer*, 603–741.

Whitford, M. F., Teather, R. M., & Forster, R. J. (2001). Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC microbiology*, *1*(1), 5.

Wright, A. D. G., Ma, X., & Obispo, N. E. (2008). Methanobrevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microbial Ecology*, *56*(2), 390-394.

Yenigün, O., & Demirel, B. (2013). Ammonia inhibition in anaerobic digestion: a review. *Process Biochemistry*, *48*(5), 901-911.

II.6 Abkürzungsverzeichnis

Abs.	Absatz
BGA	Biogasanlage
bp	Basenpaare
ca.	Circa
CeBiTec	Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld
DAPI	4′,6-Diamidin-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EL	Endlager (unbeheizt)
GPS	Ganzpflanzensilage
GW	Gigawatt
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
kW_{el} / MW_{el}	Kilowatt / Megawatt elektrische Leistung
NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
oTS	Organische Trockensubstanz
ORL	Organischen Beladungsrate
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RG	Rindergülle
RR	Referenzreaktor
TR	Testreaktor
TS	Trockensubstanz
U	Unit
VFA	flüchtige Fettsäuren (C_2 - C_6) volatile fatty acids
VW	Versuchswoche
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat Agar
z. B.	Zum Beispiel

II.7 Danksagung

Wir danken Herrn Dipl. Biol. Nils Scharfenberg und Herrn Dr. Christian Rösner für die umfassende Hilfe bei der Fermentationsanalytik. Herrn Richard Arthur möchten wir für seinen Einsatz in der Spurenelementanalyse danken. Frau MSc Miriam Meyer (studentische Hilfskraft) und Frau Monika Unbehauen (Technische Assistentin) danken wir für ihre exzellenten Hilfen im Labor.

III. Addendum

Als Zusatzinformationen werden hier Abbildungen, Tabellen und Zusatzinformationen aufgeführt, die im Hauptbericht zum Zweck der besseren Übersicht nicht gezeigt wurden.

III.1 Zusätzliche Diagramme und Tabellen zu den Mikrobiomanalysen

Abbildungen A1 und A2: Diagramme der NGS-Ergebnisse der ersten Probenserie (Abhängigkeit der mikrobiellen Zusammensetzung von der jeweiligen Prozesstemperatur) des Referenzfermenters F2 (51 °C), die im Wesentlichen dem des Testreaktors bei 53 °C ähnelten.

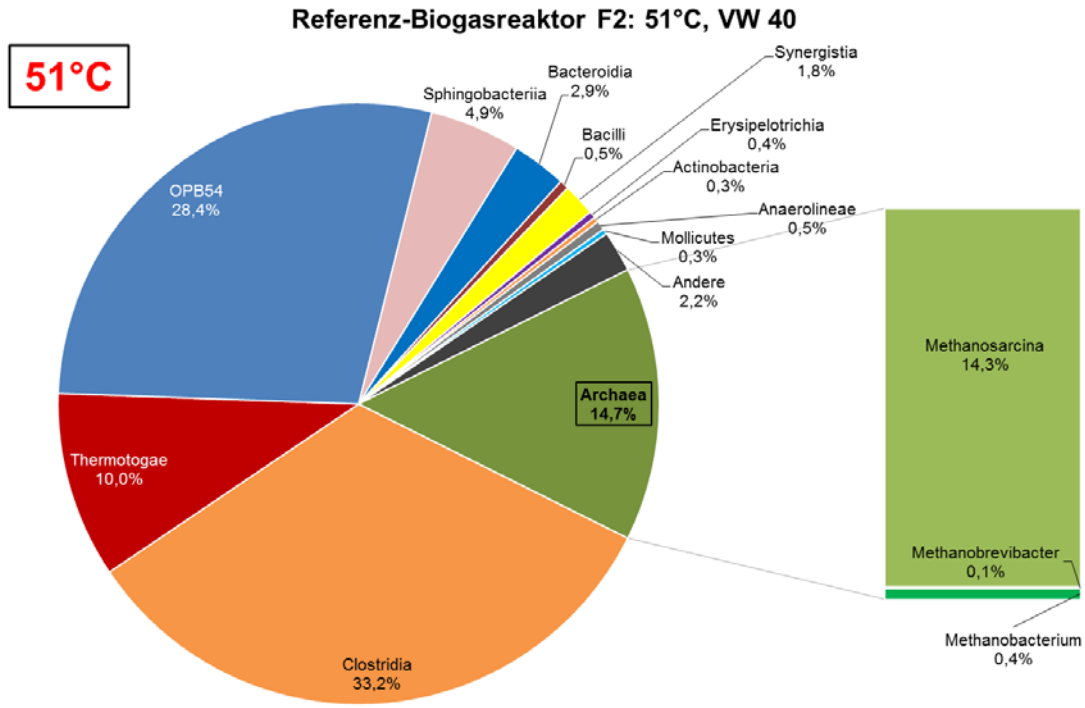


Abbildung A1: Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in dem Referenzreaktor F2 (51°C) der Biogasanlage Seth in der 40. Versuchswoche. Dargestellt sind die Bakterien-Klassen (links) ab einer Menge von 0,3 % und Archaeen-Gattungen (rechts) ab einer Menge von 0,1 % in Bezug auf die Gesamtzahl an detektierten Mikroorganismen in der Doppel-Probe des Referenzreaktors F2 bei 51 °C. „Andere“ bedeutet, dass diese Mikroorganismen einer bakteriellen Klasse zugehören, die unterhalb der gewählten Grenze von 0,3 % fällt.

