

ENTWICKLUNG EINES
MIKROBIOLOGISCHEN SCHNELLTESTS ZUR
PROZESSOPTIMIERUNG VON BIOGASANLAGEN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Biol. Carina Gasch

geboren am 18.07.1981 in Bad Kreuznach

Gutachter: Prof. Dr. habil. I. Röske (Technische Universität Dresden)

Prof. Dr. habil. T. Bley (Technische Universität Dresden)

Tag der Einreichung: 18.10.2013

Datum der Disputation: 05.02.2014

Es ist nicht genug zu wissen, man muss es auch anwenden.

Es ist nicht genug zu wollen, man muss es auch tun!

– Johann Wolfgang von Goethe –

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	V
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN & TABELLEN IM ANHANG.....	VI
1 EINLEITUNG	1
2 ZIELSETZUNG.....	5
3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	7
3.1 Der Prozess der anaeroben Fermentation.....	7
3.1.1 Hydrolyse und Acidogenese	7
3.1.2 Acetogenese	9
3.1.3 Methanogenese	9
3.2 Vergärungsverfahren von Biogasanlagen.....	11
3.2.1 Anzahl der Prozessstufen.....	12
3.2.2 Prozesstemperatur.....	13
3.2.3 Trockensubstanzgehalt der Gärsubstrate	14
3.2.4 Kontinuierliche und diskontinuierliche Fermentation.....	14
3.2.5 Biogassubstrate	15
3.3 Einflussfaktoren auf die Biogasbildung	16
3.3.1 Verfahrenstechnische Einflussfaktoren	17
3.3.2 Chemische Einflussfaktoren.....	18
3.3.3 Mikrobiologische Einflussfaktoren.....	20
3.4 Parameter zur Prozesskontrolle	20
4 MATERIAL & METHODEN.....	25
4.1 Charakterisierung der untersuchten Biogasanlagen.....	25
4.1.1 Betrachtete Biogasanlagentypen.....	26
4.1.1.1 Containeranlage.....	26
4.1.1.2 Fassanlage	28
4.1.1.3 Pilotanlage.....	29
4.1.2 Füllkörper der Methanstufe	29
4.1.3 Fermentierte Substrate.....	30
4.2 Untersuchte Proben	31
4.2.1 Probenahme und Transport	31
4.2.2 Physikochemische Analysen	34
4.3 Probenvorbehandlung	34
4.3.1 Ablösen der Biomasse von dem Substrat	35
4.3.2 Ablösen des Biofilms von den Füllkörpern	35
4.3.3 Fixierung der Proben.....	35
4.3.4 DNA-Extraktion	36
4.3.5 Polymerasekettenreaktion	36
4.4 Bestimmung von Biomasseparametern.....	38

4.4.1	Trockensubstanz.....	38
4.4.2	Mikrobielle Gesamtzellzahl.....	39
4.4.3	Protein-Gehalt.....	39
4.4.4	DNA-Gehalt.....	40
4.4.5	Biofilmdicke.....	43
4.5	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	43
4.5.1	Allgemeine heterotrophe Abbauaktivität.....	43
4.5.1.1	Klassische Methode.....	44
4.5.1.2	Schnelltest.....	45
4.5.2	Aktivität von Protein-hydrolysierenden Enzymen.....	47
4.5.2.1	Allgemeine Proteaseaktivität.....	47
4.5.2.2	Exo-Proteaseaktivität.....	48
4.5.3	Aktivität von Polysaccharid-hydrolysierenden Enzymen.....	49
4.6	Bestimmung der mikrobiellen Respiration.....	51
4.6.1	Aerobe Respiration.....	51
4.6.1.1	Atmungsaktivität nach vier Tagen.....	51
4.6.1.2	Biologischer Sauerstoffbedarf in fünf Tagen.....	52
4.6.2	Anaerobe Respiration.....	52
4.7	Quantifizierung von Mikroorganismen.....	54
4.7.1	Detektion Methanogener mittels F_{420} -Eigenfluoreszenz.....	55
4.7.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung.....	56
4.7.3	Quantitative real-time PCR.....	58
4.8	Phylogenetische Analysen.....	60
4.8.1	Denaturierende Gradientengelelektrophorese.....	60
4.8.2	Sequenzanalyse.....	62
5	ERGEBNISSE & DISKUSSION.....	65
5.1	Evaluierung geeigneter Kontrollparameter.....	65
5.1.1	Gesamtproteingehalt.....	65
5.1.2	DNA-Gehalt.....	67
5.1.3	Fluoreszenz des Coenzym F_{420}	69
5.1.4	Anaerobe Respirationsmessung.....	71
5.2	Überwachung der Biogasanlage im Normalbetrieb.....	74
5.2.1	Analyse der mikrobiellen Biomasse.....	74
5.2.1.1	Trockensubstanz.....	74
5.2.1.2	Gesamtzellzahl.....	78
5.2.1.3	Quantifizierung von Mikroorganismen in situ.....	79
5.2.2	Analyse mikrobieller Aktivität und Funktionspotentiale.....	84
5.2.2.1	Allgemeine heterotrophe Abbauaktivität.....	84
5.2.2.2	Spezifische Hydrolaseaktivitäten.....	87
5.2.2.3	Mikrobielle Atmungsaktivität.....	90
5.3	Überwachung der Biogasanlage bei Störfällen.....	92
5.3.1	Prozessstörung durch Pumpenausfall.....	93
5.3.2	Modifikation der Perkolationsrate.....	95
5.3.3	Modifikation im Perkolator.....	98
5.3.4	Modifikation des Speicher 2.....	101

5.4	Überwachung der Biogasanlage mit HCH-belasteter Grassilage als Substrat	106
5.4.1	Chemische Analysen	106
5.4.2	Analyse der mikrobiellen Biomasse	110
5.4.2.1	Trockensubstanz	110
5.4.2.2	Gesamtzellzahl	111
5.4.2.3	Quantifizierung von Mikroorganismen in situ	112
5.4.3	Analyse mikrobieller Aktivität und Funktionspotentiale	115
5.4.3.1	Allgemeine heterotrophe Abbauaktivität	115
5.4.3.2	Spezifische Hydrolaseaktivitäten	116
5.4.3.3	Mikrobielle Atmungsaktivität	117
5.4.4	Potentieller mikrobieller β -HCH-Abbau in Biogasanlagen	120
5.5	Analyse des Biofilms auf den Füllkörpern der Methanstufe	122
5.5.1	Analyse der mikrobiellen Biomasse	123
5.5.1.1	Biofilmdicke und Trockensubstanz	123
5.5.1.2	Gesamtzellzahl und Quantifizierung von Mikroorganismengruppen	125
5.5.2	Diversitätsanalyse der Biozönose	131
5.5.2.1	Diversität der Archaea	131
5.5.2.2	Diversität der Bacteria	140
5.5.3	Vergleich der Methanreaktoren	148
5.6	Wechselwirkungen verschiedener Kenngrößen im Biogasprozess	151
5.6.1	Eingangsmaterial	151
5.6.2	Hydrolyse im Perkolator	153
5.6.3	Hydrolysat	154
5.6.4	Methanisierung	155
5.6.5	Übersicht der Zusammenhänge	156
5.7	Entwicklung des Esterase-Schnelltests	161
5.7.1	Charakteristika des Esterase-Assays	161
5.7.2	Bestimmung eines effizienten Stoppreagenzes	162
5.7.3	Messbereichserweiterung	165
5.7.4	Reduktion des apparativen Aufwandes	167
5.7.5	Entwurf des Esterase-Schnelltests	168
6	ZUSAMMENFASSUNG & SCHLUSSFOLGERUNG	171
6.1	Analytische Begleitung des Biogasprozesses	171
6.2	Vergärung von HCH-belasteter Grassilage	174
6.3	Biozönose der Methanstufe	174
6.4	Ansätze zur Prozessoptimierung	175
6.5	Einsatz mikrobieller Parameter zur Prozesskontrolle	176
6.6	Esterase-Schnelltest	177
7	LITERATUR	179

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abl.	Ablauf des Perkolators	FA	Formaldehyd
ad.	auffüllen auf	FAM	fluorescein amidite (6-Carboxyfluorescein)
APS	Ammoniumperoxodisulfat	FDA	Fluoresceindiacetat
ARC	Archaea	FFS	flüchtige Fettsäuren
AT	Adenin und Thymin	FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
AT ₄	Atmungsaktivität nach vier Tagen	FK	Füllkörper
AUS	Ausgangsmaterial \triangleq Gärrest	FM	Frischmasse
BAC	Bacteria	FO	Formamid
BGD	Boden- und Grundwasserlabor Dresden	FOS/TAC	flüchtige organische Säuren/ totaler anorganischer Kohlenstoff (carbon)
BGR	Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe	GB ₂₁	Gasbildungspotential nach 21 Tagen
β -HCH	beta-1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan	GC	Guanin und Cytosin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	GICON	Großmann Ingenieur Consult
bp	Basenpaare	GZZ	Gesamtzellzahl
B _R	Raumbelastung	GA	Glutardialdehyd
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)	HCH	Hexachlorcyclohexan
BSB ₅	Biologischer Sauerstoffbedarf in fünf Tagen	I-TEQ	International Toxic Equivalents (Internationale Toxizitätsäquivalente)
C _q	quantification cycle (Quantifizierungs-Zyklus)	IU	Internationale Units (Internationale Einheit)
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf	kb	Kilobasen
Cy3	Indocarbocyanin	log	Logarithmus zur Basis 10
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	MSM	Methanosarcinales und Methanomicrobiales
ΔG°	Änderung der Gibbs-Energie unter Standardbedingungen	n	Stichprobenmenge
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese	NaF	Natriumfluorid
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.	NawaRo	Nachwachsende Rohstoffe
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)	NCBI	National Center for Biotechnology Information
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid (doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure)	Nm ³	Normkubikmeter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	oTS	organische Trockensubstanz
EE	Erneuerbare Energien	P2	Perkolator 2 der Pilotanlage
EEG	Erneuerbare Energien-Gesetz	p. a.	pro analysi (zur Analyse)
EIN	Eingangsmaterial \triangleq frisches Substrat	PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
EJ	Exajoule	PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen	PES	Polyethersulfon
<i>et al.</i>	und andere	pH	potentia hydrogenii ("Kraft des Wasserstoffs")
F	Fass	p-Wert	Signifikanzwert
		qPCR	quantitative polymerase chain reaction (quantitative Polymerasekettenreaktion)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

r	Korrelationskoeffizient
r ²	Determinationskoeffizient
rDNA	ribosomal deoxyribonucleic acid (ribosomale Desoxyribonukleinsäure)
RDP	Ribosomal Database Project (ribosomales Datenbank-Projekt)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
rpm	Runden pro Minute
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Sp 1 / 2	Speicher 1 / 2
StrEG	Stromeinspeisegesetz
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockensubstanz
TWh	Tera Wattstunde
U	Units
UASB	upflow anaerobic sludge blanket (anaerober Aufstrom-Schwebefilter)
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviolettstrahlung
ZnAc	Zinkacetat
ZZ	Zellzahl

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Anteile der erneuerbaren Energien am Endenergieverbrauch in Deutschland.....	2
Abbildung 3-1: Stadien der Biogasproduktion mit relevanten Mikroorganismengruppen	7
Abbildung 3-2: Biogasproduktion in Deutschland von 1992 bis 2013	11
Abbildung 4-1: Zweistufige Trocken-Nass-Fermentation mit getrennter Hydrolyse	26
Abbildung 4-2: Schematischer Aufbau der betrachteten Containeranlage.....	27
Abbildung 4-3: Schematischer Aufbau der betrachteten Fissanlage	28
Abbildung 4-4: Pilotanlage in Schöllnitz	29
Abbildung 4-5: Füllkörper der Methanstufe	30
Abbildung 5-1: Proteinkonzentrationen von Proben aus verschiedenen Prozessstufen	66
Abbildung 5-2: DNA-Konzentrationen mittels verschiedener Analysebedingungen	67
Abbildung 5-3: Emissionsspektren des Coenzym F_{420}	69
Abbildung 5-4: Detektion Methanogener mittels Eigenfluoreszenz des Coenzym F_{420}	70
Abbildung 5-5: Methanogene Aktivität mittels Respirationsversuche	72
Abbildung 5-6: Trockensubstanz (TS und oTS) der Perkolatorproben im Normalbetrieb	75
Abbildung 5-7: Trockensubstanz (TS und oTS) der Perkolatorablaufproben im Normalbetrieb.....	76
Abbildung 5-8: Trockensubstanz (TS und oTS) des Speicher 2 im Normalbetrieb	77
Abbildung 5-9: Gesamtzellzahl im Normalbetrieb	78
Abbildung 5-10: Anteile der Bacteria und Archaea im Normalbetrieb.....	80
Abbildung 5-11: Anteile Cellulose-abbauender Mikroorganismen im Normalbetrieb.....	82
Abbildung 5-12: Anteile methanogener Archaeen im Speicher 2 bei Normalbetrieb	84
Abbildung 5-13: Esteraseaktivität im Normalbetrieb	85
Abbildung 5-14: Hydrolaseaktivitäten von Perkolatorproben im Normalbetrieb	88
Abbildung 5-15: Hydrolaseaktivitäten von Perkolatorablaufproben im Normalbetrieb.....	89
Abbildung 5-16: Atmungsaktivität nach vier Tagen von Perkolatorproben im Normalbetrieb	91
Abbildung 5-17: Auswirkungen verschiedener Parameter des Speicher 2 auf einen Pumpenausfall.....	93
Abbildung 5-18: Parameterabweichung bei Pumpenausfall	94
Abbildung 5-19: Parameterabweichung bei modifizierter Perkolationsrate.....	96
Abbildung 5-20: Parameterabweichung bei modifiziertem Perkolator	99
Abbildung 5-21: Parameterabweichung bei modifiziertem Speicher 2.....	102
Abbildung 5-22: Stoffliche Analyse der Ein- und Ausgangsmaterialien.....	108
Abbildung 5-23: Trockensubstanz (TS und oTS) bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage .	110
Abbildung 5-24: Gesamtzellzahl bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage.....	111

Abbildung 5-25: Archaea:Bacteria-Verhältnis bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage	113
Abbildung 5-26: Anteile verschiedener Mikroorganismengruppen bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage.....	114
Abbildung 5-27: Esteraseaktivität bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage	115
Abbildung 5-28: Cellulase- und Xylanaseaktivität bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage	116
Abbildung 5-29: Atmungsaktivität nach vier Tagen bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage.....	118
Abbildung 5-30: Biologischer Sauerstoffbedarf bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage....	119
Abbildung 5-31: Mittlere Biofilmdicke sowie Trockensubstanz (TS und oTS) des Biofilms	123
Abbildung 5-32: Gesamtzellzahlen und Zellzahlen bestimmter Mikroorganismengruppen des Biofilms	125
Abbildung 5-33: Mikrobielle Abundanzen in den abgelösten Biofilm-Fractionen	127
Abbildung 5-34: Anteile methanogener Archaeen in den Methanreaktoren.....	131
Abbildung 5-35: DGGE-Bandenmuster von 16S rDNA-Fragmenten der Archaea	133
Abbildung 5-36: DGGE-Bandenmuster von 16S rDNA-Fragmenten der Methanosarcinales und -microbiales	134
Abbildung 5-37: Phylogenetischer Stammbaum der reamplifizierten DGGE-Banden der methanogenen Archaea	137
Abbildung 5-38: Phylogenetischer Stammbaum der reamplifizierten DGGE-Banden der Crenarchaea	139
Abbildung 5-39: Anteile Cellulose-abbauender Mikroorganismen in den Methanreaktoren.....	141
Abbildung 5-40: DGGE-Bandenmuster von 16S rDNA-Fragmenten der Bacteria.....	143
Abbildung 5-41: Phylogenetischer Stammbaum der reamplifizierten DGGE-Banden der Bacteria....	146
Abbildung 5-42: Clusteranalyse der DGGE-Bandenmuster.....	149
Abbildung 5-43: Überblick über die detektierten Zusammenhänge bei der zweiphasigen Vergärung.	160
Abbildung 5-44: Weitere Zunahme der Esteraseaktivität nach der Reaktionszeit	162
Abbildung 5-45: Zunahme der Esteraseaktivität pro Stunde.....	164
Abbildung 5-46: Vergleich der ermittelten Enzymaktivitäten bei unterschiedlichen Wellenlängen.....	166
Abbildung 5-47: Absorptionsspektren von Fluorescein.....	167
Abbildung 5-48: Schematische Darstellung des Küvetten-Schnelltests zur Analyse der allgemeinen heterotrophen Aktivität (Esteraseaktivität).....	168

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3-1: Physiologische Merkmale der methanogenen Archaeen.....	10
Tabelle 3-2: Übersicht verschiedener Biogasverfahren	12
Tabelle 3-3: Übersicht verschiedener Biogassubstrate nach ihrem Herkunftsbereich	16
Tabelle 3-4: Zusammenfassung verschiedener Parameter zur Kontrolle von Biogasanlagen.....	23
Tabelle 4-1: Technische Daten der Füllkörper.....	30
Tabelle 4-2: Anlagenparameter und analysierte Proben.....	33
Tabelle 4-3: Untersuchte physikochemische Parameter.....	34
Tabelle 4-4: Primer zur PCR-analytischen Untersuchung für die DGGE und Sequenzierung	37
Tabelle 4-5: Laufpuffer für die Agarosegelelektrophorese	38
Tabelle 4-6: Reagenzien zur Bestimmung des Proteingehaltes	40
Tabelle 4-7: Vergleich von Bisbenzimid (Hoechst 33258) und PicoGreen™.....	41
Tabelle 4-8: Reagenzien zur Bestimmung des DNA-Gehaltes	42
Tabelle 4-9: Pipettierschema zur Bestimmung des DNA-Gehaltes	42
Tabelle 4-10: Reagenzien zur Bestimmung der Esteraseaktivität	44
Tabelle 4-11: Getestete potentielle Esterase-Inhibitoren.....	46
Tabelle 4-12: Reagenzien zur Bestimmung der allgemeinen Proteaseaktivität	47
Tabelle 4-13: Reagenzien zur Bestimmung der L-Alanin-Aminopeptidaseaktivität	48
Tabelle 4-14: Reagenzien zur Bestimmung der Menge reduzierender Zucker	50
Tabelle 4-15: Reagenzien zur Bestimmung der anaeroben Respiration.....	53
Tabelle 4-16: Reagenzien zur Analyse mittels FISH.....	56
Tabelle 4-17: Verwendete FISH-Sonden.....	57
Tabelle 4-18: Zusammensetzung des Hybridisierungs- und Waschpuffers	58
Tabelle 4-19: Archaea-spezifische Oligonukleotide für die qPCR.....	60
Tabelle 4-20: Zusammensetzung der Stammlösungen für die Herstellung des Gradientengels.....	61
Tabelle 4-21: Zusammensetzung des Doppelgradienten-Gels.....	62
Tabelle 5-1: Archaeelle Vertreter in den Biofilm- und Schlammproben der Methanreaktoren.....	136
Tabelle 5-2: Bakterielle Vertreter in den Biofilm- und Schlammproben der Methanreaktoren.....	145
Tabelle 5-3: Ermittelte Korrelationen mit den entsprechenden statistischen Werten.....	157
Tabelle 5-4: Vergleich der Schwebstoffentfernung durch Zentrifugation und Filtration	168
Tabelle 6-1: Analysepakete hinsichtlich unterschiedlicher Gesichtspunkte der Prozesskontrolle.....	177

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN & TABELLEN IM ANHANG

A-1: Evaluierung einer geeigneten Methode zum Ablösen der Biomasse vom Substrat	i
A-2: Evaluierung einer geeigneten Methode zum Ablösen des Biofilms von den Füllkörpern	i
A-3: Primersysteme und Programmierung des Cyclers für DGGE und Sequenzierung.....	ii
A-4: Chemische Analyse der Hydrolyse im Normalbetrieb.....	iii
A-5: Prüf- und Grenzwerte für die analysierten Schadstoffe der Grassilage.....	iii
A-6: Stoffliche Analyse des Prozesswassers	iv
A-7: Chemische Analyse der Hydrolyse bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage.....	iv
A-8: Übersicht β -HCH-abbauender Mikroorganismen	v
A-9: Mineralstoff-Analyse der Proben aus Beprobungsphase C4.....	vi
A-10: Taxonomische Einordnung der sequenzierten DGGE-Banden.....	vi

1 EINLEITUNG

Energie ist ein wichtiger Motor unserer Gesellschaft und der Industrie. Ihre Bereitstellung ist eine essentielle Voraussetzung für das Funktionieren des öffentlichen Lebens (Rempel 2011). Fossile Reserven (erschlossenen Vorkommen) decken derzeit den Großteil des weltweiten Energiebedarfs. Sie sind jedoch begrenzt. Die voraussichtliche Verfügbarkeit wird abgeschätzt mit der statistischen Reichweite, dem Verhältnis der bekannten Energie-Reserven zum aktuellen Jahreskonsum. Aufgrund der jährlich variierenden Fördermenge, ist eine Voraussage auch mit der statistischen Reichweite recht spekulativ (Mükusch 2011). Nach der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffen (BGR) wurden die weltweiten Reserven an nicht-erneuerbaren Energierohstoffen im Jahr 2007 auf 37.735 EJ (Exajoule) geschätzt. Dies entspricht, berechnet für 2007, einer statistischen Reichweite von 42 Jahren für Erdöl, 61 Jahren für Erdgas, 129 Jahren für Steinkohle und 286 Jahren für Braunkohle. Die statistische Reichweite von Uran beträgt, bezogen auf die Reserven von 2005, noch etwa 70 Jahre (BMW 2009, Stober & Bucher 2012). Im Jahr 2010 betrug die Förderung von nicht-erneuerbaren Energierohstoffen einem Energiegehalt von ca. 479 EJ. Bei dem Vergleich mit den 2010 geschätzten weltweiten Reserven (39.375 EJ) und Ressourcen (590.003 EJ, geologisch nachgewiesene Vorkommen) ergibt sich ein Verhältnis von etwa 1 zu 82 zu 1232 (Andruleit *et al.* 2011). Aus geologischer Sicht können demnach die globalen Energierohstoffe den zukünftigen Energiebedarf der nächsten Jahrzehnte bis Jahrhunderte decken. Fraglich ist jedoch, ob die Reserven und Ressourcen stets entsprechend des zukünftigen Bedarfs verfügbar sein werden und ob entsprechende alternative erneuerbare Energien rechtzeitig erschlossen werden können.

Erneuerbare Energien sind, im Unterschied zu fossilen Energien, Energien aus nachhaltigen Quellen, d. h. aus nachwachsenden bzw. grundsätzlich unerschöpflichen Energiequellen. Zu den derzeit nutzbaren erneuerbaren Energien zählen u. a. Bioenergien (Biodiesel, Bioethanol, Biogas, Pflanzenöl und Biomasse), Geothermie, Gezeitenkraft, Solarenergie, Wasserkraft und Windenergie (Einbock 2012).

In Deutschland wird der Ausbau erneuerbarer Energien zur Stromerzeugung als wesentliches Element für Klimaschutz, Umweltschutz und einer nachhaltigen Entwicklung mittels des Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) durch den Staat gefördert. Das EEG regelt die Abnahme und Vergütung von ausschließlich aus erneuerbaren Energiequellen gewonnenem Strom durch Versorgungsunternehmen, die Netze für die allgemeine Stromversorgung betreiben. Es ist erstmalig im Jahr 2000 in Kraft getreten und wurde in den Jahren 2004 und 2009 adaptiert. In den Jahren 2011 und 2012 hat die Bundesregierung das EEG erneut novelliert, um es gemäß den politischen Zielen und den aktuellen Marktentwicklungen im Bereich der erneuerbaren Energien anzupassen. Ziel ist u. a. den Anteil erneuerbarer Energien an der Stromversorgung bis 2020 auf 35% zu erhöhen (FNR 2012a).

Im Jahr 2012 konnte der Anteil der erneuerbaren Energien (EE) an der Energieversorgung in Deutschland weiter gesteigert werden. Ihr Anteil am gesamten Endenergieverbrauch (Strom, Wärme und Kraftstoffe) stieg auf 12,6 % an (2010: 11,3 %; 2011: 12,2%). Hierbei umfasste die Energie aus Biomasse 8,2% der gesamten bereitgestellten Energie (vgl. Abbildung 1-1). Somit hat Biomasse mit etwa 65% den größten Anteil an den erneuerbaren Energien. Insgesamt stellten die erneuerbaren Energien knapp 2.496 TWh (Tera Wattstunden) Endenergie bereit. In nahezu allen Bereichen, mit Ausnahme der Biokraftstoffe, konnte der Trend kontinuierlich steigender Anteile fortgesetzt werden. Diese Entwicklung zeigt, dass die von Deutschland im Rahmen der Energiewende bekräftigten, ehrgeizigen Ziele für den Ausbau der erneuerbaren Energien bis zum Jahr 2020 durchaus realisierbar sind (BMU 2012, FNR 2013).

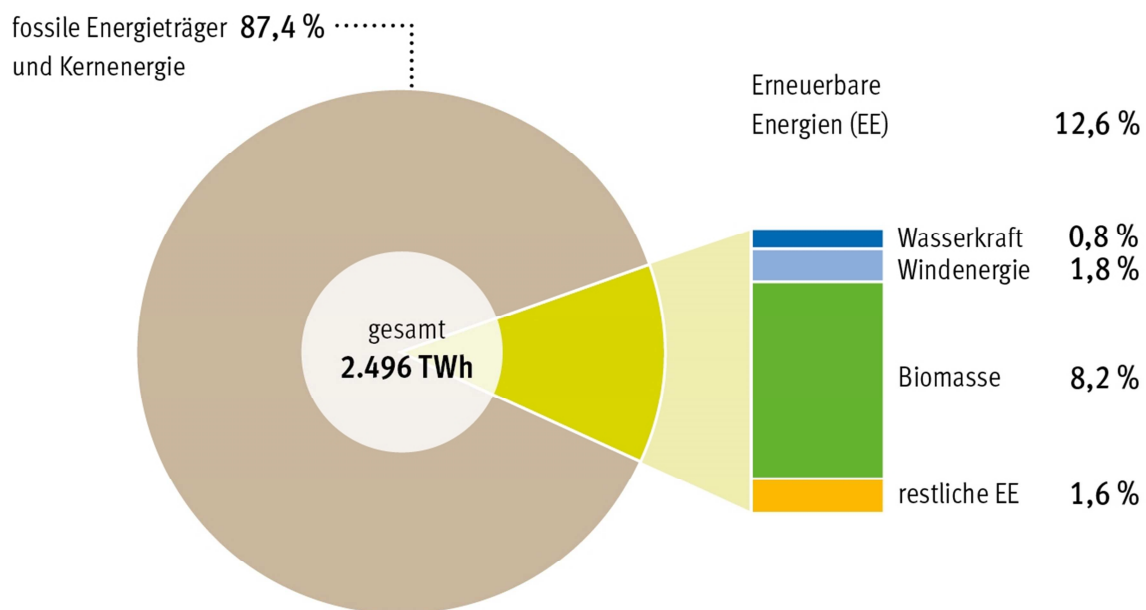


Abbildung 1-1: Anteile der erneuerbaren Energien am Endenergieverbrauch in Deutschland

Daten gültig für das Jahr 2012, TWh = Tera Wattstunde, Quelle: Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU), Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien – Statistik (AGEE-Stat), Februar 2013

(FNR 2013)

So ist die Bereitstellung ökologisch vertretbarer Energie in der heutigen Zeit eines der wichtigsten Themen überhaupt. Die Biogastechnologie ist hierbei ein aussichtsreiches Verfahren nachwachsende Rohstoffe effizient in Energie umzuwandeln. Diesbezüglich ermöglichen Biogasanlagen nicht nur eine Kohlenstoffdioxid-neutrale Energieerzeugung, sondern tragen wesentlich dazu bei, die bei der Lagerung und Ausbringung von Gülle austretenden treibhauswirksamen Emissionen von Methan und Lachgas zu vermeiden. Zudem hat sich gezeigt, dass durch den Vergärungsprozess Geruchsstoffe weitgehend abgebaut werden und gleichzeitig die Nährstoffe besser verfügbar sind, sodass im Zuge der landwirtschaftlichen Verwertung der Gärrückstände gezielt Mineraldünger eingespart werden können

(Weiland 2004). Nachteilig sind jedoch beispielsweise der hohe Investitionsaufwand sowie der große Flächenbedarf für Energiepflanzen, wodurch diese Flächen u. a. zum Anbau von Nahrungs- und Futtermittelpflanzen nicht mehr zur Verfügung stehen. Diese Problematik sowie eventuelle ökologische Probleme durch den gezielten Anbau von Monokulturen können aber durch die Nutzung von Bioabfällen, Reststoffen und Nebenprodukten, von z. B. der Landwirtschaft, als Biogassubstrat vermieden werden (Großkopf 2012).

Biogas stellt somit einen zentralen Bestandteil der zukünftigen Energieversorgung dar. Für die Nutzung des vollen Potentials der Biogastechnologie besteht jedoch noch Forschungsbedarf zur Weiterentwicklung und Verfahrensoptimierung. Diese Arbeit soll einen Beitrag hierzu leisten.

2 ZIELSETZUNG

Die Erzeugung von Biogas beruht auf der technischen Nutzung mikrobiologischer Stoffwechselprozesse, letztendlich mit dem Ziel, möglichst effizient organische Substrate in Methan umzuwandeln. Für diese Umwandlung sind mikrobiologische Lebensgemeinschaften verantwortlich. Ihre mikrobielle Aktivität für den technischen Prozess wird im Wesentlichen von den vorhandenen Substraten und der vorherrschenden Verfahrensführung bestimmt. Es kann jedoch auch innerhalb einzelner Prozessstufen zu Konkurrenzprozessen um Nährstoffe zwischen verschiedenen Mikroorganismen kommen, die negative Auswirkungen auf die Leistung des Verfahrens haben (Weiland 2010).

Die Effizienz vieler Biogasanlagen entspricht noch lange nicht dem theoretisch möglichen Wirkungsgrad. Abhängig vom eingesetzten Substrat und Verfahren liegt der gegenwärtige Biogasertrag zwischen 25 und 200 Nm³ (Normkubikmeter) Biogas je Tonne Frischmasse Substrat (FNR 2012b). Für eine Ertragssteigerung, die nur durch eine verbesserte Kontrolle und Steuerung erreicht werden kann, fehlt jedoch bislang eine probate und bezahlbare Mess- und Analysemethodik. Üblicherweise werden in Biogasanlagen vor allem physikalische und chemische Größen, wie die Temperatur, der pH-Wert, der Trockensubstanzgehalt, der CSB (Chemischer Sauerstoffbedarf), der FOS/TAC (Gehalt an flüchtigen organischen Säuren / Gehalt an anorganisch gebundenem Kohlenstoff) und gegebenenfalls das Redoxpotential überwacht (ML 2004, Wiese & König 2007, Langenbeck 2008). Die Messwerte ermöglichen jedoch keinen direkten bzw. nur einen ungenauen und zeitlich verzögerten Rückschluss auf relevante Parameter, wie beispielsweise die Aktivität der für die Hydrolyse des Ausgangssubstrates verantwortlichen Bacteria. Für den mikrobiologischen Prozess der Biogasbildung ist somit eine Analyse mikrobiologisch relevanter Parameter unumgänglich. Solche meist noch sehr zeitaufwendigen Untersuchungen erfordern bislang jedoch qualifiziertes Personal und ein entsprechend ausgestattetes Labor.

Ziel der Arbeit war es, die mikrobiologischen Gemeinschaften und deren Aktivität anhand von Proben aus Biogasanlagen zu charakterisieren und in Korrelation mit physikalischen und chemischen Parametern laufender Anlagen zu setzen, um damit neue Ansatzpunkte zur Prozessoptimierung zu erhalten. Exemplarisch wurden hierfür mesophile zweistufige NawaRo-Anlagen – Anlagen mit nachwachsenden Rohstoffen als Substrat – betrachtet. Da die Hydrolyse des pflanzlichen Substrates den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, konzentrierten sich die Analysen insbesondere auf die erste Stufe solcher Biogasanlagen.

Bestandteil dieser Untersuchungen waren Methoden zur Bestimmung mikrobieller Biomasse mittels Quantifizierung der Gesamtzellzahl, des Desoxyribonukleinsäure- (DNA) und Gesamtproteingehaltes. Abundante Mikroorganismengruppen wurden mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) und der Eigenfluoreszenz des Coenzym F₄₂₀ bestimmt. Zudem fanden zur phylogenetischen Analyse molekularbiologische Methoden wie Polymerasekettenre-

aktion (PCR), Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) und DNA-Sequenzanalysen Anwendung. Um das Stoffumsatzpotential der vorkommenden Mikroorganismengemeinschaft zu untersuchen, wurden Enzymaktivitäten verschiedener Hydrolasen ermittelt, die Aufschluss über die heterotrophe Gesamtaktivität der Mikroorganismen (Esteraseaktivität) sowie das Abbaupotential spezieller Substrate (Amylase-, Protease-, Peptidase-, Cellulase-, Xylanaseaktivität) geben. Als Indikator für den potentiellen Abbau bzw. das Restgaspotential des Substrates und des Prozesswassers dienen Raten der aeroben Respiration, Atmungsaktivität nach vier Tagen (AT_4) und Biologischer Sauerstoffbedarf nach fünf Tagen (BSB_5), sowie der anaeroben Respiration, der Bestimmung des Biogasbildungspotentials.

Im Zuge dieser Untersuchungen sollte weiterhin eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht während der Prozessführung Kontrollmessungen zum Vorkommen bestimmter Mikroorganismen bzw. deren Funktionspotentiale durchzuführen. Hierdurch sollen die Voraussetzungen geschaffen werden, um möglichen Störungen in der Effizienz der Biogasbildung bereits während des Betriebs gezielt entgegenwirken zu können. Ziel war daher die Identifizierung aussagekräftiger mikrobiologischer Parameter sowie geeigneter Analysen und deren Weiterentwicklung zu einem praxisorientierten Schnelltest, welcher vom Anlagenbetreiber vor Ort angewendet werden kann.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

In den folgenden Unterkapiteln soll das Basiswissen zum Biogasprozess, welcher auch technologisch nutzbar gemacht werden kann, vermittelt werden.

3.1 Der Prozess der anaeroben Fermentation

Unter anaerober Fermentation wird der Abbauprozess organischer Stoffe durch mikrobiologische Aktivität unter anaeroben Bedingungen verstanden. Sie gliedert sich in vier Teilprozesse, welche durch verschiedene Gruppen von Mikroorganismen gekennzeichnet sind. Hierbei setzen dafür weitgehend spezialisierte Mikroorganismen die Produkte des jeweiligen vorherigen Teilprozesses um, sodass eine Verkettung der Prozesse entsteht (Aschmann *et al.* 2007). In der Abbildung 3-1 ist der Prozess der anaeroben Vergärung mit relevanten mikrobiellen Vertretern schematisch dargestellt. Im Folgenden werden die einzelnen Stufen näher erläutert.

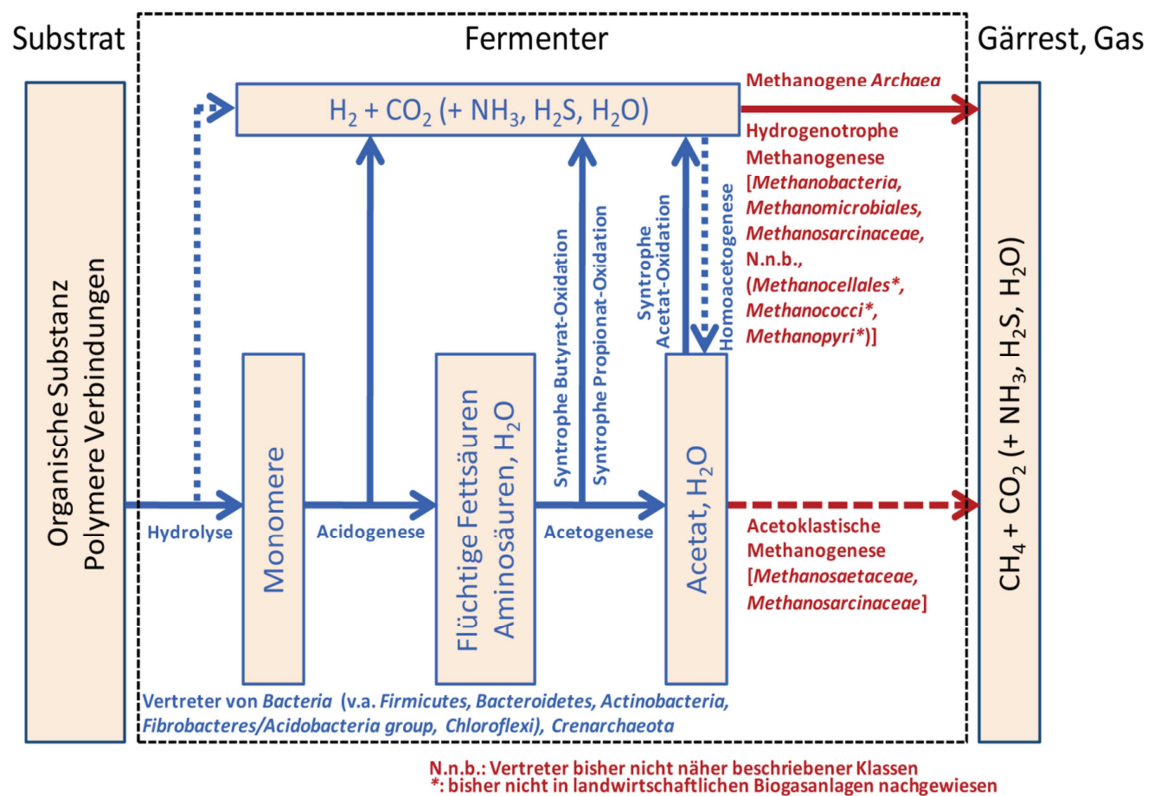


Abbildung 3-1: Stadien der Biogasproduktion mit relevanten Mikroorganismengruppen

(Bauer *et al.* 2009)

3.1.1 Hydrolyse und Acidogenese

Die Hydrolyse ist die erste Stufe der anaeroben Vergärung. In dieser Phase werden polymere Kohlenhydrate überwiegend in monomere Kohlenwasserstoffe (vor allem Monosaccharide wie Glucose),

Eiweiße überwiegend in Aminosäuren und Peptide und Fette in langkettige Fettsäuren sowie Glycerin abgebaut. Diese Reaktionen werden von Exoenzymen, wie z. B. den Hydrolasen Amylase, Protease, Peptidase, Cellulase und Xylanase, katalysiert, die von hydrolytischen Bakterien in die Umgebung abgesondert werden. Kohlenhydrate (Zucker, Hemicellulose, Cellulose, Pektin und Lignin) sind unterschiedlich gut hydrolysierbar. Viele Einfachzucker und Stärke sind sehr leicht aufzuschließen, während die Hydrolyse von Cellulose, Hemicellulose oder Pektin entsprechend langsamer verläuft. Lignin ist dagegen so gut wie gar nicht abbaubar. Der Abbauprozess von Eiweißen ist sehr komplex. Aus Proteinen können bis zu 21 verschiedene Aminosäuren freigesetzt werden (Batstone *et al.* 2002). Die Hydrolyserate ist i. d. R. etwas geringer als bei Zuckern. Zur Hydrolyse von Fetten (Lipolyse) wird die Oberfläche mittels Emulgierung des Fettes vergrößert, sodass fettspaltende Lipasen besser angreifen können. Bei Temperaturen über 20 °C werden Fette langsam aber vollständig hydrolysiert (Bischofsberger *et al.* 2005). Besteht das zu fermentierende Substrat vor allem aus pflanzlichen Bestandteilen, so wie dies bspw. bei NawaRo-Anlagen der Fall ist, stellt die Hydrolyse aufgrund des hohen Anteils an Cellulose, Pektin und Lignin in dem pflanzlichen Material den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Kaltschmitt *et al.* 2001, Aschmann *et al.* 2007).

In der anschließenden Acidogenese (Versäuerungsphase) werden die monomeren und oligomeren Produkte der Hydrolyse weiter verstoffwechselt. Die acidogenen (säurebildenden) Bakterien setzen sie intrazellulär zu niedermolekularen organischen Säuren, hauptsächlich Carboxylsäuren wie Essigsäure, Buttersäure und Propionsäure, um. Daneben werden auch andere Produkte wie kurzkettige Alkohole, Milchsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid gebildet (Souidi 2008). So entstehen in diesem Schritt schon die Ausgangsstoffe für die Methanogenese – Acetat, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Noch vorhandener Sauerstoff wird bei der Umsetzung der Hydrolyseprodukte verbraucht, sodass ein sauerstofffreies Milieu entsteht (Aschmann *et al.* 2007). Hydrolyse und Acidogenese sind meist nicht klar zu trennen, da sie typischerweise gemeinsam im mikrobiellen Stoffwechsel ablaufen.

In den ersten beiden Phasen der anaeroben Vergärung ist eine Vielzahl verschiedener Bakterien aus der Gruppe der fakultativen bis obligaten Anaerobier beteiligt, die eine große pH-Toleranz aufweisen. Unter den häufig vertretenen Gattungen befinden sich z. B. *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Actinobacteria*, *Pseudomonas* und *Acetivibrio* (Cirne *et al.* 2007, Doi 2008, Krause *et al.* 2008). Da die cellulolytischen Mikroorganismen die ersten Schritte des Abbaus der Lignocellulose-Komplexe in der pflanzlichen Biomasse durchführen, sind sie für die Biogasproduktion aus NawaRo von großem Interesse. Hier scheinen manche Arten der Clostridien besonders effizient zu sein (Lynd *et al.* 2002). Daneben finden sich hydrolytische Bakterien u. a. in den Gattungen *Lactobacillus*, *Desulfovibrio*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Escherichia* und *Sarcina*, es sind womöglich aber auch manche Archaeen (Crenarchaeota) an der Hydrolyse beteiligt. Die Untersuchung ihrer Funktion ist u. a. Bestandteil der aktuellen Forschung (Lebuhn & Gronauer 2009).

3.1.2 Acetogenese

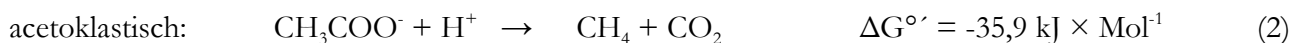
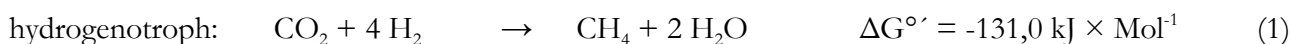
Acetogene bzw. syntrophe Bakterien bilden durch komplexe Reaktionen aus organischen Säuren (u. a. Fettsäuren) und Alkoholen die Ausgangsstoffe für die Methanbildung – Acetat, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Da bei diesen Prozessen Elektronen abgegeben werden, werden diese Reaktionen auch anaerobe Oxidation genannt. Zudem kann über die reduktive Essigsäurebildung das dabei anfallende Kohlenstoffdioxid und der Wasserstoff von homoacetogenen Bakterien zu Acetat metabolisiert werden (Wenzel 2002). Die Energiebilanz der meisten Reaktionen der Acetogenese ist positiv, sodass die Mikroorganismen, die die Reaktionen durchführen, in der Regel mehr Energie investieren müssen als sie gewinnen. Nur ein sehr geringer Wasserstoffpartialdruck, 10^{-4} bar oder niedriger, ermöglicht sekundären Gärern Wasserstoff als Endprodukt der Reaktionen ihrer Gärungen (z. B. Oxidation von Fettsäuren) freizusetzen, die unter Standardbedingungen (pH = 7, Temperatur = 25 °C, Druck = 1 bar) thermodynamisch nicht möglich wären. So kann die Acetogenese zumindest mit geringem Energiegewinn für die Mikroorganismen ablaufen. Dieser Teilschritt ist mit der Methanogenese eng gekoppelt, da der in der Acetogenese entstehende Wasserstoff direkt in der Methanogenese metabolisiert wird. Anderenfalls würde es zu einer Hemmung der acetogenen Mikroorganismen kommen und somit zum Stillstand des Gesamtprozesses (Schink 1997, Bischofsberger *et al.* 2005, Aschmann *et al.* 2007, Bauer *et al.* 2009, Lebuhn & Gronauer 2009).

Acetogene Bakterien sind strikt anaerob, haben eine lange Generationszeit, teilweise von mehreren Tagen, und sind schwer kultivierbar. Da sie auf die Stoffwechsellleistungen anderer Mikroorganismen angewiesen sind, können sie nur vergesellschaftet mit diesen wachsen und werden daher auch als syntrophe Organismen bezeichnet (Schink 1997). Typische Vertreter dieser Gruppe gehören zu den Gattungen *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Clostridium* und *Acetobacterium* (Hattori 2008, Weiland 2010) sowie *Syntrophospora*, *Syntrophus*, *Propionibacter*, *Sporotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Thermoanaerobium*, *Pelobacter* und *Smithella* (Bauer *et al.* 2009).

3.1.3 Methanogenese

Im letzten Schritt, der Methanogenese, wandeln methanogene Archaeen vor allem Acetat, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid in Kohlenstoffdioxid, Wasser und Methan um. In landwirtschaftlichen Biogasanlagen geschieht dies nach neueren Studien im Gegensatz zu früheren Theorien bei höherer Raumbelastung bzw. geringer Verweilzeit vorwiegend über den hydrogenotrophen Reaktionsweg (1) mit starker Beteiligung der syntrophen Acetat-Oxidation, Umsetzung von Acetat zu Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid (Schnürer *et al.* 1999), und nur bei relativ geringer Raumbelastung nennenswert über den acetoklastischen Weg (2) (Bauer *et al.* 2008, Lebuhn *et al.* 2008). Das Verhältnis dieser Anteile steht zudem im starken Zusammenhang mit dem ausgewählten Substrat als auch der Prozessführung z. B. hinsicht-

lich des pH-Wertes und der Temperatur (Aschmann *et al.* 2007). Folgende Reaktionsgleichungen können für diese Prozesse formuliert werden (Bauer *et al.* 2009):



Zu einer nennenswerten Bildung von Methan sind nur bestimmte Mikroorganismen fähig, die aufgrund ihrer Zellwandstruktur (ohne Murein), Cytoplasmamembranen (Isoprenoidlipide) sowie bestimmter Coenzyme (Coenzym M, F₄₂₀) den Archaea zugerechnet werden. Die strikten Anaerobier – sie benötigen zum Wachstum ein stark negatives Redoxpotential – zählen zum Phylum Euryarchaeota und werden wegen der oben aufgeführten möglichen Methanbildungswege in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe, die hydrogenotrophen Methanogenen, bildet Methan aus Wasserstoff, Formiat oder einigen Alkoholen, indem Kohlenstoffdioxid als Elektronenakzeptor genutzt wird. Die zweite Gruppe, auch acetoklastische Methanogene genannt, bildet Methan aus Acetat (Whitman *et al.* 2006). Sie haben aufgrund der geringen Energieausbeute beim Umsatz von Acetat im Gegensatz zur erstgenannten Gruppe zwei- bis vierfach niedrigere Umsatz- und Wachstumsraten (Bischofsberger *et al.* 2005). Eine dritte Gruppe, die methylotrophen Methanogenen, nutzen Verbindungen mit Methylgruppen als Substrat, wie bspw. Methanol, Methylamine und Methylsulfide. Da jedoch nur bis zu 3% des gebildeten Methans aus diesem Stoffwechselweg stammen, ist diese Gruppe in Biogasanlagen unwesentlich (Gerardi 2003, Khanal 2011).

Tabelle 3-1: Physiologische Merkmale der methanogenen Archaeen

Ordnung	Kohlenstoffquelle	Temperaturbereich [°C]	pH-Bereich	Referenz
Methanosarcinales	Acetat, H ₂ , CO ₂ , CO, Methanol, Methylamin, Methylmercapto-propionat, Dimethylsulfid	1–70	4,0–10,0	(Deppenmeier 2002, Kendall & Boone 2006, Cheng <i>et al.</i> 2007a, Liu & Whitman 2008, Thauer <i>et al.</i> 2008)
Methanomicrobiales	H ₂ , CO ₂ , Formiat, Ethanol ^a , 2-Propanol ^b , 2-Butanol ^b , Cyclopentanol ^b	15–60	6,1–8,0	(Dianou <i>et al.</i> 2001, Garcia <i>et al.</i> 2006, Liu & Whitman 2008, Thauer <i>et al.</i> 2008)
Methanobacteriales	Acetat ^d , H ₂ , CO ₂ , CO, Formiat, C ₁ -methylierte Verbindungen ^c	20–88	5,0–8,8	(Bonin & Boone 2006, Liu & Whitman 2008, Thauer <i>et al.</i> 2008, Deublein & Steinhauser 2011)
Methanococcales	H ₂ , CO ₂ , Formiat	< 20–88	4,5–9,8	(Whitman & Jeanthon 2006, Liu & Whitman 2008, Thauer <i>et al.</i> 2008)
Methanopyrales	H ₂ , CO ₂	84–110	5,5–7,0	(Kurr <i>et al.</i> 1991, Huber & Stetter 2001, Liu 2010)
Methanocellales	H ₂ , CO ₂ , Formiat	25–40	6,5–7,8	(Sakai <i>et al.</i> 2008)

^a nur für *Methanogenium* sp., ^b nur für *Methanoculleus* sp., ^c nur für *Methanosphaera* sp., ^d nur für *Methanobacterium söhngenii* und *thermoautotrophicum* angelehnt an Rosenzweig und Ragsdale (2011)

Die methanogenen Archaea werden in sechs Ordnungen unterteilt: Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Methanopyrales und Methanocellales. In Tabelle 3-1 sind relevante physiologische Merkmale dieser sechs Ordnungen aufgelistet. Es sind viele verschiedene Gattungen von hydrogenotrophen Methanogenen beschrieben, wie bspw. *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanogenium* und *Methanobrevibacter* (Garcia *et al.* 2000, Liu & Whitman 2008) sowie *Methanopyrus* und *Methanosarcina* (Scheer 2010), während zur Zeit nur drei bekannte Gattungen von acetoklastischen Methanogenen aufgeführt werden: *Methanobacterium* (*M. söhngeniei* und *M. thermoautotrophicum*), *Methanosaeta* und *Methanosarcina*. Dabei können viele Vertreter von *Methanosarcina* und *Methanobacterium* ebenfalls Methylsubstrate und Substrate des CO₂-Typs metabolisieren. *Methanosaeta* dagegen ist auf Acetat spezialisiert und kann dieses auch schon bei geringen Konzentrationen von 5–20 µM verwerten (Bischofsberger *et al.* 2005, Reay *et al.* 2010, Deublein & Steinhauser 2011).

3.2 Vergärungsverfahren von Biogasanlagen

Das Vorhandensein brennbarer Gase in der Natur, wie in Sedimenten und in Pansen von Tieren, ist schon seit Jahrhunderten bekannt. Jedoch erst seit Anfang des 20. Jahrhunderts wurde in Deutschland der technische Nutzen erkannt, sodass in Klärwerken natürlich entstehendes Biogas aufgefangen und in das städtische Gasnetz eingespeist wurde. Mitte des 20. Jahrhunderts gab es in Deutschland die erste landwirtschaftliche Biogasanlage. Bis Anfang der 1990er Jahre wurden Vergärungsverfahren zur Biogasgewinnung aber nur sporadisch weiterentwickelt, erst seit 1991 erhielt Biogas eine wirtschaftliche

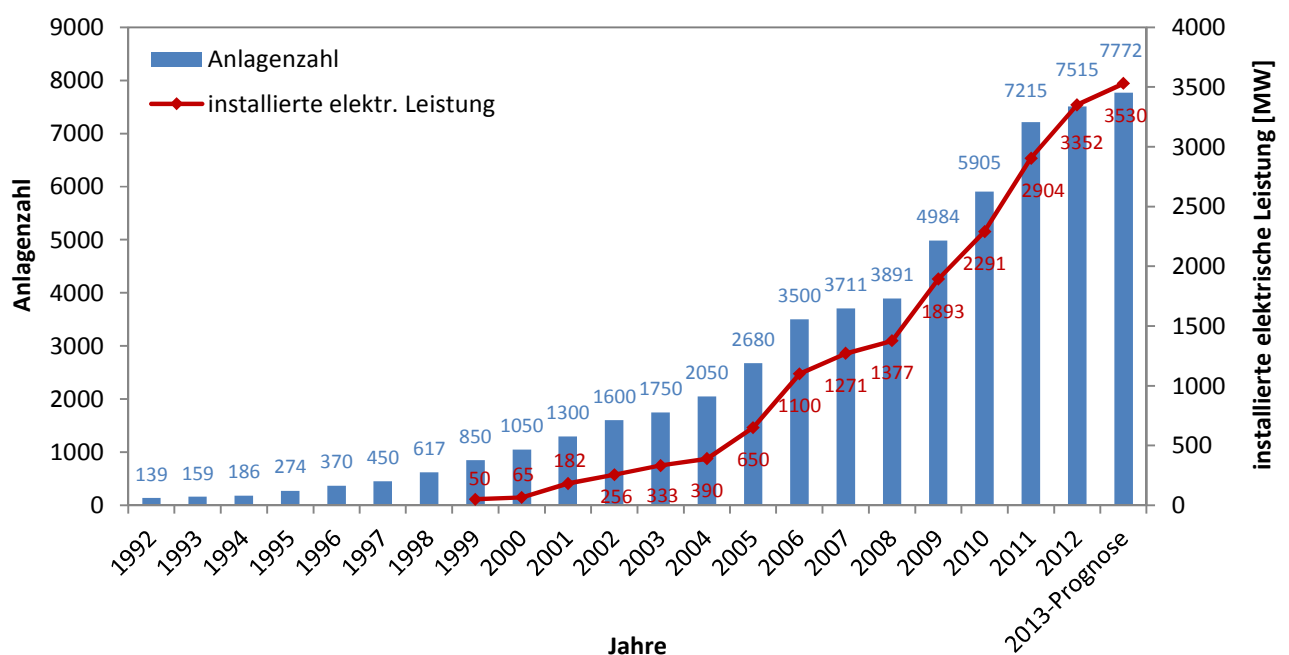


Abbildung 3-2: Biogasproduktion in Deutschland von 1992 bis 2013

Entwicklung der Anzahl Biogasanlagen und der gesamten installierten elektrischen Leistung in Megawatt [MW], Stand: Mai 2013 (Quelle: Fachverband Biogas e.V.) angelehnt an da Costa Gomez (2013)

Grundlage durch das StrEG (Stromeinspeisegesetz) vom Januar 1991. Seitdem wird das in landwirtschaftlichen Anlagen erzeugte Biogas verstromt und in das öffentliche Stromnetz eingespeist. Seit diesem Zeitpunkt nimmt die Anzahl der Biogasanlagen in Deutschland sowie auch deren verfahrenstechnische Weiterentwicklung rasant zu (vgl. Abbildung 3-2) (de Graaf & Fendler 2010, Braun *et al.* 2012).

Heute gibt es viele verschiedene Biogasanlagentypen, die sich vor allem in der Anzahl der Prozessstufen, dem Stofffluss, der Prozesstemperatur, der Substratfeuchte und -art unterscheiden. Jeder Biogasanlagentyp hat dabei gewisse Vor- und Nachteile. Eine kurze Zusammenfassung verschiedener Verfahrensparameter ist in Tabelle 3-2 gegeben.

Tabelle 3-2: Übersicht verschiedener Biogasverfahren

Kriterium	Verfahren	Erläuterung
Trockensubstanzgehalt der eingesetzten Substrate	Nassvergärung	pumpfähige Mischungen aus Substrat und Gärrest oder Prozesswasser bis 15% TS
	Trockenvergärung	stapelbares Substrat aus mehr als 30% TS
Prozesstemperatur	mesophil (30–42 °C)	sehr häufig
	thermophil (48–55 °C)	selten, da energieaufwendig
Anzahl der Prozessstufen	einstufig	Hydrolyse und Methanbildung in einem Fermenter
	mehrstufig	zwei oder mehr Fermenter in Reihe geschaltet, Hydrolyse und Methanbildung räumlich getrennt
Art der Beschickung	kontinuierlich	gleichmäßige Beschickung des/der Fermenter(s), konstante Gas- und Stromproduktion
	diskontinuierlich	Behälter wird mit einer Substratcharge befüllt und nach dem Vergärungsprozess komplett entleert, Gaserträge steigen zu Beginn des Prozesses an und sinken mit fortschreitendem Prozess ab

angelehnt an Weise (2010)

3.2.1 Anzahl der Prozessstufen

Bei Biogasanlagen wird zwischen ein- oder mehrstufigen Verfahren unterschieden, wobei die Mehrzahl an Biogasanlagen mittlerweile mehrstufig betrieben werden (Rensberg *et al.* 2012).

Bei einstufigen Anlagen findet keine räumliche Trennung der verschiedenen Prozessphasen der Vergärung (Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese) statt. Alle Prozessphasen werden in einem Reaktor durchgeführt. In solchen Anlagen findet meist eine kontinuierliche Durchmischung statt, wie bspw. bei dem kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktor. Er wird oft zur Verwertung von Klärschlamm, Speiseresten und Gülle eingesetzt. Eine Rückführung von Gärresten bzw. Prozessflüssigkeiten kann die Verweilzeit des Materials und damit auch die der Mikroorganismen erhöhen (Nordberg *et al.* 2007).

Bei zwei- bzw. mehrstufigen Verfahren wird eine räumliche Trennung der Phasen auf verschiedene Reaktoren vorgenommen. In zweistufigen Verfahren ist der erste Reaktor dafür ausgelegt, dass eine optimale Hydrolyse und Acidogenese des Rohmaterials stattfinden kann. Da eine vollständige Auftei-

lung des Verfahrens sehr kompliziert ist, werden in erster Linie organische Säuren, aber auch eine gewisse Menge an Biogas gebildet. Das fermentierte Substrat bzw. die Prozessflüssigkeit wird nun zu einem zweiten Reaktor geleitet, der speziell für die Acetogenese und Methanogenese angepasst ist (Pohland & Ghosh 1971). Diese Art von Verfahren ist besonders zweckmäßig, wenn es sich um ein leicht fermentierbares Substrat handelt und die Hydrolyse schnell erfolgt. In der zweiten Stufe wird häufig Trägermaterial eingesetzt, auf dem die acetogenen/syntrophen und methanogenen Mikroorganismen immobilisiert sind. So wird eine Auswaschung dieser aus dem Reaktor minimiert und der Kontakt zwischen den Mikroorganismengruppen intensiviert. Diese Aufteilung des Prozesses führt oft zu einer schnellen und effizienten Bildung von Biogas in der zweiten Stufe, mit Methankonzentrationen von bis zu 85% (Colleran *et al.* 1982, Verrier *et al.* 1987). Das Trägermaterial kann dabei bspw. aus Kunststoff oder Glas bestehen, aber auch andere Materialien wie Stroh oder Sisalfasern sind möglich (Andersson & Björnsson 2002, Held *et al.* 2002, Mshandete *et al.* 2008b). In der Regel handelt es sich bei diesem Anlagentyp um ein Pfropfen-Strömungssystem, bei dem das Trägermaterial als Filter fungiert. Die zweistufige Fermentation kann auch mit zwei volldurchmischten Reaktoren, die in Reihe geschaltet sind, durchgeführt werden (Pohland & Ghosh 1971, Schnürer & Jarvis 2010).

Von Vorteil ist bei einstufigen Anlagen, dass sie in der Regel wirtschaftlicher und verfahrenstechnisch einfacher zu steuern sind, nachteilig ist jedoch ihre geringere Abbauleistung und die erhöhte Gefahr der Instabilität des Prozesses. Zweistufige Biogasanlagen haben den großen Vorteil, dass die unterschiedlichen Milieubedingungen der verschiedenen Mikroorganismen besser eingestellt werden können (vor allem Temperatur und pH-Wert) und so die Behandlungsdauer bei zweistufigen Verfahren kürzer ist. Nachteilig sind jedoch die hohen Investitionskosten und der aufwendigere Betrieb sowie Kontrolle des Prozesses (Aschmann *et al.* 2007, Hupe *et al.* 2009).

3.2.2 Prozesstemperatur

Mesophile Biogasanlagen werden mit Temperaturen zwischen 30 und 42 °C, thermophile Anlagen zwischen 48 und 55 °C betrieben, die Grenzen sind dabei fließend. Die Fermentertemperatur kann darüber hinaus in Abhängigkeit des eingesetzten Substrates optimiert werden. Etwa 85% der landwirtschaftlichen Biogasanlagen arbeiten im mesophilen Bereich. Im thermophilen Bereich arbeitende Anlagen sind teilweise mit einer mesophilen Prozessstufe kombiniert.

Der Vorteil von thermophilen Anlagen ist die stark erhöhte Hydrolyserate, was zu kürzeren Verweilzeiten führt (15–20 Tage), im Gegensatz zu mesophilen Anlagen mit einer Verweilzeit von bis zu 30–40 Tagen. Dafür reagieren thermophil betriebene Anlagen sehr sensibel auf leichte Temperaturschwankungen (± 1 °C), wodurch ihre Leistung beeinträchtigt wird. Die Mikroorganismen in mesophilen Anlagen tolerieren dagegen Temperaturschwankungen von ± 3 °C ohne Beeinträchtigungen. Zudem ist

der Betrieb thermophiler Biogasanlagen kostenintensiver, da die Reaktoren stetig beheizt werden müssen (Busch & Sieber 2006, Aschmann *et al.* 2007).

3.2.3 Trockensubstanzgehalt der Gärsubstrate

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal stellt der Trockensubstanzgehalt (TS) im Fermenter dar. Die Vergärungsverfahren lassen sich je nach Feststoffgehalt im Reaktorzulauf bzw. des Eingangsmaterials (Substrates) in Nass- und Trockenvergärungsverfahren unterteilen.

Nassvergärungsverfahren arbeiten mit pump- und rührfähigen Substraten, die einen Trockensubstanzgehalt von bis zu 15% aufweisen. Trockenere Ausgangsstoffe werden durch die Zugabe von Flüssigkeit (meist Prozesswasser) angemischt. Anwendung finden sowohl ein- als auch zweistufige Nassverfahren, wobei letztere neben der Einstellung der spezifischen Milieubedingungen der Mikroorganismen auch die Möglichkeit bieten, Feststoffe nach der Hydrolyse abzutrennen und dem Methanreaktor so ausschließlich die Flüssigphase zuzuführen.

Der Bereich zwischen 15 und 20% Trockensubstanzgehalt wird als Semi-Trockenvergärung bezeichnet und stellt den Übergang zum Trockenvergärungsverfahren dar.

Trockenvergärungsverfahren können halbfleuchte, schüttfähige und stapelbare Substrate, wie landwirtschaftliche Reststoffe, Festmist aus der Tierproduktion und nachwachsende Rohstoffe in Form von Pflanzensilagen mit einem Trockensubstanzgehalt von bis zu ca. 40% verarbeiten (Aschmann & Mitterleitner 2002, Hoffmann 2003). Auch hier wird das Eingangsmaterial bei Bedarf im oder vor dem Fermenter mit Gärrest (bzw. Prozesswasser) verdünnt, um entsprechende Trockensubstanzgehalte einzustellen. Aus wirtschaftlichen Gründen werden zur Trockenvergärung vorwiegend diskontinuierlich betriebene Verfahren genutzt (Lootsma & Raussen 2008).

3.2.4 Kontinuierliche und diskontinuierliche Fermentation

Der Prozess kann abhängig von den Substrateigenschaften kontinuierlich oder diskontinuierlich (als Batch-Verfahren) betrieben werden.

Bei der kontinuierlichen Vergärung wird dem Fermenter konstant frisches Material zugeführt, woraus auch eine stetige Gasproduktion resultiert. Dieses Verfahren ist geeignet für Substrate mit einem geringen Trockensubstanzgehalt ($< 5\%$), wie bspw. bei kommunalen und industriellen Abwässern. Material mit einem Trockensubstanzgehalt zwischen 5 und 15%, wie bspw. Klärschlamm, kann dem Prozess mehr oder weniger kontinuierlich zugesetzt werden. Bei solch einer semi-kontinuierlichen anaeroben Vergärung wird frisches Substrat ein- bis achtmal pro Tag zugegeben. Im Falle von Feststoffen, die einen Trockensubstanzgehalt von über 20% aufweisen, wie z. B. Ernterückstände und Speisereste, wird die Frequenz der Zufuhr stark reduziert, dafür jedoch die zugegebene Menge erhöht. Durch Zugabe von Flüssigkeit können feste Substrate in eine Konsistenz gebracht werden, die einen kontinuierlichen

Prozess ermöglichen. Zudem wird damit eine gleichmäßige Versorgung der Mikroorganismen mit Substraten gewährleistet, sodass das Risiko einer plötzlichen Überlastung minimiert wird, was eine höhere Gesamtbelastung ermöglicht (Schnürer & Jarvis 2010).

Im Gegensatz dazu wird bei der diskontinuierlichen Fermentation dem System während des Prozesses weder neues Substrat hinzugefügt noch Gärrest entfernt. Diskontinuierliche Verfahren werden i. d. R. bei der Trockenvergärung verwendet. Die Gasproduktion beginnt langsam nach der Befüllung und geht nach der Erreichung des Maximums kontinuierlich zurück. Nachdem das Substrat abgebaut wurde, wird der gesamte Reaktor entleert und mit einer neuen Charge Substrat befüllt. Diskontinuierliche Verfahren finden zunehmend bei der Vergärung von Bioabfällen Anwendung (de Graaf & Fendler 2010). Zu unterscheiden sind zudem Perkulationsverfahren, bei denen das Substrat mit Prozesswasser, welches mit am Abbau beteiligter Mikroorganismen angereichert ist, durchfeuchtet wird und Verfahren ohne Perkulation, wobei das Substrat zu Beginn mit bereits ausgefaultem Material vermischt wird, um eine Inokulation herbeizuführen (Bischofsberger *et al.* 2005). Beim Aufstauverfahren wird das Substrat mit Gärflüssigkeit eingestaut, wodurch Probleme mit der Perkulation vermieden werden sollen. Das Haufwerkverfahren arbeitet im Gegensatz dazu gänzlich ohne Gärflüssigkeit. Hier findet die Inokulation über Rückmischung von bereits vergorenem Material statt (Liebeneiner 2010).

Aus mikrobiologischer Sicht hat die diskontinuierliche Fermentation den Vorteil, dass die Organismen hinreichend Zeit zum Abbau der organischen Substanz haben und nicht aus dem System heraus gewaschen werden. Jedoch ist die Gewährleistung einer hohen und gleichmäßigen Abbaugeschwindigkeit oft nicht gegeben, insbesondere wenn das Substrat einen erhöhten Gehalt an Trockensubstanz aufweist (Kreuger & Björnsson 2006). Der Nachteil von kontinuierlichen Verfahren ist der hohe Energiebedarf zum Betrieb von Rühraggregaten oder anderer Mischsysteme und die damit verbundenen erhöhten Kosten, da der Inhalt des Fermenters regelmäßig vermengt werden muss. Auch der Wartungsaufwand ist wegen der beweglichen Rühraggregate etwas höher. Der wesentliche Vorteil der kontinuierlichen Anlagen ist der deutlich höhere Gasertrag gegenüber diskontinuierlichen Trockenvergärungsanlagen (de Graaf & Fendler 2010).

3.2.5 Biogassubstrate

Alle Arten von Biomasse können als Substrate zur Biogaszeugung verwendet werden, solange sie Kohlenhydrate, Proteine, Fette, Cellulose und/oder Hemicellulosen enthalten. Nur stark verholzte organische Stoffe, z. B. Holz, sind aufgrund des langsamen anaeroben Abbaus ungeeignet. Die Gasausbeute variiert dabei abhängig vom Kohlenhydrat-, Protein- und Fettgehalt. Traditionell wird vor allem Rinder-, Schweine- und Geflügelgülle als Grundsubstrat vieler Biogasanlagen verwendet, da sie durch ihre Pumpfähigkeit einfach zu handhaben sind. Zudem sind sie aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften ideale Substrate. Sie haben ein großes Puffervermögen, enthalten ausreichend Mikronährstoff-

fe in verfügbarer Form und stellen die notwendige Mikroorganismenbiozönose für die anaerobe Vergärung zur Verfügung, dies gilt insbesondere für Rindergülle. Zusammen mit dem Grundsubstrat Gülle können auch andere organische Stoffe vergoren werden, um die Biogaserzeugung zu erhöhen (Kofermentation). So können neben flüssigen ebenso feste Substrate der Fermentation (selten auch zur Monovergärung) zugegeben werden, z. B. Festmist, Silagen aus Grünmasse (z. B. Mais- und Grassilage, allg. Silagen aus NawaRo), Schlempen (Destillationsrückstände) und Trester (Pressrückstände), Ernterückstände (z. B. Pflanzenreste von Zuckerrüben) und organische Abfälle aus Landwirtschaft und Industrie, Speiseabfälle und gesammelter kommunaler Bioabfall aus privaten Haushalten. In Tabelle 3-3 sind verschiedene Biogassubstrate nach ihrem Herkunftsbereich aufgelistet. Wichtig ist v. a., dass die Zusammensetzung der Nährstoffe bzw. das C/N-Verhältnis ausgewogen ist, damit der Prozess nicht durch eine Ammoniak-Akkumulation inhibiert wird. Auf weitere mögliche Hemmstoffe wird im Kapitel 3.3.2 näher eingegangen. Die Wahl des geeigneten Substrates hängt aber zum großen Teil von der Verfahrensführung ab. So ist bspw. Grassilage aufgrund der Faserstruktur in Anlagen mit Rührwerken eher ungeeignet, da die Grasfasern sich in ihnen verfangen (de Graaf & Fendler 2010, Weiland 2010).

Tabelle 3-3: Übersicht verschiedener Biogassubstrate nach ihrem Herkunftsbereich

Herkunft	Beispiel
Fäkalien aus der Tierhaltung	Rinder-, Schweinegülle, Geflügelkot, Pferdemit
landwirtschaftliche Reststoffe	Gras, Silage, Zuckerrübenblatt, Kartoffelkraut, Rückstände aus der Körnermaisproduktion
Nachwachsende Rohstoffe	gezielter Anbau für den Einsatz in Biogasanlagen: Mais, Futterrüben, Gräser
Abfälle aus der Agroindustrie	Biertreber, Rückstände aus der Gemüseverarbeitung, Pansen- und Darminhalte
Schlachthofabfälle	Flotatfett, Panseninhalt, Darminhalt
kommunale Abfälle	Bioabfall aus der Biotonne, Speiseabfälle aus der Gastronomie, Fettabscheiderinhalte, Grasschnitt
industrielle Abfälle	Algen bei Kraftwerken, Wasser-Alkohol-Gemische aus Pharmabereich, Glycerin aus der Biodieselproduktion

nach Hofmann (2001)

3.3 Einflussfaktoren auf die Biogasbildung

Die Prozessstabilität der Biogasbildung ist abhängig von verschiedenen verfahrenstechnischen, chemischen und mikrobiologischen Einflussfaktoren. Die Verfahrenstechnik nimmt dabei Einfluss auf die chemischen und mikrobiologischen Parameter. Die chemischen und mikrobiologischen Parameter beeinflussen sich zudem untereinander.

3.3.1 Verfahrenstechnische Einflussfaktoren

Am einfachsten zu steuern und zu messen sind die verfahrenstechnischen Einflussfaktoren, da sie meist schon im Voraus festgelegt werden. Dazu zählen die Bauform der Reaktoren, das Gärverfahren, die Art der Fermenterdurchmischung, der Prozessdruck, die Prozesstemperatur, die Substratauswahl sowie die hydraulische Verweilzeit und die Raumbelastung (Kaiser *et al.* 2007).

Eine gute Durchmischung des Gärbehälters gewährleistet und intensiviert den Kontakt zwischen Bakterien und Substrat. Zudem wird hierdurch ein Ausgleich von Temperatur- und Konzentrationsunterschieden im Gärsubstrat sichergestellt. Entfällt die Durchmischung, sinkt meist ein Großteil der Bakterienmasse zu Boden und das abzubauen Substrat sammelt sich in darüberliegenden Schichten an, sodass der Kontaktbereich zwischen Mikroorganismen und Substrat stark beschränkt ist. Wenn sich eine Schwimmschicht bildet, wird zudem der Gasaustritt erschwert. Eine zu heftige Durchmischung führt jedoch zur Beeinträchtigung des anaeroben Abbauprozesses, da die in Syntrophie lebenden Mikroorganismen auseinander gerissen werden und der Stoffaustausch erschwert wird. Als Kompromiss können langsam rotierende Rührwerke eingesetzt werden, welche den Reaktorinhalt in zeitlichen Intervallen durchmischen (Kaltschmitt *et al.* 2001, Bischofsberger *et al.* 2005, Kaiser *et al.* 2007).

Wie in Kapitel 3.2.2 erläutert, steigen die Umsetzungsgeschwindigkeiten mit Erhöhung der Temperatur. Für die am anaeroben Abbauprozess beteiligten Mikroorganismen existieren dabei verschiedene Temperaturoptima, für einen Großteil der Mikroorganismen liegt dieser im mesophilen Bereich. Daher und aus Kostengründen werden die meisten Biogasanlagen in diesem Bereich betrieben. Zudem kommt es bei thermophil betriebenen Anlagen, die Substrate mit hohem Stickstoffgehalt (bspw. Hühnermist, Klee gras, Getreidekörner) vergären, zu einer zunehmenden Ammoniakhemmung mit steigenden Temperaturen. Zur Einhaltung der optimalen Temperaturbedingungen ist es notwendig, den Fermenter extern zu beheizen und auch dementsprechend zu isolieren (Kaltschmitt *et al.* 2001, Kaiser *et al.* 2007).

Zwischen Raumbelastung und hydraulischer Verweilzeit sollte ein Mittelweg gefunden werden, der möglichst hohe Durchsatzraten und ein möglichst geringes Fermentervolumen erlaubt. Die Raumbelastung gibt an, wie viel Kilogramm organische Trockensubstanz (oTS) dem Fermenter je Kubikmeter Nutzvolumen und Zeiteinheit zugeführt wird. Die Verweilzeit charakterisiert die durchschnittliche theoretische Aufenthaltszeit des Substrates im Fermenter. Da dem Fermenter mit steigender Raumbelastung mehr Substrat zugegeben wird und somit die Verweilzeit zurückgeht, besteht zwischen diesen beiden Kenngrößen ein enger Zusammenhang. Die Verweilzeit sollte möglichst an die spezifische Abbaugeschwindigkeit der verwendeten Substrate angepasst sein. Mit einer längeren Verweilzeit kann i. d. R. eine bessere Abbauleistung und damit auch eine gesteigerte Methanproduktion erzielt werden. Ist die Verweilzeit jedoch geringer als die längste Generationszeit eines am anaeroben Abbau beteiligten, relevanten Mikroorganismus, kommt es durch den ständigen Substrataustausch mit der Zeit zu

dessen Ausspülen. Dies betrifft vor allem die sehr langsam wachsenden syntrophen Bakterien und manche methanogenen Archaeen (Bischofsberger *et al.* 2005, Kaiser *et al.* 2007).

3.3.2 Chemische Einflussfaktoren

Die Chemie und die Zusammensetzung des Materials sowie gebildete Zwischenprodukte haben einen wesentlichen Einfluss auf den anaeroben Abbauprozess. Abhängig von der Verfügbarkeit der Nährstoffe und der Konzentration von prozesshemmenden Stoffen ist ein Einbringen von Zusatz und Hilfsstoffen möglich, damit die Stabilität des Biogasprozesses gewährleistet ist.

Die Mikroorganismen unterschiedlicher Prozessstufen haben unterschiedliche pH-Optima (pH 4,5 bis 6,3 für die hydrolysierenden und säurebildenden Bakterien und pH 6,8 bis 7,5 für die syntrophen und methanogenen Mikroorganismen). Da die syntrophen und methanogenen Mikroorganismen empfindlicher auf pH-Wert-Veränderungen reagieren, wird im einphasigen Verfahren, wenn nötig, der pH-Wert auf einen neutralen Bereich eingestellt. In der Regel stellt sich sowohl bei einphasigen als auch bei zweiphasigen Systemen der pH-Wert automatisch durch alkalische und saure Stoffwechselforgänge ein. Wird dieses Gleichgewicht jedoch gestört und es kommt zu einer Anreicherung von flüchtigen Fettsäuren (FFS), tritt eine Versäuerung ein. Ein Stopp der Substratzufuhr schafft meist Abhilfe, da die methanogenen Organismen Zeit zum Abbau der überschüssigen Säuren bekommen. Manchmal ist eine Regulierung des pH-Wertes durch Zugabe von basischen Zuschlagstoffen (z. B. Kalk) erforderlich. Werden vermehrt Proteine abgebaut, führt dies durch die Bildung von Ammoniak zu einem Anstieg des pH-Wertes, was die Mikroorganismen ebenfalls zunehmend hemmen kann (Kaltschmitt *et al.* 2001, Bischofsberger *et al.* 2005, Kaiser *et al.* 2007).

Die im anaeroben Abbau entstehenden flüchtigen (niederen) Fettsäuren (FFS) geben Auskunft über den Zustand des Fermentationsprozesses, da deren Anreicherung eine Störung des Fließgleichgewichts in der Abbaukette, z. B. durch eine zu hohe Raumbelastung, anzeigt. Es können sowohl die Einzelkonzentrationen der Fettsäuren als auch die Gesamtkonzentration (als Essigsäureäquivalent) bestimmt werden. Auch die Bestimmung des Verhältnisses von Essigsäure zu Propionsäure ist ein nützlicher Prozessindikator, da bei vergleichsweise erhöhten Propionsäurekonzentrationen der Gärprozess destabilisiert wird. Das angestrebte Verhältnis liegt bei mindestens 2:1 (Kaiser *et al.* 2007, Effenberger *et al.* 2010).

Da im Prozess auch Säuren akkumuliert werden, ohne dass es zu einer Erniedrigung des pH-Wertes kommt, wird der Quotient aus dem Gehalt an flüchtigen Fettsäuren (FOS, flüchtige organische Säuren) und dem Gehalt an Carbonatpuffer (TAC, totales anorganisches Carbonat) als Indikator eingesetzt. Ist im laufenden Prozess ein ansteigender Trend des Wertes erkennbar, besteht die Gefahr einer Versäuerung. Der FOS/TAC-Wert ist in seinem Absolutwert jedoch stark abhängig von der Substratart und zwischen Anlagen nur bedingt vergleichbar (Kaiser *et al.* 2007, Effenberger *et al.* 2010).

Das Redoxpotential spiegelt Änderungen des Oxidations- und Reduktionszustands einzelner Milieukomponenten wider. Es reagiert sehr empfindlich, sodass schon vor dem Auftreten von messbaren Änderungen des Gehalts an organischen Säuren das Redoxpotential ansteigt. Es ist jedoch mit dem pH-Wert verknüpft, sodass nur bei konstanten Substrat- und pH-Bedingungen Störungen frühzeitig erkannt werden können (Weiland 2008, Effenberger *et al.* 2010).

Wasserstoff, ein Zwischenprodukt des anaeroben Abbaus, hemmt energetisch den Abbau von Propionsäure, sobald der Partialdruck zu hoch ist. Ein Anstieg der Wasserstoffkonzentration im Biogas ist daher ein Indikator für ein Ungleichgewicht der Abbauschritte, welches eine Akkumulation von Propionsäure und eine damit verbundene Prozesshemmung zur Folge hat. Da die Wasserstoffkonzentration starken Schwankungen unterworfen ist, lassen nur Langzeitbeobachtungen eine Früherkennung von Prozessstörungen zu (Reiss & Grupp 1990, Weiland 2008).

Eine optimale Nährstoffversorgung der Mikroorganismen wird v. a. durch die Zusammensetzung des zugeführten Substrates gewährleistet. Das C/N-Verhältnis spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Wenn das Verhältnis zu hoch ist, kann der Kohlenstoff nicht optimal abgebaut werden und die Effizienz des Prozesses sinkt. Bei einem Stickstoffüberschuss wird Ammoniak gebildet, welcher die Mikroorganismen bereits in geringen Konzentrationen hemmt. Bei einem C/N-Verhältnis im Bereich von 10 bis 45 (Hydrolyse/Acidogenese) bzw. 20 bis 30 (Methanogenese) sollte der Prozess ungestört ablaufen. Eine ausreichende Nährstoffversorgung ist bei einem C/N/P/S-Verhältnis von etwa 450/15/5/1 bis 600/15/5/1 sichergestellt. Zudem sind Spurenelemente, insbesondere Eisen, Nickel, Kobalt, Selen, Molybdän und Wolfram, für den Zellaufbau der Mikroorganismen essentiell (Nijaguna 2006, Kaiser *et al.* 2007, Weiland 2010).

Der Abbauprozess kann auch durch Hemmstoffe negativ beeinflusst werden, da diese in zu hoher Konzentration toxisch auf die Mikroorganismen wirken. Hemmstoffe können als Kontamination durch das Substrat eingebracht werden (z. B. Antibiotika, Desinfektionsmittel, Herbizide, Salze oder Schwermetalle) oder als Zwischenprodukte während der Vergärung entstehen. Sogar essentielle Spurenelemente können in zu hohen Konzentrationen den Biogasprozess hemmen. So zeigt gebildeter Schwefelwasserstoff, wobei Schwefel selbst zu den essentiellen Spurenelementen zählt, bei einer erhöhten Konzentration eine toxische Wirkung. Einige Hemmstoffe wechselwirken mit anderen Stoffen, so wie Schwermetalle bspw. nur dann schädigend auf den Gärprozess wirken, wenn sie in gelöster Form vorliegen. Der beim Gärprozess entstehende Ammoniak (NH_3) steht mit Ammonium (NH_4^+) im chemischen Gleichgewicht. Ein steigender pH-Wert führt zu einem Anstieg der Ammoniakkonzentration und kann dann die Mikroorganismen und somit den gesamten Prozess hemmen. Zudem nimmt die Hemmwirkung des Ammoniaks mit steigender Temperatur zu, daher ist vor allem bei thermophilen Prozessen eine Kontrolle sinnvoll (Kaiser *et al.* 2007, Weiland 2008, Effenberger *et al.* 2010).

Die Grenzwerte für kritische Konzentrationen weichen in der Literatur stark voneinander ab, da sie unter anderem von der Verfahrensführung und dem verwendeten Substrat abhängig sind. Daher wird auf eine Auflistung solcher Werte verzichtet.

3.3.3 Mikrobiologische Einflussfaktoren

Aufgrund der hohen Biodiversität besitzen mikrobielle Biozönosen die Fähigkeit sich an gegebene Lebensbedingungen zu adaptieren und sich auf diese zu spezialisieren. Dabei nimmt mit zunehmender Biodiversität die Flexibilität der Mikroorganismen zu. Je spezialisierter die Biozönose auf ein bestimmtes Substrat ist, desto höhere Abbauquoten können erzielt werden. Es sind jedoch längst noch nicht alle am anaeroben Abbauprozess beteiligten Mikroorganismen und deren Zusammenwirken bekannt, daher können derzeit v. a. allgemeine Aussagen über mikrobiologische Einflussfaktoren getroffen werden.

Aufgrund des Einflusses verfahrenstechnischer und chemischer Parameter auf die Mikroorganismen, sollten insbesondere die Temperatur- und pH-Optima eingehalten werden. Ebenso beeinflussen das Nährstoffangebot und die Konzentration an Hemmstoffen die Mikroorganismen. Wechselnde Substratzusammensetzungen stellen für die Bakterien auch wechselnde Lebensbedingungen dar, an die sie sich erneut anpassen müssen. Besonders zu Beginn der Anfahrphase wirkt sich daher eine niedrige Raumbelastung, die der Biozönose Zeit gibt sich zu entwickeln, positiv aus. Eine zu hohe Raumbelastung kann, wie beschrieben, zu einer Hemmung durch Versäuerung des anaeroben Abbauprozesses führen (Kaiser *et al.* 2007).

Natürlich sind die Mikroorganismen selbst der größte Einflussfaktor auf den Biogasprozess. So treibt eine hohe mikrobielle Biomasse bzw. Aktivität den Substratabbau und die Methanbildung schnell voran. Zudem ist die Enzymkonzentration, wie bspw. die mikrobieller Hydrolasen, bei ausreichend großer Substratkonzentration und konstanten Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, u. ä.) direkt proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit (Belitz *et al.* 2001). Wichtig ist jedoch v. a. eine gute Ausgewogenheit zwischen den unterschiedlichen Mikroorganismengruppen bzw. deren Enzymaktivitäten, sodass die verschiedenen Prozess-Phasen der anaeroben Vergärung problemlos ineinandergreifen können. Beeinflusst wird die Mikroorganismenzusammensetzung im Reaktor auch durch inokulierende Prozesse, wie die Zugabe von Gülle oder Prozesswasser mit einer etablierten mikrobiellen Biozönose (Lopes *et al.* 2004, Neves *et al.* 2004).

3.4 Parameter zur Prozesskontrolle

Da die Biogasbildung ein sehr komplexer Prozess ist, wird inzwischen ein großes Spektrum an vor allem physikalischen und chemischen Parametern zur Prozessüberwachung von Biogasanlagen empfohlen. Aus Kosten- und Zeitgründen wird in der Praxis jedoch nur eine reduzierte Auswahl an Parametern regelmäßig analysiert. Zu diesen gehören unter anderem die Temperatur der Fermenter, durch

welche das Aktivitätsoptimum der Mikroorganismen sowie die entstehende Biogasqualität eingestellt werden kann (ML 2004, Wiese & König 2007, Langenbeck 2008, KWS 2009), der pH-Wert des Schlammes, wobei besonders einer Versäuerung vorzubeugen ist (ML 2004, Wiese & König 2007, Langenbeck 2008, KWS 2009) sowie die Trockensubstanz und organische Trockensubstanz, welche als Maß für die Raumbelastung und den Abbaugrad dienen (Ott 2001, Wiese & König 2007, Lomborg *et al.* 2009). Die Analyse des CSB (Chemischer Sauerstoffbedarf) ist mittels Schnelltest vor Ort durchführbar. Er gibt Hinweise auf den Abbaugrad und den Rohfaseranteil (Wiese & König 2007, IFA 2012). Das Redoxpotential, welches die Reduktions- bzw. Oxidationsfähigkeit der Inhaltsstoffe wiedergibt, ist mittels entsprechender Elektrode lokal messbar, bedarf jedoch einer qualifizierten Einweisung des Personals (ML 2004, Wiese & König 2007, Langenbeck 2008). Zudem hat sich seit einigen Jahren die Messung des FOS/TAC-Wertes etabliert. Dieser gibt das Verhältnis des Gehalts an flüchtigen Fettsäuren zur Pufferkapazität an und beschreibt den biochemischen Zustand im Fermenter (ML 2004, KWS 2009). Durch spezialisierte Labore werden außerdem mehrere Substanzen analysiert. Dazu gehören flüchtige Fettsäuren, welche ein Zwischenprodukt im Biogasprozess sind und bei zu hoher Konzentration hemmend auf die Prozessbiologie wirken (ML 2004, Lesjak 2006, Wiese & König 2007, Boe *et al.* 2008, Langenbeck 2008, Lomborg *et al.* 2009, Henkelmann *et al.* 2010), der Gehalt an Spurenelementen, um einen Mangel und eine daraus resultierende Prozesshemmung vorzubeugen (Langenbeck 2008, Henkelmann *et al.* 2010) sowie der Ammoniak-Gehalt, welcher in hohen Konzentrationen toxisch auf den Biogasprozess wirkt (ML 2004, Lesjak 2006, Wiese & König 2007, Langenbeck 2008, Henkelmann *et al.* 2010). Außerdem gibt die Analyse des Gesamtstickstoffgehaltes Hinweise auf die Nährstoffversorgung bzw. Hemmung der Mikroorganismen (Lesjak 2006, Machan *et al.* 2006, Langenbeck 2008, IFA 2012). Als Kontrolle dient schließlich auch die Bestimmung der Gaszusammensetzung (v. a. CH₄, O₂, CO₂ und H₂S), welche die Biogasqualität widerspiegelt und die ebenfalls vor Ort mit entsprechender Sensorik erfasst werden kann (ML 2004, Langenbeck 2008, GDV 2010).

Die zur Prozesskontrolle relevanten mikrobiologischen Analyse-Methoden stammen zum größten Teil aus der Wasser- und Abwasser-Technologie (Lazarova & Manem 1995, Remde & Tippmann 1998, Guzzon *et al.* 2008) und sind unter anderem auf Grund ihrer unkomplizierten Handhabung und zeitnahen Resultate von Interesse.

So kann die Biomassedynamik mittels Untersuchung des Protein- und DNA-Gehaltes beobachtet werden (Lowry *et al.* 1951, Obst *et al.* 1995, BGD 2004). Zur Analyse der Biomasse auf Füllkörpern kann deren Biofilmdicke ermittelt werden (Ohl 2007, Burkhardt 2012). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) ermöglicht weiterhin die Bestimmung der mikrobiellen Gesamtzellzahl (Wenzel 2002, Arab & Wilderer 2005, Chelliapan *et al.* 2011). Die Eigenfluoreszenz des Coenzym F₄₂₀ von Methanogenen erlaubt zudem die Bestimmung der Gesamtzellzahl von methanogenen Archaeen sowohl mittels Fluoreszenzmikroskopie (Heine-

Dobbernack *et al.* 1988, Remde & Tippmann 1998, Demirel *et al.* 2008, Demirel & Scherer 2008, Schnürer & Jarvis 2010) als auch durch die Fluoreszenzspektroskopie (Cheng *et al.* 2007b, Xie *et al.* 2009, Welte & Deppenmeier 2011). Eine weitere Möglichkeit die mikrobielle Biozönose von Proben aus Biogasanlagen sowohl qualitativ als auch quantitativ zu untersuchen, ist die Analyse mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) (Remde & Tippmann 1998, Karakashev *et al.* 2005, Cirne *et al.* 2007, Li *et al.* 2011, Silva *et al.* 2011). Durch Bestimmung der Esteraseaktivität kann die heterotrophe Gesamtaktivität der Mikroorganismen mittels einer relativ schnellen photometrischen Analyse ermittelt werden (Fay *et al.* 1990, Obst *et al.* 1995, Pesta & Lenz 2006). Zudem erlaubt die Bestimmung verschiedener Hydrolaseaktivitäten, wie die der Amylase, L-Alanin-Aminopeptidase, Protease, Cellulase und Xylanase, die Analyse der Hydrolyserate, welche meist den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biogasbildung darstellt. Auch diese Analysen erfolgen photometrisch (Remde & Tippmann 1998, Enongene 2003, Parawira *et al.* 2005, Pesta & Lenz 2006, James *et al.* 2007, Mshandete *et al.* 2008a). Um die biologische Abbaubarkeit von Nährstoffen und die mikrobielle Aktivität zu bestimmen, werden häufig Respirationmessungen eingesetzt. Diese können zur Bestimmung der Atmungsaktivität unter aeroben Bedingungen, sowie zur Analyse der potentiellen Biogasbildung bzw. spezifischen methanogenen Aktivität unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden (Villela Filho *et al.* 2008, Barrena *et al.* 2009, Luo *et al.* 2011). Eine Zusammenfassung verschiedener Kontrollparameter ist in Tabelle 3-4 aufgelistet.

Zudem kann über klassische mikrobiologische Methoden der Lebend-Titer bestimmt und somit die aktive Fraktion verschiedener mikrobieller Verwerter-Typen quantifiziert werden (Süßmuth 1999, Henkelmann 2005, Lebuhn *et al.* 2006). Weiterhin dienen molekularbiologische Methoden wie die Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) zur Bestimmung der mikrobiellen Diversität und Dynamik. Dabei ist beispielsweise eine Differenzierung zwischen Bacteria und Archaea sowie der methanogenen Archaea Methanosarcinales und Methanomicrobiales möglich (Li *et al.* 2010, Piterina *et al.* 2010, Krakat *et al.* 2011). Außerdem kann eine Quantifizierung von Bacteria und Archaea mittels quantitativer PCR (qPCR) erfolgen (Bergmann *et al.* 2010, Feng *et al.* 2010, Escudié *et al.* 2011). Diese und weitere molekularbiologischen bzw. mikrobiologischen Methoden sind jedoch auf spezialisierte Labore beschränkt. Sie dienen in erster Linie der wissenschaftlichen Forschung, sowie zu vergleichenden Analysen, und tragen wesentlich zum besseren Verständnis der Dynamik der beteiligten Mikroorganismen bei. Sie können jedoch nicht im Sinne eines Schnelltests vor Ort Anwendung finden.

Tabelle 3-4: Zusammenfassung verschiedener Parameter zur Kontrolle von Biogasanlagen

Untersuchungsparameter	als Maß für	Analyse-Verfahren	Referenz
Temperatur	Aktivitätsoptimum der Mikroorganismen, Gasqualität	Temperatursonde, Thermostat	(ML 2004, Wiese & König 2007, Langenbeck 2008, KWS 2009)
pH-Wert	Versäuerung, Gasqualität	pH-Sonde	(ML 2004, Wiese & König 2007, Langenbeck 2008, KWS 2009)
Säurekapazität K_s	Pufferfähigkeit	Küvetten-Test, Titration	(Wiese & König 2007)
Hydrogencarbonat (HCO_3^-)	Pufferfähigkeit	Titration, volumetrisch	(Rudorf <i>et al.</i> 2007)
Trockensubstanz (TS), organische Trockensubstanz (oTS)	Raumbelastung, Abbaugrad, Quantität der mikrobiellen Biomasse in Biofilmen	Standardanalyse nach DIN 38414-S3	(Ott 2001, Wiese & König 2007, Guzzon <i>et al.</i> 2008, Lomborg <i>et al.</i> 2009)
essentielle Spurenelemente	Nährstoffbedingungen (Ni, Mo, Co, V, W, Se, Zn, Fe)	iCAP-Spektrometrie, ICP-/RFA-Spurenelementanalytik	(Langenbeck 2008, Henkelmann <i>et al.</i> 2010)
Redoxpotential	Reduktions- bzw. Oxidationsfähigkeit der Inhaltsstoffe	Redox-Elektrode	(ML 2004, Wiese & König 2007, Langenbeck 2008)
Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)	Abbaubarkeit und Energiepotential der Substrate	CSB-Standard-Messung (Küvettest)	(Wiese & König 2007, IFA 2012)
Flüchtige Fettsäuren (FFS)	Hemmung der Methanproduktion durch Versäuerung	Nahe-Infrarot-Spektroskopie (NIRS), Gaschromatographie, Titration, Ionenchromatografie	(ML 2004, Lesjak 2006, Wiese & König 2007, Boe <i>et al.</i> 2008, Langenbeck 2008, Lomborg <i>et al.</i> 2009, Henkelmann <i>et al.</i> 2010)
Flüchtige organische Säuren / gesamt (total) anorganischer Kohlenstoff (carbon) (FOS/TAC)	Verhältnis von freien flüchtigen Fettsäuren im Fermenter zum vorhandenen Puffervermögen → Prozessstabilität	Titration, Küvetten-Test, Ionenchromatografie	(ML 2004, KWS 2009)
Ammoniumstickstoff (NH_4^+-N)	Hemmung der Mikroorganismen	photometrische Bestimmung, Nahe-Infrarot-Spektroskopie (NIRS)	(ML 2004, Lesjak 2006, Wiese & König 2007, Langenbeck 2008, Henkelmann <i>et al.</i> 2010)
Gesamtstickstoff (N)	Nährstoffversorgung bzw. Hemmung der Mikroorganismen	Nasschemischer Nachweis (Kjeldahl), photometrische Bestimmung, Nahe-Infrarot-Spektroskopie (NIRS),	(Lesjak 2006, Machan <i>et al.</i> 2006, Langenbeck 2008, IFA 2012)
Raumbelastung B_R	Nährstoffversorgung der Mikroorganismen bzw. Über- oder Unterfrachtung	Bestimmung von kg oTS bzw. m^3 oTS pro Tag und m^3 Fermentervolumen	(Maierhofer & Wagner 2002, Hopfner-Sixt <i>et al.</i> 2007)
elektrische Leitfähigkeit	Versorgung der Biogasanlage mit Mengen- und Spurennährstoffen	Leitfähigkeitsmessgerät	(Langenbeck 2008)
Kohlenstoff/Stickstoff (C/N)	Abbaurate	Gaschromatographie	(KWS 2009)
Gaszusammensetzung: CH_4, O_2, CO_2, H_2, N_2, H_2S, NH_3	Gasqualität	Infrarot-Messung, elektrochemische Messung (EC), Gaschromatographie	(ML 2004, Langenbeck 2008)
Siloxan	Toxizität von Industrierückständen	Gaschromatographie, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Methode	(ML 2004, Dewil <i>et al.</i> 2007, Wilbur 2008)
Gasvolumen	Menge der Biogasproduktion	Eudiometerrohr, Gasdruckmessgerät, Gassammelrohr, Folienbeutel, Mikrogaszähler	(ML 2004, Schläfer 2005, Machan <i>et al.</i> 2006, Ohly 2006, Weiß & Brückner 2008)

physikalisch und chemisch

Untersuchungsparameter	als Maß für	Analyse-Verfahren	Referenz
mikrobielle Gesamtzellzahl (GZZ)	Quantität der mikrobiellen Biomasse	Fluoreszenzmikroskopie	(Remde & Tippmann 1998, Wenzel 2002, Arab & Wilderer 2005, Chelliapan <i>et al.</i> 2011)
DNA-Gehalt		fluoreszenzspektrometrische Bestimmung	(Obst <i>et al.</i> 1995, BGD 2004)
Gesamtproteingehalt		photometrische Bestimmung	(Lowry <i>et al.</i> 1951, Lazarova & Manem 1995, Lopes <i>et al.</i> 2000, Rode 2004)
Biofilmdicke		Berechnung über Masse, Dichte und Fläche	(EAWAG 1982, Wäsche 2003, Ohl 2007, Burkhardt 2012)
Coenzym F₄₂₀	Quantität der GZZ von Methanogenen	Fluoreszenzmikroskopie, Fluoreszenzspektroskopie	(Heine-Dobbernack <i>et al.</i> 1988, Remde & Tippmann 1998, Cheng <i>et al.</i> 2007b, Demirel <i>et al.</i> 2008, Demirel & Scherer 2008, Xie <i>et al.</i> 2009, Schnürer & Jarvis 2010, Welte & Deppenmeier 2011)
mikrobielle Gattungen/ Domänen	Anteil an bestimmten Gattungen/Domänen	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	(Remde & Tippmann 1998, Karakashev <i>et al.</i> 2005, Cirne <i>et al.</i> 2007, Li <i>et al.</i> 2011, Silva <i>et al.</i> 2011)
Esteraseaktivität	Stoffwechselaktivitäten der mikrobiellen Biomasse	photometrische Bestimmung	(Fay <i>et al.</i> 1990, Obst <i>et al.</i> 1995, Pesta & Lenz 2006)
Amylaseaktivität	Stärkeabbau		(Parawira <i>et al.</i> 2005, Pesta & Lenz 2006, Mshandete <i>et al.</i> 2008a)
Proteaseaktivität	Proteinabbau		(Parawira <i>et al.</i> 2005, Mshandete <i>et al.</i> 2008a)
L-Alanin-Aminopeptidase-aktivität	Peptidabbau	photometrische Bestimmung, Indikatorstäbchen	(Remde & Tippmann 1998, Enongene 2003, James <i>et al.</i> 2007)
Cellulaseaktivität	Celluloseabbau	photometrische Bestimmung	(Parawira <i>et al.</i> 2005, Pesta & Lenz 2006, Mshandete <i>et al.</i> 2008a)
Xylanaseaktivität	Xylanabbau		(Parawira <i>et al.</i> 2005, Pesta & Lenz 2006, Mshandete <i>et al.</i> 2008a)
aerobe und anaerobe Respirationsrate	biologische Abbaubarkeit von Nährstoffen und mikrobielle Aktivität	Respirationsmesssystem (AT ₄ , BSB ₅ , Gärtest GB ₂₁ , etc.), BSB-Sonde (BOD _{st})	(Süßmuth <i>et al.</i> 2000, Liu <i>et al.</i> 2003, Langenbeck 2008, Villela Filho <i>et al.</i> 2008, Barrera <i>et al.</i> 2009, Luo <i>et al.</i> 2011)

biologisch

4 MATERIAL & METHODEN

Im Folgenden werden die Untersuchungsobjekte und die analytische Vorgehensweise beschrieben.

4.1 Charakterisierung der untersuchten Biogasanlagen

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Biogasanlagen werden als zweistufige Trocken-Nass-Fermentation mit getrennter Hydrolyse betrieben. In den Reaktoren findet dabei eine mesophile Vergärung mit diskontinuierlicher Beschickung der ersten Stufe statt.

In der ersten Stufe (Hydrolyse-Stufe) erfolgt die Umsetzung von festem Substrat in wasserlösliche organische Substanzen. Hierzu sind, wie in Abbildung 4-1 dargestellt, mehrere Perkolatoren parallel geschaltet, in welchen das feste Substrat mit Prozesswasser berieselt und unter Einwirkung von Mikroorganismen und deren ausgeschiedenen Enzymen hydrolysiert wird. Das Produkt, das sogenannte Hydrolysat, ist ein nahezu feststofffreies Gemisch aus Wasser und den darin gelösten organischen Verbindungen. Das Hydrolysat der Perkolatoren wird in einem Zwischenspeicher gesammelt, wenn nötig gepuffert und kontinuierlich auf den eigentlichen Methanreaktor (zweite bzw. Methan-Stufe) gegeben. Dieser ist zur Vergrößerung der inneren Oberfläche mit Füllkörpern bestückt, mit Flüssigkeit eingestaut und wird wie ein Festbettreaktor durchströmt. Hier realisieren die an hydrophobe Füllkörper immobilisierten Mikroorganismen die kontinuierliche Umsetzung der Verbindungen des Hydrolysates zu Methan. Diese Mikroorganismen bilden auf den Füllkörpern einen Biofilm aus. Für den Aufbau des Biofilms wird von einem Schichtmodell ausgegangen, in dem die in der untersten Schicht befindlichen methanogenen Archaea durch die darüber liegenden Mikroorganismen, v. a. acetogene/syntrophe Mikroorganismen, vor zu starker Strömung und somit einem Ausschwemmen und zugleich vor zu großer Menge an Säuren aus dem Hydrolysat geschützt sind. Das Flüssigabbauprodukt des Reaktors wird nach Passage eines Belüftungs- und Schönungsbeckens in die Hydrolysephase zurückgeführt. Die Hydrolysedauer und damit die Verweilzeit des Substrates im Perkolator betragen abhängig vom Material zwischen 15 und 25 Tagen. Als Regelgröße der Methanproduktion dient die dosierte Zugabe an Hydrolysat in den Methanreaktor (Busch & Sieber 2006).

