

Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e. V.



Wissenschaftlicher Direktor: Prof. Dr. R. Brunsch

Schlussbericht

zum BMEL/FNR Förderschwerpunkt
„Nachwuchsgruppe zur stofflichen und energetischen Nutzung von Biomasse“
(FKZ: 22026411)

Biogasgewinnung aus stickstoffreichen nachwachsenden Rohstoffen und landwirtschaftlichen Reststoffen

Entwicklung und Optimierung
von verfahrenstechnischen und mikrobiologischen Lösungen
zur Vermeidung von Ammoniak-Hemmung in Biogasreaktoren

Dr. Christine Idler, Mag. Sc. Stefan Sebök, Dipl.-Ing. (FH) Carsten Jost,
Dipl.-Ing. Bertram Schmidt, B. Sc. Nils Pieper

Unter Mitarbeit von
Dr. Niklas Krakat, Dr. Michael Klocke, Dr. Reshma Anjum, M. Sc. Kay Beinersdorf, Dipl.-Biol. Lisa
Rothe, Dipl.-Ing. Donna Ditz, B. sc. Patrick Schröder, B. Sc. Riccardo Dainese, Janik Vandersee

Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam
Abteilung Bioverfahrenstechnik
Komm. Leitung Dr. Christine Idler

Projektzeitraum: 01.04.2012 - 31.05.2017

Gliederung

	Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen	3
I	Ziele	4
I.1	Aufgabenstellung	4
I.1.1	Voraussetzungen zur Durchführung des Vorhabens	5
I.1.2	Planung und Ablauf des Vorhabens	5
I.2	Stand der Technik	6
I.2.1	Ausgangsstoffe für die Biogasproduktion	6
I.2.2	Verfahren der Stickstoffeliminierung	7
I.2.3	Der Rührkesselreaktor (CSTR)	8
I.2.4	Das Leachbedfermentationssystem (LBF)	8
I.2.5	Das Schwimmbettfermentersystem (SBF)	9
I.2.6	Die mikrobiologische Gemeinschaft im Biogasreaktor – Erfassung der Prozessmikrobiologie	10
I.2.7	Mikrobiologische Stickstoffeliminierung – mögliche Anwendung des Anammox-Stoffwechselweges	12
I.2.8	Methoden zur Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften	13
I.2.9	Angaben bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden	18
I.3	Zusammenarbeit mit anderen Stellen	18
II	Ergebnisse	19
II.1	Erzielte Ergebnisse	19
II.1.1	Vergärung stickstoffreicher Substrate im Leachbedfermentationssystem (LBF)	19
II.1.1.1	Verfahren ohne und mit Kopplung eines batchbetriebenen Strippungssystem	19
II.1.1.2	Mikrobiologie der Leachbedfermenter	47
II.1.2	Vergärung stickstoffreicher Substrate im Schwimmbettfermentationssystem (SBF)	59
II.1.2.1	Verfahren zur Vergärung unterschiedlicher Silagen	59
II.1.2.2	Mikrobiologie der Schwimmbettfermenter	68
II.1.3	Vergärung stickstoffreicher Substrate im Rührkesselreaktor(CSTR)	102
II.1.3.1	Verfahren zur Vergärung von Hühnertrockenkot	102
II.1.3.2	Mikrobiologie der Rührkesselreaktoren	114
II.1.4	Stickstoffeliminierung durch anaerobe Ammoniumoxidation (Anammox)	122
II.1.5	Stickstoffeliminierung durch Strippung	140
II.1.6	Stickstoffeliminierung durch MAP Fällung	155
II.1.7	Wirtschaftlichkeitsbetrachtung	159
II.1.8	Übersicht zur Erfüllung der Meilensteine	178
II.2	Verwertung	179
II.3	Erkenntnisse von Dritten	180
II.4	Veröffentlichungen	181
	Literaturverzeichnis	183

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

AF	Anaerobfilter (Festbettreaktor zur Methanisierung)
A/B	System A: thermophil bei 55°C/ System B: hyperthermophil bei 65°C
AFA/AFB	Anaerobfilter im System A/B
Anammox	Anaerobe Ammoniumoxidation
AWT	Aufwuchsträger
CSTR	Continuously Stirred tank Reaktor, Rührkesselreaktor
ESÄ	Essigsäureäquivalent
FM	Frischmasse
GBR	Gasbildungsrate
HTK	Hühnertrockenkot
HR	Hydrolysereaktor
HRA/HRB	Hydrolysereaktor im System A/B
LBF	Leachbedfermenter
MAP	Magnesiumammoniumphosphat ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Struvit)
oTS	organische Trockenmassegehalt [% TS]
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
qPCR	quantitative Realtime PCR
PS	Perkolatspeicher
SBF	Schwimmbettfermenter
SBR	Sequencing Batch Reactor (zur Anammox-Anreicherung)
TRFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
TRF	Terminal Restriction Fragment
TS	Trockenmasse [% FM]

I Ziele

In Biogasreaktoren wird Biomasse durch eine artenreiche und dynamische Gemeinschaft unterschiedlicher Mikroorganismen abgebaut. Aufgrund der komplexen Interaktionen der Mikroorganismen untereinander reagiert die mikrobielle Biozönose äußerst sensitiv auf Verschiebungen im chemischen Gleichgewicht insbesondere auf die Akkumulation einzelner Stoffe. Die Folge ist eine verminderte Reaktorleistung oder Prozessstabilität.

In diesem Projekt wurde die Vergärung solcher Biomassen betrachtet, die aufgrund eines hohen Stickstoffgehalts leicht zur Entstehung und Akkumulation des den Biogasprozess hemmenden Ammoniaks neigen. Beispielhafte Substrate sind proteinreiche Pflanzen wie Gräser und Leguminosen sowie biogene landwirtschaftliche Reststoffe wie Geflügelerde oder Geflügelmist. Ein zentraler Schwerpunkt der Forschung liegt in der Optimierung der Stickstoffeliminierung aus der Prozessflüssigkeit. Hierbei kamen verschiedene Verfahren zur Eliminierung des Stickstoffs zum Einsatz, um einerseits eine gute Reaktor*performance* zu erzielen und andererseits die Wirtschaftlichkeit der angewendeten Verfahren sicherzustellen. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der weiteren verfahrenstechnischen Verbesserung von leistungsfähigen zweiphasigen und thermophilen Verfahren, die speziell zur Vergärung rohfaserreicher Biomasse entwickelt wurden.

Neben der verfahrenstechnischen Optimierung lag ein weiterer Fokus auf der Analyse der mikrobiologischen Grundlagen. Hierbei sollen Erkenntnisse über die mikrobiellen Populationen bei variierenden Ammoniakkonzentrationen gewonnen werden. Ziel der mikrobiologischen Arbeiten war u.a. besonders gut angepasste Bakterien und Archaeen zu identifizieren, sowie die Grundlagen zur Entwicklung eines für hohe Stickstoff- bzw. Ammoniakkonzentrationen geeigneten Fermenterzusatzes auf Basis adaptierter Mikroorganismen für die Bioaugmentation zu erarbeiten.

Gesamtziel war die Entwicklung von Strategien zur Verwertung von bislang wenig genutzten, stickstoffreichen Substraten auch in Monovergärungen.

I.1 Aufgabenstellung

Im Rahmen der Aufgabenstellung des Projektes wurden verfahrenstechnische Optimierungsprozesse, mikrobiologische Grundlagenforschung und wirtschaftliche Betrachtungsweisen kombiniert und in folgenden Arbeitspaketen und Meilensteinen (X) strukturiert.

A - Technische Stickstoffeliminierung

- (1) Kontinuierliche Bereitstellung stickstoff- bzw. ammoniumreicher Substrate während der gesamten Projektlaufzeit
- (2) Einrichtung der Biogasreaktorsysteme
Neue Konzeption eines thermophilen zweiphasigen, zweistufigen Reaktorsystems mit Bypasssystem. Installation und Inbetriebnahme zweier CSTR als Vergleichssysteme.
- (3) Entwicklung optimierter Stickstoffeliminierungsverfahren

Es soll ein optimiertes Verfahren zur Ammoniak-Eliminierung im zweiphasigen System entwickelt werden. Für eine Effizienz- und Effektivitätssteigerung sollen folgende Techniken etabliert und optimiert werden: Ammoniak-Strippping, Magnesium-Ammonium-Verfahren (MAP), ANA-Strip-Verfahren, Anammox-Verfahren (mikrobiologische Eliminierung).

B - Beschreibung der Prozessmikrobiologie

- (4) Kulturunabhängige Charakterisierung der prokaryontischen Lebensgemeinschaften und deren Populationsoszillationen bei variierenden Stickstoffgehalten mit unterschiedlichen Untersuchungstechniken
- (5) Etablierung mikrobieller Gemeinschaften, adaptiert an hohe Ammoniakkonzentrationen
- (6) Entwicklung von molekularen Markern zum Nachweis ausgewählter Mikroorganismen
- (7) Kultivierung von am Stickstoffumsatz beteiligten Mikroorganismen
- (8) Ermittlung des Metagenoms von ammoniaktoleranten Biozönosen zur Aufklärung der genetischen Grundlagen der Ammoniakverträglichkeit
- (9) Herstellung eines für hohe Stickstoffkonzentrationen geeigneten Fermenterzusatzes zur Bioaugmentation

C - Wirtschaftliche Prüfung

- (10) Prüfung der wirtschaftlichen und ökologischen Perspektiven der entwickelten Verfahren: Wirtschaftlichkeit, Effizienz und Effektivität, Einbindung in Produktionssysteme einzelner Systeme.

D - Veröffentlichung der Arbeitsergebnisse

- (11) Auswertung/Berichte/Publikationen

I 1.1 Voraussetzungen zur Durchführung des Vorhabens

Die durchgeführten Projektarbeiten beruhen auf am Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB) bereits erfolgten Vorarbeiten zur Konstruktion eines zweiphasigen, zweistufigen thermophilen Biogassystems (BMBF-Projekt: FKZ 03SF0349C).

Das System besteht aus einem Leachbedfermenter (LBF), einem Perkolatspeicher und einem nachgeschaltetem Anaerobfilter und basiert auf dem am Lehrstuhl für Abfallwirtschaft der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus-Senftenberg entwickelte und von der Firma GICON patentierten zweistufigen Trocken-Nass-Verfahren (DE 10 2004 053 615 B3). Das Unterdruckverfahren basiert auf der Grundlage des ANA-Strip®-Verfahren System GNS (Gesellschaft für Nachhaltige Stoffnutzung mbH) der Firma SSM Technology (Nauen, Brandenburg).

I.1.2 Planung und Ablauf des Vorhabens

Zur Umsetzung geplanter Strategien zur Stickstoffeliminierung wurden bei der Erstellung des Arbeitsplans verfahrenstechnische und mikrobiologische Arbeitspakete definiert:

- Strippung mit Luft, Biogas und Dampf als Trägergas
- Unterdruckstrippung (ANA-Strip®-Verfahren)
- MAP-Fällung / saure Waschung zur Rückgewinnung von Wirtschaftsdünger
- anaerobe Ammonium Oxidation (Anammox-Verfahren),

Die Umsetzung erstreckte sich zeitlich über zwei Förderphasen. Während der Bearbeitung kam es zu Verschiebungen geplanter Arbeiten, die in **Abb. I.1.2-1** dargestellt sind.

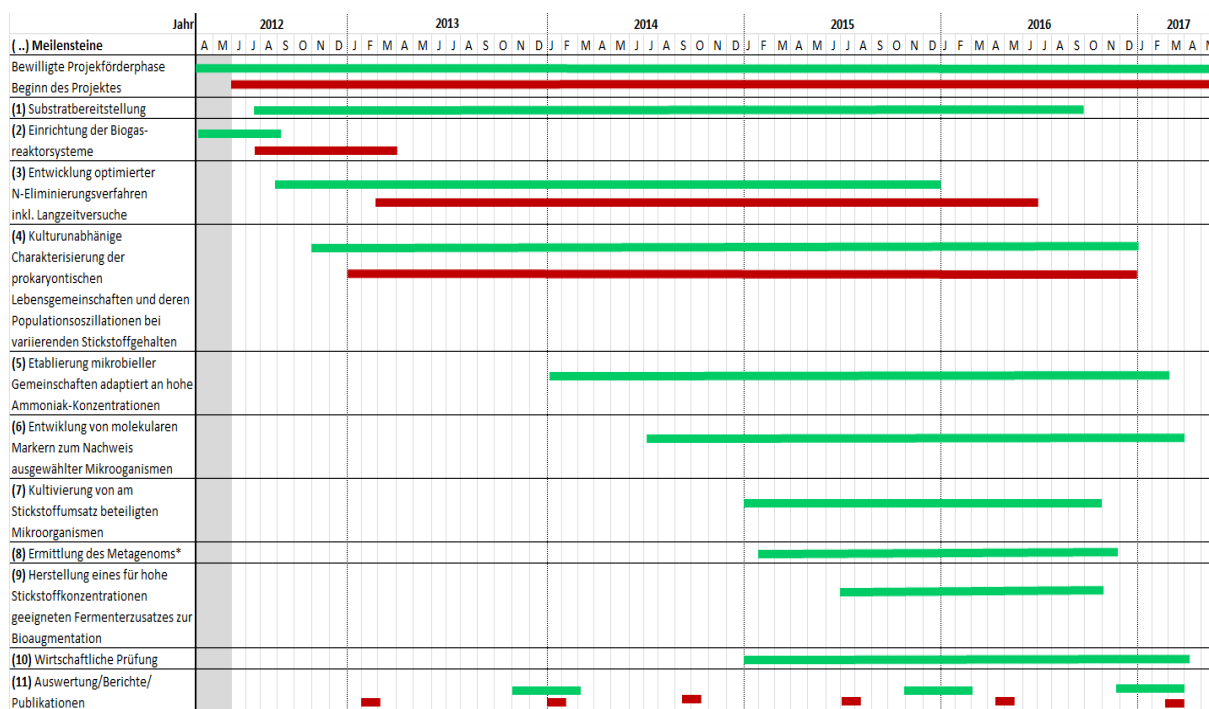


Abb. I.1.2-1: Übersicht geplanter und realisierter Arbeiten im Projekt.
Grüne Balken: geplante meilensteingebundene Zeitperioden, rote Balken: Abweichungen
* ... Es wurden keine Arbeiten zur Ermittlung des Metagenoms durchgeführt

I.2 Stand der Technik

I.2.1 Ausgangsstoffe für die Biogasproduktion

Im Jahre 2012 betrug der massebezogene Substrateinsatz nachwachsender Rohstoffe in deutschen Biogasanlagen ca. 55 % währenddessen nur 1 - 5 % industrielle Reststoffe und biogene landwirtschaftliche Wirtschaftsdünger zum Einsatz kamen. Neben Gras- und Getreideganzpflanzensilagen wird insbesondere Maissilage mit einem prozentualen Anteil von ca. 75 % bevorzugt für die Biogasproduktion verwendet. Als Co-Ferment kommen u.a. Wirtschaftsdünger wie Rinder- oder Schweinegülle zum Einsatz. Die Vergärung dieser Substratgemische erfolgt überwiegend im mesophilen Bereich bei 35 - 45°C.

Unter Berücksichtigung bioökonomischer Aspekte steht die Nutzung biogener landwirtschaftlicher Wirtschaftsdünger und bisher wenig verwendeter stickstoffreicher Biomassen für eine nachhaltig optimierte Energiegewinnung aus Biogas im Vordergrund. Insbesondere stickstoffreiche Reststoffe

wie Geflügelkot, Hühnermist und proteinreiche Pflanzen (z. B. Grassilage, Leguminosen) werden trotz ihres hohen Biogaspotentials von Anlagenbetreibern selten benutzt. Gründe für die Vermeidung liegen in der Freisetzung des beim Gärprozess entstehenden Ammoniaks, der insbesondere bei thermophilen Prozessbedingungen sowie bei einem für die Biogasbildung typischen, leicht basischen Milieu in hohen zytotoxischen Konzentrationen vorliegt. Die Bildung des ungeladenen zytotoxischen undissoziierten Ammoniaks aus dem dissoziierten Ammonium steigt mit zunehmender Prozessstemperatur.

Aus diesem Grunde werden Biogasanlagen mit höheren Stickstoffeinträgen ausschließlich in mesophiler Betriebsweise (35 - 45°C) geführt. Eine thermophile Betriebsweise, die zu einer Erhöhung der Biogasproduktion führen würde, ist deshalb derzeit mit stark stickstoffhaltigen Substraten nicht durchführbar. Jedoch laufen bei höheren Temperaturen biochemische Stoffwechselprozesse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften beschleunigt ab, so dass dadurch die Verweilzeiten der Biomasse reduziert und gleichzeitig die Beladungsraten erhöht werden können.

Durch die fehlende Verwertung stickstoffreicher Wirtschaftsdünger zur Biogasgewinnung blieben im Jahre 2011 schätzungsweise 3,46 Milliarden m³ des energiereichen Biomethans energetisch ungenutzt (Thiering & Bahrs, 2011). Damit könnten ca. 2 % der deutschen Stromproduktion abgedeckt werden.

1.2.2 Verfahren zur Stickstoffeliminierung

Um die hemmende Wirkung von Ammoniak im Biogasprozess auszuschließen, ist eine Stickstoffreduzierung in der Prozessflüssigkeit erforderlich. Zu diesem Zweck kommen insbesondere solche Verfahren zum Einsatz, bei denen neben einer Ammoniumeliminierung auch eine Rückgewinnung des Stickstoffs als Sekundärressource möglich ist. Die Verfahren hierzu sind die Strippung von Ammoniak mit Luft, Dampf oder auch Biogas sowie die Fällung des Ammoniums als Magnesium-Ammonium-Phosphat (MAP) (Marr & Končar, 1990) und das für die Stickstoffentfernung aus Gülle und Gärresten entwickelte ANA-Strip[®]-Verfahren (Bauermeister et al., 2006). Bei den genannten Strippungsmethoden wird die Flüchtigkeitseigenschaft des molekularen Ammoniaks ausgenutzt. Der mit der Luft ausgetriebene Ammoniak wird in der Regel durch eine saure Gaswäsche z. B. durch Schwefelsäure, aus der Kreislauf Luft als Ammoniumsalzlösung bis zur Löslichkeitsgrenze bei 20°C (etwa 40 Masse %) abgetrennt (Holler & Trösch, 1999).

Bei der Erprobung einer großtechnischen Anlage zur Dampfstrippung aus anaerob vorbehandelter Gülle in Pfaffendorf (Sachsen-Anhalt), konnten bei einer Dampfmenge von 11,5 % des Zulaufs, 75 % des Ammoniums abgetrennt werden (FAL, 1997). Das für die Stickstoffentfernung aus Gülle und Gärresten entwickelte ANA-Strip[®]-Verfahren (Bauermeister et al., 2006) sieht vor, dass bei max. 80°C und leichtem Unterdruck aus dem Strippbehälter ein ammoniakhaltiges Kreislaufgas entsteht, das in einem Vorlagebehälter mit einem Adsorptionsmittel unter Bildung von Ammoniumsulfat reagiert. Als Adsorptionsmittel kann REA-Gips eingesetzt werden, der mit Ammoniak, Kohlendioxid und Wasser zu Kalziumcarbonat und Ammoniumsulfat reagiert.

Das Verfahren der Luftstrippung und anschließenden sauren Wäsche wurde in den letzten Jahren an verschiedenen Substraten untersucht, so z.B. für Prozessabwässer der Zuckerindustrie (Gonzales Benito & Garcia Cubero, 1996), (Burkhardt, 1998) für Schweinegülle (Liao et al., 1995), für Deponiesickerwässer (Cheung et al., 1997) und in Verbindung mit einer Erhöhung des Methangehaltes im Biogas (Lei et al., 2007). Die technische Machbarkeit der Dampfstrippung am Beispiel von anaerob vorbehandelter Rindergülle (Zeng et al., 2006) sowie die Fällung als (MAP) aus Deponiesickerwasser (Kabdasli et al., 2000) konnte in kleintechnischen Versuchen ebenfalls nachgewiesen werden. Die Berliner Wasserbetriebe führen die MAP-Fällung aus Faulschlamm im großtechnischen Maßstab durch (Kern et al., 2008).

1.2.3 Der Rührkesselreaktor (CSTR)

Der Rührkesselreaktor (engl.: continuously stirred tank reactor; Abk.: CSTR) stellt einen Fermentertyp dar, dessen Vorteile in der Einfachheit der Prozessführung, der geringen Komplexität und den niedrigen Investitionskosten liegen (Chamy et al., 2011; Angelidaki et al., 2006). Gleichzeitig können im Vergleich zu Systemen der Trockenfermentation hohe Biogaserträge erzielt werden. Jedoch besitzt das System Nachteile die aus der Limitierung der Wahl möglicher Einsatzstoffe resultieren. So werden ausschließlich strukturarme, fließfähige Substrate mit geringem Trockensubstanzgehalt eingesetzt (FNR, 2013). Zudem erfolgt durch das Rührkesselsystem kein gezielter Biomasserückhalt und folglich keine Aufkonzentrierung von Mikroorganismen. Unter der Annahme einer Gleichverteilung der Mikroorganismen im Reaktor entspricht deren mittlere Aufenthaltszeit der hydraulischen Verweilzeit des Fermenters. Folglich muss die hydraulische Verweilzeit an die Generationszeit der Mikroorganismen angepasst sein, um eine stabile Biozönose im Rührkesselsystem zu erhalten (ATV-DVWK, 2000). Üblicherweise wird bei dem CSTR eine Aufenthaltszeit zwischen 15 - 25 Tagen gewählt (Gemmeke et al., 2009), während bei anderen Reaktortypen, bei denen die hydraulische Verweilzeit von der Verweilzeit der Biomasse entkoppelt ist, kurze Verweilzeiten und somit eine Wirtschaftlichkeit die Folgen sind. Nach Bischofsberger et al. (2005) handelt es sich demzufolge bei Rührkesselreaktoren um Schwachlastreaktoren.

Zur Durchmischung der Rührkesselfermenter kommen überwiegend schnell laufende Tauchmotorrührwerke zum Einsatz. Allerdings hat sich im Zuge der Änderung der Substratmischungen mit höheren NaWaRo-Anteilen und damit hohen Trockenmassegehalten auch der Anspruch an die Rührtechnik verändert. Im zunehmenden Maße werden Langsamläufer, wie z. B. Langachs- und Paddelrührwerke eingesetzt oder aber Kombinationen aus verschiedenen Rührwerkstypen. Zudem kann der Einsatz von Rührwerken aufgrund des sich einstellenden hohen Stromverbrauchs nicht als kostenneutral gewertet werden.

1.2.4 Das Leachbedfermentationssystem (LBF)

Das Leachbedverfahren als Möglichkeit der kontinuierlichen Trockenfermentation besitzt vielfältige Vorteile. So können die einfache und dadurch störunanfällige Gestaltung des Reaktorsystems und der geringere Energiebedarf (Weiland, 2006b) als wesentliche Vorteile gegenüber dem komplexeren

Rührkesselsystem (CSTR) betrachtet werden. Ferner ist das Leachbedsystem für alle Arten von organischen Feststoffen geeignet, wobei selbst Störstoffe, wie sie im Landschaftspflegegut oder im Bioabfall zum Teil enthalten sind, den Prozess nicht beeinträchtigen (Weiland, 2006a).

Im Leachbedfermenter erfolgt der Kontakt der methanogenen Populationen mit dem Substrat ausschließlich durch die Rezirkulation der Prozessflüssigkeit und ermöglicht damit die Biomethanisierung von Biomasse mit hohen Fasergehalten (Nizami et al., 2009). Durch die Integration eines separaten Anaerobfilters in den Kreislauf der Prozessflüssigkeit entsteht ein zweiphasiger, zweistufiger Vergärungsprozess. Der Feststofffermenter wird in erster Linie für die Hydrolyse und Versäuerung verwendet aber auch für eine bessere Metabolisierung von festen organischen Verbindungen in leicht biologisch abbaubare Kohlenstoffverbindungen (Weiland, 2010). Von der immobilisierten Mikrobiozönose im Anaerobfilter werden die Zwischenprodukte in der Prozessflüssigkeit zu Biogas konvertiert. Diese gelösten Zwischenprodukte aus dem Substrat können sich somit nicht in der Prozessflüssigkeit anreichern und zum Absenken des pH-Wertes führen. Damit ist bei der zweiphasigen Vergärung eine effiziente Hydrolyse gegeben, da diese im neutralen Bereich abläuft (Zverlov et al., 2010; Hu et al., 2004). Der schnelle biologische Abbau von hohen Mengen faserreicher Biomasse in einfache Spaltprodukte ist eine Voraussetzung für eine gute Leistungsfähigkeit der zweiphasigen Vergärung (Nizami et al., 2010; Nizami et al., 2011). Die Phasentrennung führt zu erhöhten Abbauraten (Nizami & Murphy, 2011) und einer höheren Prozessstabilität (O'keefe & Chynoweth, 2000).

1.2.5 Das Schwimmbettfermentersystem (SBF)

Im Rahmen laufender Versuchsreihen wird die Leistungsfähigkeit eines am ATB entwickelten, neuartigen Horizontalfermenters (Pfropfenströmer) als Lösungsansatz für eine kontinuierliche Trockenfermentationsanlage untersucht. Das Verfahren stellt dabei eine Weiterentwicklung der im Chargenbetrieb arbeitenden Systeme dar, bei denen die in die Fermenter eingebrachte Biomasse mit Prozessflüssigkeit eingestaut oder perkoliert wird. Bei dem genannten Verfahren werden die stickstoffreichen Biomassen als Pfropfenstrom mit Hilfe einer Prozessflüssigkeit durch den Fermenter und einen integrierten Anaerobfilter geführt, wobei die freigesetzten organischen Säuren sowie Wasserstoff im Anaerobfilter zu Biogas umgesetzt werden. Durch die im Horizontalfermenter ablaufende Biogasbildung kommt es zu einem Aufschwimmen der Feststoffe, die aus Substratbiomasse und bakterieller Biomasse bestehen. Die mit dem Substrat eingebrachte Flüssigkeit befindet sich im Fermenter unterhalb der Schwimmschicht und wird in regelmäßigen Zyklen zur Versorgung der mikrobiellen Biozönose auf die Schwimmschicht berieselt. Der vorhandene Dichteunterschied zwischen beiden Phasen führt zu einem Durchströmen der Schwimmschicht mit Flüssigkeit und dadurch zur ständigen Erneuerung der Grenzflächen. Durch die Möglichkeit zur gezielten Steuerung der Flüssigkeitsperkolation können optimale Milieubedingungen für die mikrobielle Lebensgemeinschaft geschaffen werden. Das beschriebene kontinuierliche System bietet darüber hinaus die Möglichkeit der Kopplung mit einer Struktur (Strippungs- und Anammoxsysteme) zur Behandlung hoher Stickstofffrachten in Form von Ammonium/Ammoniak.

I.2.6 Die mikrobiologische Gemeinschaft im Biogasreaktor – Erfassung der Prozessmikrobiologie

In Biogasanlagen wird komplex zusammengesetzte Biomasse durch eine vielfältige Gemeinschaft aus Bakterien und Archaeen zum Teil zu Biogas, deren Zielkomponente Methan ist, umgesetzt. Nicht, bzw. nicht in der zur Verfügung stehenden Zeit umsetzbare Anteile bleiben als Gärrest erhalten. Durch die in der Regel komplexe stoffliche Zusammensetzung der Substrate sind die hierzu nötigen Abbauewege ebenfalls komplex und werden vereinfachend in vier Schritte unterteilt: In der Hydrolyse werden biologische Makromoleküle wie Polysaccharide, Fette und Proteine zu einfachen Monomeren wie Zuckern, Fettsäuren und Aminosäuren gespalten, die bei der Acidogenese unter anderem zu verschiedenen kurzkettigen Fettsäuren vergoren werden. Diese werden in der Acetogenese weiter zu Essigsäure, Kohlendioxid und molekularem Wasserstoff umgesetzt. Dies sind die Ausgangsstoffe für den letzten Schritt des anaeroben Abbaus, der Methanogenese, die unter Spaltung von Acetat auf acetoklastischem, oder auf Basis von Wasserstoff und Kohlendioxid auf hydrogenotrophen Weg erfolgt (Rademacher et al., 2012a; FNR, 2013; Demirel, 2014). Die Vielfalt dieser Stoffumsätze führt zu einer divers zusammengesetzten prokaryotischen Gemeinschaft aus Bakterien und Archaeen, deren Bestandteile oft auf einzelne spezialisierte Stoffwechselschritte festgelegt sind. Während unter aeroben Bedingungen auch komplexe Substrate oft von einem einzelnen Organismus zu den Endprodukten wie CO₂ und H₂O abgebaut werden, erfolgt der Abbau unter anaeroben Bedingungen in der Regel durch komplizierte Nahrungsketten und –netze vieler Organismen (Maus et al., 2016), die voneinander abhängen und oft nur geringe Mengen Energie gewinnen. Deshalb ist der anaerobe Abbau stör anfällig, da die Hemmung einzelner Gruppen die Gesamtabbauleistung stark stören kann. Für den praktischen Betrieb von Biogasanlagen ist hier bedeutend, dass viele beteiligte Organismen und ihre bevorzugten Lebensbedingungen bisher unbekannt sind. Zudem deutet sich an, dass sich in jedem Fermenter ein anderes Mikrobiom entwickelt, da offenbar vergleichbare Stoffwechselschritte von unterschiedlichen Organismen durchgeführt werden können. Das verkompliziert die „Bestandsaufnahme“ der prokaryotischen Vielfalt in Biogasfermentern weiter. Es besteht hier Forschungsbedarf um die Vielfalt grundlegend zu erfassen, den Funktionen der Organismen auf die Spur zu kommen oder entscheidende Schlüsselorganismen zu identifizieren (Rademacher et al., 2012a; Maus et al., 2016).

Jedoch geht es hierbei nicht nur um Grundlagenforschung, sondern Kenntnisse der Fermenter-Mikrobiologie können entscheidend den Anlagenbetrieb unterstützen. Insbesondere können sie helfen, Störungen des Biogasprozess zu vermeiden. In diesem Zusammenhang sind beispielsweise Störungen durch die Anreicherung von Stickstoffverbindungen von Bedeutung, die bei der verstärkten Nutzung verschiedener stickstoffreicher, Energiepflanzen und landwirtschaftlicher Reststoffe auftreten können. Zwar werden in Praxisbiogasanlagen mikrobiologische Parameter bisher kaum erfasst, diese könnten jedoch entscheidende Informationen liefern, wenn es beispielsweise gelingt, Indikatororganismen für beginnende Prozessstörungen zu identifizieren.

Ein wichtiger Einflussfaktor auf die toxische Wirkung erhöhter Stickstoffgehalte in Biogasreaktoren ist die Temperatur. Zwar kann eine hohe Prozesstemperatur den Substratdurchsatz einer Biogasanlage stark erhöhen. Hier gilt grundsätzlich die „RGT-Regel“ (Reaktions-Geschwindigkeits-Temperaturregel), nach der sich bei einer Erhöhung der Temperatur um 10 K die Reaktionsgeschwindigkeit biochemischer Reaktionen verdoppelt bis verdreifacht. Jedoch wird hierdurch ggf. die Toxizität zu hoher

Stickstoffgehalte erhöht, da sich das Reaktionsgleichgewicht vom schwach toxischen Ammonium zu giftigem Ammoniak verschiebt. Dies hat einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der Prozessmikrobiologie (Rademacher et al., 2012b), da die durch die Temperaturerhöhung theoretisch mögliche höhere Durchsatzleistung nicht realisiert werden kann.

Im Rahmen des hier beschriebenen Projektes ermöglichte der thermophile und hyperthermophile Betrieb der Reaktoren eine experimentell gewollte Verstärkung der Stickstoffproblematik, wodurch beispielsweise gezielt daran angepasste Mikroorganismen angereichert werden konnten. Zudem ist die Temperatur durch die unterschiedlichen Toleranzbereiche der Mikroorganismen für diesen Umweltfaktor auch ohne Berücksichtigung der Stickstoffproblematik ein starker Einflussfaktor auf die sich herausbildenden Gemeinschaften. Es deutet sich an, dass bei hoher Prozesstemperatur und Stress durch hohe Stickstoffgehalte die hydrogenotrophe Methanbildung auf Grundlage von H_2 und CO_2 vorherrscht, da acetoklastische Methanogene empfindlicher zu sein scheinen (Rademacher et al., 2012a). Verschiedene Gruppen methanogener Archaeen reagieren unterschiedlich auf derartige Stressfaktoren, während beispielsweise die acetoklastisch methanbildende Gattung *Methanosaeta* als sehr empfindlich gegen N-Stress identifiziert wurde (Klang et al., 2015) ist *Methanosarcina* im Allgemeinen unempfindlicher und zudem zu mixotropher Methanogenese befähigt, da sowohl der Weg der acetoklastischen als auch hydrogenotrophen Methanbildung beschritten werden kann (Theuerl et al., 2015).

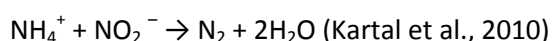
Die grundlegende Erforschung der Mikrobiologie, die im Biogasreaktor bisher noch größtenteils als „Blackbox“ (Rademacher et al., 2012a) betrachtet werden muss, verbessert das Verständnis des Prozesses und bietet damit Potential zur Optimierung der Biogasausbeute. Zudem können Prozessstörungen früher erkannt und durch rechtzeitiges Gegensteuern abgeschwächt oder vermieden werden, wenn es gelingt, Indikatororganismen zu identifizieren, die beispielsweise eine zunehmenden „Stress“ der prokaryotischen Gemeinschaft anzeigen. Solche Prozessstörungen können im Biogasprozess neben Stickstoffverbindungen durch viele verschiedene Stoffe wie Sulfid, Leicht- und Schwermetalle sowie organische Stoffe ausgelöst werden (Chen et al., 2008). Dies ist insbesondere entscheidend, da eine Umstellung der Biogas-Substrate von Energiepflanzen zu landwirtschaftlichen Reststoffen, wie z. B. Mist und Gülle gewollt ist und die politischen Rahmenbedingungen in diesem Sinne gestaltet werden. Solche Reststoffe gehören oft zu den problematischen Substraten, da sie beispielsweise zu einer erhöhten Freisetzung von Stickstoffverbindungen im Biogasprozess führen (Alsouleman et al., 2016).

Ein Beitrag zur grundlegenden Erforschung des Mikrobioms in Biogas-Fermentern bei unterschiedlich hohen Gehalten an Stickstoffverbindungen war daher ein Ziel des hier beschriebenen Forschungsvorhabens. In unterschiedlichen Fermentern wurden mikrobielle Gemeinschaften auf unterschiedlichen Reststoffen und nachwachsenden Rohstoffen sowie bei unterschiedlichen Stickstoffgehalten und Temperaturen angereichert. Dies lieferte die Grundlage die Einflüsse dieser Faktoren auf die Gemeinschaft zu erforschen.

I.2.7 Mikrobiologische Stickstoffeliminierung - mögliche Anwendung des Anammox-Stoffwechselweges

Anwendungen der mikrobiologischen Elimination von Stickstoffverbindungen sind insbesondere aus der Abwasserreinigung bekannt. Hier kommt überwiegend der „klassische“ mehrstufige Weg aus Ammonifikation, Nitrifikation und Denitrifikation zur Anwendung (Van de Graaf et al., 1996). Die komplexen stickstoffhaltigen Verbindungen werden in der Ammonifikation zu Ammonium/ Ammoniak umgesetzt, woran sich eine durch Belüftung ermöglichte aerobe Nitrifikation zu Nitrat und eine anschließende Denitrifikation zum ausgasenden Stickstoff anschließen. Der letzte Schritt ist hierbei eine anaerobe Atmung, die relativ leicht verwertbare organische Stoffe als Substrat benötigt (Timmermans & Van Haute, 1983; Isaacs & Henze, 1995; Mulder et al., 1995; Pagga et al., 2006). Die Nitrifikation, also die vollständige Oxidation des Ammoniums zu Nitrat durch aerobe chemolithotrophe Bakterien erfordert eine starke Belüftung. Die dadurch gleichzeitig erfolgende, aerobe Oxidation von organischen Stoffen im Wasser ist in der Abwasserreinigung ebenfalls erwünscht. Auch bei der Denitrifikation, erfolgt eine Zehrung von organischen Stoffen. Die erforderliche Belüftung der Nitrifikation also der aeroben Ammonium-Oxidation ist hierbei einer der energieaufwändigen Schritte der Abwasserreinigung.

Deshalb war die Entdeckung der anaeroben Ammonium-Oxidation „Anammox“ durch oxidierte Stickstoffverbindungen (Mulder et al., 1995) von großer Bedeutung für die Abwasserreinigung. Die theoretische Möglichkeit eines derartigen Stoffwechselltyps war schon fast zwanzig Jahre früher vorhergesagt worden (Broda, 1977), da die anaerobe Oxidation von Ammonium auf Basis der Elektronenakzeptoren Nitrit oder Nitrat Energie liefern kann. Jedoch waren solche Bakterien damals noch nicht gefunden und gehörten damit zu seinen „*two kinds of lithotrophs missing in nature*“. Die Reaktion kann wie folgt beschrieben werden. Der in verschiedenen Oxidationszahlen als oxidierte und reduzierte Verbindung vorliegende Stickstoff reagiert als Synproportionierung zu nullwertigem molekularem Stickstoff.



Nach der Entdeckung wurden die entsprechenden Organismen intensiv erforscht und charakterisiert. Es zeigte sich, dass dieser ungewöhnliche Weg der Energiegewinnung von ebenso ungewöhnlichen Bakterien beschränkt wird. Diese gehören zu den Planctomyceten, einer sehr tief auf Phylumebene abgespaltenen Gruppe, die viele besondere Merkmale, wie die knospende Vermehrung, Ausbildung von Stielen, eine Zellwandstruktur ohne Peptidoglycan und oft eine Zellkompartimentierung ähnlich wie bei Eukaryoten besitzen (Schmidt et al., 2003; Ward et al., 2006). Anammox-Planctomyceten besitzen eine spezielle membranumschlossene Organelle, das Anammoxosom (Schmidt et al., 2003; Jetten et al., 2005; Kartal et al., 2008). Die Anammox-Bakterien gehören zu verschiedenen Gattungen innerhalb der Planctomyceten wie *Brocadia anammoxidans*, *B. fulgida*, *Kuenenia stuttgartiensis* und *Scalindua wagneri*, *S. brodae*, *S. sorokinii* (Schmidt et al., 2003; Jetten et al., 2005; Kartal et al., 2008). Zudem zeigte die weitere Erforschung der Anammox-Organismen und -reaktion, dass dieser Stoffwechsel nicht eine seltene „Randerscheinung“ ist, sondern dass es sich hierbei um einen lange übersehenen Stoffwechsel handelt, der in vielen Umwelthabitaten auftritt (Humbert et al., 2010, 2012; Hu et al., 2011) und offenbar massiv zu den globalen Stickstoffströmen beiträgt. So wird beispiels-

weise geschätzt, dass hierauf etwa die Hälfte der marinen N_2 -Produktion zurückzuführen ist (Karlsson et al., 2009).

Da die Anammox zuerst in einem Denitrifikationsreaktor gefunden wurde aus dem auch Ammonium eliminiert wurde (Mulder et al., 1995) erfolgten nun weitere Versuche diesen Stoffwechsellyp auch gezielt in die Prozesse der Abwasserreinigung zu integrieren. Ausgehend von Reaktoren im Labormaßstab erfolgte ein Scale up auf technische Maßstäbe (Van der Star et al., 2007). Nun gewinnt die gezielte Nutzung der Anammox-Stoffwechsels in der Abwasserbehandlung zunehmend an Bedeutung, wobei aufgrund der geringen Wachstumsgeschwindigkeit dieser Planctomyceten von etwa 10 bis 12 Tagen (Van der Star et al., 2007) eine effektive Biomassezurückhaltung im System notwendig ist (Kartal et al., 2010).

Im Projekt wurden Möglichkeiten der Übertragung der Stickstoffelimination mithilfe der Anammox-Organismen auf Biogasreaktoren untersucht. Eine direkte Übertragung ist aufgrund anderer herrschender Bedingungen und Erfordernisse im Biogasprozess nicht ohne weiteres möglich. Dies liegt insbesondere daran, dass auch bei der Anammox-Reaktion die oxidierte Verbindung Nitrit als Reaktionspartner des Ammoniums vorliegen bzw. durch Teiloxidation in ausreichender Menge erzeugt werden muss. In Biogasanlagen liegt Stickstoff in der Regel komplett reduziert vor. Dies erfordert eine Teiloxidation des Ammoniums, die in einem vorgelagerten Schritt mithilfe eines SHARON-Reaktors (*Single Reactor System for High Ammonia Removal Over Nitrite*) durchgeführt werden kann und in Bezug auf Anwendungen im Abwasserbereich erforscht wird (Dapena-Mora et al., 2004). Zu bedenken ist hierbei, dass die in Kläranlagen erwünschte Oxidation organischer Verbindungen, die bei der Oxidation reduzierter Stickstoffverbindungen gleichzeitig auftritt, in der Regel ein erwünschter Prozess ist. Beide Prozesse liegen oft gekoppelt in der aeroben Belebungsstufe vor. Lediglich für die Denitrifizierung in einer anaeroben Stufe soll noch die hierzu nötige Menge verwertbarer organischer Stoffe enthalten sein. In einer Biogasanlage ist dagegen die maximale Beibehaltung der organischen Substanz als Substrat für die Methanogenese das Ziel. Es ist eine Herausforderung, dies mit der für Anammox erforderlichen Teiloxidation des Ammoniums zu verbinden.

1.2.8 Methoden zur Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften

Molekularbiologie

Die Erfassung der prokaryotischen Diversität ist eine komplexe Aufgabe und kann nach heutigem Wissensstand nur unter Einbeziehung molekularbiologischer Methoden erfolgen. Hierzu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die sich aufgrund verschiedener Stärken und Schwächen gegenseitig ergänzen können. Die angewendeten molekularbiologischen Methoden basierten auf der Detektion des Genes, das die ribosomale 16s RNA codiert. Die weite Verbreitung dieser Methoden liegt darin begründet, dass zum einen je nach Fragestellung unspezifische und viele gruppenspezifische Primer und zum anderen große frei zugängliche Datenbanken im Internet mit Vergleichssequenzen zur Verfügung stehen (Federhen, 2012; Benson et al., 2013). Die verwendeten molekularbiologischen Methoden erfassen Zielgene in extrahierter Gesamt-DNA. Hierbei werden auch Gene von nicht aktiven Zellen erfasst, die möglicherweise in größer Menge vorliegen, aber nur für sie ungünstige Bedingungen überdauern und kaum stoffwechselaktiv sind (Schmidt et al., 2001). Obwohl in der Mikrobi-

logie oft in Zellzahlen „gedacht“ wird, sind bei vielen Fragestellungen Aktivitätsparameter wichtiger, insbesondere, wenn es wie im Biogasprozess um die Optimierung von Stoffumsätzen geht. Deshalb sind die molekularbiologischen Daten im Kontext physikochemischer Messwerte zum Reaktorbetrieb zu interpretieren.

Es wurden verschiedene molekularbiologische Methoden angewendet, die überwiegend bereits in der Abteilung Bioverfahrenstechnik des ATB etabliert waren. Deshalb konnte auf umfangreichen Erfahrungen und Ausrüstung aufbauend gearbeitet werden. Zudem lagen zum Teil auch Daten aus vorangegangenen Projekten vor, die Vergleiche ermöglichten.

qPCR

Durch die Nutzung unspezifischer oder gruppenspezifischer Paaren von Primern und fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonden kann mithilfe der quantitativen Realtime PCR die Anzahl der Kopien eines Zielgens (hier 16 S rDNA) ermittelt werden. Zu berücksichtigen ist jedoch hierbei, dass die Anzahl der ermittelten Genkopien nicht der Zellzahl entspricht, da unterschiedliche Organismen sowie Zellen in verschiedenen Lebensstadien unterschiedlich viele Kopien dieses Gens pro Zelle besitzen (Klappenbach et al., 2001). Dieser Faktor ist insbesondere bei der qPCR zu berücksichtigen, beeinflusst jedoch auch andere molekularbiologischen Methoden.

Die qPCR wurde für verschiedene Fragestellungen angewendet: Im Versuch Nr. V mit den Leachbedfermentern wurde die Kopienzahl der Gesamtbakterien und Gesamtarchaeen in Perkolat und Biofilmen ermittelt und vergleichend betrachtet. In den Schwimmbettfermentern erfolgte zu ausgewählten Zeitpunkten eine Untersuchung von Gesamtbakterien, Gesamtarchaeen und verschiedenen Archaeen-Untergruppen (**Abb. I.2.8-1**).

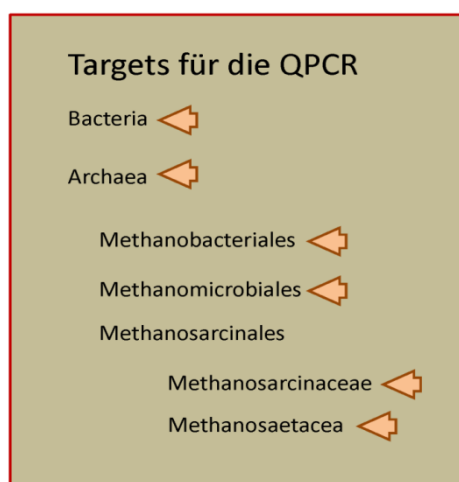


Abb. I.2.8-1: Ziel-Taxa für die qPCR an den Schwimmbettfermentern

In den Anreicherungsversuchen der Anammox-Planktomyceten erfolgte die regelmäßige Bestimmung der Kopienzahlen der Zielorganismen im Verhältnis zur Kopienzahl der Gesamtbakterien, um die Anreicherung zu überwachen. Die verwendeten Primer und Sonden wurden in **Tab. I.2.8-1** zusammengestellt.

Tab. I.2.8-1: Verwendete qPCR-Primer und Sonden zur Bestimmung der Kopienzahlen.

Target	Sequenz	Quelle
Bacteria		
Bac fw	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AG-3'	Yu et al., 2005
Bac rev	5'-GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3'	Yu et al., 2005
Bac-Sonde	5'-6-FAM TGCCA GCAGC CGCGG TAATA C-TAMRA-3'	Yu et al., 2005
Archaea		
Arch-fw	5'-ATT AGA TAC CCS BGT AGT CC-3'	Yu et al., 2005
Arch-rev	5'-GCCATG CACCWC CTCT-3'	Yu et al., 2005
Arch-Sonde	5'-6-FAM AGG AAT TGG CGG GGG AGC AC-TAMRA-3'	Yu et al., 2005
Methanomicrobiales		
Mmicr-fw	5'-ATC GRT ACG GGT TGT GGG-3'	Yu et al., 2005
Mmicr-rev	5'-CACCT AACGC RCATH GTTTA C-3'	Yu et al., 2005
Mmicr-Sonde	5'-6-FAM TYC GAC AGT GAG GRA CGA AAG CTG-TAMRA-3'	Yu et al., 2005
Methanobacteriales		
Mbac-fw	5'-CGW AGG GAA GCT GTT AAG T-3'	Yu et al., 2005
Mbac-rev	5'-TAC CGT CGT CCA CTC CTT-3'	Yu et al., 2005
Mbac-Sonde	5'-6-FAM AGC ACC ACA ACG CGT GGA -TAMRA-3'	Yu et al., 2005
Methanosarcinaceae		
Msc-fw	5'-GAA ACC GYG ATA AGG GGA-3'	Yu et al., 2005
Msc-rev	5'-TAG CGA RCA TCG TTT ACG-3'	Yu et al., 2005
Msc-Sonde	5'-6-FAM TTA GCA AGG GCC GGG CAA -TAMRA-3'	Yu et al., 2005
Methanosaetaceae		
Msaet-fw	5'-TAA TCC TYG ARG GAC CAC CA-3'	Yu et al., 2005
Msaet-rev	5'-CCTAC GGCAC CRACM AC-3'	Yu et al., 2005
Msaet-Sonde	5'-6-FAM ACGGC AAGGG ACGAA AGCTA GG-TAMRA-3'	Yu et al., 2005
Anamnox-Planctomyceten		
Amx_808-fw	5'-ARCYGTAAACGATGGCACTAA-3'	Hamersley et al., 2007 modifiziert
<i>modifiziert</i>	5'-ARCYGTAAACGATGGCACTAR-3'	
Amx-1040-rev	5'-CAGCCATGCAACACCTGTRATA-3'	Hamersley et al., 2007
Amx-Sonde	5'-TCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGCTTA-3'	Hamersley et al., 2007

Erstellung von Klonbibliotheken

Diese Technik ermöglicht eine detaillierte Analyse der prokaryotischen Gemeinschaft. Ziel dieser relativ aufwändigen Methode ist die Vereinzelung von Zielgenen (z. B. 16S rDNA) vieler unterschiedlicher Bakterien bzw. Archaeen, die sich in einer Probe befinden. Diese können dann einzeln sequenziert werden, woraus sich eine Datenbank an Sequenzen ergibt, die die Zusammensetzung der Arten in der Probe repräsentieren soll. Da relativ lange Sequenzen erhalten werden, ist eine genaue phylogenetische Zuordnung der Sequenzen möglich, sofern Sequenzen nah verwandter Organismen in öffentlichen Datenbanken verfügbar sind.

Die Erstellung von Klonbibliotheken wurde unter Nutzung von Proben aus unterschiedlichen Bioreaktoren eingesetzt, in der Regel in Kombination mit anderen Methoden. So erfolgte eine grundlegende Gemeinschaftsanalyse für Bakterien und Archaeen in den Schwimmbettfermentoren, den Rührkeselreaktoren sowie eine Analyse der Bakteriengemeinschaft in den Anamnox-anreicherungen.

Pro Reaktor wurden drei parallele Extraktionen durchgeführt, die jeweils wiederum im Dreifachansatz mit den in **Tab. I.2.8-2** aufgeführten Primern für Bakterien bzw. Archaeen amplifiziert wurden. Die aus der PCR resultierenden jeweils neun PCR-Produkte wurden vereinigt und mit kommerziell erhältlichen Kits nach Vorgabe des Herstellers (Promega, Mannheim, Deutschland) verarbeitet (Ligation, Klonierung, Vereinzeln, Plasmidextraktion, Gelelektrophorese). Schließlich wurden 96 Plasmide mit zur Sequenzierung an den Dienstleister GATC (Konstanz, Deutschland) geschickt. In einzelnen Fällen erfolgte auch die Verarbeitung der PCR-Produkte komplett bei GATC.

Die erhaltenen Sequenz-Rohdaten wurden mithilfe der Software Bionumerics 7.6 (Applied Maths) bearbeitet, was das Entfernen restlicher Plasmidsequenzen und eine grundsätzliche Qualitätskontrolle beinhaltete. Die resultierenden Sequenzen wurden mit dem Klassifizierungsprogramm des Ribosomal Database Project dem RDP Classifier (Wang et al., 2007) phylogenetisch eingeordnet.

Tab. I.2.8-2 Primer für Klonbibliotheken

Target Bezeichnung	Sequenz	Quelle
Bacteria 27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	(Lane, 1991)
Bacteria 926MR	5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'	(Lane, 1991)
Archaea 109f	5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3'	(Großkopf et al., 1998)
Archaea 912r	5'-CTCCCCGCCAATTCCTTA-3'	(Lueders & Friedrich, 2000)

TRFLP

Als grundlegende Methode der Gemeinschaftsanalyse wurde die Fingerprint-Methode Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP) (Marsh, 1999) angewendet, die sich zur Beschreibung von Gemeinschaften auch in Biogasanlagen bewährt hat (Weiss et al., 2007; Rademacher et al., 2012a, b; Klang et al., 2015; Theuerl et al., 2015; Alsouleman et al., 2016). Die TRFLP wurde ursprünglich für die Beschreibung von Bakterienpopulationen auf Grundlage von ribosomaler DNA entwickelt und 1994 publiziert (Avaniss-Aghajani et al., 1994).

Da die TRFLP Methode im Vergleich zur quantitativen Realtime PCR (qPCR) und der Erstellung von Klonbibliotheken weniger verbreitet ist, wird sie hier detaillierter dargestellt. Sie erfolgte wie von Rademacher und Klang (Rademacher et al., 2012b; Klang et al., 2015) beschrieben. Die DNA-Extraktion aus den Proben wurde mit dem PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc., USA), nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte im Fast-Prep® instrument (MP Biomedical, USA) für 2 mal 20 s bei 5 m s^{-1} . Anschließend wurde die DNA des 16S-rRNA-Gen der Bakterien und Archaeen durch im Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dabei wurde für die Detektion der Fragmente eine Fluoreszenzmarkierung mit dem Farbstoff Cy5 über die Vorwärtsprimer eingeführt. Die Primersequenzen sind in **Tab. I.2.8-3** hinterlegt.

Tab. I.2.8-3: Primersequenzen für die Amplifikation der 16 S rRNA-DNA

Name	Sequenz	Quelle
Bakterielle Taxa		
Vorwärtsprimer DNA, 27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	Lane, 1991
Reversprimer DNA, 926MRr	5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'	Weisburg et al., 1991
Archaeelle Taxa		
Vorwärtsprimer DNA, Ar109f	5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3'	Großkopf et al., 1998
Reversprimer DNA, Ar912r	5'-CTCCCCGCCAATTCCTTA-3'	Lueders & Friedrich, 2000

Die PCR-Produkte wurden mit dem PCR clean-up Gel extraction Kit (Macherey Nagel, Deutschland) aufgereinigt und anschließend mit *AluI* (Archaeen) oder *MspI* und *Hin6I* (Bakterien) verdaut. Ein Teil des Restriktionsproduktes wurde mit dem Größenstandard Size standard-600 (D1 fluoreszenzmarkiert) (Beckman Coulter, Deutschland) versetzt und im Genome Lab GeXP Genetic Analysis System (Beckmann Coulter, Deutschland) bei 4,8 kV für 70 min aufgetrennt. Die Elektropherogramme wurden zur Auswertung in Bionumerics 7.6 (Applied Maths) geladen. Schwache Signale (< 185 rfu) und solche die auf den Größenstandard zugeführt werden konnten (Bleed through), wurden von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen.

Die Längenzuordnung und Erfassung der Probenpeaks („Band matching“) erfolgte mit einer Positionstoleranz von 1 %. Die so bearbeiteten TRFLP-Profile wurden exportiert, und die Fluoreszenzwerte der einzelnen Banden auf die Gesamtfluoreszenz des jeweiligen TRFLP-Profiles normalisiert. Da die Primer für die Amplifikation des archaeellen 16S-rRNA-Gens nicht selektiv genug waren, wurden alle Banden, die nicht als archaeelles TRF bekannt sind oder über die Klonbibliothek identifiziert wurden, von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Aus drei Replikaten wurden der Median bestimmt. Bei zu niedriger Gesamtfluoreszenz oder uneinheitlichen TRF-Verteilung in den Replikaten wurden gegebenenfalls eine Wiederholungen bestehend aus drei Replikaten angesetzt. Der Median wurde in diesen Fall über alle Replikate genügender Qualität gebildet. TRFLP-Profile für die keine drei ähnlichen Replikate gefunden wurden, sind in den Abbildungen markiert (“*“). Der so erstellte Datensatz diente dann der Berechnung der TRF-Anzahl und des Ginicoeffizienten. Die Berechnung des Coeffizienten erfolgte im Programm R (R Core Team (2016), Wien Österreich) unter Verwendung des Paketes „ineq“ (Zeileis, 2014). Die Identifizierung von mikrobiellen Taxa ist durch die Kombination mit einer 16S-rRNA-Klonbibliothek möglich. Durch in silico Restriktion der zugeordneten Sequenzen in der Klonbibliothek kann so den Fragmentlängen bestimmte bakterielle oder archaeelle Taxa zugeordnet werden.

Mikroskopie

Die Mikroskopie wurde als ergänzende Methode zur Gemeinschaftsbeschreibung angewendet. Von Vorteil ist der relativ geringe Aufwand und die Tatsache, dass wie bei den molekularbiologischen Methoden Kultivierungsunabhängigkeit besteht, sodass mikrobiologische Gemeinschaften auch in nativen Proben untersucht werden können. Hierbei können viele grundlegende Aussagen zur Zusammensetzung und Dynamik der mikrobiologischen Gemeinschaften getroffen werden. Dies ist jedoch abhängig davon, ob die zu beobachtenden Gruppen charakteristische Morphotypen ausbilden. Oft ist dies nicht der Fall. Bei vielen methanogenen Archaeen gibt es ausgeprägte morphologische Merkmale, wie die Zellform und ggf. deren Anordnung. Zudem ist die Vielfalt der Methanogenen offenbar geringer als die der mit ihnen im Biogasprozess assoziierten Bakteriengemeinschaft. Dazu kommt das charakteristische Merkmal der Autofluoreszenz mithilfe des Faktors F420, der bei Verwendung eines Epifluoreszenzmikroskops eine Unterscheidung der leuchtenden Methanogenen von den nicht-leuchtenden Bakterien ermöglicht (Cheeseman et al., 1972). Eine solche gruppenspezifische Unterscheidung ist sonst auch mithilfe der Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung möglich, die den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen mit spezifischen Oligonukleotidsonden kombiniert. Dies ermöglicht es mithilfe von (nicht immer möglichen) sequenzspezifischen Sonden den gezielten Nachweis und ggf. die Quantifizierung der Zielorganismen. Für die Gemeinschaftsbeschreibung der Bakterien wäre jedoch der parallele Einsatz einer großen Anzahl von gruppenspezifischen Sonden notwendig, weswegen im

Rahmen dieses Projektes weitgehend davon abgesehen wurde. Lediglich zum spezifischen Nachweis der Anammox-Planktomyceten wurde FISH angewendet.

I.2.9 Angaben bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorabends benutzt wurden

Die durchgeführten Projektarbeiten beruhen auf am Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB) bereits erfolgten Vorarbeiten zur Konstruktion eines zweiphasigen, zweistufigen thermophilen Biogassystems (BMBF-Projekt: FKZ 03SF0349C). Das System besteht aus einem Leachbedfermentor (LBF), einem Perkolatspeicher und einem nachgeschaltetem Anaerobfilter und basiert auf dem am Lehrstuhl für Abfallwirtschaft der Brandenburgischen Technischen Universität Cottbus-Senftenberg entwickelte und von der Firma GICON patentierten zweistufigen Trocken-Nass-Verfahren (DE 10 2004 053 615 B3). Das Unterdruckverfahren basiert auf der Grundlage des ANA-Strip®-Verfahren System GNS (Gesellschaft für Nachhaltige Stoffnutzung mbH) der Firma SSM Technology (Nauen, Brandenburg).

Zur Analyse wurden ausschließlich Verfahren optimiert bzw. genutzt, die für die öffentlich finanzierte Forschung freigegeben sind. Die genaue Darstellung der Methoden und Verfahren sind der Ergebnisdarstellung in diesem Bericht sowie den entsprechenden Fachpublikationen zu entnehmen. Schutzrechte Dritter wurden zu keiner Zeit berührt.

I.3 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Innerhalb des Projektes erfolgte eine Zusammenarbeit mit folgenden Institutionen:

- Technische Universität Berlin, Institut für Technischen Umweltschutz, Fachgebiet Umweltmikrobiologie
- Brandenburgische Technische Universität Cottbus Senftenberg, Fakultät Umweltwissenschaften und Verfahrenstechnik, Lehrstuhl Abfallwirtschaft
- Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung e.V. Müncheberg (ZALF), Institut für Landschaftsstoffdynamik.

II Ergebnisse

II.1 Erzielte Ergebnisse

II.1.1 Vergärung stickstoffreicher Substrate im Leachbedfermentationssystem (LBF)

II.1.1.1 Vergärung ohne und mit Kopplung eines batchbetriebenen Strippungssystem

Vergärung stickstoffreicher Substrate im Leachbedfermentationssystem (LBF) ohne Strippung

Aufbauend auf den Ergebnissen durchgeführter Vorversuche zur Konzeptionierung und Dimensionierung redundanter Leachbedfermentationssysteme wurden nachfolgend thermophile und hyperthermophile Versuchsreihen zur Fermentation von Hühner trockenkot durchgeführt (**Tab. II.1.1.1.-1**).

Tab. II.1.1.1-1: Versuchsreihen zur Fermentation von Hühner trockenkot im Leachbedfermenter.

Versuchsreihe	Spezifikationen		
	Substrat	Temperaturregime	Strippung
LBF I (Vorversuch)	HTK	thermophil	keine
LBF II	HTK	hyperthermophil	keine
LBF III	HTK	thermophil	keine

Abb. II.1.1.1-1 und **-2** zeigen den Aufbau des Fermentationssystems für die zunächst ohne Stickstoffelimination durchgeführten Referenzversuche LBF I, II, III. Die Untersuchungen zur Versuchsreihe LBF I dienten ausschließlich dem erstmaligen Betrieb und Einstellung der Hauptanlage (Vorversuch) und haben somit nur begrenzt Aussagefähigkeit.

Der im Doppelansatz bereitgestellte Versuchsaufbau (Abb. II.1.1-1 und -2) zeichnet sich sowohl durch die strikte Trennung von Fest- und Flüssigphase (zweiphasig) als auch durch die räumliche Separation von Hydrolyse und Methanogenese (zweistufig) aus. Während das im Hydrolysereaktor (100 L) eingebrachte Substrat einer Trockenfermentation mit periodischer Inokulierung (2,6 L alle 2 h) unter (hyper-) thermophilen Temperaturen unterzogen wurde, sollen im nachgeschalteten Anaerobfilter (30 L) die während der Hydrolyse von Primärvergärem gebildeten Säuren durch eine auf Füllkörpern gewachsene leistungsfähige Biofilmpopulation zu quantitativ und qualitativ hochwertigem Biogas mit hohen Methankonzentrationen metabolisiert werden. Zusätzlich wurde dem System ein als Reservoir für die rhythmische Inokulierung dienender Perkolatspeicher (60 L) hinzugefügt, welcher dem Anaerobfilter nachgeschaltet ist. Diese Anordnung ermöglicht es, den Perkolatspeicher als Schnittstelle von Fermentations- und dem später implementierten Strippungssystem zu nutzen und die zwischen beiden Systemen variierenden Volumenströme auszugleichen. Im Fermentationssystem ist die Perkolationsrhythmik darauf ausgelegt, das Volumen des Anaerobfilters im Tagesverlauf vollständig auszutauschen (hydraulische Verweilzeit ca. 1 Tag). Die Filterbox diente zur Abtrennung des mit dem HTK in das System eingebrachten Sandes.

Redoxpotential- und Ammoniummessungen erfolgten am Ausgang des AF innerhalb einer mit Prozessflüssigkeit gefluteten extern installierten Messbox; der pH-Wert wurde zusätzlich auch vor dem AF gemessen. Mit dem Fermentationssystem waren eine Prozesswertüberwachung und eine Gasana-

lytik gekoppelt. Die Ammoniumfrachten wurden mit Hilfe einer prozessintegrierten Online-Analytik (Pronova Analysetechnik GmbH & Co. KG, Berlin) automatisiert erfasst und zusätzlich im zweitägigem Rhythmus durch im Labor zusammen mit den Parametern NH_4^+ , Stickstoff, FOS/TAC-Wert untersucht. Krustenbildungen auf den Sonden führten zu ungenauen Messungen. Neben den genannten Parametern zur Prozessüberwachung wurden zudem die Gasquantität und -qualität, Temperatur, pH und das Redoxpotential erfasst. Dadurch konnte einerseits die Genauigkeit der Online-Messung validiert und andererseits das Spektrum der zu erfassenden nicht online gemessenen Prozessgrößen erweitert werden.

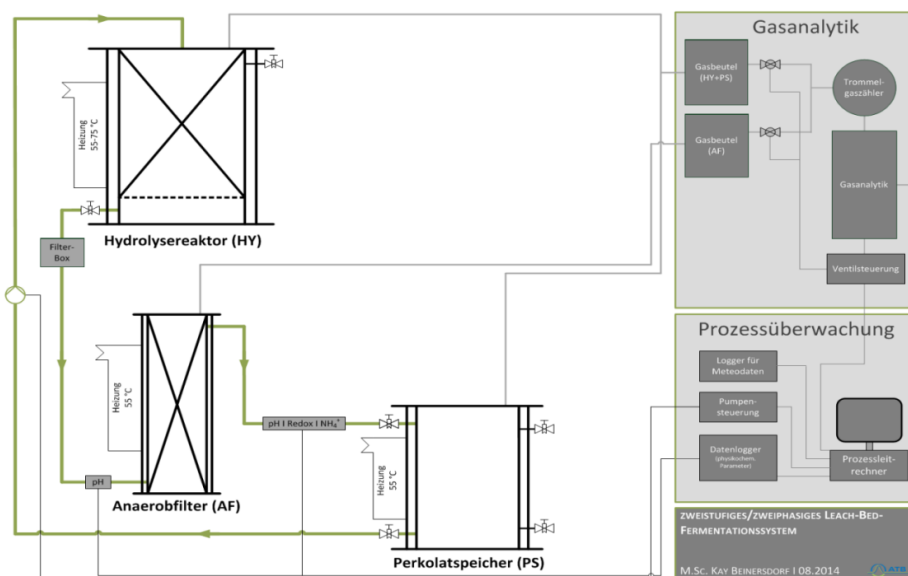


Abb. II.1.1.1-1: Verfahrensfließbild des satzweise (hyper)thermophil betriebenen Leachbedfermentationssystem mit Hydrolysereaktor, methanproduzierender Anaerobfilter und Perkolatspeicher. Grün: Perkolatstrom, grau: Gasstrom und Messdatenerfassung



Abb. II.1.1.1-2: Bild des satzweisen (hyper)thermophil betriebenen Leachbedfermentationssystem. Links: auf einem Tragegerüst stehende Hydrolysereaktoren daneben ein Trommelgaszähler (TGZ) zur quantitativen Erfassung des produzierten Biogases
Rechts: Anaerobfilter (AF), Perkolatspeicher (PS), Messbox (MB), Sandfilter (SF)

Bereits nach den ersten beiden Versuchsreihen (LBF I und II) zeichneten sich zunehmend die Leistungsgrenzen der eingesetzten Sonden ab. So war eine zeitintensive, wöchentliche Kalibrierung aller Sonden erforderlich, um Messungenauigkeiten durch Störungen und Verunreinigungen zu vermeiden.

Im Rahmen der Versuche zur Monofermentation stickstoffreicher, prozesskritischer Substrate ohne Strippping, wurden die Versuchsreihen LBF II und LBF III unter Verwendung von Hühner trockenkot durchgeführt. Stets in parallelen Zweifachansätzen erfolgten die Untersuchungen bei thermophilen (55°C, LBF III) als auch bei hyperthermophilen ($\approx 65^\circ\text{C}$, LBF II) Hydrolysetemperaturen. Die Prozesstemperaturen der Anaerobfilter betragen bei allen Versuchsreihen stets 55°C. Das Substrat wurde von einem Vermehrungsbetrieb für Legehennen (Spreenhagener Vermehrungsbetrieb GmbH, Bestensee) aus Bodenhaltung bezogen.

Beim Einbau wurde dem HTK-Haufwerk im Hydrolysefermenter sowohl Stroh als Strukturmaterial als auch Gärrest einer thermophil betriebenen Biogasanlage (Biogas Seth GmbH & Co. KG, Seth, Deutschland) als inokulierendes (Methanbildner beinhaltendes) Medium beigelegt. **Tab. II.1.1.1-2** führt die substratspezifischen Eigenschaften und eingebrachten Mengen für den thermophilen Versuchsdurchlauf auf.

Tab. II.1.1.1-2: Typisch eingebaute Mengen und Substratcharakteristika durchgeführter Vergärungsversuche zur Stickstoffelimination

Substrat	m _{Einbau} [kg]	TS [% FM]	oTS [% TS]	N [mg/kg FM]	NH ₄ -N [mg/kg FM]
HTK	5	39,93	74,76	23655	3926
Luzerne	5	45,63	89,33	14337	1183
Stroh	0,5	88,70	94,88	6050	78
Gärrest	5	10,45	74,64	3574	1107
Perkolat	25	1,19	42,52	2155	1611

Die Temperaturverläufe sowohl der Anaerobfilter als auch der Perkolatspeicher im thermophilen Ansatz wiesen ein konstantes Niveau zwischen 56 - 57°C auf (**Abb. II.1.1.1-3**). Dem gegenüber waren die gemessenen Temperaturen der Hydrolysereaktoren, sowohl im thermophilen als auch im hyperthermophilen Versuchsdurchlauf fluktuierend und das Ergebnis der zweistündigen Perkolationsrhythmik. Diese gemessenen Schwankungen resultierten aus der Zufuhr des kühleren Perkolats in den nicht beheizten Leitungsstrecken in den Hydrolysereaktor.

Insbesondere beim hyperthermophilen Versuchsdurchlauf waren diese Unterschiede am deutlichsten mit einer Temperaturdifferenz von durchschnittlich 8,3 - 8,6°C gegenüber den Hydrolysefermentern. Im Vergleich dazu betragen die Temperaturschwankungen im Anaerobfilter nur 1,1 - 1,7°C, im Perkolatspeicher hingegen 3,4 - 4,0°C. Letzte resultierten ebenfalls aus der längeren Wegstrecke vom Anaerobfilter über eine eigens entwickelte Messbox zur Erfassung der Prozessparameter hin zum Perkolatspeicher. Da es sich bei den gemessenen Temperaturfluktuationen um kurzzeitige Schwankungen handelte, konnten potentiell negative Auswirkungen auf den Fermentationsprozess ausgeschlossen werden.

Während die Temperaturen im AF und PS nahezu konstant waren unterlagen die Hydrolysefermenter geringfügig stärkeren Temperaturschwankungen (ΔT ca. 6-8 °C).

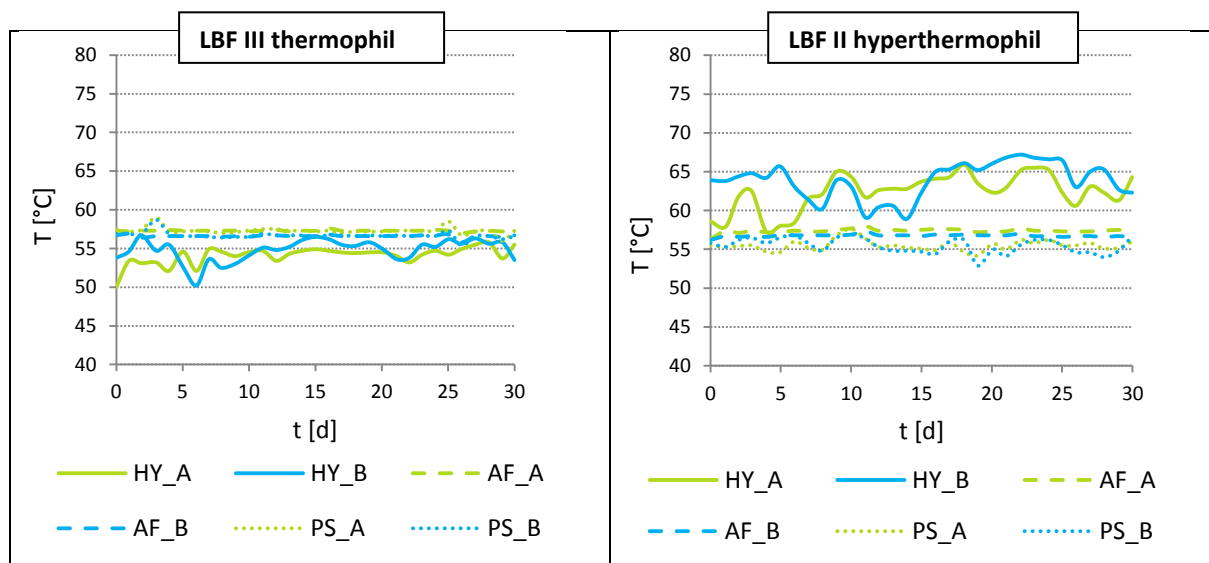


Abb. II.1.1.1-3: Temperaturverläufe der Versuche zur Leachbedfermentation ohne Strippping.
HY - Hydrolyse, AF - Anaerobfilter, PS – Perkolatspeicher, A/B – System A/B

Sowohl im thermophilen als auch hyperthermophilen Versuchsdurchlauf war innerhalb der ersten 5 - 10 Tage ein deutlicher Abfall des pH-Wertes bzw. ein Anstieg des FOS/TAC-Wertes zu erkennen (**Abb. II.1.1.1-4**). Diese Verläufe resultierten aus der zunächst raschen Freisetzung organischer Säuren, welche mit dem Perkolat in die nachgeschalteten Stufen des Fermentationssystems transportiert wurden. In Übereinstimmung mit dieser Erkenntnis war ein rascher Anstieg des FOS/TAC-Wertes zu verzeichnen, welcher als Koeffizient der flüchtigen organischen Säuren und dem Carbonatpuffer ebenfalls mit der Menge an freigesetzten Säuren korrelierte. Es kann vermutet werden, dass anfänglich mehr Fettsäuren von fermentativen Mikroorganismen produziert als nachfolgend durch methanogene Mikroorganismen abgebaut wurden.

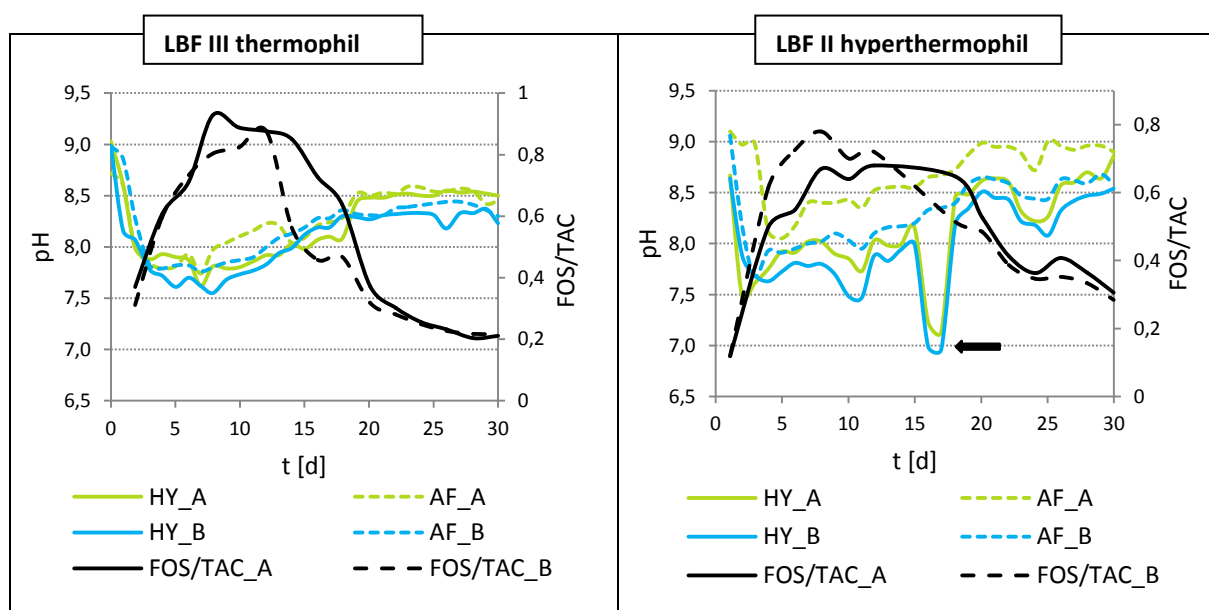


Abb. II.1.1.1-4: pH- und FOS/TAC-Verläufe der Versuche zur Leachbedfermentation ohne Strippping.
HY - Hydrolyse, AF - Anaerobfilter, PS - Perkolatspeicher; A/B - System A/B
Pfeil: Säureakkumulation zwischen Tag 15 u 17 durch Verstopfungen in Hydrolyse-Reaktor

Bei Betrachtung der FOS/TAC-Werte ab Tag 10 im thermophilen Versuchsansatz ein schnelleres Absinken als im hyperthermophilen Versuchsdurchlauf erkennen. Abweichend dazu wurden unter thermophilen Bedingungen mehr Fettsäuren gebildet, die im Vergleich zum hyperthermophilen FOS/TAC-Verlauf rascher abgebaut wurden.

Für beide Versuchsdurchläufe sind in **Abb. II.1.1.1-5** die Zusammensetzung und die Menge des gewonnenen Biogases dargestellt. Das gebildete Gas von Hydrolysereaktor und Perkolatspeicher wurde vereint gesammelt, während das Biogas des Anaerobfilters separat betrachtet wurde. Der Grund für die Zusammenfassung lag in der verfahrenstechnischen Notwendigkeit, die entstehenden Unter- und Überdrücke, welche beim Perkolationsvorgang aus dem Perkolatspeicher und in den Hydrolysereaktor entstanden, über einen gemeinsamen Gasspeicher auszugleichen. Bei Betrachtung der Ergebnisse des Anaerobfilters im thermophilen und hyperthermophilen Versuchsansatz, war ein vergleichbarer Kurvenverlauf bezüglich der Biogasmenge und Zusammensetzung zu erkennen. Die höchste Biogasproduktion erstreckte sich auf den Zeitraum des 15. – 17. Versuchstages.

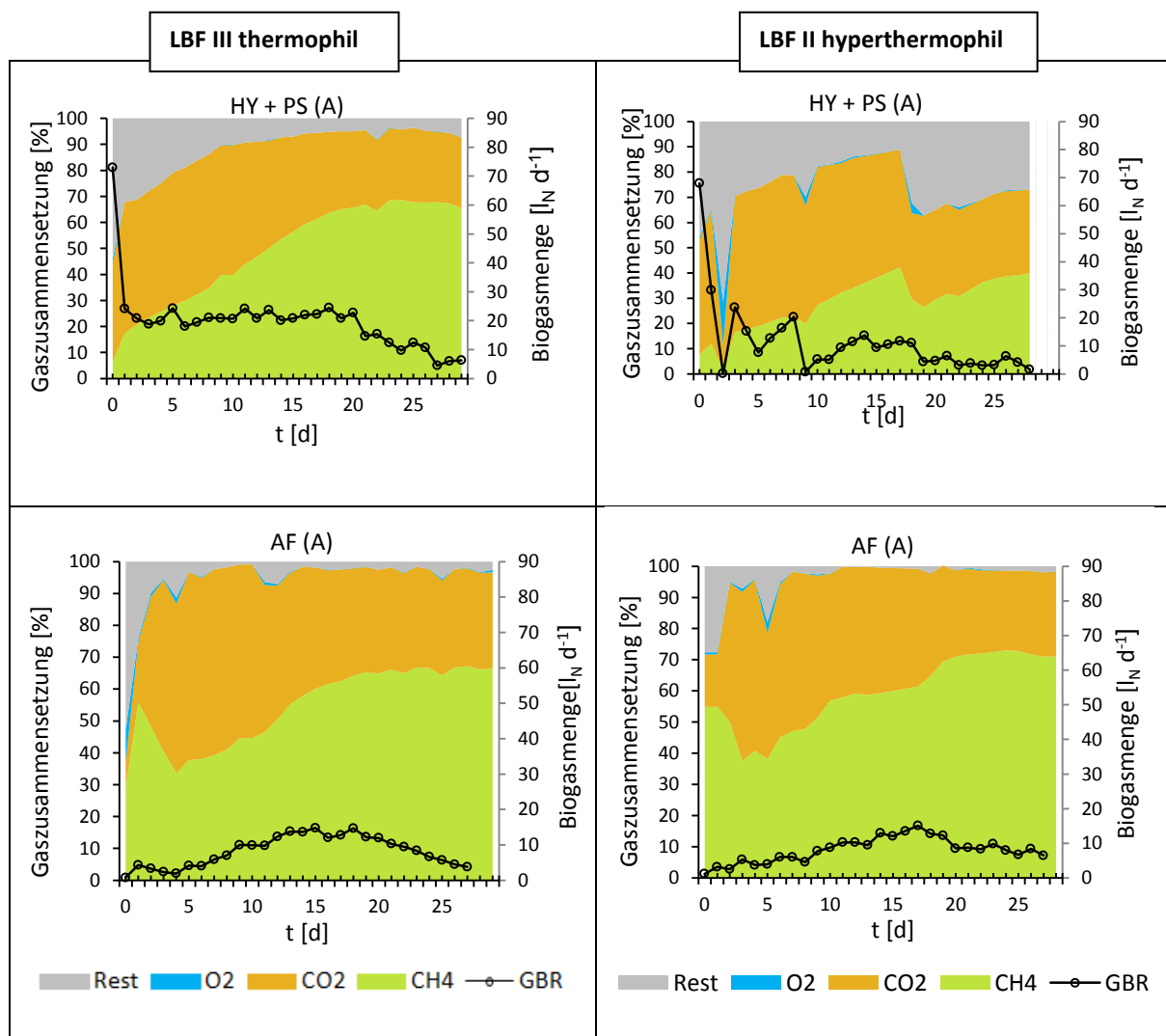


Abb. II.1.1.1-5: Darstellung der Gaszusammensetzung und Biogasmenge im Leachbedfermenter ohne Strippung.

HY – Hydrolyse, AF – Anaerobfilter, PS - Perkolat-speicher, GBR – Gasbildungsrate; System A

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zum Verlauf des pH- und FOS/TAC-Wertes (vgl. Abb. II.1.2-4) war von einer frühzeitig einsetzenden Hemmung aufgrund hoher $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentrationen und der damit einhergehenden Anreicherung organischer Säuren (hohe FOS/TAC-Werte) auszugehen, welche die methanogenen Mikroorganismen im Anaerobfilter innerhalb der ersten fünf Tage hemmten. Ein entsprechendes Absinken der Methanbildung im Zeitraum der ersten fünf Tage sowie ein nachfolgendes langsames Ansteigen der Methankonzentration bis zum Tag 20 konnte ebenfalls als Hinweis auf eine durch Ammonium und einer dadurch resultierenden Säurehemmung gewertet werden (**Abb. II.1.1.1- 6**).

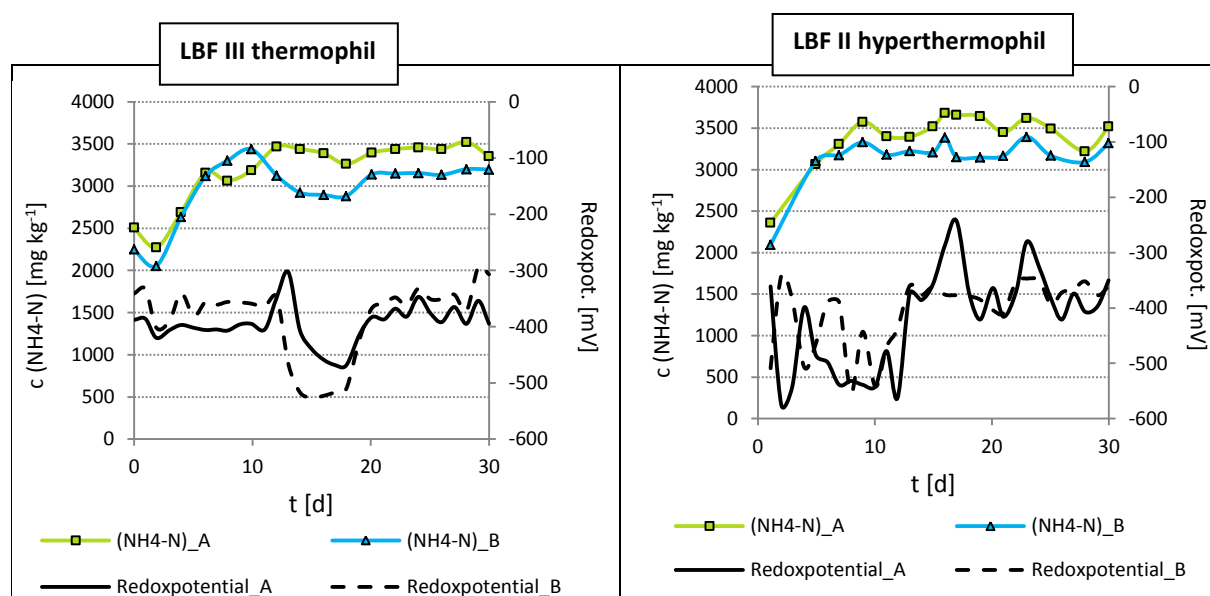


Abb. II.1.1.1-6: Darstellung der Ammoniumkonzentration und des Redoxpotentials im Leachbedfermenter ohne Strippung.

HY - Hydrolyse, AF – Anaerobfilter, PS – Perkolatspeicher, A/B - System A/B

Bei hohen Ammoniumkonzentrationen wirkt das dissoziierte NH_4^+ -Ion selbst toxisch auf die am Biogasprozess beteiligten Mikroorganismen. Bei $3 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ zeigt sich eine Hemmwirkung von 40 %, eine vollständige Hemmung ist ab $4 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ zu beobachten (Braun, 1982). Von einer zusätzlichen prozessinhibierenden Wirkung des Ammoniums während der thermophilen und hyperthermophilen Vergärung konnte folglich ausgegangen werden, da die gemessenen Werte (2.563 bis 3.684 mg L^{-1}) die Hemmgrenzen im hyperthermophilen Versuch weit überschritten und im thermophilen Versuchsansatz nah herankommen. Ferner ließen die aufgrund eines eingeschränkten Fettsäureabbaus verminderten Gaserträge unter hyperthermophilen Bedingungen auf eine Inhibierung der mikrobiellen Aktivität durch eine Ammoniakhemmung schließen. Obwohl es möglich ist, das Verhältnis von Substrat zu Inokulum zugunsten des Impfmateri als zu verschieben, um dadurch eine höhere mikrobiologische Pufferkapazität gegenüber dem im Verlauf des Abbauprozesses freigesetzten Ammoniums und Ammoniaks zu erzielen, wäre diese Strategie mit einer verminderten Wirtschaftlichkeit des Fermentationssystems gekoppelt. Geringere NH_4 -Konzentrationen bei thermophilen Temperaturen schienen sich weniger hemmend auf die mikrobielle Biozönose ausgewirkt zu haben.

Trotz der vermuteten Inhibierung war zu beobachten, dass der Methananteil im hyperthermophilen Versuchsansatz mit maximal 76 Vol.-% die Methankonzentration des thermophilen Durchlaufs (maximal 69 Vol.-%) um 7 Vol.-% übersteigt (vgl. Abb. II.1.1.1-5). Der Zuwachs der Methankonzentration

im hyperthermophilen Versuchsdurchlauf kann dem höheren Temperaturniveau des Perkolates, welches aus dem Hydrolysereaktor in den Anaerobfilter zugeführt wurde, zugeschrieben werden, da die Geschwindigkeit biochemischer Reaktionen der Mikroorganismen bei höheren Temperaturen zunimmt.

Bei Betrachtung der Biogasmenge und -zusammensetzung des Hydrolysereaktors und Perkolatspeichers unter thermophilen Prozessbedingungen, war ein stagnierender bis leicht sinkender Verlauf der gebildeten Biogasmenge erkennbar. Diese deutlich verlängerte *Lag*-Phase widersprach dem in der Literatur beschriebenen anfänglichen Verlauf typischer Gasbildungskurven im ersten Drittel eines Biogasbildungsprozesses. Hinsichtlich der Zusammensetzung des Biogases konnte erst am Tag 20 ein annähernd konstantes Verhältnis von Methan zu Kohlenstoffdioxid (ca. 3:1) detektiert werden, da sich nach diesem Zeitraum die CO_2 -Konzentration und der pH-Wert auf ein gleichbleibendes Niveau einstellte (Clemens, 2012). Die Verzögerung bis zum Erreichen eines stabilen Methan-Kohlendioxid-Verhältnisses konnte wiederholt auf die hohen NH_4^+ -Konzentrationen (Abb. II.1.1.1-6) und die vermutlich langen Adaptionszeiten der Mikroorganismen im Hydrolysereaktor zurückgeführt werden. Dem gegenüber war die Zusammensetzung und Menge des unter hyperthermophilen Prozessbedingungen gebildeten Biogases von Gaseinbrüchen gekennzeichnet. Mehrfach kam es zu Flutungen des Haufwerks, verursacht durch Verstopfungen des Ablaufs am Hydrolysereaktor, welche aus dem hohen Sandanteil im Hühnertrockenkot resultierten. Die Konsequenz hieraus war eine Säureanreicherungen im Hydrolysereaktor und die damit verbundenen Biogaseinbrüche. Zur Beseitigung der Verstopfungen bedurfte es einer Rückspülung der Leitungswege, was zu einem teilweisen Lufteintrag und damit zu einer zusätzlichen anteiligen Inhibierung des Biogasprozesses geführt haben könnte. Insbesondere am Tag 17 führte die Rückspülung zu einer Störung des anaeroben Milieus im Hydrolysereaktor und damit zu einem starken Absinken der Biogasbildung. Unter Vernachlässigung dieser Störungen konnte für den hyperthermophilen Versuchsdurchlauf auf ein vergleichbares Ergebnis für die Biogaszusammensetzung und -menge gegenüber dem thermophilen Ansatz geschlossen werden. Um potentiellen Verstopfungen zwischen den Reaktorkompartimenten entgegenwirken zu können, wurden Sandfangsysteme integriert (vgl. Abb. II.1.1.1-2).

Die NH_4 -Konzentrationen der untersuchten Perkolatproben überschritten im thermophilen Versuch nach Versuchstag 5, im hyperthermophilen Versuchsdurchlauf nach Tag 3, eine kritische Ammoniumkonzentration von 2700 mg L^{-1} (FNR, 2013) mit der Folge einer verminderten Leistungsfähigkeit der Biogasproduktion (vgl. Abb. II.1.1.1-5). Die Redoxpotenziale variierten zwischen -300 bis -500 mV (Abb. II.1.1.1-5, - 6).

Nach Rieger und Weiland (2006) weisen fakultativ anaerobe, hydrolytische Bakterien und Säurebildner ein optimales Wachstum bei Redoxpotentialen zwischen +400 bis -300 mV auf (Rieger & Weiland, 2006). Dem hingegen beanspruchen strikt anaerobe methanbildende *Euryarchaeota* ein deutlich niedrigeres Redoxpotential unter -330 mV. Aus Sicht der ermittelten Redoxpotenziale kann für die Versuchsreihen LBF II und III von einem stabilen Fermentationsprozess ausgegangen werden.

Da beide Kurven der NH_4 -Konzentration (LBF III A / LBF III B) einen sehr ähnlichen Verlauf aufweisen, wurde der NH_4^+ -Verlauf exemplarisch nur bei Versuchsreihe LBF III A berücksichtigt. Für LBF III B können die Daten aus Abb. II.1.1.1-6 entnommen werden.

Der TAC-Wert nahm über den gesamten Versuchszeitraum stetig zu (**Abb. II.1.1.1-7 A, B**), was für eine anhaltende Pufferkapazität und Stabilität des Systems sprach. Gleichzeitig stabilisierten sich die FOS- und FOS/TAC-Werte nach ca. 20 Tagen.

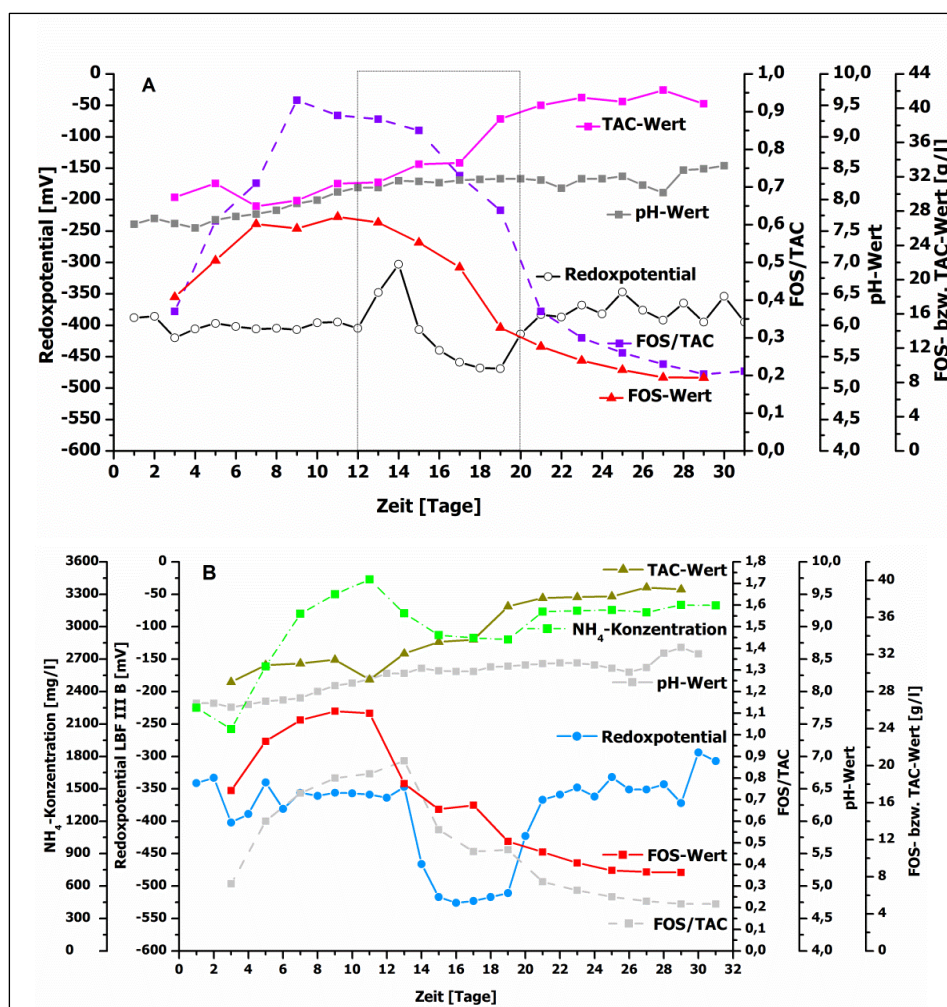


Abb. II.1.1.1-7: Darstellung der Verläufe des Redoxpotentials, pH-Wertes, FOS/TAC-Quotienten sowie der FOS- und TAC-Werte (A, B) und exemplarisch der NH₄-Konzentration (B) des LBF III im 30-tägigen Versuchszeitraum. **A:** LBF III A, thermophil, **B:** LBF III B, hyperthermophil

Auch die Kurvenverläufe des Redoxpotentials pendelten sich nach einem Abfall zwischen Tag 12 und 20 auf das anfängliche Niveau (Tag 1 - 12) ein. Diese Kurvenverläufe wiesen auf eine turbulente Einfahrphase innerhalb des ersten Drittels hin und lassen auf eine stabile Fermentation ab Tag 20 schließen. Deutlich wird, dass der pH-Wert über dem gesamten Versuchszeitraum kaum fluktuierte, sodass dieser als Indikator für mögliche Prozessstörungen ungeeignet war. Die anfängliche Zunahme der NH₄-Konzentration von 2054 mg L⁻¹ (Tag 3) bis auf 3500 mg L⁻¹ (Tag 11) könnte aus der perkolationsbedingten Ammoniumauswaschung aus dem Substrat (Hydrolysereaktor) und Weitertransport in den Anaerobfilter erklärt werden. Dasselbe gilt für die flüchtigen organischen Fettsäuren (FOS-Wert: 17300 (Tag 3), bis auf FOS: 25600 (Tag 11)). Die Abnahme der NH₄-N-Konzentration ab Tag 12 schaffte günstige Bedingungen für die Umsetzung der flüchtigen organischen Fettsäuren zu Biogas. Gleichzeitig wirkte die verringerte Ammonium-Konzentration der Inhibierung der methanproduzierenden *Euryarchaeota* entgegen, so dass flüchtige Fettsäuren nach 12 Tagen zu Methan abgebaut werden konnten (Abb. II.1.1.1-5). Zur Charakterisierung der verwendeten Einsatzstoffe wurde das maximal

erreichbare Gasbildungspotential der einzelnen Komponenten (Substrat, Inokulum, Perkolat) nach VDI-Richtlinie 4630 (2006) ermittelt (**Abb. II.1.1.1-8**). Die Ergebnisse dienen als Referenz zur Gasbildung im Trockenfermentationsansatz und lassen Aussagen über Biogasbildungseffizienzen im Fermentationsverlauf zu. Der im Fermentationssystem als Inokulum verwendete Gärrest einer thermophilen Biogasanlage (Biogasanlage Seth GmbH & Co KG) zeigte sich mit einem Restgaspotential von lediglich $6 \text{ L}_N \text{ kg}^{-1} \text{ FM}$ als weitestgehend ausgegoren. Stroh, welches im Hydrolysefermenter als Strukturmaterial diente, erzielte eine maximale Biogasausbeute von annähernd $350 \text{ L}_N \text{ kg}^{-1} \text{ FM}$ und liegt somit leicht über dem Literaturvergleichswert von $312 \text{ L}_N \text{ kg}^{-1} \text{ FM}$ (Lfl, 2014).

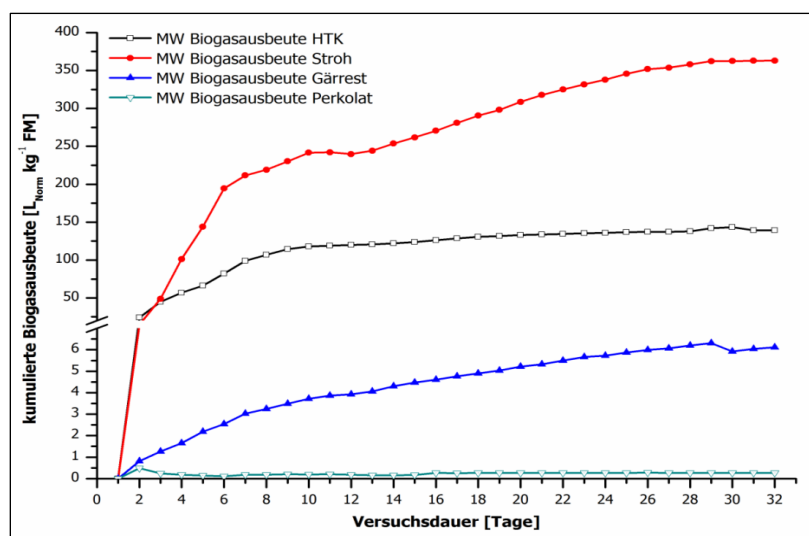


Abb. II.1.1.1-8: Darstellung der kumulierten Biogasausbeuten des eingesetzten Hühnertrockenkots (HTK), Gärrestes einer thermophilen Biogasanlage, von Stroh und der Prozessflüssigkeit (Perkolat) der Versuchsreihen LBF I bis X nach VDI 4630.

Die Gasausbeuten wurden im Doppelansatz bestimmt. Bei gleichen Ausbeuten zeigte die Vergärung unter hyperthermophilen Bedingungen eine bessere Kinetik in den ersten 20 Tagen. Im Mittel betrug die Biogasausbeute von HTK ca. $126 \text{ Normliter (L}_{\text{Norm}} \text{ kg}^{-1} \text{ Frischmasse)}$. Die thermophilen Gasbildungstests wurden bei einer Umgebungstemperatur von $56 \text{ }^\circ\text{C}$, die hyperthermophile Substratcharakterisierung zur Versuchsreihe LBF II bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. **Tab. II.1.1.1-3** fasst die Biogasausbeuten der Leachbedfermentationsversuche LBF II und III sowie der zugehörigen Gasbildungstests zusammen. Anhand der Daten ist ersichtlich, dass die Trockenfermentation, gegenüber dem Referenztest nach VDI 4630, eine zum Teil deutlich verringerte Biogasausbeute aufzeigt. Mit Einstellung eines hyperthermophilen Temperaturregimes im Hydrolysereaktor zeigte sich eine um 36% verringerte Biogasausbeute, unter thermophilen Bedingungen konnten um 9% geringere Erträge ermittelt werden.