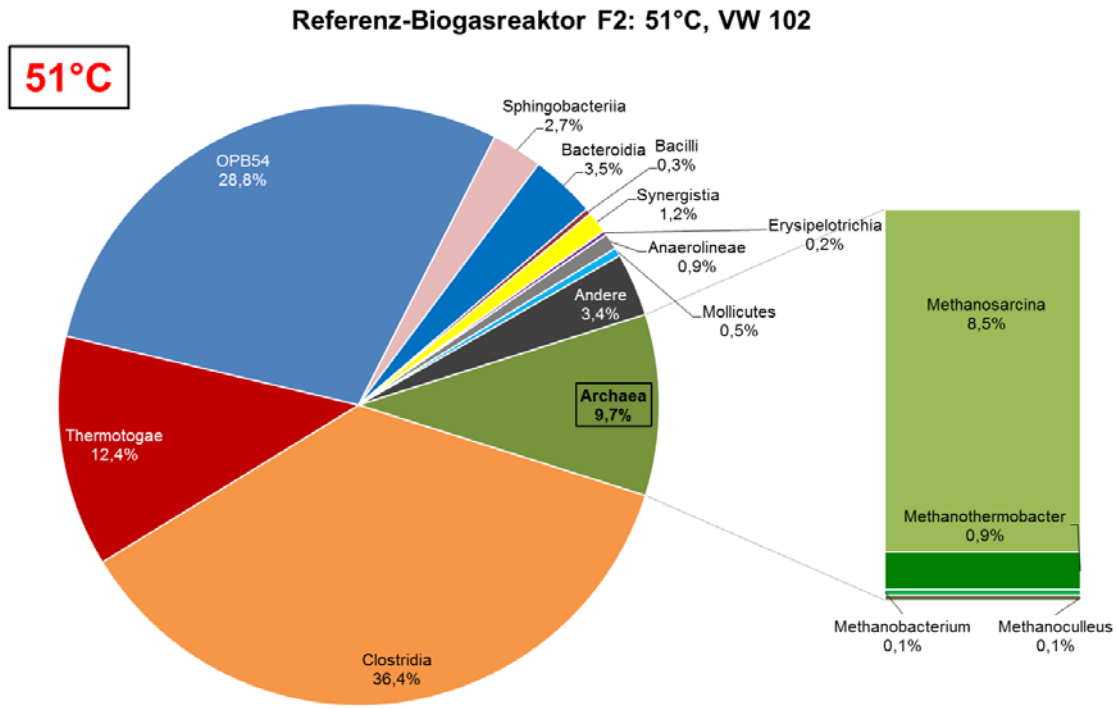


Abbildung A2: Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in dem Referenzreaktor F2 (51°C) der Biogasanlage Seth in der 102. Versuchswoche. Dargestellt sind die Bakterien-Klassen (links) ab einer Menge von 0,3 % und Archaeen-Gattungen (rechts) ab einer Menge von 0,1 % in Bezug auf die Gesamtzahl an detektierten Mikroorganismen in der Doppel-Probe des Referenzreaktors F2 bei 51 °C. „Andere“ bedeutet, dass diese Mikroorganismen einer bakteriellen Klasse zugehören, die unterhalb der gewählten Grenze von 0,3 % fällt.

Die Abbildungen A1 und A2 im Vergleich belegen eine deutliche Ähnlichkeit der mikrobiellen Zusammensetzungen trotz der Anlagen-Betriebszeit von mehr als einem Jahr zwischen den Probennahmen. Leichte Abweichungen werden in Bezug auf die Archaeen deutlich, die in der 102. Versuchswoche nur noch ca. 10 % anstatt ca. 15 % in der 40. Versuchswoche betrugen. Die Zunahme bzw. Anreicherung von *Methanothermobacter* innerhalb der Gruppe der Methanogenen war offenbar durch die Betriebsdauer bei thermophilen Temperaturen bedingt.

Tabelle A1: Liste der prozentualen Anteile mikrobieller Klassen (Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen a und b) der 1. Probenserie; Sequenzierung durch LGC Genomic GmbH; 300 bp paired-end read (Illumina MiSeq V3); Referenzdatenbank: 16S Mothur-Silva SEED r119 und RDP (Ribosomal Database Project Release 11.3); Amplikon Typ: *Prokaryota* 16S (U341F-U806R). Aufgeführt sind die internen Probennummern, der jeweilige beprobte Reaktor (F2 oder F3) sowie der Rindergülle (RG) und des Endlagers (EL) mit den entsprechenden Temperaturen und den Versuchswochen in Klammern. * Werte für Abbildung 28 markiert. Zusätzlich sind die Reads (Gesamtanzahl auswertbarer Sequenzen) in der untersten Zeile angegeben.

Interne Probennummer	2*	17*	27*	29*	32*	34*	35*	36*	37*	38*	43*	47*
Reaktor, Temperatur (VW)	F2 51°C (40)	F2 51°C (102)	RG (42)	EL 24°C (42)	F3 53°C (40)	F3 53°C (42)	F3 55°C (49)	F3 55°C (56)	F3 57°C (64)	F3 57°C (67)	F3 59°C (85)	F3 59°C (102)
Domäne; Phylum; Klasse												
Bacteria; Firmicutes; Clostridia	33,6	36,8	55,7	37,8	28,6	29,4	26,0	24,9	21,6	27,8	28,9	31,8
Bacteria; Thermotogae; Thermotogae	10,1	12,6	0,0	1,0	27,5	11,6	31,0	25,1	56,3	44,7	44,6	27,1
Bacteria; Firmicutes; OPB54	28,7	29,2	0,1	5,6	27,0	31,9	13,3	19,4	16,5	19,5	18,5	29,5
Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia	14,5	8,8	0,3	31,6	5,6	7,1	6,8	4,8	2,1	3,9	3,0	3,6
Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteriia	**5,0**	**2,8**	**0,1**	**0,8**	**5,8**	**13,4**	**16,9**	**20,7**	**1,8**	**1,6**	**0,5**	**2,8**
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia	3,0	3,5	11,5	11,5	1,2	1,9	2,5	1,6	0,1	0,2	0,2	0,3
Bacteria; Firmicutes; Bacilli	0,5	0,3	15,6	1,0	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	2,0	0,6
Bacteria; Synergistetes; Synergistia	1,8	1,2	0,0	0,7	1,0	1,6	1,0	1,3	0,2	0,5	0,3	0,5
Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia	0,4	0,2	4,6	1,5	0,2	0,2	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1
Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria	0,3	0,2	4,8	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria	0,5	1,1	1,9	0,9	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,8	2,1
Bacteria; Firmicutes; unclassified	**0,6**	**1,0**	**0,2**	**0,7**	**0,8**	**0,9**	**0,7**	**0,6**	**0,3**	**0,3**	**0,3**	**0,5**
Bacteria; Chloroflexi; Anaerolineae	0,5	0,9	0,0	1,0	0,5	0,6	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1	0,6
Bacteria; Tenericutes; Mollicutes	0,3	0,5	0,6	0,5	0,6	0,4	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
Bacteria; Bacteroidetes; unclassified	0,2	0,6	0,1	0,7	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria; Spirochaetae; Spirochaetes	0,0	0,1	0,3	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria	0,0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria	0,1	0,0	0,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
Bacteria; Actinobacteria; Coriobacteriia	0,0	0,0	0,8	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria; Candidate_division_OP9; unclassified	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
Gesamtsequenzen	**165.636**	**179.845**	**250.419**	**295.006**	**176.052**	**255.634**	**217.309**	**295.830**	**140.225**	**260.118**	**163.442**	**167.884**

Tabelle A2: Liste der prozentualen Anteile mikrobieller Klassen (Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen a und b) der 2. Probenserie; Sequenzierung durch LGC Genomic GmbH; 300 bp paired-end read (Illumina MiSeq V3); Referenzdatenbank: 16S Mothur-Silva SEED r119 und RDP (Ribosomal Database Project Release 11.4); Amplikon Typ: *Prokaryota* 16S (U341F-U806R). Aufgeführt sind die internen Probennummern, der jeweilige beprobte Reaktor (F2 oder F3) mit den entsprechenden Temperaturen und den Versuchswochen in Klammern. * Werte für Abbildung 28 markiert. Zusätzlich sind die Reads (Gesamtanzahl auswertbarer Sequenzen) in der untersten Zeile angegeben.