Das Prozesswasser zirkuliert stets in der Anlage und lediglich das noch im festen Gärrest gebundene Wasser wird aus dem System entfernt. So wird zum einen wenig Frischwasser benötigt und Nährstoffe, Enzyme und Mikroorganismen werden nicht so schnell ausgetragen, jedoch begünstigt dies auch die Anreicherung von Spurenelementen, Salzen und nicht abbaubaren organischen Stoffen, wie Huminstoffen. Dieser Anreicherung wird über einen in größeren Intervallen durchgeführten Prozesswasseraustausch entgegengewirkt. Die Milieubedingungen (Temperatur, pH-Wert, u. a.) werden in beiden Verfahrensstufen getrennt geregelt und optimiert. So können Nachteile einstufiger Anlagen vermieden werden. Unter anderem können verschiedene Substrate, sowohl landwirtschaftliche Substrate (Energie-

pflanzen, Festmist) als auch Grünschnitt und Bioabfälle, flexibel eingesetzt werden. Ein weiterer Vorteil ist die getrennte Erfassung von Gasen. Das in der Hydrolyse entstehende Gas kann so je nach Zusammensetzung getrennt abgeführt oder zusammen mit dem in der Methanstufe gebildeten Biogas weiter aufbereitet werden. Der Methangehalt im Biogas erreicht so rund 15–20% höhere Werte als bei einstufigen Anlagen, da ein Teil des Kohlenstoffdioxids bereits in der Hydrolysestufe freigesetzt und abgetrennt wird (GICON 2010).

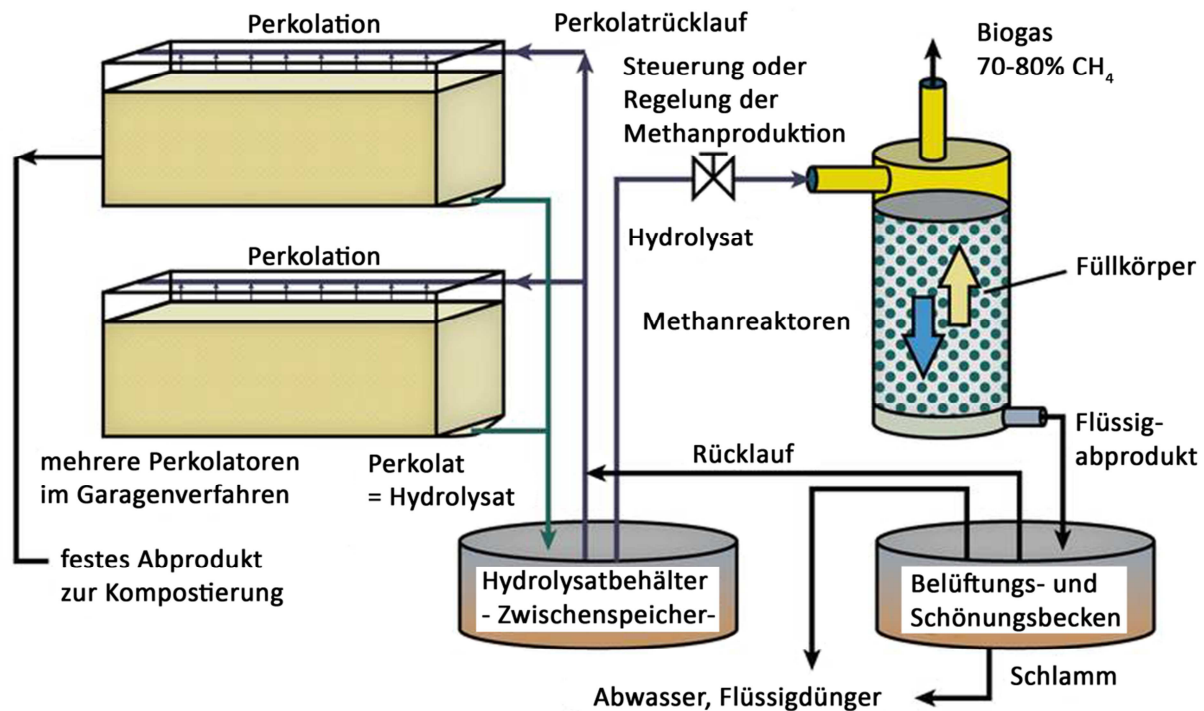


Abbildung 4-1: Zweistufige Trocken-Nass-Fermentation mit getrennter Hydrolyse

(GICON 2010)

4.1.1 Betrachtete Biogasanlagentypen

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene zweistufige Anlagen mit unterschiedlichen Reaktorgrößen beprobt.

4.1.1.1 Containeranlage

Im Großtechnikum Cottbus wurde im Jahr 2007 eine zweistufige Fest-Flüssig-Biogasanlage im Containermaßstab der Firma GICON GmbH (Großmann Ingenieur Consult GmbH) realisiert. Der schematische Aufbau der Anlage entspricht Abbildung 4-2. Neben vier Perkolatoren und diversen Zwischenspeichern besitzt diese Anlage zwei Methanreaktoren. Die Containeranlage ist eine vollautomatisierte Biogasanlage mit eigenem Prozessleitsystem (Steuerung des Perkulationsregimes und Datenaufzeichnung der Prozessdaten Temperatur, Füllstände und Volumen) und zahlreicher Feldmesstechnik. Alle relevanten Durchflüsse werden mittels magnetisch induktivem Durchflussmesser ermittelt. Die dazu-

gehörigen Summationswerte werden im Leitsystem erfasst. Die Flüssigkeitsspeicherbehälter werden mittels hydrostatischer Drucksensoren ermittelt und überwacht. In den Methanreaktoren gebildetes Biogas wird durch geeignete Gasdurchflussmesstechnik sowie Gasqualitätsmessung analysiert.

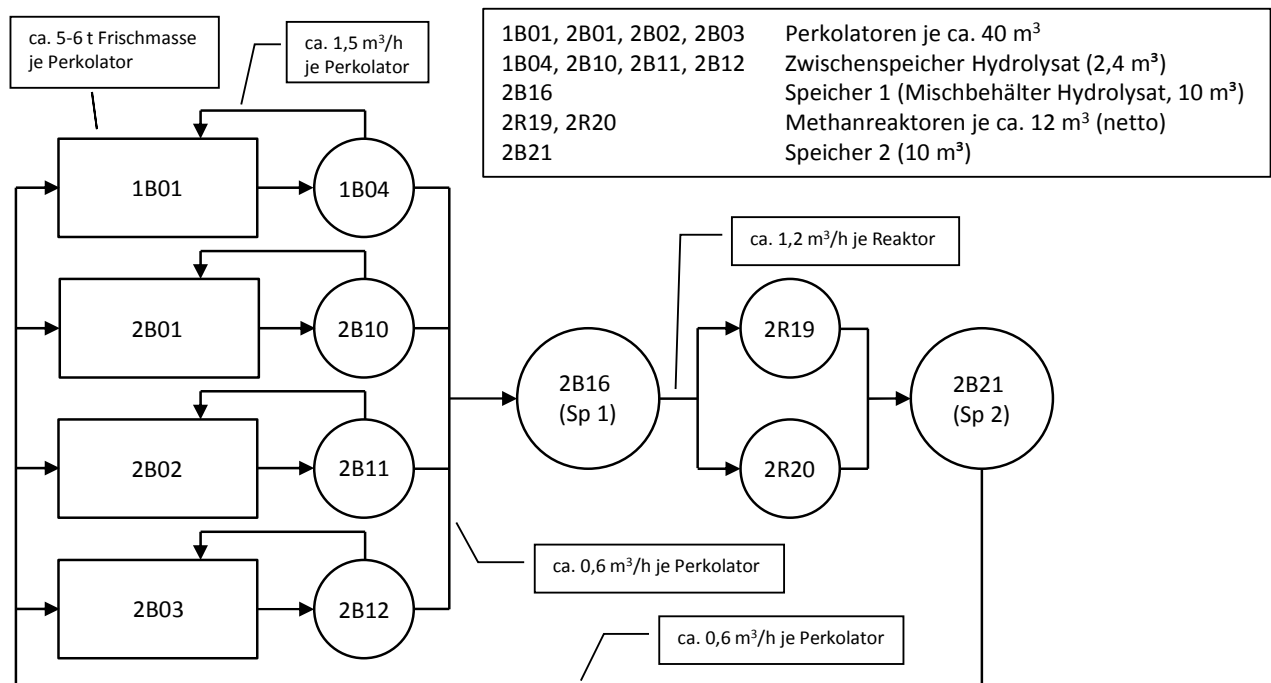


Abbildung 4-2: Schematischer Aufbau der betrachteten Containeranlage

Die Perkolatoren (1B01, 2B01–03), werden von Prozesswasser des Speicher 2 (2B21) berieselt. Der Ablauf gelangt in die Zwischenspeicher (1B04, 2B10–12), deren Flüssigkeit im Speicher 1 (2B16) gesammelt wird. Das Hydrolysat wird dann in die Methanreaktoren (2R19 und 2R20) geleitet und deren Ablauf wird in Speicher 2 (2B21) gesammelt.

Zur Verteilung der Perkolationsflüssigkeit ist an den Deckeln der Perkolatoren (ca. 40 m³) ein Düsen-system angebracht. Mittels Membranpumpe wird Flüssigkeit aus dem Speicher 2 (ca. 10 m³) durch die eingebauten Düsen in den Perkolatoren über dem Substrat verteilt. Zum besseren Abfluss der Flüssigkeit durch das Substrat, lagert das Substrat auf einem Siebboden. Das Hydrolysat gelangt nach Passage der Perkolatoren in die Zwischenspeicher (ca. 2,4 m³) und wird dann im Speicher 1 (ca. 10 m³) gesammelt. Zudem gibt es einen Rücklauf des Hydrolyсата aus den Zwischenspeichern in die entsprechenden Perkolatoren, ein kleiner Kreislauf, der das Substrat mit eventuell ausgeschwemmten Mikroorganismen und Enzymen beimpft. Das Hydrolysat aus Speicher 1 wird in die Methanreaktoren gepumpt, die zur Immobilisierung der Methanogenen mit Füllkörpern gefüllt sind (vgl. Kapitel 4.1.2). Deren Ablauf wird in Speicher 2 gesammelt. Das Prozesswasser läuft so insgesamt in einem großen Kreislauf. Sowohl in den Perkolatoren als auch in den Methanreaktoren ist eine Temperatur im mesophilen Bereich eingestellt (im Mittel 38 °C).

4.1.1.2 Fassanlage

Die Fassanlage im Großtechnikum Cottbus ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der stattfindenden Prozesse der Hydrolysestufe. So erlaubt eine sensitive Messtechnik z. B. die Analyse des bereits in der Hydrolysestufe gebildeten Gases (Hydrolysegas) hinsichtlich Menge und Zusammensetzung. Die Fassanlage besteht aus mehreren baugleichen, gasdichten, parallel betriebenen Fassperkolatoren. Methanreaktoren, die üblicherweise zwischen den Speichern 1 und 2 angeordnet wären, wurden nicht realisiert. Ein schematischer Aufbau der Fassanlage ist in der folgenden Abbildung 4-3 veranschaulicht.

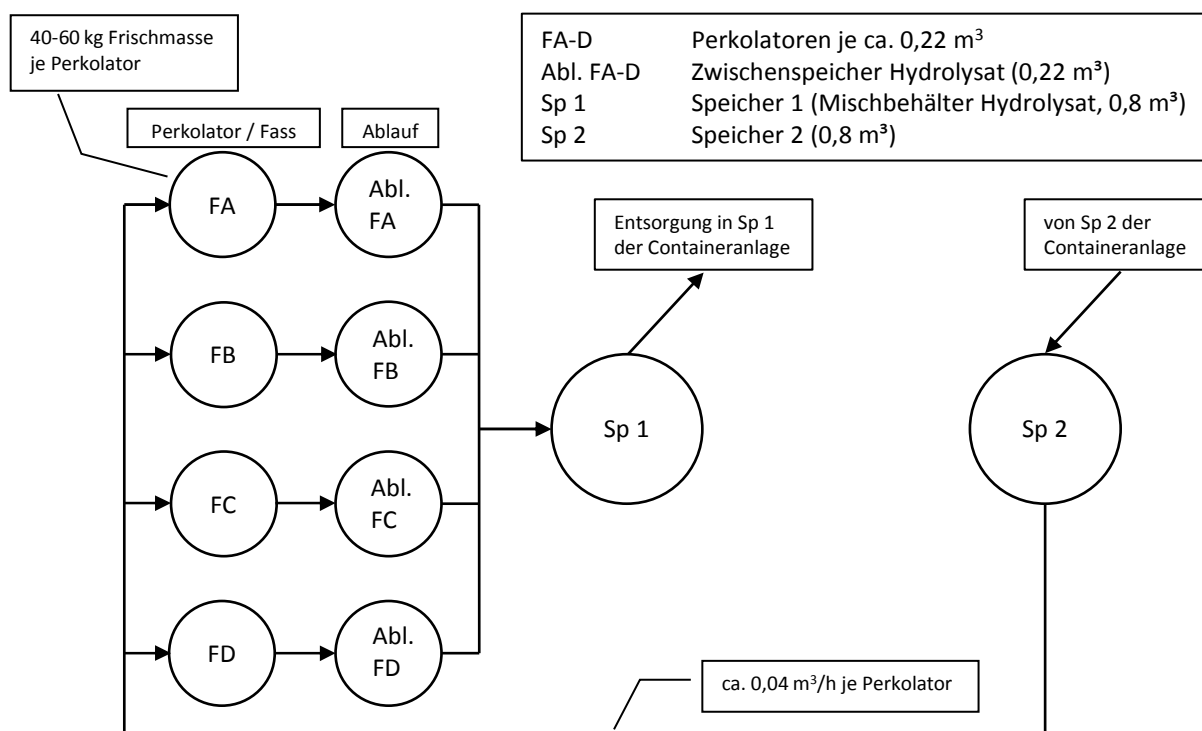


Abbildung 4-3: Schematischer Aufbau der betrachteten Fassanlage

Fass A bis D (FA–D) sind Perkolatoren, die von Prozesswasser des Speicher 2 (Sp 2) berieselt werden. Der Ablauf gelangt in die Ablauffässer (Abl. FA–D), deren Flüssigkeit im Speicher 1 (Sp 1) gesammelt wird.

Zur Verteilung der Perkolationsflüssigkeit ist im Deckel eines jeden Perkolationsfasses (220 L PE-Fass) eine Pralltellerdüse angebracht. Zudem sind eine Gasabfuhrleitung, zum Sammeln des Hydrolysegases in Gasspeicherbeuteln (300 L), und ein Thermometer zur Bestimmung der Hydrolysetemperatur montiert. Damit die Vergärungstemperatur ($\sim 38\text{ °C}$) in den Fässern gesichert ist, sind Heizmäntel um die Perkolationsfässer gespannt. Mittels Membranpumpe wird Flüssigkeit aus dem Speicher 2 (800 L PE-Behälter) der Fassanlage durch die eingebauten Düsen in den Perkolationsfässern über dem Substrat verteilt. Da sich in dem minimierten Maßstab gezeigt hat, dass die Berieselung alleine nicht ausreicht, um das Substrat vollständig zu durchfeuchten, wurden die Perkolationsfässer zusätzlich mit Prozesswasser aufgestaut (Aufstauverfahren). Zum besseren Abfluss der Flüssigkeit durch das Substrat, lagert das Substrat in den Perkolationsfässern auf einem Lochblechboden mit 2 mm Maschenweite, welches

20 cm über dem Fassboden befestigt ist. Das Hydrolysat gelangt nach Passage der Perkolationsfässer in die Ablauffässer (220 L PE-Fässer) und wird dann in einem Speicherbehälter (Speicher 1, ca. 800 L) gesammelt. Ein Rücklauf von den Ablauffässern in die Perkolationsfässer, der kleine Kreislauf, wurde nicht realisiert.

4.1.1.3 Pilotanlage

Auf dem Gelände der Agrar GmbH Altdöbern, Milchviehanlage Schöllnitz in Brandenburg, wurde 2007 eine 250 kW-Pilotanlage mit zweistufiger Trocken-Nass-Fermentation mit getrennter Hydrolyse errichtet (Abbildung 4-4). Ihr Aufbau entspricht in den Grundzügen der Containeranlage im Großtechnikum in Cottbus in einem etwa zehnmal größeren Maßstab. Vier Perkolatoren werden im offenen Garagenverfahren betrieben. Die Berieselung mit Prozesswasser erfolgt mittels Düsensystem. Nach Anreicherung mit der organischen Fracht und Passage durch das aufgeschüttete Substrat, wird das Hydrolysat in einem Sammelspeicher (Speicher 1) aufgefangen. Zu Untersuchungszwecken ist jedoch auch eine Probenahme des direkten Ablaufes des jeweiligen Perkolators möglich. Das gesammelte Hydrolysat wird kontinuierlich in die zwei Methanreaktoren gepumpt, die mit Füllkörpern beladen sind. Das gebildete Biogas wird in einer Gasblase gespeichert. Der Ablauf der Methanreaktoren gelangt in den Speicher 2, aus welchem das Prozesswasser wieder in die Perkolatoren gepumpt wird. Ein Prozessleitsystem ermöglicht den automatischen Anlagenbetrieb und eine Fernüberwachung.

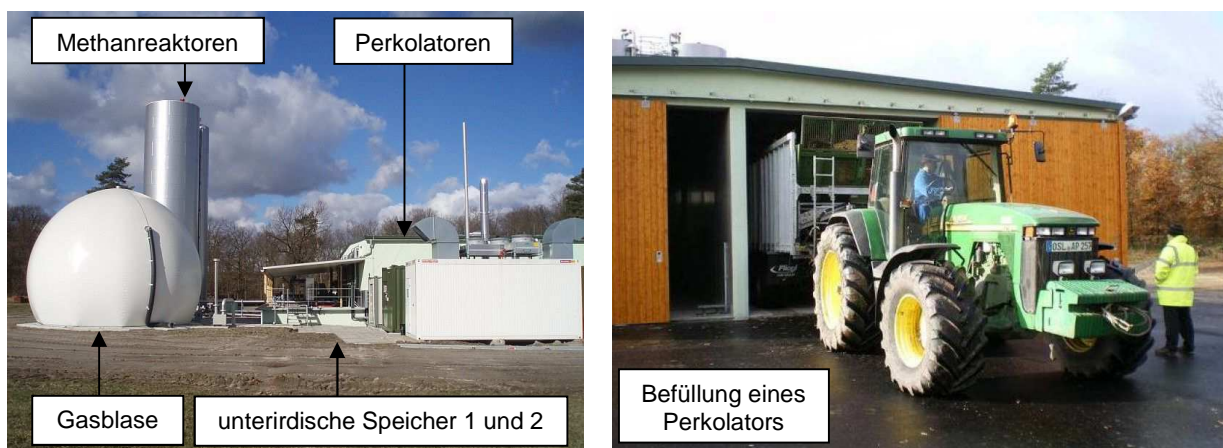


Abbildung 4-4: Pilotanlage in Schöllnitz

Die 250 kW-Pilotanlage in Schöllnitz, Brandenburg, wird als zweistufige Trocken-Nass-Fermentation mit offener Hydrolyse betrieben.

Quelle: www.gicon.de

4.1.2 Füllkörper der Methanstufe

Die Methanreaktoren der Biogasanlagen sind etwa zu 2/3 des Volumens mit Füllkörpern beladen. Diese dienen der Oberflächen- und somit auch der Reaktionsraumvergrößerung und stehen den Mikroorganismen als Aufwuchsträger zur Verfügung. Sie schützen durch Immobilisierung die syntrophen

und methanogenen Mikroorganismen, die eine relativ lange Generationszeit aufweisen, vor dem Auspülen.

Die Methanreaktoren der Containeranlage sind mit zwei verschiedenen Füllkörpern bestückt. In Reaktor 2R20 befinden sich Füllkörper der Sorte Bioflow 40 (siehe Abbildung 4-5a), in Reaktor 2R19 die Hel-X H2X36-Füllkörper (siehe Abbildung 4-5b). Die Methanreaktoren der Pilotanlage in Schöllnitz sind ebenfalls mit den Füllkörpern der Sorte Bioflow 40 beladen.

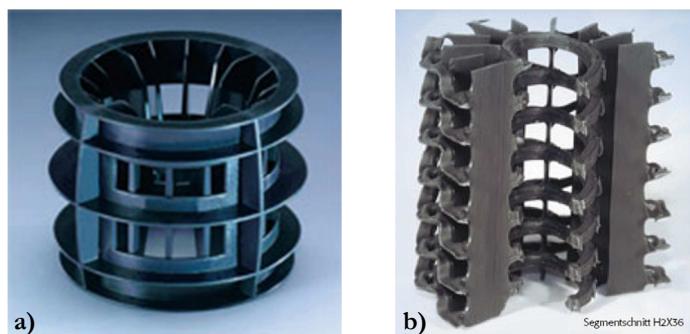


Abbildung 4-5: Füllkörper der Methanstufe
a) Füllkörper Bioflow 40 (RVT) b) Füllkörper Hel-X H2X36 (Stöhr)

Die Daten der beiden Füllkörperarten sind in Tabelle 4-1 aufgelistet.

Tabelle 4-1: Technische Daten der Füllkörper

Parameter	Bioflow 40	Hel-X H2X36
Größe	Durchmesser: 40–45 mm Länge: 35 mm	Durchmesser: 35 mm Länge: 36 mm
Oberfläche	305 m ² /m ³ 21.466 mm ²	320 m ² /m ³ 14.452 mm ²
Dichte	91 kg/m ³	80 kg/m ³
mittleres Einzelgewicht	6,29 g	4,15 g
Material	Polyethylen (PE)	Polyethylen (HDPE)
Firma	Rauschert Verfahrenstechnik GmbH, Steinwiesen	Christian Stöhr GmbH, Marktrodach

4.1.3 Fermentierte Substrate

Da die Hydrolysestufe des untersuchten Biogasverfahrens als Trockenfermentation betrieben wird, ist sie für feste, schütffähige Substrate geeignet. Silagen weisen diese Eigenschaften auf. In den untersuchten Anlagen kamen Maissilage (Ganzpflanzensilage) und Grassilage (Grasschnitt) zum Einsatz.

Die Silierung ist in der Praxis eine gängige Methode zur Konservierung von pflanzlicher Biomasse. Hierzu wird die bei der Ernte noch möglichst feuchte Biomasse (50–70% Wassergehalt) gehäckselt und in Silos oder Folienballen gelagert. Dabei liegt die optimale Trockenmasse für Maisilage bei 28–35% und für Gras bei 30–40%. Der Silierprozess wird in Gang gesetzt, wenn die Schüttung fest verpresst

und anaerob gelagert wird. Die biochemischen Prozesse der Silierung beruhen auf einem Gärprozess, bei dem anaerobe Mikroorganismen Säuren bilden. Wenn der Gehalt an vergärbaren Zuckern ausreichend hoch ist, wird dabei vorwiegend Milchsäure gebildet und es kommt zur pH-Wert-Absenkung. Bei einem niedrigen pH-Wert (etwa ab pH 4) wird die Zellatmung, die Buttersäurebildung und die Eiweißspaltung minimiert. So werden unter diesen Bedingungen die Stoffwechselprozesse durch Selbsthemmung der Mikroorganismen stark eingeschränkt und die Biomasse wird für eine längere Zeit konserviert (Kaltschmitt *et al.* 2001, Hertwig 2006).

Die bei den Versuchen verwendete Maissilage wurde von dem landwirtschaftlichen Betrieb Agrar GmbH Altdöbern bezogen. Das Substrat wurde in Betonsilos gelagert. Das gehäckselte pflanzliche Material hatte eine Länge von durchschnittlich 2 cm.

Die verwendeten Folienballen-Grassilagen kamen von Flächen der Muldeau bei Dessau – Solnitz, Priorau (Fläche Rütchenwiese) und Schierau (Fläche Jungviehstall). Die Mahd erfolgte einmal Anfang August (1. Charge) und einmal Ende Oktober 2011 (2. Charge). Der silierte Grasschnitt hatte eine Länge von durchschnittlich 20 bis 30 cm. Alle Gräser waren mehr oder minder mit Hexachlorcyclohexan-Isomeren (HCH) belastet. γ -HCH, zu mind. 99% in Lindan enthalten, ist ein Insektenbekämpfungsmittel, welches in dieser Region noch bis 1990 zum Einsatz kam. Abfälle der Produktion mit allen Nebenprodukten landeten auf Deponien in der Region und bis heute sind noch γ -HCH und dessen Reaktions- und Abbauprodukte, wie etwa α -, β - und δ -HCH, nachweisbar. Dabei sind α -, β - und δ -HCH nicht pestizid wirksam und zeichnen sich im Gegensatz zum γ -Isomer durch eine hohe Persistenz aus (Klimanek *et al.* 2000, UBA 2010). In dieser Arbeit war u. a. die Eignung von solchen belasteten Grassilagen als Biogassubstrat sowie der möglich stattfindende mikrobielle HCH-Abbau während der anaeroben Vergärung von Interesse.

4.2 Untersuchte Proben

4.2.1 Probenahme und Transport

Es wurden verschiedene Prozessstellen der in Kapitel 4.1 vorgestellten Biogasanlagen in unterschiedlichen Prozessphasen beprobt. In der Regel wurden ein- bis zweimal wöchentlich flüssige Proben genommen, d. h. Proben des Perkolatorablaufs, des Speicher 1 und des Speicher 2. Feststoffproben, d. h. Proben aus den Perkolatoren, konnten aus verfahrenstechnischen Gründen meist nur vor Beginn der Fermentation (frische Silage bzw. Eingangsmaterial) und nach der Hydrolyse (Gärrest bzw. Ausgangsmaterial) entnommen werden. Füllkörper aus der Methanstufe konnten nur zweimal beprobt werden, da hierfür das Prozesswasser aus den Reaktoren abgelassen werden muss.

In Tabelle 4-2 sind die untersuchten Proben mit den entsprechenden Probenahmestellen und -zeitpunkten sowie die entsprechenden Anlagenparameter dargestellt.

In der Beprobungsphase C3 fiel inmitten des Untersuchungszeitraumes für einige Stunden die Pumpe zur Beschickung der Methanreaktoren aus, weshalb an diesem Tag die Zulauftrate um 30% reduziert war.

Zur Analyse von Auswirkungen auf die mikrobielle Biozönose auf Modifikationen des Verfahrens wurden weiterhin einige Modifikationen getestet. So wurde die Perkolationsrate, die i. d. R. 6 L/(kg oTS×d) betrug, variiert (F1). Ferner wurde in einen Perkolator pro kg oTS Substrat 0,3 g Additiv in Form von sensoPower® Starter (Phytobiotics GmbH) zugegeben. Dieses enthält nach Angaben des Herstellers Sangrovit®, spez. Enzyme, Probiotika und Spurenelemente und soll damit die Essigsäureproduktion steigern und den gesamten Gärprozess beschleunigen. Zudem wurde in einen Perkolator Gärrest des Vorversuchs als Inokulum, zur Inokulation mit hydrolisierenden Mikroorganismen, zugesetzt (0,67 kg oTS Gärrest pro kg oTS frischem Substrat). Des Weiteren wurde in einem Perkolator die Hydrolyse ohne aufgestautes Prozesswasser getestet (F2).

Um zu analysieren, wie die Methanogenen in der Hydrolysestufe zu unterdrücken sind, wurde einer der Zuläufe, Speicher 2, über die gesamte Versuchsdauer hinweg durch einen statischen Mischer intensiv belüftet. Zudem wurde ein anderer Speicher 2 diskontinuierlich (alle zwei bis drei Tage) mit Antisept 33 (Ernst GmbH & Co. KG), einem sauren Desinfektionsmittel (Inhaltsstoffe: Peroxiessigsäure 15 Ma.-%, Wasserstoffperoxid, Essigsäure, Stabilisatoren), versetzt (F3–5). Dabei wurden tröpfchenweise 450–1650 mL Antisept 33 zu etwa 600 L Prozesswasser zugeführt bis das Redoxpotential nicht weiter anstieg. Da Antisept 33 Wasserstoffperoxid enthält und dieses dazu neigt in Wasser und Sauerstoff zu zerfallen, stieg das Redoxpotential bei Zugabe bis auf über 300 mV an.

Weiterhin wurde die Eignung von HCH-belasteter Grassilage als Biogassubstrat sowie der möglich stattfindende mikrobielle HCH-Abbau während der anaeroben Vergärung untersucht (C5).

In den Beprobungsphasen C2 und C4 konnten ferner Proben aus den Methanreaktoren analysiert werden. In Beprobungsphase C2 (etwa zwei Jahre nach Betriebsbeginn) wurden Füllkörper aus dem unteren Drittel einer der Methanreaktoren der Containeranlage (2R20) entnommen. In Beprobungsphase C4 (etwa vier Jahre nach Betriebsbeginn) fand eine Füllkörperentnahme des Methanreaktors 2R20 in drei verschiedenen Höhen (oberes, mittleres und unteres Drittel) und des Methanreaktors 2R19 im mittleren Drittel statt. Zudem wurde Bioschlamm, der sich locker zwischen den Füllkörpern befand, entnommen. Nach der Probenahme wurden alle restlichen Füllkörper aus den Reaktoren entnommen, gewaschen und den vom Bioschlamm befreiten Methanreaktoren zurückgeführt.

Tabelle 4-2: Anlagenparameter und analysierte Proben

Anlage	Beprobungsphase (Hydrolysedauer)	Substrat	Modifizierung oder Störung	analysierte Proben
Containeranlage	03.12.–22.12.2008 (19 Tage)	C1 Maissilage	--	EIN 2B01, AUS 2B01, 2B10, 2B21
	26.01.2009	C2 --	--	FK aus 2R20
	14.04.–05.05.2009 (21 Tage)	C3 Maissilage	Pumpenausfall	2B02, 2B11, 2B21
	07.03.2011	C4 --	--	FK und Bioschlamm aus 2R19 und 2R20
	14.11.2011–19.03.2012 (19–22 Tage)	C5 Grassilage	Substrat mit HCH belastet	1B01, 2B01, 2B02, 1B04, 2B10, 2B11, 2B16, 2B21
Fassanlage	29.10.2009 (21 Tage)	F1 Maissilage	Perkolationsrate [L/(kg oTS×d)]: FA: 5, FB: 5,6, FC: 6 (Referenz), FD: 3	AUS FA–D, Abl. FA–D, Sp 1, Sp 2
	30.10.–26.11.2009 (20 Tage)	F2 Maissilage	Modifikation im Perkolator: FA: Referenz, FB: Zugabe von sensoPower®, FC: Zugabe von Gärrest, FD: kein Aufstau	EIN F, AUS FA–D, Abl. FA–D
	14.06.–05.7.2010 (21 Tage)	F3 Maissilage	FA: Referenz, FB: Belüftung des Sp 2	EIN F, AUS FA–B, Abl. FA–B, Sp 2
	10.11.–02.12.2010 (22 Tage)	F4 Maissilage	FA+B: Referenz, FC+D: Belüftung des Sp 2, FE+F: Zugabe von Antisept 33 zu Sp 2	EIN F, AUS FA–F, Abl. FA–F, Sp 2
	18.01.–08.02.2011 (22 Tage)	F5 Maissilage	FA+B: Referenz, FC+D: Belüftung des Sp 2	EIN F, AUS FA–D, Abl. FA–D, Sp 2
Pilot- anlage	17.01.–01.02.2010 (15 Tage)	P Maissilage	--	P2, Abl. P2, Sp 1, Sp 2

EIN = Eingangsmaterial, AUS = Ausgangsmaterial, Abl. = Ablauf des Perkolators, F = Fass, P2 = Perkolator 2 der Pilotanlage, FK = Füllkörper; wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden Proben aus den Perkolatoren über die gesamte Beprobungsphase analysiert

Die Proben wurden i. d. R. von Mitarbeitern der Firma GICON GmbH genommen. Die flüssigen Proben, d. h. Proben des Perkolatorablaufs, des Speicher 1 und des Speicher 2, wurden in Plastikflaschen bis zum Rand abgefüllt, sodass die Proben bis zur Analyse mit möglichst wenig Sauerstoff in Kontakt kamen. Die Proben aus den Perkolatoren wurden in Plastikbecher oder Tüten möglichst dicht verpackt. Die Füllkörper wurden in einem Anaerobiertopf, der auch als feuchte Kammer fungierte, gefüllt. Alle Proben wurden kühl gelagert (~4 °C) und innerhalb von max. 18 Stunden gekühlt transportiert.

4.2.2 Physikochemische Analysen

Viele physikochemischen Parameter wurden vor Ort von der Firma GICON GmbH bestimmt bzw. die Analyse an den Kooperationspartner BGD GmbH (Boden- und Grundwasserlabor Dresden GmbH) weitergeleitet. In der Tabelle 4-3 sind die in dieser Arbeit miteinbezogenen physikochemischen Parameter und entsprechende Analyseverfahren aufgelistet.

Tabelle 4-3: Untersuchte physikochemische Parameter

Parameter	Messeinrichtung bzw. Methodik	Verantwortlicher	
pH-Wert	in Anlehnung an die DIN 38404 Teil 5, Multimesegerät Hach HQ 40D (HACH LANGE GmbH)	GICON	
Redoxpotential	pH1001 + Redoxelektrode (VWR International GmbH)	GICON	
CSB	analog EPA 410.4, US Standard Methods 5220 D und ISO 15705, Spectroquant® Analysensystem PhotoLab S12 (WTW GmbH), Thermoblock Nanocolor compact (Macherey-Nagel GmbH), Spectroquant® 1.14555.0001, CSB-Küvettestest (Merck KGaA)	GICON	
FOS/TAC	Endpunkttitrator DL 15 mit integrierter pH-Elektrode (Mettler-Toledo GmbH)	GICON	
organische Säuren	nach DIN 38414 Teil 19	GICON	Nachauftrag an die Brandenburgische TU Cottbus (BTU)
HCH-Isomere	nach DIN EN ISO 6468 (F1) nach Extraktion mit Aceton-Cyclohexan		
Dioxine/Furane,	nach 17. BImSchV (NATO CCMS)		
Cadmium	nach DIN EN ISO 5961 (E 19) 1995-05 bzw. DIN ISO 11047 2003-05	BGD	Nachauftrag an das ERGO Umweltinstitut GmbH
Arsen	nach DIN EN ISO 11969 (D 18) 1996-11 bzw. DIN ISO 11466 1997-06		
Gasanalytik der Methanreaktoren	Fluidistor Gasdurchflussmessgerät GD 050 (Esters Elektronik GmbH), VISIT-03 (Messtechnik EHEIM GmbH), Mehrkanal Gasanalysator Biogas 905 (ADOS GmbH)	GICON	
Hydrolysegas-Analytik	in Anlehnung an die VDI-Norm 4630, Trommel Gaszähler TG5/5 (Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG), VISIT-03 (Messtechnik EHEIM GmbH)	GICON	
Gesamtmenge von Ca, K, Mg, P und S	nach DIN EN ISO 11885	BGD	
Kjeldahl-Stickstoff	nach DIN ISO 11261	BGD	

4.3 Probenvorbereitung

Für einige Analysen mussten die Proben zunächst speziell aufgearbeitet werden. Dies wird in den folgenden Unterkapiteln erläutert.

4.3.1 Ablösen der Biomasse von dem Substrat

Zur Analytik der mikrobiellen Biomasse, die sich auf dem Substrat (Silage) der Feststoffproben befand, musste diese zunächst abgelöst werden. Hierzu wurden 10 g der Feststoffprobe mit 100 mL 0,9% NaCl-Lösung versetzt und eine Minute kräftig geschüttelt oder für zwei Stunden auf einem Schüttler (150 rpm (Runden pro Minute), Ströhlein Instruments HS 500) aerob sowie anaerob inkubiert und/oder mit Ultraschall behandelt (1 Minute im Ultraschallbad, mittlere Leistung). Der Überstand, die Zellsuspension, wurde abgenommen und mittels Gesamtzellzahlbestimmung (siehe Kapitel 4.4.2) hinsichtlich der Effizienz der Methoden untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass das bloße Abschütteln in der NaCl-Lösung eine einfache und die effektivste Methode darstellt (vgl. Anhang A-1). Die so abgelöste Biomasse wurde für folgende Analysen als Flüssigprobe weiter behandelt.

4.3.2 Ablösen des Biofilms von den Füllkörpern

Zur Ermittlung einer geeigneten Methode zum Ablösen des Biofilms (Biomasse) von den Füllkörpern der Methanstufe wurden je Füllkörper 150 mL 0,9% NaCl zugesetzt und dieser zwei Minuten kräftig per Hand geschüttelt, zur mechanischen Behandlung zusätzlich 40 g Glasperlen (\varnothing 3 mm) je Füllkörper zugegeben bzw. zusätzlich mit Ultraschall (3 Minuten im Ultraschallbad, mittlere Leistung) behandelt. Hierbei wurden fünf Füllkörper je Probenahmestelle berücksichtigt. Diese Prozedur wurde jeweils sooft wiederholt, bis das Lösungsmittel nur noch sehr schwach vom Biofilm getrübt war. Dadurch konnten verschiedene Biofilmfraktionen (Überstände) gewonnen und analysiert werden – von außen nach innen bzw. vom leicht bis zum schwer ablösbaren Biofilm. Zunächst wurden diese vereinigt und mittels Bestimmung der Trockensubstanz sowie organischen Trockensubstanz (siehe Kapitel 4.4.1), der Gesamtzellzahl (siehe Kapitel 4.4.2) und des Proteingehaltes (siehe Kapitel 4.4.3) hinsichtlich der Effizienz der Methoden untersucht. Es stellte sich heraus, dass das Abschütteln per Hand mit Glasperlen die effektivste Methode ist (vgl. Anhang A-2). Der so abgelöste Biofilm wurde für folgende Analysen als Flüssigprobe weiter behandelt.

4.3.3 Fixierung der Proben

Eine Fixierung der Proben macht diese für mehrere Monate haltbar. Sie sollte unmittelbar nach der Probenahme erfolgen. Zur Analyse mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und der Gesamtzellzahl (siehe Kapitel 4.7.2 und 4.4.2) werden fixierte Proben benötigt.

Die Proben wurden nach etwaiger Vorbehandlung (vgl. 4.3.1 und 4.3.2) schnellstmöglich mit einer NaN_3 -Lösung (Natriumazid, 10%-Endkonzentration) für mindestens zwei Stunden bei 4 °C fixiert. Dadurch wird der Elektronen-Transport der Atmungskette gestört und eine schnelle Fixierung der Zellen gewährleistet. Außerdem wird eine Vernetzung der EPS (Extrazelluläre Polymere Substanzen) verhindert, was eine bessere Homogenisierung der Zellsuspension ermöglicht. Zur Entfernung des

NaN₃, wurden die Proben vor der eigentlichen Fixierung mit 1xPBS-Puffer (130 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen. Dazu wurden die Zellen jeweils zehn Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Zur Fixierung von Gram-negativen Bakterien wird Paraformaldehyd als Fixativ empfohlen (Manz *et al.* 1992). Es stabilisiert die Zellwände durch Quervernetzung der Zellwandproteine. Hierfür wurde ein Teil der Zellsuspension mit drei Teilen 3,7%iger, sterilfiltrierter Paraformaldehyd-Lösung versetzt und mindestens zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Probe erneut mit 1xPBS-Puffer gewaschen, in 1xPBS-Puffer resuspendiert und mit dem gleichen Volumen eisgekühltem, 96%igen Ethanol gemischt. Auf diese Weise fixierte Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Bei Gram-positiven Bakterien kann es aufgrund ihrer besonderen Zellwandstruktur zu besonders starken Vernetzungen durch Paraformaldehyd kommen, wodurch die Analytik gestört werden kann, sodass parallel eine Fixierung nur mit Ethanol stattfand (Roller *et al.* 1994). Hierzu wurde ein Teil der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Ethanol (96%, p. a.) versetzt und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Da zwischen den EtOH- und PFA-fixierten Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzellzahl (Kapitel 4.4.2) sowie bei der FISH (Kapitel 4.7.2) detektiert werden konnten, wurden folgende Analysen einzig mit den EtOH-Fixierungen durchgeführt.

4.3.4 DNA-Extraktion

Für die molekularbiologischen Analysen, qPCR und DGGE (siehe Kapitel 4.7.3 und 4.8.1), werden DNA-Extrakte benötigt. Da die Proben stark huminstoffhaltig waren, erfolgte die Extraktion der DNA nach der Vorbehandlung (vgl. Kapitel 4.3.2) mit dem NucleoSpin® Soil Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren), welches auf solche Proben ausgerichtet ist, nach den Arbeitsanweisungen des Herstellers. Es wurde der Lyse-Puffer SL2 und der Enhancer SX verwendet und je nach erwarteter DNA-Menge zwischen 200 und 2000 µL Probe eingesetzt. Eluiert wurde die DNA in 30–80 µL des vorher auf 60 °C erwärmten Elutionspuffers.

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA nach der Extraktion wurde das NanoDrop™ ND-1000 Spektrophotometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) verwendet.

4.3.5 Polymerasekettenreaktion

Die konventionelle PCR (Polymerasekettenreaktion) ist eine weit verbreitete Methode zum gezielten Amplifizieren von DNA-Fragmenten. Für die PCR werden zwei zur Ausgangs-DNA (Template) komplementäre Oligonukleotide (Primer) gegensätzlicher Orientierung benötigt, welche das zu amplifizierende Fragment auf dem Template begrenzen. Außerdem beinhaltet ein PCR-Ansatz Puffer, Nukleotide und eine thermostabile DNA-Polymerase. Die Thermostabilität dieser Polymerase ermöglicht es,

im ersten Schritt der PCR durch hohe Temperaturen doppelsträngige DNA-Moleküle aufzuschmelzen (Denaturierung). Im zweiten Schritt können sich die Primer, bei wieder herabgesetzter und vom GC-Gehalt sowie der Länge der Primer abhängigen Temperatur, an die komplementären Sequenzen der zu amplifizierenden DNA anlagern (Annealing). Im folgenden dritten Schritt wird bei einer für die Polymerase optimalen Temperatur, ausgehend von den 3'-Enden der Primer, ein zur Template-DNA komplementärer neuer DNA-Strang synthetisiert (Elongation) (Madigan *et al.* 2001). Die Methode der PCR dient in erster Linie dazu, bestimmte DNA-Fragmente zu vervielfältigen und für weitere Analysen, wie die Klonierung (Kapitel 4.7.3), DGGE und Sequenzierung (Kapitel 4.8.1 und 4.8.2), bereitzustellen. Für die PCR wurden DNA-Extrakte eingesetzt, die wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben gewonnen wurden. Das eingesetzte DNA-Volumen wurde anhand der vorherigen Konzentrationsbestimmung festgelegt. Der PCR-Ansatz wurde in entsprechende Reaktionsgefäße pipettiert (Quali-PCR-Tube-Streifen, Kisker Biotech GmbH, Steinfurt). Zum Ausschluss eines falschpositiven Ergebnisses wurde stets ein Ansatz mit sterilem, Nukleotid-freiem Wasser anstatt Template-DNA als Negativkontrolle mitgeführt. Die Reaktion fand in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) statt. Die eingesetzten Primer sind in Tabelle 4-4 aufgeführt. Die verwendeten Primersysteme und die entsprechende Programmierung des Thermocyclers sind dem Anhang A-3 zu entnehmen.

Tabelle 4-4: Primer zur PCR-analytischen Untersuchung für die DGGE und Sequenzierung

Primer	Zielgen	Sequenz (5' → 3')	Referenz
27f	16S rDNA der Bacteria	AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG	(Suzuki & Giovannoni 1996, Polz & Cavanaugh 1998)
1492r		TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T	
357f		TAC GGG AGG CAG CAG	
518r		ATT ACC GCG GCT GCT GG	
Ar109f	16S rDNA der Archaea	ACK GCT CAG TAA CAC GT	(Stahl & Amann 1991, Ovreås <i>et al.</i> 1997, Großkopf <i>et al.</i> 1998)
Parch519f		CAG CCG CCG CGG TAA	
Ar915r		GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	
Msm355f	16S rDNA der Methanosarcinales/-microbiales	CAG GCG CGA ACT TTA C	(Banning <i>et al.</i> 2005)
Msm1068r		ATG CTT CAC AGT ACG AAC	

Ein 25 µL PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

GoTaq [®] Hot Start Green Master Mix (2x, Promega, Mannheim)	12,5 µL
Vorwärtsprimer (10 pmol)	0,5 µL
Rückwärtsprimer (10 pmol)	0,5 µL
Template (10–100 ng/µL)	0,5–2,5 µL
Lichrosolv [®] Wasser (Merck, Darmstadt)	ad. 25 µL

Die Kontrolle der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Dafür wurden je nach zu erwartender Produkt-Größe 5 µL des PCR-Ansatzes mit 1 µL Ladepuffer (Peqlab) gemischt und auf

1,5%ige (Fragmentlänge > 200 bp) oder 2%ige Gele (Fragmentlänge < 200 bp) aufgetragen. Die Gele wurden aus Agarose (Peqlab) und 1x TAE-Puffer hergestellt. Die Zusammensetzung des 50x TAE-Puffers ist in Tabelle 4-5 aufgeführt. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Fragmentgröße ein DNA-Standard (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas GmbH, St-Leon-Rot) aufgetragen. Die Gелеlektrophorese erfolgte bei 130 mA für 35–40 Minuten (Spannungsgerät Consort E835, Consort bvba, Turnhout). Anschließend wurde das Gel für etwa 20 Minuten in Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/L) gefärbt. Nach kurzem Waschen in Wasser erfolgte die Detektion mittels UV-Transilluminator (DH-30/32, biostep GmbH, Jahnsdorf).

Tabelle 4-5: Laufpuffer für die Agarosegelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung	
50x TAE	242 g Tris-HCl 57,1 mL Eisessig 100 mL 0,5 M EDTA ad. 1 L H ₂ O _{dest.}	pH 7,6 Arbeitskonzentration: 1x

4.4 Bestimmung von Biomasseparametern

Unter Biomasse werden alle durch Organismen erzeugten organischen Substanzen sowie die Organismen selbst verstanden. Die im Folgenden beschriebenen Analysen dieser Arbeit konzentrieren sich hauptsächlich auf die mikrobielle Biomasse.

4.4.1 Trockensubstanz

Die Trockensubstanz (TS) und organische Trockensubstanz (oTS) sind wichtige Grundparameter der Anlagensteuerung bezüglich der Berechnung des Abbaugrades des Substrates und Perkolates einer Biogasanlage und der Überwachung einer möglichen Akkumulation von anorganischen Inhaltsstoffen. Die organische Trockensubstanz ist der Anteil des Substrates, welcher von Mikroorganismen abgebaut und umgesetzt werden kann. Das Verhältnis von TS zu oTS stellt einen Parameter zur Einschätzung der Abbauleistung der Mikroorganismen in der Biogasanlage dar. Die Trockensubstanz dient überdies als Bezugsparameter für alle weiteren Analysenwerte.

Für die Ermittlung der Trockensubstanz der untersuchten Proben wurden in Anlehnung an die DIN-Norm (DIN EN 12880 2000) Porzellantiegel gewaschen, nummeriert und bei 105 °C getrocknet. Nach Erkalten im Exsikkator wurde das Leergewicht bestimmt, die Tiegel mit 15 mL Flüssig-Probe, 20 g Frischmasse (FM) Feststoff-Probe bzw. bewachsenem Füllkörper befüllt und bei 105 °C im Trockenschrank über Nacht getrocknet. Nach Erkalten im Exsikkator wurde das Füllgewicht bestimmt. Aus der Differenz von Füll- und Leergewicht wurde die Masse der Trockensubstanz in g/L, in % bzw. g/dm² Füllkörperfläche berechnet.

Zur Bestimmung der organischen Trockensubstanz wurden in Anlehnung an die DIN-Norm (DIN EN 12879 2001) die bereits gewogenen Proben in den Tiegeln in einem Muffelofen (Nabertherm) für eine Stunde auf 550 °C erhitzt, wobei der organische Anteil verglüht. Nach Erkalten im Exsikkator wurde das Gewicht der Tiegel mit Glührückstand bestimmt. Aus der Differenz von Masse der TS, Gewicht der Tiegel mit Glührückstand und Leergewicht wurde die Masse der organischen Trockensubstanz in g/L, in % bzw. g/dm² Füllkörperfläche berechnet.

4.4.2 Mikrobielle Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) erfolgte mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol). DAPI bindet an die AT-reichen Sequenzen der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA und bildet stark weiß-bläulich fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe (Kapusinski 1995). Dies dient der Anfärbung aller Zellen in der Probe und ermöglicht eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung. Das Anregungsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 365 nm, das Emissionsmaximum bei 456 nm. Der Einsatz einer Citifluor-Lösung dient dem Schutz der Fluoreszenzsignale vor dem Ausbleichen und beugt möglichem Signalverlust vor.

Die fixierten Proben (siehe Kapitel 4.3.3) wurden mit 1xPBS:Ethanol-Lösung (1:1) entsprechend verdünnt und mit DAPI-Lösung (10 µg/mL Endkonzentration) versetzt. Danach wurden die Proben 15–30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend 15 Sekunden mit Ultraschall (BANDELIN SONOPLUS, 50% Leistung) behandelt. Die homogenisierten Proben wurden über schwarze Polycarbonatfilter (Millipore, Isopore[®] Membrane Filters, 0,2 µm, GTBP) filtriert. Der Filter wurde auf einem Objektträger mit Citifluor-Lösung (Citifluor Ltd, London) eingebettet. Die quantitative Auswertung der gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe eines Zählgitters im Okular und einem geeigneten Filtersatz (Anregung: D 360/40, Strahlenteiler: 400 DC LP, Emission: D 460/50; Carl Zeiss). Es wurden pro Probe jeweils zehn Sehfelder bzw. mindestens 1000 Zellen ausgezählt. Die Berechnung erfolgte unter Einbezug des Mittelwertes der Zellzahl, der Größe des Zählfeldes und des Filters, der eingesetzten Probenmenge sowie der ermittelten Trockensubstanz in GZZ/g TS.

4.4.3 Protein-Gehalt

Proteine haben einen sehr hohen Anteil, ca. 55% (Madigan *et al.* 2001), an der Trockenmasse von Mikroorganismen und stellen daher ebenfalls einen möglichen Biomasseparameter dar. Da der Proteingehalt jedoch stark vom physiologischen Zustand der Zelle abhängig ist, ist eine Korrelation mit der Biomasse nicht zwangsläufig gegeben.

Die Proteinbestimmung nach Lowry (1951) beruht darauf, dass Proteine mit Kupfer einen Komplex eingehen und die nachfolgenden Reaktionen eine Reduktion des Folin Ciocalteus Phenolreagenzes und damit einen Farbumschlag von gelb nach blau bewirken. Jedoch können ebenso andere reduzierende

Substanzen, wie etwa Huminstoffe und verschiedene Zucker, mit dem Folin Ciocalteus Phenolreagenz zu einem blauen Komplex reagieren (Lo & Stelson 1972, Peterson 1979, Box 1983).

Die zur Bestimmung des Proteingehaltes nach Lowry benötigten Reagenzien sind in Tabelle 4-6 aufgelistet. Von den Feststoffproben wurde sowohl der Proteingehalt der abgelösten Biomasse (siehe Kapitel 4.3.1) als auch der Gesamtproteingehalt der Probe (Substrat und Biomasse) bestimmt. Von den bewachsenen Füllkörpern wurde nur die abgelöste Biomasse untersucht (siehe Kapitel 4.3.2). Je 0,5 mL bzw. 0,5 g FM Probe wurden in ein Reagenzglas überführt, mit 5 mL Lösung D versetzt und für 30 Minuten bei 80 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Dieser Schritt löst die Proteine effektiv aus den Zellverbänden (Owusu-Apenten 2002). Nach einer kurzen Abkühlzeit wurden die Proben für zehn Minuten bei 5000 × g zentrifugiert, je 1 mL des Überstandes in ein neues Reagenzglas überführt und 2,5 mL Gebrauchslösung zugegeben. Für den Blindwert wurden 1 mL 0,5 N NaOH mit 2,5 mL Gebrauchslösung versetzt. Nach einer zehnmütigen Inkubation wurden 0,25 mL Lösung E zugegeben und für weitere 30 bis 60 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 740 nm gegen den Blindwert (Hitachi U-2000 Spectrophotometer). Die Proteinbestimmung aller Proben erfolgte in einem dreifachen Ansatz.

Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte mithilfe einer Standardgeraden, die mit BSA (Bovine-Serum-Albumin, Sigma) in 0,5 N NaOH im Konzentrationsbereich von 20–200 µg/mL erstellt wurde, in g/g TS.

Tabelle 4-6: Reagenzien zur Bestimmung des Proteingehaltes

Reagenz	Zusammensetzung	
Lösung A	2% Na ₂ CO ₃ in 0,1 N NaOH	
Lösung B	1% CuSO ₄ in H ₂ O _{dest.}	dunkel lagern
Lösung C	2% C ₄ H ₄ KNaO ₆ in H ₂ O _{dest.}	
Lösung D	1N NaOH + 1%ige SDS-Lsg. (1:1)	
Lösung E	Folin-Ciocalteu-Reagenz 1:1 mit H ₂ O _{dest.} mischen	frisch herstellen
Gebrauchslösung	Lösung A:B:C mischen zu 100:1:1	
0,5 N NaOH	1 N NaOH + H ₂ O _{dest.} (1:1)	
Standard-Lösung	10 mg BSA in 10 mL 0,5 N NaOH	frisch herstellen

4.4.4 DNA-Gehalt

DNA-Quantifizierungen werden in der Regel auf Grundlage von photometrischen Messungen meist nach Färbung mit DNA-Farbstoffen durchgeführt. Fluorometrische sind dabei oft empfindlicher als spektrophotometrische Analysen (Sandaa *et al.* 1998). Huminstoffhaltige, matrixreiche Proben können durch ein Quenching des Fluoreszenzsignals die DNA-Quantifizierung erschweren. Daher wurden für solche Proben verschiedene DNA-Farbstoffe getestet, wie bspw. SYBR Green I, Bisbenzimid (Hoechst 33258) und PicoGreen™, und deren Eignung kontrovers diskutiert (Fritz 2000, Bachoon *et al.* 2001,

Zipper *et al.* 2003, Matsui *et al.* 2004). In dieser Arbeit wurde die DNA-Quantifizierung mittels der DNA-Farbstoffe Bisbenzimid und PicoGreen™ getestet. In Tabelle 4-7 sind die Hauptmerkmale der Farbstoffe aufgeführt.

Tabelle 4-7: Vergleich von Bisbenzimid (Hoechst 33258) und PicoGreen™

Fluoreszenzfarbstoff	Extinktion/ Emission [nm]	Spezifität	Sensitivität	Störfaktoren	Vorteile	Nachteile
Bisbenzimid	360/465	AT-reiche Sequenzen der kleinen Furche der dsDNA	10 ng/mL	pH-Wert, SDS	kostengünstig, sensitiv	stark AT-selektiv
PicoGreen™	485/535	gesamte dsDNA	250 pg/mL	--	sensitiv, keine Vorbehandlung der Proben nötig	kostspielig

nach Phenix Research Products (2003)

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde verändert nach der Standardarbeitsanweisung SOP AW 43 der BGD GmbH, welche auf der Arbeitsanweisung von McCoy und Olson (1985) basiert, durchgeführt. Dabei dient das Verfahren der Standardaddition (DIN 32633 1998) dazu, mögliche Störsignale bei der Messung zu kompensieren und so Matrixeffekte zu korrigieren.

Die zur Bestimmung des DNA-Gehaltes benötigten Reagenzien sind in Tabelle 4-8 aufgelistet. Von den Feststoffproben wurde die DNA-Konzentration der abgelösten Biomasse (siehe Kapitel 4.3.1) bestimmt. Die DNA-Bestimmung aller Proben erfolgte in einem dreifachen Ansatz. Zur Analyse des Einflusses der extrazellulären DNA wurde bei einigen Proben eine Bestimmung ohne und eine Analyse mit vorgeschaltetem Zentrifugationsschritt durchgeführt. Hierzu wurden 2 mL Probe in ein Reaktionsgefäß überführt und zehn Minuten lang bei 13.000 rpm zentrifugiert (Biofuge 13, HERAEUS Instruments). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 mL des entsprechenden Puffers resuspendiert. Zur Zellyse wurden die Proben drei Minuten auf Eis mit einer Ultraschallsonde (BANDELIN SONOPLUS, 80% Leistung, 6 Zyklen) beschallt. Die Proben wurden anschließend durch einen 0,2 µm porigen Filtern filtriert, um größere Partikel wie Zellfragmente zurückzuhalten, und der Ansatz auf vier Parallelen verteilt (Tabelle 4-9). Der Probenblindwert, Ansatz ohne Farbstoff-Testlösung, diente der Bestimmung der Autofluoreszenz der Probe. Zudem wurde pro Serie ein DNA-Standard (10.000 ng/mL) und ein Farbstoff-Blindwert zur Kontrolle mitgeführt. Der DNA-Standard dient zudem der Bestimmung des Verstärkungsgrades (gain) bei der Messung im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M200, TECAN) mithilfe der i-control-Software (TECAN). Die mit der PicoGreen™-Farbstofftestlösung versetzten Proben inkubierten zwei bis fünf Minuten vor der Messung, der Bisbenzimid-Ansatz hingegen wurde sofort nach Zugabe der Farbstofftestlösung im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge betragen für PicoGreen™ 480/530 nm und für Bisbenzimid 345/450 nm.

Die Berechnung des DNA-Gehaltes erfolgte mithilfe einer zuvor erstellten Standardgeraden im DNA-Konzentrationsbereich von 0–10.000 ng/mL mit Zugabe von 150 µL Farbstofftestlösung.

Tabelle 4-8: Reagenzien zur Bestimmung des DNA-Gehaltes

Farbstoff	Reagenz	Zusammensetzung	
PicoGreen™	Stammlösung Quanti-iT™ PicoGreen®, ds DNA reagent (Molecular Probes™ invitrogen™)	Testlösung: 1:100 mit TE-Puffer verdünnen	
	1x TE-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA	pH 7,5 mit HCl einstellen
	DNA-Stammlösung (1 mg/mL)	5 mg DNA (Heringsperma) ad. 5 mL TE-Puffer	Ultraschallbehandlung für 45 Sekunden bei 80%, 6 Zyklen (auf Eis), danach 30 Minuten unter leichter Erwärmung bis 50 °C rühren
	DNA-Standard-Lösung a (Gebrauchslösung, 10 µg/mL)	150 µL DNA-Stammlösung ad. 15 mL TE-Puffer	frisch herstellen
	DNA-Standard-Lösung b (Aufstock-Lsg., 200 µg/mL)	100 µL DNA-Stammlösung ad. 500 µL TE-Puffer	frisch herstellen
Bisbenzimid (Hoechst 33258)	Hoechst 33258 (Molecular Probes™ invitrogen™)	Stammlösung: 10 mg Bisbenzimid H 33258 ad. 100 mL H ₂ O _{dest.}	bei 4 °C mehrere Monate haltbar
		Testlösung: 1:100 mit Citratpuffer verdünnen	frisch herstellen
	Citratpuffer	4,5 g NaCl 2,2 g C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ×2 H ₂ O ad. 500 mL H ₂ O _{dest.}	pH 7,0 einstellen
	DNA-Stammlösung (1 mg/mL)	5 mg DNA (Heringsperma) ad. 5 mL Citratpuffer	Ultraschallbehandlung für 45 Sekunden bei 80%, 6 Zyklen (auf Eis), danach 30 Minuten unter leichter Erwärmung bis 50 °C rühren
	DNA-Standard-Lösung a (Gebrauchslösung, 10 µg/mL)	150 µL DNA-Stammlösung ad. 15 mL Citratpuffer	frisch herstellen
	DNA-Standard-Lösung b (Aufstock-Lsg., 200 µg/mL)	100 µL DNA-Stammlösung ad. 500 µL Citratpuffer	frisch herstellen

Tabelle 4-9: Pipettierschema zur Bestimmung des DNA-Gehaltes

	Probe [µL]	DNA-Standard b [µL]	Puffer [µL]	Farbstoff-Testlösung [µL]
1. Ansatz (Probenblindwert)	200	--	100	--
2. Ansatz (Probenmesswert)	200	--	--	150
3. Ansatz (1. Aufstockung, + 3000 ng/mL)	200	3	--	150
4. Ansatz (2. Aufstockung, + 6000 ng/mL)	200	6	--	150

4.4.5 Biofilmdicke

Die mittlere Dicke des Biofilms auf den Füllkörpern (FK) der Methanreaktoren kann berechnet werden. Kommt es zu keiner Einlagerung von Fremdmaterial, lässt sich eine Korrelation zwischen Biomassezuwachs und Zunahme der Biofilmdicke beschreiben. Zudem dient die Biofilmdicke als Maß der Verschlämmung im Methanreaktor.

Zur Ermittlung der Biofilmdicke wurde die Frischmasse des Biofilms auf die Biofilmdichte sowie auf die Oberfläche des entsprechenden Füllkörpers bezogen. Da der Wassergehalt eines Biofilms ca. 95–99% beträgt, wird eine Dichte des feuchten Biofilms ρ_{Biofilm} von $\sim 1 \text{ g/cm}^3$ angenommen. Durch die Bestimmung der Biofilmfeuchtmasse $m_{\text{Biofilm},F}$ kann die Biofilmdicke L_{Biofilm} gleichverteilt auf der Füllkörperoberfläche A_{FK} bestimmt werden (Ohl 2007).

$$L_{\text{Biofilm}} = \frac{m_{\text{Biofilm},F}}{\rho_{\text{Biofilm}} \cdot A_{FK}}$$

Biofilmfeuchtmasse: $m_{\text{Biofilm},F} = \text{Gewicht bewachsener FK} - \text{Leergewicht FK}$

Biofilmdichte: $\rho_{\text{Biofilm}} = 1 \text{ g/cm}^3 = 0,001 \text{ g/mm}^3$

Füllkörperoberfläche: A_{FK}

Die Leergewichte und die Oberflächenmaße der Füllkörper sind in Tabelle 4-1 in Kapitel 4.1.2 aufgelistet.

4.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Da die Hydrolyse bei Substraten mit einem hohen pflanzlichen Anteil den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Biogasprozess darstellt, ist die Analyse von Hydrolyseraten zur Prozesskontrolle von großem Interesse. Es kann zwischen verschiedenen Hydrolaseaktivitäten unterschieden werden. Aufgrund der energiereichen Inhaltsstoffe von Pflanzensilage, größtenteils Zucker und Eiweiße, sind dabei u. a. die Protein- und Polysaccharid-abbauenden Hydrolasen von besonderem Interesse.

Wenn nicht anders beschrieben, wird die Enzymaktivität in Internationalen Units (IU) – μmol gebildete Produkte pro Minute – pro g Trockensubstanz (g TS) bzw. mL Probe angegeben.

4.5.1 Allgemeine heterotrophe Abbauaktivität

Unspezifische Esterasen sind Enzyme, die in den meisten heterotrophen Mikroorganismen ubiquitär sind und hydrolytische Ester-Spaltungen beim biologischen Abbau organischer Verbindungen katalysieren. Sie sind bei der Umsetzung eines breiten Spektrums von organischen Substanzen innerhalb diverser Stoffwechselwege beteiligt. Die Aktivität dieser Enzyme kann daher als allgemeines Maß der heterotrophen Abbauaktivität angesehen werden und dient zur Abschätzung des Potentials einer Mikroor-

ganismengemeinschaft zur Hydrolyse von Biopolymeren (Purr 1965, Schnürer & Rosswall 1982, Obst 1985, Geller *et al.* 1991, Obst *et al.* 1995).

4.5.1.1 Klassische Methode

Zur Bestimmung der Esteraseaktivität liegt bisher kein standardisierter Test vor, wie z. B. eine Richtlinie oder DIN-Norm. In der Fachliteratur sind jedoch diverse Analysevorschriften beschrieben. Sie beruhen alle auf dem Prinzip, dass der zu untersuchenden Probe, welche die Esterasen oder aktive Mikroorganismen enthält, ein künstliches Substrat mit Esterbindungen zugeführt wird, welches innerhalb einer bestimmten Zeit bei einer spezifischen Temperatur und einem zuvor eingestellten pH-Wert inkubiert wird. In dieser Zeit katalysieren die in der Probe enthaltenen Esterasen die Hydrolyse der Esterbindungen, sodass ein chromogenes bzw. fluorogenes Produkt entsteht. Dieses kann mikroskopisch oder photometrisch analysiert und quantifiziert werden. Als künstliche Substrate werden z. B. Fluoresceindiacetat, 2-Nitrophenylacetat, α - bzw. β -Naphthylacetat, Indoxylacetat, Resorufinacetat, 5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat sowie 3-(2-Benzoxazolyl)umbelliferylacetat eingesetzt (Konrad & Gabrio 1976, Leßner 1976, Obst 1985, Palmisano *et al.* 1993, Matthies 2004, MGT 2013). In der Abwasser- und Umweltanalytik wird heute meist nach Obst und Holzappel-Pschorn (1988) Fluoresceindiacetat (FDA) als Substrat verwendet, welches nach Hydrolyse eine gelb-grünliche Fluoreszenz aufweist und somit eine mikroskopische, colorimetrische und fluoreszenzphotometrische Analyse ermöglicht (Preuß 2007).

Von den Feststoffproben wurde die Esteraseaktivität der abgelösten Biomasse (siehe Kapitel 4.3.1) ermittelt. Die Bestimmung der Esteraseaktivität aller Proben erfolgte in einem dreifachen Ansatz. Zudem wurden für jede Probe Probenblindwerte mitgeführt, Ansatz ohne FDA-Reagenz, die der Analyse der Eigenfärbung der Probe dienen sowie zur Berücksichtigung der spontanen Hydrolyse des FDA. Zur Bestimmung der Esteraseaktivität werden folgende Reagenzien benötigt (Tabelle 4-10).

Tabelle 4-10: Reagenzien zur Bestimmung der Esteraseaktivität

Reagenz	Zusammensetzung	
Fluoresceindiacetat-Lösung (FDA-Reagenz)	20 mg FDA ad. 10 mL Aceton (p. a.)	bei -20 °C lagern
0,06 M Natriumphosphatpuffer	a) 8,518 g Na ₂ HPO ₄ ad. 300 mL H ₂ O _{dest.} b) 1,38 g NaH ₂ PO ₄ × 1H ₂ O ad. 50 mL H ₂ O _{dest.} 261 mL a) + 39 mL b) ad. 1 L H ₂ O _{dest.}	pH 7,6
0,2 mM Fluorescein-Standard-Lsg.	4,26 mg Fluorescein-Natriumsalz ad. 50 mL H ₂ O _{dest.}	bei 4 °C und dunkel lagern

In dieser Arbeit wurde die Aktivität der extrazellulären Esterasen, die zum Zeitpunkt der Probenahme aktiv am Abbau beteiligt sein konnten, ermittelt. Hierzu wurden die Proben bei 13.000 rpm zentrifugiert (Biofuge 13, HERAEUS Instruments) und der Überstand, mit den freien Esterasen, weiter analy-

siert. Hiervon wurden 0,5 mL in Plastikröhrchen überführt und bis zu einem Volumen von insgesamt 9,9 mL mit Natriumphosphatpuffer aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 μ L FDA-Reagenz wurden die Röhrchen auf einem Reagenzglasschüttler 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 4 °C und 10.000 rpm durchgeführt und die Absorption der Überstände sofort bei 490 nm photometrisch gegen die Probenblindwerte gemessen (Hitachi U-2000 Spectrophotometer).

Die Berechnung der Esteraseaktivität erfolgte mithilfe einer zuvor erstellten Standardgeraden mit einem Fluorescein-Konzentrationsbereich von 1–32 μ mol/L.

4.5.1.2 Schnelltest

Die Bestimmung der Esteraseaktivität nach der herkömmlichen Methode (Kapitel 4.5.1.1) setzt ein dafür spezialisiertes Labor mit entsprechendem Equipment und qualifizierten Fachkräften voraus. Daher wurde die Methode weiter entwickelt, sodass durch Vereinfachung der Analysedurchführung auch eine Bestimmung außerhalb des spezialisierten Labors, im Feld, und durch weniger qualifiziertes Personal möglich ist.

Wichtig ist vor allem eine zuverlässige Methode zur Inhibierung der enzymatischen Reaktion, sodass die Bestimmung gegebenenfalls auch noch einige Stunden nach der Inkubationszeit erfolgen kann, ohne dass signifikante Änderungen der Messwerte eintreten. Eine Möglichkeit hierfür ist die Verlangsamung der Hydrolyse durch starkes Abkühlen des Reaktionsansatzes (Obst 1985, Obst *et al.* 1995, Steinbrenner 2011). Als mögliches Stoppreagenz wird in der Literatur zudem meist Aceton genannt (Schnürer & Rosswall 1982, Reed *et al.* 1989, Palmisano *et al.* 1993, Adam & Duncan 2001, Green *et al.* 2006). Nachteilig ist jedoch, dass Aceton die Extraktion von organischem Material fördert, Fluorescein sich an dieses anlagern kann und so das Fluoreszenzsignal verringert wird (Inbar *et al.* 1991). Deshalb rücken andere Stoppreagenzien, die die Enzymreaktion hemmen, ins Interesse. Es ist jedoch darauf zu achten, dass bei hohen bzw. niedrigen pH-Werten (außerhalb des pH-Bereichs von 7 bis 8,5) und Temperaturen über 30–40 °C eine spontane Hydrolyse des Fluoresceindiacetats auftritt (Guilbault & Kramer 1964, Schnürer & Rosswall 1982). Zudem sollte als Alternative zur Zentrifugation der Reaktionsansatz filtrierbar sein. Unter Berücksichtigung der aufgezählten Aspekte wurden in dieser Arbeit verschiedene potentielle Esterase-Inhibitoren getestet (Tabelle 4-11).

Tabelle 4-11: Getestete potentielle Esterase-Inhibitoren

Inhibitor	Endkonzentration	Wirkung	Referenz
Aceton	50%	unspezifische Präzipitation von Proteinen	(Schnürer & Rosswall 1982, Gdynia 2006)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	0,1–100 mM	komplexiert zweiwertige Metallkationen, die für die Funktion vieler Enzyme essentiell sind	(Swanson & Truesdale 1974, Sams & Mason 1999, Koitka <i>et al.</i> 2010)
Triton X-100	1–12,5%	Solubilisierung von Membranproteinen, kompetitiver Antagonist	(Rumsby <i>et al.</i> 1973, Li <i>et al.</i> 2000, Marcel <i>et al.</i> 2000)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1–10%	Solubilisierung von Membranproteinen, Denaturierung von Proteinen durch Komplexbildung	(Gonenne & Ernst 1978, Holm <i>et al.</i> 1985, Wang <i>et al.</i> 2008, Mu <i>et al.</i> 2009)
Natriumfluorid (NaF)	20 mM	nicht-kompetitiver Antagonist, toxisch	(Bozdech & Bainton 1981, Groß & Scheller 1989, Ru <i>et al.</i> 2009)
Zinkacetat (ZnAc)	2 mM	Zinkoxidation der Sulfhydrylgruppen des Enzyms, konkurrierendes Substrat	(Aso & Akamatsu 1956, Shum & Markovetz 1974, Hesketh & Flanagan 1975, Staflieni & Cleary 2000)
Formaldehyd (FA)	12,5%	vernetzt bzw. denaturiert Proteine, toxisch	(Hopwood 1967, Kirkeby & Moe 1984, Fox <i>et al.</i> 1985)
Glutardialdehyd (GA)	18,75–25%	vernetzt bzw. denaturiert Proteine, toxisch	(Hopwood 1967, Sindhu <i>et al.</i> 2011)
Formamid (FO)	20%	spaltet Proteinmoleküle, bakterizid bzw. toxisch	(Fuller 1938, Kühn & Birett 1988, Robb <i>et al.</i> 1992)

Die Verdünnungen der Stoppreagenzien wurden auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt. Die Bestimmung der Esteraseaktivität aller Proben erfolgte in einem dreifachen Ansatz. Zudem wurden für jede Probe Probenblindwerte mitgeführt, Ansatz ohne FDA-Reagenz, die der Analyse der Eigenfärbung der Probe dienen sowie zur Berücksichtigung der spontanen Hydrolyse des FDA. Um auch die Aktivität der zellgebundenen Enzyme mitzuerfassen und die Bestimmungsgrenzen zu erweitern, wurden die folgenden Versuche zur Entwicklung des Schnelltests mit den flüssigen Rohproben, inklusive mikrobieller Zellen, durchgeführt. Zur weiteren Anpassung an geläufige Schnelltests wurden weiterhin die eingesetzten Volumina der Reagenzien modifiziert und die Inkubationstemperatur auf einen in handelsüblichen Miniinkubatoren einstellbaren Wert festgelegt.

Es wurden 2 mL Probe, gegebenenfalls verdünnt, zum vorgelegten Puffer (2,9 mL 0,06 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,6) gegeben, mit 100 µL FDA-Reagenz versetzt und gemischt. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation im Wasserbad bei 30 °C. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mL des jeweiligen Stoppreagenzes inhibiert. Ein Teil der Probe wurde für zehn Minuten bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert bzw. durch eine 0,2 µm PES-Spritzenvorsatzfilter filtriert. Der Rest der Probe inkubierte zur Analyse der Hemmwirkung des Stoppreagenzes bei Raumtemperatur weiter. Die Absorption der Überstände bzw. des Filtrates wurden bei 490 und 500 nm photometrisch gegen die Probenblindwerte gemessen (Hitachi U-2000 Spectrophotometer). Zur vergleichenden Analyse wurden

zudem jeweils Reaktionsansätze mitgeführt, die nicht abgestoppt sowie welche die nach der Inkubationszeit durch Kühlung im Eisbad inhibiert wurden.

Die Berechnung der Esteraseaktivität erfolgte mithilfe einer zuvor erstellten Standardgeraden mit einem Fluorescein-Konzentrationsbereich von 1–32 $\mu\text{mol/L}$ mit Zugabe des jeweiligen Stoppreagenzes.

4.5.2 Aktivität von Protein-hydrolysierenden Enzymen

Proteasen, auch Peptidasen genannt, sind Enzyme, die Peptidbindungen eines Proteins hydrolytisch spalten. Dabei wird zwischen Endo- und Exoproteasen unterschieden. Exoproteasen greifen die Peptidkette an den Enden an und spalten typischerweise eine einzelne Aminosäure, aber auch Di- oder Tripeptide vom Kettenende ab. Hydrolytische Spaltungen im Innern des Proteins werden dagegen von Endoproteasen katalysiert. Proteasen sind ein zentraler Bestandteil des mikrobiellen Stoffwechsels. Dabei nehmen sie eine zentrale Rolle bei der Verwertung von Biomasse ein (Remde & Tippmann 1998).

4.5.2.1 Allgemeine Proteaseaktivität

Die Enzymaktivität der Gesamtheit der Proteasen wurde mit Hilfe des künstlichen Substrates Azocasein ermittelt. Azocasein besteht aus einem an Casein gebundenen Azo-Farbstoff und stellt ein allgemein übliches Proteasesubstrat dar. Durch enzymatische Hydrolyse des Proteins werden säurelösliche, farblich markierte Polypeptide frei. Unhydrolysiertes Azocasein wird durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) abgetrennt.

Zur Bestimmung der Proteaseaktivität nach Kole und Kollegen (1988) werden folgende Reagenzien benötigt (Tabelle 4-12).

Tabelle 4-12: Reagenzien zur Bestimmung der allgemeinen Proteaseaktivität

Reagenz	Zusammensetzung
0,5% Azocasein-Lösung	1 g Azocasein ad. 200mL Tris-HCl Puffer
0,2 M Tris-HCl Puffer	21,81 g Tris ad. 900 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ pH 7,4 mit 32% HCl einstellen
10% Trichloressigsäurelösung (TCA)	10 g TCA ad. 100 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
Papain-Tris-HCl-Lsg. (Standard-Lsg.)	0,004 g Papain (30000 USP-U/mg) ad. 100 mL Tris-HCl-Puffer

Von den Feststoffproben wurde die Proteaseaktivität der abgelösten Biomasse (siehe Kapitel 4.3.1) ermittelt. Die Bestimmung der Proteaseaktivität aller Proben erfolgte in einem dreifachen Ansatz. Zudem wurden für jede Probe Probenblindwerte mitgeführt, mit sofortiger Zugabe von 10% TCA, die der Analyse der Eigenfärbung der Probe dienten.

In dieser Arbeit wurde die Aktivität der extrazellulären Proteasen, die zum Zeitpunkt der Probenahme aktiv am Abbau beteiligt sein konnten, ermittelt. Hierzu wurden die Proben bei 13.000 rpm zentrifugiert (Biofuge 13, HERAEUS Instruments) und der Überstand, mit den freien Proteasen, weiter analysiert. Hiervon wurde 1 mL, gegebenenfalls verdünnt, zu 1 mL auf 50 °C vorgewärmte Azocasein-Lösung gegeben und durchmischt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 50 °C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 mL 10% TCA gestoppt. Danach wurde eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 10.000 rpm durchgeführt und die Absorption der Überstände bei 380 nm photometrisch gegen die Probenblindwerte gemessen (Hitachi U-2000 Spectrophotometer).

Die Berechnung der Proteaseaktivität erfolgte mithilfe einer zuvor mit dem Enzym Papain erstellten Standardgeraden, mit einem Papain-Konzentrationsbereich von 0,16–24 mg/L. Dabei entspricht 1 mg/L Papain gleich 30 USP-Units. Da eine USP-Unit in der Regel einer IU entspricht, wird in dieser Arbeit die Einheit IU verwendet.

4.5.2.2 Exo-Proteaseaktivität

L-Alanin-Aminopeptidasen spalten jeweils die Aminosäure L-Alanin vom N-terminalen Ende der Peptidkette ab. Sie sind vornehmlich Ektoenzyme und sind ebenfalls bedeutend an der Proteolyse beteiligt. Der vorliegende Test beruht auf dem Prinzip, dass das angebotene farblose Substrat L-Alanin-4-nitroanilidhydrochlorid von den Aminopeptidasen hydrolysiert wird und das abgespaltene, gelblich gefärbte 4-Nitroanilin photometrisch erfassbar ist.

Zur Bestimmung der L-Alanin-Aminopeptidaseaktivität nach Remde und Tippmann (1998) werden folgende Reagenzien benötigt (Tabelle 4-13).

Tabelle 4-13: Reagenzien zur Bestimmung der L-Alanin-Aminopeptidaseaktivität

Reagenz	Zusammensetzung
Natriumchlorid-Lsg.	0,9 g NaCl ad. 100 mL H ₂ O _{dest.}
L-Alanin-4-nitroanilidhydrochlorid-Lsg. (Substratlösung)	25 mg L-Alanin-4-nitroanilidhydrochlorid ad. 25 mL Natriumchlorid-Lsg. gekühlt und lichtgeschützt lagern, nur 24 h haltbar
10% Trichloressigsäurelösung (TCA)	10 g TCA ad. 100 mL H ₂ O _{dest.}
TCA-NaCl-Lösung	1 Teil TCA-Lösung 2 Teile Natriumchlorid-Lösung
4-Nitroanilin-Standard-Lsg.	0,02 g 4-Nitroanilin ad. 500 mL TCA-NaCl-Lösung

Von den Feststoffproben wurde die L-Alanin-Aminopeptidaseaktivität der abgelösten Biomasse (siehe Kapitel 4.3.1) ermittelt. Die Bestimmung der L-Alanin-Aminopeptidaseaktivität aller Proben erfolgte in einem dreifachen Ansatz. Zudem wurden für jede Probe Probenblindwerte mitgeführt, ohne Zugabe von Substrat, die der Analyse der Eigenfärbung der Probe dienten.

In dieser Arbeit wurde die Aktivität der extrazellulären Aminopeptidasen, die zum Zeitpunkt der Probenahme aktiv am Abbau beteiligt sein konnten, ermittelt. Hierzu wurden die Proben bei 13.000 rpm zentrifugiert (Biofuge 13, HERAEUS Instruments) und der Überstand, mit den freien Aminopeptidasen, weiter analysiert. Hiervon wurden 2 mL, gegebenenfalls verdünnt, zu 2 mL L-Alanin-4-nitroanilidhydrochlorid-Lsg. gegeben und durchmischt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 30 °C im Schüttelwasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 mL 10% TCA gestoppt. Danach wurde eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 10.000 rpm durchgeführt und die Absorption der Überstände bei 405 nm photometrisch gegen die Probenblindwerte gemessen (Hitachi U-2000 Spectrophotometer).

Die Berechnung der L-Alanin-Aminopeptidaseaktivität erfolgte mithilfe einer zuvor erstellten Standardgeraden mit einem 4-Nitroanilin-Konzentrationsbereich von 0,16–24 mg/L.

4.5.3 Aktivität von Polysaccharid-hydrolysierenden Enzymen

Die Enzyme Amylase, Cellulase und Xylanase sind innerhalb des Biomasse-Abbaus für die Hydrolyse verschiedener Polysaccharide verantwortlich. α -Amylasen spalten die $\alpha(1-4)$ -Glykosidbindung der Amylose (Stärke), wodurch die Produkte Dextrine bzw. Maltose, Glucose und verzweigte Oligosaccharide entstehen (Hirose 2010). Extrazelluläre Carboxymethylcellulasen hydrolysieren die glykosidische Bindung innerhalb amorpher Regionen der Cellulosefasern und setzen dadurch langkettige Oligosaccharide frei (Kamide 2005). Xylanasen können durch Endohydrolyse von $(1\rightarrow4)$ - β -D-Bindungen verschiedene, im Stützgerüst der pflanzlichen Zellwände vorhandenen Substanzen aufschließen, wie etwa der Abbau der Hemicellulose Xylan zu Xylose (Krengel & Dijkstra 1996).

Durch die Bildung dieser Abbauprodukte vervielfacht sich die Zahl der reduzierenden Zucker, welche mittels 3,5-Dinitrosalicylsäure quantifiziert werden können. In Gegenwart von Phenol und Natriumsulfit wird 3,5-Dinitrosalicylsäure durch die reduzierenden Enden zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert. Bei etwa 100 °C verursacht diese Reaktion einen Farbumschlag von gelb nach braun. Die bräunliche Färbung des Testansatzes ist proportional zur Konzentration von 3-Amino-5-nitrosalicylsäure, die wiederum äquimolar zu der Anzahl der reduzierenden Enden ist (Voget 2006).

Die zur Bestimmung der Menge reduzierender Zucker nach Miller (1959) benötigten Reagenzien sind in Tabelle 4-14 aufgelistet.

Von den Feststoffproben wurden die Enzymaktivitäten der abgelösten Biomasse (siehe Kapitel 4.3.1) ermittelt. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten aller Proben erfolgte in einem dreifachen Ansatz. Zudem wurden für jede Probe Probenblindwerte mitgeführt, mit sofortigem Abstoppen der Reaktion, die der Analyse der Eigenfärbung der Probe dienen.

In dieser Arbeit wurde die Aktivität der extrazellulären Polysaccharasen, die zum Zeitpunkt der Probenahme aktiv am Abbau beteiligt sein konnten, ermittelt. Hierzu wurden die Proben bei 13.000 rpm

zentrifugiert (Biofuge 13, HERAEUS Instruments) und der Überstand, mit den freien Hydrolasen, weiter analysiert. Hiervon wurden 150 μL , gegebenenfalls verdünnt, zu 350 μL der jeweiligen auf 55 °C vorgewärmten Substratlösung gegeben und durchmischt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 55 °C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 750 μL DNSA-Reagenz gestoppt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 99 °C im Thermomixer mit einer anschließenden 15-minütigen Inkubation auf Eis. Danach wurde eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 13.000 rpm durchgeführt (Sigma 3K30, Sigma Laborzentrifugen GmbH) und die Absorption der Überstände bei 575 nm photometrisch gegen die Probenblindwerte gemessen (Hitachi U-2000 Spectrophotometer).

Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte mithilfe einer zuvor erstellten Standardgeraden mit einem D-Glucose- bzw. D-Xylose-Konzentrationsbereich von 3–20 $\mu\text{mol/mL}$.

Tabelle 4-14: Reagenzien zur Bestimmung der Menge reduzierender Zucker

Reagenz	Zusammensetzung	
250 mM K_2HPO_4 -Puffer	8,709 g K_2HPO_4 ad. 200 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	pH 6,5
DNSA-Reagenz	1,5 g Dinitrosalicylsäure 0,3 mL Phenol 0,075 g Na_2SO_3 30 g $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ 1,5 g NaOH ad. 150 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	unter Erwärmung rühren bis gelöst, vor Licht schützen und bei 4 °C lagern, mehrere Wochen haltbar
1M NaOH	8 g NaOH ad. 200 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	
1M HCl	19,56 mL 32% HCl ad. 200 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	
1% Carboxymethylcellulose (Substratlösung für Cellulase)	0,5 g Carboxymethylcellulose 10 mL 1M NaOH 10 mL 1M HCl ad. 50 mL K_2HPO_4 -Puffer	→ unter Erwärmung rühren bis gelöst
1% lösl. Stärke (Substratlösung für Amylase)	0,5 g lösl. Stärke 10 mL 1M NaOH 10 mL 1M HCl ad. 50 mL K_2HPO_4 -Puffer	→ unter Erwärmung rühren bis gelöst
0,5% Xylan (Substratlösung für Xylanase)	0,25 g Xylan 10 mL 1M NaOH 10 mL 1M HCl ad. 50 mL K_2HPO_4 -Puffer	→ unter Erwärmung rühren bis gelöst
50 mM D-Glucose (Standard für Amylase + Cellulase)	0,5450 g D-Glucose-1 H_2O ad. 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	
50 mM D-Xylose (Standard für Xylanase)	0,3753 g D-Xylose ad. 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	

4.6 Bestimmung der mikrobiellen Respiration

Unter der Respiration (Atmung) von Mikroorganismen ist die Oxidation eines energiereichen Stoffes unter Reduktion eines externen, Elektronen akzeptierenden Stoffes (e^- -Akzeptor) zu verstehen. Ein Teil der freiwerdenden Energie dieser Redoxreaktion wird durch Synthese energiereicher Moleküle in der Zelle chemisch gespeichert. Wenn der endgültige e^- -Akzeptor freier Sauerstoff ist, handelt es sich um aerobe Respiration. Von anaerober Respiration spricht man, wenn Elektronen auf andere externe, reduzierbare Substrate übertragen werden (Kayser *et al.* 2010).

Die mikrobielle Respiration kann gemessen und so die biologische Abbaubarkeit von Nährstoffen bzw. die mikrobielle Aktivität bestimmt werden.

4.6.1 Aerobe Respiration

Durch den mikrobiellen aeroben Atmungsvorgang wird Sauerstoff (1 Teil O_2) aufgenommen, unter gleichzeitiger Abgabe von Kohlenstoffdioxid (1 Teil CO_2). Diese Gasveränderung kann bestimmt werden. In einem geschlossenen Gefäß, welches neben der zu untersuchenden Probe einen ausreichend großen, mit Luft gefüllten Gasraum und ein Absorptionsmittel für Kohlenstoffdioxid enthält, kommt es durch die Sauerstoffaufnahme bzw. durch die CO_2 -Absorption zu einer Druckabnahme. Im geschlossenen System ist die Druckänderung proportional zur Masse an aufgenommenem Sauerstoff.

4.6.1.1 Atmungsaktivität nach vier Tagen

Die Atmungsaktivität nach vier Tagen (AT_4) ist eine Methode zur Analyse von Feststoffproben. Sie basiert auf der Grundlage der Abfallablagereverordnung (AbfAbV 2001) und wurde nach der Arbeitsvorschrift der BGD GmbH durchgeführt, die Proben wurden jedoch nicht unter eine Länge von 2 cm weiter zerkleinert, um die vorherrschenden Bedingungen in der Biogasanlage zu bewahren.

Zur Einstellung des Wassergehaltes wurden 60 g der Probe mit 60 mL Leitungswasser angefeuchtet und in eine Saugnutsche mit Papierfilter überführt. Nach einer 30-minütigen Filtration bei ca. 100.000 Pa Unterdruck, wurde das abgezogene Wasservolumen bestimmt und vom zugebenen Wasservolumen abgezogen (Differenz). Das so ermittelte Wasservolumen (Differenz) wurde der Probe für die Versuchsdurchführung zuzugeben. Hierfür wurden 10 g Probe mit eingestelltem Wassergehalt in eine Braunglasflasche eingewogen und sieben NaOH-Plätzchen (CO_2 -Absorber) in den Köcher gegeben. Die Bestimmung der Atmungsaktivitäten aller Proben erfolgte in einem zweifachen Ansatz. Die Druckmessung erfolgte mittels Messkopf (AQUALYTIC[®]), der fest auf die Flasche geschraubt wurde, für eine Versuchsdauer von mindestens sechs Tagen bei 20 °C. Als Blindwert wurde zudem eine Flasche ohne Probe mitgeführt. Die Datenermittlung erfolgte über ein Auslesegerät (Sensomat-Scientific, AQUALYTIC[®]) und die Communication Software ACHAT OC (AQUALYTIC[®]). Zur Auswertung wurden außerdem die Trockensubstanzmenge und das Volumen der Probe mit eingestelltem Wasser-

gehalt bestimmt. In die Auswertung mit einbezogen wurden die vier Tage nach Abzug der lag-Phase, welche beendet war, wenn der Sauerstoffverbrauch 25% des Sauerstoffverbrauchs im Bereich der größten Steigung betrug. Die Atmungsaktivität wird in mg O₂/g TS angegeben.

4.6.1.2 Biologischer Sauerstoffbedarf in fünf Tagen

Der Biologische Sauerstoffbedarf in fünf Tagen (BSB₅) ist eine Methode zur Analyse von Flüssigproben. Die Versuchsdurchführung erfolgte mittels Druckbestimmung durch BSB₅-Messköpfe (AQUALYTIC®) nach Angaben des Herstellers (WTW 1996).

Dazu wurden unterschiedliche Volumina der Proben, je nach zu erwartetem Messbereich, in die zugehörigen Braunglasflaschen überführt. Nach dem Hinzufügen eines Magnetrührers und eines Köchers mit zwei NaOH-Plätzchen, wurden die Flaschen mit Messköpfen verschlossen. Anschließend inkubierten diese rührend in einem Thermoschrank bei 20 °C. Nach fünf Tagen wurden die ermittelten BSB₅-Werte auf den Messköpfen ausgelesen. Die Bestimmung des Biologischen Sauerstoffbedarfs aller Proben erfolgte in einem dreifachen Ansatz. Der Biologische Sauerstoffbedarf wird in mg O₂ pro mL bzw. g TS angegeben.

4.6.2 Anaerobe Respiration

Zur Beurteilung der Aktivität anaerober Mikroorganismen wurden Respiationsversuche verändert nach Süßmuth und Kollegen durchgeführt (2000). Diese Methode dient zudem der Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen unter anaeroben Bedingungen. Beim anaeroben Abbau entsteht durch die Bildung von Biogas ein Überdruck im Gasraum der gasdicht verschlossenen Messflasche. Dieser kann über Messköpfe (AQUALYTIC®) bestimmt werden. Unter der Annahme, dass v. a. Methan und Kohlenstoffdioxid gebildet werden und durch Verwendung von Austriebmittel und Absorber für Kohlenstoffdioxid, kann der Kohlenstoffanteil, der zu Methan umgesetzt wurde, ermittelt werden. Das Prinzip dieses Verfahrens ist detailliert in einer Norm (DIN EN ISO 11734 1998) beschrieben.

Die Methode ist geeignet zur Analyse von Flüssigproben. Die Bestimmung der anaeroben Respiration aller Proben erfolgte in einem zweifachen Ansatz. Die für solche Analysen vorgesehenen Messflaschen mit Aufsatzstutzen und Septen (MF 45/500 WTW) mit Magnetührstab wurden mit 220 mL Pufferlösung und 25 mL Probe befüllt. Der pH-Wert der Versuchsansätze wurde bestimmt und gegebenenfalls mit verdünnter Lauge oder Säure auf einen pH von $7 \pm 0,2$ eingestellt. Anschließend wurden die Messflaschen je 20 Minuten lang, im 35 °C warmen Wasserbad stehend, mit Stickstoff begast, um ein anaerobes Milieu zu schaffen. Kurz vor Verschluss der Messflaschen mit den Druckmessköpfen (AQUALYTIC®) wurde 5 mL Natriumacetat-Lösung (Substrat) zugegeben. Als Blindwert diente ein Ansatz ohne Zugabe von Substratlösung. Dieser gab die Eigenaktivität der Proben wieder. Die Mess-

köpfe wurden gestartet und die Messflaschen während der gesamten Versuchsdauer von mind. 20 Tagen bei 35 °C und gleichmäßigem Schütteln (120 rpm) im Inkubationsschüttler inkubiert. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde der pH-Wert bestimmt, der weiterhin bei $7 \pm 0,2$ liegen sollte. Darauf erfolgte die Injektion von 1 mL CO₂-Austriebslösung (19% HCl). Während einer weiteren Inkubation für mindestens vier Stunden erfolgte die Austreibung des CO₂ aus der Flüssigphase. Nach Zugabe von 1 mL CO₂-Absorber-Lösung (30% KOH) in die Köcher der Messflaschen wurden diese für weitere 18–24 Stunden bei 35 °C inkubiert, um den Restdruck an gebildeten Methan messen zu können. Die Datenermittlung erfolgte über ein Auslesegerät (Sensomat-Scientific, AQUALYTIC[®]) und die Communication Software ACHAT OC (AQUALYTIC[®]). Die verwendeten Reagenzien zur Bestimmung der anaeroben Respiration sind in Tabelle 4-15 aufgelistet.

Tabelle 4-15: Reagenzien zur Bestimmung der anaeroben Respiration

Reagenz	Zusammensetzung	Referenz
Natriumacetat-Lösung (1 g CSB/L)	6,4 g C ₂ H ₃ NaO ₂ ad. 100 mL H ₂ O _{dest.}	
HCl (19% v/v)	89,29 mL 32% HCl ad. 150 mL H ₂ O _{dest.}	(Süßmuth <i>et al.</i> 2000)
KOH (30% v/v)	45 g KOH ad. 150 mL H ₂ O _{dest.}	
Pufferlösung	5 g NH ₄ Cl 1,5 g K ₂ HPO ₄ 6,5 g KH ₂ PO ₄ ad. 1 L H ₂ O _{dest.}	(Souto <i>et al.</i> 2010)

Über das Ideale Gasgesetz kann das gebildete Biogas (Kohlenstoffdioxid und Methan) in der Gasphase ermittelt werden.

$$n_{C,g} = \frac{\Delta p \cdot V_g}{R \cdot T} \cdot 10^{-4}$$

$n_{C,g}$ = Anzahl der Mole des gebildeten Biogases (Kohlenstoff in der Gasphase) [mol]

Δp = Differenz des Gasdrucks am Testende minus Gasdruck zu Testbeginn [hPa]

V_g = Volumen der Gasphase im Gefäß [mL]

R = Gaskonstante [8,314 J/(mol×K)]

T = Inkubationstemperatur [308,15 K]

10^{-4} = Umrechnungsfaktor für Pa in hPa und m³ in mL

Wird der Kohlenstoffgehalt der Prüfsubstanz (Natriumacetat) in die Rechnung miteinbezogen, ist die Bestimmung des biologischen Abbaugrades der Prüfsubstanz aufgrund des in der Gasphase gebildeten Gases D_b möglich.

$$D_h = \frac{n_{C,g}}{\left(\frac{m_{PS}}{M_{PS}} \cdot x_{C,PS} \right)} \cdot 100$$

D_h = biologischer Abbaugrad der Prüfsubstanz [%]

m_{PS} = Einwaage der Prüfsubstanz im Versuchsansatz [g]

M_{PS} = molare Masse der Prüfsubstanz [g/mol]

$x_{C,PS}$ = Anzahl der Kohlenstoffatome in der Summenformel der Prüfsubstanz

Der gebildete Kohlenstoff der wässrigen Phase liegt v. a. anorganisch gebunden in Form von Carbonat bzw. Hydrogencarbonat vor. Durch Zusatz der Austrieblösung findet die Umsetzung von Carbonat zu Kohlenstoffdioxid statt, dessen nun gasförmiges Volumen einen Druckanstieg in der Gasphase zur Folge hat.

$$n_{CO_2,l} = \frac{p_2 \cdot (V_g - V_{HCl}) - p_1 \cdot V_g}{R \cdot T} \cdot 10^{-4}$$

$n_{CO_2,l}$ = Anzahl der Mole des gebildeten Gases (Kohlenstoff in der wässrigen Phase) [mol]

p_1 = Druck vor Zugabe der CO₂-Austrieblösung [hPa]

p_2 = Druck nach der Kohlenstoffdioxidfreisetzung [hPa]

V_{HCl} = Volumen der zugesetzten Salzsäure [mL]

Der zu Gas umgesetzte Gesamtkohlenstoff der Gas- und Flüssigphase wird wie folgt berechnet.

$$n_c = n_{C,g} + n_{CO_2,l}$$

n_c = Anzahl der Mole des gesamten umgesetzten Kohlenstoffes [mol]

Der biologische Gesamtabbaugrad der Prüfsubstanz ergibt sich nach folgender Formel.

$$D_t = \frac{n_{C,g} + n_{CO_2,l}}{\left(\frac{m_{PS}}{M_{PS}} \cdot x_{C,PS} \right)} \cdot 100$$

D_t = biologischer Gesamtabbaugrad [%]

4.7 Quantifizierung von Mikroorganismen

Zur Detektion und Quantifizierung von Mikroorganismen wurden in dieser Arbeit verschiedene molekularbiologische Methoden angewandt, die nachfolgend erläutert werden.

4.7.1 Detektion Methanogener mittels F₄₂₀-Eigenfluoreszenz

Das Coenzym F₄₂₀ ist ein 8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin-Derivat, welches v. a. in methanogenen Archaeen in hohen Konzentrationen vorkommt. Dort ist es als Redoxcarrier an zahlreichen Elektronenübertragungen im Energie- und Baustoffwechsel dieser Mikroorganismen beteiligt. Obwohl das Coenzym F₄₂₀ in allen Methanogenen detektiert werden konnte (Alex *et al.* 1990, Braks *et al.* 1994) ist die Konzentration von F₄₂₀ in acetoklastischen Methanogenen in der Regel deutlich niedriger als die in hydrogenotrophen und methylophen Methanogenen (Huser *et al.* 1982, Kamagata & Mikami 1991). F₄₂₀ wurde jedoch auch in nicht-methanogenen Archaeen (bspw. *Halobacterium* und *Archeoglobus*), manchen Bacteria (z. B. *Mycobacterium* und *Streptomyces*) und einzelligen Eukaryonten (bspw. *Scenedesmus*) nachgewiesen (Eker *et al.* 1980, Naraoka *et al.* 1984, Lin & White 1986, de Wit & Eker 1987, Eker *et al.* 1988, Kunow *et al.* 1993, Gorris & van der Drift 1994, Aufhammer 2004).

In oxidiert Form absorbiert F₄₂₀ Licht der Wellenlänge 420 nm und fluoresziert blau-grün (520 nm) (Cheeseman *et al.* 1972). Diese Eigenschaft kann in der Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie zur Detektion F₄₂₀-haltiger Zellen genutzt werden.

Für die mikroskopischen Analysen wurden die Proben nach van Bruggen und Kollegen (1983) mit einer Mischung von 12 mg Formaldehyd und 3 mg Glutardialdehyd pro mL für zwei bis vier Stunden bei 4 °C fixiert, was ein schnelles Ausbleichen des Coenzym verhindern soll, und anschließend 15 Sekunden mit Ultraschall (50% Leistung) behandelt. Die homogenisierten Proben wurden über schwarze Polycarbonatfilter (Millipore, Isopore[®] Membrane Filters, 0,2 µm, GTBP) filtriert. Der Filter wurde auf einem Objektträger mit Citifluor-Lösung (Citifluor Ltd, London) eingebettet. Die quantitative Auswertung der fluoreszierenden Zellen erfolgte mit Hilfe eines Zählgitters im Okular und einem geeigneten Filtersatz (Anregung: D 360/40, Strahlenteiler: 400 DC LP, Emission: D 460/50; Carl Zeiss). Es wurden pro Probe jeweils zehn Sehfelder ausgezählt. Die Berechnung erfolgte unter Einbezug des Mittelwertes der Zellzahl (ZZ), der Größe des Zählfeldes und des Filters sowie der eingesetzten Probenmenge in ZZ_{F420}/mL.

Angelehnt an Heine-Dobbernack (1988) sowie de Poorter und Kollegen (2005) wurden die Proben für die spektroskopische Analysen mit 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6, 7, 8 bzw. 9) verdünnt und in einer speziellen Küvette für anaerobe Arbeiten (Hellma) fünf Minuten mit Stickstoff begast, um die anaeroben Bedingungen in der Biogasanlage nachzubilden. Die Messung erfolgte an einem Spektrofluorometer (JASCO FP-6300) bei einer Extinktion von 420 nm und einer Emission von 400–550 nm gegen den Kalium-Phosphat-Puffer.

4.7.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ermöglicht eine phylogenetische Analyse von Bakterienpopulationen in ihrem natürlichen Habitat (*in situ*) (Amann *et al.* 1990b, Madigan *et al.* 2001). Diese gängige Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen basiert auf dem Einsatz von kurzen, einzelsträngigen Oligonukleotiden, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff, hier Indocarbocyanin (Cy3), markiert sind. Diese Oligonukleotidsonden hybridisieren mit komplementären Sequenzabschnitten der ribosomalen RNA (rRNA) und ermöglichen somit eine spezifische Detektion. Das Fluoreszenzsignal ist durch die hohe Anzahl an Ribosomen in den Zellen (10^2 – 10^5 pro Zelle) vergleichsweise stark. Dabei ist eine Mindestzahl von 10^3 Ribosomen/Zelle für eine sichere Detektion notwendig (Amann & Ludwig 1994). Da die 16S rRNA sowohl hoch konservierte als auch variable Sequenzabschnitte aufweist, ist die Spezifität der FISH von der Sequenz der Oligonukleotidsonden abhängig (Fall 2002). Zur Analyse mittels FISH werden folgende Reagenzien benötigt (Tabelle 4-16).