Tab. II.1.1.1-3: Darstellung der Biogasausbeuten der Gasbildungspotentialtests nach VDI 4630 gegenüber der Biogasausbeuten der Leachbedfermentation ohne Stripping.

Versuchsreihe	Biogasausbeuten nach VDI 4630	Biogasausbeuten der Leachbedfermentation	Differenz
	[I _N /Gesamt-FM]	[I _N /Gesamt-FM]	[I _N /Gesamt-FM] / [%]
LBF III (thermophil)	860,04	777,40	82,64 / 9,04
LBF II (hyperthermophil)	891,51	571,01	320,51/ 35,95

Untersuchungen stickstoffreicher Substrate im Leachbedfermentationssystem mit Kopplung eines batchbetriebenen Strippungssystems

Zur Etablierung eines hemmfreien und stabilen Fermentationsprozesses wurde aufbauend auf den Erkenntnissen der Versuchsreihen II und III, das zweistufige, zweiphasige Trockenfermentationssystem mit dem entwickelten Strippungssystem gekoppelt (**Abb. II.1.1.1-9, -10**). Der in Rot dargestellte Bypass diente der vollständigen Abkopplung des Anaerobfilters von dem durch die Strippung beeinflussten Perkolationskreislauf (Abb. II.1.1.1-9). Somit konnte gewährleistet werden, dass es bezüglich des Strippungsvorganges (Einstellung stark basischer pH-Werte und hoher Temperaturen) zu keinen negativen Auswirkungen der Mikrobiologie innerhalb des Anaerobfilters kommt. Die Entkopplung erfolgte nach der Durchführung der Versuche LBF IV und LBF V im Rahmen nachfolgend durchgeführter Versuchsreihen.

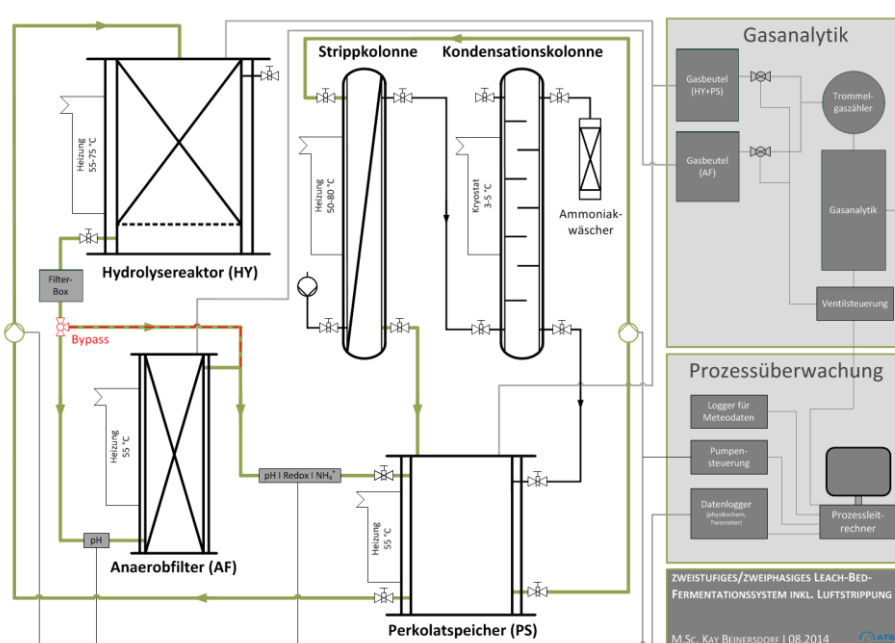


Abb. II.1.1.1-9: Verfahrensfliessbild des satzweisen Leachbedfermentationssystem mit Hydrolyse- reaktor, Anaerobfilter und Perkolatspeicher, ergänzt um ein System zur Luftstrippung. grün - Perkolatstrom, grau – Gasstrom/Gasanalytik, rot - nachträglich installierter Bypass

Erste Versuche mit Stickstoffentfrachten wurden zunächst unter Berücksichtigung thermophiler Temperaturen (55°C) durchgeführt, da hierbei bessere Biogasausbeuten zu erwarten waren (vg. Tab. II.1.1.1-3). Hyperthermophile Fermentationstemperaturen ($\approx 65^\circ\text{C}$) erzielten eine im Vergleich zur maximal erwartenden Biogasmenge 36 % niedrigere Biogasausbeute. Unter thermophilen Bedingungen betrug die Abweichung nur 9 %. Unter diesen Bedingungen wurden drei Untersuchungsreihen zur Strippung durchgeführt (LBF IV, LBF V, LBF VI). Bei Versuchsreihe **LBF IV** wurden neun Luftstrippversuche unter Berücksichtigung optimierter Einbauten (Düsen, Prallteller, Demister), Trägergasmen gen, Beschickung mit Prozessflüssigkeit, der Füllkörpermenge und Perkolattemperatur durchgeführt. Im Rahmen der Versuchsreihe **LBF V** wurde zusätzlich eine pH-Wert-Anpassung des der Strippungskolonne zugeführten Perkolates vorgenommen. Bei der Versuchsreihe **LBF VI** wurde das Fermentationssystem zusätzlich bei gleicher Hydrolysetemperatur (65°C) und angehobenen pH-Wert um einen Bypass zur Entkopplung des Anaerobfilters ergänzt. Die Filterbox (FB) diente der Abtrennung des mit

dem HTK in das System eingebrachten Sandes. Messungen der Redoxpotenziale, pH-Werte und Ammonium erfolgten am Ausgang des AF innerhalb einer mit Prozessflüssigkeit gefluteten extern installierten Messbox (MB); der pH-Wert wurde zusätzlich auch vor dem AF gemessen (Abb. II.1.1.1-10). Das Strippungssystem setzte sich aus Strippkolonne (SK, 85°C Arbeitstemperatur) und nachgeschalteter Kühlkolonne (KK, 5°C Arbeitstemperatur) zusammen.



Abb. II.1.1.1-10: Bild des satzweisen (hyper)thermophil betriebenen Leachbedfermentationssystem und dem entwickelten System zur Luftstrippung. Das Leachbedsystem setzt sich aus 2 Triplets zusammen, die aus Hydrolysereaktor (HR), Anaerobfilter (AF) und Perkolatspeicher (PS) bestehen. Filterbox (FB), Messbox (MB), Strippkolonne (SK), Kühlkolonne (KK)

Analog zum Referenztest unter thermophilen Temperaturen (vgl. LBF III) wurden die anlagenspezifischen Bedingungen sowie deren Konfiguration beibehalten. Die eingebauten Mengen an Substrat und Inokulum sowie deren spezifischen Eigenschaften entsprachen den in **Tab. II.1.1.1-4** aufgeführten Werten.

Tab. II.1.1.1-4: Darstellung der gemittelten (\pm SD) Einbaumengen und Substratparameter im Leachbedfermentersystem.

Komponente	Menge [kg FM]	Menge [kg oTS]	$N_{\text{Kjeld.}}$ [mg kg ⁻¹ FM]	$NH_4\text{-N}$ [mg kg ⁻¹ FM]	FOS/ TAC	ESÄ [g L ⁻¹]	pH
HTK	5,0 \pm 0,04	1,51 \pm 0,01	23655 \pm 5426,1	3926 \pm 682,4	-	7,3 \pm 1,7	-
Luzerne	5,0 \pm 0,05	2,03 \pm 0,03	14336 \pm 771,8	1183 \pm 91,8	-	4,1 \pm 2,3	4,5 \pm 0,1
Stroh	0,5 \pm 0,03	0,43 \pm 0,01	6050 \pm 512,0	78 \pm 0,5	-	-	-
Inokulum _(FEST)	5,0 \pm 0,01	0,38 \pm 0,03	3574 \pm 326,5	1107 \pm 403,7	0,30 \pm 0,1	1,3 \pm 1,3	7,7 \pm 0,4
Perkolat	25 \pm 1,5	0,20 \pm 0,03	2155 \pm 396,6	1611 \pm 512,0	0,13 \pm 0,1	0,31 \pm 0,1	8,3 \pm 0,5

Neben den Temperaturverläufen, pH und FOS/TAC, den prozessrelevanten Säurekonzentrationen der C₂-C₆-Fettsäuren sowie der Ammoniumkonzentrationen und der Redoxpotenziale wurden auch Gasquantität und –qualität während der Versuche erfasst (Abb. II.1.1.1-11 bis -15).

Während im Anaerobfilter ein konstantes Temperaturniveau zwischen 56 - 57°C eingestellt wurde (**Abb. II.1.1.1-11**), wiesen die Temperaturen der Hydrolysereaktoren bedingt durch die zweistündige Perkolationsrhythmik Fluktuation zwischen 53 und 58°C auf. Die stufenförmige Temperaturanpassung des Perkolats (LBF IV) von 55°C auf 68°C war für die Einstellung optimaler und effizienter Stripfungstemperaturen notwendig, da dadurch das Ammonium-Ammoniakgleichgewicht in Richtung flüchtigen Ammoniaks verschoben wurde.

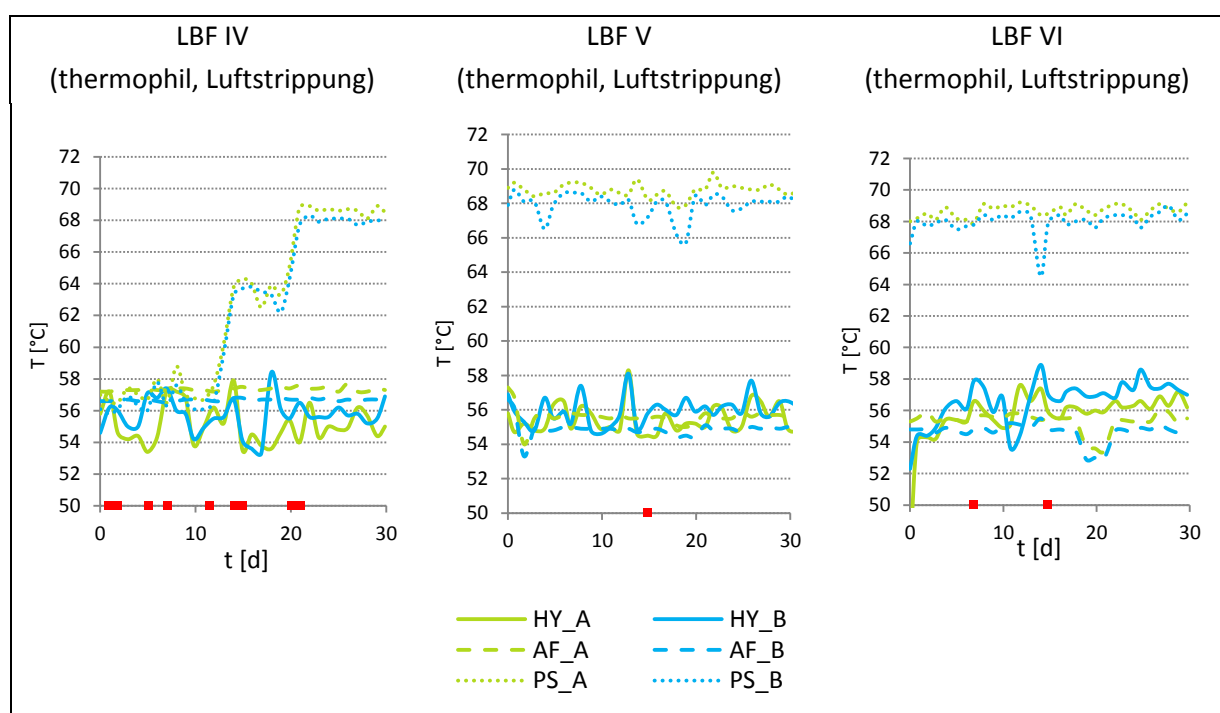


Abb. II.1.1.1-11: Temperaturverläufe der Versuchsreihen LBF IV, V und VI zur thermophilen Leachbedfermentation mit Stripfung; rot: Zeitpunkt der Stripfung.
HY – Hydrolyse, AF – Anaerobfilter, PS – Perkolatspeicher, A/B - System A/B)

Die in **Abb. II.1.1.1-12** dargestellten FOS/TAC- und pH-Wertverläufe für die Hydrolysestufe und Anaerobfilter zeigten im Vergleich mit den Referenzversuchen LBF II und III innerhalb der ersten fünf bis sieben Tage einen deutlichen Abfall des pH-Wertes von 9 bis zu 7,5 (LBF IV, LBF V) auf, welcher vermutlich aus der anfänglich starken Freisetzung organischer Säuren im Hydrolysefermenter resultierte. Die schwankenden pH-Wertverläufe der Versuchsreihe LBF VI resultierten zudem aus den für eine optimierte Stripfung herbeigeführten notwendigen pH-Wert- Anpassungen. Wie auch bei dem Referenzversuch (vgl. Abb. II.1.1.1-4) war bei LBF IV bis LBF VI ebenfalls ein rascher Anstieg des FOS/TAC-Wertes bis zum Tag 12 auf über 0,9 zu verzeichnen, der als Hinweis auf ein starkes Überangebot organischer Säuren gewertet werden konnte (Kaiser et al., 2008). Da der FOS/TAC-Wert jedoch ein anlagen- und substratspezifischer Wert ist, konnte eine pauschale Aussage zur Stabilität des Fermentationssystems allein auf Basis des FOS/TAC-Verlaufs nicht getroffen werden. Zusätzlich sollte das Redoxpotential sowie die Konzentrationen flüchtiger organischer Säuren als Parameter zur Beurteilung von Reaktorinstabilitäten herangezogen werden.

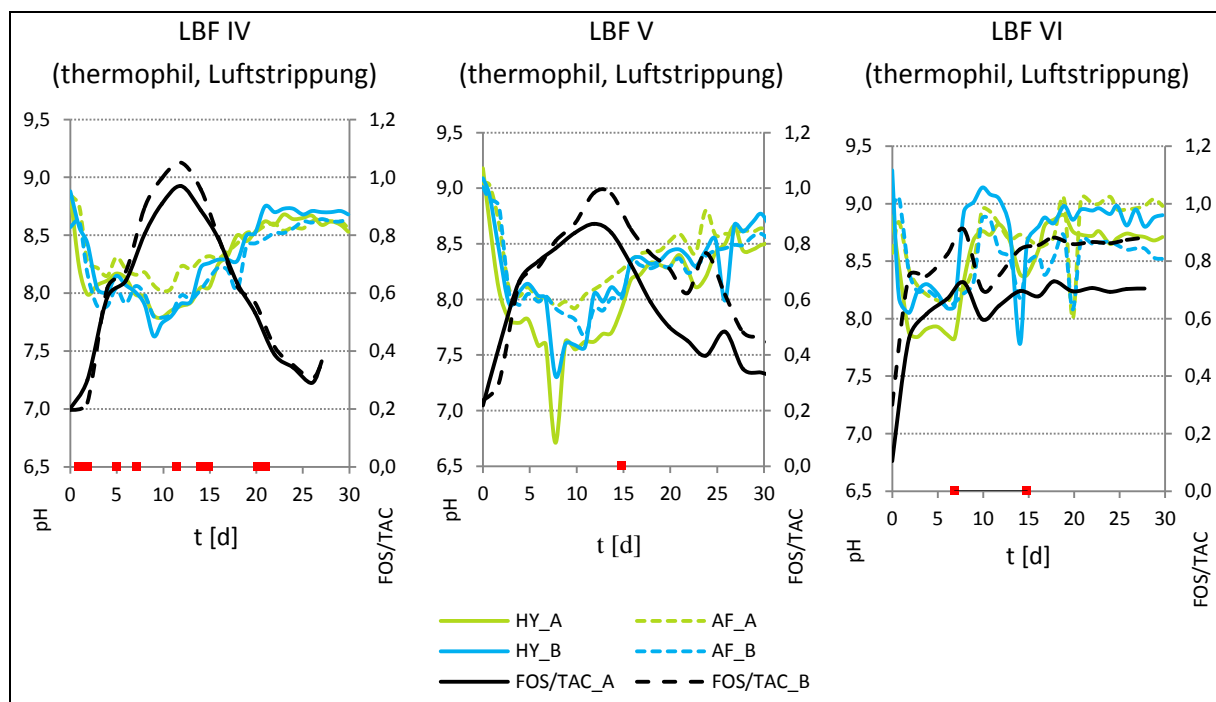


Abb. II.1.1.1-12: pH- und FOS/TAC-Verläufe der Versuche zur thermophilen Leachbedfermentation mit Strip-pung. rot: Zeitpunkte der Strip-pung, HY – Hydrolyse, AF – Anaerobfilter, PS – Perkolatspeicher, A/B - System A/B

Es wurde vermutet, dass die unterschiedlichen Kurvenverläufe der FOS/TAC-Werte auf die heterogene Chargen-Substratzusammensetzung sowie den vereinzelt auftretenden prozesstechnischen Störungen zurückzuführen waren, die zu einer plötzlichen Akkumulation organischer Säuren im Hydrolysefermenter oder Anaerobfilter führten.

Als zusätzlicher Indikator für eine Übersäuerung eignete sich die gemessene Konzentration an flüchtigen organischen Fettsäuren in der Flüssigphase (**Abb. II.1.1.1-13**). So wurde bei Versuchsreihe LBF IV eine Essigsäurekonzentration von bis zu 11 g L^{-1} und ein Essigsäureäquivalent von über 13 g L^{-1} festgestellt. Diese Konzentrationen lagen damit deutlich oberhalb der in der Literatur beschriebenen Grenzwerte von $3 - 4 \text{ g L}^{-1}$ (FNR, 2013). Auch das auf einen stabilen Fermentationsprozess hinweisende Essigsäure-Propionsäure-Verhältnis von 3:1 (Kaiser, 2007) wurde mit einem Maximum von circa 7,8:1 bei LBF IV bis LBF VI deutlich überschritten. Obwohl unter bestimmten Voraussetzungen im Fermentationsprozess ein Gesamtfettsäuregehalt von 10 g L^{-1} innerhalb einer stabilen anaeroben Degradation möglich ist (Linke, 2006), gilt dies jedoch stets unter Wahrung des genannten Essigsäure-Propionsäure-Verhältnisses sowie unter Berücksichtigung eines adäquaten pH- und FOS/TAC-Werteverlaufes (Schmack, 2000).

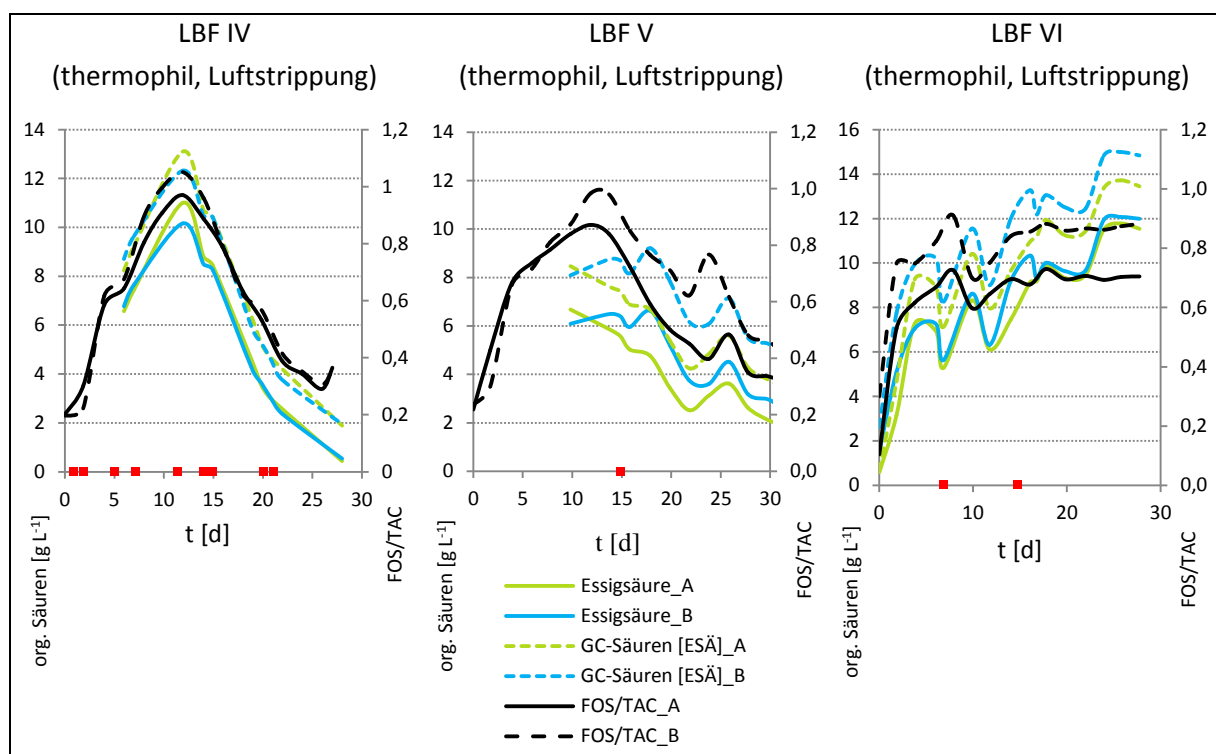


Abb. II.1.1.1-13: Konzentrationsverläufe organischer Säuren und FOS/TAC-Werte der Versuche zur thermophilen Leachbedfermentation mit Strippping im Anaerobfilter.
rot: Stripppversuche, A/B - System A/B, ESÄ - Essigsäureäquivalent

Während die angereicherten organischen Säuren in Versuchsreihe LBF IV und V (Abb. II.1.1.1-3) nach der Hälfte der Versuchszeit abgebaut und zu Biogas konvertiert wurden, kam es bei LBF VI zu einer im Versuchszeitraum anhaltenden Inhibierung. Dies wurde an der Zunahme der Säurekonzentrationen und einer stark verminderten Biogasproduktion deutlich (Abb. II.1.1.1-15). Als Ursache der Hemmung in LBF VI wurde die hohe $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration im Perkolat von $4000 - 4500 \text{ mg L}^{-1}$ zu Versuchsbeginn vermutet (Abb. II.1.1.1-14), welche aus der erhöhten Restkonzentration an Ammonium nach Versuchsreihe LBF V (ca. 3000 mg L^{-1}) und aus der beim Neustart mit dem Substrat HTK zusätzlich eingebrachte Stickstoffmenge resultierte. Die Redoxpotentiale der Versuchsreihen LBF IV bis LBF VI wiesen vergleichbar zu den vorangegangenen Versuchsreihen Schwankungen zwischen -300 bis -450 mV auf. Obwohl dieser Redoxpotenzialbereich nach Rieger & Weiland (2006) im Toleranzbereich der methanogenen Prozessbiozönose lag und für einen stabilen Fermentationsprozess spricht (Rieger & Weiland, 2006), gab insbesondere die Biogasqualität einen Hinweis auf eine eingetretene Störung (Abb. II.1.1.1-15).

Anhand der abgetragenen $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration ist die stark variierende Strippeffizienz der Stripppungsversuche ohne pH-Wert-Anpassung (LBF IV), des einstündigen Versuchs mit pH-Anpassung (LBF V) und des mehrstündigen Stripppungsversuchs mit pH-Anpassung (LBF VI) zu erkennen.

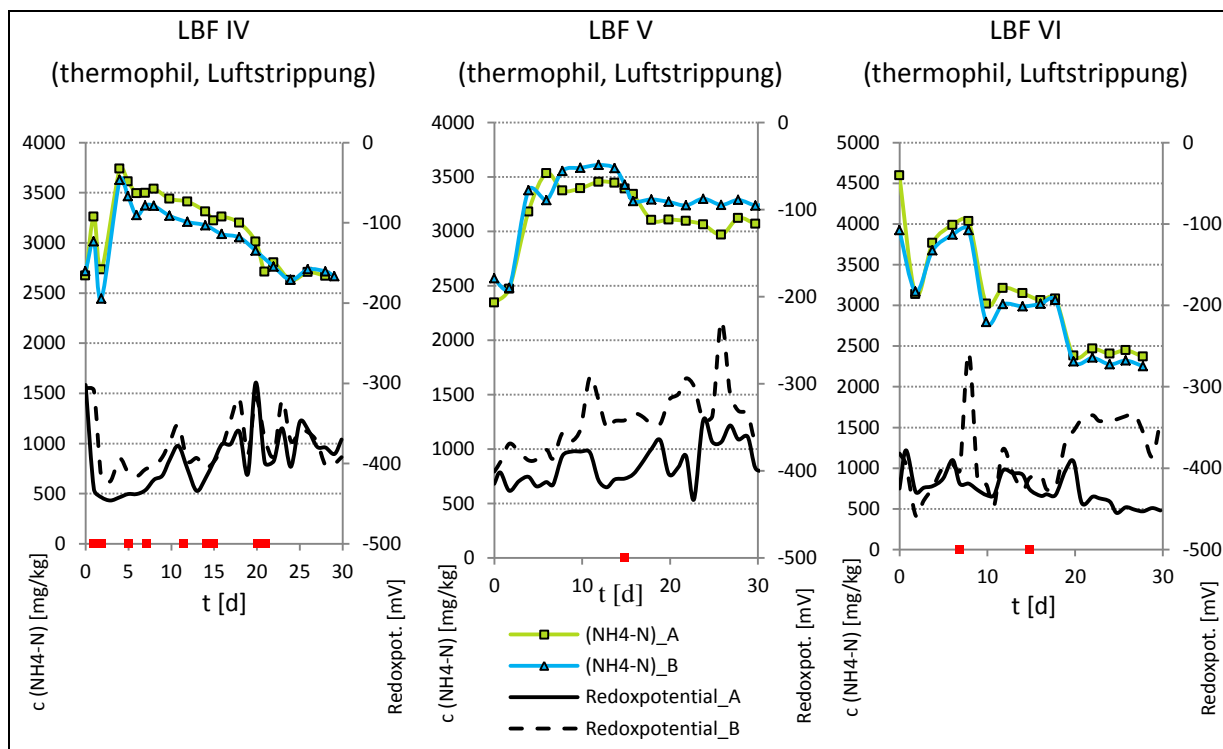


Abb. II.1.1.1-14: Darstellung der Ammoniumkonzentration und des Redoxpotentials der Versuche zur thermophilen Leachbedfermentation im Anaerobfilter mit Strippung.
Rot: Strippversuche, A/B - System A/B

Die Versuchsreihen LBF IV und V zeigten trotz einer Säureakkumulation infolge einer Ammoniakhemmung sehr gute Ergebnisse hinsichtlich der Biogasqualität (65 % - 70 % Methan) und -quantität (ca. $20\text{L}_N\text{ d}^{-1}$) (**Abb. II.1.1.1-15**). Analog zu den für Versuchsreihen II und III durchgeführten Gasbildungspotentialtests, wurden auch für die Versuchsreihen IV bis VI Gasbildungstests nach VDI 4630 durchgeführt, um die Biogasausbeute der Trockenfermentationsversuche mit Strippung beurteilen zu können. Die Gasausbeuten wurden im Doppelansatz bestimmt. Im Mittel betrug die Biogasausbeute bis zum Erreichen des Abbruchkriteriums ca. $126\text{ Normliter (L}_N\text{) pro Kilogramm Frischmasse (FM)}$.

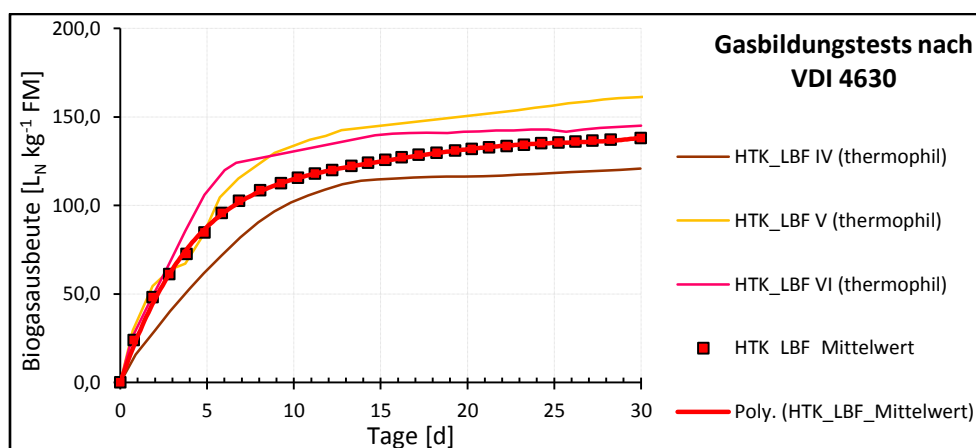


Abb. II.1.1.1-15: Darstellung der gemittelten, kumulierten Biogasausbeute von HTK der Versuchsreihen LBF IV bis VI nach VDI 4630.

Die in Abb. II.1.1.1-15 dargestellte Regressionsgerade (rot) zeigt für den verwendeten Hühnertrockenkot eine durchschnittliche Biogasausbeute von $126\text{ L}_N\text{ kg}^{-1}\text{ FM}$. Diese entspricht in etwa dem in

der Literatur genannten Mittelwert von $140 \text{ I}_N \text{ kg}^{-1} \text{ FM}$ (FNR, 2013). Wie in **Tab. II.1.1.1-9** aufgeführt, war bei beiden Durchläufen (LBF IV, LVF V) eine verminderte Biogasbildung im Vergleich zu den nach VDI 4630 ermittelten Biogasausbeuten festzustellen.

Tab. II.1.1.1-9: Darstellung der Biogasausbeuten der Gasbildungspotentialtests nach VDI 4630 gegenüber der Biogasausbeuten der zweistufigen/ zweiphasigen Trockenfermentation mit Strippung. Einbaumenge: 5 kg HTK, 5 Kg Inokulum, 0,5 Kg Stroh.

Versuchsreihe	Biogasausbeuten	Biogasausbeuten der Leachbedfermentation (Mittelwert A/B)	Differenz
	4630[I_N /Gesamt-FM]	[I_N /Gesamt-FM]	[I_N /Gesamt-FM] / [%]
LBF IV (thermophil)	805,4	732,4	73,00 / 9,1
LBF V (thermophil)	1002,6	791,6	320,51 / 21,1
LBF VI (thermophil)	834,0	333,4	500,6 / 60,0

Ein Vergleich der Biogasqualität im Anaerobfilter der Referenzversuche LBF II und LBF III ohne Strippung (Abb. II.1.1.1-5) mit den Daten der Versuchsreihen LBF IV und V mit Strippung (**Abb. II.1.1.1-16**) zeigte ebenfalls eine starke Übereinstimmung in der Zusammensetzung des Biogases. Dem gegenüber zeigte die Biogasqualität der Versuchsreihe LBF VI über den 30-tägigen Versuchszeitraum deutliche Anzeichen einer anhaltenden Hemmung des Fermentationsprozesses (Abb. II.1.1.1-16). Methananteile von 30 % bis 60 % im Hydrolysefermenter sowie starke Schwankungen der Methankonzentration im Anaerobfilter bestätigen die festgestellte, anhaltende Prozessstörung. Es wurde abgeleitet, dass die Stickstoffelimination mittels Luftstrippung keinen signifikanten Einfluss auf die Biogaszusammensetzung im Hydrolysereaktor und Anaerobfilter hatte. Jedoch könnte die Biogasmenge kurzfristig durch die zur Strippung notwendige pH-Wertanpassung negativ beeinflusst worden sein. Ferner ist zu bemerken, dass der Einfluss der Strippung auf den Biogasprozess insbesondere von der Adaptionfähigkeit der mikrobiellen Gemeinschaft auf die veränderten Konzentrationen relevanter Stickstoffspezies bedingt wurde.

Der durchgeführte Strippversuch der Versuchsreihe **LBF IV** erzielte nach einer stufenweisen Anhebung der Perkolattemperatur von 55°C auf 68°C , dem Verbauen verstopfungsfreier Düsen und 9 maliger Strippung (Strippdauer von ca. 2 h, eine längere Strippungsdauer erbrachte keine weitere Verringerung der Ammoniumfrachten) Abbauraten von maximal 17 % bzw. eine Absenkung der $\text{NH}_4\text{-N}$ Konzentration von 3242 mg L^{-1} auf 2690 mg L^{-1} . Diese Ergebnisse zeigten weiteren Optimierungsbedarf bei der Einstellung prozessbestimmender Parameter. Als Konsequenz wurde, neben der Aufrechterhaltung der Prozesstemperatur von 68°C , die Notwendigkeit zur pH-Wert-Erhöhung des Perkolats vor der Strippung abgeleitet.

Daher wurde der Anaerobfilter während der Strippzyklen vom Gesamtprozess entkoppelt und im Anschluss an den Versuchsdurchlauf **LBF V** der in Abb. II.1.1.1-9 dargestellte Bypass installiert, sodass bei Versuchsreihe **LBF VI** der Anaerobfilter während der Strippung erstmalig vom System vollständig entkoppelt wurde. Zudem wurden zwei Strippversuche durchgeführt. Zunächst wurde der pH-Wert im Perkolatspeicher auf 9,8 (1. Strippung) bzw. 11,4 (2. Strippung) angehoben und anschließend dreimal pro Strippzyklus für je eine Stunde gestrippt, wobei zwischen den Wiederholungen jeweils eine Stunde pausiert wurde. Während dieser Zeit blieb der Anaerobfilter komplett entkoppelt, die

Perkolation lief jedoch weiter, um auf diesem Wege das gesamte im System befindliche Perkolat (AF ausgenommen) einer Strippung zu unterziehen.

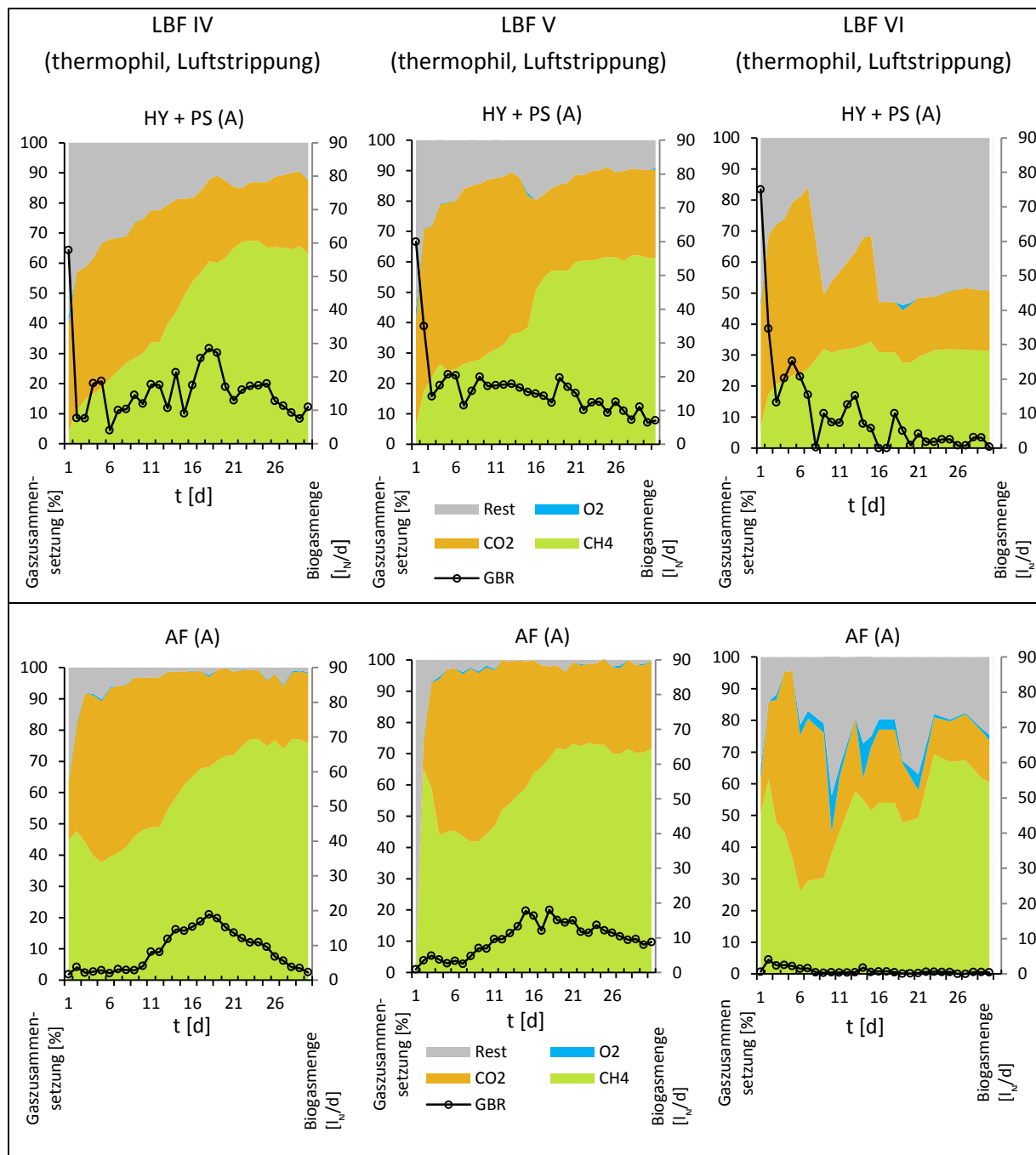


Abb. II.1.1.1-16: Darstellung der Gaszusammensetzung (CH₄, CO₂, O₂ und Spurengase) und Biogasmenge der Versuche LBF IV, V und VI zur thermophilen Leachbedfermentation mit Strippung.
HY – Hydrolyse, AF – Anaerobfilter, PS – Perkolatspeicher, GBR– Gasbildungsrate, System B

In **Abb. II.1.1.1-17** sind die pH-Wertverläufe der Versuchsreihe LBF VI sowie die Verläufe der NH₄-N-Konzentration, des FOS/TAC-Wertes und des Redoxpotentials dargestellt. Zu erkennen sind die aufgrund der Freisetzung organischer Säuren, hohen Start- und Endwerte des pH-Wertes im Anaerobfilter (max. pH-Wert T_{0(B,AF)}=9,29; T_{30(A,AF)}=8,98) in Verbindung mit einem für einen Batch-Prozess typischen Absinken des pH-Wertes innerhalb der ersten 10 Tage.

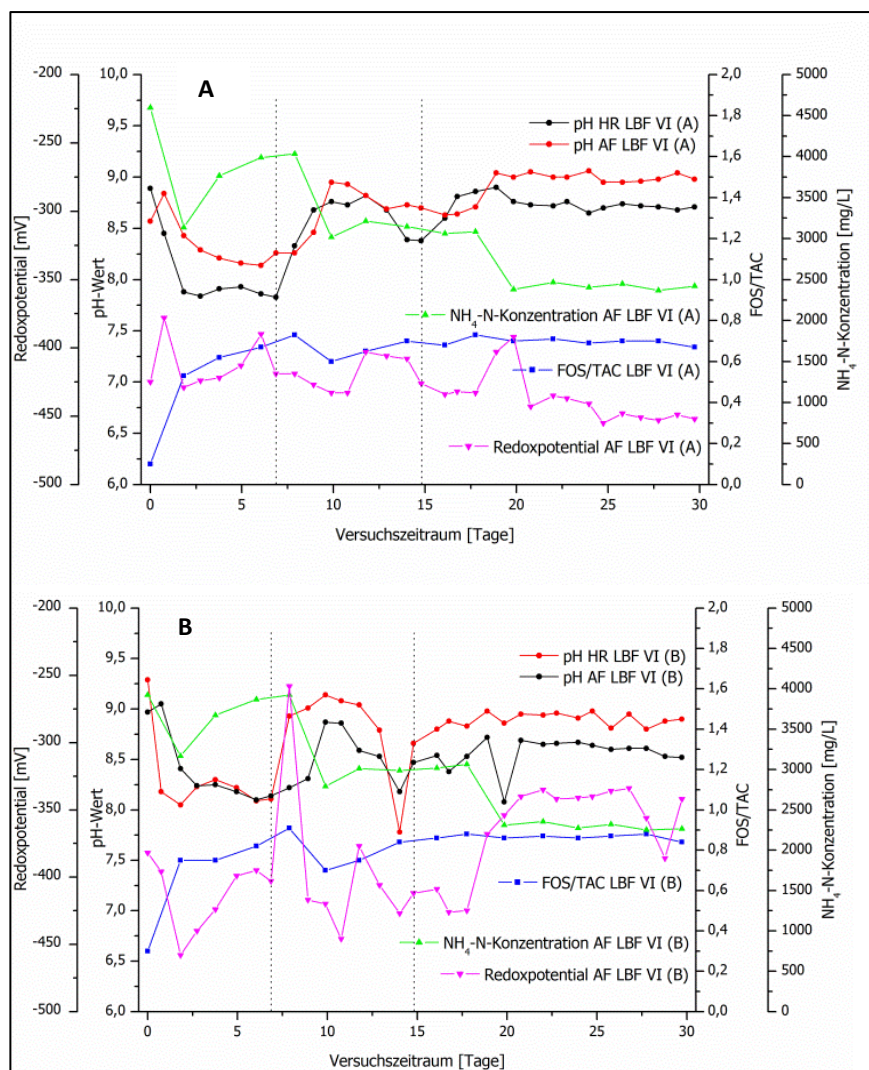


Abb. II.1.1.1-17: Darstellung der pH-Wert-, Ammonium- und FOS/TAC-Wertverläufe sowie des Redoxpotentials im redundanten Versuchsansatz LBF VI System A - oben, System B - unten. gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

Zum Zeitpunkt der Strippung (Tag 7, 15) wurden als Folge der erzeugten pH-Werterhöhung und nachfolgenden pH-Absenkung der Prozessflüssigkeit deutliche Fluktuationen im ansonsten nahezu konstanten pH-Wertverlauf festgestellt. Zudem ist die Wirkung der Strippung anhand des starken Absinkens der gemessenen NH₄-N-Konzentration (von ca. 4 g/mL auf 3 g/mL) am Tag 10 und Tag 19 erkennbar. Die sich einstellende Verzögerung zwischen Strippungszeitpunkt und Absinken der NH₄-N-Konzentration wurde durch die benötigte Zeit bedingt, die für die Passage der behandelten Prozessflüssigkeit vom Perkolatspeicher zum Anaerobfilter (als Ort der Probenahme) notwendig war.

Abb. II.1.1.1-18 A, B stellt die Freisetzung organischer Säuren im Fermentationsverlauf dar. Im Vergleich zu den Versuchsreihen LVF III bis V ist der abweichende Verlauf der organischen Säuren sowie des Essigsäureäquivalenten (Maximum bei Tag 15) auf die pH-Anhebung und Senkung der Perkolationsflüssigkeit zurückzuführen. Durch die Variation des pH-Wertes könnte es zu einer kurzfristigen, reversiblen Störung der mikrobiellen Gemeinschaft gekommen sein, so dass sich die Bildung organischer Säuren verzögerte - bis zum Zeitraum zwischen Tag 25 - 27.

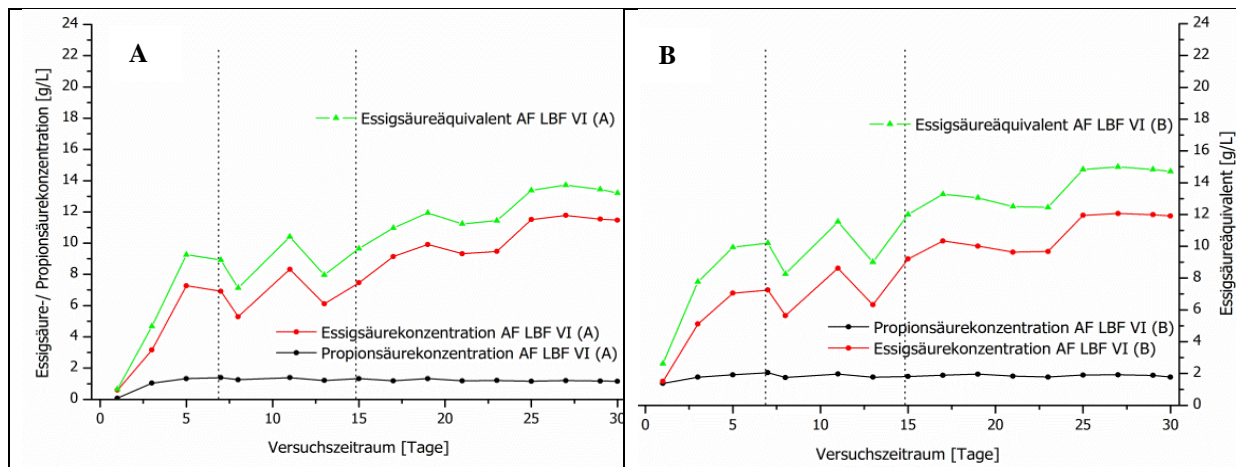


Abb. II.1.1.1-18: Darstellung der Verläufe der organischen Fettsäuren (Essigsäure und Propionsäure) sowie des Essigsäureäquivalenten im redundanten Versuchsansatz LBF VI. System A – links, System B – rechts, gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

In **Abb. II.1.1.1-19** sind die kumulative Biogasmenge sowie die gemessene Methankonzentration des Hydrolysereaktor und des Perkolatspeichers dem Anaerobfilter gegenübergestellt. Im Vergleich zu den Versuchsreihen LBF III bis V zeigte sich die Methankonzentration und Biogasbildung unmittelbar nach Tag 7 und 15 im Anaerobfilter deutlich von der pH-modulierten Strippung beeinflusst (Abb. II.1.1.1-18 A). Neben einer abnehmenden bis hin zu einer stagnierenden Biogasbildung an den Folgetagen nach der Strippung, war zudem auch ein Absinken der Methankonzentration eine Folge der Veränderung des pH-Wertes im Fermentationssystem. Insbesondere die Veränderung der Methankonzentration des Anaerobfilters (System A) am Tag 10 und 18 sowie die erkennbare pH-Wertvariation reflektierten die Strippungsaktivität.

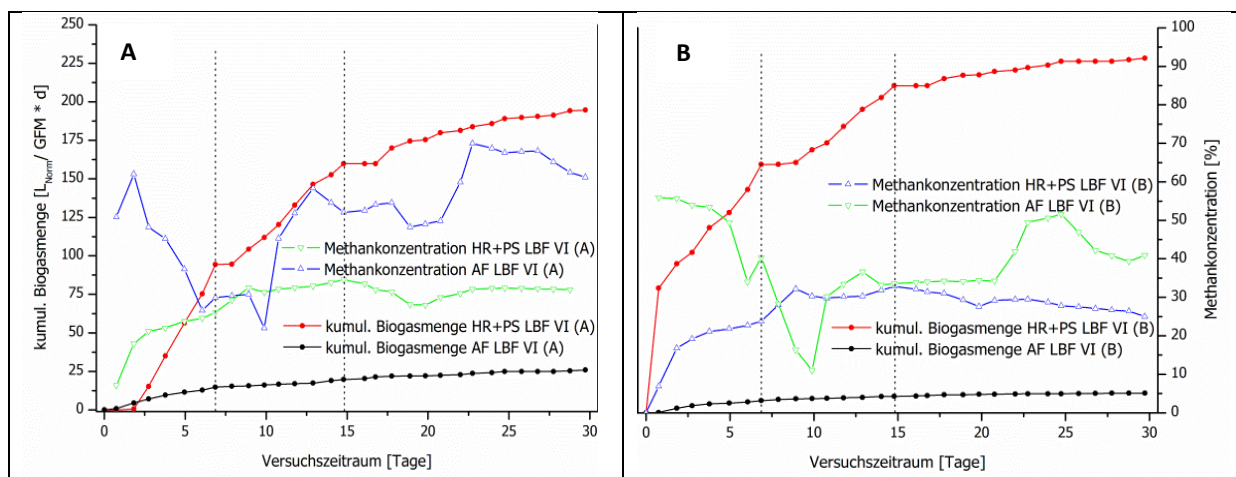


Abb. II.1.1.1-19: Darstellung der Verläufe der kumulativen Biogasmenge sowie der gemessenen Methankonzentration im redundanten Versuchsansatz LBF VI; Ergebnisse des Hydrolysereaktor und des Perkolatspeichers sind dem Anaerobfilter gegenübergestellt. System A – links, System B – rechts, gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

Dabei beeinflusste die Strippung die Methankonzentration jedoch nur kurzfristig (ca. 3 Tage), wodurch diese nach einer Abnahme wieder rapide anstieg. Ein ähnliches stagnierendes Verhalten wurde für die Biogasbildung der Hydrolysereaktoren an den Folgetagen nach der Strippung (Tag 7 und 15) festgestellt. Jedoch war eine Änderung in der Methankonzentration des produzierten Bioga-

ses nicht erkennbar. Folglich konnte anhand des hyperbolischen Verlaufes der Biogasertragskurven (Abb. II.1.1.1-19 A, B) abgeleitet werden, dass die kurzzeitige stagnierende Biogasbildung unmittelbar nach der Strippung keine Auswirkungen auf den sich am Ende des fermentativen Prozesses einstellenden Biogas-Gesamtertrag hatte.

Im Anschluss an die Versuchsreihe VI wurden vier weitere Langzeituntersuchungen (je 30 Tage) zur Vermeidung von Ammonium-/Ammoniak-Hemmungen beim Einsatz von stickstoffreichen Substraten (Hühnertrockenkot, HTK) durchgeführt (**Tab. II.1.1.1-10**). Analog zu den vorangegangenen Versuchsreihen III bis VI wurden die anlagenspezifischen Bedingungen sowie deren Konfiguration beibehalten. Dabei kam ebenfalls die bereits beschriebene Luftstrippung zum Einsatz, mit entkoppeltem Anaerobfilter zur Trennung des Strippungs- und Perkolationskreislaufes analog zur Versuchsreihe VI.

Tab. II.1.1.1-10: Versuchsreihen zur Fermentation von Hühnertrockenkot im Leadbedfermenter.

Versuchsreihe	Substrat	Spezifikationen	
		Temperaturregime	Strippung
LBF VII	HTK	thermophil	Luftstrippung
LBF VIII	HTK	thermophil	Luftstrippung
LBF IX	HTK	thermophil	Luftstrippung
LBF X	Luzerne	thermophil	Luftstrippung

Die weiterführenden Versuchsreihen LBF VII bis X waren nach Identifikation einer Vorzugsvariante für die Stripphäufigkeit- und -dauer, durch eine Variation der Strippzeitpunkte und Strippungsdauer im Versuchszeitraum gekennzeichnet. In **Abb. II.1.1.1-20** sind die gemessenen Temperaturfluktuationen für die verschiedenen Reaktorkompartimente beispielhaft für LBF-Versuch IX dargestellt.

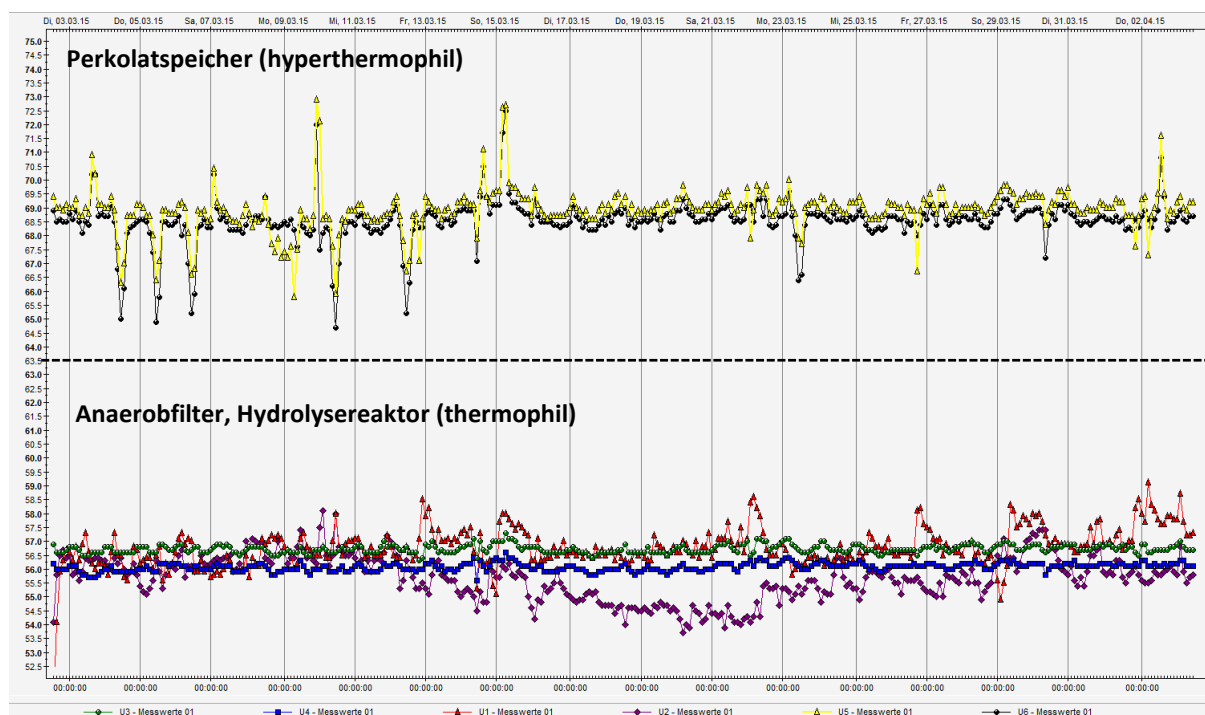


Abb. II.1.1.1-20: Temperaturfluktuationen innerhalb der Systemkomponenten des thermophilen LBF-Versuchs IX. U1, U2: Hydrolysefermenter (rote, violette Linie), U3, U4: Anaerobfilter (grüne, blaue Linie), U5, U6: Perkolatspeicher (gelbe, schwarze Linie)

Während die Anaerobfilter (blaue und grüne Linie, Abb. II.1.1.1-20) ein konstantes Temperaturniveau zwischen 55 - 57°C aufwiesen, erreichten die Temperaturen der Hydrolysereaktoren (rot und lila Linie) bedingt durch die zweistündige Perkolationsrhythmik Fluktuation Werte zwischen 53 und 58°C. Überdies führten die sechsmal stattfindenden Strippungen in LBF VIII und IX für je vier Stunden zu einer kurzfristigen, jedoch starken Senkung der Temperatur im Perkolatspeicher (gelbe und schwarze Linie; Zacken nach unten: Strippung). Diese resultierten aus den langen Leitungsstrecken zwischen Strippungskolonnen und Perkolatspeicher und der damit verbundenen Temperatursenkung. Um Temperaturschwankungen und -differenzen in den Leitungsstrecken zwischen dem Perkolatspeicher und den Strippungskolonnen sowie zwischen dem Perkolatspeicher und dem Hydrolysereaktor zu minimieren, wurde die Temperatur im Perkolatspeicher auf 68°C erhöht.

Wie in **Abb. II.1.1.1-21** zu erkennen ist, entsprachen die konstant niedrigeren pH-Werte in den Anaerobfilter der Versuchsreihe LBF VII nicht dem üblichen Verlauf und dabei nicht dem generellen Anstieg nach ca. 1/3 der Versuchszeit (vgl. hierzu LBF IV, V und VIII). Diese Abweichung resultierte aus der in **Abb. II.1.1.1-22** erkennbaren Akkumulation organischer Säuren und war die Folge der vollständigen Hemmung des Fermentationsprozesses.

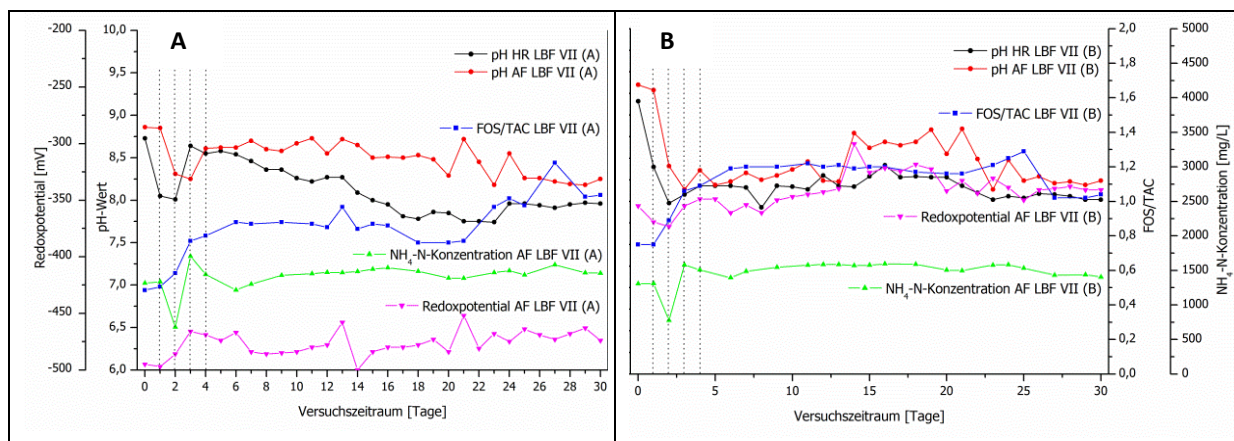


Abb. II.1.1.1-21: Darstellung der pH-Wert-, Ammonium- und FOS/TAC-Wertverläufe sowie des Redoxpotentials im redundanten Versuchsansatz LBF VII. System A – links, System B – rechts, gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

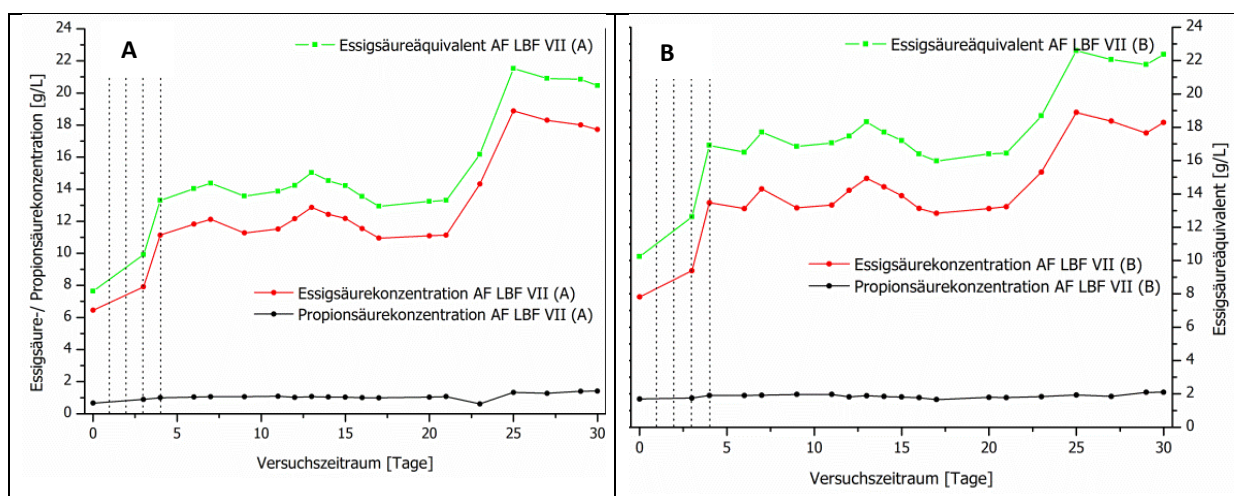


Abb. II.1.1.1-22: Darstellung der Verläufe der organischen Säuren Essigsäure und Propionsäure sowie des Essigsäureäquivalenten als Summenparameter im redundanten Versuchsansatz LBF VII. System A – links, System B – rechts, gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

Der Verlauf der gehemmten Versuchsreihe LBF VI zeigte nach einem anfänglichen Anstieg einen dauerhaft hohen FOS/TAC-Koeffizienten auf, welcher sich auf ein konstantes Niveau von 1,2 einstellte und ebenfalls das Ergebnis eines gehemmten Säureabbaus war. Ferner wiesen die dargestellten Redoxpotential-Verläufe, im Vergleich zu den Versuchsreihen LBF II bis LBF VI, vergleichbare Ausprägungen zwischen -300 bis -500 mV auf. Trotz zum Teil deutlichen Schwankungen lag der gemessene Redoxpotentialbereich nach Rieger & Weiland (2006) im Toleranzbereich der methanogenen Prozessbiozönose, was auf ein ausreichend reduzierendes und erforderliches (energiereiches) Milieu für eine effiziente Methanogenese hindeutete.

Einer möglichen Hemmung der Biogasbildung aufgrund der NH_4 -Konzentration im Versuch LBF VII kann entgegen gehalten werden, dass diese mit durchschnittlich $1500 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4\text{-N}$ unterhalb der in der Literatur beschriebenen Hemmgrenze lag (FNR, 2010). Es konnte vermutet werden, dass die Stagnation der anaeroben Fermentation eine Spätfolge der Ammonium-/Ammoniakkonzentration vorangegangener Versuchsreihen LBF VI war (Startkonzentration in LBF VI: $> 4000 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4\text{-N}$; durchschnittliche Konzentration in LBF VI: $3023,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4\text{-N}$).

Es konnte innerhalb von LBF VII eine gestörte Methanbildung festgestellt werden (**Abb. II.1.1.1-23**). Insbesondere schienen die methanogenen Mikroorganismen im Anaerobfilter B von der Hemmung betroffen zu sein. Dem gegenüber war bei dem Hydrolysereaktor und dem Anaerobfilter des Versuchsansatzes A eine anfänglich (bis Tag 12) leichte Biogasbildung erkennbar. Ferner konnte hinsichtlich der Quantität als auch der Qualität des Biogases in LBF VII (A, B) festgestellt werden, dass bereits zu Versuchsbeginn eine Hemmung vorlag. Diese Hemmung wurde durch die Anreicherung organischer Säuren (siehe FOS/TAC – Verlauf; vgl. Abb. II.1.1.1-21) deutlich und könnte durch diese weiter verstärkt worden sein.

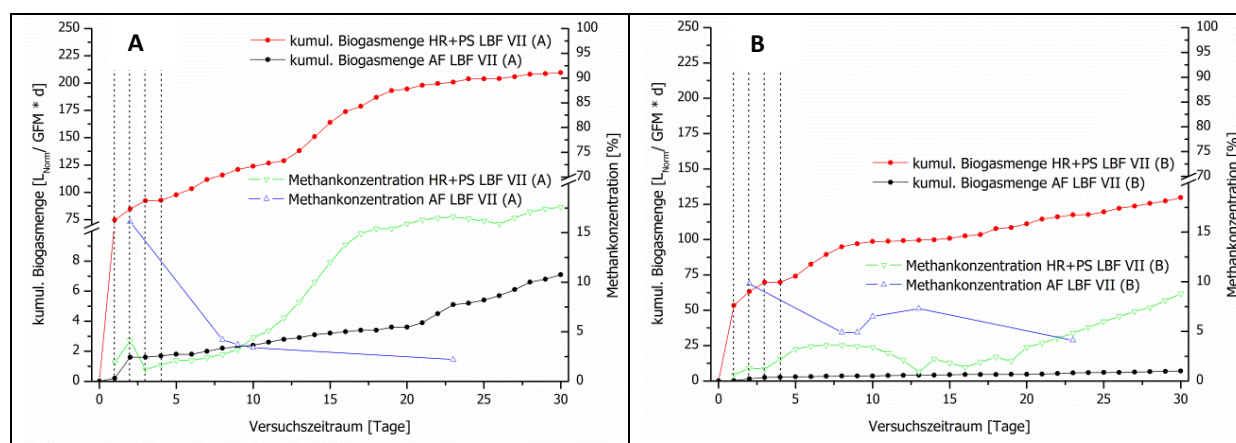


Abb. II.1.1.1-23: Darstellung der Verläufe der kumulativen Biogasmenge sowie der gemessenen Methankonzentration im redundanten Versuchsansatz LBF VII.

System A – links, System B – rechts, gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

In **Abb. II.1.1.1-24** sind die neben den pH-Wertverläufen des Hydrolysereaktors und Anaerobfilters zudem der FOS/TAC-Wertverlauf des LBF VIII aufgetragen. Wie zu erkennen ist, sanken die pH-Werte beider Reaktorkompartimente (pH-Wertänderung der AF: von im Mittel 8,9 auf 8,05) im redundanten Ansatz innerhalb der ersten 5-7 Tage ab, begleitet von einem Anstieg des FOS/TAC-Wertes bis zu einem Maximum am Tag 8 bis 12 (FOS/TAC ca. 1,5). Dabei war zu erkennen, dass der pH-Wert des Anaerobfilters über dem des Hydrolysereaktors lag.

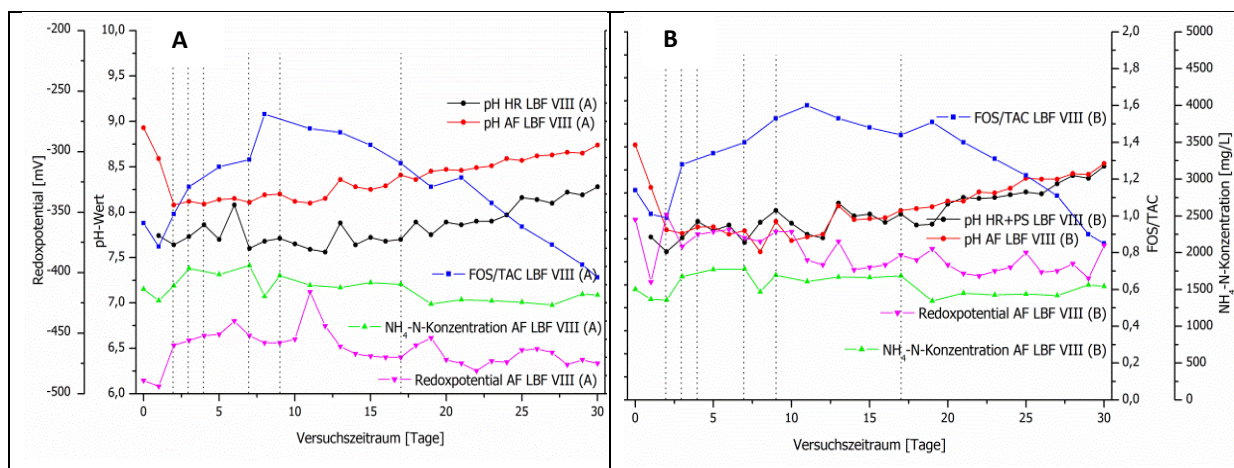


Abb. II.1.1.1-24: Darstellung der pH-Wert-, Ammonium- und FOS/TAC-Wertverläufe sowie des Redoxpotentials im redundanten Versuchsansatz LBF VIII. System A – links, System B – rechts, gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

Die Kurvenverläufe resultieren aus der Freisetzung leicht verfügbarer organischer Säuren im ersten Drittel des Untersuchungszeitraumes, wobei die verfügbare Essigsäure durch die methanogenen Mikroorganismen im Anaerobfilter bereits frühzeitig zu Biogas konvertiert wurde. Die NH₄-N-Konzentration konnte im gesamten Versuchszeitraum durch die entwickelte Strippungsstrategie unterhalb eines prozesskritischen Niveaus (< 1500 mg L⁻¹) gehalten werden.

Der Verlauf des FOS/TAC-Wertes im Anaerobfilter mit einem Maximum zwischen Tag 8 – 12, spiegelte sich in der Akkumulation der organischen Säuren wieder (**Abb. II.1.1.1-25**). Fraglich blieb, ob in diesem Zustand die leicht verfügbaren organischen Säuren größtenteils vollständig freigesetzt wurden, oder ob eine selbstinduzierte Säurehemmung vorlag, die die weitere Freisetzung organischer Säuren durch mikrobielle Prozesse hemmte.

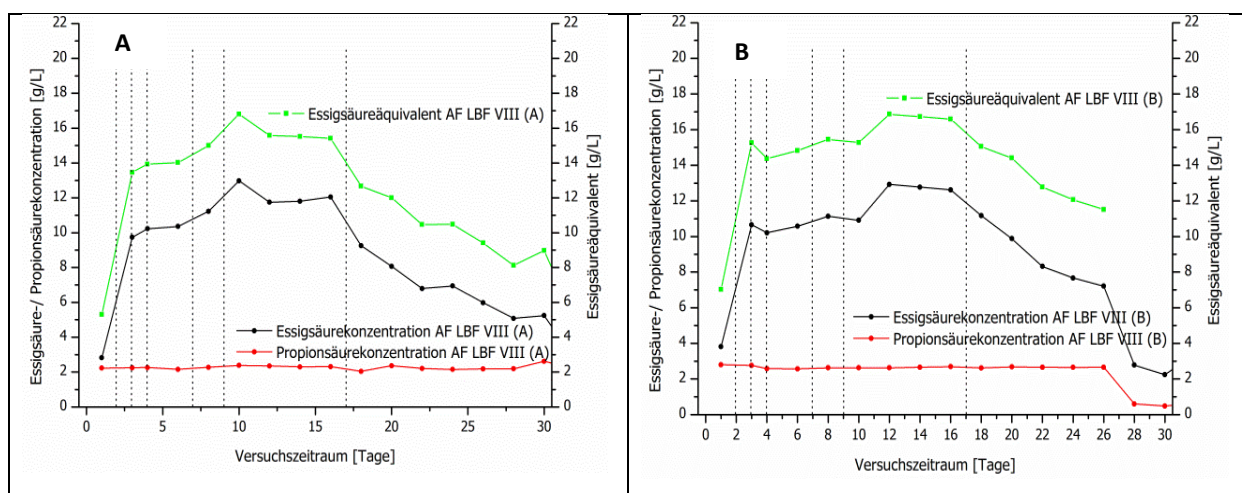


Abb. II.1.1.1-25: Darstellung der Verläufe der organischen Säuren Essigsäure und Propionsäure sowie des Essigsäureäquivalenten als Summenparameter im redundanten Versuchsansatz LBF VIII. System A – links, System B – rechts, gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

Bei Betrachtung der in **Abb. II.1.1.1-26** dargestellten Biogasbildung wurde deutlich, dass Hydrolysereaktor und Anaerobfilter eine unterschiedliche Einfahrphase durchliefen, und dass folglich der

Verlauf der Essig- und Propionsäurekonzentration hinsichtlich der jeweiligen Reaktorkompartimenten variierte.

Wie zu erkennen war, wurden prozesskritische maximale Konzentrationen von circa 17 g L^{-1} Essigsäureäquivalent erreicht (FNR, 2013). Dem gegenüber konnte beobachtet werden, dass das Essigsäure-Propionsäure-Verhältnis, wie in Kaiser et al. (2008) beschrieben, stets über dem minimalen und für einen stabilen Prozess notwendigen Verhältnis von 3:1 lag.

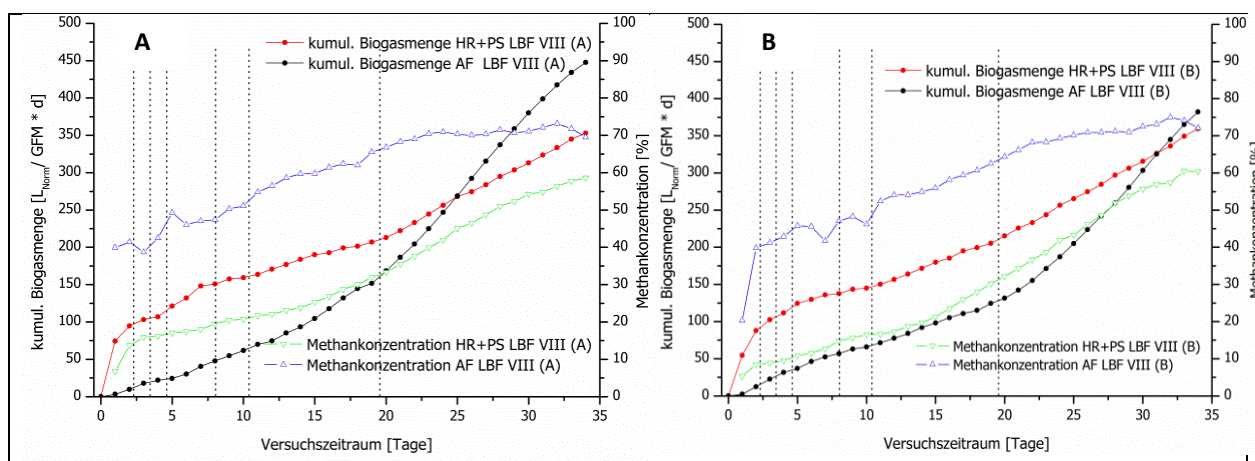


Abb. II.1.1.1-26: Darstellung der Verläufe der kumulativen Biogasmenge sowie der gemessenen Methankonzentration im redundanten Versuchsansatz LBF VIII. Ergebnisse des Hydrolysereaktor und des Perkolatspeichers sind dem Anaerobfilter gegenübergestellt. System A - links, System B - rechts, gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

Die kumulierte Biogasmenge des Hydrolyse- und Perkolatreaktors innerhalb des LBF VIII lag während des gesamten Versuchszeitraumes überwiegend über der in den Anaerobfiltern produzierten Biogasmenge, was tendenziell für ein mikrobiell stabiles System sprach (Abb. II.1.1.1 -16 A, B). Dem gegenüber war die Methankonzentration des im Anaerobfilter produzierten Biogases (Maximum: 74 % CH_4) stets größer als im Hydrolysefermenter (Maximum: 59 % Methan). In beiden Reaktorkompartimenten war sowohl für die Biogasmenge als auch für Methankonzentration eine stete Zunahme zu erkennen.

Mit Blick auf den Verlauf der organischen Säuren in Abb. II.1.1.1-10 konnte geschlussfolgert werden, dass die mikrobielle Umsetzung der organischen Säuren zu Biogas erst ab Tag 9 effektiv stattfand. Diese Tatsache kann darauf zurückgeführt werden, dass die durch Strippung herbeigeführte Elimination des Stickstoffs einer Inhibierung des Ammoniums und Fettsäuren zeitverzögert entgegenwirkte. Hinsichtlich der Biogasbildung des Anaerobfilters konnte festgestellt werden, dass die organischen Säuren bereits zu Versuchsbeginn (ca. ab Tag 3-4) zu Biogas mit einem hohen Methangehalt (> 40 %) verstoffwechselt wurden. Bei Betrachtung des Verlaufs der Methankonzentration im Hydrolysereaktor wurde deutlich, dass erst ab Tag 22-25 die Schwachgasgrenze überschritten wurde (Methangehalt > 40 %). Dies verdeutlicht einerseits die lange Einfahrphase des Hydrolysereaktors (definiert über die minimale Methankonzentration im Biogas) und andererseits die Notwendigkeit zur externen Entfrachtung der organischen Säuren über den Anaerobfilter, um die Gesamt-Einfahrphase auf eine Dauer von durchschnittlich 13 Tagen zu reduzieren.

In **Abb. II.1.1.1-27** ist ein batch-typischer Verlauf des pH-Wertes und FOS/TAC im Rahmen von LBF IX zu erkennen. Entsprechend dem Absinken des pH-Wertes durch die Freisetzung leicht verfügbarer organischer Säuren, konnte im selben Zeitraum bis Tag 12 ein Anstieg des FOS/TAC-Wertes im Anaerobfilter verzeichnet werden (im Mittel 1,48).

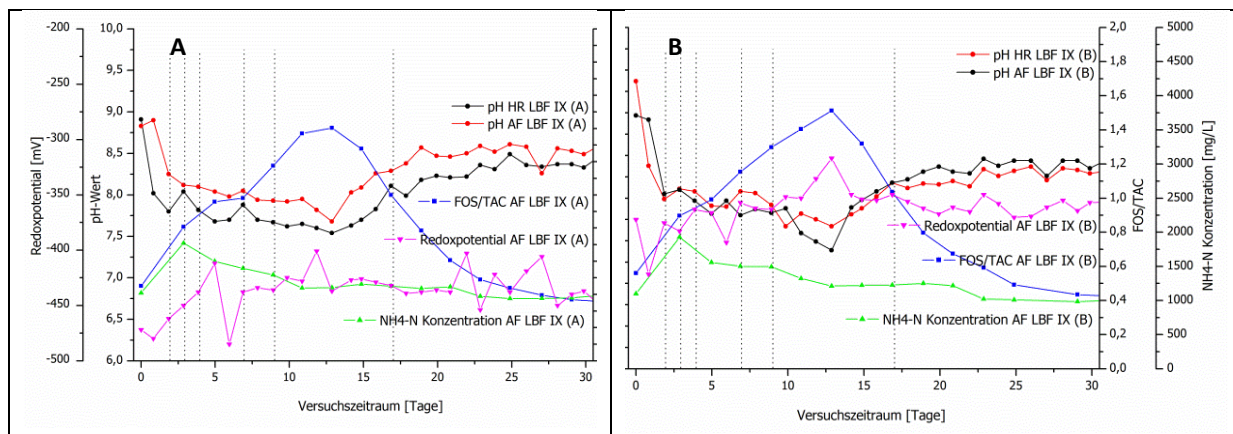


Abb. II.1.1.1-27: Darstellung der pH-Wert-, Ammonium- und FOS/TAC-Wertverläufe sowie des Redoxpotentials im redundanten Versuchsansatz LBF IX. System A – links, System B – rechts, gestrichelte Linie: Strippungszeitpunkt

Das Redoxpotential wies stets negative Werte auf, was auf ein optimal reduzierendes anaerobes Milieu zur Erzielung effizienter Wachstumsvorgänge schließen lässt. Erkennbare Fluktuationen des Redoxpotentials könnten eine Folge der durchgeführten Strippungen sein und folglich aus der Veränderung der Quantität und Qualität reduzierender und oxidierender Reaktionen resultieren. Die Verwendung der entwickelten Strippungsmethodik führte zu einer Reduzierung der Ammoniumbelastung im Fermentationssystem auf durchschnittlich $1142 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1}$ und einer maximalen Fracht von $1543 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1}$.

Entsprechend des im Anaerobfilter erkennbaren Anstiegs des FOS/TAC-Wertes (Abb. II.1.1.1-12) und der gleichzeitigen Abnahme des pH-Wertes auf im Mittel pH 7,58 bis Tag 12, ist in **Abb. II.1.1.1-28** ein Anstieg der organischen Säuren des LBF IX zu erkennen.

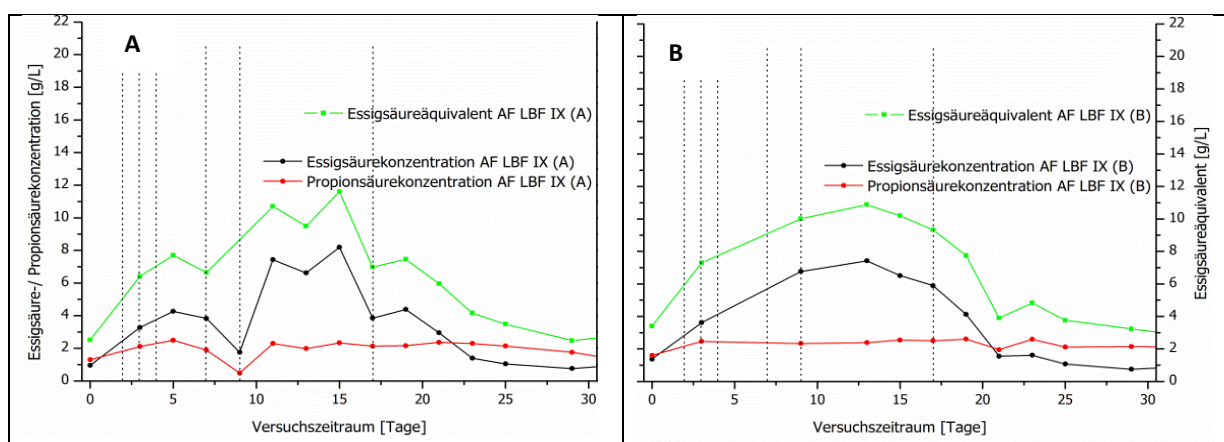


Abb. II.1.1.1-28: Darstellung der Verläufe der organischen Säuren Essigsäure und Propionsäure sowie des Essigsäureäquivalenten als Summenparameter im redundanten Versuchsansatz LBF IX. System A – links, System B – rechts, gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

Abweichend zu dem Verlauf der organischen Säuren der Versuchsreihe LBF VIII konnte ab Tag 15 - 17 eine Abnahme des Essigsäure-Propionsäure-Verhältnisses zugunsten der Propionsäure detektiert werden. Ab Tag 21 wurde mehr Propionsäure als Essigsäure in der Prozessflüssigkeit gemessen, was als Indiz für eine Störung der anaeroben Fermentation und eine mögliche Hemmung der methanogenen Mikroorganismen gewertet werden konnte (Gallert & Winter, 2008; Ma et al., 2009).

Bei Betrachtung der in **Abb. II.1.1.1-29** dargestellten Biogasbildung der Hydrolysereaktoren und Anaerobfilter wird deutlich, dass in den Filtern stets deutlich weniger Biogas produziert wurde als in den Hydrolysereaktoren.

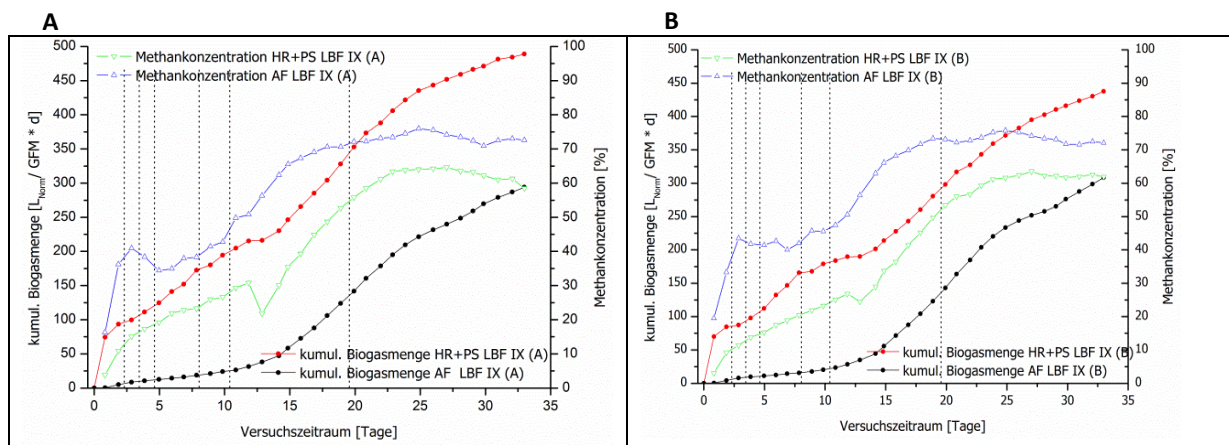


Abb. II.1.1.1-29: Darstellung der Verläufe der kumulativen Biogasmenge sowie der gemessenen Methankonzentration im redundanten Versuchsansatz LBF IX. System A – links, System B – rechts, gestrichelte Linie – Strippungszeitpunkt

Insbesondere im Vergleich zu den Ergebnissen der Versuchsreihe LBF VIII (kumulierte Biogasmenge des Anaerobfilters des LBF VIII am Tag 15: ca. 95 - 100 L_{Norm}) ist zu erkennen, dass die Anaerobfilter des LBF IX innerhalb der ersten 15 Tage eine verminderte Biogasbildungsrate aufwiesen (kumulierte Biogasmenge des Anaerobfilters des LBF IX am Tag 15: ca. 49 - 53 L_{Norm}). Zudem kann anhand der Methankonzentration der Anaerobfilter, im Vergleich zu LBF VIII, festgestellt werden, dass eine Verzögerung der Methanbildung bis Tag 10 eintrat. Die festgestellte Verschiebung des Essigsäure/Propionsäure-Verhältnisses (Tag 21, Abb. II.1.1.1-13) kann auf eine Veränderung der mikrobiologischen Produkte als Folge einer Veränderung der mikrobiologischen Gemeinschaft hinweisen, was in einer Abnahme der Methankonzentration ab Tag 25 sowohl im Hydrolysereaktor als auch im Anaerobfilter resultierte. Weiterhin blieb unbeantwortet, ob die gewählte Strippungsstrategie für die Störung in der verminderten Biogasbildung und Abnahme des Methangehaltes verantwortlich war, aufgrund einer Beeinflussung des Mikrobioms.

In **Abb. II.1.1.1-30, -31, -32** sind die Ergebnisse der Vergärung des Substrates Luzerne (LBF X) in dem zweistufigen und zweiphasigen Leachbedfermentationssystem dargestellt. Hinsichtlich des detektierten NH_4-N -Konzentrationsverlaufes ist zu bemerken, dass im Rahmen der Fermentation keine prozesskritische, inhibierende NH_4-N -Grenzkonzentration erreicht wurde. Dennoch wurde festgestellt, dass über den 30-tägigen Versuchszeitraum ein Anstieg von NH_4-N um circa 1200 mg L^{-1} erfolgte (Tag 0 = ca. $495 \text{ mg NH}_4-N \text{ L}^{-1}$; Tag 30 = ca. $1250 \text{ mg NH}_4-N \text{ L}^{-1}$).

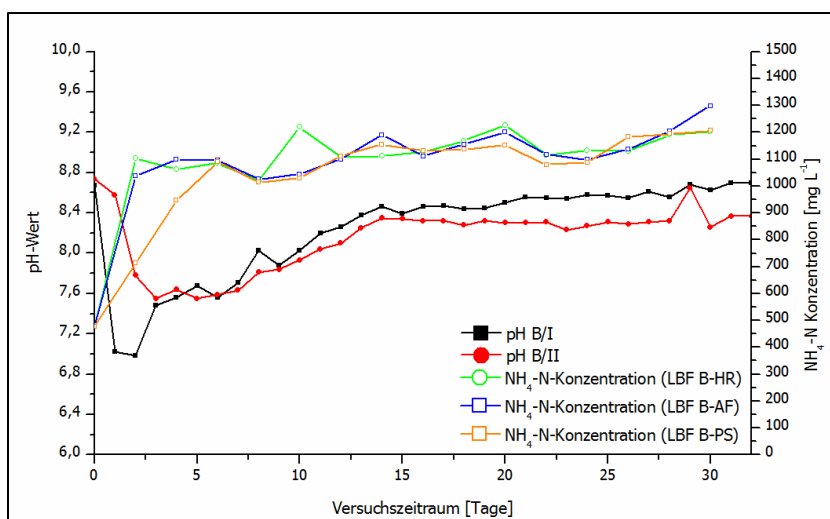


Abb. II.1.1.1-30: Darstellung der pH-Wert- und NH₄-N-Verläufe des Versuches LBF X, exemplarisch für Versuchsansatz B, gemessen in den einzelnen Reaktorkompartimenten.

Aufgrund der moderaten NH₄-N-Konzentration wurde von der Verwendung der Luftstripping als Methode der Stickstoffeliminierung abgesehen. Die fehlende Notwendigkeit der Luftstripping wurde durch den in Abb. II.1.2-31,-32 dargestellten, mustergültigen Verlauf des FOS/TAC-Wertes sowie durch die hohe Biogas- und Methanproduktion bestätigt. Der Verlauf des FOS/TAC-Wertes war durch eine frühzeitige Freisetzung der organischen Säuren geprägt, gefolgt von einem raschen und stetigen Abbau.

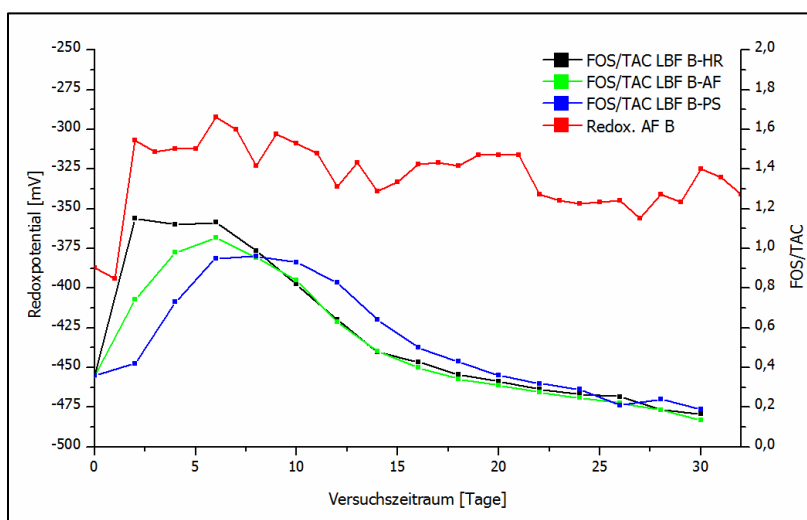


Abb. II.1.1.1-31: Darstellung der FOS/TAC- und Redoxpotenzialwert, Verläufe des Versuches LBF X, exemplarisch für Versuchsansatz B – gemessen in den einzelnen Reaktorkompartimenten

Hinsichtlich der über den 30-tägigen Versuchszeitraum andauernden Biogasbildung wurde eine anfänglich hohe, jedoch stetig abnehmende Biogasproduktion festgestellt, welche dem Verlauf der Freisetzung der organischen Säuren – ausgedrückt als FOS/TAC - entsprach (vgl. Abb. II.1.1.1-31). Ferner wurde ein über den gesamten Versuchszeitraum ansteigender Methangehalt im Biogas detektiert. Die Methankonzentration im Anaerobfilter war mit final 72 % nachweislich größer als der Methangehalt des Hydrolysereaktors (ca. 64 %).

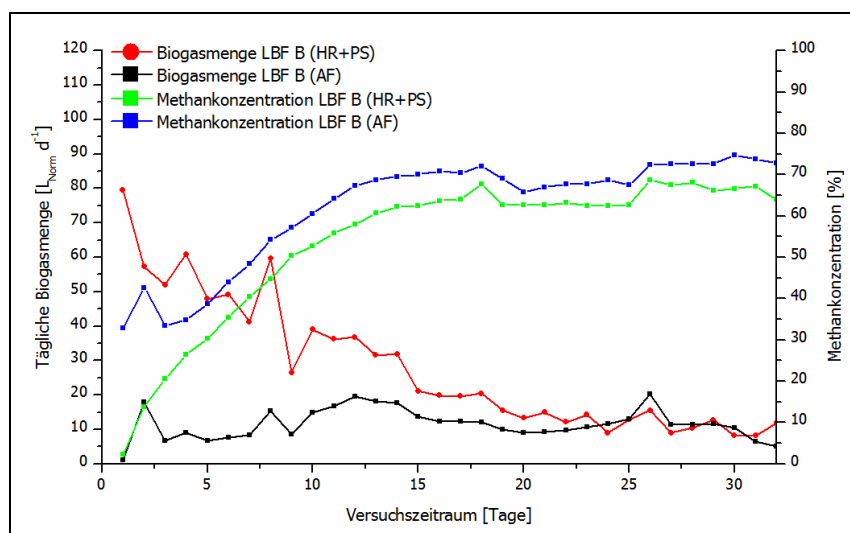


Abb. II.1.1.1-32: Darstellung der Biogasmenge und Methankonzentration über den 30-tägigen Versuchszeitraum des Versuches LBF X, exemplarisch für Versuchsansatz B – gemessen in den einzelnen Reaktorkompartimenten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Biogasausbeute des prozesskritischen Substrates Hühnertrockenkot im Leachbedfermenter unterhalb der im Gasbildungspotentialtest nach VDI 4630 festgestellten Ausbeute lag (**Tab. II.1.1.1-11**). Ursache hierfür war zum einen die Heterogenität des verwendeten Substrates als auch die des Gärrestes einer thermophilen Biogasanlage. Zum anderen wurden die Versuchsreihen im LBF-System unter verschiedenen, teilweise gehemmten Prozessbedingungen durchgeführt. Folglich können die ermittelten Biogasmengen und –ausbeuten nur bedingt mit den unter optimalen nassfermentativen Bedingungen ermittelten Ausbeuten des Gasbildungspotentialtest verglichen werden.

Tab. II.1.1.1-11: Darstellung der Biogasausbeuten der Gasbildungspotentialtests nach VDI 4630 gegenüber der Biogasausbeuten der Leachbedfermentation mit Strippung.
Einbaumenge: 5kg HTK, 5 kg Luzerne, 5 kg Inokulum, 0,5 kg Stroh.

Versuchsreihen thermophil	Mittelwert Biogasausbeuten [L _N / FM _{Gesamt}]	Mittelwert A/B Biogasausbeuten [L _N / FM _{Gesamt}]	Differenz [L _N / FM _{Gesamt}] / [%]	Intensität Hemmung
LBF VI	875,25	333,4	500,6 / 60,0	stark
LBF VII	875,25	231,5	643,75 / 73,5	stark
LBF VIII	875,25	771,6	103,56 / 11,8	gering
LBF IX	875,25	764,3	110,95 / 12,7	gering
LBF X	1277,42	1199,2	78,22 / 6,1	gering

Fazit

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das Leachbedfermentationssystem zur anaeroben Fermentation stickstoffreicher und prozesskritischer Substrate wie z. B. Hühnertrockenkot zur Erhöhung der Prozessstabilität entscheidend beitragen kann. Insbesondere die Kopplung mit einer Strippungseinheit und somit die Eliminierung des toxischen NH₄/ NH₃ führte - durch Verminderung der Stickstofffracht und der daraus resultierenden Säurehemmung – zur einer für den Biogasprozess notwendigen Prozessstabilisierung. Aus verfahrenstechnischer Sicht kann behauptet werden, dass die Integration einer Strippungsanlage in das Fermentationssystem die Aufrechterhaltung einer stabilen

Prozessbiozönose stimuliert. Eine möglichst frühzeitige und mehrfache Strippung der Prozessflüssigkeit scheint dabei die richtige Verfahrensstrategie zu sein, da dann bereits anfängliche Hemmungen durch erhöhte NH_4 -Konzentrationen und somit einer Akkumulation von NH_4 vermieden werden können.

Bisherige Untersuchungen zum potentiell negativen Einfluss der für eine effiziente Strippung erforderlichen Erhöhung des pH-Werts auf die Mikrobiologie führten dazu, dass die Strippungen ohne Einstellung eines stark basischen Milieus durchgeführt wurden. Zudem wurde die Strippungsstrategie dahingehend optimiert, dass ein dynamisches Konzept der Strippung etabliert wurde. Dieses beinhaltet, dass entsprechend der anaeroben Degradation im Biogasfermenter die Strippungshäufigkeit angepasst wird, jedoch gleichzeitig auch die Option einer Strippung bei Überschreiten eines definierten Grenzwertes gegeben bleibt. Anhand der Untersuchungsergebnisse der Versuchsreihen LBF VI bis X konnte festgestellt werden, dass der Einsatz der optimierten, dynamischen Strippungsstrategie zu konstant hoher Effizienz (> 70 %) hinsichtlich der Eliminierung von Ammonium aus der Prozessflüssigkeit führt.

II.1.1.2 Mikrobiologische Untersuchungen der Leachbedfermenter

Für die Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft in den Leachbedfermentern wurde exemplarisch Versuch V ausgewählt. Dies ermöglichte die Betrachtung der mikrobiellen Entwicklung bei diskontinuierlicher Prozessführung im Vergleich zu den kontinuierlichen Prozessen in Schwimmbettfermentern (SBF) und Rührkesselreaktoren (CSTR), die im hier beschriebenen Projekt im Zentrum standen. Im Versuch V wurden beide LBF mit Hühnertrockenkot als Substrat bei thermophilen Bedingungen (55°C) parallel betrieben. Der Betrieb der LBF gliederte sich in 30tägige Batchversuche und Zwischenphasen unterschiedlicher Länge (24 bis 46 Tagen bis Versuch V) ohne Fütterung der Reaktoren. Hieraus resultierte eine für Batchversuche charakteristische dynamische Nährstofffreisetzung. Physico-chemische Parameter wie FOS/TAC und Essigsäuregehalt zeigen diese ungleichmäßige Nährstofffreisetzung an. Zusätzlich sind die Phasen zwischen den Versuchen zu berücksichtigen, in der keine Substrate zu Verfügung standen. Es ist zu erwarten, dass die Mikrobiome der LBF an diese wechselnden Bedingungen angepasst sind und sich dynamisch anpassen.

Ein Großteil der mikrobiologischen Untersuchungen wurde an den kontinuierlichen Schwimmbettfermenterversuchen durchgeführt. Trotz dieser Einschränkung wurde ein Vergleich des untersuchten LBF-Versuches mit den Schwimmbettfermentern und den CSRTs durchgeführt, um systemübergreifend beispielsweise auftretende stickstoffresistente Organismen zu identifizieren.

Die untersuchten Proben bestanden überwiegend aus Perkolat der Hydrolysereaktoren (HR) und der Anaerobfilter (AF). Zusätzlich wurden einmalig nach Abschluss der Versuchsreihe Aufwuchsträger (AWT) aus den Anaerobfiltern entnommen und die mikrobielle Gemeinschaft des sich darauf befindlichen Biofilms untersucht.

Die Analyse der Populationsstruktur erfolgte über die TRFLP des 16S-rRNA-Gens. Die Zuordnung der TRFs erfolgte über Literatur und den Klonbibliotheken der Schwimmbettfermenter. Die Diversität der

bakteriellen und archaeellen Gemeinschaften wurde über die TRF-Anzahl (Maß der Artenvielfalt) und den Ginicoeffizienten (Verteilungsmaß) bewertet, die aus den TRFLP-Profilen berechnet wurden. Zusätzlich wurde die Ähnlichkeit der Profile der einzelnen Reaktoren berechnet (UPGMA-Algorithmus mit Pearson-Korrelationskoeffizient als Abstandsmaß). Ergänzend erfolgten quantitative Analysen mithilfe der qPCR des 16S-rRNA-Gens, die auf die Anzahl an Gesamtbakterien sowie an Archaeen zielten.

TRFLP des bakteriellen 16S-rRNA-Gens

In **Abb. II.1.1.2-1** sind die Mediane von Reaktorproben (Reaktor A) aus dem Perkolat von Anaerobfilter und Hydrolysereaktor als prozentuale Anteile der einzelnen TRF an der Gesamtfluoreszenz aus drei Replikaten dargestellt.

Es gab nur geringe Unterschiede der Gemeinschaften im Vergleich zwischen den Kompartimenten und innerhalb der Kompartimente zu den verschiedenen Zeitpunkten (mindestens 86 % Ähnlichkeit in beiden Fällen). Eine Ausnahme bildete das Profil des vierzehnten Versuchstages im Anaerobfilter A, das stark von den anderen Profilen abwich (42 % Ähnlichkeit).

Die TRF-Anzahl, die als Indikator der Biodiversität verwendet wurde, lag zu Beginn im Anaerobfilter A (AFA) sehr hoch (TRF-Anzahl AFA: 51). Im Gegensatz dazu war diese im Hydrolysereaktor A (HRA) niedrig (16). Die hohe TRF-Anzahl ging auch mit einer gleichmäßigeren Verteilung in AFA einher, beide Kompartimente wurden zu diesem Zeitpunkt vom TRF 150 bp (*Clostridiales*) dominiert. Diese Dominanz (24,2 bis 26,4 %) wurde auch an den anderen Probenahmeterminen festgestellt und lediglich am vierzehnten Tag in AFA unterbrochen. Die Entwicklung der TRF-Anzahl (AFA: 51-> 16; HRA: 16 -> 27) verlief in AFA und HRA innerhalb der ersten sechs Tag entgegengesetzt. Trotzdem nahm in beiden Kompartimenten die Gleichverteilung (AFA: 0,50 -> 0,39; HRA: 0,43 -> 0,37) zu und glich sich an.