Interne Probennummer	9 a / b*	22 a / b*	26 a / b*	39 a / b*	40 a / b*	41 a / b*	46 a / b*	48 a / b*	50 a / b	52 a / b*	53 a / b*	56 a / b*
Reaktor, Temperatur (VW)	F2 51°C (75)	F2 53°C (127)	F2 53°C (142)	F3 58°C (75)	F3 58°C (79)	F3 58,5°C (80)	F3 59°C (97)	F3 59°C (107)	F3 57°C (114)	F3 54°C (127)	F3 54°C (132)	F3 54°C (142)
Domäne; Phylum; Klasse												
Bacteria; Thermotogae; Thermotogae	6,9	16,3	20,9	33,4	55,5	61,0	48,7	35,7	16,2	28,4	38,4	21,9
Bacteria; Firmicutes; Clostridia	43,8	43,7	42,4	39,3	28,7	9,1	28,9	40,9	46,5	40,4	34,9	40,3
Bacteria; Firmicutes; OPB54	13,9	19,2	23,7	18,3	6,5	8,1	15,1	14,8	26,0	17,1	15,1	24,0
Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteriia	14,7	6,9	5,1	0,3	1,1	0,2	0,3	1,5	0,4	4,2	5,8	3,5
Archaea; Euryarchaeota; Methanomicrobia	10,2	2,7	1,7	2,5	1,3	0,5	1,7	1,7	1,7	1,9	1,0	1,6
Bacteria; Firmicutes; Bacilli	**1,1**	**5,5**	**0,8**	**3,3**	**3,8**	**3,1**	**1,4**	**1,6**	**4,2**	**3,9**	**1,6**	**1,1**
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2	14,9	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria	0,6	0,9	1,4	0,6	0,2	0,1	1,4	1,1	2,0	0,6	0,3	2,3
Bacteria; Synergistetes; Synergistia	**1,4**	**1,1**	**0,8**	**0,7**	**0,6**	**0,4**	**0,5**	**0,8**	**1,4**	**0,9**	**0,6**	**1,3**
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia	3,8	0,8	0,8	0,1	0,4	0,1	0,3	0,3	0,1	0,4	0,3	0,8
Bacteria; Firmicutes; unclassified	1,0	0,5	0,8	0,4	0,2	0,1	0,3	0,4	0,3	0,4	0,5	1,0
Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria	0,6	0,8	0,3	0,5	0,2	0,3	0,2	0,3	0,5	0,5	0,3	0,6
Bacteria; Tenericutes; Mollicutes	0,4	0,5	0,4	0,1	0,7	0,2	0,2	0,2	0,1	0,5	0,4	0,4
Bacteria; Firmicutes; Erysipelotrichia	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,5
Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,7	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
Bacteria; Candidate_division_OP9; unclassified	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
Bacteria; Chloroflexi; Anaerolineae	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2
Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria; Bacteroidetes; unclassified	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteria; Bacteroidetes; Flavobacteriia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gesamtsequenzen	**89.306**	**46.106**	**62.282**	**86.242**	**109.040**	**110.433**	**51.519**	**70.958**	**55.373**	**69.164**	**52.728**	**83.840**

Tabelle A3: Liste der prozentualen Anteile mikrobieller Klassen (Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen a und b) der 3. und 4. Probenserie; Sequenzierung durch GATC Biotech AG; HiSeq Rapid Run 300bp PE (Illumina HiSeq); Referenzdatenbank: RDP (Ribosomal Database Project Release 11 updated on September, 2016). Amplikon Typ: *Prokaryota* 16S (U341F-U806R). Aufgeführt sind die internen Probennummern, der jeweilige Reaktor (F2 oder F3) sowie der Rindergülle (RG) mit den entsprechenden Temperaturen und den Versuchswochen in Klammern. Zusätzlich sind die Reads (Gesamtanzahl auswertbarer Sequenzen) in der untersten Zeile angegeben.

Interne Probennummer	S1 a / b	S2 a / b	S3 a / b	S4 a / b	S5 a / b	S6 a / b	S7 a / b	S8 a / b	S9 a / b	S10 a / b	S11 a / b	S12 a / b	S13 a / b	S14 a / b
Reaktor, Temperatur (VW)	F2 53°C (121)	F2 53°C (136)	F3 56°C (121)	F3 54°C (136)	F1 53°C (156)	F2 57°C (156)	F2 58,5°C (159)	F2 59°C (162)	F1 53°C (167)	F2 59°C (167)	F2 51°C (102)	F3 57°C (64)	F2 53°C (114)	RG (131)
Klasse														
Thermotogae	39,3	41,7	38,0	51,0	54,2	49,1	60,2	62,4	62,9	67,6	14,3	52,2	27,3	4,9
Clostridia	51,1	50,2	54,0	42,1	37,3	43,1	34,0	32,1	29,6	28,0	68,3	41,0	59,6	44,5
Bacteroidia	2,2	2,3	1,6	1,6	4,2	2,9	2,0	1,8	3,1	1,5	7,4	2,2	4,2	12,3
Bacilli	2,9	2,4	2,8	2,4	0,7	0,9	0,8	1,3	1,0	0,9	1,2	1,2	4,9	11,8
Methanomicrobia	2,0	1,0	1,3	1,1	2,7	2,3	1,5	0,8	1,7	0,8	5,6	1,9	1,6	0,4
Actinobacteria	1,1	0,9	1,1	0,6	0,3	0,6	0,5	0,3	0,3	0,2	0,5	0,6	1,0	10,4
Erysipelotrichia	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,8	0,3	0,3	2,6
Methanobacteria	0,3	0,4	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,7	0,9	0,6	0,9	0,2	0,4	0,3
Gammaproteobacteria	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	2,8
Tissierellia	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,4	0,1	0,2	1,5
Mollicutes	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1
Alphaproteobacteria	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,3	0,9
Coriobacteriia	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,7
Deltaproteobacteria	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
Betaproteobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9
Flavobacteriia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
Synergistia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4
Spirochaetia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
Bacteria; Bacteroidetes; unclassified	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
Bacteria; Bacteroidetes; Flavobacteriia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
Gesamtsequenzen	**181.377**	**226.642**	**201.656**	**221.016**	**193.301**	**207.300**	**234.423**	**252.023**	**185.826**	**235.354**	**213.030**	**224.691**	**168.531**	**258.767**

III.2 Zusatzdiagramm zu den Versuchswochen 90 bis 170 (Wiederholungsphase) mit den dazugehörigen Temperaturen