Tabelle 4-16: Reagenzien zur Analyse mittels FISH

Reagenz	Zusammensetzung	
5 M NaCl	292,2 g NaCl ad. 1 L H ₂ O _{dest.}	sterilfiltriert
0,5 M EDTA	186,1 g EDTA ad. 1 L H ₂ O _{dest.}	pH 8 mit 10 N NaOH einstellen, sterilfiltriert
10% Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS)	10 g SDS ad. 100 mL H ₂ O _{dest.}	sterilfiltriert
1 M Tris-HCl-Lösung	121,14 g Tris ad. 1 L H ₂ O _{dest.}	pH 8 mit 32% HCl einstellen, sterilfiltriert

Um die fixierten Proben (Kapitel 4.3.3) für die FISH vorzubereiten, wurden diese mit einem eisgekühlten Gemisch aus 1xPBS und absolutem Ethanol (1:1) verdünnt und anschließend mittels Ultraschall, 15 Sekunden bei 50% Leistung (HD2070, Bandelin electronic GmbH, Berlin), homogenisiert. Je 20 µL der verdünnten Proben wurden auf eine Aussparung der beschichteten Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) gegeben. Die Trocknung erfolgte bei 35 °C im Hybridisierungssofen. Um die Zellen auf dem Objektträger nachzufixieren und zu dehydrieren wurde eine aufsteigende Ethanolreihe genutzt. Dabei wurden die Objektträger für je drei Minuten in 50%-, 80%- und 96%igem Ethanol inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Objektträger getrocknet. Auf die immobilisierten Zellen wurden je 9 µL Hybridisierungspuffer (Tabelle 4-18) gegeben und in diesen Puffer je 1 µL der entsprechenden Oligonukleotid-Sonde (Thermo Electron GmbH, Arbeitskonzentration 50 ng/µL) (Tabelle 4-17). Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer für mindestens 1½ Stunden bei 46 °C im HB-1000 Hybridizer (UVP Laboratory, Upland) unter Lichtausschluss. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde mit einer geringen Menge auf 48 °C erwärmten Waschpuffer (Tabelle 4-18) abgespült und im Wasserbad bei 48 °C im Dunkeln für 15 Minuten im Waschpuffer inkubiert, um nicht

gebundene Oligonukleotid-Sonden zu entfernen. Danach wurde der Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI (Merck, Darmstadt). Pro Probenfeld des Objektträgers wurden 20 µL einer 10 µg/mL DAPI-Lösung aufgetragen und für 15 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Der Farbstoff wurde anschließend mit destilliertem Wasser abgespült und der Objektträger in Citifluorlösung (Citifluor Ltd, London) eingebettet. Das Einbetten verhindert ein schnelles Ausbleichen der Fluorochrome während der Mikroskopie. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) bei 1000-facher Vergrößerung (Plan-Apochromat 100x/1,4 Ölimmersion, 10x Okular). Die DAPI-Signale wurden mit einem geeigneten Filtersatz (Anregung: D 360/40, Strahlenteiler: 400 DC LP, Emission: D 460/50; Carl Zeiss) und die Cy3-Signale mit einem geeigneten Filtersatz (Anregung: HQ 545/30, Strahlenteiler: Q 565 LP, Emission: HQ 610/75; Carl Zeiss) ausgewertet. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Zählgitters im Okular, wobei pro Probe zehn Sehfelder bzw. mindestens 1000 Zellen ausgezählt wurden.

In Tabelle 4-17 sind die in dieser Studie angewandten FISH-Sonden aufgeführt.

Tabelle 4-17: Verwendete FISH-Sonden

	FISH-Sonde	Zielgruppe	Sequenz (5' → 3')	Formamid [%]	Referenz
Domäne	EUBmix	Bacteria			
	EUB338-I	meisten Bacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	0	(Amann <i>et al.</i> 1990a)
	EUB338-II	Planctomycetales u. a.	GCA GCC ACC CGT AGG TGT		
	EUB338-III	Verrucomicrobiales u. a.	GCT GCC ACC CGT AGG TGT		
	Arc915	Archaea	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	20	(Stahl & Amann 1991)
methanogene Archaea	MB310	Methanobacteriaceae	CIT GTC TCA GGT TCC ATC TCC G	40	(Raskin <i>et al.</i> 1994)
	MC1109	Methanococcaceae	GCA ACA TAG GGC ACG GGT CT	40	
	MG1200	meisten Methanomicrobiales (Methanomicrobiaceae, -corpusculaceae, -planaceae)	CGG ATA ATT CGG GGC ATG CTG	40	
	MSMX860	Methanosarcinales	GGC TCG CTT CAC GGC TTC CCT	40	
Cellulose-abbaubende Bacteria	UCL284	<i>Acetivibrio</i> Gruppe	AAC CTC TCA GTT CGG CTA CC	30	(Li <i>et al.</i> 2009)
	GAM489	Pseudomonadaceae	AGC CGG TGC TTA TTC TGT TG	30	
	CLO490mix	<i>Clostridium</i> Gruppe (Clostridia GM4)	AGC CGK GGC TTC CTC CTC	40	
	CLO535	Klasse Clostridia	TCC GGA TAA CGC TTG CCC CCT ACG	40	
	BAC307	Bacteroidetes	TCT CAG TAC CAG TGT GGG GG	40	

Die Hybridisierungs- und Waschpuffer wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Formamidkonzentration hergestellt. Um die Spezifität der Sonde zu erhöhen, kann die Formamidkonzentration des Hybridisierungspuffers variiert werden. Das Formamid beeinflusst die Stringenz der Sondenbindung und senkt die Schmelztemperatur der Nukleotidstränge, sodass die Zellen nicht geschädigt werden (Fall 2002). In der Tabelle 4-18 sind die Zusammensetzungen der Puffer in Abhängigkeit von der Formamidkonzentration dargestellt.

Tabelle 4-18: Zusammensetzung des Hybridisierungs- und Waschpuffers

Puffer	Formamid [%]	5M NaCl [μL]	1M Tris-HCl [μL]	Formamid [μL]	0,5 M EDTA [μL]	H ₂ O _{dest.} [μL]	10% SDS [μL]
Hybridisierungspuffer	0			0		1600	
	20	360	40	400	--	1200	2
	30			600		1000	
	40			800		800	
Waschpuffer	0	9000					
	20	2250			--	ad. 50 mL	50
	30	1130	1000	--			
	40	460			500		

4.7.3 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), jedoch läuft die Amplifikation und die Quantifizierung des PCR-Produktes simultan in einem Schritt ab, sodass der Verlauf der qPCR verfolgt werden kann. Dies ermöglicht die Präsenz eines Farbstoffes, dessen Fluoreszenz proportional zur Menge der DNA-Amplifikate zunimmt. Bei der TaqMan-qPCR wird ein zusätzliches Oligonukleotid eingesetzt, welches spezifisch zwischen den beiden Primern an die Zielsequenz hybridisiert. Diese TaqMan-Sonde trägt am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff und am 5'-Ende einen Reporterfluoreszenzfarbstoff, der die Fluoreszenzmessung in der Elongationsphase ermöglicht. Dies erhöht zudem die Spezifität und Sensitivität der qPCR. Die Bestimmung der Menge der anfänglich vorhandenen DNA-Kopien des Zielgens erlaubt die Quantifikation durch einen mitgeführten Standard (Holzapfel & Wickert 2007, Mülhardt 2008).

In dieser Arbeit wurde die qPCR zur Quantifizierung von Archaeen eingesetzt. Als Standard für die qPCR wurde eine Plasmid-Lösung mit dem entsprechendem Archaea-spezifischem 16S rDNA-Abschnitt in unterschiedlichen Verdünnungen verwendet (10^4 – 10^9 Kopien/4 μL), deren Kopienzahl über die Konzentrationsbestimmung der DNA am NanoDropTM errechnet wurde. Für die Herstellung der Lösung wurde ein spezifisches 16S rDNA Fragment durch konventionelle PCR mit den entsprechenden Primern (Tabelle 4-19) aus der genomischen DNA von *Methanococcus jannaschii* (DSM 2661) amplifiziert, aufgereinigt (HiYield PCR Clean-up/Gel Extraction Kit, Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting) und nach Anleitung des CloneJETTM PCR Cloning Kit (Fermentas GmbH, St-Leon-Rot) kloniert.

Für die Klonierung kam der pJET 1.2/blunt Cloning Vektor zum Einsatz. Die Kopienzahl wurde unter Verwendung folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Kopienzahl} = \frac{c_{\text{Plasmid}} \cdot N_A}{M_{\text{Plasmid}}}$$

$Kopienzahl$	=	Anzahl der Plasmid-Kopien [μL^{-1}]
c_{Plasmid}	=	DNA-Konzentration der Plasmid-Lösung [$\text{g}/\mu\text{L}$]
N_A	=	Avogadro-Konstante = $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen [mol^{-1}]
M_{Plasmid}	=	Molare Masse eines Plasmids [g/mol]

Zur Etablierung der Archaea-qPCR wurden mit der Standard-Verdünnung $10^6/4 \mu\text{L}$ verschiedene Bedingungen der qPCR variiert. Diese Versuche wurden mit den Primerpaaren aus Tabelle 4-19 durchgeführt. Es wurden der Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, New York) und der Absolute Blue qPCR Mix (Thermo Fisher Scientific ABgene House, Epsom) getestet. Im Anschluss wurde die optimale Annealing-Temperatur mit Hilfe eines Temperaturgradienten im Bereich von 58 bis 61 °C bestimmt. Die Spezifität der Primer wurde mittels Einsatz von Reinkulturen-DNA von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzerii*, *Clostridium pasteurianum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacteroides vulgatus* überprüft. Da die Messwerte der qPCR bei Verwendung des Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix-UDG sowie des Primerpaares Arc787f /Arc1059r nur eine mäßige Güte zeigten, wurden diese Reaktionszusätze für die weiteren Analysen nicht verwendet.

Der 20 μL Reaktionsansatz für die qPCR enthielt die entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer (je 0,2 pmol/ μL) sowie die FAM-markierte TaqMan-Sonde (0,1 pmol/ μL , FAM = 6-Carboxyfluorescein) (siehe Tabelle 4-19), Wasser, den Reaktionspuffer (1x) und 4 μL Template-DNA. Bei allen Proben wurden Triplikate analysiert. Als Reaktionsgefäße fanden die ABgene Easy Strip Snap Tubes Ultra Clear Caps (Thermo Fisher Scientific, Epsom) Anwendung. Bei jeder qPCR wurden zudem eine Negativkontrolle (Wasser anstelle des Templates) sowie je drei Verdünnungsstufen des Standards (10^4 , 10^6 und 10^9 Kopien pro 4 μL), ebenfalls jeweils als Triplikate, mitgeführt. Die qPCR erfolgte im Mastercycler[®] ep realplex² von Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg).

Die evaluierten qPCR-Bedingungen, mit denen die Analyse der Proben erfolgte, waren folgende:

- eingesetztes Primerpaar: Arc787f/Arc979r
- verwendeter Reaktionspuffer: Absolute Blue qPCR Mix
- qPCR-Programm:

Initiale Denaturierung 15 Minuten bei 95 °C	}	40 Zyklen
Denaturierung 15 Sekunden bei 95 °C		
Annealing 1 Minute bei 60 °C		

Tabelle 4-19: Archaea-spezifische Oligonukleotide für die qPCR

Oligonukleotid	Zielgen	Sequenz (5' → 3')	Fragmentgröße [bp]	Referenz
Arc787f	16S rDNA	ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC	273	(Yu <i>et al.</i> 2005)
Arc915f *		AGG AAT TGG CGG GGG AGC AC		
Arc1059r		GCC ATG CAC CWC CTC T		
Arc979r		CMG GCG TYG AVT CCA ATT		

Primer und TaqMan-Sonde (*) (Thermo Electron GmbH), f = forward = Vorwärtsprimer, r = reverse = Rückwärtsprimer, die Fragmentgröße stellt die Größe des Amplifikats gebildet mittels Arc787f und entsprechendem Rückwärtsprimer dar

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes Realplex 2.0 (Eppendorf AG, Hamburg), das für die gemessenen Proben und Standards die C_q-Werte (Quantification cycle) ermittelte. Der C_q-Wert ist als der Zyklus definiert, bei dem zum ersten Mal eine ausreichende Menge des amplifizierten Produktes vorhanden ist, um ein gesichertes Fluoreszenzsignal zu erhalten und ist essentiell zur Auswertung der qPCR. Je niedriger der C_q-Wert, desto höher die Ausgangsmenge der Ziel-DNA im Reaktionsansatz. Es wurden nur Werte der Triplikate berücksichtigt, die sich um max. 0,5 unterschieden und die deutlich unterhalb des C_q-wertes der Negativkontrolle lagen. Unter Einbeziehung der Vorverdünnung, den bei der DNA-Isolation verwendeten Proben- und Elutionsvolumina, sowie des eingesetzten Templatevolumens wurde die Kopienzahl/mL ermittelt. Die Umrechnung auf die Zellzahl erfolgte unter Berücksichtigung der durchschnittlichen 16S rRNA-Genkopienzahl von Archaeen (1,72 Kopien/Zelle) nach der rrnDB-Datenbank (Lee *et al.* 2009). Die Zellzahl wurde in Zellen/dm² angegeben.

4.8 Phylogenetische Analysen

Mittels phylogenetischer Analysen können die evolutionären Beziehungen zwischen verschiedenen Taxa und somit der Verwandtschaftsgrad von Organismen untersucht werden.

4.8.1 Denaturierende Gradientengelelektrophorese

Bei der Denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) handelt es sich um eine Fingerprintmethode, welche die Auftrennung von DNA-Amplifikaten gleicher Länge mit unterschiedlichen Basensequenzen in einem Polyacrylamidgel und somit die Analyse komplexer Proben ermöglicht (Muyzer 1999). Bei der DGGE wird ein Polyacrylamidgel eingesetzt, das einen Gradienten der denaturierenden Agenzien Formamid und Harnstoff enthält, welcher zum partiellen Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge in Abhängigkeit von ihrer Sequenz führt. Durch das Aufschmelzen kommt es zu sterischen Änderungen der Moleküle, wodurch ihre Beweglichkeit im Gel deutlich verringert wird. So entstehen charakteristische Bandenmuster im Polyacrylamidgel (Madigan *et al.* 2001, Mülhardt 2008). Um ein vollständiges Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge zu verhindern, wird dem DNA-Fragment über einen der beiden Primer mittels PCR eine 40 bp lange GC-reiche Region, die GC-

Klammer, angefügt. Dies führt zur Verbesserung der Detektion von Sequenzunterschieden (Sheffield *et al.* 1989).

Zur Vorbereitung der DNA-Proben auf die DGGE wurde eine konventionelle PCR durchgeführt. Die hierfür verwendeten Ansätze und PCR-Programme sind im Kapitel 4.3.5 aufgeführt. Eingesetzt wurden die Primerpaare Ar109f/Ar915r und Parch519/Ar915r_GC sowie 27f/1492r und 357f_GC/518r für je eine nested PCR und das Primerpaar Msm355f/Msm1068r_GC. In der PCR wurde jeweils durch einen der Primer in die aufzutragenden Amplifikate eine 40 bp lange GC-Klammer eingeführt.

Die DGGE wurde mit dem System von INGENYphorU-2-Gele (Ingeny International BV, Goes) durchgeführt. Für alle Proben wurden Doppelgradienten-Gele mit 40–70% der denaturierenden Agenzien Harnstoff und Formamid, sowie 7–8% Acrylamid verwendet. Für deren Herstellung wurden 0 und 80%ige denaturierende Stammlösungen benutzt (siehe Tabelle 4-20). Diese Stammlösungen enthalten 50x TAE-Puffer (siehe Tabelle 4-5, Kapitel 4.3.5), 40%iges Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel40, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und destilliertes Wasser. Die 80%igen Stammlösungen enthalten zusätzlich die denaturierenden Agenzien Harnstoff (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und Formamid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und wurden nach der Herstellung filtriert (RC 58 Membranfilter, Porenweite 0,2 µm, Whatman GmbH, Dassel), um mögliche Harnstoffreste zu entfernen. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei 4 °C unter Lichtausschluss.

Tabelle 4-20: Zusammensetzung der Stammlösungen für die Herstellung des Gradientengels

Substanz	Stammlösung 0% denaturierend; 7% Acrylamid	Stammlösung 80% denaturierend; 7% Acrylamid	Stammlösung 0% denaturierend; 8% Acrylamid	Stammlösung 80% denaturierend; 8% Acrylamid
Harnstoff	--	168 g	--	168 g
Formamid	--	160 mL	--	160 mL
50xTAE, pH 7,4	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
40% Acrylamid/ Bisacrylamid	87,5 mL	87,5 mL	100 mL	100 mL
H ₂ O _{dest.}	ad. 500 mL	ad. 500 mL	ad. 500 mL	ad. 500 mL

Aus diesen Stammlösungen konnten das Sammelgel und die Lösungen B und C für das Gießen des Trenngels hergestellt werden. Tabelle 4-21 zeigt die Zusammensetzungen der Lösungen B und C für das Trenngel sowie die Zusammensetzung des Sammelgels. Die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS, Merck KGaA, Darmstadt) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, BioRad, München) erfolgte direkt vor dem Gießen der Gele. Das Gießen des Trenngels erfolgte mit Hilfe des Gradientenmischers (Gradient former 485, BioRad, München) und einer Schlauchpumpe (IP55, Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen) mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 mL/min. Das Trenngel polymerisierte 1–2 Stunden aus. Anschließend wurde das Sammelgel mit einer 10 mL Spritze zwischen den Kamm auf das Trenngel gespritzt und polymerisierte zehn Minuten aus. Nach Entfernen des Kamms

wurde die Gelkassette luftblasenfrei in die Pufferkammer mit 1x TAE-Puffer eingesetzt und der Puffer auf 60 °C erwärmt.

Tabelle 4-21: Zusammensetzung des Doppelgradienten-Gels

Substanz	Sammelgel		Trenngel	
	(Lösung A)	(Lösung B)	(Lösung B)	(Lösung C)
Anteil an denaturierenden Agenzien	0%	40%		70%
Acrylamid-Anteil	7%	7%		8%
Stammlösung 0%	6 mL	12 mL		3 mL
Stammlösung 80%	--	12 mL		21 mL
TEMED	6 µL	15 µL		15 µL
APS 20%	60 µL	50 µL		50 µL

Je nach Bandenstärke des PCR-Produktes wurden 5–20 µL der Proben aufgetragen. Um eine Vergleichbarkeit der Gele zu erreichen, wurde in mindestens zwei Spuren ein DGGE-Standard aufgetragen. Dieser wurde von Frau Dr. Burga Braun (TU Berlin) zur Verfügung gestellt und besteht aus der DNA von Mikroorganismen mit Fragmenten gleicher Länge aber unterschiedlichem GC-Gehalt (*Flectobacillus* sp., *Bacillus sphaericus*, *Enterococcus faecalis*, *Variovorax paradoxus*, *Commamonadaceae bacterium* MWH5, *Leptothrix discophora*, *Leptothrix mobilis* und *Sphaerotilus* sp.). Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V (Electrophoresis Power Supply EPS 1001, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Wien) für 20 Stunden.

Nach Abtrennung des Sammelgels erfolgte die Färbung mit 20 mL des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®] Gold (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Stammlösung 1:10.000 verdünnt). Nach 30-minütigem Färben unter Lichtausschluss wurde der Farbstoff vom Gel mit wenig destilliertem Wasser abgespült. Die angefärbten Banden konnten mittels UV-Transilluminator (Gel Doc 2000, BioRad, USA) unter Verwendung des Programmes Quantity One 4.1.1 (BioRad, München) detektiert werden. Die anschließende Auswertung der Gele erfolgte mit dem Programm BioNumerics (Applied Maths, Version 6.0).

4.8.2 Sequenzanalyse

Zur näheren Interpretation der DGGE-Bandenmuster und Identifikation wurden die DNA-Fragmente dominanter Banden sequenziert. Dazu wurden die ausgewählten Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem DGGE-Gel ausgeschnitten und in je 300 µL Wasser für etwa zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Wasser abgenommen und 50 µL frisches Wasser zugegeben. Die anschließende Elution der DNA erfolgte in Abhängigkeit von der Fragmentlänge. Die kleineren Fragmente unter 500 bp der Bacteria-DGGE und der Archaea-DGGE wurden für etwa 48 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die 700 bp-langen DNA-Fragmente der MSM-DGGE wurden durch

den dreimaligen Zyklus von Einfrieren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Auftauen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aus dem Gel gelöst. Der Überstand mit der darin befindlichen DNA wurde als Template für die Reamplifikation eingesetzt. Diese erfolgte durch eine spezifische PCR mit den entsprechenden Primern ohne GC-Klammer (siehe Kapitel 4.3.5). Das PCR-Produkt wurde im Anschluss mit dem HiYield PCR Clean-up/Gel Extraction Kit (Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting) aufgereinigt und von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert. Die Sequenzen wurden mit dem Programm BioEdit Version 7.0.4.1 (North Carolina State University) (Hall 1999) editiert und anschließend mit Hilfe des Suchalgorithmus BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1990) mit den Einträgen der Datenbank vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) verglichen. Die nächsten Verwandten wurden identifiziert sowie exemplarisch Referenzsequenzen aus der NCBI-Datenbank zur umfassenderen Analyse heruntergeladen. Die taxonomische Zuordnung bzw. Erstellung der Stammbäume der 16S rDNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Programme RDP Classifier (Ribosomal Database Project, Michigan) (Cole *et al.* 2009), Geneious 6.1.5 (Biomatters Ltd., Auckland) (Drummond *et al.* 2010) und MEGA 5.2 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, Tempe) (Tamura *et al.* 2011). Dabei erfolgte die Alignierung der Sequenzen mittels ClustalW (Thompson *et al.* 1994) und die Dendrogramme wurden unter Verwendung der Maximum Likelihood-Methode, basierend auf dem Tamura-Nei-Model (Tamura & Nei 1993), mit 1000 Bootstrap Replikationen (Felsenstein 1985) erstellt.

5 ERGEBNISSE & DISKUSSION

Die Resultate dieser Studie sowie die daraus hervorgehenden Auslegungen und Erklärungen sind in den folgenden Unterkapiteln beschrieben.

5.1 Evaluierung geeigneter Kontrollparameter

In Vorversuchen konnten die im Kapitel 3.4 (siehe Tabelle 3-4) ermittelten potentiellen Methoden, welche Kontrollmessungen zum Vorkommen bestimmter Mikroorganismen oder mikrobieller Funktionen im Sinne eines Schnelltestsystems ermöglichen sollen, hinsichtlich ihrer Eignung untersucht werden.

Als mikrobielle Biomasse wird die Masse der lebenden Mikroorganismen, zu denen Bacteria, Archaea, Pilze, Algen und Protozoen gehören, bezeichnet (Gisi 1997). Biomasseparameter sollten daher möglichst sensitiv mikrobielle Zellen bzw. Zellbestandteile erfassen. In dieser Arbeit wurden die mikrobielle Gesamtzellzahl, der Proteingehalt, der DNA-Gehalt sowie die Quantifizierung bestimmter Mikroorganismengruppen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und F_{420} -Eigenfluoreszenz als potentielle Parameter zur Analyse der Biomassedynamik überprüft. Weiterhin sollte der Anteil der organischen Trockensubstanz und die mittlere Biofilmdicke Aufschluss über die Biomasse auf den Füllkörpern geben.

Biomasseparameter erfassen sowohl aktive, inaktive als auch tote Mikroorganismen und geben daher noch keinen Aufschluss über die Funktionspotentiale einer mikrobiellen Gemeinschaft. Zur Bestimmung der Aktivität von Mikroorganismen können entsprechende Zellbestandteile, das Wachstum, die Wärmefreisetzung sowie Substratverwertung und Produktfreisetzung analysiert werden (Cypionka 2010). In dieser Studie wurden verschiedene Enzymaktivitäten (heterotrophe Gesamtaktivität der Mikroorganismen und spezifische Hydrolaseaktivitäten) sowie aerobe und anaerobe Respirationsmessungen als mögliche Kenngrößen zur Untersuchung der mikrobiellen Aktivität in Biogasanlagen begutachtet.

Die Auswertungen werden im Folgenden erläutert.

5.1.1 Gesamtproteingehalt

Der hohe Proteinanteil in mikrobiellen Zellen legt nahe, dass dieser einen geeigneten Biomasseparameter darstellt. Der Proteingehalt ist jedoch stark vom physiologischen Zustand der Zelle abhängig und auch methodische Nachteile des Lowry-Assays (1951), wie die Reaktion von Huminstoffen und Zuckern mit dem verwendeten Nachweisreagenz (Lo & Stelson 1972, Peterson 1979, Box 1983), erschweren eine fehlerfreie Analyse des mikrobiellen Proteingehaltes in komplexen Proben. Andere mögliche photometrische Proteinbestimmungsmethoden, wie das Bradford-, das Biuret- oder das Bicinchonin-

säure-Assay, weisen jedoch für das vorliegende Anwendungsgebiet ähnliche bzw. stärkere Nachteile (kleineres Erfassungsspektrum, Insensitivität oder Anfälligkeit von Störsubstanzen) auf (Chutipongtanate *et al.* 2012). Zudem werden bei der Untersuchung des Proteingehaltes sowohl mikrobielle als auch pflanzliche (substrateigene) Proteine, die in diesen Proben einen hohen Anteil haben, bestimmt. In Abbildung 5-1 sind die Analysen des Proteingehaltes von Perkolator- und Prozesswasserproben der Containeranlage (Beprobungsphase C1 bzw. C3) dargestellt.

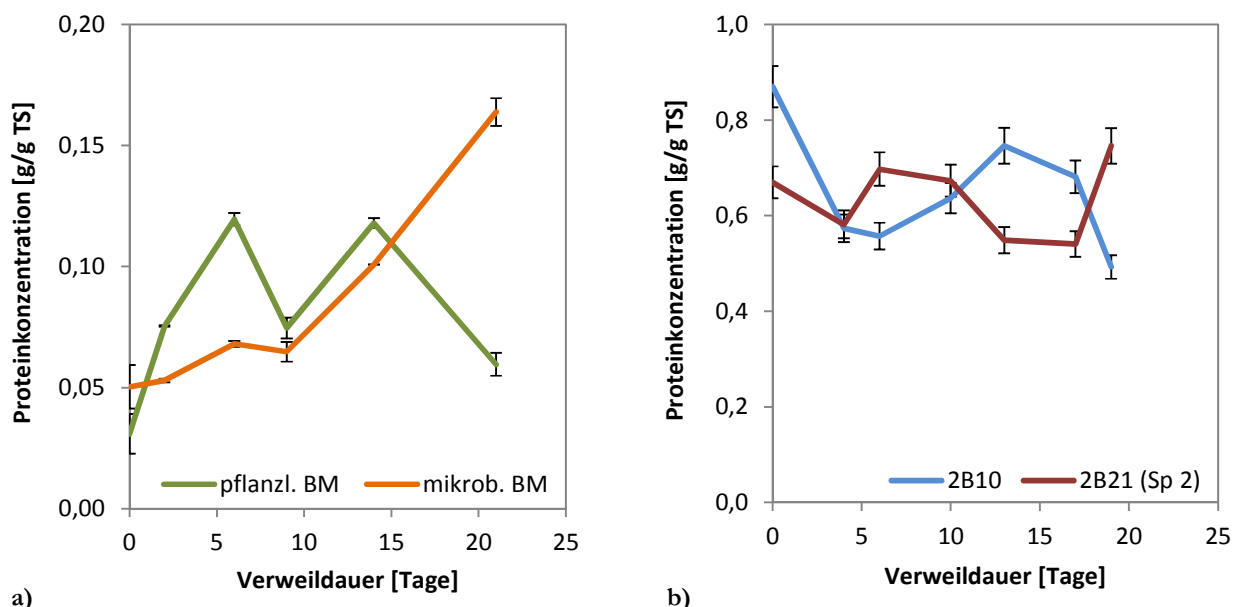


Abbildung 5-1: Proteinkonzentrationen von Proben aus verschiedenen Prozessstufen

Proteinkonzentrationen von Proben aus verschiedenen Prozessstufen gegen die Verweilzeit **a)** Perkolatorproben: pflanzliche Biomasse (pflanzl. BM) und mikrobielle Biomasse (mikrob. BM), Beprobungsphase C3. **b)** Prozesswasserproben: Ablauf Perkolator (2B10) und Ablauf Methanreaktoren (2B21, Speicher 2), Beprobungsphase C1. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Durch das Abschütteln der mikrobiellen Biomasse vom Substrat (siehe Kapitel 4.3.1) konnte grob zwischen der pflanzlichen und mikrobiellen Biomasse unterschieden werden. In Abbildung 5-1a ist ersichtlich, dass die Proteinkonzentration des Substrates zwischen 0,03 und 0,12 g/g TS sehr stark schwankte. Der mittlere Proteingehalt war dabei typisch für Maissilage, der i. d. R. zwischen 0,07 und 0,10 g/g TS liegt (Beckmann & Kolbe 2002, Kolbe *et al.* 2006). Der mikrobielle Proteingehalt nahm hingegen von 0,05 auf 0,16 g/g TS konstant zu, was auf eine starke Vermehrung der Mikroorganismen im Laufe des Gärprozesses hindeutet. So hat sich die mikrobielle Biomasse mehr als verdreifacht. Dies ist u. a. durch die stetige Inokulation des Festbettreaktors durch Prozesswasser bedingt und entspricht den Erwartungen. Der Proteingehalt des Prozesswassers (Ablauf des Perkolators und der Methanreaktoren) wies ebenfalls Schwankungen auf, im Mittel um 0,64 g/g TS (Abbildung 5-1b). Nach Abzug der Proteinkonzentration des Zulaufes vom Ablauf des Perkolators (Differenz von 2B21 und 2B10) ergab sich eine Konzentration von nur noch durchschnittlich 0,01 g/g TS. Da keine Abtrennung der pflanzlichen von den mikrobiellen Proteinen im Prozesswasser möglich war, stören diese sowie vorhandene

Zucker und Huminstoffe womöglich die Analytik. Zudem wurden hierbei auch sekretierte Enzyme erfasst, deren Abundanz nicht zwangsläufig mit der Biomasse korreliert. So konnten bei den Analysen der pflanzlichen Biomasse und des Prozesswassers keine klaren Tendenzen, die einen Proteinabbau bzw. eine Biomassedynamik charakterisieren, detektiert werden. Da eine Entnahme repräsentativer Perkolatorproben aus verfahrenstechnischen Gründen i. d. R. nicht während des Hydrolyseprozesses erfolgen kann – ein Eingriff in den Gärprozess ist zu vermeiden – eignet sich diese Methode nur bedingt zur Kontrolle der Hydrolyse.

5.1.2 DNA-Gehalt

In der Abwassertechnik und in ökologischen Systemen wird der DNA-Gehalt oft als Maß für die mikrobielle Zellzahl bzw. als Biomasseparameter genutzt (Hattingh & Siebert 1967, Maruyama *et al.* 1993, Liebeskind & Dohmann 1994, Obst *et al.* 1995). Jedoch ist auch hierbei ohne aufwendige Verfahren keine Unterscheidung zwischen pflanzlicher (substrateigener) und mikrobieller DNA möglich. Zudem können zur Analyse verschiedene Farbstoffe eingesetzt werden, die jeweils Vor- und Nachteile aufweisen. In Abbildung 5-2a sind die Analysen des DNA-Gehaltes von Hydrolysatproben (Ablauf Fass A, Beprobungsphase F3) veranschaulicht, die vor der Untersuchung durch Zentrifugation von freier DNA befreit (+) oder nicht befreit (-) wurden. Zudem wurde die Analyse unter Verwendung der Farbstoffe Bisbenzimid und PicoGreen[®] verglichen.

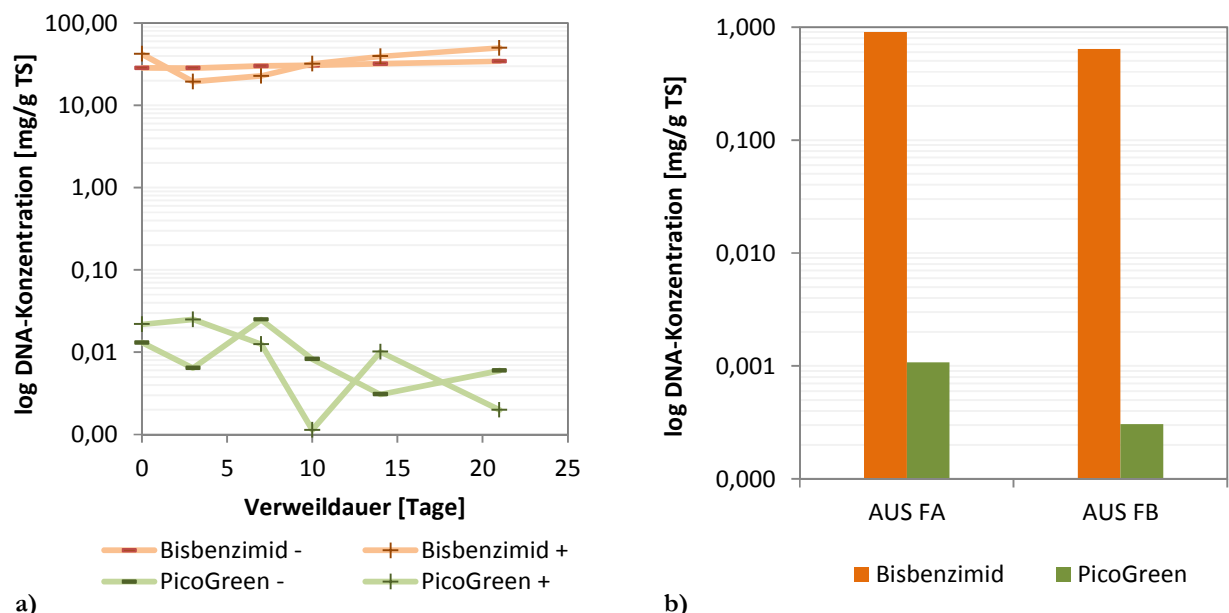


Abbildung 5-2: DNA-Konzentrationen mittels verschiedener Analysebedingungen

a) Hydrolysatproben (Ablauf FA, Beprobungsphase F3): Vergleich der Analyse mit Bisbenzimid bzw. PicoGreen[®], - ohne vorgeschalteten Zentrifugationsschritt bzw. inkl. freier DNA, + mit vorgeschaltetem Zentrifugationsschritt bzw. ohne freie DNA **b)** Perkolatorproben (Ausgangsmaterial der Fässer A und B, AUS FA+B, Beprobungsphase F3): Vergleich der Analyse mit Bisbenzimid bzw. PicoGreen[®] mit vorgeschaltetem Zentrifugationsschritt. Logarithmische Skalierung der y-Achse.

Deutliche Unterschiede lassen sich schon hinsichtlich der DNA-Konzentration [mg/g TS] beider Versuchsansätze erkennen. Der DNA-Gehalt der Proben unter Verwendung des Farbstoffes PicoGreen® im Analyseansatz war um ein Vielfaches geringer als jener der Messung mit Bisbenzimid, durchschnittlich um den Faktor 3000 (ohne Zentrifugationsschritt) bzw. 2800 (mit Zentrifugationsschritt). Eine ähnliche Tendenz lässt sich bei der Bestimmung des DNA-Gehaltes der Gärreste derselben Beprobungsphase beobachten (vgl. Abbildung 5-2b). Hier waren die DNA-Konzentrationen bei der Messung mit PicoGreen® um durchschnittlich das 1500-fache niedriger als bei der Analyse mit Bisbenzimid. Eine mögliche Ursache dieses Unterschiedes lässt sich in der Belastung der Proben mit Huminstoffen finden. So wird die Fluoreszenzintensität der Analyse mit PicoGreen® durch das Vorhandensein von Huminstoffen in den Proben signifikant beeinflusst (Bachoon *et al.* 2001, Zipper *et al.* 2003). Dies wird ebenfalls aus den Verlaufsformen der Kurven in Abbildung 5-2a ersichtlich. Während die DNA-Konzentration des Bisbenzimidansatzes ab dem dritten Tag kontinuierlich anstieg, verzeichneten die Messwerte der Analyse mittels PicoGreen® starke Schwankungen des DNA-Gehaltes und sanken schließlich. Da der Gehalt an Huminstoffen mit fortschreitender Hydrolyse des Substrates ansteigt – sie entstehen bei der Umwandlung von totem organischen Material – zeigt sich dies in einer Abnahme der Fluoreszenzintensität und wirkte sich somit auf die ermittelte DNA-Konzentration mittels PicoGreen® aus. Jedoch konnten Bergström und Kollegen ebenfalls bei der Anfärbung mit Bisbenzimid negative Auswirkungen feststellen. Sie beobachteten einen nichtfluoreszierenden, gelblichen Niederschlag bei huminstoffhaltigem Wasser (Bergström *et al.* 1986). Dieser Effekt konnte aber, wie weitere Störfaktoren (Salze, Proteine, Polysaccharide und andere hochmolekulare Verbindungen), durch die Anwendung der Standardaddition kompensiert werden. Hinweise darauf, dass auch die Fluoreszenz des Bisbenzimids durch erhöhte Huminstoff-Konzentrationen abgeschwächt wird, konnten in früheren Studien ebenso ermittelt werden. Dies liegt wahrscheinlich in der Bindung von Huminstoffen mit der DNA bzw. dem Farbstoff begründet (Cullen & Hirsch 1998, Zipper *et al.* 2003). Wie die Ergebnisse dieser und auch anderer Arbeiten zeigen, ist das Quenching bei Bisbenzimid sehr gering, nur etwa 6% (Bachoon *et al.* 2001), sodass die DNA-Quantifizierung mit Bisbenzimid eine sensitive und präzise Methode darstellt, sogar wenn es sich bei den Proben um Rohzellextrakte handelt (Bachoon *et al.* 2001, de Mey *et al.* 2006, Gangneux *et al.* 2011). Die Zentrifugation der Proben diente der Abtrennung der gelösten Huminstoffe, insbesondere Huminsäuren, sowie freier DNA. Die Vorbehandlung der Proben durch Zentrifugation ergab hinsichtlich der Messung mit Bisbenzimid einen deutlichen Unterschied im zeitlichen Verlauf des DNA-Gehaltes gegenüber den Proben ohne jene Vorbehandlung (Abbildung 5-2a). Ohne vorgeschalteten Zentrifugationsschritt war von Tag Null (Start bzw. Befüllung des Perkolators) bis Tag 21 (Ende bzw. Entleerung des Perkolators) ein stetiger Anstieg der DNA-Konzentration zu vermerken. Mit vorgeschaltetem Zentrifugationsschritt nahm die DNA-Konzentration zunächst ab und stieg dann kontinuierlich an. Da aus verfahrenstechnischen Gründen

der Ablauf des Perkolators am Tag Null noch von der vorausgehenden Hydrolyse stammt, erklärt sich eine erhöhte Biomasse-Konzentration in diesen Proben. Ohne Zentrifugation überlagern die Signale von freier DNA und/oder gelösten Huminstoffen die Signale der DNA intakter Zellen. So ist ein vorgeschalteter Zentrifugationsschritt zu empfehlen. Weil jedoch auch bei dieser Methode keine Unterscheidung zwischen pflanzlicher und mikrobieller DNA getroffen werden kann, ist auch die Analyse mikrobieller Biomasse mittels Bestimmung der DNA-Konzentration nur unter Vorbehalt anzuwenden.

5.1.3 Fluoreszenz des Coenzym F₄₂₀

Da das Coenzym F₄₂₀ insbesondere charakteristisch für Methanogene ist, wurde es schon in früheren Studien zur Quantifizierung dieser Mikroorganismen eingesetzt (Doddema & Vogels 1978, Schneckenburger *et al.* 1984, Nettmann *et al.* 2008, Kubota *et al.* 2009). Die Messung kann fluoreszenzmikroskopisch sowie -spektroskopisch erfolgen.

Für die spektroskopische Analyse wurde zunächst der Effekt der Fluoreszenzintensität des Coenzym F₄₂₀ auf verschiedene pH-Werte (pH 6–9) getestet. In Abbildung 5-3 sind die ermittelten Emissionsspektren bei einer Extinktion von 420 nm gezeigt. Bei der Emissionswellenlänge von 470 nm wiesen alle Kurven die höchste Fluoreszenzintensität auf, wie bspw. auch von Heine-Dobbernack (1988) bzw. van Bruggen und Kollegen (1983) beschrieben, welche bei den pH-Werten 8 und 9 besonders ausgeprägt war. Da die in dieser Arbeit untersuchten Proben im Mittel einen pH von 7,5 aufwiesen, wurden die folgenden spektroskopischen Analysen der F₄₂₀-Fluoreszenz (Extinktion 420 nm und Emission 470 nm) bei pH 8 durchgeführt.

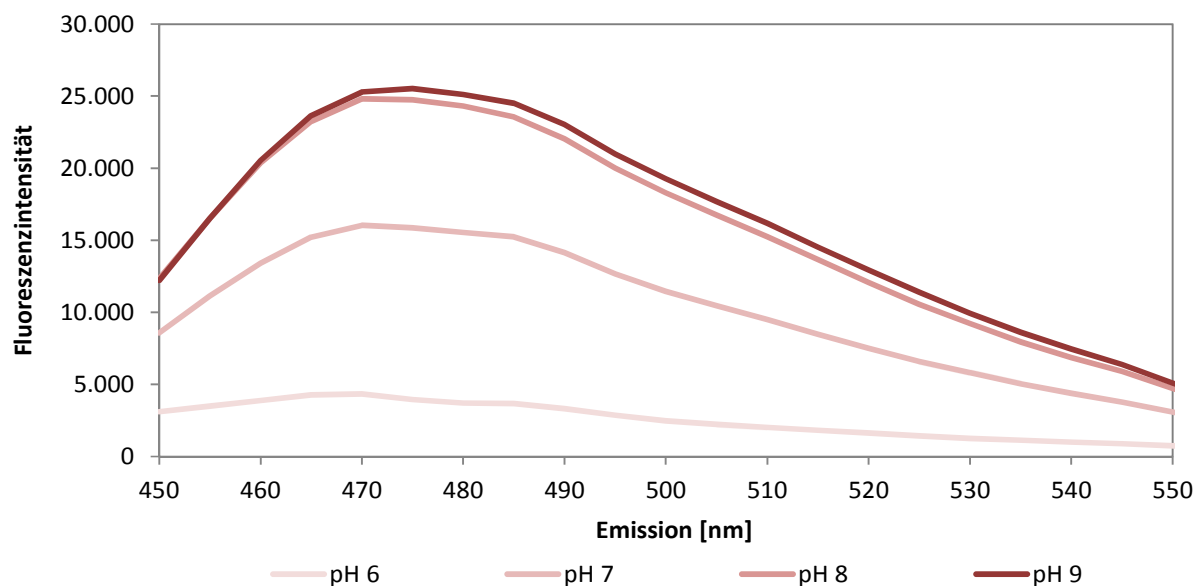


Abbildung 5-3: Emissionsspektren des Coenzym F₄₂₀

Verdünnung der Probe (Sp 2 bzw. 2B21 aus der Containeranlage) mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer verschiedener pH-Werte. Die Extinktionswellenlänge beträgt 420 nm.

In Abbildung 5-4a ist eine viermonatige spektroskopische Beobachtung von Prozesswasserproben der Containeranlage (von Speicher 1 bzw. 2B16 und Speicher 2 bzw. 2B21) dargestellt. Die Fluoreszenzkurven der untersuchten Proben zeigten einen ähnlichen Verlauf und ähnliche Intensitäten des Coenzym F_{420} , was darauf hinweist, dass sich die Zellzahlen der Methanogenen ebenfalls annähernd entsprechen. Abbildung 5-4b veranschaulicht die Zahl F_{420} -haltiger Zellen je mL ermittelt durch die mikroskopische Analyse der selben Proben. Hier zeigten die Kurven zwar einen nahezu vergleichbaren Verlauf, die Werte der Zellzahlen wichen teilweise jedoch stark voneinander ab. So konnten im Speicher 2 (2B21) gegen Ende des Beobachtungszeitraumes über 33×10^7 F_{420} -haltige Zellen je mL detektiert werden, im Speicher 1 (2B16) dagegen betrug das Maximum F_{420} -haltiger Zellen 7×10^7 je mL in der ersten Hälfte des Untersuchungszeitraumes. Da der Speicher 2 den Methanreaktoren direkt nachgeschaltet ist, war auch hier eine höhere Abundanz an Methanogenen zu erwarten.

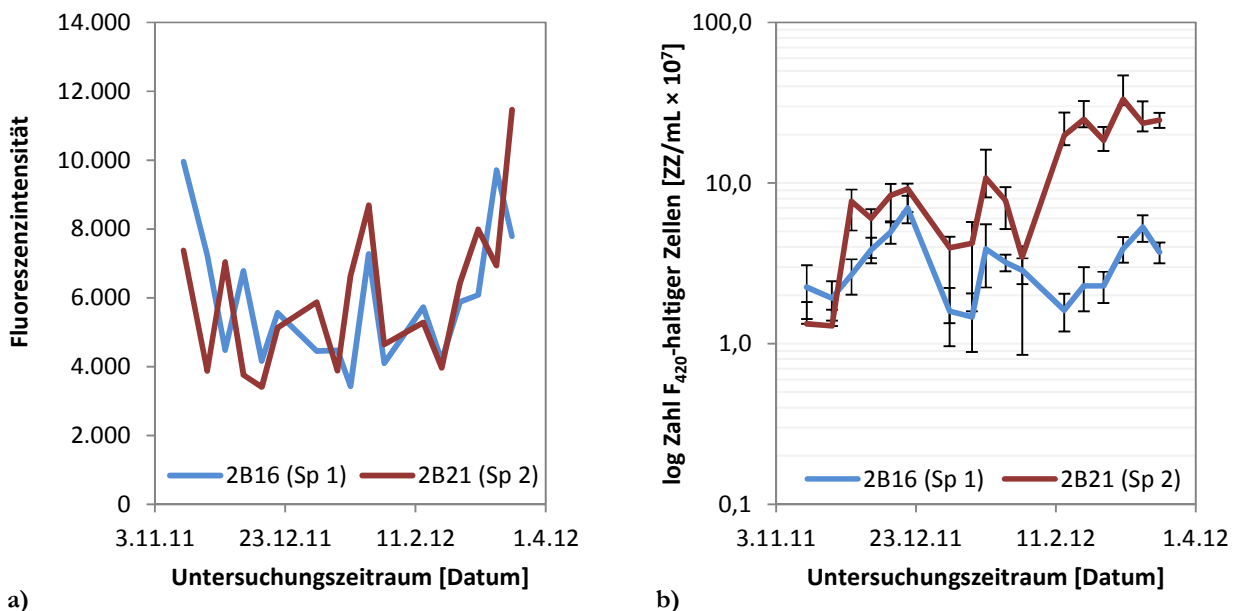


Abbildung 5-4: Detektion Methanogener mittels Eigenfluoreszenz des Coenzym F_{420}

a) Viermonatige spektroskopische Beobachtung von Prozesswasserproben (von Speicher 1 bzw. 2B16 und Speicher 2 bzw. 2B21) der Containeranlage. Verdünnung der Probe mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8). Die Extinktionswellenlänge beträgt 420 nm, die Emissionswellenlänge 470 nm. **b)** Viermonatige mikroskopische Beobachtung von Prozesswasserproben (von Speicher 1 bzw. 2B16 und Speicher 2 bzw. 2B21) der Containeranlage. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen. Logarithmische Skalierung der y-Achse.

Wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, differieren die Konzentrationen des Coenzym F_{420} in Methanogenen je nach genutztem Stoffwechselweg zur Methanbildung. Zudem können andere in der Probe vorhandene Substanzen, pflanzlich, mikrobiell oder anorganisch, die F_{420} -Fluoreszenzsignale stören bzw. überdecken (Hutschemackers *et al.* 1982, Schneckenburger *et al.* 1984), weshalb meist aufwendige Methoden zur Extraktion und Reinigung des Coenzym Anwendung finden (Reynolds & Colleran 1987, Ashby *et al.* 2001, de Poorter *et al.* 2005). Da weiterhin auch andere nicht-methanogene Mikroorganismen bekannt sind, die ebenfalls über das Coenzym F_{420} verfügen, wie diverse Actinomyceten

(*Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Nocardia* und *Mycobacterium*) (Eker *et al.* 1980, Naraoka *et al.* 1984, Isabelle *et al.* 2002, Aufhammer 2004), deren Vorkommen teilweise auch in Biogasanlagen nachgewiesen wurde (Slana *et al.* 2011, Supaphol *et al.* 2011), ist besonders die spektroskopische Detektion Methanogener solcher komplexer Proben mittels Eigenfluoreszenz des F_{420} stark fehlerbehaftet. Dagegen wird bei der mikroskopischen Analyse die Fluoreszenz einzelner Zellen ausgewertet, sodass in der Probe vorhandene interferierende Substanzen einen geringeren Einfluss auf die Analyse haben. Da es sich hierbei um eine binäre Analyse handelt, wird die Fluoreszenz-Intensität einzelner Zellen nicht berücksichtigt. Allerdings bleichen sehr schwache Signale innerhalb von einigen Sekunden aus, weshalb Zellen mit äußerst geringen F_{420} -Gehalten nicht erfasst werden können. So wird die Gesamtheit aller Methanogener, jedoch auch anderer Zellen mit einer ausreichenden F_{420} -Konzentration detektiert. Daher eignet sich auch die mikroskopische Detektion Methanogener mittels Eigenfluoreszenz des F_{420} nur bedingt zur Kontrolle von Biogasanlagen.

5.1.4 Anaerobe Respirationsmessung

Zur Beurteilung der Aktivität anaerober Mikroorganismen dienen v. a. Respirationsversuche, mittels derer das Biogasbildungspotential bestimmt wird. In solchen anaeroben Batch Tests kann die Verwertbarkeit bzw. Inhibierung verschiedener Substrate getestet sowie die methanogene Aktivität unterschiedlicher Biozönosen ermittelt werden (Abreu *et al.* 2007, Angelidaki *et al.* 2007, Li *et al.* 2008, Souto *et al.* 2010). In der VDI-Richtlinie 4630 (VDI 2006) bspw. sind verschiedene Versuchsaufbauten und Methoden zur Gaserfassung und -Analyse beschrieben. In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der methanogenen Aktivität verändert nach Süßmuth und Kollegen (2000). In Abbildung 5-5 sind die Ergebnisse der anaeroben Respirationsversuche von Proben der Speicher 2 (Beprobungsphase F4) illustriert.

Da im Batch Test die methanogenen Mikroorganismen das zugefügte Substrat (Natriumacetat) zu Biogas umsetzen, steigt der Druck in der Messflasche. Diese Umsetzung kann direkt über den acetoklastischen Weg und/oder über die syntrophe Acetat-Oxidation und den darauf folgenden hydrogentrophen Weg geschehen (Bauer *et al.* 2008, Lebuhn *et al.* 2008). Wie in Kapitel 4.6.2 näher erläutert, wird die Druckdifferenz zur Berechnung des gebildeten Biogases bzw. der Kohlenstoffmenge in der Gasphase $n_{C,g}$ und des biologischen Abbaugrades D_b aufgrund des in der Gasphase gebildeten Gases herangezogen. Der biologische Abbaugrad gibt an wie hoch der zu Biogas transformierte Kohlenstoff-Anteil des zugefügten Substrates ist bzw. wie viel Substrat umgesetzt wurde. Nach Bestimmung des zu Gas umgesetzten Gesamtkohlenstoffes n_c (Kohlenstoffmenge der Gas- und Flüssigphase) kann der biologische Gesamtabbaugrad D_t ermittelt werden. Je höher die Abundanz bzw. je aktiver die methanogenen Mikroorganismen, desto schneller und höher ist die Biogasproduktion bzw. desto höher ist der biologische (Gesamt-)Abbaugrad.

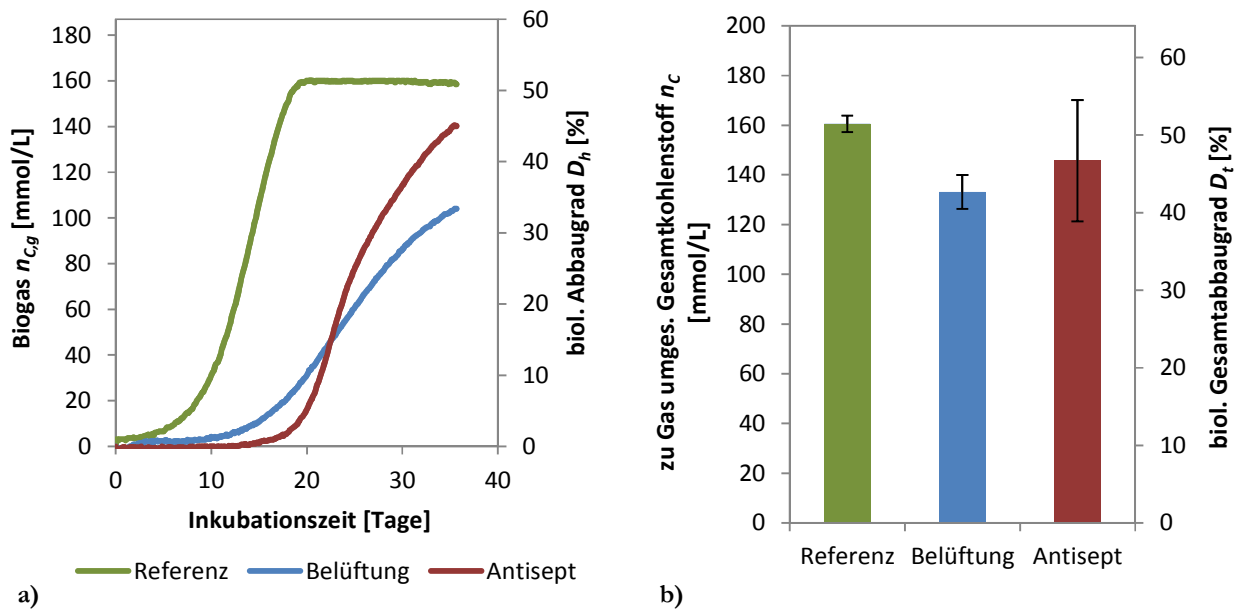


Abbildung 5-5: Methanogene Aktivität mittels Respirationsversuche

a) Pro Liter Probe gebildetes Biogas in der Gasphase $n_{C,g}$ und biologischer Abbaugrad D_h aufgrund des in der Gasphase gebildeten Gases über die Inkubationszeit des Batch Tests, analysierte Proben: Speicher 2 vom Ende der Beprobungsphase F4, Referenz: Sp 2 unbehandelt, Belüftung: Sp 2 während der gesamten Versuchsphase aktiv belüftet, Antisept: diskontinuierliche Zugabe des Desinfektionsmittels Antisept 33. **b)** Pro Liter Probe zu Gas umgesetzter Gesamtkohlenstoff n_C und biologischer Gesamtabbaugrad D_t nach Beendigung des Batch Tests, analysierte Proben: Speicher 2 vom Ende der Beprobungsphase F4, Referenz: Sp 2 unbehandelt, Belüftung: Sp 2 während der gesamten Versuchsphase aktiv belüftet, Antisept: diskontinuierliche Zugabe des Desinfektionsmittels Antisept 33. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

In der Beprobungsphase F4 wurden Verfahren untersucht, die zu einer Hemmung der Methanogenen in der Hydrolysestufe beitragen sollten. Dies ist insbesondere für offene Systeme von Interesse, damit ein Energieverlust durch abgehendes Methan verhindert wird. Hierzu wurden drei unterschiedlich behandelte Speicher 2 (Zulauf der Hydrolysereaktoren) der Fissanlage analysiert. Der Referenz-Speicher blieb unbehandelt, ein Sp 2 wurde über die gesamte Versuchsdauer hinweg intensiv aktiv belüftet und dem dritten Sp 2 wurden alle zwei bis drei Tage das Desinfektionsmittel Antisept 33 zugegeben. Am Ende der Beprobungsphase wurden die Speicher hinsichtlich der methanogenen Aktivität untersucht. Wie in Abbildung 5-5a ersichtlich, unterschieden sich die Biogasproduktion $n_{C,g}$ bzw. der biologische Abbaugrad D_h der untersuchten Proben voneinander. So startete bei der Referenz-Probe eine signifikante Biogasproduktion ab dem sechsten Tag und erreichte ab dem 19. Tag eine kumulierte gebildete Biogasmenge von durchschnittlich 160 mmol pro Liter Probe. Ab dem 19. Tag fand aufgrund von mangelndem Mineralangebot, wie das der essentiellen Spurenelemente Eisen, Nickel, Kobalt, Selen, Molybdän und Wolfram (Aschmann *et al.* 2007), oder anderer hemmenden Bedingungen, wie erhöhte Konzentrationen von Schwefelwasserstoff oder Ammoniumstickstoff (Kaiser *et al.* 2007), keine signifikante Biogasbildung mehr statt und in der Biogas-Kurve wurde eine Plateauphase ersichtlich. Die mittlere Biogasbildungsrate zwischen dem sechsten und 19. Tag betrug 11,6 mmol Biogas pro Liter Probe und Tag. Die Probe des belüfteten Speichers wies mit 15 Tagen eine deutlich längere lag-Phase (Anpassung der Mikroorganismen auf veränderte Milieubedingungen) auf und die

Biogasbildungsrate nach dieser Phase war mit durchschnittlich 4,4 mmol Biogas pro Liter Probe und Tag nur etwa 40% so hoch wie die der Referenz, sodass bis zum Ende des Batch Tests nur 104 mmol Biogas pro Liter Probe gebildet und innerhalb des Untersuchungszeitraumes keine Plateauphase erreicht wurde. Die Probe des mit Antisept 33 behandelten Speichers hatte mit 18 Tagen die längste lag-Phase. Da die Biogasbildungsrate danach jedoch mit 7,6 mmol Biogas pro Liter Probe und Tag etwa 66% so hoch wie die der Referenz war, wurde in diesem Ansatz bis zum Ende des Batch Tests noch etwa 140 mmol Biogas pro Liter Probe produziert, etwa 88% so viel wie bei dem Referenz-Ansatz. Analog der gebildeten Biogasmenge betrug der biologische Abbaugrad D_b im Referenz-Ansatz durchschnittlich 51,2%, bei der Probe des belüfteten Speichers 33,4% und bei der Probe mit Antisept-Behandlung 45%. In Abbildung 5-5b ist die Menge des zu Gas umgesetzten Gesamtkohlenstoffes n_c bzw. der biologische Gesamtabbaugrad D_t der drei Probenarten dargestellt. Dabei traten beim Referenz-Ansatz nur minimale Änderungen auf – die Gesamtkohlenstoffmenge n_c betrug ebenso ca. 160 mmol/L und der biologische Gesamtabbaugrad D_t etwa 51,4%. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die ausgetriebene Kohlenstoffmenge in der Flüssigphase des Batch Tests mit 2 mmol/L sehr gering war. Bei der Probe des belüfteten Speichers ergaben sich eine Gesamtkohlenstoffmenge von 133 mmol/L und ein biologischer Gesamtabbaugrad von 42,7%. Dies entspricht einer Erhöhung von 28% im Vergleich ohne Einbezug des Kohlenstoffgehaltes der Flüssigphase. Bei der Probe mit Antisept-Behandlung wurde insgesamt 146 mmol/L Kohlenstoff umgesetzt und 46,7% des Substrates abgebaut, was einer Steigerung von 4% gleichkommt. Somit war die methanogene Aktivität des Referenz-Ansatzes, keine Behandlung des Speicher 2, am höchsten. Durch Belüftung des Speicher 2 und dem somit stark Sauerstoffgesättigtem Prozesswasser konnte die methanogene Aktivität um etwa 17% reduziert werden. Da durch die kontinuierliche Belüftung des Speicher 2 eine Flockenbildung, vergleichbar den Belebtschlammflocken in Abwasserbehandlungsanlagen (Röske & Uhlmann 2005), beobachtet werden konnte, in denen sich ein Sauerstoffgradient ausbildet (Steinbrenner 2011), wird den anaeroben Mikroorganismen ein Überleben im Inneren der Flocke ermöglicht, sodass sie unter den anaeroben Bedingungen im Batch Test reaktiviert werden konnten. Jedoch weist der erhöhte Kohlenstoffgehalt der Flüssigphase auf einen erhöhten CO_2 -Gehalt hin, da Kohlenstoffdioxid im Gegensatz zu CH_4 gut in wässrigen Flüssigkeiten löslich ist. Somit zeigte das gebildete Biogas eine schlechte Qualität mit einem erhöhten CO_2/CH_4 -Verhältnis. Die desinfizierende Wirkung von Antisept 33 beruht auf einer oxidativen Zerstörung der Zellmembran und der Inaktivierung von für die Mikroorganismen lebenswichtigen Enzymsystemen (Ernst 2005). Zudem wird durch die Zugabe des Wasserstoffperoxid-haltigen Desinfektionsmittels das Redoxpotential des Prozesswassers stark erhöht (teilweise über 300 mV), was einen stark inhibierenden Effekt auf methanogene Mikroorganismen hat. Das optimale Redoxpotential für die Methanogenese liegt unter -250 mV (Weiland 2001). Die methanogene Aktivität wurde hierbei um etwa 9% im Vergleich zur Referenz reduziert. Beide Behandlungsmethoden

beruhen v. a. auf dem Effekt des Sauerstoffeintrages. Die desinfizierende Wirkung von Antisept 33 wird ab einer Konzentration von 0,05 Ma.-% ermöglicht (Ernst 2005), welche methodisch bedingt jedoch nicht immer gegeben war. Bei der kontinuierlichen Belüftung konnte die methanogene Aktivität stärker reduziert werden. Da die Zugabe des Antisept 33 diskontinuierlich erfolgte, dem Speicher 2 jedoch mehr oder minder kontinuierlich unbehandeltes Prozesswasser aus den Methanreaktoren zugeführt wurde, fand scheinbar eine regelmäßige Regeneration der strikt anaeroben Mikroorganismen statt, sodass die Reduktion der methanogenen Aktivität trotz verlängerter Adaptationszeit im Batch Test nur geringen Erfolg zeigte. Weitere Analysen zur Methanunterdrückung in der Hydrolysestufe bzw. Untersuchungen der Beprobungsphase F4 sind im Kapitel 5.3.4 erläutert.

Wie durch den Vergleich der unterschiedlich behandelten Proben ersichtlich, ermöglichen anaerobe Respirationmessungen durchaus die Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Substraten bzw. die Aktivität anaerober Mikroorganismen in Biogasanlagen. Da die Methode jedoch eine Inkubationszeit von mindestens 20 Tagen erfordert und es sich zudem um ein äußerst sensibles Analyseverfahren handelt, dessen korrekte Durchführung ein dafür spezialisiertes Labor voraussetzt, ist sie als Schnelltest nicht geeignet.

Die Analysenergebnisse der Parameter, die eine bessere Eignung zur Kontrolle der Biomassedynamik und der mikrobiellen Aktivität in den untersuchten Vergärungsanlagen zeigten, werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

5.2 Überwachung der Biogasanlage im Normalbetrieb

Wie in Kapitel 5.1 beschrieben, wurde ein vielfältiges Methodenspektrum zur Quantifizierung und Charakterisierung bestimmter Mikroorganismen sowie von Stoffumsatzpotentialen evaluiert und entwickelt. Es wurden verschiedene Testreihen zur Untersuchung der Biogasanlagen im Normalbetrieb ausgewählt und die Ergebnisse und Tendenzen der Analysen im Folgenden erläutert. Die chemischen Analysen zur Untersuchung des Hydrolyseprozesses sind im Anhang A-4 gezeigt und wurden von Gasch und Kollegen (2013) detailliert erläutert.

5.2.1 Analyse der mikrobiellen Biomasse

Im Folgenden werden die Analyseresultate verschiedener Biomasseparameter von Biogasanlagen im Normalbetrieb dargelegt.

5.2.1.1 Trockensubstanz

In der Routineanalyse wurde die Trockensubstanz (TS) sowie die organische Trockensubstanz (oTS) bestimmt, welche einen schnellen Überblick über den Abbaugrad des Substrates liefern (Ott 2001, Wiese & König 2007, Lomborg *et al.* 2009). So konnte bei Normalbetrieb eine kontinuierliche Abnah-

me der (organischen) Trockensubstanz mit der Verweildauer des Substrates in der Hydrolysestufe detektiert werden. Zudem gibt der Quotient oTS/TS den organischen Anteil der Proben wider, welcher letztendlich zur Biogasproduktion genutzt werden kann (Reinhold 2005, Kusch 2007). Die Trockensubstanz dient überdies als Bezugsparameter für alle weiteren Analysenwerte. Zur Analyse der mikrobiellen Biomasse findet dieser Parameter an dieser Stelle jedoch nur indirekt Anwendung. In Abbildung 5-6 sind die Gehalte der Trockensubstanz (TS), der organischen Trockensubstanz (oTS) sowie der Anteil der oTS an der TS von Perkolatorproben von Biogasanlagen im Normalbetrieb (Referenzansätze der Beprobungsphasen C1, F1–5 und P) dargestellt.

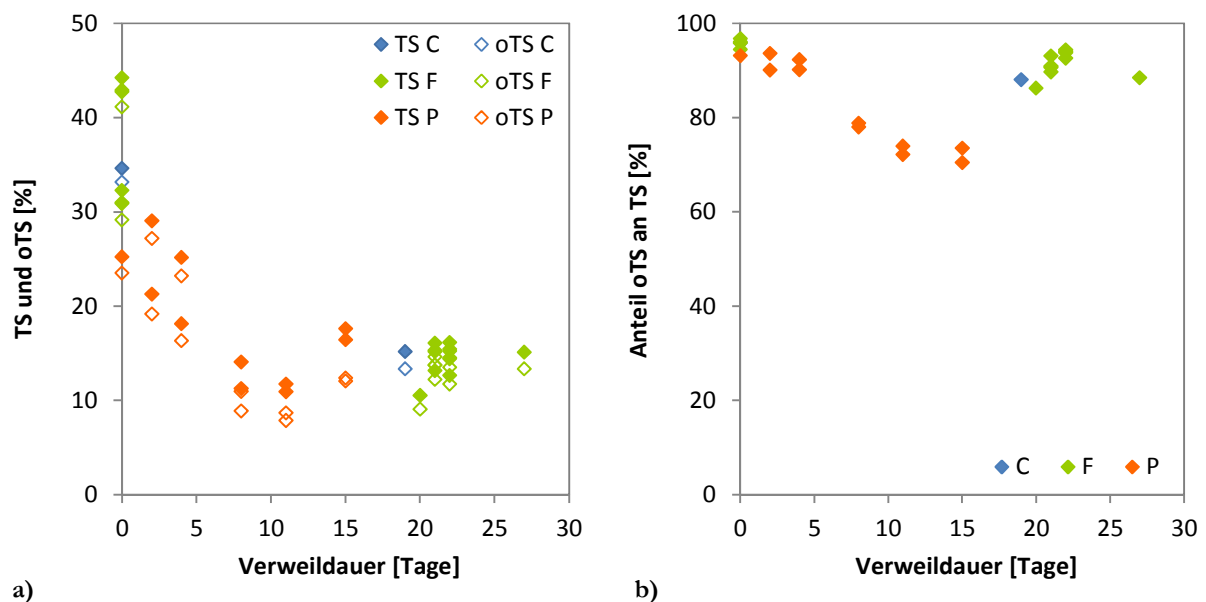


Abbildung 5-6: Trockensubstanz (TS und oTS) der Perkolatorproben im Normalbetrieb

a) TS und oTS über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Perkolatorproben (Substrat) der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, $n = 2$), F1–5 (F = Fassanlage, $n = 14$) und P (= Pilotanlage, $n = 11$)
 b) Anteil der oTS an der TS über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Perkolatorproben (Substrat) der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, $n = 2$), F1–5 (F = Fassanlage, $n = 14$) und P (= Pilotanlage, $n = 11$).

Da aus verfahrenstechnischen als auch mikrobiologischen Gründen ein Eingriff in die Hydrolyse durch Beprobung des Substrates zu vermeiden ist, um bspw. einen Sauerstoffeintrag zu verhindern, wurden bei der Containeranlage (C1) und Fassanlage (F) nur die entsprechenden Ein- und Ausgangsmaterialien analysiert. Wie aus Abbildung 5-6a ersichtlich, nahm im Verlauf der Hydrolyse der TS- sowie der oTS-Gehalt besonders in den ersten zehn Tagen kontinuierlich ab. Dies ist zum einen durch die Perkolation bedingt, durch die das Substrat angefeuchtet wird, veranschaulicht jedoch auch den Substratabbau. Dabei zeigten die Proben aus der Fassanlage und der Pilotanlage eine ähnliche Tendenz. Der TS-Gehalt nahm während der Vergärung durchschnittlich um 50% ab, der oTS-Gehalt um 57%. In Abbildung 5-6b ist der Anteil der oTS an der TS über die Dauer der Hydrolyse veranschaulicht. In der Pilotanlage nahm der oTS-Anteil dabei von 93% im Eingangsmaterial auf 72% im Gärrest um 23% ab. In der

Containeranlage konnte ein Abbau des oTS-Anteils von 8% – von 96% im Eingangsmaterial auf 88% im Gärrest – und in der Fassanlage von durchschnittlich 5% ermittelt werden – von 96% im Eingangsmaterial auf 91% im Gärrest. In der Literatur wird für Maissilage ein oTS-Anteil von etwa 85–97% angegeben (Eggersglüß & Kraschinski 2001, Feng *et al.* 2006). Das hier eingesetzte Substrat lag in diesem Bereich. In verschiedenen Biogasanlagen, die ebenfalls im Perkolationsverfahren betrieben wurden, konnten in den Gärresten ein oTS-Anteil von 72,4%, nach einer Verweildauer von 50 Tagen (Gronauer & Aschmann 2003), bzw. nach einer achttägigen Hydrolyse von noch 92% (Sträuber *et al.* 2012) ermittelt werden. Zur weiteren Analyse sind im Folgenden die TS- und oTS-Gehalte der entsprechenden Ablaufproben der Perkolatoren gezeigt (Abbildung 5-7).

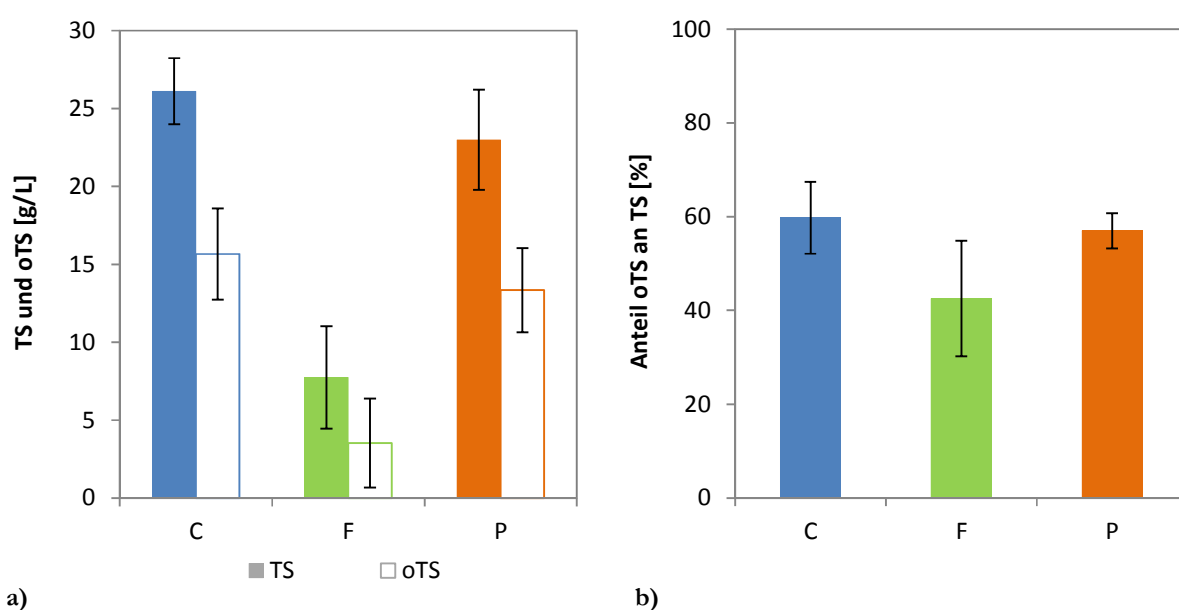


Abbildung 5-7: Trockensubstanz (TS und oTS) der Perkolatorablaufproben im Normalbetrieb

a) Durchschnittliche TS und oTS über die Dauer der Hydrolyse im entsprechenden Perkolator, analysierte Proben: Referenz-Perkolatorablaufproben der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 8), F1–5 (F = Fassanlage, n = 36) und P (= Pilotanlage, n = 8) **b)** Durchschnittlicher Anteil der oTS an der TS über die Dauer der Hydrolyse im entsprechenden Perkolator, analysierte Proben: Referenz-Perkolatorablaufproben der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 8), F1–5 (F = Fassanlage, n = 36) und P (= Pilotanlage, n = 8). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

So wurden während der Vergärung durchschnittlich 19 g/L TS und 11 g/L oTS aus den Perkolatoren gespült (Abbildung 5-7a). Bedingt durch das aufgestaute Prozesswasser im Perkolator sind die TS und oTS-Werte der Proben aus der Fassanlage generell etwas niedriger als die der Container- bzw. Pilotanlage. In Abbildung 5-7b ist der durchschnittliche Anteil der oTS an der TS der Ablaufproben über die Dauer der Hydrolyse dargestellt. Dabei konnte im Gegensatz zur Analyse des oTS-Abbaus der Substratproben (Abbildung 5-6b) der höchste Wert, mit einem durchschnittlichen oTS-Anteil von 60%, bei der Containeranlage ermittelt werden. Bei der Fassanlage wurde während der Vergärung des Substrates Hydrolysat mit durchschnittlich 43% oTS/TS aus dem Perkolator gespült. In der Pilotanlage betrug der oTS-Anteil im Mittel 57%. Diese Organik stand der folgenden Methanstufe zur Verfügung. Das Pro-

zesswasser nach der Methanstufe bzw. der Zulauf der Hydrolysestufe hatte einen durchschnittlichen TS-Gehalt von 24 g/L (Containeranlage), 6 g/L (Fassanlage) bzw. 17 g/L (Pilotanlage). Der durchschnittliche oTS-Gehalt des Speicher 2 der Containeranlage betrug 13 g/L, der der Fassanlage 2 g/L und der der Pilotanlage 8 g/L (Abbildung 5-8a). Dies weist auf einen weiteren TS- und oTS-Abbau in der Methanstufe hin. So war auch der oTS-Anteil nach der Methanstufe mit 53% (C), 30% (F) bzw. 44% (P) um 6% (C), 12% (F) bzw. 13% (P) geringer als vor der Methanstufe (Abbildung 5-8b).

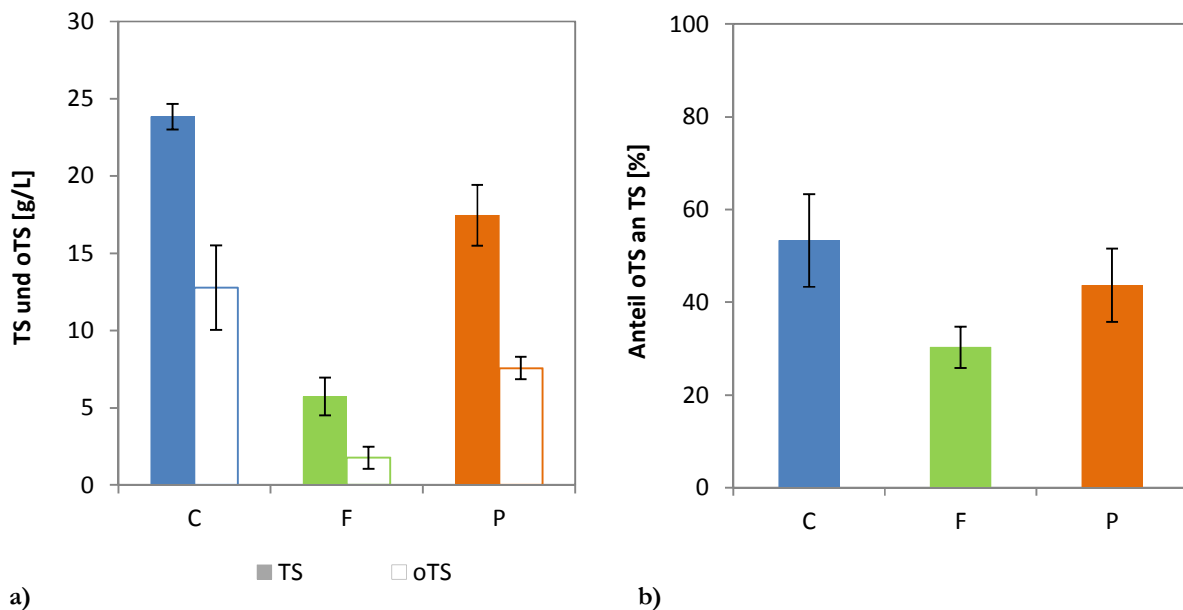


Abbildung 5-8: Trockensubstanz (TS und oTS) des Speicher 2 im Normalbetrieb

a) Durchschnittliche TS- und oTS-Gehalte des Speicher 2, analysierte Proben: Referenzproben des Speicher 2 der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 4), F1–5 (F = Fassanlage, n = 27) und P (= Pilotanlage, n = 4)
b) Anteil der oTS an der TS des Speicher 2, analysierte Proben: Referenzproben des Speicher 2 der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 4), F1–5 (F = Fassanlage, n = 27) und P (= Pilotanlage, n = 4). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Es ist daher davon auszugehen, dass bei den untersuchten Anlagen die entsprechenden oTS-Anteile in der Methanstufe zur Biogasbildung beigetragen haben. In der Literatur werden in ähnlichen Biogasanlagen für das Prozesswasser oTS-Anteile von durchschnittlich 61,3% (Linke *et al.* 2007) bzw. zwischen 39 und 49% (Gronauer & Aschmann 2003) beschrieben. Der Austrag der oTS aus dem Substrat ist sehr stark vom Rücklaufverhältnis und somit von der theoretischen Verweilzeit der Flüssigkeit in der Hydrolyse abhängig. Bei einer niedrigen mittleren hydraulischen Verweilzeit in der Hydrolyse (wenige Stunden) wird ein hoher Anteil der Feststoffe unversäuert ausgetragen, sodass zwar ein hoher oTS-Anteil der Methanstufe zugeführt wird, dieser aber noch weitgehend unaufgeschlossen ist und womöglich ungenutzt die Methanstufe durchläuft. Bei hohen hydraulischen Verweilzeiten (mehrere Tage) ist der oTS-Austrag dementsprechend deutlich geringer (Sieber 2012). Da in der hier analysierten Beprobungsphase der Containeranlage erhöhte Werte für den oTS-Anteil des Hydrolysats ermittelt werden konnten (60%), jedoch nur ein geringer Teil hiervon in der Methanstufe weiter abgebaut wurde (6%),

besteht die Möglichkeit, dass in diesem Fall die hydraulische Verweilzeit in der Hydrolyse zu gering war. Da die flüchtigen organischen Stoffe (organische Säuren und Alkohole) bei der klassischen oTS-Bestimmung jedoch nicht miterfasst werden und die Analyse zudem sowohl sehr gut biologisch abbaubare Stoffe als auch biologisch nicht abbaubare Stoffe einbezieht, lässt der oTS-Anteil im Prozesswasser alleine keine Aussage über die Effizienz der Hydrolyse bzw. der Methanogenese zu (Sieber 2012).

5.2.1.2 Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) ist in vielen Habitaten eine etablierte Methode zur Charakterisierung mikrobieller Biozönosen. Hierzu werden die Zellen meist mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und mikroskopisch analysiert (Knorr & Schell 1997, Cypionka 2010). Sie dient auch bei der Untersuchung von Einflüssen auf mikrobielle Lebensgemeinschaften in Biogasanlagen als Biomasseparameter (Bengelsdorf 2011, Rademacher *et al.* 2012a). In Abbildung 5-9 sind die Gesamtzellzahlen von Perkolator- und Prozesswasserproben von Biogasanlagen im Normalbetrieb (Referenzansätze der Beprobungsphasen C1, F1–5 und P) veranschaulicht.

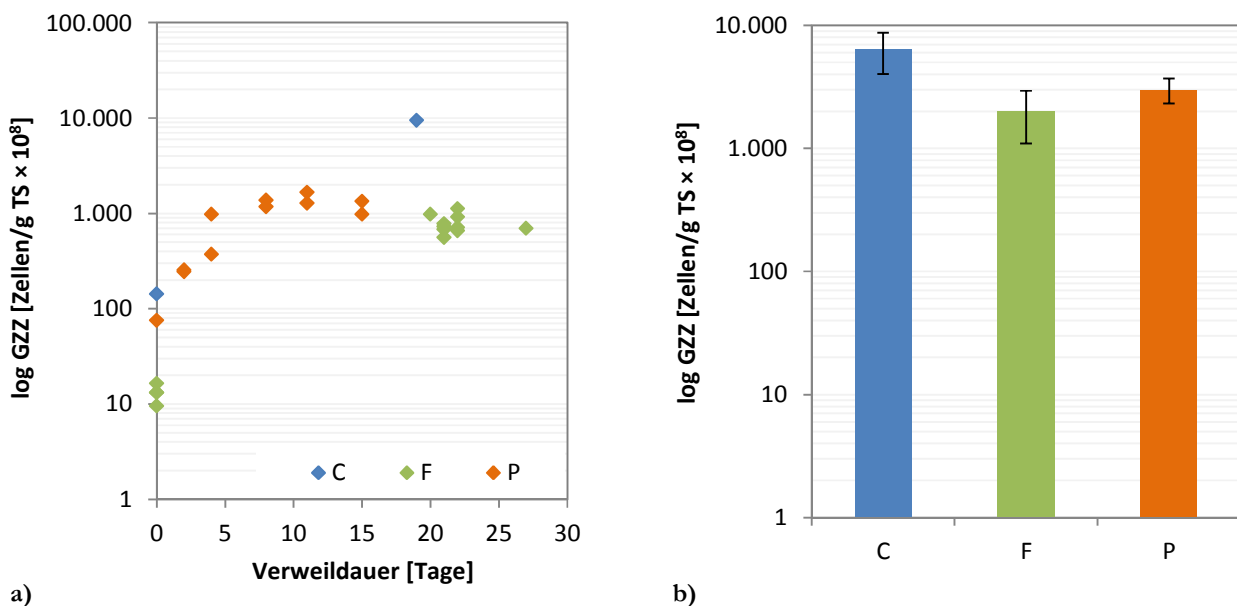


Abbildung 5-9: Gesamtzellzahl im Normalbetrieb

a) Gesamtzellzahlen (GZZ) der Perkolatorproben über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Proben (Substrat) der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 2), F1–5 (F = Fassanlage, n = 14) und P (= Pilotanlage, n = 11) **b)** Gesamtzellzahlen von Prozesswasserproben (Ablauf Perkolator, Sp 1 und Sp 2), analysierte Proben: Referenz-Proben der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 8), F1–5 (F = Fassanlage, n = 60) und P (= Pilotanlage, n = 12). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen. Logarithmische Skalierung der y-Achse.

Die GZZ der Mikroorganismen der Perkolatorproben nahm bei der Fass- und Pilotanlage von Tag Null (Befüllung des Perkolators) bis zur Entleerung des Perkolators von im Mittel $4,4 \times 10^9$ Zellen/g TS auf $9,7 \times 10^{10}$ Zellen/g TS um durchschnittlich das 22-fache zu. Dabei war innerhalb der ersten fünf Tage das stärkste Wachstum zu verzeichnen (vgl. Abbildung 5-9a), was u. a. durch die stetige Inokulati-

on des Festbettreaktors durch das Prozesswasser bedingt ist. Bei der Containeranlage ist eine stärkere Zunahme der GZZ zu verzeichnen, von $1,4 \times 10^{10}$ Zellen/g TS auf $9,5 \times 10^{11}$ Zellen/g TS. Die großen Differenzen in der GZZ des Eingangsmaterials (Tag Null) sind dabei v. a. auf die unterschiedlichen Silage-Chargen (Erntezeitpunkt, Silagealter und andere Qualitätsmerkmale) zurückzuführen (Kaltschmitt *et al.* 2001, Herrmann *et al.* 2007). Auf diesen Zusammenhang wird in Kapitel 5.6 detaillierter eingegangen. Aufgrund der hohen Zellzahl des Eingangsmaterials des Containerversuches konnte so bis zum Ende der Hydrolyse ein mikrobielles Wachstum um das 66-fache detektiert werden.

Die GZZ der Prozesswasserproben (Abbildung 5-9b) schwankten abhängig vom Anlagentyp um durchschnittlich $6,4 \times 10^{11}$ Zellen/g TS ($\triangleq 1,6 \times 10^{10}$ Zellen/mL) in der Containeranlage, 2×10^{11} Zellen/g TS ($\triangleq 1,4 \times 10^9$ Zellen/mL) in der Fasanlage und 3×10^{11} Zellen/g TS ($\triangleq 6,2 \times 10^9$ Zellen/mL) in der Pilotanlage. Dies ist vergleichbar mit den ermittelten Zellzahlen untersuchter Biogasanlagen bzw. Fermenter anderer Studien. So bestimmte Bengelsdorf (2011) in einer mehrstufigen Biogasanlage durchschnittlich $1,46 \times 10^{10}$ Zellen/mL. Nettmann und Kollegen (2010) wiesen in sechs verschiedenen Biogasanlagen Gesamtzellzahlen im Bereich von 10^8 Zellen/mL nach und Krakat und Kollegen (2010) detektierten in einem 6 L-Laborreaktor im Mittel $3,2 \times 10^{10}$ Zellen/mL Reaktorinhalt. Demirel und Kollegen (2009) konnten in einem anaerob betriebenen Fermenter im Labormaßstab über eine mehrmonatige Untersuchungsphase hinweg GZZ von durchschnittlich $2,3 \times 10^{10}$ Zellen/mL detektieren. Dies weist darauf hin, dass die Prozessflüssigkeit von Biogasanlagen im Normalbetrieb über eine anlagen- und/oder substratspezifische GZZ verfügt. Zudem kann durch die Bestimmung der GZZ die Biomassedynamik der Substratproben analysiert werden, sodass sich diese Methode bei den Untersuchungen als sensitiver Parameter erwiesen hat.

5.2.1.3 Quantifizierung von Mikroorganismen *in situ*

Zur detaillierteren Analyse der mikrobiellen Biomasse diente die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Mittels dieser Methode können Zellen einzelner Mikroorganismengruppen detektiert und quantifiziert werden. Da die ersten drei Phasen des Biogasprozesses von Vertretern der Bacteria und die letzte Phase von methanogenen Archaeen dominiert werden (Bauer *et al.* 2009), erfolgte zunächst eine grobe funktionelle Unterscheidung der mikrobiellen Gruppen in Bacteria und Archaea. Einzelne Proben wurden differenzierter analysiert und es erfolgte eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Cellulose-abbauenden bakteriellen Gruppen – der *Acetivibrio* Gruppe, den Pseudomonadaceae, der *Clostridium* Gruppe und den Bacteroidetes – deren Vorkommen und Funktion schon in diversen Studien nachgewiesen wurden (Cirne *et al.* 2007, O’Sullivan *et al.* 2007, Doi 2008, Li *et al.* 2009, Hung *et al.* 2011). Zudem fand eine Differenzierung zwischen den vier abundantesten methanogenen Gruppen statt. So wurden mittels FISH Vertreter der Methanobacteriaceae, der Methanococcaceae, der

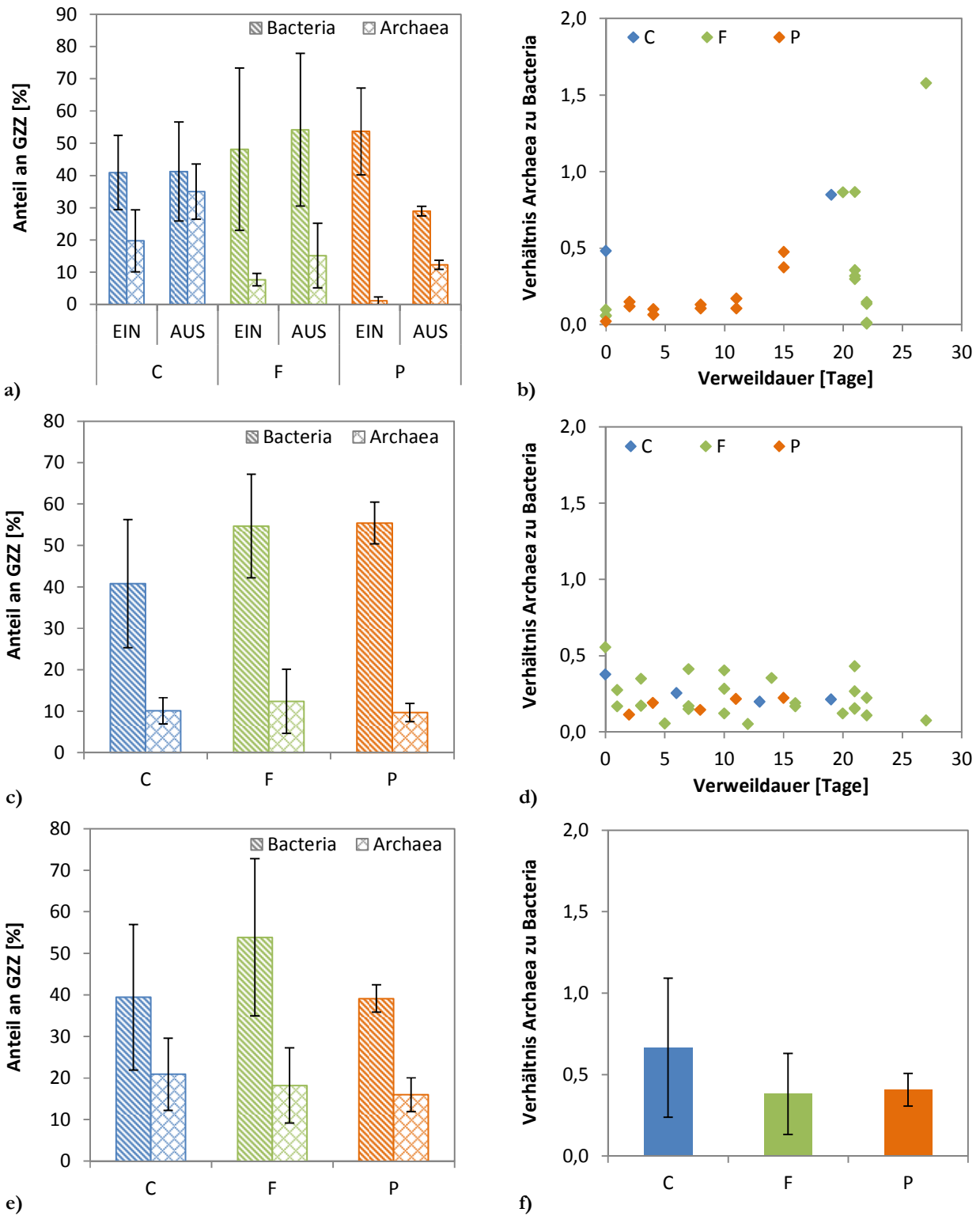


Abbildung 5-10: Anteile der Bacteria und Archaea im Normalbetrieb

a) Anteile der Bacteria und Archaea an der GZZ von Perkolatorproben (EIN = Eingangsmaterial, AUS = Ausgangsmaterial) und **b)** Verhältnis Archaea zu Bacteria von Perkolatorproben über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Proben (Substrat) der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 2), F1–5 (F = Fassanlage, n = 13) und P (= Pilotanlage, n = 11). **c)** Anteile der Bacteria und Archaea an der GZZ von Perkolatorablaufproben und **d)** Verhältnis Archaea zu Bacteria von Perkolatorablaufproben über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Proben der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 4), F1–5 (F = Fassanlage, n = 25) und P (= Pilotanlage, n = 5). **e)** Anteile der Bacteria und Archaea an der GZZ von Prozesswasserproben (Speicher 2) und **f)** Verhältnis Archaea zu Bacteria von Prozesswasserproben (Speicher 2), analysierte Proben: Referenz-Proben der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 4), F1–5 (F = Fassanlage, n = 25) und P (= Pilotanlage, n = 4). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Methanomicrobiales und der Methanosarcinales detektiert, welche nachweislich bei der Biogasbildung beteiligt sind (Bauer et al. 2009, Kaparaju et al. 2009).

In Abbildung 5-10 sind die Anteile der Bacteria und Archaea an der GZZ von Perkolator- und Prozesswasserproben von Biogasanlagen im Normalbetrieb (Referenzansätze der Beprobungsphasen C1, F1–5 und P) dargestellt. Im Perkolator lag der mittlere Anteil der Bacteria bei 48% im Substrat (Eingangsmaterial) und 41% im Gärrest (Ausgangsmaterial). Der Anteil der Archaeen nahm im Laufe der Hydrolyse um durchschnittlich 11% zu, von 9% im Eingangsmaterial auf 21% im Ausgangsmaterial (Abbildung 5-10a). Dies wird in Abbildung 5-10b eingehender verdeutlicht. So lag das Verhältnis der Archaea zu den Bacteria gegen Ende der Verweildauer bei teilweise über 1, d. h. der Anteil der Archaea überstieg den der Bacteria. Dies weist auf einen weit fortgeschrittenen Abbau hin, sodass Bedingungen vorherrschen, die eine Ansiedlung methanogener Archaeen ermöglichen. Zwischen den verschiedenen Biogasanlagentypen sind tendenziell keine signifikanten Unterschiede in den Zellzahlen der Bacteria und Archaea zu verzeichnen, mit Ausnahme des Ausgangsmaterials der Pilotanlage. Dieses wies mit im Mittel 29% einen besonders geringen Anteil an Bacteria auf, was womöglich auf die verkürzte Verweildauer des Substrates im Perkolator von 15 Tagen zurückzuführen ist. Der Anteil der Bacteria im Ablauf der Perkolatoren lag mit durchschnittlich 53% leicht über dem der Perkolatorproben. Der Anteil der Archaeen betrug im Mittel 12% und lies keinen Anstieg zum Ende der Hydrolyse erkennen (Abbildung 5-10c). So lag das Verhältnis der Archaea zu Bacteria stets weit unter 1, im Mittel bei 0,22 (Abbildung 5-10d). Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anlagentypen zu erkennen. Ähnliche mikrobielle Anteile konnten auch Li und Kollegen (2011) ermitteln. In der ersten Stufe eines zweiphasigen UASB-Reaktors haben sie Bacteria-Anteile von 68% und Archaea-Anteile von 28% detektiert, was einem Archaea:Bacteria-Verhältnis von etwa 0,4 entspricht. Vergleichbare Werte wurden im Speicher 2 ermittelt. Hier lag der durchschnittliche Anteil der Bacteria bei 50%. Der Anteil der Archaea wies mit im Mittel 18% leicht erhöhte Werte im Vergleich zum Prozesswasser vor der Methanstufe auf. Das Verhältnis der Archaea zu Bacteria mit 0,4 lässt jedoch darauf schließen, dass der Großteil der Methanogenen wie angestrebt auf den Füllkörpern der Methanstufe immobilisiert blieb. Auch die Proben der Speicher 2 zeigten eine vergleichbare mikrobielle Zusammensetzung unabhängig vom Anlagentyp.

Die Hydrolysestufe der Pilotanlage wurde hinsichtlich der Abundanz Cellulose-abbauender Mikroorganismen detaillierter untersucht. In Abbildung 5-11 sind die Anteile der detektierten mikrobiellen Gruppen an der GZZ von Perkolator- und Hydrolysatproben der Pilotanlage im Normalbetrieb gezeigt.

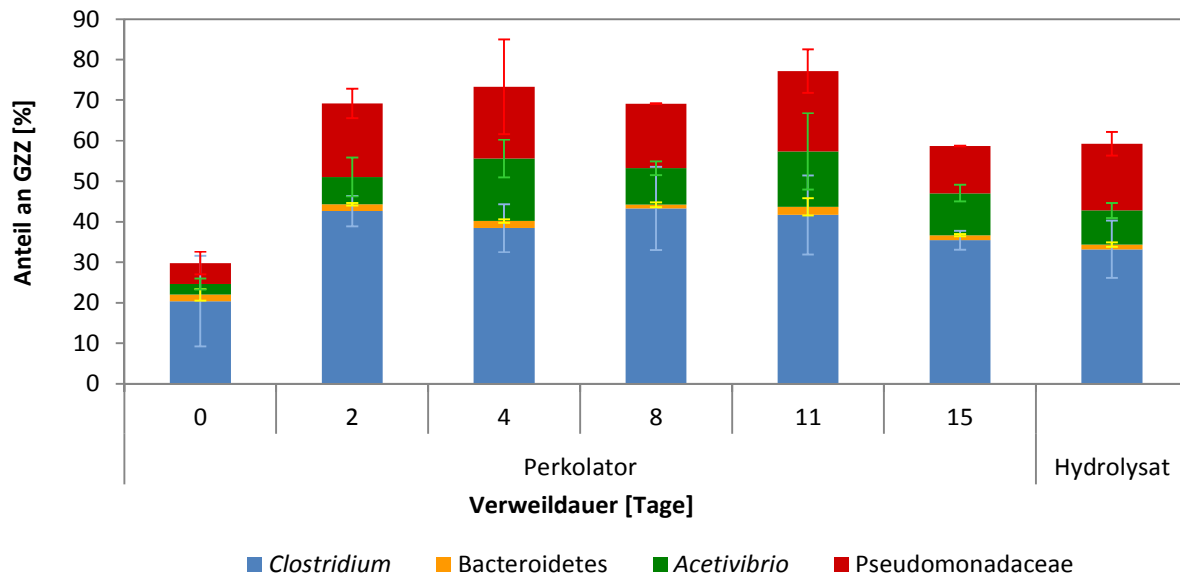


Abbildung 5-11: Anteile Cellulose-abbauender Mikroorganismen im Normalbetrieb

Anteile von Vertretern der *Clostridium* Gruppe, der Bacteroidetes, der *Acetivibrio* Gruppe und Pseudomonadaceae an der GZZ von Perkolatorproben über die Dauer der Hydrolyse und die gemittelten Werte von Hydrolysatproben (Perkolatorablauf und Sp 1), analysierte Proben: Perkolatorproben (Substrat, n = 11) und Hydrolysatproben (n = 8) der Beprobungsphase P (= Pilotanlage). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Die *Clostridium* Gruppe nahm mit durchschnittlich 37% bei den Perkolatorproben und 33% im Hydrolysat den größten Anteil ein. Darauf folgten Vertreter der Pseudomonadaceae mit 15% im Perkolator und 16% im Hydrolysat und die *Acetivibrio* Gruppe mit 10% auf dem Feststoff und 8% im Prozesswasser. Der Anteil der Bacteroidetes war mit durchschnittlich 2% (Perkolatorprobe) bzw. 1% (Hydrolysat) sehr gering. Nach Beginn der Hydrolyse nahm die Abundanz der analysierten Gruppen zu, von anfänglich 30% im Eingangsmaterial auf durchschnittlich 69%, die Verteilung der einzelnen Gruppen änderte sich jedoch wenig. So spiegelt die mikrobielle Zusammensetzung des Hydrolysats recht gut jene der Perkolatorproben wider (Abbildung 5-11). Da verschiedene Spezies von Clostridien in den ersten drei Phasen der Biogasbildung involviert sind (Aschmann *et al.* 2007, Cirne *et al.* 2007), ist die hohe Abundanz dieser Gattung in Biogasanlagen nicht überraschend. So konnten ähnlich hohe Anteile an Clostridien auch in anderen Untersuchungen von Biogasanlagen festgestellt werden, wie etwa in einer Studie von Kröber und Kollegen (2009), die nach einer Metagenom Sequenzanalyse einer großtechnischen Anlage die Mehrheit der analysierten Sequenzen den Clostridia zuordneten. Burrell und Kollegen (2004) konnten mittels FISH zeigen, dass es sich beim Großteil der Bacteria auf den Oberflächen von Cellulosepartikeln um Clostridien handelt und schlossen daraus, dass sie womöglich die Schlüsselorganismen für die Cellulolyse in Bioreaktoren darstellen. Obwohl Vertreter der Pseudomonadaceae zu den aeroben Nichtfermentierern zählen, wurden sie mehrfach auch in anderen Studien in anaeroben Fermentern detektiert (Chanakya & Malayil 2012, Nelson *et al.* 2012, Ziemiński & Frąc 2012). Li und Kollegen (2009) vermuten darüber hinaus, dass bestimmte Vertreter der Pseudomonadaceae eine wichtige Rolle beim Acetatabbau einnehmen könnten. Der relativ hohe Anteil dieser Gruppe in diesen

Proben ist womöglich auch durch die offene Fahrweise der Perkolatoren bedingt, die einen Sauerstoffeintrag ermöglicht. *Acetivibrio* zählt ebenso zu den häufigst vertretenen Cellulose-abbauenden Mikroorganismen in Biogasanlagen (Cirne *et al.* 2007, Li *et al.* 2009). In einer Analyse aller veröffentlichten Sequenzen von Mikroorganismen, die weltweit in anaeroben Reaktoren detektiert wurden, dominiert die Gattung *Acetivibrio* sogar in der Klasse der Clostridia (Nelson 2011). Vertreter der Bacteroidetes wurden auch häufig in Biogasanlagen nachgewiesen. Dies liegt vermutlich unter anderem daran, dass sie darauf spezialisiert sind komplexe organische Materialien, v. a. Proteine und Polysaccharide, abzubauen. Da sie als Gruppe vielfältige Biopolymere als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können, reagieren sie sehr unempfindlich auf Änderungen im Substratangebot (Thomas *et al.* 2011, Kampmann *et al.* 2012). In dieser Studie nahmen sie jedoch nur eine untergeordnete Rolle ein.

In den Perkolatoren und im Prozesswasser wurde bei Normalbetrieb nur ein relativ geringer Anteil an Archaeen detektiert (durchschnittlich 12%, vgl. Abbildung 5-10). Exemplarisch wurde daher das Prozesswasser der Speicher 2, mit einem leicht erhöhten Gehalt an Archaeen, detaillierter hinsichtlich der methanogenen Biozönose untersucht (Abbildung 5-12).