Dabei waren die zeitlichen Veränderungen innerhalb der ersten sechs Tagen die zwischen den Profilen auftraten ähnlich intensiv und relativ gering (AFA: 89 % Ähnlichkeit; HRA: 85 % Ähnlichkeit). Auch im Folgenden waren die Veränderungen in HRA relativ gering, sodass die Ähnlichkeit der Profile von sechsten bis zum dreißigsten Tag hoch war (HRA: 85 % Ähnlichkeit). Die TRF-Anzahl in HRA blieb dabei auch im mittleren Zeitabschnitt konstant, nahm aber vom Zwanzigsten bis zum Dreißigsten Versuchstag deutlich ab (TRF-Anzahl: 33 ->32->13). Die Reduktion der TRF-Anzahl, die sich besonders auf TRFs mit kleinen Anteil auswirkte, bewirkte ein angleichen der Verteilung (Gini-Koeffizient: 0,46->0,40->0,38).

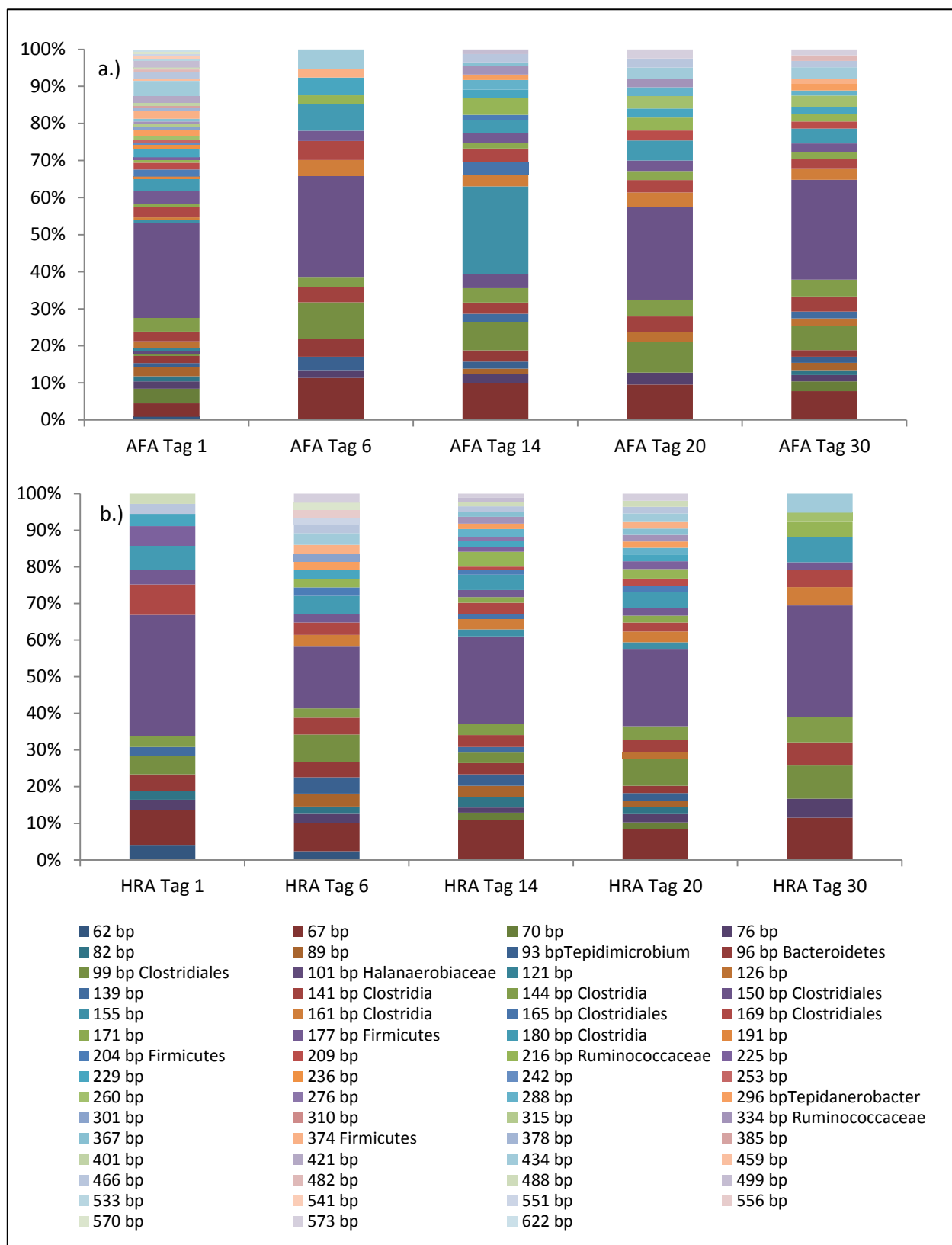


Abb. II.1.1.2-1 Fingerprintprofile der TRFLP des bakteriellen 16S-rRNA-Gens aus den Proben des Anaerbofilters (a) und der Hydrolysestufe (b) von Reaktor A.

Wie oben erwähnt wich der vierzehnte Tag in AFA deutlich von der Struktur der anderen Profile ab (AFA: 41 % Ähnlichkeit). Am auffälligsten dabei war die Dominanz von TRF 155 bp zu Lasten von TRF 150 bp, wobei der Anteil von TRF 155 bp (23,5 %) in der Größenordnung lag der an den anderen Tagen durch TRF 150 bp eingenommen wurde. Die Diversität gemessen über TRF-Anzahl und Gini-Koeffizient blieb weitgehend konstant nahm dabei zum dreißigsten Versuchstag leicht zu (TRF-Anzahl 26 -> 21-> 29; Ginicoeffizient: 0,41 -> 0,37 -> 0,42). Der überwiegende Teil der TRFs wurden der Klasse der *Clostridia* zugeordnet, wobei keine wesentliche Unterschiede zwischen beiden Kompartimenten auftraten (AFA: $49,9 \pm 9,4$ %; HRA: $51,7 \pm 6,1$ %). Die größte Präsenz zeigte das TRF 150 bp innerhalb der *Clostridia*. Daneben existierten mehrere TRFs, die den *Clostridia* zugeordnet werden konnten, wie 99 bp und 144 bp und 180 bp, die jeweils einen mittleren Gesamtanteil zwischen 3,5 und 6,4 % besaßen und damit zu den dominanteren *Clostridia*-Gruppen nach TRF 150 bp zählten. TRFs die den Bacteroidetes zugeordnet werden konnten, erreichten nur einen geringen Anteil (AFA: 2,91 % bis 7,9 %; HRA: 3,9 % bis 8,0 %), oder konnten gar nicht erst nachgewiesen werden (AFA 20. Tag, HRA 1. Tag und 30. Tag). Einen größeren Anteil besaß auch das TRF 67 bp, das nicht zugeordnet werden konnte. Dieser lag in Reaktor A mit Ausnahme des ersten Tages in AFA zwischen 7,6 und 11,1 %. Die Diversität verlief in beiden Kompartimenten gegensätzlich und war in HRA stärker im mittleren Abschnitt, während diese in AFA eher zu Beginn und am Ende stärker ausgeprägt war.

In **Abb. II.1.1.2-2** sind die Mediane von Reaktorproben (Reaktor B) aus dem Perkolat von Anaerobfilter und Hydrolysereaktor als prozentuale Anteile der einzelnen TRF an der Gesamtfluoreszenz aus drei Replikaten dargestellt.

Im Gegensatz zu Reaktor A war die TRF-Anzahl und die Gleichverteilung in HRB (TRF-Anzahl: 41, Gini-Koeffizient: 0,39) stärker als in AFB (TRF-Anzahl: 15; Ginicoeffizient 0,37). In der Folge näherten sich die Profile in ihrer Struktur an, so dass die Ähnlichkeit der Profile von AFB und HRB im Versuchsverlauf zunahm (35 % -> 91 % -> 95 % -> 96 % -> 98 % Ähnlichkeit). Dabei näherten sich auch die TRF-Anzahl (AFB: 15 -> 31 -> 26 -> 30 -> 28; HRB: 41 -> 37 -> 34 -> 18 -> 27) an, wobei dies durch ein Einbruch der Diversität in HRB am zwanzigsten Versuchstag unterbrochen wurde. Die Gleichverteilung in HRB und AFB verlief dabei über den gesamten Versuchszeitraum parallel (AFB: 0,37 -> 0,36 -> 0,40 -> 0,39 -> 0,43; HRB: 0,39 -> 0,41 -> 0,48 -> 0,42 -> 0,48).

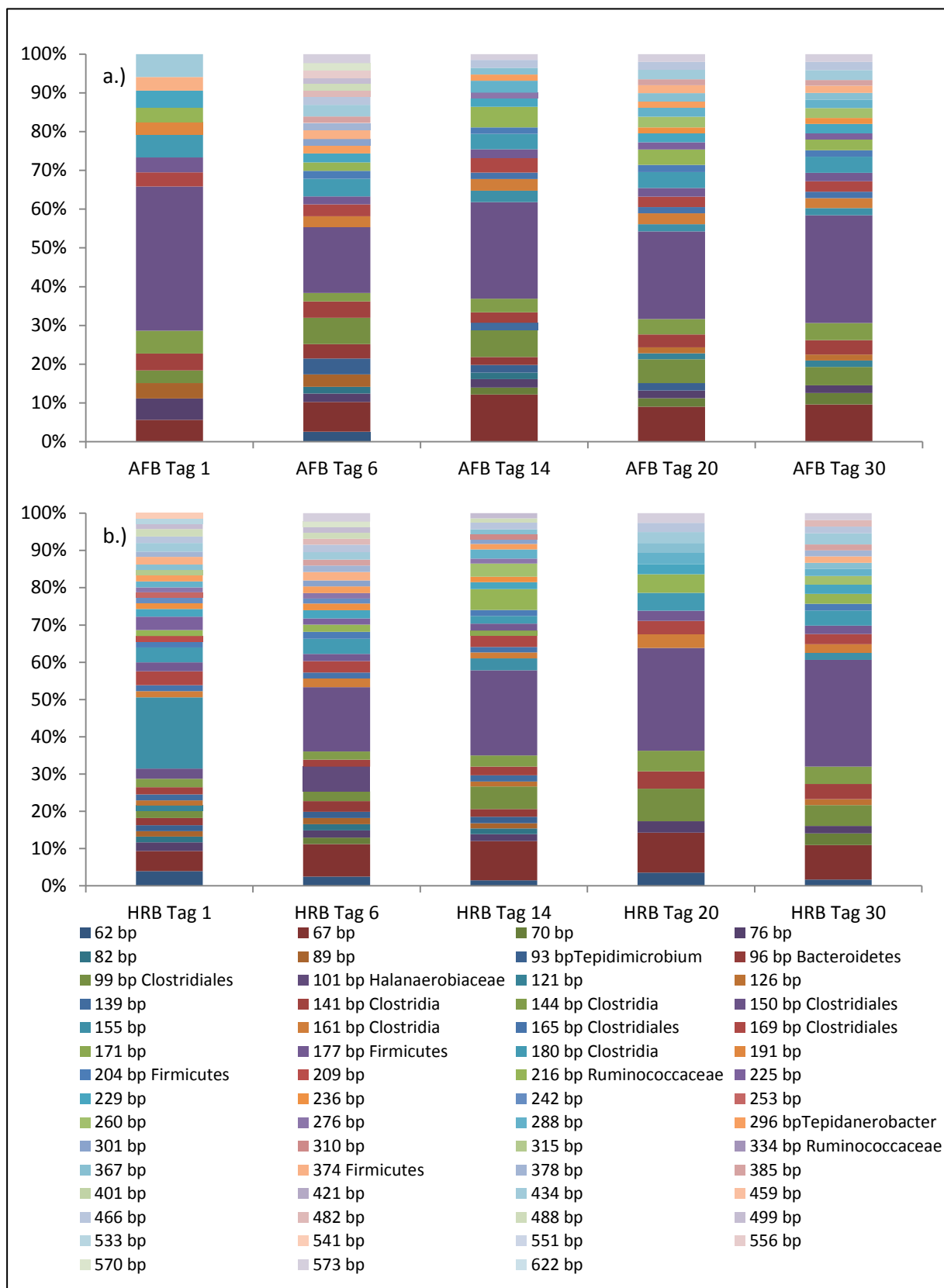


Abb. II.1.1.2-2: Fingerprintprofile der TRFLP des bakteriellen 16S-rRNA-Gens aus den Proben des Anaerobifilters (a) und der Hydrolysestufe (b) von Reaktor B.

Ähnlich wie Reaktor A wurde auch Reaktor B vornehmlich durch *Clostridia* (AFB $51,5 \pm 11,2$ %; HRB $45,9 \pm 15,73$) dominiert, wobei TRF 150 bp, mit Ausnahme des ersten Profils vom HRB, mit einem mittleren Anteil von $24,9 \pm 6,5$ % in AFB bzw. $23,9 \pm 5,1$ % in HRB den größten Anteil hatte. Ruminococcaceae (TRF 216 bp) konnten ebenfalls mit 2,0 bis 4,9 % in HRB detektiert werden. In AFB fehlte dieses TRF vollständig, im Gegensatz dazu war TRF 216 bp in Reaktor A in beiden Teilsystemen vertreten (AFA: 0,7 bis 4,4 % HRA: 2,2 bis 4,1 % nicht am ersten Tag). Auch die anderen betrachteten *Clostridia*-TRFs 99 bp (AFB: $5,41 \pm 1,57$ %; HRB: $4,93 \pm 2,77$ %), 140 bp (AFB: $3,86 \pm 1,2$ %; HRB: $3,49 \pm 1,5$ %), 180 bp (AFB: $4,37 \pm 0,61$ %; HRB: $3,77 \pm 1,01$ %) traten in einem ähnlichen Verhältnis wie in Reaktor A auf. So dass die Ähnlichkeit der Profile aus den beiden verschiedenen Reaktoren bei mindestens 85 % lag; wenn die beiden abweichenden Profile (AFB 14. Tag und HRB 1. Tag) nicht berücksichtigt wurden.

In **Abb. II.1.1.2-3** ist die Archaeengemeinschaft des Reaktors A dargestellt als Mediane der prozentualen Anteile der einzelnen TRF an der Gesamtfluoreszenz aus drei Replikaten. Die Proben wurden aus dem Perkolat von Anaerobfilter und Hydrolysereaktor entnommen (Abb. II.1.1.2-3). Zusätzlich wurde der Biofilm eines Auswuchsträgers (AWT) aus dem Anaerobfilter beprobt.

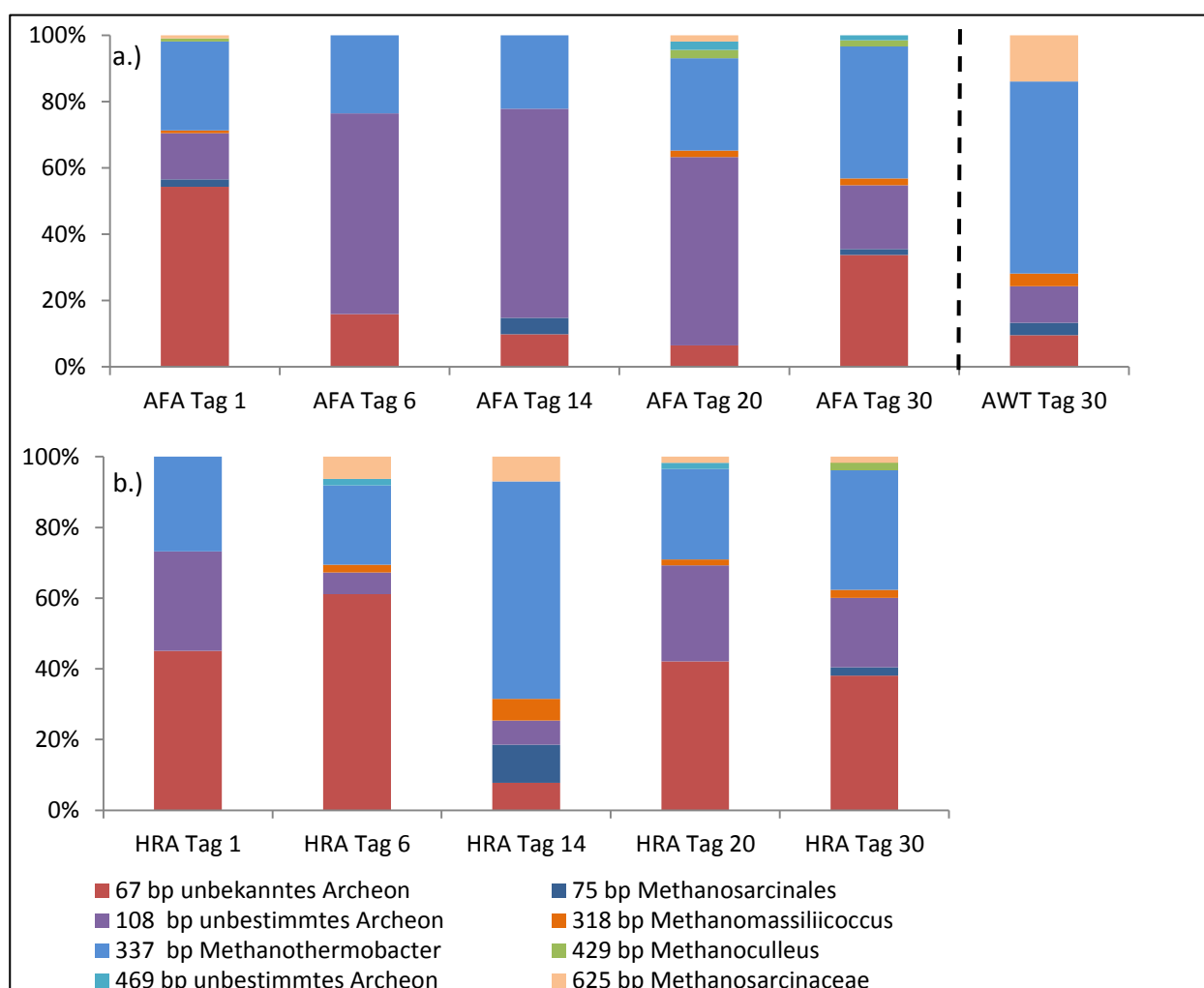


Abb. II.1.1.2-3 Fingerprintprofile der TRFLP des archaeellen 16S-rRNA-Gens aus den Proben des Anaerobfilters a.) und der Hydrolysestufe b.), AWT Auswuchsträger von Reaktor A.

Die *Archaeengemeinschaft* in Reaktor A wurde in beiden Teilsystemen überwiegend durch die drei TRFs 67 bp, 108 bp und 337 bp bestimmt. Dabei wurde AFA besonders durch das TRF 108 bp dominiert, während in HRA TRF 67 bp bzw. 337 bp (*Methanothermobacter*) eine dominierende Rolle einnahmen.

Waren sich zu Beginn HRA und AFA relativ ähnlich (91 %), entwickeln sich beide Kompartimente in unterschiedliche Richtungen. So sank die TRF-Anzahl in AFA bis zum sechsten Tag (7 → 3) während diese in HRA in diesen Zeitraum stieg (3 → 6). Ebenfalls sank das Verhältnis TRF 67 bp zu TRF 108 bp in AFA (3,88 → 0,26), während dies in HRA (1,60 → 10,04) stieg.

Die wesentlichen Merkmale des Profils vom sechsten Tag aus AFA spiegelten sich auch in den Profilen des 14. und 20. Tages wieder (mindestens 97 % Ähnlichkeit). Dabei stieg die TRF-Anzahl kontinuierlich an, gleichzeitig veränderten sich die Anteile der Hauptgruppen (TRF 67, 108, 337) nur geringfügig. In den letzten zehn Tagen kam es zu einem Angleichen der Anteile der drei Haupt-TRFs, was sich nur leicht auf den Ginicoeffizienten (0,63 → 0,57) auswirkte, da noch vier Gruppen vorhanden waren deren Anteil unter 2 % lag.

Im Gegensatz zu AFA gab es in HRA stärkere Veränderungen in der Zusammensetzung zwischen dem sechsten und zwanzigsten Tag (64 % Ähnlichkeit zwischen 6. und 14. Tag und 14. und 20. Tag). Insbesondere war der Anteil des TRF 337 bp (*Methanothermobacter*) am 14. Tag wesentlich erhöht (61,5 %) gegenüber den anderen Probenahmezeitpunkten. Dabei blieb aber die TRF-Anzahl (6) in diesen Zeitraum unverändert. Nach dreißig Tagen war die Diversität gemessen über TRF-Anzahl (AFA: 7; HRA: 7) und Ginicoeffizient (AFA: 0,52; HRA: 0,57) auf einen hohen Niveau in beiden Teilsystemen. Ebenfalls stieg die Ähnlichkeit beider Systeme zueinander zum Ende wieder erheblich an (58 % → 99%). Auch ähnelte sich Start- und Endprofile beider Teilsysteme stark (AFA 91 %, HRA 95 %), so dass beide Kompartimente ähnliche Start und Endpopulationen aufwiesen. Dies steht im Einklang mit der Populationsentwicklung wie sie für ein diskontinuierliches Batchverfahren zu erwarten war. Die diskontinuierliche Verfahrensweise wirkte sich auch auf die FOS/TAC-Werte aus, die zu Beginn (0,21) und am Ende (0,23) vergleichbar waren und am vierzehnten Tag ein Maximum (0,88) erreichten und insgesamt einen parabolischen Verlauf aufwiesen. Da der Fos/Tac-Wert das Verhältnis von flüchtigen organischen Säuren zu Pufferkapazität angibt, deutet sich eine parallele Entwicklung in der Freisetzung von Intermediaten des anaeroben Abbaus und der Populationsdynamik der Methanogenen an.

Gleichzeitig zum Maximum des Fos/Tac-Wertes wurde auch ein zunehmender Anteil des TRFs 75 bp Methanosarcinales nachgewiesen. Das Profil der archaellen Gemeinschaft, die den Aufwuchsträger besiedelte, unterschied sich von den Profilen die aus den Perkolatproben des Anaerobfilters. So war hier der Anteil von TRF 337 bp *Methanothermobacter* (Aufwuchsträger: 57,9 %, AFA maximal: 38,7 %) und Methanosarcinaceae (Aufwuchsträger: 13,9 %, AFA maximal 1,9 %) wesentlich höher als in den Anaerobfilter-Perkolatproben.

In **Abb. II.1.1.2-4** sind die Archaeengemeinschaft des Reaktors B dargestellt als Mediane der prozentualen Anteile der einzelnen TRF an der Gesamtfluoreszenz aus drei Replikaten. Die Proben wurden aus dem Perkolat von Anaerobfilter und Hydrolysereaktor entnommen. Zusätzlich wurde der Biofilm eines Aufwuchsträgers (AWT) aus dem Anaerobfilter beprobt.

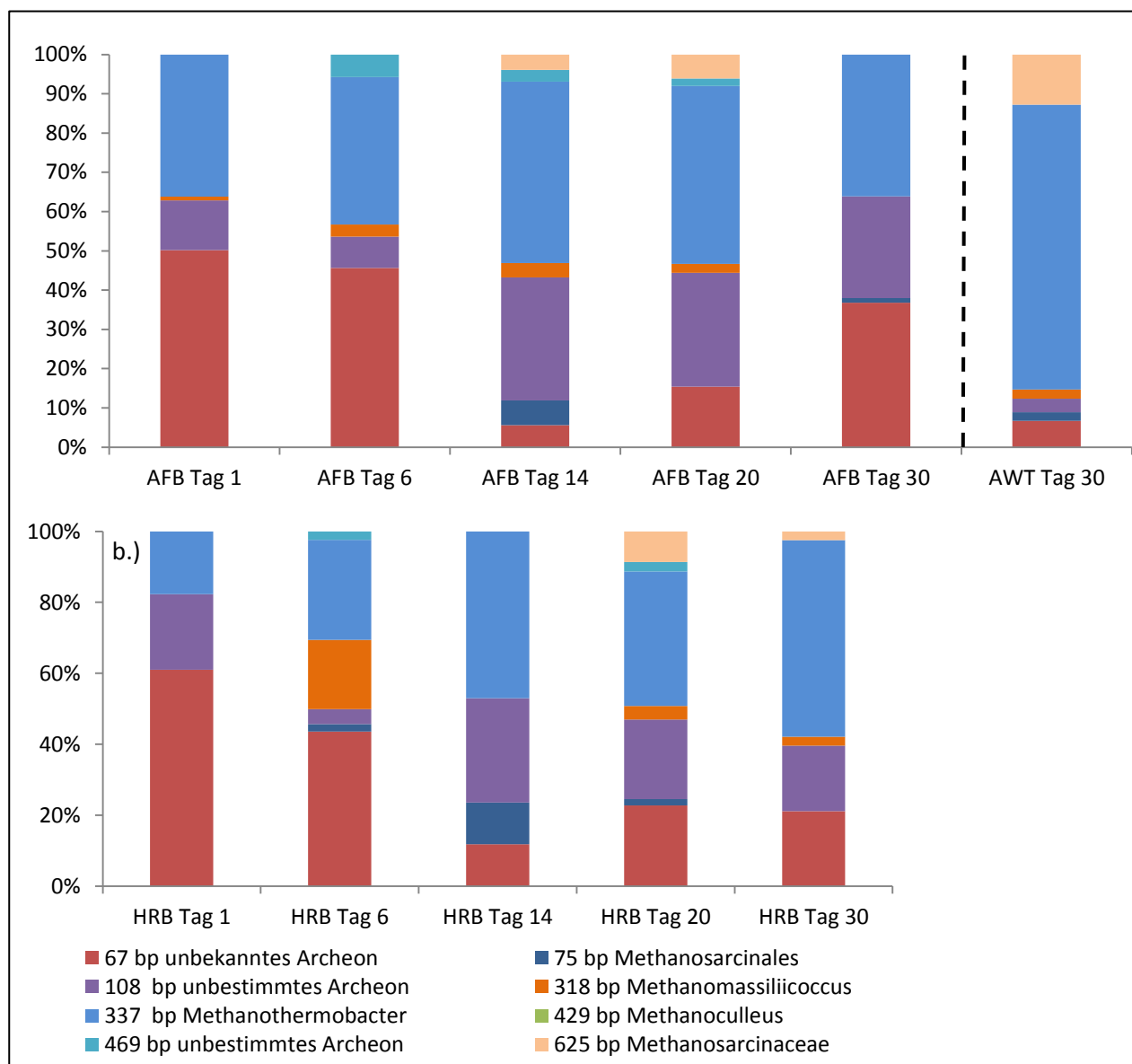


Abb. II.1.1.2-4: Fingerprintprofile der TRFLP des archaeellen 16S-rRNA-Gens aus den Proben des Anaerobfilters a.) und der Hydrolysestufe b.), AWT Auswuchsträger von Reaktor B.

Auch die *Archaeengemeinschaften* in Reaktor B wurden wesentlich durch die TRFs 67 bp, 108 bp und 337 bp dominiert. Analog zum Anaerobfilter A wurde auch in AFB eine Abnahme des Verhältnis TRF 67 bp zu TRF 108 bp (6. Tag \rightarrow 14. Tag: 5,72 \rightarrow 0,16) beobachtet, die sich aber später als in AFA zeigte, weshalb die Ähnlichkeit der Profile vom ersten und sechsten Tag sehr groß war (99 %). Bis zum vierzehnten Tag stieg die TRF-Anzahl in AFB an (4 \rightarrow 5 \rightarrow 7), fiel dann aber bis zum Ende kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu war die TRF-Anzahl (6 \rightarrow 4 \rightarrow 7) in HRB am vierzehnten Tag wesentlich geringer als an den angrenzenden Probenahmeterminen. Auch in Reaktor B zeigte sich am vierzehnten Tag eine verstärkte Präsenz des TRFs 75 bp Methanosarcinales, wobei der Anteil in beiden Reaktoren in etwa gleich war (AFA: 5,00 %; AFB: 6,28 %; HRA: 10,78 %, HRB: 11,78 %). Die Ähnlichkeit zwischen den Start und Endprofilen war in HRB (75 %) weniger stark ausgeprägt als in AFB (94 %) oder Reaktor A (AFA 91 %, HRA 95 %). Gleichzeitig waren die Übergänge zwischen den Profilen in AFB und HRB fließender, weshalb die Ähnlichkeit (mindestens 75 %) der Profile zueinander größer war als in Reaktor A (mindestens 68 %). Die TRF-Anzahl (AFB: 4; HRB: 5) zeigte am dreißigsten Tag im Gegen-

satz zur Reaktor A ein Minimum, wobei das Maß der Ungleichverteilung in den letzten zehn Tagen in AFB (0,50 → 0,35) sank beziehungsweise in HRB (0,44 → 0,45) konstant blieb.

Die Reaktoren wiesen einige wenige Unterschiede in der Entwicklung auf. So setzte die Umstrukturierung der Population in Folge der Nährstofffreisetzung in AFB verzögert ein, dies spiegelte sich auch in der Gasproduktion von AFB wieder. Trotz solcher Unterschiede zeigten beide Reaktoren ein ähnliches Verhalten, was sich unter anderem an der Zunahme von TRF 108 bp im mittleren Abschnitt oder dem relativ konstant großen Anteil des TRF 337 bp *Methanothermobacter* (AFA: 27,69 ± 6,49 %; HRA: 34,00 ± 15,96 %; AFB: 38,98 ± 6,29 %; HRA: 34,00 ± 15,96 %; HRB: 37,50 ± 15,24 %) zeigte. Ähnlich zu Reaktor A war dessen Anteil auf den Aufwuchsträgern erhöht (71,1 %), zusätzlich wurden auch hier Methanosarcinaceae (12,5 %) mit ähnlichem Anteil nachgewiesen. So dass sich die Profile der Aufwuchsträger aus Reaktor A und B stark ähnelten (85 % Ähnlichkeit).

Die Ähnlichkeit der Profile der analogen Kompartimente Anaerobfilter und Hydrolysestufe von Reaktor A und B war für die Archaeen (zwischen den Hydrolysestufen 70 %, zwischen den Anaerobfilter 65 %) niedriger als für die Bakterien. Dies war insbesondere auf den größeren Anteil von TRF 108 bp in AFA zurückzuführen. Insgesamt wurden beide mikrobiellen Gemeinschaften durch die Dynamik der Nährstofffreisetzung im diskontinuierlichen Verfahren bestimmt. So dass insbesondere die archaeelle Gemeinschaft einen dynamischen Verlauf zeigte, der in der Mitte ein Maximum aufwies.

qPCR-Analyse der Kopienzahl des bakteriellen und des archaeellen 16S-rRNA-Gens

Der Vergleich der Kopienzahl in Perkolatproben der Anaerobfilter und Biofilmproben der Aufwuchsträger sind in **Abb. II.1.1.2-5, -6** dargestellt. Signifikante Unterschiede zum vorherigen Wert sind mit * markiert, signifikante Unterschiede zwischen Biofilmprobe und Perkolatprobe mit #. Die statistische Auswertung erfolgte durch ANOVA (Kim, 2014) und anschließenden Bonferroni-post-Hoc-Test (Goman & Solari, 2014). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 9 Replikaten.

Die Kopienzahl des 16S-rRNA-Gens war zunächst in Reaktor A und B sowohl für die archaeelle als auch die bakterielle Variante niedrig. Diese zeigte in der Folge bis zum dreißigsten Tag einen dynamischen Verlauf mit einem Maximum am sechsten Versuchstag. In den ersten sechs Tagen stieg die Kopienzahl beider Genvarianten auf das 2,5 bis 6,7-fache des Ausgangswertes an. Die Kopienzahl des bakteriellen 16S-rRNA-Genes reduzierte sich bis zum vierzehnten Tag wiederum soweit, dass diese den Anfangswerten ähnelte. Im weiteren Verlauf stieg in beiden Reaktoren die bakterielle Kopienzahl zum zwanzigsten Tag noch einmal um das zweifache, fiel aber am dreißigsten Versuchstag auf ein ähnliches Niveau wie in der Mitte der Versuchsphase zurück.

Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Kopienzahl des archaeellen 16S-rRNA-Gens vom sechsten auf den vierzehnten Tag lediglich im Hydrolysereaktor A auf die Hälfte. Insgesamt wurde eine gleichbleibend hohe archaeelle Kopienzahl festgestellt, die zwar in Reaktor A aber noch nicht in Reaktor B am Ende reduziert war. Auffällig war, dass die Kopienzahl des archaeellen 16S-rRNA-Gens in den Aufwuchsträgern um das vierzehn- bis dreißigfache gesteigert war gegenüber den Werten, die im Perkolat der Anaerobfilter gemessen wurde. Im Gegensatz dazu gab es keine wesentlichen Unterschiede bei den bakteriellen Kopienzahlen. Daher wurde auf den Aufwuchsträgern eine deutliche Steigerung des Verhältnisses von Archaeen zu Bakterien im Vergleich zum Perkolat beobachtet (Aufwuchsträger:

4,88 - 8,97 % Perkolat: 0,17- 0,36 % im Perkolat). Wodurch gezeigt wurde, dass die Aufwuchsträger besonders gut von Methanogenen besiedelt wurden.

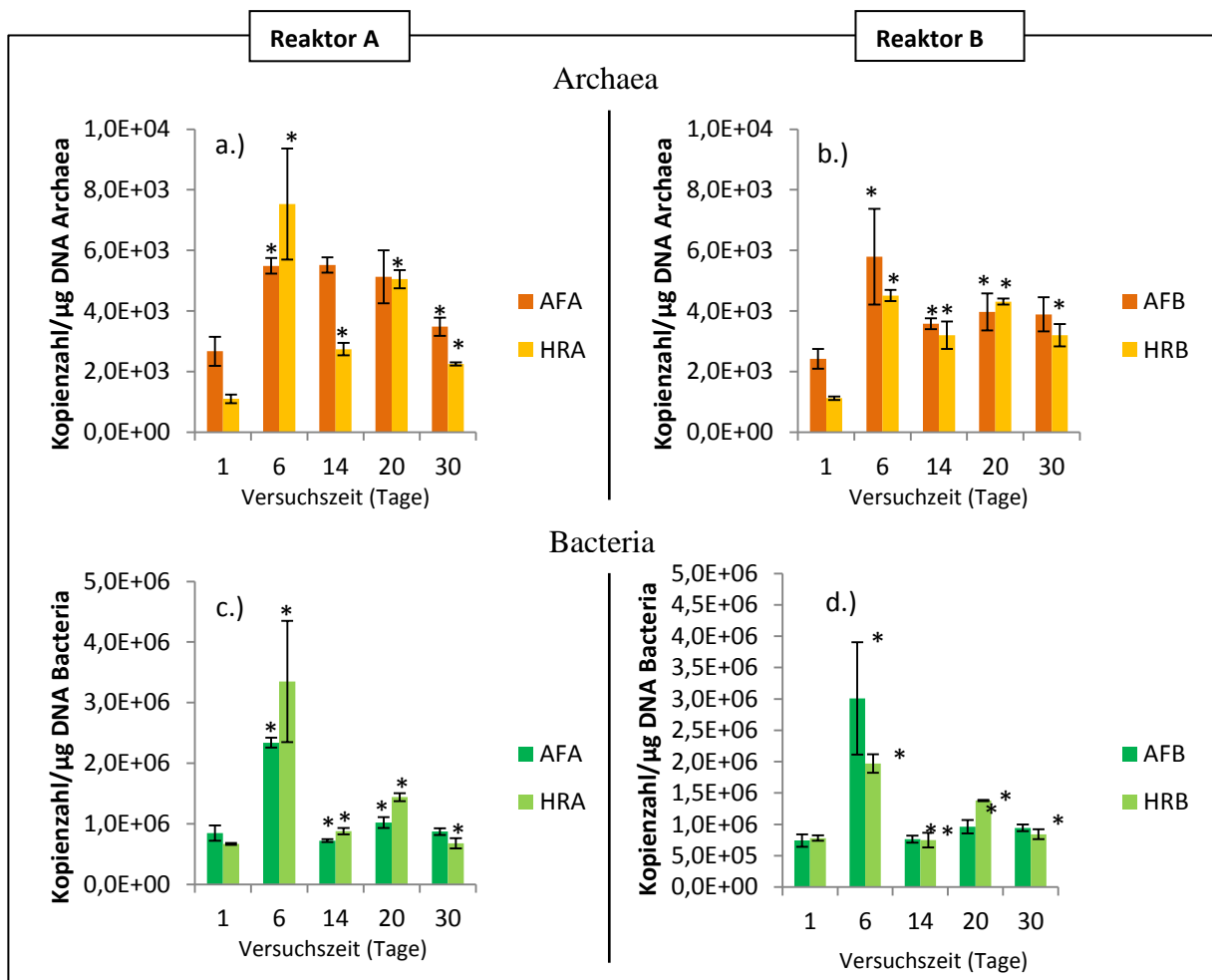


Abb. II.1.1.2-5 qPCR des archaeellen und bakteriellen 16-S-rDNA aus Perkolatproben des Anaerobfilters und der Hydrolysestufe der LBF Reaktoren A (a. und c.) und B (b. und d.)

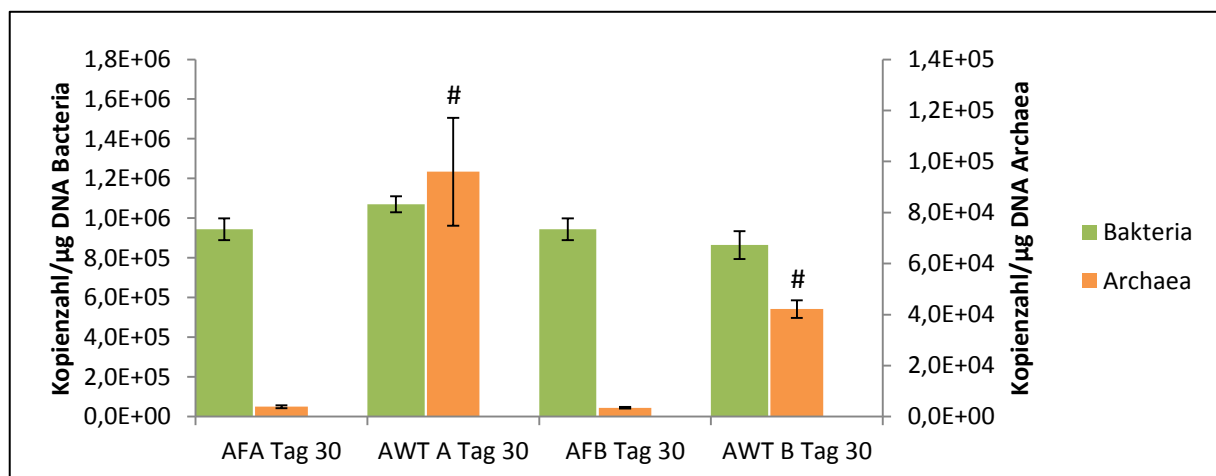


Abb. II.1.1.2-6 qPCR des archaeellen und bakteriellen 16-S-rDNA aus Perkolatproben des Anaerobfilters und der Hydrolysestufe sowie der Aufwuchsträger (AWT) der LBF Reaktoren A und B.

Zusammenfassung zu den molekularbiologische Untersuchungen Leachbedfermenter

Sowohl TRFLP als auch die qPCR-Ergebnisse der *Archaeen* zeigten einen Verlauf, der ähnliche Start und Endwerte aufwies. Einen analogen Verlauf der Werte zeigen auch verfahrenstechnische Messgrößen wie die Biogasproduktion der Anaerobfilter und die Essigsäure-Werte, die in den Perkolat-speichern gemessen wurden. Diese Dynamik ist eine Folge des Versuchsdesigns als „Batchansatz“ in dem eine gegebene Anfangsmenge an Substrat umgesetzt werden kann und es zu keiner kontinuierlichen Nährstofflieferung für die meisten Mikroorganismen kommen kann.

Der Anstieg der Kopienzahlen der qPCR nach sechs Tagen deutete auf eine Aktivierung der *Archaeen*- und Bakterienpopulation durch das frische Substrat hin. Diese Entwicklung führte insbesondere bei den *Archaeen* auch zu Umstrukturierungen in der Zusammensetzung, die beispielsweise in Anaerobfilter A zum Anstieg von TRF 108 bp und in Reaktor B von TRF 337 bp (*Methanothermobacter*) führte. Dabei dominierte *Methanothermobacter* insbesondere in Reaktor B. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit dem eingesetzten Substrat Hühnertrockenkot. Auch in den Untersuchungen der HTK vergärenden CSTRs wurde ein großer Anteil (85 %) an *Methanothermobacter* gefunden. Möglicherweise ist diese Gattung besonders resistent gegenüber den Bedingungen bei der thermophilen Vergärung von HTK.

Da sowohl in den Perkolatproben der Leachbedfermenter als auch auf den Aufwuchsträgern die hydrogenotrophe Gattung (Wasserfallen et al., 2000) *Methanothermobacter* dominierte und der Anteil der mixotrophen, also auch zur acetoklastischen Methanogenese befähigten, *Methanosarcinaceae* gering war, kann angenommen werden, dass die Methanogenese in den LBF überwiegend über den hydrogenotrophen Weg verlief. Dies stimmt mit der Beobachtung überein dass, bei thermophiler Prozessführung hydrogenotrophe weniger stickstoffsensitiv sind als acetoklastische Methanogene (Angelidaki & Ahring., 1993).

Die relative Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft zeigte nur geringe zeitliche Veränderungen auch wenn deutliche quantitative Unterschiede in der qPCR auftraten. Dominiert wurde die bakterielle Gemeinschaft durch die *Clostridia*, der in etwa die Hälfte aller TRFs angehörten. Auch in den langzeitadaptierten Schwimmbettfermentern (AFA: 47,9 ± 13,5 %; AFB: 51,5 ± 14,1 %; HRA: 49,0 ± 14,8 %; HRB: 49,3 ± 13,5 %) sowie in anderen thermophilen (Niu et al., 2013) und mesophilen Biogasreaktoren mit hoher Stickstoffbelastung (Werner et al., 2014) wurde eine starke Dominanz von Vertretern der *Clostridia* festgestellt. Diese Befunde deuten darauf hin, dass *Clostridia*-dominierte Bakteriengemeinschaften charakteristisch für stabil arbeitende, Reaktoren bei hohen Temperaturen und hohen Stickstoffwerten sind. Ähnliches wurde auch von Alsouleman et al. (2016) gefunden, die bei Erhöhung der Stickstoffwerte eine Umstellung der Gemeinschaft zu *Clostridia* feststellte, die die Reaktorperformance nicht negativ beeinflusste.

Innerhalb der *Clostridia* dominierte in den LBF das TRF 150 bp, welches ungefähr ein Viertel der bakteriellen Population einnahm. Auch in den Schwimmbettfermentern besaß dieses TRF einen großen Anteil (AFA: 14,9 ± 6,4 %; AFB: 14,9 ± 6,4 %; HRA: 17,3 ± 7,2 %; HRB: 13,8 ± 6,9 %), obwohl in den SBF im Gegensatz zu den LBF keine tierischen Reststoffe sondern pflanzliche Substrate verwendet wurden. Deshalb ist es plausibel, dass diese Gruppe der *Clostridia* (TRF 150 bp) besonders an stickstoff-

reiche Substrate angepasst ist unabhängig deren Herkunft. *Bacteroidetes* besaßen dagegen nur eine untergeordnete Rolle in der bakteriellen Gemeinschaft der LBF.

Die TRF-Anzahl der Bakterien (AFA: 29 ± 13 , AFB: 26 ± 6 , HRA: 24 ± 9 , HRB: 31 ± 9) und *Archaeen* (AFA: 6 ± 2 , AFB: 5 ± 1 , HRA: 6 ± 2 , HRB: 5 ± 2), lag im Bereich, der auch in den Schwimmbettfermentern und anderen Systemen gemessen wurde. Offenbar wird die mikrobielle Diversität nicht durch diese Unterschiede in der Verfahrensweise beeinflusst. Die Unterschiede die zwischen den beiden parallel betriebenen Reaktoren auftraten, bezogen sich überwiegend auf die archaeelle Gemeinschaft in Anaerobfilter und Hydrolysereaktor. Wobei die Abweichungen auf den Aufwuchsträgern nur gering waren. Obwohl Anaerobfilter und Hydrolysestufe Biogas unterschiedlicher Qualität produzierten (vgl. Abb. II 1.1.1-16), wurden eher geringe Unterschiede der Gemeinschaften im Perkolat zwischen den Kompartimenten beobachtet. Dies kann darin begründet liegen, dass das beprobte Perkolat durch das gesamte Reaktor-System zirkulierte und somit eine starke gegenseitige Beeinflussung der Gemeinschaften in HR und AF vorlag. Die Unterschiede beruhten deshalb auf den archaeellen Gemeinschaften die adhäsiv auf den Aufwuchsträgern wuchsen. Diese zeigten sowohl eine etwas andere Populationsstruktur als auch eine deutliche gesteigerte Quantität sowohl absolut als auch in Relation zur bakteriellen Gemeinschaft. Wodurch die höheren Methangehalte in den Anaerobfiltern (Methan-gehalt in den letzten vierzehn Tagen AFA: $71,1 \pm 2,0$, HRA: $59,9 \pm 2,2$; AFB: $71,2 \pm 1,0$; HRB: $52,0 \pm 5,1$) erklärt werden konnten.

Die am fünfzehnten Versuchstag einsetzende Luftstrippung zeigte keine deutlichen Auswirkungen auf die Gemeinschaften weder der Archaea und Bakterien. Da diese unter vorheriger Abkopplung der Reaktorkompartimente vom Perkolatspeicher durchgeführt wurde, ist zu vermuten, dass hierdurch die Auswirkungen auf die mikrobielle Gemeinschaft gering gehalten wurden.

Obwohl keine eigene Klonbibliotheken für den LBF Versuch V erstellt wurden, was sich insbesondere auf die Identifizierung der bakteriellen TRFs auswirkte, konnten trotzdem anhand der Klonbibliotheken aus den Schwimmbettfermentern und Literaturdaten auch hier 75 % der zahlenmäßig wichtigsten Gruppen (die in einem Profil über 5 % Anteil besaßen) zugeordnet werden.

Fazit

Durch die Verwendung von HTK als Substrat sowie die Integration der Strippung war Versuch V der LBF besonders interessant für die Untersuchung der Prozessmikrobiologie. Obwohl vermutet wurde, dass die diskontinuierliche Verfahrensweise die Adaption an hohe Stickstoffwerte erschwerte, wurden stabile bakterielle und archaeelle Gemeinschaften beobachtet. Hier fielen Parallelen in der Zusammensetzung der Arten im Vergleich der LBF mit anderen Biogasreaktorsystemen auf, die ebenfalls hohem Stickstoffstress ausgesetzt waren. So wurde für die Bakterien eine Dominanz der Klasse *Clostridia* und für die *Archaeen* der Gattung *Methanothermobacter* festgestellt. Im Vergleich der Aufwuchsträger der Anaerobfilter gegenüber dem Perkolat zeigte sich, dass in den Biofilmen *Archaeen* besonders angereichert waren, was sich förderlich auf die Methanbildung des gesamten Systems auswirkte.

II.1.2 Vergärung stickstoffreicher Substrate im Schwimmbettfermentationssystem (SBF)

II.1.2.1 Verfahren zur Vergärung unterschiedlicher Silagen

Als Referenzsystem zu den batchbetriebenen Leachbedfermentationsanlagen wurden zwei kontinuierliche Schwimmbettfermentationssysteme (SBF A, B) installiert und über einen Versuchszeitraum von 606 Tagen im thermophilen (55°C) und hyperthermophilen (65°C) Temperaturbereich betrieben. Das Schwimmbettfermentationssystem ist aufgrund seiner verfahrenstechnischen Beschaffenheit und Eigenschaften besonders gut für die Vergärung faserreicher Substrate (wie z.B. Gras- und Luzernesilage) geeignet. In Kopplung mit einem nachgeschalteten Methanreaktor ist das System für hohe Raumbelastungen ($B_R > 5 \text{ kg oTS/m}^3 \text{ d}^{-1}$) und einen kontinuierlichen Anlagenbetrieb ausgelegt. Eine kalkulatorische Bestimmung der Verweilzeit anhand einer TS-Massenbilanz für die Vergärung von Maissilage bei einer Raumbelastung $B_R = 4,5$ nach Linke et al. (2015) ergab für die verwendeten Schwimmbettfermenter eine HRT_{HR} von 158 Tagen.

Wie bei dem Leachbedfermenter handelt es sich bei dem Schwimmbettfermenter um ein zweiphasiges und zweistufiges Anlagenkonzept (**Abb. II.1.2.1-1, Abb. II.1.2.1-2**).

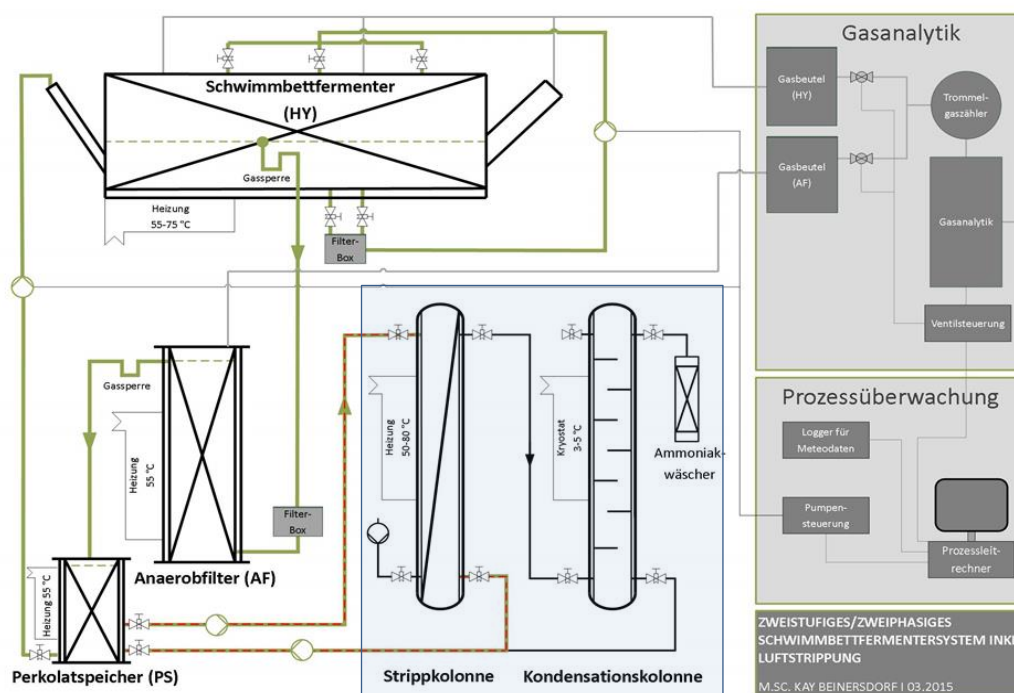


Abb. II.1.2.1-1: Verfahrensfliessbild des kontinuierlichen (hyper)thermophil betriebenen Schwimmbettfermentersystems mit Horizontalfermenter als Hydrolysestufe und Anaerobfilter als Methanogenesestufe, ergänzt um ein System zur Luftstrippung (blau hinterlegt). grün - Perkolatstrom, grau - Gasstrom, rot - zu strippende/gestrippte Prozessflüssigkeit, schwarz - Prozessüberwachung

Der im Doppelansatz bereitgestellte Versuchsaufbau zeichnete sich durch die Trennung von Fest- und Flüssigphase (zweiphasig) als auch durch die räumliche Separation von Hydrolyse und Methanogenese (zweistufig) aus. Ebenso waren bei dem SBF-System keine zusätzlichen Elemente zur aktiven Durchmischung (Rührer) des Fermenters notwendig. Ausschließlich eine zyklisch betriebene Perkolation (Berieselung) der im Kreislauf geführten Prozessflüssigkeit wurde als eine dynamische Komponente verwendet (Linke et al., 2015). Die als Horizontalfermenter genutzte Hydrolyseeinheit wies ein

Arbeitsvolumen von 35 L auf und nutzte die Neigung strukturreicher Substrate zur Ausbildung einer Schwimmschicht aus. Die unter der Schwimmschicht befindliche Prozessflüssigkeit war somit weitestgehend frei von Feststoffen und wurde über eine Perkolation zur Inokulierung der Schwimmschicht als auch zur internen Entfrachtung der Organik genutzt.

In einem zweiten Kreislauf floß das mit niedermolekularen Verbindungen (z. B. langkettige Fettsäuren, Zuckermomere, Aminosäuren, Stickstoff) angereicherte Perkolat in den nachgeschalteten Anaerobfilter/Methanreaktor (AF; Arbeitsvolumen 22 L). Das in diesem Reaktorkompartiment eingebrachte Festbett aus Kunststofffüllkörpern (Typ: Pall-Ring 15; Raschig GmbH, Deutschland) bildete mittels der deutlich vergrößerten Oberfläche die Grundlage für die Etablierung eines leistungsfähigen Biofilms. Die Pumpvolumina im Sekundärkreislauf wurden so gewählt, dass der Inhalt des AF einmal pro Tag vollständig ausgetauscht wurde. Der gegenüber organischen Kohlenstoffs entfrachtete Ablauf des AF floß anschließend über eine Gassperre in den Perkolatspeicher (PS), aus dem die Rezirkulation in den Horizontalfermenter erfolgte. Im Zuge einer stetigen prozesstechnischen Erweiterung und Optimierung, wurde ein ca. 20 L fassender, beheizbarer (55°C) Edelstahlbehälter als Perkolatspeicher installiert, welcher einen Kunststoffkanister ersetzte. Entsprechend dem Versuchsaufbau zur Leachbedfermentation bildete dieses Reaktorelement die Schnittstelle zwischen Fermentations- und Strippungssystem.

Die kontinuierliche Substratbeschickung erfolgte über ein Substratzugaberohr, welches unterhalb der Schwimmschicht in den Reaktor mündete. Die Einstauhöhe des Schwimmbettes wurde durch eine am Ende des Reaktionsraumes befindliche Rampe limitiert. Ausgegorenes Substrat konnte mittels eines Schubstempels über die Rampe geschoben und der Gärrest über ein dem Fütterungsrohr gegenüberliegendes Entnahmerohr aus dem Gärrestlager entnommen werden. Die Entnahme von Gärresten erfolgte im zweiwöchigen Turnus, wobei der entnommene Gärrest gepresst und das Presswasser dem Fermentationssystem wieder zugeführt wurde.

Zur Behandlung einer im Fermentationssystem stetig akkumulierenden, zytotoxischen Ammonium- und Ammoniakkonzentration erfolgte die Kopplung des Schwimmbett-Fermentationssystems mit einem System zur Ammoniumstrippung (**Abb. II.1.2.1-2 -3, -4**).

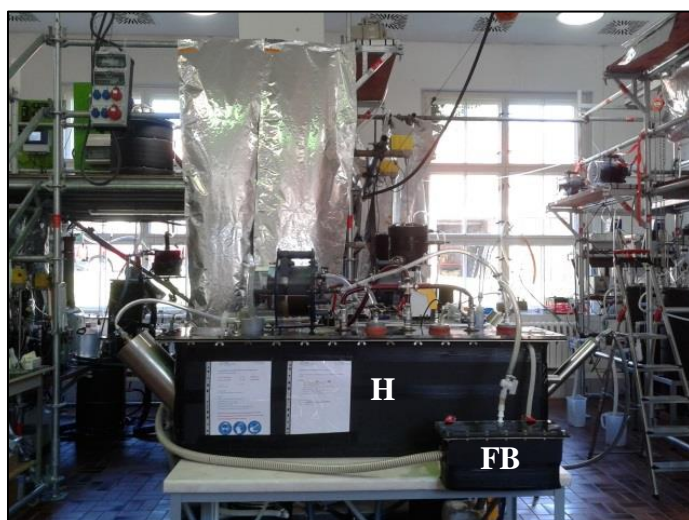


Abb. II.1.2.1-2: Seitenansicht der Hydrolyseeinheit (HR) des Schwimmbettreaktors und Filterbox (FB)

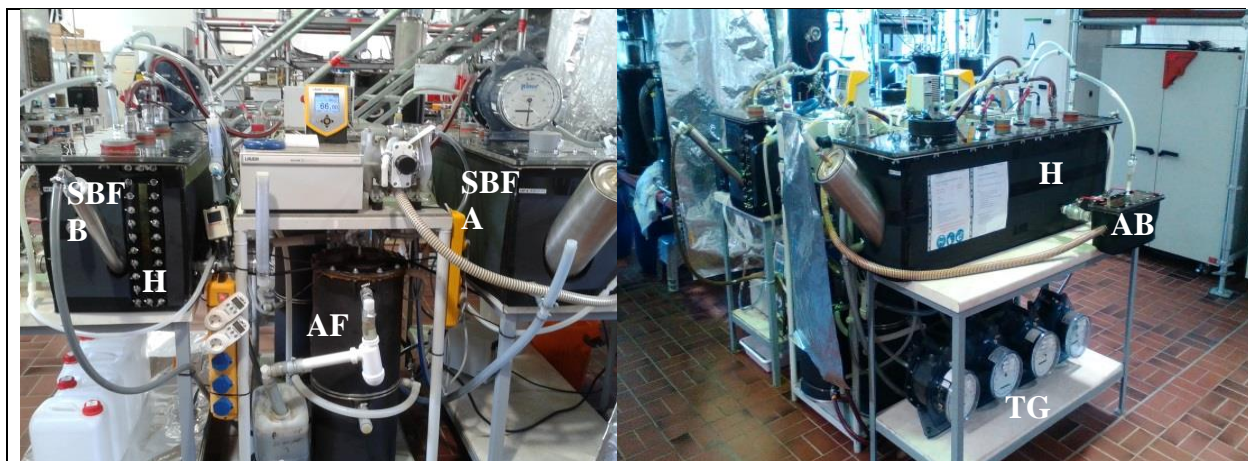


Abb. II.1.2.1-3: Anaerobfilter (AF), Überlauf zum Perkolatspeicher (PS), Thermobad (TB), Anaerobfilter (AF), Membranpumpe (MP).

Abb. II.1.2.1-4: Erweiterung des kontinuierlich (hyper) thermo-phil betriebenen SBF um Perkolatspeicher (PS) separater Erfassung der Biogasvolumina von HR+PS und AF mittels Trommelgaszähler (TGZ)

Substratcharakterisierung

Als Einsatzstoffe im Rahmen des 606-tägigen Versuchszeitraumes diente neben siliertem Klee gras auch Grassilage und Luzernesilage (Rhinmilch GmbH, Fehrbellin, Deutschland). Klee (*Trifolium sp.*) als auch Luzerne (*Medicago sp.*) sind der Familie *Fabaceae* taxonomisch zuzuordnen während die Zusammensetzung von Grassilage durch Vertreter der Gattung *Poaceae* dominiert wurde. Insbesondere die Vertreter der *Fabaceae* weisen bedingt durch ihre Fähigkeit symbiontisch Luftstickstoff zu binden, hohe Stickstoffgehalte auf ($N\text{-Kjeld.}_{\text{Klee}} \approx 12.531 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FM}$; $N\text{-Kjeld.}_{\text{Luzerne}} \approx 14.338 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FM}$; $N\text{-Kjeld.}_{\text{Gras}} \approx 8.260 \text{ mg kg}^{-1} \text{ FM}$). Eine kontinuierliche Monofermentation von Gras-, Klee gras- oder Luzernensilage erhöhte demnach, aufgrund der Aufkonzentrierung prozessinhibierenden Ammoniaks ($\text{NH}_3\text{-N}$), die Gefahr einer nachhaltigen und z. T. irreversiblen Hemmung des Biogasprozesses.

Im Rahmen der prozessbegleitenden Substratcharakterisierung erfolgte ferner eine Bewertung des Biogasbildungspotentials der eingesetzten Silagen nach der im Regelwerk VDI 4630 (VDI, 2006) definierten Methodik. Für Klee grassilage wurden Biogaserträge von ca. $223 \text{ l}_N \text{ kg}^{-1} \text{ FM}$ bzw. $632 \text{ l}_N \text{ kg}^{-1} \text{ oTS}$ erreicht, für Luzernensilagen Erträge in Höhe von ca. $208 \text{ l}_N \text{ kg}^{-1} \text{ FM}$ bzw. $547 \text{ l}_N \text{ kg}^{-1} \text{ oTS}$ und für Grassilage von ca. $188 \text{ l}_N \text{ kg}^{-1} \text{ FM}$ bzw. $578 \text{ l}_N \text{ kg}^{-1} \text{ oTS}$ (**Tab. II.1.2.1-1**).

Tab. II.1.2.1-1: Ermittelte Biogaserträge nach VDI 4630 für die im Schwimmbettfermentationssystem eingesetzten Substrate im Vergleich zu gemittelten Literaturwerten (*in Klammern*) nach LfL Bayern

Substrat	Biogasertrag [$\text{l}_N \text{ kg}^{-1} \text{ FM}$]	Biogasertrag [$\text{l}_N \text{ kg}^{-1} \text{ oTS}$]	Methananteil [%]
Klee grassilage	223,1 (≈ 185)	632,1 (≈ 551)	54,4 (≈ 54)
Grassilage	188,2 (≈ 208)	578,0 (≈ 584)	53,8 (≈ 54)
Luzernensilage	207,6 (≈ 159)	546,6 (≈ 536)	60,2 (≈ 55)

Die initiale Inokulierung der SB-Fermentationssysteme, insbesondere zur Ausbildung eines Biofilms auf den Füllkörpern im AF, erfolgte wie in den Versuchsreihen zum batchbetriebenen Trockenfermentation (LBF) mit Rindergülle (LVAT - Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung e.V.,

Groß Kreuzt). Die chemischen Parameter der eingesetzten Silagen sind in **Tab. II.1.2.1-2** zusammengestellt.

Tab. II.1.2.1-2: Physikochemische Parameter der in den Schwimmbettfermentern eingesetzten Substrate.

Silagen	TS	oTS	Leitfähigkeit	NH ₄ -N	N	Essig-Säure	Propion-säure	Gesamt-säure als ESÄ	P _{gesamt}
	[%FM]		[mS cm ⁻¹]	[mg kg ⁻¹ FM]			[g L ⁻¹]		[mg kg ⁻¹ FM]
Kleegras	36,8	91,8	18,6	511,8	10749,2	2,5	0,1	2,7	924,9
Gras	37,6	86,9	22,8	576,6	8260,8	4,8	0,4	5,5	739,6
Luzerne	45,6	89,3	41,0	1183,4	14336,6	3,9	0,2	4,1	1098,0

Versuchsmethodik

Die kontinuierliche Substratbeschickung erfolgte ausschließlich wochentags. Die in **Tab. II.1.2.1-3** relativ zur mittleren Tagesmenge (entspricht 100 %) dargestellten Beschickungsmengen sollen nach Liebetrau et al. (2015) trotz Aussetzung der Substratzugabe am Wochenende einem kontinuierlichen Gasertrag entsprechen.

Tab. II.1.2.1-3: Wöchentliche prozentuale Beschickungsmenge

Wochentag	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag
Beschickungsmenge [%] relativ zur mittleren Tagesmenge	160	80	80	90	90

Eine Raumbelastung von $B_R = 5 \text{ g}_{\text{oTS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ wurde unter kontinuierlicher Steigerung der Substratzugabemenge basierend auf am ATB generierten Erfahrungswerten nach rund 100 Tagen erreicht (Tab. II.1.2.1-3). Das aufgeführte Befütterungsregime mit Steigerungsraten der Raumbelastung um jeweils $1 \text{ g}_{\text{oTS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnte durch die Entfrachtungskapazität der Anaerobfilter gegenüber organischen Säuren zeitnah realisiert werden. Um einer potentiellen Säureakkumulation aufgrund steigender Raumbelastungen entgegen zu wirken, wurden die Befütterungsintervalle ab $B_R = 2 \text{ g}_{\text{oTS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ verlängert (**Tab. II.1.2.1-4**).

Tab. II.1.2.1-4: Höhe und zeitliche Dauer der Raumbelastung

Höhe Raumbelastung [kg oTS m ⁻³ d ⁻¹]	1	2	3	4	5
Befütterungsdauer [d]	21	21	28	35	150

Nach Erreichen einer definierten Schwimmschichtstärke von ca. 50 % der nutzbaren Reaktionsraumhöhe (bis Rampenoberkante), wurde ab Tag 135 in zweiwöchigem Rhythmus Gärrest entnommen, um langfristig konstante Bedingungen zwischen oTS-Zufuhr und oTS-Entnahme zu gewährleisten. Der entnommene Gärrest wurde mechanisch entwässert (gepresst) und anschließend, wie auch der anfallende Presssaft, physikochemisch charakterisiert (TS, oTS, NH₄-N, Kjeldahl-N). Neben der versuchstäglichen Erfassung der Gasquantität und -qualität, Temperatur und des pH-Wertes wurde die Prozessflüssigkeit hinsichtlich der Parameter Leitfähigkeit (EC), NH₄-N, Kjeldahl-N, Redoxpotential sowie FOS/TAC-Koeffizient, Säurekonzentrationen (C₂-C₆-Fettsäuren) und niedermolekulare Alkohole (Ethanol, Propanol) untersucht. Ausgewählte Ergebnisse der Prozessparameter sind Tab II.1.2.1-3 zu entnehmen. In **Abb. II.1.2.1-5** ist die gemittelte Biogasausbeute (Wochenmittel) des thermophilen und

hyperthermophilen Versuchsansatzes (SBF A bzw. SBF B) für die ca. 135-tägigen Einfahrzeit unter Verwendung von Grassilage sowie für die nachfolgenden Zeiträume unter Variation der Substratart (SW1 - Klee gras, SW2 - Luzerne) und für den Zeitraum der Luftstrippung (NE) als Verfahren zur Stickstoffeliminierung dargestellt. Substratwechsel (SW1, 2) erfolgten ausgehend von Klee grassilage (Tag 0-240) über Grassilage (Tag 241 – 375) und Luzernesilage (Tag 376 – 606); Stickstoffeliminierung (NE) erfolgte ab Tag 520.

Schwankungen der dargestellten Biogasausbeuten resultierten aus dem prozessstörenden Einfluss der Gärrestentnahme sowie aus den stark ausgeprägten, stetig wiederkehrenden Struvit-Inkrustrationen im Leitungs- und Pumpensystem. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die ermittelten Biogasausbeuten für Raumbelastungen $B_R < 5 \text{ g}_{\text{OTS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ anteilig über den Referenzwerten lagen. Es ist zu vermuten, dass die erhöhten Gasausbeuten, die zum Teil bis zu 5 - 7 % über den Referenzwerten nach VDI 4630 lagen, das Resultat einer Akkumulation organischer Säuren im Zuge einer vorübergehenden Prozessstörung darstellen. Die Fähigkeit der Konversion der angereicherten organischen Säuren zu Biogas unterstreicht das Vermögen der Schwimmbettfermentations-technologie kurzzeitig erhöhte Stoßbelastungen auszugleichen.

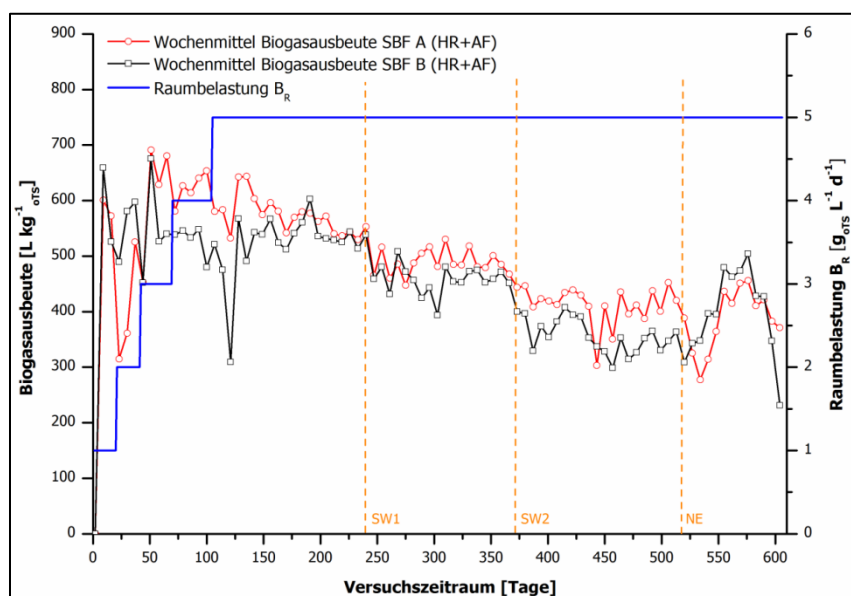


Abb. II.1.2.1-5: Biogasausbeuten und Raumbelastung des kontinuierlichen, thermophil und hyperthermophil betriebenen Schwimmbettfermenters. A bzw. B im Versuchszeitraum von 0 - 606 Tagen.

Ferner wurde festgestellt, dass die ermittelte Biogasausbeute des hyperthermophilen Versuchsansatzes (SBF B) nahezu im gesamten Versuchszeitraum unterhalb des thermophilen Fermentationsansatzes lag. Zudem konnte eine verlängerte Einfahrphase im hyperthermophilen Ansatz in Bezug auf eine Annäherung an die Referenzbiogasausbeute detektiert werden. Ursache hierfür könnte die benötigte Adaptiondauer der Mikroorganismen an hyperthermophile Prozessbedingungen sein, um eine effiziente und stabile Biozönose zu etablieren.

Weitere Faktoren für die verringerte Biogasausbeute im hyperthermophilen SBF könnten zudem auch die fortschreitende Anreicherung von Fettsäuren oder der Anstieg prozessinhibierender Stickstoffverbindungen sein (**Abb. II.1.2.1-6, Abb. II.1.2.1-7**). Hinsichtlich der ab Tag 175 stetig abneh-

menden Biogasausbeute kann vermutet werden, dass mit dem Überschreiten der prozesskritischen Ammoniumkonzentration von ca. $3000 \text{ mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$ (und einer entsprechenden Ammoniakkonzentration von ca. $696 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ bei pH 7,88 und 55°C bzw. $1046 \text{ mg NH}_3 \text{ L}^{-1}$ bei pH 7,88 und 65°C) und trotz einsetzender Adaption der Mikroorganismen an die Habitatbedingungen in den Fermentationssystemen, eine prozessbiologische Hemmung erfolgte (FNR, 2013).

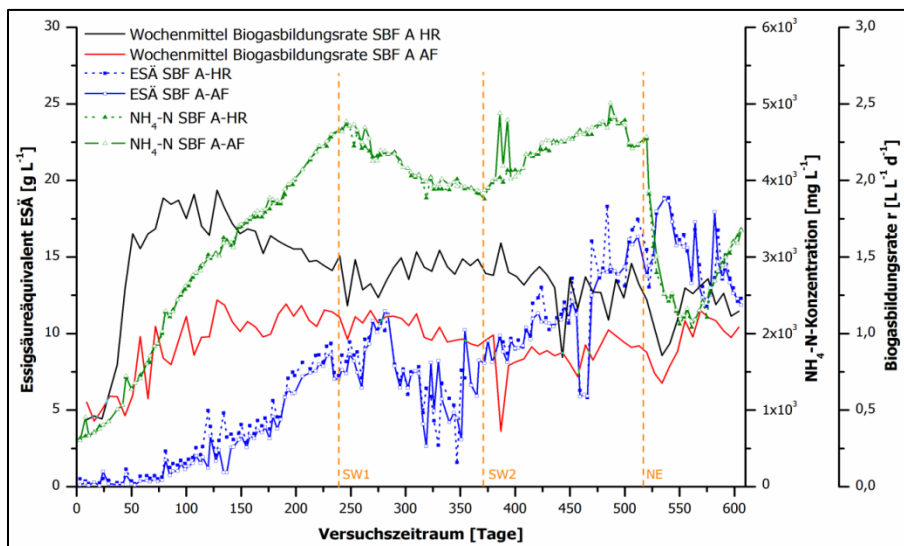


Abb. II.1.2.1.-6 : Verlauf der Biogasbildungsrate, der Ammoniumkonzentration ($\text{NH}_4\text{-N}$) und der organischen Säuren - ausgedrückt als Essigsäureäquivalent (ESÄ) - im Hydrolysereaktor (HR) und Anaerobfilter (AF) des kontinuierlich betriebenen, thermophilen Schwimmbettfermentationssystem (SBF A) im Versuchszeitraum von 0 - 606 Tagen.

Diese Annahme wurde gestützt durch den detektierten Anstieg der Biogasausbeuten nach Einsetzen der Stickstoffeliminierung (NE) im Schwimmbettfermentationssystem ab Versuchstag 525.

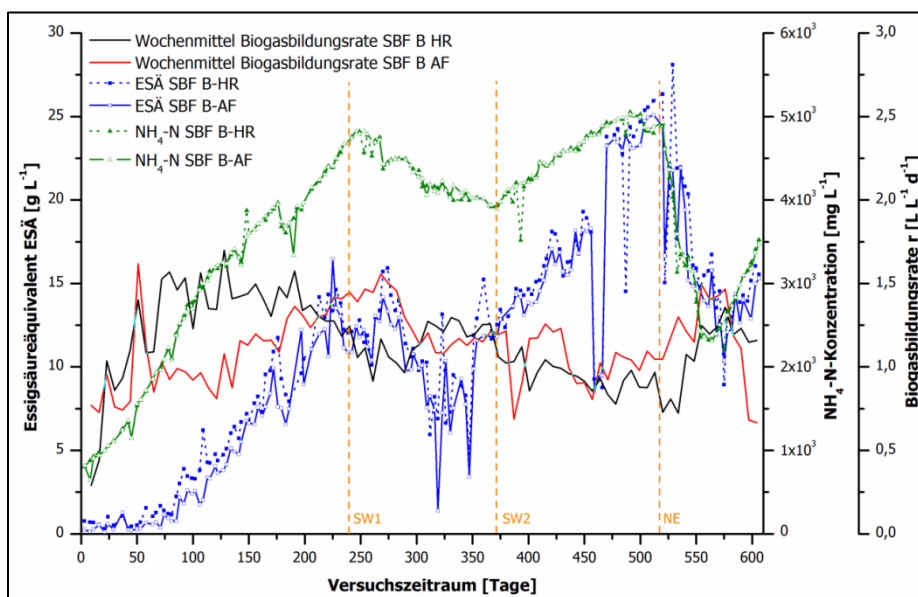


Abb. II.1.2.1.-7 : Verlauf der Biogasbildungsrate, der Ammoniumkonzentration ($\text{NH}_4\text{-N}$) und der organischen Säuren - ausgedrückt als Essigsäureäquivalent (ESÄ) - im Hydrolysereaktor (HR) und Anaerobfilter (AF) des kontinuierlich betriebenen, hyperthermophilen Schwimmbettfermentationssystem (SBF B) im Versuchszeitraum von 0 - 606 Tagen.

Ferner ist festzustellen, dass der kontinuierliche Anstieg der $\text{NH}_4^-/\text{NH}_3$ -Konzentration über den Versuchszeitraum zu einer Akkumulation organischer Säuren (ausgedrückt als Essigsäureäquivalent) führte.

Insbesondere im hyperthermophilen Fermentationssystem wurden maximale Konzentrationen von $26,34 \text{ g L}^{-1}$ (Tag 520) ermittelt – im Vergleich zu maximal $17,46 \text{ g L}^{-1}$ im thermophilen Fermentationssystem (Tag 512). Diese fehlende Konversion organischer Säuren bestätigte ebenfalls die Hemmung der methanbildenden Mikroorganismen durch die akkumulierenden Stickstoffverbindungen. Gleichzeitig wurde die anhaltende Anreicherung organischer Säuren ebenfalls als Stress- und Hemmfaktor für die mikrobielle Gemeinschaft in den Fermentationssystemen gewertet.

Der in Abb. II.1.2.1-6 und Abb. II.1.2.1-7 dargestellte, fluktuierende Verlauf der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration und des Essigsäureäquivalenten ist in Übereinstimmung mit dem durchgeführten Substratwechsel von Klee gras auf Grassilage (SW1) und Grassilage auf Luzerne (SW2). Hierbei konnte festgestellt werden, dass die detektierte Menge an $\text{NH}_4\text{-N}$ in der Prozessflüssigkeit von SBF A und B nach dem Substratwechsel SW1 abnahm. Infolgedessen konnte eine leichte Zunahme der Biogasbildungsrate und eine Verringerung der freien organischen Säuren (als ESÄ) detektiert werden. Ursache hierfür kann einerseits die verringerte Freisetzung von $\text{NH}_4\text{-N}$ aus dem Substrat Grassilage im Vergleich zu Klee gras und Luzerne sein. Dies könnte in einer Verbesserung der mikrobiologischen Aktivität, einer zunehmenden Konversion der im System vorhandenen organischen Säuren zu Biogas und folglich in einer Steigerung der Biogasbildungsrate resultiert haben. Andererseits ist es möglich, dass die Metabolisierung des Substrates Grassilage komplexer als die des Substrates Klee grassilage ist und einer Adaptionsphase bedurfte. Dadurch fand die Bildung organischer Säuren und anderer Metabolite verlangsamt statt, was zu der ermittelten Steigerung der Biogasbildungsrate führte. Es ist zu bemerken, dass der prozessstimulierende Effekt einer verringerten Belastung durch $\text{NH}_4\text{-N}$ primär in den Hydrolysereaktoren erkennbar war.

Folglich kann vermutet werden, dass mit dem Substratwechsel eine physikochemische Veränderung des Haufwerk/ Schwimmbettes innerhalb der Hydrolyseeinheit einherging, welcher einen förderlichen Effekt auf die mikrobiologische Aktivität im Haufwerk zu haben schien. Dem gegenüber nahm die Biogasbildungsrate im Anaerobfilter sowohl des SBF A als auch B weiter ab. Es ist zu vermuten, dass sich eine Minderung der Konzentration an $\text{NH}_4\text{-N}$ um ca. 1000 mg L^{-1} für die im Anaerobfilter unter relativ homogenen Umweltbedingungen lebenden Mikroorganismen, weniger prozessstimulierend auswirkt.

Bei Betrachtung der in Abb. II.1.2.1-6 und Abb. II.1.2.1-7 dargestellten Verläufe der Biogasbildungsrate für die Hydrolysereaktoren und Anaerobfilter wurden deutliche Unterschiede festgestellt. Während die Biogasbildungsrate des thermophilen Hydrolysereaktors stets größer als die des zugehörigen thermophilen Anaerobfilters war, wechselte dieses Verhältnis zwischen hyperthermophilen Hydrolysereaktor und dem zugehörigen, thermophilen Anaerobfilter zeitweise. Es wurde vermutet, dass das hyperthermophile Fermentationssystem aufgrund der bestehenden kritischen Temperatur-, $\text{NH}_4^-/\text{NH}_3$ -Bedingungen (**Abb. II.1.2.1-8**), auf Veränderungen im Fermentationsverlauf, hervorgerufen durch z. B. Substratwechsel, Prozessstörungen, Gärrestentnahme, sensibler in Form einer Zu- oder Abnahme der Biogasbildungsrate reagiert.

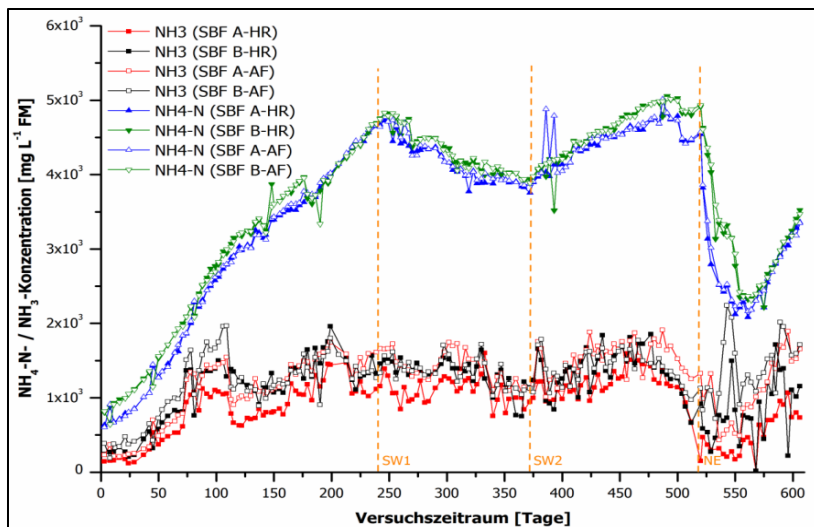


Abb. II.1.2.1-8: Verlauf der Ammonium- und Ammoniakkonzentration im Hydrolysereaktor (HR) und Anaerobfilter (AF) des kontinuierlich betriebenen, thermophilen und hyperthermophilen Schwimmbettfermentationssystems im Versuchszeitraum von 0 - 606 Tagen.

Hinsichtlich der produzierten Biogasmenge in den SBF-Systemen wurde festgestellt, dass durchschnittlich $\frac{2}{3}$ der Gesamtbiogasmenge durch Umsetzung der organischen Säuren in den Hydrolysereaktoren und nur $\frac{1}{3}$ in den Anaerobfiltern erfolgte (**Abb. II.1.2.1-9**). Entsprechend dem Verlauf der Biogasbildungsraten, nahm die produzierte Biogasmenge in den Hydrolysereaktoren stetig ab, während die Biogasmengen der Anaerobfiltern relativ konstant über den gesamten Versuchszeitraum blieben. Mit Beginn der Stickstoffeliminierung ist ein deutliches Absinken der produzierten Biogasmenge in den Hydrolysereaktoren festzustellen. Dieses Absinken könnte als Folge der gravierenden Änderungen in Bezug auf die Ammoniumkonzentration, die Konzentration organischer Säuren und des pH-Wertes im Strippungszeitraum erklärt werden. Hingegen ist mit Einsetzen der Stickstoffeliminierung ein leichter Anstieg der durch die Anaerobfilter produzierten Biogasmenge erkennbar.

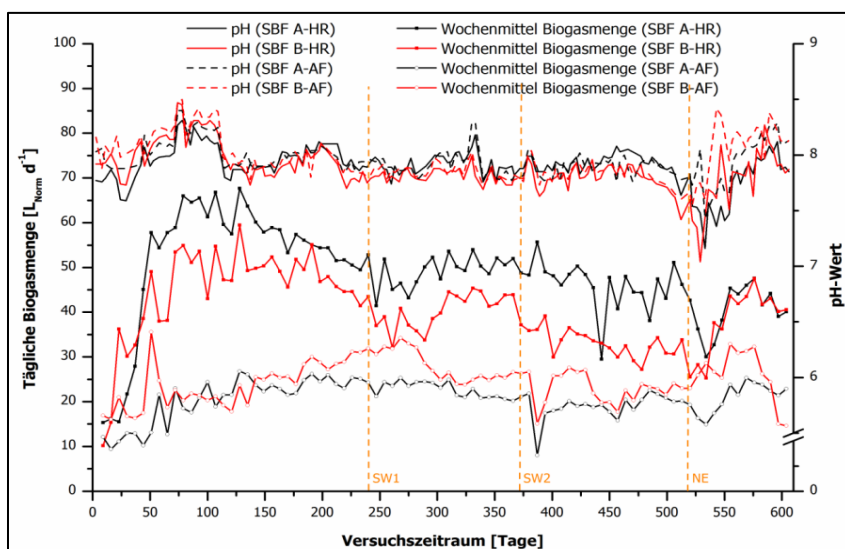


Abb. II.1.2.1-9: Verlauf der Biogasmenge und des pH-Wertes im Hydrolysereaktor (HR) und Anaerobfilter (AF) des kontinuierlich betriebenen, hyperthermophilen Schwimmbettfermentationssystem (SBF B) im Versuchszeitraum von 0 - 606 Tagen.

Für die detektierte Methankonzentration im Versuchsverlauf (**Abb. II.1.2.1.-10**) wurde ein abweichendes Verhältnis im Vergleich zu der produzierten Biogasmenge durch die jeweiligen Systemkomponenten festgestellt.

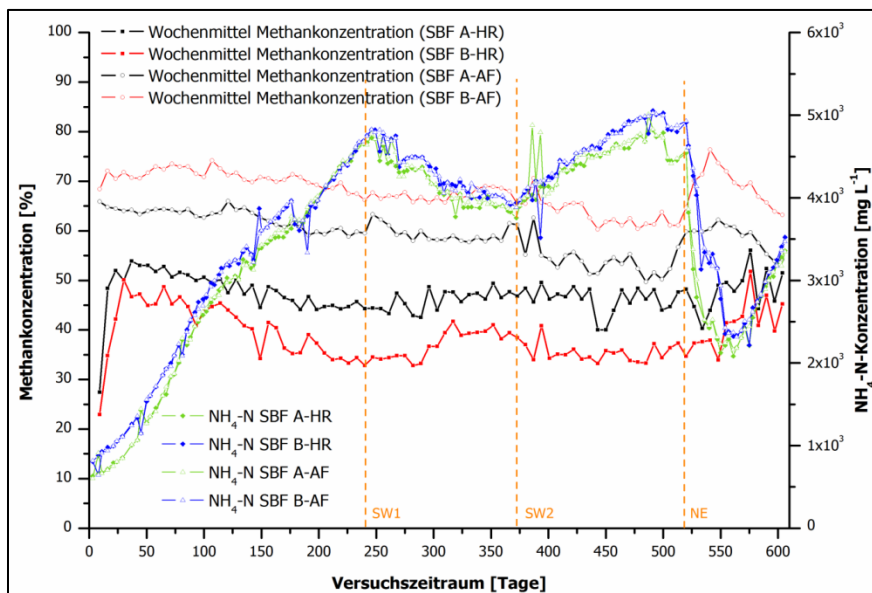


Abb. II.1.2.1.-10: Verlauf der Methan- und $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration im Hydrolysereaktor (HR) und Anaerobfilter (AF) des kontinuierlich betriebenen, hyperthermophilen Schwimmbettfermentationssystem (SBF B) im Versuchszeitraum von 0 - 606 Tagen.

Dabei war die Methankonzentration im Biogas der Anaerobfilter stets größer als die im Biogas der Hydrolysereaktoren. Dieses Ergebnis war für beide Fermentationssysteme (SBF A, B) gültig. Jedoch ist zu bemerken, dass trotzdem die geringste Methankonzentration im Biogas des hyperthermophilen Hydrolysereaktors detektiert wurde, die höchste Methankonzentration im Biogas des zugehörigen thermophilen Anaerobfilters festgestellt werden konnte. Obwohl also die Biogasmenge der Hydrolysereaktoren größer war als die der Anaerobfilter, war die Qualität (bzgl. Methan) des Biogases der Anaerobfilter deutlich besser (ca. 65 % CH_4 in AF ggü. ca. 43 % CH_4 in HR – gemittelt über beide SBF-Systeme). Folglich wurde vermutet, dass die Methanogenese im Schwimmbettfermenter unter hyperthermophilen Bedingungen weniger gut abläuft als unter thermophilen Bedingungen. Gleichzeitig aber werden die der Methanogenese vorgeschalteten Stufen der anaeroben Vergärung unter hyperthermophilen Bedingungen begünstigt, infolgedessen mehr Edukte zur Methanbildung im zugehörigen Anaerobfilter verfügbar waren (Abb. II.1.2.1.-7). Diese Annahme wird durch den direkten Vergleich der in den Anaerobfiltern erzeugten Biogasmenge (Abb. II.1.2.1.-9) gestützt, wobei der Anaerobfilter (AF-B) des hyperthermophiler Schwimmbettfermenters mehr und qualitativ höherwertiges Biogas produziert als der Anaerobfilter (AF-B) des thermophilen Schwimmbettfermenters.

Fazit

Es kann zusammengefasst werden, dass die im Versuchsverlauf ermittelten Konzentrationen an NH_4 und NH_3 circa 3- bis 10-fach höher waren, als von anaeroben Fermentationssystemen toleriert werden konnten. Somit führten die Konzentrationen der genannten Stickstoffverbindungen zu einer eingeschränkten Fermentationsleistung. Ferner ist zu vermuten, dass aufgrund der festgestellten,

zunehmenden Akkumulation organischer Säuren, insbesondere methanogene Mikroorganismen von der $\text{NH}_4\text{-}/\text{NH}_3$ -Hemmung betroffen waren, aufgrund dessen nur eine unvollständige Konvertierung der vorhandenen organischen Säuren zu Methan durchgeführt werden konnte. Folglich ist zu bemerken, dass eine Monofermentation stickstoffreicher Substrate im kontinuierlichen Schwimmbettfermenter, diese Systeme zunehmend an die Leistungsgrenzen führt und die Gefahr einer irreversiblen Hemmung zunimmt. Unter Berücksichtigung der ermittelten Biogasquantität und -qualität und deren zeitlichen Fluktuationen ist festzustellen, dass der hyperthermophile Hydrolysereaktor gegenüber dem thermophilen Pendant höhere Schwankungen aufwies und folglich als mikrobiologisch sensibler und weniger prozessstabil im Hinblick auf eine Auslenkung durch prozess- und verfahrenstechnische Veränderungen bzw. Störungen reagiert. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass das hyperthermophil betriebene Fermentationssystem im Versuchszeitraum deutlich stärkeren Stressoren ausgesetzt war. Folglich kann dem hyperthermophilen Schwimmbettfermenter trotz nachweislich höherer Sensitivität eine außerordentliche Stressresilienz unterstellt werden.

II.1.2.2 Mikrobiologie der Schwimmbettfermenter

Die Langzeitversuche mit den zwei Schwimmbettfermenter-Systemen stellten verfahrenstechnisch einen zentralen Teil des Projektes dar und wurden auch mikrobiologisch intensiv untersucht. Die folgenden Randbedingungen aus dem verfahrenstechnischen Betrieb gaben hierbei den Rahmen für die mikrobiologischen Untersuchungen an den Schwimmbettfermentern (SBF) vor. Die zwei Fermenter-Systeme wurden über einen Zeitraum von 606 Tagen betrieben und unterschieden sich in der Prozesstemperatur (thermophil 55°C bzw. hyperthermophil 65°C) der Hydrolysereaktoren (HR) wogegen die Anaerobfilter (AF) bei beiden Systemen thermophil betrieben wurden. Es erfolgten zwei Wechsel des Substrates, welches aus den stickstoffreichen nachwachsenden Rohstoffen Klee-, Gras- und Luzernesilage bestand. Gegen Ende des Betriebes mit Luzernesilage wurde die Stickstoffeliminierung aus der Prozessflüssigkeit mithilfe der Strippung, die zuvor in den LBF-Versuchen erprobt worden war, in den Versuchsaufbau integriert. Im Versuchsverlauf wurde viermal Perkolat entnommen um weitere Stickstoffeliminierungsverfahren zu erproben. Diese bestanden in der MAP-Fällung sowie Versuchen zur Behandlung der Prozessflüssigkeit mithilfe des mikrobiologischen Anammox-Verfahrens (vgl. II.1.7). Die sich demnach im Laufe des Betriebes der SBF mehrfach ändernden Bedingungen erforderten eine umfangreiche vergleichende mikrobiologische Charakterisierung der angereicherten Gemeinschaften von Bakterien und Archaeen bei thermophilen und hyperthermophilen Bedingungen.

Untersucht wurde die Prozessflüssigkeit aus den verschiedenen Reaktorkompartimenten. Diese Proben stellten, da das Perkolat durch HR und AF zirkuliert, aussagekräftige „Mischproben“ für das Gesamtsystem dar. Es ist zu beachten, dass trotz der Benennung in „Hydrolyse-Reaktor“ und „Anaerobfilter“ zur Methanisierung die Trennung der Biomasse-Abbauschritte zwischen den Reaktorstufen nicht vollständig erfolgt. Auch in den HR erfolgte eine erhebliche Biogasbildung und in den AF eine bakterielle Vergärung gelöster Stoffe. Deshalb ist es beispielsweise auch in den HR sinnvoll, die Methanogenen-Gemeinschaft zu untersuchen, da hier insbesondere der Temperaturunterschied zwischen HRA und HRB interessant ist. Zu bedenken ist, dass Organismen die überwiegend in den Biofilmen leben, im Perkolat unterrepräsentiert sein sollten. Allerdings wurde bei der mikroskopischen

Untersuchung von Substratpartikeln zumindest in Bezug auf die autofluoreszierenden Methanogenen meist keine starke Besiedlung der Partikel beobachtet.

Die SBF wurden mit unterschiedlichen molekularbiologischen Methoden untersucht: die TRFLP deckte den gesamten Versuchszeitraum ab. Die besonders interessante Phase, während der durch Stripung herbei geführten Senkung der Stickstoffgehalte, wurde mit Klonbibliotheken detailliert untersucht. Regelmäßige mikroskopische Untersuchungen zu autofluoreszierenden Methanogenen sowie QPCR-Untersuchungen wurden ergänzend angewendet. Wesentliche Informationen zum Betrieb der SBF und der Beprobung zur molekularbiologischen Untersuchung sind in **Abb. II.1.2.2-1** dargestellt. Zusätzliche mikroskopische Untersuchungen erfolgten ab Tag 437 in wöchentlichem Rhythmus.

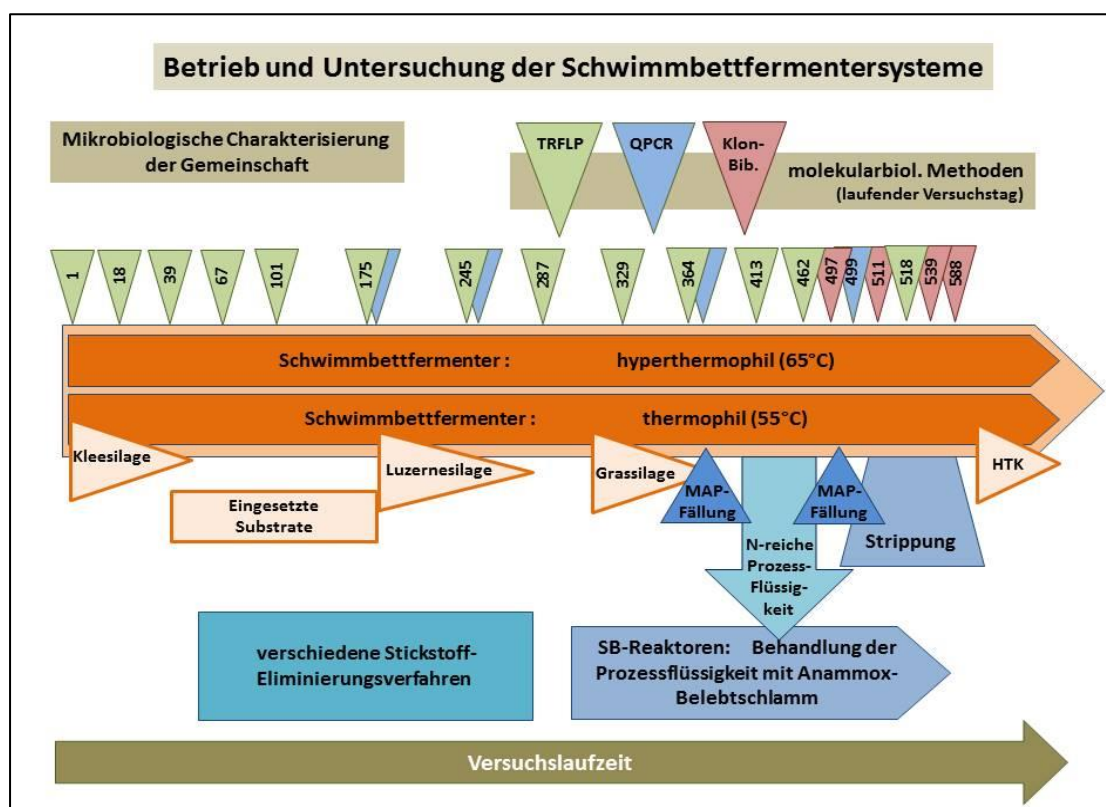


Abb. II.1.2.2-1: Betrieb und molekularbiologische Untersuchung der Schwimmbettfermenter

Mikroskopie

Die mikroskopische Untersuchung der Reaktorkompartimente erfolgte ab Tag 437 wöchentlich zur Überwachung der autofluoreszierenden archaeellen Gemeinschaft. Die Morphotypengemeinschaft war zunächst über einen längeren Zeitraum weitgehend konstant zusammengesetzt: Das Perkolat im Reaktorsystem A enthielt überwiegend einzellige, kokkoide Formen und zu einem geringen Anteil *Methanosarcina*-Cluster (**Abb. II.1.2.2-2**). In Reaktorsystem B (**Abb. II.1.2.2-3**) waren ebenfalls einzellige, kokkoide Formen zu beobachten, wobei jedoch *Methanosarcina*-Cluster anfangs fehlten. Es war zusätzlich ein erheblicher Anteil schwach leuchtender langer Stäbchen vorhanden, die teilweise auch in kurzen Ketten angeordnet waren.