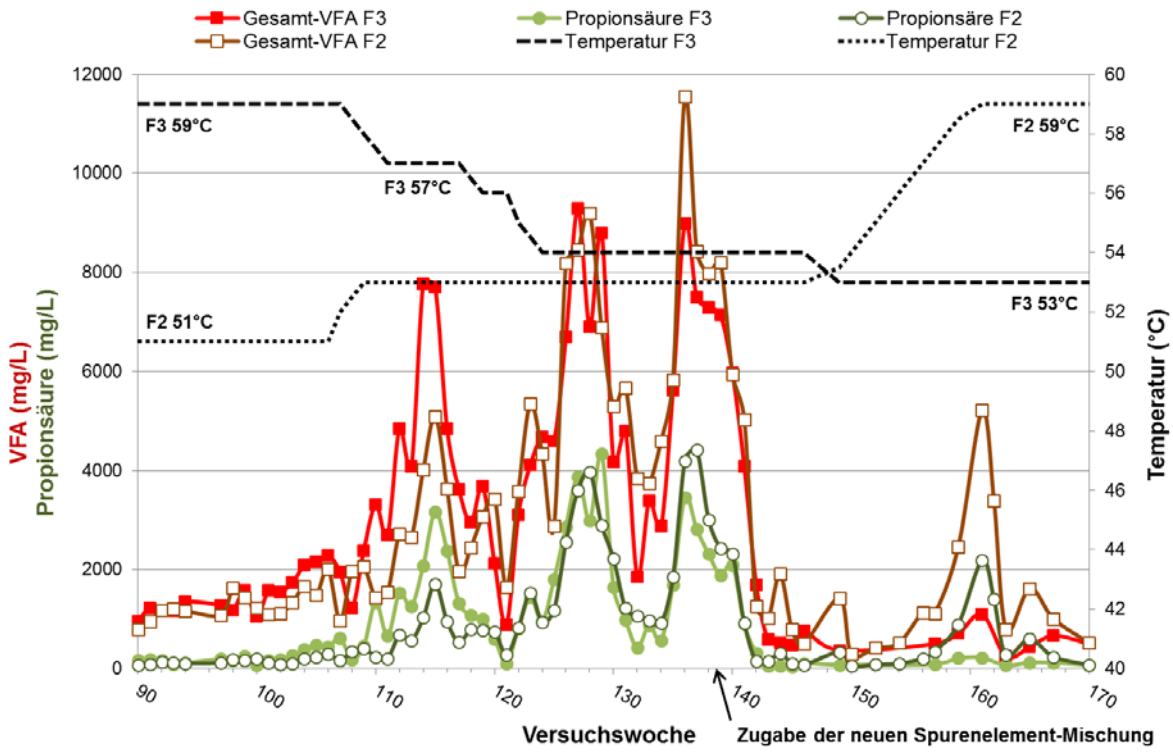


Abbildung A3: Darstellung der Gehalte an Gesamt-Fettsäuren (VFA) und Propionsäure in den Reaktoren F2/F3 und separat dem Testreaktor F2 in den Versuchswochen 90 bis 170 sowie den dazugehörigen Temperaturen.

III.3 Vergleich der Messmethoden von FOS/TAC nach Nordmann und FOS/TAC neu nach HAW

Ein interessantes Nebenergebnis des Projektes ergab sich durch Vergleich des sogenannten FOS/TAC-Indexes nach Nordmann (Nordmann, 1977; Scherer, 2007) für Prozessstörungen bei erhöhten Fettsäuren in Faultürmen von Kläranlagen. Für Biogasanlagen wurde im deutschsprachigen Raum der FOS/TAC-Quotient nach Nordmann erstmalig durch Rieger und Weiland (2006) eingeführt, da dieser Wert zuvor schon für 20 Jahre an der FAL eingesetzt wurde (Burchard et al., 2001). Unter FOS verbirgt sich die Gesamtheit der organischen Fettsäuren, wozu im biologischen Anaerobenbereich fast nur die freien oder kurzkettigen Fettsäuren C_1-C_6 gehören. Diese lassen sich annäherungsweise per Titration mit 50 mM Schwefelsäure (0,1 N Säure) bestimmen, wobei man den Verbrauch als $CaCO_3$-Äquivalente in mg/L umrechnet. Dazu durchwandert man per Titration vom in der Regel neutralen oder leicht alkalischen Anfangs-pH-Wert die drei typischen Pufferbereiche eines Biogas-Reaktormediums, siehe zum besseren Verständnis die klassische Grafik A4 von Georgacakis et al. (1982). TAC bedeutet totales anorganisches Carbonat, was der Alkalinität oder Hydrogencarbonathärte oder „Kalkreserve“ entspricht. Nordmann (1977) nutzte wiederum als Basis die Grundlagen der Arbeit von McGhee (1968), die sich aber auf Abwasser mit einem niedrigen TAC-Wert von max. 3000 mg $CaCO_3$-Äq. bezogen (McGhee, 1968). Rieger und Weiland (2006) haben dann den FOS/TAC-Wert mitsamt dem von Nordmann empirisch bestimmten Korrekturfaktor für Faultürme 1:1 auf die wesentlich stärker gepufferten Biogasanlagen übertragen, wo erfahrungsgemäß TAC-Werte zwischen 9.000 – 20.000 mg $CaCO_3$-Äq./L vorherrschen. In der untersuchten Anlage Seth wurden Werte zwischen 9.000 und 12.000 mg $CaCO_3$-Äq./L bestimmt. Bei Biogasanlagen kommt noch der Ammoniumpuffer hinzu (Abbildung A4), der im Faulturmbereich wesentlich geringer ausfällt, in der Regel unter 1000 mg/L Ammonium. Mittlerweile hat sich in der Praxis in Deutschland zur Routinekontrolle der über Zweipunkt-Titration einfach zu bestimmende FOS/TAC nach Nordmann durchgesetzt, z. B. mit 20 mL zentrifugiertem Probenvolumen (1. Titrationsvolumen: V-A zur Titration vom Anfangs-pH nach → pH 5,0 = TAC-Wert = Kalkreserve = Alkalinität; zweites Titrationsvolumen: V-B von pH-Wert 5,0 nach → 4,4 = FOS-Wert. Dieser Wert sollte aber etwas modifiziert werden, siehe später).

FOS/TAC Nordmann: TAC ≈ T-A x 250 (mg $CaCO_3$-Äq.), FOS ≈ ((T-B x 1,66) – 0,15) x 500

Es gibt zur Einschätzung des FOS/TAC-Quotienten für einen sicheren Biogasprozess keine universelle Literaturstelle. Aus eigener Erfahrung wird für Gülle-Mais-Biogasanlagen ein Wert bis 0,3 im grünen, von 0,3 – 0,6 im gelben und von höher als 0,6 im roten Bereich angesehen. Dabei ergeben sich häufig parallel FOS bzw. VFA-Werte (VFA hier im Text für exakt bestimmte Fettsäuren mittels Gaschromatographie, siehe II.1.1) von 0 – 1500 mg/L (grüner Bereich), von 1500 – 3000 mg/L (gelber Bereich) und über 3000 mg/L (roter Gefahrenbereich) (Abbildung A5).

Diese Einteilung gilt nicht für Faultürme mit vergleichsweise gering abbaubarer Organik und Fettsäurekonzentration. Hier gilt ein FOS-Wert von 250 mg/L im Abfluss von Kläranlagen als problematisch, da man einen kompletten Abbau erwartet. In vergleichsweise stark befrachteten Biogasreaktoren, wo der Abbau von Organik im Hauptfermenter noch im Gange ist, wäre ein FOS-Wert von 500 mg/L dagegen ein harmloser Wert im grünen Bereich.

Nach den Pufferungskurven von Georgacakis et al. (1982) sieht man jedoch, dass man bei einer Titration bis 5,0 noch einen Teil des Carbonatpuffers **nicht** erfasst, der etwa bis pH 4,3 – 4,4 reicht (Abbildung A4). Dadurch wird bei der zweiten Titration aus diesem Bereich 5,0 – 4,3 (siehe oben) der resultierende TAC-Wert dem FOS-Wert zugeschlagen, wobei