Den größten Anteil an methanogenen Archaeen nahmen Vertreter der Methanosarcinales mit durchschnittlich 6% ein. Die Methanobacteriaceae, Methanococcaceae und Methanomicrobiales waren jeweils mit einem Anteil von etwa 3% vertreten. Vertreter der Methanosarcinales nutzen in Biogasanlagen hauptsächlich Acetat als Kohlenstoffquelle, weshalb die Gruppe als größtenteils acetoklastisch anzusehen ist. Die anderen drei untersuchten Gruppen hingegen verwerten v. a. Wasserstoff, Kohlenstoffdioxid und Formiat und zählen somit zu den hydrogenotrophen Methanogenen (Raskin *et al.* 1994, Karakashev *et al.* 2005). Somit wurden in dieser Studie im Prozesswasser etwa 9% hydrogenotrophe und 6% acetoklastische Methanogene detektiert, was nahe legt, dass in den untersuchten Biogasanlagen der hydrogenotrophe Methanbildungsweg leicht favorisiert wird. Dabei wiesen die mit der MSMX860-Sonde hybridisierten Zellen, welche spezifisch für Methanosarcinales ist, zum überwiegenden Teil eine Stäbchenform auf und sind deshalb den *Methanosaeta* zuzuordnen (Kendall & Boone 2006). Ihre Dominanz gegenüber morphologisch andersartiger Vertreter der Methanosarcinales, wie etwa *Methanosarcina*, lässt auf eine niedrige Acetat-Konzentration im System schließen, da *Methanosaeta* nur unter diesen Bedingungen einen Konkurrenzvorteil besitzen. Zur genauen Verifizierung der Verteilung von *Methanosaeta* und *Methanosarcina* im System wären jedoch weitere Analysen mit gattungsspezifischen FISH-Sonden nötig, wie etwa MX825 für *Methanosaeta* und MS821 für *Methanosarcina* (Raskin *et al.* 1994). Eine eingehendere Betrachtung der methanogenen Biozönose in der Methanstufe der untersuchten Anlagen ist in Kapitel 5.5 zu finden.

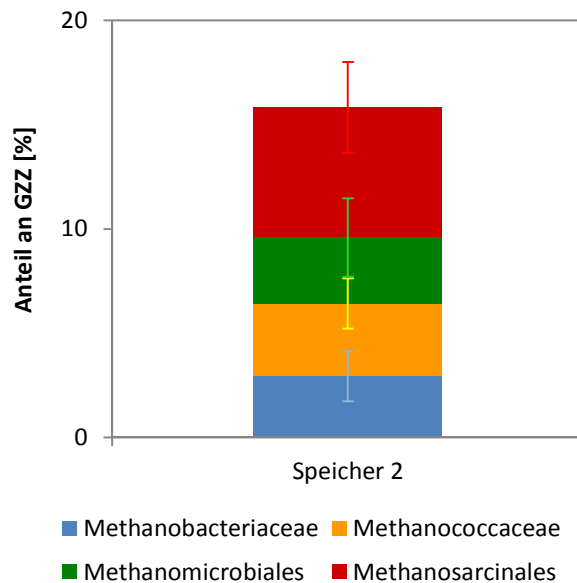


Abbildung 5-12: Anteile methanogener Archaeen im Speicher 2 bei Normalbetrieb

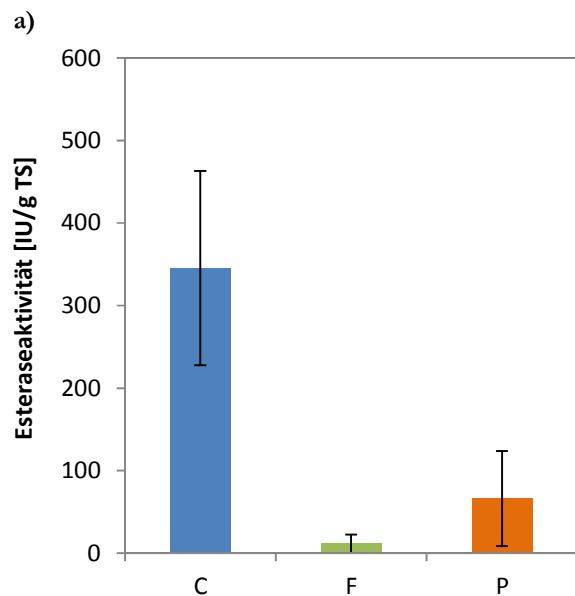
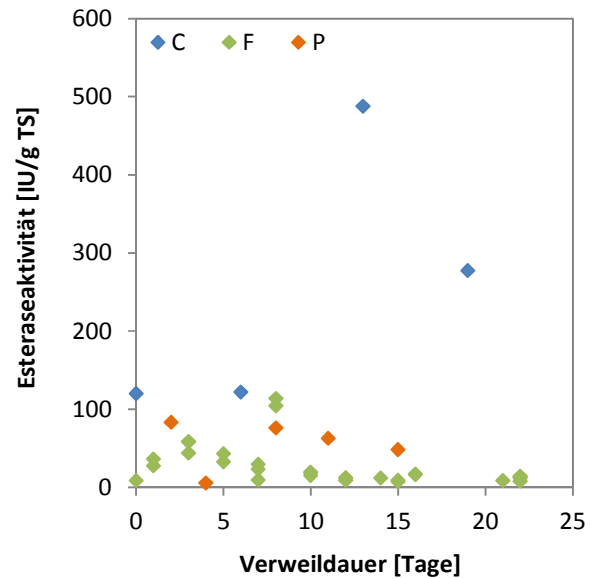
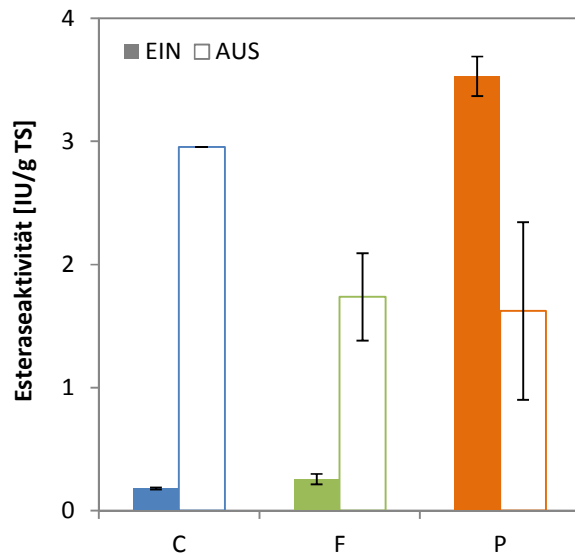
Durchschnittliche Anteile von Vertretern der Methanobacteriaceae, der Methanococcaceae, der Methanomicrobiales und der Methanosarcinales an der GZZ, analysierte Proben: Prozesswasserproben (Sp 2) der Beprobungsphasen F3–4 (F = Fasanlage, n = 5) und P (= Pilotanlage, n = 3). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

5.2.2 Analyse mikrobieller Aktivität und Funktionspotentiale

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse zur Analyse der Aktivität von Mikroorganismen von Biogasanlagen im Normalbetrieb beschrieben.

5.2.2.1 Allgemeine heterotrophe Abbauaktivität

Zur Analyse der heterotrophen Abbauaktivität in biologischen Systemen hat sich in der Praxis, insbesondere der Abwasseranalytik, die Bestimmung der Esteraseaktivität bewährt. Neben Untersuchungen anderer ubiquitärer mikrobieller Enzyme, wie die der Phosphatase und Dehydrogenase, stellt sie eine schnelle und sensitive Methode zur Analyse der allgemeinen mikrobiellen Aktivität dar (Schnürer & Rosswall 1982, Valarini *et al.* 2003). In der Routineanalyse zur Überwachung von Biogasanlagen findet diese Methode jedoch bislang noch keine Anwendung. In Abbildung 5-13 ist die Esteraseaktivität von Perkolator- und Prozesswasserproben von Biogasanlagen im Normalbetrieb (Referenzansätze der Beprobungsphasen C1, F3–5 und P) veranschaulicht.



b)

Abbildung 5-13: Esteraseaktivität im Normalbetrieb

a) Esteraseaktivität von Perkolatorproben (EIN = Eingangsmaterial, AUS = Ausgangsmaterial), analysierte Proben: Referenz-Proben (Substrat) der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 2), F3–5 (F = Fassanlage, n = 8) und P (= Pilotanlage, n = 11) **b)** Esteraseaktivität von Perkolatorablaufproben über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Proben der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 4), F3–5 (F = Fassanlage, n = 28) und P (= Pilotanlage, n = 5) **c)** Durchschnittliche Esteraseaktivität von Prozesswasserproben (Speicher 1 und 2), analysierte Proben: Referenz-Proben der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 4), F3–5 (F = Fassanlage, n = 26) und P (= Pilotanlage, n = 7). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

c)

Die Enzymaktivität des Eingangsmaterials ist stark von der Silagequalität abhängig. Bei einer qualitativ hochwertigen Silage ist die mikrobielle Aktivität durch Selbstinhibierung der Mikroorganismen auf ein Mindestmaß reduziert (Kaltschmitt *et al.* 2001, Hertwig 2006). Bei schlechter Lagerung jedoch, wenn die Silage unzureichend verdichtet ist bzw. mit Sauerstoff in Kontakt kommt, kann es zur Vermehrung von Fäulnisbakterien, Schimmelpilzen und Hefen kommen und die Enzymaktivität weist erhöhte Werte auf (Schroeder 2004, Reeker *et al.* 2008). In dieser Studie zeigten vier von fünf frischen Maissilagen, die der Container- und Fassversuche, eine Esteraseaktivität von durchschnittlich 0,2 IU/g TS und eine Erhöhung der Aktivität um über das Achtfache im Gärrest (\bar{O} 1,9 IU/g TS). So führten die Reaktivierung der Mikroorganismen im Eingangsmaterial sowie die Inokulation durch das Prozesswasser zum Abbau des Substrates. Die Charge der Maissilage, die bei der Hydrolyse der Pilotanlage eingesetzt wurde, wies mit 3,5 IU/g TS einen stark erhöhten Wert auf, was ein Indiz für eine schlechte Lagerung darstellt. So betrug in diesem Versuch die Esteraseaktivität des Gärrestes nur noch etwa die Hälfte der

des Eingangsmaterials (\emptyset 1,6 IU/g TS, vgl. Abbildung 5-13a). Dies deutet darauf hin, dass die verwendete Silage insgesamt einen reduzierten Energiegehalt aufwies. So war auch im Ablauf des entsprechenden Perkolators eine Abnahme der Esteraseaktivität mit der Zeit zu verzeichnen, von 83 auf 48 IU/g TS (Abbildung 5-13b, P). Im Gegensatz dazu zeigten die Proben der Container- und der Fassanlage ihre maximale Esteraseaktivität erst später im Laufe der Hydrolyse, bei den Fassversuchen im Mittel am vierten Tag mit durchschnittlich 76 IU/g TS und bei den Containerversuchen am 13. Tag mit durchschnittlich 487 IU/g TS (Abbildung 5-13b, C und F). Damit wiesen die Proben der Containeranlage über sechsfach höhere Esteraseaktivitäten auf. Bei der Analyse der Prozesswasserproben (Speicher 1 und 2) zeigte sich ein ähnlicher Unterschied zwischen den untersuchten Anlagen. So lag die mittlere Esteraseaktivität der Proben der Containeranlage mit 345 IU/g TS deutlich über der der Fassanlage mit durchschnittlich 11 IU/g TS und der Pilotanlage mit 66 IU/g TS (Abbildung 5-13c). Eine ähnliche Tendenz zeigte sich schon bei der Bestimmung der GZZ (vgl. Abbildung 5-9b, Seite 78). Auch hier wiesen die Proben aus der Fassanlage die geringsten Messwerte auf. Dies könnte an der kleinen Reaktorgröße und/oder an der leicht veränderten Verfahrensführung, aufgestautes Prozesswasser im Perkolator und fehlender Rücklauf des Perkolatorablaufes, liegen. Die vergleichsweise geringe GZZ und Esteraseaktivität der Proben der Pilotanlage können womöglich, wie erwähnt, durch einen reduzierten Energiegehalt des eingesetzten Substrates und ein daraus resultierendes vermindertes Wachstum und eine verringerte Aktivität der Mikroorganismen erklärt werden. Im Vergleich zu anderen verfahrenstechnischen Anlagen zum Abbau organischer Stoffe, wie Kläranlagen oder Anlagen zur Schlammstabilisierung, zeigten die hier untersuchten Biogasanlagen eine vielfach höhere Esteraseaktivität. So wurden in verschiedenen Studien zur mikrobiellen Aktivität im Belebtschlamm von Kläranlagen Werte zwischen 0,03 und 0,33 mmol/(g TS×h) detektiert (Nybroe *et al.* 1992, Frølund *et al.* 1995, Steinbrenner 2011). In dieser Studie betrug die mittlere Esteraseaktivität des Prozesswassers mit 3,6 mmol/(g TS×h) das Zehn- bis Hundertfache. Dagegen ermittelten Oviedo sowie Sanchez und Kollegen in Untersuchungen zur aeroben Stabilisierung von Klärschlamm mikrobielle Aktivitäten zwischen 5 und 35 IU/g TS (Oviedo *et al.* 2005, Sánchez *et al.* 2006), was vergleichbar zu den Messwerten der Fassanlage in dieser Studie ist. Da die mikrobielle Aktivität eng mit dem vorhandenen Substratangebot gekoppelt ist, gibt sie auch Hinweise auf den Abbaugrad des Substrates bzw. die Menge an ausgespülten organischen Kohlenstoffverbindungen aus dem Substrat. Diese können bspw. über den CSB des Prozesswassers bestimmt werden. Dabei ist der CSB der Sauerstoffbedarf, der für die chemische Umwandlung der organischen Kohlenstoffverbindungen erforderlich ist. In dieser Studie lag er im Mittel bei etwa 13.000 mg O₂/L im Prozesswasser vor der Methanstufe (vgl. Anhang A-4) und bei etwa 7.000 mg O₂/L nach der Methanstufe und damit ebenso um ein Vielfaches höher als in Prozesswasserproben von Kläranlagen. Steinbrenner ermittelte z. B. CSB-Werte von 261 bis 570 mg O₂/L in Zulauf-

proben und 23 bis 59 mg O₂/L in Ablaufproben kommunaler Kläranlagen (Steinbrenner 2011). Das entspricht etwa 2% des durchschnittlichen CSB in dieser Studie.

5.2.2.2 Spezifische Hydrolaseaktivitäten

Zur Analyse mikrobieller Abbauaktivitäten in der Hydrolysestufe können Hydrolyseraten verschiedener spezifischer Hydrolasen ermittelt werden. Aufgrund der energiereichen Inhaltsstoffe von Pflanzensilage, größtenteils Zucker und Eiweiße, sind dabei u. a. die Protein- und Polysaccharid-abbauenden Hydrolasen von besonderem Interesse.

In Abbildung 5-14 sind die durchschnittlichen Hydrolaseaktivitäten entsprechender Enzyme von Perkolatorproben von Biogasanlagen im Normalbetrieb (Referenzansätze der Beprobungsphasen C1, F3–5 und P) dargestellt. Da Maissilage einen mittleren Proteingehalt zwischen 7 und 10% an der TS aufweist (Beckmann & Kolbe 2002, Kolbe *et al.* 2006, Schieder *et al.* 2010) stellt u. a. die Proteolyse einen wichtigen Schritt im anaeroben Abbau dar. Dabei zählen Proteine zu den recht schnell hydrolysierbaren Komponenten (Lehtomäki *et al.* 2008) mit einer relativ hohen theoretischen Methanausbeute von etwa 477 L/kg oTS (Eder *et al.* 2009).

In dieser Studie nahm die allgemeine Proteaseaktivität im Perkolator zunächst von durchschnittlich 78 IU/g TS im Eingangsmaterial auf etwa 8 IU/g TS in den ersten zehn Tagen ab. Gegen Ende der Hydrolyse nahm sie erneut bis auf durchschnittlich 47 IU/g TS im Gärrest zu (Abbildung 5-14a). So war in den ersten Tagen die Hydrolyse der gut zugänglichen und leicht abbaubaren Proteine möglich und gegen Ende der Hydrolysedauer konnten auch die schwer zugänglicheren Proteine der pflanzlichen Zellwand abgebaut werden. Ferner könnte die erhöhte Proteaseaktivität gegen Ende der Hydrolyse auf den Abbau toter mikrobieller Zellen zurückzuführen sein (Parawira *et al.* 2005). Die Aktivität der Alanin-Aminopeptidase verhielt sich entgegengesetzt hierzu. Sie nahm von im Mittel 16 IU/g TS im Eingangsmaterial auf durchschnittlich 29 IU/g TS zwischen dem vierten und vierzehnten Tag zu und sank dann im Gärrest auf im Mittel 14 IU/g TS (Abbildung 5-14a). Die Bestimmung der Alanin-Aminopeptidase stellt hierbei eine weitere Möglichkeit zur Analyse der proteolytischen Aktivität dar. Die Aminopeptidase spaltet sequenzspezifisch das N-terminale L-Alanin von der Peptidkette ab und ist als Exopeptidase in der Regel erst in der fortgeschrittenen Proteolyse aktiv (Bohley & Seglen 1992, Read & Skwierczynski 2007), was den verzögerten Anstieg der Aktivität erklärt. Weiterhin ist zu beachten, dass Proteasen sowohl pflanzliche als auch mikrobielle Proteine bzw. Enzyme, wie auch bspw. sekretierte Hydrolasen, abbauen, welche in Anlagen mit hoher mikrobieller Aktivität in großen Mengen vorhanden sind. Dies konnte schon anhand der Esteraseaktivität erläutert werden (vgl. Abbildung 5-13, Seite 85). Somit gibt die proteolytische Aktivität nicht zwangsläufig die genaue Hydrolyserate des Substrates wieder.

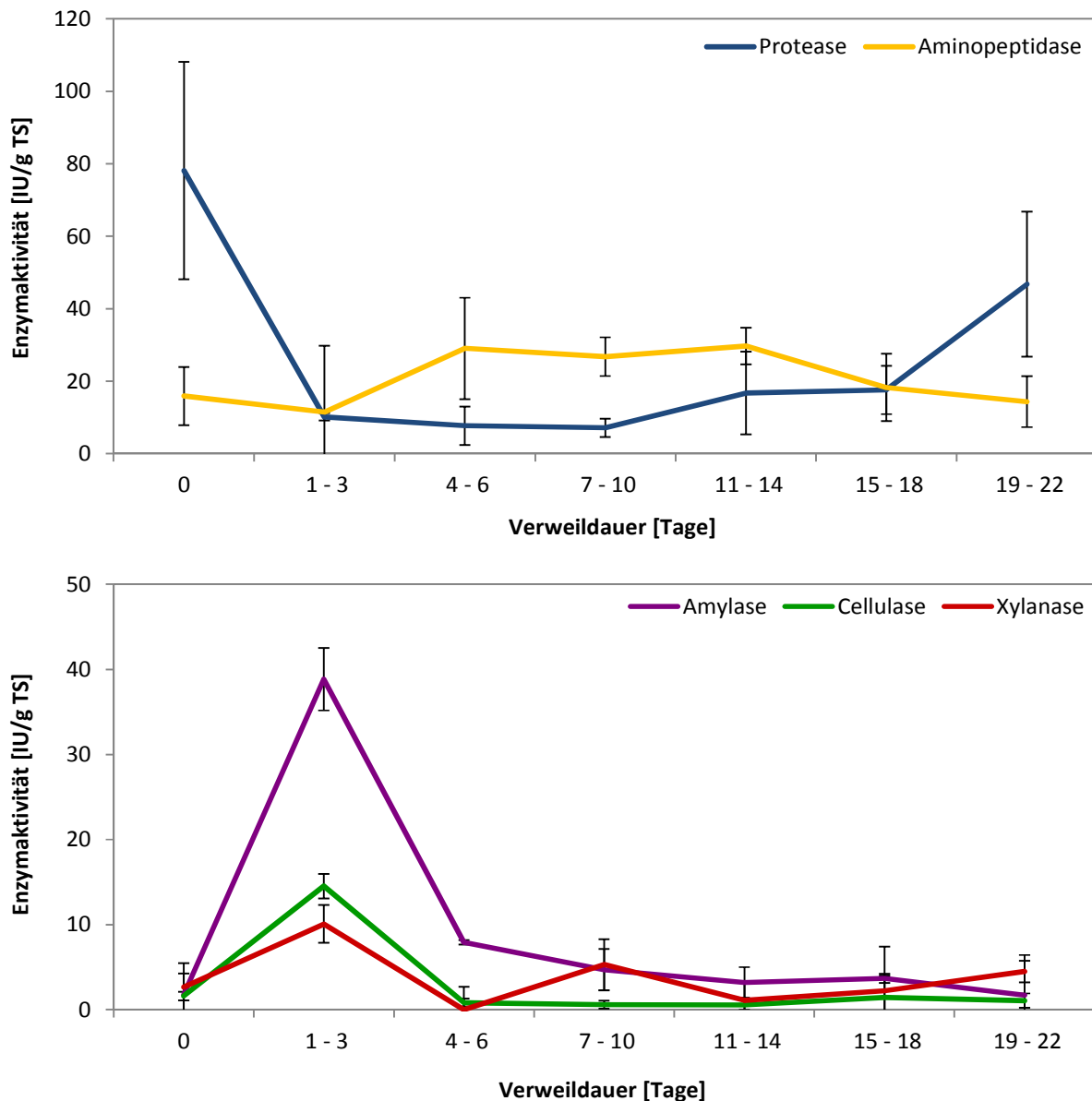


Abbildung 5-14: Hydrolaseaktivitäten von Perkolatorproben im Normalbetrieb

a) Durchschnittliche Protease- und Alanin-Aminopeptidaseaktivität von Perkolatorproben über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Proben (Substrat) der Beprobungsphasen C1 (n = 2), F3–5 (n = 8) und P (n = 11) **b)** Durchschnittliche Amylase-, Cellulase- und Xylanaseaktivität von Perkolatorproben über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Proben (Substrat) der Beprobungsphasen C1 (n = 2), F3–5 (n = 8) und P (n = 11). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

In Abbildung 5-14b sind die Aktivitätsprofile der Polysaccharid-hydrolysierenden Enzyme gezeigt. Maissilage hat mit etwa 70–74% einen sehr hohen Kohlenhydratanteil an der TS. Unter den vergärbaren Zuckern macht Stärke, die sich v. a. in den Maiskörnern befindet, mit 38% den größten Anteil aus. Daneben sind Cellulose mit etwa 19% und Hemicellulose, wie Xylan, mit ca. 17% Anteil in der Zellwand der gesamten Pflanze vorzufinden (Schober 2008, Weißbach 2009). Stärke zählt zu den leicht abbaubaren Polysacchariden. Da Hemicellulose und Cellulose zunächst aus dem Ligno-Cellulose-Komplex gelöst werden müssen, sind sie unter den schwer abbaubaren Polysacchariden einzuordnen (Sieber 2012). Die theoretische Methanausbeute von Kohlenhydraten beträgt dabei etwa 373 L/kg oTS

(Eder *et al.* 2009). In dieser Studie konnten die maximalen Enzymaktivitäten der untersuchten Polysaccharasen jeweils innerhalb der ersten drei Tage der Hydrolyse verzeichnet werden. Die Amylaseaktivität stieg auf bis zu 39 IU/g TS. Die Cellulase wies ein Aktivitätsmaximum von 15 IU/g TS und die Xylanase von 10 IU/g TS auf.

In Abbildung 5-15 sind die durchschnittlichen Hydrolaseaktivitäten der untersuchten Enzyme von Perkolatorablaufproben von Biogasanlagen im Normalbetrieb (Referenzansätze der Beprobungsphasen C1, F3–5 und P) dargestellt.

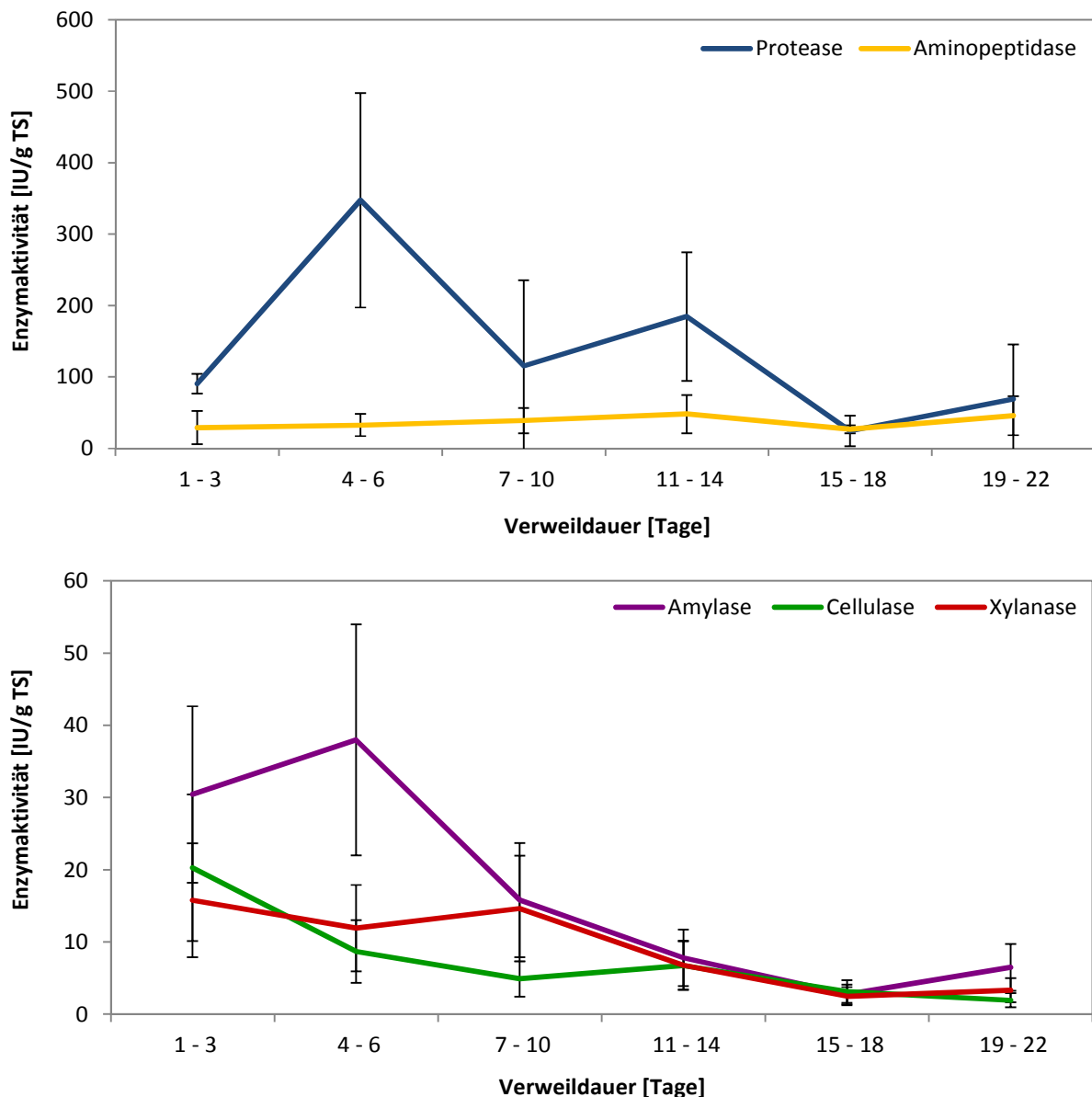


Abbildung 5-15: Hydrolaseaktivitäten von Perkolatorablaufproben im Normalbetrieb

a) Durchschnittliche Protease- und Alanin-Aminopeptidaseaktivität von Perkolatorablaufproben über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Proben der Beprobungsphasen C1 (n = 4), F3–5 (n = 28) und P (n = 5)
 b) Durchschnittliche Amylase-, Cellulase- und Xylanaseaktivität von Perkolatorablaufproben über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Proben (Substrat) der Beprobungsphasen C1 (n = 4), F3–5 (n = 28) und P (n = 5). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Die maximale Aktivität der allgemeinen Proteasen der Ablaufproben konnte leicht verzögert zu den Proben aus dem Perkolator zwischen dem vierten und sechsten Tag ermittelt werden und betrug im Mittel 347 IU/g TS. Insgesamt wiesen die allgemeine Proteaseaktivitäten größere Schwankungen auf und stiegen gegen Ende der Hydrolyse nicht erneut stark an. Die Amino-peptidase zeigte eine vergleichsweise konstant geringe Aktivität von durchschnittlich 40 IU/g TS (Abbildung 5-15a).

Die Aktivitätsmaxima der Polysaccharasen der Ablaufproben traten ebenfalls leicht verzögert zu denen der Perkolatorproben ein. Die Amylaseaktivität stieg zwischen dem vierten und sechsten Tag auf bis zu 38 IU/g TS. Die Cellulase wies zwischen dem ersten und dritten Tag ein Aktivitätsmaximum von 20 IU/g TS auf und die Xylanase zeigte zwischen dem ersten und zehnten Tag eine erhöhte Aktivität von durchschnittlich 14 IU/g TS (Abbildung 5-15b).

Mshandete und Kollegen (2008c) ermittelten bei der Analyse der Hydrolyse von Sisalblattresten in einer vergleichbaren Anlage ähnliche Aktivitätsprofile. Alle dort untersuchten Hydrolasen (Filterpapier-Cellulase, Carboxymethyl-Cellulase, β -Glucosidase, Amylase, Pectinase, Xylanase und Protease) zeigten ein Aktivitätsmaximum innerhalb der ersten sieben Tage der Fermentation. Dabei lagen die Hydrolaseaktivitäten im Ablauf des Hydrolysereaktors etwa zwischen 0,1 bis 2,8 IU/mL, was vergleichbar mit den Messwerten dieser Studie ist, in der Enzymaktivitäten von im Mittel 0,1 bis 2,0 IU/mL bestimmt wurden. Parawira und Kollegen (2005) hingegen konnten bei der Untersuchung der Hydrolyse von Kartoffelabfällen zeigen, dass die Hydrolasen auch noch nach 30 bis 50 Tagen eine erhöhte Aktivität aufweisen können. Die Aktivität der analysierten Enzyme (Amylase, Carboxymethyl-Cellulase, Filterpapier-Cellulase, Pectinase, Xylanase und Protease) variierte hierbei zwischen unter 0,001 bis etwa 4 IU/mL. So scheinen die enzymatischen Aktivitätsprofile stark von der Art des Substrates abhängig zu sein. Schon die Form des Substrates bzw. die Länge der Substratfaser hat Auswirkungen auf die Abbaubarkeit. Da bspw. kleinere Partikel den Mikroorganismen eine vergrößerte verfügbare Oberfläche bieten, erhöht dies die mikrobielle Abbaubarkeit des Substrates (Mshandete *et al.* 2006). Die gehäckselte Form der Maissilage erleichtert in dieser Studie den Angriff der Hydrolasen, sodass auch die schwer abbaubaren Bestandteile Cellulose und Xylan innerhalb der ersten Tage der Fermentation aufgeschlossen werden können.

5.2.2.3 Mikrobielle Atmungsaktivität

Die Bestimmung der Atmungsaktivität nach vier Tagen (AT_4) findet v. a. bei der Untersuchung der biologischen Stabilität und Beurteilung der Deponiefähigkeit von Feststoffen Anwendung. Sie dient hierbei als Maß für die aerobe biologische Abbaubarkeit (AbfabIV 2001, Heerenklage 2010). Sie wird jedoch auch bei der Untersuchung der Gärreste von Biogasanlagen eingesetzt (Loock *et al.* 1999, Vollmer 2000). In dieser Arbeit diente die Bestimmung der AT_4 als Indikator für den potentiellen aeroben Abbau der Feststoffproben aus der Hydrolysestufe (Ein- und Ausgangsmaterialien). In Abbil-

dung 5-16 sind die durchschnittlichen Atmungsaktivitäten (AT_4) der Silageproben von Biogasanlagen im Normalbetrieb (Referenzansätze der Beprobungsphasen F1–5 und P) veranschaulicht.

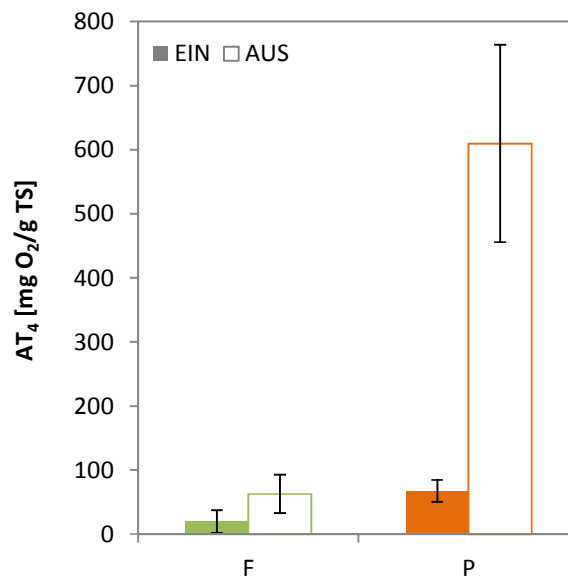


Abbildung 5-16: Atmungsaktivität nach vier Tagen von Perkolatorproben im Normalbetrieb

Durchschnittliche Atmungsaktivität von Ein- und Ausgangsmaterial (EIN, AUS), analysierte Proben: Referenzproben der Beprobungsphasen F1–5 (F = Fassanlage, $n = 14$) und P (= Pilotanlage, $n = 3$). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Die Proben des Eingangsmaterials (frische Maissilage) wiesen mit durchschnittlich $29 \text{ mg O}_2/\text{g TS}$ stets eine niedrigere AT_4 auf als die des Ausgangsmaterials (Gärrest). Dies lässt sich aus der geringen Zelldichte an Mikroorganismen des Eingangsmaterials erklären. Da im Rahmen der Analyse keine Inokulation sowie keine Zugabe eines künstlichen Substrates stattfindet und die frische Maissilage weitestgehend unaufgeschlossen war, da sie durch den Silierungsprozess konserviert wurde, war die mikrobielle Aktivität vergleichsweise gering. Durch die Perkolations des Prozesswassers in der Biogasanlage wurden die Perkolatoren beimpft und die Werte der AT_4 der entsprechenden Proben stiegen. Die durchschnittliche AT_4 des Ausgangsmaterials der Fassversuche lag mit $63 \text{ mg O}_2/\text{g TS}$ deutlich unter der der Pilotanlage mit $610 \text{ mg O}_2/\text{g TS}$. So war auch die AT_4 des Eingangsmaterials der Fassversuche mit $20 \text{ mg O}_2/\text{g TS}$ deutlich niedriger als die der Pilotanlage mit $67 \text{ mg O}_2/\text{g TS}$. Schon bei der Bestimmung der GZZ und der Esteraseaktivität nahmen die Analysewerte der Pilotanlage eine Sonderstellung ein. Dies ist womöglich, wie bereits erwähnt, auf den reduzierten Energiegehalt des eingesetzten Substrates bei der Pilotanlage zurückzuführen, der vermutlich aus einer nicht optimalen Silierung resultierte, was die erhöhte AT_4 des Eingangsmaterials erklären würde. Das daraus resultierende verminderte Wachstum und die verringerte Aktivität der Mikroorganismen hat eine verlangsamte Hydrolyse des Substrates zur Folge, sodass im Gärrest noch ein hoher Anteil an verfügbaren organischen Kohlen-

stoff-Verbindungen vorhanden ist, die noch potentiell hydrolysiert werden könnten. So zeigt sich, je höher der mittlere Sauerstoffverbrauch nach vier Tagen im Gärrest, desto unvollständiger der Abbau der organischen Substanz bzw. die Hydrolyse des Substrates und desto höher das Restgaspotential. So konnten Kim und Kollegen (2011) sowie Cossu und Raga (2008) eine Korrelation ($r^2 = 0,79$ bzw. $0,80$) zwischen der AT_4 und dem anaeroben Gasbildungspotential (GB_{21}) feststellen. Die Bestimmung der anaeroben Respiration bzw. des Biogasbildungspotentials stellt, wie in Kapitel 5.1.4 erwähnt, eine sehr sensible Methode dar, die zudem eine lange Inkubationszeit erfordert, sodass die AT_4 eine einfachere und schnellere Möglichkeit zur Beurteilung des Gasbildungspotentials repräsentiert. Durch Bestimmung der Atmungsaktivität des Eingangsmaterials lässt sich zudem die Güte des Substrates ermitteln. Im Gegensatz zur Bestimmung der Esteraseaktivität, in der nur die Exoenzyme analysiert wurden, die zur Zeit der Probenahme frei vorlagen, wird bei der AT_4 das mikrobielle Aktivitätspotential ermittelt. So haben die Mikroorganismen im Batchversuch, sowie auch in der Biogasanlage, Zeit sich an die neuen Bedingungen anzupassen und ihren Stoffwechsel zu aktivieren. Je höher die AT_4 , desto höher ist der Stoffumsatz welcher auf eine höhere Zelldichte an Mikroorganismen, welche am Zersetzungsprozess beteiligt sind, bzw. auf ein nährstoffreicheres Substrat schließen lässt. Die Bedeutung der AT_4 des Eingangsmaterials wird in Kapitel 5.6 eingehender erläutert.

Arnold (2009) konnte für Gärreste, bestehend aus verschiedenen Schlämmen von Biogasanlagen, eine AT_4 von sieben bis $22 \text{ mg O}_2/\text{g TS}$ bestimmen. Deublein und Steinhauser (2011) beschrieben für Gärreste aus Biogasanlagen, die mit Bioabfall als Substrat betrieben wurden, Messwerte zwischen zehn und $25 \text{ mg O}_2/\text{g TS}$. Binner und Kollegen (2012) ermittelten für Gärreste sogar Atmungsaktivitäten zwischen etwa 30 und $100 \text{ mg O}_2/\text{g TS}$. So liegen die Atmungsaktivitäten der Ausgangsmaterialien der Fassversuche auch etwa in diesem Bereich. Jedoch die Gärreste der Pilotanlage wiesen wie bereits oben aufgeführt einen stark erhöhten Wert auf, sodass dort von einer unzureichenden Hydrolyse auszugehen ist. Da die Verweildauer des Substrates im Perkolator der Pilotanlage jedoch verkürzt war, nur 15 Tage im Vergleich zu 20 bis 22 Tage in der Container- bzw. Fassanlage, ist dies ebenso eine Erklärung für die erhöhte restliche Atmungsaktivität.

5.3 Überwachung der Biogasanlage bei Störfällen

Die Eignung eines Parameters zum Überwachen von Biogasanlagen ist v. a. davon geprägt, ob durch ihn auch effektiv Störungen im Prozess detektiert werden können. Daher wurden mehrere Testreihen zur Erprobung der Auswirkungen von Störfällen bzw. Verfahrensmodifikationen auf verschiedene mikrobielle Parameter durchgeführt. Die Ergebnisse und Tendenzen der Analysen werden im Folgenden erläutert.

5.3.1 Prozessstörung durch Pumpenausfall

In der Beprobungsphase C3 kam es inmitten des Untersuchungszeitraumes zu einer Störung (Ausfall der Pumpe zur Beschickung der Methanreaktoren), sodass an diesem Tag die Zulauftrate der Methanreaktoren um 30% reduziert war. Technische Störungen dieser Art sind v. a. bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen nicht selten und können bei längerem Auftreten große Folgen für die Mikroorganismen haben, da die Substratzufuhr und somit das Prozessgleichgewicht gestört wird. In Abbildung 5-17 sind zur Veranschaulichung die Auswirkungen dieser Prozessstörung auf ausgewählte Parameter des Speicher 2 (2B21) dargestellt.

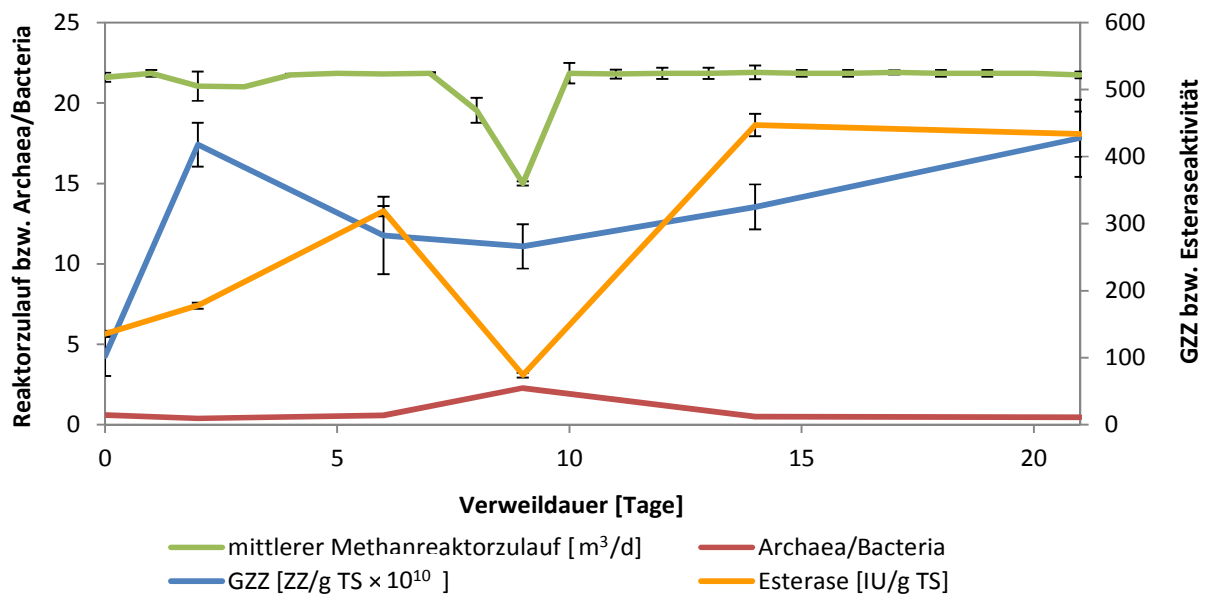


Abbildung 5-17: Auswirkungen verschiedener Parameter des Speicher 2 auf einen Pumpenausfall

Messwerte verschiedener Parameter des Speicher 2 während der Beprobungsphase C3 gegen die Dauer der Hydrolyse im Perkolator, Pumpenausfall am 8. – 9. Tag der Hydrolyse, dargestellte Parameter: mittlerer Methanreaktorzulauf ($n = 44$), Verhältnis Archaea zu Bacteria, Gesamtzellzahl (GZZ) und Esteraseaktivität (jeweils $n = 6$). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Die mittlere Zulauftrate der Methanreaktoren betrug im Untersuchungszeitraum etwa $22 \text{ m}^3/\text{d}$, was einer CSB-Raubelastung von durchschnittlich $31 \text{ kg CSB}/\text{m}^3 \times \text{d}$ entsprach. Am Tag neun der Hydrolyse des untersuchten Perkolators sank die Zulauftrate der Methanreaktoren aufgrund des Pumpenausfalls auf $15 \text{ m}^3/\text{d}$ bzw. auf eine CSB-Raubelastung von $24 \text{ kg CSB}/\text{m}^3 \times \text{d}$. Dies hatte offenbar einen direkten Einfluss auf die Mikroorganismen. So kam es zu dieser Zeit im Speicher 2, Ablauf der Methanreaktoren, zu einer starken Abnahme der Gesamtzellzahl und der mikrobiellen Aktivität sowie zur Verschiebung des Archaea:Bacteria-Verhältnisses von durchschnittlich 0,5 auf 2,3. Im Folgenden wird diese Thematik eingehender erläutert. Hierzu sind in Abbildung 5-18 die durchschnittlichen Messwerte der untersuchten Parameter relativ zur Referenz (keine Störung) der Beprobungsphasen C1 (Referenz) und C3 (Pumpenausfall) aufgezeigt.

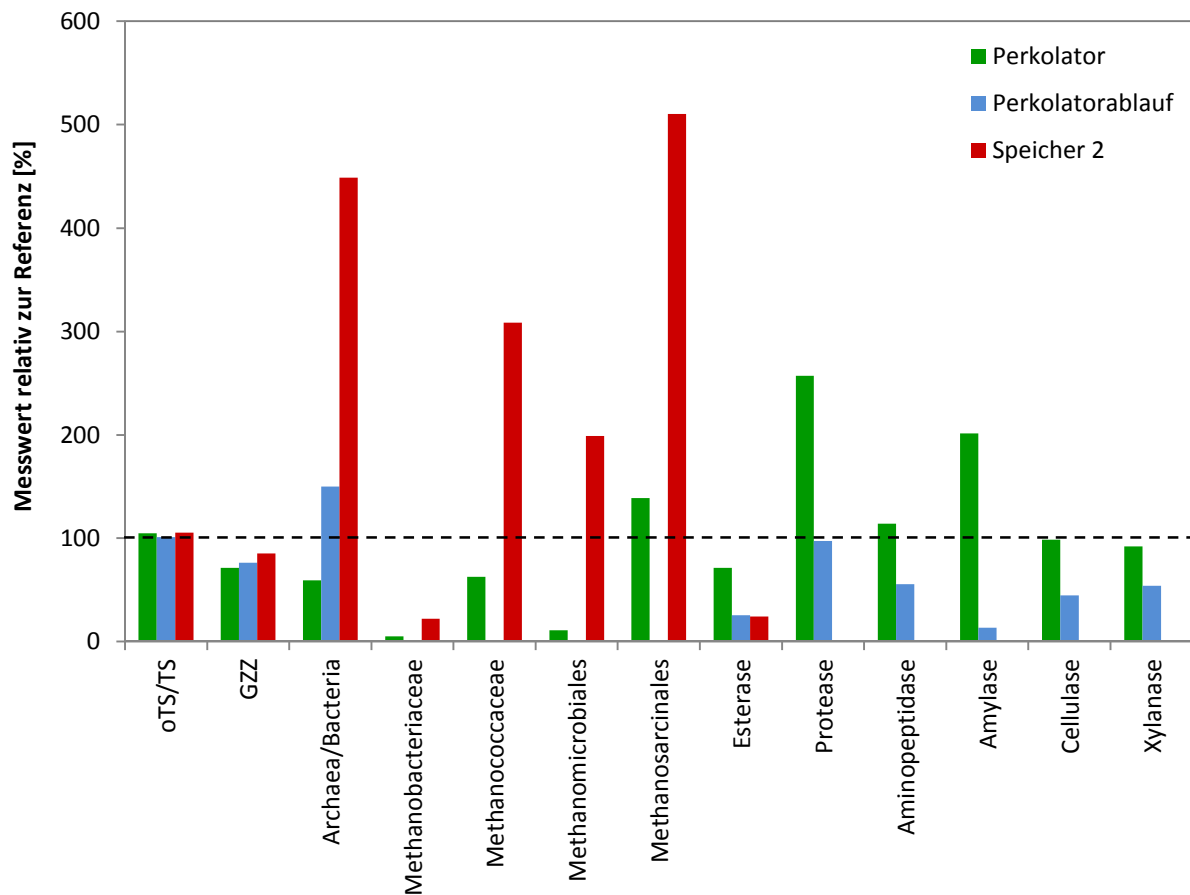


Abbildung 5-18: Parameterabweichung bei Pumpenausfall

Durchschnittliche Messwerte verschiedener Parameter relativ zur Referenz der Beprobungsphasen C1 (Referenz) und C3 (Pumpenausfall), Biomasseparameter: Anteil oTS an TS, Gesamtzellzahl (GZZ), Verhältnis Archaea zu Bacteria, Anteil Methanobacteriaceae, Methanococcaceae, Methanomicrobiales und Methanosarcinales, Aktivitätsparameter: Aktivität der Esterase, Protease, Aminopeptidase, Amylase, Cellulase und Xylanase, analysierte Proben: Ausgangsmaterial der Perkolatoren (n = 3), Perkolatorablaufproben (n = 6) und Proben aus Speicher 2 (n = 6). Der Referenzwert liegt bei 100% (gestrichelte Linie).

Auf den oTS-Abbau hatte der Pumpenausfall nur sehr geringe Auswirkungen. So lag der durchschnittliche Anteil der oTS an der TS bei allen Probenahmestellen (Ausgangsmaterial- und Ablaufproben sowie Proben des Sp 2) nur etwa 4% über der Referenz. Die durchschnittliche Gesamtzellzahl lag jedoch bereits 22% unter dem der Referenz. Dies weist insbesondere bei dem Gärrest und den Ablaufproben des Perkolators auf ein reduziertes mikrobielles Wachstum bzw. eine Umverteilung der Mikroorganismen in andere Systemeinheiten hin. Wie in Abbildung 5-17 zu sehen ist, bewirkte schon die leichte Schwankung der Zulauftrate einige Tage zuvor eine Reduktion der GZZ im Speicher 2. Dies lässt darauf schließen, dass die mikrobiellen Zellen vermehrt in den Methanreaktoren verweilen. Das Verhältnis der Archaea zu den Bacteria im Gärrest lag etwa 41% unter dem der Referenz, was darauf hindeutet, dass der Abbauprozess im Perkolator noch nicht so weit fortgeschritten war und den Methanogenen daher geeignete Substrate zum Wachstum fehlten. Vermutlich wurden sie deshalb durch den Perkolator gespült, sodass das Archaea:Bacteria-Verhältnis im Ablauf des Perkolators um etwa 50% erhöht war. Im Speicher 2 konnte am Tag des Pumpenausfalls sogar eine Erhöhung um etwa

350% festgestellt werden (vgl. auch Abbildung 5-17). So scheint der reduzierte Zulauf der Methanreaktoren und das daraus resultierende verminderte Substratangebot dazu geführt zu haben, dass ein großer Teil der Archaeen aus den Methanreaktoren gespült wurde. Dabei handelte es sich offenbar v. a. um Vertreter der Methanosarcinales, deren Anteil im Vergleich zu den Referenzproben um etwa 410% erhöht war. So konnten auch Muha und Wittum einen Zusammenhang zwischen einer reduzierten Zulauftrate bzw. Acetatkonzentration und dem verminderten Vorkommen von Acetatverwertern im Methanreaktor feststellen (Muha & Wittum 2012). Auch die Anteile der Methanomicrobiales und der Methanococcaceae waren überdurchschnittlich hoch, 99% bzw. 208% über dem Referenzwert. Der Anteil der Methanobacteriaceae lag jedoch etwa 78% unter dem der Referenz, sodass der Substratmangel für diese Mikroorganismen offenbar einen Konkurrenzvorteil darstellte. Die veränderte Zusammensetzung des Speicher 2, Zulauf der Perkolatoren, spiegelt sich auch im Ausgangsmaterial des Perkolators wider. Der Anteil der Methanosarcinales lag dabei fast 40% über dem der Referenzproben. Die Anteile der Methanococcaceae, der Methanomicrobiales und der Methanobacteriaceae waren jedoch um 37%, 89% bzw. 95% reduziert. Auch die Enzymaktivitäten wiesen Unterschiede zur Referenz auf. So war die allgemeine mikrobielle Aktivität in allen Proben verringert, um 29% im Gärrest, 74% im Perkolatorablauf und um 76% im Speicher 2 (vgl. auch Abbildung 5-17). Dies ist sehr wahrscheinlich u. a. auf die verminderte mikrobielle GZZ zurückzuführen. Hingegen war die Aktivität der allgemeinen Protease, Aminopeptidase und Amylase im Gärrest erhöht und zwar um 157%, 14% bzw. 101%. Da diese Enzyme für die Hydrolyse von leicht abbaubaren Substraten verantwortlich sind, weist dies ebenso auf einen verlangsamten Abbau der Maissilage hin. So zeigten die Enzyme Cellulase und Xylanase, die die schwer abbaubaren Substrate Cellulose und Xylan hydrolysieren, im Gärrest eine leicht reduzierte Aktivität relativ zur Referenz, 98% bzw. 92%. Im Ablauf konnte dabei für alle getesteten Hydrolasen eine reduzierte Aktivität festgestellt werden, die zwischen 14% bis 97% im Vergleich zur Referenz lag. Die Ergebnisse legen nahe, dass schon eine kurzfristige Reduktion der Methanreaktor-Zulauftrate bzw. der CSB-Raumbelastung um 30% Auswirkungen auf die mikrobielle Biozönose der Methanstufe hat und diese sich in dem geschlossenen System auch in der Hydrolysestufe und dem Substratabbau widerspiegeln. So ist bekannt, dass unterbelastete Biogasreaktoren zwar i. d. R. einen stabilen Betrieb ermöglichen, die Produktivität jedoch stark eingeschränkt wird, da sie u. a. durch ein Prozessungleichgewicht niedrige Umsetzungsraten aufweisen (Stamatelatos *et al.* 1997, Boe 2006).

5.3.2 Modifikation der Perkulationsrate

Zur Analyse von Auswirkungen auf die mikrobielle Biozönose auf Modifikationen des Verfahrens wurden weiterhin einige Verfahrensabwandlungen getestet. In Beprobungsphase F1 wurde die Perkulationsrate variiert, neben einer Rate von 6 L/(kg oTS×d), dem Referenzversuch, wurden auch die niedrigeren Perkulationsraten 3, 5 und 5,6 L/(kg oTS×d) getestet.

Die Bedeutung einer für das System gut angepassten Perkulationsrate liegt v. a. in der Abbaueffizienz begründet. Da bei Festbettreaktoren keine Durchmischung durch bspw. Rührwerke stattfindet, erfolgt der für den Abbau notwendige Kontakt von Mikroorganismen und Biomasse durch Rückmischung mittels Perkulation (Liebeneiner 2010). Die Perkulationsrate bestimmt dabei auch den Feuchtegehalt im Perkolator und damit die Hydrolyseeffizienz (Sanphoti *et al.* 2006). Die Gefahr einer zu starken Perkulation besteht allerdings in einer zu hohen Errosionsbelastung, die die Mikroorganismen vom Substrat löst und ausspült und dadurch die Abbauleistung verschlechtert. Bei einer sehr niedrigen Perkulationsrate dagegen kommt es zur Akkumulation von Hydrolysespaltprodukten und Säuren, was wiederum die hydrolytisch wirksamen Mikroorganismen inhibiert (Buschmann & Busch 2009). Wie in Kapitel 5.2.1.1 erwähnt, hängen die Perkulationsrate bzw. die hydraulische Verweilzeit in der Hydrolysestufe u. a. mit dem oTS-Abbau zusammen, sodass bei niedrigen Perkulationsraten möglicherweise ein verbesserter Substratabbau zu erwarten wäre. In Abbildung 5-19 sind die durchschnittlichen Messwerte verschiedener Parameter relativ zur Referenz (keine Modifikation) der Beprobungsphase F1 dargestellt.

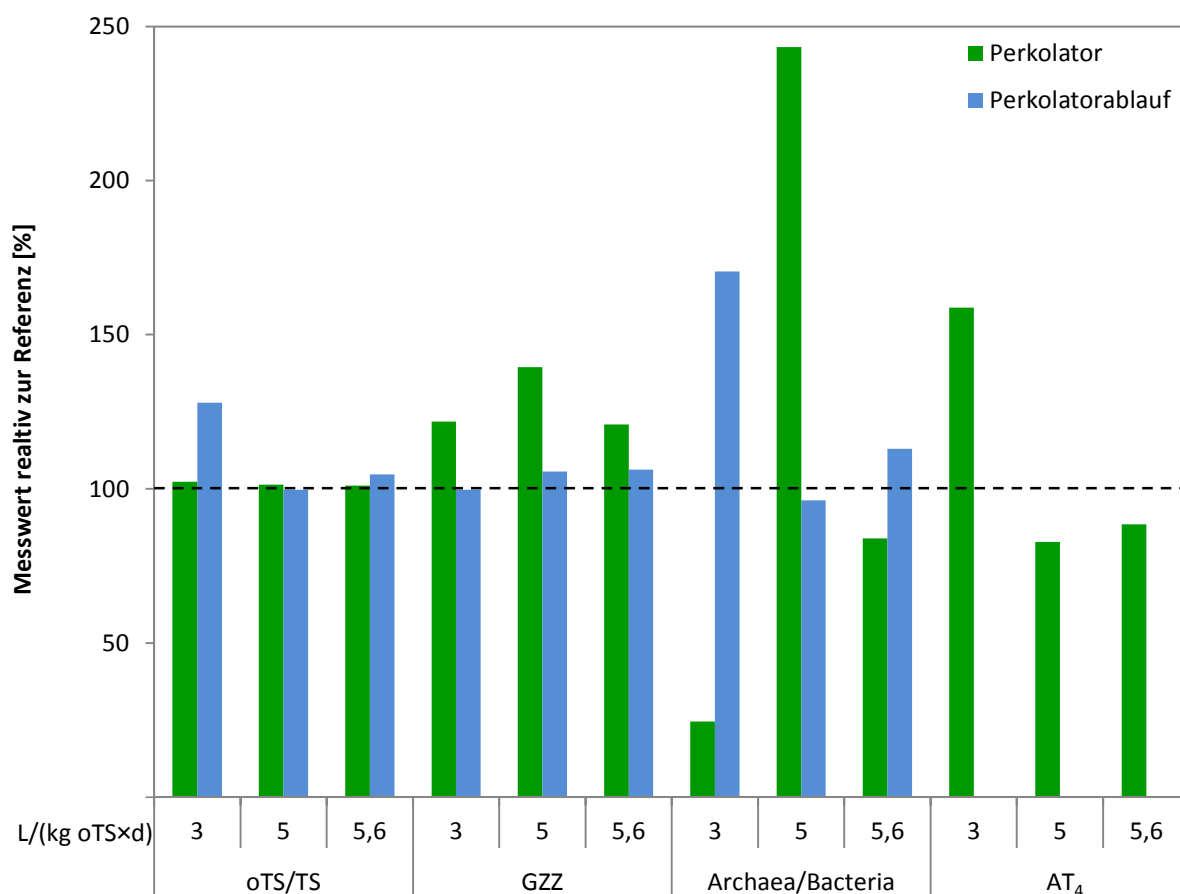


Abbildung 5-19: Parameterabweichung bei modifizierter Perkulationsrate

Durchschnittliche Messwerte verschiedener Parameter relativ zur Referenz der Beprobungsphase F1, getestete Perkulationsraten: 3, 5 und 5,6 L/(kg oTS×d), Referenz: 6 L/(kg oTS×d), Biomasseparameter: Anteil oTS an TS, Gesamtzellzahl (GZZ), Verhältnis Archaea zu Bacteria, Aktivitätsparameter: Atmungsaktivität (AT₄), analysierte Proben: Ausgangsmaterial der Perkolatoren (n = 4) und Perkolatorablaufproben (n = 4). Der Referenzwert liegt bei 100% (gestrichelte Linie).

In diesem Versuch lag der Fokus auf der Hydrolysestufe, weshalb Gärreste aus den Perkolatoren und die entsprechenden Abläufe analysiert wurden. Entgegen den Erwartungen führte eine reduzierte Perkolationsrate nicht eindeutig zu einem verbesserten Abbau der oTS. So lag der Anteil der oTS an der TS im Gärrest sogar 1 bis 2% über dem der Referenz, wengleich der Versuch mit einer Perkolationsrate von 3 L/(kg oTS×d) eine erhöhte oTS-Auswaschung mit einem 28% höheren Anteil der oTS an der TS im Perkolatorablauf zeigte. Die Versuche mit einer Perkolationsrate von 5 bzw. 5,6 L/(kg oTS×d) wiesen im Ablauf einen durchschnittlichen oTS-Anteil von 100% bzw. 105% im Vergleich zur Referenz auf. Die Gesamtzellzahlen des Ausgangsmaterials zeigten einen 21 bis 39% höheren Wert im Vergleich zur Referenz, was auf ein vermehrtes mikrobielles Wachstum durch die erhöhte hydraulische Verweilzeit hinweist (Liebeneiner 2010). Auch die GZZ der entsprechenden Abläufe waren um bis zu 6% erhöht. Dabei wies v. a. der Gärrest bei einer Perkolationsrate von 5 L/(kg oTS×d) einen stark erhöhten Wert des Archaea:Bacteria-Verhältnisses auf, der 143% über dem der Referenz lag. Im Vergleich hierzu zeigten die Gärreste bei Perkolationsraten von 3 bzw. 5,6 L/(kg oTS×d) erniedrigte Archaea:Bacteria-Verhältnisse auf, 75 bzw. 16% unter dem der Referenz. Dafür wurden in diesen Versuchen vermehrt Archaeen aus den Perkolatoren gespült, was sich in einem erhöhten Archaea:Bacteria-Verhältnis der Perkolatorabläufe zeigt, mit 71 bzw. 13% über dem der Referenz. Bei einer Perkolationsrate von 5 L/(kg oTS×d) lag das Archaea:Bacteria-Verhältnis des Ablaufes etwa 4% unter dem der Referenz, sodass hier von einem weit fortgeschrittenen Substratabbau auszugehen ist, der eine verstärkte Kolonisation von Archaeen in dem Perkolator ermöglichte. Auch die Atmungsaktivität nach vier Tagen lag bei diesem Versuch etwa 17% unter dem der Referenz und zeigte damit ein geringeres Restgaspotential, was wiederum auf eine effizientere Hydrolyse hindeutet. Der Versuch mit einer Perkolationsrate von 5,6 L/(kg oTS×d) zeigte im Vergleich zum Referenzversuch ebenso eine um 11% erniedrigte AT₄. Bei einer Perkolationsrate von 3 L/(kg oTS×d) konnte jedoch eine um 59% erhöhte AT₄ festgestellt werden, sodass hier von einem unvollständigeren Umsatz der organischen Substanz auszugehen ist. Die mikrobiologischen Analysen lassen in diesem Versuch darauf schließen, dass die Substratumsetzung durch eine Verringerung der Perkolationsrate optimiert werden kann. Eine Perkolationsrate von 3 L/(kg oTS×d) scheint jedoch wiederum zu gering zu sein, was sich insbesondere in dem erhöhten Wert der AT₄ zeigt. Hier wurden womöglich Abbauzwischenprodukte im Perkolator akkumuliert (u. a. organische Säuren), was auch das geringe Archaea:Bacteria-Verhältnis erklären würde.

Bei der Analyse der kumulierten CSB-Auswaschung, also des effektiven CSB-Austrages durch die Hydrolyse, wies hingegen der Versuch mit einer Perkolationsrate von 5,6 L/(kg oTS×d) mit 591 g CSB/kg oTS, dicht gefolgt von dem Referenzversuch mit 584 g CSB/kg oTS, den höchsten Wert auf. Die Versuche mit einer Perkolationsrate von 3 bzw. 5 L/(kg oTS×d) zeigten mit 471 bzw. 405 g CSB/kg oTS eine deutlich geringere kumulierte CSB-Auswaschung. Auch Buschmann und Busch

zeigten bei der Vergärung von Maissilage in einer ähnlichen Anlage, dass durch vergleichsweise hohe Perkolationsraten, in diesem Fall $100 \text{ L}/(\text{kg oTS} \times \text{d})$, erhöhte CSB-Erträge erzielt werden können (Buschmann & Busch 2009). Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei einem weit fortgeschrittenen Substratabbau im Hydrolysereaktor und einer erhöhten Abundanz an Methanogenen die Biogasbildung schon im Perkolator einsetzen kann. Bei dem Versuch mit einer Perkolationsrate von $5 \text{ L}/(\text{kg oTS} \times \text{d})$ lag die kumulierte Methanproduktion im Hydrolysegas bspw. mit $32 \text{ Nm}^3/\text{kg oTS}$ deutlich über der der anderen Versuche (16 bis $27 \text{ Nm}^3/\text{kg oTS}$), was den entsprechenden CSB-Verlust im Ablauf erklärt. Bei einer offenen Hydrolyse ohne Gaserfassung ist eine Hydrolysegasbildung zu vermeiden, da dies einem Energieverlust entspricht. So ist die Wahl der optimalen Perkolationsrate auch sehr stark von der Verfahrensführung abhängig.

5.3.3 Modifikation im Perkolator

In der Beprobungsphase F2 wurden Modifikationen im Perkolator vorgenommen. So wurde dem Substrat (Eingangsmaterial) ein Additiv in Form von sensoPower® Starter zugegeben, welches durch verschiedene Inhaltsstoffe den Gärprozess optimieren soll. Weiterhin wurde in einem Perkolator Gärrest als Inokulum, zur Inokulation mit hydrolisierenden Mikroorganismen, zugesetzt. Zudem wurde die Hydrolyse im Fassversuch auch ohne aufgestautes Prozesswasser getestet, was, wie schon aus Vorversuchen bekannt war, zur mangelnden Durchfeuchtung des Substrates führen kann. In Abbildung 5-20 sind die durchschnittlichen Messwerte verschiedener Parameter relativ zur Referenz (keine Modifikation) der Beprobungsphase F2 veranschaulicht.

Wie schon bei den vorangegangenen Versuchen ermittelt, konnten bei dem Anteil der oTS an der TS im Vergleich zur Referenz nur geringe Abweichungen detektiert werden. So lag der oTS-Anteil im Gärrest der Versuche mit Additiven (sensoPower® bzw. Gärrest) bei etwa 100%. Bei dem Versuch ohne Aufstau konnte ein leicht erhöhter oTS-Anteil (um 6%) im Gärrest festgestellt werden. Auch die oTS-Anteile der Perkolatorabläufe wichen nur wenige Prozentpunkte vom Referenzwert ab. Hier zeigte der Ablauf des Versuches ohne Aufstau den niedrigsten oTS-Anteil, 9% unter dem der Referenz, sodass dies bereits ein Indiz für eine mangelnde Substratumsetzung darstellt. Durch das Additiv sensoPower® konnte eine Erhöhung der Gesamtzellzahl im Gärrest um etwa 10% ermittelt werden, durch die Inokulation des Substrates mittels Zugabe von Gärrest sogar um ca. 53%. Bei dem Versuch ohne Aufstau hingegen wies die GZZ des Ausgangsmaterials einen leicht erniedrigten Wert auf, 2% unter dem der Referenz. Bei den Perkolatorabläufen konnten nur sehr geringe Differenzen zur Referenz detektiert werden. Die GZZ lagen hierbei zwischen 102 und 103% im Vergleich zur Referenz. Bei dem Verhältnis der Archaea zu den Bacteria waren die Abweichungen zum Referenzversuch ungleich höher. So konnte in den Gärresten eine Reduktion dieses Verhältnisses festgestellt werden – um 37% bei

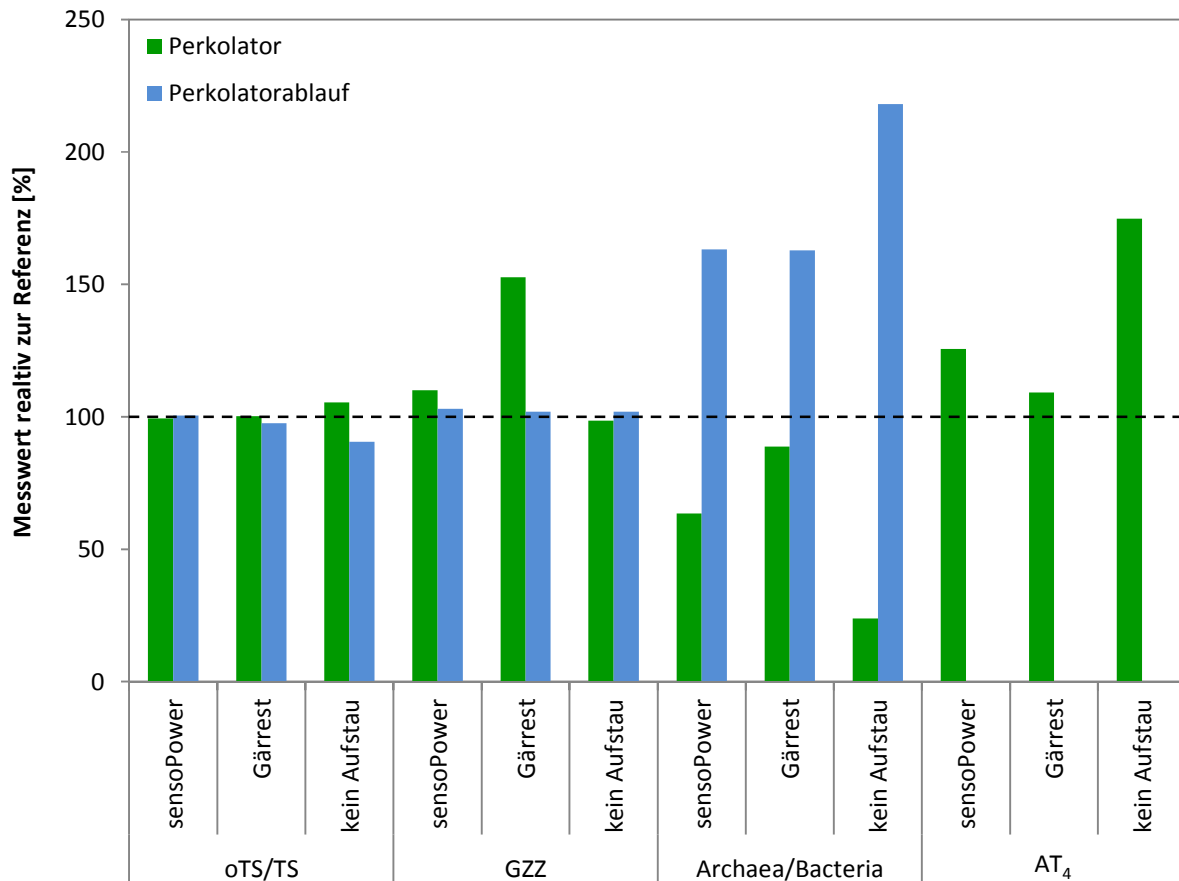


Abbildung 5-20: Parameterabweichung bei modifiziertem Perkolator

Durchschnittliche Messwerte verschiedener Parameter relativ zur Referenz der Beprobungsphase F2, Modifikationen: sensoPower als Additiv, Gärrest als Inokulum, Fahrweise ohne Aufstau, Biomasseparameter: Anteil oTS an TS, Gesamtzellzahl (GZZ), Verhältnis Archaea zu Bacteria, Aktivitätsparameter: Atmungsaktivität (AT₄), analysierte Proben: Ausgangsmaterial der Perkolatoren (n = 8) und Perkolatorablaufproben (n = 16). Der Referenzwert liegt bei 100% (gestrichelte Linie).

Zugabe von sensoPower[®], um 11% bei Zugabe von Gärrest und um 76% bei dem Versuch ohne Aufstau. In den Perkolatorabläufen zeigten sich dagegen erhöhte Werte des Archaea:Bacteria-Verhältnisses. Bei dem Versuch mit sensoPower[®] bzw. Gärrest als Additiv lag es jeweils etwa 63% über dem der Referenz und bei dem Versuch ohne Aufstau sogar 118% darüber. Da ebenso die AT₄ der drei Versuche über dem Referenzwert lag, 26% bei Zugabe von sensoPower[®], 9% bei Inokulation durch Gärrest bzw. 75% bei dem Versuch ohne Aufstau, lässt dies insbesondere bei dem Versuch ohne Aufstau vermuten, dass der Substratabbau im Vergleich zum Referenzversuch Mängel aufwies.

Durch chemische Analysen konnte dies weitestgehend bestätigt werden. So lag die kumulative CSB-Auswaschung bei den Versuchen mit sensoPower[®] als Additiv bzw. ohne Aufstau 8% bzw. 36% unter dem Referenzwert. Die kumulative CSB-Auswaschung des inokulierten Versuches wies hingegen einen 18% höheren Wert auf. Der Gärrest dieses Versuches hatte eine deutlich höhere GZZ, was auch die erhöhte AT₄ gegenüber der Referenz erklärt. Dies zeigt die ausgeprägte Abhängigkeit der AT₄ von der GZZ. So lag die spezifische AT₄ (AT₄/Zelle) des inokulierten Versuches sogar 6% unter dem der Referenz und deutet somit auch auf einen fortgeschritteneren Substratabbau hin. Dies lässt spekulieren,

ob zur alleinigen Beurteilung der Substratverfügbarkeit bzw. dessen Energiegehaltes eine generelle Angabe der Atmungsaktivität durch das Verhältnis AT_4 /Zelle erfolgen sollte. So lag auch das kumulierte Methanvolumen im Perkolator mit Inokulation etwas über dem der Referenz (11%), obwohl das Archaea:Bacteria-Verhältnis in diesem Fall nicht auf eine erhöhte Abundanz an Archaeen hinwies. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass durch die Zugabe des Gärrestes u. a. gezielt methanogene Archaeen zugeführt wurden. Diese könnten so, womöglich im Biofilm des Gärrestes vor bspw. einem zu niedrigen pH-Wert geschützt, schon von Beginn der Hydrolyse an Biogas produzieren. Bei den Versuchen mit sensoPower[®] als Additiv bzw. ohne Aufstau lag das kumulierte Methanvolumen dagegen ebenso unter dem Referenzwert, 11% (sensoPower[®]) bzw. 58% (ohne Aufstau), sodass nur bei dem inokulierten Versuch von einem im Vergleich zum Referenzversuch leicht verbesserten Substratumsatz ausgegangen werden kann.

Biogasadditive sind biologische oder chemische Zusatzstoffe, die die Biogasproduktion durch Stimulation der mikrobiellen Aktivität erhöhen. Die Eignung eines Additivs ist dabei stark abhängig von der Art des Substrates und der Prozessführung (Yadvika *et al.* 2004).

Das Biogasadditiv sensoPower[®] entwickelte sich aus dem pflanzlichen Futtermittelzusatzstoff Sangrovit[®] (gewonnen aus *Macleaya cordata*) heraus, welchem eine positive Wirkung auf die Mastleistung zugeschrieben wird (Spiekers *et al.* 2006). Neben Sangrovit[®] enthält sensoPower[®] noch spezielle Enzyme, Probiotika und Spurenelemente und soll damit die Abbaugeschwindigkeit eines Substrates bei der Vergärung erhöhen und gleichzeitig gezielt Bausteine und Zwischenprodukte der Essigsäurebildung vor weiteren unerwünschten Abbauprozessen schützen. sensoPower[®] Starter wirkt dabei v. a. positiv auf die Hydrolyse, Versäuerung und Essigsäurebildung. Eine Wirksamkeit im einstufigen Betrieb wurde nach Angaben des Herstellers von verschiedenen Instituten belegt (Phytobiotics 2013). In dieser Studie hatte das Additiv zwar einen positiven Effekt auf die mikrobielle Zellzahl, was u. a. auf die Probiotikazugabe zurückgeführt werden kann, eine verbesserte Substratumsetzung konnte jedoch nicht festgestellt werden. Dies könnte womöglich an einer zu geringen Dosierung des Additivs liegen. Da es vom Hersteller keine Dosierungsangabe für die hier angewandte Verfahrensführung gibt, sollte für weitere Analysen zunächst eine geeignete Dosierung des Additivs ermittelt werden.

Es ist oft üblich den Abbauprozess mithilfe von mikrobiell angereichertem Material zu starten. Als Inokulum wird dabei meist Gärrest aus einer Biogasanlage oder Gülle verwendet. Die Zugabe von Impfgut kann sowohl die Gasausbeute und den Methangehalt im Biogas verbessern als auch die Verweildauer des Substrates im Fermenter reduzieren (Yadvika *et al.* 2004). In der Hydrolysestufe von zweistufigen Anlagen ist dabei besonders die Inokulation von hydrolisierenden Bakterien bzw. von Hydrolasen von Bedeutung (Marín-Pérez & Weber 2012). Sowohl Sans (1995) als auch Linke und Kollegen (2006) zeigten, dass durch die Beimpfung des Substrates mit Gärrest (30 Ma.-%) die Methanproduktion bei einstufigen Trockenvergärungsanlagen beschleunigt werden kann. Im Perkolationsver-

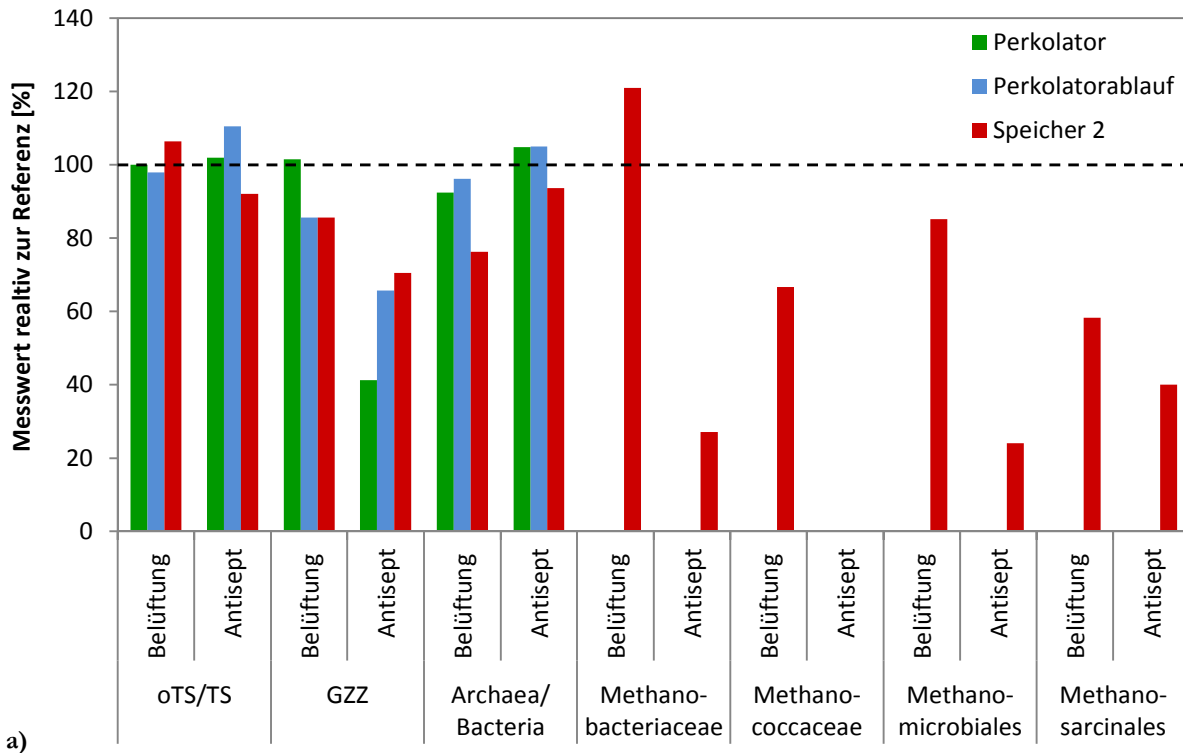
fahren geschieht die Inokulation jedoch schon durch die Perkolation, wobei in zweistufigen Anlagen mit Prozesswasser aus der ersten und/oder zweiten Stufe perkoliert werden kann. So ist bei dieser Prozessvariante das Animpfen mit Gärrest nicht zwingend erforderlich (Schönberg & Linke 2009). Ähnlich wie in dieser Studie konnten auch Cysneiros und Kollegen (2011) bei einer zweistufigen Trockenvergärungsanlage mit Perkolationsverfahren nachweisen, dass der Hydrolysereaktor sowohl mit cellulolytischen als auch methanogenen Mikroorganismen inokuliert wird. Letztere entfaltet ihre Aktivität aber erst nachdem die Säurekonzentration reduziert war. Diese Studie zeigte jedoch, dass auch im Perkolationsverfahren die Substratumsetzung durch Beimpfung mit Gärrest intensiviert werden kann.

Beim Aufstauverfahren wird das Substrat mit Gärflüssigkeit eingestaut und dadurch inokuliert. Damit sollen die Probleme der ungleichmäßigen Verteilung des Perkolats im Substratstapel, wie sie auch in Vorversuchen der Fissanlage beobachtet wurden, vermieden werden (Liebeneiner 2010). In dieser Studie konnte diese Problematik nochmals analysiert werden. Aufgrund der schlechten Verteilung des Perkolats und der daraus resultierenden reduzierten Substratumsetzung ist das Perkolationsverfahren bei den Fassreaktoren der Anlage offensichtlich nicht ausreichend, sodass sie wie beschrieben zusätzlich im Aufstauverfahren betrieben wurden.

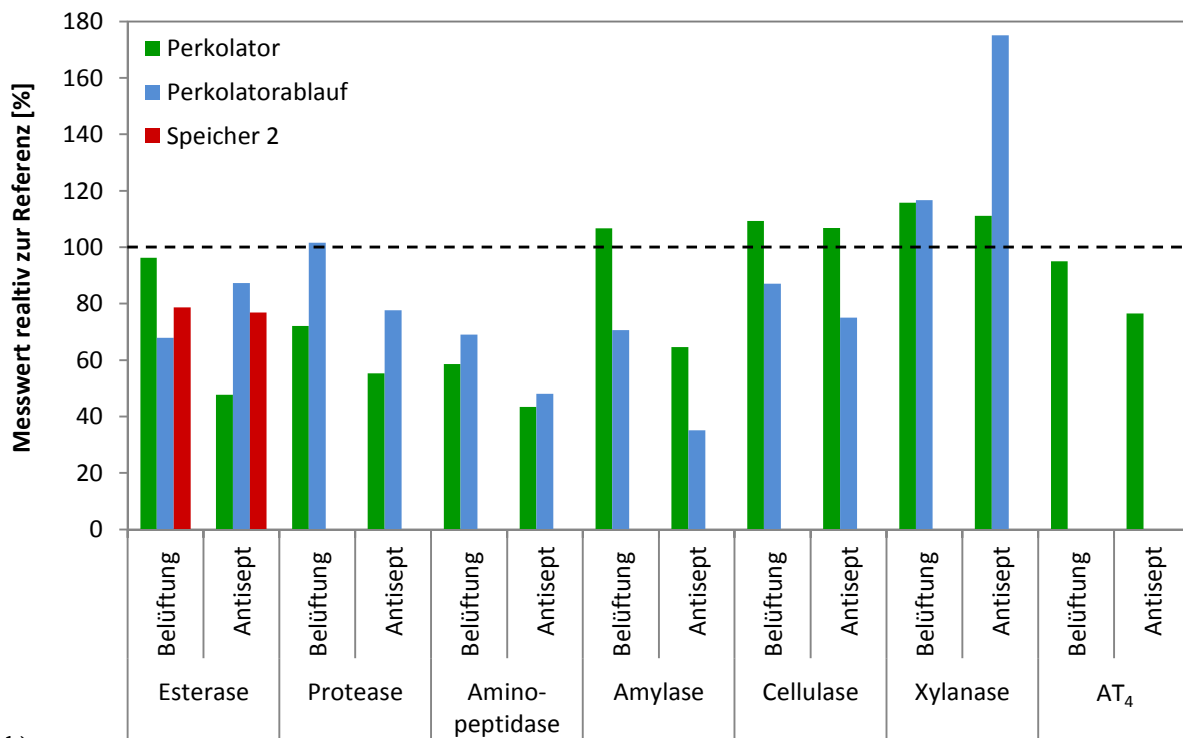
5.3.4 Modifikation des Speicher 2

Zur Vermeidung eines Energieverlustes durch abgehendes Biogas sollte bei einer offenen Hydrolysestufe, wie bspw. bei der Pilotanlage, sichergestellt werden, dass dort ausschließlich die Hydrolyse und Acidogenese stattfindet. Um zu analysieren wie die Methanogenen in der Hydrolysestufe zu unterdrücken sind, wurde in den Beprobungsphasen F3–5 einer der Zuläufe, Speicher 2, über die gesamte Versuchsdauer hinweg durch einen statischen Mischer intensiv belüftet und ein anderer diskontinuierlich mit Antisept 33, einem sauren Desinfektionsmittel, versetzt. So sollten die methanogenen Mikroorganismen weitestgehend inhibiert, die restlichen prozessfördernden Inhaltsstoffe des Zulaufes, wie bspw. freie Hydrolasen, jedoch möglichst unbeeinflusst bleiben.

In Abbildung 5-21 sind die durchschnittlichen Messwerte verschiedener Parameter relativ zur Referenz (keine Modifikation) der Beprobungsphasen F3–5 dargestellt. Die Behandlung der Speicher 2 zeigte nur geringe Auswirkungen auf den oTS-Abbau des Substrates (vgl. Abbildung 5-21a). So lag der Anteil der oTS an der TS des Ausgangsmaterials des Versuches mit belüftetem Speicher 2 bei fast 100% und der des Versuches mit Antisept-Behandlung nur 2% über dem Referenzwert. Die Abläufe der Perkolatoren zeigten einen durchschnittlichen oTS Anteil knapp unter (-2% bei Belüftung) bzw. etwas über dem der Referenz (+10% bei Antisept). Die Proben aus Speicher 2 dagegen wiesen einen leicht erhöhten (+6% bei Belüftung) bzw. erniedrigten Wert im Vergleich zur Referenz auf (-8% bei Antisept). In der mikrobiellen GZZ schlugen sich die Modifikationen der Speicher 2 deutlicher nieder. Bei dem Versuch mit



a)



b)

Abbildung 5-21: Parameterabweichung bei modifiziertem Speicher 2

Durchschnittliche Messwerte verschiedener Parameter relativ zur Referenz der Beprobungsphasen F3–5, Modifikationen: Belüftung bzw. Zugabe von Antisept 33 zu Sp 2 **a)** Biomasseparameter: Anteil oTS an TS, Gesamtzellzahl (GZZ), Verhältnis Archaea zu Bacteria, Anteil Methanobacteriaceae, Methanococcaceae, Methanomicrobiales und Methanosarcinales **b)** Aktivitätsparameter: Aktivität der Esterase, Protease, Aminopeptidase, Amylase, Cellulase sowie Xylanase und Atmungsaktivität (AT₄), analysierte Proben: Ausgangsmaterial der Perkolatoren (n = 12), Perkolatorablaufproben (n = 66) und Proben des Speicher 2 (n = 42). Der Referenzwert liegt bei 100% (gestrichelte Linie).

Belüftung betrug die GZZ der Gärreste mit 101% zwar annähernd dem Wert des Referenzversuches, bei dem Versuch mit Antisept war die Zellzahl des Gärrestes jedoch um etwa 59% reduziert. Auch die Ablaufproben der Perkolatoren wiesen bei beiden Modifikationen erniedrigte GZZ im Vergleich zur Referenz auf, 86% bei Belüftung und 66% bei Antisept-Behandlung. Die Proben der Speicher 2 zeigten eine vergleichbare Entwicklung, 86% bei Belüftung und 70% bei Antisept-Behandlung im Vergleich zum Referenzwert. Dabei nahm im Speicher 2 das Verhältnis Archaea zu Bacteria um 24% (Belüftung) bzw. 6% (Antisept) ab. Bei den Gärresten lag das Archaea:Bacteria-Verhältnis 8% unter (Belüftung) bzw. 5% über (Antisept) dem Referenzwert. Die Abläufe der Perkolatoren wiesen Werte von 4% unter (Belüftung) bzw. 5% über (Antisept) der Referenz auf. So zeigte sich schon hier, dass sich die Auswirkungen der Modifikationen des Speicher 2 nicht zwangsläufig im Perkolator bzw. dessen Ablauf niederschlagen. Die Zusammensetzung der methanogenen Biozönose im Speicher 2 hat sich durch dessen Belüftung bzw. durch die Behandlung mit Antisept 33 verändert. Bei dem Versuch des belüfteten Speicher 2 konnte eine Zunahme der Methanobacteriaceae um 21% im Vergleich zur Referenz verzeichnet werden. Der Anteil der Methanococcaceae, Methanomicrobiales und Methanosarcinales nahm hingegen um 33, 15 bzw. 42% ab. Durch die Antisept-Zugabe konnte eine Reduktion aller untersuchter Methanogener im Speicher 2 beobachtet werden. Der Anteil der Methanobacteriaceae sank auf 27%, der der Methanococcaceae auf 0%, der der Methanomicrobiales auf 24% und der Anteil der Methanosarcinales sank auf 40% im Vergleich zum Referenzwert. So konnte die bakterizide Wirkung des Antisept 33, insbesondere auf Vertreter der Methanococcaceae, bestätigt werden. Daneben wirkt Antisept 33 unspezifisch auch auf andere Mikroorganismen (Bacteria und Fungi, inkl. sporider Formen) letal (Ernst 2005), sodass es mit der Zeit zu einer Reduktion der GZZ kommt und das Archaea:Bacteria-Verhältnis nicht notwendigerweise beeinflusst wird. Jedoch wirkt Antisept 33 v. a. auch, wie in Kapitel 5.1.4 beschrieben, durch den Sauerstoffeintrag nach Zerfall des Wasserstoffperoxides und hat somit auf strikt anaerobe Mikroorganismen einen besonders stark letalen Effekt. Durch die kontinuierliche Belüftung des Speicher 2 konnte zudem eine Flockenbildung, vergleichbar den Belebtschlammflocken in Abwasserbehandlungsanlagen (Röske & Uhlmann 2005), beobachtet werden. Solche mikrobiellen Aggregate sind eine nicht an Oberflächen gebundene Biofilmform, die von mikrobiell gebildeten extrazellulären polymeren Substanzen zusammengehalten werden. In der Regel bilden sich innerhalb einer Biofilm-Flocke unterschiedliche Stoffkonzentrationen aus. So weist die Randzone höhere Substrat- und Sauerstoffkonzentrationen auf als der Kern (Steinbrenner 2011). Dies ermöglicht auch den anaeroben Mikroorganismen ein Überleben im Inneren der Flocke, sodass bei dem Versuch mit Belüftung eine geringere Reduktion der GZZ sowie der methanogenen Mikroorganismen beobachtet werden konnte. Rizzi und Kollegen (2006) beobachteten ebenso, dass nach Reduktion der Substratzufuhr eines anaeroben Schlammbedtrektors Vertreter der Methanobacteriaceae die dominanten Methanogener darstellten. In Kapitel 5.3.1, Prozessstörung durch Pumpenausfall, konnte eine ähnliche

Beobachtung gemacht werden. Da sich Methanogene aufgrund des Sauerstoffgradienten vorzugsweise im Kern der Biofilm-Flocken befinden, sind sie zwangsläufig auch dem Substratgradienten unterlegen, sodass sich womöglich deshalb die archaeelle Zusammensetzung in Richtung Methanobacteriaceae verschoben hat. Die Flockenbildung begründet auch die leicht erhöhte GZZ im Perkolator sowie die reduzierte GZZ des Ablaufes, da sich die Flocken auf dem Substrathaufen absetzen können und so weniger Zellen aus dem Perkolator gespült werden.

In Abbildung 5-21b sind die durchschnittlichen Messwerte verschiedener Aktivitätsparameter relativ zur Referenz der Beprobungsphasen F3–5 gezeigt. Durch beide Modifikationen des Speicher 2 konnte eine Reduktion der allgemeinen heterotrophen Abbauaktivität (Esteraseaktivität) festgestellt werden. Bei Belüftung des Speicher 2 nahm die mikrobielle Aktivität der Proben um durchschnittlich 21% ab. Die Esteraseaktivität des Ausgangsmaterials war um 4% vermindert und die des entsprechenden Perkolatorablaufes um 32%. Bei dem Versuch mit Antisept-Behandlung konnte eine Reduktion der Esteraseaktivität von 23% (Sp 2), 52% (Gärrest) und 13% (Perkolatorablauf) beobachtet werden. Da die Esterase prinzipiell unter aeroben und anaeroben Bedingungen eine ähnlich hohe Aktivität aufweist (Obst 1985, Frølund *et al.* 1995), ist die Verringerung der Esteraseaktivität in dieser Studie wahrscheinlich größtenteils auf die gleichzeitige Abnahme der GZZ zurückzuführen, was auch die Verminderung anderer Enzymaktivitäten erklärt. Zudem ist davon auszugehen, dass durch den Sauerstoffeintrag die Aktivität anaerober Mikroorganismen inhibiert wurde. Abgesehen von einer leichten Erhöhung der allgemeinen Proteaseaktivität des Perkolatorablaufes des Belüftungsversuches, war die proteolytische Aktivität insgesamt bei beiden Verfahrensmodifikationen verringert. In den Gärresten konnte eine Reduktion der allgemeinen Proteaseaktivität im Vergleich zur Referenz um 28% (bei Belüftung) und 45% (bei Antisept-Zugabe) festgestellt werden. Die Aktivität der Aminopeptidase wurde in diesen Proben um 41% (bei Belüftung) sowie 57% (bei Antisept-Zugabe) vermindert. Die allgemeine Proteaseaktivität des Perkolatorablaufes betrug im Versuch mit Antisept-Behandlung 78% im Vergleich zum Referenzwert. Die Aktivität der Aminopeptidase der Ablaufproben zeigte eine Verminderung auf 69% (bei Belüftung) bzw. auf 48% (bei Antisept-Zugabe). Auch Goel und Kollegen (1998) konnten bei der Analyse eines Sequencing-Batch-Reaktors (sequentiell beschickter Reaktor) unter aeroben Bedingungen eine Reduktion der proteolytischen Aktivität um 40 bis 75% im Vergleich zur Aktivität unter anaeroben Bedingungen feststellen. Die Aktivitäten der untersuchten Polysaccharasen des Ausgangsmaterials waren, mit Ausnahme von der Amylaseaktivität im Antisept-Versuch mit einer Reduktion auf 65%, alle leicht erhöht. Bei Belüftung des Speicher 2 konnte im Vergleich zum Referenzversuch eine Steigerung um 7% (Amylaseaktivität), 9% (Cellulaseaktivität) und 16% (Xylanaseaktivität) ermittelt werden. Nach Antisept-Behandlung des Speicher 2 zeigten die Gärreste eine durchschnittliche Erhöhung der Cellulase- bzw. Xylanaseaktivität um 7 bzw. 11%. Die Amylase- und Cellulaseaktivität der Ablaufproben waren bei beiden Verfahrensmodifikationen reduziert. Bei Belüftung konnte eine Ver-

minderung um 29% (Amylaseaktivität) bzw. 13% (Cellulaseaktivität) festgestellt werden. Nach Antisept-Behandlung betrug die Aktivität der Amylase des Perkolatorablaufes durchschnittlich 35% im Vergleich zur Referenz und die der Cellulase 75%. Die Xylanaseaktivitäten der Abläufe zeigten bei beiden Modifikationen im Vergleich zum Referenzwert eine Steigerung, um 17% (bei Belüftung) bzw. 75% (bei Antisept-Zugabe). Der anaerobe Cellulose- bzw. Xylan-Abbau wird vorwiegend von anaeroben Bacteria durchgeführt, wohingegen der aerobe Abbau von Cellulose und Xylan neben einigen Vertretern der Bacteria, wie *Pseudomonas* und Actinomycetes, in erster Linie durch Pilze erfolgt (Pohlschröder *et al.* 1994, Heck *et al.* 2002). Pseudomonaden sind nachweislich in den untersuchten Anlagen vorhanden (vgl. Kapitel 5.2.1.3) und auch ein Vorkommen von Pilzen ist in Biogasanlagen weit verbreitet (Rajendran *et al.* 2011, Bengelsdorf *et al.* 2012), sodass die Erhöhung der Cellulase- und Xylanaseaktivität u. a. auf diese Mikroorganismen zurückgeführt werden könnte. Die mikrobielle Atmungsaktivität (AT_4) des Ausgangsmaterials war hingegen auf 95% (bei Belüftung) bzw. auf 76% (bei Antisept-Zugabe) reduziert, sodass von einem geringeren Restgaspotential bzw. einem besseren Substratumsatz im Vergleich zur Referenz auszugehen ist.

Da die Versuche der Beprobungsphasen F3–5 v. a. dazu dienten eine mögliche Inhibierung der Biogasproduktion in der Hydrolysestufe zu analysieren, ist die kumulierte Hydrolysegasmenge, welche während der Hydrolyse im Perkolator gebildet wird, von besonderem Interesse. Durch beide Verfahrensmodifikationen konnte eine Reduktion der kumulierten Hydrolysegasmenge verwirklicht werden. So lag diese 21% (bei Belüftung) bzw. 16% (bei Antisept-Zugabe) unter dem Referenzwert. Dies steht zudem im Einklang mit den Ergebnissen, die durch die anaeroben Respirationsmessungen von Proben der entsprechenden Speicher 2 ermittelt wurden (vgl. Kapitel 5.1.4). Die kumulierte Methanausbeute in der Hydrolysestufe wurde sogar um 63% (bei Belüftung) bzw. 55% (bei Antisept-Zugabe) im Vergleich zur Referenz verringert. Gleichzeitig konnte jedoch eine Erhöhung des CO_2 -Anteils im Hydrolysegas um 205% (bei Belüftung) bzw. 9% (bei Antisept-Zugabe) beobachtet werden. Die verstärkte CO_2 -Produktion deutet darauf hin, dass ein wesentlicher Anteil des Substrates aerob veratmet wurde. Dies erklärt sich durch den starken Sauerstoffeintrag in den Perkolator durch das O_2 -gesättigte Prozesswasser nach Belüftung bzw. Antisept-Behandlung des Speicher 2. Bei der aeroben Atmung werden jedoch keine Gärungsprodukte, wie Alkohole und Säuren, gebildet, die für die Biogasproduktion essentiell sind (Röske & Uhlmann 2005). So konnte bei dem Belüftungsversuch zudem eine Reduktion der kumulierten CSB-Auswaschung von 5% ermittelt werden. Bei dem Antisept-Versuch, welcher nur eine geringe Erhöhung des CO_2 -Anteils im Hydrolysegas aufwies, betrug die kumulierte CSB-Auswaschung dagegen 109% im Vergleich zur Referenz.

So konnten durch die Verfahrensmodifikationen die Methanogenen und damit die Hydrolysegasbildung inhibiert werden, die Folge war jedoch eine erhöhte aerobe Atmungsaktivität und ein damit einhergehender Energieverlust für die Biogasbildung. Die Behandlung mit Antisept 33 erzielte zwar eine leichte

Zunahme des CSB-Ertrages, jedoch kann die Rentabilität einer solchen Verfahrensmodifikation in Bezug auf die Kostenkalkulation bezweifelt werden. Zudem fehlt eine Analyse dieser Anwendung hinsichtlich der langfristigen Auswirkungen auf die einzelnen Prozessstufen.

5.4 Überwachung der Biogasanlage mit HCH-belasteter Grassilage als Substrat

In einem mehrmonatigen Zeitraum (Beprobungsphase C5) wurde ein Testprogramm zur Verwertung von Grasaufwuchs aus HCH-kontaminierten Flächen der Muldeau bei Dessau durchgeführt.

1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (HCH) ist ein monocyclischer chlorierter Kohlenwasserstoff. Fünf stabile Stereoisomere sind im technischen HCH in nennenswerten Mengen enthalten (65–70% α -, 7–20% β -, 14–15% γ -, 6–10% δ - und 1–2% ϵ -HCH). Als Lindan wird das insektizid wirksame Produkt, in welchem mindestens 99% γ -HCH enthalten ist, bezeichnet. Bei der Herstellung von Lindan aus technischen HCH fallen pro Tonne Lindan etwa neun Tonnen Abfallisomere an. Die Anwendung von Lindan ist heute nur noch stark eingeschränkt legal (Fiedler *et al.* 1993, Klimanek *et al.* 2000, UBA 2010).

In den Jahren von 1963 bis 1982 wurde in Bitterfeld (Sachsen-Anhalt) das Insektizid Lindan produziert. Das sehr umweltgefährdende β -HCH, ein Abfallprodukt der Lindan-Erzeugung, wurde damals über den Bach Spittelwasser in den Fluss Mulde abgeleitet. Durch Überschwemmungen des Auengebietes der Mulde stromabwärts von Bitterfeld kam es wiederholt zu einer Kontamination dieser Flächen mit schadstoffbelasteten Flusssedimenten. β -HCH kann aufgrund der geringen Flüchtigkeit und Wasserlöslichkeit und des langsamen Abbaus in der Natur noch viele Jahre gefährdend wirken, weshalb belastete Flächen nur beschränkt genutzt werden können. Schon 2010 konnte in einem gemeinsamen Forschungsprojekt der Hochschule Anhalt und der Firma GICON GmbH die Reduktion von β -HCH im Biogasprozess im Labormaßstab nachgewiesen werden (Großmann *et al.* 2012, Kranert-Rydzy 2012).

In dieser Studie sollte der potentielle mikrobielle Abbau des HCH bzw. die Verwertbarkeit von HCH-kontaminierter Grassilage als Biogassubstrat untersucht werden.

Da die Auenflächen seit längerer Zeit nicht mehr gemäht wurden, war der Anteil alten trockenen Grases in der 1. Charge (Frühjahrmahd 2011) deutlich höher als bei der 2. Charge (Herbstmahd 2011). Aus diesem Grund war der Siliererfolg sehr minderwertig und der Gärprozess insuffizient. Die 1. Charge wurde daher in der Analyse zur Eignung HCH-belasteter Grassilage als Biogassubstrat nicht berücksichtigt.

5.4.1 Chemische Analysen

Die Auenflächen bei Bitterfeld gelten als die am stärksten belasteten Flussauen in Deutschland. Neben der Einleitung von Abwässern der ansässigen chemischen Industrie und der einhergehenden Belastung mit HCH-Isomeren und anderer produktionsbedingter Abfallprodukte kam es dort zudem zur Anrei-

cherung von Schadstoffen über den Sedimenteintrag aus dem Erzbergbau im Erzgebirge. Zu den relevanten Schadstoffen zählen somit u. a. auch Dioxine/Furane (polychlorierte Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane) sowie Cadmium und Arsen (Hille *et al.* 1992, Lindemann 2000, Brandt 2003). Es ist zu beachten, dass Cadmium und Arsen ab bestimmten Konzentrationen, 0,01–0,02 mg/L bzw. 0,5–1 mg/L, den mikrobiellen Substratabbau inhibieren und den Biogasprozess stören können (Mignone 2005, Chen *et al.* 2008). Auf der anderen Seite sind auch ein Abbau der Dioxine/Furane bzw. eine Mobilisation der Schwermetalle während der Fermentation möglich, sodass diese über den anaeroben Abbau aus dem ökologischen Kreislauf gelöst werden könnten (Field *et al.* 1995, Lehtomäki 2006). Ferner gelten für Schadstoffe gewisse Grenzwerte, die bei einer Ausbringung von Gärresten, z. B. als Dünger, eingehalten werden müssen. Nutzungs- und schutzgutbezogene Bodenprüfwerte nach Rippen (1984) sowie Grenzwerte für die analysierten Schadstoffe nach der aktuellen Düngemittelverordnung (DüMV 2012) sind im Anhang A-5 aufgeführt. Aus diesen Gründen wurden die genannten Schadstoffe in die chemischen Analysen miteinbezogen. Da der Milchsäuregehalt Auskunft über den Konservierungserfolg bei der Silierung gibt, gute Silagen sollten Konzentrationen im Bereich > 50 g/kg TS aufweisen (Scharf 2010), wurde auch dieser Parameter in die chemischen Analysen mitaufgenommen.