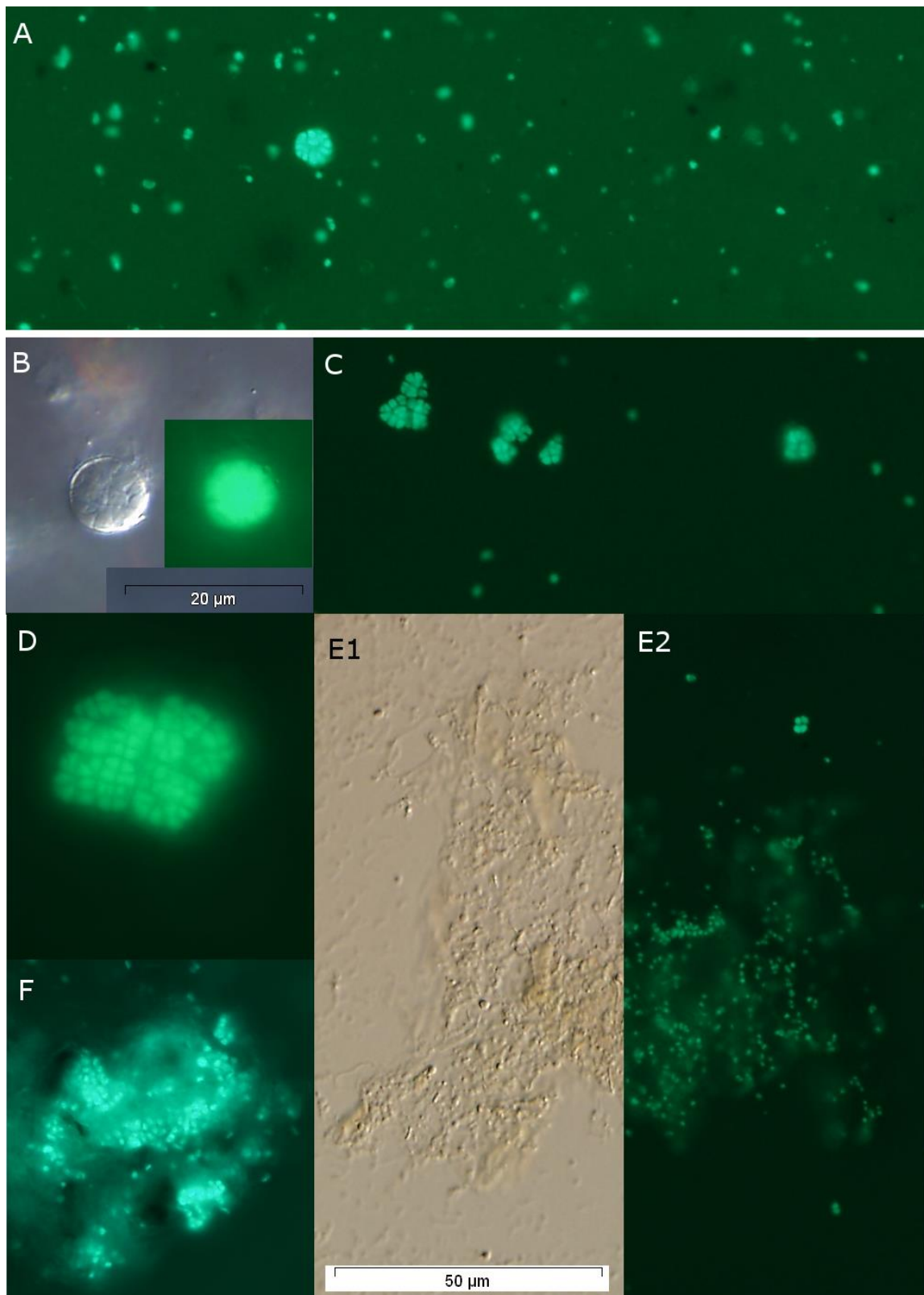


Abb. II.1.2.2-2: Reaktorsystem A: Zusammenstellung verschiedener Ausschnitte mikroskopischer Bilder **A** Morphotypen-Zusammensetzung vor der Strippung, kokkoide Formen und ein *Methanosarcina*-Cluster; ab **B**: zunehmende Morphotypendiversität während der Strippungsphase: **B**, **C**, **D**, **F**: verschiedene *Methanosarcina*-Stadien; **B**: Cyste mit beginnender Fragmentierung in Interferenzkontrast und Autofluoreszenz; **E1,2** unbekannter kokkoider Morphotyp als lose verbundene Flocke in Interferenzkontrast und Autofluoreszenz

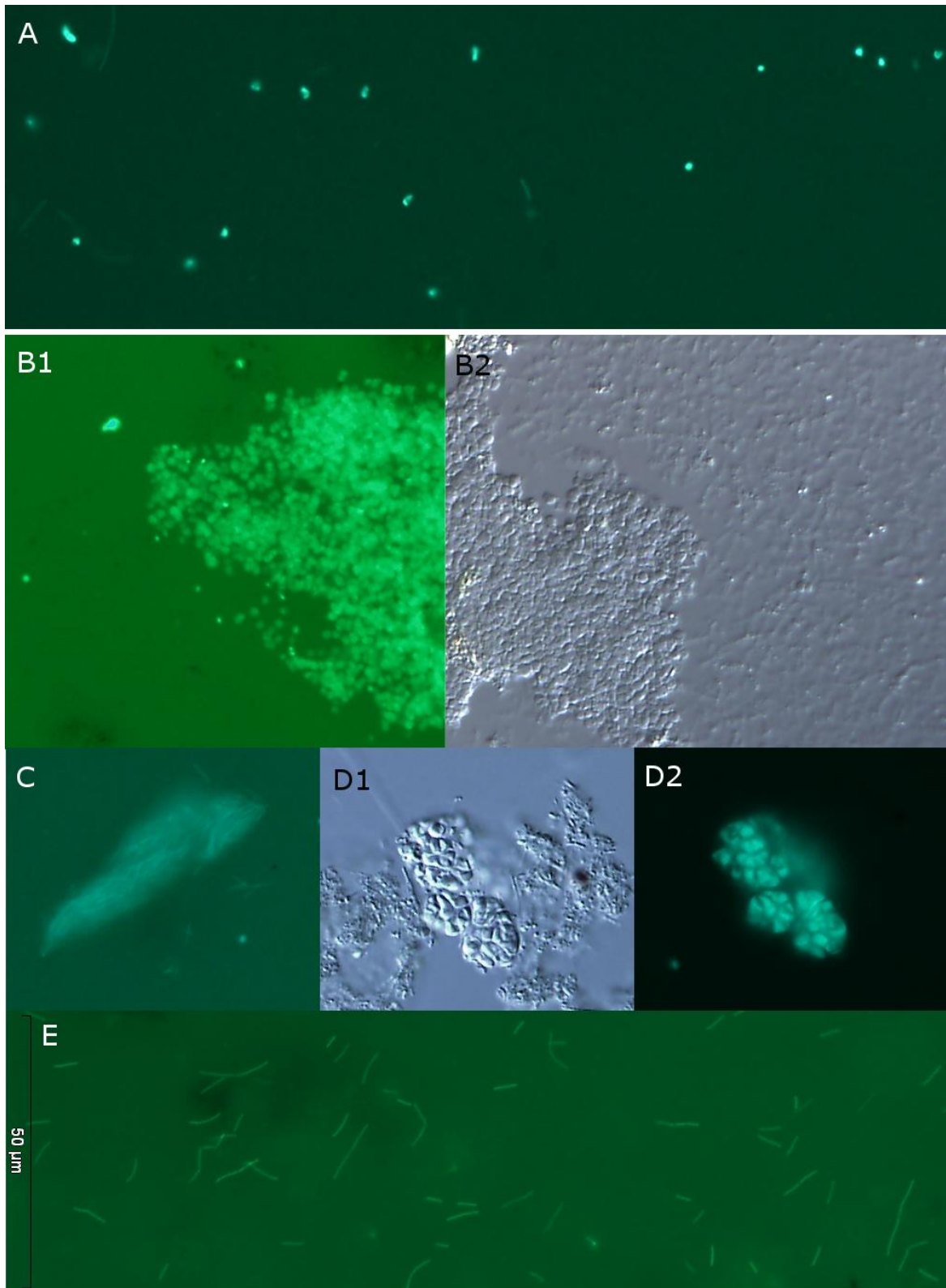


Abb. II.1.2.2-3: Reaktorsystem B: Zusammenstellung verschiedener Ausschnitte mikroskopischer Aufnahmen: **A** Morphotypen-Zusammensetzung vor der Strippung, kokkoide Formen und lange schwach fluoreszierende Stäbchenformen; ab **B** stark erhöhte Morphotypendiversität während der Strippungsphase: **B1,2** *Methanosarcina*-Cluster in Autofluoreszenz und Interferenzkontrast; **C** unbekannter Morphotyp: spindelförmiges Bündel aus vielen stäbchenförmigen Zellen; **D1,2** *Methanosarcina* in Interferenzkontrast und Autofluoreszenz; **E** stäbchenförmige Zellen

In Folge der Strippung, die am Tag 500 begann, wurde eine starke Zunahme der Morphotypendiversität beobachtet. Diese war ab der zweiten Woche nach Beginn der Strippung besonders auffällig. Die starke morphologische Veränderung deutete darauf hin, dass sich die Archaeen-Gemeinschaften in Folge der Strippung dynamisch veränderten. Besonders auffällig war die Morphotypen-Zunahme im Reaktorsystem B, welches durch die höhere Temperatur auch bei ähnlichen Stickstoffgehalten eine höhere Ammoniak-Toxizität aufwies als System A. Deshalb wurde angenommen, dass hier eine Anpassung der Archaeen-Gemeinschaften als Folge des Stickstoffstresses zu beobachten ist. Diese dynamische Phase der Gemeinschaften wurde durch die Erstellung von Klonbibliotheken intensiv untersucht, wobei sowohl Archaeen als auch Bakterien betrachtet wurden. Auch wenn die Bakteriengemeinschaften kaum Gegenstand der mikroskopischen Untersuchungen waren, wurde angenommen, dass auch sie auf die sich verändernden Bedingungen reagierten.

TRFLP-Analysen

Aufgrund des günstigen Verhältnisses vom Aufwand und Informationsgehalt eignete sich die TRFLP besonders zur Bearbeitung einer großen Anzahl von Proben und damit zur Abdeckung des gesamten Versuchszeitraums. Beprobte wurden das Perkolat der Hydrolysereaktoren und der der Methanisierung dienenden Festbettreaktoren („Anaerobfiltern“). Der untersuchte Zeitraum umfasst insbesondere die Dynamik der Anfangsphase sowie Veränderungen in der Folge der Substratwechsel. Günstig ist ebenfalls die hohe Verbreitung dieser Methode im Bereich der Biogasforschung (Carballa et al., 2011; Rademacher et al., 2012b; Niu et al., 2013; Sträuber & Kleinstüber, 2013; Goux et al., 2015; Klang et al., 2015; Theuerl et al., 2015; Jiménez et al., 2016), denn sie ermöglichte eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse und die Zuordnung von TRFs, wenn diese nicht durch die erstellten Klonbibliotheken abgedeckt wurden.

Die Ergebnisse, die in Form von Elektropherogramme vorliegen, wurden zu den einzelnen Probenahmezeitpunkten zu Fingerprintprofilen zusammengefasst. Profile deren Aussagefähigkeit durch mangelnde Qualität der Elektropherogramme eingeschränkt wurde oder die eine zu geringe Anzahl an Replikaten aufwiesen, wurden in Abbildungen mit einem Stern markiert (Details vgl. I.2.8).

Auf Basis der erstellten TRFLP-Profile wurden zur grundsätzlichen ökologischen Beschreibung die TRF-Anzahl und der Ginicoefficient als Maß der Gleichverteilung aus den Profilen errechnet. Die TRF-Anzahl ist ein Indikator wie viele unterschiedliche Bakterien- bzw. Archaeengruppen vorhanden waren und spiegelt so die Artenvielfalt wieder. Der Ginicoefficient kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und ist umso niedriger je gleichmäßiger die Verteilung ist. Zusätzlich wurde die Ähnlichkeit der Profile zueinander verglichen und einer Clusteranalyse unterzogen. Dies erfolgte mithilfe des UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)-Algorithmus, unter Verwendung des Pearson-Korrelations-Index als Abstandsmaß. Daraus resultiert ein prozentualer Wert der wiedergibt wie hoch die Ähnlichkeit zwischen den Profilen ist.

Zuordnung der TRFs zu taxonomischen Gruppen

Die Zuordnung der TRFs zu bestimmten bakteriellen (**Tab. II.1.2.2-1**) und archaeellen Taxa (**Tab. II.1.2.2-2**) erfolgte anhand der Klonbibliotheken des Schwimmbettfermenters und einem Abgleich mit publizierten Studien, die ebenfalls TRFLP zur Untersuchung von Biogasreaktoren verwendeten. Zu beachten ist dabei, dass die angefertigten Klonbibliotheken erst zum Ende der Versuchsphase ab

dem 497 Tag erstellt wurden. Dies schränkt den Aussagewert in Bezug auf die Proben in der Anfangsphase ein, besonders bei TRFs die mehreren Taxa zugeordnet werden können. Ein Beispiel dafür ist das archaeelle TRF 108 bp das in der Literatur sechs unterschiedlichen Taxa zugeordnet werden konnte, die den zwei Klassen *Methanobacteria* und *Methanomicrobia* entstammen. Für eine bessere Differenzierung wäre die Verwendung eines anderen Restriktionsenzym als *AluI* notwendig, da *AluI* sich als Restriktionsenzym für diese Anwendung etablierte (Rademacher et al., 2012b; Goux et al., 2015; Klang et al., 2015; Theuerl et al. 2015; Jiménez et al., 2016), würde die Verwendung einer Alternative die Vergleichbarkeit mit anderen Studien herabsetzen. Für die Zuordnung über Literatur war die Übereinstimmung im methodischen Ablauf der TRFLP entscheiden, wobei zusätzlich auch die Reaktorbedingungen vergleichbar sein mussten.

Tab. II.1.2.2-1 Zuordnung der bakteriellen TRFs zu den entsprechenden Taxa.

TRF-Länge	Taxon	Quelle der Zuordnung
68 bp	<i>Defluviitoga</i>	Klonbibliothek SBF
77 bp	Firmicutes	Theuerl et al., 2015
81 bp	Ruminococcaceae	Klonbibliothek SBF
93 bp	<i>Tepidimicrobium</i>	Klonbibliothek SBF
99 bp	Clostridiales	Theuerl et al., 2015
101 bp	Halanaerobiaceae	Klonbibliothek SBF
141 bp	<i>Hydrogenispora</i>	Klonbibliothek SBF
144 bp	<i>Hydrogenispora</i>	Klonbibliothek SBF
150 bp	Clostridia	Klonbibliothek SBF, Rademacher et al., 2012b
161 bp	Clostridia	Klonbibliothek SBF
164 bp	Clostridiales	Theuerl et al., 2015
166 bp	unbestimmtes Bakterium	Theuerl et al., 2015
169 bp	Clostridiales	Klonbibliothek SBF
172 bp	<i>Hydrogenispora</i>	Klonbibliothek SBF
181 bp	Clostridiales	Theuerl et al., 2015
194 bp	unbestimmtes Bakterium	Klonbibliothek SBF
205 bp	Clostridia	Klonbibliothek SBF
216 bp	Ruminococcaceae	Klonbibliothek SBF
218 bp	Ruminococcaceae	Klonbibliothek SBF
224 bp	<i>Acholeplasma</i>	Klonbibliothek SBF
296 bp	<i>Tepidanaerobacter</i>	Klonbibliothek SBF
303 bp	Clostridiales <i>incertae sedis XI</i>	Theuerl et al., 2015
334 bp	Ruminococcaceae	Klonbibliothek SBF, Theuerl et al., 2015
373 bp	Firmicutes	Theuerl et al., 2015
502 bp	Unbekanntes Bakterium	Theuerl et al., 2015

Tab. II.1.2.2-2: Zuordnung der archaeellen TRFs zu den entsprechenden Taxa.

TRF-Länge	Taxon	Quelle der Zuordnung
75 bp	Methanosarcinales	Klonbibliothek SBF
84 bp	Methanosarcinaceae	Theuerl et al., 2015
93 bp	Methanosaetaceae	Klonbibliothek SBF
108 bp	Unbestimmtes Archeon mögliche Taxa : <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanomicrobia</i> , <i>Methanothrix</i> , <i>Methanothermobacter</i> , <i>Methanosaeta</i> , <i>Methanobacterium</i> ,	Klonbibliothek SB,F Theuerl et al., 2015
244 bp	<i>Methanothermobacter</i>	Klonbibliothek SBF
318 bp	<i>Methanomassiliicoccus</i>	Klonbibliothek SBF
337 bp	<i>Methanothermobacter</i>	Theuerl et al., 2015
339 bp	Methanobacteriales	Rademacher et al., 2012b Rademacher et al., 2012b
429 bp	<i>Methanoculleus</i>	Klonbibliothek SBF

Fortsetzung Tab. II.1.2.2-2:

TRF-Länge	Taxon	Quelle der Zuordnung
435 bp	Methanomicrobia	Theuerl et al. 2015
434 bp	<i>Methanoculleus</i>	Klonbibliothek SBF
469 bp	Unbestimmtes Archeon mögliche Taxa: <i>Methanomassiliicoccus</i> , <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanothermobacter</i>	Klonbibliothek SBF
625 bp	Methanosarcinaceae	Klonbibliothek SBF

TRFLP Bacteria

Die Fingerprintprofile der TRFLP des bakteriellen 16S-rRNA-Gens aus der Hydrolysestufe und des Anaerobfilters der Reaktoren A und B sind in den **Abb. II.1.2.2-4** und **Abb. II.1.2.2-5** dargestellt.

Die Profile beider Kompartimente ähnelten sich zu denselben Probenahmetermeninen über den gesamten Zeitraum stark (mindestens 74 %). Dabei nahm die Ähnlichkeit der Profile im Verlauf zu und lag ab dem 364. Tag bei mindesten 94 %. Die zeitliche Entwicklung der Profile lässt sich in zwei Phasen einteilen. Wobei sich jeweils die Profile der Versuchstage 18 bis 67 von den späteren Profilen absetzten. In beiden Teilsystemen wich das Profil des 101 Versuchstages von den übrigen Profilen ab. Auffälligster Unterschied war die Dominanz des TRF 147 bp (AFA: 21,35 %; HRA: 20,11), der die sonst dominierende Gruppe 150 bp (Clostridiales) verdrängte. Ab dem 175. Tag wiesen die Profile eine große Kontinuität auf, so dass insgesamt nur geringe Veränderungen zwischen den einzelnen Zeitpunkten auftraten (AFA mindestens 77 % bzw. HRA mindestens 74 % Ähnlichkeit).

Die Umstellung von Kleesilage auf Grassilage bewirkte eine deutliche Reduktion der TRF-Anzahl in HRA und AFA (Tag 245 auf 287 AFA 35 -> 22, HRA 34-> 20), gleichzeitig veränderte sich die Verteilung aber nur gering (Ginicoeffizient AFA: 0,46 ->0,43; HRA: 0,53 -> 0,53). Die merklichen Unterschiede zwischen Tag 287 und 329 im Hydrolysereaktor spiegelten sich ebenfalls im Anaerobfilter wieder, der darüber hinaus bis zum Tag 413 nur geringe weitere Veränderungen (Ähnlichkeit 95 %) aufwies. Nach der Umstellung auf Luzernesilage am 365. Tag reduzierte sich die TRF-Anzahl zunächst bis zum Tag 413 nur leicht, dieser Rückgang intensivierte sich aber bis zum 462. Tag nochmals deutlich (AFA: 26->21->8, HRA: 27->20->6), während die Verteilung im selben Zeitraum kontinuierlich gleichmäßiger in AFA und HRA wurde (AFA: 0,44 -> 0,40 -> 0,33 HRA: 0,54 -> 0,45 -> 0,40). Dieser Trend kehrte sich dann zum Ende hin um, so dass die TRF-Anzahl zunahm und die Verteilung ungleichmäßiger wurde (AFA: 8->17; 0,33 -> 0,42; HRA: 6->15; 0,34 -> 0,48).

Der Anteil aller TRFs die der Klasse Clostridia zugeordnet werden konnten lag für AFA zwischen 25 und 70 % und für HRA zwischen 25 bis 86 %, nahm dabei in der Versuchslaufzeit zu und lag ab dem 175. Tag über 50 %. Ein Maximum wurde jeweils am Tag 462 festgestellt, das 12 (AFA) bis 28 (HRA) Prozentpunkte gegenüber den umliegenden Werten erhöht war. Innerhalb der Gruppe der Clostridia spielten quantitativ vor allen das TRF 150 bp (mittlere Anteil ohne Tag 101, AFA: 19,3 ± 3,1 %, HRA: 18,8 ± 2,8 %) und ab dem 175. Tag auch das TRF 99 bp (AFA: 17,5 ± 5,4 %; HRA: 17,4 ± 8,5 %) eine bedeutende Rolle. In geringeren Maße verbreitet waren innerhalb der Klasse Clostridia die Familie der *Ruminococcaceae* (TRFs 81 bp, 216 bp, 218 bp), die im mittleren Abschnitt vom 175. bis zum 413. Tag in beiden Kompartimenten auftraten (AFA 4,03 ± 1,83 % HRA 3,98 ± 2,51).

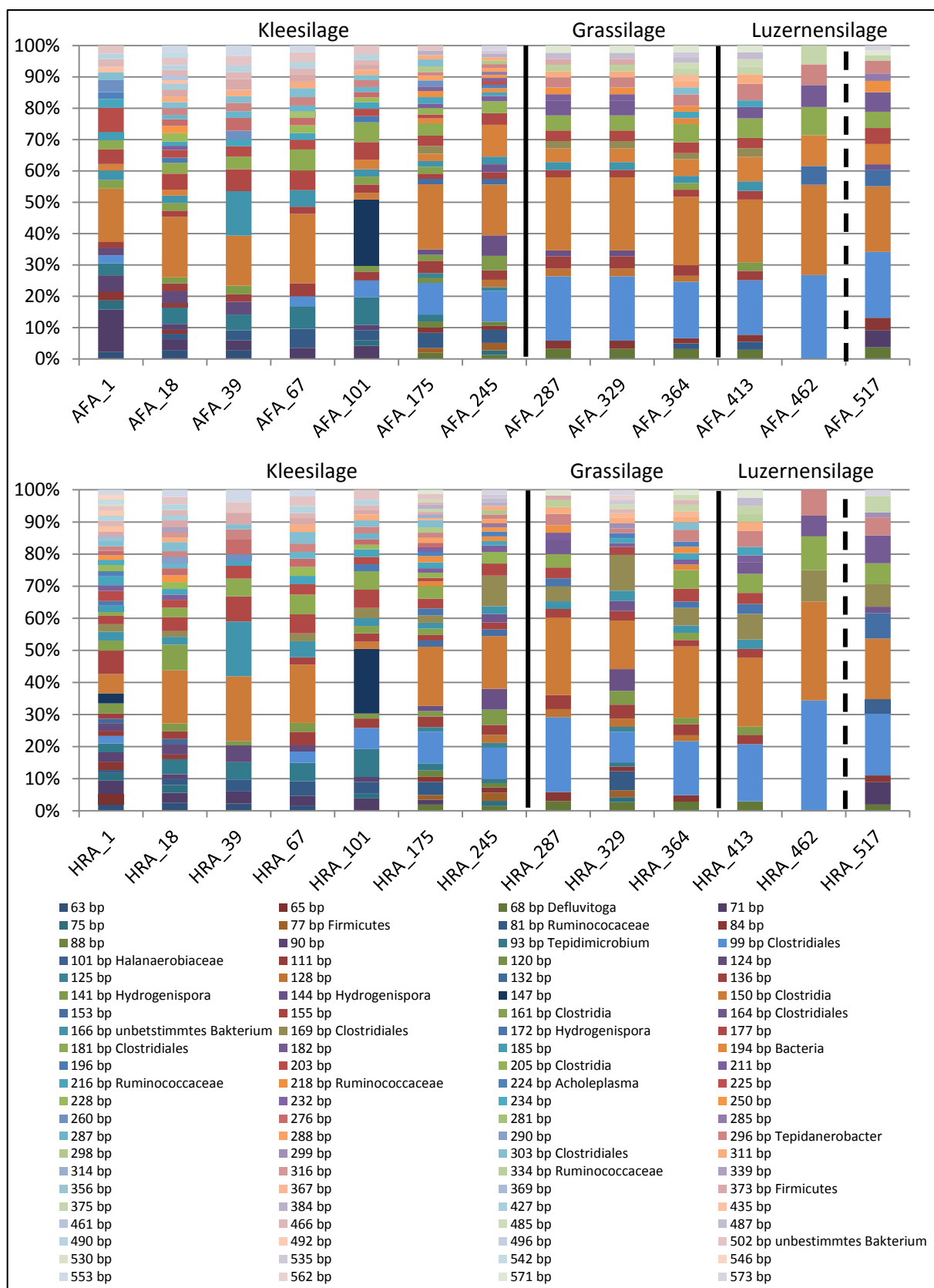


Abb. II.1.2.2-4: Fingerprintprofile der TRFLP des bakteriellen 16S-rRNA-Gens der Hydrolysestufe und des Anaerobfilters von Reaktor A. Durchgängige Linien: Zeitpunkte der Substratwechsel, gestrichelten Linie: Luftstrippung

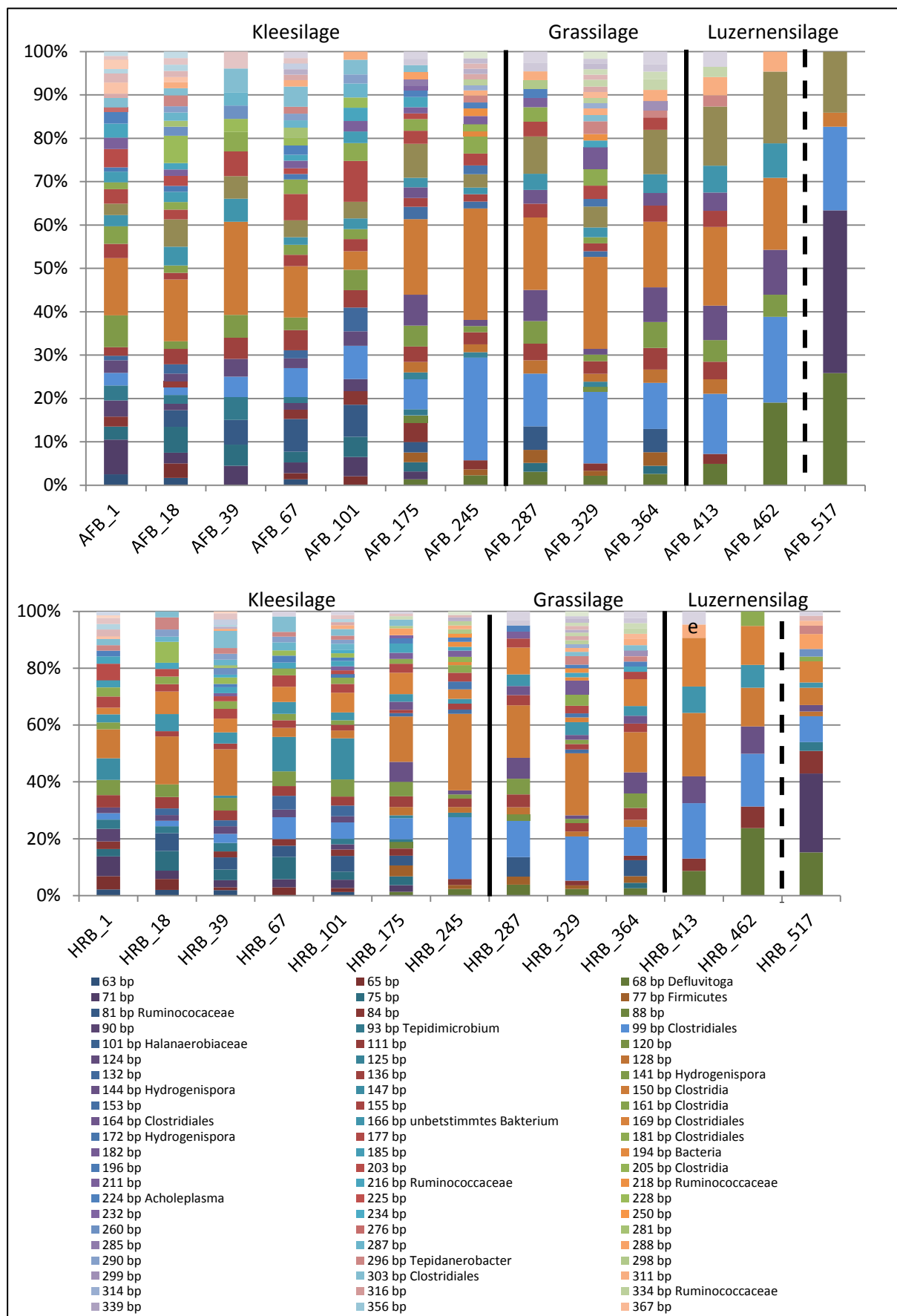


Abb. II.1.2.2-5: Fingerprintprofile der TRFLP des bakteriellen 16S-rRNA-Gens der Hydrolysestufe und des Anaerobfilters von Reaktor B. Durchgezogene Linie: Zeitpunkte der Substratwechsel, gestrichelte Linie: Luftstripping

Im vergleichbaren Maße aber über den gesamten Beobachtungszeitraum trat auch das TRF 296 bp auf (AFA: $2,8 \pm 1,7\%$; HRA $3,1 \pm 2,0 \%$), dass der Gattung *Tepidanaerobacter* als Teil der Klasse Clostridia zugeordnet werden konnte. Diese erreichten zum Tag 462 ein Maximum (ARB: $6,3 \%$; HRB: $8,1\%$) in beiden Kompartimenten. Der überwiegende Teil der TRFs die nicht der Klasse Clostridia zugeordnet wurde, konnte auch keinem anderen bekannten bakteriellen Taxon zugeordnet werden. Eine Ausnahme hiervon bildeten die Gruppe *Defluviitoga* welche in kleinen Anteil durchgängig ab dem 175. Tag ($1,21$ bis $3,74 \%$) und AFA ($1,42$ bis $2,98 \%$) nachgewiesen wurden.

Auch für **Reaktor B** wurde eine starke Parallelität in der Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaft in beiden Kompartimenten beobachtet, so dass die Ähnlichkeit von AFB und HRB an jedem Probenahmedatum mit Ausnahme des 67. Versuchstages bei mindestens 85% lag. Die beobachtete Dynamik mit der Veränderungen stattfanden, war in Reaktor B größer als in Reaktor A, was in Zusammenhang steht mit der höheren Reaktortemperatur in Reaktor B. Einen größeren Unterschied zwischen AFB und HRB konnte nicht festgestellt werden. Dies ist bemerkenswert, da beide Teilsysteme nicht dieselbe Betriebstemperatur verwendeten.

In der zeitlichen Entwicklung setzen sich in HRB der 67. und der 101. Tag von den vorgehenden und nachfolgenden Profilen ab. Dabei wurde wie in Reaktor A eine Verdrängung des sonst dominierenden TRF 150 bp Clostridiales durch TRF 147 bp beobachtet. Der Anteil des TRF 99 bp ebenfalls Clostridiales (Tag 1 :AFB: $2,89 \%$; HRB: $2,20 \%$) stieg in der Verlaufszeit sukzessive an und erreichte am 245. Tag ein Maximum (AFB: $24,13 \%$; HRB: $20,9 \%$), fiel danach aber nicht mehr unter 10% . Daneben erreichte wie in Reaktor A TRF 150 bp Clostridiales (AFB: $14,89 \pm 6,38 \%$; HRB: $13,79 \pm 6,91 \%$) einen dominierenden Anteil an der bakteriellen Population.

Die Veränderungen nach der Umstellung auf Grassilage (Tag 246) sind in ihrem Umfang nicht stärker als innerhalb der Phase der Vergärung von Kleegrassilage (Tag 1 bis 245). Gleichzeitig sank aber in diesen Zeitraum die TRF-Anzahl (AFB: $31 \rightarrow 22$; HRB: $30 \rightarrow 19$). Diese erholte sich zwar zum 287. Tag sank aber am 329 wieder auf das Niveau des 245. Tages. Gleichzeitig wurde auch eine größere Ähnlichkeit der Profile von 245. Tag und 329. Tag (AFB: 95% ; HRB 92%) festgestellt als zum 287. Tag (AFB und HRB 77%).

Die Umstellung von Gras- auf Luzernesilage bewirkte im Zeitraum von 364. zum 462. Tag einen erheblichen Rückgang in der TRF-Anzahl (AFB: $22 \rightarrow 16 \rightarrow 8$; HRB: $27 \rightarrow 9 \rightarrow 8$). Dabei fanden die größten Veränderungen in der Zusammensetzung bereits zwischen dem 364 und 413 Tag (AFB: 80% ; HRB: 70% Ähnlichkeit) statt, da die Ähnlichkeit der Profile von Tag 413 und 462 trotz der anhaltenden Reduktion der Diversität in beiden Kompartimenten bei 95% lagen.

Im letzten Abschnitt bis zum Tag 517 traten die stärksten beobachteten Veränderungen (AFB: 40% ; HRB: 40% Ähnlichkeit) in der bakteriellen Gemeinschaft des Reaktors B auf. Während diese Veränderungen mit einem Zuwachs an TRFs in HRB ($8 \rightarrow 17$) verbunden waren, blieb dies in AFB ($8 \rightarrow 5$) aus, wohingegen die Gleichverteilung in AFB ($0,27 \rightarrow 0,28$) unverändert blieb und in HRB ($0,40 \rightarrow 0,59$) deutlich abnahm. Gleichzeitig trat am 517. Tag das TRF 71 bp (AFB: $35,3 \%$; HRB: $27,7 \%$) auf, das zuvor nur in geringem Maße am Tag 175 (AFB: $2,1 \%$; HRB: $2,3 \%$) nachgewiesen wurde. Diese Veränderungen können mit der Stripfung am 500. Versuchstag im Zusammenhang stehen, die eine deutliche Veränderung der bakteriellen Struktur bewirkt haben könnte.

Der Anteil aller TRFs der Clostridia war in Reaktor B vergleichbar mit dem in Reaktor A und lag bei $51,3 \pm 14,3$ % für AFB und $49,3 \pm 13,5$ % für HRB. Der Anteil der Clostridia war am 517. Tag deutlich reduziert (AFB 34 %, HRB 26,6 %), wobei der Einfluss auf TRF 150 bp größer war als auf TRF 99 bp. Die Gruppe der Ruminococcaceae (TRF 81 bp) konnte durchgängig im ersten Versuchsdrittel vom 18. Bis zum 175. Tag nachgewiesen und trat danach noch an einzelnen Probenahmeterminen auf. Der Anteil der Ruminococcaceae lag dabei in AFB zwischen 3,6 bis 6,3 %, in HRB bei 4,5 bis 5,9 % und damit in der Größenordnung die auch in Reaktor A beobachtet wurde. Die TRFs der *Defluviitoga* gewannen insbesondere im letzten Versuchsabschnitt an Bedeutung und waren in diesen Zeitraum in Reaktor B (AFB: 4,8 bis 24,4 %, HRB: 6,9 bis 20,5%) wesentlich stärker vertreten als im gesamten beobachteten Zeitraum von Reaktor A (8FA 2,8- 3,7 %, HRA: 1,9 bis 2,9 %).

Korrelation der bakteriellen TRF-Anzahl mit dem Stickstoffgehalt

Der Zusammenhang zwischen Ammoniumgehalt und Bakterien-TRF-Anzahl ist in **Abb. II.1.2.2-6** dargestellt.

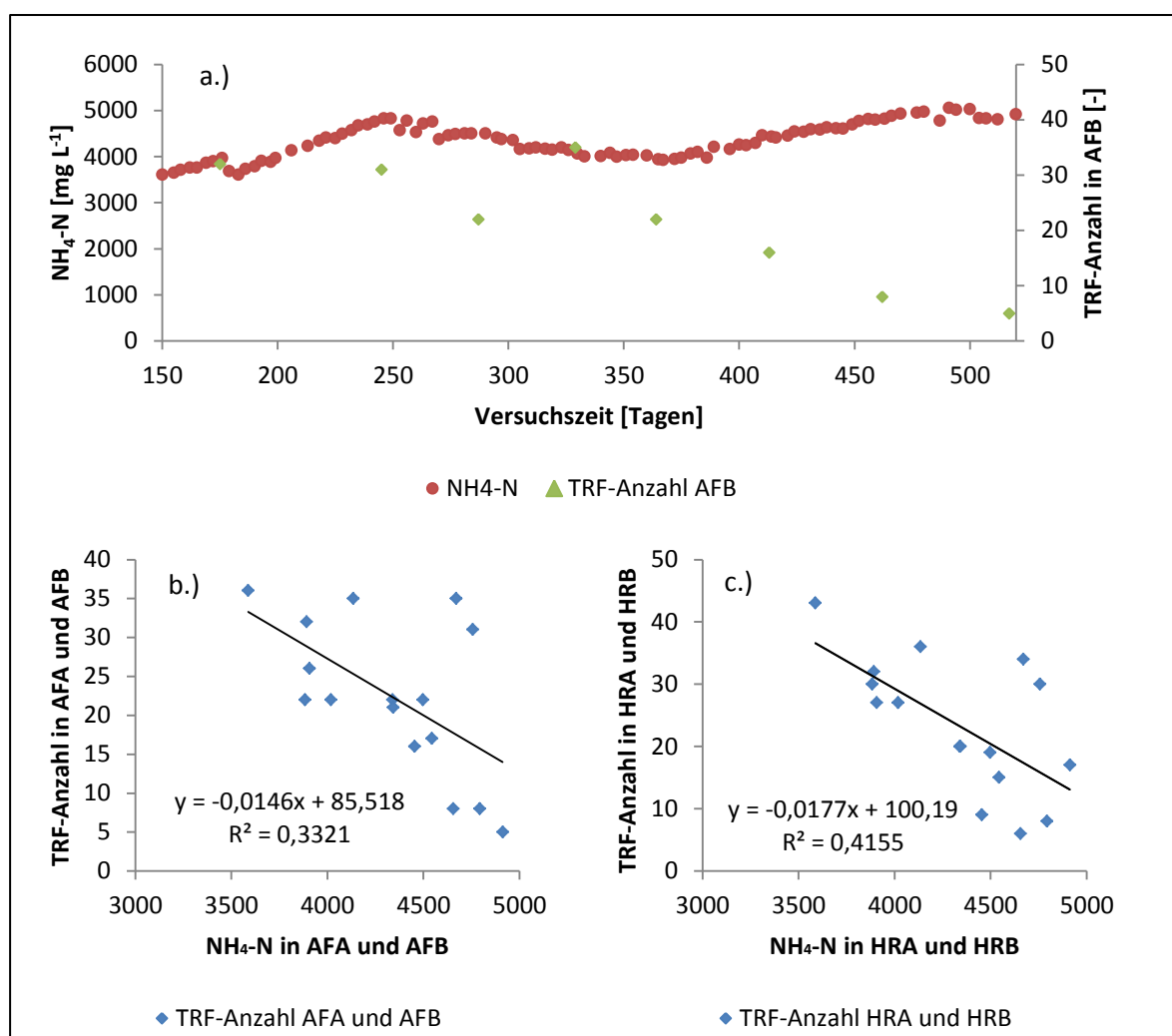


Abb. II.1.2.2-6 Zusammenhang zwischen Ammoniumstickstoffgehalt und Bakterien-TRF-Anzahl.

- a.) exemplarische Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Ammoniumstickstoffgehalts und der TRF-Anzahl von Anaerobfilter B.
b.) Korrelation des Ammoniumstickstoffgehalts und der TRF-Anzahl in den Anaerobfiltern
c.) Korrelation des Ammoniumstickstoffgehalts und der TRF-Anzahl in den Hydrolysereaktoren.

Die TRF-Anzahl ist ein wichtiger Indikator der Diversität von mikrobiellen Gemeinschaften. Sie ist proportional zur Anzahl der verschiedenen auftretenden mikrobiellen Gruppen und spiegelt damit die Artenvielfalt wieder. Da ein Fallen der TRF-Anzahl parallel mit steigenden Stickstoffwerten in den Kompartimenten beobachtet werden konnte (z. B. Anaerobfilter B, Abb. II.1.2.2-6a.), wurde eine mögliche Korrelation durch eine lineare einfaktorielle Varianzanalyse zum Signifikanzniveau von 5 % überprüft (**Tab. II.1.2.2-3**). Als Stickstoffindikator wurden neben dem Ammoniumstickstoffgehalt ($\text{NH}_4\text{-N}$) auch der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl (TKN) verwendet. Für die Varianzanalyse wurden die TRF-Anzahl der Anaerobfilter und Hydrolysestufen von A und B zusammengefasst, so dass die Analyse für beide Reaktoren gemeinsam getrennt nach den Kompartimenten erfolgte.

Tab. II.1.2.2-3: Zusammenfassung der einfaktoriellen Varianzanalyse von TRF-Anzahl und Stickstoffparameter getrennt nach der Bestimmungsmethode. TKN: Gesamtstickstoff nach Kjeldahl

Stickstoffindikator	Zielgröße	Anstieg	Schnittpunkt mit Ordinate	R ²	Signifikanz
TKN	TRF-Anzahl AF	-0,011	80,98	0,313	0,024
TKN	TRF-Anzahl HR	-0,015	85,52	0,332	0,019
$\text{NH}_4\text{-N}$	TRF-Anzahl AF	-0,013	93,88	0,383	0,011
$\text{NH}_4\text{-N}$	TRF-Anzahl HR	-0,018	100,19	0,416	0,007

Sowohl für den Ammoniumstickstoffgehalt als auch für den totalen Stickstoffgehalt nach Kjeldahl konnte ein negativer Zusammenhang zur TRF-Anzahl in beiden Kompartimenten signifikant bestätigt werden. Die mittleren Abstandsmaße R² der Regressionsanalyse lagen in einen Bereich der auch in einer ähnlichen Studie erzielt wurde, in der die TRF-Anzahl mit prozesschemischen Parametern in Beziehungen gesetzt wurde (Carballa et al., 2011).

Die Steilheit des negativen Anstieges der Regressionsgeraden ((Abb. II.1.2.2-6 b), c) in den vier Vergleichen zeigte an, dass der Stickstoffgehalt großen Einfluss auf die TRF-Anzahl hatte. Es war dabei allerdings anzunehmen, dass dieser starke, lineare Zusammenhang nur in dem untersuchten Bereich des Stickstoffgehalts auftrat. Es konnte aber bestätigt werden, dass ein Anstieg der Stickstoffwerte mit einem Rückgang in der Vielfalt der bakteriellen Gemeinschaft korrelierte.

TRFLP Archaea

Im Unterschied zu den Ergebnissen der bakteriellen Gemeinschaftsanalyse ergab die einfaktorielle Varianzanalyse für die TRF-Anzahl der archaeellen Gemeinschaft in mit den Stickstoffwerten keine signifikanten Ergebnisse (**Abb. II.1.2.2-7** und **Abb. II.1.2.2-8**). Die Profile basieren auf nur auf zwei parallelen Elektropherogrammen und sind daher nur eingeschränkt aussagekräftig. Mit ursächlich dafür kann sein, dass die TRF-Anzahl der Archaeen erheblich kleiner war (Bsp.: TRF-Anzahl Bakterien in AFA: $25,1 \pm 8,0$ TRF-Anzahl Archaeen in AFA: $4,4 \pm 1,5$), weshalb ein möglicherweise vorhandener Zusammenhang nicht erkennbar war.

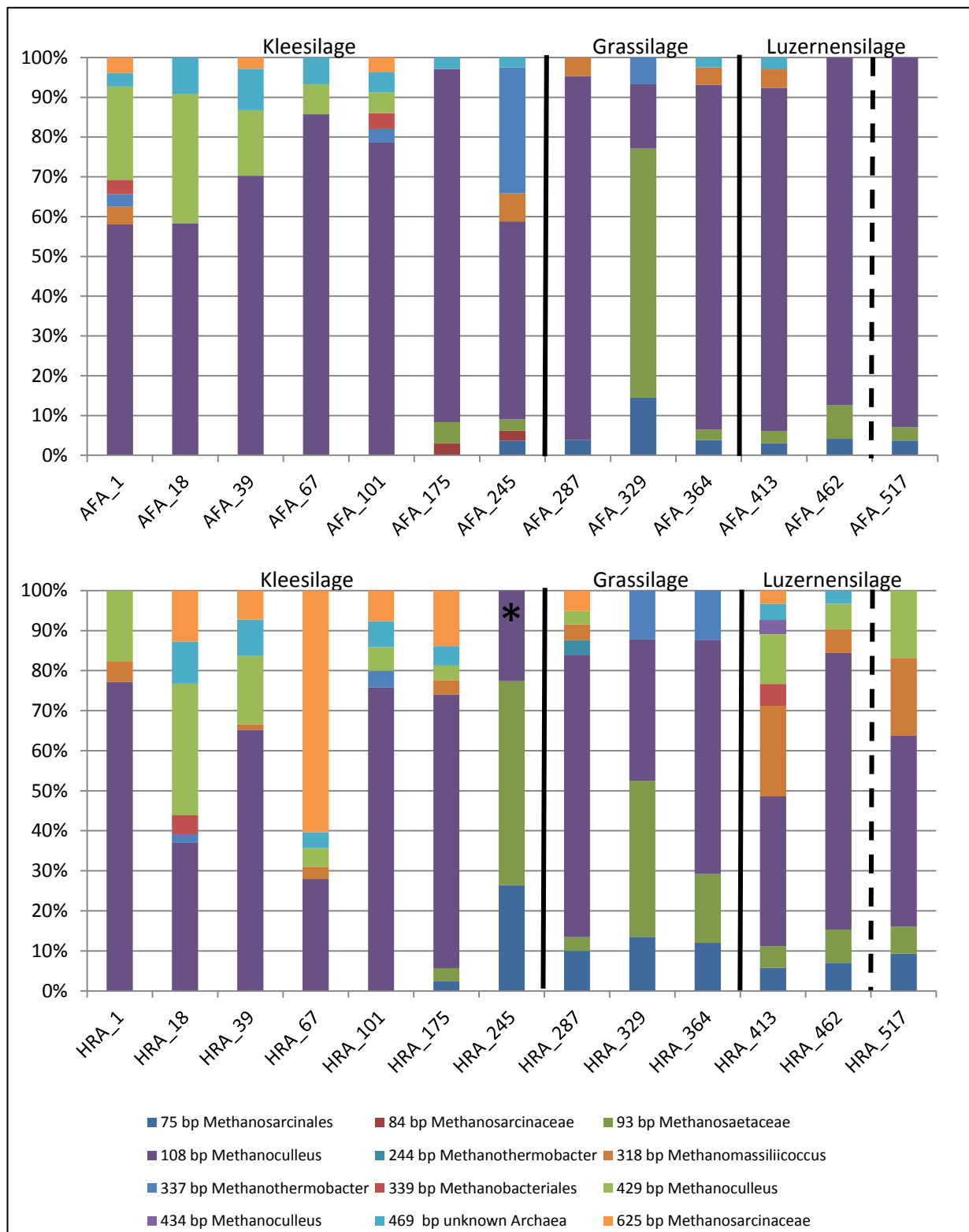


Abb. II.1.2.2-7 Fingerprintprofile der TRFLP des archaeellen 16S-rRNA-Gens der Hydrolysestufe und des An-aerobfilters von Reaktor A. Durchgehende Linie: Zeitpunkte der Substratwechsel, gestrichelte Linie: Luftstrippung

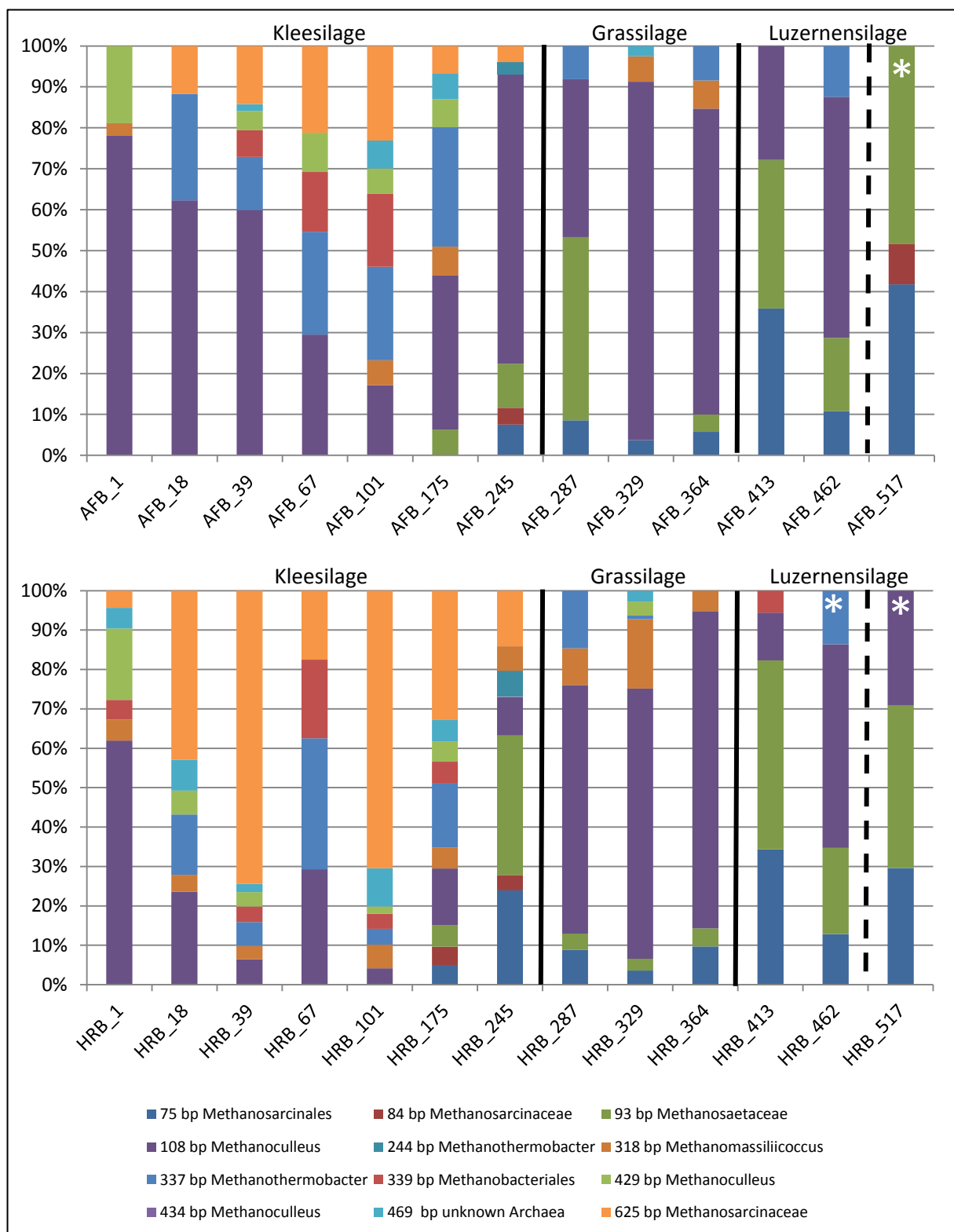


Abb. II.1.2.2-8 Fingerprintprofile der TRFLP des archaeellen 16S-rRNA-Gens der Hydrolysestufe und des Anaerobfilters von Reaktor B. Durchgehende Linie: Zeitpunkte der Substratwechsel, gestrichelte Linie: Luftstrippung

Am ersten Versuchstag unterschieden sich Anaerobfilter und Hydrolysereaktor nur leicht (94 % Ähnlichkeit). Dabei traten in AFA (TRF-Anzahl:7) zusätzlich mehrere kleinere Gruppen auf, die in Hydrolysereaktor A (TRF-Anzahl: 3) nicht nachgewiesen werden konnten. In AFA reduzierte sich die TRF-Anzahl bis zum achtzehnten Tag auf drei. In der Folge traten bis 67. Tag dann nur geringe Verände-

rungen (mindestens 94 % Ähnlichkeit) auf, gleichzeitig stieg aber der Anteil von TRF 108 bp kontinuierlich an. Im Gegensatz dazu stieg die TRF-Anzahl in HRA (3->6->5->5) zum achtzehnten Tag an und blieb bis zum 67. Tag über dem Wert der im Anaerobfilter (6->3->4->3) festgestellt wurde. Dadurch war die Dominanz des TRFs 108 bp weniger ausgeprägt als in AFA, wobei die Struktur des Profils am 67. Tag sogar überwiegend durch das TRF 626 bp (*Methanosarcinaceae*) bestimmt wurde. Deswegen war auch die Ähnlichkeit (46 %) der Profile aus AFA und HRA an diesen Tag wesentlich im Vergleich zu den früheren Probenahmetermen (mindestens 83 % Ähnlichkeit) herabgesetzt. Die Profile der archaeellen Gemeinschaft glichen sich aber bis zur nächsten Probennahme wieder an (99 % Ähnlichkeit) und besaßen in der Folge mit Ausnahme der Profile von 287. Tag mindestens eine Ähnlichkeit von 83 % und verliefen damit überwiegend parallel.

Die dominierende Rolle des TRF 108 bp (relativer Anteil 50 bis 90 %) blieb mit Ausnahme des Profils vom Versuchstag 329 über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten. Das TRF 108 bp repräsentiert verschiedene Archaeengruppen (*Methanosaeta*, *Methanobacterium*, *Methanoculleus*, *Methanomicrobia*, *Methanothrix*, *Methanothermobacter*), wobei *Methanoculleus* am stärksten in den Klonbibliotheken dieses Reaktors vertreten war. Der 329. Versuchstag setzte sich durch den deutlich größeren Anteil von TRF 93 bp (*Methanosaetaceae*) deutlich von den anderen Profilen ab (25 % Ähnlichkeit). Daneben war auch der Anteil des TRFs 75 bp (*Methanosarcinales*) mit 12,5 % wesentlich erhöht gegenüber der Präsenz in den anderen Profilen (3,03 bis 4,14 %).

Während in der Folge der Umstellung von Kleesilage auf Grassilage (246. Versuchstag) merkliche Veränderungen auftraten, welche am Tag 329 am deutlichsten wurden, zeigte die Archaeenpopulation bei der Umstellung von Gras- auf Luzernesilage keine Veränderungen. Die Struktur der Profile blieb bei den folgenden Probenahme bis zum Ende der Versuchsphase erhalten (99 % Ähnlichkeit in der Clusteranalyse), so dass geschlussfolgert werden konnte, dass seit dem Tag 364 eine stabile Archaeenpopulation im Anaerobfilter A etabliert war. Da für den 245. Tag zu wenig auswertbare Parallelen vorlagen, können keine wesentlichen Aussagen getroffen werden. Zwischen den 175. und 287. Tag traten nur geringe Veränderungen (97 % Ähnlichkeit) auf. Die Umstellung auf Grassilage (246. Versuchstag) bewirkte eine Zunahme des Anteils von TRF 93 bp bei gleichzeitiger Reduktion des Anteils von TRF 108 bp. Bis zum Tag 364 blieben die wesentlichen Merkmale des Profils erhalten, wobei der Anteil von TRF 108 bp wieder anstieg. Mit der Umstellung auf Luzernesilage erhöhte sich die Anzahl der auftretenden TRFs (4 -> 9). In den letzten 100 Tagen bestand eine stabile archaeelle Population, deren wesentlichen Merkmale erhalten blieben bei gleichzeitiger Reduktion der TRF-Anzahl. Die Teilsysteme wurden ab den 101. Tag überwiegend durch das TRF 108 bp dominiert, wobei diese Dominanz in beiden Kompartimenten am Tag 329 durch den hohen Anteil von TRF 93 bp unterbrochen wurde. In der Folge bildete sich in den letzten 100 Versuchstagen in AFA und HRA eine stabile Archaeenpopulation aus. In dieser stabilen Phase war die Diversität gemessen über die Anzahl der TRFs (AFA: $3,7 \pm 1,2$ %; HRA: $6,7 \pm 2,1$ %) und den Gini-Koeffizienten (AFA $0,62 \pm 0,05$; HRA $0,46 \pm 0,09$) im Hydrolysereaktor größer. Das steht im Einklang mit der Annahme dass der Abbau der komplexeren Nährstoffzusammensetzung im Hydrolysereaktor eine differenziertere archaeelle Gemeinschaft benötigt als dies im Anaerobfilter der Fall ist, dessen Nährstoffzusammensetzung homogener und weniger komplex ist. Ähnlich zum Anaerobfilter bildete TRF 75 bp (*Methanosarcinales*) ab dem 175. Tag wieder eine stabile Nebengruppe die über den kompletten Zeitraum mit einem gleichblei-

benden Anteil von $8,5 \pm 2,2$ % vertreten war. Andere Gruppen wie 429 bp (*Methanoculleus*) oder 625 bp (Methanosarcinaceae) traten nach dem hundertsten Tag lediglich im Hydrolysereaktor auf.

Am ersten Tag ähnelten sich AFB und HRB stark (98 % Ähnlichkeit), wobei die TRF-Anzahl (AFB: 3; HRB: 6) in HRB höher war. Am achtzehnten und 39. Tag unterschieden sich die Kompartimente deutlicher voneinander (43 %). Dabei stieg der Anteil von TRF 625 bp (Methanosarcinaceae) in HRB (4,3 % \rightarrow 43,6 % \rightarrow 73,2 %) stärker an als in AFB (0 % \rightarrow 10,7 % \rightarrow 14,2 %). In der Folge nahm der Anteil von TRF 625 bp bis zum 245. Tag in beiden Kompartimenten ab und lag ab dem 287. Tag unter der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu wurde das TRF 75 bp (Methanosarcinales), erst ab dem 175. bzw. 245. Tag detektiert, blieb aber bis zum Ende des Beobachtungszeitraum vorhanden (AFB: 3,7 % bis 43,8 %; HRB: 3,6 % bis 34,4 %). Vom 39. Bis zum 101. Tag nahmen in AFB der Anteil von TRF 108 bp ab, gleichzeitig stiegen die Anteile von TRF 337 bp (*Methanothermobacter*) (13,0 % \rightarrow 25,0 % \rightarrow 22,9 %) und 339 bp Methanobacteriales (6,5 \rightarrow 14,6 \rightarrow 17,9 %) an. Der Anteil von TRF 108 bp nahm in beiden Kompartimenten aber nach dem 101. Tag wieder zu.

Während die TRF-Anzahl in AFB von 101. bis zum 245. Tag an den beobachteten Terminen nahezu unverändert blieb, erreichte dieser Wert ein Maximum in HRB und fiel in Folge bis zum 287. Tag ab. Beide Kompartimente besaßen nach dem ersten Tag mit Ausnahme von Tag 67 nur eine geringe Ähnlichkeit zu einander (maximal 43 %). Dies änderte sich nach der Umstellung auf Grassilage deutlich, so betrug die Ähnlichkeit am 287. Tag schon 65 % und lag in der Folge bei mindestens 85 %. Dabei bildete sich im Hydrolysereaktor B eine stabile Population aus, die bis zum Ende der Grassilagevergärung erhalten blieb (mindestens 96 % Ähnlichkeit). Auch blieb in diesen Zeitraum das Verteilungsmaß ($0,53 \pm 0,08$) nahezu konstant, allerdings bei abnehmender TRF-Anzahl. Ein ähnliches Bild ergab sich im Anaerobfilter erst ab dem 329. Versuchstag. In der Phase der Grassilagevergärung war auch die Dominanz von TRF 108 bp (AFB: $57,4 \pm 27,2$ % HRB: $62,0 \pm 5,7$ %) am stärksten ausgeprägt.

Mit der Umstellung auf Luzernesilage trat eine starke parallele Veränderungen der Archaeenpopulation auf, sodass die Ähnlichkeit innerhalb eines Kompartiments zwischen den Probenahmen 45 bis 48 % betrug, während die Ähnlichkeiten zwischen Kompartimenten zum selben Probenahmedatum 93 bis 99 % betrug. In der Folge der Umstellung ging der Anteil von TRF 108 bp deutlich zurück (AFB 50,9 % \rightarrow 28,9 %; HRB 59,1 % \rightarrow 12,1 %) bei gleichzeitiger Zunahme von TRF 75 bp (7,2 % \rightarrow 34,3 %) und 93 bp (3,4 % \rightarrow 48,0 %). Diese Tendenz kehrte sich bis zum Tag 462 wieder um, so dass TRF 108 bp wieder an Dominanz gegenüber den anderen TRFs gewann, wobei diese Entwicklung wiederum mit starker Parallelität (99 % Ähnlichkeit zw. AFB und HRB am Tag 462) in beiden Kompartimenten auftrat. Am Tag 517 wurde wieder eine Verschiebung der Anteile von TRF 108 bp zu den TRFs 75 bp und 93 bp beobachtet.

Die Veränderungen zwischen den Probenahmen sind im Reaktor B stärker und insbesondere die Anfangsphase war dynamischer als in Reaktor A, wobei dies in Zusammenhang steht mit der höheren Betriebstemperatur von Reaktor B, da mit höheren Reaktortemperatur die mikrobiellen Dynamik zunimmt. Die Nutzung von Grassilage führte in Reaktor B zu einer starken Parallelität die sogar deutlicher ausgeprägter war als dies für Reaktor A im letzten Versuchsdrittel der Fall war und das obwohl Anaerobfilter und Hydrolysereaktor bei unterschiedlichen Temperaturen betrieben wurden. Die Um-

stellung von Gras- auf Luzernesilage wirkte sich stärker auf die Population in Reaktor B als auf die in Reaktor A aus.

Zusammenfassung der TRFLP der Schwimmfettfermenter

Sowohl die archaeelle als auch die bakteriellen Gemeinschaften der SBF zeigten in der zeitlichen Entwicklung eine ausgeprägte Stabilität und Kontinuität. Die Veränderungen, die beobachtet wurden, entsprachen der üblichen Dynamik die in stabilen mikrobiellen Gemeinschaften von Biogasreaktoren auftreten (Carballa et al., 2011). Die Adaption an die steigenden Ammoniumstickstoffgehalte ging mit einem deutlichen Anstieg der Klasse der Clostridiales einher. Diese dominierten mit einem Anteil von über 50 % bis zum Ende des Versuchszeitraums, wobei der Anteil am letzten Probenahmetermin zugunsten von *Defluviitoga* etwas zurückging.

Die Artenvielfalt gemessen über die TRF-Anzahl, die für die Archaea und Bakterien beobachtet wurde, lag im Bereich wie er auch in anderen Reaktoren beobachtet wurde (**Tab. II.1.2.2-4**), so dass es durch die in den SBF herrschenden Bedingungen (u. a. hohe Temperaturen und hohe Stickstoffgehalte) nicht zu einer generellen Verarmung der mikrobiellen Diversität kam.

Tab. II.1.2.2-4: Vergleich der Anzahl der TRF-für Bakterien und Archaeen.

Reaktortyp	Temperatur	Substrat	TRF-Anzahl		Quelle
			Bakterien	Archaea	
Praxisanlage	mesophil	Energiepflanzen, Rindermist	15±3	6±1	Theuerl et al., 2015
Pilotanlage	mesophil	Zuckerrübenpellet	9±2	6±2	Goux et al., 2015
Labormaßstab	mesophil	Maissilage	48±9	6±2	Klang et al., 2015
Labormaßstab	mesophil	Rübensilage	41±9	7±2	Klang et al., 2015
Labormaßstab	mesophil	Schweinegülle	26	7	Jiménez et al., 2016
Labormaßstab	mesophil	Schweinegülle, Reisstroh	23	4	Jiménez et al., 2016
Anaerobfilter	thermophil	Kleesilage	30±6	4±1	-
Hydrolysereaktor	thermophil	Kleesilage	33±9	7±2	-
Anaerobfilter	hyperthermophil	Kleesilage	31±7	3±1	-
Hydrolysereaktor	hyperthermophil	Kleesilage	31±5	4±1	-
Anaerobfilter	thermophil	Grassilage	23±2	4±1	-
Hydrolysereaktor	thermophil	Grassilage	26±5	5±2	-
Anaerobfilter	hyperthermophil	Grassilage	26±8	4±1	-
Hydrolysereaktor	hyperthermophil	Grassilage	27±9	5±2	-
Anaerobfilter	thermophil	Luzernesilage	15±7	5±2	-
Hydrolysereaktor	thermophil	Luzernesilage	14±7	5±1	-
Anaerobfilter	hyperthermophil	Luzernesilage	10±6	5±2	-
Hydrolysereaktor	hyperthermophil	Luzernesilage	11±5	7±2	-

Trotzdem zeigte sich, dass steigende Stickstoffwerte mit einem Minimum der bakteriellen Artenvielfalt korrelierten, sodass auch in den adaptierten Gemeinschaften der Schwimmbettfermenter weitere Steigerungen des Ammoniumstickstoffgehalts die Diversität beeinträchtigten. So war die bakterielle Artenvielfalt bei der Vergärung von Luzernesilage niedriger als bei Gras- oder Kleesilage. Die archaeelle Gemeinschaften wurden überwiegend durch TRF 108 bp dominiert. Dieses TRF konnte zwar

nicht eindeutig einem einzelnen archaeellen Taxon zugeordnet werden, die Auswertung der Klonbibliotheken legte aber nahe, dass in den SBF dieses TRF hauptsächlich durch *Methanoculleus* repräsentiert wurde.

Klonbibliotheken der Strippungsphase

Mögliche Auswirkungen der Luftstrippung auf die prokaryotischen Gemeinschaften

Die Strippung hat in Abhängigkeit von den gewählten physikochemischen Betriebsparametern potentiell große Auswirkungen auf die in den Reaktoren angereicherten Gemeinschaften aus Bakterien und Archaeen. Die angestrebten positiven Effekte auf die Leistungsfähigkeit der Reaktoren, also der prokaryotischen Gemeinschaften, sind von der Reduktion des Gehaltes an potentiell toxischem Ammonium und Ammoniak zu erwarten. Dem stehen die potentiell negativen Auswirkungen entgegen, die insbesondere von der hohen Temperatur des Strippungsgases und vom Luftsauerstoff-Eintrag zu erwarten sind. Die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften kann nur Veränderungen in Folge der Strippung anzeigen. Entscheidend für die Bewertung, ob positive oder negative Auswirkungen der Strippung überwiegen, sind im Grunde nur durch die verfahrenstechnischen Kenngrößen der Reaktorperformance (Biogasmenge und –qualität).

Die physikochemischen Auswirkungen der Strippung sind erheblich, da eine große Kontaktfläche zwischen Perkolat und Gasstrom angestrebt wird, um das Ausgasen von Ammoniak zu befördern. Dies erhöht jedoch natürlich auch unerwünschten Stoffaustausch wie den Eintrag von Sauerstoff. Sauerstoff wirkt auf streng anaerobe Zellen toxisch und inaktiviert diese. Es ist zu erwarten, dass die anaerobe Abbaukette durch den Sauerstoff geschädigt wird und der Biogasertrag dadurch zeitweise zurückgeht. Zu bedenken ist zudem, dass verschiedene anaerobe Organismen auch zur aeroben Atmung befähigt, also fakultativ anaerob sind. Ihnen bietet die Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff eine Möglichkeit zur stark gesteigerten Energiegewinnung im Vergleich zum anaeroben gärenden Stoffwechsel. Hierbei werden leicht verwertbare organische Stoffe als Elektronendonator verwendet. Diese werden dem Biogasbildungsprozess entzogen, sodass auch hierdurch der Prozess negativ beeinflusst werden kann. Allerdings führt die aerobe Atmung zur Bindung und damit Entgiftung des Sauerstoffes. Dies sollte an der verstärkten Bildung von CO₂ im Biogas erkennbar sein. Die negativen Auswirkungen der Strippung treffen überwiegend die Bakterien und Archaeen, die sich im Perkolat befinden. Zellen, die sich in den Reaktoren fixiert, als Biofilmen befinden, sind vor den direkten Auswirkungen der Strippung zum Teil geschützt. Des Weiteren wurde der Anaerobfilter während der Strippung vom System abgekoppelt, damit die enthaltenen Biofilme möglichst wenig geschädigt werden.

Ein weiterer potentiell problematischer Faktor bei der Strippung ist die Temperatur. Gestrippt wurde bei Temperaturen von 50 - 80°C. Diese hohe Temperatur wirkt auf das durch die Strippkolonne geleitete Perkolat ein. Hierbei werden viele Zellen abgetötet, da die hierbei auftretenden Bedingungen im Grunde dem Hygienisierungsverfahren der Pasteurisierung entsprechen, bei dem gezielt die Keimzahl in Lebensmittel wie Milch reduziert wird.

Wie die verfahrenstechnischen Ergebnisse zeigten (vgl. II.1.2.1), führte die Strippung insbesondere in den Hydrolysereaktoren der SBF zu einer Verringerung der Biogasproduktion, wogegen die Anaerob-

filter leicht erhöhte Werte zeigten. Vermutlich waren die auf den Aufwuchsträgern der AF fixierten Biofilme im Gegensatz zu Zellen im Perkolat kaum negativ von der Strippung beeinflusst und konnten die zusätzlichen Substratmengen nutzen, die durch die geschädigten Bakterien und Archaeen des Perkolats nicht verwertet werden konnten.

Erstellung der Klonbibliotheken

Untersucht wurden die Gemeinschaften der Hydrolysestufen beider SBF, da sich hier die Prozesstemperaturen unterschieden. Zum Probenahmezeitpunkt (12.10.2015) wurde die langzeitangereicherte mikrobielle Gemeinschaft (vor der Strippung) analysiert, die an hohe Stickstoffwerte angepasst war. Durch die darauf folgende Strippung veränderten sich entscheidende Parameter: insbesondere der Stickstoffstress nahm stark ab, weshalb hier die Anpassung der Gemeinschaft an variierende Stickstoffgehalte untersucht werden konnte.

Zwei Probenahme-Zeitpunkte (26.10.2015, 23.11.2015) lagen innerhalb, der letzte untersuchte Zeitpunkt (11.01.2016) nach Abschluss der Strippung. Hier stiegen die Stickstoffgehalte langsam wieder an, erreichten aber nicht wieder die hohen Werte vor der Strippungsphase. Die Klonbibliotheken der 16SrRNA-Gene der Archaeen- und Bakterien-Gemeinschaften wurden nach dem in **Tab. II.1.2.2-5** dargestellten Konzept erstellt. Zudem wurde hier der Gesamteindruck der mikroskopischen Analyse kurz zusammengefasst, der oben detaillierter beschrieben wurde (s. Mikroskopie).

Tab. II.1.2.2-5: Übersicht der erstellten Klonbibliotheken der Strippungsphase für Archaea und Bacteria. HR Hydrolysereaktor, A/B Systeme A und B

Strippung	Gruppe	Anzahl der Sequenzen	Kompartiment	Versuchstag	Mikroskopischer Eindruck		
Beginn der Strippung Tag 500	Archaea	77	HRA	497	Zustand vor der Strippung		
		83	HRB				
		95	HRA	511	erste sichtbare Veränderung		
		83	HRB				
		Ende der Strippung Tag 559	Archaea	77	HRA	539	besonders hohe Diversität an Morphotypen
				83	HRB	588	immer noch hohe Diversität trotz wieder steigender N-Gehalte
102	HRA						
Beginn der Strippung Tag 500	Bacteria	127	HRA	497	Zustand vor der Strippung		
		115	HRB				
		131	HRA	511	erste sichtbare Veränderung		
		100	HRB				
		Ende der Strippung Tag 559	Bacteria	146	HRA	539	besonders hohe Diversität an Morphotypen
				116	HRB		
				84	HRA	588	immer noch hohe Diversität trotz wieder steigender N-Gehalte
124	HRB						

Die schließlich ausgewerteten Klonbibliotheken setzten sich aus zwei Teilen zusammen. Die Daten der extern in Auftrag gegebenen Bibliotheken (GATC Biotech AG) waren teilweise quantitativ nicht ausreichend, weshalb für die betreffenden Bibliotheken erneut Klonierungen vorgenommen wurden. Die aus der Vereinigung der entsprechenden Klonbibliotheken resultierende Sequenzanzahl wurde in Tab. II.1.2.2-5 angegeben. Die resultierenden Daten wurden als FASTA-Dateien exportiert und mit dem Online-Werkzeug RDP-Classifer (Wang et al., 2007) phylogenetisch eingeordnet. Folgende Ähnlichkeitsschwellen wurden in Abhängigkeit von der taxonomischen Ebene gewählt: Phylum 80 %,

Ordnung 90 %, Klasse 90 %, Familie 95 %, Gattung 97 % Übereinstimmung. In **Abb. II.1.2.2-9** wurde dargestellt, wie groß in Abhängigkeit von der taxonomischen Ebene die Anteile der Sequenzen in den Klonbibliotheken waren, die anhand dieser Schwellen bekannten Taxa zuzuordnenden bzw. nicht zuzuordnenden sind.

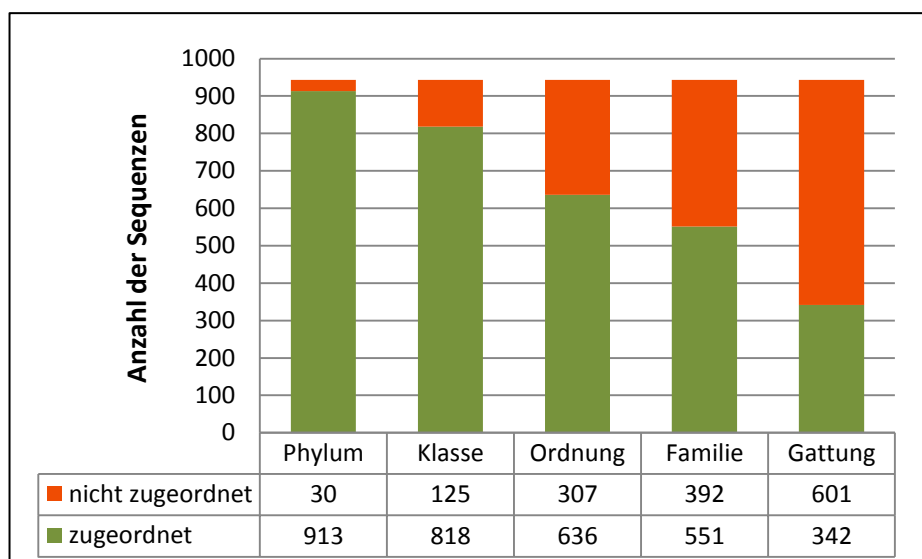


Abb. II.1.2.2-9: Nicht zugeordnete Sequenzen in Abhängigkeit von der taxonomischen Ebene, Anteil der mit dem RDP-Classifer sicher zuzuordnenden Bacteria-Sequenzen aller Klonbibliotheken zur Strippungsphase der SBF insgesamt

Während die Archaeen-Sequenzen bis zum Gattungsniveau eingeordnet werden konnten, war dies bei bakteriellen Sequenzen in vielen Fällen nicht möglich, da die betreffenden Sequenzen zu unbekanntem Gattungen, bzw. auch unbekanntem übergeordneten Taxa gehörten. Deshalb wurde für die Bakterien eine Darstellung auf Phylumebene gewählt. Diese ermöglichte zunächst einen Überblick. Das viele Sequenzgruppen in den Klonbibliotheken in Biogasanlagen kaum beschriebenen Arten zugeordnet werden konnten, wurde auch bei anderen Untersuchungen beobachtet (Theuerl et al., 2015; Maus et al., 2016b). Daher konnte über die Stoffwechselwege und damit die Rolle, die die betreffenden Bakterien in den Biogasreaktoren spielten, keine sichere Aussage getroffen werden. Dies erschwerte die funktionale Analyse der Gemeinschaften und weiterführende Aussagen zum Verlauf der Fermentation wie beispielsweise vorliegenden Prozessstörungen. Der hohe Anteil an nicht beschriebenen Arten zugeordneten Sequenzen zeigte jedoch auch, dass in den Biogasreaktoren interessante unbekannte Bakterien detektiert werden konnten, die eine genauere Erforschung erfordern (vgl. II.1.3.2). Einige Gruppen von Sequenzen konnten jedoch auf Art- oder Gattungsebene eingeordnet werden, wie beispielsweise mit *Defluviitoga tunisiensis* verwandte Sequenzen. Die in der Literatur verfügbaren Beschreibungen ermöglichen hier detaillierte Aussagen zu ihrer Rolle und Funktion.

Ergebnisse Bakterien

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse auf Phylumebene sind in **Abb. II.1.2.2-10** dargestellt. In beiden Reaktorkompartimenten sind die Firmicutes eine dominierende Gruppe, die insbesondere in Reaktor HRA zu Anfang der Strippungsphase massiv dominiert. Zunehmend wächst dann der Anteil der Gruppe Thermotogae, die am Ende des untersuchten Zeitraumes etwa die Hälfte der Sequenzen beinhaltet, bei Reaktor HRB im Unterschied zu HRA jedoch auch schon zum Zeitpunkt vor der Strip-pung schon einen erheblichen Anteil besitzt. Während das Phylum Firmicutes durch eine Vielzahl von

Untergruppen repräsentiert ist, sind alle Sequenzen des Phylums Thermotogae sehr ähnlich bzw. oft identisch und wurden der Gattung *Defluviitoga tunisiensis* (Hania et al., 2012; Maus et al., 2016a). Vor der Strippung sind die Bakteriengemeinschaften durch ein Maximum an Clostridiales mit den oben genannten TRFs 99, 150, 180 usw. geprägt, im späteren Verlauf, insbesondere in Reaktor HRA mit der beginnenden Strippung sinkt der Anteil von Clostridiales zu Gunsten von *Defluviitoga*. Teilweise besitzt diese Gattung dann mit 40 % der Sequenzen eine deutliche Dominanz.

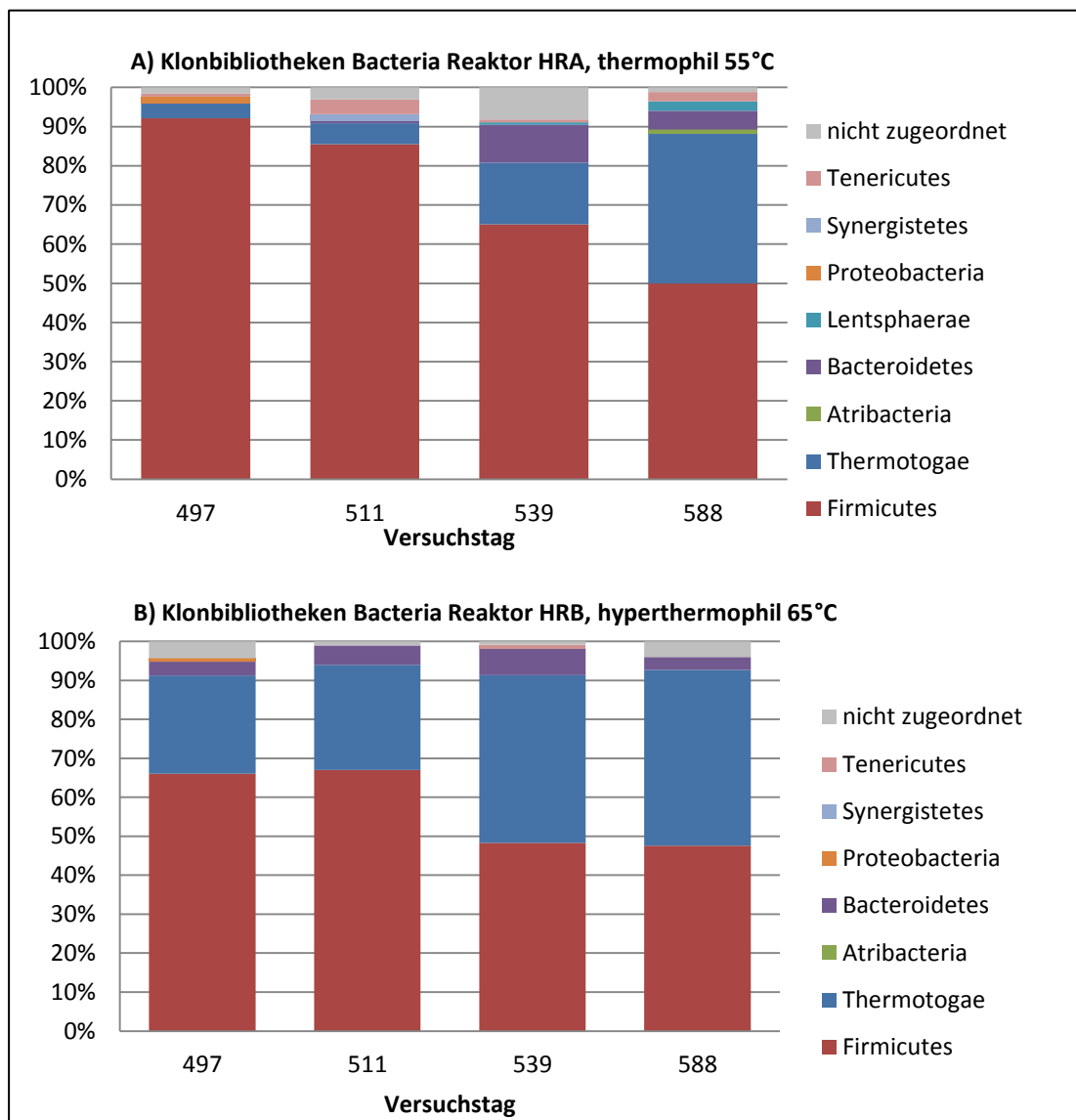


Abb. II.1.2.2-10: Darstellung der Klonbibliotheken des bakteriellen 16S Gens der Schwimmbettreaktoren auf Gattungsebene; Tag 497 vor der Strippung; Tage 511 und 539 während der Strippung; Tag 588 nach der Strippung

Als zu geringen Anteilen enthaltene Gruppen treten unter anderem Bacteroidetes und „Tenericutes“ auf. Das geringe Auftreten von Bacteroidetes, welches in ähnlichen Systemen oft eine dominante Gruppe ist (Rademacher et al., 2012a; Klang et al., 2015), ist hier besonders zu erwähnen. Insgesamt zeigt vor allem Reaktor HRA im Verlauf der untersuchten Strippungsphase eine deutliche Änderung und Zunahme der Diversität, während sich die Zusammensetzung bei Reaktor HRB, zumindest auf Phylumebene, weniger verändert.

Phylogenetische Analyse der Bakterien-Sequenzen

Zusätzlich zu Klassifizierungen der Klonsequenzen mit dem RDP Classifier wurden in Bionumerics Vergleiche mithilfe von phylogenetischen Stammbäumen erstellt, um eine genauere taxonomische Einordnung der Sequenzen zu ermöglichen.

Zur Erstellung des Übersichtsbaumes wurde, um diesen übersichtlich und darstellbar zu halten, eine Auswahl getroffen. Ausgehend von einem Alignment, welches alle auswertbaren Sequenzen enthielt, wurden von allen Gruppen, die durch eine größere Anzahl von Sequenzen repräsentiert waren, wenige für den Übersichtsbaum ausgewählt. Dies hat zur Folge, dass dieser die Diversität, jedoch nicht die Abundanz der Sequenzen wiedergibt, was beispielsweise an der Gruppe *Defluviitoga* deutlich wird, die in den Klonbibliotheken sehr viele Sequenzen vertreten ist, wovon jedoch nur drei im Baum enthalten sind. Der zeitliche Verlauf der Probenahmen wurde nicht berücksichtigt, da keine wesentlichen Änderungen der phylogenetischen Einordnung der Gruppen über die Zeit erkennbar waren. Beispielsweise änderte sich zwar der Anteil der *Defluviitoga*-Sequenzen über die Zeit, jedoch blieb deren phylogenetische Einordnung gleich, es lösten sich somit nicht unterschiedliche Arten der Gattung im zeitlichen Verlauf ab. Bei der Auswahl der Sequenzen wurden einzeln stehende Sequenzen nicht berücksichtigt, da diese mit Unsicherheit behaftet sein können. Daher enthält der Baum nur die dominanten Gruppen und verzichtet zugunsten der Darstellbarkeit und Übersichtlichkeit auf viele kleine Gruppen. Ausgehend davon, wie die Gruppen mit dem RDP-Classifier phylogenetisch eingeordnet waren, wurde ein Satz Referenzsequenzen (wenn möglich Typstamm-Sequenzen) ausgewählt und in den Vergleich einbezogen. Als Außengruppe (Outgroup bzw. Root) wurden mehrere Typstamm-Sequenzen von *Methanobacterium* verwendet. Die Berechnung des Alignments erfolgte in Bionumerics mit dem Softwareinternen Algorithmus „Bionumerics“. Der Baum wurde mit Neighbor Joining und Korrektur nach Jukes und Cantor erstellt.

Der daraus resultierende phylogenetische Baum wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP grafisch bearbeitet. Zur Erhöhung der Übersichtlichkeit wurden taxonomische Gruppen farblich unterlegt. Die Benennung erfolgte auf Basis der taxonomischen Einordnung der betreffenden Sequenzen mit dem RDP-Classifier. Daraus folgt eine Benennung, die mit Unsicherheiten behaftet ist und deren taxonomische Ebene variiert, je nachdem wie nah verwandt die verfügbaren Typstamm-Sequenzen sind. Daher sind einige Gruppen nach Gattungen benannt (z. B. „*Defluviitoga*“) wohingegen andere nur grob beispielsweise als „Clostridia“ bezeichnet sind. Da in Bionumerics ein *in silico* Verdau der Sequenzen erfolgte, wurde ebenfalls eingefügt, welche Länge die Fragmente (TRFs) in der TRFLP haben würden. Dies ermöglicht einen Abgleich der Klonbibliotheken mit den TRFLP-Ergebnissen. Die Darstellung erfolgte als Übersichtsabbildung sowie in detaillierter Darstellung in zwei Teilen (**Abb. II.1.2.2-11, -12, -13**).

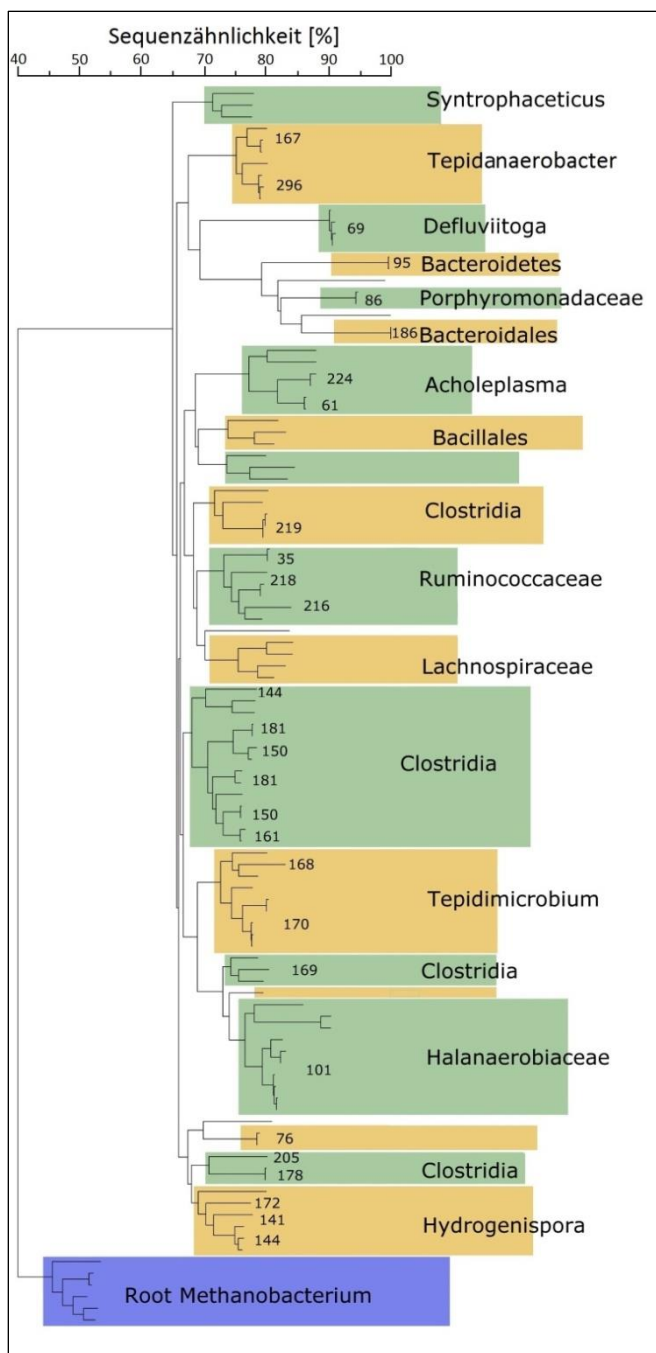


Abb. II.1.2.2-11: Übersichtsdarstellung phylogenetischer Baum ausgewählter Sequenzen der Bacteria-Klonbibliotheken der Strippungsphase; 16S rDNA (Primer 27f – 926MRr); die Zahlen stellen die resultierende TRF-Länge in der TRFLP dar

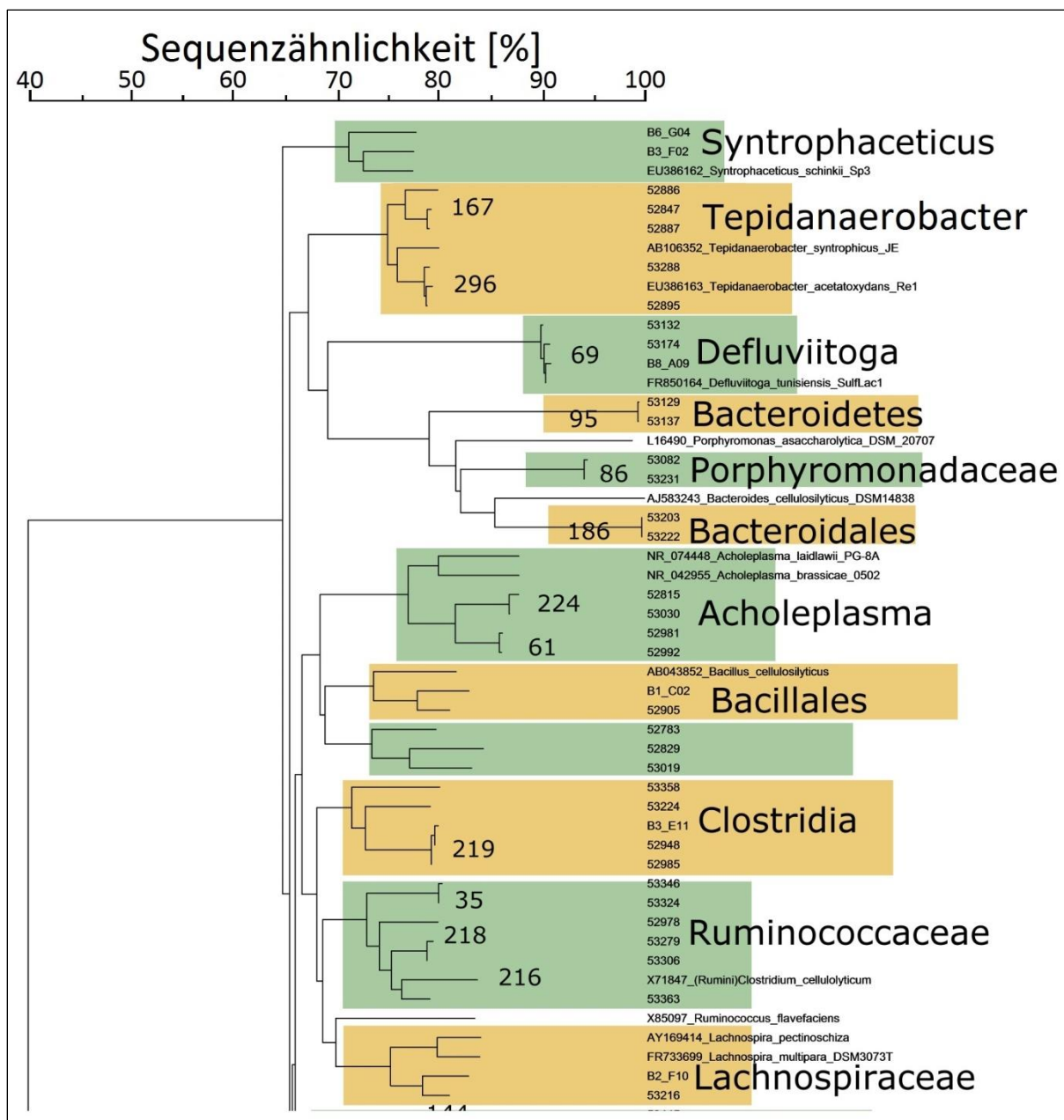


Abb. II.1.2.2-12: Detaildarstellung des phylogenetischen Baumes aus Abb. II.1.2.2-11, oberer Bereich.

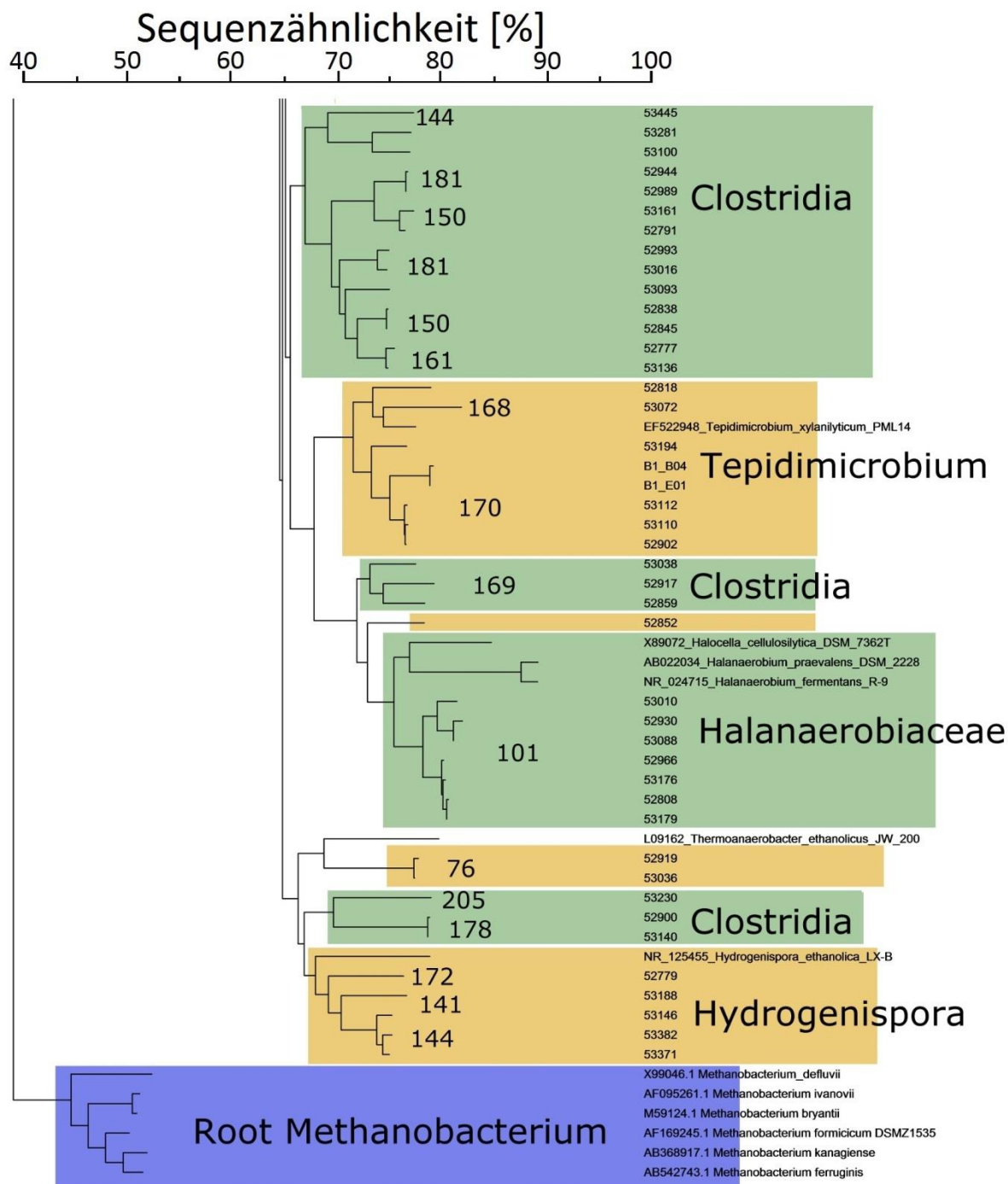


Abb. II.1.2.2-13: Detaildarstellung des phylogenetischen Baumes aus Abb. II.1.2.2-11, unterer Bereich.

Die auftretenden Bakteriengruppen

Der in den Abb. II.1.2.2-11, -12, -13 abgebildete phylogenetische Baum stellt die Diversität der in den Klonbibliotheken der Strippungsphase gewonnenen Sequenzen dar. Erkennbar ist, dass es viele Gruppen gibt, die nicht nahe mit bekannten Typstämmen verwandt sind und daher nicht beispielsweise auf Gattungsebene eingeordnet werden können, wie oben diskutiert wurde. Trotzdem wird insbesondere die in Abb. II.1.2.2-10 als Firmicutes zusammengefasste Vielfalt an phylogenetischen Gruppen aufgelöst. Die in den Klonbibliotheken auftretenden Gruppen sind im Wesentlichen auch in den TRFLP-Profilen vertreten.

Es ist auffällig, dass eine Reihe von Bakterien-Gruppen nachgewiesen wurden, die, wie Literaturvergleiche zeigen, wichtige Abbauschritte in Biogasreaktoren durchführen und Ausgangsstoffe für die Methanogenese liefern. Zudem gibt es bei einigen Gruppen Hinweise auf eine syntrophe Lebensweise in Verbindung mit methanogenen Archaeen.

Defluviitoga tunisiensis

Viele Sequenzen in den Klonbibliotheken wurden *Defluviitoga tunisiensis* zugeordnet. Diese entsprechen dem Phylum Thermotogae in Abb. II.1.2.2-10. Wie die TRFLP-Profile zeigen, konnte diese Gruppe ab Tag 175 des Reaktorbetriebes nachgewiesen werden. Ihr Anteil wird zum Ende der Betriebszeit zunehmend größer. Im Reaktorsystem A ist *D. tunisiensis* zu Beginn der Strippungsphase erst zu einem geringen Anteil vertreten, im System B ist es auch vor der Strippung schon eine dominante Gruppe, weshalb die Strippung offenbar nicht der auslösende Faktor für ihre Dominanz ist. Die Klonbibliotheken bestätigen dies.

Im Verlauf der Strippung wächst der Anteil der *Defluviitoga*-Sequenzen weiter an, sodass diese Gruppe die Artenzusammensetzung schließlich stark dominiert. Die Sequenzen unterscheiden sich nicht bzw. kaum voneinander und vom Typstamm *D. tunisiensis* SulfLac1, wie der phylogenetische Baum **Abb. II.1.2.2-14** zeigt. (Maus et al., 2015; 2016b) wiesen *Defluviitoga tunisiensis* mit dem Stamm L3 in thermophilen Biogasreaktoren nach. Diese Bakterien sind offenbar ein entscheidendes Glied im anaeroben Abbau insbesondere bei hohen Temperaturen, Maus et al. (2015) zeigten in ihrer detaillierten Genom-Analyse von *D. tunisiensis* L3, dass dieses Bakterium eine große Bandbreite an komplexen Polysacchariden verwerten und daraus verschiedene Gärprodukte sowie die Edukte für die Methanogenese, Acetat, CO₂ und H₂ erzeugen kann. Zudem ist das Bakterium hydrolytisch aktiv. Offenbar ist diese Art auch in den Schwimmbettfermentern, während und nach der Strippungsphase ein bedeutendes Glied der Abbaukette.

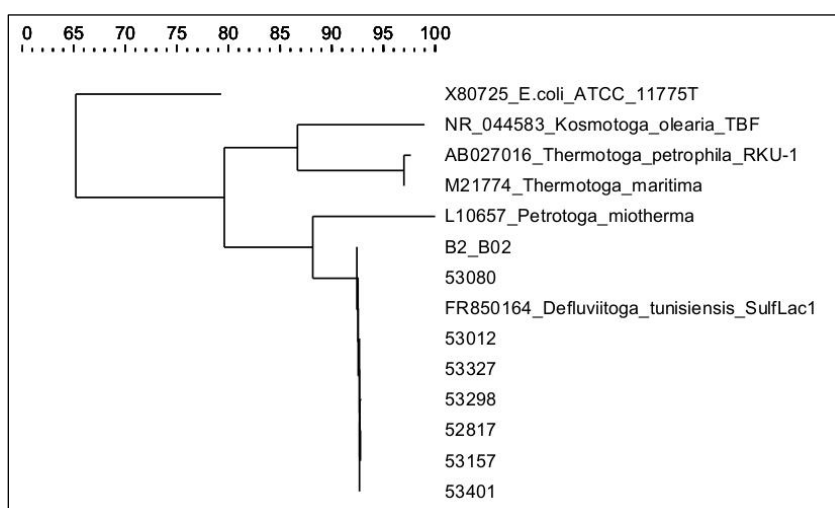


Abb. II.1.2.2-14: Phylogenetischer Vergleich ausgewählter Sequenzen (je eine Sequenz aus den acht Bacteria-Klonbibliotheken) der Klonbibliotheken mit *Defluviitoga tunisiensis* und weiteren Arten innerhalb der Klasse Thermotogae

Ursprünglich beschrieben Hania *et al.* (2012) *Defluviitoga tunisiensis* als anaerobes, thermophiles, leicht halophiles Bakterium. Es wurde aus einem anaeroben Fermenter, der mit Molke und Schwefelverbindungen betrieben wurde, isoliert und zeichnete sich morphologisch besonders durch die na-

mensgebende äußere Hülle (Toga) aus. Der Stamm nutzte verschiedene Schwefelverbindungen als terminale Elektronen-Akzeptoren für anaerobe Atmungsreaktionen. Der von Hania et al. (2012) beschriebene Stamm SulfLac1 ist der Typstamm von *D. tunisiensis*, der einzigen beschriebenen Art der Gattung. Andere Vertreter der Thermotoga-Gruppe (Huber & Hannig, 2006) stammen aus marinen hydrothermalen Systemen und auch Habitaten wie Ölfeldern. Sie stellen Bakterien mit besonders hoher Wachstumstemperatur-Obergrenze von bis zu 90°C dar, was auch ihr Auftreten in thermophilen und hyperthermophilen Biogasreaktoren erklärt. Sie sind soweit bekannt organoheterotroph und ihr Energiestoffwechsel basiert auf Gärungen und anaeroben Atmungen. Der von ihnen erzeugte H₂ wirkt in höheren Konzentrationen hemmend auf ihr Wachstum. Dies deutet darauf hin, dass sie als Syntrophie-Partner für Wasserstoff-Zehrer wie Methanogene infrage kommen. Darauf deuten auch die Forschungen von Balk et al. (2002) an *Thermotoga* (inzwischen *Pseudothermotoga*) *lettingae* hin. Es wurde gezeigt, dass diese Art Methanol zu CO₂ und H₂ abbaut und auch verschiedene Kohlenhydrate fermentativ umsetzen kann (Balk et al., 2002). Es trat Wachstum in syntropher Co-Kultur mit dem methanogenen Archaeon *Methanothermobacter thermoautotrophicus* auf. Auch Maus et al. (2015) vermuteten für *D. tunisiensis* L3 die Eigenschaft in syntropher Co-Kultur mit thermophilen Methanogenen zu wachsen, waren jedoch der Meinung, dass weitere Forschung nötig ist, um dies endgültig zu belegen. Besonders bemerkenswert für Bakterien dieser Gruppe ist, dass offenbar in großem Umfang horizontaler (lateraler) Gentransfer mit Archaeen stattgefunden hat. Es wird beispielsweise genannt, dass bei *Thermotoga maritima* 24 % der Offenen Leseraster (ORF) ihre größte Ähnlichkeit mit solchen der Archaeen haben (Nelson et al., 1999). Der intensive Gen-Austausch deutet darauf hin, dass offenbar ähnliche Habitats wie Archaeen besiedelt werden, was wiederum auch auf Stoffwechsel-Beziehungen wie Syntrophie hindeuten kann.