gerade bei stark gepufferten Güllebiogassystemen mit niedrigen VFA-Werten dadurch ein fälschlich hoher FOS-Wert suggeriert wird. Dies hatte bereits Kapp (1984) in seiner Doktorarbeit gefunden und daher den Titrationsbereich von 5,0 auf 4,0 statt von 5,0 auf 4,4 (nach Nordmann) für die FOS-Bestimmung verwendet (Kapp, 1984). Dies führte später zu weiteren Anpassungen verschiedener Autoren (Literatur In Scherer, 2007). Aus dem FOS-Endtitrationspunkt von 4,4 resultieren aber in stark gepufferten Systemen zu hohe FOS/TAC-Anfangswerte von 0,2 – 0,3, obwohl die VFA-Konzentration beispielsweise mit < 500 mg/L noch im grünen Bereich liegt. Deshalb wurde an der HAW in der Wiederholungsphase von der 150. – 164. Versuchswoche versuchsweise der FOS/TAC-Wert nach Nordmann mit dem FOS/TAC-Wert der HAW verglichen (Abbildung A5, 154. Versuchswoche), wobei die Gesamt-FOS als VFA bzw. als Essigsäureäquivalente) exakt über Gaschromatographie bestimmt wurden (Methodik unter II.1.1). Für die Bestimmung des TAC-Wertes der HAW wurde die Titration von pH X der zentrifugierten Probe nach Endpunkt 5,0 herangezogen (Kapp, 1984). Für die Essigsäureäquivalente wurden die per GC quantifizierten Fettsäuren unabhängig von der Kettenlänge in Essigsäure-Millimole und über das Molgewicht von 60 g/Mol in Essigsäureäquivalente (mg/L) umgerechnet und zusammenaddiert. Dies galt zwar auch für Phenylessigsäure (Abbauprodukt von Protein, Griehl et al., 2010), die aber in den Analysen von Seth nicht relevant auftauchte.

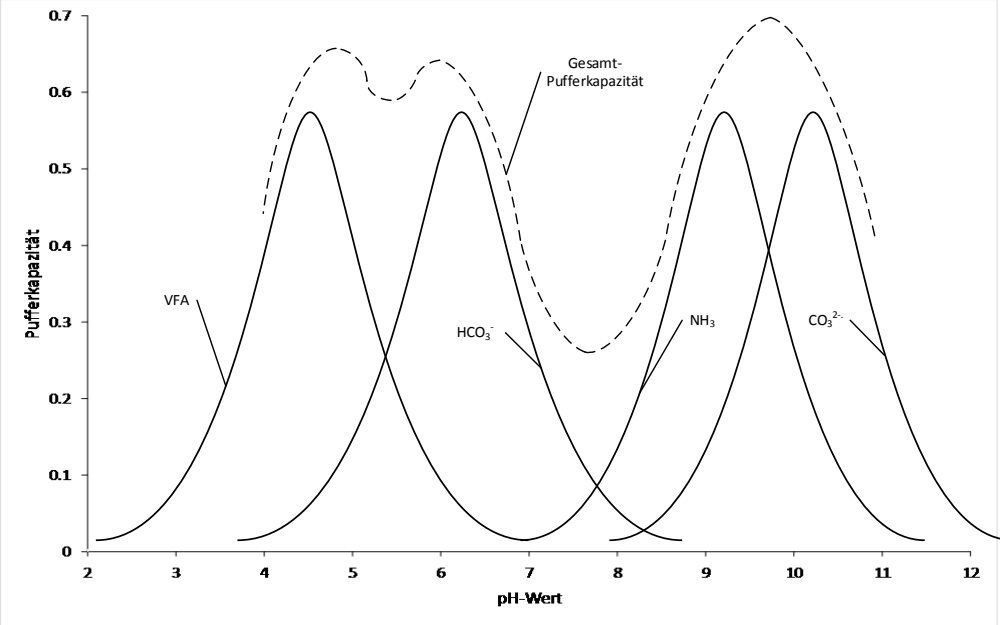


Abbildung A4: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Puffersysteme von Biogasanlagen. FOS = VFA = Summe der Volatile Fatty Acids (Georgacakis et al. 1982).

Ein tieferer Titrationsendpunkt als 5,0 für die Bestimmung von TAC wurde nicht erwogen, um bei hohen Fettsäurekonzentrationen und einer eventuellen Übersäuerungen nicht unnötig den Pufferbereich von Fettsäuren (pH 6 – pH 2) im TAC-Wert mit zu erfassen. Mit pH 5,0 ist aber der dominante Hydrogencarbonat- und Ammoniumpuffer weitgehend berücksichtigt (Abbildung A4), was aber auch schon Kapp (1984) feststellte.

Der Vergleich der Analysenergebnisse der beiden Messmethoden zeigte, dass der neue FOS/TAC-HAW exakt mit den mittels GC bestimmten Fettsäuren von 500 – 2500 mg/L korrelierte und mit dem Fettsäuremaximalwert 5250 mg/L die FOS/TAC-Grenze von 0,6

durchbrach (Abbildung A5). Der FOS/TAC-HAW reagierte dabei eine ganze Versuchswoche früher (161. VW), während der FOS/TAC nach Nordmann die erhöhte Fettsäurekonzentration nicht aussagefähig erfasste und eine Woche zu spät einen überhöhten FOS/TAC-Wert von 0,62 anzeigte (162. VW), als bereits über 1500 mg/L Fettsäuren wieder abgebaut waren. Aufgrund der Messungen und aufgrund der theoretischen Betrachtungen erscheint der FOS/TAC-Wert nach Nordmann in einem stark gepufferten System (Gülle-Biogasanlagen) zur Frühwarnung von Prozessstörungen als nicht geeignet. In jedem Fall aussagekräftiger ist das quantitative Fettsäuremuster über GC oder HPLC. Die Alkalinität indiziert hingegen den durch Pufferung gesicherten Bereich. Als Reserve-Alkalinität gilt TAC minus FOS bzw. VFA. Nach Speece (1996) ist zur Erhaltung eines pH-Werts von 7,0 eine Pufferkapazität von etwa 6000 mg $CaCO_3$-Äquivalenten erforderlich. Hier lagen aber die TAC-Werte bei 9 – 12.000 mg $CaCO_3$-Äq., wie es für solche Gülle-Biogasanlagen typisch ist. Damit ist eine Übersäuerung (pH < 7,0) einer solchen Anlage schätzungsweise erst bei einem VFA-Spiegel in derselben Größenordnung des TAC-Wertes möglich.

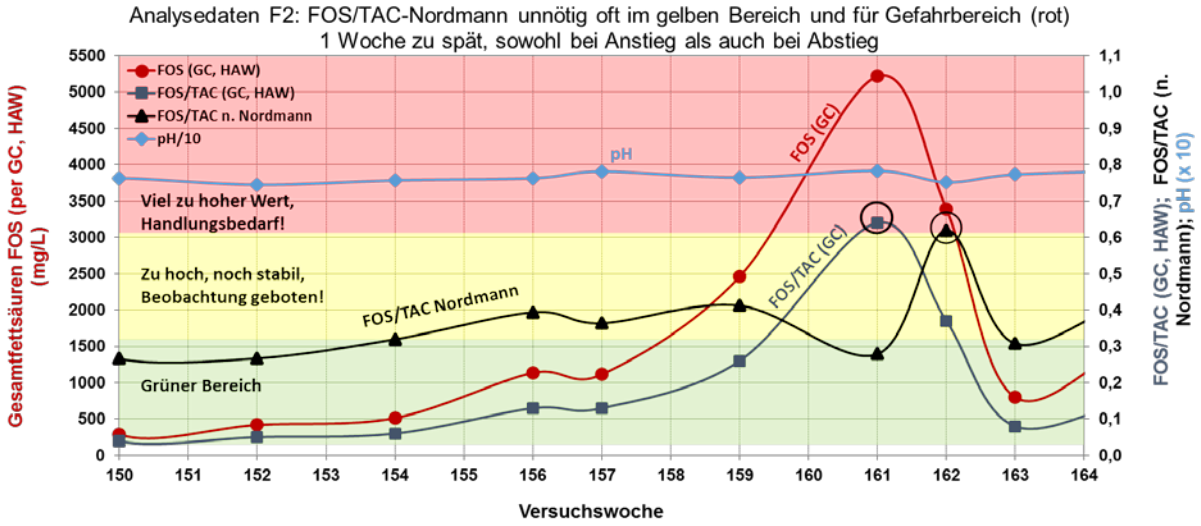


Abbildung A5: Beprobung des Fermenters F2 der untersuchten Biogasanlage über die 150. – 164. Versuchswoche, um die Charakteristika des FOS/TAC-Index nach Nordmann (1977, 2-fache Titration lediglich) mit der des FOS/TAC-HAW zu vergleichen, bei dem die Fettsäuren genau bestimmt und nicht abgeschätzt werden (siehe ergänzend Abbildungen 13 und 14 des Hauptberichtteils).