In Abbildung 5-22 sind die durchschnittlichen Stoff-Konzentrationen der Grassilagen und Gärreste dargestellt. Die Analyse der Grassilage hinsichtlich der HCH-Isomere hat ergeben, dass α -, γ -, δ - sowie ϵ -HCH in so geringen Mengen vorkamen, dass sie nicht nachweisbar waren. Die Konzentrationen lagen für alle Silageproben unter der Bestimmungsgrenze von 0,05 mg/kg TS. Die durchschnittliche β -HCH-Konzentration wies wie erwartet mit 0,7 mg/kg TS einen erhöhten Wert auf. In dieser Region wurden 1995 in Grasschnitt jedoch noch β -HCH-Konzentrationen von 3 bis 5 mg/kg TS detektiert (Schulz *et al.* 1997). Dies entspricht einer Reduktion der Schadstoffbelastung des Grases von bis zu 86%. Dabei ist jedoch ein Schadstoffabbau während der Silierung nicht auszuschließen. Da die nutzungs- und schutzgutbezogenen Bodenprüfwerte zwischen 0,2 bis 2 mg/kg TS liegen (Rippen 1984), sollte eine Nutzung der Flächen bzw. des Aufwuchses in dieser Form weiter eingeschränkt bleiben. Die vorgefundenen HCH-Konzentrationen (max. ca. 1 mg/kg Frischmasse) lagen jedoch deutlich unterhalb der Konzentrations-Grenzen, die für eine Hemmung methanogener Mikroorganismen in der Literatur genannt werden. So haben Farghaly und Kollegen (1998) eine signifikante Wirkung auf die mikrobielle Aktivität des Bodens ab einer Konzentration von 10 mg γ -HCH pro kg Boden beschrieben. Quintero und Kollegen (2006) konnten darüber hinaus nachweisen, dass die hemmende Wirkung von β -HCH sowie anderer HCH-Isomere geringer ist und die minimale Hemm-Konzentration für die Biogasbildung somit noch höher liegt, ab ca. 100 mg HCH-Isomer pro kg. Daher sollten der anaerobe Abbau bzw. die Biogasproduktion durch die HCH-Belastung der Grassilagen nicht beeinträchtigt sein. Vielmehr konnte nach der Hydrolyse des Substrates eine Reduktion des β -HCH um durchschnittlich 83%

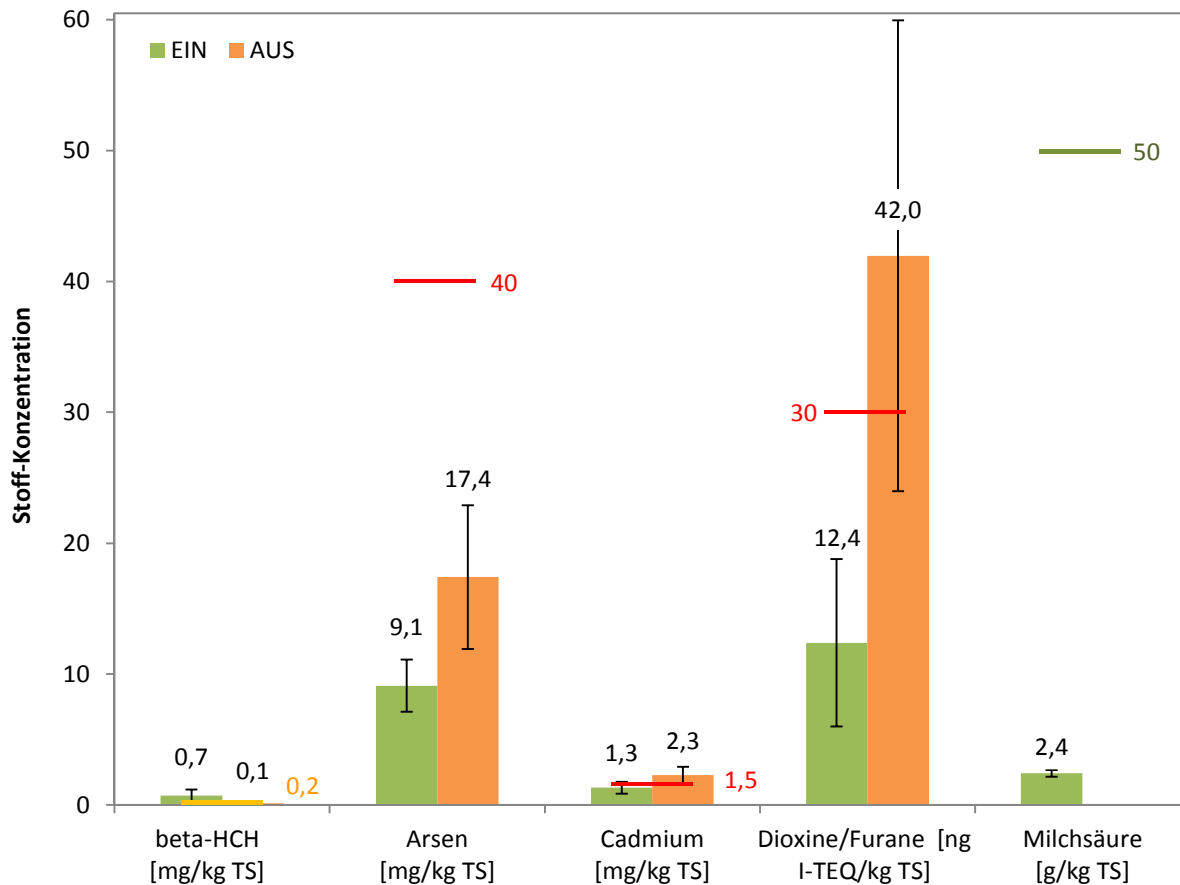


Abbildung 5-22: Stoffliche Analyse der Ein- und Ausgangsmaterialien

Durchschnittliche Messwerte verschiedener Stoff-Konzentrationen der Feststoffproben aus Charge 2 der Beprobungsphase C5 (Ein- und Ausgangsmaterial; EIN, AUS). Untersuchte Stoffe: β -HCH ($n = 9$; Einzelwerte, die unter der Bestimmungsgrenze lagen, wurden bei der Berechnung mit $0,05 \text{ mg/kg TS}$ berücksichtigt), Arsen ($n = 9$), Cadmium ($n = 9$), Dioxine/Furane ($n = 3$) und Milchsäure ($n = 7$). Nutzungs- und schutzgutbezogene Bodenprüfwerte (gelb) (Rippen 1984) sowie Grenz- (rot) (DüMV 2012) und Sollwerte (grün) (Scharf 2010) sind als horizontale Linien dargestellt. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

beobachtet werden, sodass im Mittel die β -HCH-Konzentration im Gärrest mit nur noch $0,1 \text{ mg/kg TS}$ unter den nutzungs- und schutzgutbezogenen Bodenprüfwerten nach Rippen (1984) lag. Auch konnte keine Anreicherung von HCH-Isomeren im System beobachtet werden.

Der durchschnittliche Arsengehalt der Grassilagen lag mit $9,1 \text{ mg/kg TS}$ deutlich unter dem Grenzwert nach der aktuellen Düngemittelverordnung (40 mg/kg TS). Auch die Arsenkonzentration der Gärreste befand sich mit durchschnittlich $17,4 \text{ mg/kg TS}$ unter dem Grenzwert, wies jedoch eine Erhöhung um 91% auf. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Analyse von Cadmium sowie der Dioxine/Furane gemacht werden. Die mittlere Cadmiumkonzentration der Grassilagen lag mit $1,3 \text{ mg/kg TS}$ unter dem Grenzwert nach der aktuellen Düngemittelverordnung ($1,5 \text{ mg/kg TS}$), drei von neun Silage-Proben lagen jedoch 8 bis 30% darüber. Die Gärreste wiesen im Mittel Cadmiumgehalte von $2,3 \text{ mg/kg TS}$ auf. Dies entspricht einer Erhöhung von 73% und liegt über dem Grenzwert. Messwerte für Dioxine/Furane werden aufgrund der Vielzahl an relevanten Stoffen als Internationale Toxizitätsäquivalente (I-TEQ) verglichen. Im Mittel wiesen die Grassilagen eine Dioxin-Konzentration von $12,4 \text{ ng I-}$

TEQ/kg TS auf (Maximalwert: 19,6 ng I-TEQ/kg TS). Sie lagen damit alle unter dem Grenzwert von 30 ng I-TEQ/kg TS. Die ermittelte durchschnittliche Dioxin-Konzentration der Gärreste befand sich dagegen bei 42 ng I-TEQ/kg TS und lag somit nach einer Steigerung um fast 240% über dem Grenzwert. Weitere Analysen des Prozesswassers haben ergeben, dass in der Biogasanlage eine Entfrachtung der Gräser von Arsen und Cadmium sowie Dioxine/Furane erfolgte und eine Verlagerung und Anreicherung im Prozesswasser stattfand (vgl. Anhang A-6). Somit kam es in den Gärresten zur Akkumulation dieser Schadstoffe, auch aus vorangegangenen Fermentationen der Charge 1. Lehtomäki (2006) zeigte bei ähnlichen Versuchen, dass während der Acidogenese eine Mobilisation der Schwermetalle aus dem Substrat stattfindet und sich so während dieser Phase die Möglichkeit bietet Metalle vom Hydrolysat auszufällen, um sie dann aus dem System zu entfernen. Eine geeignete Entfrachtung von Arsen und Cadmium aus den internen Kreisläufen der in dieser Studie untersuchten Biogasanlage, die auch zu einer noch weitergehenden Schadstoffreduzierung in den Gärresten führen würde, muss noch entwickelt werden. Die Prozesswasseranalysen zeigten jedoch auch, dass die Schwermetall-Gehalte teilweise über den minimalen Hemm-Konzentrationen von 0,5–1 mg/L für Arsen und 0,01–0,02 mg/L für Cadmium lagen (Mignone 2005, Chen *et al.* 2008) und sie damit zu einer Inhibierung des Biogasprozesses beigetragen haben könnten. Der mögliche anaerobe, mikrobielle Abbau der Dioxine/Furane über die reduktive Dechlorierung, die Substitution eines Chloratoms durch Wasserstoff (Bunge 2004), konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden. Vielmehr kam es trotz schlechter Wasserlöslichkeit ebenfalls zu einer Akkumulation im System.

Weiterhin war der durchschnittliche Milchsäuregehalt der Silage von 2,41 g/kg TS ein deutlicher Hinweis auf eine nur mittelmäßige Silierung – der angestrebte Gehalt liegt bei über 50 g/kg TS (Scharf 2010). So waren ein Energieverlust des Substrates während der Silierung und eine verminderte Biogasausbeute nicht auszuschließen. Ferner zeigte sich, je höher die β -HCH-Konzentration der Grassilage, desto niedriger der Milchsäuregehalt (vgl. Kapitel 5.6.1). Dies könnte auf eine Inhibierung der Milchsäurebakterien durch β -HCH hindeuten und den mäßigen Silierungserfolg erklären. Ariño und Kollegen (1993) konnten dagegen einen gesteigerten HCH-Abbau mit einer erhöhten Abundanz an Milchsäurebakterien assoziieren, sodass diese womöglich die Milchsäuregärung zugunsten des HCH-Abbaus reduzierten. Eine andere mögliche Erklärung wäre die Umsetzung der Milchsäure durch andere β -HCH-abbauende Bakterien. So konnten bspw. van Doesburg und Kollegen (2005) einen β -HCH-Abbau durch *Dehalobacter* in Cokultur mit *Sedimentibacter* sp. nachweisen bei dem Milchsäure als Elektronen-Donor fungierte. Insofern ist anzuraten die generelle Silierbarkeit der HCH-belasteten Grassilage zu überprüfen bzw. die Silierung, bspw. durch Zugabe von Additiven, zu optimieren.

Die Auswirkungen der schadstoffbelasteten Silage auf die Hydrolyse hinsichtlich verschiedener chemischer Parameter sind in Anhang A-7 veranschaulicht. Hier konnte schon zu Beginn der Hydrolyse ein stark erhöhter pH-Wert festgestellt werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass auch schon die Silage (Ein-

gangsmaterial) einen erhöhten pH-Wert aufwies, was sich durch den niedrigen Milchsäuregehalt erklären lässt. Auch der FOS/TAC-Wert war über den Beobachtungszeitraum vergleichsweise konstant und im Vergleich zur Vergärung von Maissilage in der gleichen Anlage um etwa 95% reduziert. Da ebenso der CSB einen verringerten Austrag aufwies, um 65% im Vergleich zur Fermentation der Maissilage, ist von einer geringeren Hydrolyseeffizienz mit erniedrigter Produktion an organischen Säuren auszugehen. Ob dies allein auf die Silagequalität bezüglich des Energiegehaltes zurückzuführen oder durch eine reduzierte mikrobielle Aktivität aufgrund der Schadstoffbelastung bedingt ist, soll in den folgenden Kapiteln erörtert werden.

5.4.2 Analyse der mikrobiellen Biomasse

Die Untersuchung von Biomasseparametern sollte erste Hinweise auf die Vergärbarkeit von schadstoffbelasteter Grassilage geben. Die Resultate hierzu sind nachfolgend erläutert.

5.4.2.1 Trockensubstanz

Auch hier sollten die Trockensubstanz (TS) sowie die organische Trockensubstanz (oTS) einen schnellen Überblick über den Abbaugrad des Grassilage-Substrates liefern (Ott 2001, Wiese & König 2007, Lomborg *et al.* 2009). Zur Analyse der mikrobiellen Biomasse findet dieser Parameter nur indirekt Anwendung. In Abbildung 5-23 sind die Gehalte der Trockensubstanz (TS), der organischen Trockensubstanz (oTS) sowie der Anteil der oTS an der TS der Beprobungsphase C5 (Charge 2) dargestellt.

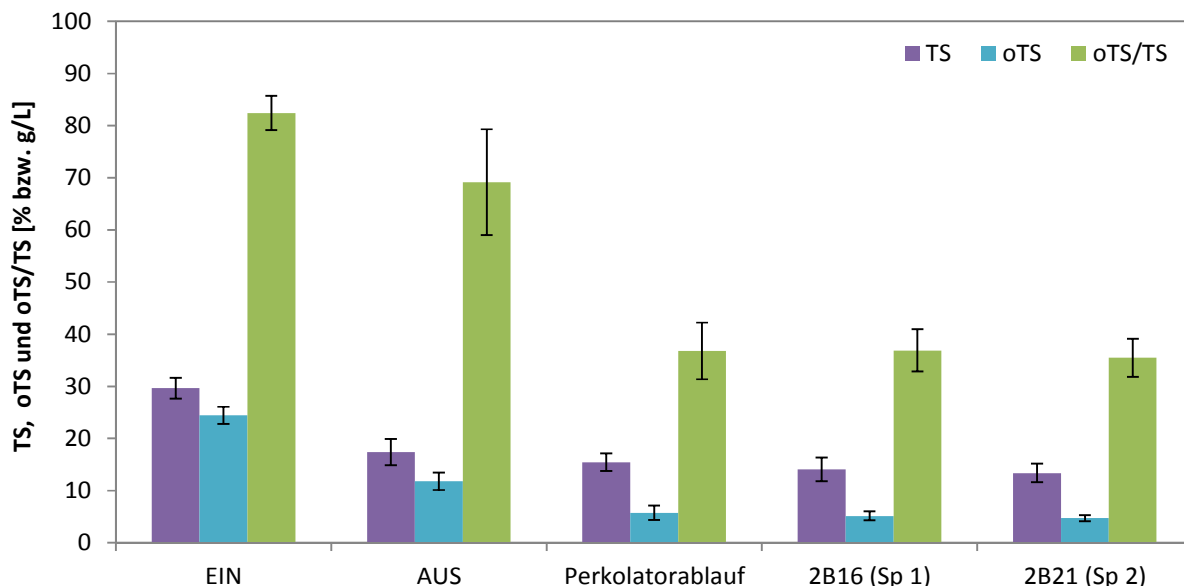


Abbildung 5-23: Trockensubstanz (TS und oTS) bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage

Durchschnittliche TS und oTS von Proben der 2. Charge der Beprobungsphase C5, analysierte Proben: Eingangsmaterial (EIN, n = 9), Ausgangsmaterial (AUS, n = 9) – jeweils in % – bzw. von Perkolatorablaufproben (n = 34), Proben aus 2B16 (Sp 1, n = 18) und 2B21 (Sp 2, n = 18) – jeweils in g/L. Der Anteil der oTS an der TS ist in % angegeben. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Der durchschnittliche TS-Gehalt des Substrates (Eingangsmaterial) lag bei 30% und damit an der unteren Grenze des optimalen Wertebereichs für Grassilage (Scharf 2010). Nach der Hydrolyse konnte eine Abnahme der TS um durchschnittlich 41% verzeichnet werden. Der Anteil der oTS reduzierte sich im Mittel von 24% im Eingangsmaterial um die Hälfte (12% im Ausgangsmaterial). Der Anteil der oTS an der TS der Feststoffe nahm im Laufe der Hydrolyse um etwa 16% ab. So konnten in den Gärresten noch im Mittel 69% oTS/TS ermittelt werden. In der Literatur werden dagegen bei der Fermentation von Grassilage in zweistufigen Biogasanlagen oTS-Abbauraten von 39% bis 60% beschrieben (Lehtomäki & Björnsson 2006, Cirne *et al.* 2007, Lehtomäki *et al.* 2008), sodass hier von einem reduzierten Abbau ausgegangen werden kann. Die Prozesswasserproben (Perkolatorablauf, Speicher 1 und 2) zeigten alle eine ähnliche Zusammensetzung. So lag der TS-Gehalt im Mittel bei etwa 14 g/L, der oTS-Gehalt bei ca. 5 g/L und der Anteil der oTS an der TS bei durchschnittlich 36%.

5.4.2.2 Gesamtzellzahl

Wie in den vorhergehenden Analysen gezeigt werden konnte, kann die mikrobielle Gesamtzellzahl (GZZ) die Biomassedynamik in Vergärungsanlagen gut widerspiegeln und gibt auch Hinweise auf Beeinträchtigungen im Biogasprozess. Daher diente sie auch bei der Untersuchung von schadstoffbelasteter Grassilage als Biomasseparameter. In Abbildung 5-24 sind die GZZ von Proben der Beprobungsphase C5 (Charge 2) illustriert.

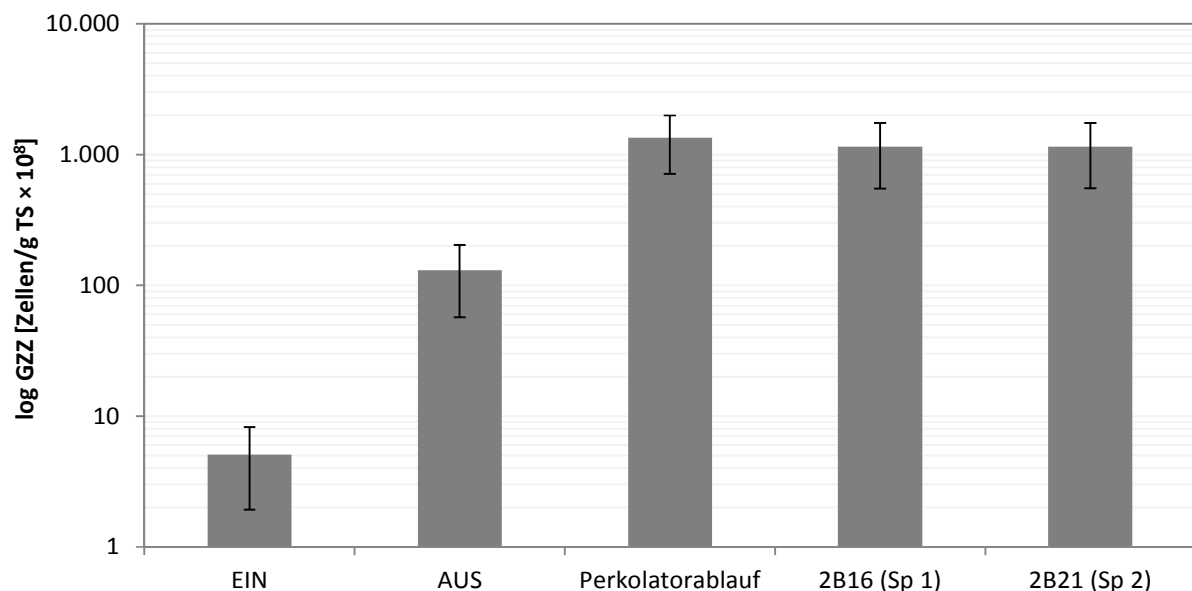


Abbildung 5-24: Gesamtzellzahl bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage

Durchschnittliche GZZ von Proben der 2. Charge der Beprobungsphase C5, analysierte Proben: Eingangsmaterial (EIN, n = 9), Ausgangsmaterial (AUS, n = 9), Perkolatorablaufproben (n = 34), Proben aus 2B16 (Sp 1, n = 18) und 2B21 (Sp 2, n = 18). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen. Logarithmische Skalierung der y-Achse.

Die durchschnittliche GZZ der Grassilagen betrug 5×10^8 Zellen/g TS und nahm bis zum Ende der Hydrolyse um das 26-fache auf im Mittel $1,3 \times 10^{10}$ Zellen/g TS im Gärrest zu. Somit ist ein deutliches Wachstum der Mikroorganismen zu verzeichnen, was auf ein hinreichend großes Nährstoffangebot zurückzuführen ist. Im Vergleich hierzu wurden jedoch bei den Fermentationen von Maissilage in der Containeranlage auf den Feststoffproben etwa achtmal höhere Gesamtzellzahlen detektiert. Dabei wies schon die GZZ der frischen Maissilage einen durchschnittlich etwa neunmal höheren Wert auf. Die GZZ der Prozesswasserproben (Perkolatorablauf, Speicher 1 und 2) lag bei durchschnittlich $1,2 \times 10^{11}$ Zellen/g TS bzw. $1,8 \times 10^9$ Zellen/mL. Hier konnten bei der Vergärung von Maissilage über fünffach höhere GZZ ermittelt werden (vgl. Kapitel 5.2.1.2). Jedoch auch Witzig (2009) konnte bei der Analyse der Vergärbarkeit verschiedener Futtermittel zeigen, dass die mittlere Gesamtzellzahl des Gärgutes mit zunehmendem Grassilageanteil bzw. sinkendem Maissilageanteil im Substrat abnahm. Dies liegt u. a. im relativ hohen Stickstoffgehalt von Grassilage begründet, der im Fermenter zu einer hohen, die Mikroorganismen hemmenden Ammoniumkonzentration führen kann (Rösch *et al.* 2006). So kann an dieser Stelle nicht zwingend von einer Hemmung der Biozönose durch enthaltene Schadstoffe ausgegangen werden.

5.4.2.3 Quantifizierung von Mikroorganismen *in situ*

Zur eingehenderen Analyse der mikrobiellen Biozönose von schadstoffbelasteten Proben wurden diese mittels FISH-Analyse phylogenetisch charakterisiert und quantifiziert.

In Abbildung 5-25 sind die durchschnittlichen Verhältnisse der Archaea zu Bacteria von Proben der Beprobungsphase C5 (Charge 2) veranschaulicht. Das Archaea:Bacteria-Verhältnis betrug bei der frischen Grassilage durchschnittlich 0,16 und nahm im Laufe der Hydrolyse um das 1,8-fache auf im Mittel 0,29 zu, was ein Hinweis auf einen fortschreitenden Substratabbau ist. Das Verhältnis lag im Gegensatz zu den Versuchen mit Maissilage als Substrat jedoch immer weit unter 1. Dies ist wahrscheinlich ebenso auf den erhöhten Stickstoffgehalt des Grases und der einhergehenden inhibierenden Wirkung des freigesetzten Ammoniums insbesondere auf die Methanogenen zurückzuführen (Karakashev *et al.* 2005). Das Verhältnis von Archaea zu Bacteria der frischen Grassilage war im Vergleich zur Maissilage jedoch leicht erhöht (etwa 1,8-fach, vgl. Kapitel 5.2.1.3). Dies ist ein weiteres Indiz für eine mangelnde Silierungseffizienz des Grases. Aufgrund der geringen Milchsäureproduktion, vgl. Kapitel 5.4.1, fand nur eine mangelnde Inhibierung der Mikroorganismen statt. Durch die somit ermöglichte Substratumsetzung konnte sich auch ein geeignetes Milieu für die Archaea entwickelt haben. Das Verhältnis der Archaea zu Bacteria betrug im Perkolatorablauf sowie im Speicher 1 durchschnittlich 0,18. Die Abnahme dieses Verhältnisses der Perkolatorablaufproben mit der Verweildauer des Substrates im Reaktor (von durchschnittlich 0,20 zu Beginn auf im Mittel 0,12 am Ende der Hydrolyse) zeigt zudem, dass mit der Zeit ein erhöhter Anteil der Archaeen auf dem Hydrolysesubstrat immobilisiert

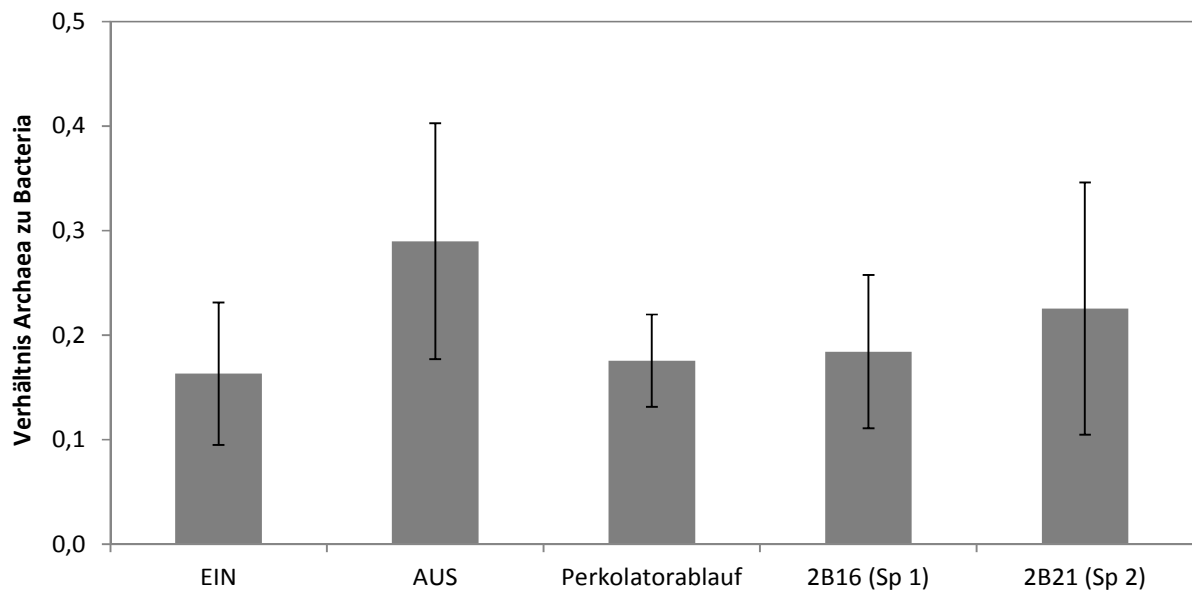


Abbildung 5-25: Archaea:Bacteria-Verhältnis bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage

Durchschnittliches Archaea:Bacteria-Verhältnis von Proben der 2. Charge der Beprobungsphase C5, analysierte Proben: Eingangsmaterial (EIN, n = 9), Ausgangsmaterial (Aus, n = 9), Perkolatorablaufproben (n = 34), Proben aus 2B16 (Sp 1, n = 18) und 2B21 (Sp 2, n = 18). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

wurde. Das Archaea:Bacteria-Verhältnis im Speicher 2 war mit durchschnittlich 0,23 leicht erhöht, was auf den vermehrten Archaeen-Anteil in den Methanreaktoren zurückzuführen ist.

Ausgewählte Proben wurden hinsichtlich der mikrobiellen Zusammensetzung detaillierter untersucht. In Abbildung 5-26 sind die Anteile der detektierten mikrobiellen Gruppen von Cellulose-Abbauern und Methanogenen an der GZZ von Proben der Beprobungsphase C5 (Charge 2) dargestellt. Wie auch schon bei der Analyse des Prozesses mit Maissilage als Substrat festgestellt wurde, nahmen Vertreter der *Clostridium* Gruppe mit durchschnittlich 29% den größten Anteil an der GZZ ein (Abbildung 5-26a). Dieser lag im Perkolatorablauf etwa 7% höher als bei den Feststoffproben. Der Anteil der Bacteroidetes sank von etwa 4% auf der frischen Grassilage auf ca. 2–3%. Die Abundanz der *Acetivibrio* Gruppe betrug durchschnittlich 9% und die der Pseudomonadaceae 12%. In den analysierten Proben konnten somit etwa 53% der Mikroorganismen phylogenetisch zugeordnet werden. Bei der Analyse des Prozesses mit Maissilage als Substrat wurden hingegen bis zu 77% der Zellen durch die verwendeten FISH-Sonden erfasst. Bei dem Abbau des hier eingesetzten Substrats (Grassilage) ist demnach eine Vielzahl weiterer, an dieser Stelle nicht berücksichtigter, mikrobieller Vertreter beteiligt. Wang und Kollegen (2010) detektierten bspw. mittels 16S rRNA Sequenzanalysen, in einem ähnlichen System im Labormaßstab mit Grassilage als Substrat, neben Vertretern der Clostridia und Bacteroidetes auch einige mikrobielle Vertreter der Actinobacteria sowie der α -, β - und γ -Proteobacteria. Dabei konnten u. a. nahe Verwandtschaften zu Wasserstoff-oxidierenden Bakterien, wie *Alcaligenes* und *Hydrogenophaga*, oder dem Nitrat-reduzierenden Bakterium *Achromobacter insolitus* ermittelt werden.

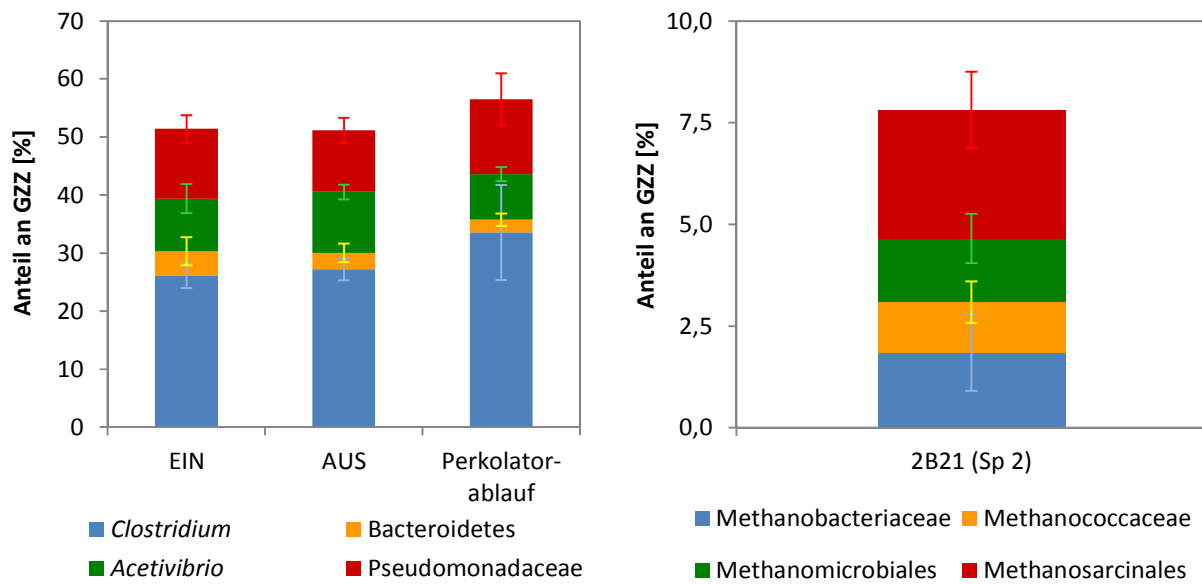


Abbildung 5-26: Anteile verschiedener Mikroorganismengruppen bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage

Durchschnittliche Anteile mikrobieller Gruppen von Proben der 2. Charge der Beprobungsphase C5, analysierte Proben: Eingangsmaterial (EIN, n = 9), Ausgangsmaterial (AUS, n = 9), Perkolatorablaufproben (n = 12) und Proben aus 2B21 (Sp 2, n = 18). **a)** Anteile von Vertretern der *Clostridium* Gruppe, der Bacteroidetes, der *Acetivibrio* Gruppe und Pseudomonadaceae an der GZZ. **b)** Anteile von Vertretern der Methanobacteriaceae, der Methanococcaceae, der Methanomicrobiales (Methanomicrobiaceae, -corpusculaceae und -planaceae) und der Methanosarcinales an der GZZ. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Der Speicher 2 wurde weiterhin hinsichtlich der Abundanz methanogener Mikroorganismen untersucht (Abbildung 5-26b). Der Anteil der Methanobacteriales sowie der Methanomicrobiales lag jeweils durchschnittlich bei 2% an der GZZ. Die Methanococcaceae waren mit etwa 1% vertreten und die Methanosarcinales mit ca. 3%. Damit betrug der Anteil der hydrogenotrophen etwa 5% und der der acetoklastischen Methanogenen ca. 3%. Insgesamt war die Abundanz der Methanogenen dieser Proben im Vergleich zum Prozess mit Maissilage als Substrat um etwa die Hälfte reduziert. Einige Monate zuvor fand jedoch im Rahmen der Beprobungsphase C4 eine Entleerung der Methanreaktoren statt, im Zuge dessen überschüssiger Bioschlamm entfernt und die Füllkörper gewaschen wurden und sich daraufhin die Biozönose der Methanstufe im Prozess der Entwicklung befand. Ein direkter Vergleich der Methanstufe ist an dieser Stelle daher schwierig. Merlino und Kollegen (2012) untersuchten die Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur während der anaeroben Vergärung verschiedener Substrate in Batch Tests. Sie konnten bei Proben mit Gras als Substrat sowohl mittels DGGE- als auch qPCR-Analyse ebenfalls eine große Abundanz an Methanosarcinales nachweisen. Wang und Kollegen (2010) detektierten mittels 16S rRNA Sequenzanalysen im Gegensatz dazu zum Großteil Methanobacteriales und nur einen sehr geringen Anteil an Methanosarcinales in einem vergleichbaren System im Labormaßstab.

5.4.3 Analyse mikrobieller Aktivität und Funktionspotentiale

Nachdem die Untersuchungen zur mikrobiellen Biomasse keine eindeutigen Anzeichen für eine reduzierte Hydrolyse durch die Schadstoffbelastung der Grassilage gaben, wurde im Folgenden der Einfluss auf die mikrobielle Aktivität analysiert.

5.4.3.1 Allgemeine heterotrophe Abbauaktivität

In den vorangegangenen Analysen hat sich gezeigt, dass sich die Esteraseaktivität auch in Biogasanlagen gut zur Analyse der allgemeinen mikrobiellen Aktivität eignet und die Abbauaktivität charakterisiert. So wurde sie auch zur Untersuchung der Vergärbarkeit von schadstoffbelasteter Grassilage eingesetzt.

In Abbildung 5-27 ist die Esteraseaktivität von Perkolator- und Prozesswasserproben von Proben der Beprobungsphase C5 (Charge 2) gezeigt.

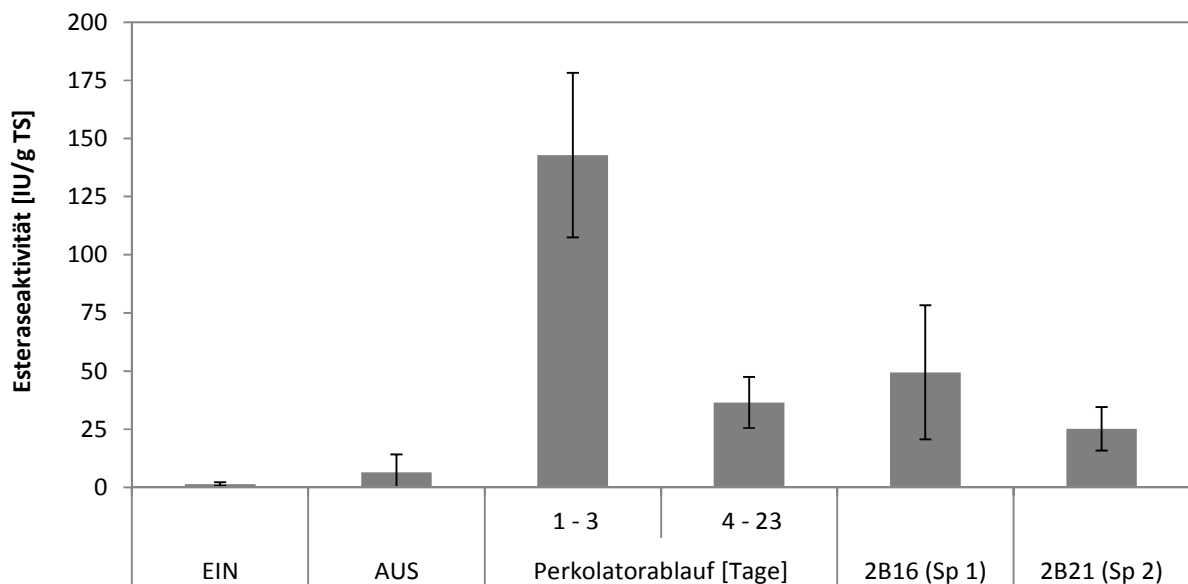


Abbildung 5-27: Esteraseaktivität bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage

Durchschnittliche Esteraseaktivität von Proben der 2. Charge der Beprobungsphase C5, analysierte Proben: Eingangsmaterial (EIN, n = 9), Ausgangsmaterial (AUS, n = 9), Perkolatorablaufproben (n = 34), Proben aus 2B16 (Sp 1, n = 18) und aus 2B21 (Sp 2, n = 18). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Die Esteraseaktivität des Eingangsmaterials betrug im Mittel 1,4 IU/g TS. Dieser Wert ist über siebenmal höher als der in dieser Studie für qualitativ gute Maissilage ermittelte Wert (vgl. Kapitel 5.2.2.1). Nach der Hydrolyse der Grassilage wurde für die Feststoffproben, im Gärrest, eine Esteraseaktivität von durchschnittlich 6,4 IU/g TS detektiert. Dies entspricht einer Erhöhung um etwa dem Vierfachen des Eingangsmaterial-Wertes. Bei der Hydrolyse von Maissilage konnte hingegen ein Anstieg um das Achtfache verzeichnet werden. Dies deutet darauf hin, dass die untersuchte Grassilage insgesamt einen reduzierten Energiegehalt aufwies. So war auch in den Abläufen der Perkolatoren eine Abnahme der Esteraseaktivität mit der Zeit zu verzeichnen. Während der ersten drei Tage der Hydrolyse betrug die mikrobielle Aktivität im Perkolatorablauf im Mittel 143 IU/g TS. Im Verlauf der weiteren Hydrolyse

nahm sie auf durchschnittlich 36,5 IU/g TS ab. Im Speicher 1 betrug die durchschnittliche Esteraseaktivität 49,4 und im Speicher 2 lag sie bei 25,2 IU/g TS. Auch hier wiesen die Prozesswasserproben bei der Vergärung von Maissilage in der Anlage eine vielfach höhere Esteraseaktivität auf, von im Mittel 345 IU/g TS. Die vorliegenden Enzymaktivitäten, insbesondere die erhöhte mikrobielle Aktivität des Eingangsmaterials, lassen jedoch nicht auf eine generelle Inhibierung der Mikroorganismen durch die enthaltenen Schadstoffe schließen.

5.4.3.2 Spezifische Hydrolaseaktivitäten

Zur differenzierteren Analyse der mikrobiellen Abbauaktivität wurde die Aktivität spezifischer Hydrolasen untersucht. Da in vorangegangenen Untersuchungen (Kapitel 5.2.2.2) festgestellt wurde, dass, aufgrund der hohen Abundanz von mikrobiellen Enzymen, die proteolytische Aktivität nicht zwangsläufig die genaue Hydrolyserate des Substrates wiedergibt, wurde auf die Analyse der proteolytischen Aktivität an dieser Stelle verzichtet. Zumal ferner Grassilage keine Stärke enthält, wurde ebenso keine Analyse der Amylaseaktivität durchgeführt.

In Abbildung 5-28 ist die Cellulase- und Xylanaseaktivität von Perkolator- und Prozesswasserproben von Proben der Beprobungsphase C5 (Charge 2) veranschaulicht.

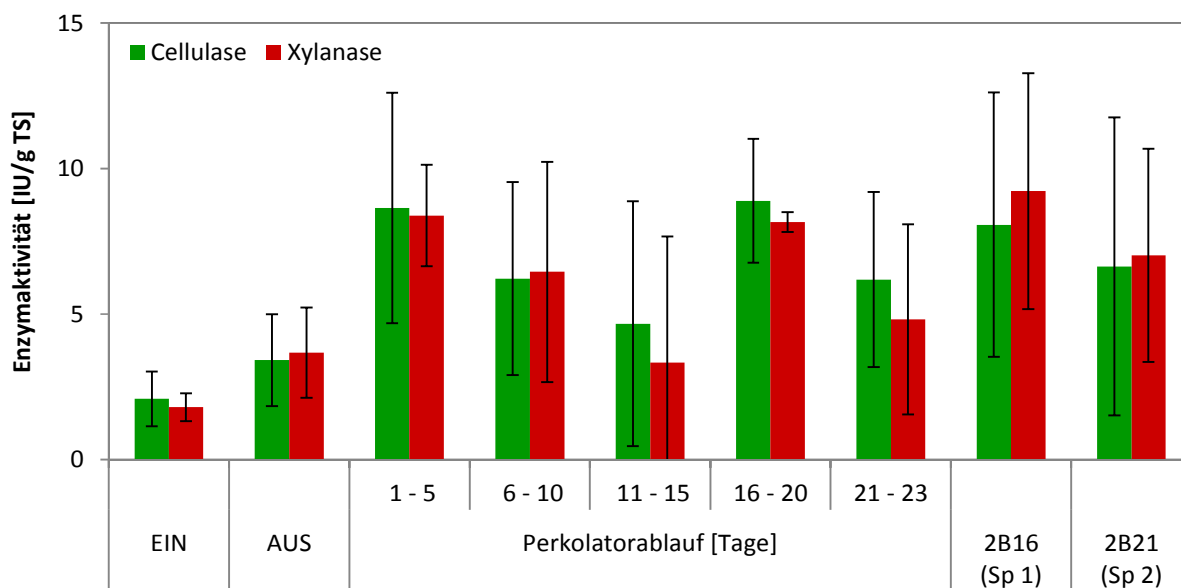


Abbildung 5-28: Cellulase- und Xylanaseaktivität bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage

Durchschnittliche Cellulase- und Xylanaseaktivität von Proben der 2. Charge der Beprobungsphase C5, analysierte Proben: Eingangsmaterial (EIN, n = 9), Ausgangsmaterial (AUS, n = 9), Perkolatorablaufproben (n = 34), Proben aus 2B16 (Sp 1, n = 18) und aus 2B21 (Sp 2, n = 18). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Die Cellulase- und Xylanaseaktivitäten der entsprechenden Proben wiesen jeweils einen vergleichbaren Wert auf. Im Mittel lag die Enzymaktivität der untersuchten Polysaccharasen des Eingangsmaterials bei 1,9 IU/g TS, und ähnelt damit der von frischer Maissilage, und die des Gärrestes bei 3,5 IU/g TS.

Dieser Wert ist etwa 21% höher als die Enzymaktivität des Maissilage-Gärrestes in dieser Studie (vgl. Kapitel 5.2.2.2) und weist auf eine verlangsamte Hydrolyse hin. So konnte im Gegensatz zu den Versuchen mit Maissilage auch in den Perkolatorablaufproben noch gegen Ende der Verweildauer (Tag 16 bis 20) eine erhöhte Enzymaktivität von durchschnittlich 8,5 IU/g TS festgestellt werden. Im Speicher 1 lag die durchschnittliche Enzymaktivität der untersuchten Polysaccharasen bei 8,6 IU/g TS und die des Speicher 2 betrug 6,8 IU/g TS. Auch die Enzymaktivität dieser Proben lag 40 bis 81% über den Werten, die bei den Versuchen mit Maissilage ermittelt werden konnten. Dies zeigt, dass der Abbau der untersuchten Polysaccharide in den Perkolatoren womöglich unvollständig war und daher zumindest teilweise in nachgeschaltete Anlageneinheiten verlagert wurde. Da es sich bei der untersuchten Anlage um ein geschlossenes System handelt, wurden die ausgespülten Hydrolasen den Perkolatoren teilweise wieder zurückgeführt, sodass wiederum hierdurch eine Förderung der Substratumsetzung anzunehmen ist. Wie in Kapitel 5.2.2.2 erläutert, scheinen die enzymatischen Aktivitätsprofile stark von der Art des Substrates sowie von dessen Form bzw. der Länge der Substratfasern abhängig zu sein (Mshandete *et al.* 2006). So zeigten auch die analysierten Hydrolasen bei der Untersuchung der Hydrolyse von Kartoffelabfällen von Parawira und Kollegen (2005) noch nach 30 bis 50 Tagen eine erhöhte Aktivität. Eine Kürzung der Grashalme, deren Länge in den vorliegenden Untersuchungen 20 bis 30 cm betrug, könnte daher zu einer Erhöhung der Hydrolyserate bzw. einem verbesserten Substratumsatz führen. Aufgrund der insgesamt hohen Enzymaktivitäten, insbesondere auch der des frischen Substrates, kann ebenso an dieser Stelle nicht von einer grundsätzlichen Hemmung der Biozönose durch enthaltene Schadstoffe ausgegangen werden.

5.4.3.3 Mikrobielle Atmungsaktivität

Zur Analyse der aeroben mikrobiellen Atmungsaktivität von Feststoffproben, die einerseits Aussagen über den potentiellen aeroben Abbau der frischen Silage zulässt und andererseits das Restgaspotential der Gärreste angibt, diente in dieser Arbeit die Atmungsaktivität nach vier Tagen (AT_4).

In Abbildung 5-29 sind die durchschnittlichen Atmungsaktivitäten (AT_4) der Perkolatorproben der Beprobungsphase C5 (Charge 2) dargestellt. Besonders auffällig waren hier die erhöhten Werte der AT_4 der frischen Grassilage, im Mittel 66 mg O_2 /g TS. Dies weist auf einen schlechten Silierungserfolg mit erhöhter mikrobieller Aktivität hin. Im Vergleich hierzu lagen bspw. die Werte der AT_4 von verschiedenen frischen Maissilagen dieser Studie bei im Mittel 29 mg O_2 /g TS (vgl. Kapitel 5.2.2.3). Die biologische Stabilitätsgrenze liegt bei einer AT_4 von maximal 5 mg O_2 /g TS (AbfabIV 2001, Teglia *et al.* 2011). Biologische Stabilität bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Substrat nicht durch enthaltene Mikroorganismen umgesetzt wird. Da die Silierung der Konservierung von Substraten dient, indem die mikrobielle Aktivität inhibiert wird, sollte auch eine hochwertige Silage zur Biogasgewinnung

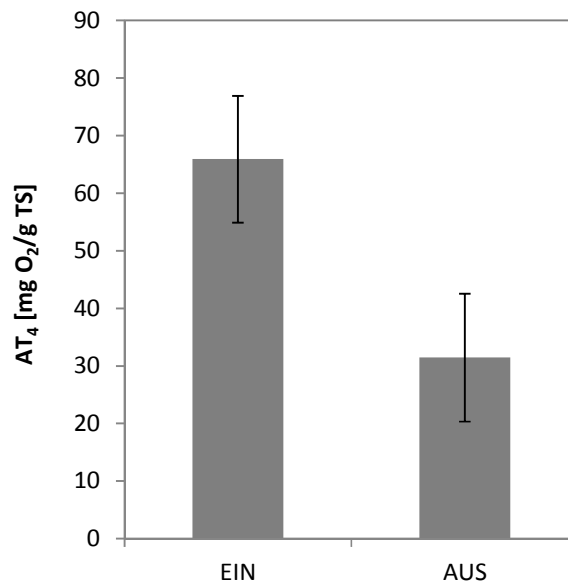


Abbildung 5-29: Atmungsaktivität nach vier Tagen bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage
Durchschnittliche Atmungsaktivität (AT₄) von Proben der 2. Charge der Beprobungsphase C5, analysierte Proben: Eingangsmaterial (EIN, n = 9) und Ausgangsmaterial (AUS, n = 9). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

eine möglichst geringe AT₄ aufweisen. In diesem Fall bedeutet dies, dass vermutlich schon während des Silierungszeitraums ein mikrobieller Substratabbau stattgefunden hat, was zu einer Reduzierung des Energiegehaltes der Silage führte und einen geringeren Biogasertrag erwarten lässt. Dies ist jedoch auch ein Hinweis auf einen potentiellen mikrobiellen HCH-Abbau schon während der Silagelagerung. Nichtsdestotrotz konnte ein Substratabbau über die AT₄ innerhalb der Versuchsdauer festgestellt werden. So lag die mittlere AT₄ der Gärreste, das Restgaspotential, bei nur noch 31 mg O₂/g TS und somit deutlich unter den Messwerten, die im Normalfall die Gärreste der Maissilage aufwiesen (Ø 63 mg O₂/g TS). Da insbesondere die frische Silage eine vergleichsweise hohe Atmungsaktivität aufwies, scheinen die enthaltenen Schadstoffe die Mikroorganismen nicht außergewöhnlich zu inhibieren. Vielmehr liegen die erhobenen Werte der AT₄ in einem Bereich, der auch schon in anderen Studien zur anaeroben Vergärung für verschiedene Substrate ermittelt wurde (Arnold 2009, Deublein & Steinhauser 2011, Binner *et al.* 2012) (vgl. auch Kapitel 5.2.2.3).

Der Biologische Sauerstoffbedarf in fünf Tagen (BSB₅) gibt die Menge an Sauerstoff an, die zum biotischen Abbau in einer Flüssigkeit vorhandener organischer Stoffe unter standardisierten Bedingungen innerhalb von fünf Tagen benötigt wird. Insbesondere dient der Biologische Sauerstoffbedarf als Parameter zur Beurteilung der organischen Belastung von Abwasser (Röske & Uhlmann 2005). Der BSB₅ diente in dieser Arbeit zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit der organischen Verbindungen im Prozesswasser der untersuchten Biogasanlage.

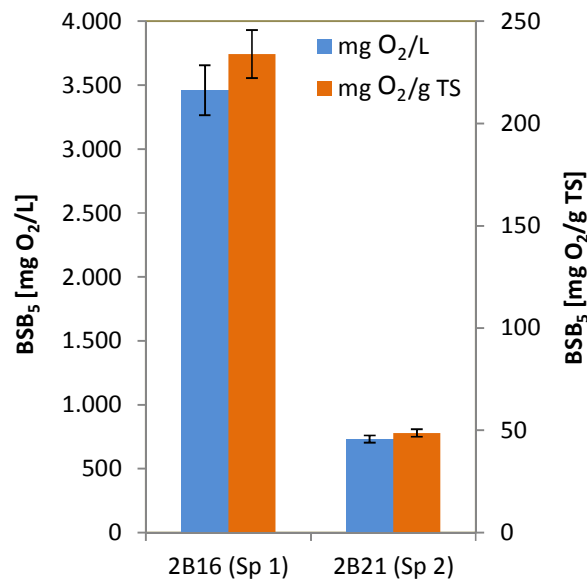


Abbildung 5-30: Biologischer Sauerstoffbedarf bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage
 Durchschnittlicher Biologischer Sauerstoffbedarf (BSB₅) von Prozesswasserproben (2B16 und 2B21, je n = 18). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

In Abbildung 5-30 sind die durchschnittlichen Werte des BSB₅ der Prozesswasserproben der Beprobungsphase C5 (Charge 2) gezeigt. Der durchschnittliche BSB₅ des Speicher 1 betrug 3.461 mg O₂/L (\pm 234 mg O₂/g TS) und der des Speicher 2 732 mg O₂/L (\pm 49 mg O₂/g TS). Die biologisch abbaubare organische Fracht lag wie auch schon der CSB (vgl. Kapitel 5.2.2.1) um ein Vielfaches höher als in Prozesswasserproben von Kläranlagen. Steinbrenner (2011) ermittelte z. B. BSB₅-Werte von 87 bis 260 mg O₂/L in Zulaufproben und 4 bis 9 mg O₂/L in Ablaufproben kommunaler Kläranlagen. Das entspricht etwa 3% des durchschnittlichen BSB₅ in dieser Studie. In anderen Gärssystemen konnten hingegen für ähnliche Prozessproben BSB₅-Werte von ca. 700 bis zu über 40.000 mg O₂/L bestimmt werden (Liu *et al.* 2003, Ağdağ & Sponza 2005, Kerga 2011). Von besonderem Interesse ist an dieser Stelle jedoch auch der BSB₅-Abbau, der in den Methanreaktoren stattfand. Der Vergleich des BSB₅ vor und nach den Methanreaktoren (Sp 1 bzw. Sp 2) diente hierbei als Maß für den mikrobiellen Kohlenstoffumsatz in der Methanstufe. Dieser war mit im Mittel 71% vergleichsweise niedrig, was sich auch mit einer relativ geringen Biogasproduktion von durchschnittlich 3,7 Nm³/d deckte – etwa 4% der Biogasproduktion der Beprobungsphasen C1 und C3. Wie in Kapitel 5.4.2.3 erwähnt, kann dies jedoch auch auf die einige Monate zuvor im Zuge der Beprobungsphase C4 stattgefundenen Entleerung der Methanreaktoren zurückzuführen sein. Nach dem Waschen der Füllkörper musste sich der Biofilm zunächst neu bilden, die Biozönose befand sich noch im Prozess der Entwicklung und hatte wahrscheinlich noch nicht ihr volles Abbau- bzw. Biogasbildungspotential entfaltet. In anderen Studien konnten für die Methanstufe BSB₅-Abbauraten von 80 bis 90% (Pipyn *et al.* 1979, Rajesh *et al.* 1999,

Rao *et al.* 2010) ermittelt werden. Ein weiterer aussagekräftiger Parameter stellt das Verhältnis BSB_5/CSB dar. Durch dieses wird der Anteil biologisch abbaubarer Verbindungen (BSB_5) an der Gesamtheit chemisch oxidierbarer Substanzen (CSB) charakterisiert. Dabei gilt eine Substanz als biologisch leicht abbaubar, wenn das Verhältnis BSB_5/CSB größer oder gleich 0,5 ist (Mutamim *et al.* 2012). Im Zulauf der Methanstufe lag der Anteil biologisch abbaubarer Verbindungen bei durchschnittlich 39% ($BSB_5/CSB = 0,39$), im Ablauf betrug er im Mittel 9% ($BSB_5/CSB = 0,09$). Der verhältnismäßig niedrige BSB_5/CSB -Quotient des Zulaufs der Methanstufe zeigt, dass die leicht abbaubaren organischen Kohlenstoffverbindungen schon zuvor in der Hydrolysestufe umgesetzt wurden. In der Methanstufe wurden durchschnittlich 76% der biologisch schwer abbaubaren organischen Fracht umgewandelt, sodass von einer generellen Funktionstüchtigkeit der Methanstufe ausgegangen werden kann.

5.4.4 Potentieller mikrobieller β -HCH-Abbau in Biogasanlagen

Wie in den vorangegangenen Kapiteln (5.4.2 bis 5.4.3) erläutert, konnte kein Hinweis zur Inhibierung der Mikroorganismen aufgrund des schadstoffbelasteten Substrates ermittelt werden. Vielmehr zeigten die chemischen Analysen (Kapitel 5.4.1) einen Abbau des β -HCH um durchschnittlich 83% nach der Hydrolyse der Grassilage. Prinzipiell eignet sich daher auch die schadstoffbelastete Grassilage als Biogassubstrat, wobei zur Erhaltung des Energiegehaltes des frischen Grases der Silierungsprozess zu optimieren ist.

Der HCH-Abbau kann abiotisch und biotisch erfolgen. Der abiotische Abbau von β -HCH ist jedoch sehr gering. β -HCH wird unter neutralen Bedingungen weder oxidiert noch hydrolysiert und ist gegen Luft, Feuchtigkeit sowie starke Säuren beständig. Nur in alkalischem Milieu reagiert β -HCH minimal unter spontaner Dehydrochlorierung. Das photolytische Reaktionsvermögen von β -HCH ist unter natürlichen Bedingungen ebenso gering. Zudem stellt β -HCH das thermodynamisch stabilste der HCH-Isomere dar. HCH-Isomere können zuerst bei Temperaturen über 100 °C thermisch zersetzt werden (Fiedler *et al.* 1993).

Da der abiotische HCH-Abbau als vernachlässigbar gering einzuschätzen ist, ist an dieser Stelle von einem mikrobiellen β -HCH-Abbau auszugehen. Dieser kann unter aeroben und anaeroben Bedingungen geschehen.

Der aerobe Abbau von β -HCH erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden hydrolytischen Dechlorierungsreaktionen. Im ersten Schritt wird β -HCH zu 2,3,4,5,6-Pentachlorocyclohexanol transformiert und im zweiten Schritt erfolgt die Umwandlung weiter zu 2,3,5,6-Tetrachlorocyclohexanediol. Dabei wird die Reaktion beider Schritte durch die haloalkane Dehalogenase LinB katalysiert. Lin bezeichnet hierbei Enzyme, die am Abbau von Lindan beteiligt sind (Lal *et al.* 2010). Dieser Abbauweg konnte für einige Mikroorganismen nachgewiesen werden (vgl. Anhang A-8). Auch in Boden- und Schlammproben wurde der aerobe Abbau von β -HCH, wenn auch in geringen Umsatzraten, wiederholt beobachtet

(MacRae *et al.* 1984, Zimmermann 2008). Murthy und Manonmani stellten bei ihren Analysen zum HCH-Abbau mittels eines mikrobiellen Konsortiums fest, dass der Abbau von β -HCH im neutralen pH-Bereich am effizientesten ist (Murthy & Manonmani 2007).

Unter anaeroben Bedingungen und einem möglichst niedrigen Redoxpotential erfolgt der Abbau von β -HCH über zwei Dechlorierungsreaktionen – zuerst zu δ -3,4,5,6-Tetrachlorocyclohexen und dann zu 5,6-Dichloro-1,3-cyclohexadien, einem instabilen Zwischenprodukt. Darauf folgt entweder eine weitere Dechlorierungsreaktion zu Benzen oder eine Dehydrochlorierungsreaktion zu Chlorobenzen. Beide stellen unter methanogenen Bedingungen stabile Endprodukte dar. Diese Metabolite können danach aerob oder anaerob weiter mineralisiert werden. Die beschriebenen Reaktionen werden scheinbar über bislang noch nicht weiter spezifizierte reduktive Dehalogenasen katalysiert (Middeldorp *et al.* 1996, van Eekert *et al.* 1998, Phillips *et al.* 2005). Der anaerobe Abbau kann sowohl von strikten Anaerobiern als auch von fakultativen Anaerobiern erfolgen, indes letztere ihre Fähigkeit zum zügigen HCH-Abbau nur unter anaeroben Bedingungen entwickeln (Zimmermann 2008). Bisher konnte allerdings nur wenigen Mikroorganismen der reduktive Abbau von β -HCH nachgewiesen werden (vgl. Anhang A-8). Jedoch wurde in Boden- und Schlammproben der anaerobe Abbau von β -HCH schon mehrfach belegt (MacRae *et al.* 1984, Buser & Müller 1995, Middeldorp *et al.* 1996, van Eekert *et al.* 1998, Quintero *et al.* 2005).

Da der hier untersuchte Biogasanlagentyp auch Einheiten aufweist, die mit Sauerstoff in Kontakt kommen (Hydrolysatzwischenspeicher sowie Speicher 1 und 2), sind prinzipiell beide Abbauewege möglich. Der aerobe Abbau von β -HCH ist jedoch meist sehr langsam bzw. die Abbaurate unter anaeroben Bedingungen erhöht (Fiedler *et al.* 1993, Zimmermann 2008), sodass bei der in dieser Arbeit ermittelten β -HCH-Abbaurate von 83% innerhalb von durchschnittlich 21 Tagen von einem größtenteils anaeroben Abbau auszugehen ist. Auch konnten in den analysierten Proben eine hohe Abundanz an Clostridia (durchschnittlicher Anteil der *Clostridium* Gruppe an der GZZ: 29%, vgl. Kapitel 5.4.2.3) detektiert werden, von der bislang drei Vertreter als β -HCH-Abbauer unter anaeroben Bedingungen bekannt sind (vgl. Anhang A-8). Diese konnten weiterhin in anderen Vergärungsanlagen nachgewiesen werden – *Clostridium butyricum* (Delbès *et al.* 2000, Sousa *et al.* 2007), *C. pasteurianum* (Souidi 2008) und *C. sphenoides* (Wenzel 2002). So ist der anaerobe mikrobielle β -HCH-Abbau in dieser Studie durch bspw. Vertreter der *Clostridium* Gruppe potentiell möglich.

Middeldorp und Kollegen (1996) wiesen zum ersten Mal einen effizienten Abbau von β -HCH unter anaeroben Bedingungen inklusive der Detektion der spezifischen Abbauprodukte nach. Dabei wurden nach 49 Tagen 67% des β -HCH zu Chlorobenzen und etwa 19% zu Benzen umgesetzt. Van Eekert und Kollegen (1998) beobachteten in einem ähnlichen Versuch nach 30 Tagen einen 60 bis 73%igen β -HCH-Abbau zu Chlorobenzen und Benzen ohne eine Inhibierung der methanogenen Aktivität. Dabei zeigten sie zudem, dass solch hohe Umsatzraten durch ein stark negatives Redoxpotential und hohe

Biomassekonzentrationen ermöglicht werden, auch ohne eine vorherige Anreicherung von dechlorierenden Mikroorganismen. Quintero und Kollegen (2005) untersuchten den anaeroben Abbau von β -HCH in Faulschlamm und aufgeschlämmten Bodenproben. Dabei wurde β -HCH erst nach 102 Tagen vollständig abgebaut, was sie sich u. a. durch die geringe Menge an eingesetzter Biomasse in ihren Versuchen erklärten.

Aber auch ein teilweiser aerober β -HCH-Abbau durch bspw. Pseudomonaden wäre denkbar. So beobachteten mehrere Wissenschaftler einen α -HCH-Abbau durch verschiedene *Pseudomonas*-Spezies (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. diminuta*) (Kumar *et al.* 2005, Murthy & Manonmani 2007, Singh *et al.* 2007, Elcey & Kunhi 2009). Wie in Kapitel 5.4.2.3 erläutert betrug der durchschnittliche Anteil der Pseudomonadaceae in dieser Studie immerhin 12%. Zudem konnten in anderen anaeroben Systemen mehrfach auch mikrobielle Vertreter der Actinobacteria sowie der α -, und γ -Proteobacteria sowie Bacilli detektiert werden, zu denen u. a. verschiedene β -HCH-abbauende *Sphingobium*-, *Sphingomonas*-, *Xanthomonas*-, *Microbacterium*- sowie *Arthrobacter*-Spezies zählen (vgl. Anhang A-8) (Klocke *et al.* 2007, Wang *et al.* 2010, Nelson 2011).

Um den mikrobiellen β -HCH-Abbau in Biogasanlagen weiter zu verifizieren, könnten in zukünftigen Studien bekannte β -HCH-abbauende Mikroorganismen bzw. die spezifischen Stoffwechsel-Gene, soweit bekannt, molekularbiologisch detektiert werden. Außerdem könnte der mikrobielle β -HCH-Abbau indirekt über die Bestimmung von β -HCH-Abbauprodukten (2,3,4,5,6-Pentachlorocyclohexanol und 2,3,5,6-Tetrachlorocyclohexanediol bzw. δ -3,4,5,6-Tetrachlorocyclohexen, Chlorobenzen und Benzen) erfolgen. Weiterhin könnten aus einer Anlage mit HCH-kontaminiertem Substrat Mikroorganismen isoliert und im Labormaßstab bezüglich des β -HCH-Abbaus untersucht werden.

5.5 Analyse des Biofilms auf den Füllkörpern der Methanstufe

Für eine effiziente Biogasproduktion in der Methanstufe ist eine ausgewogene mikrobielle Biozönose mit hoher Aktivität essentiell. Bei dem untersuchten zweistufigen Anlagentyp dienten Füllkörper (FK) im Methanreaktor als Aufwuchsfläche für die Mikroorganismen der dritten und vierten Prozessphase. Da die acetogenen bzw. syntrophen Bakterien und methanogenen Archaeen eine lange Generationszeit aufweisen (Yang & Okos 1987, Schink 1997), schützt die Immobilisierung auf den Füllkörpern die Mikroorganismen so vor dem Ausspülen aus dem Reaktor.

Zur Analyse dieser Biozönose ist es nötig Füllkörper aus dem Methanreaktor zu entnehmen. Dies war in der untersuchten Containeranlage jedoch nur möglich, wenn zunächst das Prozesswasser abgelassen wurde. Da dies einen großen Eingriff in den Prozess darstellt, fand solch eine Probenahme im Rahmen dieser Studie nur zweimal statt. In Beprobungsphase C2 (etwa zwei Jahre nach Betriebsbeginn) wurden Füllkörper aus dem unteren Drittel einer der Methanreaktoren der Containeranlage (2R20) entnommen. In Beprobungsphase C4 (etwa vier Jahre nach Betriebsbeginn) fand eine Füllkörperentnahme des

Methanreaktors 2R20 in drei verschiedenen Höhen (oberes, mittleres und unteres Drittel) und des Methanreaktors 2R19 im mittleren Drittel statt. Zudem wurde Bioschlamm, der sich locker zwischen den Füllkörpern befand, entnommen.

5.5.1 Analyse der mikrobiellen Biomasse

Im Folgenden werden die Resultate zur Untersuchung der Biomasseparameter des Biofilms und Bioschlammes der Methanstufe beschrieben.

5.5.1.1 Biofilmdicke und Trockensubstanz

Die mittlere Biofilmdicke diente als Parameter für die Immobilisierung der Mikroorganismen auf den Füllkörpern. Kommt es zu keiner Einlagerung von Fremdmaterial, lässt sich eine Korrelation zwischen Biomassezuwachs und Zunahme der Biofilmdicke beschreiben. Zudem fungierte die Biofilmdicke als Maß der Verschlammlung im Methanreaktor. Für weitere Analysen wurde der Biofilm von den Füllkörpern gelöst (vgl. Kapitel 4.3.2), wobei durchschnittlich 96% des Biofilms von den Füllkörpern erfasst werden konnte. So stellte die Trockensubstanz (TS) des Biofilms einen Parameter für die Verschlammlung im Methanreaktor und die organische Trockensubstanz (oTS) ein Maß für die Quantität der organischen Biomasse im Biofilm dar. Durch das Verhältnis oTS/TS konnten weiterhin sich anreichernde anorganische Inhaltsstoffe erfasst werden. In Abbildung 5-31 sind die Werte der mittleren Biofilmdicke der Füllkörper sowie der TS, oTS und des Anteils der oTS an der TS des abgelösten Biofilms von den Füllkörpern der Beprobungsphasen C2 und C4 dargestellt.

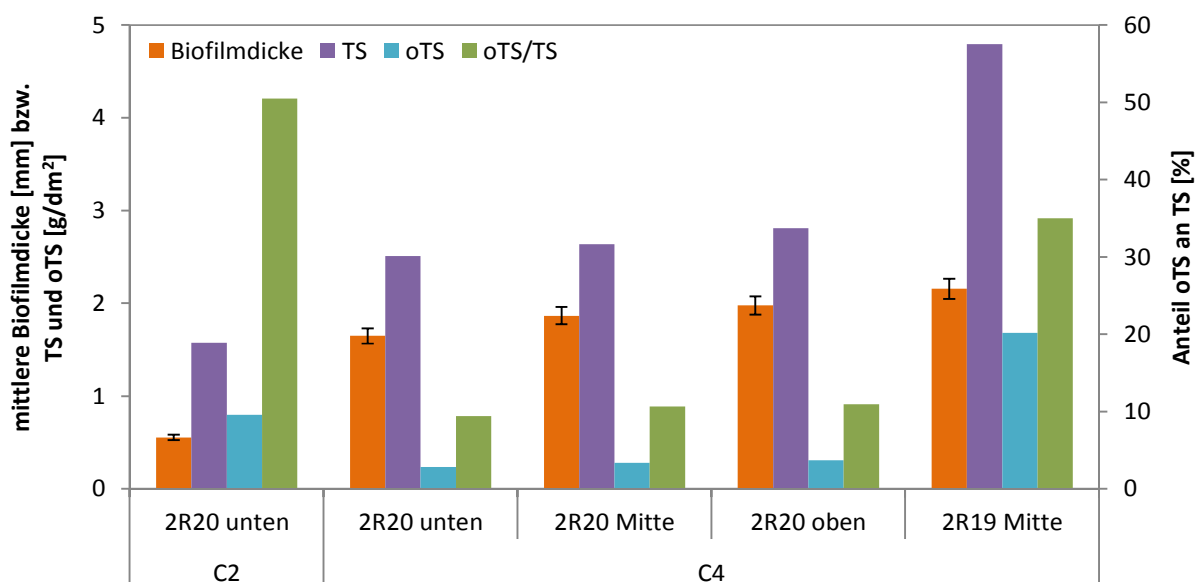


Abbildung 5-31: Mittlere Biofilmdicke sowie Trockensubstanz (TS und oTS) des Biofilms

Durchschnittliche Biofilmdicken auf den Füllkörpern sowie TS, oTS und oTS/TS des abgelösten Biofilms der Füllkörper von Methanreaktor 2R20 (Bioflow 40) und 2R19 (Hel-X H2X36) zu den Beprobungsphasen C2 und C4. Probenahmestellen im Reaktor: unten \triangleq ca. 1 m über Reaktorboden, Mitte \triangleq mittleres Drittel der Füllkörpererschüttung, oben \triangleq ca. 1 m unterhalb Schüttoberfläche. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Die mittlere Biofilmdicke nahm von 555 μm (2R20 unten, Beprobungsphase C2) auf 1649 μm (2R20 unten, Beprobungsphase C4) zu. Sie hat sich innerhalb der zwei Jahre demnach annähernd verdreifacht. Bei der Bestimmung der Trockensubstanz des abgelösten Biofilms zeigte sich eine Erhöhung um das 1,6-fache. Der Anteil der organischen Trockensubstanz des abgelösten Biofilms nahm hingegen von etwa 50% auf etwa 9% ab. Dies lässt darauf schließen, dass der Biofilm in der Beprobungsphase C4 größtenteils mit anorganischem Material, wie Sediment oder Salzen, durchsetzt war, was eine Begründung für die geringe Leistung der Methanreaktoren wäre, welche zu diesem Zeitpunkt unterhalb der Messgrenze (Biogasproduktion $< 1 \text{ Nm}^3/\text{d}$) lag. Auch innerhalb des Reaktors 2R20 (C4) lassen sich klare Tendenzen erkennen. So nahm sowohl die mittlere Biofilmdicke (1649 bis 1977 μm), die TS (2,5 bis 2,8 g/dm^2 Füllkörperfläche) als auch die oTS (0,2 bis 0,3 g/dm^2 Füllkörperfläche) von unten nach oben zu. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass die Füllkörperschüttung eine starke Filterfunktion einnimmt und sich so die Biomasse zunehmend im oberen Bereich des Methanreaktors akkumuliert hat. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die mittlere Biofilmdicke sowie der TS und oTS-Gehalt der Füllkörper des Reaktors 2R19 (Hel-X H2X36) deutlich höher waren, als die aus Reaktor 2R20 entnommenen Füllkörper (Bioflow 40). Der Biofilm der 2R19-Proben war im Mittel 2155 μm dick und der TS-Gehalt betrug 4,8 g/dm^2 Füllkörperfläche. Durch den ebenfalls vergleichsweise hohen oTS-Gehalt von 1,7 g/dm^2 Füllkörperfläche ergab sich ein Anteil der oTS an der TS von etwa 35%. Obwohl die Methanreaktoren eine identische Zulauftrate aufwiesen und mit dem selben Prozesswasser beschickt wurden, scheinen die FK des Reaktors 2R19 weniger durch anorganisches Material belastet zu sein, was womöglich auf die Füllkörperform, -größe und/oder -dichte zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 4-5 und Tabelle 4-1, Seite 30), die ein besseres Durchspülen von solchen Partikeln durch den Reaktor ermöglichen. Da nur Füllkörper aus einer Höhe vorlagen, kann dies an dieser Stelle nicht weiter verifiziert werden. Nichtsdestotrotz besaßen die Biofilme der FK aus Reaktor 2R19 bei ähnlicher Biofilmdicke eine fast doppelt so hohe TS pro Füllkörperfläche auf als die FK aus Reaktor 2R20, sodass der Biofilm noch kompakter war. So wiesen insgesamt sowohl die mittlere Biofilmdicke als auch der TS-Gehalt auf eine starke Verschlammung beider Methanreaktoren hin. Auch die Bioschlämme um die FK zeigten mit 334 g/L (2R20) bzw. 337 g/L (2R19) für beide Reaktoren ähnlich hohe Werte für die TS. Der Anteil der oTS an der TS war dabei mit 45% (2R20) bzw. 43% (2R19) im Vergleich zu den Biofilmen der FK sehr hoch, was auf eine mögliche Verlagerung der mikrobiellen Biomasse in die Bioschlämme hinweist. Aufgrund des hohen anorganischen Anteils in den Biofilmproben der Beprobungsphase C4 kann von der starken Biofilmdicke hingegen nicht zwingend auf einen hohen mikrobiellen Biomassegehalt geschlossen werden.

5.5.1.2 Gesamtzellzahl und Quantifizierung von Mikroorganismengruppen

Bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie auch der Quantifizierung von Mikroorganismengruppen *in situ* (mittels FISH) oder *in vitro* (mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion, qPCR) findet eine direkte Unterscheidung zwischen mikrobieller zu anderer Biomasse statt. In Abbildung 5-32 sind die Werte der durchschnittlichen mikrobiellen Gesamtzellzahl sowie der Zellzahlen der Bacteria und Archaea im abgelösten Biofilm der Füllkörper der Beprobungsphasen C2 und C4 veranschaulicht.

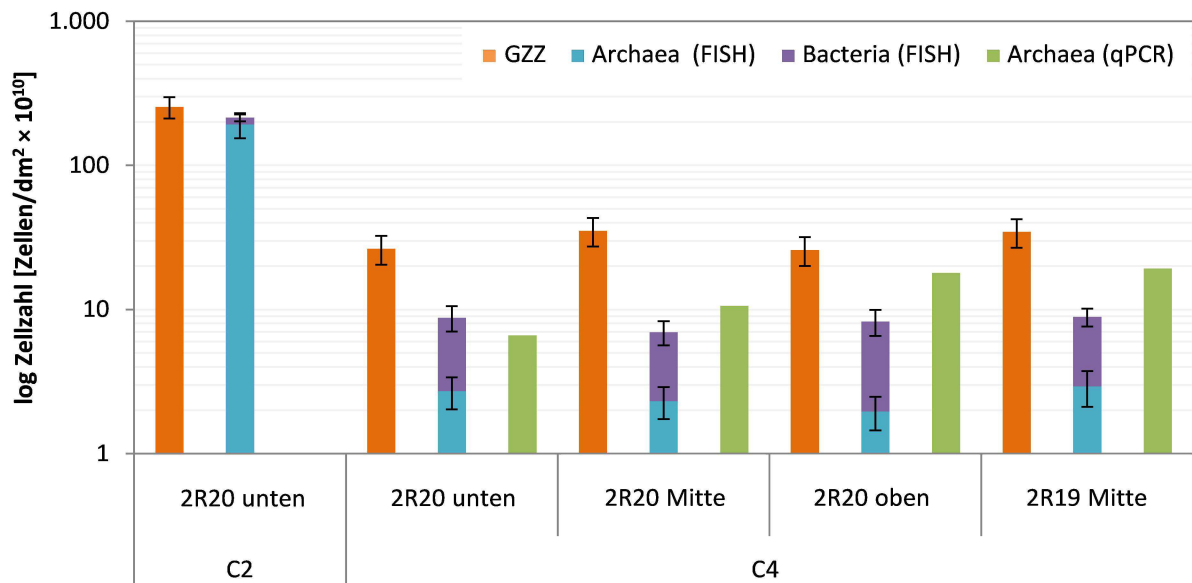


Abbildung 5-32: Gesamtzellzahlen und Zellzahlen bestimmter Mikroorganismengruppen des Biofilms

Durchschnittliche mikrobielle Gesamtzellzahlen und Zellzahlen von Bacteria und Archaea des abgelösten Biofilms der Füllkörper von Methanreaktor 2R20 (Bioflow 40) und 2R19 (Hel-X H2X36) zu den Beprobungsphasen C2 und C4. Biomasseparameter: Gesamtzellzahl (GZZ) und Zellzahl der Bacteria bzw. Archaea bestimmt mittels FISH sowie qPCR (nur bei C4). Probenahmestellen im Reaktor: unten \triangleq ca. 1 m über Reaktorboden, Mitte \triangleq mittleres Drittel der Füllkörperschüttung, oben \triangleq ca. 1 m unterhalb Schüttoberfläche. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Im Gegensatz zu den Werten für die Biofilmdicke und der Trockensubstanz konnte zwischen den zwei Probenahmen C2 (im Jahr 2009) und C4 (im Jahr 2011) eine Reduktion der GZZ ermittelt werden. So betrug die mikrobielle GZZ auf den untersuchten Füllkörpern (Reaktor 2R20 unten) in der Beprobungsphase C2 $254,3 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche und für die Beprobungsphase C4 konnten für die gleiche Probenahmestelle nur noch $26,4 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche – etwa 1/10 – detektiert werden. In der Mitte des Reaktors 2R20 konnte zur Beprobungsphase C4 mit $35,2 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche die höchste GZZ innerhalb des Reaktors bestimmt werden. Die GZZ auf den Füllkörpern des Reaktors 2R19 Mitte wies mit $34,6 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche einen ähnlichen Wert wie die Proben des Reaktors 2R20 Mitte auf. Die GZZ der Bioschlammproben um die FK der Methanreaktoren betrug $18,9 \times 10^{10}$ Zellen/g TS (2R20) und $7,0 \times 10^{10}$ Zellen/g TS (2R19) und war damit 53 bzw. 77% geringer als die durchschnittliche GZZ im Biofilm der FK, sodass der Großteil der Mikroorganismen wie angestrebt auf den FK immobilisiert vorlag. Aufgrund des

hohen organischen Anteils in den Schlämmen (vgl. Kapitel 5.5.1.1), kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Mikroorganismen in den Bioschlämmen einen nicht unerheblichen Anteil an der Substratumsetzung hatten.

Mittels FISH wurde weiterhin zwischen Bacteria und Archaea unterschieden. In der Beprobungsphase C2 konnten im Biofilm auf den Füllkörpern des Reaktors 2R20 unten mit $22,0 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche nur vergleichsweise geringe bakterielle Zellzahlen bestimmt werden (etwa 9% der GZZ). Die Zellzahlen der Archaea betrug hierbei mit $192,4 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche etwa 76% der GZZ. Zwei Jahre später, zur Beprobungsphase C4, konnten für die gleiche Probenahmestelle zwar nur noch $6,1 \times 10^{10}$ bakterielle Zellen/dm² Füllkörperfläche detektiert werden, was einer Reduktion um 72% entspricht, dafür war der Anteil der Bacteria an der GZZ jedoch auf 23% gestiegen. Die Zellzahl der Archaea betrug dabei mit $2,7 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche nur noch etwa 10% der GZZ. Vergleichbare Werte konnten für den gesamten Reaktor 2R20 bestimmt werden. Auf mittlerer Schütthöhe lag die Zellzahl der Bacteria bei etwa $4,7 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche (13% der GZZ) und die der Archaea bei ca. $2,3 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche (7% der GZZ). Im oberen Drittel des Reaktors konnten im Biofilm der Füllkörper bakterielle Zellzahlen von durchschnittlich $6,3 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche (24% der GZZ) ermittelt werden und die Zellzahl der Archaea betrug im Mittel $2,0 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche (8% der GZZ). Die Biofilmproben des Reaktors 2R19 wiesen ebenso ähnliche Werte auf. Die Zellzahl der Bacteria lag bei durchschnittlich $6,0 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche (17% der GZZ) und die der Archaea bei $2,9 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche (8% der GZZ). In den Bioschlämmen um die FK konnten bakterielle Zellzahlen von $2,3 \times 10^{10}$ Zellen/g TS (2R20, 12% der GZZ) und $0,7 \times 10^{10}$ Zellen/g TS (2R19, 10% der GZZ) ermittelt werden. Sie waren damit 72 bzw. 87% geringer als die durchschnittlichen Zellzahlen der Bacteria im Biofilm der FK. Die archaeellen Zellzahlen lagen bei $1,3 \times 10^{10}$ Zellen/g TS (2R20, 7% der GZZ) und $0,6 \times 10^{10}$ Zellen/g TS (2R19, 8% der GZZ). Auch sie wiesen niedrigere Werte auf als in den Biofilmen der FK – 60 bzw. 79% geringere archaeelle Zellzahlen. Die qPCR stellt eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung bestimmter Mikroorganismengruppen dar. Im Gegensatz zur FISH, bei der die Signalstärke an die Zahl der Ribosomen in der Zelle und somit mit der Aktivität der Zelle zur Zeit der Fixierung gekoppelt ist (DeLong *et al.* 1989, Amann & Ludwig 1994), erfolgen PCR-basierte Methoden unabhängig vom Zustand der Zelle, da die Zielsequenz auf der DNA lokalisiert ist, welche auch noch einige Stunden oder sogar Tage nach dem Tod der Zelle intakt ist (Nielsen *et al.* 2007). So betrug die in dieser Arbeit mittels qPCR ermittelten Zellzahlen der Archaea im Mittel 81% höhere Werte als die mittels FISH detektierten Zellzahlen. Hierbei ist zu beachten, dass bei der Analyse die gleiche Zielregion der 16S rRNA erfasst wurde und die qPCR durch Nutzung dreier verschiedener Oligonukleotide, im Gegensatz zu einem Oligonukleotid bei der FISH, sogar eine

höhere Spezifität aufweist. Im Biofilm des Reaktors 2R20 lagen die Zellzahlen mit der Reaktorhöhe steigend zwischen $6,6$ und $17,9 \times 10^{10}$ Zellen/dm² Füllkörperfläche und hatten dabei einen GZZ-Anteil von 25 bis 69%. Im Reaktor 2R19 Mitte betrug die archaeelle Zellzahl $19,3 \times 10^{10}$ Zellen pro dm² Füllkörperfläche (56% der GZZ) und zeigte somit sowohl bei der FISH als auch der qPCR die höchste archaeelle Abundanz im Vergleich zwischen den Reaktoren. In den Bioschlämmen zwischen den FK betrug die Zellzahlen der Archaea $4,7 \times 10^{10}$ Zellen/g TS (2R20, 25% der GZZ) bzw. $2,5 \times 10^{10}$ Zellen/g TS (2R19, 36% der GZZ). Auch hier waren die archaeellen Zellzahlen in den Bioschlämmen im Vergleich zu denen im Biofilm der FK erniedrigt – 69 bzw. 84% geringer.

Weiterhin konnten durch die Ablöse-Methodik (vgl. Kapitel 4.3.2) verschiedene Fraktionen (1–5) der Biofilme der Beprobungsphase C4 gewonnen werden – von außen nach innen bzw. vom leicht ablösbaren Biofilm bis zum schwer ablösbaren Biofilm. Dabei wies die erste Fraktion stets die höchste TS auf, im Mittel $0,9$ g/dm² Füllkörperfläche, da sie den ganz lockeren Biofilm darstellte. Die mittlere TS der Fraktionen zwei bis fünf betrug $0,6$ g/dm² Füllkörperfläche. Diese Fraktionen wurden auch einzeln hinsichtlich der mikrobiellen Abundanz analysiert. In Abbildung 5-33 sind beispielhaft die Werte der mikrobiellen Gesamtzellzahl sowie der Zellzahlen der Bacteria und Archaea in den abgelösten Biofilm-Fraktionen der Füllkörper des Methanreaktors 2R19 Mitte der Beprobungsphase C4 gezeigt.

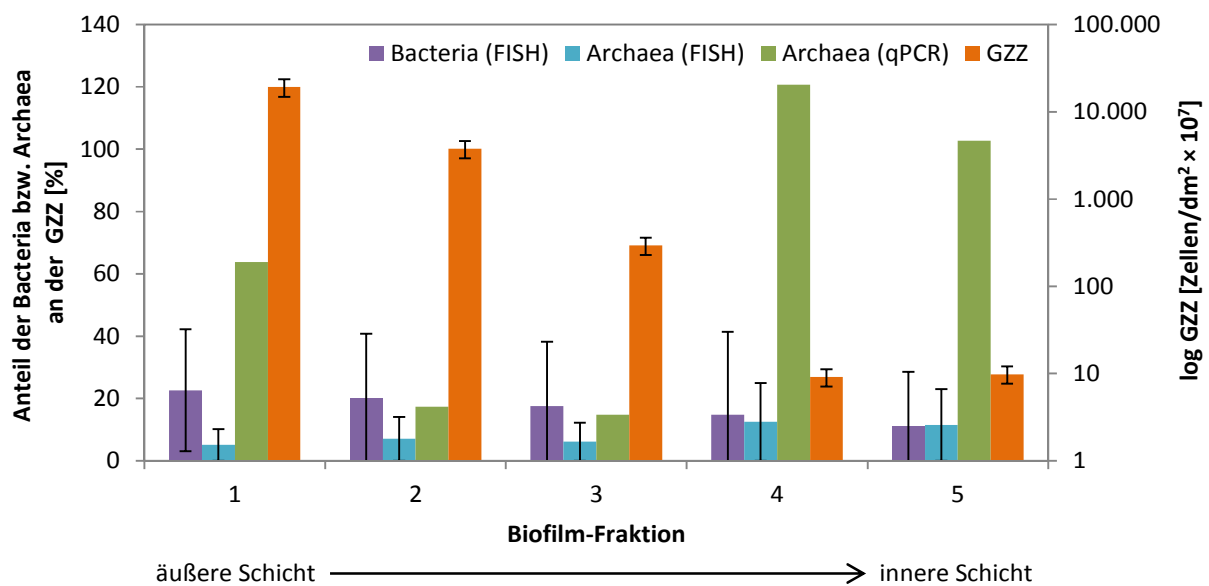


Abbildung 5-33: Mikrobielle Abundanzen in den abgelösten Biofilm-Fraktionen

Mikrobielle Gesamtzellzahlen und Zellzahlen von Bacteria und Archaea der abgelösten Biofilm-Fraktionen der Füllkörper von Methanreaktor 2R19 (Hel-X H2X36) zu der Beprobungsphase C4. Biomasseparameter: Gesamtzellzahl (GZZ) und Zellzahl der Bacteria bzw. Archaea bestimmt mittels FISH sowie qPCR. Probenahmestellen im Reaktor: Mitte \triangle mittleres Drittel der Füllkörperschüttung. Fraktionen: 1 \triangle außen bis 5 \triangle innen. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Für den Aufbau von Biofilmen in anaeroben Systemen auf Aufwuchsflächen wird von einem Schichtmodell ausgegangen. Dabei sind die in der untersten Schicht an der Aufwuchsfläche liegenden metha-

nogenen Archaea durch die darüber liegenden Mikroorganismen vor zu starker Strömung und zugleich vor zu großen Mengen an Säuren aus dem Hydrolysat geschützt. Darüber befinden sich die syntrophen bzw. acetogenen Bakterien und in den äußeren Schichten liegen die acidogenen Bakterien, die teilweise mit dem Hydrolysat aus der Hydrolysestufe gespült werden. Der interzelluläre Stoffaustausch in dieser Biozönose sorgt somit für eine angemessene Zuführung von Acetat sowie von Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zu den Methanogenen und für die Abführung der Reaktionsprodukte (Busch & Sieber 2006, Busch *et al.* 2009). Wie in Abbildung 5-33 zu sehen ist, konnte dieses Schichtmodell auch für den Biofilm der in dieser Arbeit analysierten FK weitgehend bestätigt werden. So nahm bei den FISH-Analysen der Anteil der Bacteria von Fraktion 1 (außen) zu Fraktion 5 (innen) ab und der Anteil der Archaea nahm von Fraktion 1 zu Fraktion 5 zu. Auch bei den Untersuchungen mittels qPCR konnte der größte Anteil der Archaea an der GZZ in den inneren Biofilmschichten detektiert werden, wenngleich ein nicht unerheblicher Anteil in der äußersten Schicht lokalisiert wurde. Sasaki und Kollegen machten bei der Untersuchung der mikrobiellen Biozönose auf Trägermaterial eines Festbettreaktors, der Biomüll abbaut, ähnliche Beobachtungen. Sie konnten Bacteria und Archaea in allen Schichten detektieren, wobei der Anteil der Archaea in den inneren Schichten ebenfalls besonders hoch war (Sasaki *et al.* 2007). Die GZZ nahm von außen nach innen stark ab, um etwa die Hälfte, sodass davon auszugehen ist, dass sich die gesamte Biozönose mit der Zeit in die mittleren bis äußeren Schichten verlagert hat. Ein Grund hierfür ist u. a. die starke Biofilmdicke von im Mittel 1,9 mm mit erhöhten anorganischen Einlagerungen v. a. in den inneren Schichten. So war der Anteil der oTS in der äußeren Schicht im Mittel um das 13-fache höher als in der inneren Schicht, was vermuten lässt, dass die Substratversorgung in den inneren Schichten stark reduziert war. Bekannterweise ist der Transport der Substrate in den Biofilm nicht konstant und ändert sich mit der Tiefe (Wanner & Gujer 1985), weshalb es lokal zu unterschiedlichen Wachstumsraten verschiedener Mikroorganismen kommt (Burkhardt 2012). Bei sehr dicken Biofilmen stößt die Nährstoffdiffusion an ihre Grenzen, u. a. da der Transport der gasförmigen Produkte stets zu einer Störung des ungehinderten Stofftransportes führt. Deshalb kann meist zwischen einer aktiven und inaktiven Biofilmschicht differenziert werden (Lazarova & Manem 1995). Daher ist eine Biomassezunahme nicht gleichbedeutend mit einer erhöhten Umsatzleistung. Da sich zudem bei weitergehender Biofilmbildung die Reaktionsoberfläche verringert, kann es sogar zu Umsatzeinbußen kommen (Wäsche 2003). Kennedy und Droste (1987) ermittelten dem gegenüber, dass in anaeroben Biofilmen keine Diffusionslimitierung vorliegt. Bei einer Biofilmdicke bis zu 2,6 mm war der untersuchte Biofilm aktiv und vollständig penetriert. Sie erklärten dies mit der offenporigen filamentösen Struktur des Biofilmes und der damit verbundenen Durchmischung auf Mikroebene durch die gasförmigen Emissionen. Aufgrund der hohen TS und des hohen Anteils an Anorganik im Biofilm wird in dieser Studie nicht von einer stark offenporigen Biofilmstruktur, insbesondere der inneren Schichten, ausgegangen. Um diese negativen Effekte aufgrund der immensen

Biofilmdicke zu unterbinden, wird die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Biomasseaufwuchs inklusive Filtereffekt und geschwindigkeitsbedingtem Materialabtrag angestrebt. In der Praxis ist dies jedoch nicht realisierbar, weshalb empfohlen wird, in geeigneten zyklischen Abständen einen Teil der Biofilmbiomasse durch erhöhte Strömungsgeschwindigkeiten aus den Festbettreaktor zu spülen, sodass der Betrieb unter Ausnutzung des vollständigen Reaktorvolumens ohne Totzonen und Kurzschlussströmung betrieben werden kann (Escudié *et al.* 2011, Burkhardt 2012). In der hier untersuchten Anlage besteht diesbezüglich scheinbar noch Optimierungspotential.

In der Beprobungsphase C2 konnten mittels FISH 85% der Mikroorganismen im Biofilm erfasst werden. In der Beprobungsphase C4 war der detektierte Anteil jedoch mit im Mittel 27% sehr gering. Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, dass bei dieser Methode die Signalstärke mit der Aktivität der Zelle gekoppelt ist (DeLong *et al.* 1989, Amann & Ludwig 1994). Der hohe anorganische Anteil im Biofilm der FK und die geringe Biogasproduktion der Methanreaktoren vor der Probenahme, unterhalb der Messgrenze ($< 1 \text{ Nm}^3/\text{d}$), deutet auf eine Inhibierung der Mikroorganismen hin. In diesem Fall ist es möglich, dass die Zahl der Ribosomen sehr gering war und so mittels FISH nicht alle Zellen phylogenetisch zugeordnet werden konnten. Beispielsweise kommt es bei hohen Salzkonzentrationen zur Dehydrierung der Bakterienzellen und somit zur Inhibierung oder sogar Zellyse (de Baere *et al.* 1984, Yerkes *et al.* 1997). Leichtmetall-Ionen, einschließlich Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium können durch den Abbau von organischem Material in der Biogasanlage freigesetzt werden oder in Form von Puffern dem System hinzugefügt werden (Grady Jr *et al.* 1999). Während moderate Konzentrationen das mikrobielle Wachstum stimulieren, inhibieren übermäßige Mengen die Mikroorganismen oder wirken sogar toxisch (Soto *et al.* 1993). In den chemischen Analysen der Biofilm- und Schlammproben konnten erhöhte Werte für Calcium, Kalium, Magnesium, gesamt Phosphor, gesamt Schwefel sowie Kjeldahl-Stickstoff ermittelt werden (vgl. Anhang A-9). Die Methanisierung kann ab einer Calcium-Konzentration von 5 g/L, einer Magnesium-Konzentration von 3 g/L, einer Kalium-Konzentration von 6 g/L, einer Stickstoff-Konzentration von 3 g/L und einer Schwefel-Konzentration von 0,2 g/L inhibiert werden (Kugelman & McCarty 1965, Kossmann *et al.* 1999, Sánchez *et al.* 2000, Ahn *et al.* 2006). Diese Konzentrationen wurden teilweise weit überschritten. Zudem spielt das C/N-Verhältnis eine entscheidende Rolle. Wenn das Verhältnis zu hoch ist, sinkt die Effizienz des Prozesses und bei einem Stickstoffüberschuss wird Ammoniak gebildet, welcher die Mikroorganismen bereits in geringen Konzentrationen hemmt. Allgemein ist eine ausreichende Nährstoffversorgung für die Methangärung bei einem C/N/P/S-Verhältnis von etwa 450-600/15/5/1 sichergestellt (Weiland 2010), welches hier jedoch, u. a. durch den stark erhöhten Schwefelgehalt, nicht gegeben war. Ferner können hohe Schwefelgehalte dazu führen, dass Spurenelemente als Metallsulfide ausfallen und somit deren Bioverfügbarkeit reduziert wird (Zandvoort *et al.* 2006). Daneben deuten erhöhte Schwefelgehalte auf eine erhöhte Schwefelwasserstoffbildung hin, wodurch die Methanogenen inhibiert werden (Speece

1996). Die äußerst geringen detektierten Anteile der Bacteria und Archaea in den Bioschlammproben von im Mittel 18% in Summe sind wahrscheinlich v. a. auf die erhöhten Mineralstoffkonzentrationen und einer resultierenden Hemmung der Mikroorganismen zurückzuführen. Zudem war zum Lösen des Biofilms von den FK der Beprobungsphase C4 aufgrund des dicken und kompakten Biofilms ein sehr intensives und mehrmaliges Schütteln notwendig, was zu einem erhöhten Sauerstoffeintrag führte. Dies könnte die überwiegend strikt anaeroben Mikroorganismen inhibiert bzw. geschädigt haben. Zusätzlich waren die Zellen währenddessen mechanischem Stress ausgesetzt, sodass diese womöglich aus den genannten Gründen nicht mehr mittels FISH detektiert werden konnten. Diese Behandlung hatte keine Auswirkungen auf das Ergebnis der qPCR. Dort könnte es prinzipiell jedoch zu Verlusten bei der Isolierung der DNA und durch die Oligonukleotidspezifität gekommen sein, die möglicherweise bestimmte Taxa nicht erfasste. Nichtsdestotrotz konnten mittels qPCR im Mittel 40% Archaea an der GZZ detektiert werden. Dieser Anteil lag somit meist sogar höher als der Anteil der Mikroorganismen (Archaea + Bacteria) der mittels FISH ermittelt wurde. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die mittels FISH ermittelten Zellzahlen in der Beprobungsphase C4 unterbestimmt waren. Allgemein ist an dieser Stelle auch darauf hinzuweisen, dass der konkrete Status eines Methanreaktors bzw. die Zusammensetzung der immobilisierten Mikroorganismen und deren Aktivität nur über eine Entnahme der Aufwuchskörper möglich ist, da sich die ermittelten Werte und Tendenzen zwischen den Biofilmproben der FK und dem Ablauf der Methanreaktoren (Speicher 2) deutlich unterscheiden. So lag der Anteil der Bacteria von Proben des Speicher 2 zu beiden Beprobungsphasen (C2 und C4) bei etwa 57% und der der Archaea um die 14%, obwohl sich die Anteile der Mikroorganismen in den Biofilmen signifikant unterschieden. Auch Sasaki und Kollegen (2007) stellten heraus, dass die 16S rRNA-Konzentrationen von Methanogenen in der anhaftenden Biomasse des Trägermaterials im Reaktor höher waren als die im Reaktorablauf.

In anderen Methanreaktoren konnte oftmals eine Dominanz der bakteriellen gegenüber der archaeellen Zellzahl festgestellt werden. Burkhard (2012) ermittelte mittels FISH in jungen Biofilmen von Füllkörpern eines überstauten Festbettreaktors Archaea-Abundanzen zwischen 7 und 43% an der GZZ mit teilweise großen Schwankungen im Zeitverlauf. Rademacher und Kollegen (2012b) detektierten im anaeroben Biofilm von vergleichbaren Füllkörpern mittels 454 Pyrosequenzierung ebenfalls einen vergleichsweise geringen Archaea-Anteil von 12% und einen Anteil an Bacteria von 88%. Demgegenüber wiesen bspw. Lee und Kollegen (2008) in einem mesophilen, anaeroben Batch-Reaktor mittels qPCR-Analyse eine Dominanz der Archaea nach, mit etwa einer zehnfach höheren Zellzahl gegenüber den Bacteria. Diese differierenden Abundanzen lassen sich jedoch u. a. dadurch erklären, dass die Komposition der mikrobiellen Biozönose stark von der Betriebsweise der Reaktoren, der Zusammensetzung des zugeführten Substrates und der Raumbelastung abhängt (Casserly & Erijman 2003, Encina & Hidalgo 2005, Karakashev *et al.* 2005, Aschmann *et al.* 2007). So kann die Beschaffenheit einer mik-

robiellen Biozönose innerhalb eines Reaktors auch im Laufe der Zeit bzw. abhängig von sich ändernden Prozessbedingungen variieren.

5.5.2 Diversitätsanalyse der Biozönose

Im Folgenden wurde die mikrobielle Biozönose in den Methanreaktoren der Beprobungsphase C4 detaillierter hinsichtlich der phylogenetischen Diversität untersucht.

5.5.2.1 Diversität der Archaea

Zur Bestimmung der phylogenetischen Diversität diente u. a. die Methode der FISH mit spezifischen Sonden für methanogene Archaea – Methanobacteriaceae, Methanococcaceae, Methanomicrobiales und Methanosarcinales. In Abbildung 5-34 sind die Anteile der methanogenen Archaea in den abgelösten Biofilm-Fractionen der Füllkörper (1 bis 5) der Methanreaktoren 2R20 und 2R19 Mitte sowie in den entsprechenden Schlammproben der Beprobungsphase C4 dargestellt.

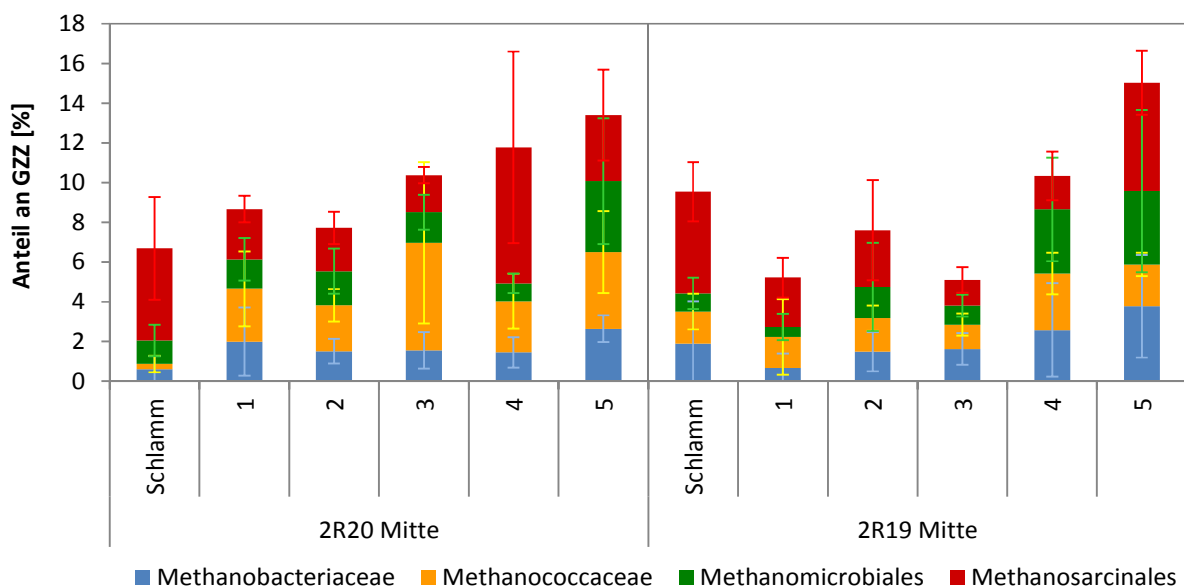


Abbildung 5-34: Anteile methanogener Archaeen in den Methanreaktoren

Anteile von Vertretern der Methanobacteriaceae, der Methanococcaceae, der Methanomicrobiales (Methanomicrobiaceae, -corpusculaceae und -planaceae) und der Methanosarcinales an der GZZ zur Beprobungsphase C4, analysierte Proben: Schlammproben sowie Biofilmproben der Füllkörper der Methanreaktoren 2R20 und 2R19 Mitte, Biofilm-Fractionen: 1 \triangleq außen bis 5 \triangleq innen. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Wie im vorangegangenen Kapitel (5.5.1.2) beschrieben, waren auch bei dieser FISH-Analyse die Anteile der hybridisierten Zellen insgesamt sehr gering. Nichtsdestotrotz konnte bei den Biofilmproben der FK ebenso tendenziell eine Zunahme der Archaeen von außen nach innen (Fraktion 1 nach 5) festgestellt werden. Im Mittel war der Anteil der Methanosarcinales dabei am höchsten ($\bar{\varnothing}$ 3,4% an der GZZ). Der Anteil der Methanococcaceae lag durchschnittlich bei 2,3% und der der Methanobacteriaceae und Methanomicrobiales jeweils bei 1,8%. Für beide Reaktoren konnte eine ähnliche Verteilung der metha-

nogenen Gruppen beobachtet werden. Die Abundanz der Methanosarcinales war in den Schlammproben und in den inneren Biofilmschichten der Füllkörper am höchsten. Der Anteil der Methanococaceae war in den mittleren Biofilmschichten vergleichsweise hoch. Die Abundanz der Methanomicrobiales war in den mittleren bis inneren Biofilmschichten tendenziell am höchsten. Die Methanobacteriaceae waren in allen Biofilmschichten ähnlich häufig vertreten, in den Schlammproben jedoch weniger stark.