Bacteroidetes - Porphyromonadaceae

Bakterien des Phylums Bacteroidetes wurden mehrfach als dominante Gruppe in Biogasreaktoren nachgewiesen, wobei jedoch verschiedene Prozessbedingungen einen entscheidenden Einfluss auszuüben schienen (Demirel, 2014; Klang et al., 2015; Theuerl et al., 2015; Maus et al. 2016b). Rademacher et al. (2012a) berichteten, dass sich Vertreter der Bacteroidetes erst bei hohen Temperaturen über 65°C durchsetzen. Nach Alsouleman et al. (2016) führte eine Erhöhung des Stickstoff-Gehalts in einem Biogas-Fermenter infolge der Zugabe von Geflügelmist zu einer Umstellung der mikrobiellen Gemeinschaft von Bacteroidetes-dominiert zu Clostridiales-dominiert. Damit verbunden war eine Umstellung von überwiegend acetoklastischer zu hydrogenotropher Methanogenese, wobei der Prozess nach der Umstellung vergleichbare Biogasmengen erzeugte. Eine weitere Erhöhung des Anteils von Geflügelmist führte dann zu einer Prozessstörung mit einbrechender Reaktorperformance.

Auf dieser Basis ist zu vermuten, dass der im Vergleich zu einigen der genannten Veröffentlichungen geringere Anteil der Bacteroidetes in den hier untersuchten Schwimmbettfermentern durch die hohen Stickstoffgehalte verursacht wird. Während der Strippungsphase ist in den Klonbibliotheken eine Zunahme von Bacteroidetes zu erkennen (besonders in HRA) wobei nach der Strippung wieder eine Abnahme erfolgt, was mit den erneut ansteigenden Stickstoff-Werten zusammenhängen kann.

Tenericutes /Acholeplasma

Wie auch in den mit HTK betriebenen CSTRs (vgl. II.1.3.2), kamen auch in den Schwimmbettfermentern Vertreter der Tenericutes vor. Diese wurden in die Verwandtschaft von *Acholeplasma* eingeord-

net. In den TRFLP treten Fragmente dieser Gruppe (TRFs 61 und 244) im Bereich von null bis wenigen Prozent auf (1,5-2 %). In den Klonbibliotheken sind sie auch nur durch wenige Sequenzen vertreten, erreichen also nicht die hohen Anteile von 11 – 12 % wie die *Tenericutes* in den HTK-CSTR.

Es sind *Acholeplasma* spp. beschrieben, die vermutlich Krankheitserreger bei Tieren sind (Al-Aubaidi et al. 1972; Hill 1992). Andere Arten besiedeln Pflanzenoberflächen wie Tully et al. (2016) an *A. brassicae*, *A. palmae* zeigten. Eine mögliche Phytopathogenität wurde jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen. *Acholeplasma* sind selten als in Biogasanlagen vorkommende Bakterien erwähnt. Jedoch wurden sie von Wirth et al. (2012) als eine der dominanten Bakterien gefunden. Die Autoren gaben an, dass diese Mollicutes Glucose fermentieren und dabei Säuren als Vorstufen für die Methanogenese erzeugen. Sie gehen also von einer funktionellen Rolle dieser Bakterien im Biogasprozess aus.

Firmicutes/Clostridia

Die überwiegende Anzahl an Bakterien-Gruppen, die in den SBF nachgewiesen wurde, gehört zum Phylum Firmicutes, wobei die meisten zudem in die Klasse Clostridia eingeordnet werden können.

Ruminococcaceae

Wie der Name der Gruppe andeutet, sind wichtige Vertreter insbesondere aus dem Pansen der Wiederkäuer bekannt. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen anaeroben Lebensraum in dem große Mengen Pflanzenmaterial zersetzt werden und in dem unter anderem Methanogenese erfolgt. Damit ist der Pansen grundsätzlich einer Biogasanlage als Habitat ähnlich. Karlsson et al. (2014) zeigten, dass *Ruminococcus* spp. dominante Celluloseabbauer im Pansen von Wiederkäuern sind. Gagen et al. (2015) wiesen nach, dass den Ruminococcaceae zugeordnete Bakterien Acetat aus H₂ und CO₂ bilden können, wenn die Methanogenese mit Bromoethansulfonat gehemmt wurde. Somit können offenbar Vertreter dieser Gruppe auch als Substrat-Konkurrenten der Methanogenen in Erscheinung treten. Dies ist im beschriebenen Fall jedoch erwünscht, da hier die Reduktion der Methanemissionen aus der Viehhaltung untersucht wurde.

In den Klonbibliotheken traten mehrere unterschiedliche Gruppen dieser Familie auf und auch in der TRFLP gibt es unterschiedliche Fragmente (82, 216, 218, 334), die mit Ruminococcaceae in Verbindung gebracht werden können. Nicht genau phylogenetisch eingeordnete Ruminococcaceae wurden in Biogas-Systemen wiederholt gefunden (Rademacher et al., 2012c; Theuerl et al., 2015; Maus et al. 2016b).

Tepidanaerobacter

Sekuguchi et al. (2006) beschreiben *Tepidanaerobacter syntrophicus* als ein anaerobes, moderat thermophiles Bakterium welches syntroph in Co-Kultur mit *Methanothermobacter thermoautotrophicus* leben kann. Unter anderem werden Alkohol und Lactat abgebaut, dies jedoch insbesondere in syntropher Co-Kultur. Der Abbau dieser Stoffe in Reinkultur erforderte die Zugabe terminaler Elektronenakzeptoren.

Mit *Tepidanaerobacter syntrophicus* verwandte Sequenzen kommen sowohl in den Klonbibliotheken als auch in den TRFLPs vor, hier jedoch insbesondere im Reaktorsystem A. Im System B mit der hyperthermophilen Hydrolysestufe, tritt er nur lückenhaft auf, vermutlich weil hier das Temperaturo-

timum überschritten wird, worauf auch die genannte Erstbeschreibung hindeutet, die einen Temperaturbereich von 25 - 60°C für *Tepidanaerobacter syntrophicus* angibt. Der phylogenetische Vergleich zeigt jedoch, dass in den SBF zwei andere „Arten“ von *Tepidanaerobacter* vorkommen, die die TRFLP-Fragmente von 167 und 296 Länge ausbilden.

Halanaerobiaceae/ Halocella

Halocella cellulytica wurde von Simankova *et al.* (1994) beschrieben. Es handelt sich um ein anaerobes, halophiles Bakterium, welches Cellulose und andere Polysaccharide vergärt. Die Produkte sind unter anderem Acetat, H₂ und CO₂. Maus *et al.* (2016b) fanden *Halocella*-Verwandte als dominante Bakteriengruppe in den von ihnen untersuchten Biogas-Systemen. Sie vermuteten eine Rolle als „key-player“ bei der Hydrolyse der Substrate in thermophilen Systemen und hoben auch die Toleranz gegenüber hohen Salzgehalten hervor, die in Biogasanlagen auftreten können.

Weitere Firmicutes

Tepidimicrobium

Niu *et al.* (2009) isolierten *Tepidanaerobacter xylanilyticum* aus einem thermophilen Fermenter und zeigten, dass die Art verschiedene Kohlenhydrate und Proteine/Aminosäuren vergären konnte, wobei unter anderem Acetat, CO₂ und H₂ entstanden. Auch ein auf anaeroben Atmungen z. B. mit Fe(III) basierender Energiestoffwechsel ist möglich (Slobodkin *et al.*, 2006).

Hydrogenispora

Mit dem Fragment der Länge 144 und anderen traten Verwandte von *Hydrogenispora* in der TRFLP auf. In System B kamen sie über die gesamte Laufzeit vor, in System A jedoch nur bis zum Versuchstag 329. Die *Hydrogenispora*-fragmente 172 und 141 traten ebenfalls, teilweise lückenhaft in beiden Systemen auf. Liu *et al.* (2014) beschrieben die einzige Art der Gattung *Hydrogenispora ethanolica* als anaeroben Sporenbildner der verschiedenen Kohlenhydrate und komplexe organische Stoffe vergärt. Gebildet werden u. Ammoniumacetat, Ethanol und Wasserstoff. Die Art ist mit einem Wachstumsbereich von 20 - 50°C leicht thermophil. Dieser Stamm wurde als Bioaugmentationszusatz untersucht, um die Wasserstoffproduktion aus organischen Substraten zu erhöhen, was auch teilweise funktionierte (Yang *et al.*, 2016). Die phylogenetische Analyse zeigt, dass verwandte, jedoch andere, bisher unbeschriebene Arten als *H. ethanolica* in den SBF vorkommen (vgl. Abb. II.1.2.2-13)

Zusammenfassend zeigt der phylogenetische Vergleich in Kombination mit einer Literaturrecherche also, dass obwohl verschiedene Gruppen von Bakterien nicht bis zur Gattungsebene eingeordnet werden können, doch verwandte Stämme identifiziert werden können, die in Biogasanlagen funktionell wichtige Funktionen ausüben können. Zudem werden ähnliche Gruppen immer wieder in Biogasanlagen gefunden, oft auch bei hohen Temperaturen oder unter Stickstoff-Stress. Die in den untersuchten Reaktoren vorkommenden Bakterien stellen jedoch vielfach unbekannt Arten/Gattungen dar. Hier zeigt sich die Notwendigkeit, diese unbekannt Organismen beispielsweise durch Isolierung zugänglich zu machen um u. a. ihren Stoffwechsel genauer zu untersuchen.

Ergebnisse Archaeen

Die Archaeen-Gemeinschaften sind im Vergleich zu denen der Bakterien einfacher zusammengesetzt, da alle Gruppen zu demselben Phylum Euryarchaeota gehören. Die QPCR-Untersuchungen zeigten auch, dass die Archaeen-Kopienzahl eine oft etwa zwei Größenordnungen tiefer lag als die der Bakterien. Die in der anaeroben Nahrungskette von komplexen Substraten bis zum Methan durchgeführten Stoffumsätze sind überwiegend von Bakterien dominiert, wobei die Archaeen überwiegend die Methanogenese (auf verschiedenen Wegen) durchführen.

Im Unterschied zu den Bakterien sind die Archaeen überwiegend bis auf Gattungsebene einzuordnen, was zeigt, dass hier die betreffenden Arten beschrieben sind und in der Regel kultiviert vorliegen. Deshalb können hier im Vergleich zu Bakterien konkretere Aussagen getroffen werden. Die Archaeen-Gemeinschaften der bei unterschiedlichen Temperaturen betriebenen Reaktoren HRA und HRB waren sehr unterschiedlich zusammengesetzt (**Abb. II.1.2.2-15**).

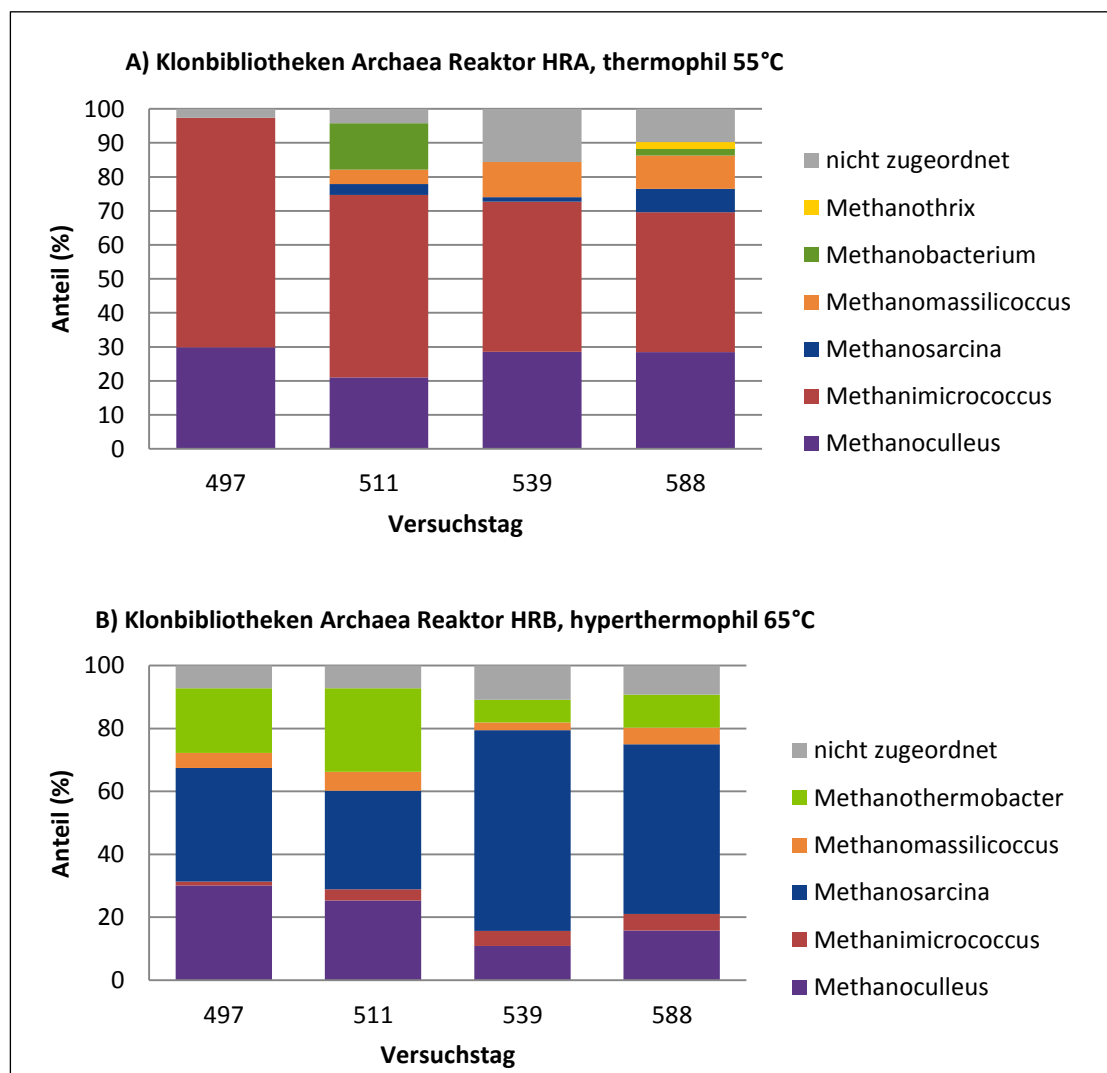


Abb. II.1.2.2-15: Darstellung der Klonbibliotheken des archaeellen 16S Gens der Schwimmbettreaktoren auf Gattungsebene; Tag 497 vor der Strippung; Tage 511 und 539 während der Strippung; Tag 588 nach der Strippung

Die Gattung *Methanoculleus* war zu allen untersuchten Zeitpunkten als eine Hauptkomponente der Gemeinschaften vertreten, nahm jedoch im Reaktor HRB während der Strippung relativ zu den anderen Gruppen ab, wobei nach der Strippung wieder ein Zunahme zu beobachten war. Die anderen dominierenden Gruppen waren jedoch bei beiden Reaktorsystemen grundsätzlich unterschiedlich. In Reaktor HRA lag vor der Strippung ganz überwiegend *Methanimicrococcus* vor. In Reaktor HRB war vor der Strippung die Gemeinschaft diverser zusammengesetzt und *Methanimicrococcus* nur sehr gering vertreten. Dagegen war *Methanosarcina* sehr dominierend und *Methanothermobacter* besaß einen erheblichen Anteil. *Methanomassiliococcus* war als Nebenkomponekte enthalten.

Während der Strippung ist in Reaktor HRA eine starke Zunahme der Diversität der methanogenen Archaeen zu beobachten. Die vorher nur aus *Methanoculleus* und *Methanimicrococcus* zusammengesetzte Gemeinschaft wies nun weitere Gruppen auf. *Methanomassiliococcus* trat auf und *Methanobacterium* bildete zu Beginn der Strippung einen erheblichen Anteil, verschwand später jedoch weitgehend wieder. Im Reaktor HRB, wo vor der Strippung die Gemeinschaft schon diverser war, kommt es zu einer zunehmenden Dominanz von *Methanosarcina*. Die relative Zunahme erfolgte auf Kosten von *Methanoculleus* und *Methanothermobacter*. Die insbesondere im Reaktor HRB im mikroskopischen Bild beobachtete starke Zunahme der Morphotypendiversität spiegelt sich nicht in der Zusammensetzung der Klonbibliotheken wider. Zudem ist zu bemerken, dass *Methanosarcina* auch schon vor der Strippung einen erheblicher Teil der methanogenen Gemeinschaft in Reaktor HRB bildete, ohne dass im mikroskopischen Bild die typischen Zellcluster bzw. Pseudosarcinen zu beobachten waren. Dies lässt sich damit erklären, dass diese bezeichnenden Morphotypen nicht immer ausgebildet werden, sondern *Methanosarcina* auch zu einzelligem, kokkoidem Wachstum in der Lage ist. Laut Literaturquellen tritt dies insbesondere unter Stressbedingungen auf (Maus et al., 2016b).

Die morphologische Diversität von *Methanosarcina* ist bemerkenswert groß, wie auch im hier beschriebenen Projekt beobachtet wurde, und in Abb. II.1.2.2-13 zusammengestellt ist. Neben einzelligem Wachstum werden große „Cysten“ aus vielen Zellen ausgebildet (vgl. Abb. II.1.2.2-2 (B)), wie auch von Liu (2010) beschrieben wurde. Diese Cysten zeigen innerhalb der gemeinsamen Kapsel eine zunehmende Fragmentierung und bilden kugelige Zellcluster und Pseudosarcinen (vgl. Abb. II.1.2.2-2 (C, D)) und schließlich große, lockere, weniger geordnete Aggregate aus teilweise vielen hundert Zellen. Zwischen diesen verschiedenen Wachstumsformen sind Zwischenstufen zu beobachten, sodass ein fließender Übergang vorzuliegen scheint.

Abgleich der TRFLP-Methode mit den Klonbibliotheken

Mithilfe der Klonbibliotheken und *in silico*-Verdau der erhaltenen Sequenzen erfolgte eine Identifizierung mehrerer TRFs. Weitere wurden über relevante Literaturquellen identifiziert (vgl. TRF-Tabelle Tab. II.1.2.2-1,-2, Abb. II.1.2.2-11). Dieses Vorgehen ermöglicht es, beide molekularbiologischen Methoden miteinander in Beziehung zu setzen und die erhaltenen TRF-Fingerabdrücke mit der Sequenzzusammensetzung der Klonbibliotheken zu vergleichen. Beim Vergleich der Ergebnisse beider Methoden fiel zunächst auf, dass bei den Archaeen die beiden Methoden eine grundsätzlich ähnliche Anzahl und Verteilung der von „Gemeinschaftselementen“ zeigen. Somit ermöglicht auch die Restriktionsanalyse mit dem Enzym *AluI* eine grundsätzlich aussagekräftige Gemeinschaftsanalyse, obwohl die „Informationsdichte“ und phylogenetische Aussagekraft bei den Sequenzen der Klonbibliotheken erheblich höher ist. Bei den Bakterien ist dieser Vergleich schwieriger, da sowohl die TRFs als auch

die Sequenzen einen hohen Anteil an nicht oder nur grob eingeordneten Gruppen aufweisen. Eine vollständige Parallelität von TRFLP und Klonbibliotheken ist nicht ohne weiteres zu erzielen. Zum einen gibt es eine Reihe von TRFs, die nicht durch Sequenzen in den Klonbibliotheken repräsentiert sind. Dies könnte durch die Erstellung weiterer Klonbibliotheken, insbesondere aus der frühen Phase des Betriebes der SBF reduziert werden. Zum anderen ist es möglich, dass ein TRF, also ein markiertes Fragment definierter Länge durch mehrere unterschiedliche Organismen zustande kommt. Dies ist im Falle der hier angewendeten Archaeen-Methode bei TRF 108 bp der Fall, welches durch Literaturquellen sowie Erfahrungen in der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik des ATB unterschiedliche Organismen (z. B. *Methanoculleus* auch *Methanosaeta*, *Methanobacterium*, vgl. Tab. II.1.2.2-2) repräsentieren kann.

Da in den im Rahmen dieses Projektes erzeugten Klonbibliotheken des SBF das Fragment nur durch *Methanoculleus*-Sequenzen entsteht, wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen, dass das TRF 108 *Methanoculleus* repräsentiert. Dies ist jedoch mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, da die erstellten Klonbibliotheken aus Proben, die am Ende des Reaktorbetriebes genommen wurden, erstellt wurden. Im TRF 108 bp könnten daher zu anderen Zeiten auch weitere Arten repräsentiert sein. Zudem zeigte der *in silico*-Verdau, dass die Sequenzen der insbesondere in den Klonbibliotheken des Reaktors HRA dominanten Gattung *Methanimicrococcus* nicht vom Enzym *AluI* geschnitten werden. Deshalb wird dieser Organismus in der angewendeten TRFLP bisher nicht erfasst, da die ungeschnittenen langen Fragmente die Kapillare erst außerhalb des vom Größenstandard abgedeckten Bereich verlassen und in der Regel im angewendeten Zeitfenster nicht detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die TRFLP Methode bisher offenbar einzelne Gruppen von Archaeen nicht erfasst und aufgrund dieser Erfahrungen weiterentwickelt werden sollte. Dies sollte zum einen dadurch geschehen, dass die Laufzeit entsprechend verlängert wird, um auch ungeschnittene Fragmente erfassen zu können. Dies könnte mit einem weiterentwickelten Größenstandard mit größerem Bereich kombiniert werden. Tritt am Ende der Laufzeit ein Peak relevanter Größe auf, deutet dies auf ungeschnittene Sequenzen hin und es könnte beispielsweise der Einsatz anderer oder zusätzlicher Restriktionsendonucleasen erprobt werden. Allerdings ist der Einsatz anderer Restriktionsendonucleasen deshalb ungünstig, weil die Vergleichbarkeit verschiedener Untersuchungen dann nicht mehr möglich ist.

QPCR-Untersuchungen

Ausgewählte Daten des Langzeitversuches wurden mit verschiedenen QPCR-Systemen untersucht, um grundsätzliche quantitative Daten über die Zusammensetzung der aktiven Mikroorganismengemeinschaften zu gewinnen. Neben der Erfassung der Gesamtbakterien und Gesamtarchaeen, wurden verschiedene Gruppen von Methanogenen untersucht. Dies sollte die anderen Methoden zur Untersuchung der prokaryotischen Gemeinschaften wie Klonbibliotheken und TRFLP ergänzen. Die Ergebnisse sind in **Tab. II.1.2.2-6** zusammengefasst. Die verschiedenen Zielorganismengruppen sowie die verwendeten Primer und TaqMn-Sonden sind in Tab. I.2.8-1 dargestellt. Bei den QPCR-Untersuchungen erfolgte eine Beschränkung auf die AF-Stufe, da hier die genauere Untersuchung insbesondere der Methanogenen-Gemeinschaft angestrebt wurde.

Tab. II.1.2.2-6: Ergebnisse der qPCR-Untersuchungen an den Schwimmbettfermentern.

Reaktor- stufe	Probe- nahme- tag	Bacteria	Archaea	Methano- bacteriales	Methano- microbiales	Methano- sarcinaceae	Methano- saetaceae
		[Kopien/ng DNA]					
AFA	175	2,95E+06	2,82E+04	2,41E+02*	1,84E+04	1,55E+03*	nn
AFB	175	3,37E+06	8,14E+03	2,57E+03	2,02E+03	4,05E+02*	nn
AFA	245	3,39E+06	3,23E+04	1,44E+02*	2,07E+04	8,90E+02*	nn
AFB	245	3,66E+06	1,72E+04	4,61E+03	5,98E+03	3,94E+02*	nn
AFA	364	3,72E+06	2,99E+04	3,38E+02*	1,86E+04	6,64E+02*	nn
AFB	364	3,92E+06	1,48E+04	3,21E+03	5,71E+03	2,82E+02*	nn
AFA	499	4,12E+06	3,22E+04	2,75E+01*	2,28E+04	1,05E+03*	nn
AFB	499	4,09E+06	1,53E+04	2,68E+03	6,31E+03	2,50E+02*	nn

* die gekennzeichneten Daten sind im Vergleich zu den qPCR-Standards im unteren Bereich und daher nur ungenau quantifizierbar

Die vergleichende Darstellung der qPCR-Ergebnisse zeigt nur geringe Änderungen über den zeitlichen Verlauf, da die jeweils dominierenden Gruppen bestehen blieben (**Abb. II.1.2.2-16**).

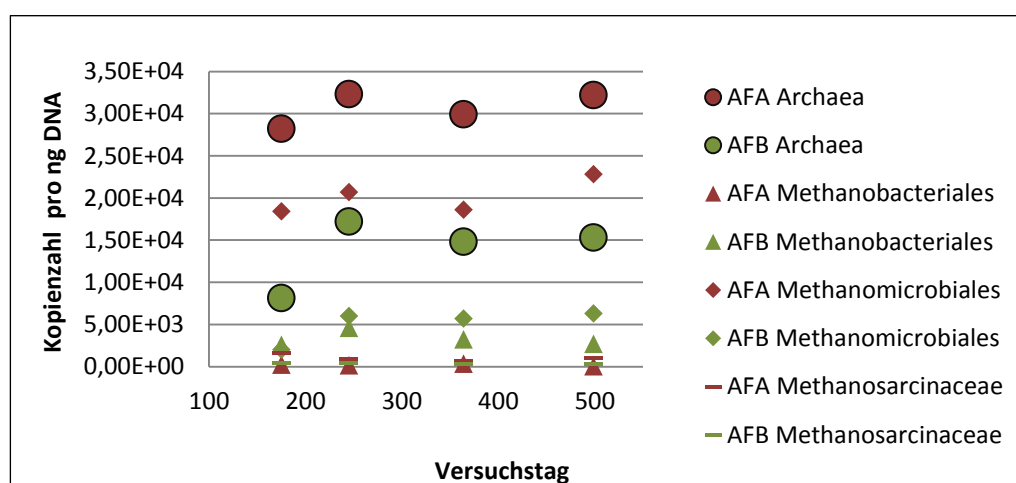


Abb. II.1.2.2-16 qPCR-Ergebnisse zu methanogenen Gruppen und Gesamt-Archaea ausgewählter Versuchstage der AF-Reaktoren der Schwimmbettfermenter, rot – Reaktor AFA, grün – Reaktor AFB

Die beiden Anaerobfilterstufen der bei unterschiedlichen Temperaturen betriebenen Reaktoren A und B zeigen Ähnlichkeiten und Unterschiede. Die Kopienzahl der Bakterien war jeweils um mindestens zwei Größenordnungen höher als die der Archaeen, was angesichts des Verhältnisses der autofluoreszierenden und nicht leuchtenden Zellen in der mikroskopischen Untersuchung plausibel und in Anbetracht der komplizierten Stoffwechsellaskaden der Bakterien im Vorlauf der archaeellen Methanogenese verständlich ist. Zwar wird in den AF-Stufen nur wenig partikuläre Substratmasse vorhanden, da hier lediglich kleine Partikel mit dem Perkolat eingetragen werden, jedoch erfolgen auch hier der Methanogenese vorgelagerte Abbaureaktionen, die im Perkolat gelöste Stoffe umsetzen.

Der Vergleich der Methanogenen-Gruppen ergab folgendes Gesamtbild: Im Reaktor AFA waren Methanomicrobiales die dominierende Gruppe, wohingegen im Reaktor AFB Methanomicrobiales und Methanobacteriales in vergleichbarer Größenordnung vorkamen. Im Reaktor A waren Methanobacteriales dagegen nur in geringer Kopienzahl nachweisbar, weshalb sie „am Rand“ des durch die Standards definierten Messbereiches der qPCR lagen (vgl. *Markierung Tab. II.1.2.2-6). Methanosaetaceae wurden nicht nachgewiesen. Unsicher war die Quantifizierung mit dem Methanosar-

cinaceae-System (Markierung in der Tabelle). Mit dieser Einschränkung wurden höhere Kopienzahlen von Methanosarcinaceae für den AFA als für den AFB gefunden, was den mikroskopischen Befunden entspricht.

Fazit

Trotz hoher Gehalte an Stickstoffverbindungen, die insbesondere bei den gewählten thermophilen und hyperthermophilen Bedingungen toxisch auf relevante Mikroorganismen des Systems wirken können, konnten die SBF stabil betrieben werden. Die verschiedenen molekularbiologischen Methoden zeigen hierbei, dass sich trotz hoher Stickstoffwerte diverse Methanogenen- und Bakterien-Gemeinschaften entwickelt haben, die sich mehrfach umstellten, da dominante Gruppen ausgetauscht wurden. Damit erwiesen sich die Gemeinschaften als anpassungsfähig und führten zu einer vergleichsweise hohen Biogas-Bildung, insbesondere angesichts sehr hoher Stickstoffgehalte. Auch zusätzliche Änderungen wie die erforderliche Anpassung der Gemeinschaften an die Wechsel des Substrates wurden verkräftet.

Die Strippung, die in der Endphase des Reaktorbetriebes zur Verringerung der Stickstoffgehalte integriert wurde, hatte erhebliche Auswirkungen auf die prokaryotischen Gemeinschaften. Dem positiven Effekt der Absenkung des Stickstoffgehaltes stehen negative Effekte beispielsweise durch den Sauerstoffeintrag bei Strippung mit Luft gegenüber, was erheblichen Einfluss auf die Lebensbedingungen hat. Die Reaktion der Gemeinschaft darauf war im Wesentlichen eine Diversifizierung der Artenzusammensetzung, worauf die Klonbibliotheken und die mikroskopische Morphotypenanalyse hindeuteten. Der durch die Strippung anfangs auftretende Einbruch der Biogasproduktion in den Hydrolysestufen konnte nach Anpassung der Gemeinschaft kompensiert werden. Die bakterielle Gemeinschaft in den Reaktoren ist divers zusammengesetzt und weist viele für die anaeroben Umwandlungsprozesse von Biomasse zu Biogas relevante Gruppen auf. Diese werden im zeitlichen Verlauf zum Teil ausgetauscht. Gegen Ende der Reaktorlaufzeit setzt sich *Defluviitoga tunisiensis* durch, wobei dies nicht oder nicht nur von der Strippung ausgelöst wird.

Grundsätzlich ließ sich insbesondere an den Langzeit-Daten der TRFLP erkennen, dass bei steigenden Gehalten an Stickstoffverbindungen die Diversität der Bakterien-Gemeinschaft abnahm. Dies könnte die Gemeinschaft instabiler machen, jedoch wurden im untersuchten Bereich keine negativen Effekte beobachtet.

Die Zusammensetzung der vertretenen Archaeen-Gruppen deutet darauf hin, dass bei hohen Stickstoffgehalten, hydrogenotrophe Methanogenese vorherrscht, was auch in der Literatur beschrieben wird (Angelidaki & Ahring, 1993). Zu Beginn des Reaktorbetriebes sowie während der Strippung ist durch das vermehrte Auftreten von mixotrophen *Methanosarcina* ein Anteil von acetoklastischer Methanogenese möglich.

Die Ausbildung von angepassten leistungsfähigen Gemeinschaften in den SBF unter hoher Belastung mit Stickstoffverbindungen zeigen auch, dass sich diese Reaktorsysteme zur Produktion eines Inokulums anbieten. Dieses könnte aus Perkolat oder Gärrest bestehen und könnte zur Unterstützung insbesondere der Einfahrphase in mit stickstoffreichen nachwachsenden Rohstoffen betriebenen

Praxisanlagen eingesetzt werden. Dies kann das in den mit HTK betriebenen CSTR erzeugte Inokulum sinnvoll ergänzen.

II.1.3 Vergärung stickstoffreicher Substrate im Rührkesselreaktor (CSTR)

II.1.3.1 Verfahren zur Vergärung von Hühnertrockenkot

Die Vorteile des Rührkesselreaktors liegen in der Einfachheit der Prozessführung, der geringen Komplexität und den niedrigen Investitionskosten (Chamy et al., 2011; Angelidaki et al., 2006). Jedoch besitzt das System auch Nachteile, die aus der Limitierung der Wahl möglicher Einsatzstoffe und der fehlenden Möglichkeit zur Rückhaltung von Biomasse resultieren (Gemmeke et al., 2009), (Bischofsberger, 2003). So werden ausschließlich strukturarme, fließfähige Substrate mit geringem Trockensubstanzgehalt sowie mit einer gegenüber anderen Fermentationstypen langen Verweilzeit eingesetzt (FNR, 2013). Dennoch sind diese Systeme aufgrund der guten Durchmischung und der gleichmäßigen Konzentrationsverteilung denen der Trockenfermentation insbesondere für die anvisierte Vergärung stickstoffreicher Substrate vorzuziehen (Gemmeke et al., 2009). Im Rahmen des Projektes lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Analyse mikrobiologischer Grundlagen, insbesondere auf der Generierung von Erkenntnissen über die Auswirkungen variierender Ammoniakkonzentrationen auf die mikrobielle Population. Ein weiteres Ziel der mikrobiologischen Arbeiten war die Entwicklung eines für hohe Stickstoff- bzw. Ammoniakkonzentrationen geeigneten Fermenterzusatzes auf Basis adaptierter Mikroorganismen. Die an hohe Ammoniumkonzentrationen adaptierten Mikroorganismen sollten als „Hochleistungsinokulum“ Biogasanlagen mit kritischen Substraten in Form von Bioaugmentationsprozessen zugeführt werden, um dadurch die Prozessstabilität, insbesondere während der kritischen Anfahrphase, zu gewährleisten.

Im Rahmen der Langzeitversuche wurden im Juli 2014 zwei Biogasfermenter vom CSTR-Typ mit einem Nutzvolumen von acht Litern installiert. Zum Einfahren der Reaktoren kamen die Gärreste zweier thermophiler, labortechnischer Versuchsanlagen zum Einsatz (50 % Rindergülle, 50 % HTK, thermophil) welche ebenfalls anteilig mit Hühnertrockenkot gefahren wurden. Dadurch kann von einer quantitativ und qualitativ hochwertigen, mikrobiellen Starterkultur in den Fermentern ausgegangen werden. Die Reaktoren wurden bei thermophilen Temperaturbedingungen betrieben (56°C). Der Rührzyklus erstreckt sich über 24 Stunden am Tag mit einer Geschwindigkeit von 80 rpm. Von beiden Reaktoren werden versuchstäglich der pH-Wert, die Temperatur und die produzierte Biogasmenge erfasst (Abb. II.1.3.1-1, -2).

Wie aus **Abb. II.1.3.1-1** deutlich wird, weichen die pH-Wertverläufe der CST-Reaktoren 1 und 2 innerhalb der ersten 50 Tage wenig voneinander ab. Dies kann auf die Heterogenität des verwendeten Inoculums, als auch auf die des zugeführten Substrates (HTK) zurückgeführt werden. Ab Tag 50 sind die pH-Wertverläufe zunehmend übereinstimmend. Mit Tag 60 wurde die Einfahrphase als abgeschlossen definiert und mit der Steigerung der Raumbelastung begonnen.

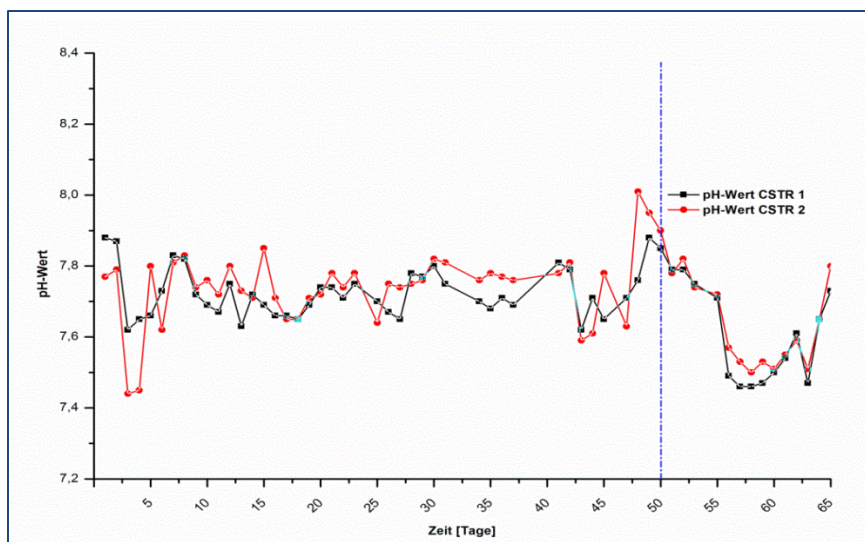


Abb. II.1.3.1-1: Darstellung des pH-Wertverlaufs innerhalb der Einfahrphase für die CST-Reaktoren 1 und 2.

Zur Bestimmung der täglichen Biogasmenge in Normliter wurden ferner die Umweltparameter, Raumtemperatur und Luftdruck aufgenommen. Eine qualitative Analyse des gesammelten Biogases erfolgte in der Einfahrphase im wöchentlichen Rhythmus. Wie in **Abb. II.1.3.1-2** zu erkennen ist, findet über die gesamte Einfahrphase eine Abnahme der produzierten Biogasmenge statt. Dies ist der Senkung der Raumbelastung und des abnehmenden TS-Gehaltes des Fermenterinhalt (Tab. II.1.3.1-1) im Verlauf der Einfahrphase geschuldet. Ebenso nehmen Ammoniumkonzentration und FOS/TAC-Werte während der Einfahrphase kontinuierlich ab.

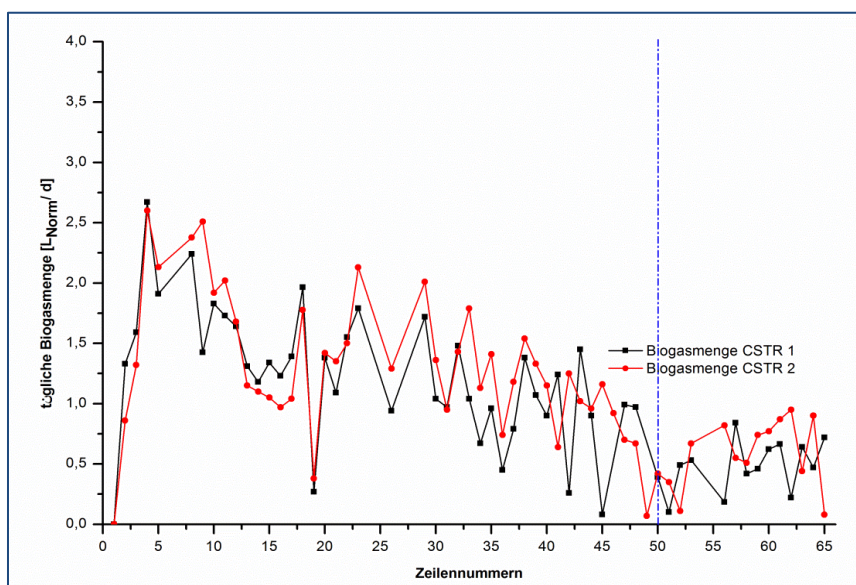


Abb. II.1.3.1-2: Darstellung der täglich gebildeten Biogasmenge während der Einfahrphase für die Rührkesselreaktoren CSTR 1 und CSTR 2.

Tab. II.1.3.1-1: Substratanalytischen Parameter der untersuchten CST-Reaktoren 1 und 2 in der Einfahrphase.

Reaktor	TS-Gehalt [% FM]			NH ₄ -N [mg/L]			FOS/TAC		
	05.06.14	01.07.14	05.08.14	05.06.14	01.07.14	05.08.14	05.06.14	01.07.14	05.08.14
CSTR-1	5,19	3,54	2,07	3347	2751	2685	0,24	0,19	0,14
CSTR 2	5,86	4,08	2,05	3380	2886	2648	0,36	0,23	0,13

Durch eine versuchstägliche Substratzugabe der Reaktoren mit Hühnertrockenkot als Monosubstrat wird auf eine Raumbelastung von 4 bis 5 g oTS L⁻¹ d⁻¹ abgezielt. Gleichzeitig soll damit eine Adaption der mikrobiellen Lebensgemeinschaft an hohe NH₄-N-Konzentrationen erzielt werden. Zum Ende der Einfahrphase betrug die Raumbelastung 2 g oTS L⁻¹ d⁻¹. Nachfolgend sind die genannten verfahrenstechnischen Parameter in tabellarischer Form zusammengefasst dargestellt (**Tab. II.1.3.1-2**).

Tab. II.1.3.1-2: Darstellung der verfahrenstechnischen Parameter der untersuchten Rührkesselreaktoren CSTR 1 und 2

Parameter	CSTR 1	CSTR 2
Nutzvolumen (Reaktorvolumen) [L]	8 (15)	8 (15)
pH-Wert :Min, Max, MW	7,62; 8,01; 7,73	7,44; 8,01; 7,74
Betriebstemperatur [°C]	65	65
Rückgeschwindigkeit [rpm]	80	80
Befütterung (Methodik)	(Liebetau et al, 2015)	

Nach erfolgreichem Abschluss der Einfahrphase erfolgte eine Variation der Betriebsbedingungen der etablierten CST-Reaktoren. Eine Erhöhung der Prozesstemperatur auf ein hyperthermophiles Niveau (66°C) fand bei CSTR 2 statt. Hingegen wurde CSTR 1 weiterhin bei thermophilen (56°C) Temperaturbedingungen betrieben. Der Rührzyklus erstreckte sich weitehin über 24 Stunden am Tag, wurde jedoch von initialen 80 rpm auf 60 rpm reduziert, um mögliche Scherkräfte im Fermentationsprozess zu minimieren, dennoch aber eine vollständige Durchmischung zu gewährleisten. Von beiden Reaktoren werden versuchstäglich der pH-Wert, die Temperatur und die produzierte Biogasmenge erfasst (**Abb. II.1.3.1-3**).

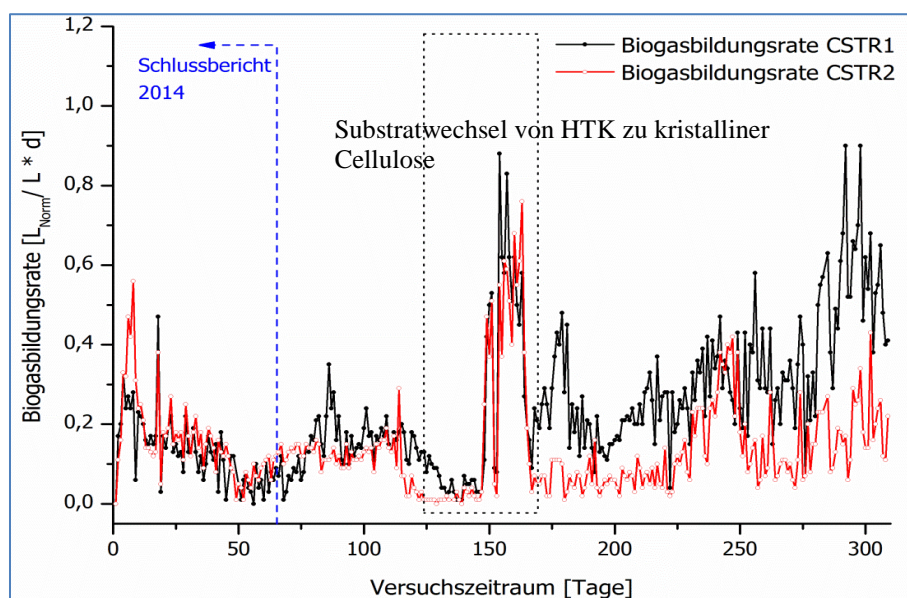


Abb. II.1.3.1-3: Darstellung der Biogasbildungsrate über die gesamte Versuchsperiode.
Blau gestrichelte Linie: vor und nach der Einfahrphase
Gestrichelter Kasten: kurzzeitige Substratumstellung zur Aktivierung der Methanogenese

Im Versuchsverlauf sank die Biogasbildungsrate insbesondere beim hyperthermophilen Versuchsansatz (CSTR 2) ab Tag 120 für ca. 20 Tage, bis auf nahezu null ab (Abb. II.1.3.1-3). Zur Reaktivierung der Methanogenese bzw. zur effizienteren Reduktion freier Fettsäuren wurde die Befütterung für 14 Tage eingestellt und ein Wechsel von HTK zu kristalliner Cellulose als leicht verstoffwechselbare Substratquelle vollzogen. Wie anhand der darauffolgenden rapiden Zunahme der Biogasbildungs-

rate ab Tag 150 zu erkennen ist, führte das Vorgehen bei beiden Reaktorsystemen zu einer Stabilisierung der methanogenen Biozönose, so dass ab Tag 175 erneut mit der Fütterung von Hühner trockenkot (Raumbelastung $2,5 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) begonnen werden konnte. Auch der Essigsäureäquivalent als Summenparameter sämtlicher Fettsäurekonzentrationen, weist auf eine beginnende Prozessstörung ab Tag 120 bis 125 hin (**Abb. II.1.3.1-4**).

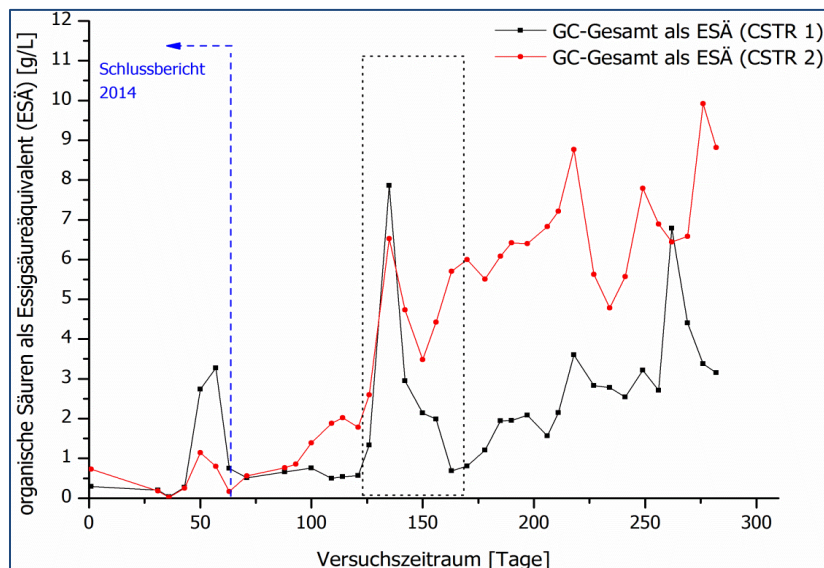


Abb. 1.3.1-4: Darstellung der Konzentrationsveränderungen der organischen Säuren (GC Gesamt) als Essigsäureäquivalent (ESÄ) vor und nach der Einfahrphase (blau gestrichelte Linie) für die CSTR-Reaktoren 1 und 2.

Zu erkennen ist, dass eine Säureakkumulation bei CSTR 1 und CSTR 2 bis auf einen Maximalwert von $7,86$ bzw. $6,53 \text{ g L}^{-1}$ stattfand. Ein Aussetzen der Befütterung gefolgt von einem kurzzeitigen Substratwechsel ab Tag 150, führte zu einem Absinken des ESÄ auf ca. $3,5 \text{ g L}^{-1}$ (CSTR 2) und $0,6 \text{ g L}^{-1}$ (CSTR 1). Mit Fortführung der Befütterung der Reaktoren ab Tag 175 mit HTK als Monosubstrat konnte erneut ein rascher Anstieg des ESÄ festgestellt werden. Die Analyse des ESÄ im hyperthermophilen Versuchsansatz (CSTR 2) ergab nach ca. 150 Tagen der kurzfristigen Substratumstellung eine neue Maximal-Konzentration von $9,92 \text{ g L}^{-1}$. Dem gegenüber blieb der ESÄ im thermophilen Versuchsansatz (CSTR 1) mit einer Konzentration von $6,79 \text{ g L}^{-1}$ unterhalb des bisherigen Maximums von $7,86 \text{ g/L}$. Parallel zur Erhöhung des ESÄ ist ein Anstieg der täglichen Biogasbildungsrate im thermophilen als auch hyperthermophilen CSTR zu verzeichnen (Abb. II.1.3.1-3), als Indikator für einen stabilen Prozess durch Adaptions- und Akklimatisierungsprozesse der Mikrobiologie an hohe Stickstofffrachten.

Die gemessenen ESÄ waren im Schnitt bei thermophilen Temperaturen niedriger, was auf einen schnelleren Abbau der Fettsäuren durch Primär- und Sekundärvergärer schließen lässt. Die als ESÄ-Verläufe dargestellten temporären Prozessstörungen spiegelten sich jedoch nicht in Form eines fluktuierenden pH-Wertes wieder, da sich dieser über die gesamte Fermentationsperiode bis auf wenige Oszillationen kaum verändert hat (**Abb. II.1.3.1-5**). Deutlich ist jedoch der Abfall des pH-Wertes nach Änderung des zugeführten Substrates am Tag 150 (pH-Wert ca. 7,2) zu erkennen, was ebenfalls auf eine durch Exoenzyme katalysierte rasche Hydrolyse freiwerdender Polymere und effiziente intrazelluläre Fettsäureoxidation sowie günstige Intermediateinschleusung in die Stoffwechselwege hinweist. Für den anhaltenden Zeitraum der erneuten Monofermentation von Hühner trockenkot ab Tag 175 wird deutlich, dass der pH-Wert des hyperthermophilen Versuchsansatzes (CSTR 2) über dem

des thermophilen (CSTR 1) Ansatzes liegt. Möglicherweise weisen die Pufferkapazitäten (Ammoniumpuffer, eingebracht durch das Substrat) unterschiedliche Bereiche auf, bei denen sich der Äquivalenzpunkt verschoben hat bzw. die Reaktion der Fettsäuren mit Ammonium in Richtung Ammoniumhydrogencarbonat forciert wurde.

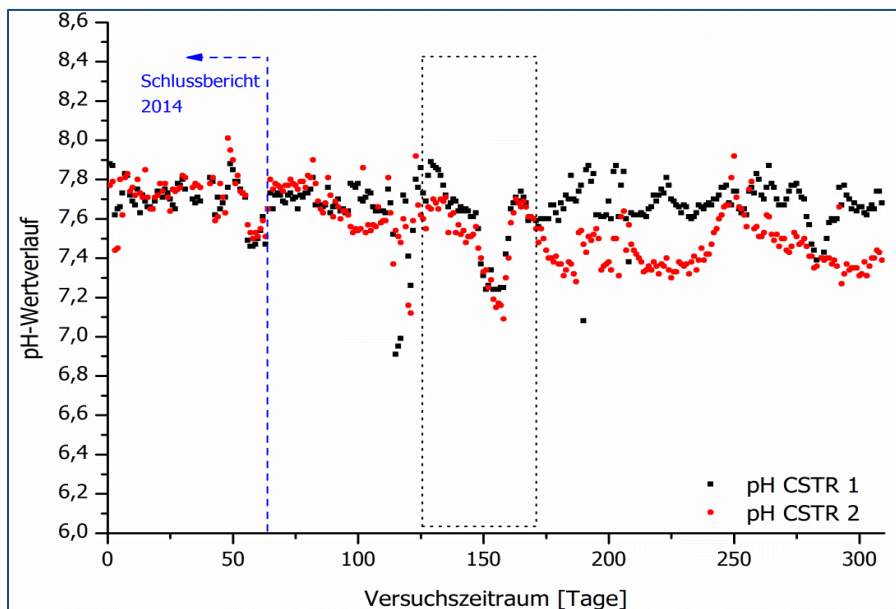


Abb. II.1.3.1-5: Darstellung der pH-Wert-Änderungen vor und nach der Einfahrphase (blau gestrichelte Linie) für die CST-Reaktoren 1 und 2.

Trotz der Steigerung der metabolischen und biochemischen Prozessabläufe ist im gesamten Versuchszeitraum keine signifikant höhere NH_4 -Konzentration im hyperthermophilen Versuchsansatz (CSTR 2) im Vergleich zum thermophilen Ansatz (CSTR 1) zu erkennen (**Abb. II.1.3.1-6**).

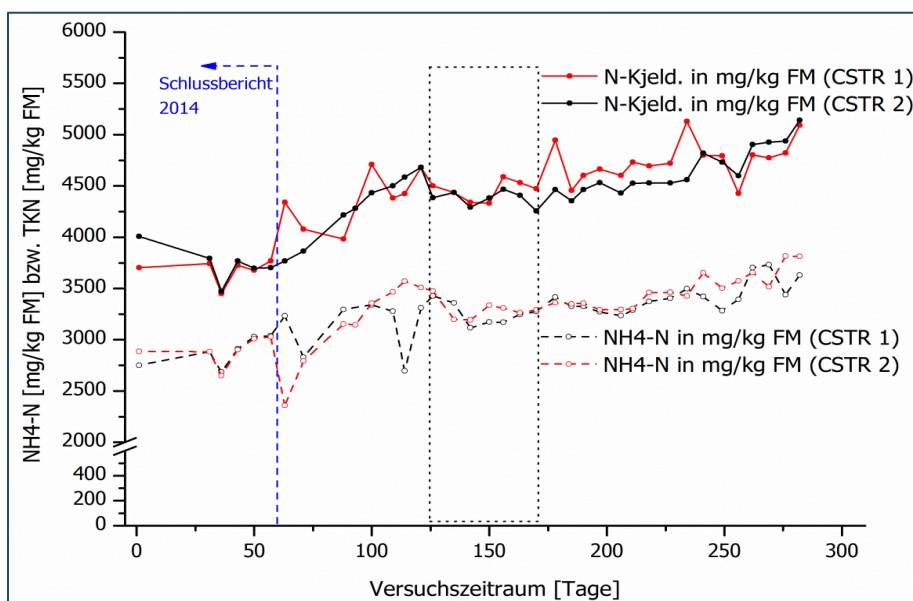


Abb. II.1.3.1-6: Darstellung der Konzentrationsveränderungen von NH_4 -N und Kjeldahl-Stickstoff vor und nach der Einfahrphase (blau gestrichelte Linie) für die CST-Reaktoren 1 und 2.

Die Konzentration an Ammonium-Stickstoff betrug am Tag 125 im CSTR1 3313 mg L⁻¹, im CSTR2 3510 mg L⁻¹. Nach Angelidaki et al. (1994) und Koster et al. (1984) können diese genannten Konzentrationen bereits zu einer Hemmung in der fermentativen Prozesskette führen und damit ursächlich für das Absinken der Biogasbildungsrate sein. Nach Veränderung der Befütterungsstrategie und erneuter stufenweise Erhöhung der Raumbelastung, konnten gegenwärtig NH₄-N-Konzentrationen von 3630 mg L⁻¹ im thermophilen Fermenter (CSTR 1) und 3812 mg L⁻¹ im hyperthermophilen Versuchsansatz ermittelt werden. Die nahezu konstant höheren Konzentrationen des hauptsächlich in Harnstoff- und Harnsäure organisch eingebundenen und ungelösten reduzierten Stickstoffs weisen darauf hin, dass die Verfahrensweise ca. 70 % des gesamten Stickstoffs freisetzt. Zur Kultivierung von spezialisierten, stickstoffverwertenden Mikroorganismen sollte die Freisetzung von prozessinhibierendem Stickstoff erhöht werden, um einen effektiven Adaptionsprozess der Mikroorganismen an hohen Stickstoffkonzentrationen herbeizuführen. Diese wurde durch Erhöhung der HTK-Zugabemenge erzielt.

Im Rahmen weiterführender Untersuchungen zur Langzeitanreicherung von stickstofftoleranten Mikroorganismengemeinschaften wurde eine gleichbleibende Biogasbildungsrate festgestellt. Die Methankonzentrationen insbesondere im hyperthermophilen Betrieb verblieben meist unterhalb der für die energetische Nutzung relevanten 40 % (**Abb. II.1.3.1-7**).

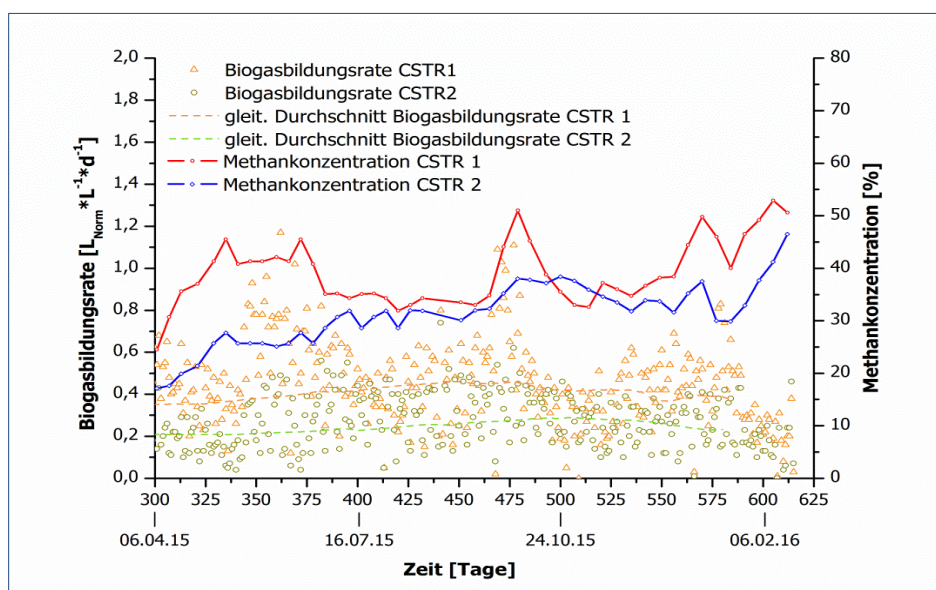


Abb. II.1.3.1-7: Biogasbildungsrate sowie der daraus kalkulierte durchschnittlichen Verlauf und Methankonzentration der thermophilen (CSTR 1) und hyperthermophilen (CSTR 2) Rührkesselreaktoren.

Jedoch konnte ab Oktober 2015 eine anhaltende, leichte Abnahme der Biogasbildungsrate festgestellt werden. Diese Abnahme wurde vermutlich durch eine zunehmende NH₄-N Konzentration ausgelöst, welche bereits im Juli 2015 einen Wert von ca. 5.480 mg kg⁻¹ FM erreichte (Kjeldahl-Stickstoff (TKN) ca. 7211 mg kg⁻¹) (**Abb. II.1.3.1-8**). Bedingt durch die Zunahme der Ammoniumkonzentration fand eine Erhöhung des zytotoxischen NH₃ statt, welches einen hemmenden/ störenden Einfluss auf die mikrobielle Biozönose ausübte.

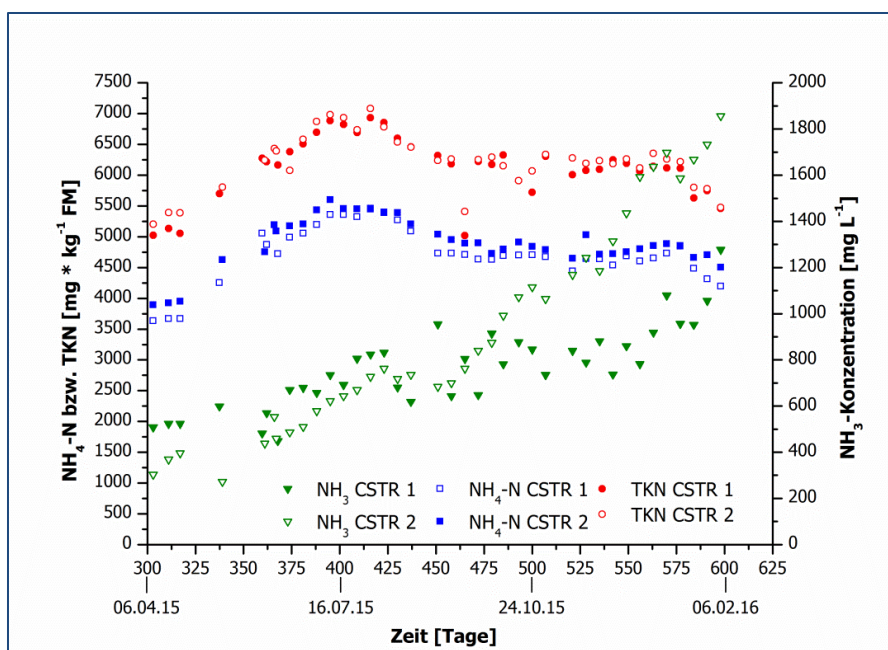


Abb. II.1.3.1-8: Verlauf der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration und der daraus kalkulierten NH_3 -Konzentration sowie TKN der thermophilen (CSTR 1) und hyperthermophilen (CSTR 2) Rührkesselreaktoren.

Dies führte zu einer gehemmten Biogasproduktion und aufgrund dessen zu einer Anreicherung organischer Säuren (**Abb. II.1.3.1-9**). Dabei resultierte die Anreicherung des NH_4/NH_3 im Reaktor und dessen Pufferkapazität in einer stetigen Zunahme des pH-Wertes sowohl im thermophilen als auch im hyperthermophilen Rührkesselsystem.

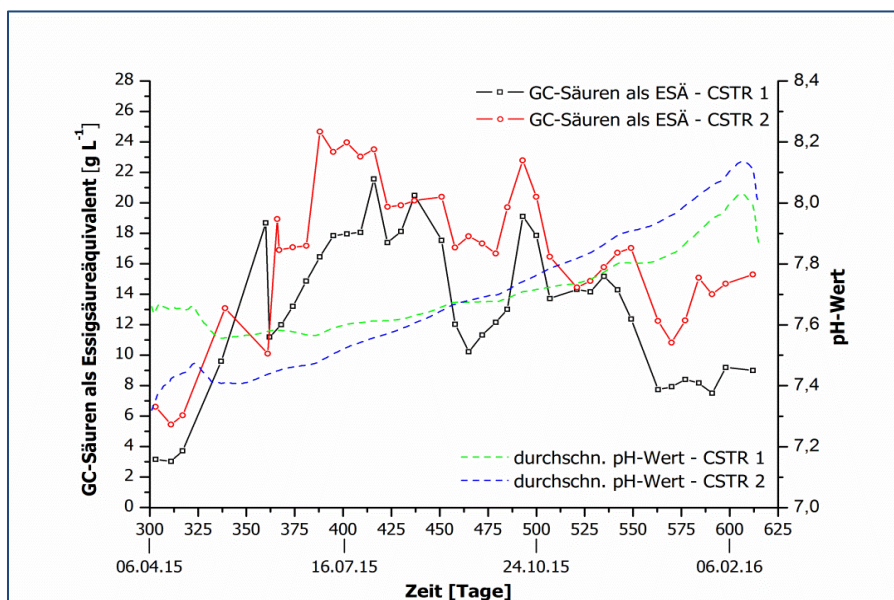


Abb. II.1.3.1-9: Verlauf der GC-Säuren als Essigsäureäquivalent und des kalkulierten durchschnittlichen pH-Wertes der thermophilen (CSTR 1) und hyperthermophilen (CSTR 2) Rührkesselreaktoren.

Aufgrund der festgestellten deutlichen Hemmung des Biogasprozesses wurde erneut ein Aussetzen der Befütterung mit Hühnertrockenkot festgelegt, gefolgt von einer Zugabe von mikrokristalliner Cellulose (5 g d^{-1} je Fermenter) als Kohlenstoffquelle zur Stabilisierung der am Biogasbildungsprozess beteiligten Mikroorganismen. Nach erfolgreicher Stabilisierung der Biogasproduktion wurde die Stei-

gerung Raumbelastung der CST-Reaktoren fortgeführt. In **Abb. II.1.3.1-10** sind die pH-Wertverläufe der CST-Reaktoren 1 und 2 fortführend dargestellt.

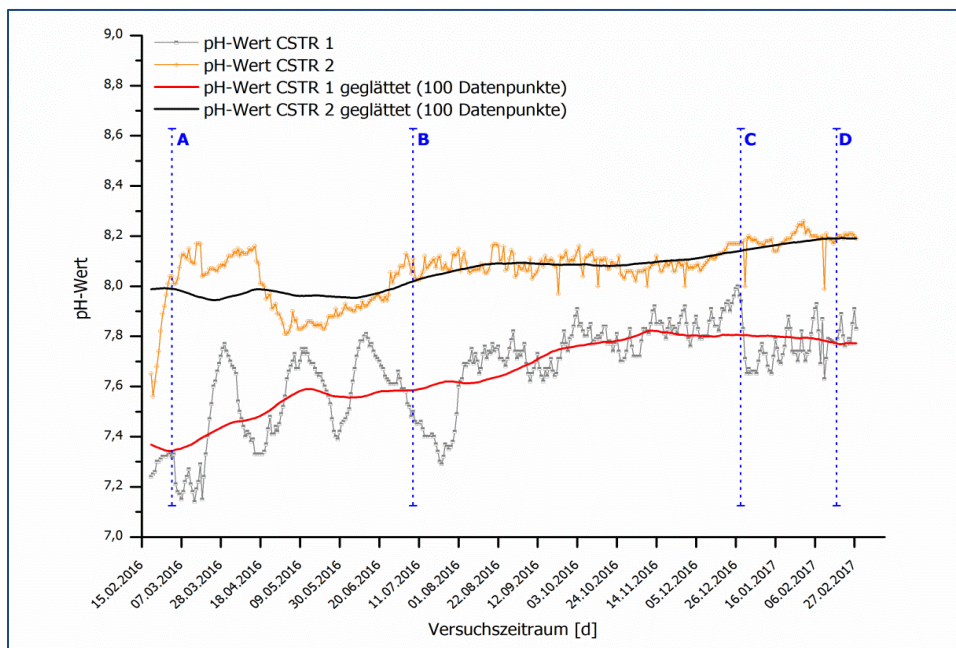


Abb. II.1.3.1-10: Veränderung des pH-Wertes im Zeitraum vom 15.02.2016 bis 28.02.2017 unter thermophilen (CSTR 1) und hyperthermophilen (CSTR 2) Bedingungen unter Darstellung der originären als auch interpolierten Daten (100 Datenpunkte).

- (A) Reduzierung der Fütterung aufgrund einer anhaltenden Prozessstörung im Januar 2016
- (B) Wiedereinsetzen der regulären Fütterung
- (C) Erhöhung der Raumbelastung $B_R = 3 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$,
- (D) Erhöhung der Raumbelastung auf $B_R = 4 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Anhand der eingefügten Trendlinien der pH-Wertverläufe ist ein steter, jedoch nur geringfügiger Anstieg des pH-Wertes, sowohl unter thermophilen als auch hyperthermophilen Prozessbedingungen zu erkennen. Die geringe Ausprägung der Veränderungen des pH-Wertes war dabei der Wirkung des Carbonat- als auch des $\text{NH}_4^-/\text{NH}_3$ -Puffers geschuldet. Dennoch ist zu bemerken, dass der gemessene pH-Wert weiterhin über dem für die anaerobe Vergärung optimalen Bereich von 6,8 bis 7,5 lag (FNR, 2013). Eine Erhöhung der Raumbelastung auf $B_R = 3 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und $B_R = 4 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Markierung C bzw. D) resultierte unter hyperthermophilen Prozessbedingungen in einem unverändertem pH-Wert von 8,2 (Stand 28.02.2017). Unter thermophilen Bedingungen hingegen war ein leichtes Absinken des pH-Wertes erkennbar. Diese Prozessreaktion als Antwort auf eine Erhöhung der Raumbelastung kann, trotz des bestehenden hohen Carbonat- und $\text{NH}_4^-/\text{NH}_3$ -Puffers, als eine noch vorhandene prozessbiologische Kapazität zur Steigerung der Leistungsfähigkeit interpretiert werden. Diese Annahme wird durch die Veränderung der nachfolgend dargestellten Prozessparameter in den Abb. II.1.3.1-11 bis -15 bestätigt.

In Übereinstimmung mit den Überlegungen zur Veränderung des pH-Wertes und zur prozessbiologischen Kapazität des thermophilen Versuchsansatzes, wurde in **Abb. II.1.3.1-11** der Verlauf der Biogasbildungsrate dargestellt. Eine Erhöhung der Raumbelastung von $B_R = 2,5 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf $B_R = 3 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ sowie $B_R = 4 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Zeitpunkt C bzw. D) bedingte unter thermophilen Temperaturbedingungen einen leichten Anstieg der Biogasbildungsrate von $0,43 \text{ L}_{\text{Norm}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf ca. $0,55 \text{ L}_{\text{Norm}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Dem gegenüber führte die Erhöhung der Raumbelastung unter hyperthermophilen Prozessbedingungen zu einem weiterhin anhaltenden Absinken der Biogasbildungsrate von $0,14 \text{ L}_{\text{Norm}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf $0,12 \text{ L}_{\text{Norm}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

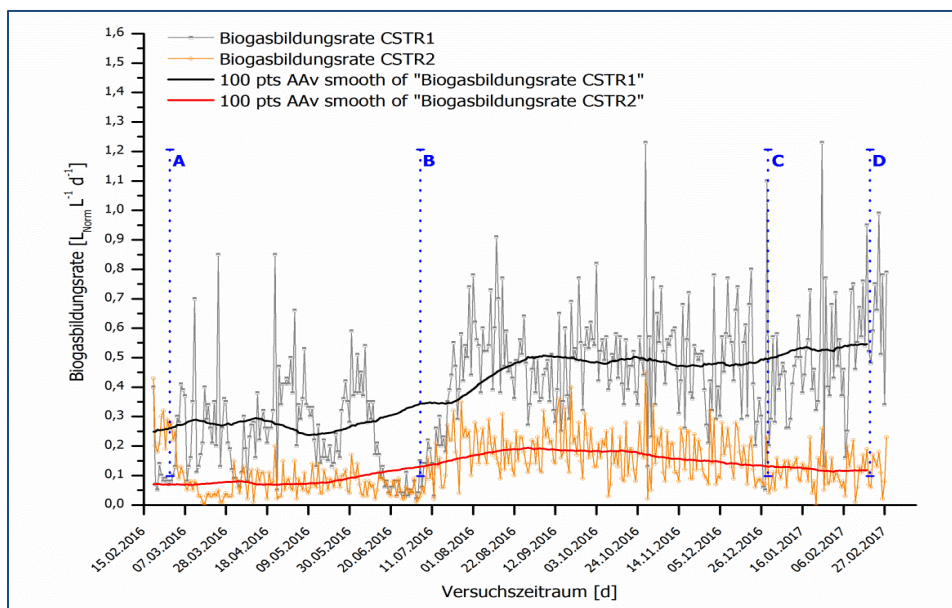


Abb. II-1-3-1-11: Veränderung der Biogasbildungsrate im Zeitraum vom 15.02.2016 bis 28.02.2017 unter thermophilen (CSTR 1) und hyperthermophilen (CSTR 2) Bedingungen unter Darstellung der originalen als auch interpolierten Daten (100 Datenpunkte).

(A) Reduzierung der Fütterung aufgrund einer anhaltenden Prozessstörung im Januar 2016

(B) Wiedereinsetzen der regulären Fütterung

(C) Erhöhung der Raumbelastung $B_R = 3 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

(D) Erhöhung der Raumbelastung auf $B_R = 4 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Dennoch ist mit Blick auf den dargestellten Verlauf der Biogasausbeute (**Abb. II.1.3.1-12**) festzustellen, dass sowohl im thermophilen als auch im hyperthermophilen Versuchsansatz die berechnete, tägliche Biogasausbeute [$\text{L}_{\text{Norm}} \text{ g}^{-1} \text{ oTS}$] unterhalb des Referenzwertes von Hühnertrockenkot HTK – Ref 1 (Reinhold, 2005) und Rindergülle RG – Ref 2 (FNR, 2013) verbleibt. Dieses Ergebnis lässt auf eine Hemmung in beiden Versuchsansätzen schließen, welches in einer, gegenüber den Referenzwerten verringerten Biogasausbeute resultierte. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die dargestellten Referenzwerte für Hühnertrockenkot (HTK Ref. 1) bei einer unbekanntem Raumbelastung und einem unbekanntem, prozentualen Anteil am Gesamtsubstrat, für Rindergülle (RG Ref. 2) für eine Raumbelastung von $B_R = 3 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und 100 % Rindergülle erhoben wurden. Folglich ist eine direkte Korrelation der Daten nur bedingt möglich. Hinsichtlich der erkennbaren, leichten Abnahme der Biogasbildungsrate im Zeitraum von A zu B ist festzustellen, dass dies aus der verminderten Fütterung mit Hühnertrockenkot und der Zuführung von mikrokristalliner Zellulose (jeweils 1x wöchentlich, Montag) als Kohlenstoffquelle resultierte. Diese Strategie wurde einerseits zur Vermeidung einer weiteren Stickstoffanreicherung und andererseits zur Erhöhung des C:N-Verhältnisses im Fermenter und damit zur Stabilisierung der Prozessbiologie gewählt. Ferner ist im Zeitraum vom 16.06.2016 bis 11.07.2016 ein Einbruch der Biogasbildungsrate erkennbar, welcher ausschließlich den thermophilen Versuchsansatz betraf. Im hyperthermophilen Versuch war ein derartiges Absinken nicht feststellbar.

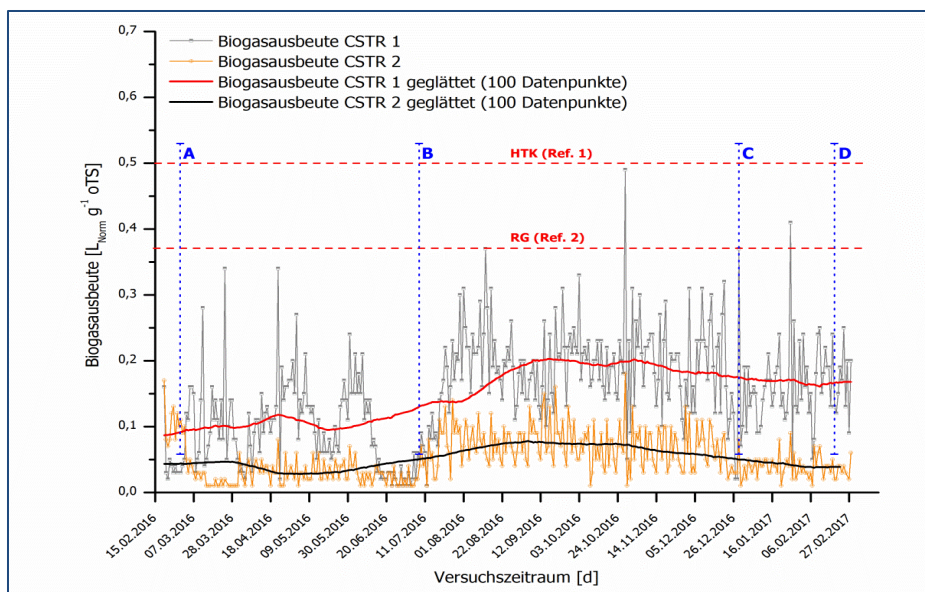


Abb. II.1.3.1-12: Veränderung der Biogasausbeute im Zeitraum vom 15.02.2016 bis 28.02.2017 unter thermophilen (CSTR 1) und hyperthermophilen (CSTR 2) Bedingungen unter Darstellung der originären als auch interpolierten Daten (100 Datenpunkte).
 HTK (Ref. 1) Hühnertrockenkot; RG (Ref. 2) 100 % Rindergülle
(A) Reduzierung der Fütterung aufgrund einer anhaltenden Prozessstörung im Januar 2016
(B) Wiedereinsetzen der regulären Fütterung
(C) Erhöhung der Raumbelastung $B_R = 3 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$,
(D) Erhöhung der Raumbelastung auf $B_R = 4 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Diese Prozessstörung war auch im Verlauf der Methankonzentration sichtbar (**Abb. II.1.3.1-13**).

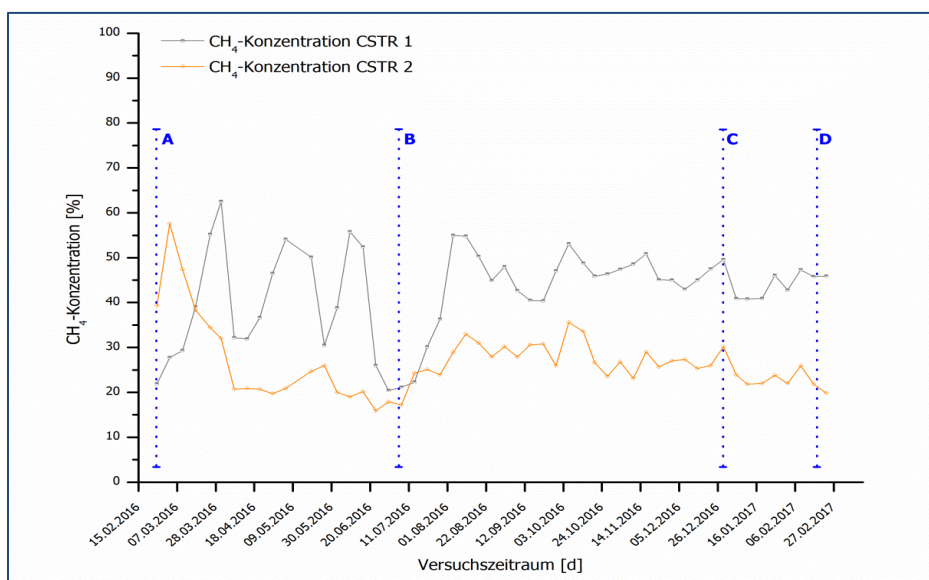


Abb. II.1.3.1-13: Veränderung der Methankonzentration im Zeitraum vom 15.02.2016 bis 28.02.2017 unter thermophilen (CSTR 1) und hyperthermophilen (CSTR 2) Bedingungen.
(A) Reduzierung der Fütterung aufgrund einer anhaltenden Prozessstörung im Januar 2016
(B) Wiedereinsetzen der regulären Fütterung
(C) Erhöhung der Raumbelastung $B_R = 3 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$,
(D) Erhöhung der Raumbelastung auf $B_R = 4 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Wie deutlich wird, fand ein Absinken der CH_4 -Konzentration des thermophilen Versuchsansatzes von 54,1 % CH_4 auf 23,2 % CH_4 statt. Ursache für die hohen Fluktuationen der Biogasbildungsrate im thermophilen Versuchsansatz kann aus der veränderten Befütterung resultieren und damit die Folge einer Störung, der an eine ausschließliche Monofermentation mit Hühner trockenkot adaptierten Prozessbiozönose. Ferner ist beim Vergleich des thermophilen und hyperthermophilen Versuchsansatzes eine Differenz der Methankonzentration von ca. 20 % festzustellen. Insbesondere im thermophilen Versuch findet ein „Einpegeln“ der Methankonzentration auf ca. 45 % statt, wohingegen sie im hyperthermophilen Versuchsansatz stetig absinkt und im Mittel bei 22 % verbleibt.

Eine kontinuierliche Beschickung des thermophilen und hyperthermophilen Fermenters führte im Zeitraum zwischen B zu C zu einer fluktuierenden Entwicklung der Essigsäurekonzentration als auch der Essigsäureäquivalenten (**Abb. II.1.3.1-14**).

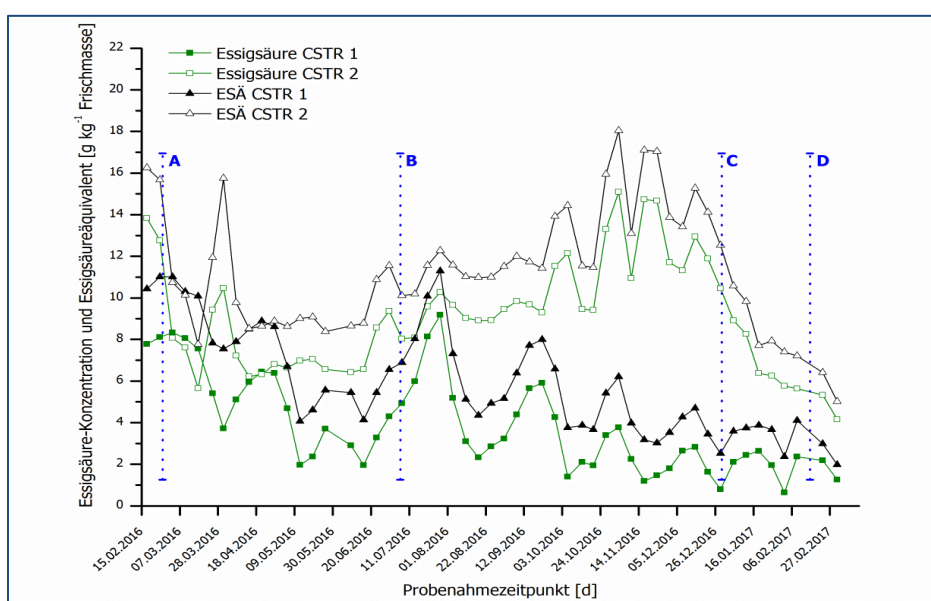


Abb. II.1.3.1-14: Veränderung der Essigsäurekonzentration und des Essigsäureäquivalenten (ESÄ) im Zeitraum vom 15.02.2016 bis 28.02.2017 unter thermophilen (CSTR 1) und hyperthermophilen (CSTR 2) Bedingungen.

- (A) Reduzierung der Fütterung aufgrund einer anhaltenden Prozessstörung im Januar 2016,
- (B) Wiedereinsetzen der regulären Fütterung,
- (C) Erhöhung der Raumbelastung $B_R = 3 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$,
- (D) Erhöhung der Raumbelastung auf $B_R = 4 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Als Reaktion auf die prozessbiologische Störung im Januar 2015 erfolgte die verminderte Fütterung und kurzfristige Substitution durch mikrokristalline Zellulose (Zeitpunkt A). Aufgrund dessen ist eine Abnahme der Konzentration an Essigsäure bzw. der ESÄ zu erkennen. Mit Wiedereinsetzen der regulären Befütterung (ab Zeitpunkt B) erfolgte eine Anreicherung des ESÄ und der Essigsäurekonzentration im hyperthermophilen Versuchsansatz mit einem Maximum von 18,04 g L^{-1} bzw. 15,09 g L^{-1} . Die Konzentration der Essigsäure lag somit über dem für eine stabile Prozessbiologie annehmbaren Niveau von 3 bis 4 g L^{-1} (FNR, 2013). Dem gegenüber ist unter thermophilen Prozessbedingungen nach einem kurzfristigen Anstieg des Essigsäureäquivalenten und der Essigsäurekonzentration eine stete Abnahme festzustellen. Folglich kann im Fall des hyperthermophilen Versuchsansatzes erneut auf eine prozessbiologische Hemmung, bezüglich des thermophilen Versuches auf eine funktionierende mikrobiologische Biozönose, aufgrund des fehlenden bzw. des feststellbaren Abbaus organischer

Säuren geschlossen werden. Mit Erhöhung der Raumbelastung auf $B_R = 3 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und $B_R = 4 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Markierung C bzw. D) ist im hyperthermophilen Versuchsansatz ein rapides Absinken der Essigsäurekonzentration und des Essigsäureäquivalenten festzustellen. Diese Reaktion spiegelt zum einen die genannte Hemmung der Prozessbiozönose und folglich die fehlende Bildung organischer Säuren aus dem Eingangssubstrat wieder. Zum anderen kann dies als Reaktion auf eine vermehrte Ausschleusung der vorhandenen Säuren aus dem Reaktionsraum zurückgeführt werden.

Die Steigerung der Ammonium-Konzentration im Reaktionsraum, welche eine zunehmende Hemmung im Abbau organischer Säuren und damit eine Minderung der Leistungsfähigkeit des Fermentationsprozesses bedingt, ist in **Abb. II.1.3.1-15** dargestellt. Sowohl im thermophilen als auch im hyperthermophilen Versuchsansatz war eine nahezu gleichbleibende Konzentration an $\text{NH}_4\text{-N}$ (CSTR 1 und CSTR 2, mit im Durchschnitt 4.015 mg L^{-1} bzw. $4.179 \text{ mg L}^{-1} \text{NH}_4\text{-N}$) erkennbar.

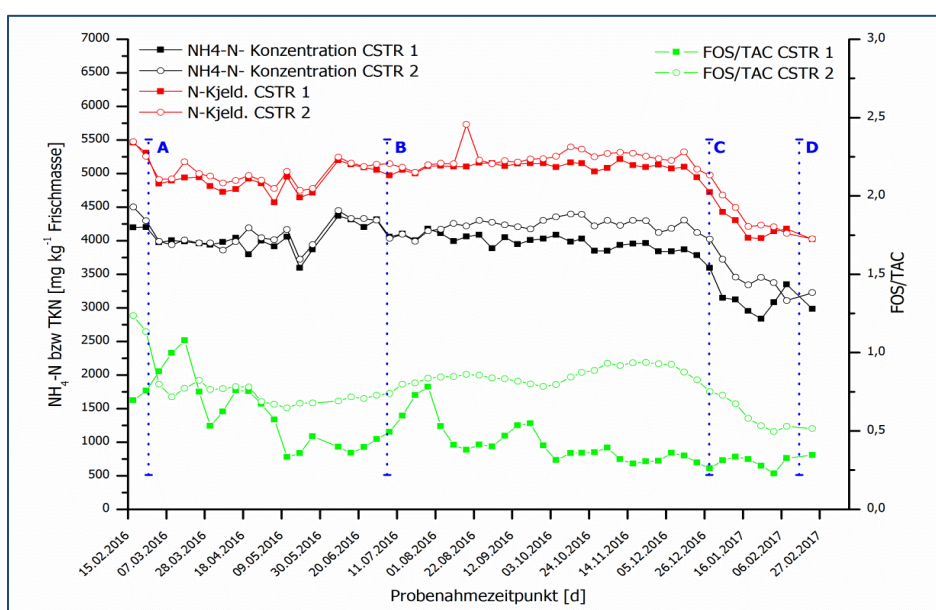


Abb. II.1.3.1-15: Veränderung des FOS/TAC als auch der Konzentrationen an $\text{NH}_4\text{-N}$ und Kjeldahl-Stickstoff (N-Kjeld.) im Zeitraum vom 15.02.2016 bis 28.02.2017 unter thermophilen (CSTR 1) und hyperthermophilen (CSTR 2) Bedingungen.

(A) Reduzierung der Fütterung aufgrund einer anhaltenden Prozessstörung im Januar 2016

(B) Wiedereinsetzen der regulären Fütterung

(C) Erhöhung der Raumbelastung $B_R = 3 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

(D) Erhöhung der Raumbelastung auf $B_R = 4 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Dennoch war im Zeitraum zwischen den Markierungen A und B eine leichte Abnahme und entsprechende Fluktuation der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration als Folge einer Veränderung des Befütterungsregimes erkennbar. Im folgenden Zeitraum (Markierung B zu C) fand eine Stabilisierung der Konzentrationen an $\text{NH}_4\text{-N}$ und Kjeldahl-Stickstoff statt. Deutlich wurde dabei die leichte Varianz der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentrationen im thermophilen gegenüber denen des hyperthermophilen Versuchsansatzes. Dies kann als Reaktion auf die temperaturbedingte, unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit interpretiert werden. Im anschließenden Zeitraum (Markierung C zu D) ist eine Abnahme der Konzentrationen des $\text{NH}_4\text{-N}$ als auch des Kjeldahl-Stickstoffs festzustellen. Diese Abnahme ist wiederum die Folge der Erhöhung der Raumbelastung bei Konstanz der Verweilzeit und unter der nachweislichen Hemmung der Prozessbiozönose. Hinsichtlich des in **Abb. II.1.3.1-15** dargestellten Verlaufs des Parame-

ters FOS/TAC, ist eine Übereinstimmung mit dem Verlauf der ESÄ feststellbar. Während der FOS/TAC im thermophilen Versuchsansatz (CSTR 1) stufenweise abnimmt, ist im hyperthermophilen Versuchsansatz ein Anstieg des Parameters aufgrund einer Anreicherung der organischen Säuren und Hemmung der diese abbauenden Prozessbiozönose erkennbar. Dennoch ist die Erhöhung des FOS/TAC im hyperthermophilen Versuch weniger intensiv ausgeprägt, als der Verlauf des Essigsäureäquivalenten im CSTR 2, was auf die Erfassung der Pufferwirkung durch den Parameter FOS/TAC zurückzuführen ist.

Seit dem 28.02.2017 erfolgte keine Fortführung der Befütterung, jedoch eine Erfassung der Versuchsparameter bis zum 31.03.2017 im Rahmen der Ausgasungsphase (nicht dargestellt).

Fazit

Zusammenfassend ist anhand der dargestellten Untersuchungsergebnisse festzustellen, dass eine langfristige Monofermentation von prozesskritischem Hühnertrockenkot unter *thermophilen* Bedingungen, mit Blick auf den Parameter der Methankonzentration (im Durchschnitt 45 %), als möglich eingestuft werden kann. Ferner ist festzustellen, dass nach einer gegebenen Adaptionsphase an die als prozesskritisch einzustufenden, hohen Ammoniumkonzentrationen mit ca. $4,02 \text{ g L}^{-1}$, eine Erhöhung der Raumbelastung im thermophilen Versuchsansatz, mit einer Steigerung der Leistungsparameter (Methankonzentration, Biogasbildungsrate, Abbau organischer Säuren) entsprochen wird. Diese Reaktion kann als noch verfügbare Kapazität zur Leistungssteigerung unter thermophilen Bedingungen betrachtet werden.

Dem gegenüber ist eine Monovergärung von Hühnertrockenkot unter *hyperthermophilen* Bedingungen, aufgrund der im Vergleich zum thermophilen Betrieb verstärkten Bildung von toxischem Ammoniak, als prozessbiologisch nicht zielführend einzustufen. Bei einer Methankonzentration von 22 %, welche als Schwachgas nicht verwertet werden kann, und einer Biogasbildungsrate von $0,14 \text{ L}_{\text{Norm}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bis $0,12 \text{ L}_{\text{Norm}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, kann die hyperthermophile Fermentation von Hühnerkot als ökonomisch nicht rentabel betrachtet werden. Ungeachtet dessen kann die Verwendung von Hühnertrockenkot auch unter hyperthermophilen Bedingungen, in Verbindung mit einem stickstoffarmen Co-Substrat zu einer praktikablen Fermentation mit Methankonzentrationen von über 40 % führen. Der Verwendung des Reaktorinhaltes als an hohe Stickstoffkonzentrationen angepasstes Inokulum für entsprechende Praxisanlagen kann insbesondere unter thermophilen Prozessbedingungen und unter Verwendung eines kohlenstoffreichen Co-Substrates entsprochen werden.

II.1.3.2 Mikrobiologische Charakterisierung des CSTR

Die CST-Reaktoren wurden thermophil (55°C) und hyperthermophil (65°C) betrieben und mit Hühnertrockenkot HTK, welcher mit Wasser versetzt wurde, befüttert. Die unter diesen Bedingungen langzeit-angereicherte Gemeinschaft aus ammoniumtoleranten Prokaryoten wurde intensiv mikrobiologisch charakterisiert. Dies erfolgte mithilfe der Mikroskopie sowie den molekularbiologischen Methoden der quantitativer Realtime PCR (qPCR) und der Erstellung von Klonbibliotheken. Die Klonbibliotheken lieferten detaillierte Informationen zur Zusammensetzung der Bakterien- und Archaeengemeinschaft zu einem ausgewählten Zeitpunkt. Die qPCR diente dazu, ergänzend die zeitli-

che Vorlaufphase zu untersuchen. In **Abb. II.1.3.2-1** wurden die Untersuchungstermine über den Verlauf der Biogasbildungsrate aufgetragen. Während dieses Zeitraumes vom 01.01.2015 bis zum 30.08.2015 erfolgte zudem ein Chargenwechsel des als Substrat verwendeten HTK, der sich unter anderem auf die Biogasbildungsrate auswirkte. Damit wurde gezeigt, dass verschiedene HTK-Chargen sich hinsichtlich ihrer biologischen Verwertbarkeit qualitativ unterscheiden können.

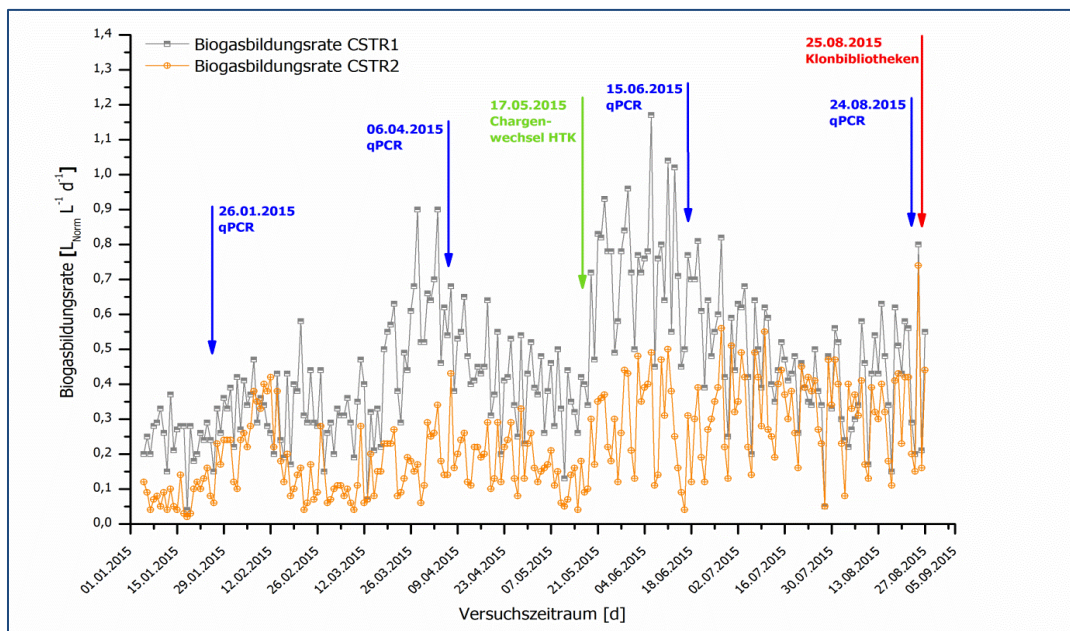


Abb. II.1.3.2-1 Daten der qPCR-Untersuchungen im zeitlichen Vorlauf der erstellten Klonbibliotheken.

Mikroskopie

Es wurde die, auf den in Methanogenen vorkommenden Enzym-Co-Faktor F420 zurückgehende, Autofluoreszenz genutzt (Cheeseman et al., 1972) um am Epifluoreszenzmikroskop die Methanogenengemeinschaftszusammensetzung anhand von unterscheidbaren Morphotypen zu untersuchen. Im mikroskopischen Bild (**Abb. II.1.3.2-2**) zeigte sich eine, beispielsweise im Vergleich zu den Untersuchungen in den Schwimmbettfermenter eingeschränkte morphologische Diversität der autofluoreszierenden Zellen. Ein Morphotyp von langen Stäbchen, die nur eine sehr schwache Autofluoreszenz zeigten, war in beiden CSTR überwiegend vertreten. Morphologisch entspricht dieser stäbchenförmigen Methanogenen wie *Methanobacterium* und *Methanothermobacter* (Wasserfallen et al., 2000; Ma et al., 2005; Cheng et al., 2011). Diese langen Stäbchen konnten nur mit geringem Kontrast in dem durch Autofluoreszenz abgestrahlten blaugrünen Licht fotografiert werden, was durch das schwache Licht-Signal sowie die Einbettung der Zellen in streuende Substratpartikel erklärt werden konnte. In geringem Anteil kamen zudem einzelne, unregelmäßig kokkenförmige, autofluoreszierende Zellen vor, die im Vergleich zu den genannten stäbchenförmigen Zellen viel stärker leuchteten und der beschriebenen Morphologie von *Methanoculleus* entsprachen (Zeelner et al., 1998; Dianou et al., 2001).

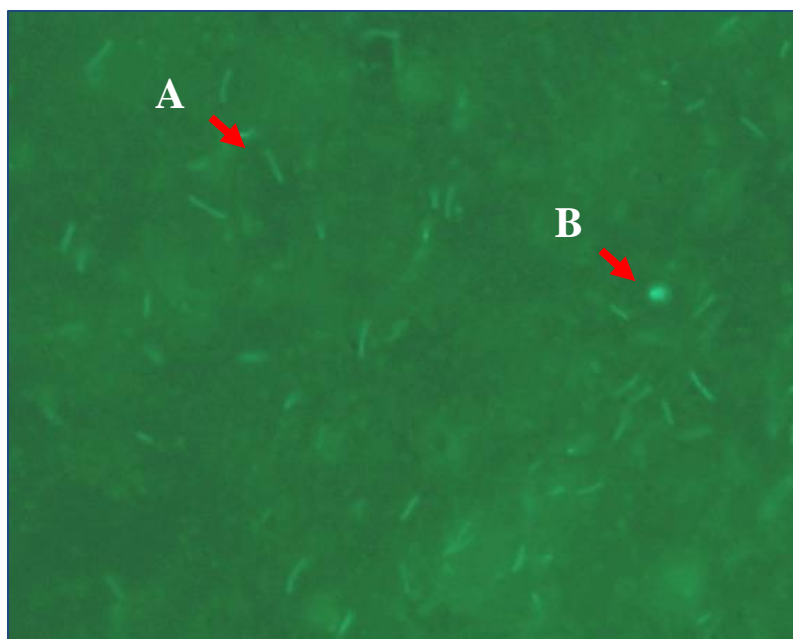


Abb. II.1.3.2-2 Autofluoreszenzaufnahme einer Probe aus dem CSTR 1. **A:** schwach leuchtende stäbchenförmige Zellen, **B:** vereinzelte kokkenförmige stärker leuchtende Zellen

Die erstellten Klonbibliotheken von Bakterien sowie Archaeen ermöglichten die Erfassung der prokaryotischen Gemeinschaft zum gewählten Probenahmezeitpunkt 28.08.2015. Die Ergebnisse sind in **Tab. II.1.3.2-1** und in **Abb. II.1.3.2-3** zusammengefasst.

Tab. II.1.3.2-1 Phylogenetische Einordnung (RDP Classifier) der erhaltenen Klonsequenzen für Bacteria und Archaea.