Der pH-Wert hingegen war noch weniger als Prozessindikator brauchbar, da er sich quasi überhaupt nicht zwischen der 150. – 164. Versuchswoche änderte. In schwächer gepufferten Systemen (Faultürmen, Biogasanlagen mit wenig oder keiner Gülle) hat der FOS/TAC nach Nordmann dagegen eine ausreichende Genauigkeit, wobei dann aber in solchen Anlagen auch der pH-Wert alleine zur Prozesskontrolle herangezogen werden könnte.

III.4 Analysenwerte des unbeheizten Endlagers und zum Gülle-Input der untersuchten Biogasanlage

Tabelle A4: Analysenergebnisse des unbeheizten Endlagers

Versuchswoche	pH	Gesamtfettsäuren VFA (mg/L)	Essigsäure (mg/L)	Propionsäure (mg/L)	NH_4 (mg/L)	PO_4 (mg/L)
105	7.56	416	392.75	20.85	2205	144
106	7.46	482.4	445.35	29.6	2052	135
107	7.53	524.3	494.7	21.8	2039	152
108	7.56	376.1	359.55	13.65	2133	146
109	7.53	328.8	316.35	8.9	2460	152
110	7.74	516.5	490.6	19.8	2208	133
111	7.79	328.3	313.45	12.75	1984	116
112	7.64	300.3	288.05	10.15	2761	171
113	7.73	291.5	278.6	9.15	2575	140
114	7.65	310.5	298.45	9.55	3252	177
115	7.72	418.9	404.55	12.45	3254	137
116	7.99	2373.5	1235.15	966.1	2878	176
117	7.63	374.3	355.9	15.2	3133	189
118	7.67	193.1	184.45	7.35	3285	170
119	7.77	184.1	173.45	8.25	2987	155
120	7.7	131.6	124.75	5.45	2302	156
121	7.67	166.1	158.1	6.65	2864	159
122	7.82	188.5	174.3	11	3193	150
123	7.62	34.9	27.2	6.7	3435	87
124	7.85	159.5	148	7.2	2976	70
125	7.77	60	55.6	3.4	3098	84
126	7.86	144.3	40.8	95.55	3111	152
127	7.93	144.1	41	94.8	2949	141
128	7.92	69.2	55.7	9.6	2836	150
129	7.91	77.2	69.4	6.2	3063	155
130	7.93	183.2	173.3	7.9	2750	167
131	7.84	301.1	280.6	14.7	2911	159
132	7.82	698.6	668.15	25.3	2855	212
133	7.78	421.8	398.8	18.85	2619	165
134	7.84	371.7	361.65	8	2780	166
135	7.81	740.2	715	19.5	2823	166
136	7.96	874.4	843.1	23.2	2766	148
137	7.89	929.4	912.7	12.35	2865	162
138	7.8	580.2	567.8	10.5	3004	168
139	7.83	636.5	624.3	10.35	3109	149
140	7.83	639.6	625.8	7.95	2598	133
141	7.77	693.25	676.55	10.9	2852	127
142	7.81	864.2	846.45	11.65	3268	135
143	7.81	649.5	631	12.75	2688	132
144	7.77	98.4	86.45	8.1	2605	125
145	7.82	93.4	81.85	9.2	3240	135
146	7.8	115.6	104.3	7.85	3468	167

Tabelle A5: Analysenergebnisse der Substrat-Rindergülle

Versuchs-woche	oTS (%)	TS (%)	TAC (mg $CaCO_3$/L)	Gesamt-fettsäuren (mg/L)	Essigsäure (mg/L)	Propionsäure (mg/L)	NH_4 (mg/L)	PO_4 (mg/L)
24	8.58	10.78	9970				2268	701
25	5.78	7.29	8560				2848	683
26	7.1	8.92	4270				2197	248
27	5.55	6.91	6520				2074	265
28	7.05	8.87	8680				2013	204
35	5.86	7.2	8060				1754	253
41	7.01	8.89	8780				2015	244
42	6.83	8.33	8040				1951	132
44	4.12	5.1	6520				1558	136
45	4.44	5.58	7320	4378.7	2813.3	887.95	1847	219
46	5.08	6.32	6730				1408	241
47	3.75	4.74	6730	2770.3	1854	485	1554	236
49	6.4	8.82	8770	5287.3	3362.5	1034.55	1999	306
50	4.67	5.72	6310	3991.6	2617.8	727.7	1553	148
51	5.3	6.59	8230	4477.4	2977.35	768.75	1965	209
53	4.37	5.55	7670	3888	2684.4	686.15	1724	183
54	3.92	4.85	6250	4253.3	2716.2	772.1	1374	156
56	4.4	5.82	6910	3202.2	2219.75	512.4	1489	124
57	4.03	5.03	6560	3691.5	2468.2	611.95	1446	225
58	5.19	6.51	7710	5599.4	3728	967.3	1813	131
59	4.38	5.5	6940	5319.6	3481.45	954	2311	126
61	4.75	5.2	5540	6166.6	3990	1113.4	1541	153
63	6.42	7.89	7950	6582.9	4634.5	921.6	2079	132
65	2.03	2.66	6350	4076.9	2418.1	826	1455	184
67	4.11	4.96	5300	3678.5	2163.8	813.8	1378	159
69	1.87	2.43	4490	1922.1	1178.8	510.4	1195	145
70	2.22	2.83	6060	3142.5	2059	746.6	1124	152
71	4.65	5.68	7070	3584.7	2434.5	779.25	1767	132
73	6.44	7.91	9150	6265.4	4070	1251	2245	170
74	4.87	6.09	7660	3249.2	2089.75	754.8	1858	159
75	3.96	5.13	7490	1356.6	1024.9	220.55	1878	131
77	6.25	7.79	8190	1878	1268	352.8	2100	141
79	4.1	5.05	5630	4331.7	2829.75	1043	1771	115
80	4.77	5.9	3290	5492.5	3360	1589.25	1819	106
81				3302.9	1956.75	1106.95		
83	6.33	7.71	8660	3577.4	2516.65	805.15	1888	112
84	5.92	7.48	8740	1912.4	1275.45	475.2	1861	147
85	6.41	8.02	7780	3872.7	2666.95	829.55	1547	122
86	4.99	6.08	6180	3319.3	2232	266.75	1221	129
87	4.69	5.81	6960	3432.4	2361.1	214.2	1529	146
88	6.2	7.76	8560	5033.3	3501	825.3	1941	126
89	5.66	7.08	7760	3910.6	2525	807.35	1917	118