So konnte auch bei den Biomasseproben der Methanreaktoren, ähnlich den Analysen des Speicher 2 (Kapitel 5.2.1.3), eine Dominanz der hydrogenotrophen Methanogenen festgestellt werden, sodass davon auszugehen ist, dass in der untersuchten Biogasanlage der hydrogenotrophe Methanbildungsweg favorisiert wird. Auch in diesen Untersuchungen wiesen die mit der MSMX860-Sonde hybridisierten Zellen zum überwiegenden Teil eine Stäbchenform auf und sind deshalb den *Methanosaeta* zuzuordnen (Kendall & Boone 2006). Da *Methanosaeta* nur bei geringen Acetatkonzentrationen einen Konkurrenzvorteil besitzen, lässt ihre Dominanz auf eine niedrige Acetat-Konzentration im System schließen. Wahrscheinlich ist dies v. a. durch eine verstärkte syntrophe Acetat-Oxidation durch acetogene Bakterien bedingt. Dies bestärkt die Annahme eines bevorzugten hydrogenotrophen Biogasbildungsweges in dieser Anlage und unterstützt die Hypothese von Bauer (2008) bzw. Lebuhn und Kollegen (2008), dass der hydrogenotrophe Weg in den meisten Biogasanlagen, insbesondere bei hohen Raumbelastungen und geringen Verweilzeiten, bevorzugt wird. So wiesen auch die in dieser Arbeit untersuchten Methanreaktoren, ermöglicht durch die Immobilisation der Mikroorganismen auf den Füllkörpern, mit durchschnittlich 0,8 Tagen eine vergleichsweise geringe hydraulische Verweilzeit auf.

Zur weiteren Untersuchung der phylogenetischen Diversität diente die Analyse mittels DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese). Hierbei werden zunächst 16S rDNA-Abschnitte der isolierten DNA aus einer Biozönose amplifiziert, die nachfolgend abhängig von ihrer Basenzusammensetzung und Sequenz gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei entstehen verschiedene Bandenmuster, die weiter analysiert werden können.

In Abbildung 5-35 sind die DGGE-Bandenmuster von 16S rDNA-Fragmenten der Archaea der abgelösten Biofilme der Füllkörper aus Reaktor 2R20 aus verschiedenen Tiefen sowie die der einzelnen Biofilm-Fractionen der Füllkörper (1 bis 5) der Methanreaktoren 2R20 und 2R19 Mitte und die der entsprechenden Schlammproben der Beprobungsphase C4 gezeigt. Bei der Untersuchung der Proben mit der Archaea-spezifischen DGGE ergab sich ein Bandenmuster mit einer vergleichsweise niedrigen Bandenanzahl, was i. d. R. auf eine geringe archaeelle Diversität schließen lässt. Insgesamt konnten sieben verschiedene Banden detektiert werden (1–7). Drei Banden (1, 2 und 4) traten in allen Proben auf, wobei Bande 1 in ihrer relativen Intensität, verglichen mit den anderen Banden in derselben Spur, dominant war. Bande 5 trat nur bei den Schlammproben sowie in den Biofilmen der Füllkörper aus

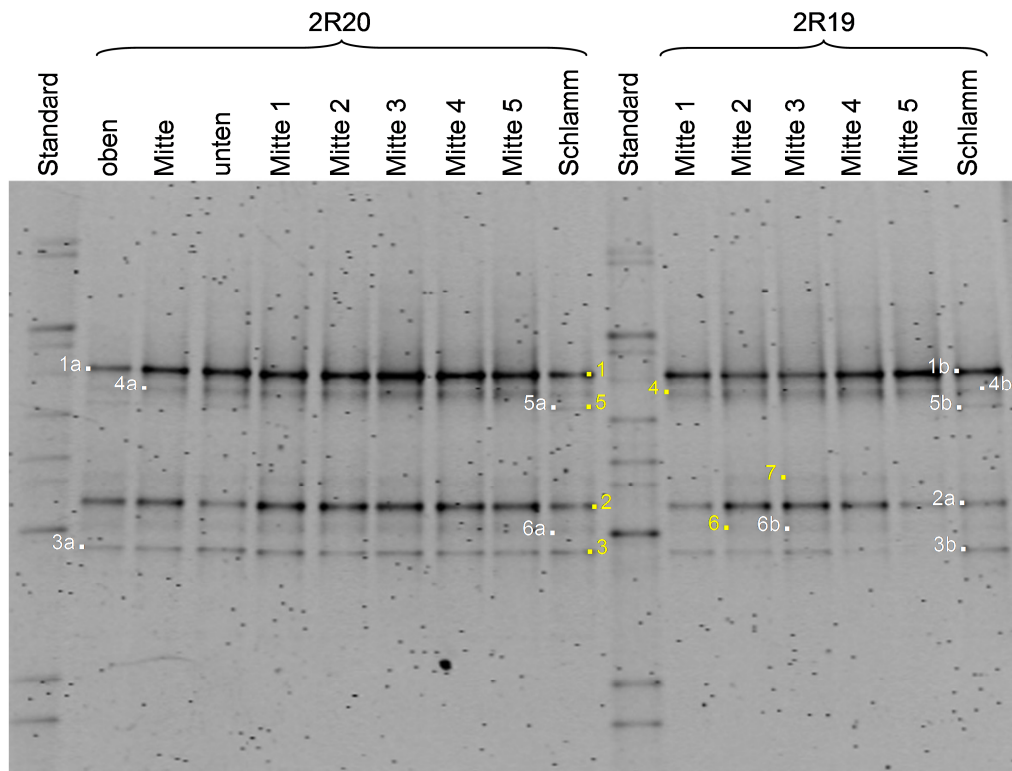


Abbildung 5-35: DGGE-Bandenmuster von 16S rDNA-Fragmenten der Archaea

Gelelektrophoretische Auftrennung von 16S rDNA-Fragmenten amplifiziert durch das Primerpaar Parch519/Ar915r, analysierte Proben: Schlammproben sowie Biofilmproben der Füllkörper der Methanreaktoren 2R20 und 2R19, Biofilm-Fractionen: 1 \triangleq außen bis 5 \triangleq innen, Beprobungsphase C4. Die gelb gekennzeichneten Banden (1–7) zeigen die relevanten Bandentypen. Die mit weißen Zahlen beschrifteten Banden wurden ausgeschnitten, reamplifiziert, sequenziert und phylogenetisch weiter analysiert.

Reaktor 2R20 (oben, Mitte, unten) auf und war in ihrer relativen Intensität schwach. Bande 6 war ebenfalls nur schwach ausgeprägt, konnte jedoch in fast allen Proben, außer 2R19 Mitte Biofilmfraktion 1 und 5, detektiert werden. Eine sehr geringe Intensität wies auch Bande 7 auf, welche in den Biofilmen der Füllkörper aus Reaktor 2R20 (oben, Mitte, unten), in den Schlammproben sowie in Probe 2R19 Mitte Biofilmfraktion 1 und 5 fehlte. Bande 3 war in allen Proben außer 2R19 Mitte Biofilmfraktion 5 vertreten. Abgesehen von der sehr schwachen Bande 7 konnten alle charakteristische Bandentypen ausgeschnitten und erfolgreich sequenziert werden (Banden 1–6). Im Anhang A-10 ist die taxonomische Zuordnung der sequenzierten Banden mittels RDP Classifier (Cole *et al.* 2009) tabellarisch aufgelistet.

Zur detaillierten Untersuchung der methanogenen Archaea wurde weiterhin eine Methanosarcinales- und Methanomicrobiales-spezifische DGGE für die Biofilm- und Schlamm-Proben durchgeführt. In Abbildung 5-36 sind die DGGE-Bandenmuster von 16S rDNA-Fragmenten der Methanosarcinales/-microbiales der abgelösten Biofilme der Füllkörper aus Reaktor 2R20 aus verschiedenen Tiefen sowie die der einzelnen Biofilm-Fractionen der Füllkörper (1 bis 5) der Methanreaktoren 2R20 und 2R19 Mitte und die der entsprechenden Schlammproben der Beprobungsphase C4 dargestellt.

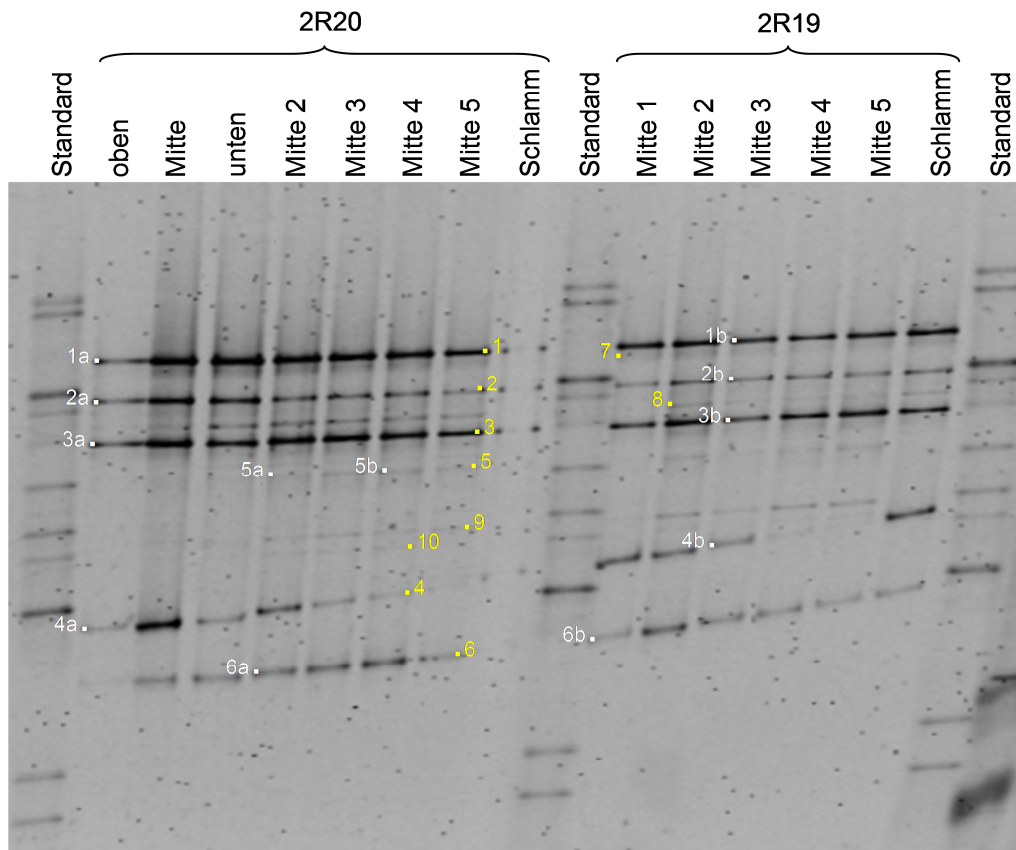


Abbildung 5-36: DGGE-Bandenmuster von 16S rDNA-Fragmenten der Methanosarcinales und -microbiales

Gelelektrophoretische Auftrennung von 16S rDNA-Fragmenten amplifiziert durch das Primerpaar Msm355f/Msm1068r, analysierte Proben: Schlammproben sowie Biofilmproben der Füllkörper der Methanreaktoren 2R20 und 2R19, Biofilm-Fractionen: 1 \triangleq außen bis 5 \triangleq innen, Beprobungsphase C4. Die gelb gekennzeichneten Banden (1–10) zeigen die dominanten Bandentypen. Die mit weißen Zahlen beschrifteten Banden wurden ausgeschnitten, reamplifiziert, sequenziert und phylogenetisch weiter analysiert.

Das Bandenmuster der Methanosarcinales/-microbiales-spezifischen DGGE war diverser als das der Archaea-spezifischen-DGGE (Abbildung 5-35). Die Fragmente der Schlammprobe aus dem Methanreaktor 2R20 konnten im Gel jedoch nicht detektiert werden, sodass diese Probe nicht ausgewertet werden konnte. Zudem war das DGGE-Gel im unteren Teil schief gelaufen, weshalb die unteren Banden nicht alle auf einer Höhe lagen.

Das vorliegende Bandenmuster wies insgesamt zehn mehr oder minder starke Bandentypen auf (1–10). Vier Banden (1–3 und 6) konnten in jeder Probe detektiert werden, wobei die Banden 1 und 3 in ihrer relativen Intensität in allen Proben dominant waren. Bande 2 und 6 unterschieden sich in ihrer Intensität je nach Probe. Bei allen Proben aus Methanreaktor 2R20 (Ausnahme 2R20 oben) bildete sich eine Doppelbande (Bande 1 und 7) aus, die auch in einem Teil der 2R19 Proben auftrat, jedoch nicht in den Proben 2R19 Mitte Biofilmfraktion 4 und 5. Ebenfalls in der 2R20 oben Probe und bei 2R19 Mitte Biofilmfraktion 1 fehlte die Bande 8, die ansonsten in unterschiedlicher Intensität in allen Proben detektiert werden konnte. Auch die Banden 5, 9 und 10 fehlten in der Probe aus 2R20 oben, in der

auch Bande 6 nur sehr schwach ausgebildet war. Die 2R20 oben Probe wies damit die geringste Bandenzahl auf. Bande 9 und 10 bildeten eine sehr schwach detektierte Doppelbande in den Proben 2R20 Mitte Biofilmfraktion 2, 3 und 4 sowie 2R19 Mitte Biofilmfraktion 2 bis 5 aus. Bande 4 fehlte jeweils in den Füllkörperproben, die die unteren Schichten des Biofilms charakterisierten (2R20 Mitte Biofilmfraktion 5 und 2R19 Mitte Biofilmfraktion 4 und 5). In den äußeren Biofilmschichten und in der Schlammprobe aus 2R19 sowie dem Biofilm des Füllkörpers 2R20 Mitte war die Bandenintensität dafür vergleichsweise stark. Die Bandentypen 1–6 konnten ausgeschnitten, reamplifiziert und erfolgreich sequenziert werden. Im Anhang A-10 ist die taxonomische Zuordnung der sequenzierten Banden mittels RDP Classifier (Cole *et al.* 2009) bis auf Gattungsebene tabellarisch aufgelistet.

Auf Grundlage dieser Sequenzierergebnisse und der Bandenmuster der entsprechenden DGGE (Abbildung 5-35 und Abbildung 5-36) erfolgte eine Zuordnung der detektierten archaeellen Vertreter zu den analysierten Proben (Tabelle 5-1). Wie weiter oben beschrieben, waren die Bandenmuster nicht besonders verschieden, sodass die mikrobielle Verteilung sich sehr ähnelte. Um ein mögliches Artefakt der DGGE-Banden auszuschließen, dass mehrere Sequenzen mit einer Bande assoziiert sind (Sekiguchi *et al.* 2001, Legatzki *et al.* 2011), wurden i. d. R. zwei Banden mit gleicher Laufweite analysiert. Da die Bandenstärken zwischen den Proben methodisch bedingt nicht vergleichbar sind, kann hierbei keine Aussage über die quantitative Verteilung der Mikroorganismen getroffen werden, die sich sehr wohl zwischen den Proben unterscheiden kann. Auffällig ist, dass durch die Archaea-spezifische DGGE nur Vertreter der Methanobacteriales (*Methanobacterium* sp.) und Acidilobales (*Caldisphaera* sp.) detektiert werden konnten. Vertreter der Methanomicrobiales (*Methanospirillum* sp. und *Methanolinea* sp.) und Methanosarcinales (*Methanosaeta* sp. und *Methanosarcina* sp.) wurden in dieser Arbeit einzig mittels Methanosarcinales/-microbiales-spezifischer DGGE erfasst. Dies lässt darauf schließen, dass mittels der Archaea-spezifischen DGGE nur die am häufigst vertretenen Archaea detektiert wurden und zur Charakterisierung der vollständigen archaeellen Vielfalt noch weitere Gruppen-spezifischere DGGE notwendig sind. Eine ähnliche Beobachtung konnten auch Gast und Kollegen (2004) bei der Charakterisierung der Protisten-Biozönose im Rossmeer machen. So wurden in der vorliegenden Arbeit mittels DGGE bspw. gar keine Methanococcales erfasst, die jedoch mittels FISH detektiert werden konnten (vgl. Abbildung 5-34). Schlussfolgernd würde dies auch bedeuten, dass die Abundanz von *Methanobacterium* sp. und *Caldisphaera* sp. in den untersuchten Methanreaktoren besonders hoch war.

Tabelle 5-1: Archaeelle Vertreter in den Biofilm- und Schlammproben der Methanreaktoren

Proben- bezeichnung	Euryarchaeota			Crenarchaeota	
	Methanobacteriales	Methanomicrobiales	Methanosarcinales	Acidilobales	
2R20	oben	<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6) <i>Methanolinea</i> sp. (MSM4)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
	Mitte	<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6) <i>Methanolinea</i> sp. (MSM4)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
	unten	<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6) <i>Methanolinea</i> sp. (MSM4)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
	Mitte 1	<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	n. a.	n. a.	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
	Mitte 2	<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6) <i>Methanolinea</i> sp. (MSM4)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3, -5) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
	Mitte 3	<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6) <i>Methanolinea</i> sp. (MSM4)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3, -5) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
	Mitte 4	<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6) <i>Methanolinea</i> sp. (MSM4)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3, -5) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
	Mitte 5	<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3, -5) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
	Schlamm	<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	n. a.	n. a.	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
	2R19	Mitte 1	<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6) <i>Methanolinea</i> sp. (MSM4)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)
Mitte 2		<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6) <i>Methanolinea</i> sp. (MSM4)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3, -5) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
Mitte 3		<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6) <i>Methanolinea</i> sp. (MSM4)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3, -5) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
Mitte 4		<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3, -5) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)
Mitte 5		<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3, -5) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	
Schlamm		<i>Methanobacterium</i> sp. (ARC1, -2, -4)	<i>Methanospirillum</i> sp. (MSM6) <i>Methanolinea</i> sp. (MSM4)	<i>Methanosaeta</i> sp. (MSM1, -3) <i>Methanosarcina</i> sp. (MSM2)	<i>Caldisphaera</i> sp. (ARC3, -5, -6)

In Klammern sind die dazugehörigen Bandentypen der Archaea-spezifischen (ARC) und Methanosarcinales/-microbiales-spezifischen (MSM) DGGE (Abbildung 5-35 und Abbildung 5-36) beschrieben, taxonomische Zuordnung nach RDP Classifier (vgl. Anhang A-10), n. a. = nicht auswertbar

Zur weiteren Diversitäts-Analyse wurden die sequenzierten archaeellen 16S rDNA-Abschnitte sowie ausgewählte Referenz-Sequenzen aus der Datenbank des NCBI zur Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen eingesetzt. Mittels BLASTn-Analyse wurden zudem Mikroorganismen detektiert, die die höchste Sequenzhomologie zu den Vergleichssequenzen aufwiesen. Da keine vollständigen 16S rDNA-

Gensequenzen vorlagen, können die DGGE-Banden nicht zweifelsfrei den ermittelten Spezies zugewiesen werden. Aufgrund der geringen Signifikanzwerte (e-values) von 0 bis maximal 3×10^{-103} sind die Ergebnisse jedoch als sehr signifikant einzustufen. In Abbildung 5-37 ist das entsprechende Dendrogramm der methanogenen Archaea illustriert.

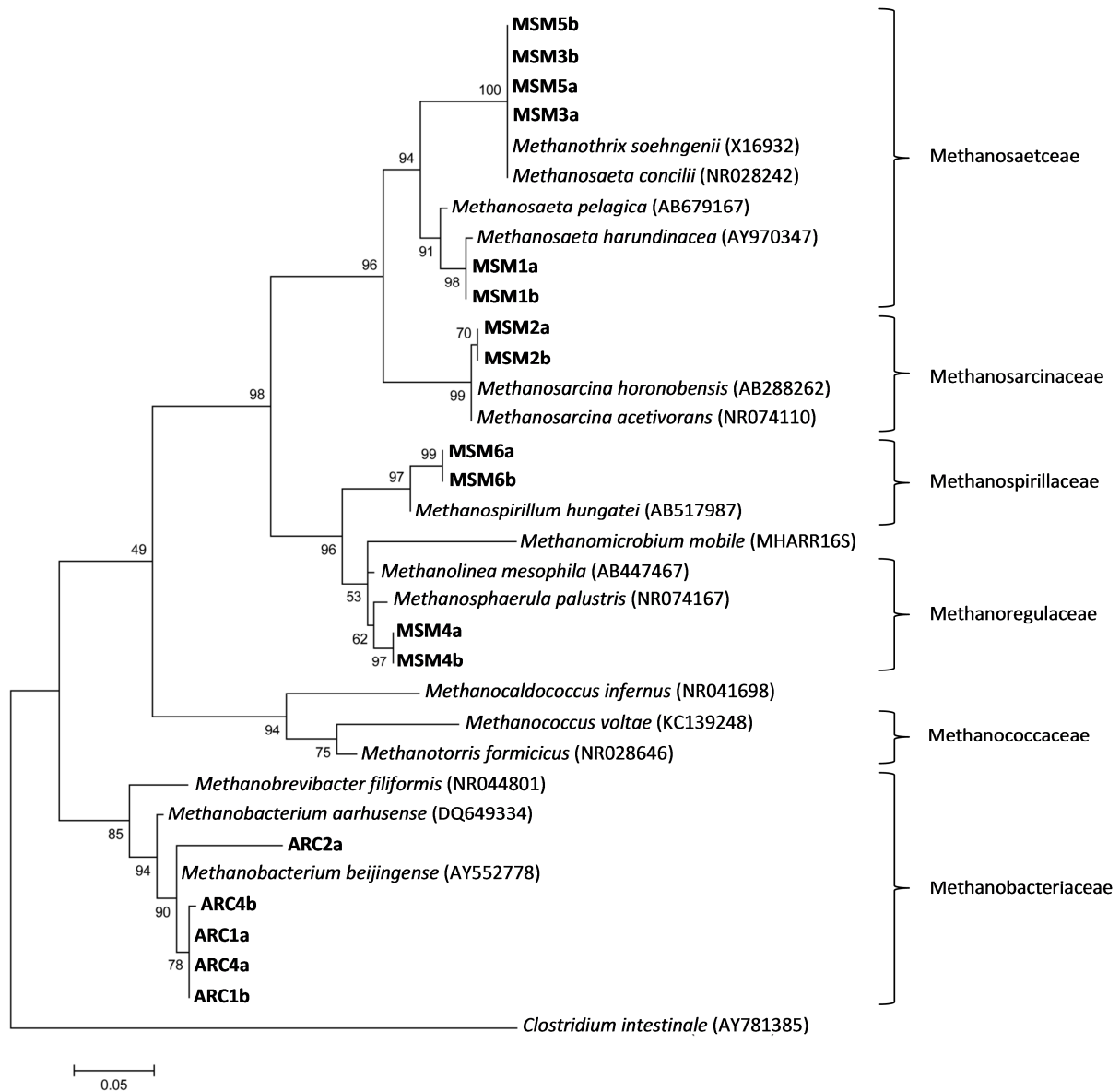


Abbildung 5-37: Phylogenetischer Stammbaum der reamplifizierten DGGE-Banden der methanogenen Archaea
Phylogramm erstellt auf Grundlage von reamplifizierten 16S rDNA-Sequenzen von Archaea (ARC) bzw. Methanosarcinales/-microbiales (MSM) aus den entsprechenden DGGE-Analysen (Abbildung 5-35 und Abbildung 5-36). Der Stammbaum wurde mit dem Programm MEGA 5.2 (Tamura *et al.* 2011) unter Verwendung der Maximum Likelihood-Methode, basierend auf dem Tamura-Nei-Model (Tamura & Nei 1993), erstellt. Zahlenangaben an internen Ästen bezeichnen Bootstrapping-Bestätigungswerte für den entsprechenden Ast bezogen auf 1000 Replikationen. Die Accession Numbers der Referenzsequenzen sind in Klammern angegeben. Als technische Referenzgruppe diente die Sequenz von *Clostridium intestinale*. Der Größenstandard bezeichnet einen Sequenzunterschied von 5% bezogen auf die Gesamtlänge des zugrundeliegenden Sequenz-Alignments.

Wie schon mittels RDP Classifier ermittelt, konnte für die Sequenzen ARC1, -2 und -4 eine nahe Verwandtschaft zu *Methanobacterium* sp. bestätigt werden. So bildeten sie mit *Methanobacterium beijingense*

(AY552778), das auch nach der BLASTn-Analyse zu allen drei DGGE-Bandentypen die höchste Sequenzhomologie aufwies (94–99%), ein Cluster. Dieses Archaeon wurde aus einer anaeroben Biogasanlage in China isoliert und kann Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid sowie Formiat in seinem Stoffwechsel metabolisieren (Ma *et al.* 2005). Weiterhin clusterten die Sequenzen MSM4 mit Vertretern der Methanoregulaceae. Sie wiesen nach BLASTn-Analyse zu *Methanolinea mesophila* (AB447467) und *Methanolinea tarda* (NR028163) die höchste Verwandtschaft auf (97% Sequenzhomologie). Letzterer wurde aus einem methanogenen Bioschlammreaktor isoliert (Imachi *et al.* 2008). Des Weiteren konnte die nahe Verwandtschaft der MSM6-Sequenzen zu *Methanospirillum* sp. verifiziert werden. Sie bildeten laut BLASTn-Analyse mit *Methanospirillum hungatei* (NR074177 bzw. AB517987) ein Cluster, mit dem sie eine sehr hohe Sequenzhomologie aufwiesen (97%). Dieses Archaeon nutzt H₂/CO₂ und Formiat zur Biogasproduktion (Iino *et al.* 2010) und zählt, wie die vorangegangenen Mikroorganismen, somit zu den hydrogenotrophen Methanbildnern. Die Sequenzen der MSM2-Banden konnten bereits mittels RDP Classifier eindeutig der Gattung *Methanosarcina* zugeordnet werden, sodass sie auch im Dendrogramm mit *Methanosarcina*-Spezies clusterten. Nach BLASTn-Analyse konnte die höchste Sequenzhomologie (99–100%) zu *Methanosarcina thermophila* (KC203046 bzw. JQ346758) ermittelt werden. Letzterer wurde in einem anaeroben Bioreaktor der Universität Michigan detektiert, zählt zu den acetoklastischen Methanogenen und sein Temperaturoptimum liegt bei etwa 50 °C (Pinto & Raskin 2012). Weiterhin clusterten die MSM1-Sequenzen mit der Gattung *Methanosaeta* und zeigten nach BLASTn-Analyse eine sehr nahe Verwandtschaft, 99% Sequenzhomologie, zu *Methanosaeta harundinacea* (NR102896 und CP003117). Dieses mesophile, obligat acetoklastische Archaeon wurde u. a. schon aus einem UASB-Reaktor in Beijing isoliert (Zhu *et al.* 2012). Auch die Sequenzen der MSM3- und MSM5-Banden bildeten ein deutliches Cluster mit den Methanosaetaceae. Dabei konnte durch die BLASTn-Analyse die Gattungszugehörigkeit zunächst nicht eindeutig geklärt werden. Die MSM3- und MSM5-Sequenzen zeigten sowohl zu *Methanosaeta concilii* (NR102903, AB679168, CP002565 und NR028242) als auch zu *Methanobrix soehngenii* (X51423 bzw. X16932) eine gleich hohe Sequenzhomologie (99–100%). Allerdings wurde die Nomenklatur der Gattungen *Methanobrix* und *Methanosaeta*, insbesondere der vorab genannten Spezies, in der Vergangenheit kontrovers diskutiert und die Bezeichnungen werden heute meist als Synonyme verwendet (Wayne 1994, Boone & Kamagata 1998, Zheng & Raskin 2000), sodass es sich voraussichtlich um den gleichen Organismus handelt. Dieser ist ein filamentös wachsendes, rein acetoklastisch-methanogenes Archaeon (Thauer *et al.* 2008, Rajakumar *et al.* 2012).

Da die MSM3- und MSM5-Sequenzen bzw. die ARC1- und ARC4-Sequenzen und gegebenenfalls auch die ARC2-Sequenz zueinander eine bis zu 100%ige Sequenzhomologie aufwiesen, ist davon auszugehen, dass es sich jeweils um den selben Mikroorganismus handelt, der ein multiples Bandenmuster in der DGGE erzeugt. Dies ist dann der Fall, wenn mehrere 16S rRNA-Genkopien in einem Organismus

vorliegen, jedoch die entsprechenden Sequenzen nicht gleich sind. Ähnliche Beobachtungen wurden in früheren Studien schon mehrfach getätigt (Nübel *et al.* 1996, Satokari *et al.* 2001, Neilson *et al.* 2013).

Da einige Banden Archaea-spezifische DGGE Sequenzen repräsentierten, die den Crenarchaeota zuzuordnen sind (vgl. Anhang A-10 und Tabelle 5-1), ist im Folgenden (Abbildung 5-38) das generierte Dendrogramm der Crenarchaeota gezeigt.

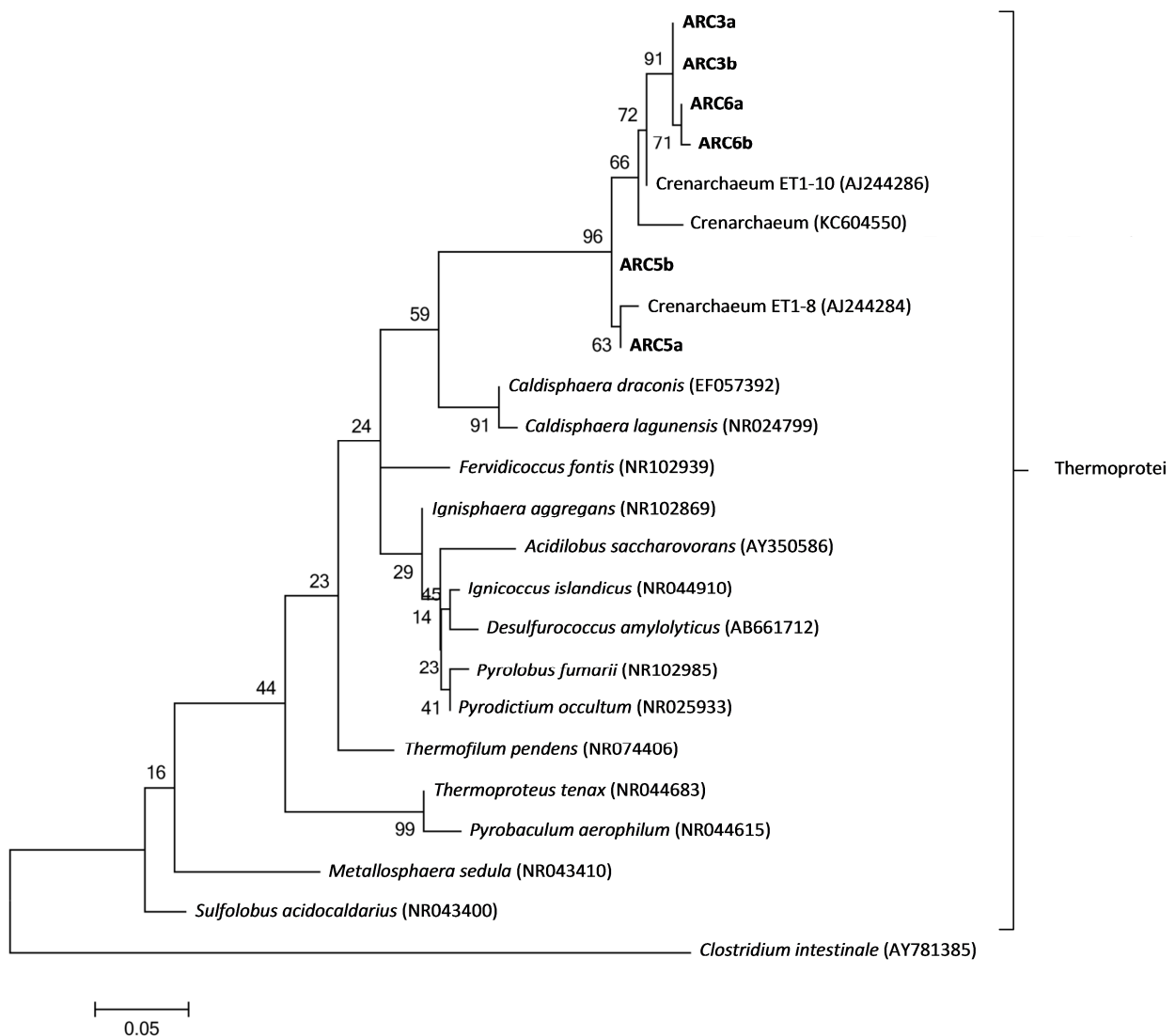


Abbildung 5-38: Phylogenetischer Stammbaum der reamplifizierten DGGE-Banden der Crenarchaea

Phylogramm erstellt auf Grundlage von reamplifizierten 16S rDNA-Sequenzen von Archaea (ARC) aus der entsprechenden DGGE-Analyse (Abbildung 5-35). Der Stammbaum wurde mit dem Programm MEGA 5.2 (Tamura *et al.* 2011) unter Verwendung der Maximum Likelihood-Methode, basierend auf dem Tamura-Nei-Model (Tamura & Nei 1993), erstellt. Zahlenangaben an internen Ästen bezeichnen Bootstrapping-Bestätigungswerte für den entsprechenden Ast bezogen auf 1000 Replikationen. Die Accession Numbers der Referenzsequenzen sind in Klammern angegeben. Als technische Referenzgruppe diente die Sequenz von *Clostridium intestinale*. Der Größenstandard bezeichnet einen Sequenzunterschied von 5% bezogen auf die Gesamtlänge des zugrundeliegenden Sequenz-Alignments.

Die Taxonomische Zuordnung der ARC3, -5, und -6-Sequenzen nach RDP Classifier war auf Gattungsebene nicht so sicher. Es konnten jedoch eine 89–98%ige Konfidenz für die Klasse der Ther-

moprotei und immerhin noch eine 31–66%ige Konfidenz für *Caldisphaera* sp. ermittelt werden. Im Dendrogramm clusterten alle sechs analysierten Sequenzen mehr oder minder miteinander, wobei ARC3 und ARC6 eine sehr nahe Verwandtschaft zueinander aufwiesen und eine hohe Sequenzhomologie (93–96%) zu dem Crenarchaeon ET1-10 (AJ244286), welches in einer Anreicherungskultur detektiert wurde, die mit Reisfeldboden angeimpft worden war. In der selben Studie wurde auch das Crenarchaeon ET1-8 (AJ244284) detektiert (Chin *et al.* 1999), welches eine sehr hohe Sequenzhomologie (98–99%) zu den ARC5-Sequenzen aufwies. Wie schon vorab ermittelt, wiesen die ARC3, -5, und -6-Sequenzen ebenso eine recht nahe Verwandtschaft zu den *Caldisphaeraceae* auf, wie bspw. zu *Caldisphaera draconis* (EF057392) und *Caldisphaera lagunensis* (NR024799). Eine eindeutige phylogenetische Zuordnung war jedoch aufgrund fehlender Referenzsequenzen nicht möglich.

Auch in der Studie zur mikrobiellen Struktur eines Schlamm-Bett-Filter Reaktors durch Connaughton und Kollegen (2006) wurden Crenarchaeota vergesellschaftet mit methanogenen Archaea ermittelt. Untersuchungen zeigten, dass Crenarchaeota in anaeroben Biofilmen zur Abwasserbehandlung in hohen Abundanzen vorkommen und zusammen mit Methanogenen in anaeroben Labor-Bioreaktoren kultiviert werden können. Dabei wurden Crenarchaeota-Zellen in direkter räumlicher Nähe zu *Methanosaeta*-Zellen detektiert, was die Hypothese aufstellte, dass Crenarchaeota ein aktiver Teil des mikrobiellen Konsortiums in Bioschlamm sind, welche in Interaktionen mit Acetat-verwertenden Methanogenen stehen (Collins *et al.* 2005). Yenigün und Demirel (2013) konnten indessen einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Raumbelastung sowie eines erhöhten Ammoniak-Gehaltes mit einer vermehrten Abundanz an Crenarchaeen in Fermentern ermitteln. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Chen und Kollegen. Sie konnten hierbei Crenarchaeen detektieren, die nahe verwandt zu *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, der Ammoniak zu oxidieren vermag, waren (Chen *et al.* 2012). Auch die in dieser Arbeit analysierten Sequenzen (ARC3, -5, und -6) wiesen eine hohe Sequenzähnlichkeit zu diesem Organismus auf (83–85%). Ferner wurde bereits in Kapitel 3.1.1 die mögliche Beteiligung der Crenarchaeota an der Hydrolyse erwähnt (Lebuhn & Gronauer 2009). So sind Crenarchaeen bei der anaeroben Vergärung offensichtlich in einer höheren Abundanz vertreten als in früheren Studien angenommen. Allerdings konnte ihre Rolle im Stoffwechselweg der Methanbildung noch nicht aufgeklärt werden.

5.5.2.2 Diversität der Bacteria

Da in Kapitel 5.5.1.2 eine vergleichsweise hohe bakterielle Zellzahl in den Proben der Methanreaktoren festgestellt wurde, wurde auch die bakterielle Diversität eingehender betrachtet. Zur Bestimmung der phylogenetischen Diversität der Bacteria diente dabei ebenso unter anderem die Methode der FISH mit spezifischen Sonden für Cellulose-Abbauer – der *Clostridium* Gruppe, der Bacteroidetes, der *Acetivibrio* Gruppe und der Pseudomonadaceae. In Abbildung 5-39 sind die Anteile der hydrolytischen Bacteria in

den abgelösten Biofilm-Fractionen der Füllkörper (1 bis 3) der Methanreaktoren 2R20 und 2R19 Mitte sowie in den entsprechenden Schlammproben der Beprobungsphase C4 dargestellt.

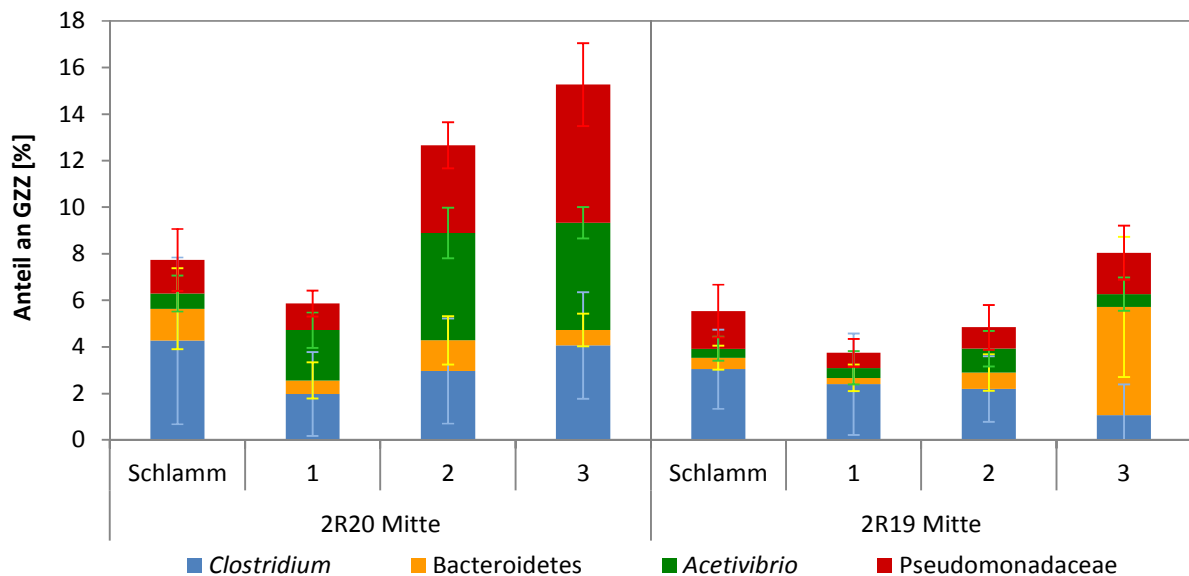


Abbildung 5-39: Anteile Cellulose-abbauender Mikroorganismen in den Methanreaktoren

Anteile von Vertretern der *Clostridium* Gruppe, der Bacteroidetes, der *Acetivibrio* Gruppe und Pseudomonadaceae an der GZZ zur Beprobungsphase C4, analysierte Proben: Schlammproben sowie Biofilmproben der Füllkörper der Methanreaktoren 2R20 und 2R19 Mitte, Biofilm-Fractionen: 1 \triangle außen bis 3 \triangle mittig. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

Entgegen den Beobachtungen bei der Analyse der Gesamtheit der Bacteria, bei der eine Abnahme der bakteriellen Anteile von der äußeren zur inneren Biofilmschicht der Füllkörper ermittelt wurde (Abbildung 5-33), nahmen hierbei die Summe der Anteile der untersuchten Cellulose-Abbauer nach innen hin zu. So scheinen in den äußeren Biofilmschichten noch andere, an dieser Stelle nicht erfasste, Bacteria vorzukommen.

In Reaktor 2R20 konnte von außen zur Mitte eine Zunahme der *Clostridium* Gruppe um etwa das Doppelte, im Reaktor 2R19 jedoch eine Abnahme dieser Gruppe auf etwa die Hälfte beobachtet werden. In Reaktor 2R20 zeigte sich eine leichte Schwankung der Abundanz der Bacteroidetes um etwa 1%. Im Reaktor 2R19 nahm der Anteil der Bacteroidetes zur Mitte bis auf ca. 5% zu. Die Abundanz der *Acetivibrio* Gruppe war hingegen in der mittigen Biofilmfraktion des Reaktor 2R20 mit knapp 5% vergleichsweise hoch. In beiden Reaktoren konnte eine Zunahme der Pseudomonadaceae im Biofilm von außen zur Mitte ermittelt werden, um jeweils über das Doppelte. Die Verteilung der verschiedenen Cellulose-Abbauer in den Schlammproben war in beiden Reaktoren sehr ähnlich und, abgesehen von einem leicht erhöhten Anteil an Bacteroidetes, ähnelte die mikrobielle Zusammensetzung stark der des analysierten Prozesswassers (vgl. Abbildung 5-11, Seite 82).

Wie schon in den vorangegangenen Analysen dieser Proben, waren jedoch auch bei dieser FISH-Analyse die Anteile der hybridisierten Zellen insgesamt sehr gering. Nichtsdestotrotz kann davon ausgegangen

werden, dass ein geringer Teil der Hydrolyse/Acidogenese auch in den Methanreaktoren stattfindet. Dabei kommt hier neben *Clostridium* auch den anderen drei analysierten Gruppen eine verstärkte Bedeutung zu. So wird, wie bereits erwähnt, u. a. vermutet, dass bestimmte Vertreter der Pseudomonadaceae eine wichtige Rolle beim Acetatabbau einnehmen könnten (Li *et al.* 2009). So wäre eine Vergesellschaftung mit bspw. dem ebenso in diesen Proben detektierten *Methanosaeta*, die durch eine hohe Acetatkonzentration inhibiert werden, denkbar. Da Vertreter der Bacteroidetes darauf spezialisiert sind, komplexe organische Materialien abzubauen und zudem noch sehr stressresistent auf Änderungen im Substratangebot reagieren, ist ihr leicht erhöhter Anteil in den Methanreaktoren, in denen kein leicht hydrolysierbares Material mehr ankommen sollte, nachvollziehbar (Thomas *et al.* 2011, Kampmann *et al.* 2012). Vertreter der Gattung *Acetivibrio* und der *Clostridium* Gruppe sind mesophile, fermentative Bakterien, die allgemein zu den am häufigsten vertretenen Cellulose-abbauenden Mikroorganismen in Biogasanlagen zählen (Cirne *et al.* 2007, Li *et al.* 2009). Da bspw. *Acetivibrio cellulolyticus* aus Cellulose direkt die Ausgangsstoffe für die Methanbildung – Acetat, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid – bilden kann, hohe Konzentrationen von Acetat und H₂ aber wiederum dessen Wachstum inhibieren, ist eine symbiotische Beziehung mit Methanogenen sogar naheliegend (Khan 1980, Laube & Martin 1981). Auch verschiedene Vertreter der *Clostridium* Gruppe sind fernerhin an der Acetogenese beteiligt (Hattori 2008, Weiland 2010).

Zur weiteren Untersuchung der phylogenetischen Diversität diente auch hier die Analyse mittels DGGE. In Abbildung 5-40 sind die DGGE-Bandenmuster von 16S rDNA-Fragmenten der Bacteria der abgelösten Biofilme der Füllkörper aus Reaktor 2R20 aus verschiedenen Tiefen sowie die der einzelnen Biofilm-Fraktionen der Füllkörper (1 bis 5) der Methanreaktoren 2R20 und 2R19 Mitte und die der entsprechenden Schlammproben der Beprobungsphase C4 gezeigt. Obwohl das amplifizierte Fragment für die DGGE-Analyse sehr klein war (ca. 160 bp), war das Bandenmuster sehr divers. Die Banden lagen sehr eng und waren daher teilweise nicht unterscheidbar. Auch die relative Intensität vieler Banden war sehr schwach, weshalb in dieser Auswertung nur auf die Hauptbanden (Banden 1–13), die auch ausgeschnitten und sequenziert wurden, eingegangen werden kann. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass hier im Gegensatz zur Archaea-spezifischen DGGE viele Banden detektiert werden konnten, die spezifisch für eine oder wenige Proben waren. Zur Auswertung der vollständigen Bandenmuster wurde mittels des Programmes BioNumerics eine Clusteranalyse durchgeführt (siehe Abbildung 5-42, Kapitel 5.5.3).

Generell waren die Hauptbanden in ihrer relativen Intensität je nach Probe unterschiedlich. Die Banden 7 und 11, die in allen Füllkörperproben des Methanreaktors 2R19 als Doppelbande und in hoher Intensität ausgeprägt vorlagen, wiesen im Methanreaktor 2R20 eine deutlich schwächere Intensität auf, wobei Bande 11 teilweise kaum noch erkennbar war. In den Schlammproben beider Festbett-Reaktoren fehlte Bande 11. Dafür war in den Schlammproben Bande 9 in ihrer relativen Intensität dominant,

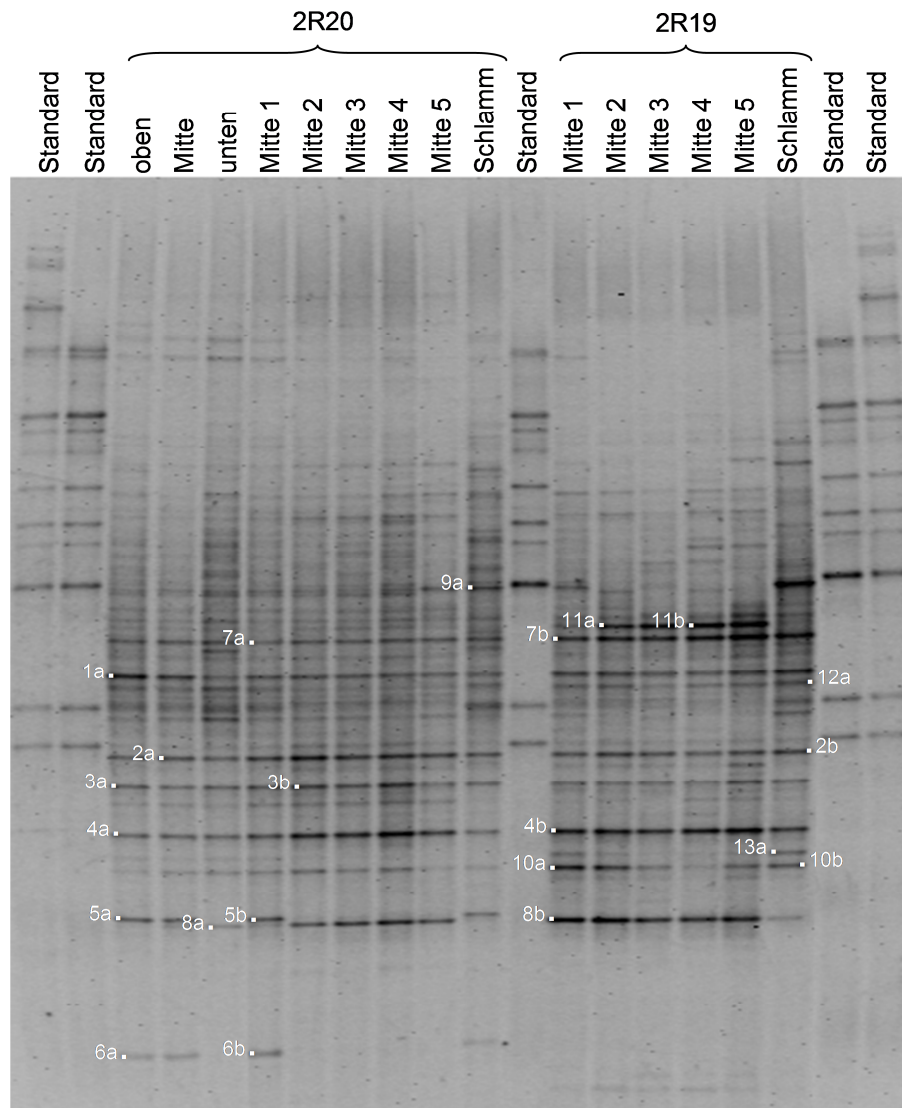


Abbildung 5-40: DGGE-Bandenmuster von 16S rDNA-Fragmenten der Bacteria
 Gelelektrophoretische Auftrennung von 16S rDNA-Fragmenten amplifiziert durch das Primerpaar 357f/518r, analysierte Proben: Schlammproben sowie Biofilmproben der Füllkörper der Methanreaktoren 2R20 und 2R19, Biofilm-Fractionen: 1 \triangle außen bis 5 \triangle innen, Beprobungsphase C4. Die gekennzeichneten Banden wurden ausgeschnitten, reamplifiziert, sequenziert und weiter phylogenetisch analysiert.

während sie in den Proben 2R19 Mitte Biofilmfraktion 2, 4 und 5 fehlte und auch in den anderen Füllkörperproben nur schwach detektiert wurde. Die Banden 1 bis 4 sowie 12 waren in allen Proben vertreten. Bande 10 wurde in sehr unterschiedlicher Intensität detektiert und konnte in den Proben 2R20 Mitte Biofilmfraktion 1 und 5 sowie 2R19 Mitte Biofilmfraktion 4 nur noch sehr schwer erkannt werden. In jeder Probe wurde entweder Bande 5 oder Bande 8 detektiert, jedoch nur in den Proben 2R20 Mitte und 2R20 Mitte Biofilmfraktion 1 traten beide Banden gemeinsam auf. Die Bandenmuster der Proben aus dem Festbett-Reaktor 2R19 enthielten weiterhin alle Bande 8, genauso wie die Proben aus Reaktor 2R20 unten und die Füllkörperproben 2R20 Mitte Biofilmfraktion 2 bis 5. Bande 5 dagegen wurde in den Proben aus Reaktor 2R20 oben und Mitte sowie in der Schlammprobe des Methanreaktors 2R20 und bei der Probe 2R20 Mitte Biofilmfraktion 1 detektiert. Bande 6 trat nur in Proben des

Methanreaktors 2R20 auf – 2R20 oben, Mitte, Mitte Biofilmfraktion 1 und in der Schlammprobe. Bande 13 war nur in Proben des Reaktor 2R19 stark ausgeprägt, insbesondere in der Schlammprobe und in 2R19 Mitte Biofilmfraktion 1. In Reaktor 2R20 war sie nur leicht in den Proben 2R20 oben bis unten und 2R20 Mitte Biofilmfraktion 1 bis 4 erkennbar. Alle beschriebenen Banden wurden ausgeschnitten, reamplifiziert und sequenziert. Im Anhang A-10 ist die taxonomische Zuordnung der sequenzierten Banden mittels RDP Classifier (Cole *et al.* 2009) tabellarisch aufgelistet. Aufgrund des teilweise minderwertigen Sequenziererfolges bzw. der Kürze der Sequenzen konnten nicht alle Banden eindeutig einer Gattung zugeordnet werden, was sich in einer geringen Konfidenz zeigte.

Auf Grundlage dieser Sequenzierergebnisse und der Bandenmuster der entsprechenden DGGE (Abbildung 5-40) erfolgte eine Zuordnung der detektierten bakteriellen Vertreter zu den analysierten Proben (Tabelle 5-2). Dabei wurden nur die Sequenzen berücksichtigt, deren Konfidenz für die Zuordnung des Phylums bei mindestens 75% lag. Um auszuschließen, dass mehrere Sequenzen mit einer Bande assoziiert sind (Sekiguchi *et al.* 2001, Legatzki *et al.* 2011), wurden, wenn möglich, je zwei Banden mit gleicher Laufweite analysiert. Da die Bandenstärken zwischen den Proben methodisch bedingt nicht vergleichbar sind, kann auch hier keine Aussage über die quantitative Verteilung der Mikroorganismen getroffen werden. Weil auch hier die dominanten Banden in den meisten Proben vorhanden waren, ähnelte sich ebenso die mikrobielle Verteilung. Auffällig war jedoch, dass *Gemmatimonas* sp. (BAC6) nur in Reaktor 2R20 detektiert werden konnte. Die meisten ermittelten Sequenzen wurden aber den Firmicutes zugeordnet.

Zur weiteren Diversitäts-Analyse wurden die sequenzierten bakteriellen 16S rDNA-Abschnitte sowie ausgewählte Referenz-Sequenzen aus der Datenbank des NCBI zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes eingesetzt. Auch hier wurden nur die Sequenzen berücksichtigt, deren Konfidenz für die Zuordnung des Phylums bei mindestens 75% lag. Aufgrund der kurzen Sequenzlängen waren einige Bootstrapping-Bestätigungswerte, insbesondere an wurzelnahen Knotenpunkten, verhältnismäßig gering, sodass den Verzweigungen an diesen Punkten nur eine geringe Signifikanz zugewiesen werden kann. In Abbildung 5-41 ist das entsprechende Dendrogramm der Bacteria dargestellt. Ebenso an dieser Stelle erfolgte mittels BLASTn-Analyse ferner die Detektion der Datenbanksequenzen bzw. der Mikroorganismen, die die höchste Sequenzhomologie zu den Vergleichssequenzen aufwiesen. Da keine vollständigen 16S rDNA-Gensequenzen vorlagen, können auch hier die DGGE-Banden nicht zweifelsfrei den ermittelten Spezies zugewiesen werden. Hierbei kann jedoch anhand der geringen Signifikanzwerte (e-values) von 9×10^{-57} bis maximal 5×10^{-29} von einer signifikanten Zuordnung ausgegangen werden.

Tabelle 5-2: Bakterielle Vertreter in den Biofilm- und Schlammproben der Methanreaktoren

Proben- bezeichnung	Phylum				
	Firmicutes	Proteobacteria	Synergistetes	Gemmatimonadetes	
2R20	oben	<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	<i>Gemmatimonas</i> sp. (BAC6)
	Mitte	<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	<i>Gemmatimonas</i> sp. (BAC6)
	unten	<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	
	Mitte 1	<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	<i>Gemmatimonas</i> sp. (BAC6)
	Mitte 2	<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	
	Mitte 3	<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	
	Mitte 4	<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	
	Mitte 5	<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	
	Schlamm	<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	<i>Gemmatimonas</i> sp. (BAC6)
	2R19	Mitte 1	<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)
Mitte 2		<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	
Mitte 3		<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	
Mitte 4		<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	
Mitte 5		<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	
Schlamm		<i>Sarcina</i> sp. (Bac1), <i>Thermoflavimicrobium</i> sp. (BAC2), <i>Pelotomaculum</i> sp. (BAC7, -11), <i>Syntrophaceticus</i> sp. (BAC8), <i>Anaerobacter</i> sp. (BAC9)	<i>Syntrophobacter</i> sp. (BAC3)	<i>Anaerobaculum</i> sp. (BAC4)	

In Klammern sind die dazugehörigen Bandentypen der Bacteria-spezifischen (BAC) DGGE (Abbildung 5-40) beschrieben, taxonomische Zuordnung nach RDP Classifier (vgl. Anhang A-10)

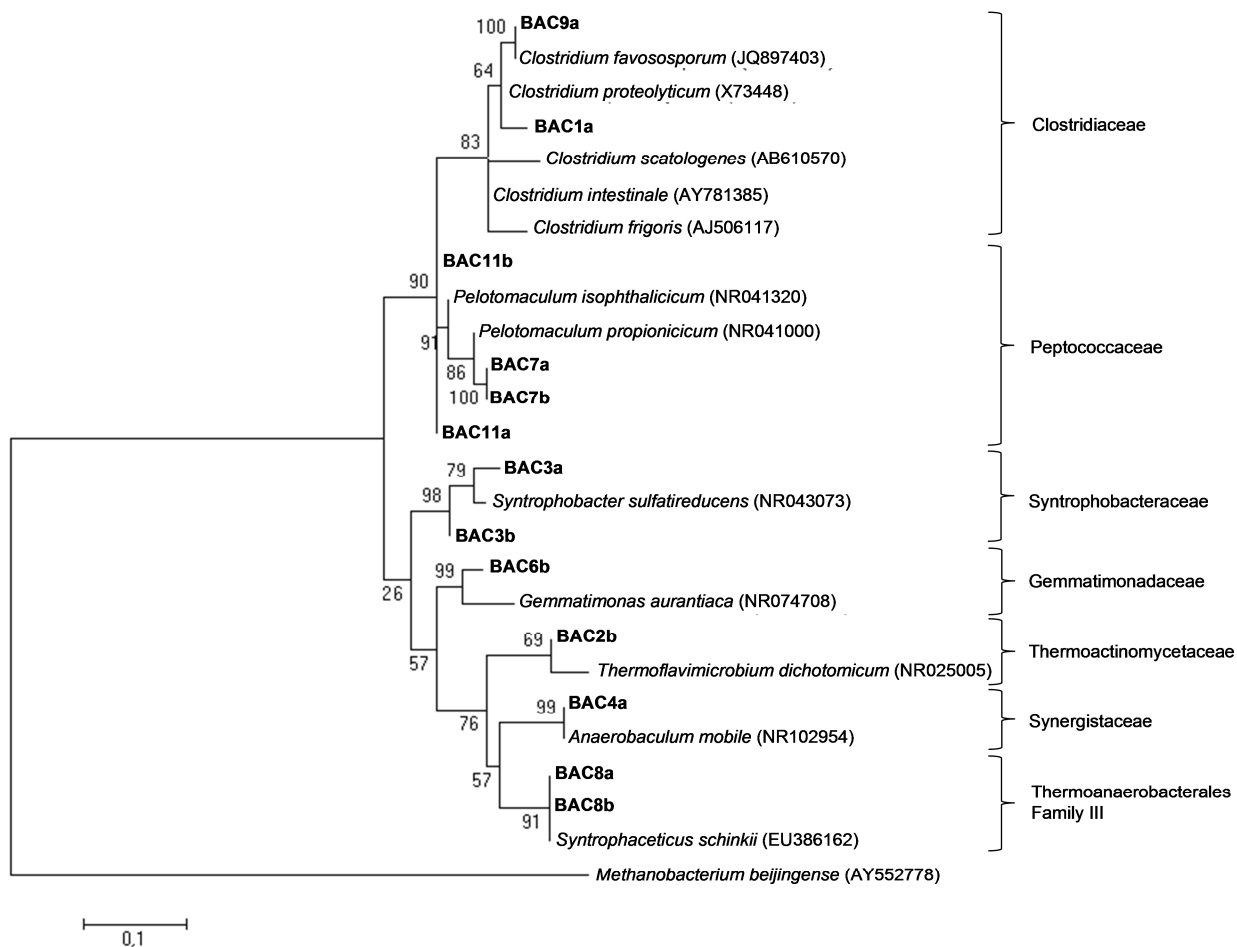


Abbildung 5-41: Phylogenetischer Stammbaum der reamplifizierten DGGE-Banden der Bacteria

Phylogramm erstellt auf Grundlage von reamplifizierten 16S rDNA-Sequenzen von Bacteria (BAC) aus der entsprechenden DGGE-Analyse (Abbildung 5-40). Der Stammbaum wurde mit dem Programm MEGA 5.2 (Tamura *et al.* 2011) unter Verwendung der Maximum Likelihood-Methode, basierend auf dem Tamura-Nei-Modell (Tamura & Nei 1993), erstellt. Zahlenangaben an internen Ästen bezeichnen Bootstrapping-Bestätigungswerte für den entsprechenden Ast bezogen auf 1000 Replikationen. Die Accession Numbers der Referenzsequenzen sind in Klammern angegeben. Als technische Referenzgruppe diente die Sequenz von *Methanobacterium beijingense*. Der Größenstandard bezeichnet einen Sequenzunterschied von 10% bezogen auf die Gesamtlänge des zugrundeliegenden Sequenz-Alignments.

Schon nach RDP Classifier konnten beide BAC8 Sequenzen 100%ig *Syntrophaceticus* sp. zugeordnet werden und auch im Dendrogramm clusterten sie mit den Thermoanaerobacterales und zeigten nach BLASTn-Analyse eine 100%ige Sequenzhomologie zu *Syntrophaceticus schinkii* (EU386162). Hierbei handelt es sich um ein mesophiles, syntroph Acetat-oxidierendes Bakterium, das aus Bioschlamm eines mesophilen Biogasreaktors mit hohen Ammonium-Konzentrationen isoliert wurde (Westerholm *et al.* 2010). Die BAC4-Bande konnte *Anaerobaculum* sp. zugeordnet werden und bildete auch im Stammbaum ein Cluster mit *Anaerobaculum mobile* (bspw. NR102954 oder CP003198), mit dem es, ebenso wie zu *Acetomicrobium flavidum* (FR733692), eine nahe Verwandtschaft aufwies (je 97% Sequenzhomologie). *Anaerobaculum mobile* ist ein gemäßigt thermophiles Bakterium mit einer Generationszeit von ca. drei Stunden, welches Kohlenhydrate und organische Säuren zu Acetat, Wasserstoff und CO₂ umwandelt (Menes & Muxí 2002). Es wurde u. a. schon in einem methanogenen Festbettreaktor mit kurzer hydraulischer Verweilzeit detektiert (Sasaki *et al.* 2006). Sehr ähnliche physiologische Merkmale sind für

Acetomicrobium flavidum beschrieben, das ebenfalls zur Familie der Synergistaceae zählt (Soutschek *et al.* 1984). Nach RDP Classifier wurden die BAC2-Sequenzen den Thermoactinomycetaceae zugeordnet. Nach BLASTn-Analyse wiesen sie indes mit einer Sequenzhomologie von jeweils 95% die nächste Verwandtschaft zu *Desulfotomaculum thermobenzpicum* (AJ294430, NR042045 bzw. Y11574) und *Desulfotomaculum thermoacetoxidans* (NR029336), die zu den Peptococcaceae zählen, auf. Jedoch konnte bei der Stammbaumanalyse keine nähere Verwandtschaft mit dieser Familie bestätigt werden. So war die taxonomische Zuordnung an dieser Stelle aufgrund der kurzen Sequenz nicht eindeutig, wobei aber anzunehmen ist, dass die BAC2-Sequenzen sicher bei den Firmicutes einzugliedern sind. Nach BLASTn-Analyse sowie nach RDP Classifier wiesen die BAC6-Sequenzen eine Verwandtschaft zu *Gemmatimonas* sp., mit einer Sequenzhomologie von 87% insbesondere zu *G. aurantiaca* (NR074708, AP009153 bzw. NR027529) auf. In der Tat wurde *Gemmatimonas aurantiaca* auch schon aus einem anaeroben-aeroben sequentiellen Batch-Reaktor für die biologische Phosphor-Elimination von Abwasser isoliert (Zhang *et al.* 2003). Und da es offenbar auch in anaeroben Biogasanlagen wachsen kann, wurde es ebenfalls in einem langfristigen Feldversuch nach Düngung mit Gärresten nachgewiesen (Abubaker 2012). Die BAC3-Sequenzen clusterten im Dendrogramm deutlich mit *Syntrophobacter sulfatireducens* (NR043073) und auch nach RDP Classifier und der BLASTn-Analyse zeigten sie eine 96–97% Sequenzhomologie zu diesem Mikroorganismus. *Syntrophobacter* sp. ist ein typischer Vertreter der aceto-genen bzw. syntrophen Bakterien (Hattori 2008, Weiland 2010). Oben genannte Spezies wurde aus UASB-Reaktoren isoliert und oxidiert Propionat und Pyruvat zu Acetat, mit Sulfat als Elektronenakzeptor, zudem es Pyruvat auch durch Fermentation zu oxidieren vermag (Chen *et al.* 2005). Die BAC7- und BAC11-Sequenzen bildeten ein gemeinsames Cluster mit den Peptococcaceae. BAC7 wies dabei mit 95–96% die höchste Sequenzhomologie zu *Pelotomaculum propionicicum* (NR041000) auf und BAC11 zeigte mit 96% Sequenzhomologie die größte Ähnlichkeit zu *Pelotomaculum isophthalicum* (NR041320). *Pelotomaculum isophthalicum* wächst nur mit aromatischen Verbindungen in Co-Kultur mit hydrogenotrophen Methanogenen. In einer syntrophen Co-Kultur mit *Methanospirillum hungatei*, der ebenfalls in den Proben detektiert wurde (vgl. Kapitel 5.5.2.1), kann *P. isophthalicum* Phthalat-Isomere und Benzoate für das Wachstum nutzen und die Co-Kultur produziert dabei Acetat und Methan (Qiu *et al.* 2006). Das oben genannte obligat syntrophe Bakterium *Pelotomaculum propionicicum* wurde aus einem UASB-Reaktor isoliert und setzt in Co-Kultur mit methanogenen Archaea Propionat in Acetat um (Imachi *et al.* 2007). Die Sequenzen von BAC1 und BAC9 bildeten mit den Clostridiaceae ein Cluster. Nach RDP Classifier wurde die BAC1-Sequenz mit einer Konfidenz von nur 14% *Sarcina* sp. zugeordnet. Nach der BLASTn-Analyse wies die Sequenz mit 96% jedoch die höchste Homologie zu *Clostridium diolis* (DQ831125) auf. Dieses Bakterium kann eine Vielzahl von Kohlenhydraten und Kohlenhydrat-Derivaten, einschließlich Glucose, Cellobiose und Xylose, fermentieren. Die Fermentationsprodukte von Glucose sind dabei Butyrat und Acetat (Biebl & Spröer 2002). *Clostridium diolis* wurde daher schon

mehrfach in Biogasanlagen detektiert (Lee *et al.* 2008, Kim *et al.* 2012). Auch BAC9 wurde nach RDP Classifier nicht der Gattung *Clostridium* zugeordnet, sondern mit einer Konfidenz von 25% *Anaerobacter* sp.. Jedoch auch in diesem Fall ergab die BLASTn-Analyse eine nahe Verwandtschaft zu der Gattung *Clostridium*, im Speziellen zu *Clostridium favosporum* (JQ897403), mit einer Sequenzhomologie von 98%. Dieser Mikroorganismus wurde u. a. bei der Analyse mikrobieller Lebensgemeinschaften beim methanogenen Abbau von Reisstroh im Boden detektiert (Weber 2000). Die Sequenzen der BAC1- und BAC9-Banden zählen beide zum Cluster I der Clostridiaceae und die entsprechenden Mikroorganismen zeigen daher auch ähnliche physiologische Merkmale.

5.5.3 Vergleich der Methanreaktoren

Die untersuchten Methanreaktoren waren vom selben Typ (Größe, Bauform, Material, etc.), seit der selben Zeit in Betrieb und wurden mit dem gleichen Prozesswasser mit einheitlicher Zulauftrate beschickt. Der einzige Unterschied lag in der Sorte der Füllkörper, mit denen sie beladen waren, Bioflow 40 in Reaktor 2R20 und Hel-X H2X36 in Reaktor 2R19, wobei diese sich in Größe, Form, Material und Dichte ähneln (vgl. Tabelle 4-1, Seite 30). Aber schon bei der Untersuchung der organischen Trockensubstanz zeigten sich klare Unterschiede zwischen der abgelösten Biomasse der Füllkörper. So wies der Biofilm des Füllkörpers Hel-X H2X36 aus Reaktor 2R19 einen über dreimal höheren organischen Anteil an der Trockensubstanz auf (vgl. Abbildung 5-31) und war weit weniger stark mit anorganischem Material durchsetzt als der Biofilm des Füllkörpers Bioflow 40 des Reaktors 2R20. Auch die ermittelte Zellzahl der Archaea lag im Biofilm des Reaktors 2R19 methodenunabhängig über der des Reaktors 2R20 (vgl. Abbildung 5-32). Bei der FISH-Analyse bezüglich bestimmter Mikroorganismen-Gruppen zeigten sich weiterhin einige Unterschiede. So waren im Biofilm des Reaktors 2R19 die Anteile der Methanobacteriaceae und Methanomicrobiales im Mittel etwas höher und im Biofilm des Reaktors 2R20 waren dagegen die Anteile der Methanococcaceae und Methanosarcinales vergleichsweise hoch (vgl. Abbildung 5-34). Auch bei der FISH-Analyse der Cellulose-Abbauer zeigten sich Unterschiede in der mikrobiellen Verteilung. So war im Biofilm des Reaktors 2R19 der Anteil der Bacteroidetes durchschnittlich etwa doppelt so hoch wie im Reaktor 2R20. Dafür waren im Reaktor 2R20 die Anteile der *Clostridium* sowie *Acetivibrio* Gruppe sowie der Pseudomonadaceae bis teilweise über das Fünffache höher als im Biofilm des Reaktors 2R19.

Bei der Analyse mittels DGGE zeigten sich zwischen den Reaktoren zum Teil sehr ähnliche Bandenmuster, jedoch insbesondere bei der Bacteria-spezifischen DGGE konnten auch viele Banden detektiert werden, die probenspezifisch waren. Zur besseren Auswertung der diversen Bandenmuster wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Mit in die Analyse einbezogen wurden die Bandenmuster der DGGE-Gele für Archaea, Methanosarcinales/-microbiales und Bacteria. Das Ergebnis der Clusteranalyse ist in Abbildung 5-42 illustriert.

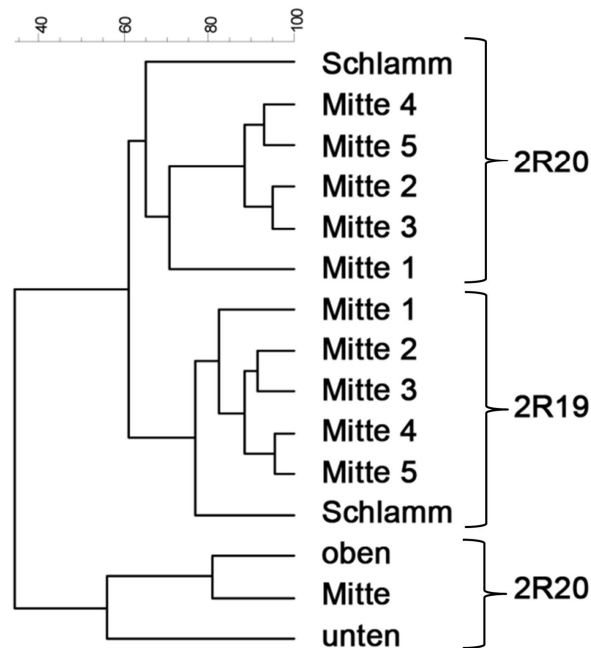


Abbildung 5-42: Clusteranalyse der DGGE-Bandenmuster
 Dendrogramm erstellt aus den Bandenmustern der Archaea-, Methanosarcinales/-microbiales- und Bacteria-spezifischen DGGE (Abbildung 5-35, Abbildung 5-36 und Abbildung 5-40) mittels BioNumerics unter Verwendung des Pearson Korrelationskoeffizienten und der Clustering-Methode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Der Maßstabsbalken gibt die prozentuale Ähnlichkeit der verglichenen Probenmuster an.

Besonders auffällig ist hierbei, dass sich die Biofilm-Proben des Reaktors 2R20 aus den verschiedenen Tiefen (oben bis unten) deutlich von den Proben der einzelnen Biofilmfraktionen sowie von den Schlammproben unterschieden und daher ein gemeinsames Cluster bildeten. Da in ihnen alle Biofilmschichten erfasst wurden, war hier auch die Bandenzahl und damit die Anzahl der detektierten Mikroorganismen am höchsten (vgl. Abbildung 5-36 und Abbildung 5-40). Des Weiteren zeigte sich eine größere Ähnlichkeit zwischen den Proben aus dem oberen und mittleren Drittel des Reaktors. Da die Zufuhr des Hydrolysats der untersuchten Methanreaktoren von oben stattfand, kann im oberen Bereich zunächst noch das leichter abbaubare Material umgewandelt werden und im unteren Drittel ist dann womöglich eine spezialisiertere Biozönose anzutreffen. Verstärkt wird dieser Effekt durch die Filterfunktion der Füllkörper, durch die Partikel wie auch Zellen im oberen Bereich der Füllkörperschüttung akkumulieren. Weiterhin clusterten die verschiedenen Biofilmfraktionen und Schlammproben der jeweiligen Reaktoren miteinander, was die Unterschiede zwischen den Biozönosen in den Methanreaktoren bestätigte. Dabei waren sich insbesondere die Biofilmfraktionen 2 und 3 sowie 4 und 5 sehr ähnlich. Die lockere, äußere Biofilmschicht (Biofilmfraktion 1) ähnelte mehr der entsprechenden Schlammprobe. Dies bestätigt erneut das Schichtmodell des Biofilms auf Aufwuchsflächen, nach dem

die mikrobielle Zusammensetzung eines Biofilms je nach Schicht variiert (Busch & Sieber 2006, Busch *et al.* 2009).

Die dominantesten Banden der DGGE wurden jedoch in beiden Methanreaktoren detektiert. Unter den hydrolysierenden/acidogenen Bakterien konnten dabei nahe Verwandte zu *Clostridium diolis* und *Clostridium favosporum* detektiert werden. Zudem konnten einige nahe Verwandte von acetogenen/syntrophen Bakterien erfasst werden, wie etwa *Anaerobaculum mobile* bzw. *Acetomicrobium flavidum*, *Syntrophaceticus schinkii*, *Syntrophobacter sulfatireducens*, *Pelotomaculum isophthalicum* und *Pelotomaculum propionicum*. Zu Vertretern der hydrogenotrophen Methanogenen zählen *Methanobacterium beijngense*, *Methanolinea tarda*, *Methanolinea mesophila* sowie *Methanospirillum hungatei*, deren nahe Verwandte in den Proben detektiert werden konnten. Außerdem konnten nahe Verwandte zu den acetoklastischen Methanogenen *Methanosarcina thermophila*, *Methanosaeta harundinacea* und *Methanosaeta concilii* (*Methanobrix soehngenii*) erfasst werden.

Auffällig war, dass das Vorkommen von *Syntrophaceticus schinkii* und *Crenarchaeota*, die in dieser Arbeit ebenfalls detektiert wurden, mit einem erhöhten Ammonium bzw. Ammoniak-Gehalt assoziiert werden konnte (Westerholm *et al.* 2010, Chen *et al.* 2012, Yenigün & Demirel 2013). Auch in den Proben beider Methanreaktoren konnte ein erhöhter Stickstoffgehalt ermittelt werden (vgl. Anhang A-9), der ein Indiz für eine vermehrte Ammoniak-Bildung darstellt. Weiterhin wurden unter den dominanten Banden auch thermophile Mikroorganismen erfasst, *Anaerobaculum mobile* bzw. *Acetomicrobium flavidum*, *Methanosarcina thermophila* sowie Thermoprotei (Crenararchaeota) (Soutschek *et al.* 1984, Menes & Muxí 2002, Pinto & Raskin 2012), was ein Hinweis auf Bereiche mit erhöhter Temperatur in den Methanreaktoren sein kann. Lindorfer und Kollegen (2006) untersuchten die Selbsterhitzung von Fermentern und gingen davon aus, dass diese mit dem mikrobiellen Stoffwechsel verbunden ist, also aus exothermen Substratumsatzreaktionen resultiert. Dies ist aufgrund der schnelleren Umsatzraten bei erhöhten Temperaturen jedoch von Vorteil für den Prozess (Aschmann *et al.* 2007).

Da sich jedoch auch der mittlere Biogasertag der beiden Methanreaktoren unterschied, für Reaktor 2R20 konnte in den sechs Monaten vor der Probenahme durchschnittlich etwa doppelte so hohe Werte detektiert werden, obwohl hier der Anteil der Anorganik erhöht war, ist davon auszugehen, dass sich die Wahl der Füllkörper sowohl auf die Zusammensetzung der Biozönose als auch auf die Effizienz der Biogasbildung auswirkt. So wurden die Füllkörper aus dem Reaktor 2R20 (Bioflow 40) schon mehrfach erfolgreich in Methanreaktoren für die anaerobe Vergärung eingesetzt (Zielonka *et al.* 2009, Pohl *et al.* 2012, Schönberg & Linke 2012). Dass sich die Füllkörper Hel-X H2X36 prinzipiell auch gut zur Immobilisation von Mikroorganismen eignen, zeigt bspw. die Studie von Koschorreck und Kollegen (2010), die diese Füllkörper in Bioreaktoren zur Sulfat-Reduktion von Wasser eines sauren Tagebausees verwendeten.

5.6 Wechselwirkungen verschiedener Kenngrößen im Biogasprozess

Im Rahmen dieser Arbeit konnten verschiedene mikrobiologische Parameter diverser Versuchsreihen mit unterschiedlichen Verfahrensmodifikationen analysiert werden. Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargelegt, eignen sich die angewandten Methoden, um sowohl den Normalbetrieb zu beobachten und frühzeitig Prozessstörungen zu detektieren als auch die Auswirkungen von Modifikationen im Verfahren zu analysieren. Zur eingehenderen Untersuchung dieser Parameter dienten Korrelationsanalysen (Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson). Hierbei wurden lineare Abhängigkeiten zwischen zwei Variablen genauer betrachtet. In die Berechnungen wurden, wenn nicht anders angemerkt, alle in dieser Arbeit erfassten gemeinsamen Daten zweier Parameter einbezogen. Aufgrund der teilweise geringen Datendichte (Stichprobenmenge < 15) sind die entsprechenden Auslegungen als Hypothesen zu verstehen und bedürfen einer Validierung. In Tabelle 5-3 (Seite 157 ff.) sind die wesentlichen ermittelten Korrelationen zusammengefasst. Dabei wurden nur Korrelationspaare berücksichtigt, die eine gemeinsame Stichprobenmenge (n) von mindestens fünf, einen Determinationskoeffizienten (r^2) von mindestens 0,6 und einen Signifikanzwert (p -Wert) von maximal 0,05 aufwiesen. In Abbildung 5-43 (Seite 160) sind die Korrelationen, die in Tabelle 5-3 aufgelistet sind, in einer schematischen zweistufigen Biogasanlage dargestellt. Im Folgenden wird die Nummerierung der Tabelle 5-3 und der Abbildung 5-43 zur Bezeichnung der beschriebenen Korrelationen verwendet. Die M- bzw. G-Nummern weisen hierbei auf Korrelationen hin, die nur für die Vergärungsversuche mit Maissilage (M) bzw. Grassilage (G) detektiert werden konnten. Dies lag zum einen in der schlechten Silagequalität des Grases begründet (vgl. auch Erläuterung im Text), zum anderen wurden, wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, einige Parameter nicht durchgängig mitgeführt.

5.6.1 Eingangsmaterial

Einige mikrobiologischen Parameter korrelierten untereinander und mit mehreren chemischen Größen, was ihrer Signifikanz Nachdruck verleiht, wobei alle Prozessstufen erfasst werden konnten. Schon die Analyse der frischen Silage gibt Aufschluss über deren Qualität als Biogassubstrat. So stehen hier, wie auch in den anderen Prozessstufen, die Gesamtzellzahl (GZZ), die Esteraseaktivität, die Atmungsaktivität nach vier Tagen (AT_4) und der CSB in positiver Wechselwirkung und beeinflussen sich gegenseitig (#2, 3 und 24). Je höher die organische Fracht, desto höher die mikrobielle Aktivität sowie das mikrobielle Wachstum. Zudem konnte festgestellt werden, je älter die Silage, desto geringer die AT_4 , desto niedriger also die mikrobielle Atmungsaktivität (#1). Bei den Versuchen mit Maissilage konnte zudem eine negative Korrelation zwischen dem Silagealter und der Esterase-, Peptidase- bzw. Cellulaseaktivität ermittelt werden (#M1–3). Je frischer die Silage, desto höher die mikrobielle Aktivität. Das Prinzip der Silierung basiert auf einem Fermentationsprozess, in dem anaeroben Mikroorganismen Säuren bilden, v. a. Milchsäure, somit der Stoffwechsel durch Selbsthemmung stark eingeschränkt und die Biomasse

für eine längere Zeit konserviert wird. Daher nimmt die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Lagerzeit der Silage ab. Wenn die Silage mehrere Monate alt ist und eine niedrige Enzymaktivität aufweist, deutet dies auf eine gute Qualität der Silage mit einem geringen Energieverlust durch mikrobiellen Abbau hin. Wenn die Lagerungsbedingungen jedoch schlecht sind und das Substrat zum Beispiel in Kontakt mit Sauerstoff kommt, kann dies zu einem sekundären aeroben Abbau führen und die mikrobielle Aktivität ist erhöht (Schroeder 2004). So nahmen die Enzymaktivitäten bei der HCH-belasteten Grassilage, deren Konservierungserfolg nur mittelmäßig bis mangelhaft war, zwar tendenziell mit der Lagerdauer etwas ab, dies konnte in den meisten Fällen jedoch statistisch nicht gesichert werden. Vielmehr wurde hier eine negative Korrelation zwischen der Esteraseaktivität und dem Milchsäuregehalt detektiert (#G1), ein eindeutiger Beleg für die qualitativen Mängel der Silage. Weiterhin zeigte sich, je höher der β -HCH-Gehalt, desto niedriger der Milchsäuregehalt (#G2), was auf eine Hemmung der Milchsäurebakterien bzw. -gärung hinweist und einen Grund für den schlechten Konservierungserfolg darstellt. Die Qualität des Eingangsmaterials ist auch ein Hinweis auf die Effizienz der Hydrolyse. So korrelierten die Cellulase-, Protease- und Peptidaseaktivität des Eingangsmaterials positiv mit dem kumulativen CSB-Austrag aus dem Substrat der Hydrolysestufe (#4, M4 und M5). Die Enzymaktivität des frischen Substrates scheint demnach ein Anhaltspunkt für die Fermentierbarkeit desselbigen zu sein. Eine Erklärung hierfür ist die Inokulation von adaptierten Mikroorganismen, die die entsprechenden Hydrolasen erzeugen und eine effiziente Hydrolyse ermöglichen. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Zugabe von hydrolytischen Enzymen zum Prozess den Substratumsatz verbessern kann, was zu einer erhöhten Biogasausbeute führt (Schimpf & Valbuena 2009, Sri Bala Kameswari *et al.* 2011). Da das Cellulase-Enzym die Fähigkeit besitzt unlösliche Faserpflanzensubstrate zu löslichen, niedermolekularen reduzierenden Zuckern aufzuspalten, ist sie neben anderen Additiven dafür bekannt, die Abbauraten und Biogasausbeuten von Lignocellulose-haltiger Biomasse zu verbessern (Gerhardt *et al.* 2007). Ferner konnte dabei auch eine positive Korrelation zwischen der mikrobiellen GZZ des Eingangsmaterials und der kumulierten CSB-Auswaschung detektiert werden (#7), sodass sich auch in dem hier untersuchten Perkolationssystem eine mikrobielle Beimpfung durch das Substrat positiv auf die Hydrolyseeffizienz auswirkte. Dies bestätigt die Analysen des Kapitels 5.3.3, in dem die positive Wirkung der Inokulation des Substrates durch Zugabe von Gärrest aufgezeigt wurde. Negative Korrelationen konnten hingegen zwischen der AT_4 bzw. dem Anteil an hydrogenotrophen Methanogenen im Eingangsmaterial und der kumulierten CSB-Auswaschung aus dem Substrat ermittelt werden. Dies lässt sich erneut durch den Konservierungserfolg der Silage erklären. Je besser die Effizienz der Silierung, desto geringer die mikrobielle Aktivität, desto geringer der Substratumsatz und desto weniger Substrat steht den hydrogenotrophen Methanogenen zum Wachstum zur Verfügung. Dies resultiert in einem hohen Energiegehalt der Silage und einem erhöhten CSB-Austrag. Die mikrobiellen Aktivitäten und Zellzahlen der frischen Silage sind besonders interessant, weil sie Hinweise auf die Effizienz der Silie-

rung und deren Energiepotential geben und daher als Indikator für die Qualität der Silage als Biogassubstrat verwendet werden können.

5.6.2 Hydrolyse im Perkolator

Auch während der Hydrolyse des Substrates wurden diverse Zusammenhänge nachgewiesen. So konnten ebenso für Silageproben aus dem Perkolator positive Korrelationen zwischen der GZZ, der Esteraseaktivität, der AT_4 und des CSB erfasst werden (#2, 3 und 24). Weiterhin zeigten sich einige Korrelationen im Zusammenhang mit der Hydrolysegasbildung. Je höher die Peptidase- bzw. Proteaseaktivität, desto mehr Hydrolysegas wurde gebildet (#12 und 13). Dies liegt mitunter an dem im Vergleich zu Kohlenhydraten erhöhten Methanbildungspotential von Proteinen begründet (Eder *et al.* 2009). Dabei konnte auch eine positive Korrelation zwischen der Peptidase- bzw. Proteaseaktivität und dem H_2S -Anteil im Hydrolysegas ermittelt werden (#14 und 15). Proteasen und Peptidasen sind für die Spaltung von Proteinen bzw. Peptiden verantwortlich. Bei dieser Hydrolyse entsteht unter anderem Schwefelwasserstoff, der die Qualität des Biogases reduziert und in hohen Konzentrationen zur Hemmung der Bakterien führt (Speece 1996). Daher könnte diese Analyse auch als H_2S -Indikator dienen. Das Verhältnis Archaea zu Bacteria steht weiterhin mit der Atmungsaktivität des Substrats in Zusammenhang. Je höher das Verhältnis von Archaea zu Bacteria ausfällt, desto niedriger die AT_4 (#M6), das heißt, desto effektiver die vorangegangene Hydrolyse und desto geringer das Restgaspotential. Allerdings bringt ein hohes Archaea:Bacteria-Verhältnis auch eine erhöhte Produktion an Hydrolysegas und darin enthaltenem Methan mit sich (#9 und 10), sodass die in der Hydrolyse entstandenen Substrate der Methanogenen schon vor der eigentlichen Methanstufe zu Biogas umgesetzt werden. Ähnliche Beobachtungen machten auch Braun und Kollegen (2011), die bei der Analyse von anaeroben Schlämmen ebenfalls ein erhöhtes Archaea:Bacteria-Verhältnis mit einem guten Biogasproduktionspotential assoziierten. Ferner konnten Regueiro und Kollegen (2012) bei der Untersuchung von verschiedenen Biogasanlagen einen positiven Zusammenhang zwischen der archaeellen Abundanz und der methanogenen Aktivität feststellen. So ist auch die negative Korrelation zwischen der AT_4 , als Maß für das Restgaspotential, und dem Methangehalt im Hydrolysegas schlüssig (#16). Je niedriger das Restgaspotential der Silage (AT_4), je fortgeschrittener demnach der Substratabbau, desto intensiver die Methanbildung in der Hydrolysestufe. Der Prozess der Vergärung zeigte sich auch an der Beziehung von Xylanaseaktivität und dem Anteil an Methanosarcinales. Je höher die Xylanaseaktivität, je weiter fortgeschritten demnach die Hydrolyse, desto höher der Anteil der acetoklastischen Methanogenen (#18). So besteht auch eine positive Korrelation zwischen der Xylanaseaktivität und dem Methangehalt im Hydrolysegas (#11). Eine hohe Xylanaseaktivität in der Hydrolysestufe ist folglich unter anderem ein Indiz für die potentielle Produktion von Biogas. Auch Horn und Kollegen (2011) wiesen bei der Vergärung von Weiden (*Salix viminalis*) eine positive Korrelation zwischen der Bildung von Xylose und Glucose, die Abbau-

produkte von Xylan, und der Biogas- bzw. Methanbildung nach. Des Weiteren konnten einige Korrelationen zwischen den Silageproben aus dem Perkolator und dem Ablauf desselbigen ermittelt werden. Je höher die GZZ bzw. die AT_4 des Substrates, je höher also die mikrobielle Aktivität, desto höher der CSB im Hydrolysat (#M7 und 17), d. h. desto mehr organische Verbindungen stehen zur Methanproduktion zur Verfügung. Ebenso konnten positive Korrelationen zwischen der AT_4 , dem CSB, der Amylase- sowie Peptidaseaktivität der Perkolatorproben und dem FOS/TAC-Wert des Hydrolysats bestimmt werden (#19, 20, 22 und 23). Da das FOS/TAC-Verhältnis nur bei stark erhöhten Säurekonzentrationen, wie etwa in den ersten Tagen der Hydrolyse, einen vergleichsweise hohen Wert aufweisen sollte (vgl. Anhang A-4), stellt es ein Maß für die Prozessstabilität dar und zeigt zudem den Fortschritt der Hydrolyse an. Die Korrelation zwischen der Amylaseaktivität des Substrates und dem Essigsäureäquivalent des Ablaufes lässt ähnliche Schlüsse zu (#21).

5.6.3 Hydrolysat

Doch auch die Analyse des Hydrolysates deckte umfangreiche Zusammenhänge auf. Da sich die Amylaseaktivitäten im Perkolator und dessen Ablauf sehr ähnelten, konnte auch hier eine positive Korrelation zwischen der Amylaseaktivität und dem Essigsäureäquivalent ermittelt werden (#26). Zudem korrelierten der Essigsäureäquivalent, der oTS-Anteil, der FOS/TAC-Wert, die Esteraseaktivität sowie die GZZ jeweils positiv mit dem CSB (#25, 27, 28, 29/30 sowie 31). Dabei wurde festgestellt, dass innerhalb der ersten drei Tage der Hydrolyse im Vergleich zur Aktivität der Esterasen der CSB-Austrag aus den Perkolatoren besonders hoch war. Daher entsprach innerhalb dieser Phase eine Esteraseaktivität von 1 IU/mL einem CSB-Austrag von ca. 25.200 mg/L (#30). Ohne Berücksichtigung der Werte der ersten drei Tage der Hydrolyse entsprach eine Esteraseaktivität von 1 IU/mL einer CSB-Konzentration von ca. 11.300 mg/L (#29). Eine Erklärung für den erhöhten CSB-Austrag im Vergleich zur Esteraseaktivität im Ablauf der Perkolatoren ist eine höhere Säurekonzentration in den ersten Tagen der Hydrolyse. Durch die Verfügbarkeit von leicht abbaubaren Material der frischen Silage resultiert eine starke Produktion von organischen Säuren, wie bspw. Milchsäure, Essigsäure, n-Valeriansäure, Propionsäure und n-Buttersäure (Cirne *et al.* 2007, Sträuber *et al.* 2012). Darüber hinaus werden in den ersten Tagen die organischen Säuren der Silierung (hauptsächlich Milchsäure) ausgewaschen. So war sowohl der pH-Wert innerhalb der ersten drei Tage der Hydrolyse reduziert als auch der FOS/TAC erhöht (vgl. Anhang A-4). Da unspezifische Esterasen bei pH-Werten unter 6 eine stark verminderte Aktivität aufweisen (Rumsby *et al.* 1973, Perez-Gilabert *et al.* 2005), ist in dieser Phase das Verhältnis von Esteraseaktivität und CSB verschoben. Der FOS/TAC-Wert wird bei einem funktionierenden Puffersystem vorwiegend durch den FOS-Wert, also dem Anteil an flüchtigen organischen Säuren, bestimmt. Daher ist zu vermuten, dass der CSB vorwiegend durch die organischen Säuren im Prozesswasser ausgemacht wird, was auch die Korrelation zwischen dem Essigsäureäquivalent und dem

CSB erklärt. Die Korrelationen mit dem CSB zeigen zudem, dass die Substratumsetzung auch im Prozesswasser fortschreitet. Je höher die organische Fracht und je höher die mikrobielle GZZ, desto höher die mikrobielle Aktivität und die Substratumsetzung. Dies konnte auch durch die positive Korrelation zwischen der Esteraseaktivität und der GZZ bzw. dem BSB₅ bestätigt werden (#24 und 39). Dies ist insofern interessant, da der BSB inzwischen auch erfolgreich zur Prozesskontrolle von Biogasanlagen eingesetzt wird. Die Bestimmung des BSB₅ beansprucht jedoch eine Dauer von fünf Tagen. Als Alternative wurden Sensoren zur kurzzeitigen Messung des BSB (BOD_{st} = short term biological oxygen demand) entwickelt, die entweder respirometrische Methoden oder immobilisierte Mikroorganismen kombiniert mit einer Sauerstoff-Sonde verwenden (Liu *et al.* 2003, Ward *et al.* 2008). Die Bestimmung der Esteraseaktivität stellt hierbei eine weitere unabhängige sowie schnelle Alternative zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität von flüssigen aber auch von festen Proben dar. Des Weiteren konnte eine positive Korrelation zwischen der Esteraseaktivität des Prozesswassers und dem Methangehalt des Biogases des Methanreaktors detektiert werden (#38). Auch zwischen der GZZ, dem BSB₅, dem FOS/TAC-Wert, der Amylaseaktivität bzw. dem oTS-Gehalt und dem Biogasertrag des Methanreaktors konnten positive Korrelationen festgestellt werden (#32–36), sodass hier von der organischen Fracht sowie von der mikrobiellen Aktivität im Prozesswasser gut auf die Biogasbildung geschlossen werden kann. Somit kann durch die mikrobiologische Analyse des Hydrolysats sowohl die Hydrolyseeffizienz beobachtet als auch die potentielle Biogasproduktion prognostiziert werden.

5.6.4 Methanisierung

Die Analyse der Proben aus dem Methanreaktor deckte ebenso einige Zusammenhänge auf. So konnte jeweils eine negative Korrelation zwischen der Biofilmdicke der Füllkörper und des Archaea:Bacteria-Verhältnisses bzw. der GZZ ermittelt werden (#40 und 42). Dies bestätigt die Analysen des Kapitels 5.5.1.2, in dem erläutert wurde, dass bei sehr dicken Biofilmen die Nährstoffdiffusion an ihre Grenze stoßen kann (Lazarova & Manem 1995) und somit auch das mikrobielle Wachstum eingeschränkt wird. Weiterhin wurde eine positive Korrelation zwischen der GZZ und dem Archaea:Bacteria-Verhältnis detektiert (#41), was ein Hinweis darauf ist, dass sich unter guten Prozessbedingungen, die allgemein das mikrobielle Wachstum fördern, die Archaea etablieren können. Dies liegt v. a. in der syntrophen Beziehung zwischen acetogenen Bakterien (Produzenten) und methanogenen Archaeen (Konsumenten) begründet (Amani *et al.* 2010). Auch konnte eine negative Korrelation zwischen dem Archaea:Bacteria-Verhältnis im Ablauf der Methanreaktoren und dem Methanertrag der Reaktoren ermittelt werden (#37). Ein vermehrtes Ausspülen der Archaeen aus dem Methanreaktor ist somit ein Indiz für eine Prozessstörung, die sich auf den Biogasprozess auswirkt. Wie auch im Ablauf des Perkolators, konnte des Weiteren zwischen der Esteraseaktivität im Ablauf der Methanreaktoren und dem Methangehalt im Biogas eine positive Wechselwirkung detektiert werden (#38). Dies zeigt, dass bei einer

allgemeinen hohen mikrobiellen Aktivität im Prozesswasser bzw. im System, welche auf eine gute Substratumsatzrate hinweist, auch ein hoher Methanertrag zu erwarten ist. Schon Jones und Kollegen (1983) erkannten den positiven Zusammenhang zwischen verschiedenen Enzymaktivitäten und der Biogasproduktion von Deponien. In vorliegender Arbeit wurde darüber hinaus auch eine positive Korrelation zwischen der GZZ des Methanreaktorablaufes und der Biogasproduktion festgestellt (#36). Und wie für den Zulauf des Methanreaktors beschrieben, konnten auch in diesem Ablauf positive Wechselwirkungen zwischen der Esteraseaktivität, dem BSB₅, der GZZ, dem CSB, dem oTS-Gehalt und dem FOS/TAC-Wert beobachtet werden (#24, 27, 28, 29, 31 und 39).

5.6.5 Übersicht der Zusammenhänge

Zusammenfassend lässt sich beschreiben, dass durch die Analyse der mikrobiellen Biomasse und Aktivität Rückschlüsse auf die Güte des Biogassubstrates, der Hydrolyseeffizienz sowie möglicher Hydrolysegasbildung und der Effizienz der Methanisierung möglich sind. Tabelle 5-3 und Abbildung 5-43 geben eine Übersicht über die vorab beschriebenen Wechselwirkungen. Insbesondere für die allgemeinen mikrobiellen Parameter – die GZZ, dem Verhältnis von Archaea zu Bacteria, die AT₄ und die Esteraseaktivität – konnten vielfältige Zusammenhänge in unterschiedlichen Prozessstufen aufgeklärt werden. Diese umfassende Validität lässt auf eine Allgemeingültigkeit dieser Korrelationen schließen, sodass sie auch auf andere Anlagentypen, einstufige sowie mehrstufige Vergärungsanlagen, bzw. für die Fermentation anderer Substrate übertragbar sind. Da insbesondere Enzymaktivitäten vergleichsweise einfach und schnell zu bestimmen sind und sie in jeder Prozessstufe aussagekräftige Indikatoren für die Effizienz des Biogasprozesses liefern, ist deren Analyse auch als potentieller Schnelltest geeignet. Der Vorteil von insbesondere der Esteraseaktivität ist u. a., dass sie im Gegensatz zu bspw. dem CSB, der bislang einer der wichtigsten Prozessparameter darstellt, keine toxischen Chemikalien benötigt, was das Sicherheitsrisiko und den Kostenaufwand reduziert, und zudem sehr sensitiv auf Prozessstörungen reagiert (Analytik Jena).