Taxa	CSTR 1 (55°C)		CSTR 2 (65°C)	
	Anzahl	Anteil [%]	Anzahl	Anteil [%]
Bacteria, Phylum				
<i>Firmicutes</i>	39	42	28	36
<i>Bacteroidetes</i>	8	9	11 (davon 6*)	14
<i>Proteobacteria</i>	10	11	6	8
<i>Atribacteria</i>	1	1	2	3
<i>Thermotogae</i>	15	16	7	9
<i>Tenericutes</i>	10 (alle *)	11	9 (davon 7*)	12
<i>Actinobacteria</i>	-	-	3	4
nicht klassifiziert	10	11	11	14
Summe	93		77	
	* 60% Kriterium		* 60% Kriterium	
Archaea, Gattung				
<i>Methanothermobacter</i>	82	85	82	86
<i>Methanobrevibacter</i>	1	1	1	1
<i>Methanoculleus</i>	7	7	8	8
<i>Methanomassiliicoccus</i>	3	3	3	3
<i>Methanocorpusculum</i>	-	-	1	1
nicht klassifiziert	3	3		
Summe	96		95	

Die Klonbibliotheken sowohl der Bacteria als auch Archaea zeigten, dass sich in beiden Reaktorsystemen grundsätzlich ähnliche mikrobiologische Gemeinschaften etabliert haben. Dies war nicht unbedingt zu erwarten, da sich CSTR 1 und 2 in der Temperatur erheblich unterschieden, was insbesondere in Bezug auf die Ammoniak-Toxizität einen erhöhten Stress im hyperthermophilen im Vergleich

zum thermophilen Versuchsansatz zur Folge hatte. Jedoch waren die detektierten Hauptgruppen im Wesentlichen gleich.

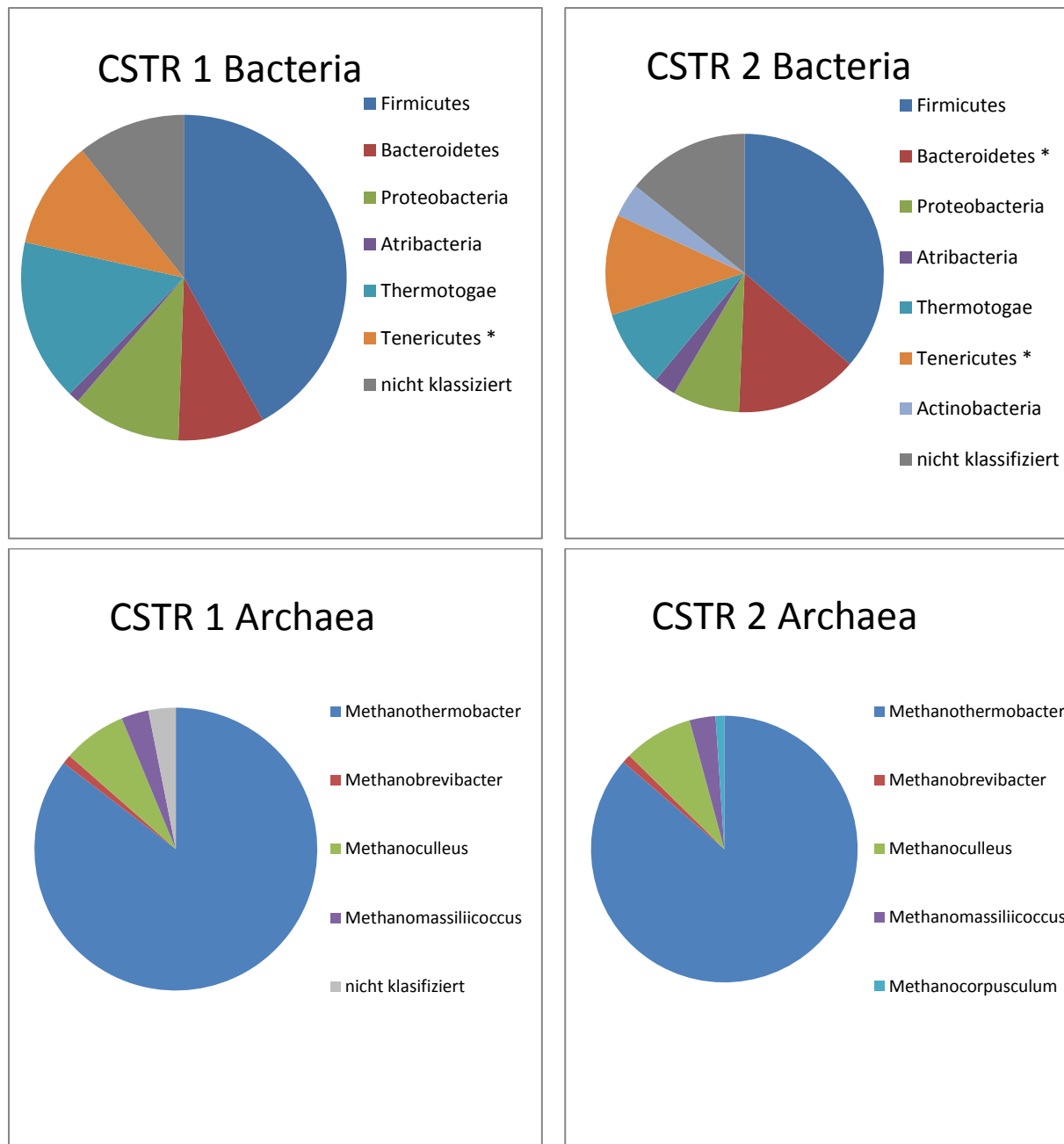


Abb. II.1.3.2-3 Verteilungsdarstellung der Klonsequenzen aus Tab. II.1.3.2-1 für die Bacteria- und Archaea-Gemeinschaften der CST-Reaktoren

Methanogene Archaeen

Die Zusammensetzung der Archaeen-Klonbibliotheken zeigte, dass Vertreter der Gattung *Methanothermobacter* deutlich dominierten. Diese Gattung wurde durch eine Neuuntersuchung dezidiert thermophiler Arten, die vorher *Methanobacterium* zugeordnet waren, aufgestellt (Wasserfallen et al., 2000; Cheng et al., 2011). Ihr dominantes Vorkommen in den hier untersuchten CSTR zeigte, dass die betreffenden Vertreter offenbar gegenüber Ammoniakstress vergleichsweise robust sind und auch an die sonstigen physikochemischen Bedingungen in den mit HTK betriebenen Reaktoren

angepasst waren. Begleitend kamen *Methanoculleus*, *Methanomassilicoccus* und *Methanobrevibacter* vor. Zwar waren die gefundenen Methanogenen offensichtlich in der Lage unter den Bedingungen in den CSTR zu existieren, jedoch war die Menge des gebildeten Biogases gering, sodass davon ausgegangen werden musste, dass das Substrat nur unzureichend in Biogas umgesetzt werden konnte. Die Ergebnisse der Klonbibliotheken entsprachen somit dem Eindruck der bei der mikroskopischen Untersuchung gewonnen wurde. Hier waren neben den dominant vorkommenden langen Stäbchen, die als *Methanothermobacter* identifiziert wurden, auch kokkoide, autofluoreszierende Zellen vertreten, die wahrscheinlich *Methanoculleus* darstellten.

Im Vergleich zu den anderen im hier beschriebenen Projekt betriebenen Reaktorsystemen fällt auf, dass die Gattungen *Methanothermobacter* und *Methanoculleus* auch sonst dominante Bestandteile der Archaeengemeinschaften bei hohen Stickstoffgehalten und thermophiler bzw. hyperthermophiler Betriebsweise waren. *Methanoculleus* kam in Schwimmbettfermentern und Leachbedfermentern regelmäßig vor, *Methanothermobacter* jedoch insbesondere im untersuchten Versuch V der LBF als dominante Gruppe. Deshalb kann vermutet werden, dass diese Art in mit Hühnertrockenkot betriebenen Reaktoren besonders konkurrenzstark ist. Allerdings kommt *Methanothermobacter* auch in den Klonbibliotheken des SBF B (nicht jedoch in SBF A) vor, die mit Luzernesilage betrieben werden.

Bakterien

Die Gemeinschaft der Bacteria war deutlich vielfältiger zusammengesetzt als die der methanogenen Archaea. Neben der größten Gruppe, den Firmicutes, kommen unter anderem die Phyla Bacteroidetes, Proteobacteria, Thermotogae und Tenericutes vor, wobei deren Anteile an der Gesamtpopulation bei beiden Reaktoren leicht unterschiedlich waren.

Wie auch bei den Schwimmbettfermenter-Systemen diskutiert, konnte die Einordnung bei den Archaeen bis zur Gattungsebene erfolgen, wogegen bei den Bakterien aufgrund des weitgehenden Fehlens von nah verwandten Referenzsequenzen bekannter Arten eine Zuordnung nur auf Phylumebene erfolgte. Diese Einteilung wurde insbesondere deshalb gewählt, weil viele der feineren Taxonomieebenen sich nicht eindeutig zuordnen ließen, wenn entsprechende Ähnlichkeitsprozentsschwellen (< 97 % Art; < 95 % Gattung; ~ < 90 % Familie, Phylum 80 %) (Stackebrandt & Goebel, 1994; Yarza et al., 2008) angelegt wurden. Da die vorkommenden Phyla der Bacteria demnach in niedere Taxa beispielsweise in verschiedene Gattungen hätten unterteilt werden können, ist hier die Vielfalt der Bacteria sehr viel größer. Alle Methanogenen gehörten dagegen zum selben Phylum, den Euryarcheota.

Viele an den Biomasse-Abbauwegen beteiligte Bakterien in Biogasanlagen sind bisher kaum bekannt (Rademacher et al., 2012a; Wirth et al., 2012; Theuerl et al., 2015; Maus et al., 2016). Dies zeigte sich auch daran, dass zu vielen Sequenzen in den erstellten Bacteria-Klonbibliotheken keine nah verwandten Sequenzen kultivierter und damit detailliert bekannter Stämme in den Datenbanken hinterlegt waren. Dies war jedoch für die hier gefundenen phylogenetischen Gruppen unterschiedlich. So ließen sich beispielsweise die Gattungen *Staphylococcus* und *Lactobacillus*, die hier in dem Phylum Firmicutes inbegriffen waren, bis zur Gattungsebene einordnen. Eine Gruppe von Sequenzen die in unseren Darstellungen (Abb. II.1.3.2-3) „Tenericutes“ genannt wurden, ließen sich jedoch bei dem gewählten Sequenzähnlichkeits-Schwellenwert von 80 % nicht einmal auf Phylumebene sicher einordnen, so-

dass in diesem Fall der Schwellenwert auf 60 % gesenkt wurde, da diese Sequenzen ansonsten in den nicht klassifizierten Sequenzen „verschwunden“ wären, obwohl sie einen erheblichen und möglicherweise funktionell interessanten Teil der Gemeinschaft darstellten. Die entsprechend mit einem Schwellenwert von 60 % zugeordneten Gruppen sind in den Darstellungen mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Viele der im Biogasprozess aktiven Taxa müssen als bisher unbekannte Arten gelten, deren Rolle in den komplexen anaeroben „Nahrungsketten“ ebenfalls meist noch nicht untersucht wurde. Dieses „Problem“ trat bei den weniger diversen Sequenzen der Methanogenen nicht auf, die sich hier bis auf Gattungsebene einordnen ließen.

Hinter den Firmicutes, die als größte Gruppe erschienen, verbargen sich mehr als zehn verschiedene Gattungen, die allerdings zum großen Teil nicht nach oben genannten Ähnlichkeits-Werten beschriebenen Gattungen zugeordnet werden konnten. Auf Gattungsebene zuordnen ließen sich neben den schon genannten *Staphylococcus* und *Lactobacillus* noch *Tepidimicrobium*, *Tepidanaerobacter* und *Dethiobacter*. Unter den vorkommenden Bacteroidetes-Sequenzen waren ausschließlich Sequenzen vertreten, die vom RDP-Classifer als ähnlich zu der Gattung *Acetomicrobium* angegeben wurden, jedoch war nur eine der Sequenzen mit 97 % Ähnlichkeit belastbar *Acetomicrobium* zuzuordnen, wogegen die übrigen Sequenzen niedrigere Ähnlichkeiten aufwiesen. Die vorkommenden Thermotoga-Sequenzen waren untereinander sehr ähnlich, wie auch in den SBF Klonbibliotheken und stimmten weitgehend mit 100 bzw. 99 % mit dem Typstamm Sulflact1 von *Defluviitoga tunisiensis* überein, was Informationen über ihre Stoffwechsellmöglichkeiten zugänglich macht und eine Einordnung in die Abbauege im Biogasprozess ermöglichte. Die meisten Proteobakterien-Sequenzen ließen sich der Gattung „Ignatzschineria“ zuordnen. Actinobakterien (nur in CSTR 2 nachgewiesen) und Atribacteria waren selten vorkommende Gruppen mit wenigen Sequenzen in den Klonbibliotheken.

Besonders interessant war die Gruppe von Sequenzen die mit etwa 10 % einen erheblichen Anteil an den Klonbibliotheken besaß, aber nicht eindeutig phylogenetisch einzuordnen war. Wie oben besprochen ist sie hier provisorisch als „Tenericutes“ benannt, was jedoch angesichts der geringen Ähnlichkeit von 60 % auf Phylumebene mit Unsicherheit behaftet war. Tenericutes sind pleomorphe, d.h. zur Formänderung befähigte, zellwandlose Bakterien, zu denen beispielsweise die Mycoplasmen gehören, die als Krankheitserreger bedeutsam sind (Brown, 2009). Jedoch ist unklar, ob die in den CSTR nachgewiesenen Sequenzen, bzw. die zugehörigen Zellen hygienisch relevant waren und mit dem Substrat HTK eingetragen wurden, oder ob sie in den Biogasanlagen stoffwechselaktiv sind. Zu bedenken war in diesem Zusammenhang, dass Vertreter der Tenericutes auch in den SBF gefunden wurden. Da diese mit pflanzlichen nachwachsenden Rohstoffen und nicht mit dem möglicherweise mit Krankheitserregern belasteten HTK betrieben wurden ist eine funktionelle Rolle dieser Bakterien in den Biogasanlagen wahrscheinlich.

Da diese Sequenzen einen erheblichen Anteil in den untersuchten CSTR-Proben darstellten, bietet sich hier eine gute Möglichkeit diese für den Biogasprozess potentiell interessante Bakterien-Gruppe weiter zu untersuchen. Dies kann beispielsweise mithilfe spezifischer Primer oder Sonden für Fluoreszenz In Situ Hybridisierung geschehen. Zudem könnte versucht werden mithilfe geeigneter Sequenzierungs-Verfahren das Genom dieser Organismen zu rekonstruieren und damit beispielsweise Informationen zu ihrem Stoffwechsel und damit ihren Einfluss auf den Biogas-Prozess zu gewinnen. Wenn Informationen zum Stoffwechsel dieser Gruppe vorliegen, könnte zudem versucht werden,

diese unbekanntenen Organismen mithilfe angepasster Kultivierungsbedingungen zu isolieren oder zumindest gezielt anzureichern.

Einige Sequenzen in den Bacteria-Klonbibliotheken wurden der Gattung *Staphylococcus* zugeordnet (CSTR1: von 3 von 93 Sequenzen $\sim 3\%$, CSTR2: 5 von 77 Sequenzen $\sim 7\%$). Der Abgleich der Internet-Datenbank Genbank (Benson et al., 2013) zeigte eine nahe Verwandtschaft der Sequenzen zur Art *S. equorum*. Dies wurde durch einen phylogenetischen Vergleich im Programm Bionumerics bestätigt (**Abb. II.1.3.2-4**).

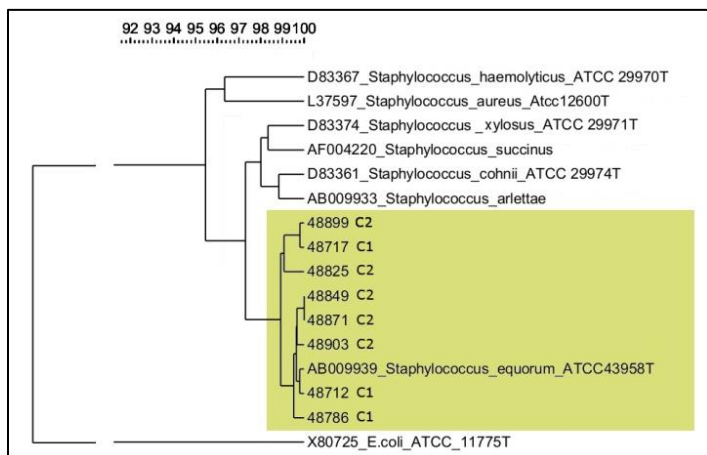


Abb. II.1.3.2-4: Phylogenetischer Vergleich der *Staphylococcus* zugeordneten Sequenzen der CSTR-Klonbibliotheken mit ausgewählten *Staphylococcus*-Arten

Vertreter der Gattung *Staphylococcus* sind weit verbreitete Besiedler von Haut und Schleimhäuten von Tieren und kommen auch in der Umwelt vor (Vela et al., 2012). Einige Arten sind opportunistische Pathogene (Kooistra-Smid et al., 2009; Otto, 2009), wobei die Virulenz unter anderen von der Koagulase-Aktivität abhängt. Diese beschreibt die Fähigkeit der eindringenden Zelle sich mit wirtseigenen Proteinen gegen eine Immunreaktion zu maskieren (McAdow et al., 2012). Staphylokokken sind mehrfach als bedeutender Bestandteil der Bakterienpopulation in Geflügelmist nachgewiesen worden (Martin et al., 1998; Terzich et al., 2000; Lu et al., 2003; Vela et al., 2012), auch wenn keine eindeutigen Hinweise auf Pathogenität vorlagen und überwiegend Koagulase-negative Arten (*S. xylosum*, *S. succinus*, *S. cohnii*) nachgewiesen wurden. Problematisch wird zudem die hohe Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in Geflügelmist vorkommenden Staphylokokken gesehen (Brooks et al., 2010).

Die im CSTR nachgewiesenen Sequenzen waren am nächsten mit der Art *Staphylococcus equorum* verwandt, deren Unterarten auf Pferden aber auch auf gereiftem Käse nachgewiesen wurden (Vadari et al., 2006). Für *S. equorum* wurde Fermentation von und teilweise Säurebildung aus verschiedenen Kohlenhydraten nachgewiesen (Vadari et al., 2006), sodass auch eine funktionelle Rolle beim anaeroben Abbau im Biogasprozess möglich ist.

Bei den in den CSTR nachgewiesenen Staphylokokken ist zu vermuten, dass sie mit dem Substrat HTK eingetragen wurden und trotz der hohen Temperaturen von 55 bzw. 65°C überlebten. Die hier beschriebenen Hinweise zeigen, dass weitere Forschung zum Vorkommen von pathogenen Bakterien

im HTK und zum Hygienisierungspotential thermophiler und hyperthermophiler Biogasreaktoren anzuraten ist.

qPCR zu verschiedenen Daten- Vorlauf der Klonbibliotheken

Da die beschriebenen Klonbibliotheken eine detaillierte Momentaufnahme darstellen, wurden ergänzend qPCR-Untersuchungen vorgenommen. Als Zielorganismen wurden neben den Hauptgruppen Bacteria und Archaea die Ordnung der Methanobacteriales untersucht. In diese ist die in den Klonbibliotheken der Archaeen dominante Gattung *Methanothermobacter* eingeordnet. Hiermit sollte geprüft werden, wie sich die Kopienzahlen dieser Gruppe, im zeitlichen Verlauf entwickeln, ob hier beispielsweise eine zunehmende Anreicherung erkennbar ist. Die untersuchten Proben wurden im Abstand von 10 Wochen zu den Daten 26.01.15; 06.04.15; 15.06.15 und 24.08.15 genommen, um einen längeren Gesamtzeitraum abdecken zu können. Die Ergebnisse wurden in **Tab. II.1.3.2-2** und **Abb. II.1.3.2-5** zusammengestellt.

Tab. II.1.3.2-2 Kopienzahlen der Bacteria, Gesamtarchaea und Methanobacteriales, sowie deren Anteil an den Gesamtarchaea (*kursiv*)

Datum	Kopienzahlen pro ng extrahierter DNA					
	Bacteria		Gesamtarchaea		Methanobacteriales	
	CSTR 1	CSTR 2	CSTR 1	CSTR 2	CSTR 1	CSTR 2
26.01.2015	1,99E+06	2,90E+06	1,96E+04	2,97E+04	8,98E+03	1,11E+04
					46 %	37 %
06.04.2015	2,17E+06	2,86E+06	1,22E+04	1,94E+04	5,78E+03	7,83E+03
					47 %	40 %
15.06.2015	2,45E+06	3,04E+06	9,58E+03	1,78E+04	4,53E+03	7,68E+03
					47 %	43 %
24.08.2015	2,84E+06	3,23E+06	1,35E+04	1,52E+04	4,98E+03	6,52E+03
					37 %	43 %

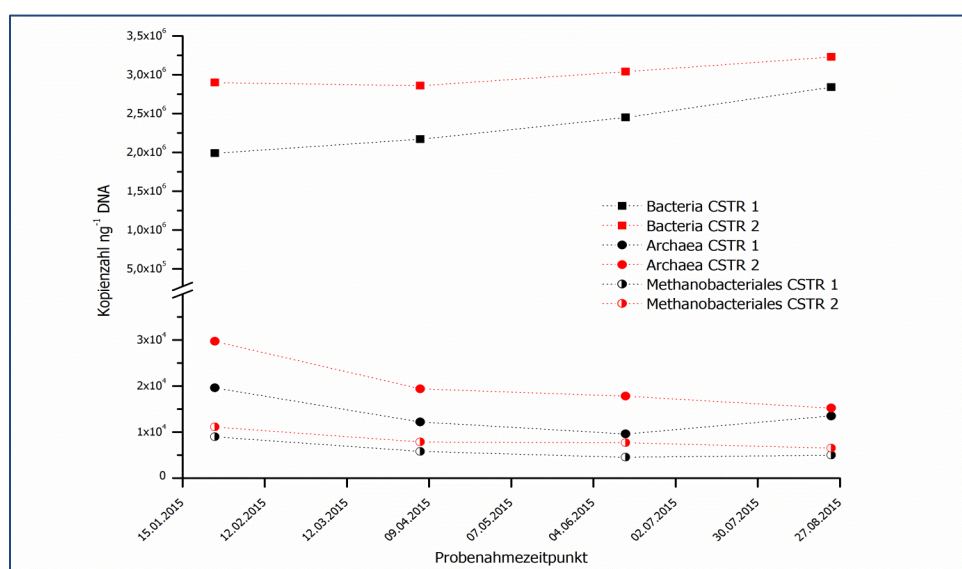


Abb. II.1.3.2-5 Entwicklung der Kopienzahlen ermittelt mittels qPCR für Bacteria, Archaea sowie Methanobacteriales in den Reaktoren CSTR 1 (schwarz) und CSTR 2 (rot)

Die Kopienzahlen pro ng extrahierte DNA lagen für CSTR 2 bei allen Daten und Essays etwas über den Werten von CSTR 1. Bei den Bacteria-Kopienzahlen war jeweils eine leicht steigende Tendenz zu erkennen, die Werte lagen zwischen $2 \cdot 10^6$ bis $3,2 \cdot 10^6$. Die Kopienzahlen für die Gesamt-Archaeen

lagen etwa zwei Größenordnungen unter denen der Bakterien und zeigten grundsätzlich eine abnehmende Tendenz. Auch die Methanobacteriales nahmen entsprechend den Gesamt-Archaeen etwas ab. Bemerkenswert war hier, dass *Methanothermobacter* 85 % der Sequenzen in den Klonbibliotheken zugeordnet wurden, wogegen, wenn man die beiden entsprechenden qPCR-Systeme aufeinander bezog, die Kopienzahlen der Methanobacteriales, zu denen die Gattung *Methanothermobacter* gehört, nur zwischen 37 und 47 % der Archaeen ausmachten.

Die Anwendung der verschiedenen qPCR-Systeme half dabei, die Klonbibliotheksdaten einzuordnen. Dort sind die Diversität der Bacteria und die der Archaea einander „gleichberechtigt“ gegenübergestellt. Es sollte dabei aber bedacht werden, dass die Bacteria um etwa zwei Größenordnungen mehr Kopienzahlen besaßen, wie die qPCR zeigte und ähnlich auch in anderen Studien gefunden wurde (Theuerl et al., 2015; Maus et al., 2016). Die Kopienzahl des 16S-rRNA-Gens kann nicht ohne weiteres als „Zellzahlen“ interpretiert werden, da je nach Art und Lebenszustand ein Bakterium/Archaeon eine unterschiedliche Anzahl des Zielgens besitzen kann (Klappenbach et al., 2001). Trotzdem ergibt das Verhältnis einen Eindruck von dem erheblichen Übergewicht der bakteriellen Abundanz. Die Klonbibliotheken zeigten, dass auch die Vielfalt erheblich höher war als die der auf Gattungsebene dargestellten Archaeen. Auch das mikroskopische Erscheinungsbild entsprach diesem Verhältnis, da nur ein kleiner Teil der im Interferenzkontrast erkennbaren Zellen unter UV-Beleuchtung Autofluoreszenz zeigte. Allerdings führen die als Minderheit vorliegenden Archaeen den letzten Schritt der anaeroben Nahrungskette durch und setzen auch viel Substrat um, was aufgrund des geringen Energiegewinns der Methanogenese (Bischofsberger et al., 2005) auch für die Erhaltung der Lebensvorgänge nötig ist.

Fazit

Bezugnehmend auf die erhobenen mikrobiologischen Daten in den kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktoren war festzustellen, dass eine, an die Bedingungen von 100 % Hühnertrockenkot angepasste, mikrobielle Gemeinschaften angereichert wurde. Ungeachtet der verringerten Biogasbildung war zu vermuten, dass neben den Archaeen insbesondere die angereicherten Bakterien, die den Abbau organischer Verbindungen dominieren, den Bedingungen bei hohem Ammoniakstress angepasst waren. Der Verwendung des Reaktorinhaltes als an hohe Stickstoffkonzentrationen angepasstes Inokulum für entsprechende Praxisanlagen kann insbesondere unter thermophilen Prozessbedingungen und unter Verwendung eines kohlenstoffreichen Co-Substrates entsprochen werden.

II.1.4 Stickstoffeliminierung durch anaerobe Ammoniumoxidation (Anammox)

Versuchsaufbau

Die zur Umsetzung der mikrobiologischen Stickstoffeliminierungsstrategie notwendige Kultivierung der langsam wüchsigen Anammox-*Planctomyceten* wurde mit Hilfe einer verfahrenstechnischen Kultivierung im doppelten Ansatz in Form von Sequencing-Batch-Reaktoren (SBR) im November 2013 realisiert. Bei beiden Systemen erfolgte die Messwertaufnahme (NH_4^+ , Temperatur, pH, Redoxpotential) und eine Pumpensteuerung über ein Prozessleitsystem (KM 3000, Pronova, Berlin) online (**Abb. II.1.4-1, -2**).

Relevante Messwerte wurden minütlich mit Hilfe des Prozessleitsystems aufgenommen. Die Probenahme zur externen Bestimmung der TS-, oTS-, Nitrit- und Nitrat-Werte erfolgte zweimal wöchentlich. Eine pH-Wertregulierung erfolgt über eine mikroprozessorgesteuerte automatische Zugabe einer 2,5 M NaOH-Lösung. Die für eine vollständige Stickstoffbilanz notwendige Erfassung des Nitrits und Nitrates erfolgte mittels Ionenchromatographie in den Laboren des ATB. In den Reaktoren wurde eine Wachstumstemperatur von 38°C und ein leicht basisches Milieu (pH = 8,5-9,0) eingestellt.

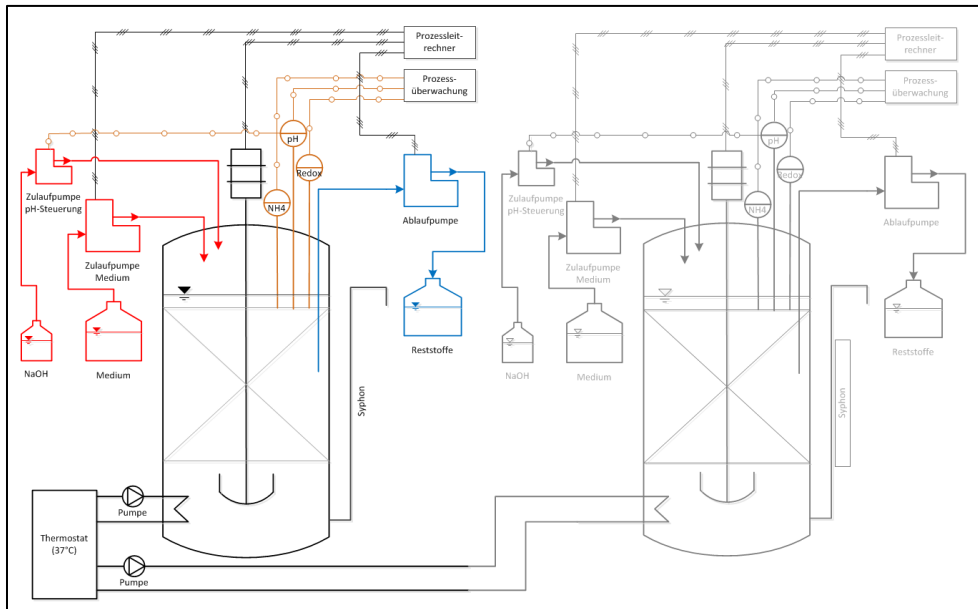
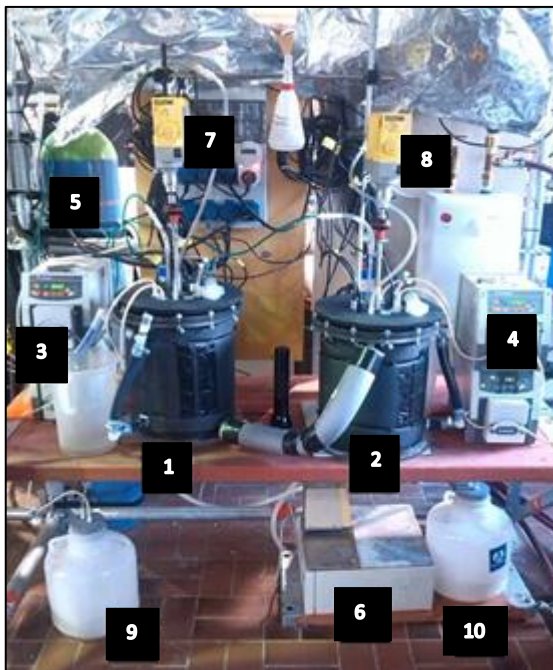


Abb. II.1.4-1: Schematische Darstellung beider SBR zur Anreicherung von Anammox-Planctomyeten, bestehend aus je einem Mediumzulauf, einem Hauptreaktor und Ablauf mit je zwei Pumpen.



- 1, 2 SB-Reaktoren
- 3, 4 Heidolph-Pumpen für den Zu- und Ablauf
- 5 Druckflasche für Ar/CO₂-Begasung
- 6 Wärmebad für den Wärmemantel
- 7, 8 Rührwerke;
- 9, 10 Ablaufbehälter.

Die Vorlagebehälter für das künstlich angefertigte Kultivierungsmedium sowie die implementierten mikroprozessorgesteuerten pH-Regler sind nicht abgebildet.

Abb. II.1.4-2: Anammox-Planctomyeten-Kultivierungsreaktoren.

Kultivierungsmedium

Zur Kultivierung wurde ein synthetisches autotrophes Medium nach Van de Graaf et al. (1996) hergestellt (Tab. II.1.4-1). Während Ammonium als Elektronendonator und Nitrit als Elektronenakzeptor verwendet wurde, diente Carbonat als anorganische Kohlenstoffquelle.

Tab. II.1.4-1: Zusammensetzung eines synthetisch autotrophen Kultivierungsmediums (Van de Graaf et al., 1996)

Konzentration	Chemikalie	Formel	Menge	Zugabe ⁶⁾
250X ¹⁾	Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	82,50 g	20 ml
	Natriumnitrit	NaNO ₂	86,25 g	
	Kaliumhydrogencarbonat	KHCO ₃	125,00 g	
	Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	6,80 g	
250X ²⁾	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO ₄ x 7H ₂ O	75,0 g	4 ml
250 ³⁾	Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ x 2H ₂ O	45,0 g	2 ml
TS I ^{*4)}	EDTA		5,0 g	5 ml
	Eisensulfat	FeSO ₄ x H ₂ O	5,6 g	
TS II ^{#,5)}	EDTA (weiß)		15,0 g	5 ml
	Zinksulfat-Heptahydrat (weiß)	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,43 g	
	Cobaldchlorid-Hexahydrat (rötlich)	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,24 g	
	Manganchlorid-Tetrahydrat	MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,99 g	
	Kupfersulfat (wasserfrei ,blau)	CuSO ₄	0,16 g	
	Natriummolybdat-Dihydrat	Na ₂ Mo ₄ x 2H ₂ O	0,22 g	
	Nickelchlorid-Hexahydrat	NiCl ₂ x 6H ₂ O	0,19 g	
		Na ₂ O ₃ Se x 5H ₂ O	0,15 g	
	H ₃ BO ₃	0,014 g		

*Lösung gelblich; #Lösung violett, weißer Bodensatz (EDTA), Lösungen werden mit Aqua dest. aufgefüllt und bei 121°C für 20 min autoklaviert, ¹⁾⁴⁾⁵⁾ Aufgefüllt auf 1 L, ²⁾ Aufgefüllt auf 0,2 L, ³⁾ Aufgefüllt auf 100 mL, ⁶⁾ Zugabe, bezogen auf 4 L Medium

Inokulum

Als ein mit Anammox-*Planctomyceten* angereichertes Inokulum wurden zwei eingedickte Granulat-Klärschlämme kommunaler Abwasseranlage (Stadtwerke Landshut und Kläranlage Potsdam Nord, ca. 5 L pro Abwasseranlage) nach einmonatiger Lagerung bei 4°C im Verhältnis 1:3 gemischt. Vor dem Zusammenführen beider Schlämme wurde zwecks Erhöhung der Biomasse ein dreistündiger Sedimentationsschritt eingeleitet und der Überstand verworfen. Im Anschluss hieran erfolgten die Zusammenführung der Schlämme in den Reaktoren, die Zugabe des flüssigen Nährmediums (vgl. Tab. II.1.4-1) und die analytische Charakterisierung des durchmischten Schlamms (Tab. II.1.4-2).

Tab. II.1.4-2: Analytische Charakterisierung gemischter Anammoxschlämme (1:2) aus Reaktor 1 und 2

Parameter	TS 105 [% FM]	oTS [% TM]	NH ₄ -N [mg/kg FM]	N [mg/kg FM]	NH ₄ -N [mg/L]	NO ₂ -N [mg/L]	NO ₃ -N [mg/L]
Schlamm R1	1,55	52,76	151,3	815,4	102,1	0,06	0,03
Schlamm R2	1,77	53,02	155,3	914,6	105,8	0,08	0,03

Mit Hilfe eines Standardtest (Vapodest Destilliergerät, Fa. C. Gerhardt, sowie der Ionenchromatographie (IC) wurden Ammoniumkonzentrationen ermittelt. Vermutlich war die Bestimmungsmethode nach VDLUFA (Methodenbuch Band 3, Kapitel 4.8.2; Deller et al., 2001) für die Bestimmung der Ammoniumkonzentration nicht optimal, währenddessen sich die Ergebnisse der IC den stöchiometrisch errechneten Konzentrationen angleichten (92 mg/L).

Regulierung des pH-Wertes und Einstellung anaerober Bedingungen

Obwohl das synthetisch hergestellte Wachstumsmedium auf einen leicht basischen pH-Wert von 9,0 eingestellt wurde, zeigte sich, dass dieser in den Reaktoren auf einen leicht sauren pH-Wert von $\text{pH} = 6,6$ absank (**Abb. II.1.4-3**). Die pH-Werterhöhung ging mit einer Absenkung des Redoxpotentials und somit auch mit einem reduzierten (energiereichen) Milieu des Reaktorinhalts einher.

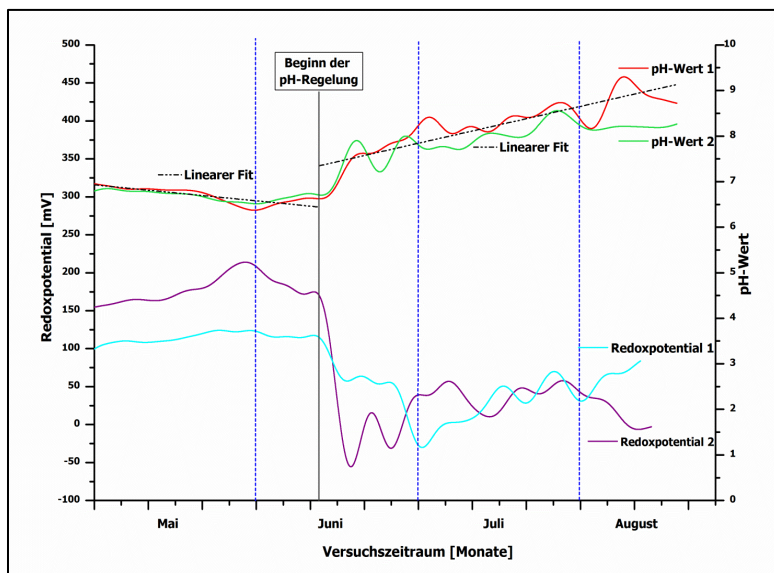


Abb. II.1.4-3: Veränderung des gemessenen pH-Wertes und Redoxpotentials in den Anammox-Reaktoren 1 und 2 nach Integration einer pH-Wertregelung.

Zur pH-Stabilisierung wurde eine mikroprozessorgesteuerte Regelung in das bestehende System integriert (Fa. Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland). Hierbei wurde der pH-Wert über eine Sonde (Fa. Sensortechnik Meinsberg, Waldheim) ausgelesen und durch Zugabe einer anfangs 2,5 M NaOH-Lösung auf einen vorgegebenen Sollwert ($\text{pH} = 8,5$) eingestellt.

Um Sauerstoffeinträgen in die Fermenter entgegenzuwirken, wurde ein Argon/ CO_2 -Gasgemisch (95 % Ar, 5 % CO_2 ; 25 ml pro Minute) in die Fermenter eingeleitet. Argon diente hierbei zum Austreiben des Sauerstoffs, der CO_2 -Anteil sollte den anzureichernden lithotropen Organismen als Kohlenstoffquelle dienen.

Betrieb der SBR zur Anammox-Anreicherung

Über den anfänglichen Zeitraum von sechs Monaten erfolge die Zugabe des Anammox-Mediums gemäß der in **Tab. II.1.4-3** dargestellten Strategie. Hierbei wurden jeweils sechs Stunden dauernde Zyklen durchlaufen. An den „normalen“ Betrieb mit Zulauf von 300 ml frischen Mediums unter Rühren und Begasen schloss sich eine 50-minütige Phase an, in der die in Flocken konzentrierte Biomasse sedimentieren konnte. Danach schließlich erfolgte über zehn Minuten das Abpumpen verbrauchten Mediums. Nach den ersten sechs Monaten wurde die Zulaufzeit von fünf auf eine Stunde verkürzt um die Kontaktzeit zwischen Biomasse und frischem Medium zu erhöhen. Aus den Zulaufmengen (1,2 L pro Tag) und dem Nutzvolumen der Reaktoren (3 L) ergab sich eine mittlere hydraulische Mediumverweilzeit von ca. drei Tagen.

Tab. II.1.4-3: Strategie 1: SBR-Medium-Phasenabfolge zur Kultivierung von Anammox-Planctomyceten in beiden Reaktoren. Die blauen Balken stellen den Zeitraum der jeweiligen Phase dar.

Zeit [min]	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	340	350	360
Zulauf	█													
Sedimentation												█	█	
Ablauf														█
Begasung	█													
Rührer	█													

Mit Beginn im November 2013 wurden nach einer ca. sechsmonatigen Einfahrphase die NH_4 -Konzentrationen zur Medienoptimierung erhöht (**Abb. II.1.4-4**). Um die erforderlichen stöchiometrischen Verhältnisse des Ammoniums zu Nitrit aufrecht zu erhalten, wurden gleichzeitig die NO_2 -Konzentrationen im Zugabemedium entsprechend angehoben. Die gemessenen NO_2 -Werte im Zulauf der Anammox-Reaktoren stiegen nach Erhöhung der NO_2 -Medienkonzentration (**Abb. II.1.4-5**) deutlich an.

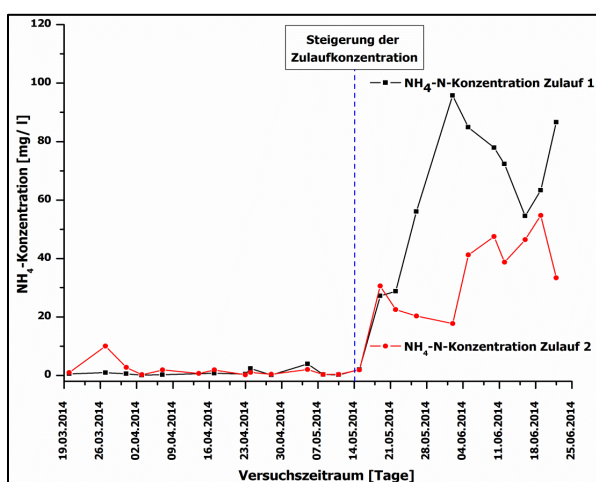


Abb. II.1.4-4: NH_4 -Konzentrationen im Medium.

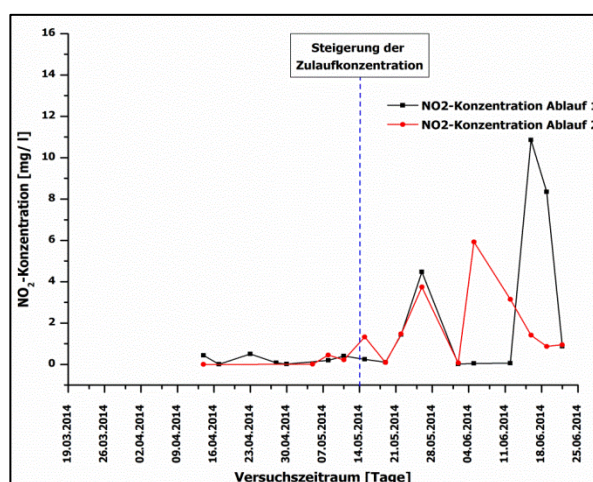


Abb. II.1.4-5: NO_2 -Konzentration im Reaktor

Blaue Linie: Beendigung der Einfahrphase, Beginn der Steigerung der Zulaufkonzentration (Nitrit, Ammonium)

Der Zulauf bezeichnet hier die sich im Reaktor einstellenden Bedingungen, nachdem frisches Medium zugegeben wurde. Auch im Reaktor-Ablauf stieg der NO_2 -Gehalt stark fluktuierend von 2 mg/L auf 6 bis 12 mg/L an (**Abb. II.1.4-5**). Offensichtlich konnte das NO_2 -Überangebot nicht vollständig von der Biomasse umgesetzt werden.

Die Messung der Ammoniumkonzentrationen in den Reaktoren zeigte einen abfallenden Kurvenverlauf von 60 mg/L auf 35 mg/L und deutete somit auf einen kontinuierlichen Verbrauch des durch das Anreicherungsmedium in die Reaktoren eingebrachten Ammoniums hin (**Abb. II.1.4-6**). Die Darstellung zeigt zudem die zyklischen Schwankungen, die sich aus dem oben beschriebenen Betrieb von Medienzu- und -ablauf ergaben.

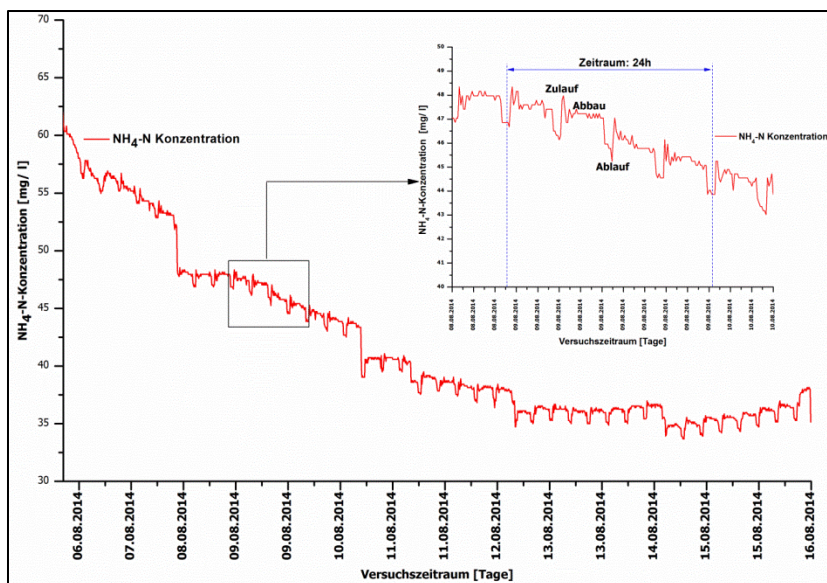
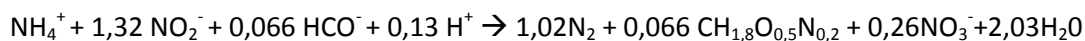


Abb. II.1.4-6: Gemessene NH₄-Konzentrationen innerhalb des Anreicherungsreaktors (Reaktor 1).

Gemäß der stöchiometrischer Gleichung Strous et al. (1999) wird von Anammox-Planctomyceten Ammonium als Elektronendonator mit Nitrit als Elektronenakzeptor zu gasförmigen elementaren Stickstoff oxidiert. Hierbei entstehen auch geringere Mengen Nitrat.



Die im Reaktorablauf gemessenen Werte für Nitrat (**Abb. II.1.4-7**) 7 waren jedoch deutlich zu hoch. Deswegen musste davon ausgegangen werden, dass aufgrund zu hoher Sauerstoffeinträge in die Reaktoren, die von der Begasung mit Argon/CO₂ nicht eliminiert werden konnte, ein Wachstum von aeroben Ammonium-Oxidierern also Nitrifikanten auftrat. Durch diese direkte Konkurrenz wurde die Anreicherung der Zielorganismen gestört.

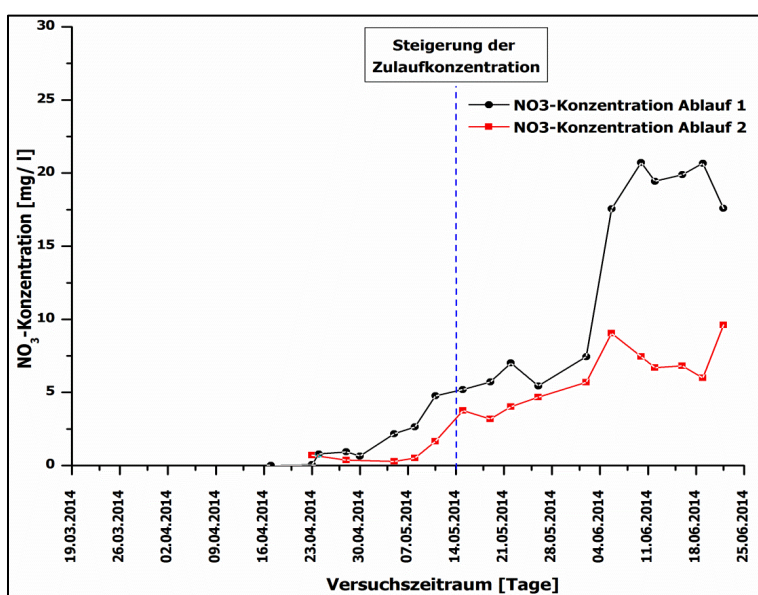


Abb. II.1.4-7: Entwicklung der Nitratkonzentrationen im Ablauf der SBR

Neuinokulierung infolge einer Prozessstörung

Etwa 170 Tage nach Steigerung der Zulaufkonzentration trat eine verfahrenstechnische Störung bei der pH-Regelung (gestrichelter Bereich in **Abb. II.1.4-8**) auf, die zu einer NaOH-Überdosierung führte. Grund hierfür war eine fehlerhafte Interpretation des Programmscriptes, hervorgerufen durch eine überlastete central processing unit (CPU). Die hierdurch hervorgerufene erhöhte Abpumpmenge führte zu einem fallenden Flüssigkeitspegel in den Reaktoren. Hierdurch verloren die pH-Sonden den Kontakt mit der Prozessflüssigkeit, was zu einer NaOH-Überdosierung führte. Der pH-Wert stieg infolge dessen in beiden Reaktoren stark auf wachstumsinhibierende Werte an (pH-Wert: ca. 10,8).

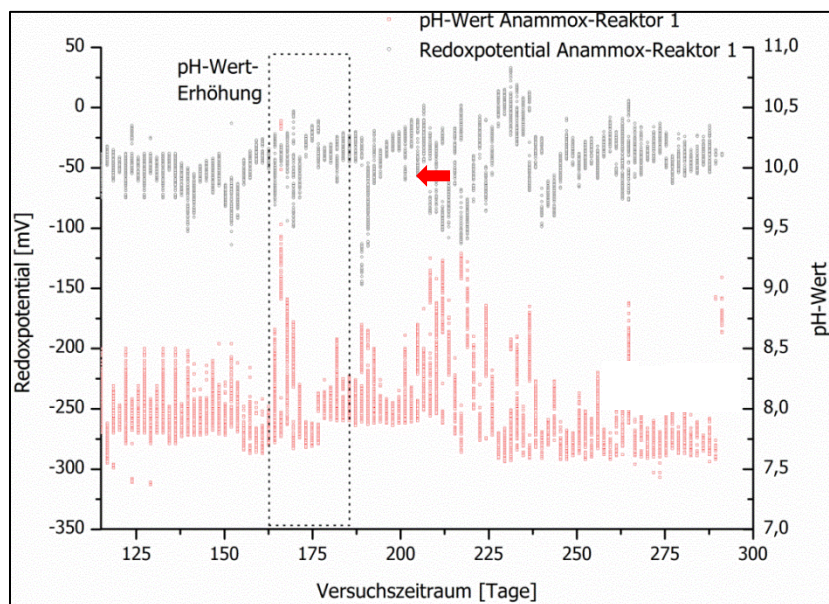


Abb. II.1.4-8: pH-Wert- und Redoxpotentialverlauf des Anammox-Reaktors (2-fach konzentriert NH_4^+ , NO_2^-). Roter Pfeil: übermäßiger Anstieg des pH-Wertes, ausgelöst durch eine NaOH-Überdosierung

Aufgrund der destruktiven Auswirkungen der beschriebenen pH-Werterhöhung wurden die Anreicherungen abgebrochen und beide Reaktoren erneut mit Anammoxschlamm nach oben beschriebenen Vorgehen beimpft.

Um Aussagen über den mikrobiellen Verbrauch des Ammoniums treffen zu können, wurde der Kurvenverlauf der NH_4^- -Konzentrationen vor und nach der Neuinokulierung beispielhaft für den Anammox-Reaktor 1 dargestellt (**Abb. II.1.4-9**). Die theoretisch maximale NH_4^- -Konzentration stellt sich im Reaktor nicht ein, da die Differenz offenbar bereits mikrobiologisch verwertet wurde. Die Neubeimpfung bewirkte einen starken Abfall der NH_4^- -Konzentrationen 120 mg L^{-1} auf ca. 10 mg L^{-1} , was auf ein starkes Wachstum stickstoffverwertender Mikroorganismen zurückgeführt wurde. Etwa ab Tag 215 stiegen die Ammoniumwerte jedoch wieder deutlich an, was auf einen verminderten Umsatz schließen lässt.

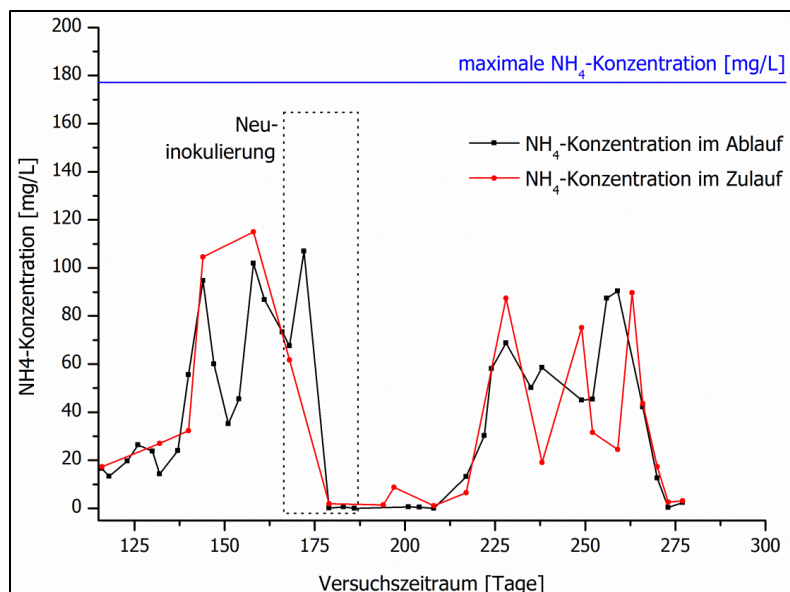


Abb. II.1.4-9: Gemessene NH_4 -Konzentrationen innerhalb des Anreicherungsreaktors im Zu- und Ablauf. Blaue Linie: NH_4 -Konzentration des zugeführten synthetischen Mediums gestricheltes Kästchen: Zeitpunkt der Neuinokulierung

Weitere Optimierung der Kultivierungsbedingungen

Aufgrund der chemischen Analysen der Stickstoffverbindungen in Zu- und Ablauf sowie der Ergebnisse der regelmäßig durchgeführten qPCR-Analysen (vgl.w.u. Abb. II.1.4-15) zeigte sich, dass die Zielorganismen offenbar nur gering angereichert waren. Deshalb wurden problematische Faktoren identifiziert und im Folgenden die Anreicherungsbedingungen in den Reaktoren optimiert. Dies betraf insbesondere die Versorgung mit Medium sowie die Minimierung unerwünschter Sauerstoffeinträge. Als potentiell Problem wurde die lange Standzeit der Medium-Flaschen identifiziert, da mehrfach Ausfällen von Medien-Komponenten beobachtet wurde. Das Volumen der Medienflaschen wurde deshalb von 5 L auf 2 L verringert. Es erfolgte zudem eine intensive Begasung der Mediumflaschen mit Argon, bevor sie an die Reaktoren angeschlossen wurden, da Messungen zuvor einen Restsauerstoffgehalt im Flüssigmedium gezeigt hatten. Dies war vermutlich auf die Lagerung der Mediumflaschen im Kühlraum zurückzuführen, bei der es im Laufe der Zeit durch undichte Verschlüsse zu einem Wiedereintritt von Sauerstoff kam. Da Sauerstoff als Hemmstoff der Anammox-Organismen bekannt ist (Van De Graaf et al. 1996), erfolgte hier eine Optimierung, da die Begasung der Reaktoren mit Argon möglicherweise die Sauerstoffeinträge nicht schnell genug aus dem System entfernen konnte.

Auch im weiteren Verlauf der Anreicherungsversuche blieb die pH-Wertsteuerung störanfällig. Die Stabilisierung des pH-Wertes um den angestrebten Wert von 8,5 war verfahrenstechnisch herausfordernd (**Abb. II.1.4-10**). Ausgelöst durch die materialbedingte Trägheit der verbauten pH-Einstabmessketten erfolgten zum Teil erhöhte Zudosierungen der NaOH-Pufferlösung. Um die resultierenden Schwankungen zu verringern wurden eine Absenkung des vorgegebenen pH-Sollwertes auf 7,5 und eine Verdünnung der NaOH-Pufferlösung auf eine 0,5-molare Lösung durchgeführt, da dann höhere Volumina zugegeben werden und der Wert in den Reaktoren sich langsamer veränderte.

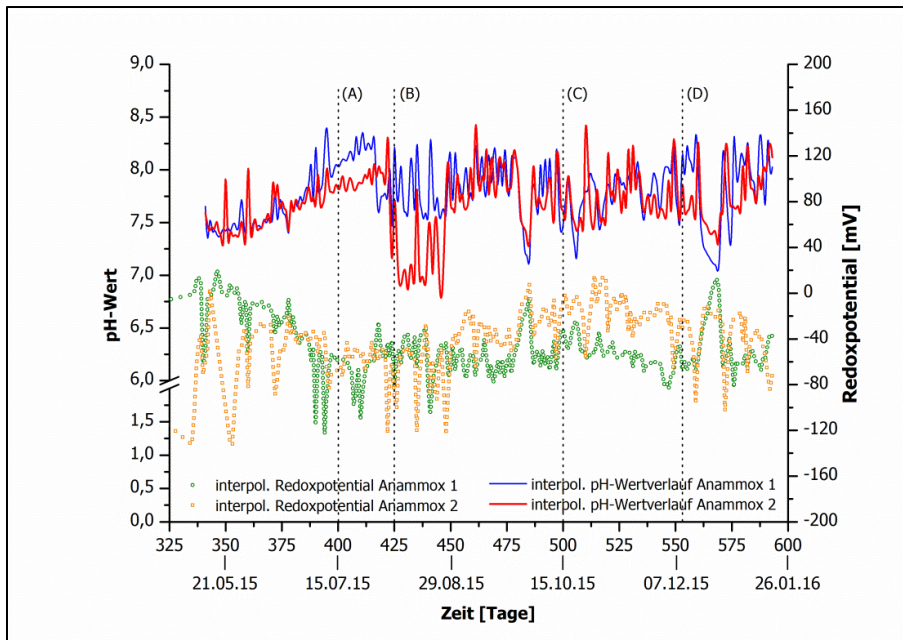
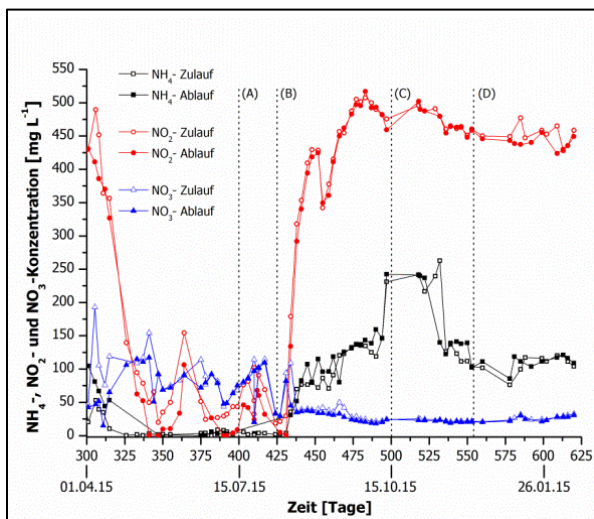


Abb. II.1.4-10: Interpolierte Verläufe der pH-Werte und Redoxpotentiale der Anammoxreaktoren 1 und 2. (A) – Veränderung des Befütterungsregimes, (B) – Begasung der Medienflaschen, (C) – Erhöhung der NH_4^- und NO_2^- -Konzentration in Medium von Anammox-Reaktor 2, (D) – Probenahme und Anfertigung von Klonbibliotheken

Nachfolgend sind die Veränderung der Zulauf- und Ablaufkonzentrationen an NH_4^+ , NO_2^- und NO_3^- nach erneuter Einfahrphase der Reaktorsysteme 1 und 2 dargestellt (Abb. II.1.4-11).

Anammoxreaktor 1



Anammoxreaktor 2

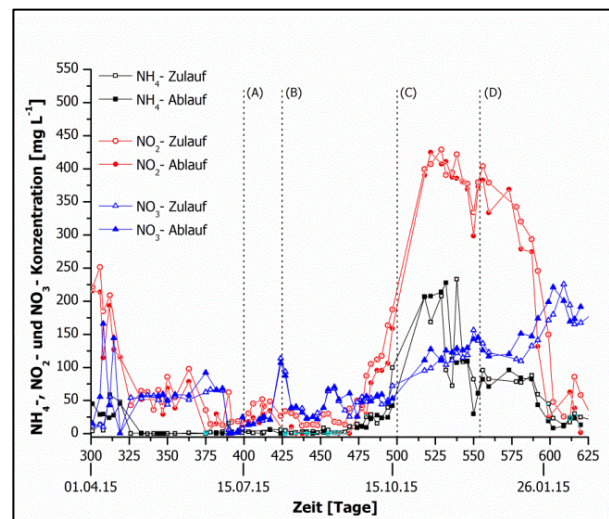


Abb. II.1.4-11: Verläufe der NH_4^+ , NO_2^- und NO_3^- Konzentrationen. (A) – Veränderung des Befütterungsregimes, (B) – Begasung der Medienflaschen, (C) – Erhöhung der NH_4^+ und NO_2^- -Konzentration in Medium von Anammox-Reaktor 2, (D) – Probenahme und Anfertigung von Klonbibliotheken

Aufgrund der Veränderung des Befütterungs- und Vorbehandlungsregimes fand im Zeitraum zwischen dem 15.07.15 und 15.10.15 eine Zunahme der NH_4^+ - als auch NO_2^- - Konzentration sowohl in dem Reaktorsystem 1 als auch in System 2 statt. Es wurde daher angenommen, dass die durch die Begasung des Mediums stark verringerten Sauerstoffeinträge sich im System dauerhaft sauerstoff-

freie Bedingungen einstellen. Die zuvor im System vorhandene Aktivität der Nitrifizierer wurde daher herabgesetzt. Jedoch verhielten sich beide Reaktoren unterschiedlich (Abb. II.1.4-11). Während die Begasung der Medienflaschen in Reaktor 1 die Bildung von Nitrat durch Nitrifikanten komplett verhinderte, kam es in Reaktor 2 erneut zur Bildung von Nitrat, sodass hier vermutet werden muss, dass es im Reaktor 2 durch Undichtigkeiten weiterhin zu Sauerstoffeinträgen kam, die in System 1 nicht auftraten. Die verfahrenstechnische Überwachung der Anreicherungen ergab daher ein unklares Bild, das nicht eindeutig auf eine erfolgreiche Anreicherung der Zielorganismen schließen ließ.

Mikrobiologische Untersuchung der Anammox-Anreicherungen

Mikroskopische Untersuchung

Die beiden Anreicherungsreaktoren SBR1 und SBR2 wurden mikroskopisch untersucht. Hier kamen der Differentielle Interferenz Kontrast (DIC) sowie die Epifluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. In **Abb. II.1.4-12** und **-13** wurden aussagekräftige Aufnahmen zusammengestellt.

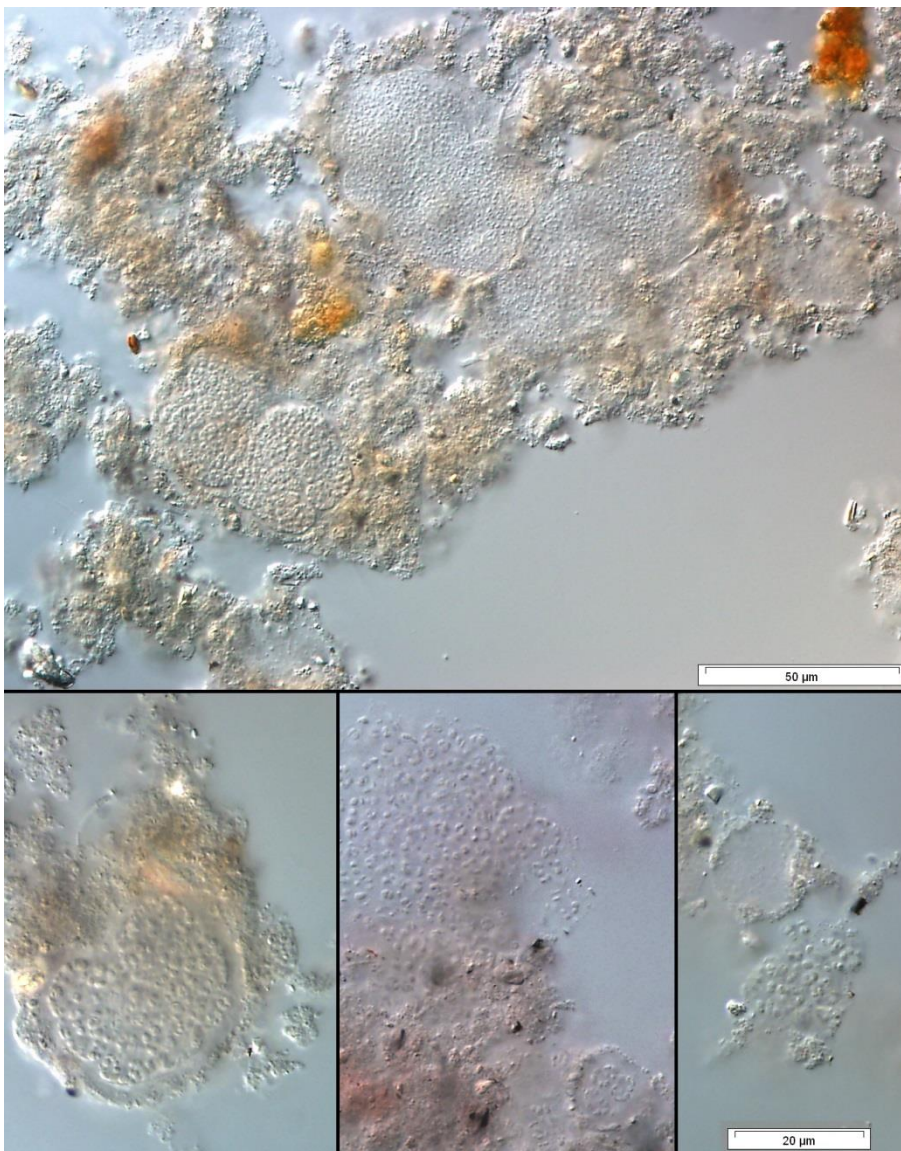


Abb. II.1.4--12: Mikroskopisches Erscheinungsbild von Flocken aus Reaktor SBR 1 vom 02.11.2015 die drei unteren Bilder haben denselben Vergrößerungsmaßstab, DIC

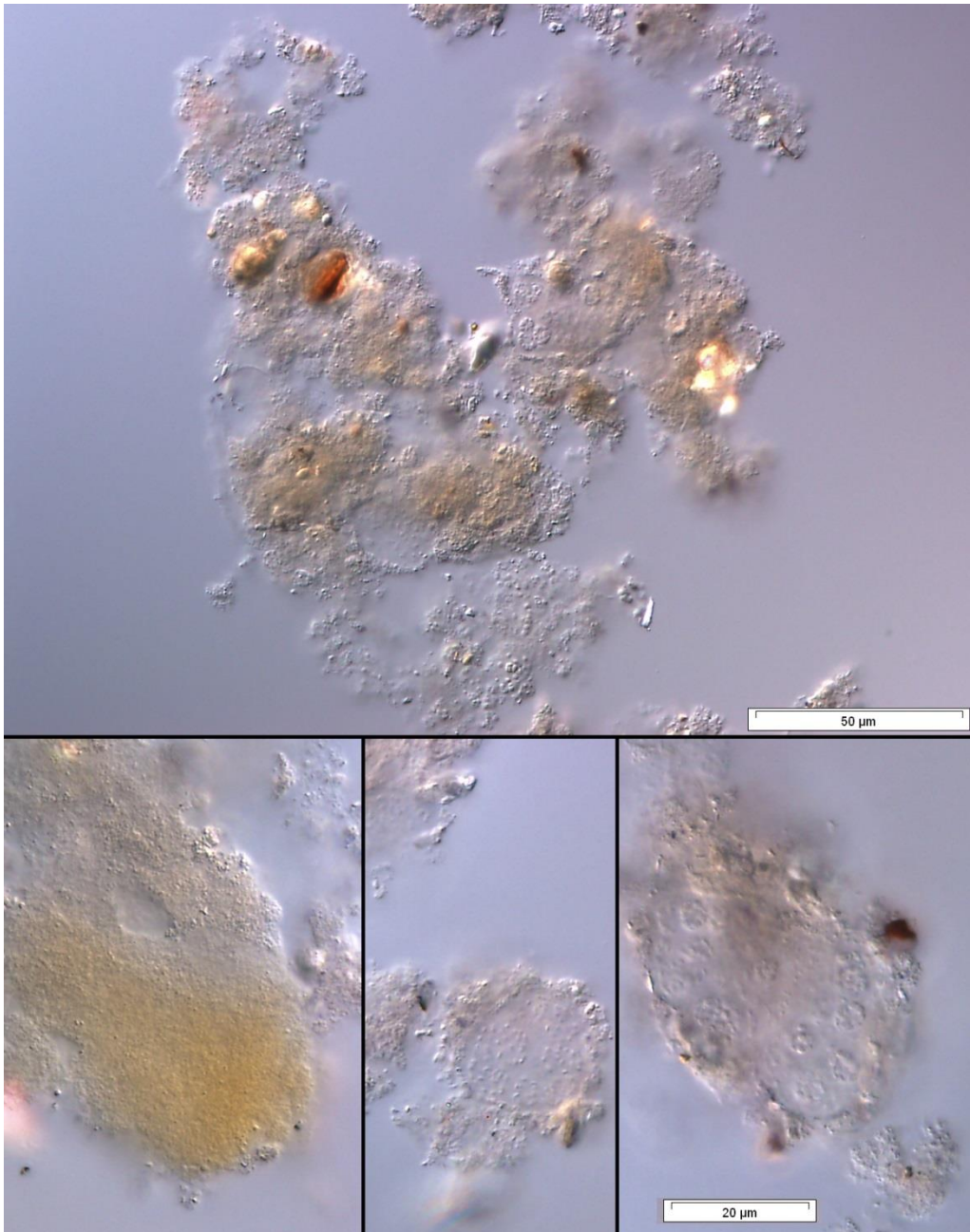


Abb. II.1.4-13: Mikroskopisches Erscheinungsbild von Flocken aus Reaktor SBR 2 vom 02.11.2015 die drei unteren Bilder haben denselben Vergrößerungsmaßstab, DIC

Das mikroskopische Bild war von charakteristischen Flockenstrukturen dominiert, und es sind vielfältige in EPS gehüllte Bakterienkolonien erkennbar. Die Bakterien waren in Mikrokolonien zu Aggregaten zusammengelagert. Viele kompakte knollenförmige Kolonien bestanden aus morphologisch ähnlichen Zellen in gemeinsamen Schleimkapseln (EPS). Diese Kolonien waren mit partikulären Stoffen, die möglicherweise aus dem Beimpfungsschlamm stammten und nicht genauer erkennbarem amorphem Material zu größeren Flocken zusammengesetzt. Die Ursache der Ausbildung kompakter größerer Flocken und der weitgehenden Abwesenheit von einzelnen suspendierten Zellen ist durch den speziellen Reaktorbetrieb zu erklären. Durch eine Sedimentationsphase mit anschließendem teilweisem Austausch der Flüssigphase wurden in der Flüssigphase suspendierte Zellen ausgewaschen und nur größere Flocken wurden zurückgehalten. Ob sich trotzdem frei suspendierte Zellen in der Flüssigphase etablieren konnten, hing von der Wachstumsrate der Zellen im Verhältnis zur Verweilzeit

des Mediums im Reaktorraum ab. Da die Austauschrate des Mediums relativ gering war, zeigte dies auch an, dass die Wachstumsrate der freien Bakterien ebenfalls gering sein musste. Da im synthetischen Medium energiereiche organische Stoffe weitgehend fehlten, konnten sich keine schnell wachsenden Bakterien auf Basis solcher leicht verwertbaren Substrate etablieren.

Zur phylogenetischen Einordnung der unterschiedlichen Mikrokolonien können mit mikroskopischen, morphologischen Daten in der Regel wenige Aussagen getroffen werden. Eine DAPI-Färbung (**Abb. II.1.4-14**) der Reaktorproben bestätigte das weitgehende Fehlen suspendierter Zellen. In den amorphen Zonen der Flocken war die Dichte anfärbarer Zellen gering. In den teilweise dichtgepackten erkennbaren Mikrokolonien war dagegen die Zelldichte sehr hoch und diese Zellen im Vergleich zu umgebenen Zellen relativ groß.

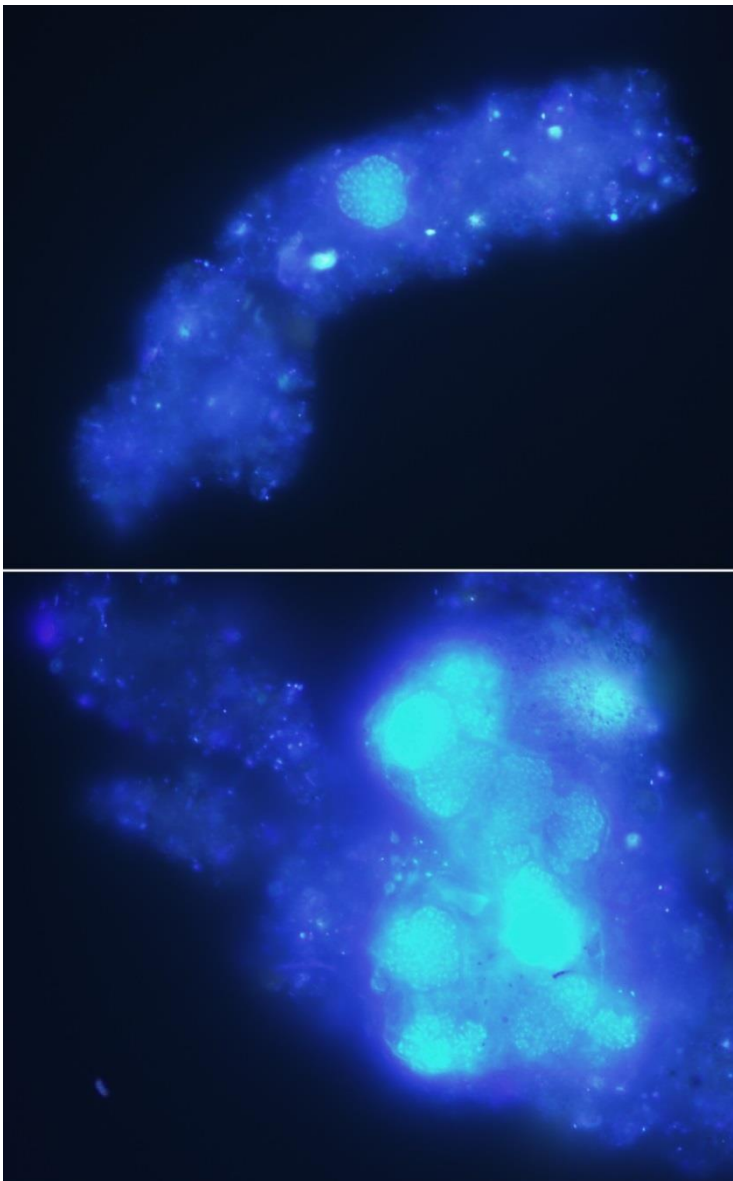


Abb. II.1.4-14: Mit Dapi gefärbte Flocken aus Reaktor SBR1 vom 03.06.2015 stark leuchtende Mikrokolonien aus relativ großen Zellen umgeben von nur gering besiedelten Bereichen

Ein Wachstum in Form der beschriebenen kompakten, knollenförmigen Mikrokolonien ist für unterschiedliche physiologische Gruppen beschrieben. Beispielsweise können sowohl Anammox-

Planktomyceten (Schmid et al. 2003) als auch nitrifizierende Bakterien (Schramm et al. 1998) derartige Morphotypen ausbilden. Pätzold et al. (2008) zeigten diesbezüglich, dass sich die sehr ähnlichen Aggregate von ausgewählten nitrifizierenden Bakterien und Anammox-Bakterien mithilfe der Raman-Mikroskopie voneinander unterscheiden lassen, was aber im hier beschriebenen Projekt nicht erfolgte, da molekularbiologische Verfahren eingesetzt wurden. Da es in den verwendeten Anreicherungsreaktoren anfangs zu unerwünschten Sauerstoffeinträgen kam, ist das Wachstum von hier unerwünschten Nitrifikanten nicht auszuschließen. Zur Einschätzung des Erfolges der Anammox-Anreicherung wurden molekularbiologische Verfahren verwendet.

Molekularbiologische Untersuchung

qPCR

Zur quantitativen Beurteilung der Anreicherung wurden qPCR-Nachweissysteme für Anammox-Planktomyceten sowie Gesamtbakterien als Bezugsgröße etabliert. Nach Vorversuchen zur Methodenanpassung im Mai 2015 wurden entsprechende Untersuchungen zwei- bzw. dreiwöchentlich durchgeführt, was durch die geringe Wachstumsgeschwindigkeit der Zielorganismen bedingt wurde (Bagchi et al., 2010). In **Abb. II.1.4-15** sind die Ergebnisse der qPCR zusammenfassend dargestellt.

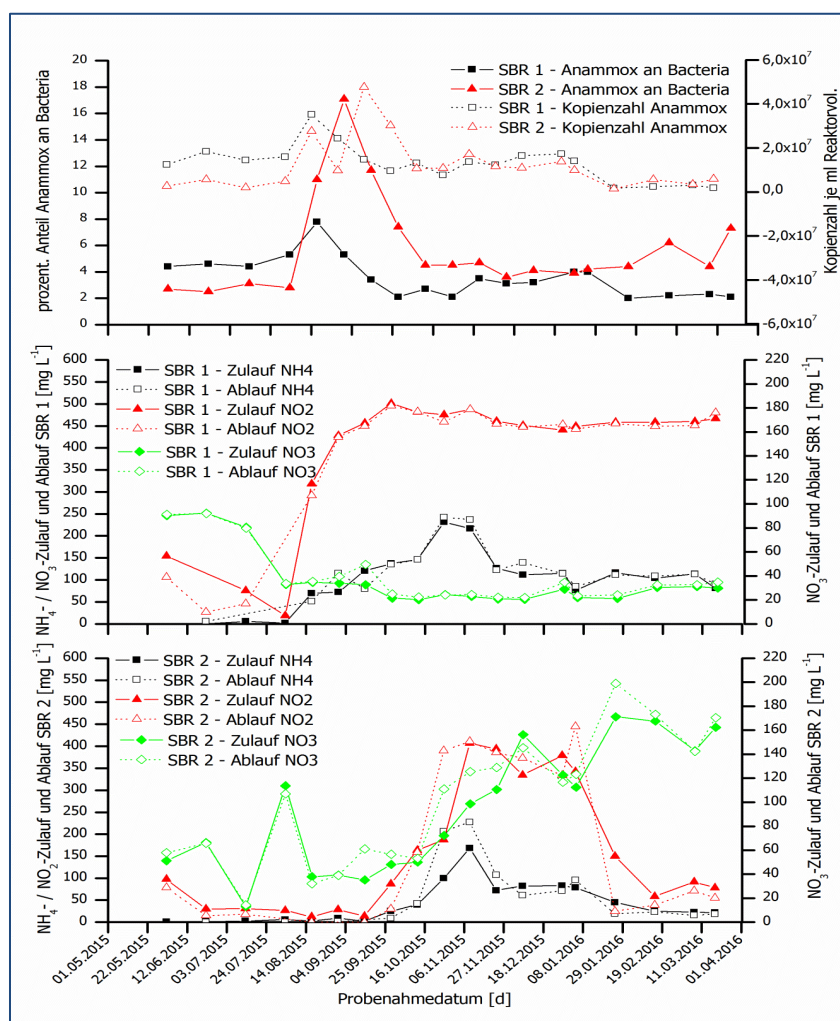


Abb. II.1.4-15: QPCR-Ergebnisse beider Anammox-Anreicherungsreaktoren.
 oben: Prozentanteil Anammox an Gesamtbakterien
 Mitte: Konzentrationen der gemessenen anorganischen Stickstoffverbindungen im Reaktor 1
 unten: Konzentrationen der gemessenen anorganischen Stickstoffverbindungen im Reaktor 2

Da die Anreicherung der Zielorganismen sichtbar gemacht werden sollte, wurde zum einen die Kopienzahl pro mL des Reaktorinhalts angegeben, obwohl dies wegen Unterschieden z.B. in der DNA-Extraktion mit Unsicherheiten behaftet ist. Zum anderen wurden die Kopienzahlen auf die der Gesamtbakterien bezogen. Bei der Entwicklung der Kopienzahlen über die Anreicherungszeit ließen sich drei Phasen abgrenzen, die in beiden Reaktoren relativ ähnlich verliefen. In Phase 1 (bis etwa 07.08.2015) blieben die Werte weitestgehend stabil. Reaktor 1 wies mit ca. 4 % eine höhere Anreicherung der Anammox-Bakterien auf, als der mit dem geringer konzentrierten (betrifft die verschiedenen N-Quellen) Medium betriebene Reaktor 2. Eine deutliche Zunahme der Zielorganismen in Phase 1 konnte nicht festgestellt werden.

In der sich anschließenden Phase 2 (bis etwa 16.10.2015) wirkten sich die oben beschriebenen Veränderungen der Inkubationsbedingungen aus. Es wurde die Medienzugabe verändert und insbesondere der unerwünschte Eintrag von Sauerstoff durch Begasung des Mediums verringert. Infolgedessen kam es zu dynamischen Änderungen des vorher relativ stabilen Verhältnisses von Zielorganismen zu Gesamtbakterien. Die starke relative Zunahme auf etwa 17 % Anreicherung (Anammox an Gesamtbakterien) insbesondere bei Reaktor 2 kann vermutlich auf eine starke Schwankungen der Gesamtbakterien also überwiegend der „Begleitflora“ zurückgeführt werden, die infolge des fehlenden Sauerstoffes zusammenbrach.

In der darauffolgenden Phase 3 war eine erneute Stabilisierung der Werte zu erkennen. Die Populationen beider Systeme glichen sich zunehmend an. Grundsätzlich war ähnlich wie in Phase 1 keine deutliche Anreicherung der Anammox-Bakterien zu erkennen.

Literaturquellen berichten von deutlich höheren Anreicherungsgraden. So erreichte van der Star et al. (2007) offenbar Anreicherungen von 50-60 % (ermittelt mit FISH), allerdings nach sehr langer Reaktorlaufzeit von über 1000 Tagen. In mehreren Phasen zeigten die gleichen Autoren mithilfe der qPCR Verdopplungszeiten der Zielorganismen von 10-12 Tagen, die in den im hier beschriebenen Projekt durchgeführten Versuchen nicht beobachtet werden konnten.

Erstellung von Klonbibliotheken

Zur Analyse der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft in den Anreicherungsreaktoren wurden Klonbibliotheken des 16s rRNA-Gens erstellt. Die erzielten Sequenzen wurden im Programm Bionumerics bearbeitet und die resultierenden Sequenzen mit dem RDP Classifier (Wang et al. 2007) phylogenetisch eingeordnet. Es erfolgte eine Darstellung auf Phylumebene (**Abb. II.1.4-16**, und **-17**, **Tab II.1.4-4**).

Die Ergebnisse der Klonbibliotheken stimmten mit den qPCR-Ergebnissen tendenziell überein. Planctomyceten, zu denen die Zielorganismen gehören, waren nur zu einem geringen Anteil von 1 - 2 % enthalten. Die bakterielle Gemeinschaft beider Reaktorsysteme ähnelte sich. Dominierend waren Vertreter der Chloroflexi mit verschiedenen Gattungen innerhalb der Anaerolineaceae, die auch in anderen anaeroben Systemen wie Biogasanlagen teilweise nach Langzeitanreicherung gefunden wurden (Rademacher et al., 2012c; Klang et al., 2015; Liang et al., 2015). Die Proteobakterien als weitere dominante Gruppe waren divers vertreten, da sowohl Alpha-, Beta-, Gamma-, und Deltapro-

teobakterien detektiert wurden beispielsweise auch nitrifizierende Bakterien der Gattung *Nitrosomonas*), deren Vorkommen aufgrund der verfahrenstechnischen Ergebnisse vermutet worden war.

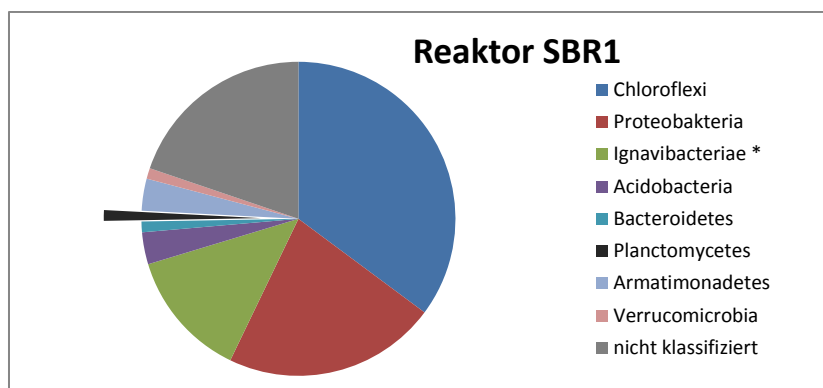


Abb. II.1.4-16: Zusammensetzung der Sequenzen der Klonbibliothek SBR1; Hervorgehobener Anteil der Planctomyceten.

* Zuordnung zum Phylum erfolgte anhand eines 60% Übereinstimmungskriteriums

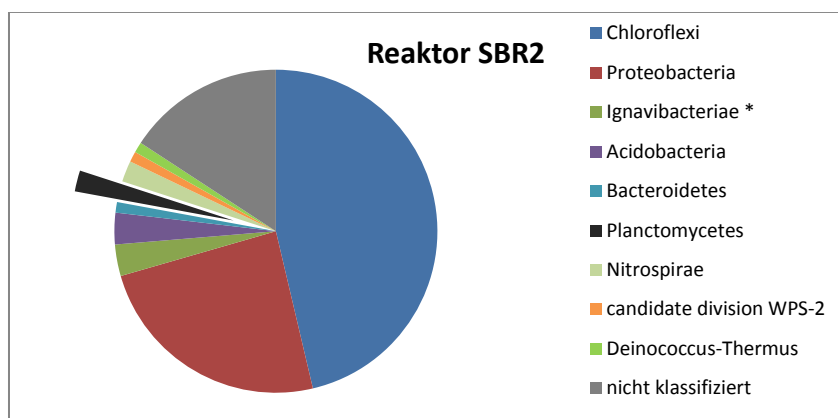


Abb. II.1.4-17: Zusammensetzung der Sequenzen der Klonbibliothek SBR2; Hervorgehobener Anteil der Planctomyceten

* Zuordnung zum Phylum erfolgte anhand eines 60% Übereinstimmungskriteriums.

Aufgrund der mikrobiologischen Ergebnisse wurde der weitere Betrieb der SBR-Anreicherungen beendet, da keine erhebliche Anreicherung der Zielorganismen festgestellt werden konnte.

Tab. II.1.4-4: Klonbibliotheken der Anammox-Anreicherungen: Verteilung der Sequenzen.

Beide Reaktoren im Vergleich	SBR1	SBR2
Chloroflexi	32	44
Proteobacteria	20	23
Ignavibacteriae *	12	3
Acidobacteria	3	3
Bacteroidetes	1	1
Planctomycetes	1	2
Nitrospirae		2
candidate division WPS-2		1
Deinococcus-Thermus		1
Armatimonadetes	3	
Verrucomicrobia	1	
nicht klassifiziert	18	15
gesamt	91	95

Anwendung der anaeroben Ammoniumoxidation zur Stickstoffeliminierung

In anschließenden Versuchen ab dem 24.06.2016 wurde untersucht, ob eine Behandlung von Prozessflüssigkeit (Perkolat) aus Biogasanlagen mithilfe des Anammox-Stoffwechsels möglich ist. Hierzu wurde ein Medium aus Prozessflüssigkeit aus den SBF und LBF hergestellt. Da dieses zwar große Mengen Ammonium jedoch kein Nitrit enthält, wurde dieses entsprechend der Stöchiometrie der Anammox-Reaktion zudosiert.

Als aktive Biomasse wurde angereicherter „Anammox-Schlamm“ aus der Kläranlage Landshut verwendet. Dieser wurde mithilfe der qPCR auf den Gehalt an Anammox-Planctomyceten untersucht (**Tab. II.1.4-5**). Die Kopienzahlen zeigten, dass die Zielorganismen einen Anteil von etwa 1 % bildeten. Dies erschien plausibel, da im Belebtschlamm neben Stickstoffumsätzen viele andere biologische Reaktionen ablaufen.

Tab. II.1.4-5: qPCR Ergebnisse zum Belebtschlamm der Kläranlage Landshut.

Gruppe	Kopien pro ng der 16S rDNA
Bacteria	$1,18 \cdot 10^6$
Archaea	$6,14 \cdot 10^3$
(Anammox)-Planctomyceten	$1,21 \cdot 10^4$

Das verwendete Medium wurde auf Basis der Prozessflüssigkeit der LBF und SBF erzeugt. Es erfolgte eine Anpassung der Inhaltstoffe NH_4^+ und NO_2^- der Prozessflüssigkeit. Hierfür wurden 68 ml der Prozessflüssigkeit mit 1932 ml H_2O (Verdünnungsverhältnis 1:28,4) gemischt. Dem folgte eine Zudosierung von 1,32 g Natriumnitrit. In **Tab. II.1.4-6** sind die Konzentrationen an NH_4^+ , NO_2^- und NO_3^- im mineralischen Medium, in der unbehandelten Prozessflüssigkeit, als auch in der durch Verdünnung mit Wasser und durch Zugabe von Natriumnitrit angepassten Prozessflüssigkeit des LBF dargestellt. Zudem fand vor der Verwendung des angepassten LBF-Mediums ebenfalls eine Begasung mit Argon- CO_2 -Gas statt, um ein anaerobes Milieu sicherzustellen.

Tab. II.1.4-6: Darstellung der initialen Werte der Prozessparameter $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$ und $\text{NO}_2\text{-N}$ der verwendeten Medien im Anammoxprozess (Mittelwerte)

Bezeichnung	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ [mg L ⁻¹]	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ [mg L ⁻¹]	$\text{NO}_2^-\text{-N}$ [mg L ⁻¹]
Mineralisches Medium	139,8	0,3	138,3
LBF (unbehandelt)	3393	0,05	37,7
LBF (angepasst)	118,4	0,9	140,7

Als verfahrenstechnische Verbesserungen in Vorbereitung auf den Einsatz der angepassten Prozessflüssigkeit als Anammox-Medium, fanden eine Überarbeitung der Argon- CO_2 -Begasung und ein Umbau der Reaktordeckel zur verbesserten Messwerterfassung statt. Zudem wurde die pH-Wertsteuerung verbessert.

In **Abb. II.1.4-18** ist der Verlauf des pH-Wertes und des Redoxpotentials dargestellt. Die erste Phase zeigt zeitlich das Ende der oben beschriebenen Anreicherungsversuche mit mineralischem Medium. Zu erkennen war eine relativ hohe Fluktuation des pH-Wertes innerhalb des Zeitraumes bis zum 25.04.2016, bedingt durch die automatisierte Ein-Punkt-pH-Regelung (Untergrenze pH 7,9). Ab dem 24.06.2016 zeigt sich die Auswirkung der Überarbeitung der pH-Wertsteuerung, welche die Sedimen-

tations- und Befütterungsintervalle berücksichtigt. Dadurch konnte eine sichtbare Stabilisierung des pH-Wertes erzielt werden. Zudem wurde durch den verfahrenstechnischen Umbau der Argon-CO₂-Begasung in den Anammox-Reaktoren als auch durch eine ausreichend lange Begasung des Mediums (ca. 15-20 Min.) eine signifikante Verbesserung des Redoxpotentials und Verschiebung in den negativen mV-Bereich erzielt.

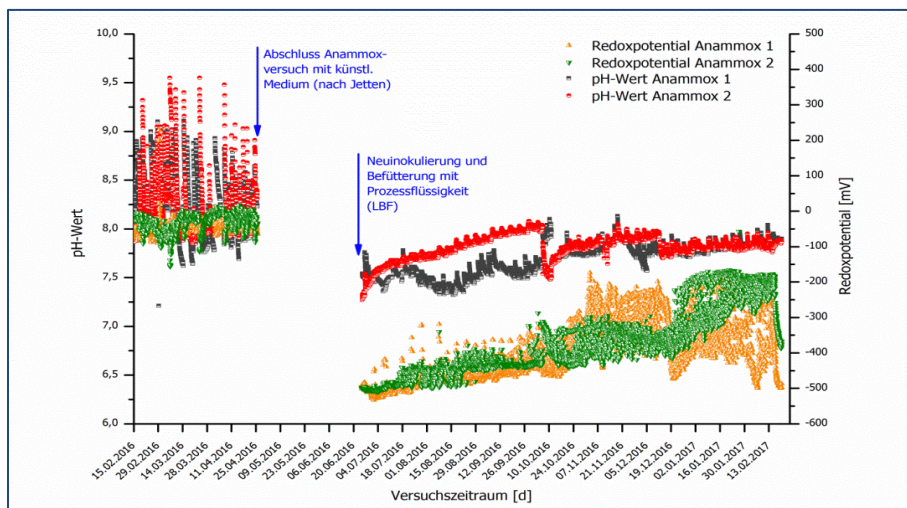


Abb. II.1.4-18: Verlauf des pH-Wertes und des Redoxpotential in Anammox-Reaktor 1 und 2 unter Verwendung eines synthetischen Mineralmediums bis zum 25.04.2016 und einer modifizierten Prozessflüssigkeit des Leachbedfermentationssystems (LBF) ab dem 24.06.2016.

Wie in **Abb. II.1.4-19** bis zum 25.04.2016 erkennbar ist, fand nach der Neuinokulierung am 24.06.2016 eine Anreicherung der NH₄-Konzentration auf ein lokales Maximum im Zeitraum vom 04.07.2016 bis 14.07.2016 statt, welches als residuale, im Anammox-Schlamm ursprünglich enthaltene Ammoniumkonzentration und als Folge der langsamen Adaptionsgeschwindigkeit der Anammox-Bakterien an die im Medium enthaltene Ammoniumkonzentration gewertet werden kann. Dem Maximum folgend war eine stete Abnahme der NH₄-Konzentration in Reaktor 1 und 2 feststellbar.

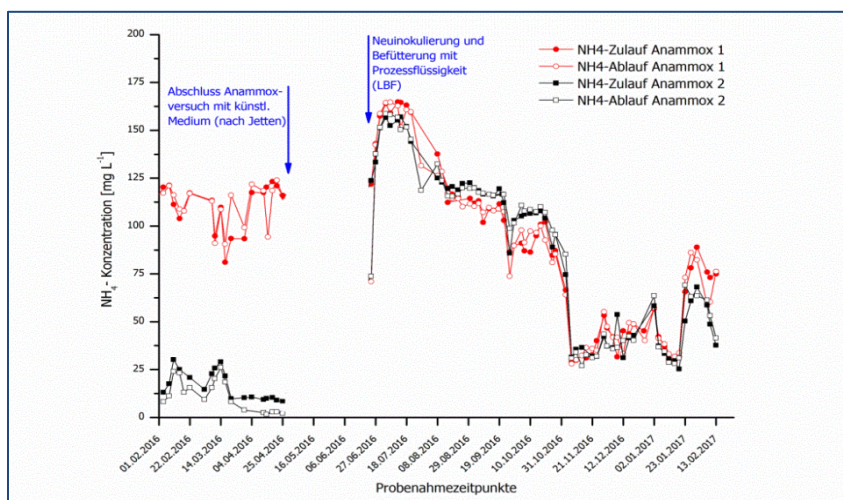


Abb. II.1.4-19: Verlauf der NH₄-Konzentration in Anammox-Reaktor 1 und 2 unter Verwendung eines synthetischen Mineralmediums bis zum 25.04.2016 und einer modifizierten Prozessflüssigkeit des Leachbedfermentationssystems (LBF) ab dem 24.06.2016.

Wie in (Abb. II.1.4-20) dargestellt, war nach der Neuinokulierung am 24.06.2016 zunächst kein NO_2 nachweisbar. Dies kann auf mikrobielle Umsätze zurückgeführt werden, wobei neben Anammox auch Denitrifizierende Bakterien, die im Belebtschlamm enthalten sind infrage kommen. Diese reduzieren in einer anaeroben Atmung NO_2 zu NH_4 und können damit auch zu dem in Abb II.1.4-15 erkennbaren Ammonium-Maximum beigetragen haben. Die mögliche Aktivität der Denitrifikanten ging im weiteren Verlauf zurück, was sowohl von sinkenden NH_4 -Werten als auch an ansteigendem NO_2 , welches nun nicht mehr verbraucht wurde zu erkennen war.

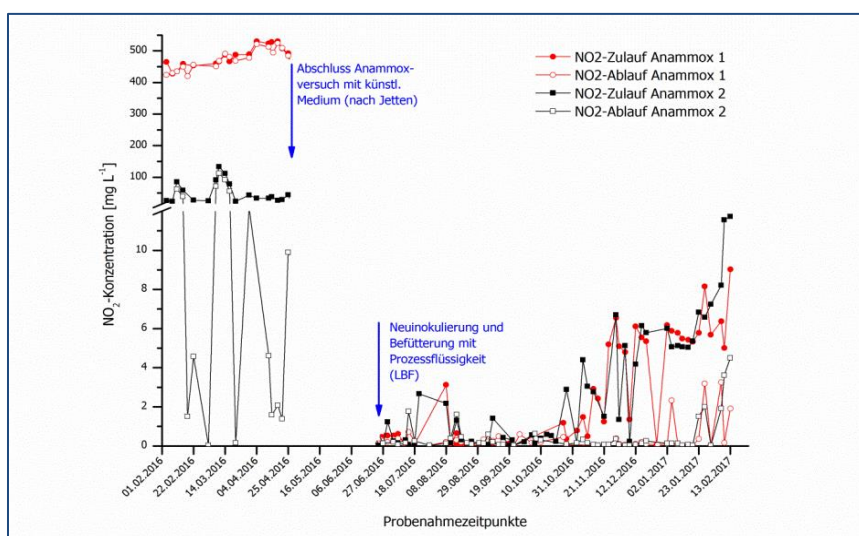


Abb. II.1.4-20: Verlauf der NO_2 -Konzentration in Anammox-Reaktor 1 und 2 unter Verwendung eines synthetischen Mineralmediums bis zum 25.04.2016 und eines Mediums aus modifizierter Prozessflüssigkeit der LBF und SBF ab dem 24.06.2016.

Fazit

Hinsichtlich der Anwendbarkeit des Anammox-Prozesses zur N-Reduktion in Biogasanlagen unter Verwendung der Prozessflüssigkeit ist zusammenfassend festzustellen, dass die Frage nach der Machbarkeit zur Reduktion von Stickstoffverbindungen in der Biogas-Prozessflüssigkeit mithilfe der Anammox-*Planctomyceten* noch nicht abschließend beantwortet werden kann. Zwar gab es durch die Abnahme von Ammonium und Nitrit verfahrenstechnische Hinweise auf Anammox-Aktivität, jedoch kommen hierfür auch andere stickstoffumsetzende Gruppen in Betracht. Die Konkurrenzschwäche und das langsame Wachstum der Anammox-*Planctomyceten* waren hier problematisch.

Die für die Übertragung in die Praxis entscheidende Frage der Verfügbarkeit von NO_2 konnte ebenfalls noch nicht geklärt werden. Dieses durch kontrollierte Oxidation von NH_4 zu erzeugen, ist im streng anaeroben Biogassystem schwer umzusetzen.

Ferner ist der Prozess der anaeroben Ammoniumoxidation mit Blick auf die Zielstellung der Kaskaden- und Koppelnutzung zu hinterfragen, da Stickstoff als Gas in die Atmosphäre entlassen wird und einer stofflichen Nutzung als Düngemittel somit nicht mehr zur Verfügung steht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der angestrebte Einsatz der Anammox-*Planctomyceten* in einer Biogasanlage in einer komplexen Konkurrenzsituation mit anderen Mikroorganismen mündet.

Die Frage nach der Praxistauglichkeit dieser Technologie im Biogasbereich gilt es weiterhin anhand von Versuchen in Praxisanlagen nachzuweisen.

II.1.5 Stickstoffeliminierung durch Strippung

Die initialen Untersuchungen zur Bewertung von Strippeffizienzen bauten auf Forschungsergebnissen vorangegangener Untersuchungen zur Stickstoffentfrachtung auf, die am ATB durchgeführt wurden (Müller, 2011) Bereits vorhandene Systemkomponenten zur Durchführung von Desorptionsversuchen (Strippung) wurden genutzt, erweitert und modifiziert sowie ergänzende Elemente installiert.