Versuchs-woche	oTS (%)	TS (%)	TAC (mg $CaCO_3$/L)	Gesamt-fettsäuren (mg/L)	Essigsäure (mg/L)	Propionsäure (mg/L)	NH_4 (mg/L)	PO_4 (mg/L)
90	4.77	5.94	6120	3464	2180.15	759.95	1832	135
91	5.05	6.22	6530	4659.5	2511.4	1107	1550	127
92	2.6	3.33	5100	3292.7	1788.35	883	1489	110
93	6.17	7.5	6280	3272.6	2088.8	596.5	1456	129
94	5.3	6.42	5630	6774.3	3727.5	1305.45	1153	126
97	5.36	6.46	5970	4115	2481.75	847.85	1664	119
98	3.11	3.86	5470	3197.7	2170	522.95	1499	105
99	3.55	4.37	5860	2782.4	1979.75	429.6	1787	105
100	6.4	7.78	7920	3231.4	2268	573.8	1942	121
101	4.58	5.57	5820	3591.2	2796	493	1395	108
102	2.58	3.22	4610	3405	2180.75	501.6	1219	145
103	6.19	7.41	6240	3710.1	2085.75	796.95	1614	129
104	4.24	5.16	5440	3911.8	2661.6	685.9	1350	120
105	6.49	7.97	5810	3889.5	2661	665.35	1390	123
106	2.98	3.74	5050	3733	2558.35	677.2	1477	102
107	5.64	6.85	6500	5491.1	3577.2	1010.9	1654	125
108	5.1	6.61	6760	4682.5	3175.25	856.1	1610	130
109	5.75	6.99	6040	5779.1	3567.1	1162.4	1618	125
110	5.04	6.22	6560	6996.3	4404.45	1483.55	1669	121
111	5.18	6.38	6630	4929.1	3292.7	884	1745	109
112	6.37	7.7	7620	6942.8	4753.8	1288.05	2055	138
113	4.04	5.05	6010	4349.6	2883	855.35	1018	110
114	3.64	4.68	7400	4919.7	3080.95	1057.05	1900	132
115	6.76	8.72	8670	7097.5	4615	1487.75	2342	128
116	5.83	7.27	7390	5815	3779.55	1171.75	1939	141
117	4.2	5.45	6910	6152.5	4168.9	1180.9	1880	310
118	5.03	6.34	7780	6079.6	4045.85	1205.9	1925	150
119	5.61	6.92	7670	5633.8	3912.75	998.5	3036	160
120	7.75	10	9900	8371.4	5686.5	1532.6	2342	147
121	5.93	7.75	8770	6357.2	4488.5	1107.1	2134	150
122	5.89	7.38	9540	9241.6	6614.25	1605.55	2291	142
123	5.46	6.95	9240	8462.5	5908.5	1550.9	2315	145
124	4.09	5.31	8480	4671.9	3428.9	741.5	1843	60
125	5.46	6.93	9970	6333.3	4283.5	1227.55	2136	76
126	4.96	6.24	7070	6680.4	4565.45	1213.3	1835	128
127	6.49	8.01	7730	7565.9	5153.2	1448.35	1816	145
128	3.59	4.64	7670	6996.1	4643.25	1362.5	2094	130
129	5.39	6.82	7560	6555.7	4322.7	1324.75	1675	140
130	5.64	7.18	7450	7483.3	5259.05	1381.5	1642	155
131	6.25	7.76	8795	6112.7	4482.05	925.6	1990	137
133	5.1	6.46	6790	5571.1	3604.35	1074.45	1802	148
134	4.55	5.76	7090	5607.9	3784.05	1008.9	1699	136

Versuchs-woche	oTS (%)	TS (%)	TAC (mg $CaCO_3$/L)	Gesamt-fettsäuren (mg/L)	Essigsäure (mg/L)	Propionsäure (mg/L)	NH_4 (mg/L)	PO_4 (mg/L)
135	6	7.38	7700	6456.5	4166.65	1297.15	1670	156
136	2.5	3.4	6410	5921.5	3884.85	1136.35	1533	134
137	3.17	4.17	6760	6227.2	3923.4	1378.85	1546	162
138	3.24	4.24	6240	7229.5	4725.65	1425.7	1626	136
139	5.96	7.27	7860	7627.9	4863.4	1538.6	1763	134
140	4.93	6.2	7500	7229.3	4762.95	1380.4	1666	132
141	6.25	7.7	8040	8249.65	5526.95	1482.45	1911	121
142	3.74	4.71	6360	5317.9	3715.05	883.85	1513	120
143	5.48	6.92	7840	5788.1	3939.65	1047.25	1560	124
144	5.24	6.61	6330	5584.3	3658	1102.35	1656	108
145	4.51	5.5	5340	4109.3	2599.75	835.1	1462	111
146	5.39	6.8	8080	4528.4	3218.9	743	2158	133

III.5 Zusammenfassung des Vorhabens (deutsch und englisch)

Zuwendungsempfänger: Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Forschungsschwerpunkt „Biomassenutzung Hamburg“, Fakultät Life Sciences, Biogaslabor: Prof. Dr. Paul Scherer, Dr. Sandra Off Ulmenliet 20, 21033 Hamburg	Förderkennzeichen: 22011710
Thema: Entwicklung eines Biogasprozesses zur hygienisierenden Vergärung	
Laufzeit des Vorhabens: 01.03.2012 - 31.12.2016	

Projektbeschreibung:

Die Biogasanlage eines Milchviehwirts (Seth, Deutschland) wurde über drei Jahre wöchentlich im laufenden Betrieb fermentationsanalytisch untersucht (Fettsäuremuster, Pufferkapazität/ Alkalinität TAC, TS/oTS, pH, Salzgehalt, Ammonium/Ammoniak). Die volumetrische Gasproduktion als auch die Gaszusammensetzung wurden von jedem der drei Reaktoren abschnittsweise über eine eigene Gasmessstation überwacht, wobei die Daten über Mobilfunk an die HAW übertragen wurden. Mit einer neuen Methode wurden zum ersten Mal für den Nonstop-Dauerbetrieb einer Großanlage die bioverfügbaren, gelösten Spurenelemente im µg/L-Bereich überwacht. Bei stabilem Betrieb betrug die hydraulische Verweilzeit der Reaktoren jeweils nur 11,5 Tage, die organische Beladungsrate lag bei 14 kg oTS/(m^3×d). Der Fokus richtete sich auf den Testreaktor F3. Die Temperatur von F3 wurde langsam von 53 °C auf 59 °C erhöht (0,5 °C/Woche), dann auf 53 °C wieder abgesenkt und das Ganze nach mehreren Monaten wiederholt. Die Temperatur der beiden parallelen Referenzreaktoren F1/F2 betrug konstant 51 °C oder 53 °C.

Der Hygienestatus der Biogasanlage wurde monatlich überprüft. Dazu wurden Proben der Rindergülle, der Reaktoren und des Gärrestes genommen und durch konventionelle Plattentechnik auf Indikatororganismen zur Beurteilung der Hygiene untersucht. Außerdem wurden Gesamtbakterien- und Methanbildnerzahlen mittels einer an der HAW entwickelten Software zum Quantitativ Microscopic Fingerprinting (QMF) erfasst.