Tabelle 5-3: Ermittelte Korrelationen mit den entsprechenden statistischen Werten

#	abhängige Variable		unabhängige Variable		n	r	r ²	p-Wert
	Parameter	Messstelle/ Probenart	Parameter	Messstelle/ Probenart				
1	Alter der Silage [Monate]	Eingangsmaterial	AT ₄ [mg O ₂ /g TS]	Eingangsmaterial	17	-0,874	0,764	4,5×10 ⁻⁶
2	Esteraseaktivität [IU/Zelle]	Ein- + Aus- gangsmaterial	AT ₄ [mg O ₂ /Zelle]	Ein- + Aus- gangsmaterial	42	0,906	0,820	1,7×10 ⁻¹⁶
3	CSB [mg O ₂ /g TS]	Ein- + Aus- gangsmaterial	AT ₄ [mg O ₂ /g TS]	Ein- + Aus- gangsmaterial	51	0,880	0,775	1,7×10 ⁻¹⁷
4	Cellulaseaktivität [IU/g FM]	Eingangsmaterial	kumulierter CSB [mg O ₂ /L]	Perkolatorablauf	16	0,787	0,619	3,0×10 ⁻⁴
5	AT ₄ [mg O ₂ /g TS]	Eingangsmaterial	kumulierte CSB- Auswaschung [kg O ₂ /kg oTS]	Perkolatorablauf	16	-0,778	0,606	3,9×10 ⁻⁴
6	hydrogenotrophe Methanogene [%]	Eingangsmaterial	kumulierte CSB- Auswaschung [mg O ₂ /mL]	Perkolatorablauf	12	-0,944	0,891	3,9×10 ⁻⁶
7	GZZ [ZZ/g TS]	Eingangsmaterial	kumulierte CSB- Auswaschung [kg O ₂ /kg oTS]	Perkolatorablauf	16	0,844	0,713	3,9×10 ⁻⁵
8	AT ₄ [mg O ₂ /g TS]	Ausgangsmaterial	kumuliertes Hydrolysegas- volumen [L]	Ausgangsmaterial	24	-0,837	0,700	3,5×10 ⁻⁷
9	Archaea/Bacteria	Ausgangsmaterial	kumuliertes Hydrolysegas- volumen [L]	Ausgangsmaterial	24	0,879	0,773	1,6×10 ⁻⁸
10	Archaea/Bacteria	Ausgangsmaterial	kumuliertes Methanvolumen im Hydrolysegas [L]	Ausgangsmaterial	24	0,888	0,789	6,9×10 ⁻⁹
11	Xylanaseaktivität [IU/g FM]	Ausgangsmaterial	Methananteil im Hydrolysegas [%]	Ausgangsmaterial	8	0,776	0,602	2,4×10 ⁻²
12	Peptidaseaktivität [IU/g FM]	Ausgangsmaterial	kumuliertes Hydrolysegas- volumen [L]	Ausgangsmaterial	12	0,801	0,641	1,8×10 ⁻³
13	Proteaseaktivität [IU/g FM]	Ausgangsmaterial	kumuliertes Hydrolysegas- volumen [L]	Ausgangsmaterial	12	0,842	0,709	5,9×10 ⁻⁴
14	Peptidaseaktivität [IU/g FM]	Ausgangsmaterial	H ₂ S-Anteil im Hydrolysegas [ppm]	Ausgangsmaterial	11	0,819	0,671	2,0×10 ⁻³
15	Proteaseaktivität [IU/g FM]	Ausgangsmaterial	H ₂ S-Anteil im Hydrolysegas [ppm]	Ausgangsmaterial	11	0,866	0,751	5,6×10 ⁻⁴
16	kum. Methan- volumen im Hydrolysegas [L]	Ausgangsmaterial	AT ₄ [mg O ₂ /g TS]	Ausgangsmaterial	23	-0,803	0,646	3,9×10 ⁻⁶
17	GZZ [ZZ/g TS]	Ausgangsmaterial	kumulierte CSB- Auswaschung [mg O ₂ /L]	Perkolatorablauf	35	0,821	0,675	1,5×10 ⁻⁹
18	Xylanaseaktivität [IU/g FM]	Perkolator	Anteil Metha- nosarcinales [%]	Perkolator	11	0,807	0,652	2,7×10 ⁻³

#	abhängige Variable		unabhängige Variable		n	r	r ²	p-Wert
	Parameter	Messstelle/ Probenart	Parameter	Messstelle/ Probenart				
19	AT ₄ [mg O ₂ /g TS]	Perkolator	FOS/TAC	Perkolatorablauf	26	0,944	0,891	4,9×10 ⁻¹³
20	Amylaseaktivität [IU/g FM]	Perkolator	FOS/TAC	Perkolatorablauf	28	0,848	0,719	1,2×10 ⁻⁸
21	Amylaseaktivität [IU/g FM]	Perkolator	Essigsäureäquivalent [g/L]	Perkolatorablauf	10	0,814	0,663	4,2×10 ⁻³
22	Peptidaseaktivität [IU/g FM]	Perkolator	FOS/TAC	Perkolatorablauf	18	0,977	0,954	3,9×10 ⁻¹²
23	CSB [mg O ₂ /g TS]	Perkolator	FOS/TAC	Perkolatorablauf	32	0,829	0,687	4,6×10 ⁻⁹
24	GZZ [ZZ/g TS]	Perkolator, -ablauf, Sp 1 + 2	Esteraseaktivität [IU/g TS]	Perkolator, -ablauf, Sp 1 + 2	283	0,791	0,626	4,9×10 ⁻⁶²
25	CSB [mg O ₂ /L]	Perkolatorablauf	Essigsäure- äquivalent [g/L]	Perkolatorablauf	5	0,952	0,905	1,3×10 ⁻²
26	Amylaseaktivität [IU/mL]	Perkolatorablauf	Essigsäure- äquivalent [g/L]	Perkolatorablauf	5	0,877	0,770	5,0×10 ⁻²
27	oTS [g/L]	Perkolatorablauf, Sp 1 + 2	CSB [mg O ₂ /L]	Perkolatorablauf, Sp 1 + 2	237	0,862	0,743	2,3×10 ⁻⁷¹
28	CSB [mg O ₂ /L]	Perkolatorablauf, Sp 1 + 2	FOS/TAC	Perkolatorablauf, Sp 1 + 2	176	0,831	0,690	3,7×10 ⁻⁴⁶
29	Esteraseaktivität [IU/mL]	Perkolatorablauf (ohne Tag 0–3), Sp 1 + 2	CSB [mg O ₂ /L]	Perkolatorablauf (ohne Tag 0–3), Sp 1 + 2	184	0,841	0,708	1,6×10 ⁻⁵⁰
30	Esteraseaktivität [IU/mL]	Perkolatorablauf (Tag 0–3)	CSB [mg O ₂ /L]	Perkolatorablauf (Tag 0–3)	13	0,843	0,711	2,9×10 ⁻⁴
31	GZZ [ZZ/g TS]	Perkolatorablauf, Sp 1 + 2	CSB [mg O ₂ /g TS]	Perkolatorablauf, Sp 1 + 2	227	0,811	0,657	3,0×10 ⁻⁵⁴
32	oTS [g/L]	Sp 1	mittlere Biogas- produktion [m ³ /d]	Methanreaktoren	18	0,977	0,954	3,7×10 ⁻¹²
33	BSB ₅ [mg O ₂ /L]	Sp 1	mittlere Biogas- produktion [m ³ /d]	Methanreaktoren	13	0,907	0,822	1,9×10 ⁻⁵
34	FOS/TAC	Sp 1	mittlere Biogas- produktion [m ³ /d]	Methanreaktoren	15	0,993	0,986	2,2×10 ⁻¹³
35	Amylaseaktivität [IU/mL]	Sp 1	mittlere Biogas- produktion [m ³ /d]	Methanreaktoren	15	0,879	0,773	1,6×10 ⁻⁵
36	GZZ [ZZ/mL]	Sp 1 + 2	mittlere Biogas- produktion [m ³ /d]	Methanreaktoren	44	0,818	0,670	1,2×10 ⁻¹¹
37	Archaea/Bacteria	Sp 2	mittlere Methan- produktion [m ³ /d]	Methanreaktoren	5	-0,828	0,685	5,0×10 ⁻²
38	Esteraseaktivität [IU/mL]	Sp 1 + 2	mittlerer Methan- gehalt im Biogas [%]	Methanreaktoren	12	0,869	0,755	2,4×10 ⁻⁴
39	Esteraseaktivität [IU/mL]	Sp 1 + 2	BSB ₅ [mg O ₂ /L]	Sp 1 + 2	36	0,893	0,797	2,6×10 ⁻¹³
40	Biofilmdicke [µm]	Biofilm der Füllkörper	Archaea/Bacteria	Biofilm der Füllkörper	5	-0,957	0,916	1,1×10 ⁻²
41	GZZ [ZZ/dm ²]	Biofilm der Füllkörper	Archaea/Bacteria	Biofilm der Füllkörper	25	0,961	0,924	2,3×10 ⁻¹⁴

#	abhängige Variable		unabhängige Variable		n	r	r ²	p-Wert
	Parameter	Messstelle/ Probenart	Parameter	Messstelle/ Probenart				
42	Biofilmdicke [µm]	Biofilm der Füllkörper	GZZ [ZZ/dm ²]	Biofilm der Füllkörper	5	-0,961	0,924	9,2×10 ⁻³
M1	Alter der Silage [Monate]	Eingangsmaterial	Esteraseaktivität [IU/g FM]	Eingangsmaterial	6	-0,846	0,715	3,4×10 ⁻²
M2	Alter der Silage [Monate]	Eingangsmaterial	Cellulaseaktivität [IU/g FM]	Eingangsmaterial	6	-0,880	0,774	2,1×10 ⁻²
M3	Alter der Silage [Monate]	Eingangsmaterial	Peptidaseaktivität [IU/g FM]	Eingangsmaterial	6	-0,825	0,680	4,3×10 ⁻²
M4	Proteaseaktivität [IU/g FM]	Eingangsmaterial	kumulierte CSB- Auswaschung [mg O ₂ /L]	Perkolatorablauf	5	0,905	0,819	3,5×10 ⁻²
M5	Peptidaseaktivität [IU/g FM]	Eingangsmaterial	kumulierte CSB- Auswaschung [mg O ₂ /L]	Perkolatorablauf	6	0,826	0,682	4,3×10 ⁻²
M6	Archaea/Bacteria	Ausgangsmaterial	AT ₄ [mg O ₂ /g TS]	Ausgangsmaterial	23	-0,807	0,651	3,3×10 ⁻⁶
M7	AT ₄ [mg O ₂ /g TS]	Perkolator	CSB [mg O ₂ /L]	Perkolatorablauf	26	0,957	0,915	2,2×10 ⁻¹⁴
G1	Milchsäuregehalt [g/kg TS]	Eingangsmaterial	Esteraseaktivität [IU/g TS]	Eingangsmaterial	8	-0,808	0,653	1,5×10 ⁻²
G2	β-HCH [mg/kg TS]	Eingangsmaterial	Milchsäuregehalt [g/kg TS]	Eingangsmaterial	8	-0,820	0,672	1,3×10 ⁻²

Angabe der Stichprobenmenge (n), des Korrelationskoeffizienten (r), des Determinationskoeffizienten (r²) und des Signifikanzwertes (p-Wert). Die Nummerierung dient zur Erläuterung der Abbildung 5-43. M1 bis M7 konnten nur für Versuche mit Maissilage und G1 und G2 nur für Versuche mit Grassilage bestimmt werden.

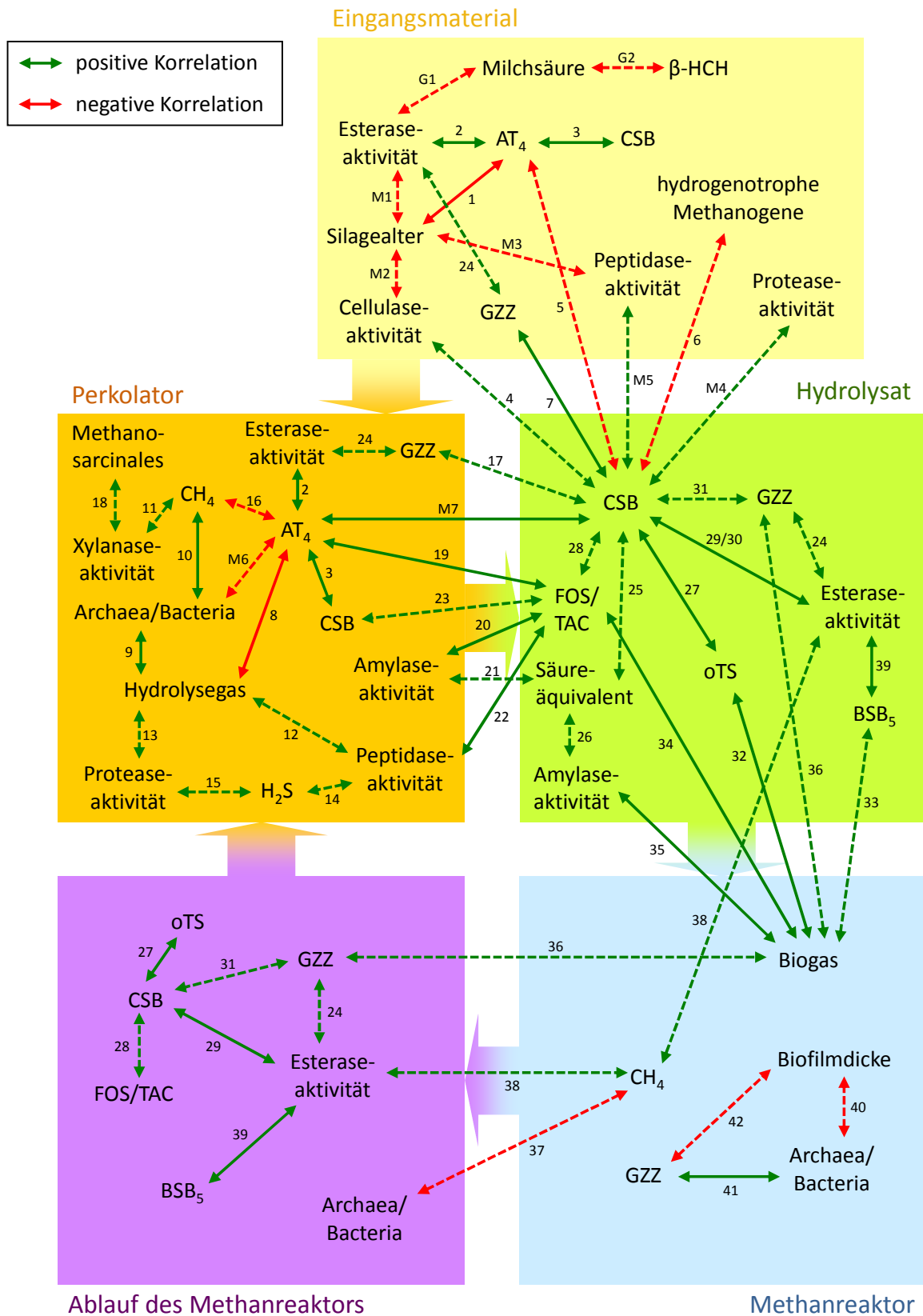


Abbildung 5-43: Überblick über die detektierten Zusammenhänge bei der zweiphasigen Vergärung.
 Im Schema des zweiphasigen Biogas-Systems sind alle ermittelten signifikanten Korrelationen zwischen verschiedenen Prozessparametern angezeigt. Grüne Pfeile weisen auf eine positive Korrelation hin, rote Pfeile auf eine negative Korrelation hin. Durchgehende Pfeile zeigen eine hohe Korrelation mit einem Determinationskoeffizienten von mind. 0,7 und einer Stichprobenmenge von mind. 15 an. Gestrichelte Pfeile zeigen eine mittlere Korrelation mit einem Determinationskoeffizienten von 0,6 bis 0,7 und/oder einer Stichprobenmenge von unter 15 an. Die Nummerierung dient zur Erläuterung der statistischen Werte in Tabelle 5-3.

5.7 Entwicklung des Esterase-Schnelltests

Die Analyse der Esteraseaktivität wird bislang in der Abwasserbehandlung und bei der großtechnischen Kompostierung zur Prozesskontrolle verwendet (Obst 1985, Obst & Holzapfel-Pschorn 1988, Schwab *et al.* 1994, Obst *et al.* 1995, Stozek & Koppe 1998, Denecke & Nachbarschulte 2004, Fuchs *et al.* 2004, Hollender 2009). Weiterhin dient sie als wichtiger Parameter bei der Untersuchung von Umweltproben, wie Gewässer und Böden, z. B. hinsichtlich möglicher Schadstoffbelastungen (Obst & Holzapfel-Pschorn 1988, Geller *et al.* 1991, Burns & Dick 2002, Kuhbier 2003, Flemming & Petry-Hansen 2006). In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass sich die Esteraseaktivität auch als sensitive Kenngröße zum Überwachen von Biogasanlagen erweist. So ist dieser allgemeine mikrobielle Aktivitätsparameter in verschiedenen Prozessstufen als Indikator zur Prozesseffizienz und -stabilität einsetzbar. Daher war eine Weiterentwicklung der Methodik als Schnelltest von großem Interesse. Dabei sollte die Bestimmung praktisch und recht einfach durchzuführen sein und als Küvetten-Schnelltest auch vor Ort (z. B. bei einer Biogasanlage) Anwendung finden können.

5.7.1 Charakteristika des Esterase-Assays

Das Prinzip des Esterase-Assays beruht auf einer allgemeinen Enzymreaktion heterotropher Mikroorganismen nach Zugabe eines künstlichen Substrates und Inkubation des Ansatzes für eine bestimmte Zeit sowie bei einer spezifischen Temperatur. Durch die Enzymaktivität wird das künstliche Substrat umgesetzt, wodurch eine Farbreaktion hervorgerufen wird, welche wiederum photometrisch bestimmt werden kann (vgl. Kapitel 4.5.1). Da es sich um eine enzymatische Reaktion handelt, ist nach Inkubation entweder eine sofortige Messung nötig oder die Reaktion muss abgestoppt werden. Oftmals wird die Hydrolyse durch starkes Abkühlen des Reaktionsansatzes verlangsamt und eine sofortige Messung erfolgt (Obst & Holzapfel-Pschorn 1988, GFI 2009, Steinbrenner 2011). Als mögliche Stoppreagenzien werden in der Literatur zudem meist Aceton (Schnürer & Rosswall 1982, Reed *et al.* 1989, Palmisano *et al.* 1993, Adam & Duncan 2001, Green *et al.* 2006) oder eine Chloroform/Methanol-Lösung (Adam & Duncan 2001, Aguilera *et al.* 2010) genannt. Nachteilig ist jedoch, dass Aceton die Extraktion von organischem Material fördert, Fluorescein sich an dieses anlagern kann und so das Fluoreszenzsignal verringert wird (Inbar *et al.* 1991). Weil die Termination der Hydrolyse durch Zugabe von Chloroform/Methanol ferner eine Phasentrennung mittels Zentrifugation benötigt und zur Vereinfachung des Assays der Reaktionsansatz filtrierbar sein sollte, wurde dieses potentielle Stoppreagenz in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt. Die Inkubation selbst sollte bei einem festen pH-Wert und einer festgelegten Temperatur erfolgen. Da Fluorescein bei pH-Werten zwischen 7 und 8 die maximale Fluoreszenz aufweist und Fluoresceindiacetat (FDA) ab pH 8,5 dazu neigt, spontan zu hydrolysieren (Guilbault & Kramer 1964), sollte der Reaktionspuffer einen pH zwischen 7 und 8,5 haben. Bei pH 7,6 zeigt Fluoresceindiacetat nach Swisher und Carroll (1980) die maximale mikrobielle Hydrolyserate,

weshalb es sinnvoll ist, diesen pH-Wert einzustellen. Eine spontane Hydrolyse des FDA tritt zudem auch bei erhöhten Temperaturen auf, nach Guilbault und Kollegen (1964) bei über 30 °C und nach Adam und Duncan (2001) ab 40 °C. Daher empfiehlt sich eine Inkubationstemperatur von maximal 40 °C.

5.7.2 Bestimmung eines effizienten Stoppreagenzes

Neben der Adaptation des Tests auf handelsübliche Reagenzglasgröße (Voraussetzung für Konfektionierung als Schnelltest) ist die Ermittlung eines neuen Stoppreagenzes, welches die Enzymreaktion zuverlässig inhibiert, essentiell. Dies soll auch noch einige Stunden nach Inkubation eine Bestimmung ermöglichen, ohne dass signifikante Änderungen der Messwerte eintreten. Unter Berücksichtigung der oben genannten Bedingungen bezüglich des pH-Wertes, der Temperatur und der Filtrierbarkeit wurden in dieser Arbeit verschiedene Reagenzien, potentielle Esterase-Inhibitoren, getestet (vgl. Tabelle 4-11, Seite 46 und entsprechende Versuchsdurchführung in Kapitel 4.5.1.2). Hierzu wurde das jeweilige Stoppreagenz dem Reaktionsansatz nach Ablauf der Inkubation hinzugefügt, der Ansatz gemischt und die Absorption sofort sowie nach 1, 3, 5 und 24 Stunden des Abstoppens, zunächst nur bei 490 nm, gemessen. Zur vergleichenden Analyse wurden zudem jeweils Reaktionsansätze mitgeführt, die nicht abgestoppt sowie welche, die nach der Inkubationszeit durch Kühlung im Eisbad inhibiert wurden. In Abbildung 5-44 ist die weitere Zunahme der Esteraseaktivität mit der Zeit nach Abstoppen der Reaktion mittels einiger Reagenzien beispielhaft illustriert.

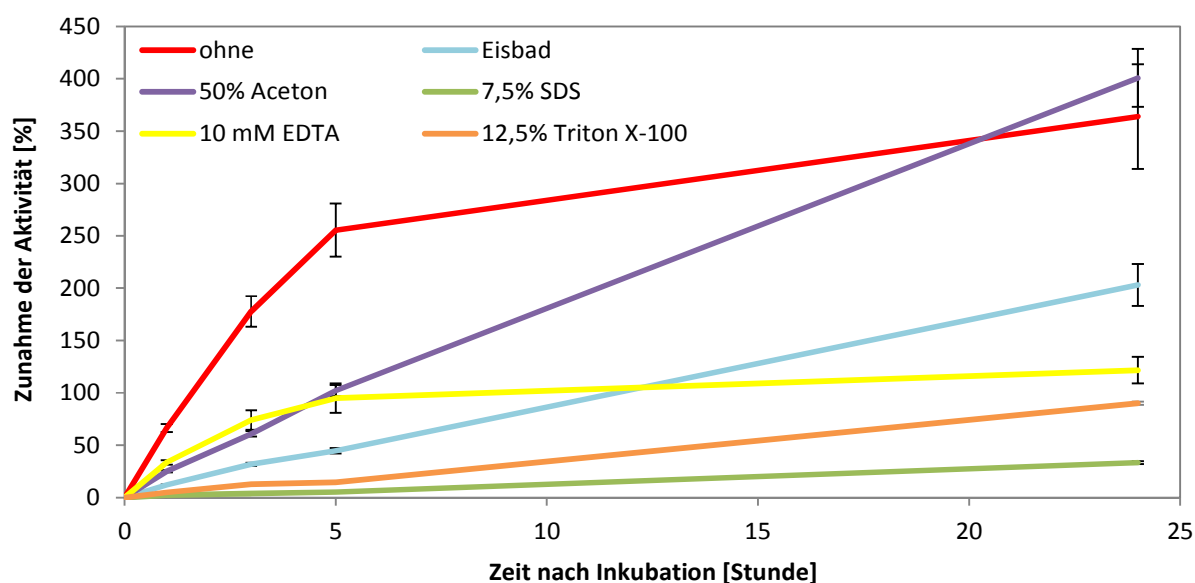


Abbildung 5-44: Weitere Zunahme der Esteraseaktivität nach der Reaktionszeit

Prozentuale Zunahme der Enzymaktivität nach der Reaktionszeit ohne Abstoppen der Reaktion oder nach Kühlung im Eisbad bzw. nach Zugabe von Aceton (Endkonz. 50%), SDS (Natriumdodecylsulfat, Endkonz. 7,5%), EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Endkonz. 10 mM) und Triton X-100 (Endkonz. 12,5%). Die entsprechende Esteraseaktivität zum Zeitpunkt Null, direkt nach der Reaktionszeit, wurde jeweils auf 0% gesetzt. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen ($n \geq 3$).

Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Versuche wurden die relativen Zunahmen der Aktivität nach der Inkubationszeit in Prozent gegenübergestellt. Ohne Abstoppen der Enzymreaktion nahm die Aktivität dabei, insbesondere innerhalb der ersten Stunden, stark zu, bis um 255% nach fünf Stunden bzw. um 364% nach 24 Stunden. Die Kurve zeigt einen Sättigungsverlauf, da das künstliche Substrat nach einiger Zeit aufgebraucht bzw. die mikrobielle Aktivität durch Produkthemmung inhibiert ist und kein weiteres Fluorescein gebildet werden kann. Durch Kühlung des Reaktionsansatzes im Eisbad konnte die Hydrolyse verlangsamt werden. So nahm die Aktivität nach fünf Stunden nur noch bis um 45% und nach 24 Stunden um insgesamt 203% zu. Auch durch Zugabe von Aceton wurde die Reaktion verlangsamt. Die Aktivität nahm jedoch nach 5 Stunden noch um 102% und nach 24 Stunden um etwa 400% zu. Aceton hilft zum einen bei der Solubilisierung der Zellmembranen und der Extraktion des Fluoresceins, zum anderen präzipitiert Aceton unspezifisch Proteine, also auch Esterasen, die so inaktiviert werden (Schnürer & Rosswall 1982, Gdynia 2006). Die Hemmung der Esterase durch EDTA (Ethylendiamintetraacetat) zeigte in den ersten 5 Stunden nach Inkubation einen ganz ähnlichen Verlauf. Die Aktivität nahm hier noch um 95% zu. Nach 24 Stunden konnte eine Zunahme um insgesamt 122% beobachtet werden. EDTA komplexiert zweiwertige Metallkationen, die für die Funktion vieler Enzyme essentiell sind, und setzt damit ihre Aktivität herab (Swanson & Truesdale 1974, Sams & Mason 1999, Koitka *et al.* 2010). Durch Zugabe von Triton X-100 konnte die Enzymaktivität schon sehr effizient inhibiert werden. So nahm die Aktivität nach 5 Stunden nur noch um etwa 14% und nach 24 Stunden um insgesamt 90% zu. Triton X-100 ist ein nichtionisches Tensid, welches bei der Solubilisierung von Membranproteinen beteiligt ist und als kompetitiver Antagonist – besetzt die Substrat-Enzym-Bindestelle – verschiedene Enzyme inhibieren kann (Rumsby *et al.* 1973, Li *et al.* 2000, Marcel *et al.* 2000). SDS (Natriumdodecylsulfat) zeigte eine noch stärkere inhibitorische Wirkung auf die Esteraseaktivität. So konnte nach 5 Stunden nur noch eine Zunahme der Aktivität um 5% und nach 24 Stunden um 33% beobachtet werden. Das anionische Tensid wirkt ebenfalls bei der Solubilisierung von Membranproteinen mit und denaturiert bzw. inaktiviert Proteine, indem es Komplexe mit ihnen bildet (Gonenne & Ernst 1978, Holm *et al.* 1985, Wang *et al.* 2008). Die Enzym-Untereinheiten dissoziieren dabei bei Konzentrationen über 1% (w/v) und die Hemmung wird dann als irreversibel eingestuft (Tóth *et al.* 1998, Mu *et al.* 2009).

Da nach Abstoppen der Reaktion innerhalb der ersten 5 Stunden die höchste Zunahme der Esteraseaktivität beobachtet werden konnte, wurde zur genaueren Bewertung der potentiellen Stoppreagenzien innerhalb dieses Zeitraumes die stündliche, relative Zunahme der Aktivität (Steigung des Kurvenabschnittes) berechnet. In Abbildung 5-45 ist die Analyse aller untersuchter potentieller Inhibitoren in verschiedenen Endkonzentrationen dargestellt.

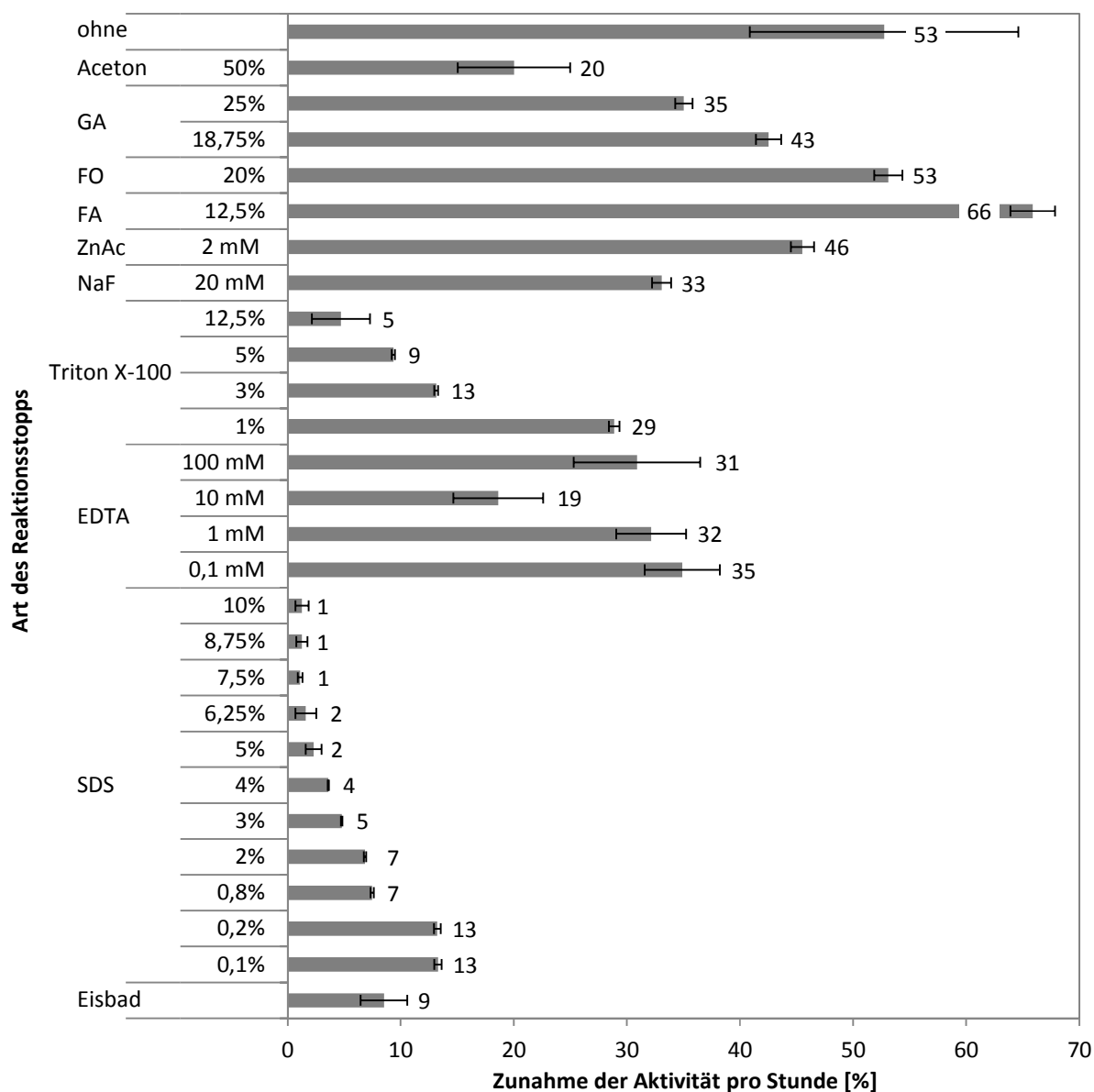


Abbildung 5-45: Zunahme der Esteraseaktivität pro Stunde

Stündliche prozentuale Zunahme der Enzymaktivität nach der Reaktionszeit ohne Abstoppen der Reaktion oder nach Kühlung im Eisbad bzw. nach Zugabe von Aceton (Endkonz. 50%), GA (Glutardialdehyd, Endkonz. 18,75–25%), FO (Formamid, Endkonz. 20%), FA (Formaldehyd, Endkonz. 12,5%), ZnAc (Zinkacetat, Endkonz. 2 mM), NaF (Natriumfluorid, Endkonz. 20 mM), Triton X-100 (Endkonz. 1–12,5%), EDTA (Endkonz. 0,1–100 mM) und SDS (Endkonz. 0,1–10%). Die Standardabweichung ist mittels horizontaler Fehlerbalken aufgetragen ($n \geq 3$).

Ohne Abstoppen der Enzymreaktion nahm die Aktivität stündlich um weitere 53% zu. Die Zugabe von Formamid (FO, Zunahme um 53% pro Stunde) bzw. Formaldehyd (FA, Zunahme um 66% pro Stunde) zeigte im Vergleich hierzu keine hemmende Wirkung. Formamid spaltet Proteinmoleküle und wirkt zudem bakterizid bzw. toxisch (Fuller 1938, Kühn & Birett 1988, Robb *et al.* 1992). Dies zeigte im Rahmen dieses Tests keine Wirkung auf die Esteraseaktivität. Formaldehyd vernetzt bzw. denaturiert ebenfalls Proteine und zeigt eine toxische Wirkung (Hopwood 1967, Kirkeby & Moe 1984, Fox *et al.* 1985). Doch auch in diesem Fall scheint die benötigte Reaktionszeit zu lang bzw. die eingesetzte Konzentration inadäquat zu sein, sodass die stündliche Aktivitätszunahme sogar über der ohne Zugabe

eines Reagenzes lag. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine verstärkte Extraktion des Fluoresceins aus den toten Zellen. Einen etwas besseren Erfolg zeigte die Zugabe von Glutardialdehyd (GA), welches prinzipiell den gleichen Effekt wie Formaldehyd aufweist, jedoch effizienter wirken soll (Hopwood 1967, Sindhu *et al.* 2011). In dieser Arbeit konnte die Enzymaktivität auf eine stündliche Zunahme von 35 bzw. 43% reduziert werden, was womöglich auch auf die höheren Endkonzentrationen von 25 bzw. 18,75% zurückzuführen ist. Nach Zugabe von Zinkacetat (ZnAc) konnte eine stündliche Aktivitätszunahme von etwa 46% ermittelt werden. Zinkacetat oxidiert die Sulfhydrylgruppen eines Enzyms und kann es somit inhibieren (Aso & Akamatsu 1956, Shum & Markovetz 1974, Hesketh & Flanagan 1975, Stafslin & Cleary 2000). Weiterhin dient Zinkacetat als konkurrierendes Substrat von FDA, was die Umsatzrate des FDA verringert. Mittels Zugabe von Natriumfluorid (NaF) konnte die stündliche Aktivitätszunahme auf etwa 33% reduziert werden. Natriumfluorid ist ein nicht-kompetitiver Antagonist – verändert durch Bindung die Enzymkonformation und inaktiviert es somit – und wirkt zudem toxisch (Bozdech & Bainton 1981, Gruß & Scheller 1989, Ru *et al.* 2009). Als noch wirkungsvoller erwies sich allerdings EDTA. Hier konnte die stündliche Erhöhung der Enzymaktivität auf 19% (bei einer Endkonzentration von 10 mM) reduziert werden. Andere eingesetzte Konzentrationen zeigten einen geringeren Erfolg (0,1 mM: 35%, 1 mM: 32% und 100 mM: 31% Aktivitätszunahme). Wie in Abbildung 5-44 dargestellt, zeigte auch Triton X-100 eine gute Wirkung als Inhibitor. Dabei konnte die Hemmwirkung mit Erhöhung der Konzentration verstärkt werden. Bei einer Endkonzentration von 1% Triton X-100 nahm die Enzymaktivität um weitere 29% zu, bei 3% um 13%, bei 5% um 9% und bei einer Endkonzentration von 12,5% wurde die Enzymaktivität nur noch um 5% gesteigert. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der Analyse mit SDS gemacht werden. Bei dieser Untersuchung wurde die stündliche Zunahme der Enzymaktivität von 13% bei einer Endkonzentration von 0,1% SDS auf 1% bei einer Endkonzentration von 7,5 bis 10% SDS reduziert und zeigte damit die höchste Effizienz als Stoppreagenz. Durch die Kühlung im Eisbad wurde die Hydrolyse dagegen nur so weit verlangsamt, dass die Aktivität im Mittel noch 9% pro Stunde zunahm.

Die Analysen zeigten, dass SDS in den Endkonzentrationen von 7,5 bis 10% die Enzymreaktion äußerst effektiv inhibierten. Da Tenside die Eigenschaft aufweisen zu schäumen, ist für die Analyse eine möglichst niedrige Konzentration anzustreben, sodass hier 7,5% SDS als geeignetes Stoppreagenz mit einer irreversiblen Esterasehemmung (Tóth *et al.* 1998, Mu *et al.* 2009) präferiert wurde.

5.7.3 Messbereichserweiterung

Da das entstehende Fluorescein ein Absorptionsmaximum bei 490 nm aufweist (Obst 1985, Adam & Duncan 2001, GFI 2009), ist die photometrische Analyse bei dieser Wellenlänge optimal. In der Praxis werden jedoch oftmals einfache Photometer eingesetzt, die nur eine eingeschränkte Auswahlmöglichkeit verschiedener Wellenlängen zulassen (bspw. in Fünffziger-Schritten), sodass die Möglichkeit einer

Messung bei 500 nm sinnvoll wäre. Da sich in den vorangegangenen Analysen 7,5% SDS als effizientes Stoppreagenz erwiesen hat und in der Literatur mehrmals die Hemmung der Esteraseaktivität durch Kühlung bzw. durch 50% Aceton beschrieben wurde, soll an dieser Stelle ein direkter Vergleich dieser unterschiedlichen Inhibitoren geleistet werden. In Abbildung 5-46 sind die entsprechenden Enzymaktivitäten gezeigt, die bei einer Wellenlänge von 490 und 500 nm gemessen wurden.

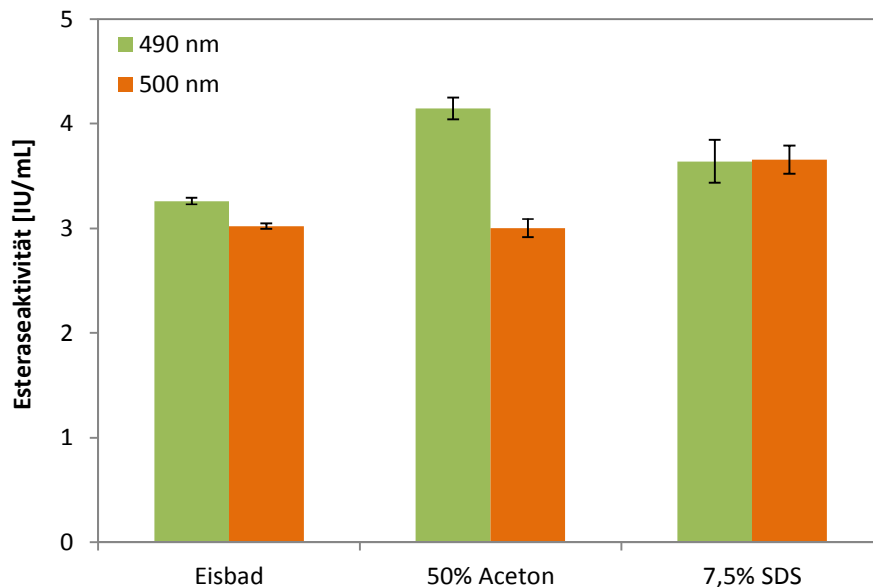


Abbildung 5-46: Vergleich der ermittelten Enzymaktivitäten bei unterschiedlichen Wellenlängen

Vergleich der Enzymaktivitäten bei Reaktionsstopp durch Kühlung im Eisbad durch 50% Aceton und durch 7,5% SDS. Die Bestimmung erfolgte bei 490 bzw. 500 nm. Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen (n = 12).

Obwohl im Vergleich zur Analyse mit Kühlung unter Verwendung des hier beschriebenen Tests mit Abstoppen durch 7,5% SDS die absoluten Enzymaktivitäten etwas höhere Werte aufwiesen, um durchschnittlich etwa 12%, kann die Dynamik mikrobieller Aktivitäten im vorgeschlagenen Anwendungsbe-
reich gut verfolgt werden. Dabei können die Messungen auch ohne Einbußen bei einer Wellenlänge von 500 nm durchgeführt werden. Die Analyse des Ansatzes mit Kühlung bzw. 50% Aceton zeigte hingegen eine Reduktion der Enzymaktivität von 7 bzw. 28% bei einer Wellenlänge von 500 nm. Zudem zeigte die Esteraseaktivität bei Zugabe von Aceton im Vergleich zur Analyse ohne Zugabe eines Stoppreagenzes eine Erhöhung um 27%. So scheint die Extraktion des Fluoresceins aus den Zellen durch Aceton und der resultierenden Erhöhung des Fluoreszenzsignals (Schnürer & Rosswall 1982, Gdynia 2006) die Abschwächung der Fluoreszenz durch Anlagerung des Fluoresceins an organisches Material (Inbar *et al.* 1991) zu überragen.

Zur weiteren Analyse der spektroskopischen Eigenschaften der Stoppreagenzien diente eine Spektralanalyse. Hiermit konnten die Absorptionsmaxima sowie die Fluoreszenzintensitäten vergleichend analysiert werden. In Abbildung 5-47 sind die Absorptionsspektren von Fluorescein in Natriumphos-

phatpuffer mit und ohne Zugabe eines Stoppreagenzes dargestellt. Reines Fluorescein in Puffer wies, wie in der Literatur beschrieben, ein deutliches Fluoreszenzmaximum bei 490 nm auf, ebenso die Fluoresceinlösung mit einer 7,5% SDS-Konzentration. Bei der Fluoresceinlösung mit 50% Aceton war das Fluoreszenzmaximum nach rechts verschoben und lag bei 497,5 nm. Obwohl durch Zugabe von SDS sowie auch ohne ein Zusatz die Absorption bei 500 nm etwa 30% geringer ist, kann, wie vorab gezeigt, nach Erstellung einer entsprechenden Standardgeraden die Enzymaktivität ohne Verluste auch bei 500 nm bestimmt werden. Die Option der Messung bei 500 nm ermöglicht so auch eine Bestimmung der Esteraseaktivität mit schlichten Filterphotometern, wie sie auch für andere Küvettenschnelltests in der Praxis eingesetzt werden.

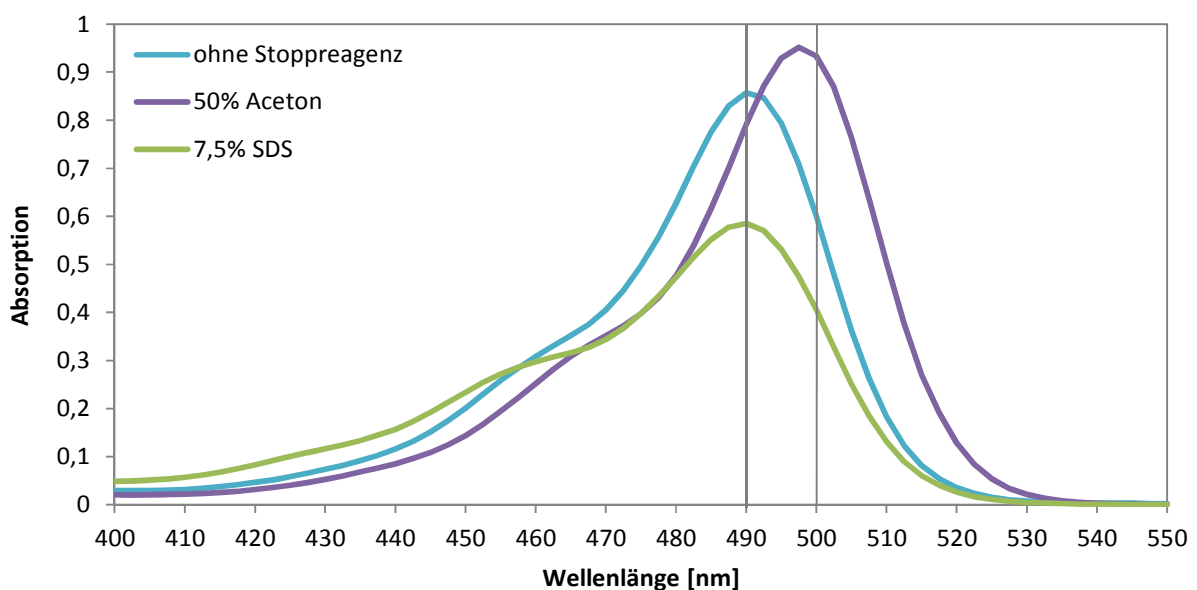


Abbildung 5-47: Absorptionsspektren von Fluorescein

Absorptionsspektren von Fluorescein (Endkonzentration 16 $\mu\text{mol/L}$) in 0,06 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,6) und ggf. Zugabe eines Stoppreagenzes.

5.7.4 Reduktion des apparativen Aufwandes

Da der Schnelltest in der Praxis auch Anwendung in Bereichen finden soll, die nur über eine minimale Ausstattung verfügen, ist der apparative Aufwand möglichst gering zu halten. Nach der herkömmlichen Analyseverfahren ist jedoch eine Zentrifugation zur Klärung des Ansatzes vor der photometrischen Analyse nötig. Eine Alternative hierzu stellt die technisch schlichter durchführbare Filtration dar. Mittels Einsatz eines geeigneten Filters können ebenso Zellen, Zellfragmente und andere störende Bestandteile aus der Messlösung entfernt werden. Wie in Tabelle 5-4 gezeigt, kann die Filtration durch einen 0,2 μm Membranfilter, mittels Einsatz einer einfachen Spritze mit Spritzenvorsatzfilter, die Messlösung ebenso gut klären. So konnten keine signifikanten Unterschiede in den Messwerten festgestellt werden.

Tabelle 5-4: Vergleich der Schwebstoffentfernung durch Zentrifugation und Filtration

Wellenlänge	Esteraseaktivität [IU/mL]	
	Zentrifugation	Filtration
490 nm	11,45 (\pm 0,06)	11,45 (\pm 0,03)
500 nm	11,36 (\pm 0,04)	11,36 (\pm 0,02)

Die Standardabweichung ist in Klammern angegeben.

5.7.5 Entwurf des Esterase-Schnelltests

In den vorangegangenen Schritten konnte ein effizientes Stoppreagenz eruiert, der potentielle Wellenlängenmessbereich der Analyse erweitert sowie der apparative Aufwand der Untersuchung verringert werden. Zudem werden bei diesem Schnelltest Volumina eingesetzt (2–5 mL), die mit einfachen Pipetten abzumessen sind. Die Substratlösung kann darüber hinaus über eine simple Tropfpipette dosiert werden. So steht im Ergebnis der Testentwicklung folgende Versuchsdurchführung des Esterase-Schnelltests, die in Abbildung 5-48 schematisch dargestellt ist und nachfolgend beschrieben wird.

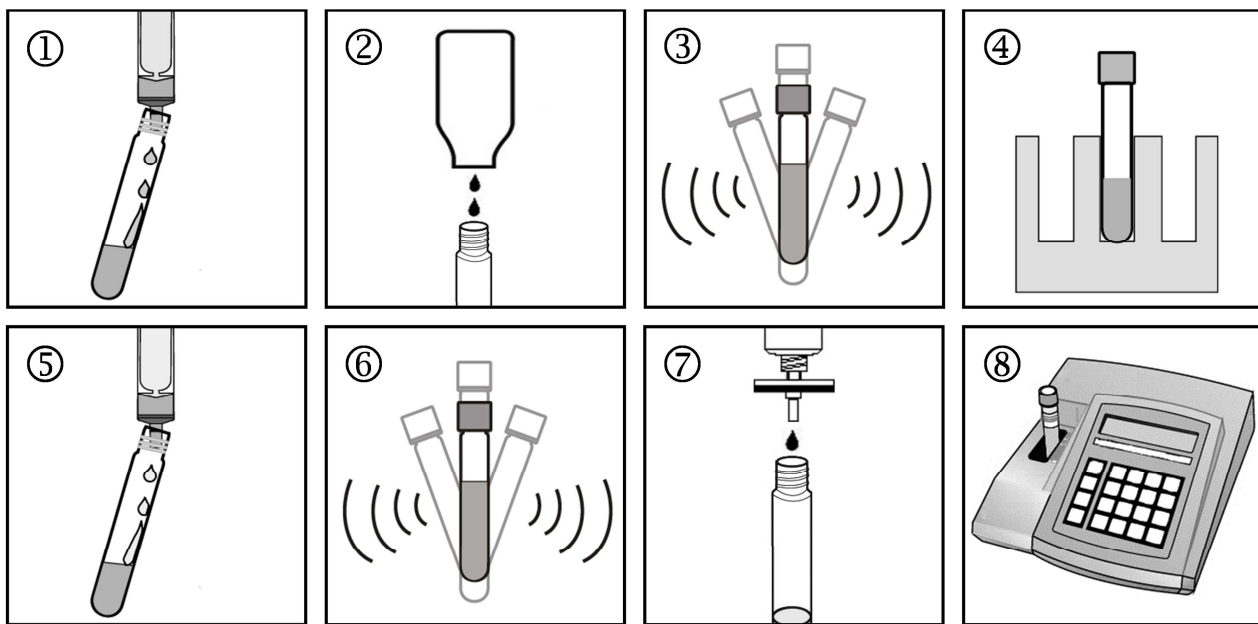


Abbildung 5-48: Schematische Darstellung des Küvetten-Schnelltests zur Analyse der allgemeinen heterotrophen Aktivität (Esteraseaktivität)

- ① Zugabe von 2 mL Probe (ggf. verdünnt) zum vorgelegten Puffer (2,9 mL 0,06 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,6)
- ② Zugabe von 2 Tropfen Substrat (\approx 100 μ L 0,2% FDA, in Aceton, bei -20°C , im Dunkeln und gut verschlossen mehrere Jahre haltbar)
- ③ Mischen des Ansatzes

- ④ Inkubation des Ansatzes bei 30 °C für 1 Stunde (in einem handelsüblichen Reagenzglas-Inkubator oder im Wasserbad)
- ⑤ Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 mL des Stoppreagenzes (15%ige SDS-Lsg., pH 7,6)
- ⑥ Mischen des Ansatzes
- ⑦ Filtrieren des Ansatzes (0,2 µm Porengröße, PES-Membran)
- ⑧ Messen der Absorption am Photometer bei 490 oder 500 nm

Die Auswertung erfolgt mithilfe einer zuvor vom Nutzer zu erstellenden Eichgerade. Die Reagenzien sowie die Anleitung hierzu können dem Schnelltest beigelegt werden (Fluorescein-Standard-Lösung, Konzentrationsbereich von 1 bis 32 µmol/L, liegt im Messgrenzbereich von 0,5 bis 64 µmol/L). Die Absorptions-Messwerte können so über eine einfache Tabellenkalkulation der Kalibrierfunktion in die Enzymaktivität in Units ($\mu\text{mol}/\text{min}^{-1}\text{mL}^{-1}$) umgerechnet werden.

Die Analyse der Esteraseaktivität, wie sie bislang in der Literatur beschrieben wird, setzt ein dafür spezialisiertes Labor mit entsprechendem Equipment und qualifizierten Fachkräften voraus. Durch den hier beschriebenen Esterase-Schnelltest ist im Gegensatz dazu, durch Vereinfachung der Analysedurchführung, auch eine Bestimmung außerhalb des spezialisierten Labors, im Feld, und durch weniger qualifiziertes Personal (analog den handelsüblichen Schnelltests für die Wasseranalytik) möglich. Ein weiterer Vorteil besteht in der schnellen Auswertung der Ergebnisse, das ein entsprechend schnelles Handeln beim Steuern einer Anlage erlaubt. Generell ist durch die Veränderlichkeit des biologisch aktiven Materials eine möglichst schnelle Messung nach der Probenahme sinnvoll. Dies ist durch die herkömmliche Bearbeitung in einem Labor eingeschränkt, da dort eine Analyse meist erst nach Stunden des Probenverkehrs am nächsten Tag erfolgen kann. Durch den Schnelltest ist eine sofortige Bestimmung nach der Probenahme möglich, sodass Veränderungen der Proben vermieden werden können. Zudem ermöglicht das zuverlässige Abstoppen der Reaktion durch das ermittelte Stoppreagenz, den Reaktionsansatz ohne Beeinträchtigung für eine spätere Messung zu lagern – für mindestens fünf Stunden, ohne signifikante Änderung der Messwerte – oder zu einem Labor zu transportieren, falls kein Photometer vor Ort vorhanden ist.

Der hier beschriebene Schnelltest stellt eine wesentliche Vereinfachung der Analyse von biologisch aktivem Material von verfahrenstechnischen Anlagen bzw. von Umweltproben hinsichtlich mikrobieller Aktivität dar. Der Esterase-Schnelltest wurde ferner unter dem amtlichen Aktenzeichen DE 10 2013 220 896 zum Patent angemeldet (Gasch & Hildebrandt 2013).

6 ZUSAMMENFASSUNG & SCHLUSSFOLGERUNG

Die Biogastechnologie nutzt mikrobiologische Stoffwechselaktivitäten zur Erzeugung von Energie. Hierbei wird die Aktivität der mikrobiologischen Biozönose, welche für die Methanbildung aus organischen Substraten verantwortlich ist, in erster Linie von den vorhandenen Substraten und den vorherrschenden Milieubedingungen bestimmt. Jedoch auch innerhalb spezifischer Prozessstufen kann es zu Konkurrenzprozessen zwischen Mikroorganismen kommen, die negative Auswirkungen auf die Leistung des Verfahrens haben. Üblicherweise werden derzeit in Biogasanlagen vorwiegend physikalische und chemische Größen überwacht. Da die Biogasbildung ein mikrobiologischer Prozess ist, ist die Analyse mikrobiologisch relevanter Parameter aber unabdingbar. Ziel der Arbeit war es daher, die mikrobiologischen Gemeinschaften und deren Aktivität zu charakterisieren und eine mikrobiologische Prozessüberwachung zu ermöglichen. Durch die Analyse der Wechselwirkungen mit physikalischen und chemischen Kenngrößen laufender Anlagen wurden hierdurch neue Ansatzpunkte zur Prozessoptimierung gewonnen. Darüber hinaus wurde eine Methodik entwickelt, die es ermöglicht, während der Prozessführung Kontrollmessungen zur allgemeinen heterotrophen Abbauproduktivität durchzuführen, um möglichen Störungen in der Effizienz der Biogasbildung während des Betriebs gezielt entgegenwirken zu können. Die folgenden Unterkapitel geben eine Übersicht über die wesentlichen Ergebnisse.

6.1 Analytische Begleitung des Biogasprozesses

In dieser Arbeit wurde die Vergärung von in erster Linie Maissilage in drei verschiedenen zweistufigen Anlagen analytisch begleitet. Hierbei wurde eine Vielzahl verschiedener Methoden zur Untersuchung der mikrobiellen Biomasse und Aktivität angewendet.

Die Trockensubstanz (TS) sowie die organische Trockensubstanz (oTS) liefern einen schnellen Überblick über den Abbaugrad des Substrates. So konnte insbesondere bei den Perkolatorproben eine kontinuierliche Abnahme der Messwerte mit der Hydrolysedauer beobachtet werden. Innerhalb von im Mittel 21 Tagen nahm der oTS-Gehalt um durchschnittlich 61% ab. Störfälle bzw. Modifikationen des Verfahrens wirkten sich nur geringfügig auf den oTS-Abbau der untersuchten Proben aus. In der Methanstufe konnte hingegen eine deutliche Abnahme des organischen Anteils innerhalb von zwei Jahren ermittelt werden, um etwa 81%, was hierbei auf eine verstärkte Anreicherung von Anorganik in den Reaktoren zurückzuführen war. Aufgrund der erhöhten Verschlämmung der Methanreaktoren eignet sich die TS bzw. oTS auch hier nur bedingt als mikrobieller Biomasseparameter. Im Gegensatz hierzu konnte statistisch bestätigt werden, dass der oTS-Gehalt des Methanreaktorzulaufes, als allgemeines Maß für die organische Fracht, einen nachweislichen Hinweis auf die Biogasproduktionsrate gibt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Prozessflüssigkeit von Biogasanlagen im Normalbetrieb über eine anlagen- bzw. substratspezifische konstante Gesamtzellzahl (GZZ) verfügt. In den hier untersuchten Anlagen lag diese zwischen 2×10^{11} Zellen/g TS bei der Fissanlage und 6×10^{11} Zellen/g TS bei der Containeranlage. So können auch Auswirkungen von Störfällen bzw. Modifikationen des Verfahrens durch Änderungen der spezifischen GZZ dargelegt werden. Zudem kann durch die Bestimmung der GZZ die Biomassedynamik der Perkolatorproben analysiert werden. Hier wurde innerhalb der ersten sechs Tage der Hydrolyse eine Zunahme der Zellzahl um durchschnittlich das 13-fache verzeichnet. Auch die mikrobielle Besiedlung sowie deren Verteilung in den Biofilmen auf den Füllkörpern der Methanstufe konnten adäquat analysiert werden, um ein Vielfaches besser, als die oTS oder die Biofilmdicke dies ermöglichten. Da auch die Zusammenhänge im System zwischen der GZZ und der mikrobiellen Aktivität, der organischen Fracht bzw. der Biogasproduktionsrate statistisch bestätigt werden konnten, erwies sich die GZZ als nützlicher Biomasseparameter zum Überwachen von Biogasanlagen.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ermöglicht die Quantifizierung einzelner mikrobieller Gruppen. Schon die Analyse der Bacteria und Archaea verdeutlichte den Fortschritt der Hydrolyse in den Perkolatoren. Hier konnten gegen Ende der Hydrolysedauer teilweise Archaea:Bacteria-Verhältnisse über 1 detektiert werden. Dies war, wie die statistischen Analysen zeigten, mit einer erhöhten Hydrolysegasbildung verbunden. Ein erhöhtes Archaea:Bacteria-Verhältnis im Ablauf der Methanreaktoren, also eine vermehrte Ausspülung der Archaea, zeigte dahingegen eine verminderte Biogasproduktion der Reaktoren an. Jedoch konnten auch die Auswirkungen von Modifikationen im Verfahren durch die Bestimmung der bakteriellen und archaeellen Abundanz angemessen analysiert werden.

Bei der detaillierteren Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung konnte aufgezeigt werden, dass die Gattung *Clostridium* mit einem Anteil von durchschnittlich 35% in der Hydrolysestufe die dominanten Cellulose-Abbauer aller untersuchten Gruppen darstellte. Darauf folgte die Gruppe der Pseudomonadaceae mit durchschnittlich 16% und die Gattung der *Acetivibrio* mit 9%. Bacteroidetes nahmen im Durchschnitt nur einen Anteil von etwa 1% ein. Somit fielen im Mittel 61% der mikrobiellen Zellzahl der Hydrolysestufe auf die hier analysierten Cellulose-Abbauer, die folglich einen großen Anteil an der Cellulolyse tragen.

Den größten Anteil an methanogenen Archaeen im Ablauf der Methanstufe nahmen Vertreter der Methanosarcinales mit durchschnittlich 6% ein. Die Methanobacteriaceae, Methanococcaceae und Methanomicrobiales waren jeweils mit etwa 3% Anteil vertreten. Eine ähnliche Zusammensetzung zeigte sich auch im Biofilm und -schlamm der Methanreaktoren. So konnte eine leichte Dominanz der hydrogenotrophen Methanogenen nachgewiesen werden, was auch auf eine Präferenz dieses Methanbildungsweges in den untersuchten Biogasanlagen schließen lässt. Außerdem zeigten die statistischen

Analysen, dass die Abundanz der Methanogenen Hinweise auf die Qualität der Silage und der Hydrolyseeffizienz gibt.

Zur Analyse der heterotrophen Abbauaktivität in verschiedenen biologischen Systemen hat sich in der Praxis die Bestimmung der unspezifischen Esteraseaktivität bewährt. In dieser Arbeit wurde die Esteraseaktivität erstmalig zur Untersuchung von Proben aus Biogasanlagen eingesetzt. Hier bestätigte sich, dass die Enzymaktivität des Eingangsmaterials stark von der Silagequalität abhängig ist. So konnten Korrelationen zwischen der Esteraseaktivität und der AT_4 , des Silagealters, des Milchsäuregehaltes sowie der GZZ detektiert werden. Wie bei der GZZ, wies auch die Esterase eine anlagen- bzw. substratspezifische Aktivität auf. Die mittlere Esteraseaktivität der Prozesswasserproben der Containeranlage lag mit 345 IU/g TS deutlich über der Fasanlage mit durchschnittlich 11 IU/g TS und der Pilotanlage mit 66 IU/g TS. Daher können auch hier Auswirkungen von Störfällen bzw. Modifikationen des Verfahrens durch Änderungen in der Esteraseaktivität eindeutig bestimmt werden. Dies zeigten auch die statistischen Analysen, in denen die Esteraseaktivität des Prozesswassers mit der organischen Fracht, der GZZ und dem BSB_5 korrelierten und zudem einen Hinweis auf die Methanproduktion der Biogasreaktoren gab. Aufgrund dessen stellt die Esteraseaktivität einen äußerst aufschlussreichen Parameter zur Prozesskontrolle dar.

Die Bestimmung von Substrat-spezifischen Hydrolasen während des Prozesses ermöglicht eine Überwachung des Hydrolysefortschritts. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Aktivitätsprofile zwischen den Proben aus den Perkolatoren und dessem Ablauf ähneln. Für eine detaillierte Analyse der Abbauprozesse im Perkolator ist eine Untersuchung der Biomasse darin jedoch unvermeidlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyserate bei Vergärung von Maissilage schon innerhalb von sechs Tagen deutlich ansteigt. Hohe Xylanase- und Cellulaseaktivitäten zeigen hierbei einen besonders weit fortgeschrittenen Abbau des pflanzlichen Substrates an. So konnte auch ein Zusammenhang zwischen der Xylanaseaktivität und der Abundanz an Methanogenen bzw. dem Methananteil im Hydrolysegas nachgewiesen werden. Weitere Korrelationen zwischen der Proteaseaktivität und dem Hydrolysegas sowie der Amylaseaktivität bzw. der Peptidaseaktivität und dem ausgespülten Essigsäureäquivalent zeigen, dass sich die Bestimmung der Hydrolasen zur Analyse der Hydrolyseeffizienz und somit des Prozessfortschritts gut eignet. Zudem korrelieren die Protease- und Cellulaseaktivität des Eingangsmaterials mit dem CSB-Austrag aus dem Substrat nach der Hydrolyse. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Analyse der spezifischen Hydrolaseaktivität auch als Indikator für die Qualität der Silage als Biogassubstrat fungieren kann.

Die Bestimmung der AT_4 diene als Indikator für den potentiellen Abbau bzw. das Restgaspotential des Substrates der Hydrolysestufe. Zur Untersuchung des Eingangsmaterials wurde die AT_4 in dieser Arbeit erstmals eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine niedrige AT_4 des Eingangsmaterials auf eine

gute Silagequalität mit hohem Energiegehalt hinweist, was in einem hohen CSB-Austrag durch die Hydrolyse resultiert. In dieser Studie lag die durchschnittliche AT_4 frischer Maissilage mit guter Qualität bei 20 mg O_2/g TS. Dagegen zeigte eine hohe AT_4 des Substrates während der Hydrolyse eine effiziente Substratumsetzung mit einem hohen Austrag an organischer Facht an. Eine niedrige AT_4 des Gärrestes ist wiederum ein Nachweis für einen effizienten Substratabbau mit geringem Restgaspotential. Da auch eine Korrelation zwischen der AT_4 und der Esteraseaktivität belegt werden konnte, könnte die schnellere Messmethode zur Bestimmung der Esteraseaktivität als Alternative dienen.

Über den BSB_5 kann die biologische Abbaubarkeit organischer Verbindungen im Prozesswasser bestimmt werden. Bei der untersuchten Biogasanlage lag der BSB_5 des Hydrolysats im Mittel bei 3.461 mg O_2/L . Schon eine junge mikrobielle Biozönose in der Methanstufe konnte den BSB_5 um durchschnittlich 71% reduzieren. So eignet sich der BSB_5 insbesondere auch zur Beurteilung der Effizienz der Methanisierung. Auch zwischen dem BSB_5 und der Esteraseaktivität konnte eine signifikante Korrelation bestimmt werden. Aufgrund der schnelleren Bestimmungsmethode eignet sich auch hier die Esteraseaktivität als sinnvolle Alternative.

6.2 Vergärung von HCH-belasteter Grassilage

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Vergärbarkeit von HCH-belasteter Grassilage bzw. ein potentieller mikrobieller β -HCH-Abbau untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Mikroorganismen durch die Schadstoffbelastung des Substrates nicht inhibiert war. Darüber hinaus konnte ein Abbau des β -HCH nach der Hydrolyse der Grassilage nachgewiesen werden. Die einbezogenen Anlageneinheiten der untersuchten Biogasanlage lassen teilweise Sauerstoffkontakt zu, sodass prinzipiell sowohl der aerobe als auch der anaerobe, mikrobielle β -HCH-Abbauweg möglich sind. So konnten sowohl Clostridia, von denen verschiedene Spezies am anaeroben Abbau beteiligt sind, als auch Pseudomonadaceae, von denen einige *Pseudomonas*-Spezies am aeroben Abbau mitwirken, in den HCH-belasteten Proben nachgewiesen werden. Bevor weitere Vergärungsuntersuchungen durchgeführt werden, ist jedoch zunächst die Silierbarkeit von HCH-belastetem Substrat zu prüfen, da Anzeichen für eine Inhibierung der hierfür essentiellen Milchsäurebakterien detektiert werden konnten.

6.3 Biozönose der Methanstufe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Biofilm bzw. Bioschlamm der Methanstufe analysiert. Hierbei wurde festgestellt, dass sich innerhalb von vier Jahren nach Betriebsbeginn eine große Menge an Organik sowie Anorganik (u. a. Mineralstoffe) in die Methanreaktoren einlagerte. Aufgrund der starken Biofilmdicke auf den Füllkörpern (\varnothing 1,9 mm) war die mikrobielle Zellzahl sowie Aktivität reduziert, insbesondere in den inneren Schichten des Biofilms. Die mikrobielle Zusammensetzung des Bioschlammes um die Füllkörper wies eine große Ähnlichkeit zu der des Prozesswassers auf. Die Analy-

sen der Zusammensetzung der Mikroorganismen des Füllkörperbiofilms zeigten hingegen eine deutliche Schichtung hinsichtlich ihres Stoffwechsels und syntrophen Beziehungen zueinander. Mittels qPCR- und DGGE-Analysen konnten die dominanten bakteriellen Vertreter *Clostridium* (hydrolysierende/acidogene Bakterien), *Anaerobaculum* bzw. *Acetomicrobium*, *Syntrophaceticus*, *Syntrophobacter* sowie *Pelotomaculum* (acetogene/syntrophe Bakterien) nachgewiesen werden. Zu häufigen Vertretern der hydrogentrophen Methanogenen zählten *Methanobacterium*, *Methanolinea* sowie *Methanospirillum*. Außerdem konnten acetoklastische Methanogene, *Methanosarcina* und *Methanosaeta*, erfasst werden. Ferner war auch eine erhebliche Abundanz an Crenarchaeota vertreten, deren Funktion im Biogasprozess noch ungeklärt ist. Da diese nicht-methanogene Gruppe auch zur Domäne der Archaea zählt, wird daher zur alleinigen Erfassung von methanogenen Archaea mittels molekularbiologischer Analysen der Einsatz von Methanogenen-spezifischen Oligonukleotiden empfohlen.

6.4 Ansätze zur Prozessoptimierung

Im Rahmen der analytischen Begleitung der Biogasanlagen konnten einige Ansätze zur Steigerung der Prozesseffizienz dargelegt werden.

So hat sich gezeigt, dass nicht nur die Art des Substrates (Gülle, Silage, Bioabfall, etc.), sondern auch die Form des Substrates (Partikelgröße) großen Einfluss auf die Vergärbarkeit hat. Deshalb ist zur Erhöhung der Hydrolyserate eine Zerkleinerung der Substratteilchen, z. B. der Pflanzenfasern, anzuraten. Des Weiteren hat auch die Substratqualität (z. B. die Silierungseffizienz, der Energiegehalt sowie die mikrobielle Zellzahl und Aktivität) einen großen Einfluss auf den Substratabbau und den effektiven Biogasertrag. Aus diesem Grund stellt die Untersuchung der Substratqualität eine elementare Maßnahme zur präventiven Bewertung der Effizienz des Biogasprozesses dar. So ist gegebenenfalls eine entsprechende Modifikation des Verfahrens auf die gegebenen Substrateigenschaften möglich.

Obwohl beim Perkolationsverfahren prinzipiell keine zusätzliche Inokulation benötigt wird, wurde in dieser Studie gezeigt, dass der Substratabbau durch Beimischung des Eingangsmaterials intensiviert werden kann. Insbesondere bei Substraten mit geringer mikrobieller Zellzahl ist daher zur Erhöhung der Hydrolyserate eine Inokulation durch bspw. Gärrest oder Gülle zu empfehlen.

Die Zulauftrate und damit auch die Raumbelastung nehmen einen großen Einfluss auf die mikrobielle Biozönose. In den vorliegenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur die Perkolationsrate der Hydrolysestufe zugunsten einer maximalen Hydrolyserate optimiert werden sollte, auch eine entsprechend eingestellte Zulauftrate der Methanstufe ist für den gesamten Biogasprozess essentiell. Abweichungen haben große Auswirkungen auf die mikrobielle Aktivität, sodass eine stetige Kontrolle wesentlich ist.

Die Untersuchungen der Methanstufe nach mehrjährigem Betrieb der Anlage zeigten eine erhebliche Anreicherung von organischem und anorganischem Material auf. Die Auswirkungen auf die mikrobielle Biozönose (u. a. Verringerung der Zellzahl) resultierten in einem stark reduzierten Biogasertrag. So ist eine regelmäßige Ausspülung des akkumulierten Materials, bspw. durch erhöhte Durchflussraten anzuraten. Auch würde ein vermehrter Prozesswasseraustausch der verstärkten Aufsatzung entgegenwirken.

Es konnte gezeigt werden, dass es beim zweistufigen Biogasverfahren vielfältige Möglichkeiten zur Prozesskontrolle gibt. Durch verschiedene physikochemische sowie mikrobiologische Kenngrößen können sowohl die Prozesse in der Hydrolyse- als auch der Methanstufe optimiert werden, was in einem erhöhten Biogasertrag resultiert. Da mit einer erhöhten Hydrolyserate auch eine einsetzende Biogasbildung in der Hydrolysestufe einhergeht, ist eine Miterfassung des Hydrolysegases zu empfehlen. So kann einem Energieverlust durch abgehendes Methan in der Hydrolysestufe entgegengewirkt werden.

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass auch mit Schadstoffen kontaminierte Silage prinzipiell als Biogassubstrat geeignet ist. Jedoch sollte noch eine Methodik entwickelt werden, um die nicht abbaubaren mobilisierten Schadstoffe aus den internen Kreisläufen der Biogasanlage entfrachten zu können; bspw. durch die Ausfällung von Schwermetallen.

6.5 Einsatz mikrobieller Parameter zur Prozesskontrolle

Wie vorab beschrieben konnten diverse Korrelationen verschiedener Kenngrößen im Biogasprozess nachgewiesen werden. So eignen sich verschiedene mikrobiologische Parameter sehr gut zur Prozesskontrolle. Die umfangreichen Zusammenhänge bezüglich der allgemeinen mikrobiologischen Parameter – wie GZZ, Verhältnis von Archaea zu Bacteria, AT_4 und Esteraseaktivität – lassen auf eine Allgemeingültigkeit der nachgewiesenen Korrelationen schließen. Daraus resultiert, dass diese Zusammenhänge auch in anderen Anlagentypen, einstufige sowie mehrstufige Vergärungsanlagen, bzw. für die Fermentation anderer Substrate vorzufinden und entsprechende Analysen anwendbar sind.

In der folgenden Tabelle 6-1 sind konkrete Analysepakete hinsichtlich unterschiedlicher Einsatzmöglichkeiten der mikrobiologischen Untersuchungsparameter aufgelistet.

Tabelle 6-1: Analysepakete hinsichtlich unterschiedlicher Gesichtspunkte der Prozesskontrolle

Analysenpaket	Untersuchungsparameter
Analyse der Güte des Eingangsmaterials/Substrates	– Esteraseaktivität
	– Cellulaseaktivität
	– Proteaseaktivität
	– Peptidaseaktivität
	– Gesamtzellzahl
	– AT ₄
	– Abundanz hydrogenotropher Methanogener
Analyse der Hydrolyseeffizienz im Perkolator	– Esteraseaktivität
	– Amylaseaktivität
	– Peptidaseaktivität
	– Xylanaseaktivität
	– Gesamtzellzahl
	– AT ₄
Analyse der Hydrolysegasbildung im Perkolator	– AT ₄
	– Proteaseaktivität
	– Peptidaseaktivität
	– Verhältnis Archaea/Bacteria
Analyse der Methanbildung im Perkolator	– Xylanaseaktivität
	– Verhältnis Archaea/Bacteria
	– AT ₄
Überwachung der Hydrolyseeffizienz über das Prozesswasser	– Esteraseaktivität
	– Amylaseaktivität
	– BSB ₅
	– Gesamtzellzahl
Überwachung der Effizienz der Methanisierung über das Prozesswasser	– Esteraseaktivität
	– BSB ₅
	– Gesamtzellzahl
	– Verhältnis Archaea/Bacteria

6.6 Esterase-Schnelltest

In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass sich insbesondere die Esteraseaktivität als vielseitige mikrobiologische Kenngröße zum Überwachen des Biogasprozesses auszeichnet. Aus diesem Grund wurde hierfür ein Schnelltest mit vereinfachter Versuchsdurchführung entwickelt, der es ermöglicht, die allgemeine heterotrophe Abbauaktivität vor Ort zu ermitteln. Hierbei ist die Option von Messungen bei 490 nm oder 500 nm gegeben, was die Bestimmung mit einfachen Filterphotometern erlaubt. Weiterhin konnte der apparative Aufwand reduziert werden, sodass auch auf Großgeräte, wie Zentrifugen, verzichtet werden kann. Essentiell hierbei war jedoch v. a. die Eruierung eines geeigneten Stoppreagenzes (7,5% SDS). Somit ist es nun möglich die enzymatische Reaktion nach Ablauf der Inkubationszeit effizient zu inhibieren. Noch nach fünf Stunden, nach Zugabe des Stoppreagenzes, ist keine signifikan-

te Änderung der Messwerte detektierbar, was eine um Stunden spätere photometrische Messung erlaubt. Die Analyse der Esteraseaktivität durch den Schnelltest ermöglicht, im Gegensatz zu vielen zeitintensiven und aufwendigen chemischen Untersuchungen, eine einfache und schnelle Begutachtung des Biogasprozesses, sodass eine zeitnahe Reaktion auf detektierte Prozessstörungen realisierbar ist.

Ferner kann der hier beschriebene Schnelltest auch zur Analyse von biologisch aktivem Material anderer verfahrenstechnischer Anlagen bzw. von Umweltproben hinsichtlich der mikrobiellen Aktivität eingesetzt werden. Der Esterase-Schnelltest wurde zudem zum Patent angemeldet (Gasch & Hildebrandt 2013).

7 LITERATUR

- AbfAbIV (2001) Verordnung über die umweltverträgliche Ablagerung von Siedlungsabfällen (Abfallablagerungsverordnung - AbfAbIV). BGBl. IS. 2807.
- Abreu, A. A., Costa, J. C., Araya-Kroff, P., Ferreira, E. C. und Alves, M. M. (2007) Quantitative image analysis as a diagnostic tool for identifying structural changes during a revival process of anaerobic granular sludge. *Water Research*. Vol. 41 (7): 1473-1480.
- Abubaker, J. (2012) Effects of fertilisation with biogas residues on crop yield, soil microbiology and greenhouse gas emissions: Recycling of plant nutrients from bioenergy production. Dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Adam, G. und Duncan, H. (2001) Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 33 (7-8): 943-951.
- Adhya, T. K., Apte, S. K., Raghu, K., Sethunathan, N. und Murthy, N. B. K. (1996) Novel polypeptides induced by the insecticide lindane (γ -hexachlorocyclohexane) are required for its biodegradation by a *Sphingomonas paucimobilis* strain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 221 (3): 755-761.
- Ağdağ, O. N. und Sponza, D. T. (2005) Co-digestion of industrial sludge with municipal solid wastes in anaerobic simulated landfilling reactors. *Process Biochemistry*. Vol. 40 (5): 1871-1879.
- Aguilera, P., Briceño, G., Mora, M. d. l. L., Demanet, R. und Palma, G. (2010) Effect of liquid cow manure on chemical and biological properties in an andisol. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*. Vol. 10 (2): 158-169.
- Ahn, J.-H., Do, T. H., Kim, S. D. und Hwang, S. (2006) The effect of calcium on the anaerobic digestion treating swine wastewater. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 30 (1): 33-38.
- Alex, L. A., Reeve, J. N., Orme-Johnson, W. H. und Walsh, C. T. (1990) Cloning, sequence determination, and expression of the genes encoding the subunits of the nickel-containing 8-hydroxy-5-deazaflavin reducing hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H. *Biochemistry*. Vol. 29 (31): 7237-7244.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 215 (3): 403-410.
- Amani, T., Nosrati, M. und Sreerikshnan, T. R. (2010) Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects - a review. *Environmental Reviews*. Vol. 18: 255-278.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. und Stahl, D. A. (1990a) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 56 (6): 1919-1925.
- Amann, R. I., Krumholz, L. und Stahl, D. A. (1990b) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*. Vol. 172 (2): 762-770.
- Amann, R. I. und Ludwig, W. (1994) Typing *in situ* with probes. in "Bacterial Diversity and Systematics". Priest, F. G., Ramos-Cormenzana, A. und Tindall, B. J. Plenum Press, New York. 115-135.
- Analytik Jena Grundlagen - Instrumentation und Techniken der Summenparameteranalytik. Analytik Jena AG. Jena.
- Andersson, J. und Bjornsson, L. (2002) Evaluation of straw as a biofilm carrier in the methanogenic stage of two-stage anaerobic digestion of crop residues. *Bioresource Technology*. Vol. 85 (1): 51-56.
- Andruleit, H., Babies, H. G., Meßner, J., Rehder, S., Schauer, M. und Schmidt, S. (2011) Kurzstudie - Reserven, Ressourcen und Verfügbarkeit von Energierohstoffen 2011. "DERA Rohstoffinformationen". Deutsche Rohstoffagentur (DERA) in der Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR). Hannover.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, L., Guwy, A., Jenicek, P., Kalyuzhnyi, S. und Van Lier, J. (2007) Anaerobic biodegradation, activity and inhibition (ABAI). in "Task Group Meeting". Prag.
- Arab, H. und Wilderer, P. (2005) Konzeptionierung, Erstellung und Betrieb einer Versuchsfermentieranlage zur Bearbeitung von Fragestellung im Bereich Inputmaterialien und Mikrobiologie bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Technische Universität München, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft.
- Ariño, A., Herrera, A., Conchello, M. P., Lazaro, R. und Pérez, C. (1993) Hexachlorocyclohexane residues in meat products after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 6 (1): 55-61.
- Arnold, U. (2009) Options for reuse of nutrients from waste water in the Mekong Delta, Vietnam. Dissertation, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Aschmann, V. und Mitterleitner, H. (2002) Trockenvergären: Es geht auch ohne Gülle. in "Biogas - Strom aus Gülle und Biomasse". top agrar Fachbuch. Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster-Hiltrup.

- Aschmann, V., Effenberger, M., Gronauer, A., Kaiser, F., Kissel, R., Mitterleitner, H., Nesper, S., Schlattmann, M., Speckmaier, M. und Ziehfrennd, G. (2007) Grundlagen und Technik. in "Biogashandbuch Bayern - Materialienband - Kap. 1.1 – 1.5, Stand Juli 2007". Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU). Augsburg.
- Ashby, K. D., Casey, T. A., Rasmussen, M. A. und Petrich, J. W. (2001) Steady-state and time-resolved spectroscopy of F₄₂₀ extracted from methanogen cells and its utility as a marker for fecal contamination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 49 (3): 1123-1127.
- Aso, Y. und Akamatsu, S. (1956) Activation and inhibition of phosphomonoesterase by cyanide and zinc ions. *Journal of Biochemistry*. Vol. 43 (1): 1-6.
- Aufhammer, S. W. (2004) Kristallstrukturen von F₄₂₀-abhängiger Alkohol-Dehydrogenase (Adf) und F₄₂₀-abhängiger Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer) Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Bachoon, D. S., Otero, E. und Hodson, R. E. (2001) Effects of humic substances on fluorometric DNA quantification and DNA hybridization. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 47 (1): 73-82.
- de Baere, L. A., Devocht, M., van Assche, P. und Verstraete, W. (1984) Influence of high NaCl and NH₄Cl salt levels on methanogenic associations. *Water Research*. Vol. 18: 543-548.
- Banning, N., Brock, F., Fry, J. C., Parkes, R. J., Hornibrook, E. R. C. und Weightman, A. J. (2005) Investigation of the methanogen population structure and activity in a brackish lake sediment. *Environmental Microbiology*. Vol. 7 (7): 947-960.
- Barrena, R., d'Imporzano, G., Ponsá, S., Gea, T., Artola, A., Vázquez, F., Sánchez, A. und Adani, F. (2009) In search of a reliable technique for the determination of the biological stability of the organic matter in the mechanical-biological treated waste. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 162 (2-3): 1065-1072.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W., Siegrist, H. und Vavilin, V. (2002) Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1). IWA. London.
- Bauer, C., Korthals, M., Gronauer, A. und Lebuhn, M. (2008) Methanogens in biogas production from renewable resources - a novel molecular population analysis approach. *Water Science and Technology*. Vol. 58 (7): 1433-1439.
- Bauer, C., Lebuhn, M. und Gronauer, A. (2009) Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL). Band 12.
- Beckmann, U. und Kolbe, H. (2002) Mais im Ökologischen Landbau - Informationen für Praxis und Beratung. Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft. Dresden.
- Belitz, H. D., Grosch, W. und Schieberle, P. (2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York. 5. Auflage.
- Bengelsdorf, F. R. (2011) Characterization of the microbial community in a biogas reactor supplied with organic residues. Dissertation, University of Ulm, Ulm.
- Bengelsdorf, F. R., Gerischer, U., Langer, S., Zak, M. und Kazda, M. (2012) Stability of a biogas-producing bacterial, archaeal and fungal community degrading food residues. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 84 (1): 201-212.
- Bergmann, I., Nettmann, E., Mundt, K. und Klocke, M. (2010) Determination of methanogenic Archaea abundance in a mesophilic biogas plant based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 56 (5): 440-444.
- Bergström, I., Heinänen, A. und Salonen, K. (1986) Comparison of acridine orange, acriflavine, and bisbenzimid stains for enumeration of Bacteria in clear and humic waters. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 51 (3): 664-667.
- BGD (2004) DNA-Bestimmung in Boden- und Wasserproben (Bisbenzimid, Hoechst 33252). "Standardarbeitsanweisung - SOP AW 43".
- Biebl, H. und Spröer, C. (2002) Taxonomy of the glycerol fermenting Clostridia and description of *Clostridium diolis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 25 (4): 491-497.
- Binner, E., Böhm, K. und Lechner, P. (2012) Large scale study on measurement of respiration activity (AT₄) by Sapromat and OxiTop. *Waste Management*. Vol. 32 (10): 1752-1759.
- Bischofsberger, W., Dichtl, N., Rosenwinkel, K.-H., Seyfried, C.-F. und Böhnke, B. (2005) Anaerobtechnik. Springer Verlag. Berlin - Heidelberg.
- BMU (2012) Erneuerbare Energien 2011 - Daten des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit zur Entwicklung der erneuerbaren Energien in Deutschland im Jahr 2011 auf der Grundlage der Angaben der Arbeitsgruppe Erneuerbare Energien-Statistik (AGEE-Stat) - Vorläufige Angaben, Stand 08. März 2012 Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) - Referat KI III 1 (Allgemeine und grundsätzliche Angelegenheiten der Erneuerbaren Energien).
- BMWi (2009) Energie in Deutschland - Trends und Hintergründe zur Energieversorgung in Deutschland. "Energie". Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi). Aktualisierte Ausgabe April 2009.

- Boe, K. (2006) Online monitoring and control of the biogas process. Dissertation, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby.
- Boe, K., Steyer, J.-P. und Angelidaki, I. (2008) Monitoring and control of the biogas process based on propionate concentration using online VFA measurement. *Water Science and Technology*. Vol. 57 (5): 661-666.
- Bohley, P. und Seglen, P. O. (1992) Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia*. Vol. 48 (2): 151-157.
- Böltner, D., Moreno-Morillas, S. und Ramos, J.-L. (2005) 16S rDNA phylogeny and distribution of lin genes in novel hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas* strains. *Environmental Microbiology*. Vol. 7 (9): 1329-1338.
- Bonin, A. S. und Boone, D. R. (2006) The order Methanobacteriales. in "The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes". Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. und Dworkin, M. Springer Verlag, New York.
- Boone, D. R. und Kamagata, Y. (1998) Rejection of the species *Methanobrix soehngeni*^{NP} and the genus *Methanobrix*^{NP} as nomina confusa, and transfer of *Methanobrix thermophila*^{NP} to the genus *Methanosaeta*^{NP} as *Methanosaeta thermophila* comb. nov. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 48 (3): 1079-1080.
- Box, J. D. (1983) Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research*. Vol. 17 (5): 511-525.
- Bozdech, M. J. und Bainton, D. F. (1981) Identification of alpha-naphthyl butyrate esterase as a plasma membrane ectoenzyme of monocytes and as a discrete intracellular membrane-bounded organelle in lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 153 (1): 182-195.
- Braks, I. J., Hoppert, M., Roge, S. und Mayer, F. (1994) Structural aspects and immunolocalization of the F₄₂₀-reducing and non-F₄₂₀-reducing hydrogenases from *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *Journal of Bacteriology*. Vol. 176 (24): 7677-7687.
- Brandt, O. (2003) Eintrags- und Wirkungspfade von Schwermetallen und Arsen in Flußaußensystemen am Beispiel der Mulde zwischen Bitterfeld/Wolfen und Dessau, Sachsen-Anhalt. Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin.
- Braun, F., Hamelin, J., Gévaudan, G. und Patureau, D. (2011) Development and application of an enzymatic and cell flotation treatment for the recovery of viable microbial cells from environmental matrices such as anaerobic sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 77 (24): 8487-8493.
- Braun, J., Lorleberg, W. und Stauss, W. (2012) Wirkungsanalyse gesetzlicher Änderungen im Bereich erneuerbarer Energien aus Sicht von Landwirtschaft und ländlichen Räumen in Nordrhein-Westfalen. "Forschungsberichte des Fachbereichs Agrarwirtschaft Soest Nr. 28 - Biogas im EEG 2012: Regionale Struktur- und Einkommenswirkungen in Nordrhein-Westfalen". Fachhochschule Südwestfalen, Fachbereich Agrarwirtschaft
- van Bruggen, J. J. A., Stumm, C. K. und Vogels, G. D. (1983) Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. *Archives of Microbiology*. Vol. 136 (2): 89-95.
- Bunge, M. (2004) Dioxin-dechlorierende Bakterien in anaeroben Kulturen aus kontaminierten Flußsedimenten. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Burkhardt, M. (2012) Die Leistungsfähigkeit anaerober Rieselfeststoffreaktoren zur Methanisierung flüssiger und gasförmiger organischer Verbindungen durch biofilmgebundene methanogene Archaeen. Dissertation, Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus, Cottbus.
- Burns, R. G. A. und Dick, R. P. A. (2002) *Enzymes in the environment: Activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker Verlag, New York.
- Burrell, P. C., O'Sullivan, C., Song, H., Clarke, W. P. und Blackall, L. L. (2004) Identification, detection, and spatial resolution of *Clostridium* populations responsible for cellulose degradation in a methanogenic landfill leachate bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70 (4): 2414-2419.
- Busch, G. und Sieber, M. (2006) Zweistufiges Fest-Flüssig-Biogasverfahren mit offener Hydrolyse – ein neues technologisches Konzept für die Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen und bioverfügbaren Abfällen. *Forum der Forschung*. Vol. 19: 63-68.
- Busch, G., Großmann, J., Sieber, M. und Burkhardt, M. (2009) A new and sound technology for biogas from solid waste and biomass. *Water, Air and Soil Pollution: Focus*. Vol. 9 (1-2): 89-97.
- Buschmann, J. und Busch, G. (2009) Vergärung von Maissilage in einer zweiphasigen Prozessführung - Forschungsergebnisse und Erfahrungen bei der praktischen Umsetzung in technischen Anlagen. *Bornimer Agrartechnische Berichte*. Heft 68: 153-168.
- Buser, H.-R. und Müller, M. D. (1995) Isomer and enantioselective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage sludge under anaerobic conditions. *Environmental Science and Technology*. Vol. 29 (3): 664-672.
- Casserly, C. und Erijman, L. (2003) Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. *International Biodeterioration and Biodegradation*. Vol. 52 (1): 7-12.

- Chanakya, H. N. und Malayil, S. (2012) Anaerobic digestion for bioenergy from agro-residues and other solid wastes - An overview of science, technology and sustainability. *Journal of the Indian Institute of Science*. Vol. 92 (1): 111-143.
- Cheeseman, P., Toms-Wood, A. und Wolfe, R. S. (1972) Isolation and properties of a fluorescent compound, Factor₄₂₀, from *Methanobacterium* Strain MoH. *Journal of Bacteriology*. Vol. 112 (1): 527-531.
- Chelliapan, S., Wilby, T., Yuzir, A. und Sallis, P. J. (2011) Influence of organic loading on the performance and microbial community structure of an anaerobic stage reactor treating pharmaceutical wastewater. *Desalination*. Vol. 271 (1-3): 257-264.
- Chen, S., Liu, X. und Dong, X. (2005) *Syntrophobacter sulfatireducens* sp. nov., a novel syntrophic, propionate-oxidizing bacterium isolated from UASB reactors. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 55 (3): 1319-1324.
- Chen, S., Zamudio Cañas, E. M., Zhang, Y., Zhu, Z. und He, Q. (2012) Impact of substrate overloading on archaeal populations in anaerobic digestion of animal waste. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 113 (6): 1371-1379.
- Chen, Y., Cheng, J. J. und Creamer, K. S. (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource technology*. Vol. 99 (10): 4044-4064.
- Cheng, L., Qiu, T.-L., Yin, X.-B., Wu, X.-L., Hu, G.-Q., Deng, Y. und Zhang, H. (2007a) *Methermicoccus shengliensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen isolated from oil-production water, and proposal of Methermicoccaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 57 (12): 2964-2969.
- Cheng, Y.-H., Sang, S.-X., Huang, H.-Z., Liu, X.-J. und Ouyang, J.-B. (2007b) Variation of coenzyme F₄₂₀ activity and methane yield in landfill simulation of organic waste. *Journal of China University of Mining and Technology*. Vol. 17 (3): 403-408.
- Chin, K.-J., Lukow, T., Stubner, S. und Conrad, R. (1999) Structure and function of the methanogenic archaeal community in stable cellulose-degrading enrichment cultures at two different temperatures (15 and 30 °C). *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 30 (4): 313-326.
- Chutipongtanate, S., Watcharatanyatip, K., Homvises, T., Jaturongkakul, K. und Thongboonkerd, V. (2012) Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs. *Talanta*. Vol. 98: 123-129.
- Cirne, D. G., Lehtomäki, A., Björnsson, L. und Blackall, L. L. (2007) Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 103 (3): 516-527.
- Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T. und Garrity, G. M. (2009) The ribosomal database project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*. Vol. 37 (1): D141-D145.
- Colleran, E., Barry, M., Wilkie, A. und Newell, P. J. (1982) Anaerobic digestion of agricultural wastes using the upflow anaerobic filter design. *Process Biochemistry*. Vol. 17: 12-17.
- Collins, G., O'Connor, L., Mahony, T., Gieseke, A., de Beer, D. und O'Flaherty, V. (2005) Distribution, localization, and phylogeny of abundant populations of Crenarchaeota in anaerobic granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71 (11): 7523-7527.
- Connaughton, S., Collins, G. und O'Flaherty, V. (2006) Development of microbial community structure and activity in a high-rate anaerobic bioreactor at 18 °C. *Water Research*. Vol. 40 (5): 1009-1017.
- Cossu, R. und Raga, R. (2008) Test methods for assessing the biological stability of biodegradable waste. *Waste Management*. Vol. 28 (2): 381-388.
- Cullen, D. W. und Hirsch, P. R. (1998) Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 30 (8-9): 983-993.
- Cypionka, H. (2010) *Grundlagen der Mikrobiologie*. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg. Vol. 4.
- Cysneiros, D., Banks, C. J., Heaven, S. und Karatzas, K.-A. G. (2011) The role of phase separation and feed cycle length in leach beds coupled to methanogenic reactors for digestion of a solid substrate (Part 2): Hydrolysis, acidification and methanogenesis in a two-phase system. *Bioresource Technology*. Vol. 102 (16): 7393-7400.
- da Costa Gomez, C. (2013) Branchenzahlen 2012 und Prognose der Branchenentwicklung 2013. Fachverband Biogas e.V., Freising. veröffentlicht am 22.05.13, siehe: http://www.biogas.org/edcom/webfvb.nsf/id/DE_Branchenzahlen.
- Dadhwal, M., Singh, A., Prakash, O., Gupta, S. K., Kumari, K., Sharma, P., Jit, S., Verma, M., Holliger, C. und Lal, R. (2009) Proposal of biostimulation for hexachlorocyclohexane (HCH)-decontamination and characterization of culturable bacterial community from high-dose point HCH-contaminated soils. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 106 (2): 381-392.
- Delbès, C., Moletta, R. und Godon, J.-J. (2000) Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction – single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*. Vol. 2 (5): 506-515.

- DeLong, E. F., Wickham, G. S. und Pace, N. R. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*. Vol. 243 (4896): 1360-1363.
- Demirel, B., Neumann, L. und Scherer, P. (2008) Microbial community dynamics of a continuous mesophilic anaerobic biogas digester fed with sugar beet silage. *Engineering in Life Sciences*. Vol. 8 (4): 390-398.
- Demirel, B. und Scherer, P. (2008) The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. Vol. 7 (2): 173-190.
- Demirel, B., Ergun, S., Neumann, L. und Scherer, P. (2009) Performance and behaviour of the microbial community of an anaerobic biogas digester using sugar beet silage as mono-substrate. *Biosystems Engineering*. Vol. 102 (4): 444-452.
- Denecke, M. und Nachbarschulte, J. (2004) Wirkung von Fällmitteln auf die heterotrophe Enzymaktivität von Belebtschlammorganismen. *GWF Wasser Abwasser*. Vol. 145 (12): 881-885.
- Deppenmeier, U. (2002) The unique biochemistry of methanogenesis. in "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology". Academic Press, Volume 71: 223-283.
- Deublein, D. und Steinhauser, A. (2011) Biogas from waste and renewable resources: An introduction. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Dewil, R., Appels, L., Baeyens, J., Buczynska, A. und van Vaeck, L. (2007) The analysis of volatile siloxanes in waste activated sludge. *Talanta*. Vol. 74 (1): 14-19.
- Dianou, D., Miyaki, T., Asakawa, S., Morii, H., Nagaoka, K., Oyaizu, H. und Matsumoto, S. (2001) *Methanoculleus chikugoensis* sp. nov., a novel methanogenic archaeon isolated from paddy field soil in Japan, and DNA-DNA hybridization among *Methanoculleus* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 51 (5): 1663-1669.
- DIN 32633 (1998) Chemische Analytik - Verfahren der Standardaddition. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 12879 (2001) Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse. Beuth-Verlag, Berlin.
- DIN EN 12880 (2000) Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN ISO 11734 (1998) Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der vollständigen anaeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen im Faulschlamm - Verfahren durch Messung der Biogasproduktion. Beuth-Verlag, Berlin.
- Doddema, H. J. und Vogels, G. D. (1978) Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 36 (5): 752-754.
- van Doesburg, W., van Eekert, M. H. A., Middeldorp, P. J. M., Balk, M., Schraa, G. und Stams, A. J. M. (2005) Reductive dechlorination of β -hexachlorocyclohexane (β -HCH) by a *Dehalobacter* species in coculture with a *Sedimentibacter* sp. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 54 (1): 87-95.
- Doi, R. H. (2008) Cellulases of mesophilic microorganisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1125 (1): 267-279.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S. und Sturrock, S. (2010) Geneious v5. 1. 2010.
- DüMV (2012) Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln (Düngemittelverordnung - DüMV). BGBl. I S. 2482.
- EAWAG (1982) EAWAG Jahresbericht 1982. Eidg. Anstalt für Wasserversorgung Abwasserreinigung und Gewässerschutz. Eidg. Technische Hochschulen.
- Eder, B., Eder, J., Papst, C., Darnhofer, B., Mukengele, M., Heuwinkel, H. und Oechner, H. (2009) Welcher Maissortentyp zur Biogaserzeugung? Internationale Wissenschaftstagung - Biogas Science 2009, Erding.
- van Eekert, M. H. A., van Ras, N. J. P., Mentink, G. H., Rijnaarts, H. H. M., Stams, A. J. M., Field, J. A. und Schraa, G. (1998) Anaerobic transformation of β -hexachlorocyclohexane by methanogenic granular sludge and soil microflora. *Environmental Science and Technology*. Vol. 32 (21): 3299-3304.
- Effenberger, M., Bachmaier, H., Kränsel, E., Lehner, A. und Gronauer, A. (2010) Wissenschaftliche Begleitung der Pilotbetriebe zur Biogasproduktion in Bayern - Abschlussbericht. "LfL-Schriftenreihe". Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) Freising. Vol. 1.
- Eggersglüß, W. und Kraschinski, S. (2001) Biogas II. Rationalisierungs-Kuratorium für Landwirtschaft. Rendsburg-Osterrönnfeld.
- Einbock, S. (2012) Erneuerbare Energien. zuletzt abgerufen am 15.08.12, siehe: <http://www.juraforum.de/lexikon/erneuerbare-energien>.
- Eker, A. P. M., Pol, A., van der Meyden, P. und Vogels, G. D. (1980) Purification and properties of 8-hydroxy-5-deazaflavin derivatives from *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 8 (3): 161-165.

- Eker, A. P. M., Hessels, J. K. C. und van de Velde, J. (1988) Photoreactivating enzyme from the green alga *Scenedesmus acutus*. Evidence for the presence of two different flavin chromophores. *Biochemistry*. Vol. 27 (5): 1758-1765.
- Elcey, C. D. und Kunhi, A. A. M. (2009) Substantially enhanced degradation of hexachlorocyclohexane isomers by a microbial consortium on acclimation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 58 (2): 1046-1054.
- Encina, P. A. G. und Hidalgo, M. D. (2005) Influence of substrate feed patterns on biofilm development in anaerobic fluidized bed reactors (AFBR). *Process Biochemistry*. Vol. 40 (7): 2509-2516.
- Enongene, G. N. (2003) The enzymology of enhanced hydrolysis within the biosulphidogenic recycling sludge bed reactor (RSBR). Dissertation, Rhodes University, Grahamstown.
- Ernst (2005) Antisept 33 - Saures Desinfektionsmittel mit 15 % Peressigsäure - Produktinformation. Ernst GmbH & Co. KG. Kamen.
- Escudí, R., Cresson, R., Delgenès, J.-P. und Bernet, N. (2011) Control of start-up and operation of anaerobic biofilm reactors: An overview of 15 years of research. *Water Research*. Vol. 45 (1): 1-10.
- Fall, P. A. D. (2002) FISH zur Überwachung von Biogasreaktoren. Dissertation, Technische Universität München, München.
- Farghaly, M., Zayed, S., Mahdy, F. und Soliman, S. M. (1998) Lindane degradation and effects on soil microbial activity. *Biomedical and Environmental Sciences*. Vol. 11 (3): 218-225.
- Fay, J. P., Jakober, K. D., Cheng, K. J. und Costerton, J. W. (1990) Esterase activity of pure cultures of rumen bacteria as expressed by the hydrolysis of p-nitrophenylpalmitate. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 36 (8): 585-589.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. Vol. 39: 783-791.
- Feng, X. M., Karlsson, A., Svensson, B. H. und Bertilsson, S. (2010) Impact of trace element addition on biogas production from food industrial waste – linking process to microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 74 (1): 226-240.
- Feng, Y., Behrendt, J., C., W. und Otterpohl, R. (2006) Parameter analysis of the IWA Anaerobic Digestion Model No. 1 for the anaerobic digestion of blackwater with kitchen refuse. *Water Science and Technology*. Vol. 54 (4): 139-147.
- Fiedler, H., Hub, M. und Hutzinger, O. (1993) Stoffbericht Hexachlorcyclohexan (HCH). Landesanstalt für Umweltschutz. Karlsruhe.
- Field, J. A., Stams, A. J. M., Kato, M. und Schraa, G. (1995) Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 67 (1): 47-77.
- Flemming, H.-C. und Petry-Hansen, H. (2006) Charakterisierung der mikrobiellen Besiedlung in Langsandsfiltern im Hinblick auf eine Optimierung des Betriebsverhaltens. "Schlussbericht Teilprojekt A3". DVGW-Technologiezentrum Wasser TZW. Karlsruhe.
- FNR (2012a) Gesetze und Verordnungen. zuletzt abgerufen am 15.08.12, siehe: <http://www.biogasportal.info/rahmenbedingungen/rahmenbedingungen2/gesetzeslage/erneuerbare-energien-gesetz-eeg/>.
- FNR (2012b) Basisdaten Bioenergie Deutschland - August 2012. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR). Gülzow-Prüzen.
- FNR (2013) 12.07.13. Mediathek - Bioenergie. zuletzt abgerufen am 27.07.13, siehe: <http://mediathek.fnr.de/grafiken/daten-und-fakten/bioenergie.html>.
- Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J. und Roller, P. P. (1985) Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Vol. 33 (8): 845-853.
- Fritz, I. (2000) Das Bakterioplankton im Westlichen Mittelmeer - Analyse der taxonomischen Struktur freilebender und partikelgebundener bakterieller Lebensgemeinschaften mit mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig.
- Frolund, B., Griebe, T. und Nielsen, P. H. (1995) Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 43 (4): 755-761.
- Fuchs, J. G., Bieri, M. und Chardonnens, M. (2004) Auswirkungen von Komposten und Gärgut auf die Umwelt, die Bodenfruchtbarkeit sowie die Pflanzengesundheit. Zusammenfassende Übersicht der aktuellen Literatur. Forschungsintstitut für biologischen Landbau (FiBL). Frick, Schweiz.
- Fuller, A. T. (1938) The formamide method for the extraction of polysaccharides from hæmolytic streptococci. *British Journal of Experimental Pathology*. Vol. 19 (2): 130-139.
- Gangneux, C., Akpa-Vinceslas, M., Sauvage, H., Desaire, S., Houot, S. und Laval, K. (2011) Fungal, bacterial and plant dsDNA contributions to soil total DNA extracted from silty soils under different farming practices: Relationships with chloroform-labile carbon. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 43 (2): 431-437.