Mittels des Versuchsaufbaus (**Abb. II.1.5-1, -2**) wurden initiale Versuche zur Luft- (Konfiguration blau) als auch zur Unterdruckstrippung (Konfiguration rot) durchgeführt mit Fokus auf die Ableitung von prozessrelevanten Parametern für die Erhöhung der Strippeffizienz (pH, Temperatur, Beschickungsvolumen). Zentrales Element des Versuchsaufbaus ist die mit einem Volumen von 30 L dimensionierte, durch einen Wassermantel beheizte Strippkolonne.

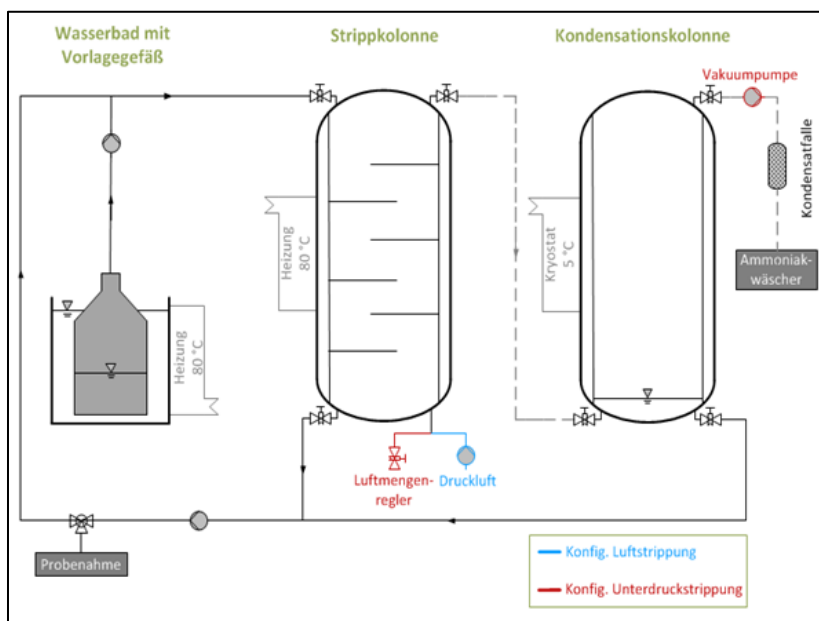


Abb. II.1.5-1: Schematische Darstellung der Testanlage für die Durchführung von Desorptionsvorversuchen zur Luft- und Unterdruckstrippung: Vorlagegefäß, Strippkolonne, Kondensatfang, blau: Konfiguration der Luftstrippung, rot: Konfiguration der Unterdruckstrippung.

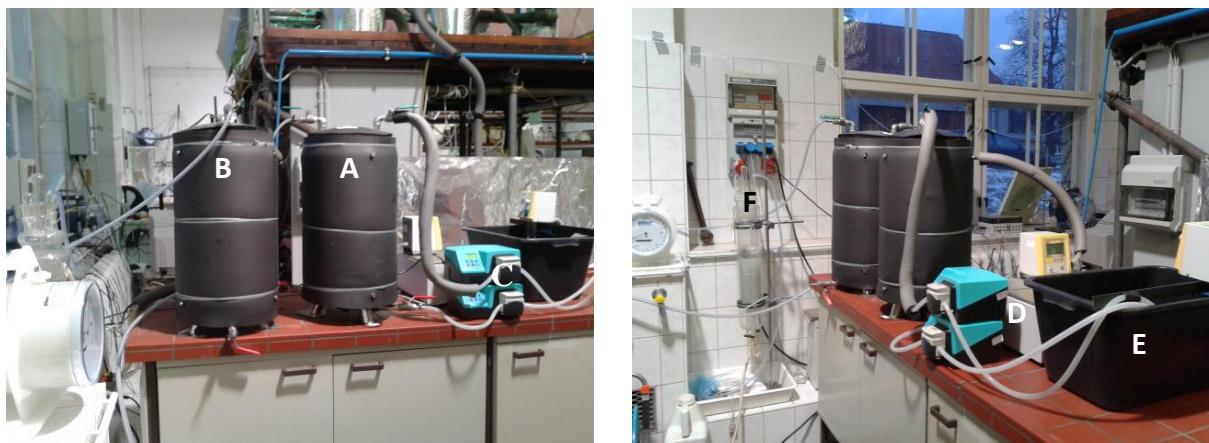


Abb. II.1.5-2: Pilotanlage zur Luft- und Unterdruckstrippung aus zwei verschiedenen Perspektiven (dargestellt: Stripp (A)- und Kondensationskolonne (B), Beschickungspumpen (C), Kryostat (D) und Wärmebad (E); Hintergrund: Säurewäscher zur Rückgewinnung des gasförmigen NH_3 in Form des Wirtschaftsdüngers Ammoniumsulfat (F).

Einzelkomponenten des Versuchsaufbaus zur Luft- und Unterdruckstrippung sind in **Tab. II.1.5-1** zusammengestellt.

Tab. II.1.5-1: Einzelkomponenten des Versuchsaufbaus zur Luft- und Unterdruckstrippung.

Komponente	Typ	Hersteller/Ort
Kolonnen	Edelstahlausführung; 35 l	ATB, Potsdam
Absperrventile	Kugelhahn KH 12 ES; G 1/2"	Landefeld GmbH, Kassel
Heizbad	Wärmethermostat Eco E 20 G	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pumpen	Laborpumpe 323S/D	Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen
Unterdruckpumpe	Mod. 4000482	Ilmvac GmbH, Ilmenau
Verschlauchung	Tygon Flexible	Saint-Gobain Performance Plastics, Courbevoie (FR)
Gassammlung	TECOBAG 50 l	Tesseraux gmbh, Bürstadt
Trommelgaszähler	TG 3 (Kunststoff)	Dr.Ing. Ritter GmbH & Co. KG, Bochum
Flowmeter	100 G/H	Brooks Instrument, Veenendaal (NL)
pH, LF, T-Messgerät	pH/COND 340i	WTW GmbH, Weilheim
Sonde pH	SenTix 41	WTW GmbH, Weilheim
Sonde Leitfähigkeit	TetraCon 352	WTW GmbH, Weilheim
NH_4 -Analytik	Gerhardt Vapodest VAP 20	Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter

Zur Steigerung der Kontaktzeiten zwischen dem Trägergas und der Stickstoff entfrachtenden Prozessflüssigkeit wurden innerhalb der Strippkolonne Zwischenböden in Form einer Plattenkolonne installiert. Die Beschickung der Strippkolonne erfolgte mit einer synthetisch hergestellten Ammoniumcarbonatlösung (**Tab. II.1.5-2**) von oben, die Einbringung der Druckluft von unten.

Tab. II.1.5-2: Eingangsparameter der Vorversuche zur Luftstrippung ohne Kondensatrückführung in die Strippkolonne, T: Temperatur V: Volumen.

Lösung	T _{Vorlage & Kolonne} [°C]	V _{Luft} [L/h]	V _{Vorlauf} [L/h]	V _{Rücklauf} [L/h]
Ammoniumcarbonatlösung (V = 1,5 L; $c_{\text{NH}_4^+} \approx 4 \text{ g/L}$)	80	2600 - 3500	8,5	8,5

Die Kondensation des mit Wasserdampf angereicherten Ammoniaks (NH_3) und Trägergases erfolgte in einer nachgeschalteten Kondensationskolonne, deren Reaktionsraum konstant auf 5°C temperiert wurde. Das derart konditionierte Gas konnte auf den abschließenden Gaswäscher geleitet werden.

Vorversuche zur Stickstoffelimination ohne Kondensatrückführung

Erste Vorversuche zur Luftstrippung erfolgten ohne Rückführung des in der Kühlkolonne (Abb. II.1.5-1, -2) anfallenden NH_3 -angereicherten Kondensats in die Strippkolonie. Sie zeigten, dass gemäß der aufgeführten Versuchsbedingungen (Tab. II.1.5-2) bis zu 99 % des Ammoniumstickstoffs ($\text{NH}_4\text{-N}$) aus einer synthetisch hergestellten Ammoniumcarbonatlösung eliminiert und als gasförmiges $\text{NH}_3\text{-N}$ in die Gasphase überführt werden konnten (**Abb. II.1.5-3**).

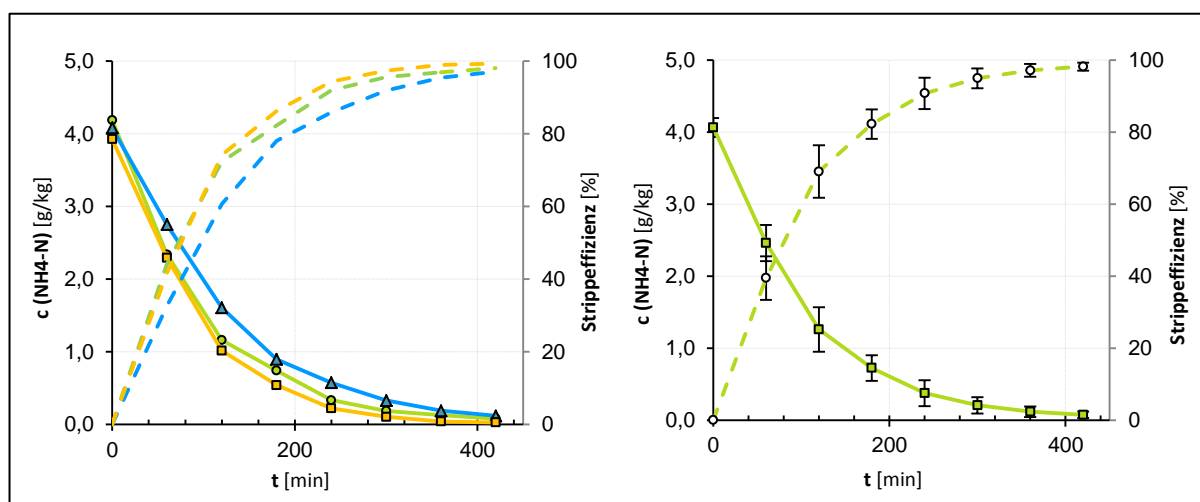


Abb. II.1.5-3: Ergebnisse zur Luftstrippung ohne Kondensatrückführung. **Links:** Zeitlicher Verlauf der Ammoniumkonzentration der gestrippten Standardlösung. **Rechts:** mittelwertbasierende Zusammenfassung der drei Versuchsreihen.

Die im Anschluss an die Versuche ohne Kondensatrückführung durchgeführte Bilanzierung der Volumenströme zeigte, dass ausschließlich 20 – 30 % des ursprünglichen Vorlagevolumens (1,5 L) für eine rezirkulierende Stickstoffentfrachtung zurückgewonnen werden konnten, während 60 - 70 % der Standardlösung in der Kühlkolonne ungenutzt als Kondensat verblieb. Etwa 10 - 15 % der Ammoniumcarbonatlösung wurden über die Kühlkolonne hinaus mit dem Gasstrom ausgetragen. Nach Zusammenführung der gestrippten Ammoniumcarbonatlösung mit der auskondensierten stickstoffreichen Flüssigkeit in der Kondensatkolonne stellte sich eine Rest-Ammoniumkonzentration von 1,96 g/L ein. Die daraus abgeleitet kalkulatorische Eliminationsleistung betrug bereits 50 %.

Vorversuche zur Stickstoffelimination mit Kondensatrückführung

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde deutlich, dass eine zusätzliche Behandlung des mit NH_4 angereicherten Kondensats zur Steigerung der Gesamtstrippfizienz notwendig ist. Infolgedessen wurde das System um eine Kondensatrückführung (Einbindung der Kondensatkolonne in den Pumpkreislauf) zur Wiederbehandlung des anfallenden Kondensats ergänzt (Abb. II.1.5-1, -2).

Ferner wurden verschiedene Strategien (Luft- und Unterdruckstrippung) zur Optimierung der Stickstoffentfrachtung entwickelt (**Tab. II.1.5-3**), welche im Dreifachansatz geprüft wurden. Eine Erhöhung der Strippfizienz in Bezug auf Luft- und Unterdruckstrippung wurde im Wesentlichen durch die

Steigerung der Trägergasvolumina bzw. der negativen Druckdifferenz und/oder durch eine Erhöhung der Zulauf- und Rücklaufmengen in die bzw. aus den Strippskolonnen erzielt.

Tab II.1.5-3: Eingangsparameter der Vorversuche zur Luft- und Unterdruckstrippung mit Kondensatrückführung in die Strippskolonne.

AC: Ammoniumcarbonat, t: Zeit, T: Temperatur., p: Druck, V: Volumenstrom

Versuchsreihe	Lösung	t	pH	T Vorlage,	p System	V Luft	Volumen	
		Versuch	Testlsg.	Kolonne			Vorlauf	Rücklauf
		[min]	-	[°C]	[mbar]	[L/h]	lauf [L/h]	
Luftstrippung	1,5 L AC; $c_{\text{NH}_4^+} \approx 4 \text{ g/L}$	420	8,78	80	1013	200 - 890	8,5	8,5
Luftstrippung, optimiert		420	8,78	80	1013	1200	60,5	30,2
Unterdruckstrippung		420	8,78	80	650	1000	36,3	17,0
Unterdruckstrippung optimiert		420	8,78	80	650	1200	60,5	30,2

Das Ergebnis der modifizierten Eingangsparameter (Tab. II.1.5-3) über den sechs- bis siebenstündigen Versuchszeitraum hinweg, ist aus **Abb. II.1.5-4** zu entnehmen. Aufgetragen wurden jeweils die Mittelwerte der im Dreifachansatz durchgeführten Versuchsreihen. Die als Fehlerbalken hinterlegte Standardabweichung wurde als Maß für die Streuung der Ergebnisse hinzugefügt.

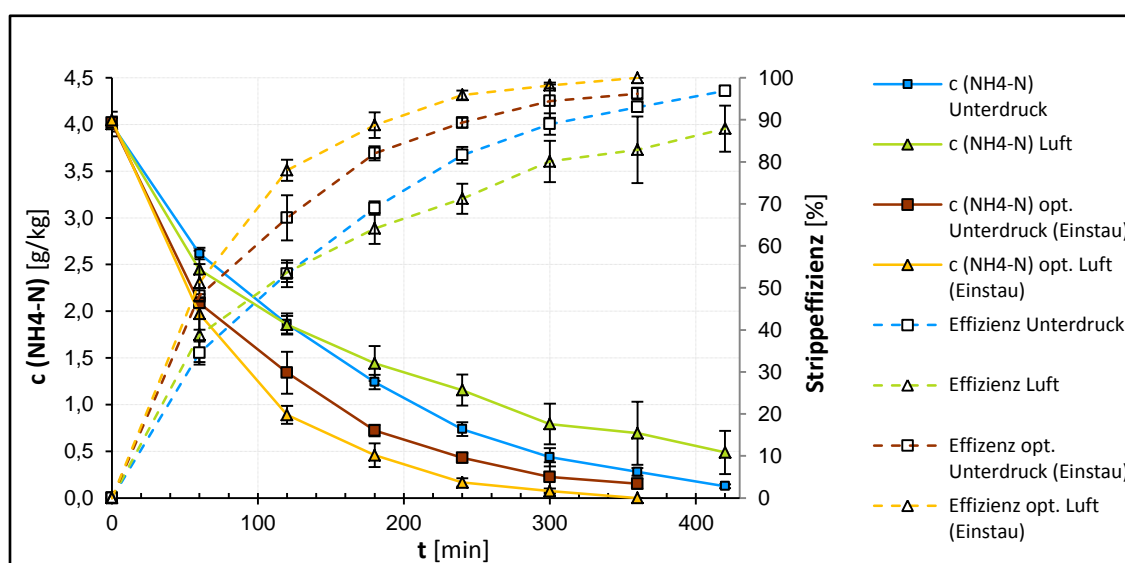


Abb. II.1.5-4: Übersicht erzielter Strippeffizienzen der Vorversuchsreihen zur Luft- und Unterdruckstrippung (opt. = optimiert) mit rezirkulierender Kondensatrückführung. Als NH_4^+ -Quelle diente eine Ammoniumcarbonatlösung.

Es zeigte sich, dass eine Ansammlung von Prozessflüssigkeit (Einstau) in der Strippskolonne (ca. 0,5 L) eine zusätzliche Steigerung der Ammoniumelimination herbeiführte. Dieser Umstand ist auf die längeren Verweilzeiten der Prozessflüssigkeit in der Strippskolonne zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde innerhalb weiterer Testreihen eine gegenüber dem Rücklauf erhöhte Zulaufbeschickung gewählt. Die effizienteste Stickstoffeliminierung konnte mit Luft als Trägergas und zusätzlichem Einstau der Prozessflüssigkeit in der Strippskolonne erzielt werden.

Versuchsreihen mit höheren Beschickungs- und Ablaufvolumina an Prozessflüssigkeit (Tab. II.1.5-3; optimierte Luft- und Unterdruckstrippung), höheren Trägergasmengen sowie mit dem gewählten

Einstau der Prozessflüssigkeit in der Stripppkolonne zeigten die höchsten Eliminationsraten (Abb. II.1.5-4). Als effektivstes Verfahren in Bezug auf eine Ammoniumelimination erwies sich die Luftstrippung unter optimierten Bedingungen (mit Einstau). Dabei wurde die zugeführte Menge an Trägergas von 200 auf 1200 l/h gesteigert (Tab. II.1.5-3). Weiterhin wurde die Beschickungshäufigkeit der Stripppkolonne von einer anfänglich 6-fachen Zirkulation auf eine 42-fache Zirkulation (Faktor 7, auf ca. 60 l/h) erhöht. Die Eliminationseffizienz einer Luftstrippung ohne Kondensatrückführung (Effizienz von 50 %) konnte durch dieses Vorgehen auf 100 % gesteigert werden. Die effizienzsteigernde Wirkung des Einstaus konnte auch durch Versuche zur Unterdruckstrippung belegt werden (Abb. II.1.5-4), wobei der Einstau der Testlösung in der Stripppkolonne zudem zur Erzeugung eines Unterdrucks erforderlich war.

Welcher der drei effizienzsteigernden Parameter (Trägergas, Beschickungsvolumen und Einstau) in welchem Maße zur Erhöhung der NH_4 -Elimination beitrug, konnte anhand der Ergebnisse nicht eindeutig validiert werden. Jedoch konnte ein maßgebender Einfluss der Trägergasvolumina auf die Strippeffizienz konstatiert werden. Im Rahmen der ersten Versuche zur Luftstrippung wurden die zugeführten Gasvolumina von 280 l/h bis 890 l/h zunehmend gesteigert (Tab. II.1.5-3), woraus stets eine Erhöhung der Eliminationsleistung resultierte. Dieser deutliche Zusammenhang zwischen den Parametern Trägergasmenge und Strippeffizienz wurde ferner durch den ausgegebenen Korrelationskoeffizienten ($R^2 = 0,96$) bestätigt (**Abb. II.1.5-5 A**).

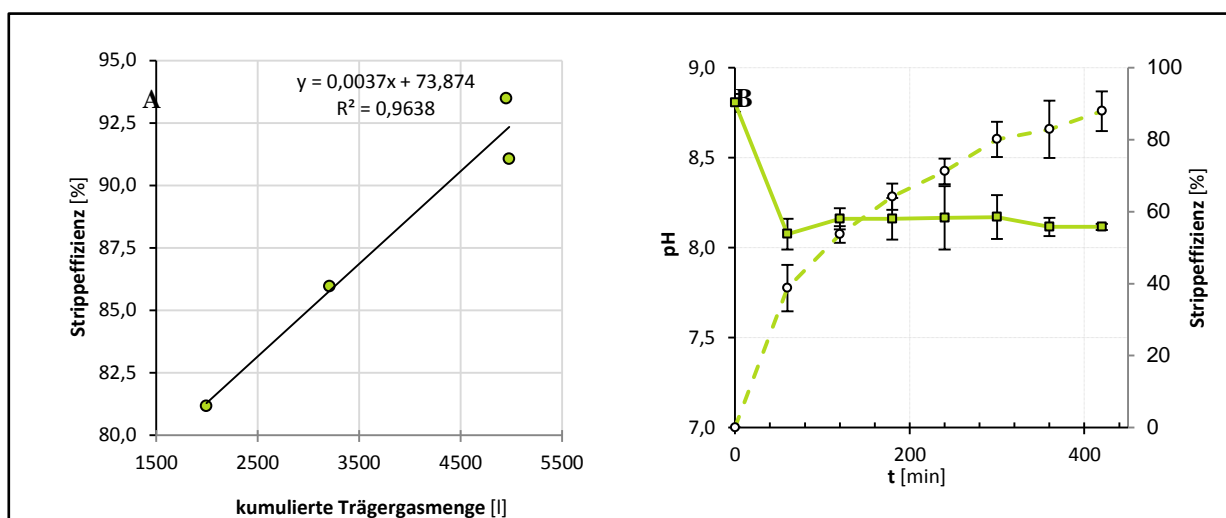


Abb. II.1.5-5: A: Zusammenhang zwischen Trägergasmenge und Strippeffizienz
B: Verlauf des pH-Wertes (durchgängige Kurve) der Versuche zur Luftstrippung (Mittelwerte).

Sowohl die Korrelation zwischen Effizienz und Gasmenge als auch die durch stark variierende Gasvolumina (200-890 l/h, Tab. II.1.5-3) erzielte Streuungen der Ergebnisse zur Luftstrippung (Abb. II.1.5-4), deuteten darauf hin, dass der Trägergasmenge hinsichtlich der Strippeffizienz eine signifikante Bedeutung zukommt.

Mit steigender Trägergasmenge erhöht sich die Strippeffizienz. Ergänzend wurde der zeitliche Verlauf des pH-Wertes am Beispiel der Versuchsreihen zur Luftstrippung dargestellt (**Abb. II.1.5-5 B**). Es zeigte sich, dass der Ausgangswert von pH 8,8 bereits nach 60 min auf ein annähernd konstantes Niveau von 8,1 – 8,2 abfällt. Der anfänglich erhöhte pH-Wert lässt sich dadurch erklären, dass die erste pH-Messung vor Einbringung in die Stripppkolonne bei Raumtemperatur erfolgte. Mit einer

Temperaturerhöhung geht eine Verschiebung des Ammonium-Ammoniak-Gleichgewichtes zugunsten des Ammoniaks einher.

Die Versuchsreihen zur Unterdruckstrippung (Abb. II.1.5-1, - 4, Tab. II.1.5-3) zeigten, gegenüber den Ergebnissen der optimierten Luftstrippung (mit Einstau), vergleichbare Eliminierungsraten von durchschnittlich 96 %. Jedoch wurden diese erst nach einer Versuchsdauer von 420 Minuten erreicht. Die mittels Vakuumpumpe geförderten Luftmengen lagen anfänglich bei ca. 1000 L/h. Zugleich wurde ein Systemunterdruck von 650 mbar eingestellt, was den Übergang des in der Prozessflüssigkeit gebundenen Ammoniums in gasförmiges Ammoniak bei konstanten pH- und Temperaturwerten begünstigen soll. Eine Optimierung der Unterdruckstrippung erfolgte durch eine Steigerung der Trägergasmenge auf 1200 L/h in Verbindung mit einer Verdopplung der Beschickungsrate mit Standardlösung auf 60 L/h (Tab. II.1.5-3).

Ausgehend von diesen Prozessbedingungen konnte eine 96 %ige Strippeffizienz bereits nach 360 min erzielt werden. Entgegen den Erwartungen, dass Unterdruck eine signifikante Effizienzsteigerung bewirkt, erwies sich die Unterdruckstrippung im Vergleich zur Luftstrippung als geringfügig leistungsschwächere Desorptionsvariante. Aufgrund dieser Tatsache und angesichts eines geringeren verfahrenstechnischen Aufwands, wurde zunächst die Luftstrippung als Vorzugslösung für den Bau prozessoptimierter Kolonnen bevorzugt. Diese wurden für weiterführende Versuche zur Entfrachtung der Prozessflüssigkeit gegenüber Ammoniumstickstoff in das zweistufige und zweiphasige Leach-Bed-Fermentersystem (Fermentationshauptsystem) (Abb. II.1.5-6) genutzt.

Der Aufbau der Kolonnen kann in drei Segmente unterteilt werden (Abb. II.1.5-6), welche unterschiedliche Funktionen während des Desorptionsprozess erfüllen.

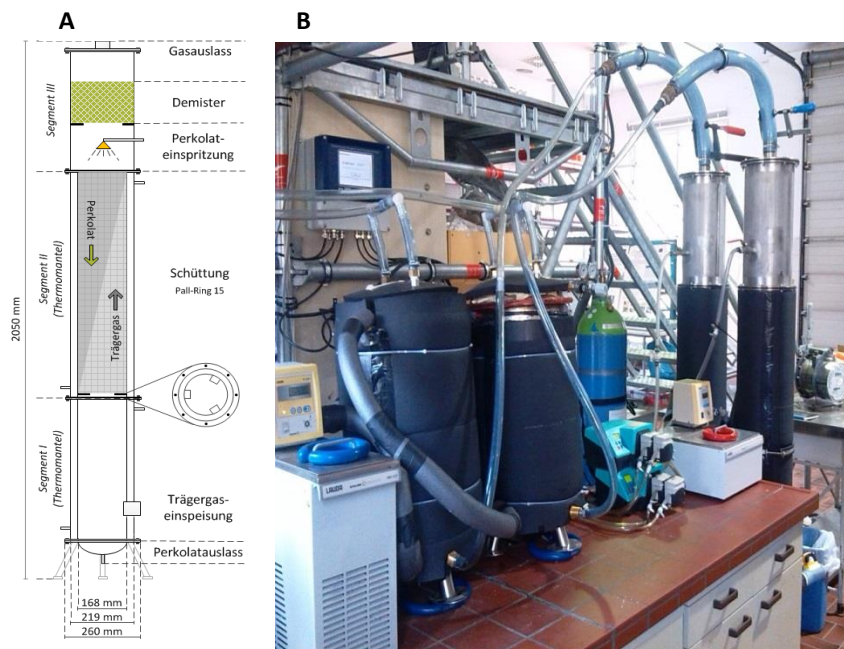


Abb. II.1.5-6: **A:** schematische Darstellung der für Stripppversuche dimensionierten Entfrachtungskolonnen. **B:** Versuchsaufbau im Biogastechnikum. (Vordergrund: Kühl- bzw. Kondensationskolonnen zur Rückgewinnung anfallenden Kondensats. Rechts: redundant betriebene Stripppkolonnen, die über Schlauchverbindungen mit den Kühlkolonnen verbunden sind)

Konstruktion, Dimensionierung und Bau der Strippkolonnen

Für die Dimensionierung von Strippkolonnen, angepasst an die zweistufigen/zweiphasigen Fermentationssysteme, wurden zunächst die prozessrelevanten Eingangsparameter identifiziert und darauf aufbauend essentiellen Bemessungsgrößen abgeleitet. Anhand der Eingangswerte (**Tab. II.1.5-4**) und unter Verwendung zweier Dimensionierungsprogramme (Raschig GmbH, Ludwigshafen; Vereinigte Füllkörper-Fabriken GmbH & Co. KG, Ransbach-Baumbach) wurden die Kolonnen dimensioniert.

Tab. II.1.5-4: Programmgestützte Ausgabewerte der Kolonnendimensionierung.

Parameter (Software)	Einheit	Ausgabewert Raschig	Ausgabewert Winsorp	Ausgabewert VFF (Desorption)
Flutfaktor	%	13,30		12,02
Spezifischer Druckverlust	Pa/m	27,2		36,1
Druckverlust	Pa	20,0		30,1
Spezifischer Flüssigkeitsholdup	m ³ /m ³	0,0080		0,0133
Gesamtzahl Transfereinheiten (Flüssigphase) NTU _{OL}	-	2,802		2,807
Gesamthöhe Transfereinheiten (Flüssigphase); HTU _{OL}	mm	220		297
Gesamthöhe Transfereinheiten (Gasphase); HTU _{OG}	mm	800		1040
Packungshöhe	mm	790		830

NTU ... number of transfer units, HTU ... height of one transfer unit, OL ... overall liquid, OG ... overall gas

Zentrales Element zur Berechnung der Kolonnen-Leistungsfähigkeit ist die aus einer losen Schüttung bestehende Füllkörperpackung, die die Kontaktzeit und Kontaktfläche zwischen Flüssigmedium und Trägergas erhöht. Es erfolgte die Einteilung in sogenannte Transfereinheiten, deren Dimensionen sich aus den in **Tab. II.1.5-5** aufgeführten Eingangsparametern ableiten lassen.

Tab. II.1.5-5: Bemessungsparameter der Kolonnendimensionierung.

	Parameter	Einheit	Wert
Perkolat	Volumenstrom	m ³ /h	0,02
	Betriebsdichte	kg/m ³	983,2
	Molmasse	kg/kmol	18,0153
	Viskosität	mPa*s	0,466
	Oberflächenspannung	mN/m	66,24
	Konzentration (Input)	mg/L	5000
	Konzentration (Output)	mg/L	500
	Temperatur	°C	60
Gas (Luft)	Volumenstrom	m ³ /h	20
	Betriebsdichte	kg/m ³	1,1894
	Molmasse	kg/kmol	28,9613
	Viskosität	mPa*s	0,01823
	Konzentration (Input)	mg/m ³	0
	Konzentration (Output)	mg/m ³	4500
	Temperatur	°C	20
Absorbend (NH ₃)	Molmasse	kg/kmol	17,03
	Henry-Konstante	bar	4,715
	Theoret. Mindestgasmenge	m ³ /h	5
	Stripping-Faktor	-	3,548
	Diffusionskoeffizient Gas	m ² /s	2,36 e ⁻⁵
	Diffusionskoeffizient Flüssigkeit	m ² /s	4,18e ⁻⁹
Kolonne	Kolonnendurchmesser	m	0,15
	Füllkörper	-	Pall-Ring 15 (Plastik)
	spezif. Oberfläche	m ² /m ³	350
	Lückengrad	m ³ /m ³	0,88

Die Packungshöhe und somit die Höhe der Schüttung ergibt sich aus dem Produkt der Höhe und Anzahl der Transfereinheiten der Flüssigphase, ergänzt um den notwendigen Sicherheitsfaktor von 1,25. Entsprechend der Ausgabewerte zur Kolonnendimensionierung (Tab. II.1.5-4) wurde eine Packungshöhe von 810 mm gewählt, welche sich aus dem Mittelwert der Festbetthöhen beider Dimensionierungsprogramme ergibt.

Das unterste Segment (Segment 1) verfügt über einen Klöpperboden und fungiert als Kolonnensumpf, in welchen sich die nach der Füllkörperpassage abgereicherte Prozessflüssigkeit sammelt und über ein Auslassventil aus der Kolonne abgeführt wird. Die Trägergaseinspeisung erfolgt über einen 2“-Anschluss nach ca. einem Drittel der Segmentlänge. Um eine von der Fa. Raschig empfohlene Entfernung von 350–400 mm von der Gaseinspeisung zur desorptiv aktiven Zone zu gewährleisten, beträgt die Länge dieses Segmentes (ohne Füße) rund 550 mm. Darauf aufbauend folgt das zweite Segment, welches im Wesentlichen den Dimensionen der darin befindlichen Füllkörperschüttung und des Auflagebodens (strömungsoptimierter Tragrost) entspricht. Die Schüttung besteht aus einer losen Aufhäufung von Kunststoff-Pall-Ringen (Raschig GmbH, Ludwigshafen) mit einem Durchmesser von 15 mm.

Insgesamt weist Segment II eine Höhe von 835 mm auf und ist ebenso wie Segment 1 von einem wassergefüllten Mantel zur Temperierung umgeben. Das anschließende Segment 3 beinhaltet das System zur Perkolateindüsung, welches 80 mm über dem Festbett angebracht wurde, um einen Sprühwinkel von 90° und somit eine gleichmäßige Beaufschlagung der Füllkörperpackung zu gewährleisten. Darüber liegend wurde ein Demister als Tropfenabscheider/Kondensatfang installiert, welcher das mit Wasserdampf angereicherte Gas entfeuchten soll. Das derart konditionierte Gas wird über den am Kopf befindlichen 2“-Auslass der Kühlkolonne zugeführt.

Trotz der Gaskonditionierung innerhalb der Stripppkolonnen mit Hilfe des Demisters zeigten erste Versuche und der dabei auftretende Flüssigkeitsverlust über die Gasphase, dass weiterhin die Notwendigkeit zur Verwendung separater Kondensationskolonnen besteht. Um dies zu gewährleisten, wurden die in Vorversuchen verwendeten Kolonnen baulich angepasst (Einbau von weiteren Zwischenböden, Installation zusätzlicher Anschlüsse) und dem Desorptionssystem nachgeschaltet.

Strippungsuntersuchungen im Leachbedfermentationssystem (LBF IV bis LBF IX)

Bei der Verwendung von Hühnertrockenkot als stickstoffreiches Substrat zur anaeroben Fermentation konnte das verwendete zweistufiges/zweiphasiges Fermentationssystem zur Erhöhung der Prozessstabilität entscheidend beitragen. Insbesondere die Kopplung mit einer Strippungseinheit und somit die Eliminierung des toxischen NH_4/NH_3 führte - durch Verminderung der Stickstofffracht und der daraus resultierenden Säurehemmung – zur einer für den Biogasprozess notwendigen Prozessstabilisierung. Aus verfahrenstechnischer Sicht kann behauptet werden, dass die Integration einer Strippungsanlage in das Fermentationssystem die Aufrechterhaltung einer stabilen Prozessbiozönose protegert.

Die Ergebnisse der Versuchsreihen **LBF IV** bis **LBF IX** der Luftstrippung zur Eliminierung von Ammonium sind in **Abb. II.1.5-7** dargestellt.

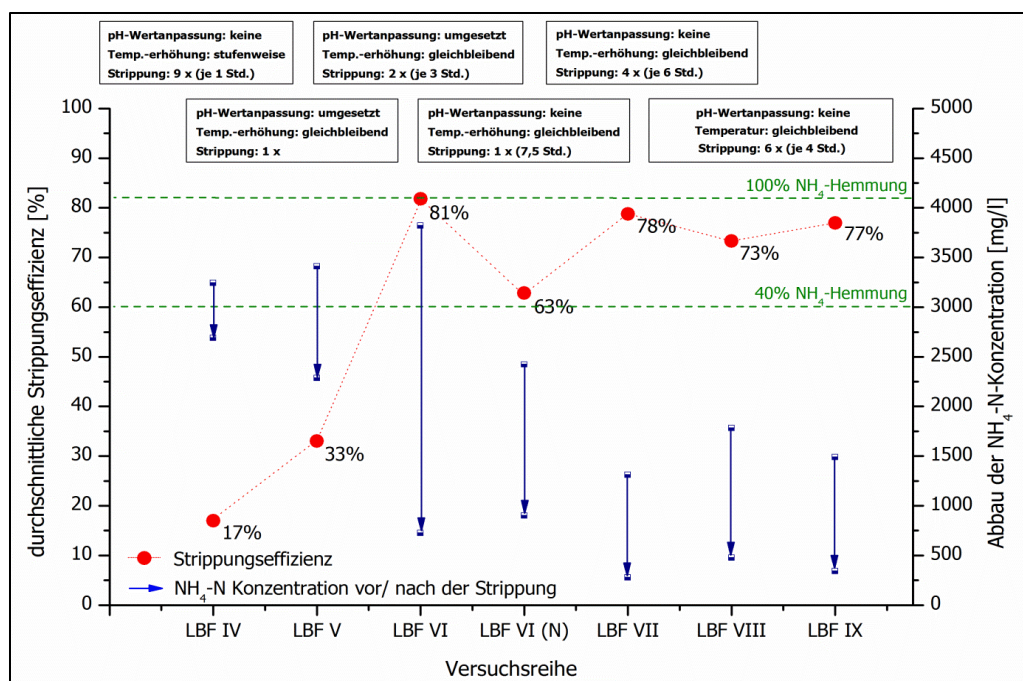


Abb. II.1.5-7: Effizienzen der in Versuchsreihe LBF IV bis LBF IX durchgeführten Luftstrippung zur Eliminierung von NH_4 . **Rot:** maximale Effizienz, **blaue Pfeile:** Anfangs- und Endkonzentration an NH_4 vor bzw. nach der Strippung, **grüne Linien** = Hemmgrenzen der anaeroben Fermentation für die jeweilige NH_4 -Konzentration.

Der Versuch der Untersuchungsreihe **LBF IV** erzielte nach einer stufenweisen Anhebung der Perkolattemperatur von 55°C auf 68°C , dem Verbauen verstopfungsfreier Düsen und neunmaliger Strippung (Strippdauer von ca. 2 h) Abbauraten von maximal 17 % bzw. eine Absenkung der NH_4 -N Konzentration von 3242 mg/L auf 2690 mg/L (Abb. II.1.5-7). Diese Ergebnisse zeigten weiteren Optimierungsbedarf bei der Einstellung prozessbestimmender Parameter. Als Konsequenz wurde neben der Aufrechterhaltung der Prozesstemperatur von 68°C , die Notwendigkeit zur pH-Wert-Erhöhung des Perkolats vor der Strippung abgeleitet.

Im Rahmen der Versuchsreihe **LBF V** erfolgte eine pH-Wertanhebung der Prozessflüssigkeit im Perkolatspeicher von ca. 8,5 auf 10,3 (durch Zugabe einer 10M NaOH-Lösung) bei einer einmaligen 2 stündigen Strippung. Mit diesem Ansatz zur Stickstoffeliminierung konnte die NH_4 -N Konzentration von 3411 mg/L auf 2285 mg/L gesenkt werden, was im Vergleich zu LBF IV einer Verdopplung der Strippungseffizienz entsprach (ca. 31 % gegenüber von 17 %). Eine anschließende pH-Absenkung zur Anpassung der erforderlichen Milieuanpassungen an den biologischen Abbauprozess erfolgte durch die Biogaseinleitung in den Perkolatspeicher. Die dadurch herbeigeführte CO_2 -Zufuhr in die Perkolatflüssigkeit hatte erwartungsgemäß eine Absenkung des Säurepegels zur Folge (pH = 8,5-8,7).

Im Anschluss an den Versuchsdurchlauf LBF V wurde ein Bypass installiert, sodass bei Versuchsreihe **LBF VI** der Anaerobfilter während der Strippung erstmalig vom System vollständig entkoppelt wurde. Zudem wurden zwei Strippversuche durchgeführt. Zunächst wurde der pH-Wert auf 9,8 (1. Strippung) bzw. 11,4 (2. Strippung) im Perkolatspeicher angehoben und anschließend dreimal pro Strippzyklus für je eine Stunde gestrippt, wobei zwischen den Wiederholungen jeweils eine Stunde pausiert wurde. Während dieser Zeit blieb der Anaerobfilter komplett entkoppelt, die Perkolatation lief jedoch weiter, um auf diesem Wege das gesamte im System befindliche Perkolat (excl. dem Perkolat im An-

aerobfilter) einer Strippung zu unterziehen. Diese Methodik erwies sich als besonders effektiv und führte bei Strippungsversuch 1 des LBF VI im Reaktorsystem A zu einer 81 %igen (von 3821 mg/L auf 726 mg/L), in Reaktorsystem B zu einer 79 %igen (3157 mg/L auf 589 mg/L) Eliminierung des in der Flüssigphase befindlichen Ammoniums. Der Versuch 2 zeigte trotz des höheren Start-pH-Wertes eine vergleichbare Strippeffizienz von 81 % (Reaktorsystem A) bzw. 80 % (Reaktorsystem B) (Abb. II.1.5-7).

Um vorangegangenen Überlegungen zum potentiell negativen Einfluss des für eine effiziente Strippung erforderlichen starken pH-Wertwechsels auf die Mikrobiologie aufzugreifen, wurde im Anschluss an den 30-tägigen Fermentationsversuch eine Stickstoffeliminierung ohne Einstellung eines stark basischen Milieus bei unveränderten Temperaturen durchgeführt (LBF VI N, Abb. II.1.5-7). Anstelle eines doppelt durchgeführten Strippungsansatzes für je 3 Stunden mit entkoppeltem Anaerobfilter wurde nur einmal kontinuierlich für 7,5 Stunden gestrippt, jedoch mit am Hauptsystem gekoppeltem Anaerobfilter. Die aus diesem Ansatz resultierende Strippungseffizienz betrug 60 %. Diese Variante stellt einen Kompromiss zwischen biologischer Verträglichkeit und Strippungseffizienz dar, da zum einen keine kostenintensive pH-Wertanpassung erforderlich ist, jedoch mit einer 25 %igen Verschlechterung der Effizienz einhergeht. Ferner wurde in den Langzeit-Strippungsversuchen festgestellt, dass die vergleichsweise kühle Trägergastemperatur (ca. 22°C) nach Einbringung in die heiße Strippkolonne (ca. 82°C) im Verlaufe der Eliminierungsreaktion zu einer Abkühlung der Strippungskolonne auf 76°C führte. Gleichzeitig stieg die Temperatur der Kühlkolonne von 5°C auf 15°C an. Es wurde vermutet, dass durch eine vorherige Erwärmung des Trägergases dem Abfall der Strippungstemperatur entgegen gewirkt und somit die Effizienz von 81 % übertroffen werden kann.

Aufgrund der Annahme eines potentiell negativen Einflusses der pH-Wertanhebung auf die Mikrobiologie, wurden die Strippungen innerhalb den nachfolgenden Versuchsreihen **LBF VII bis IX** ohne Einstellung eines stark basischen Milieus durchgeführt. Ziel des Vorgehens war es, einen Kompromiss zwischen biologischer Verträglichkeit, Strippungseffizienz und Wirtschaftlichkeit zu erreichen. Eine leichte Minderung der Strippungseffizienz um ca. 5 % erschien hierbei vertretbar.

Anhand der Untersuchungsergebnisse der Versuchsreihen LBF VII bis IX konnte festgestellt werden, dass der Einsatz der optimierten, dynamischen Strippungsstrategie zu konstant hohen Effizienzen (> 70 %) hinsichtlich der Eliminierung von NH_4 aus der Prozessflüssigkeit führt. Dieses Ergebnis lies den Schluss zu, dass für eine noch höhere Ammoniumreduktion das im System befindliche Perkolat entweder mehrfach die Kolonnen passieren oder tatsächlich eine pH-Wertanpassung erfolgen muss. Dieser Schlussfolgerung standen jedoch Bedenken entgegen, dass eine mehrstündiger Strippungsprozess, aber auch die Option der für eine effiziente Entfrachtung erforderlichen Einstellung eines stark basischen Milieus, die etablierte Biozönose des Anaerobfilters einem hohen Stress aussetzen könnte. Aus diesen Gründen wurde die Richtlinie abgeleitet, den Anaerobfilter während der Stripppyklen vom Gesamtsystem stets zu entkoppeln.

Ferner wurde zusammenfassend abgeleitet, dass der Einsatz prozesskritischer Substrate wie HTK im zweistufigen und zweiphasigen Fermentationssystem trotz hoher Ammoniumkonzentrationen und auftretender Hemmung durch Übersäuerung eine hohe Robustheit und sehr schnelle Regenerationsfähigkeit besitzt. Als Ursache hierfür sind die Adaptionsfähigkeit der Mikroorganismen im Anaerobfil-

ter in Verbindung mit einer hohen NH_4 -Elimination durch die gewählte Strippungstechnologie und entwickelte Strippungsmethodik zu nennen.

Aus verfahrenstechnischer Sicht zeichnete sich ab, dass die Integration einer Strippungsanlage in das Hauptsystem hinsichtlich des potentiell mikrobiellen Adaptionsvermögens an hohe Ammoniumkonzentrationen entlastend eingesetzt werden kann. Eine möglichst frühzeitige und mehrfache Strippung der Prozessflüssigkeit erwies sich als zielführende Verfahrensstrategie, da anfängliche Hemmungen durch erhöhte NH_4 -Konzentrationen und somit einer beginnenden Akkumulation von NH_4 entgegen gewirkt werden kann. Zudem wurde die Strippungsstrategie dahingehend optimiert, dass ein dynamisches Konzept der Strippung etabliert wurde. Dieses beinhaltet, dass entsprechend der anaeroben Degradation im Biogasfermenter die Strippungshäufigkeit angepasst wird, jedoch gleichzeitig auch die Option einer Strippung bei Überschreiten eines definierten Grenzwertes gegeben ist. Ein solches Vorgehen eignete sich sowohl im batch-betriebenen, wie auch in kontinuierlich betriebenen Fermentationsystemen.

Gegenüberstellung der Luft-, Biogas- und Unterdruckstrippung

Im Rahmen der Untersuchungen zur Reduzierung der NH_4 -Belastungen in der Prozessflüssigkeit wurden die Biogasstrippung und die Unterdruckstrippung unter Verwendung des bestehenden Strippungssystems und des zweistufigen und zweiphasigen Trockenfermentationssystems (LBF) untersucht. **Tab. II.1.5-6** stellt die Prozessbedingungen der verwendeten Strippungsmethoden gegenüber der Luftstrippung als bereits durch vorangegangene Untersuchungen etablierte Strategie zur Eliminierung der Stickstofffrachten dar.

Tab. II.1.5-6: Darstellung der Prozessbedingungen der Luft-, Unterdruck- und Biogasstrippung zur Eliminierung der NH_4 -N-Konzentrationen in der Prozessflüssigkeit des zweistufigen und zweiphasigen Trockenfermentationssystems, Werte wurden in Dreifachbestimmung ermittelt.

Parameter	Luftstrippung	Unterdruckstrippung	Biogasstrippung
Kolonntemperatur: Anfang; Ende	80°C; 74°C	80°C; 70°C	80°C, 80°C
Trägergasvolumen bzw. erzeugter Unterdruck	20 m ³ h ⁻¹	750 mbar – 710 mbar	10 m ³ h ⁻¹ (Var.1); 4 m ³ h ⁻¹ (Var.2)
Strippungsdauer [h]	4	4	4 (Var.1); 1 (Var.2)
Zu- und Rücklaufgeschwindigkeit [rpm]	95; 96	70; 340	95; 96

Innerhalb der Unterdruckstrippung gestaltete sich die Überwindung des erzeugten Unterdrucks zur Rückführung der behandelten Prozessflüssigkeit aus dem Kolonnensumpf als verfahrenstechnisch schwierig. Nur durch eine deutliche Erhöhung der Rücklaufgeschwindigkeit auf 340 rpm in Verbindung mit einem erzwungenen Einstau in der Strippungs- und nachgeschalteten Kühlkolonne konnte eine gleichmäßige Rückführung der Prozessflüssigkeit erreicht werden. Dabei wurde festgestellt, dass der Einstau in Verbindung mit dem anliegenden Unterdruck zu einem verstärktem „Aufkochen“ der Prozessflüssigkeit in der Strippungskolonne führte, was die erreichten Eliminierungseffizienzen erklärt. Gleichzeitig war zu erkennen, dass eine übliche Zirkulation der Prozessflüssigkeit und des anfallenden Kondensates zwischen Perkolatspeicher und Strippungssystem nicht stattfinden konnte, da einerseits der notwendige Unterdruck für die Strippung aufrecht erhalten werden musste und andererseits das LBF-System nicht vollständig evakuiert werden sollte. Ein höherer Unterdruck hätte diese Problematik weiter verstärkt, und eine kontinuierliche Beschickung der Kolonnen verhindert. Zu-

sammenfassend ist die Unterdruckstrippung als problembehaftet bei einem zunehmenden Scale-Up einzustufen. Der notwendige Einstau, die fehlende Rezirkulation des Perkolates mit dem LBF-System und der energetische Aufwand lassen ausschließlich eine Durchführung im batch-Modus zu und erlauben damit keine kontinuierliche NH_4 -Behandlung im laufenden Fermentationsprozess.

Untersuchungen zur Biogasstrippung wurden in zwei Variationen durchgeführt. Begonnen wurde mit einer Biogasstrippung im Kreislaufverfahren. Hierbei passierte das Biogas die Strippungs- und Kühlkolonnen und wurde abschließend in den Gasspeicherbeutel zurückgeführt. Dieser Verfahrensvariante steht die Problematik einer zunehmenden Sättigung (mit NH_3 und Wasserdampf) des im Kreislauf gefahrenen Biogases gegenüber, wodurch Beschränkungen hinsichtlich der Dauer und folglich Effizienz der Biogasstrippung resultieren. In einer zweiten Untersuchungsreihe wurde das Biogas im Durchlaufverfahren durch die Kolonnen geführt, ohne Rezirkulation. Der zweiten Verfahrensvariante stehen als Ausschlusskriterium die Bereitstellung einer großen, im labortechnischen Maßstab nicht zu realisierenden Biogasmenge (mind. 80 m^3 bei einer Strippungsdauer von 4 h) gegenüber. **Tab. II.1.5-7** stellt die durchschnittlichen Strippungseffizienzen der verschiedenen Strippungsformen dar und spiegelt die oben genannten Schwierigkeiten der prinzipiellen Methodik sowie die verfahrenstechnischen Limitationen eines klein-/labortechnischen Versuchsaufbaus wieder.

Tab. II.1.5-7: Darstellung der Anfangs- und Endkonzentrationen sowie der Eliminationseffizienzen der Luft-, Unterdruck- und Biogasstrippung in der Prozessflüssigkeit des zweistufigen und zweiphasigen Fermentationssystems, Mittelwerte aus durchschnittlich drei Wiederholungen

Parameter [Einheit]	Luftstrippung (Vergleichsbasis)	Unterdruckstrippung	Biogasstrippung
Start- NH_4 -N-Konzentration [mg L^{-1}]	$1907,5 \pm 2,5$	$2260,0 \pm 144,0$	$1949,0 \pm 105,5$
End- NH_4 -N-Konzentration [mg L^{-1}]	$852,5 \pm 30,6$	$2010,5 \pm 120,5$	$1802,9 \pm 77,7$
N-Eliminierung [%]	$55,3 \pm 1,1$	$11,0 \pm 0,3$	$7,4 \pm 3,1$

Abb. II.1.5-8 bis -10 zeigen den Verlauf relevanter verfahrenstechnischer Prozessparameter, bei der Monovergärung von Hühnertrockenkot unter thermophilen Prozessbedingungen, im Verlauf dessen die Unterdruckstrippung als Methode zur Eliminierung von Ammonium untersucht wurde.

Untersuchungen zum Anreicherungsverhalten organischer Säuren im Fermentationsverlauf zeigten, dass bis zum Tag 3 bis 4 eine Anreicherung auf bis zu $8,5 \text{ g L}^{-1}$ erreicht wurde (**Abb. II.1.5-8**). Dem Anstieg der organischen Säuren schließt sich ein kontinuierlicher Abfall und damit stetiger mikrobieller Abbau bis zum Ende des Versuchszeitraumes an. Zu bemerken ist, dass sich im Anaerobfilter zum Teil Methankonzentrationen von über 80 % gebildet haben (**Abb. II.1.5-9**). Entsprechend der in Abb. 8 dargestellten Zu- und Abnahme der Essigsäureäquivalente, ist in **Abb. II.1.5-10** ein anfängliches Absinken des pH-Wertes zu bemerken, resultierend aus der raschen Freisetzung organischer Säuren. Aufgrund der zunehmenden Pufferkapazität des im Fermentationsverlauf freigesetzten NH_4 / NH_3 , sowie bedingt durch die einsetzende Konversion der organischen Säuren zu Biogas, ist eine pH-Stabilisierung im Hydrolysereaktor (HR) bei ca. $\text{pH}=7,9$ und Anaerobfilter (AF) bei ca. $\text{pH}=8,1$ zu erkennen. Eine Stabilisierung des pH-Wertes bei $\text{pH} 8,2$ (AF) und $8,4$ (HR) findet ab Tag 12 statt.

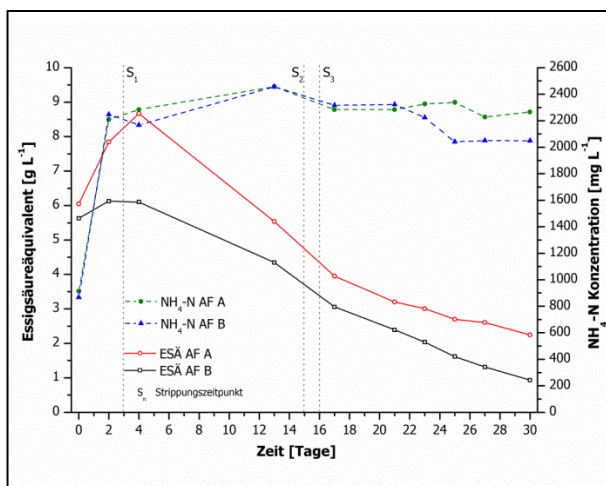


Abb. II.1.5-8: Darstellung der GC-Säuren als Essigsäurereäquivalent und der Konzentration an Ammonium-Stickstoff innerhalb des Versuchs zur zweistufigen und zweiphasigen Trockenfermentation. HR-Hydrolysereaktor, AF Anaerobfilter

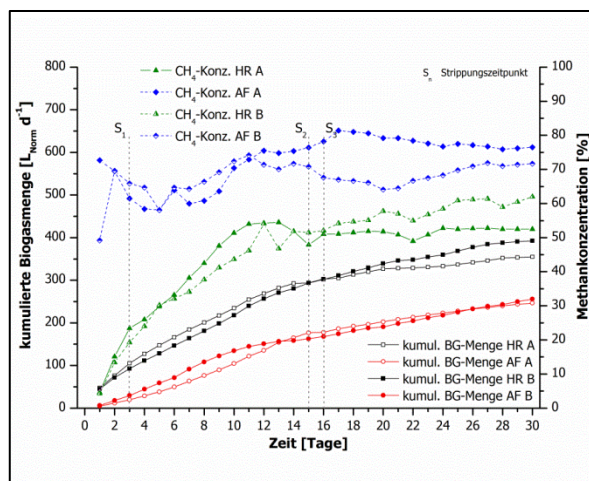


Abb. II.1.5-9: Darstellung der Methankonzentration und zugehörigen Biogasmenge ausgewählter Systemkomponenten innerhalb des Versuchs zur zweistufigen und zweiphasigen Trockenfermentation. HR-Hydrolysereaktor AF-Anaerobfilter

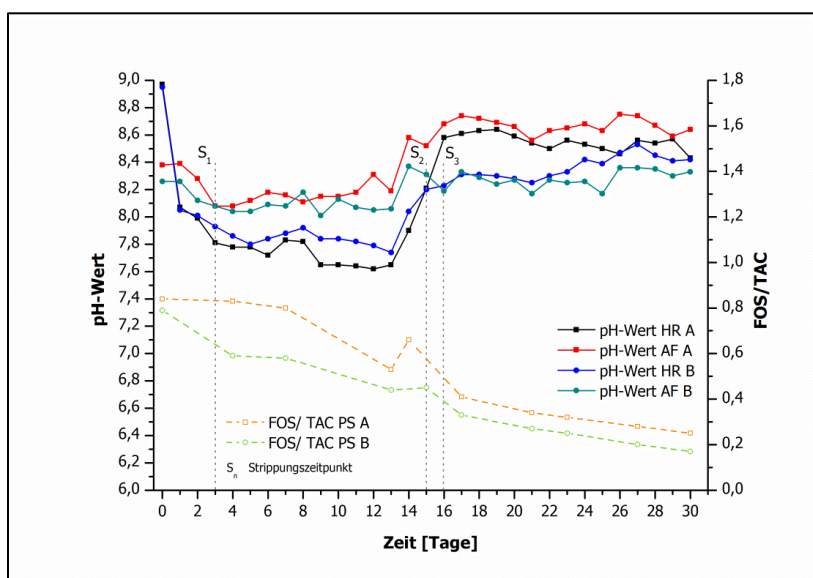


Abb. II.1.5-10: Darstellung der pH-Werte und des FOS/TAC-Wertes ausgewählter Systemkomponenten innerhalb des Versuchs zur zweistufigen und zweiphasigen Trockenfermentation. HR-Hydrolysereaktor AF-Anaerobfilter

Zusammenfassend ist festzustellen, dass keine signifikante Korrelation der Strippung auf die verfahrenstechnischen Prozessparameter (pH, FOS/TAC, ESÄ, Biogasbildung, etc.) des LBF-Systems erkennbar war. Dennoch konnte eine langfristig stimulierende Wirkung der Strippung, durch Verringerung der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration im Fermentationssystem abgeleitet werden. Es ist jedoch zu vermuten, dass die Strippungsmethodik und hierbei insbesondere das pH-Wert- und Temperaturregime sowie die Strippungsdauer maßgeblichen Einfluss auf die physikochemischen Parameter (Quantität und Qualität der organischen Säuren) des Biogasprozesses haben können.

Stickstoffeliminierung im Schwimmbettfermentersystem

Als Methode zur Eliminierung der im Fermentationssystem angereicherten, prozesskritischen NH_4 -Konzentration wurde am 16.10.2015 das etablierte Verfahren der Luftstrippung angewendet. In **Abb. II.1.5-11** ist die Änderung der NH_4 -Konzentration in den Reaktorkomponenten dargestellt. Deutlich ist die höhere Konzentration an NH_4 -N im hyperthermophilen Versuchsansatz. Parallel zur Stripung wurde die Befütterung fortgeführt, mit der Folge, dass die Minderung der NH_4 - und NH_3 -Konzentration abgeschwächt erfolgte.

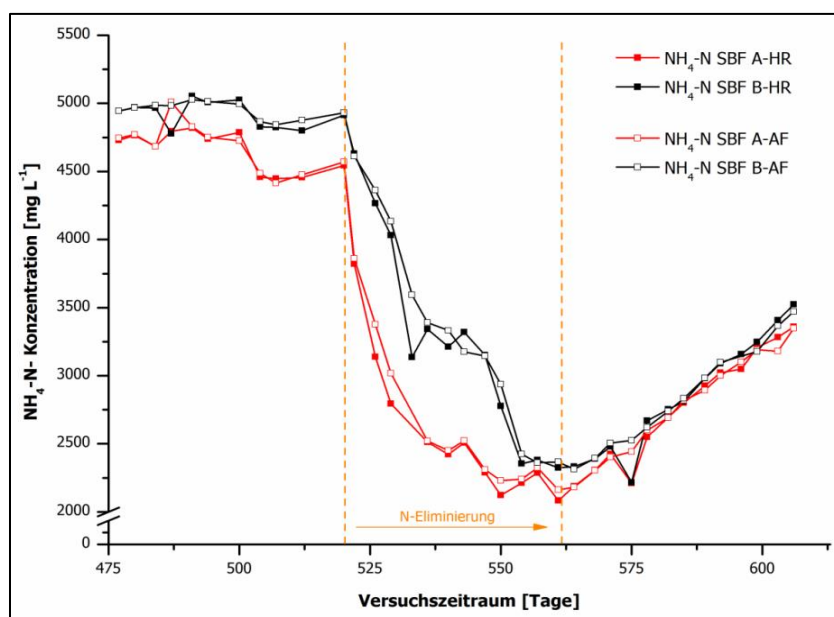


Abb. II.1.5-11: NH_4 -N-Konzentration der Prozessflüssigkeit des thermophilen (SBF A) und hyperthermophilen (SBF B) Schwimmbettfermenters – differenziert nach den Systemkomponenten HR und AF – während der Phase der Stickstoffeliminierung.

Die mittlere NH_4 -N-Eliminationsrate je 4-stündigem Strippungszyklus betrug in Kolonne A ca. 29 % und in B 16 %. Diese verringerte Effizienz begründete sich einerseits in der geringen Temperatur der Prozessflüssigkeit beim Eintritt in die Kolonnen (ca. 45°C im Vgl. zur Temperatur der Prozessflüssigkeit des LBF von ca. 70°C) sowie durch seinen niedrigen pH-Wert von ca. 7,6. Trotz dieser verfahrenstechnisch limitierten Voraussetzungen konnten über den Strippungszeitraum hohe Effizienten erzielt werden. Die prozentuale Eliminierung des in der Prozessflüssigkeit enthaltenen NH_4 -N betrug ca. 70% in SFB B und ca. 62 % in SFB A. Die dargestellte Variation der Eliminationsraten zwischen Kolonne A und B resultierte aus der hohen und stets wiederkehrenden Ablagerung von Struvit im Zu- und Ableitungssystem der Kolonne B, was den raschen Austausch der Prozessflüssigkeit stark bremste. Folglich musste die Stripung des Systems B zur Anpassung des Stickstoffeliminierungsniveaus fortgeführt werden. Ferner ist zu bemerken, dass der verringerte Flüssigkeitsaustausch zwischen Kolonne und Fermentationssystem anteilig in einem Einstau und folglich unerwünschten Aufkochen der Prozessflüssigkeit resultierte.

Der Verlauf der NH_4 -N-Konzentration im Hydrolysereaktor als auch im Anaerobfilter des thermophilen und hyperthermophilen Schwimmbettfermentationssystems war durch eine konstant hohe Konzentration an NH_4 -N ($> 4000 \text{ mg L}^{-1}$) gekennzeichnet, wobei eine tendenziell höhere Konzentration im hyperthermophilen Reaktionssystem festzustellen war (**Abb. II.1.5-12**). Die NH_4 -N-Konzentration

stieg mit der kontinuierlichen Zugabe von Kleegrassilage und Luzerne auf Werte von über 5000 mg L⁻¹ an.

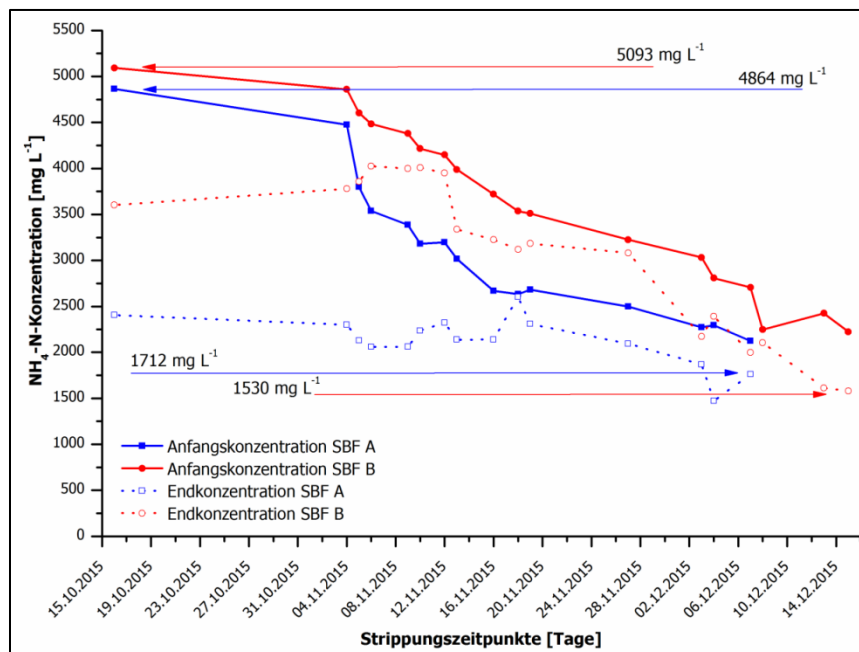


Abb. II.1.5-12: NH₄-N-Konzentration vor und nach der Strippung der Prozessflüssigkeit des thermophilen (SBF A) und hyperthermophilen (SBF B) Schwimmbettfermenters.

Mit Beginn der Luftstrippung und unter Fortführung der Befütterung sank die Ammoniumkonzentration deutlich ab, sodass zum Strippungsende NH₄-N-Konzentration in Höhe von im Mittel 1621 mg L⁻¹ erreicht wurden. Die Verläufe der GC-Säuren - ausgedrückt als Essigsäureäquivalent - belegten eine Anreicherung organischer Säuren auf über 26 g L⁻¹ im hyperthermophilen und 17 g L⁻¹ im thermophilen Hydrolysefermenter. Entsprechend stieg der FOS/ TAC-Wert im hyperthermophilen Reaktionssystem stärker an als im thermophilen System und erreichte bereits frühzeitig Werte > 1,5. Dies bestätigte einerseits den schnelleren Abbau organischen Materials und dessen Konvertierung zu organischen Säuren mit zunehmender Temperatur, jedoch auch andererseits die erhöhte Gefahr einer Hemmung der mikrobiellen Biozönose im hyperthermophilen Temperaturbereich. Trotz verfahrenstechnischer Einschränkungen konnten über den fokussierten Strippungszeitraum hohe Strippungseffizienten erzielt werden. Die prozentuale Eliminierung betrug 70 % (SBF B) und 62 % (SBF A).

Fazit

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Trockenfermentation von prozesskritischen, stickstoffreichen Substraten als Monosubstrat in dem innovativen Schwimmbettfermentationssystem erfolgreich sein und zu hohen Biogaserträgen führen kann, wenn das Fermentationssystem als zweistufiges System ausgelegt und mit einer Strippungsanlage zur Stickstoffeliminierung gekoppelt wird. Ferner zeigte sich, dass das hyperthermophile System in der gegebenen Konstellation durchaus praktikabel sein kann, jedoch aufgrund höherer Konzentrationen an NH₄-N/ NH₃ sowie an organischen Säuren stärker Auslenkungen ausgesetzt ist. Erneut ist zu betonen, dass die Kopplung mit dem implementierten Strippungssystem, Garant für die langfristig stabile und erfolgreiche Fermentation prozesskritischer Substrate sein kann.

II.1.6 Stickstoffeliminierung durch MAP Fällung

Die MAP-Fällung als ein Verfahren, das hauptsächlich in der Abwasserreinigung zur Rückgewinnung von Phosphor eingesetzt wird, findet im Biogasbereich als Möglichkeit der gezielten Stickstoffentfernung, in Form einer MAP-basierenden Struvitausfällung, bisher wenig Beachtung. Dabei kann das Verfahren auch der Verringerung der Phosphorbelastung in Gewässern und Böden, der Verhinderung von Inkrustationen in Rohrleitungssystemen von Abwasser- und Biogasanlagen sowie der Gewinnung des alternativen Düngemittels *Struvit* dienen. Im Rahmen initialer labortechnischer Versuchsreihen, die vom Hauptprozess der zweistufigen-zweiphasigen Leachbedfermentation entkoppelt waren, erfolgte die Bestimmung grundlegender Parameter der MAP-Gewinnung unter Verwendung des in **Abb. II.1.6-1** dargestellten Versuchsaufbaus. Die Untersuchungen beinhalteten die Variation der folgenden Versuchsparameter (**Tab. II.1.6-1**).



Abb. II.1.6-1: Versuchsanordnung zu vom Hauptprozess entkoppelten Vorversuchen zur MAP-Fällung.

Tab. II.1.6-1: Versuchsparameter der MAP-Fällung im Labormaßstab; FM = Fällungsmittel (MgCl₂ bzw. MgO)

Parameter	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Versuch IV	Versuch V
pH-Wert	9,42	8,60	8,37	8,46	8,76
Phosphorquelle	H ₃ PO ₄ (85%)	(NH ₄) ₂ PO ₄	H ₃ PO ₄ (85%)	H ₃ PO ₄ (85%)	H ₃ PO ₄ (85%)
Menge [g/L]	3,77	1,33	3,77	11,32	3,77
Stickstoffquelle	CH ₆ N ₂ O ₂ *CH ₅ NO ₃	(NH ₄) ₂ PO ₄	CH ₆ N ₂ O ₂ *CH ₅ NO ₄	CH ₆ N ₂ O ₂ *CH ₅ NO ₃	CH ₆ N ₂ O ₂ *CH ₅ NO ₃
Menge [g/L]	4,00	1,33	12,00	4,00	4,00
Magnesiumquelle	MgCl ₂ *6H ₂ O	MgCl ₂ *6H ₂ O	MgCl ₂ *6H ₂ O	MgCl ₂ *6H ₂ O	MgO
Menge [g/L]	14,28	6,66	14,28	14,28	2,11
pH-Puffer	NaOH (1 M)	NaOH (1 M)	NaOH (1 M)	NaOH (1 M)	NaOH (1 M)
Menge [g/L]	6,67	13,33	-	46,67	-
Versuchsdauer [min]	30	30	30	30	30
molares Verhältnis (Mg : NH ₄ : PO ₄)	1:1:1	1,5:1:1	1:3:1	1:1:3	1:1:1

In den primären Versuchsreihen zur MAP-Präzipitation wurde der pH-Wert in Anlehnung an relevante Literatur zwischen 8,0 – 9,5 eingestellt (Montag, 2008). Obwohl ein molares Verhältnis der Hauptkomponenten Magnesium:Ammonium:Phosphor von 1:1:1 als optimal für die Fällung bei kommunalen Abwasseranlagen beschrieben wurde (Montag, 2008), erfolgte innerhalb dieser Studie eine Überdosierung der einzelnen Komponenten (Tab. II.1.6-1), um deren Einfluss auf den bisher wenig beschriebenen mit Stickstoff eutrophierten Gesamtprozess zu beurteilen.

Die notwendigerweise zur Anhebung des pH-Wertes deutlich höhere NaOH-Zugabe bei Verwendung von $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (Versuch II) als Phosphorquelle kann zwei Ursachen haben. Einerseits ist mit einer möglichen Bildung von HCl im Verlauf der Protonierung des H_2O zu rechnen, andererseits könnte NaOH mit NH_4 unter Bildung von NH_3 und H_2O zum Verbrauch von NaOH beigetragen haben. Dabei ist zu vermerken, dass die Freisetzung von NH_3 in einer Verschiebung der molaren Verhältnisse zugunsten von Magnesium und Phosphor resultiert. Nach einem Versuchsintervall von 0,5 bis 2 Stunden konnte eine Formation ausschließlich dendritischer MAP-Kristallstrukturen detektiert werden (Gerovac & Gerovac, 2008). Die für *Struvit* typisch orthorhombischen Kristallausprägungen wurden kaum vorgefunden (**Abb. II.1.6-2, Abb. II.1.6-3**).

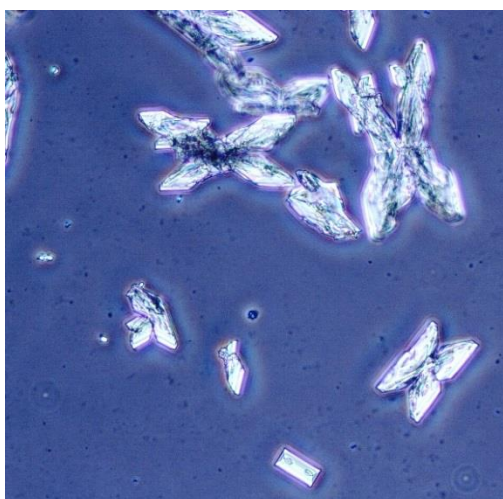


Abb. II.1.6-2: Mikroskopische Aufnahme (Durchlicht) dendritischer Kristallstrukturen (oben); „sargdeckelähnliche“ orthorhombisch Kristallstruktur (unten); 100-fache Vergrößerung



Abb. II.1.6-3: Mikroskopische Aufnahme (Durchlicht) dendritischer Kristallstrukturen; 200-fache Vergrößerung

Es kann vermutet werden, dass im Labormaßstab die Reaktionszeit einen weitaus wichtigeren Einfluss auf die Geometrie der gebildeten MAP-Kristalle (persönliche Kommunikation, Dr. Lengemann, Leiter der MAP-Anlage, Berliner Wasserwerke) hat, als bisher angenommen. Schnellere Reaktionsgeschwindigkeiten scheinen dendritische Ausbildungen zu begünstigen. Auch das zugefügte Ammoniumsulfat scheint durch die Freisetzung zusätzlicher Ammoniak-Ionen die Beschleunigung der MAP-Fällung und somit auch die Formation dendritischer Strukturen zu protegieren.

Weiterführende Untersuchungen zur MAP-Fällung fokussierten auf den Einfluss der MAP-Fällungsdauer auf die Effizienz der Präzipitation. Ferner wurde innerhalb weitestgehender Untersuchungen auf die Optimierung der molaren Verhältnisse der Hauptkomponenten Mg , NH_4^+ und PO_4^{3-} unter Verwendung eines synthetischen Mediums sowie einer Prozessflüssigkeit des zweistufigen und zweiphasigen Trockenfermentationssystems im batch- und kontinuierlichen Betrieb orientiert (**Tab. II 1.6-2**). Wie festgestellt wurde, sind die Komponenten Mg^{2+} und PO_4^{3-} sowohl im kontinuierlich betriebenen Trockenfermentationssystem als auch im batch-Betrieb um den Faktor von mindestens 50 unterhalb der Konzentration des ermittelten $\text{NH}_4\text{-N}$. Folglich wurde basierend auf dem als optimal festgestellten, molaren Verhältniss von 1: 1: 1,3 ($\text{NH}_4 : \text{Mg} : \text{PO}_4$) die Fällungsreaktion durch die Zugabe von MgO bzw. MgCl_2 in nachfolgenden Versuchsreihen initiiert. Die Untersuchungen

basierten initial auf der Verwendung einer Ammoniumcarbonatlösung, welcher die verbleibenden Komponenten zugesetzt wurden.

Tab. II.1.6-2: Startwerte der zur MAP-Fällung verwendeten Prozessflüssigkeiten der Trockenfermentationssysteme im batch- (LBF) und im kontinuierlichen Betrieb (SBF).
Werte sind Mittelwerte (n=4) \pm Standardabweichung *' verweist auf Schwankungen größer als Mittelwert.

Substrat	NH ₄ -N [mg L ⁻¹]	Mg ²⁺ [mg L ⁻¹]	PO ₄ ⁻ [mg L ⁻¹]
Rindergülle	1370,25 \pm 123,6	1,60 \pm 0,6	570,0 \pm 8,5
Prozessflüssigkeit SBF	3343,00 \pm 237,0	7,89 \pm 4,1	44,64 \pm 0,8
Prozessflüssigkeit LBF	1785,00 \pm 496,4	18,88 \pm 0,04	23,52*

Tab. II.1.6-3 zeigt die Startbedingungen und -werte bei Verwendung des synthetisch erzeugten Mediums unter Variation der Konzentrationen der jeweiligen drei Komponenten.

Tab. II.1.6-3: Startwerte der MAP-Fällung hinsichtlich NH₄-N, Mg und PO₄ sowie der Reaktionstemperatur und des verwendeten Wassers.

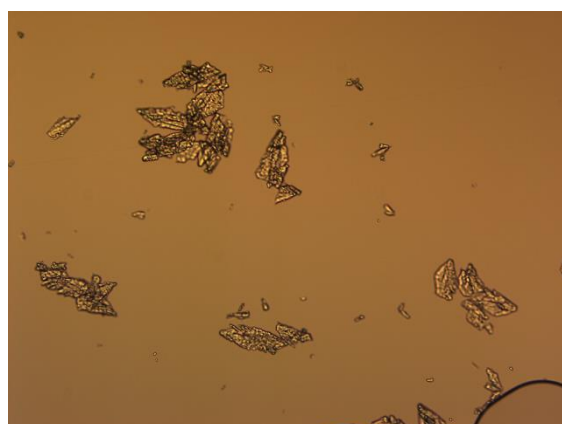
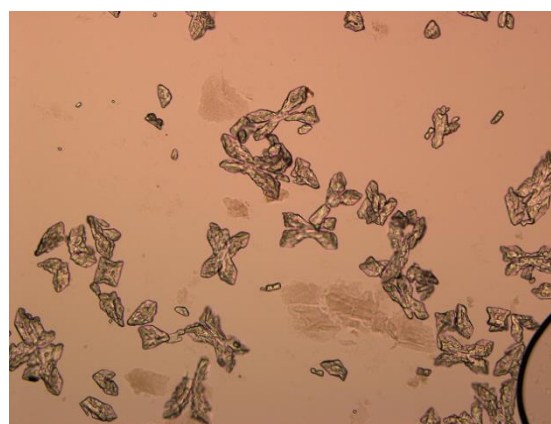
Probebezeichnung	NH ₄ -N [mg/l]	Mg ²⁺ [mg/l]	PO ₄ -P [mg/l]	Temperatur [°C]	Wasser- aufbereitung
1_MgCl ₂	1299.0	2430.5	3097.4	22	destilliert
2_MgCl ₂	2598.0	4861.0	6194.8	22	destilliert
3_MgCl ₂	1299.0	2430.5	3097.4	55	deionisiert
4_MgCl ₂	2598.0	4861.0	6194.8	55	deionisiert
5-A_MgCl ₂	1299.0	2430.5	3097.4	22	deionisiert
5-B_MgCl ₂	1299.0	2430.5	3097.4	22	deionisiert
6-A_MgCl ₂	1299.0	2430.5	3097.4	55	destilliert
6-B_MgCl ₂	1299.0	2430.5	3097.4	55	destilliert
7-A_MgO	1299.0	2430.5	3097.4	22	destilliert
7-B_MgO	1299.0	2430.5	3097.4	22	destilliert
8-A_MgO5	1299.0	2430.5	3097.4	55	destilliert
8-B_MgO	1299.0	2430.5	3097.4	55	destilliert
9_MgO	1299.0	2430.5	3097.4	27	destilliert
10_MgCl ₂	1299.0	2430.5	3097.4	27	destilliert

In **Tab. II.1.6-4** sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihen dargestellt. Es wurde festgestellt, dass sich insbesondere die Eliminierung des in hohen Konzentrationen vorliegenden NH₄-N als kritisch gestaltet, da eine Ausfällung der Komponenten Mg²⁺ und PO₄³⁻ bereits in einem Zeitraum von unter einer Stunde erfolgte. Die in Konkurrenz zum anvisierten Fällungsprodukt MAP auftretenden Produkte waren Neuberyit (MgHPO₄·3H₂O) und Hydroxylapatit (Ca₅[OH(PO₄)₃]). Aufgrund dessen fand eine Reduzierung der Verfügbarkeit von Magnesium und Ortho-Phosphat statt, was eine Verminderung der im weiteren Reaktionsverlauf stattfindenden Ausfällung von Ammonium in Form von MAP bedingte. Ferner konnten die Parameter Temperatur, pH-Wert sowie Fällungsmittel und Prozessdauer als den Fällungsprozess beeinflussend identifiziert werden.

Tab. II.1.6-4: Effizienz der MAP-Fällung hinsichtlich $\text{NH}_4\text{-N}$, Mg und PO_4 in Abhängigkeit der Temperatur.

Probe	Temperatur °C	$\text{NH}_4\text{-N}$ [mg/l]	Mg^{2+} [mg/l]	$\text{PO}_4\text{-P}$ [mg/l]	$\text{NH}_4\text{-N}$	Mg^{2+}	$\text{PO}_4\text{-P}$
					Effizienz der Entfernung [%]	Effizienz der Entfernung [%]	Effizienz der Entfernung [%]
1_MgCl ₂	22	587.9	112.4	3.94	54.7	95.4	99.9
2_MgCl ₂	22	597.1	219.3	2.72	77.0	91.0	99.9
3_MgCl ₂	55	220.1	179.9	14.24	83.1	92.6	99.5
4_MgCl ₂	55	105.0	78.76	8.11	96.0	96.8	99.7
5-A_MgCl ₂	22	316.7	151.4	4.52	75.6	93.8	99.9
5-B_MgCl ₂	22	252.0	26.7	14.61	80.6	98.9	99.5
6-A_MgCl ₂	55	100.8	79.51	8.25	92.2	96.7	99.7
6-B_MgCl ₂	55	213.6	143.6	2.34	83.6	94.1	99.9
7-A_MgO	22	360.0	0.7	654.0	72.3	100.0	78.9
7-B_MgO	22	376.0	0.7	654.0	71.1	100.0	78.9
8-A_MgO5	55	480.0	2.4	1100.0	63.0	99.9	64.5
8-B_MgO	55	422.0	2.5	888.0	67.5	99.9	71.3
9_MgO	27	507.4	1.0	633.0	60.9	100.0	79.6
10_MgCl ₂	27	262.7	43.5	18.6	79.8	98.3	99.4

Mikroskopische Untersuchung (**Abb. II.1.6-4, -5**) der Fällungsprodukte zeigen, dass deutliche Unterschiede hinsichtlich des Erscheinungsbildes und der Größe der bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen und variierenden, initialen Konzentrationen gebildeten Kristalle auftreten. Diese Erkenntnis ist in Einklang mit wissenschaftlichen Untersuchungsergebnissen nach Babić-Ivančić et al. (2002). Bei einer Temperatur von 22°C sind gehäuft kleine, irregulär oder lanzettlich geformte Strukturen anzutreffen. Hingegen treten bei 55°C Reaktionstemperatur zumeist dendritische, schmetterlingsförmige Kristallstrukturen auf. Die Größe der detektierten Kristalle ist entsprechend Münch & Barr (2001) an die Reaktionszeit des Fällungsprozesses gekoppelt.

**Abb. II.1.6-1:** 100-fache Vergrößerung des Präzipitationsproduktes unter Verwendung von MgCl_2 als Fällungsmittel bei 22°C Reaktionstemperatur.**Abb. II.1.6-5:** 100-fache Vergrößerung des Präzipitationsproduktes unter Verwendung von MgCl_2 als Fällungsmittel bei 55°C Reaktionstemperatur.

Fazit

Es kann zusammengefasst werden, dass die MAP-Fällung ein zeitunkritischer Prozess ist, der unter äquimolaren Verhältnissen in einem definierten Bereich abläuft, dessen Effizienz (Verringerung von $\text{NH}_4\text{-N}$ zwischen 70 % - 80 % in 1 Stunde) über den pH-Wert limitiert und aufgrund bestehender Kon-

kurrenzreaktionen beeinflusst wird. Untersuchungen zur MAP-Fällung unter Verwendung der Prozessflüssigkeit des kontinuierlich betriebenen Trockenfermentationssystems zeigten, dass die hohen Konzentrationen an Calcium ($MW = 24,2 \text{ mg L}^{-1}$ Prozessflüssigkeit) störend auf die Präzipitation von MAP einwirken können. Die festgestellte Störung kann auf einer frühzeitigen Fällung von Calciumphosphat resultieren, infolge dessen Ortho-Phosphat und damit eine wesentliche Komponente der MAP-Fällung eliminiert wird. Entsprechend Marti et al. (2008) wäre zur Vermeidung der Ausfällung des Konkurrenzproduktes Calciumphosphat, eine Verringerung der Retentionszeit des Fällungsprozesses zielführend. Als optimiertes Vorgehen zur MAP-Fällung ist ein pH-Wert zwischen 8,0 und 8,3 zu etablieren. Ferner wurde festgestellt, dass das Fällungsergebnis bei einem stöchiometrischen, molaren Verhältnis von 1:1.08:1.08 am größten ist. Zudem konnte anhand labortechnischer Untersuchungen bei 22°C und 55°C festgestellt werden, dass der Einfluss der Temperatur vernachlässigbar ist. Aufgrund der quantiativ hohen Ausbeute des Fällungsproduktes bietet sich die MAP-Fällung begleitend zur Strippung an. Hierbei ist jedoch die Bestimmung der Tragfähigkeit nötig unter Berücksichtigung der Effizienz der MAP-Fällung und Strippung sowie der energetischen und stofflichen Kosten des jeweiligen Verfahrens.

II.1.7 Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

Es wird einerseits die Wirtschaftlichkeit zweier Systeme im Labormaßstab vergleichend betrachtet: Leachbedfermentation (LBF) und Schwimmbettfermentation (SBF) und andererseits zwei Verfahren zur Eliminierung von Ammoniak: MAP-Fällung und Strippung.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtung der labortechnischen Fermentationssysteme LBF und SBF

Ziel diese Betrachtung ist es, zwei verschiedene Biogas-Produktionsprozesse vergleichend zu bewerten: ein diskontinuierliches, gekoppeltes Festbett-Perkolations-System (LBF) und ein kontinuierlich beschicktes Schwimmbettfermentationssystem (SBF). Beide Verfahren basieren auf einer zweistufigen anaeroben Fermentation, wobei Hydrolyse und Methanogenese räumlich getrennt sind. Die Systeme sind in II.1.1 (LBF) bzw. in II.1.2 (SBF) beschrieben.

Energiebedarf

Um den Energiebedarf der obigen Systeme im Labormaßstab zu bewerten, konzentriert sich die Analyse auf die Unterschiede zwischen den in LBF und SBF installierten und verwendeten Geräten in dem verwendeten Systemaufbau.

- Das LBF-System verfügt über eine Temperierung, die aus drei Kesseln (Warmwassertank à 5 Liter, Fa. Hajdu) besteht jeweils für die Systemkomponenten Hydrolysereaktor, Anaerobfilter und Perkolatspeicher.
- Das im SBF verwendete System zur Temperierung der drei Reaktorkomponenten besteht aus drei Wasserbädern (Fa. Lauda, Typ Eco Line).
- Der Beregnung des Festbettes/ Schwimmbettes mit Prozessflüssigkeit wird von einem druckluftbetriebenen Membranpumpe realisiert. Da ein solches System sowohl im LBF als auch SBF Verwendung findet, wird diese Pumpe nicht in Rechnung gestellt.
- Im SBF-System wird eine Schlauchpumpe verwendet, um die Prozessflüssigkeit vom Speichertank in den Hydrolysereaktor zu rezirkulieren.

Tab. II.1.7-1 listet den täglichen Energiebedarf der Systeme zur Temperierung und zum Transport der Prozessflüssigkeit auf. Es ist ersichtlich, dass das SBF-System aus energetischer Sicht etwas mehr Energie als das LBF-System benötigt (+ 2,2 %).

Tab. II.1.7-1: Kumulativer Tages-Energiebedarf der LBF- und SBF-Systeme.

Gerät	LBF [kW]	SBF[kW]
Heizsystem	108,0	110,4
Membranpumpe (SBF)	-	0,005
Total	108,0	110,4

Unter der Annahme, dass 1 kWh Energiekosten in Höhe von 0,091 € verursacht (Statista.de, 2015), unterscheiden sich die Kosten zwischen LBF und SBF um 0,22 €/ Tag bzw. 72,73 €/ Jahr (unter der Annahme von 8000 Betriebsstunden bzw. 333 Betriebstagen).

Methanbildung

Um die Verfahren ökonomisch zu bewerten, wurden die Techniken zu Beginn miteinander verglichen, um die Gemeinsamkeiten zwischen beiden Systemen zu identifizieren (**Tab. II.1.7-2**). Der Vergleich zeigt, dass die beiden Systeme wichtige Merkmale gemeinsam haben: Substrat, Temperatur und pH-Wert. Beide sind beheizt, nahe gleiche Rückführung vom Lagertank zum Hydrolyse-Reaktor alle zwei Stunden ($\approx 2,4 \text{ L} / 2\text{h}$).

Tab. II.1.7-2: Ausgewählte Prozessparameter für den Vergleich des LBF und SBF-Systems.

Parameter	Einheit	LBF	SBF	Vergleich LBF vs. SBF
Substrat	kg/Monat	Luzerne /5	Luzerne/9.2	Vergleichbar
Temperatur (HR, AF, PS)	°C	55	55 (SBF A)	Vergleichbar
pH-Wert	-	8.26	8.37	\approx Vergleichbar
TS-Gehalt im System	%	14,7	≈ 25	Unterschiedlich
Befütterungsregime	-	Batch	Kontinuierlich (5/7)	Unterschiedlich
Hydrolyse Reaktor	L	Festbett (100)	Pfropfenstrom (35)	Unterschiedlich
Anaerober Reaktor	L	30	22	Vergleichbar
Temperierung	-	ja	ja	Gleich
Pumpen	Stück	1	2	Unterschiedlich

Die deutlichen Unterschiede ergaben sich in folgenden Parametern: Fütterungsregime, Gesamtfeststoffgehalt, Menge des zugeführten Substrats pro Monat, Hydrolyse-Reaktorkonfiguration. Die durchschnittlichen Prozessdaten der Anaerobfilter des LBF- und SBF-Systems sind in **Tab. II.1.7-3** dargestellt. Die dargestellten Daten des LBF- und SBF-Systems, repräsentieren Werte nach der Einfahrphase und nach Erreichen der maximalen Raumbelastung.

Tab. II.1.7-3: Parameter im Anaerobfilter des LBF- bzw. SBF-Systems.

Parameter	Einheit	LBF	SBF
CH ₄ -Konzentration	%	62,3	54,5
CO ₂ -Konzentration	%	37,7	45,5
Essigsäureäquivalent	g L ⁻¹	2,62	9,70
NH ₄ -N	mg kg ⁻¹ FM	1815	3276
Biogasbildung	L _{Norm} d ⁻¹	11,60	18,46
Gesamt produziertes Biogas	L _{Norm} 30d ⁻¹	336,35	572,26
oTS-Gehalt je kg FM	kg oTS kg ⁻¹ FM	0,1234	0,1234
Zugeführte Substratmenge	kg FM 30 d ⁻¹	5	9,2

Die dargestellten Quantitäten an Methan schwanken in Abhängigkeit der organischen Beladungsrate, Verweilzeit und Art des Substrats (**Abb. II.1.7-1, -2**). Vergleichbar wurde die Einfahrphase des LBF-Systems im Zuge der nachfolgenden Berechnungen nicht berücksichtigt.

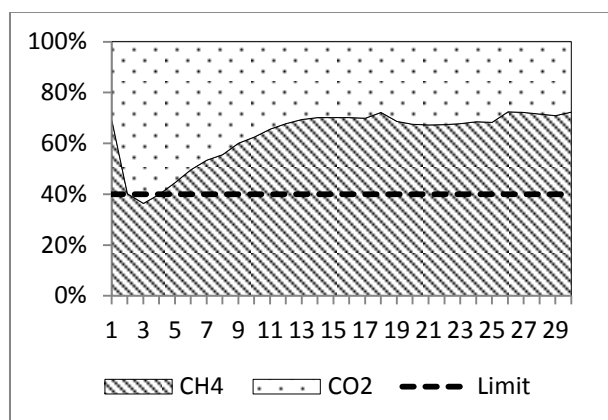


Abb. II.1.7-1: Darstellung der Biogaszusammensetzung im LBF.

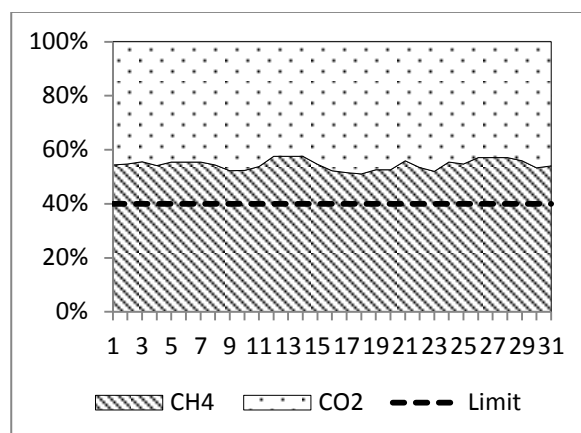


Abb. II.1.7-2: Darstellung der Biogaszusammensetzung im Anaerobfilter im SBF.

Volumetrische Biogasproduktion

Entsprechend der in Tab. II.1.7-3 dargestellten Werte und auf Grundlage der durchschnittlichen täglichen und kumulativen (Gesamt-) Biogasmengen, wurden die nachfolgenden Berechnungen zur Bestimmung der volumetrischen Biogasproduktion für das **LBF-System** durchgeführt.

$$\text{volum. Tagesprodukt.} = \frac{\text{Durchschn. Biogasproduktion}}{\text{AF-Reaktorvolumen}} = \frac{11,60 \frac{\text{LN}}{24\text{h}}}{30 \text{ l}} = 0,39 \frac{\text{LN}}{\text{l}_{\text{Reakt}} \cdot 24\text{h}} = 0,39 \frac{\text{Nm}^3}{\text{m}^3_{\text{Reakt}} \cdot 24\text{h}}$$

$$\text{volum. Gesamtprodukt.} = \frac{\text{kumul. Biogasproduktion}}{\text{AF-Reaktorvolumen}} = \frac{336,35 \frac{\text{LN}}{30\text{d}}}{30 \text{ l}} = 11,21 \frac{\text{LN}}{\text{l}_{\text{Reakt}} \cdot 30\text{d}} = 11,21 \frac{\text{Nm}^3}{\text{m}^3_{\text{Reakt}} \cdot 30\text{d}}$$

Ein vergleichbares Vorgehen wurde für das **SBF-System** verwendet. Die Werte sind in **Tab. II.1.7-4** dargestellt.

Tab. II.1.7-4: Volumetrische Biogasproduktion (durchschnittliche Tagesproduktion, Gesamtbioogasproduktion) und tatsächliche Biogaserträge für das LBF- und SBF-System.

Parameter	Einheit	LBF	SBF
Tägliche Biogasproduktion	$\frac{\text{Nm}^3}{\text{m}^3_{\text{reakt}} \cdot 24\text{h}}$	0,39	0,84
Gesamtbioogasproduktion	$\frac{\text{Nm}^3}{\text{m}^3_{\text{reakt}} \cdot 30\text{d}}$	11,21	26,01
Tatsächliche Biogasertrag	$\frac{\text{LN}}{\text{kg oTS}}$	544,98	506,22

Basierend darauf erfolgte die Kalkulation der tatsächlichen Biogaserträge für beide Systemansätze.

$$\text{LBF} = \frac{\text{kumul. Biogasproduktion}}{\text{Gesamtsubstratmenge} \cdot \text{oTS-Gehalt}} = \frac{336,35 \frac{\text{LN}}{30\text{d}}}{5 \frac{\text{kg FM}}{30\text{d}} \cdot 0,1234 \frac{\text{kg oDM}}{\text{kg FM}}} = 544,98 \frac{\text{LN}}{\text{kg oDM}}$$

$$SBF = \frac{\text{kumul. Biogasproduktion}}{\text{Gesamtsubstratmenge} \cdot \text{oTS-Gehalt}} = \frac{572,26 \frac{\text{LN}}{30\text{d}}}{9,14 \frac{\text{kg FM}}{30\text{d}} \cdot 0,1234 \frac{\text{kg oDM}}{\text{kg FM}}} = 506,22 \frac{\text{LN}}{\text{kg oDM}}$$

Wie in Tab. II.1.7-4 zu erkennen ist, hat das SBF-System bezüglich der volumetrischen Gasproduktion eine höhere Effizienz als das LBF-System. Dem gegenüber ist der Wert des tatsächlichen Biogasertrages für das LBF-System größer als für das SBF-System. Diesbezüglich ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Biogaserträge des SBF-Systems vor Erreichen einer stabilen Prozessphase in obiger Kalkulation unberücksichtigt blieben.

Ökonomische Analyse

Eine zusammenfassende ökonomische Analyse wurde durchgeführt, um die betrachteten Systeme des LBF und SBF zu bewerten. **Tab. II.1.7-5** und **Tab. II.1.7-6** listen alle Komponenten auf, die Bestandteil der genannten Systeme sind. Die Spalte *Quelle* repräsentiert die Herkunft der Daten zu den Investitionskosten der jeweiligen Komponente – entweder auf Basis von Angeboten von Unternehmen oder sofern der Preis nicht bestimmt werden konnte, auf Basis nachfolgender Berechnungen sowie in Anlehnung an bekannte Preise für vergleichbare Komponenten.

Berechnung für LBF-System: Es wurde unterstellt, dass der Perkolatspeicher von annähernd gleicher Beschaffenheit wie der Hydrolysereaktor ist. Entsprechend erfolgte die Kostenkalkulation über eine volumetrische Relation in Anlehnung an Green & Perry (2008).

$$\text{Perkolatspeicher} = \text{Hydrolysereaktor} \cdot \left(\frac{\text{Volumen Perkolatspeicher}}{\text{Volumem Hydrolysereaktor}} \right)^n = 1280,00 \text{ €} \cdot \left(\frac{60 \text{ l}}{100 \text{ l}} \right)^{0,6} = 942,11 \text{ €}$$

Berechnung für SBF-System: Ein vergleichbares Vorgehen wurde für die Kalkulation der Anschaffungskosten für die Komponenten Anaerobfilter und Perkolatspeicher im SBF-System verwendet. Es wurde angenommen, dass die inhärente Technologie der Komponenten des LBF-Systems entspricht. Entsprechend erfolgte die Kostenkalkulation über eine volumetrische Relation in Anlehnung an Green & Perry (2008).

$$\text{Anaerobfilter, SBF} = \text{Anaerobfilter, LBF} \cdot \left(\frac{\text{Volumen Anaerobfilter, SBF}}{\text{Volumen Anaerobfilter, LBF}} \right)^n = 880,00 \text{ €} \cdot \left(\frac{22 \text{ l}}{30 \text{ l}} \right)^{0,6} = 730,57 \text{ €}$$

$$\begin{aligned} \text{Perkolatspeicher, SBF} &= \text{Perkolatspeicher, LBF} \cdot \left(\frac{\text{Volumen Perkolatspeicher, SBF}}{\text{Volumen Perkolatspeicher, LBF}} \right)^n = 942,11 \text{ €} \cdot \left(\frac{40 \text{ l}}{60 \text{ l}} \right)^{0,6} \\ &= 738,66 \text{ €} \end{aligned}$$

Die Kalkulation des innovativen Schwimmbettfermenters als Hydrolysestufe wurde aufgrund fehlender Referenzsysteme ausschließlich auf Basis der Materialkosten inklusive eines Faktors (+0,25) berechnet, der aufgrund der Komplexität des Fermenters im Herstellungsprozess Berücksichtigung fand.

$$\text{Hydrolysereaktor, SBF} = \text{Materialkosten} * 1,25 = 1940,25 \text{ €} * 1,25 = 2425,31 \text{ €}$$

In **Tab. II.1.7-5, -6** sind die Kosten für das LBF-System in Höhe von 15.515,22 EUR, und die des SBF-Systems in Höhe von 18.199,32 EUR auf Basis der einzelnen Komponenten dargestellt. Die benötigten Arbeitsstunden für die Errichtung und Instandhaltung der Systeme sind nicht berücksichtigt worden.

Tab. II.1.7-5: Anschaffungskosten der Komponenten des LBF-Systems.

Komponenten	Quelle	Nettopreis[€]	19 %MwSt [€]	Gesamtinvestitionen[€]
Verschlauchung & Peripherie	Angebot	463,00	87,97	550,97
Automatische Ventilsteuerung	Angebot	1136,00	215,84	1351,84
Temperaturmessgerät	Angebot	1000,00	190,00	1190,00
Automatische Parametererfassung für pH, Redox und NH ₄	Angebot	3,000,00	570,00	3570,00
Anaerobfilter	Angebot	880,00	167,20	1047,20
Hydrolysereaktor	Angebot	1280,00	243,20	1523,20
Perkolatspeicher	Schätzung	942,11	179,00	1121,11
Temperierung	Angebot	270,00	-	270,00
Behälterdeckel	Angebot	460,00	87,40	547,40
Flachdichtungen	Angebot	50,00	9,50	59,50
Filter am Anaerobfilter	Angebot	330,00	62,70	392,70
Membranpumpe (Perkolation)	Angebot	510,00	96,90	606,90
Dämmmaterial	Angebot	200,00	38,00	238,00
Rohrleitungen	Angebot	500,00	95,00	595,00
Trommelgaszähler	Angebot	2000,00	380,00	2380,00
Biogasbeutel	Angebot	60,00	11,40	71,40
			Total	15.515,22

Tab. II.1.7-4: Anschaffungskosten der Komponenten des SBF-Systems.