Die Vielfalt der mikrobiellen Population inkl. eventuell pathogener Bakterien wurde ferner durch die moderne NGS-Technik (Next Generation Sequencing) mittels Illumina MiSeq untersucht. Das eingesetzte prokaryotische Primerpaar zielte dabei auf die hypervariable Region V3 – V4 des 16S-rRNA-Gens von Bakterien und Archaeen ab.

Projektergebnisse:

Die Untersuchungen zur Prozessstabilität und den Gasproduktionsraten der Biogasanlage ergaben, dass die Gas- bzw. Methanproduktion unter den hygienisierenden, thermophilen Temperaturen von 57 – 59°C ohne signifikante Leistungseinbußen möglich war. Die Reaktortemperatur von 51 °C erwies sich jedoch als deutlich schlechter. Der pH-Wert lag bei allen Reaktoren stabil bei 7,6 – 8,0. Der Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren blieb nach Supplementierung einer nickelhaltigen Spurenelement-Mischung beständig unter 1000 mg/L und im Endlager unter 200 mg/L. In der hygienisierend thermophilen Biogasanlage mit hoher Güllebelastung lagen bei einem Ammoniumspiegel von 1500 – 2500 ppm die Ammoniakwerte

ebenfalls relativ hoch zwischen 200 – 600ppm, was jedoch zu keiner messbaren Hemmung der Gasproduktion führte

Es konnte ein drastischer Hygieneeffekt durch eine fast 10.000-fache Reduktion von coliformen Enterobakterien (einschl. *E. coli*) und Enterokokken bei 57 – 59°C beobachtet werden. Salmonellen wurden nur in Proben der Rindergülle, nicht aber in den Biogasreaktoren und im Endlager nachgewiesen.

Die Mikrobiomanalysen per NGS-Technik zeigten einen sehr raschen und charakteristischen Umbau der Güllemikroorganismen in eine thermophile Flora. Dabei kam es zu kurzzeitig erhöhten Fettsäurewerten. Der Vergleich der methanogenen Population der Rindergülle mit den Proben aus den Biogasreaktoren ergab, dass die Gattung *Methanobrevibacter* in der Rindergülle zu 90 % dominierte, in den Reaktorflüssigkeiten war es jedoch dafür *Methanosarcina*. Mikroskopische Analysen offenbarten, dass der Morphotyp von *Methanosarcina* sich vollständig von den bekannten Zellpaketen unterschied und in Form einzelner Kokken auftrat. Ein erhöhtes Vorkommen der Gattung *Methanothermobacter* wurde bei Temperaturen über 57 °C beobachtet. Mit Hinblick auf die hydrolytischen Bakterien war die kontinuierliche Zunahme der einzelnen Art *Defluviitoga tunisiensis* parallel mit ansteigender Temperatur einzigartig und beispiellos in der Literatur. Das Vorkommen von *D. tunisiensis,* welches ein sehr breites Substratspektrum besitzt, stieg bis auf 67 % der gesamten mikrobiellen Population bei 59 °C als Maximum. *D. tunisiensis* erscheint daher als neues Indikatorbakterium zur Erkennung der optimalen Hygienisierungstemperatur und eines stabilen thermophilen Biogasprozesses geeignet.

Short Project Description

Beneficiary: Hamburg University of Applied Sciences, Faculty Life Sciences, Biogas laboratory: Prof. Dr. Paul Scherer, Dr. Sandra Off Ulmenliet 20, 21033 Hamburg-Bergedorf, Germany	Project number: 22011710
Project title: Development of a biogas process for sanitizing anaerobic digestion	
Project : 01.03.2012 - 31.12.2016	

Project objective:

The full-scale biogas plant of a dairy cattle farm (Seth, Germany) was tested for fermentation analysis (volatile fatty acids, bioavailable trace elements in the sub-ppm range, dry solids/organic dry solids, total inorganic alkalinity, ammonium/ammonia, etc.) during regular nonstop operation over a period of three years. The volumetric gas production as well as the gas composition was monitored by each of the three reactors separately via an extra gas measuring station. The data being transmitted to the HAW via cellular phone network. Each of the three parallel-connected, cylindrical biogas reactors received the same substrate with up to 70 % cattle manure in an hourly pulse. During stable operation, the hydraulic residence time of the reactors was only 11.5 days, the organic loading rate was 14 kgVS/(m³×d). Focus was set on the test reactor F3. The temperature of F3 was slowly increased from 53 °C to 59 °C (0.5°C/week) and then lowered again. The temperature of the reference reactors F1/F2 was hold constant 51 °C or 53 °C.

The hygienic status of the biogas plant was examined monthly. For this purpose, samples of the cattle manure, the reactors and the fermentation residue were taken and examined by conventional plate technology on indicator organisms for the assessment of hygiene. The chemical analyses of the thermophilic fermentation processes were weekly performed. In addition, total bacteria and methanogens numbers were quantified by a software called “Quantitative Microscopic Fingerprinting” (QMF) developed at the Hamburg University of Applied Sciences.

The diversity of the microbial community including possible pathogens was investigated using the modern NGS technology (Next Generation Sequencing) using Illumina MiSeq. The prokaryotic primer pair employed targeted the hypervariable region V3 – V4 of the 16S-rRNA gene of bacteria and archaea.

Project results:

The studies on the process stability and the gas production rates of the biogas plant showed that process temperatures in the sanitizing thermophilic range of 57 – 59°C did not direct to decreased gas and methane production, but apparently the productivity at reactor temperature 51 °C was somewhat lower. The pH was stable by 7.6 – 8.0. The content of short-chain fatty acids remained constantly below 1000 mg/L after supplementation of a nickel-containing trace element mixture. In the effluent tank, the content of VFA was below 200 mg/L. In the biogas reactors, the ammonia (200 – 600 mg/L) and ammonium (1500 – 2500 mg/L) were quite high due to the high manure load, but this did not lead to any measurable inhibition of the gas production.

A drastic sanitation effect by an almost 10,000-fold reduction of coliform enterobacteria (including *E. coli*) and enterococci could be observed at 57 – 59°C. Salmonellae were detected only in samples of the cattle manure, but not in the biogas reactors or in the final effluent tank.

The analysis of microbiomes by NGS technology exhibited a quick and characteristic rebuilding and change of the manure immanent microorganisms into a new thermophilic population. This was accompanied by temporarily elevated fatty acid levels. The comparison of the methanogenic population of the cattle manure with the samples from the biogas reactors revealed that the genus *Methanobrevibacter* dominated 90 % the cattle manure but instead of this *Methanosarcina* in the reactor fluids. In addition, microscopic investigations revealed surprisingly that the morphotype of the genus *Methanosarcina* differed completely from the known cell packets and occurred in the form of single cocci. An increased occurrence of the genus *Methanothermobacter* could be observed at temperatures above 57 °C. With respect to the hydrolytic bacteria, the continuous increase of a single species with elevating the temperature was unique and lacked a precedent. The presence of *Defluviitoga tunisiensis* having a very broad substrate spectrum increased up to 67 % of the total microbial community at the temperature of 59 °C. Therefore, *D. tunisiensis* can be used as a new indicator bacterium for the right sanitation temperature and a stable thermophilic biogas process.