- Garcia, J.-L., Patel, B. K. C. und Ollivier, B. (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*. Vol. 6 (4): 205-226.
- Garcia, J.-L., Ollivier, B. und Whitman, W. B. (2006) The order Methanomicrobiales. in "The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes". Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. und Dworkin, M. Springer Verlag, New York.
- Gasch, C., Hildebrandt, I., Rebbe, F. und Röske, I. (2013) Enzymatic monitoring and control of a two-phase batch digester leaching system with integrated anaerobic filter. *Energy, Sustainability and Society*. Vol. 3 (1): 1-11.
- Gasch, C. und Hildebrandt, I. (2013) Verfahren und Kit zur Bestimmung der Esteraseaktivität in biologisch aktiven Umweltproben. Deutsche Patentanmeldung mit dem amtlichen Aktenzeichen DE 10 2013 220 896.0, Technische Universität Dresden und Boden- und Grundwasserlabor GmbH, Dresden, angemeldet am 15.10.2013.
- Gast, R. J., Dennett, M. R. und Caron, D. A. (2004) Characterization of protistan assemblages in the Ross Sea, Antarctica, by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70 (4): 2028-2037.
- GDV (2010) Erneuerbare Energien - Gesamtüberblick der Technischen Versicherer im GDV über den technologischen Entwicklungsstand und das technische Gefährdungspotenzial Gesamtverband der Deutschen Versicherungswirtschaft e. V. (GDV).
- Gdynia, A. (2006) Untersuchungen zur physiologischen Funktion der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Geller, A., Brauch, G., Werner, P. und Berberich, A. (1991) Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung - Materialien zur Altlastenbearbeitung. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg. Karlsruhe.
- Gerardi, M. H. (2003) The microbiology of anaerobic digesters. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey. Band 3 von Wastewater Microbiology Series.
- Gerhardt, M., Pelenc, V. und Bäuml, M. (2007) Application of hydrolytic enzymes in the agricultural biogas production: Results from practical applications in Germany. *Biotechnology Journal*. Vol. 2 (12): 1481-1484.
- GFI (2009) Anlage zur Akkreditierungsurkunde DGA-PL-4214.00 nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005. Gültigkeitsdauer: 2009-12-22 bis 2014-12-21. Urkundeninhaber: GFI Grundwasserforschungsinstitut GmbH Dresden Meraner Straße 10, D-01217 Dresden.
- GICON (2010) Innovative Technologien zur Erzeugung und Verwertung von Biogas. "Infomaterial". GICON Bioenergie GmbH. Dresden.
- Gisi, U. (1997) Bodenökologie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart - New York.
- Goel, R., Mino, T., Satoh, H. und Matsuo, T. (1998) Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor. *Water Research*. Vol. 32 (7): 2081-2088.
- Gonenne, A. und Ernst, R. (1978) Solubilization of membrane proteins by sulfobetaines, novel zwitterionic surfactants. *Analytical Biochemistry*. Vol. 87 (1): 28-38.
- Gorris, L. G. und van der Drift, C. (1994) Cofactor contents of methanogenic bacteria reviewed. *Biofactors*. Vol. 4 (3-4): 139-145.
- de Graaf, D. und Fendler, R. (2010) Biogaserzeugung in Deutschland. "SPIN Hintergrundpapier". Umweltbundesamt. Dessau-Roßlau.
- Grady Jr, C. P. L., Daigger, G. T. und Lim, H. C. (1999) Biological wastewater treatment. Marcel Dekker. New York.
- Green, V. S., Stott, D. E. und Diack, M. (2006) Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 38 (4): 693-701.
- Gronauer, A. und Aschmann, V. (2003) Wissenschaftliche Begleitung einer Pilotanlage zur Feststoffvergärung von landwirtschaftlichen Gütern - Az: N/01/17 - Endbericht. Landtechnischer Verein in Bayern e.V.
- Großkopf, R., Janssen, P. H. und Liesack, W. (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 64 (3): 960-969.
- Großkopf, S. (2012) Vor- und Nachteile von Biogasanlagen. zuletzt abgerufen am 15.08.12, siehe: <http://www.alternative-energiequellen.com/biogasanlage.html>.
- Großmann, J., Hildebrandt, I., Otto, S., Nitsche, C., Guderitz, I., Peter, H., Richter, A., Ramig, S., Bethge, C. und Lattke, S. (2012) Durchführung eines Testprogramms zur Bergung, Silierung und Verwertung von Grasaufwuchs aus HCH-kontaminierten Flächen der Mulde bei Dessau "Abschlussbericht". GICON - Großmann Ingenieur Consult GmbH. Dresden.
- Gruß, R. und Scheller, F. (1989) Amperometrisches Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Cholinesterasen und Nachweis der Inhibitoren dieser Enzyme. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 333 (1): 29-32.

- Guilbault, G. G. und Kramer, D. N. (1964) Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha-, and gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. *Analytical Chemistry*. Vol. 36 (2): 409-412.
- Gupta, A., Kaushik, C. P. und Kaushik, A. (2000) Degradation of hexachlorocyclohexane (HCH; α , β , γ and δ) by *Bacillus circulans* and *Bacillus brevis* isolated from soil contaminated with HCH. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 32 (11): 1803-1805.
- Guzzon, A., Bohn, A., Diociaiuti, M. und Albertano, P. (2008) Cultured phototrophic biofilms for phosphorus removal in wastewater treatment. *Water Research*. Vol. 42 (16): 4357-4367.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*.
- Hattingh, W. H. J. und Siebert, M. L. (1967) Determination of the deoxyribonucleic acid (DNA) content of anaerobic sludge. *Water Research*. Vol. 1 (3): 197-203.
- Hattori, S. (2008) Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes and Environments*. Vol. 23 (2): 118-127.
- Heck, J. X., Hertz, P. F. und Ayub, M. A. Z. (2002) Cellulase and xylanase productions by isolated amazon *bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 33 (3): 213-218.
- Heerenklage, J. (2010) 16.03.2010. Kontrollanalysen im MBA-Praxisbetrieb. zuletzt abgerufen am 04.02.2013, siehe: http://www.umwelt.niedersachsen.de/portal/live.php?navigation_id=2347&article_id=8037&psmand=10.
- Heine-Dobbernack, E., Schoberth, S. M. und Sahn, H. (1988) Relationship of intracellular coenzyme F₄₂₀ content to growth and metabolic activity of *Methanobacterium bryantii* and *Methanosarcina barkeri*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 54 (2): 454-459.
- Held, C., Wellacher, M., Robra, K.-H. und Gübitz, G. M. (2002) Two-stage anaerobic fermentation of organic waste in CSTR and UFAF-reactors. *Bioresource Technology*. Vol. 81 (1): 19-24.
- Henkelmann, G. (2005) Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten - Teilprojekt: Wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchungen - Lysimeter-, Labor- und Praxisversuche. "STUMGV-Abschlussbericht". Institut für Agrarökologie, Ökologischer Landbau und Bodenschutz an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft.
- Henkelmann, G., Meyer zu Köcker, K., Gronauer, A., Effenberger, M., Heuwinkel, H. und Lebuhn, M. (2010) Schlüsselparameter zur Kontrolle des Gärprozesses Laboranalytik. Bayern, B. F. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung.
- Herrmann, C., Heiermann, M., Idler, C. und Scholz, V. (2007) Fortschritte in der Bewertung der Einflussfaktoren auf die Substratqualität und Biogasausbeute. in "Schriftenreihe des Landesamtes für Verbraucherschutz, Landwirtschaft und Flurneuordnung - Aktuelle Ergebnisse - Nutzung von Biomasse als Gärsubstrate 2007 - 26. Fachtagung Acker- und Pflanzenbau". Landesamt für Verbraucherschutz, L. u. F. R.-A. u. G. Landesamt für Verbraucherschutz, Landwirtschaft und Flurneuordnung: 23-29.
- Hertwig, F. (2006) Praxishandbuch Futterkonservierung: Silagebereitung, Siliermittel, Dosiergeräte, Silofolien. DLG-Verlag GmbH. Frankfurt.
- Hesketh, T. R. und Flanagan, M. T. (1975) The effect of zinc on the activity and fluorescence of carbonic anhydrase holoenzymes. *Biochemical Journal*. Vol. 147 (1): 37-43.
- Hille, J., Ruske, R., Scholz, R. W. und Walkow, F. (1992) Bitterfeld: Modellhafte ökologische Bestandsaufnahme einer kontaminierten Industrieregion : Beiträge der 1. Bitterfelder Umweltkonferenz. Schmidt Erich Verlag. Berlin. Band 10.
- Hirosue, M. (2010) Grafting polyacrylates from carbohydrates by ATRP and formation of nanoparticles for advanced drug delivery. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Hoffmann, M. (2003) Trockenfermentation in der Landwirtschaft - Entwicklung und Stand. in "VDI Berichte 1751". VDI-Verlag, Düsseldorf. 193-201.
- Hofmann, J. (2001) Grundlagen der Biogaserzeugung. Regierung von Niederbayern, Sachgebiet "Technischer Umweltschutz".
- Hollender, J. (2009) Spurenstoffe eliminieren: Erfolgskontrolle. *Eawag News*. Vol. 67d/Juni: 28-30.
- Holm, G., Kylberg-Hanssen, K. und Svensson, L. (1985) Use of dodecyl sulfate as an esterase inhibitor before gas-chromatographic determination of labile beta-adrenoceptor blocking drugs. *Clinical Chemistry*. Vol. 31 (6): 868-870.
- Holzpfel, B. und Wickert, L. (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit*. Vol. 37 (2): 120-126.
- Hopfner-Sixt, K., Amon, T., Bauer, A., Kryvoruchko, V., Amon, B., Bodiroza, V., Ramusch, M., Hrbek, R., Friedel, J. K., Boxberger, J. und Zollitsch, W. (2007) Möglichkeiten zur Verbesserung der Gasausbeute aus Gärrohstoffen. "energytech.at - Die Internet-Plattform für innovative Energietechnologien in den Bereichen Erneuerbare Energieträger und Energieeffizienz". Universität für Bodenkultur Wien.

- Hopwood, D. (1967) Some aspects of fixation with glutaraldehyde. A biochemical and histochemical comparison of the effects of formaldehyde and glutaraldehyde fixation on various enzymes and glycogen, with a note on penetration of glutaraldehyde into liver. *Journal of Anatomy*. Vol. 101 (1): 83-92.
- Horn, S. J., Estevez, M. M., Nielsen, H. K., Linjordet, R. und Eijssink, V. G. H. (2011) Biogas production and saccharification of *Salix* pretreated at different steam explosion conditions. *Bioresource Technology*. Vol. 102 (17): 7932-7936.
- Huber, R. und Stetter, K. O. (2001) Order I. Methanopyrales ord. nov. in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria (2nd ed. ed.)". Boone, D. R. und Castenholz, R. W. Springer Verlag, New York.
- Hung, C.-H., Chang, Y.-T. und Chang, Y.-J. (2011) Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems – A review. *Bioresource Technology*. Vol. 102 (18): 8437-8444.
- Hupe, K., Heyer, K.-U. und Stegmann, R. (2009) Biologische Bioabfallverwertung: Kompostierung kontra Vergärung. Stegmann und Partner. IFAS - Ingenieurbüro für Abfallwirtschaft. Hamburg.
- Huser, B. A., Wuhrmann, K. und Zehnder, A. J. B. (1982) *Methanotrix soehngenii* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Archives of Microbiology*. Vol. 132 (1): 1-9.
- Hutschemackers, J., Delafontaine, M., Naveau, H. P. und Nyns, E. J. (1982) An improved method for the quantitative evaluation of the potential for methane production of mixed microbial communities in digestion mixed liquors through the determination of the content in coenzyme F₄₂₀. *Biomass*. Vol. 2 (2): 115-125.
- IFA (2012) Monitoring/Prozesskontrolle von Biogasanlagen. zuletzt abgerufen am 14.08.2012 siehe: <http://www.codigestion.com/index.php?id=411>.
- Iino, T., Mori, K. und Suzuki, K.-i. (2010) *Methanospirillum lacunae* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a puddly soil, and emended descriptions of the genus *Methanospirillum* and *Methanospirillum bungatei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 60 (11): 2563-2566.
- Imachi, H., Sakai, S., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y. und Sekiguchi, Y. (2007) *Pelotomaculum propionicicum* sp. nov., an anaerobic, mesophilic, obligately syntrophic, propionate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 57 (7): 1487-1492.
- Imachi, H., Sakai, S., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Kamagata, Y., Ohashi, A. und Harada, H. (2008) *Methanolinea tarda* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 58 (1): 294-301.
- Inbar, Y., Boehm, M. J. und Hoitink, H. A. J. (1991) Hydrolysis of fluorescein diacetate in sphagnum peat container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 23 (5): 479-483.
- Isabelle, D., Simpson, D. R. und Daniels, L. (2002) Large-scale production of coenzyme F₄₂₀-5,6 by using *Mycobacterium smegmatis*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68 (11): 5750-5755.
- Ito, M., Prokop, Z., Klvaňa, M., Otsubo, Y., Tsuda, M., Damborský, J. und Nagata, Y. (2007) Degradation of β-hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from γ-hexachlorocyclohexane-utilizing bacterium *Sphingobium* sp. MI1205. *Archives of Microbiology*. Vol. 188 (4): 313-325.
- Jagnow, G., Haider, K. und Ellwardt, P.-C. (1977) Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology*. Vol. 115 (3): 285-292.
- James, A. L., Perry, J. D., Rigby, A. und Stanforth, S. P. (2007) Synthesis and evaluation of novel chromogenic aminopeptidase substrates for microorganism detection and identification. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 17 (5): 1418-1421.
- Jones, K. L., Rees, J. F. und Grainger, J. M. (1983) Methane generation and microbial activity in a domestic refuse landfill site. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 18 (4): 242-245.
- Kaiser, F., Metzner, T., Effenberger, M. und Gronauer, A. (2007) Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. "LfL-Information". Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft.
- Kaltschmitt, M., Hartmann, H. und Hofbauer, H. (2001) Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren. Springer Verlag. Berlin.
- Kamagata, Y. und Mikami, E. (1991) Isolation and characterization of a novel thermophilic *Methanosaeta* strain. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 41 (2): 191-196.
- Kamide, K. (2005) Cellulose and cellulose derivatives. Elsevier Science. Amsterdam.
- Kampmann, K., Ratering, S., Kramer, I., Schmidt, M., Zerr, W. und Schnell, S. (2012) Unexpected stability of Bacteroidetes and Firmicutes communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 78 (7): 2106-2119.

- Kaparaju, P., Ellegaard, L. und Angelidaki, I. (2009) Optimisation of biogas production from manure through serial digestion: Lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresource Technology*. Vol. 100 (2): 701-709.
- Kapuscinski, J. (1995) DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic and Histochemistry*. Vol. 70 (5): 220-233.
- Karakashev, D., Batstone, D. J. und Angelidaki, I. (2005) Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 71 (1): 331-338.
- Kayser, F. H., Böttger, E. C. und Zinkernagel, R. M. (2010) Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. Thieme Verlag. Stuttgart.
- Kendall, M. M. und Boone, D. R. (2006) The order Methanosarcinales. in "The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes". Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. und Dworkin, M. Springer Verlag, New York.
- Kennedy, K. J. und Droste, R. L. (1987) Diffusional limitations of anaerobic biofilms. *Canadian Journal of Civil Engineering*. Vol. 14 (5): 631-637.
- Kerga, G. A. (2011) Optimum production of biogas from bio-municipal solid wastes using two stages anaerobic digester Dissertation, Addis Ababa University, Addis Ababa.
- Khan, A. W. (1980) Degradation of cellulose to methane by a coculture of *Acetivibrio cellulolyticus* and *Methanosarcina barker**. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 9 (3): 233-235.
- Khanal, S. (2011) Anaerobic biotechnology for bioenergy production: Principles and applications. John Wiley & Sons. New York.
- Kim, H. J., Jeong, S. R., Park, J. K., Kim, H. K. und Lee, N. H. (2011) Biological stabilization criteria of excavated waste from MSW landfill by aerobic (AT₄) and anaerobic (GB₂₁) methods. *한국폐기물자원순환학회지 (Resource Circulation Journal of Korea Solid Wastes)*. Vol. 28 (4): 378-384.
- Kim, J., Lee, S. und Lee, C. (2012) Comparative study of changes in reaction profile and microbial community structure in two anaerobic repeated-batch reactors started up with different seed sludges. *Bioresource Technology*. Vol. 129: 495-505.
- Kirkeby, S. und Moe, D. (1984) The effect of fixation on esterases. *Acta Histochemica*. Vol. 75 (2): 159-163.
- Klimanek, E.-M., Schulz, E. und Lehmann, J. (2000) Rückstände aus der Lindanproduktion in der Mulde. *UFZ-Jahresbericht*. Vol. '98-'99: 130-135.
- Klocke, M., Mähnert, P., Mundt, K., Souidi, K. und Linke, B. (2007) Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 30 (2): 139-151.
- Knorr, C. und Schell, T. (1997) Mikrobieller Schadstoffabbau: Ein interdisziplinärer Ansatz. Springer Verlag. Berlin - Heidelberg.
- Koitzka, M., Höchel, J., Gieschen, H. und Borchert, H.-H. (2010) Improving the *ex vivo* stability of drug ester compounds in rat and dog serum: Inhibition of the specific esterases and implications on their identity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 51 (3): 664-678.
- Kolbe, H., Schuster, M., Hänsel, M., Schließer, I., Pöhlitz, B., Steffen, E. und Pommer, R. (2006) Feldfutterbau und Gründüngung im Ökologischen Landbau - Informationen für Praxis und Beratung. Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft - Fachbereich Pflanzliche Erzeugung. Fischer Druck. Großpönsna.
- Kole, M. M., Draper, I. und Gerson, D. F. (1988) Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 28 (4): 404-408.
- Konrad, H. und Gabrio, T. (1976) Enzymatisch-kolorimetrische Schnellmethode zur Ermittlung von Rückständen phosphororganischer Insektizide in Milch. *Food / Nahrung*. Vol. 20 (4): 395-398.
- Koschorreck, M., Geller, W., Neu, T., Kleinstüber, S., Kunze, T., Trosiener, A. und Wendt-Potthoff, K. (2010) Structure and function of the microbial community in an *in situ* reactor to treat an acidic mine pit lake. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 73 (2): 385-395.
- Kossmann, W., Pönitz, U., Habermehl, S., Hoerz, T., Krämer, P., Klingler, B., Kellner, C., Wittur, T., v. Klopotek, F., Krieg, A. und Euler, H. (1999) Biogas Digest - Biogas Basics. ISAT and GTZ. Vol. 1.
- Krakat, N., Westphal, A., Schmidt, S. und Scherer, P. (2010) Anaerobic digestion of renewable biomass: Thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 76 (6): 1842-1850.
- Krakat, N., Schmidt, S. und Scherer, P. (2011) Potential impact of process parameters upon the bacterial diversity in the mesophilic anaerobic digestion of beet silage. *Bioresource Technology*. Vol. 102 (10): 5692-5701.
- Kranert-Rydzky, H. (2012) Verseuchtes Gras soll in Biogasanlagen verarbeitet werden. *Mitteldeutsche Zeitung*, veröffentlicht am 09.09.2012, siehe: <http://www.mz-web.de/bitterfeld/anhalt-bitterfeld-verseuchtes-gras-soll-in-biogasanlagen-verarbeitet-werden,20640916,21261874.html>.

- Krause, L., Diaz, N. N., Edwards, R. A., Gartemann, K.-H., Krömeke, H., Neuweger, H., Pühler, A., Runte, K. J., Schlüter, A., Stoye, J., Szczepanowski, R., Tauch, A. und Goesmann, A. (2008) Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Biotechnology*. Vol. 136 (1-2): 91-101.
- Krengel, U. und Dijkstra, B. W. (1996) Three-dimensional structure of endo-1,4- β -xylanase I from *Aspergillus niger*: Molecular basis for its low pH optimum. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 263 (1): 70-78.
- Kreuger, E. und Björnsson, L. (2006) Anaerobic digestion of horse manure with and without co-digestion with grass-clover silage in a batch loaded reactor with percolation. "Report". Department of Biotechnology, Lund University.
- Kröber, M., Bekel, T., Diaz, N. N., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krause, L., Miller, D., Runte, K. J., Viehöver, P., Pühler, A. und Schlüter, A. (2009) Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *Journal of Biotechnology*. Vol. 142 (1): 38-49.
- Kubota, K., Ozaki, Y., Matsumiya, Y. und Kubo, M. (2009) Analysis of relationship between microbial and methanogenic biomass in methane fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 158 (3): 493-501.
- Kugelman, I. J. und McCarty, P. L. (1965) Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. *Water Pollution Control Federation*. Vol. 37 (1): 97-116.
- Kuhbier, S. (2003) Charakterisierung der Selbstreinigungsprozesse und des Gewässerzustandes eines abwasserbelasteten Fließgewässers (Horloff, Vogelsberg) mit Hilfe von Sediment und Aufwuchs. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.
- Kühn, R. und Birett, K. (1988) Merkblätter Gefährliche Arbeitsstoffe. Ecomed Sicherheit. Landsberg.
- Kumar, M., Chaudhary, P., Dwivedi, M., Kumar, R., Paul, D., Jain, R. K., Garg, S. K. und Kumar, A. (2005) Enhanced biodegradation of β - and δ -hexachlorocyclohexane in the presence of α - and γ -isomers in contaminated soils. *Environmental Science and Technology*. Vol. 39 (11): 4005-4011.
- Kunow, J., Schwörer, B., Stetter, K. O. und Thauer, R. K. (1993) A F_{420} -dependent NADP reductase in the extremely thermophilic sulfate-reducing *Archaeoglobus fulgidus*. *Archives of Microbiology*. Vol. 160 (3): 199-205.
- Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H. W., Fricke, H., Trincone, A., Kristjansson, J. K. und Stetter, K. O. (1991) *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Archives of Microbiology*. Vol. 156 (4): 239-247.
- Kusch, S. (2007) Methanisierung stapelbarer Biomassen in diskontinuierlich betriebenen Feststofffermentationsanlagen. Dissertation, Universität Hohenheim, Hohenheim.
- KWS (2009) Biogas - Grundlagen der Gärbiologie. KWS Mais GmbH.
- Lal, R., Pandey, G., Sharma, P., Kumari, K., Malhotra, S., Pandey, R., Raina, V., Kohler, H.-P. E., Holliger, C., Jackson, C. und Oakeshott, J. G. (2010) Biochemistry of microbial degradation of hexachlorocyclohexane and prospects for bioremediation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 74 (1): 58-80.
- Langenbeck, G. (2008) Prozessbegleitende Überwachung bei Biogasanlagen. Bio Power Service GmbH & Co. KG.
- Laube, V. M. und Martin, S. M. (1981) Conversion of cellulose to methane and carbon dioxide by triculture of *Acetivibrio cellulolyticus*, *Desulfovibrio* sp., and *Methanosarcina barkeri*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 42 (3): 413-420.
- Lazarova, V. und Manem, J. (1995) Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*. Vol. 29 (10): 2227-2245.
- Lebuhn, M., Effenberger, M. und Gronauer, A. (2006) Gewässerschutz durch Biogastechnologie. "Kongressband der 15. Jahrestagung des Fachverbands Biogas e.V.: Wirtschaftsmotor Biogas". Technische Universität München, Fakultät für Bauingenieur- und Vermessungswesen, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft. Hannover.
- Lebuhn, M., Bauer, C. und Gronauer, A. (2008) Probleme der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen im Langzeitbetrieb und molekularbiologische Analytik. *VDLUFA-Schriftenreihe*. Vol. 64: 118-125.
- Lebuhn, M. und Gronauer, A. (2009) Microorganisms in the biogas-process - the unknown beings. *Landtechnik*. Vol. 64 (2): 127 - 130.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S. G. und Hwang, S. (2008) Monitoring bacterial and archaeal community shifts in a mesophilic anaerobic batch reactor treating a high-strength organic wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 65 (3): 544-554.
- Lee, Z. M.-P., Bussema, C. und Schmidt, T. M. (2009) rrnDB: Documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. *Nucleic Acids Research*. Vol. 37 (suppl 1): D489-D493.
- Legatzki, A., Ortiz, M., Neilson, J. W., Dominguez, S., Andersen, G. L., Toomey, R. S., Pryor, B. M., Pierson III, L. S. und Maier, R. M. (2011) Bacterial and archaeal community structure of two adjacent calcite speleothems in Kartchner Caverns, Arizona, USA. *Geomicrobiology Journal*. Vol. 28 (2): 99-117.
- Lehtomäki, A. (2006) Biogas production from energy crops and crop residues. Dissertation, University of Jyväskylä, Jyväskylä.

- Lehtomäki, A. und Björnsson, L. (2006) Two-stage anaerobic digestion of energy crops: methane production, nitrogen mineralisation and heavy metal mobilisation. *Environmental Technology*. Vol. 27 (2): 209-218.
- Lehtomäki, A., Huttunen, S., Lehtinen, T. M. und Rintala, J. A. (2008) Anaerobic digestion of grass silage in batch leach bed processes for methane production. *Bioresource Technology*. Vol. 99 (8): 3267-3278.
- Lesjak, M. (2006) Newsletter. IPUS GmbH.
- Leßner, L. (1976) Bestimmungen der Esterase-Aktivität in der menschlichen Haut mit dem Substrat o-Nitrophenylacetat. Dissertation, Universität Bremen, Bremen.
- Li, B., Stribley, J. A., Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L. M., Hammond, P., Brimijoin, S., Hinrichs, S. H. und Lockridge, O. (2000) Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *Journal of Neurochemistry*. Vol. 75 (3): 1320-1331.
- Li, J., Wang, J., Luan, Z., Deng, Y. und Chen, L. (2011) Evaluation of performance and microbial community in a two-stage UASB reactor pretreating acrylic fiber manufacturing wastewater. *Bioresource Technology*. Vol. 102 (10): 5709-5716.
- Li, P., Wang, Y., Wang, Y., Liu, K. und Tong, L. (2010) Bacterial community structure and diversity during establishment of an anaerobic bioreactor to treat swine wastewater. *Water Science and Technology*. Vol. 61 (1): 243-252.
- Li, S.-L., Kuo, S.-C., Lin, J.-S., Lee, Z.-K., Wang, Y.-H. und Cheng, S.-S. (2008) Process performance evaluation of intermittent-continuous stirred tank reactor for anaerobic hydrogen fermentation with kitchen waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33 (5): 1522-1531.
- Li, T., Mazéas, L., Sghir, A., Leblon, G. und Bouchez, T. (2009) Insights into networks of functional microbes catalysing methanization of cellulose under mesophilic conditions. *Environmental Microbiology*. Vol. 11 (4): 889-904.
- Liebeneiner, R. (2010) Leistungsfähigkeit der Trockenvergärung von nachwachsenden Rohstoffen unter thermophiler und mesophiler Prozessführung. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- Liebeskind, M. und Dohmann, M. (1994) Improved method of activated sludge biomass determination. *Water Science and Technology*. Vol. 29 (7): 7-13.
- Lin, X. L. und White, R. H. (1986) Occurrence of coenzyme F₄₂₀ and its gamma-monoglutamyl derivative in nonmethanogenic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology*. Vol. 168 (1): 444-448.
- Lindemann, M. (2000) Das ökologische Großprojekt Bitterfeld-Wolfen - eine Bilanz aus fachlicher Sicht. *Altlasten Spektrum*. Vol. 10 (4): 205-214.
- Lindorfer, H., Braun, R. und Kirchmayr, R. (2006) Self-heating of anaerobic digesters using energy crops. *Water Science and Technology*. Vol. 53 (8): 159-166.
- Linke, B., Heiermann, M. und Mumme, J. (2006) Ergebnisse aus den wissenschaftlichen Begleitungen der Pilotanlagen Pirow und Clausnitz. *Gülzower Fachgespräche*. Vol. 24 (112-130):
- Linke, B., Heiermann, M., Loock, R. und Kessler, U. (2007) Ergebnisse aus der wissenschaftlichen Begleitung der Pilotanlage Pirow - ETI Arbeitsgruppensitzung. *Energie Technologie Initiative (ETI) Brandenburg*. Friedersdorf.
- Liu, J., Olsson, G. und Mattiasson, B. (2003) Monitoring of two-stage anaerobic biodegradation using a BOD biosensor. *Journal of Biotechnology*. Vol. 100 (3): 261-265.
- Liu, Y. und Whitman, W. B. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 1125 (1): 171-189.
- Liu, Y. (2010) Taxonomy of methanogens. in "Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology". McGinity, T., van der Meer, J. R., de Lorenzo, V. und Timmis, K. N. Springer Verlag, Heidelberg.
- Lo, C.-H. und Stelson, H. (1972) Interference by polysucrose in protein determination by the lowry method. *Analytical Biochemistry*. Vol. 45 (1): 331-336.
- Lomborg, C. J., Holm-Nielsen, J. B., Oleskowicz-Popiel, P. und Esbensen, K. H. (2009) Near infrared and acoustic chemometrics monitoring of volatile fatty acids and dry matter during co-digestion of manure and maize silage. *Bioresource Technology*. Vol. 100 (5): 1711-1719.
- Loock, R., Fetsch, S., Foellmer, T. und Nöldeke, P. (1999) Trockenfermentation von Restmüll - Einstufige anaerobe Trockenfermentation von Restmüll, Verfahrensentwicklung und Ergebnisse *Müll und Abfall*. Vol. 2: 86-90.
- Lootsma, A. und Raussen, T. (2008) Aktuelle Verfahren zur Aufbereitung und Verwertung von Gärresten. "Bio- und Sekundärrohstoffverwertung III - 20. Kasseler Abfallforum-2008". Witzenhausen-Institut für Abfall, Umwelt und Energie GmbH. Kassel.
- Lopes, F. A., Vieira, M. J. und Melo, L. F. (2000) Chemical composition and activity of a biofilm during the start-up of an airlift reactor. *Water Science and Technology*. Vol. 41 (4-5): 105-111.
- Lopes, W. S., Leite, V. D. und Prasad, S. (2004) Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. *Bioresource Technology*. Vol. 94 (3): 261-266.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 193 (1): 265-275.
- Luo, G., Xie, L., Zhou, Q. und Angelidaki, I. (2011) Enhancement of bioenergy production from organic wastes by two-stage anaerobic hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*. Vol. 102 (18): 8700-8706.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. und Pretorius, I. S. (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 66 (3): 506-577.
- Ma, K., Liu, X. und Dong, X. (2005) *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 55 (1): 325-329.
- Machan, N., Padinger, R., Stiglbrunner, R., Berghold, H., Roschitz, C., Kleinhappl, M., Stutterecker, W. und Kirchmayr, R. (2006) Stoffstromanalyse im Rahmen großtechnischer Versuche sowie quantitative und qualitative Bewertung der Einsatzstoffe. "Biogas Pilotanlage - Teilprojekt 1". Joanneum Research, Institut für Energieforschung.
- MacRae, I. C., Raghu, K. und Bautista, E. M. (1969) Anaerobic degradation of the insecticide lindane by *Clostridium* sp. *Nature*. Vol. 221 (5183): 859-860.
- MacRae, I. C., Yamaya, Y. und Yoshida, T. (1984) Persistence of hexachlorocyclohexane isomers in soil suspensions. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 16 (3): 285-286.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Goebel, W., Brock, T. D. und Beginnen, K. (2001) Brock-Mikrobiologie. Spektrum Akad. Verlag. Heidelberg - Berlin.
- Maierhofer, H. und Wagner, R. (2002) Monitoring der Biogasanlage Rück. Newsletter/ nawaros®06/02. zuletzt abgerufen am 14.08.12, siehe: <http://www.carmen-ev.de/dt/aktuelles/nawaros/nawa02/nawa0602.html>.
- Manickam, N., Mau, M. und Schlömann, M. (2006) Characterization of the novel HCH-degrading strain, *Microbacterium* sp. ITRC1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 69 (5): 580-588.
- Manickam, N., Misra, R. und Mayilraj, S. (2007) A novel pathway for the biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane by a *Xanthomonas* sp. strain ICH12. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 102 (6): 1468-1478.
- Manickam, N., Reddy, M. K., Saini, H. S. und Shanker, R. (2008) Isolation of hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas* sp. by dehalogenase assay and characterization of genes involved in γ -HCH degradation. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 104 (4): 952-960.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. und Schleifer, K.-H. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 15 (4): 593-600.
- Marcel, V., Estrada-Mondaca, S., Magné, F., Stojan, J., Kláčebé, A. und Fournier, D. (2000) Exploration of the Drosophila acetylcholinesterase substrate activation site using a reversible inhibitor (Triton X-100) and mutated enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275 (16): 11603-11609.
- Marín-Pérez, C. und Weber, A. (2012) Möglichkeiten und Grenzen zweiphasiger Systeme zum Aufschluss lignocellulosereicher Substrate durch biologische Behandlung Bornimer Agrartechnische Berichte. Heft 79: 9-21.
- Maruyama, A., Oda, M. und Higashihara, T. (1993) Abundance of virus-sized non-DNase-digestible DNA (coated DNA) in eutrophic seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59 (3): 712-717.
- Matsui, K., Ishii, N., Honjo, M. und Kawabata, Z. i. (2004) Use of the SYBR Green I fluorescent dye and a centrifugal filter device for rapid determination of dissolved DNA concentration in fresh water. *Aquatic Microbial Ecology*. Vol. 36 (1): 99-105.
- Matthies, I. E. (2004) Isolierung und physiologische sowie biochemische Charakterisierung eines Zearalenon-abbauenden Enzyms aus dem Mykoparasiten *Gliocladium roseum*. Cuvillier Verlag. Göttingen. Vol. 1.
- McCoy, W. F. und Olson, B. H. (1985) Fluorometric determination of the DNA concentration in municipal drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 49 (4): 811-817.
- Menes, R. J. und Muxí, L. (2002) *Anaerobaculum mobile* sp. nov., a novel anaerobic, moderately thermophilic, peptide-fermenting bacterium that uses crotonate as an electron acceptor, and emended description of the genus *Anaerobaculum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 52 (1): 157-164.
- Merlino, G., Rizzi, A., Villa, F., Sorlini, C., Brambilla, M., Navarotto, P., Bertazzoni, B., Zagni, M., Araldi, F. und Daffonchio, D. (2012) Shifts of microbial community structure during anaerobic digestion of agro-industrial energetic crops and food industry byproducts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 87 (9): 1302-1311.
- de Mey, M., Lequeux, G., Maertens, J., de Maeseneire, S., Soetaert, W. und Vandamme, E. (2006) Comparison of DNA and RNA quantification methods suitable for parameter estimation in metabolic modeling of microorganisms. *Analytical Biochemistry*. Vol. 353 (2): 198-203.
- MGT (2013) Esterase Detection. zuletzt abgerufen am 15.07.2013, siehe: <http://www.markergene.com/Categories/esterase.php>.

- Middeldorp, P. J. M., Jaspers, M., Zehnder, A. J. B. und Schraa, G. (1996) Biotransformation of α -, β -, γ -, and δ -hexachlorocyclohexane under methanogenic conditions. *Environmental Science and Technology*. Vol. 30 (7): 2345-2349.
- Mignone, N. A. (2005) Biological inhibition/toxicity control in municipal anaerobic digestion facilities. Alabama Water and Pollution Control Association.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31 (3): 426-428.
- ML (2004) Tipps für die Optimierung von Biogasanlagen. Biogasforum am Niedersächsischen Ministerium für den ländlichen Raum, Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (ML).
- Mshandete, A., Björnsson, L., Kivaisi, A. K., Rubindamayugi, M. S. T. und Mattiasson, B. (2006) Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. *Renewable Energy*. Vol. 31 (14): 2385-2392.
- Mshandete, A. M., Björnsson, L., Kivaisi, A. K., Rubindamayugi, M. S. T. und Mattiasson, B. (2008a) Effect of aerobic pre-treatment on production of hydrolases and volatile fatty acids during anaerobic digestion of solid sisal leaf decortication residues. *African Journal of Biochemistry Research*. Vol. 2 (5): 111-119.
- Mshandete, A. M., Björnsson, L., Kivaisi, A. K., Rubindamayugi, M. S. T. und Mattiasson, B. (2008b) Performance of biofilm carriers in anaerobic digestion of sisal leaf waste leachate. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 11 (1): 93-100.
- Mshandete, A. M., Björnsson, L., Kivaisi, A. K., Rubindamayugi, M. S. T. und Mattiasson, B. (2008c) Two-stage anaerobic digestion of aerobic pre-treated sisal leaf decortication residues: Hydrolases activities and biogas production profile. *African Journal of Biochemistry Research*. Vol. 2 (11): 211-218.
- Mu, H., Zhou, S.-M., Xia, Y., Zou, H., Meng, F. und Yan, Y.-B. (2009) Inactivation and unfolding of the hyperthermophilic inorganic pyrophosphatase from *Thermus thermophilus* by sodium dodecyl sulfate. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 10 (6): 2849-2859.
- Muha, I. und Wittum, G. (2012) Effektivität und optimale Steuerung eines Anaerobfilters Bornimer Agrartechnische Berichte. Heft 79: 145-152.
- Mükusch, C. (2011) Strategische Rahmenbedingungen - Vernetzte Energiesicherheit. VS Verlag für Sozialwissenschaften. Wiesbaden.
- Mülhardt, C. (2008) Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg - Berlin.
- Murray, A. E., Hollibaugh, J. T. und Orrego, C. (1996) Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62 (7): 2676-2680.
- Murthy, H. M. R. und Manonmani, H. K. (2007) Aerobic degradation of technical hexachlorocyclohexane by a defined microbial consortium. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 149 (1): 18-25.
- Mutamim, N. S. A., Noor, Z. Z., Hassan, M. A. A. und Olsson, G. (2012) Application of membrane bioreactor technology in treating high strength industrial wastewater: A performance review. *Desalination*. Vol. 305: 1-11.
- Muyzer, G. (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 2 (3): 317-322.
- Nagasawa, S., Kikuchi, R., Nagata, Y., Takagi, M. und Matsuo, M. (1993) Aerobic mineralization of γ -HCH by *Pseudomonas paucimobilis* UT26. *Chemosphere*. Vol. 26 (9): 1719-1728.
- Naraoka, T., Momoi, K., Fukasawa, K. und Goto, M. (1984) Isolation and identification of a naturally occurring 7, 8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin derivative from *Mycobacterium avium*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. Vol. 797 (3): 377-380.
- Neilson, J. W., Jordan, F. L. und Maier, R. M. (2013) Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 92 (3): 256-263.
- Nelson, M. C. (2011) An integrated investigation of the microbial communities underpinning biogas production in anaerobic digestion systems Dissertation, The Ohio State University Columbus.
- Nelson, M. C., Morrison, M., Schanbacher, F. und Yu, Z. (2012) Shifts in microbial community structure of granular and liquid biomass in response to changes to feed and digester design in anaerobic digesters receiving food-processing wastes. *Bioresource Technology*. Vol. 107: 135-143.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B. und Klocke, M. (2008) Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 105 (6): 1835-1850.

- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C. und Klocke, M. (2010) Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 76 (8): 2540-2548.
- Neves, L., Oliveira, R. und Alves, M. M. (2004) Influence of inoculum activity on the bio-methanization of a kitchen waste under different waste/inoculum ratios. *Process Biochemistry*. Vol. 39 (12): 2019-2024.
- Nielsen, K. M., Johnsen, P. J., Bensasson, D. und Daffonchio, D. (2007) Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research*. Vol. 6 (1): 37-54.
- Nijaguna, B. T. (2006) *Biogas Technology*. New Age International. New Delhi.
- Nordberg, Å., Jarvis, Å., Stenberg, B., Mathisen, B. und Svensson, B. H. (2007) Anaerobic digestion of alfalfa silage with recirculation of process liquid. *Bioresource Technology*. Vol. 98 (1): 104-111.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. und Backhaus, H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. Vol. 178 (19): 5636-5643.
- Nybroe, O., Jørgensen, P. E. und Henze, M. (1992) Enzyme activities in waste water and activated sludge. *Water Research*. Vol. 26 (5): 579-584.
- O'Sullivan, C., Burrell, P. C., Clarke, W. P. und Blackall, L. L. (2007) A survey of the relative abundance of specific groups of cellulose degrading bacteria in anaerobic environments using fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 103 (4): 1332-1343.
- Obst, U. (1985) Test instructions for measuring the microbial metabolic activity in water samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 321 (2): 166-168.
- Obst, U. und Holzapfel-Pschorn, A. (1988) *Enzymatische Tests für die Wasseranalytik*. Oldenbourg Verlag. München.
- Obst, U., Holzapfel-Pschorn, A., Weßler, A. und Wiegand-Rosinus, M. (1995) *Enzymatische Tests für die Wasseranalytik*. Oldenbourg Verlag. München. 2. überarbeitete Auflage zu Nr. 36.
- Ohl, A. L. (2007) Wechselwirkungen von Stofftransport und Wachstum in Biofilmsystemen. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig.
- Ohly, N. (2006) Verfahrenstechnische Untersuchungen zur Optimierung der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen. Dissertation, Technische Universität Bergakademie Freiberg, Freiberg.
- Ott, M. (2001) *Prozeßoptimierung als Service-Paket*. Schmack Biogas GmbH.
- Oviedo, M. D. C., Sánchez, J. B. und Alonso, J. M. Q. (2005) Enzymatic estimation of biosolids stability in aerobic digestion systems. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 36 (2-3): 191-197.
- Ovreås, L., Forney, L., Daae, F. L. und Torsvik, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63 (9): 3367-3373.
- Owusu-Apenten, R. K. (2002) *Food protein analysis: Quantitative effects on processing*. Marcel Dekker Incorporated. New York - Basel.
- Palmisano, A. C., Schwab, B. S. und Maruscik, D. A. (1993) Hydrolytic enzyme activity in landfilled refuse. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 38 (6): 828-832.
- de Paolis, M. R., Lippi, D., Guerriero, E., Polcaro, C. M. und Donati, E. (2013) Biodegradation of α -, β -, and γ -hexachlorocyclohexane by *Arthrobacter fluorescens* and *Arthrobacter giacomelloi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 170 (3): 514-524.
- Parawira, W., Murto, M., Read, J. S. und Mattiasson, B. (2005) Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste. *Process Biochemistry*. Vol. 40 (9): 2945-2952.
- Perez-Gilbert, M., Morte, A., Avila-Gonzalez, R. und Garcia-Carmona, F. (2005) Characterization and histochemical localization of nonspecific esterase from ascocarps of desert truffle (*Terfezia clavaryi* Chatin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53 (14): 5754-5759.
- Pesta, G. und Lenz, J. (2006) Verzuckerung von Biertrebern durch Mischenzyme zur Steigerung der spezifischen Gasausbeute bei der anaeroben Vergärung. "Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben R 399". Lehrstuhl für Energie- und Umwelttechnik der Lebensmittelindustrie, Technische Universität München.
- Peterson, G. L. (1979) Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosenbrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*. Vol. 100: 201-220.
- Phenix Research Products (2003) Overview of common fluorescent dyes used in nucleic acid quantitation. "Application Note".
- Phillips, T. M., Seech, A. G., Lee, H. und Trevors, J. T. (2005) Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation*. Vol. 16 (4): 363-392.

- Phytobiotics (2013) sensopower biogas additive. zuletzt abgerufen am 20.02.2013, siehe: <http://www.sensopower.de>.
- Pinto, A. J. und Raskin, L. (2012) PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. *PLoS ONE*. Vol. 7 (8): e43093.
- Pipyn, P., Verstraete, W. und Ombregt, J. P. (1979) A pilot scale anaerobic upflow reactor treating distillery wastewaters. *Biotechnology Letters*. Vol. 1 (12): 495-500.
- Piterina, A. V., Bartlett, J. und Pembroke, J. T. (2010) Molecular analysis of bacterial community DNA in sludge undergoing autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD): Pitfalls and improved methodology to enhance diversity recovery. *Diversity*. Vol. 2 (4): 505-526.
- Pohl, M., Mumme, J., Heeg, K. und Nettmann, E. (2012) Thermo- and mesophilic anaerobic digestion of wheat straw by the upflow anaerobic solid-state (UASS) process. *Bioresource Technology*. Vol. 124: 321-327.
- Pohland, F. G. und Ghosh, S. (1971) Developments in anaerobic stabilization of organic wastes - the two-phase concept. *Environmental Letters*. Vol. 1 (4): 255-266.
- Pohlschröder, M., Leschine, S. B. und Canale-Parola, E. (1994) Multicomplex cellulase-xylanase system of *Clostridium papyrosolvens* C7. *Journal of Bacteriology*. Vol. 176 (1): 70-76.
- Polz, M. F. und Cavanaugh, C. M. (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 64 (10): 3724-3730.
- de Poorter, L. M. I., Geerts, W. J. und Keltjens, J. T. (2005) Hydrogen concentrations in methane-forming cells probed by the ratios of reduced and oxidized coenzyme F₄₂₀. *Microbiology*. Vol. 151 (5): 1697-1705.
- Preuß, G. (2007) Konzepterstellung für die Analyse des ökologisch-mikrobiologischen Zustands von Grundwasser und seiner Veränderung durch anthropogene Einflüsse: Exemplarische mikrobiologische Untersuchungen belasteter und unbelasteter Grundwasserstandorte. in "Dortmunder Beiträge zur Wasserforschung". Inst. für Wasserforschung GmbH Dortmund, Dortmund.
- Purr, A. (1965) Testpapier zum Nachweis von Esterasen in tierischen und pflanzlichen Geweben und Mikroorganismen. *Food / Nahrung*. Vol. 9 (4): 445-454.
- Qiu, Y.-L., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Tseng, I.-C., Cheng, S.-S., Ohashi, A., Harada, H. und Kamagata, Y. (2006) *Pelotomaculum terephthalicum* sp. nov. and *Pelotomaculum isophthalicum* sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens. *Archives of Microbiology*. Vol. 185 (3): 172-182.
- Quintero, J. C., Moreira, M. T., Feijoo, G. und Lema, J. M. (2005) Anaerobic degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. *Chemosphere*. Vol. 61 (4): 528-536.
- Quintero, J. C., Moreira, M. T., Lema, J. M. und Feijoo, G. (2006) An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry. *Chemosphere*. Vol. 63 (6): 1005-1013.
- Rademacher, A., Nolte, C., Schönberg, M. und Klocke, M. (2012a) Temperature increases from 55 to 75 °C in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within the bacterial and archaeal community structure. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 96 (2): 565-576.
- Rademacher, A., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Schönberg, M., Szczepanowski, R., Goesmann, A., Pühler, A. und Klocke, M. (2012b) Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 79 (3): 785-799.
- Rajakumar, R., Meenambal, T., Saravanan, P. M. und Ananthanarayanan, P. (2012) Treatment of poultry slaughterhouse wastewater in hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor packed with pleated poly vinyl chloride rings. *Bioresource Technology*. Vol. 103 (1): 116-122.
- Rajendran, R., Soora, M., Kandasamy, S., Dananjeyan, B., Krishnamurthy, K. und Benckiser, G. (2011) Biogas plants efficiency in purifying Indian sago factory waste water with wide C/N ratios: Strategies for process water reuse. *International Journal of Sustainable Engineering*. Vol. 4 (4): 348-358.
- Rajesh, G., Bandyopadhyay, M. und Das, D. (1999) Some studies on UASB bioreactors for the stabilization of low strength industrial effluents. *Bioprocess Engineering*. Vol. 21 (2): 113-116.
- Rao, P. V., Baral, S. S., Dey, R. und Mutnuri, S. (2010) Biogas generation potential by anaerobic digestion for sustainable energy development in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 14 (7): 2086-2094.
- Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E. und Stahl, D. A. (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 60 (4): 1232-1240.
- Read, G. und Skwierczynski, R. (2007) *Revise A2 Biology for AQA*. Heinemann. Oxford.
- Reay, D., Smith, P. und van Amstel, A. (2010) *Methane and Climate Change*. Earthscan. London. Vol. 1.
- Reed, J. P., Krueger, H. R. und Hall, F. R. (1989) Fluorescein diacetate hydrolysis for determination of accelerated degradation of thiocarbamate herbicides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 43 (6): 929-934.

- Reeker, H., Rühl, B. und Richert, O. (2008) Qualität fängt bei der Ernte an! BIENE Service GmbH. Hopsten.
- Regueiro, L., Veiga, P., Figueroa, M., Alonso-Gutierrez, J., Stams, A. J. M., Lema, J. M. und Carballa, M. (2012) Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiological Research*. Vol. 167 (10): 581-589.
- Reinhold, G. (2005) Eigenschaften und Einsatz der Biogasgülle in der Pflanzenproduktion. Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft. Jena.
- Reiss, T. und Grupp, H. (1990) Perspektiven der Biotechnologie: Wo steht die Bundesrepublik? Verlag TÜV Rheinland. Köln.
- Remde, A. und Tippmann, P. (1998) Mikrobiologische Charakterisierung aquatischer Sedimente. Oldenbourg Verlag. München - Wien. 1. Auflage.
- Rempel, H. (2011) Verfügbarkeit von nicht-erneuerbaren Energierohstoffen. *Zeitschrift für Energiewirtschaft*. Vol. 35 (1): 15-30.
- Rensberg, N., Hennig, C., Naumann, K., Billig, E., Sauter, P., Daniel-Gromke, J., Krautz, A., Weiser, C., Reinhold, G. und Graf, T. (2012) Monitoring zur Wirkung des Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) auf die Entwicklung der Stromerzeugung aus Biomasse. DFBZ - Deutsches BiomasseForschungsZentrum gemeinnützige GmbH. Leipzig.
- Reynolds, P. J. und Colleran, E. (1987) Evaluation and improvement of methods for coenzyme F₄₂₀ analysis in anaerobic sludges. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 7 (2-3): 115-130.
- Rippen, G. (1984) Handbuch der Umwelt-Chemikalien: Physikalisch-chemische Stoffe und ökotoxikologische Daten ausgewählter chemischer Stoffe. ecomed Verlag. Landsberg.
- Rizzi, A., Zucchi, M., Borin, S., Marzorati, M., Sorlini, C. und Daffonchio, D. (2006) Response of methanogen populations to organic load increase during anaerobic digestion of olive mill wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 81 (9): 1556-1562.
- Robb, F. T., Park, J.-B. und Adams, M. W. W. (1992) Characterization of an extremely thermostable glutamate dehydrogenase: A key enzyme in the primary metabolism of the hyperthermophilic archaebacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. Vol. 1120 (3): 267-272.
- Rode, A. (2004) Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen aus Biofilmen. Dissertation, Universität Duisburg-Essen, Duisburg-Essen.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. und Schleifer, K.-H. (1994) *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*. Vol. 140 (10): 2849-2858.
- Rösch, C., Raab, K. und Stelzer, V. (2006) Potenziale der Biogasgewinnung aus Gras von Überschussgrünland in Baden-Württemberg. in "Bioenergienutzung in Baden-Württemberg - Auf dem Weg zum nachhaltigen Ausbau". Stuttgart.
- Rosenzweig, A. C. und Ragsdale, S. W. (2011) Methods in methane metabolism, part A, 1st edition - Methanogenesis. in "Methods in Enzymology". Academic Press, Vol. 494.
- Röske, I. und Uhlmann, D. (2005) Biologie der Wasser- und Abwasserbehandlung. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart.
- Ru, Y.-X., Mi, Y.-C., Liu, J.-H., Wang, H.-J., Zhao, S.-X., Cui, W., Li, C.-W., Li, Q.-H., Zhu, X.-F., Xiao, Z.-J., Pang, J.-X. und Wang, J.-X. (2009) Significance of transmission electron microscopy in subtyping of monocytic leukemia1. *Ultrastructural Pathology*. Vol. 33 (2): 67-75.
- Rudorf, A., Hecht, M. und Clemens, J. (2007) Prozessüberwachung von Biogasanlagen durch Messung der HCO₃⁻ - Pufferkapazität. "Internationales Biogas und Bioenergie Kompetenzzentrum (IBBK) -Tagungsband". Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES) – Abteilung Pflanzenernährung.
- Rumsby, M. G., Getliffe, H. M. und Riekkinen, P. J. (1973) On the association of non-specific esterase activity with central nerve myelin preparations. *Journal of Neurochemistry*. Vol. 21 (4): 959-967.
- RVT Biological Carrier Media for Waste Water Treatment. Rauschert Verfahrenstechnik GmbH. Steinwiesen.
- Sahu, S. K., Patnaik, K. K., Sharmila, M. und Sethunathan, N. (1990) Degradation of alpha-, beta-, and gamma-hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 56 (11): 3620-3622.
- Sahu, S. K., Patnaik, K. K., Bhuyan, S., Sreedharan, B., Kurihara, N., Adhya, T. K. und Sethunathan, N. (1995) Mineralization of alpha-, gamma-, and beta-Isomers of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 43 (3): 833-837.
- Sakai, S., Imachi, H., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H. und Kamagata, Y. (2008) *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 58 (4): 929-936.
- Sams, C. und Mason, H. J. (1999) Detoxification of organophosphates by A-esterases in human serum. *Human and Experimental Toxicology*. Vol. 18 (11): 653-658.

- Sánchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L. und Martín, A. (2000) Effect of temperature and pH on the kinetics of methane production, organic nitrogen and phosphorus removal in the batch anaerobic digestion process of cattle manure. *Bioprocess Engineering*. Vol. 22 (3): 247-252.
- Sánchez, J. B., Quiroga Alonso, J. M. und Coello Oviedo, M. D. (2006) Use of microbial activity parameters for determination of a biosolid stability index. *Bioresource Technology*. Vol. 97 (4): 562-568.
- Sandaa, R. A., Enger, Ø. und Torsvik, V. (1998) Rapid method for fluorometric quantification of DNA in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 30 (2): 265-268.
- Sanphoti, N., Towprayoon, S., Chaiprasert, P. und Nopharatana, A. (2006) The effects of leachate recirculation with supplemental water addition on methane production and waste decomposition in a simulated tropical landfill. *Journal of Environmental Management*. Vol. 81 (1): 27-35.
- Sans, C., Mata-Alvarez, J., Cecchi, F., Pavan, P. und Bassetti, A. (1995) Volatile fatty acids production by mesophilic fermentation of mechanically-sorted urban organic wastes in a plug-flow reactor. *Bioresource Technology*. Vol. 51 (1): 89-96.
- Sasaki, K., Haruta, S., Tatara, M., Yamazawa, A., Ueno, Y., Ishii, M. und Igarashi, Y. (2006) Microbial community in methanogenic packed-bed reactor successfully operating at short hydraulic retention time. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 101 (3): 271-273.
- Sasaki, K., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M. und Igarashi, Y. (2007) Microbial population in the biomass adhering to supporting material in a packed-bed reactor degrading organic solid waste. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 75 (4): 941-952.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D. L., Saarela, M. und de Vos, W. M. (2001) Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67 (2): 504-513.
- Scharf, F. (2010) Grundfutteruntersuchung - Auch Gärqualität untersuchen lassen. Amt für Landwirtschaft und Forsten Deggendorf.
- Scheer, M. (2010) Charakterisierung der Diversität von Mikroorganismen im Nationalpark "Unteres Odertal" Dissertation, Technische Universität Dresden, Dresden.
- Schieder, D., Gronauer, A., Lebuhn, M., Bayer, K., Beck, J., Hiepp, G. und Binder, S. (2010) Prozessmodell Biogas. Biogas Forum Bayern. Arbeitsgemeinschaft Landtechnik und landwirtschaftliches Bauwesen in Bayern e.V., Freising. siehe: http://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Prozessmodell_Biogas.pdf.
- Schimpf, U. und Valbuena, R. (2009) Increase in efficiency of biomethanation by enzyme application. *Bornimer Agrartechnische Berichte*. Vol. 68: 44-56.
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 61 (2): 262-280.
- Schläfer, O. (2005) Biogas measuring device and method for measuring biogas volumes. Clausthaler Umwelttechnik Institut GmbH (Cutec-Institut), WO/2006/034699.
- Schneckenburger, H., Reuter, B. W. und Schoberth, S. M. (1984) Time-resolved fluorescence microscopy for measuring specific coenzymes in methanogenic Bacteria. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 163: 249-255.
- Schnürer, A., Zellner, G. und Svensson, B. H. (1999) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 29 (3): 249-261.
- Schnürer, A. und Jarvis, Å. (2010) Microbiological handbook for biogas plants. in "Swedish Gas Centre Report 207".
- Schnürer, J. und Rosswall, T. (1982) Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 43 (6): 1256-1261.
- Schober, C. (2008) Untersuchungen zum Einsatz technischer und mikrobiell hergestellter Enzymsysteme zur Hydrolyse der Lignocellulose in Maissilage. Logos Verlag, Berlin.
- Schönberg, M. und Linke, B. (2009) Vergärung von Roggen-Ganzpflanzensilage in einer zweiphasigen Prozessführung. *Bornimer Agrartechnische Berichte*. Heft 68: 114-126.
- Schönberg, M. und Linke, B. (2012) The influence of the temperature regime on the formation of methane in a two-phase anaerobic digestion process. *Engineering in Life Sciences*. Vol. 12 (3): 279-286.
- Schroeder, J. W. (2004) Silage fermentation and preservation. Quality forage. NDSU Extension Service, Fargo, North Dakota, USA. 1-8. siehe: <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1254.pdf>.
- Schulz, E., Klimanek, E. M., Kalbitz, K. und Heinrich, K. (1997) Investigations on beta-HCH decomposition in heavy polluted soils in the riverine area of the river Mulde in the region of Dessau. 4th forum HCH and unwanted pesticides, 15-16 January 1996. Poznan, Poland, Proceedings. 51-58.

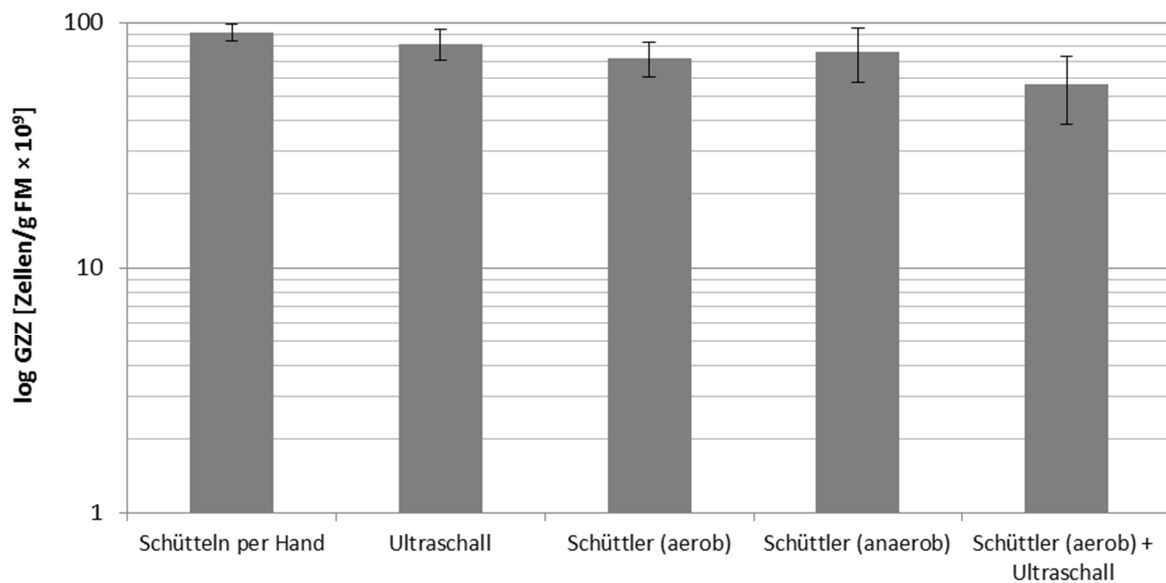
- Schwab, B. S., Ritchie, C. J., Kain, D. J., Dobrin, G. C., King, L. W. und Palmisano, A. C. (1994) Characterization of compost from a pilot plant-scale composter utilizing simulated solid waste. *Waste Management and Research*. Vol. 12 (4): 289-303.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T. und Uchiyama, H. (2001) A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters*. Vol. 23 (15): 1205-1208.
- Senoo, K. und Wada, H. (1989) Isolation and identification of an aerobic γ -HCH-decomposing bacterium from soil. *Soil Science and Plant Nutrition*. Vol. 35 (1): 79-87.
- Sharma, P., Raina, V., Kumari, R., Malhotra, S., Dogra, C., Kumari, H., Kohler, H.-P. E., Buser, H.-R., Holliger, C. und Lal, R. (2006) Haloalkane dehalogenase LinB is responsible for β - and δ -hexachlorocyclohexane transformation in *Sphingobium indicum* B90A. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 72 (9): 5720-5727.
- Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S. und Myers, R. M. (1989) Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 86 (1): 232-236.
- Shum, A. C. und Markovetz, A. J. (1974) Purification and properties of undecyl acetate esterase from *Pseudomonas cepacia* grown on 2-tridecanone. *Journal of Bacteriology*. Vol. 118 (3): 880-889.
- Sieber, M. (2012) Grundlegende Untersuchungen zu einem neuentwickelten zweistufigen Trocken-Nass-Vergärungsverfahren. Dissertation, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, Cottbus.
- Silva, A. J., Domingues, M. R., Hirasawa, J. S., Varesche, M. B., Foresti, E. und Zaiat, M. (2011) Kinetic modeling and microbial assessment by fluorescent *in situ* hybridization in anaerobic sequencing batch biofilm reactors treating sulfate-rich wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Vol. 28: 209-219.
- Sindhu, R., Suprabha, G. N. und Shashidhar, S. (2011) Purification and characterization of α -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) and its application in detergent industry. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering*. Vol. 1 (1): 25-32.
- Singh, A. K., Chaudhary, P., Macwan, A. S., Diwedi, U. N. und Kumar, A. (2007) Selective loss of *lin* genes from hexachlorocyclohexane-degrading *Pseudomonas aeruginosa* ITRC-5 under different growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 76 (4): 895-901.
- Slana, I., Pribylova, R., Kralova, A. und Pavlik, I. (2011) Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a farm-scale biogas plant supplied with manure from paratuberculosis-affected dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 77 (9): 3115-3119.
- Soto, M., Méndez, R. und Lema, J. M. (1993) Sodium inhibition and sulphate reduction in the anaerobic treatment of mussel processing wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 58 (1): 1-7.
- Souidi, K. (2008) Mikrobielle Diversität in Biogasreaktoren. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin.
- Sousa, D. Z., Pereira, M. A., Smidt, H., Stams, A. J. M. und Alves, M. M. (2007) Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 60 (2): 252-265.
- Souto, T., Aquino, S., Silva, S. und Chernicharo, C. (2010) Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. *Biodegradation*. Vol. 21 (3): 411-424.
- Soutschek, E., Winter, J., Schindler, F. und Kandler, O. (1984) *Acetomicrobium flavidum*, gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic bacterium from sewage sludge, forming acetate, CO₂ and H₂ from Glucose. *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 5 (3): 377-390.
- Speece, R. E. (1996) *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press. Nashville, Tennessee.
- Spiekers, H., Lindermayer, H., Moosmeyer, M., Obermaier, A., Preißinger, W., Rauch, P., Richter, W., Rutzmoser, K., Spann, B. und Steinberger, S. (2006) Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft - Jahresbericht 2005. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft. Freising.
- Sri Bala Kameswari, K., Kalyanaraman, C., Porselvam, S. und Thanasekaran, K. (2011) Enhancement of biogas generation by addition of lipase in the co-digestion of tannery solid wastes. *CLEAN—Soil, Air, Water*. Vol. 39 (8): 781-786.
- Stafslin, D. K. und Cleary, P. P. (2000) Characterization of the streptococcal C5a peptidase using a C5a-green fluorescent protein fusion protein substrate. *Journal of Bacteriology*. Vol. 182 (11): 3254-3258.
- Stahl, D. A. und Amann, R. I. (1991) Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. in "Nucleic acid techniques in bacterial systematics". Stackebrandt, E. und Goodfellow, M., John Wiley & Sons Ltd., Chichester. 205-248.
- Stamatelatos, K., Lyberatos, G., Tsiligiannis, C., Pavlou, S., Pullammanappallil, P. und Svoronos, S. A. (1997) Optimal and suboptimal control of anaerobic digesters. *Environmental Modeling and Assessment*. Vol. 2 (4): 355-363.

- Steinbrenner, C. (2011) Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung von Biofilmen des WSB®-Verfahrens im Vergleich zum Belebungsverfahren unter besonderer Berücksichtigung der Nitrifikation. Dissertation, Technische Universität Dresden, Dresden.
- Stober, I. und Bucher, K. (2012) Geothermie. Springer Verlag. Berlin - Heidelberg.
- Stöhr. Die neue Generation - Hel-X. Christian Stöhr GmbH & Co.KG. Marktrodach.
- Stozek, A. und Koppe, P. (1998) Kommunales Abwasser. Seine Inhaltsstoffe nach Herkunft, Zusammensetzung und Reaktionen im Kläranlagenprozess einschließlich Klärschlämme. Vulkan Verlag. Essen. Vol. 4.
- Sträuber, H., Schröder, M. und Kleinstaub, S. (2012) Metabolic and microbial community dynamics during the hydrolytic and acidogenic fermentation in a leach-bed process. *Energy, Sustainability and Society*. Vol. 2 (1): 1-10.
- Supaphol, S., Jenkins, S. N., Intomo, P., Waite, I. S. und O'Donnell, A. G. (2011) Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Bioresource Technology*. Vol. 102 (5): 4021-4027.
- Süßmuth, R. (1999) Mikrobiologisch-biochemisches Praktikum. Thieme Verlag. Stuttgart.
- Süßmuth, R., Doser, C. und Lueders, T. (2000) Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe unter anaeroben Bedingungen mit dem Meßsystem OxiTop Control. "Applikationsbericht zur Analytik - WTW-Bericht 0600412". Hohenheim.
- Suzuki, M. T. und Giovannoni, S. J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62 (2): 625-630.
- Swanson, A. A. und Truesdale, A. W. (1974) Some enzymic properties of human lens esterase I. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. Vol. 13 (6): 466-468.
- Swisher, A. R. und Carroll, C. (1980) Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microbiology and Ecology*. Vol. 6: 217-226.
- Tamura, K. und Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 10 (3): 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. und Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 28 (10): 2731-2739.
- Teglia, C., Tremier, A. und Martel, J. L. (2011) Characterization of solid digestates: Part 1, review of existing indicators to assess solid digestates agricultural use. *Waste and Biomass Valorization*. Vol. 2 (1): 43-58.
- Thauer, R. K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W. und Hedderich, R. (2008) Methanogenic Archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 6 (8): 579-591.
- Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Czyzek, M. und Michel, G. (2011) Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 2 (93): 1-16.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994) CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. Vol. 22 (22): 4673-4680.
- Tóth, M., Kukor, Z. und Sahin-Tóth, M. (1998) Differential response of basal and tetrahydrobiopterin-stimulated activities of placental type III nitric oxide synthase to sodium dodecyl sulphate: Relation to dimeric structure. *Molecular Human Reproduction*. Vol. 4 (12): 1165-1172.
- UBA (2010) Fische aus Mulde und Elbe kaum noch mit Lindan und seinen Nebenprodukten belastet. "Hintergrundpapier". Umweltbundesamt Fachgebiet II 1.2 Dessau-Roßlau.
- Valarini, P. J., Díaz Alvarez, M. C., GascóII, J. M., GuerreroII, F. und TokeshiII, H. (2003) Assessment of soil properties by organic matter and EM-microorganism incorporation. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Vol. 27 (3): 519-526.
- VDI (2006) Vergärung organischer Stoffe - Substratcharakterisierung, Probenahme, Gärversuche. in "VDI Richtlinie 4630". Verein deutscher Ingenieure 2006.
- Verrier, D., Roy, F. und Albagnac, G. (1987) Two-phase methanization of solid vegetable wastes. *Biological Wastes*. Vol. 22 (3): 163-177.
- Villela Filho, M., Schaarschmidt, I., Wahl, B., Rother, E., Zimmermann, H. und Karau, A. (2008) Process for the production of biogas and further fermentation products from a hydrolysate. in Evonik Degussa GmbH. EP20080102622.
- Voget, S. (2006) Metagenomanalyse eines hydrolytischen Konsortiums: Identifizierung und biochemische Charakterisierung von Polysaccharid-abbauenden Biokatalysatoren aus nicht kultivierten Mikroorganismen. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen.
- Vollmer, C.-R. (2000) Erfahrungen mit anaeroben Anlagen. *Brandenburgische Umwelt Berichte*. Vol. 6: 207-213.

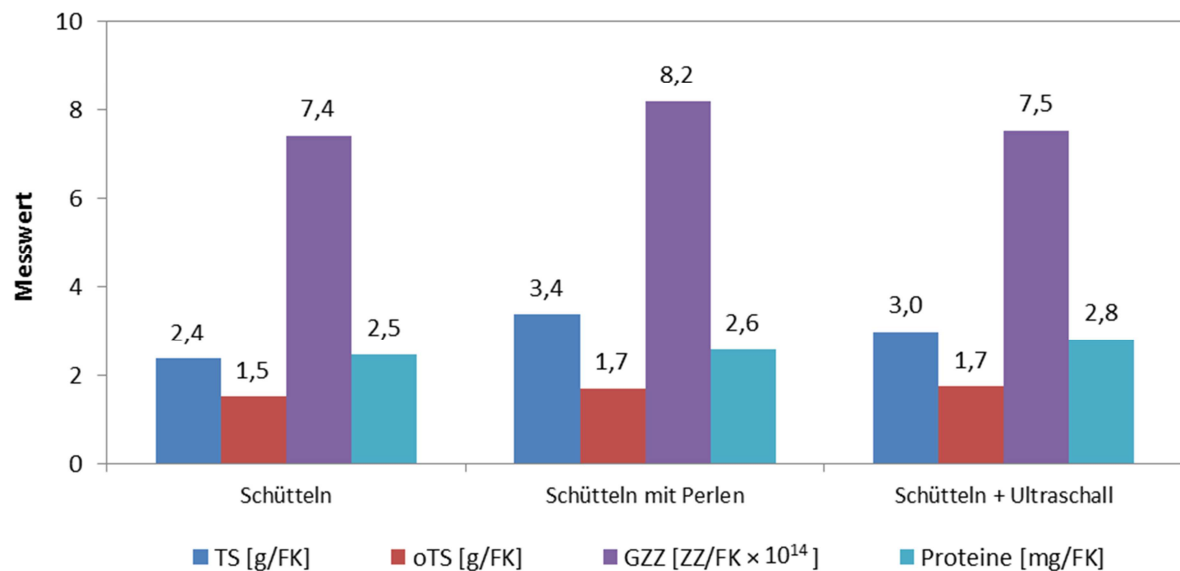
- Wang, H., Vuorela, M., Keränen, A.-L., Lehtinen, T. M., Lensu, A., Lehtomäki, A. und Rintala, J. (2010) Development of microbial populations in the anaerobic hydrolysis of grass silage for methane production. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 72 (3): 496-506.
- Wang, Z., Yan, J., Fu, Y., Tang, X., Feng, S., He, X. und Bai, D. (2008) Pharmacodynamic study of FS-0311: A novel highly potent, selective acetylcholinesterase inhibitor. *Cellular and Molecular Neurobiology*. Vol. 28 (2): 245-261.
- Wanner, O. und Gujer, W. (1985) Competition in biofilms. *Water Science and Technology*. Vol. 17 (2-3): 27-44.
- Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J. und Jones, D. L. (2008) Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*. Vol. 99 (17): 7928-7940.
- Wäsche, S. (2003) Einfluss der Wachstumsbedingungen auf Stoffübergang und Struktur von Biofilmsystemen. FIT-Verl. für Innovation u. Technologietransfer.
- Wayne, L. G. (1994) Actions of the Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology on requests for opinions published between January 1985 and July 1993. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 44 (1): 177-178.
- Weber, S. (2000) Entwicklung mikrobieller Lebensgemeinschaften beim methanogenen Abbau von Reisstroh im Boden. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg / Lahn.
- Weiland, P. (2001) Grundlagen der Methangärung - Biologie und Substrate. in "Biogas als regenerative Energie- Stand und Perspektiven: Tagung Hannover, 19. Und 20. Juni 2001 - VDI-Bericht 1620". Gesellschaft Energietechnik. VDI-Verlag, Düsseldorf.
- Weiland, P. (2004) Biogas : eine neue Einkommensquelle für die Landwirtschaft. Forschungsreport Verbraucherschutz, Ernährung, Landwirtschaft. Heft 1: 16-19.
- Weiland, P. (2008) Wichtige Messdaten für den Prozessablauf und Stand der Technik in der Praxis. "Gülzower Fachgespräche - Messen, Steuern, Regeln bei der Biogaserzeugung". Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR). Hannover. Band 27.
- Weiland, P. (2010) Biogas production: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 85 (4): 849-860.
- Weise, A. (2010) Eine wirtschaftliche und verfahrenstechnische Betrachtung mehrstufiger Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung von Abfallsubstraten. Diplomarbeit, Fachhochschule Jena - Grin Verlag, Norderstedt.
- Weiß, D. und Brückner, C. (2008) Aufarbeitung landwirtschaftlicher Biomasse für den Vergärungsprozess "Biomasseaufbereitung zur Vergärung - Schriftenreihe der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft". Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft. Heft 19/2008.
- Weißbach, F. (2009) Das Gasbildungspotential von Halm- und Körnerfrüchten bei der Biogasgewinnung. *Landtechnik*. Vol. 64 (5): 317-321.
- Welte, C. und Deppenmeier, U. (2011) Re-evaluation of the function of the F₄₂₀ dehydrogenase in electron transport of *Methanosarcina mazei*. *FEBS Journal*. Vol. 278 (8): 1277-1287.
- Wenzel, W. (2002) Mikrobiologische Charakterisierung eines Anaerobreaktors zur Behandlung von Rübenmelasseschlempe. Dissertation, Technischen Universität Berlin, Berlin.
- Westerholm, M., Roos, S. und Schnürer, A. (2010) *Syntrophacetivus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 309 (1): 100-104.
- Whitman, W. B., Bowen, T. L. und Boone, D. R. (2006) The methanogenic Bacteria. in "The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes". Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. und Dworkin, M. Springer Verlag, New York.
- Whitman, W. B. und Jeanthon, C. (2006) Methanococcales. in "The Prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes". Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. und Dworkin, M. Springer Verlag, New York.
- Wiese, J. und König, R. (2007) Prozessbegleitende Fermenterüberwachung auf Biogasanlagen. "Praxisbericht - Laboranalytik und Prozess-Messtechnik - Biogas - Anlagenüberwachung". HACH LANGE GmbH.
- Wilbur, S. (2008) Gaschromatographie-Massenspektrometrie - Kopplungsmethode hilft bei der Biogasanalyse. zuletzt abgerufen am 14.08.2012, siehe: <http://www.laborpraxis.vogel.de/analytik/elementanalytik/icp/articles/123869/>.
- de Wit, L. E. A. und Eker, A. P. M. (1987) 8-Hydroxy-5-deazaflavin-dependent electron transfer in the extreme halophile *Halobacterium cutirubrum*. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 48 (1-2): 121-125.
- Witzig, M. (2009) Molekularbiologische Untersuchungen zum Einfluss der Grobfutterquelle und Futterpartikelgröße auf die ruminale Mikroorganismengemeinschaft *in vitro*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale.
- WTW (1996) BSB-Fibel: Grundlagen und Tips zur BSB-Messung. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten Weilheim (WTW). Oberbayern.

- Wu, J., Hong, Q., Han, P., He, J. und Li, S. (2007) A gene *linB2* responsible for the conversion of β -HCH and 2,3,4,5,6-pentachlorocyclohexanol in *Sphingomonas* sp. BHC-A. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 73 (5): 1097-1105.
- Xie, B., Liu, H. und Yan, Y. (2009) Improvement of the activity of anaerobic sludge by low-intensity ultrasound. *Journal of Environmental Management*. Vol. 90 (1): 260-264.
- Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T. R., Kohli, S. und Rana, V. (2004) Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques - A review. *Bioresource Technology*. Vol. 95 (1): 1-10.
- Yang, S.-T. und Okos, M. R. (1987) Kinetic study and mathematical modeling of methanogenesis of acetate using pure cultures of methanogens. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 30 (5): 661-667.
- Yenigün, O. und Demirel, B. (2013) Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochemistry*. Vol. 48 (5-6): 901-911.
- Yerkes, D. W., Boonyakitsombut, S. und Speece, R. E. (1997) Antagonism of sodium toxicity by the compatible solute betaine in anaerobic methanogenic systems. *Water Science and Technology*. Vol. 36 (6): 15-24.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. und Hwang, S. (2005) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 89 (6): 670-679.
- Zandvoort, M. H., Van Hullebusch, E. D., Feroso, F. G. und Lens, P. N. L. (2006) Trace metals in anaerobic granular sludge reactors: Bioavailability and dosing strategies. *Engineering in Life Sciences*. Vol. 6 (3): 293-301.
- Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y. und Nakamura, K. (2003) *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 53 (4): 1155-1163.
- Zheng, D. und Raskin, L. (2000) Quantification of *Methanosaeta* species in anaerobic bioreactors using genus- and species-specific hybridization probes. *Microbial Ecology*. Vol. 39 (3): 246-262.
- Zhu, J., Zheng, H., Ai, G., Zhang, G., Liu, D., Liu, X. und Dong, X. (2012) The genome characteristics and predicted function of methyl-group oxidation pathway in the obligate acetoclastic methanogens, *Methanosaeta* spp. *PLoS ONE*. Vol. 7 (5): e36756.
- Zielonka, S., Lemmer, A., Oechsner, H. und Jungbluth, T. (2009) Vergärung von Grassilage in einer zweiphasigen Prozessführung. *Bornimer Agrartechnische Berichte*. Heft 68: 140-152.
- Ziemiński, K. und Fraç, M. (2012) Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 11 (18): 4127-4139.
- Zimmermann, D. (2008) Untersuchungen zur Sanierbarkeit HCH-kontaminierter Ackerböden. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.
- Zipper, H., Buta, C., Lämmle, K., Brunner, H., Bernhagen, J. und Vitzthum, F. (2003) Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. *Nucleic Acids Research*. Vol. 31 (7): e39.

ANHANG

**A-1: Evaluierung einer geeigneten Methode zum Ablösen der Biomasse vom Substrat**

Vergleich der Methoden: eine Minute kräftiges Schütteln per Hand, einminütige Ultraschallbehandlung, zweistündige Inkubation auf einem Schüttler aerob sowie anaerob, zweistündige Inkubation auf einem Schüttler (aerob) und nachfolgende Ultraschallbehandlung, Bestimmung der mikrobiellen Gesamtzellzahl (GZZ), Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

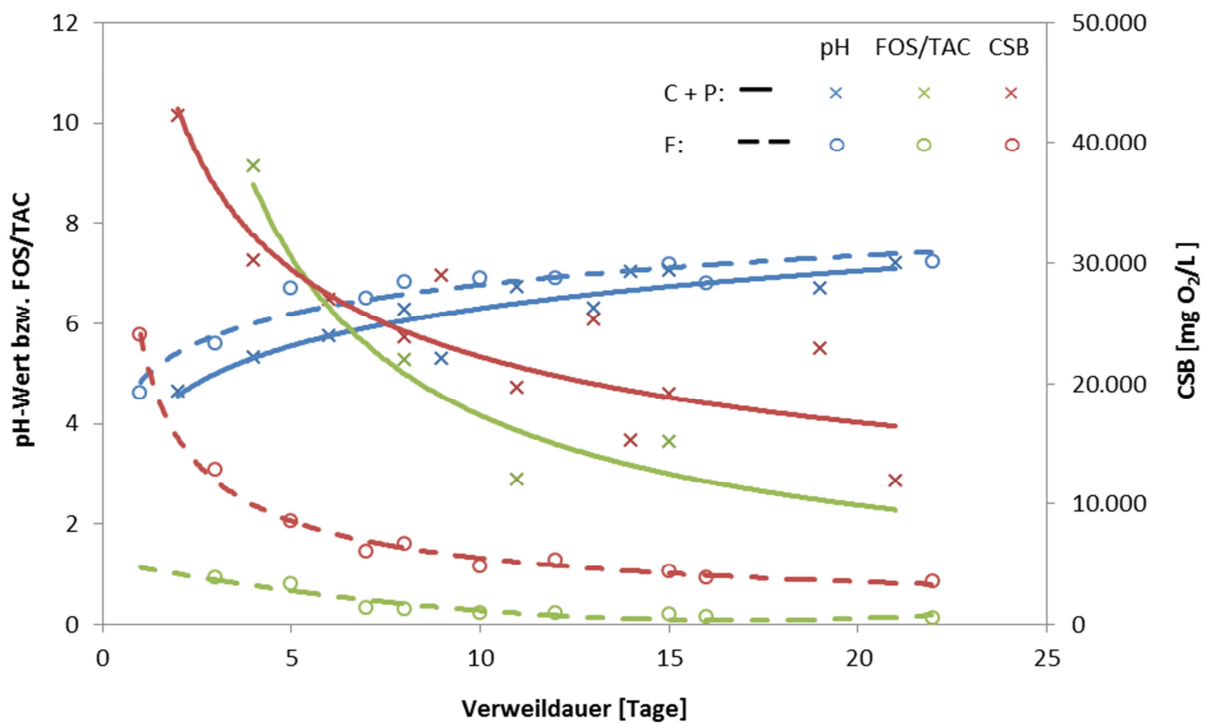
**A-2: Evaluierung einer geeigneten Methode zum Ablösen des Biofilms von den Füllkörpern**

Vergleich der Methoden: zweiminütiges Schütteln per Hand, zweiminütiges Schütteln per Hand mit 40 g Glasperlen und zweiminütiges Schütteln per Hand mit nachfolgender Ultraschallbehandlung, Messwerte der Trockensubstanz (TS), organischer Trockensubstanz (oTS), Gesamtzellzahl (GZZ) und des Proteingehaltes

A-3: Primersysteme und Programmierung des Cyclers für DGGE und Sequenzierung

Primersystem	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
27f/1492r	Initiale Denaturierung	95	2:00	35
	Denaturierung	95	0:30	
	Annealing	66	0:45	
	Elongation	72	1:30	
	Finale Elongation	72	10:00	
357f/518r	Initiale Denaturierung	95	5:00	20
	Denaturierung	95	1:00	
	Annealing	65–55*	1:00	
	Elongation	72	1:00	
	Denaturierung	95	1:00	5
	Annealing	55	1:00	
	Elongation	72	1:00	
Finale Elongation	72	10:00		
Ar109f/Ar915r	Initiale Denaturierung	95	5:00	25
	Denaturierung	95	1:00	
	Annealing	55	0:30	
	Elongation	72	1:00	
	Finale Elongation	72	10:00	
Parch519f/Ar915r	Initiale Denaturierung	95	5:00	17
	Denaturierung	95	0:30	
	Annealing	57	0:40	
	Elongation	72	0:40	
	Finale Elongation	72	10:00	
Msm355f/Msm1068r	Initiale Denaturierung	95	5:00	34
	Denaturierung	95	1:00	
	Annealing	52	1:00	
	Elongation	72	1:00	
	Finale Elongation	72	10:00	

* Touchdown-PCR um je 0,5 °C

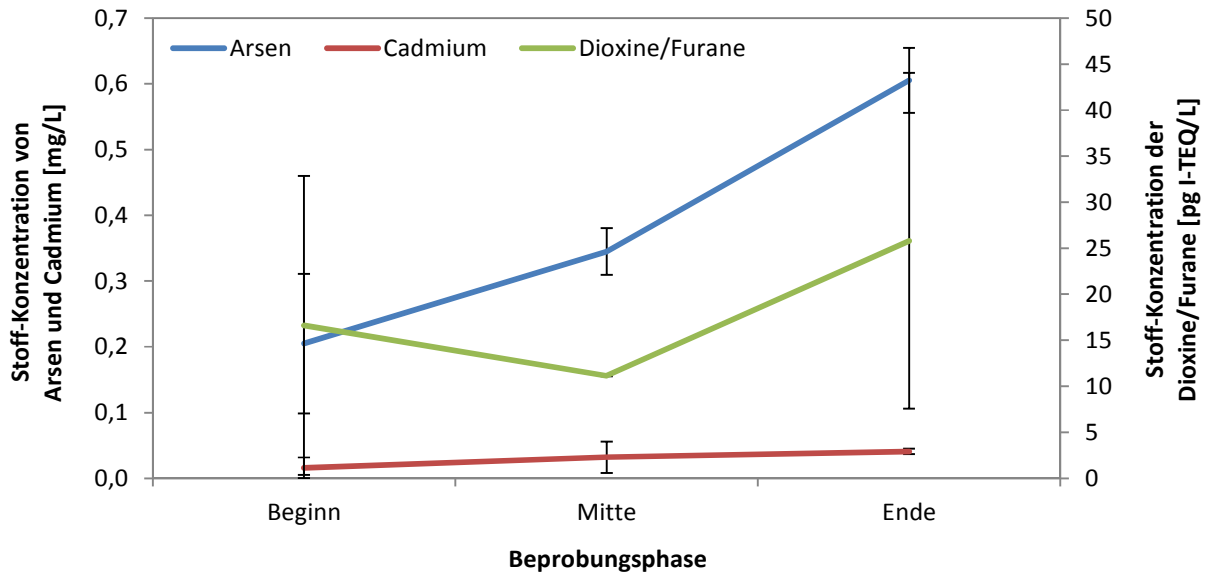


A-4: Chemische Analyse der Hydrolyse im Normalbetrieb

pH-Wert, FOS/TAC und CSB über die Dauer der Hydrolyse, analysierte Proben: Referenz-Perkolatorablaufproben der Beprobungsphasen C1 (C = Containeranlage, n = 6), F1-5 (F = Fasanlage, n = 27) und P (= Pilotanlage, n = 5)

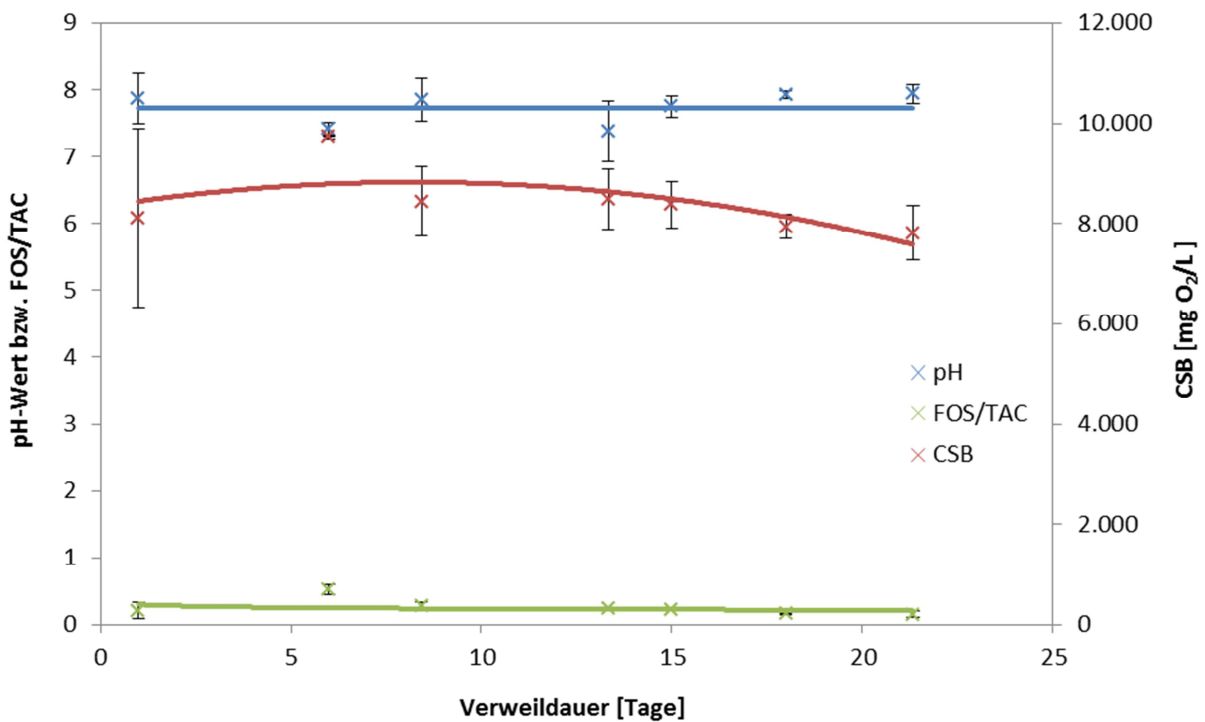
A-5: Prüf- und Grenzwerte für die analysierten Schadstoffe der Grassilage

Schadstoff	Grenzwert	Referenz
HCH-Isomerenmische	0,2–2 mg/kg TS (Nutzungs- und schutzgutbezogene Bodenprüfwerte)	(Rippen 1984)
Dioxine/Furane	30 ng I-TEQ/kg TS	
Arsen	40 mg/kg TS	(DüMV 2012)
Cadmium	1,5 mg/kg TS	



A-6: Stoffliche Analyse des Prozesswassers

Durchschnittliche Messwerte verschiedener Stoff-Konzentrationen des Prozesswassers (Speicher 1 und 2) aus Charge 2 der Beprobungsphase C5. Untersuchte Stoffe: Arsen (n = 6), Cadmium (n = 6) und Dioxine/Furane (n = 6). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.



A-7: Chemische Analyse der Hydrolyse bei der Vergärung von HCH-belasteter Grassilage

Durchschnittlicher pH-Wert, FOS/TAC und CSB über die Dauer der Hydrolyse von Proben der 2. Charge der Beprobungsphase C5, analysierte Proben: Perkolatorablaufproben (n = 34). Die Standardabweichung ist mittels vertikaler Fehlerbalken aufgetragen.

A-8: Übersicht β -HCH-abbauender Mikroorganismen

		Mikroorganismen	Referenz	
aerober Abbauweg	α -Proteobacteria	<i>Sphingobium indicum</i> B90A (ex- <i>Pseudomonas</i> sp.)	(Sahu <i>et al.</i> 1990, Sahu <i>et al.</i> 1995)	
		<i>Sphingobium indicum</i> B90 (ex- <i>Sphingomonas paucimobilis</i>)	(Adhya <i>et al.</i> 1996)	
		<i>Sphingobium japonicum</i> UT26 (ex- <i>Sphingomonas paucimobilis</i>)	(Senoo & Wada 1989, Nagasawa <i>et al.</i> 1993)	
		<i>Sphingobium</i> sp. MI1205	(Ito <i>et al.</i> 2007)	
		<i>Sphingobium</i> sp. BHC-A	(Wu <i>et al.</i> 2007)	
		<i>Sphingobium francense</i> Sp+ (ex- <i>Sphingomonas paucimobilis</i>)	(Sharma <i>et al.</i> 2006)	
		<i>Sphingomonas</i> sp. NM05	(Manickam <i>et al.</i> 2008)	
		<i>Sphingomonas</i> sp. DS2		
		<i>Sphingomonas</i> sp. DS2-2		
		<i>Sphingomonas</i> sp. DS3-1	(Böltner <i>et al.</i> 2005)	
		<i>Sphingomonas</i> sp. α 4-2		
		<i>Sphingomonas</i> sp. γ 1-7		
		<i>Sphingobium</i> sp. UM1		
		<i>Sphingomonas</i> sp. UM2		
		<i>Sphingobium</i> sp. RL-3		
		<i>Sphingobium</i> sp. F2	(Dadhwal <i>et al.</i> 2009)	
		<i>Sphingobium</i> sp. IP26		
		<i>Sphingobium</i> sp. HDIP04		
		<i>Sphingobium</i> sp. HDU05		
	γ -Proteobacteria	<i>Xanthomonas</i> sp. ICH12	(Manickam <i>et al.</i> 2007)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ITTC-5		(Kumar <i>et al.</i> 2005, Singh <i>et al.</i> 2007)		
Actinobacteria	<i>Microbacterium</i> sp. ITTC1	(Manickam <i>et al.</i> 2006)		
	<i>Arthrobacter fluorescens</i> <i>Arthrobacter giacomelloi</i>	(de Paolis <i>et al.</i> 2013)		
Bacilli	<i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus circulans</i>	(Gupta <i>et al.</i> 2000)		
	Konsortium aus <i>Pseudomonas putida</i> CFR1021, <i>P. fluorescens</i> CFR1022, <i>P. aeruginosa</i> CFR1023, <i>P. aeruginosa</i> CFR1024, <i>P. stutzeri</i> CFR1027, <i>Burkholderia cepacia</i> CFR1025, <i>B. cepacia</i> CFR1026, <i>Vibrio alginolyticus</i> CFR1028, <i>Acinetobacter lwoffii</i> CFR1029 und <i>Fusarium</i> sp. CFR225	(Elcey & Kunhi 2009)		
anaerober Abbauweg	Clostridia	Konsortium aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar, <i>P. fluorescens</i> biovar I, <i>P. fluorescens</i> biovar II, <i>P. diminuta</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>Burkholderia pseudomallai</i> , <i>Flavobacterium</i> sp. und <i>Vibrio alginolyticus</i>	(Murthy & Manonmani 2007)	
		γ -Proteobacteria	<i>Citrobacter freundii</i>	
		<i>Clostridium butyricum</i>	(Jagnow <i>et al.</i> 1977)	
		<i>Clostridium pasteurianum</i>		
		<i>Clostridium sphenoides</i> UQM780	(MacRae <i>et al.</i> 1969)	
	<i>Dehalobacter</i> sp. (in Kokultur mit <i>Sedimentibacter</i> sp.)	(van Doesburg <i>et al.</i> 2005)		

A-9: Mineralstoff-Analyse der Proben aus Beprobungsphase C4

Probe		Calcium	Kalium	Magnesium	gesamt Phosphor	gesamt Schwefel	Kjeldahl-Stickstoff
		[g/L] / [g/kg TS]					
2R20	oben	0,28 / 23,5	0,03 / 2,8	0,04 / 3,2	0,11 / 9,5	0,12 / 10,0	0,03 / 2,8
	Mitte	0,28 / 24,7	0,03 / 2,9	0,05 / 4,1	0,12 / 10,2	0,16 / 13,8	0,03 / 3,0
	unten	0,19 / 18,0	0,03 / 2,5	0,04 / 3,8	0,09 / 8,3	0,12 / 11,1	0,03 / 2,9
	Schlamm	21,5 / 64,4	1,9 / 5,8	6,3 / 19,1	8,8 / 26,3	13,4 / 40,1	4,1 / 12,2
2R19	Mitte	0,31 / 22,7	0,05 / 3,3	0,08 / 5,7	0,14 / 10,0	0,2 / 14,5	0,01 / 0,9
	Schlamm	18,0 / 53,4	2,1 / 6,3	6,8 / 20,1	8,8 / 26,0	14,7 / 43,6	3,6 / 10,6

A-10: Taxonomische Einordnung der sequenzierten DGGE-Banden

DGGE-Bande	Länge [bp]	Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung
1a	344	Euryarchaeota (100%)	Methanobacteria (100%)	Methanobacteriales (100%)	Methanobacteriaceae (100%)	<i>Methanobacterium</i> (100%)
1b	309	Euryarchaeota (100%)	Methanobacteria (100%)	Methanobacteriales (100%)	Methanobacteriaceae (100%)	<i>Methanobacterium</i> (96%)
2a	339	Euryarchaeota (100%)	Methanobacteria (100%)	Methanobacteriales (100%)	Methanobacteriaceae (100%)	<i>Methanobacterium</i> (45%)
3a	332	Crenarchaeota (94%)	Thermoprotei (94%)	Acidilobales (58%)	Caldisphaeraceae (58%)	<i>Caldisphaera</i> (58%)
3b	342	Crenarchaeota (92%)	Thermoprotei (92%)	Acidilobales (48%)	Caldisphaeraceae (48%)	<i>Caldisphaera</i> (48%)
4a	310	Euryarchaeota (100%)	Methanobacteria (100%)	Methanobacteriales (100%)	Methanobacteriaceae (100%)	<i>Methanobacterium</i> (97%)
4b	259	Euryarchaeota (100%)	Methanobacteria (100%)	Methanobacteriales (100%)	Methanobacteriaceae (100%)	<i>Methanobacterium</i> (93%)
5a	341	Crenarchaeota (97%)	Thermoprotei (97%)	Acidilobales (66%)	Caldisphaeraceae (66%)	<i>Caldisphaera</i> (66%)
5b	216	Crenarchaeota (98%)	Thermoprotei (98%)	Acidilobales (66%)	Caldisphaeraceae (66%)	<i>Caldisphaera</i> (66%)
6a	326	Crenarchaeota (90%)	Thermoprotei (90%)	Acidilobales (38%)	Caldisphaeraceae (38%)	<i>Caldisphaera</i> (38%)
6b	343	Crenarchaeota (89%)	Thermoprotei (89%)	Acidilobales (31%)	Caldisphaeraceae (31%)	<i>Caldisphaera</i> (31%)

DGGE-Bande	Länge [bp]	Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung	
Methanosarcinales und Methanomicrobiales (MSM)	1a	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanosarcinales (100%)	Methanosaeetaceae (100%)	<i>Methanosaeta</i> (100%)	
	1b	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanosarcinales (100%)	Methanosaeetaceae (100%)	<i>Methanosaeta</i> (100%)	
	2a	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanosarcinales (100%)	Methanosarcinaceae (100%)	<i>Methanosarcina</i> (100%)	
	2b	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanosarcinales (100%)	Methanosarcinaceae (100%)	<i>Methanosarcina</i> (100%)	
	3a	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanosarcinales (100%)	Methanosaeetaceae (100%)	<i>Methanosaeta</i> (100%)	
	3b	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanosarcinales (100%)	Methanosaeetaceae (100%)	<i>Methanosaeta</i> (100%)	
	4a	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanomicrobiales (100%)	Methanomicrobiales incertae sedis (69%)	<i>Methanolinea</i> (42%)	
	4b	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanomicrobiales (100%)	Methanomicrobiales incertae sedis (69%)	<i>Methanolinea</i> (47%)	
	5a	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanosarcinales (100%)	Methanosaeetaceae (100%)	<i>Methanosaeta</i> (100%)	
	5b	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanosarcinales (100%)	Methanosaeetaceae (100%)	<i>Methanosaeta</i> (100%)	
	6a	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanomicrobiales (100%)	Methanospirillaceae (100%)	<i>Methanospirillum</i> (100%)	
	6b	Euryarchaeota (100%)	Methanomicrobia (100%)	Methanomicrobiales (100%)	Methanospirillaceae (100%)	<i>Methanospirillum</i> (100%)	
	Bacteria (BAC)	1a	Firmicutes (86%)	Clostridia (69%)	Clostridiales (63%)	Clostridiaceae (58%)	<i>Sarcina</i> (14%)
		2a	Firmicutes (59%)	Clostridia (46%)	Thermoanaerobacterales (10%)	Thermoanaerobacteraceae (10%)	<i>Syntrophaceticus</i> (10%)
2b		Firmicutes (89%)	Bacilli (49%)	Bacillales (49%)	Thermoactinomycetaceae (42%)	<i>Thermo- flavimicrobium</i> (30%)	
3a		Proteobacteria (100%)	Delta-proteobacteria (100%)	Syntrophobacterales (100%)	Syntrophobacteraceae (100%)	<i>Syntrophobacter</i> (99%)	
3b		Proteobacteria (96%)	Delta-proteobacteria (95%)	Syntrophobacterales (95%)	Syntrophobacteraceae (95%)	<i>Syntrophobacter</i> (89%)	

DGGE-Bande	Länge [bp]	Phylum	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung
4a	108	Synergistetes (100%)	Synergistia (100%)	Synergistales (100%)	Synergistaceae (100%)	<i>Anaerobaculum</i> (100%)
4b	108	Firmicutes (47%)	Clostridia (43%)	Clostridiales (27%)	Ruminococcaceae (15%)	<i>Acetanaerobacterium</i> (10%)
5a	127	Planctomycetes (27%)	Planctomycetacia (21%)	Planctomycetales (21%)	Planctomycetaceae (21%)	<i>Schlesneria</i> (8%)
5b	132	Proteobacteria (45%)	Delta-proteobacteria (38%)	Desulfurellales (24%)	Desulfurellaceae (24%)	<i>Hippea</i> (24%)
6a	107	Actinobacteria (36%)	Actinobacteria (36%)	Actinomycetales (25%)	Pseudonocardiaceae (13%)	<i>Goodfellowiella</i> (5%)
6b	125	Gemmatimonadetes (78%)	Gemmatimonadetes (78%)	Gemmatimonadales (78%)	Gemmatimonadaceae (78%)	<i>Gemmatimonas</i> (78%)
7a	104	Firmicutes (98%)	Clostridia (97%)	Clostridiales (97%)	Peptococcaceae (91%)	<i>Pelotomaculum</i> (91%)
7b	109	Firmicutes (89%)	Clostridia (86%)	Clostridiales (65%)	Peptococcaceae (48%)	<i>Pelotomaculum</i> (48%)
8a	109	Firmicutes (100%)	Clostridia (100%)	Thermoanaerobacterales (100%)	Thermoanaerobacteraceae (100%)	<i>Syntrophaceticus</i> (100%)
8b	109	Firmicutes (100%)	Clostridia (100%)	Thermoanaerobacterales (100%)	Thermoanaerobacteraceae (100%)	<i>Syntrophaceticus</i> (100%)
9a	132	Firmicutes (86%)	Clostridia (81%)	Clostridiales (81%)	Clostridiaceae (56%)	<i>Anaerobacter</i> (25%)
10a	107	Proteobacteria (15%)	Delta-proteobacteria (15%)	Desulfovibrionales (10%)	Desulfohalobiaceae (8%)	<i>Desulfovermiculus</i> (5%)
10b	109	Actinobacteria (8%)	Actinobacteria (8%)	Actinomycetales (8%)	--	--
11a	110	Firmicutes (99%)	Clostridia (99%)	Clostridiales (92%)	Peptococcaceae (88%)	<i>Pelotomaculum</i> (86%)
11b	109	Firmicutes (98%)	Clostridia (95%)	Clostridiales (85%)	Peptococcaceae (78%)	<i>Pelotomaculum</i> (77%)
12a	110	Firmicutes (58%)	Clostridia (50%)	Clostridiales (37%)	Clostridiaceae (9%)	<i>Thermobrachium</i> (4%)
13a	108	Proteobacteria (9%)	Delta-proteobacteria (8%)	Desulfurellales (6%)	Desulfurellaceae (6%)	<i>Hippea</i> (5%)

Berechnung mit einem Konfidenz-Schwellenwert von 80% mittels RDP Classifier nach Cole und Kollegen (2009), in Klammern steht die prozentuale Angabe der Konfidenz; grau hinterlegt: in weiteren Analysen nicht berücksichtigte Sequenzen, da Konfidenz zu niedrig

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen und mich während der Promotionszeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Röske, die mir die Gelegenheit gab, diese Arbeit am Institut für Mikrobiologie durchzuführen. Ihre fachliche Kompetenz und stetige Förderung sowie ihr persönliches Engagement haben diese Arbeit ermöglicht.

Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Bley für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Auch möchte ich Frau Dr. Hildebrandt, Herrn Dr. Richter und Herrn Rebbe der GICON-Firmengruppe für die ertragreiche Kooperation danken. Die fachliche und tatkräftige Unterstützung sowie anregenden Diskussionen haben entscheidend zu den Erkenntnissen dieser Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt außerdem den Laborkräften sowie den Mitarbeitern am Großtechnikum in Cottbus für die Durchführung zahlreicher Vergärungsversuche sowie Analytik. Zudem danke ich der GICON-Firmengruppe für die finanzielle Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Angewandte Mikrobiologie der Technischen Universität Dresden. Das einzigartig angenehme Arbeitsklima mit stets anregendem Gedankenaustausch und größter Hilfsbereitschaft machte vieles erst möglich und brachte dazu viel Freude in den Arbeitsalltag. Insbesondere möchte ich mich für die produktive Hilfe von Kerstin, Chris, Sandro, Frank, Axel, Hanna sowie Frau Totrova bedanken. Nicht vergessen möchte ich Jenny und Franziska, die im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten wesentliche Untersuchungen für diese Arbeit durchgeführt haben.

Nicht zuletzt gilt großer Dank meiner Familie für die aufgebrachte Geduld und moralische Unterstützung. Besonders danke ich auch meinem Papa für das Korrekturlesen. Ganz lieben Dank auch an meinen Freund Björn. Ohne ihn hätte ich wohl nie den Mut für das Biologiestudium aufgebracht. Er hat meine Studien stets sachkritisch gefördert und gab mir liebevollen Rückhalt und die Kraft zum Abschließen meiner Promotion.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Arbeit ist am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Prof. Dr. Isolde Röske angefertigt worden. Die Arbeit wurde in Kooperation der GICON-Firmengruppe gefördert.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der TU Dresden in der Fassung vom 23.02.2011 an.

Carina Gasch