Komponente	Quelle	Nettopreis [€]	19 % MwSt [€]	Gesamtinvestitionen [€]
Verschlauchung & Peripherie	Angebot	463,00	87,97	550,97
Automatische Ventilsteuerung	Angebot	1136,00	215,84	1351,84
Temperaturmessgerät	Angebot	200,00	38,00	238,00
Anaerobfilter	Schätzung	730,57	138,81	869,38
Hydrolysefermenter	Schätzung	2425,31	460,81	2308,74
Perkolatspeicher	Schätzung	738,66	140,35	879,01
Thermobad	Angebot	4000,00	760,00	4760,00
Behälterdeckel	Angebot	460,00	87,40	547,40
Flachdichtungen	Angebot	50,00	9,50	59,50
Filter	Angebot	100,00	19,00	119,00
Schlauchpumpe (Rezyklat)	Angebot	510,00	96,90	606,90
Membranpumpe (Perkolation)	Angebot	1770,00	336,30	2106,30
Dämmmaterial	Angebot	150,00	28,50	178,50
Rohrleitungen	Angebot	500,00	95,00	595,00
Gaszähler (TGZ)	Angebot	2000,00	380,00	2380,00
Biogasbeutel	Angebot	60,00	11,40	71,40
			Total	18.199,32

Bewertung der organische Säuren und Ammonium-Konzentration

Zur wirtschaftlichen Bewertung des Fermentationserfolges sind neben dem Biogasertrag als direkt messbare Kenngröße zudem auch die organischen Säuren (Mattocks, 1984) sowie die Konzentration an Ammonium (Hansen et al., 1998; Nakakubo et al., 2008; Procházka et al., 2012) in dem Perkolat als Prozessindikatoren zu berücksichtigen (Chen et al., 2008; Hejnfelt & Angelidaki, 2009; Rajagopal et al., 2013; Sung & Liu, 2003). Es ist festzustellen, dass in der stabilen Fermentationsphase des SBF-Systems eine höhere Konzentration an organischen Säuren als im LBF-System vorhanden ist. Obgleich dies als Gefahr einer säurebasierten Hemmung induziert, könnte dies andererseits auch als Hinweis auf einen effektiven mikrobiologischen Abbau im SBF-System verstanden werden. Dem gegenüber ist

die Konzentration organischer Säuren im LBF-System stets unterhalb einer kritischen Konzentration, was entweder als adäquates Zusammenspiel zwischen fermentativen und methanogenen Mikroorganismen betrachtet werden kann oder einen Hinweis auf eine gehemmte und dadurch nur verzögerte Säurebildung geben kann.

Bezüglich der festgestellten Konzentration an $\text{NH}_4\text{-N}$ in der Prozessflüssigkeit sind deutliche Unterschiede zwischen dem LBF und SBF-System zu erkennen. Diese Unterschiede resultieren aus der Betriebsweise der Fermenter (Batch-Betrieb vs. kontinuierlicher Prozessführung). In Verbindung mit den Ergebnissen zur Biogasproduktion der jeweiligen Systeme, geben diese Hinweise auf die Anpassungsfähigkeit der mikrobiellen Biozönose im jeweiligen Fermentationssystem an hohe $\text{NH}_4\text{-N}$ bzw. NH_3 -Konzentrationen.

Fazit Energiebedarf des LBF und SBF-Systems

Die Unterschiede beider Systeme im Energieverbrauch entsprechen 72,73 €/ Jahr unter der Annahme von 333 Betriebstagen (8000 Betriebsstunden). Aus Sicht des energetischen Inputs ist festzustellen, dass der Energiebedarf der LBF und SBF-Systeme nahezu gleich sind. Ein Vergleich der Parameter Biogasqualität und –menge der beiden Fermentationssysteme ergibt, dass die volumetrische Biogasproduktion des SBF-Systems höher ist als die des LBF-Systems. Trotz der höheren Methankonzentration im Biogas des LBF ist die Gesamtausbeute an wertgebenden Methan im SBF größer, womit dieses System aus ökonomischer Sicht (hinsichtlich Vergütung) zu bevorzugen ist.

Ein gegensätzliches Ergebnis resultiert aus der Betrachtung des tatsächlichen Biogasertrages. Hier konnte festgestellt werden, dass im LBF-System der Biogasertrag höher ist ($\approx 7\%$) als der des SBF-Fermentationssystems. Dieses abweichende Ergebnis ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die geringere Raumbelastung im LBF-System zurückzuführen und daher das Resultat des Batch-Betriebes (Linke et al., 2006). Dieser Tatsache ungeachtet ist festzustellen, dass die zur Berechnung des tatsächlichen Biogasertrages im SBF-System erhobenen Daten aus der stationären und daher höchsteffizienten Betriebsphase stammen.

Hinsichtlich des Verlaufs der Konzentrationen an Ammonium und an organischen Säuren ist zu bemerken, dass die Ergebnisse einerseits die Effizienz des Inokulums zur Verwertung des Substrates widerspiegeln (insbesondere im Fall des LBF-Systems) und andererseits das Resultat der unterschiedlichen Betriebsweisen (30-tägigen vs. kontinuierlichen) darstellen. Adaptions- und Akklimatisierungsprozesse der mikrobiellen Biozönose als Kriterium zur Bewertung des Fermentationserfolges wurden im Rahmen dieser Wirtschaftlichkeitsuntersuchung nicht berücksichtigt, obgleich von derartigen Effekten, insbesondere im kontinuierlichen SBF-System ausgegangen werden muss. Dies wird beispielsweise an dem gleichbleibenden Biogasertrag im SBF-System trotz der immanenten Stressbedingungen, die aus den hohen Konzentrationen an Ammonium und organischen Säuren resultieren, deutlich.

Beide Fermentationssysteme erlauben die Behandlung des in der Prozessflüssigkeit enthaltenen Ammoniums durch Einsatz verschiedener Stickstoffeliminierungsstrategien. Sowohl mittels der MAP-Fällung als auch durch die Luftstrippung konnte die Ammoniumfracht gemindert und damit positiven Einfluss auf die Biogasbildung genommen werden. Dennoch ist festzustellen, dass der Einsatz einer

dynamischen Luftstrippungsmethodik im Labormaßstab nicht durch einen Mehrertrag an Biogas, kostendeckend kompensiert werden konnte. Es ist jedoch zu bemerken, dass durch eine großtechnische Umsetzung die Wirtschaftlichkeit dieser Eliminationsstrategie zunimmt, da die Kosten dem Biogasertrag mehrerer, parallel betriebener Fermenter gegenüber gestellt und durch diese kompensiert werden kann. Ferner stehen den Kosten der Stickstoffeliminierung die Einnahmen des erzeugten Düngemittels MAP oder Ammoniumsulfat gegenüber.

Hinsichtlich der Investitionskosten ist festzustellen, dass das SBF-System, aufgrund der größeren verfahrenstechnischen Komplexität, höhere Kosten verursacht. Obgleich die Kosten der Instandsetzung und Instandhaltung der beiden Fermentationssysteme im Rahmen dieser Betrachtung unberücksichtigt blieben, ist unter Bezugnahme auf die labortechnischen Versuchsreihen festzustellen, dass im SBF-System häufiger Verstopfungen im Rohrleitungssystem aufgrund von MAP-Ausfällungen auftreten. Dies verursachte einen deutlich höheren Instandhaltungsaufwand als im LBF-System. Unter Berücksichtigung dieses Sachverhaltes ist davon auszugehen, dass sich die Kostendifferenz zwischen den Fermentationssystemen vergrößern wird.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtung zur MAP-Fällung

Um die unterschiedlichen Behandlungsverfahren zu bewerten, erfolgte ihre Dimensionierung in Anlehnung an eine durchschnittliche, landwirtschaftliche Biogasanlage (vgl. hierzu Biogas-Messprogramm II - 61 Biogasanlagen im Vergleich). Hierbei wurde von einer Leistung des zur energetischen Verwertung angeschlossenen BHKW von durchschnittlich 500 kW_{el} ausgegangen, mit Geflügelkot als dominierendes Substrat der Fermentation. Basierend auf diesen Annahmen erfolgte die Kalkulation der nachfolgenden Reaktionen sowie der Zu- und Ablaufströme. Die Rahmengrößen der Bezugsbiogasanlage sind in **Tab. II.1.7-7** dargestellt. Für die ökonomische Betrachtung der Verfahren der das MAP-Fällung wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt: Dimensionierung der Fermentationsanlage (Reaktorvolumen, Pumpen, usw.), Entwicklung eines Modells zur Beschreibung des Fermentationsbetriebs, Erstellung einer thermischen Energiebilanz, Erfassung der fixen und variablen Kosten und die ökonomische Bewertung der Stickstoffeliminationsverfahren in EUR je kg eliminiertes NH₄. Die MAP Fällung unter II.1.6 beschrieben.

Tab. II.1.7-7: Allgemeine Daten der Biogasanlage als Mittelwert aus zwei Datenquellen: DIN 51857 (1997) und ASTM D3588-98 (2017), Charakteristik des Substrat gemäß KTBL (2013)

Parameter	Symbol	Einheit	Menge
Durchflussrate	Q_{IN}	m ³ /Tag	240
Hydraulische Verweilzeit	HRT	Tag	20
Volumen Fermenter	VAD	m ³	4,800
Elektrische Energie	P_{el}	kW _{el}	500
Elektrischer Ertrag	η_{el}	-	0,38
Unterer Heizwert Methan	$LHVCH_4$	kWh/Nm ³	9,957
TS-Gehalt Hühnerkot	TS	TS/FM	0,4
oTS-Gehalt Hühnerkot	oTS	oTS/TS	0,75
Spezifischer Methanertrag	I_N	Nm ³ /kg oTS	0,5
Methangehalt	-	CH ₄ /Biogas	0,55

Beschreibung des Fällungs-Prozesses und Dimensionierung des MAP-Reaktors

Als Grundvoraussetzung für eine ökonomische Betrachtung die Stickstoffeliminationsstrategie der MAP-Fällung erfolgte die Dimensionierung des MAP-Reaktors (Tab. II.1.7-8).

Tab. II.1.7-8: Dimensionen des MAP-Reaktors.

Parameter	Symbol	Menge	Einheit
Volumen	V_{MAP}	20,0	m^3
Fläche	A_{MAP}	4,0	m^2
Höhe	H_{MAP}	5,0	m
Radius	r_{MAP}	1,13	m
Durchmesser	d_{MAP}	2,26	m

$$V_{MAP,NET} = Q_{IN,MAP} \cdot HRT_{MAP} = 10 \frac{m^3}{h} \cdot 1 h = 10 m^3$$

Hierbei entspricht das kalkulierte Volumen dem Netto-Arbeitsvolumen des MAP-Reaktors. Die nachfolgende Verdoppelung des errechneten Volumens berücksichtigt die notwendige Zudosierung von Chemikalien in den Reaktionsraum.

$$V_{MAP} = V_{MAP,NET} \cdot f = 10 m^3 \cdot 2 = 20 m^3 \quad H_{MAP} = 5 m$$

$$A_{MAP} = \frac{V_{MAP}}{H_{MAP}} = \frac{20 m^3}{5 m} = 4 m^2$$

$$r_{MAP} = \sqrt{\frac{A_{MAP}}{\pi}} = 1.13 m$$

Der Fällungsreaktor wurde beheizt und kontinuierlich gerührt. Unter Berücksichtigung des thermischen Gleichgewichts kann davon ausgegangen werden, dass die zu behandelte Prozessflüssigkeit im Fällungsreaktor eine Temperatur von circa 50°C besitzt. Die ökonomische Betrachtung der MAP-Fällung erfordert die nachfolgende Auslegung der Rührwerkseinheit und der Systembedingungen, die in **Tab. II.1.7-9** angegeben sind.

Tab. II.1.7-9: Eigenschaften der Prozessflüssigkeit und der Rührereinheit im MAP Reaktor.

Systemelement	Symbol	Menge
Rührelement	- (z.B. Pfaudler Rührwerk)	-
Newton-Zahl	N_p	2,8
Dichte des Fluids	ρ	987,7 [kg/m ³]
Dynamische Viskosität des Fluids	ν	0,547·10 ⁻³ [Pa s]

Für ein gegebenes Rührelement und bei einer definierten Tankgeometrie, wird das Strömungsmuster im Tank durch die Reynolds-Zahl des Laufrades ausgedrückt:

$$Re_l = \frac{D^2 \cdot N \cdot \rho}{\mu}$$

wobei D der Flügelraddurchmesser, N die Drehzahl (ausgedrückt als Umdrehungen pro Sekunde) und ρ und μ die Flüssigkeitsdichte bzw. die Viskosität sind. Typischerweise ist $Re_l > 10^4$ für turbulente, volldurchströmte Zustände im gesamten Tank erforderlich. Demzufolge wurde ein Re_l -Wert von 10^5 gewählt, um turbulente Bedingung im MAP-Reaktor zu gewährleisten.

$$N = \frac{Re_l \cdot \mu}{D^2 \cdot \rho} = \frac{10^5 \cdot 0,547 \cdot 10^{-3}}{1,20^2 \cdot 987,7} = 0,05 \frac{rev}{s} \approx 1 \frac{rev}{s}$$

Die von dem Rührelement benötigte Leistung P wird für nachfolgende, vergleichende Betrachtungen unter Berücksichtigung der dimensionslosen Newton-Zahl N_p berechnet:

$$N_p = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5}$$

$$P = N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5 = 2,8 \cdot 987,7 \cdot 1^3 \cdot 1,2^5 = 6,9 \text{ kW}$$

Pumpen im MAP-Fällungssystem

Im System werden zwei identische Pumpen eingesetzt, zum einen um die Prozessflüssigkeit aus dem anaeroben Reaktor in den MAP-Reaktor zu pumpen und zum anderen um die behandelte Prozessflüssigkeit wieder in den anaeroben Reaktor zurück zu führen. Die Merkmale der Pumpen sind in **Tab. II.1.7-10** angegeben.

Tab. II.1.7-10: Pumpeneigenschaften.

Parameter	Einheit	Wert
Durchlauf	m ³ /h	10
Pumphöhe	m	6,5
Benötigte Energie	kW	0,37
Frequenz	Hz	50

Fest-Flüssig-Trennung

Die Fest-Flüssig-Separation ist ein entscheidender Schritt, der die Menge an MAP bestimmt, die aus dem Fällungsreaktor gewonnen werden kann. Damit bestimmt die Fest-Flüssig-Trennung die MAP-Ausbeute und damit die Einnahmen, die durch den Verkauf erzielt werden können. Die gewählte Konfiguration setzt einen zweistufigen Trennprozess, mit der in **Abb. II.1.7-3** dargestellten Effizienz voraus. Bei einem minimalen durchschnittlichen Durchmesser der MAP-Kristalle von 50 µm, wird eine Trennwirkung von etwa 80 % erwartet.

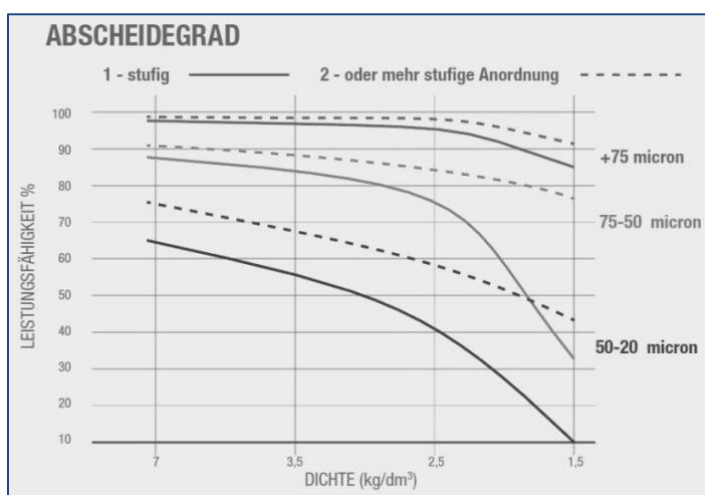


Abb. II.1.7-3: Abscheideeffizienz eines theoretischen Zentrifugalabscheiders in Abhängigkeit des Druckverlustes (Produktdatenblatt),

Modellierung

Um das Verfahren der MAP-Fällung zu simulieren, wurden die nachfolgenden Annahmen getroffen:

- stabilisierter Fermentationsprozess
- keine Anreicherung im Fermentationssystem

- konstante Zulauf-Konzentration an Ammonium in den anaeroben Fermenter
- sowohl das anaerobe Fermentationssystem als auch die MAP-Fällung sind vollständig durchmisch
- Die hydraulische Retentionszeit der Biogasanlage ändert sich nicht.

Die nachfolgenden Modellbetrachtungen basieren auf einer Massenbilanz. Daher werden alle Berechnungen mit molarer Konzentration als Maßeinheit durchgeführt. Die Anfangsbedingungen des Systems sind **Tab. II.1.7-11** zu entnehmen.

Tab. II.1.7-11: Anfangsbedingungen des MAP- und Fermentationssystems.

Parameter	Symbol	Einheit	Menge
Zulaufrate - anaerober Fermenter	$Q_{IN,A}$	m^3/h	10,0
Zulaufkonzentration NH_4 - anaerober Fermenter	$C_{NH_4-N,IN-A}$	mol/m^3	58,4
Initiale NH_4 -Konzentration - anaerober Fermenter	$C_{NH_4-N,A}$	mol/m^3	86,0
Ablaufrate - anaerober Fermenter	$Q_{OUT,A}$	m^3/h	10,0
Zulaufrate - MAP Reaktor	$Q_{IN,MAP}$	m^3/h	10,0
Ablaufrate - MAP Reaktor	$Q_{OUT,MAP}$	m^3/h	10,0
Zulaufkonzentration NH_4 - MAP Reaktor	$C_{NH_4-N,IN-MAP}$	mol/m^3	-
Ablaufkonzentration NH_4 - MAP Reaktor	$C_{NH_4-N,OUT-MAP}$	mol/m^3	-
NH_4 -Eliminationseffizienz	$NH_4-N_{REM-MAP}$	-	0,75

Berechnungen der Anfangsbedingungen: aus der Annahme einer Anfangskonzentration von NH_4-N im anaeroben Fermenter und MAP-Reaktor von 86 mol/m^3 folgt:

$$C_{NH_4-N,IN-A} = C_{NH_4-N,IN-MAP}$$

Im MAP-Fällungsreaktor sei eine Ammoniumeliminationseffizienz von 75 % (Ueno & Fujii, 2001) angenommen. Folglich beträgt die aus dem MAP-Reaktor austretende Ammoniakonzentration:

$$C_{NH_4-N,OUT-MAP} = C_{NH_4-N,IN-MAP} \cdot (1 - NH_4 - N_{REM}) = 86,0 \cdot (1 - 0,75) = 21,5 \frac{mol}{m^3}$$

Die Menge an Ammonium, die durch die MAP-Fällung entfernt wird ($NH_4-N_{REM-MAP}$), beträgt:

$$\dot{N}H_4 - N_{REM-MAP} = Q_{IN,MAP} \cdot (C_{NH_4-N,IN-MAP} - C_{NH_4-N,OUT-MAP}) = 10,0 \cdot (86,0 - 21,5) = 645,0 \frac{mol}{h}$$

Demzufolge werden $9,3 \text{ kg } NH_4-N$ je Stunde aus dem System entfernt. Um eine derartige MAP-Präzipitation unter praktischen Bedingungen zu erreichen, müssen MgO und H_3PO_4 als Magnesium- bzw. Phosphatquelle zugegeben werden. Es wurde angenommen, dass Magnesiumoxid (MgO) mit einer vergleichbaren, molaren Durchflussrate wie NH_4-N dem MAP-Reaktor zugeführt wird. Bezüglich PO_4 wurde eine geringere Zudosierung gewählt (mit einem molaren Verhältnis von 1:0,97), da das Vorhandensein einer geringen Menge an Ortho-Phosphat im System durch chemische Analysen bestätigt wurde. Nachfolgend sind die Zulaufkonzentrationen aller für die MAP-Fällung relevanten Komponenten dargestellt.

$$\dot{N}H_4 - N_{IN-MAP} = Q_{IN,MAP} \cdot C_{NH_4-N,A} = 10,0 \cdot 86,0 = 860,0 \frac{mol}{h}$$

$$\dot{M}gO_{IN-MAP} = \dot{N}H_4 - N_{IN-MAP} = 860,0 \frac{mol}{h}$$

$$\dot{P}O_{4,IN-MAP} = \dot{N}H_4 - N_{IN-MAP} \cdot 0.97 = 834,2 \frac{mol}{h}$$

Es ist zu beachten, dass unter den bestehenden initialen Prozessbedingungen (Temperatur $\approx 50^\circ\text{C}$ und $\text{pH} \approx 8$) die folgenden Verbindungen die höchste Ausfallwahrscheinlichkeit haben:

- Struvit (MAP) - $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- Neuberyit (NEW) - $\text{Mg}(\text{HPO}_4) \times 3\text{H}_2\text{O}$
- Hydroxylapatit (HAP) - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$.

Mit der Kenntnis um das molare Verhältnis von MAP in Verbindung mit der durch Wiegung ermittelten Masse des gebildeten MAP-Niederschlags ist es möglich, die verbleibenden Molmengen an Magnesium und Phosphat zu berechnen, die für die Präzipitation von Neuberyit und Hydroxylapatit verbleiben. Die Versuchsergebnisse mit synthetischem Medium ergaben eine Entfernungseffizienz von Magnesium in Höhe von ca. 95%. Basierend hierauf erfolgte die Kalkulation der Menge an potentiell ausfällbarem Neuberyit und Hydroxylapatit.

$$NEW = 0.95 \cdot \dot{M}gO_{IN-MAP} - \dot{N}H_4 - N_{REM-MAP} = 0.95 \cdot 860,0 - 645,0 = 172,0 \frac{mol}{h}$$

$$HAP = (\dot{P}O_{4,IN-MAP} - \dot{N}H_4 - N_{REM-MAP} - NEW)/3 = (834,2 - 645,0 - 172,0)/3 = 5,83 \frac{mol}{h}$$

Die Massen und Dichten der jeweiligen Komponenten zur Berechnung der Volumina sind **Tab. II.1.7-12** zu entnehmen.

Tab. II.1.7-12: Molare Massen und Dichten der gefällten Produkte.

Komponente	Formel	Molare Masse [g/mol]	Dichte [kg/m ³]
Struvit	$\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$	245,404	1,700
Neuberyit	$\text{Mg}(\text{HPO}_4) \times 3\text{H}_2\text{O}$	174,327	2,120
Hydroxylapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	502,307	3,160

Abb. II.1.7-4 zeigt die molaren Massen der In- und Outputgrößen bei der MAP Fällung.

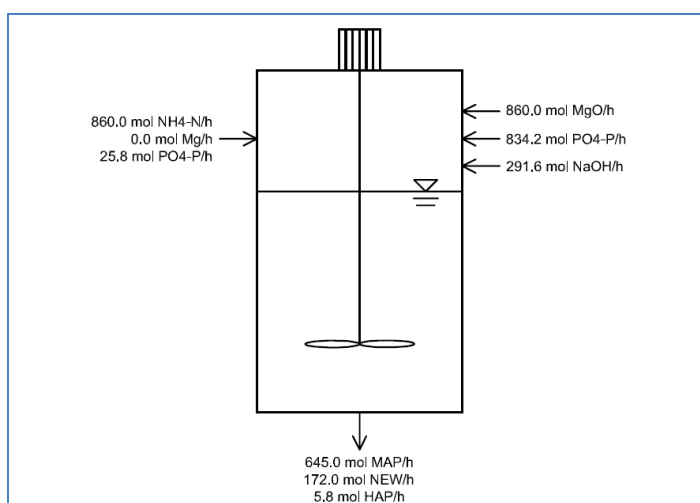


Abb. II.1.7-4: Molare Verhältnisse der In- und Outputströme im MAP-Reaktor.

$$M_{MAP} = N\dot{H}_4 - N_{REM-MAP} \cdot MM_{MAP} = 645,0 \cdot \frac{245,404}{1000} = 158,3 \frac{kg}{h}$$

$$V_{MAP} = \frac{M_{MAP}}{\rho_{MAP}} = \frac{158,3}{1,700} = 0,093 m^3$$

$$M_{NEW} = NEW \cdot MM_{NEW} = 172,0 \cdot \frac{174,327}{1000} = 29,98 \frac{kg}{h}$$

$$V_{NEW} = \frac{M_{NEW}}{\rho_{NEW}} = \frac{29,98}{2,120} = 0,014 m^3$$

$$M_{HAP} = HAP \cdot MM_{HAP} = 5,83 \cdot \frac{502,307}{1000} = 2,93 \frac{kg}{h}$$

$$V_{HAP} = \frac{M_{HAP}}{\rho_{HAP}} = \frac{2,93}{3,160} = 0,00093 m^3$$

Nach den Fällungsreaktionen im MAP-Reaktor wird die verbleibende Prozessflüssigkeit mit den nachfolgend dargestellten Output-Konzentrationen in den anaeroben Fermenter rezirkuliert:

$$N\dot{H}_4 - N_{OUT-MAP} = Q_{OUT,MAP} \cdot C_{NH_4-N,OUT-MAP} = 10,0 \cdot 21,5 = 215,0 \frac{mol}{h}$$

$$MgO_{OUT-MAP} = Q_{OUT,MAP} \cdot C_{MgO,OUT-MAP} = 10,0 \cdot (86,0 - 64,5 - 17,2) = 43,0 \frac{mol}{h}$$

Aufgrund der geringen Magnesiummenge im rezirkulierten Output-Stoffstrom ($C_{Mg,OUT-MAP} = 0,11 \text{ g L}^{-1}$), wurde diese in der Massenbilanz nicht berücksichtigt. Nachfolgende Gleichung stellt eine Bilanz aus der Verknüpfung von MAP-Fällung und anaerober Fermentation nach einer Betriebsstunde unter Darlegung der verringerten Ammoniumkonzentration dar.

$$C_{NH_4-N,A(1h)} = \frac{(C_{NH_4-N,A(0)} \cdot V_{AD}) + (N\dot{H}_4 - N_{IN,A}) - (N\dot{H}_4 - N_{OUT-A}) - (N\dot{H}_4 - N_{IN-MAP}) + (N\dot{H}_4 - N_{OUT-MAP})}{V_{AD}}$$

$$= \frac{86,0 \cdot 4800 + 584,0 - 860,0 - 860,0 + 215,0}{4800} = 85,808 \frac{mol}{m^3}$$

Folglich wird die Ammoniumkonzentration im anaeroben Reaktor um $0,192 \text{ mol m}^{-3}$ innerhalb einer Betriebsstunde verringert.

Bestimmung der Wärmeverluste durch die MAP-Fällung

Der Wärmeverlust des Prozesses wurde berechnet, um festzustellen, wieviel thermische Leistung erforderlich ist, um die aus dem MAP-Reaktor rezirkulierte Prozessflüssigkeit auf die Betriebstemperatur des anaeroben Reaktors aufzuheizen. Die Eigenschaften des Systemverbundes sind in **Tab. II.1.7-13** dargestellt.

Tab. II.1.7-13: Konzeptdaten zur Bestimmung des Wärmeverlustes.

Parameter	Symbol	Einheit	Menge
Innenradius Rohr	r_{INT}	m	0,075
Außenradius Rohr	r_{EXT}	m	0,077
Außenradius Rohrdämmung	$r_{EXT,INS}$	m	0,087
Länge Zulaufrohr	L_{IN}	m	25,0
Länge Ablaufrohr	L_{OUT}	m	25,0

Fortsetzung Tab. II.1.7-13:

Parameter	Symbol	Einheit	Menge
MAP Reaktor Innendurchmesser	R_{INT}	m	1,15
MAP Reaktor - äußerer Radius	R_{EXT}	m	1,155
MAP Reaktor und Dämmung - äußerer Radius	$R_{EXT,INS}$	m	1,175
MAP Reaktorhöhe	H	m	5,0
Stahl thermische Leitfähigkeit	K_{ST}	W/m*K	16,0
Dämmung thermische Leitfähigkeit	K_{INS}	W/m*K	0,037
Temperatur Prozessflüssigkeit	T_{IN}	°C	55
Außentemperatur	T_{OUT}	°C	5

Um die Wärmeverluste der Rohrleitungen und des MAP-Reaktors mit der Umgebung abzuschätzen, wurde das folgende Berechnungsprinzip genutzt. Beispielhaft sind nachfolgend die Berechnungen für das Einlassrohr zum MAP-Reaktor dargestellt. Die Ergebnisse für das Auslassrohr und den MAP-Reaktor sind **Tab. II.1.7-14** zu entnehmen.

Tab. II.1.7-14: Wärmeverlust zwischen MAP-System und der Umgebung.

Element	$\Delta T_{\text{Prozessflüssigkeit}}$	Einheit
Zulaufrohr	0,20	°C
Ablaufrohr	0,18	°C
MAP Reaktor	0,29	°C

$$R_{Rohr} = \frac{\ln\left(\frac{r_{EXT}}{r_{INT}}\right)}{2\pi \cdot K_{ST} \cdot L_{IN}} = \frac{\ln\left(\frac{0,077}{0,075}\right)}{2\pi \cdot 16,0 \cdot 25,0} = 1,05 \cdot 10^{-5} \frac{K}{W}$$

$$R_{INS} = \frac{\ln\left(\frac{r_{EXT,INS}}{r_{EXT}}\right)}{2\pi \cdot K_{INS} \cdot L_{IN}} = \frac{\ln\left(\frac{0,087}{0,077}\right)}{2\pi \cdot 0,037 \cdot 25,0} = 2,1 \cdot 10^{-5} \frac{K}{W}$$

$$R_{TOT} = R_{PIPE} + R_{INS} = 2,1 \cdot 10^{-5} + 1,05 \cdot 10^{-5} = 2,10105 \cdot 10^{-5} \frac{K}{W}$$

R_{TOT} entspricht dabei dem Wärmeverlust als Maß für die Temperaturdifferenz zwischen der Wärmequelle des anaeroben Fermenters hin zu dem MAP-Reaktor.

$$Q = \frac{\Delta T}{R_{TOT}} = \frac{(55 - 5)}{2,10105 \cdot 10^{-5}} = 2,379 \text{ W}$$

Q stellt die Änderung der Wärmeenergie dar, die aus dem Wärmeverlust zwischen dem anaeroben Fermenter und dem MAP-Reaktor bzw. aus dem Transport der Flüssigkeit vom anaeroben Fermenter zu dem MAP-Reaktor resultiert und zu der Temperaturänderung ΔT führt.

$$\Delta T_{leachate} = \frac{Q}{c_p \cdot \dot{m}} = \frac{2,379}{4,187 \cdot 10,000/3,600} = 0,20 \text{ °C}$$

Als weitere wichtige Quelle für Wärmeverluste, wurden chemischen Reaktionen im MAP-Reaktor betrachtet. Die Werte der Enthalpie der Edukte und der Fällungsreaktionen sind in der **Tab. II.1.7-15** und den nachfolgenden Gleichungen angegeben.

Tab. II.1.7-15: Reaktionsenthalpie der Komponenten der Fällungsreaktion.

Komponente	Enthalpie H_r (negative Werte = exothermische Reaktion)	Einheit
MgO	-34,60	kJ/mol
H ₃ PO ₄	10,96	kJ/mol
NaOH	-44,20	kJ/mol
Struvit	98,99	kJ/mol

$$H_{r,MgO} = \dot{M}_{MgO} \cdot H_{r,MgO0} = 860,0 \cdot (-34,6) = -29,7560 \frac{kJ}{h}$$

$$H_{r,H_3PO_4} = \dot{M}_{H_3PO_4} \cdot H_{r,H_3PO_40} = 860,0 \cdot (10,96) = 9,4256 \frac{kJ}{h}$$

$$H_{r,NaOH} = \dot{M}_{NaOH} \cdot H_{r,NaOH0} = 291,6 \cdot (-44,20) = -12,8887 \frac{kJ}{h}$$

$$H_{r,MAP} = \dot{M}_{MAP} \cdot H_{r,MAP0} = 645,0 \cdot (98,99) = 63,8486 \frac{kJ}{h}$$

$$\begin{aligned} H_{r,TOT} &= H_{r,MgO} + H_{r,H_3PO_4} + H_{r,NaOH} + H_{r,MAP} = -29,756,0 + 9,425,6 - 12,888,7 + 63,848,6 \\ &= 30,6295 \frac{kJ}{h} \end{aligned}$$

$$\Delta T_{leachate} = \frac{H_{r,TOT}}{c_p \cdot \dot{m}} = \frac{30,629,5}{4,187 \cdot 10,000} = 2,60 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Folglich berechnet sich die Temperatur der Prozessflüssigkeit beim Übergang zwischen anaeroben Fermenter und MAP-Reaktor aus den Wärmeverlusten der technischen Elemente und dem Wärmeverlust durch die chemischen Reaktionen.

$$T_{leachate,AD-MAP} = T_{IN} - (\Delta T_{pipe,IN} + \Delta T_{pipe,OUT} + \Delta T_{reactor} + \Delta T_{reaction}) = 55 - (0,20 + 0,18 + 0,29 + 2,6) = 51,73^\circ\text{C}$$

Die dem Wärmeverlust folgende Änderung der Wärmeenergie der Prozessflüssigkeit errechnet sich demnach wie folgt:

$$Q_{add} = c_p \cdot \dot{m} \cdot \Delta T = 4,187 \frac{Ws}{L \cdot ^\circ\text{C}} \cdot \frac{10,000 L}{3600 s} \cdot (55^\circ\text{C} - 51,73^\circ\text{C}) = 38,03 W$$

Ökonomische Betrachtungen des MAP-Prozesses

Basierend auf den vorausgegangenen Annahmen und Berechnungen wurde eine ökonomische Betrachtung des MAP-Prozesses durchgeführt. Nachfolgend wurden zwei verschiedene Kostenarten auf der Basis geschätzter Investitionskosten der Einzelkomponenten berücksichtigt (**Tab. II.1.7-16**): Fixkosten (Investitionskosten, Abschreibungen, Zinsen und Instandhaltung) und variable Kosten (Betriebskosten).

Tab. II.1.7-16: Geschätzte Investitionskosten der Einzelkomponenten der MAP-Fällung.

Gegenstand	Investitionskosten [€] (gerundet)
Wärme gedämmter Rührkessel	26.400
Zulaufpumpe	10.500
Ablaufpumpe	10.500
Ammonium- und pH-Analysegerät	12.600
Dosiereinheit für Chemikalien	11.300
Chemikalienlager	7.100
MAP-Lager	10.500

Fortsetzung Tab. II.1.7-16

Gegenstand	Investitionskosten [€] (gerundet)
Separationsprozess	11.000
Rohrleitungen	8.600
Elektrik	4.300
Personalkosten	4.800
Projektierungskosten	10.000
Versicherung	1.000
Gesamtkosten	128.605 €

Investitionskosten

Die Bewertung der Investitionskosten erfolgte nach verschiedenen Methoden. Hinsichtlich der Bestimmung der Gesamtkosten wurden eine Kosten-Kapazitäts-Relation und ein Kostenindex verwendet. Erstere steht in Relation zu den Volumina, wohingegen letztere Methode die Kosten in Relation zu einem Basisjahr setzt. Die nachfolgenden Berechnungen sind beispielhaft für den MAP-Reaktor dargestellt unter der Annahme der Verwendung eines Rundtanks vom Typ 304-SS-Mischtank 1985 (Green & Perry, 2008). Zur Schätzung der notwendigen Kosten für die Errichtung einer Reaktoreinheit wurde die nachfolgende Kapitalkosten-Methode (Garrett, 1989) verwendet, wobei zur Vereinfachung der Kostenbetrachtung unterstellt wurde, dass 1 \$ = 1 € entspricht und im Basisjahr 1985 die Kapitalkosten 6000 € betragen.

$$C_{MAP,1985} = C_1 \cdot \left(\frac{S_2}{S_1}\right)^n = 6000 \cdot \left(\frac{20}{100}\right)^{0.52} = 2600 \text{ €}$$

Hierbei entspricht C_x den Kapitalkosten eines Projektes mit der Kapazität S_x . Der Index n stellt einen Sicherheitsfaktor für die Berechnung der Kapitalkosten bei unzureichenden Vergleichswerten für die geplante Anlage dar. Ferner wurden als Kostenindizes für Anlagen (CEPCI) die Jahre 1985 ($CE_{1985}=325,3$) und 2014 ($CE_{2014}=575,7$) zur weiterführenden Berechnung der Kosten gewählt.

$$C_{MAP,2014} = C_{MAP,1985} \cdot \left(\frac{CE_{2014}}{CE_{1985}}\right) = 2600 \cdot \left(\frac{575,7}{325,3}\right) = 4601,3 \text{ €}$$

Zudem wurden weitere Kostenfaktoren in die Kalkulation einbezogen. Diese spiegeln die vermuteten Kosten für u.a. die Herstellung eines Beton-Fundamentes, für die Verlegung von Rohrleitungen und Elektrik und für die Anbringung der Dämmung am Reaktor wieder und wurden im sogenannten Faktor f_{L+M} in Höhe von 2,5 berücksichtigt.

$$L + M = C_{MAP,2014} \cdot f_{L+M} = 4601,3 \cdot 2,5 = 11503,4 \text{ €}$$

$$L = 0,2 \cdot (L + M) = 0,2 \cdot 11503,4 \text{ €} = 2300,7 \text{ €}$$

Zudem wurde ein Kostenfaktor für die Instandsetzung und Herstellung der Betriebsbereitschaft in Höhe von $L=0,2$ als auch eine Pauschale für die objektbezogene Geräteausstattung des Reaktors in Höhe von $Instr. = 8000,- \text{ €}$ einbezogen. Die Kosten je Position wurden überschlägig errechnet.

$$BMC = (L + M) + (L + M) + L + Instr = 4601,3 + 11503,4 + 2300,7 + 8000 = 26.405 \text{ €}.$$

Abschreibungen und Zinsaufwendungen

Nach der Schätzung der Investitionskosten erfolgte die Berechnung der Abschreibungen und Zinskosten. Der anteilige Zinssatz wurde mit 0,04 % angenommen. Ferner wurde davon ausgegangen, dass die gesamten Zinskosten innerhalb von 10 Jahren zurückgezahlt werden. Die Formel zur Berechnung der jährlichen Zinsaufwendungen erfolgt über den Kapitalwiedergewinnungsfaktor (A_n):

$$A_n = P \left[\frac{i(1+i)^n}{(1+i)^n - 1} \right] = 128.605 \cdot \left[\frac{0.04(1+0.04)^{10}}{(1+0.04)^{10} - 1} \right] = 15.855,83 \frac{\text{€}}{\text{Jahr}}$$

Wobei P =Investitionskosten, n =Laufzeit und i =Zinssatz ist. Die Abschreibungen wurden unter Berücksichtigung einer Anlagenwertes am Ende der Abschreibung von Null und eines Abschreibungszeitraums von 10 Jahren (20 Jahre für Reaktor- und Projektkosten) berechnet. Die Abschreibungsberechnungen werden beispielhaft für die Zulaufpumpe nachfolgend dargestellt.

$$D_{\text{pump}} = \frac{10.500 - 0}{10} = 1.050,0 \frac{\text{€}}{\text{Jahr}}$$

In **Tab. II.1.7-17** sind die jährlichen Abschreibungen sowie Zinsaufwendungen dargestellt.

Tab. II.1.7-17: Abschreibungen und Zinsaufwendungen des MAP-Fällungsprozesses.

Gegenstand	Abschreibungskosten[€/year]	Zinsaufwendungen[€/year]
Wärme gedämmter Rührkessel	1320,0	1942,6
Zulaufpumpe	1050,0	1294,6
Ablaufpumpe	1050,0	1294,6
Ammonium- und pH-Analysegerät	1260,0	1553,5
Dosiereinheit für Chemikalien	1134,0	1398,1
Chemikalienlager	708,8	873,8
MAP-Lager	1050,0	1294,6
Separationsprozess	1102,5	1359,3
Rohrleitungen	428,2	527,9
Elektrik	428,2	527,9
Projektierungskosten	494,9	1220,4
Total	10.026,6	13.287,3

Weitere fixe Kosten ergeben sich aus den Personalaufwendungen (Annahme: 1 Mitarbeiter, 221 Arbeitstage, 8 h/ Tag) sowie den Kosten für Versicherungen. Diese errechnen sich nach unten stehenden Gleichungen.

$$\text{Personalkosten} = 52,0 \frac{\text{€}}{\text{Stunde}} * 1768 \frac{\text{Stunde}}{\text{Jahr}} = 91.936 \frac{\text{€}}{\text{Jahr}}$$

$$\text{Versicherungskosten} = 1\% \text{ of (Investkosten - Projektkosten)} = 1186,05 \text{ €/Jahr}$$

Operative Kosten

Die Betriebskosten errechnen sich aus der Multiplikation der im gesamten Betriebsjahr verbrauchten Sachmittel/ Betriebsstoffe mit den Stückkosten je Einheit. Abweichend dazu werden die Wartungskosten nachfolgend mit 2,5% der Investitionskosten berechnet. In **Tab. II.1.7-18** sind die Ergebnisse dargestellt.

Tab. II.1.7-18: Operative Kosten des MAP-Fällungsprozesses.

Gegenstand	notwendige Menge	Einheit	Preis [€ / VE]	Prozesskosten [€]
MgO	84,5	[t/Jahr]	17,0	1.437,00
H ₃ PO ₄ (85 %)	211,1	[t/Jahr]	23,5	4.961,00
NaOH (99 %)	85,3	[t/Jahr]	13,0	1.109,00
Elektrische Energie	31,400	kW	0,0844	2.650,00
Instandhaltung	-	-	-	2.100,00

Im Rahmen der ökonomischen Analyse wurden Chemikalien, Energie und Instandhaltung berücksichtigt.

Einnahmen

Die Einnahmenquelle aus der untersuchten Stickstoffeliminierungsstrategie, die im Rahmen dieser Studie betrachtet wurde, ist der Verkauf von MAP als Düngemittel. Die Leistungssteigerung der anaeroben Fermentation und damit die mögliche Verbesserung der Methanausbeute durch Abreicherung des Ammoniums aus der Prozessflüssigkeit wurde aufgrund fehlender Leistungsdaten nicht berücksichtigt. Die in einem Jahr erzeugte Menge an MAP und die durch den Verkauf des MAP erzielten Einnahmen sind in **Tab. II.1.7-19** dargestellt. Als Vergleichsbasis für die Preisbildung wurde handelsüblicher NPK-Volldünger in Form von 1 Tonne-Gebinde verwendet. Dabei wurde unterstellt, dass eine MAP-Fällung auf 12 Stunden pro Tag erweitert wird, unabhängig von der Personalbereitschaft von 8 Stunden pro Tag.

Tab. II.1.7-19: Einnahmen aus dem MAP-Fällungsprozess.

Produkt	Menge [t/ Jahr]	Preis[€/t]	Einnahmen[€]
MAP	419,8	≈300	125.927,57

Fazit MAP Fällung

Bei einer Gegenüberstellung der jährlichen Einnahmen und Ausgaben, ergibt sich das folgende Ergebnis:

$$\text{Gewinn bzw. Kosten} = 125.927,6 - (10.026,6 + 13.287,3 + 122.257 + 91.936 + 1.186,1) = \underline{\underline{-112.765,4 \text{ €}}}$$

Wie aus der Gesamtrechnung hervorgeht, ist unter den gewählten Betriebsbedingungen ein MAP-Präzipitationsverfahren **nicht wirtschaftlich** durchführbar. Eine erhöhte Wirtschaftlichkeit kann demzufolge nur durch Minderung der zudosierten Chemikalien oder durch Zugewinne seitens der Biogasproduktion erwirkt werden durch eine Reduzierung der NH₄/NH₃-Hemmung.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtung des Strippungsverfahrens

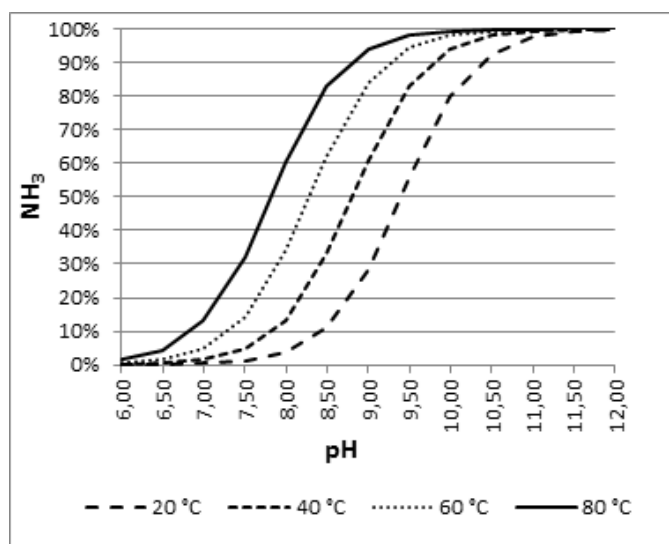
Ziel ist zu analysieren, ob das Ammoniak-Strippverfahren eine tragfähige Technologie darstellt, um die Ammoniak/Ammonium-Konzentration während des anaeroben Aufschlusses zu verringern. Das Verfahren ist in II.1.5 beschrieben.

Hinsichtlich der gewählten Strippungsrhythmik wurde ein dynamisches Strippungs-Modell angewendet. "Dynamisch" bezeichnet dabei das Einsetzen der Strippung, wenn die Ammoniumkonzentration in der Prozessflüssigkeit eine Konzentration von 1.500 mg/L überschreitet. Die Parameter des Strippverfahrens sind in **Tab. II.1.7-20** angegeben.

Tab. II.1.7-20: Parameter des Strippungsprozesses.

Parameter	Einheit	Menge
Perkolat – Zulauftrate	m ³ /h	0.02
Luft – Zulauftrate	m ³ /h	20
pH-Wert	-	≈8.5
Druck	bar	1
Temperatur Strippungskolonne	°C	80
Lufttemperatur	°C	23
Temperatur Kondensationskolonne	°C	5
Verhältnis Luft zu Flüssigkeit	-	1000
Höhe der Füllkörperpackung	mm	880
Packungsmaterial	mm	15
Flutfaktor	%	≈20

Fünf Schlüsselfaktoren bestimmen den Wirkungsgrad, mit dem Ammoniak entfernt werden kann: (i) pH-Wert, (ii) Temperatur, (iii) Geschwindigkeit der Gasübertragung, (iv) Luftzufuhrtrate und (v) hydraulische Beladungsrate. Die Bedeutung des pH-Wertes und der Temperatur auf die Strippungseffizienz sind, wie in **Abb. II.1.7-5** dargestellt, direkt erkennbar.

**Abb. II.1.7-5** Einfluss von pH-Wert und Temperatur auf die Konversion von Ammonium zu Ammoniak

Der Prozentsatz an Ammoniak, der in der Prozessflüssigkeit vorhanden ist, wurde unter Verwendung der nachfolgenden Formel berechnet:

$$FAN = TAN \cdot \left(1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-(0,0902 + \frac{2730}{T})}} \right)^{-1}$$

Die Konzentrationen an Ammonium und Ammoniak sowie das vorliegende Verhältnis dieser Substanzen werden demzufolge vom pH-Wert und der Temperatur bestimmt.

Bei einem gegebenen pH-Wert steigt der Prozentsatz an Ammoniakstickstoff, der als gelöstes Gas vorliegt, mit der Temperatur an (Abb. II.1.7-2). Darüber hinaus gilt, entsprechend Henry's Gesetz, dass die Löslichkeit von Ammoniakgas in Wasser zunimmt, wenn die Temperatur abnimmt (Huang & Shang, 2006). Das Verhältnis von aufeinandertreffender Luft und Prozessflüssigkeit beeinflusst die Abscheidegrad der Stickstoffeliminierung (Bonmati & Flotats, 2003). In der betrachteten Kolonne hat

das Verhältnis von Luft zu Flüssigkeit einen Wert von ca. 1000, was im Vergleich zu den durch Praxisanlagen vorgeschlagenen Werten (Epa, 2000) höher ist. Ferner beträgt der Flutfaktor typischerweise etwa 80 % (Henley et al., 2011). Im betrachteten System ist der Flutfaktor etwa 20 %. Diese Einschränkungen resultieren aus dem labortechnischen Maßstab sowie aus den nur geringen Mengen an verfügbarer Prozessflüssigkeit.

Ökonomische Betrachtungen

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der zur Bewertung der Strippungstechnologie berücksichtigt wurde, war die wirtschaftliche Umsetzung unter Berücksichtigung der Investitionskosten. Die in **Tab. II.1.7-21** dargestellten Kosten für die Herstellung einer Strippungsanlage, bestehend aus Heiz- und Kühlkolonne sowie saurem Wäscher, wurden nach verschiedenen Methoden ermittelt. Die Spalte „Quelle“ repräsentiert die Herkunft des verwendeten Preisangebotes. Hinsichtlich der Schätzung der Kosten der Kondensationskolonne wurden eine Kosten-Kapazitäts-Relation und ein Kostenindex verwendet.

Tab. II.1.7-21: Kosten relevanter Komponenten einer labortechnischen Strippungsanlage.

Komponente	Quelle	Nettokosten [€]	19 % MwSt [€]	Gesamtkosten [€]
Peristaltikpumpen	Internetseite	3653,31	694,13	4.347,43
Lüfter	Persönliche Aussage	101,48	19,28	120,76
Heizsystem	Angebot	2059,23	391,25	2.830,48
Kühlsystem	Angebot	2059,23	391,25	2.830,48
Strippungskolonne	Angebot	3389,46	643,99	4.033,45
Kondensationskolonne	Kalkulation der Materialkosten	1406,17	267,17	1.673,34
Füllmaterial	Angebot	101,48	19,28	120,76
Ammoniakwäscher	Persönliche Aussage	553,70	105,20	601,91
			Total	15.855,61

Eine Kosten-Kapazitäts-Relation generiert eine Relation zum Volumen des konzipierten Reaktionskörpers, wohingegen ein Kostenindex die Kosten in Relation zu einem Basisjahr stellt. Die Kosten der Kühlkolonne errechnen sich wie folgt:

$$C_{MAP,1985} = C_1 \cdot \left(\frac{S_2}{S_1}\right)^n = 3340 \text{ €} \cdot \left(\frac{100 \text{ l}}{30 \text{ l}}\right)^{0.6} = 1385,65 \text{ €}$$

$$C_{MAP,2014} = FOB = C_{MAP,1985} \cdot \left(\frac{CE_{2014}}{CE_{1985}}\right) = 1385,65 \text{ €} \cdot \left(\frac{575,7}{567,3}\right) = 1406,17 \text{ €}$$

wobei als Kostenindizes der Jahre $CE_{1985} = 567,3$ und $CE_{2014} = 575,7$ (Chemical Engineering Plant Cost Index (2014)) verwendet wurden. Dem kalkulierten Preis $C_{MAP,2015}$ werden Steuern hinzugerechnet (VAT) sodass sich die folgenden Gesamtkosten ergeben:

$$VAT = 0,19 \cdot 1406,17 \text{ €} = 267,17 \text{ €}$$

$$Gesamtkosten = FOB + VAT = 1406,17 \text{ €} + 267,17 \text{ €} = 1673,34 \text{ €}$$

Aus Tab. II.1.7-21 geht hervor, dass die Gesamtinvestitionen einer labortechnischen Strippungsanlage etwa 15.856 € betragen. Es ist zu bemerken, dass bei der ökonomischen Schätzung folgende Parameter nicht berücksichtigt wurden: Mannstunden für den Bau des Systems, Instandhaltungskosten, Schwefelsäure-Kosten, Energiekosten für die Trocknung des Präzipitats und potenzielle Einnahmen durch den Verkauf von Ammoniumsulfat.

Im Folgenden wurden die Kosten für die Entfernung von 1 kg Ammonium aus 60 L Prozessflüssigkeit unter Nutzung der Stripping-Technologie und bei einer vermuteten Effizienz von 75 % kalkuliert und den Anschaffungskosten der Strippungsanlage gegenübergestellt. Die Kalkulation geht ferner von einer kontinuierlichen Befütterung und somit einem gleichbleibenden Neueintrag von Ammonium aus, womit die Strippung alle fünf Tage durchgeführt werden muss. Die Abschreibungsdauer wird mit 10 Jahren angenommen, sodass die Kosten über diese Dauer verteilt dem eliminierten NH_4 über denselben Zeitraum gegenübergestellt werden.

$$\text{GesamtNH}_4 - \text{N im System} = 2,5 \text{ g} \frac{\text{NH}_4 - \text{N}}{\text{l}} \cdot 60 \text{ l} = 150 \text{ g NH}_4 - \text{N}$$

$$\text{Menge an eliminiertem NH}_4 \text{ je Strippung} = 150 \text{ g NH}_4 - \text{N} \cdot 75 \% = 112,5 \text{ g NH}_4 - \text{N}$$

$$\text{Menge an elimin. NH}_4 \text{ je Monat} = 112,5 \text{ g NH}_4 - \text{N} \cdot 6 \frac{1}{\text{Monat}} = 675 \frac{\text{g NH}_4 - \text{N}}{\text{Monat}}$$

$$\text{Gesamtmenge an eliminierten NH}_4 \text{ über 10 Jahre} = 675 \frac{\text{g NH}_4 - \text{N}}{\text{Monat}} \cdot 12 \frac{\text{Monat}}{\text{Jahr}} \cdot 10 \text{ Jahre} = 81 \text{ kg NH}_4 - \text{N}$$

$$\text{Kosten der NH}_4 - \text{Eliminierung} = \frac{15855,61 \text{ €}}{81 \text{ kg NH}_4 - \text{N}} = 195,75 \frac{\text{€}}{\text{kg NH}_4 - \text{N}}$$

Aus den Berechnungen ergibt sich, dass die Eliminierung von 1 kg Ammonium, Kosten in Höhe von 195,75 € entspricht.

Fazit Strippung

Die Kosten in Höhe von 195,75 € je kg eliminiertem Ammonium **scheinen ökonomisch wenig tragfähig**. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Strippungstechnologie bei mehreren Fermentationsssystemen nacheinander eingesetzt werden kann, da ein Strippungszyklus nur zwei Stunden in Anspruch nimmt. Folglich könnte eine größere Menge an eliminierten Stickstoff im Abschreibungszeitraum von 10 Jahren erzeugt werden. Ferner kann durch die Eliminierung von NH_4 aus der Prozessflüssigkeit eine gesteigerte Biogasproduktion vermutet werden, die in einem Mehrertrag an Methan resultiert. Zudem ist zu beachten, dass für den Betrieb der Strippungsanlage kein weiteres Personal notwendig ist, da die Strippungsanlage nach erfolgter Implementierung nahezu störungsfrei über einen mehrjährigen Versuchszeitraum betrieben werden konnte.

II.1.8 Übersicht zur Erfüllung der Meilensteine

Meilenstein (M)	Erreichungsstand zum Projektabschluss
M 1 Kontinuierliche Bereitstellung stickstoffreicher Substrate	Die Bereitstellung prozesskritischer Substrate war während der gesamten Projektlaufzeit gewährleistet: Grass-, Klee gras- und Luzernesilage, Hühner trockenkot
M 2 Einrichtung der Biogasreaktorsysteme	Alle geplanten Biogasreaktorsysteme (LBF, SBF, CSTR) wurden etabliert und bei Bedarf durch einzelne Komponenten erweitert
M 3 Entwicklung optimierter Stickstoffeliminierungsverfahren	Verfahren zur optimierten Eliminierung von Stickstoff im batch- und kontinuierlichen Betrieb sind abgeschlossen. Verfahren mit Luft und Biogas als Trägergas mit und ohne Unterdruck (Ana-Strip) stellte die erfolgreichste Methode dar. Strippungsversuche zur Optimierung der Strippungsfrequenz wurden durchgeführt. Präzipitationsversuche zur Generierung von MAP wurden durchgeführt.

Meilenstein (M)	Erreichungsstand zum Projektabschluss
	<i>Die Frage der Anwendbarkeit des mikrobiologischen Anammox-Stoffwechsels zur Stickstoffelimination in Biogasreaktor-Prozessflüssigkeit konnte nicht eindeutig beantwortet werden.</i>
M 4 Kulturunabhängige Charakterisierung der prokaryotischen Lebensgemeinschaften und deren Populationsoszillationen bei variierenden Stickstoffgehalten	Verschiedene Phasen mit unterschiedlichem Ammonium- bzw. Ammoniakstress in LBF, SBF und CSTR zur Evaluierung von stickstoffabhängigen Populationschwankungen wurden mikrobiologisch untersucht. Hierzu wurden kulturunabhängige, mikroskopische und molekularbiologische Techniken eingesetzt.
M 5 Etablierung mikrobieller Gemeinschaften adaptiert an hohe Ammoniakkonzentrationen	Die Langzeit-Anreicherung von angepassten mikrobiellen Gemeinschaften in den CSTR wurde nach 994 Versuchstagen abgeschlossen. Die etablierten Bakterien- und Archaeen-Gemeinschaften wurden mit verschiedenen molekular- und mikrobiologischen Methoden charakterisiert.
M 6 Entwicklung von molekularen Markern zum Nachweis ausgewählter Mikroorganismen	Die aus Proben der Reaktorsysteme des SBF und CSTR erstellten Klonbibliotheken ermöglichten die Identifizierung von Bakterien und Archaeen, die an die Bedingungen in mit stickstoffreichen Substraten betriebenen Biogasreaktoren angepasst waren.
M 7 Kultivierung von am Stickstoffumsatz beteiligten Mikroorganismen	Die Versuchsreihen zur Kultivierung von zur anaeroben Ammoniumoxidation befähigten Planctomyceten wurden vorzeitig beendet, da eine weitere Anreicherung nicht erkennbar war.
M 8 Ermittlung des Metagenoms von ammoniaktoleranten Biozönosen zur Aufklärung der genetischen Grundlagen der Ammoniakverträglichkeit	Auf eine Metagenomanalyse wurde verzichtet, zugunsten einer intensivierten Untersuchung der ammoniaktoleranten Gemeinschaften mithilfe von Klonbibliotheken.
M 9 Bioaugmentationszusatz	Die im CSTR angereicherte und an hohe Ammoniakkonzentrationen adaptierte Biozönose wurde molekularbiologisch charakterisiert und steht als Bioaugmentationsmaterial einer weiteren Verwertung zur Verfügung. Ergänzend hierzu ist auch das Material aus den SBF ist zur Bioaugmentation geeignet, insbesondere wenn NaWaRo vergoren werden.
M 10 Wirtschaftlichkeitsprüfung	Betrachtungen zur Wirtschaftlichkeit ausgewählter, hocheffektiver Verfahren der Stickstoffeliminierung werden im Rahmen des Schlussberichtes abschließend, unter Einbeziehung mikrobiologischer Ergebnisse, vollumfänglich dargelegt.
M 11 Praxistransfer	Zur Übertragung von Teilergebnissen in die Praxis ist ein neues Projekt mit Unterstützung mehrere Wirtschaftspartner gestartet.

II.2 Verwertung

Für die bestehenden landwirtschaftlichen Biogasanlagen bleibt die Nutzung von Abfall- und Reststoffen, sowie von landwirtschaftlichen biogenen Reststoffen auch weiterhin eine wichtige Säule der ökonomischen Biogasgewinnung. Trotz des hohen Biomethanpotentials der landwirtschaftlichen, biogenen Reststoffe werden diese Einsatzstoffe von Anlagenbetreibern wenig genutzt. Somit stellen die dem laufenden Projekt zugrunde liegenden Forschungsschwerpunkte auch weiterhin einen sehr wichtigen und dringend notwendigen Baustein zur Steigerung der Wirtschaftlichkeit von landwirtschaftlichen Biogasanlagen dar. Neben der Möglichkeit der Substratsubstitution und –Erweiterung zeigt der untersuchte Ansatz weitere positive wirtschaftliche Aspekte auf. Einerseits wird bei der geplanten verfahrenstechnischen Eliminierung des Ammoniaks ein stickstoffreicher, hochwertiger Dünger in Form von Magnesiumammoniumsulfat oder Ammoniumsulfat produziert, der zur Bodenverbesserung eingesetzt werden kann. Zum anderen werden klimaschädliche, atmosphärische Lach-

gasemissionen aus Gärresten reduziert. Zudem kann das kontaminierende Potential als Folge einer Auswaschung von Nitratverbindungen in Pedos- und Hydrosphäre signifikant verringert werden.

Das als Verbundvorhaben ausgelegte Anschlussprojekt hat primär die Maßstabsvergrößerung als auch die Integration ausgewählter, hocheffizienter Eliminierungsstrategien in das verfahrenstechnische Gesamtkonzept zum Gegenstand. Aufgrund der hohen Wirtschaftsnähe des Anschlussprojektes ist eine deutliche finanzielle Beteiligung der Wirtschaftspartner notwendig. Daher ist im Rahmen eines im April 2017 begonnenen Verbundvorhabens mit Partnern aus Wirtschaft und Wissenschaft eine Übertragung der Projektergebnisse in die Praxis geplant. Innerhalb des Vorhabens soll eine containerbasierte Lösung für die energetische als auch stoffliche Nutzung stickstoffreicher, landwirtschaftlicher Roh- und Reststoffe entwickelt und implementiert werden.

II.3 Erkenntnisse Dritter

Eine das Forschungsvorhaben begleitende Informationsrecherche zum wissenschaftlichen Stand der Technik ergab bisher keine Ergebnisse, die für das Vorhaben und die hierin definierten Ziele konterkarierend sind. Im Projektverlauf konnte ein Verfahren der Stickstoffeliminierung, welches unter dem Namen Ductor® patentiert ist und als vermarktungsfähiges Paket angeboten wird, identifiziert werden. Die darin beschriebene Waschung stickstoffreicher Biogassubstrate als Vorbehandlung, wird jedoch aus ökologischen als auch ökonomischen Gesichtspunkten als nicht langfristig tragfähig bewertet. Die dargebotene Lösung stellt nur eine Verlagerung der Problematik durch Verdünnung des stickstoffhaltigen Eduktes dar.

Im Projektverlauf konnte ein wissenschaftliches Vorhaben identifiziert werden, mit dem anteilig eine inhaltliche Überschneidung besteht. Hierbei handelt es sich um ein Forschungsprojekt der Brandenburgischen Technischen Universität (BTU) Cottbus- Senftenberg. Das Vorhaben (FKZ: 22003212) beschäftigt sich mit der Gewinnung von Ammoniumcarbamat durch Behandlung stickstoffreicher Einsatzstoffe. Dabei grenzt sich das genannte Projekt durch das methodische Vorgehen als auch durch die verfolgte Zielstellung deutlich ab. Das Projekt zielt hierbei ausschließlich auf die Bestimmung von Prozess- und Dimensionierungsparameter und die verfahrenstechnische Realisierung des Konzeptes der Ammoniakverwertung ab. Jedoch findet weder eine Betrachtung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Fermenter bei variierenden Ammoniakkonzentrationen noch eine Betrachtung der Auswirkungen verfahrenstechnischer Eingriffe auf die Biozönose im Biogasreaktor statt. Dies erscheint jedoch notwendig, um eine effiziente Verknüpfung von innovativer Technologie und anaerober mikrobiologischer Prozesse zu erwirken.

II.4 Veröffentlichungen

Im Rahmen des Projektes sind folgende Veröffentlichungen erfolgt:

Artikel

Alsouleman K, Linke B, Klang J, Klocke M, Krakat N, Theuerl S. 2016: Reorganisation of a mesophilic biogas microbiome as response to a stepwise increase of ammonium nitrogen induced by poultry manure supply. *Biore-source Technology*: 1-10

Anjum R, Krakat N, Reza M, Klocke M. 2014: Assessment of mutagenic potential of pyrolysis biochars by Ames Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Excotoxicology and Environmental Safety*. 107: 306-312
Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.005>

Anjum R, Sebök S, Krakat N. 2015: Thermophilic (55 °C) and moderately hyperthermophilic (65 °C) fermentation of poultry manure triggers release of high heavy metal concentrations leading to enhanced genotoxicity. *Engineering in Life Sciences*. 1-10

Anjum R, Grohmann E, Krakat N. 2017. Anaerobic digestion of nitrogen rich poultry manure: Impact of thermophilic biogas process on metal release and microbial resistances. *Chemosphere* 168 (Febr): 1637-1647.

Beinersdorf K, Sebök S, Krakat N. (2015): Biogasgewinnung aus stickstoffreichen Substraten: Entwicklung und Optimierung von verfahrenstechnischen Lösungen zur Vermeidung von Ammoniak-Hemmungen in Biogasreaktoren. In: KTBL, (eds.): *Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven*. KTBL/FNR-Kongress "Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven". KTBL, Darmstadt, (ISBN 978-3-945088-07-4), p. 195-204.

Krakat N, Beinersdorf K, Sebök S. (2014): Monovergärung stickstoffreicher Substrate künftig möglich. *Biogas Journal*. 17 (5): 82-85. Online: <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201500096>,
Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.104>

Vorträge

Alsoulemann K, Krakat N. 2013. Potential Impact of Increasing Ammonia Concentrations upon Microbial Population Dynamics in Anaerobic Meso- and Thermophilic driven Fermenters. International PhD Program for Agricultural Science (IPAG), Germany, Göttingen, Georg-August-University, March 15th, 2013.

Alsouleman K, Linke B, Klang J, Klocke M, Krakat N, Theuerl S. 2016. Reorganisation of a mesophilic biogas microbiome as a response to a stepwise increase of ammonium nitrogen induced by pultry manure supply. *Biogas Science* 2016, 21.08.2016-24.08.2016, Szeged, Ungarn

Anjum R, Klocke M, Krakat N 2014. Is there any dark side of biochar? National conference of contemporary topics in Biotechnology: Progress and future applications and panel discussion at Amity Institute of Biotechnology, Amity University, Haryana Gurgaon, India.

Anjum R, Krakat N. (2015). A Scavenger technology in biogas processing risk. The removal of pollutants produced in biogas process due to the utilization of renewable raw materials (Oral presentation) Forum for international postdoctoral Leibniz researchers, 6th. November 2015 at the Leibniz association head office, Berlin

Beinersdorf K, Schönberg M, Müller M, Dietz D, Linke B, Krakat N. 2013. Implementierung von verfahrenstechnischen Lösungen zur Vermeidung von Ammoniakhemmnungen unter thermophilen/hyperthermophilen Prozessbedingungen in einem zweistufigen und zweiphasigen Leach-Bed-Fermentersystem. 7. VDI Fachtagung Biogas - Energieträger der Zukunft, Nürtingen/Stuttgart, June 12th - 13th.

Posterbeiträge

Rothe L, Krakat N. 2013. Fermentation of nitrogen-rich Wastes: Optimization of Microbiological Solutions to Avoid substrate-induced Ammonia-Inhibition with Parallel Characterization of Biocenosis involved. 5th Congress of European Microbiologists FEMS. July 21th-25th, 2013.

Rothe L, Beinersdorf K, Krakat N. Charakterisierung der methanogenen Gemeinschaft bei erhöhten N-Konzentrationen in Schwimmbettfermentern. KTBL/FNR-Kongress "Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven", 22.09.2015-23.09.2015, Potsdam

Qualifizierungsarbeiten

Kay Beinersdorf fertigt eine Dissertation zum Thema „Monofermentation stickstoffreicher Substrate in zweistufigen und zweiphasigen Biogasreaktorsystemen – Implementierung eines prozessstabilen Betriebsregimes“ an, die Anfang 2018 an der HU Berlin einreichen wird.

Schöder P. 2014. Evaluation of molecular biological techniques for the detection of microorganisms from biogas plants. Masterarbeit, TU Berlin

Vandersee, J. 2014. Fällung von Magnesiumammoniumphosphat aus stickstoffreichen Bioabfällen. Projektbericht, Staatliche Technikerschule Berlin

Geplante Publikationen

Gegenwärtig ist folgende Publikation für eine Veröffentlichung in *Biomass & Bioenergy* in Vorbereitung: Sebök S, Krakat N. Thermophilic monofermentation of nitrogen-rich poultry manure in a two-phase leach bed reactor enhanced by in situ ammonia stripping.

Weiterhin soll zum Abschluss des Projektes ein Beitrag in Form einer Zusammenfassung in einer populärwissenschaftlichen Zeitschrift im deutschsprachigen Raum eingereicht werden. Mögliche Zeitschriften wären *Landtechnik* (Herausgeber u.a. KTB VDI) oder *Biogas Journal*, in dem Daten aus dem Projekt wurden bereits publiziert wurden.

Nach Abschluss der Arbeiten werden ausgewählte DNA - Sequenzdaten in der öffentlichen Datenbank GenBank hinterlegt, um sie so für weitere wissenschaftliche Arbeiten zur Verfügung zu stellen.

Literaturverzeichnis

- Al-Aubaidi M, Dardiri H, Muscoplatt CC, Mc Cauley EH. 1972. Identification and Characterization of *Acholeplasma oculosi* spec. nov. from the Eyes of Goats with Keratoconjunctivitis.
- Alsouleman K, Linke B, Klang J, Klocke M, Krakat N, Theuerl S. 2016. Reorganisation of a mesophilic biogas microbiome as response to a stepwise increase of ammonium nitrogen induced by poultry manure supply. *Bioresource Technology* 208:200-204
- Angelidaki I, Ahring BK. 1993. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:560-564.
- Angelidaki I, Ahring B. 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. *Water Research* 28(3):727-731.
- Angelidaki I, Chen X, Cui J, Kaparaju P, Ellegaard L. 2006. Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of household municipal solid waste: start-up procedure for continuously stirred tank reactor. *Water Research* 40:2621-2628.
- ASTM D3588, 98(2017) Standard Practice for Calculating Heat Value, Compressibility Factor, and Relative Density of Gaseous Fuels. ASTM International, USA.
- ATV-DVWK. 2000. Arbeitsblatt ATV-DVWKA-131 Bemessung von einstufigen Belebungsanlagen. Hennef, GFA - Mai 2000.
- Avaniss-Aghajani E, Jones K, Chapman D, Brunk C. 1994. A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences.
- Babić-Ivančić V, Kontrec J, Kralj D, Brečević L. 2002. Precipitation diagrams of struvite and dissolution kinetics of different struvite morphologies. *Croatica chemica acta* 75:89-106.
- Bagchi S, Biswas R, Nandy T. 2010. Alkalinity and dissolved oxygen as controlling parameters for ammonia removal through partial nitrification and ANAMMOX in a single-stage bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:871-876.
- Balk MM, Weijma J, Stams AJM. 2002. *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanol-degrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1361-1368. doi: 10.1099/ijs.0.02165-0
- Bauermeister U, Spindler H, Wild DKA. 2006. Treatment of Digested Substrates for Nitrogen Removal and Emission Decrease. *Use of Bioenergy in the Baltic Sea Region*: 138.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipmann DJ, Ostell J, Sayers EW. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res* 41:36-42. doi: 10.1093/nar/gks1195
- Bischofsberger W. 2003. *Anaerobtechnik*. Springer Science & Business.
- Bischofsberger W, Dichtl N, Rosenwinkel K-H, Seyfried C.-F, Böhnke B (Eds.) 2005. *Anaerobtechnik, Mikrobiologische Grundlagen*. 2. Auflage, Springer Verlag
- Bonmati A, Flotats X. 2003. Air stripping of ammonia from pig slurry: characterisation and feasibility as a pre-or post-treatment to mesophilic anaerobic digestion. *Waste management*, 23:261-272.
- Braun R. 1982. *Biogas-Methangärung organischer Abfallstoffe*. Wien / New York. Springer.
- Broda E. 1977. Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 17:491-493.

- Brooks JP, McLaughlin MR, Scheffler B, Miles DM. 2010. Microbial and antibiotic resistant constituents associated with biological aerosols and poultry litter within a commercial poultry house. *Sci Total Environ* 408:4770–4777. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.06.038
- Brown DR. 2009. Phylum XVI. Tenericutes. In: *Bergey's Manual of Systematics Biology*. 67–78
- Burkhardt C. 1998. Elimination of ammonia from sugar factory condensates by physico- chemical stripping. *Zuckerindustrie (Germany)*.
- Carballa M, Smits M, Etchebehere C, Boon N, Verstraete W. 2011. Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:303–314. doi: 10.1007/s00253-010-2858-y
- Chamy R, León C, Vivanco E, Poirrier P, Ramos C. 2011. Anaerobic monodigestion of poultry manure: determination of operational parameters for CSTR. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* 65:53.
- Cheeseman P, Toms-wood A, Wolfe RS. 1972. Isolation and Properties of a Fluorescent Compound, Factor 420, from *Methanobacterium* Strain M.o.H. *Microbiology* 112:527–531.
- Chemical Engineering's Plant Cost Index (CEPCI). 2014. <http://www.che.com/pci/>.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour Technol* 99:4044–4064. doi: 10.1016/j.biortech.2007.01.057
- Cheng L, Dai L, Li X, Zhang H, Lu Y. 2011. Isolation and characterization of *Methanothermobacter crinale* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the shengli oil field. *Appl Environ Microbiol* 77:5212–5219. doi: 10.1128/AEM.00210-11
- Cheung K, Chu L, Wong M. 1997. Ammonia stripping as a pretreatment for landfill leachate. *Water, air, and soil pollution* 94:209-221.
- Clemens J. 2012. How to Optimize the Biogas Process according to Process Control Monitoring Data in Biogas Plants. online: http://www.biogaschina.org/index.php?id=41&cid=38&fid=23&task=download&option=com_flexicontent&Itemid=19&lang=en.
- Dapena-Mora A, Van Hulle SWH, Campos JL, Méndez R, Vanrolleghem PA, Jetten M. 2004. Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: Experimental and modelling results. *J Chem Technol Biotechnol* 79:1421–1428. doi: 10.1002/jctb.1148
- Deller B, Eckstein B, Janßen E. 2001. Association of German agricultural investigation- and research Institutes. In: BREITSCHUH, G. (ed.) Book 3, Chapter 3.1 / 8.4. Darmstadt: VDLUFA, self-publishing.
- Demirel B. 2014. Major Pathway of Methane Formation From Energy Crops in Agricultural Biogas Digesters. *Crit Rev Environ Sci Technol* 44:199–222. doi: 10.1080/10643389.2012.710452
- Dianou D, Miyaki T, Asakawa S, Morii H, Nagaoka K, Oyaizu H, 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1663–1669. doi: 10.1099/00207713-51-5-1663
- DIN 51857. 1997-03. Gasförmige Brennstoffe und sonstige Gase - Berechnung von Brennwert, Heizwert, Dichte, relativer Dichte und Wobbeindex von Gasen und Gasgemischen. Beuth Verlag.
- Epa U. 2000. Wastewater Technology Fact Sheet. Ammonia Stripping. Washington, D.C.

FAL 1997. Technologische Bewertung von Demonstrationsanlagen zur umweltverträglichen Gülleaufbereitung und –verwertung. Abschlussbericht zum BMBF-Förderschwerpunkt „Güllebehandlung und –verwertung“. Institut für Technologie der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft.

Federhen S. 2012. The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Res* 40:D136–D143. doi: 10.1093/nar/gkr1178

FNR, 2010. Leitfaden Biogas: Von der Gewinnung zur Nutzung. Gülzow-Prüzen.

FNR. 2013. Fachagentur nachwachsende Rohstoffe. Leitfaden Biogas: Von der Gewinnung zur Nutzung, 6. überarb. Aufl., Gülzow.

FNR. 2013. Leitfaden Biogas. 7.Auflage 2016. ISBN: 3-00-014333-5.

Gagen EJ, Padmanabha J, Denman SE, McSweeney CS. 2015. Hydrogenotrophic culture enrichment reveals rumen Lachnospiraceae and Ruminococcaceae acetogens and hydrogen-responsive Bacteroidetes from pasture-fed cattle. *FEMS Microbiol Lett* 362:1–8. doi: 10.1093/femsle/fnv104

Gallert C, Winter J. 2008. Propionic acid accumulation and degradation during restart of a full-scale anaerobic biowaste digester. *Bioresource technology* 99:170-178.

Garrett DE. 1989. *Chemical Engineering Economics*. Springer Verlag

Gemmeke B, Rieger C, Weidland P, Schröder J. 2009. Biogas-Messprogramm II, 61 Biogasanlagen im Vergleich. Gülzow-Prüzen: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe.

Gerovac M, Gerovac D. 2008. Aus Gülle Geld machen – Ammoniumrückgewinnung aus Abwässern. *Junge Wissenschaft*. Ausgabe 80, Jahrgang 02/2008

Goeman JJ, Solari A. 2014. Multiple hypothesis testing in genomics. *Statistics in Medicine* 33:1946-1978

Gonzalez Benito G, Garcia Cubero M. 1996. Ammonia elimination from beet sugar factory condensate streams by a stripping-reabsorption system. *Zuckerindustrie* 121:721-726.

Goux X, Calusinska M, Lemaigre S, Marynowska M, Klocke M, Udelhoven T, Benizri E, Delfosse P. 2015. Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnol Biofuels* 8:122. doi: 10.1186/s13068-015-0309-9

Green DW, Perry RH. 2008. *Perry's chemical engineers' handbook*, McGraw-hill New York.

Großkopf R, Janssen PH, 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 Diversity and Structure of the Methanogenic Community in Anoxic Rice Paddy Soil Microcosms as. 64:960–969.

Hamersley MR, Hamersley MR, Lavik G, Woebken D, Rattray JE, Phyllis L, Hopmans EC, Sinninghe Damsté JS, Krüger S, Graco M, Gutiérrez D, Kuypers MMM. 2007. Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnology* 52:923–933.

Hania W Ben, Godbane R, Postec A, Hamdi M, Olliver B, Fardeau ML. 2012. *Defluviitoga tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a mesothermic and anaerobic whey digester. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1377–1382. doi: 10.1099/ijs.0.033720-0

Hansen KH, Angelidaki I, Ahrinbg BK. 1998. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research*, 32:5-12.

Hejnfelt A, Angelidaki I. 2009. Anaerobic digestion of slaughterhouse by-products. *Biomass and bioenergy*, 33:1046-1054.

Henley EJ, Seader JD, Roper DK. 2011. *Separation process principles*, Wiley.

- Hill AC. 1992. *Acholeplasma cavigenitalium* sp. nov.; Isolated from the Vagina of Guinea Pigs. *INTERNATIONAL J Syst BACTERIOLO* 42:589–592.
- Holler S, Trösch W. 1999. Entwicklung eines nachhaltig umweltschonenden Verfahrens zur Reinigung kommunaler Abwasser-Membrangestützte Abwasserreinigung. Schlussbericht zum BMBF-Forschungsvorhaben 02WA9733/3
- Hu B, Shen L, Xu X, Zheng P. 2011. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in different natural ecosystems. *Biochem Soc Trans* 39:1811–6. doi: 10.1042/BST20110711
- Hu Z-H, Wang G, Yu H-Q. 2004. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal* 21:59-62.
- Huang J-C, Shang C. 2006. Air stripping. *Advanced Physicochemical Treatment Processes*. Springer.
- Huber R, Hannig M. 2006. Thermotogales. In: Dworking M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ed) *The Prokaryotes*. Springer, Luxemburg, Berlin, Chapter 12.1, pp 889-992
- Humbert S, Tarnawski S, Fromin N, Mallet MP, Aragno M, Zopfi J. 2010. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. *ISME J* 4:450–454. doi: 10.1038/ismej.2009.125
- Humbert S, Zopfi J, Tarnawski SE. 2012. Abundance of anammox bacteria in different wetland soils. *Environ Microbiol Rep* 4:484–490. doi: 10.1111/j.1758-2229.2012.00347.x
- Isaacs SH, Henze M. 1995. Controlled carbon source addition to an alternating nitrification-denitrification wastewater treatment process including biological P removal. *Water Res* 29:77–89. doi: 10.1016/0043-1354(94)E0119-Q
- Jetten MSM, Cirpus I, Kartal B, van Niftrik L, van de Pas-Schoonen KT, Sliemers O, Haaijer S, van der Star W, Schmid M, van de Vossenberg J, Schmidt I, Harhangi H, van Loosdrecht M, Gijs Kuenen J, Op den Camp H, Strous M. 2005. 1994-2004. 10 Years of Research on the Anaerobic Oxidation of Ammonium. *Biochem Soc Trans* 33:119–123. doi: 10.1042/BST0330119
- Jiménez J, Theuerl S, Bergmann I, Klocke M, Guerra G, Romero-Romero O. 2016. Prokaryote community dynamics in anaerobic co-digestion of swine manure, rice straw and industrial clay residuals. *Water Sci Technol* 74:824–835. doi: 10.2166/wst.2016.170
- Kabdasli I, Tnay O, Yilmaz S, Arıkan O. 2000. Ammonia removal from young landfill leachate by magnesium ammonium phosphate precipitation and air stripping. *Water Science and Technology* 41:237-240.
- Kaiser F. 2007. LfL-Information, Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL).
- Kaiser F, Metzner T, Effenberger M, Gronauer A. 2008. Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. LfL-Information. Freising-Weißenstephan: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft.
- Karlsson A, Björn A, Yekta S, Svensson BH. 2014. Improvement of the biogas production process. *Linköping Univ* 88.
- Karlsson R, Karlsson A, Bäckman O, Johansson BR, Hulth S. 2009. Identification of key proteins involved in the anammox reaction. *FEMS Microbiol Lett* 297:87–94. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01677.x
- Kartal B, Kuenen JG, van Loosdrecht M. 2010. Sewage treatment with Anammox. *Science* 328:702-703. doi: 10.1126/science.1185941
- Kartal B, Van Niftrik L, Rattray J, van de Vossenberg JL, Schid MC, Sinninghe Damsté J, Jetten MS, Strous M. 2008. Candidatus “*Brocadia fulgida*”: An autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol Ecol* 63:46–55. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00408.x

- Kern J, Heinzmann B, Markus B, Kaufmann AC, Soethe N, Engels C. 2008. Recycling and Assessment of Struvite Phosphorus from Sewage Sludge. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*: 1-13.
- Kim HY. 2014. Analysis of variance (ANOVA) comparing means of more than two groups. *Restorative Dentistry & Endodontics* 39:74-77
- Klang J, Theuerl S, Szewzyk U, Huth M, Tölle R, Klocke M, Linden UD. 2015. Dynamic variation of the microbial community structure during the long-time mono-fermentation of maize and sugar beet silage. doi: 10.1111/1751-7915.12263
- Klappenbach J a, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res* 29:181–184. doi: 10.1093/nar/29.1.181
- Kooistra-Smid M, Nieuwenhuis M, Van Belkum A, Verbrugh H. 2009. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* burn wound colonization. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57:1–13. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00565.x
- Koster I, Lettinga G. 1984. The influence of ammonium-nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agricultural wastes* 9(3):205-216.
- KTBL. 2013. Faustzahlen Biogas. 3. Ausgabe Darmstadt.
- Lane DJ. 1991. 16/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, pp 113–175
- Lei X, Sugiura N, Feng C, Maekawa T. 2007. Pretreatment of anaerobic digestion effluent with ammonia stripping and biogas purification. *Journal of Hazardous Materials* 145:391-397.
- LFL 2014. Biogasausbeuten verschiedener Substrate. Landesanstalt für Landwirtschaft, Bayerische Landesanstalt - Agrarökonomie - Ökonomik und regenerative Energie. 2014URL: <http://www.lfl.bayern.de>.
- Liang B, Wang L-Y, Mbadinga SM, et al (2015) Anaerolineaceae and Methanosaeta turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation. *AMB Expr* 5:37. doi: 10.1186/s13568-015-0117-4
- Liao P, Chen A, Lo K. 1995. Removal of nitrogen from swine manure wastewaters by ammonia stripping. *Bioresource Technology* 54:17-20.
- Liebetrau J, Pfeiffer D, Thrän D. 2015. Messmethodensammlung Biogas - Methoden zur Bestimmung von analytischen und prozessbeschreibenden Parametern im Biogasbereich. Leipzig.
- Linke B, Mähnert P, Heiermann M, Mumme J. 2006. Grundlagen und Verfahren der Biogasgewinnung. Leitfa-den Biogas, 13-25.
- Linke B, Rodríguez-Abalde Á, Jost C, Krieg A. 2015. Performance of a novel two-phase continuously fed leach bed reactor for demand-based biogas production from maize silage. *Bioresource Technology* 177:34-40.
- Liu Y. 2010. Methanosarcinales. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, <http://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4>
- Liu Y, Qiao JT, Yuan XZ, Guo RB, Qiu YL. 2014. *Hydrogenispora ethanolica* gen. nov., sp. nov., an anaerobic carbohydrate-fermenting bacterium from anaerobic sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:1756–1762. doi: 10.1099/ijs.0.060186-0
- Lu J, Sanchez S, Hofacre C, John J, Harmon BG, Lee MD, Maurer JJ. 2003. Evaluation of Broiler Litter with Reference to the Microbial Composition as Assessed by Using 16S rRNA and Functional Gene Markers Evaluation of Broiler Litter with Reference to the Microbial Composition as Assessed by Using 16S rRNA and Functional Gene M. *Appl Environ Microbiol* 69:901–908. doi: 10.1128/AEM.69.2.901

- Lueders T, Friedrich M. 2000. Archaeal Population Dynamics during Sequential Reduction Processes in Rice Field Soil. *Appl Environ Microbiol* 66:2732–2742. doi: 10.1128/AEM.66.7.2732-2742.2000.Updated
- Ma J, Carballa M, van de Caveye P, Verstraete W. 2009. Enhanced propionic acid degradation (EPAD) system: proof of principle and feasibility. *Water Research* 43:3239-3248.
- Ma K, Liu X, Dong X. 2005. *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:325–329. doi: 10.1099/ijs.0.63254-0
- Marsh TL. 1999. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism: an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplicons. *Curr Opin Microbiol* in press:323–7. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80056-3
- Marr R, Končar M. 1990. Rückgewinnung von Ammoniak aus Industrieabwasser. *Chemie Ingenieur Technik* 62:175-182.
- Marti N, Bouzas A, Seco A, Ferrer J. 2008. Struvite precipitation assessment in anaerobic digestion processes. *Chemical Engineering Journal* 141:67-74.
- Martin SA, Mccann MA, Waltman WD. 1998. Microbiological survey of Georgia poultry litter. *J Appl Poult Res* 7:90–98.
- Mattocks R. 1984. Understanding biogas generation, Volunteers in Technical Assistance.
- Maus I, Cibis KG, Bremges A, Stolze Y, Wibberg D, Tomazetto G, Blom J, Sczyrba A, König H, Pühler A, Schlüter A. 2016a. Genomic characterization of *Defluviitoga tunisiensis* L3, a key hydrolytic bacterium in a thermophilic biogas plant and its abundance as determined by metagenome fragment recruitment. *J Biotechnol* 232:50–60. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.001
- Maus I, Cibis KG, Wibberg D, Winkler A, Stolze Y, König H, Pühler A, Schlüter A. 2015. Complete genome sequence of the strain *Defluviitoga tunisiensis* L3, isolated from a thermophilic, production-scale biogas plant. *J Biotechnol* 203:17–18. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.03.006
- Maus I, Koeck DE, Cibis KG, Hahnke S, Kim YS, Langer T, Kreubel J, Erhard M, Bremgas A, Off S, Stolze Y, Jaenicke S, Goesmann A, Sczyrba A, Scherer P, König H, Schwarz WH, Zverlov VV, Pühler A, Schlüter A, Klocke, M. 2016b. Unraveling the microbiome of a thermophilic biogas plant by metagenome and metatranscriptome analysis complemented by characterization of bacterial and archaeal isolates. *Biotechnol Biofuels* 9:171. doi: 10.1186/s13068-016-0581-3
- McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O. 2012. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *J Innate Immun* 4:141–148. doi: 10.1159/000333447
- Montag DM. 2008. Phosphorrückgewinnung bei der Abwasserreinigung: Entwicklung eines Verfahrens zur Integration in kommunale Kläranlagen. Universitätsbibliothek.
- Mulder A, Graaf AA, Robertson LA. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 16:177–184. doi: 10.1111/j.1574-6941.1995.tb00281.x
- Müller M. 2011. Stickstoffelimination durch Strippung bei der zweiphasigen Vergärung von stickstoffhaltigen Substraten. Masterarbeit, BTU Cottbus
- Münch EV, Barr K. 2001. Controlled struvite crystallisation for removing phosphorus from anaerobic digester sidestreams. *Water research* 35:151-159.
- Nakakubo R, Moller HB, Nielsen AM, Matsuda J. 2008. Ammonia inhibition of methanogenesis and identification of process indicators during anaerobic digestion. *Environmental Engineering Science*, 25:1487-1496.

Nelson KE, Clayton R a, Gill SR, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Nelson WC, Ketchum KA, McDonald L, Utterback TR, Malek JA, Linher KD, Garrett MM, Stewart AM, Cotton MD; Pratt MS, Phillips CA, Richardson D, Heidelberg J, Sutton GG, Fleischmann RD, Eisen JA, White O, Salzberg SL, Smith HO, Venter JC, , Fraser CM. 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399:323–329. doi: 10.1038/20601

Niu L, Song L, Liu X, Dong X. 2009. *Tepidimicrobium xylanilyticum* sp. nov., an anaerobic xylanolytic bacterium, and emended description of the genus *Tepidimicrobium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2698–2701. doi: 10.1099/ijs.0.005124-0

Niu Q, Qiao W, Qiang H, Li YY. 2013. Microbial community shifts and biogas conversion computation during steady, inhibited and recovered stages of thermophilic methane fermentation on chicken manure with a wide variation of ammonia. *Bioresour Technol* 146:223–233. doi: 10.1016/j.biortech.2013.07.038

Nizami A-S, Korres NE, Murphy JD. 2009. Review of the integrated process for the production of grass biogas. *Environmental Science & Technology* 43:8496-8508.

Nizami A-S, Murphy JD. 2011. Optimizing the operation of a two-phase anaerobic digestion system digesting grass silage. *Environmental Science & Technology* 45:7561-7569.

Nizami A-S, Singh A, Murphy JD. 2011. Design, commissioning, and start-up of a sequentially fed leach bed reactor complete with an upflow anaerobic sludge blanket digesting grass silage. *Energy & Fuels* 25:823-834.

Nizami A-S, Thamsiroj T, Singh A, Murphy J. 2010. Role of leaching and hydrolysis in a two- phase grass digestion system. *Energy & Fuels* 24:4549-4559.

O'keefe D, Chynoweth D. 2000. Influence of phase separation, leachate recycle and aeration on treatment of municipal solid waste in simulated landfill cells. *Bioresource Technology* 72:55-66.

Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7:555–567. doi: 10.1038/nrmicro2182.*Staphylococcus*

Pagga U, Bachner J, Strotmann U. 2006. Inhibition of nitrification in laboratory tests and model wastewater treatment plants. *Chemosphere* 65:1–8. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.021

Pätzold R, Keuntje M, Theophile K, et al (2008) In situ mapping of nitrifiers and anammox bacteria in microbial aggregates by means of confocal resonance Raman microscopy. *J Microbiol Methods* 72:241–248. doi: 10.1016/j.mimet.2007.12.003

Procházka J, Dolejs P, Máca J, Dohányos M. 2012. Stability and inhibition of anaerobic processes caused by insufficiency or excess of ammonia nitrogen. *Applied microbiology and biotechnology*, 93: 439-447.

Rademacher A, Hanreich A, Bergmann I, Klocke M. 2012a. Black-Box-Biogasreaktor — mikrobielle Gemeinschaften zur Biogaserzeugung. *BIOspektrum* 18:727–729. doi: 10.1007/s12268-012-0253-1

Rademacher A, Nolte C, Schönberg M, Klocke M. 2012b. Temperature increases from 55 to 75 °C in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within the bacterial and archaeal community structure. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:565–576. doi: 10.1007/s00253-012-4348-x

Rademacher A, Zakrzewski M, Schlüter A, Schönberg M, Szczepanowski R, Goesmann A, Pühler A, Klocke M. 2012c. Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *Fems Microbiol Ecol* 79(3):785–799. doi: DOI 10.1111/j.1574-6941.2011.01265.x

Rajagopal R, Massé DI, Singh G. 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresource Technology*, 143: 632-641.

Reinhold G. 2005. Masse- und Trockensubstanzbilanz in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. *Neue Landwirtschaft* 12:68–72.

Rieger C, Weiland P. 2006. Prozessstörungen frühzeitig erkennen. *Biogas Journal* 4:18-20.

Schmack D. 2000. Biotechnologie von Vergärungsprozessen – Möglichkeiten der Verbesserung und Optimierung. Energetische Nutzung von Biogas: Stand der Technik und Optimierungspotenzial; Gülzower Fachgespräche. Weimar: FNR, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe.

Schmid M, Walsh K, Webb R, et al (2003) *Candidatus "Scalindua brodae"*, sp. nov., *Candidatus "Scalindua wagneri"*, sp. nov., two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* 26:529–538. doi: 10.1078/072320203770865837

Schmidt I, Sliemers O, Schmid M, Bock E, Fuerst J, Kuenen JG, Jetten MS, Strous M. 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol Rev* 27:481–492. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00039-1

Schmidt JE, Mladenovska Z, Lange M, Ahring BK. 2001. Acetate conversion in anaerobic biogas reactors : Traditional and molecular tools for studying this important group of anaerobic microorganisms. 359–364.

Sekiguchi Y, Imachi H, Susilorukmi A, Muramatsu M, Ohashi A, Harada H, Hanada S, Kamagata Y. 2006. *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1621–1629. doi: 10.1099/ijs.0.64112-0

Simankova MV, Chernych NA, Osipov GA, Zavarzin GA. 1994. *Halocella cellulolytica* gen. nov., sp. nov., a New Obligately Anaerobic, Halophilic, Cellulolytic bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* 16:385-389.

Slobodkin AI, Tourova TP, Kostrikina NA, Lysenko AM, German KE, Bonch-Osmolovskaya EA, Birkeland N-K. 2006. *Tepidimicrobium ferriphilum* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, Fe(III)-reducing bacterium of the order Clostridiales. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:369–372. doi: 10.1099/ijs.0.63694-0

Stackebrandt E, Goebel BM. 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846–849. doi: 10.1099/00207713-44-4-846

Statistika.DE. 2015. Industrial sector electricity prices in selected European countries between January and June 2014 (in euro-cents per kilowatt hour) [Online]. Available: <http://www.statista.com/statistics/263262/industrial-sector-electricity-prices-in-selected-european-countries/> [Accessed].

Schramm A, De Beer D, Wagner M, Amann R (1998) Identification and activities in situ of *Nitrospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl Environ Microbiol* 64:3480–3485.

Sträuber H, Kleinstüber S. 2013. Metabolic and microbial community dynamics during the anaerobic digestion of maize silage in a two-stage process. *Int Water Assoc 13th World Congr Anaerob Dig* 25 - 28 June 2013, Santiago Compost , Spain 4.

Strous M, Kuenen JG, Jetten MS. 1999. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3248-3250.

Sung S, Liu T. 2003. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere*, 53: 43-52.

Terzich M, Pope MJ, Cherry TE, Hollinger J. 2000. Survey of Pathogens in Poultry Litter in the United States. *Applied Poultry Science*.

- Theuerl S, Kohrs F, Benndorf D, Maus I, Wibberg D, Schlüter A, Kausmann R, Heiermann M, Rapp E, Reichl U, Pühler A, Klocke M. 2015. Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7791–7803. doi: 10.1007/s00253-015-6627-9
- Thiering J, Bahrs E. 2011. Biogasproduktion in Deutschland - Sollte die energetische Nutzung von Wirtschaftsdünger explizit gefördert werden? *German Journal of Agricultural Economics* 60(4): 259-275
- Timmermans P, Van Haute A. 1983. Denitrification with methanol. *Water Res* 17:1249–1255. doi: 10.1016/0043-1354(83)90249-X
- Tully JG, Comb RFW, Rose DL, Joseph MBOVE, Carle P, Somerson NL, Williamson DL, Eden-green S. 2016. *Acholeplasma brassicae* sp. nov. and *Acholeplasma palmae* sp. nov., Two Non-Sterol-Requiring Mollicutes from Plant Surfaces. 680–684.
- Ueno Y, Fujii M. 2001. Three years experience of operating and selling recovered struvite from full scale plant. *Environmental Technology*. 22: 1373-1381.
- Vadari Y, Mason BP, Doerner KC. 2006. Isolation from poultry litter and characterization in high phosphate conditions of *Staphylococcus* spp. capable of growth. *Lett Appl Microbiol* 43:64–70. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01901.x
- Van de Graaf AA, de Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM, Kuenen JG. 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142:2187-2196. doi: 10.1099/13500872-142-8-2187
- Van der Star WRL, Abma WR, Blommers D, Mulder JW, Tokutomi T, Strous M, Picoreanu C, van Loosdrecht MC. 2007. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res* 41:4149–4163. doi: 10.1016/j.watres.2007.03.044
- VDI. 2006. VDI 4630 (Richtlinie) - Vergärung organischer Stoffe; Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche Verein Deutscher Ingenieure ICS 13030. 27.220.
- Vela J, Hildebrandt K, Metcalfe A, Rempel H, Bittman S, Topp E, Diarra M. 2012. Characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from broiler chicken barn bioaerosol. *Poult Sci* 91:3003–12. doi: 10.3382/ps.2012-02302
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07
- Ward N, Staley JT, Fuerst Ja., Giovannoni SJ, Schlesner H, Stakebrandt E. 2006. The order Planctomycetales, including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the candidatus genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua*.
- Wasserfallen JN, Pfister P, Reeve J, de Macario EC. 2000. Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:43-53.
- Weiland P. 2006a. Biomass digestion in agriculture: a successful pathway for the energy production and waste treatment in Germany. *Engineering in Life Sciences* 6:302-309.
- Weiland P. 2006b. Stand der Technik bei der Trockenfermentation – Aktuelle Entwicklungen. *Gülzower Fachgespräche* 24:22-38.
- Weiland P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*

85:849-860.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier D a, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173:697–703.

Weiss J V., Rentz J a., Plaia T, Neubauer SC, Merrill-Floyed M, Lilburn T, Bradburne C, Magonigal J, Patrick J, Emerson D. 2007. Characterization of Neutrophilic Fe(II)-Oxidizing Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Wetland Plants and Description of *Ferritrophicum radicola* gen. nov. sp. nov., and *Sideroxydans paludicola* sp. nov. *Geomicrobiol J* 24:559–570. doi: 10.1080/01490450701670152

Werner JJ, Garcia ML, Perkins SD, Yarasheski KE, Smith SR; Muegge BD, Stadermann FJ, Derito CM, Floss C, Madsen EL, Gordon JI, Angenent LT. 2014. Microbial Community Dynamics and Stability during an Ammonia-Induced Shift to Syntrophic Acetate Oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 80(11):3375-83

Wirth R, Kovács E, Maróti G, Bagi Z, Rákhely G, Kovács KL. 2012. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol Biofuels* 5:41. doi: 10.1186/1754-6834-5-41

Yang Z, Guo R, Shi X, He S, Wang L, Dai M, Qui Y, Dang X. 2016. Bioaugmentation of *Hydrogenispora ethanolica* LX-B affects hydrogen production through altering indigenous bacterial community structure. *Bioresour Technol* 211:319–326. doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.097

Yarza P, Richter M, Peplies J, Euzéby J, Amann R, Schleifer KH, Ludwig W, Glöckner FO, Rosselló-Móra R. 2008. The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol* 31:241–250. doi: 10.1016/j.syapm.2008.07.001

Yu Y, Kim J, Hwang S. 2005. Use of Real-Time PCR for Group-Specific Quantification of Aceticlastic Methanogens in Anaerobic Processes: Population Dynamics and Community Structures.

Zeelner G, Messner P, Winter J, Stackebrandt E. 1998. *Methanoculleus palmolei* sp. nov., an irregularly coccoid methanogen from an anaerobic digester treating wastewater of a palm oil plant in North-Sumatra, Indonesia. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1111-1117

Zeileis A. 2014. ineq: Measuring Inequality, Concentration, and Poverty. R package version 0.2-13. <https://CRAN.R-project.org/package=ineq>, Programmpaket, unveröffentlicht in Literatur.

Zeng L, Mangan C, Li X. 2006. Ammonia recovery from anaerobically digested cattle manure by steam stripping. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* 54:137.

Zverlov VV, Hiegl W, Köck DE, Kellermann J, Köllmeier T, Schwarz WH. 2010. Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass. *Engineering in Life Sciences* 10:528-536.