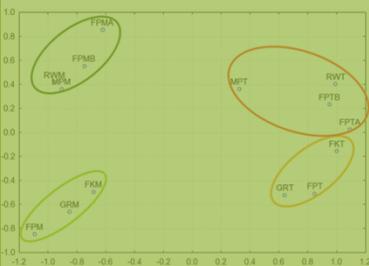
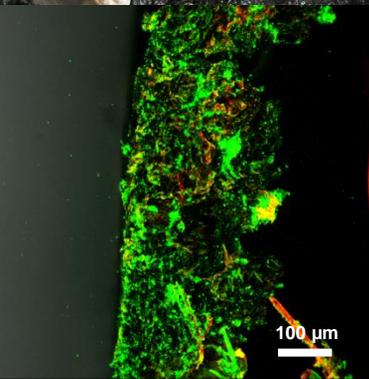


Biofilme in Biogasanlagen



**Struktur, Einfluss auf die Biogasausbeute
und Optimierung technischer Systeme zur
Rückhaltung der mikrobiellen Biomasse**



Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Bornimer Agrartechnische Berichte

Heft 87

Potsdam-Bornim 2015

**Biofilme in Biogasanlagen -
Struktur, Einfluss auf die Biogasausbeute und
Optimierung technischer Systeme zur Rückhaltung
der mikrobiellen Biomasse**

**Schlussbericht zum Forschungsverbund
BIOGAS-BIOFILM**

Bornimer Agrartechnische Berichte
Heft 87

Potsdam-Bornim 2015

Herausgeber:

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.
Max-Eyth-Allee 100
14469 Potsdam-Bornim
☎ (0331)-5699-0
Fax.: (0331)-5699-849
E-mail: atb@atb-potsdam.de
Internet: <http://www.atb-potsdam.de>

März 2015

Redaktion:

Dr. Michael Klocke

Typografische Gestaltung:

Andrea Gabbert

Quellennachweis der Umschlagfotos

(von oben nach unten)

1, 2, 3, 4, 6: Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.
5: Brandenburgische Technische Universität Cottbus-Senftenberg

Herausgegeben vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) mit Förderung durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) und das Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kultur des Landes Brandenburg (MWFK).

Für den Inhalt der Beiträge zeichnen die Autoren verantwortlich.

Eine Weiterveröffentlichung von Teilen ist unter Quellenangabe und mit Zustimmung des Leibniz-Instituts für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. möglich.

ISSN 0947-7314

© Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., 2015

Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:

**Biofilme in Biogasanlagen -
Struktur, Einfluss auf die Biogasausbeute und
Optimierung technischer Systeme zur
Rückhaltung der mikrobiellen Biomasse**

BIOGAS-BIOFILM

Zuwendungsempfänger:

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB)

Förderkennzeichen:

22016308

Laufzeit:

01.09.2010 bis 31.12.2013

Datum der Veröffentlichung: 26. März 2015

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

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

Autoren

Dr. Ingo Bergmann

Dr. Michael Klocke

Kontakt

Dr. Michael Klocke

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB)

Abt. Bioverfahrenstechnik - AG Mikrobielle Systemökologie

Max-Eyth-Allee 100, D-14469 Potsdam

mklocke@atb-potsdam.de

www.atb-potsdam.de

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 7 |
| Vorwort | 9 |
| Zusammenfassung | 11 |
| I Hintergrund | 13 |
| I.1 Aufgabenstellung | 13 |
| I.2 Voraussetzungen zur Durchführung des Vorhabens..... | 14 |
| I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens..... | 15 |
| I.4 Stand der Wissenschaft und Technik..... | 17 |
| I.4.1 Mikrobiologie der Biomethanisierung | 17 |
| I.4.2 Ein Modellsystem zur Anreicherung von mikrobieller Biomasse: Die Bildung von Granules..... | 19 |
| I.4.3 Methanogene Biofilme in Anaerobsystemen..... | 21 |
| I.4.4 Ansiedlung und Rückhaltung mikrobieller Biomasse bei der Vergärung nachwachsender Rohstoffe..... | 22 |
| I.4.5 Kultivierungsunabhängige molekulargenetische Verfahren zur Erfas- sung der mikrobiellen Diversität | 23 |
| I.4.6 Fluoreszenz-mikroskopische Verfahren zur Aufklärung von Biofilm- strukturen | 24 |
| I.4.7 Offene Fragen und Ziele des Forschungsvorhabens | 26 |
| I.4.8 Patentsituation | 26 |
| I.4.9 Verwendete Literatur..... | 26 |
| I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen | 31 |
| II Ergebnisse | 32 |
| II.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse | 32 |
| II.1.1 Aufbau und Betrieb von Biogasreaktoren im Labormodell | 32 |
| CSTR System: Effekt einer schrittweisen Erhöhung der Raumbelas- tung..... | 33 |
| Exkurs Methodenetablierung: Etablierung eines spezifischen Q-PCR- Assays und Primersets zum Nachweis von Methanococcales..... | 40 |
| Bioleaching System: Effekt der schrittweisen Erhöhung der Raumbel- lastung | 42 |
| II.1.2 Etablierung der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie zur FISH Analytik von Biogasfilmen | 49 |
| II.1.3 Erfassung der mikrobiellen Biodiversität in Biofilmen..... | 53 |

| | |
|--|-----|
| Archaeelle Biodiversität im CSTR System bei konstanter Raumbelastung | 54 |
| Archaeelle Biodiversität im Bioleaching System bei konstanter Raumbelastung..... | 63 |
| Analyse des mikrobiellen Metagenoms anhand zweier ausgewählter Biofilmproben aus dem Bioleaching System | 75 |
| II.1.4 Entwicklung von neuen Oligonukleotidsonden zur mikroskopischen Analyse von Biofilmen | 82 |
| II.1.5 Materialstudien zur Entwicklung von neuen Füllkörpern | 84 |
| II.1.6 Betrieb von optimierten Reaktorsystemen..... | 97 |
| Biofilmbildung auf magnetischen Aufwuchsträgern im CSTR System bei kontinuierlicher Raumbelastung | 97 |
| Biofilmbildung auf magnetischen Aufwuchsträgern im Bioleaching System bei kontinuierlicher Raumbelastung | 105 |
| Biofilmbildung auf magnetischen Aufwuchsträgern im CSTR System bei kontinuierlicher Steigerung der Raumbelastung bis zum Eintritt einer Überlastung..... | 113 |
| II.1.7 Biofilme in einer großtechnischen Forschungsanlage | 130 |
| II.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 138 |
| II.1.9 Literaturverzeichnis zur Ergebnisdarstellung..... | 146 |
| II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises..... | 150 |
| II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit | 150 |
| II.4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse | 150 |
| II.4.1 Publikationsstrategie | 150 |
| II.4.2 Wirtschaftliche Anschlussfähigkeit | 151 |
| II.4.3 Wissenschaftliche und technische Anschlussfähigkeit..... | 152 |
| II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen | 153 |
| II.6 Veröffentlichungen | 154 |
| Verzeichnis der Abbildungen | 155 |
| Verzeichnis der Tabellen | 158 |
| In der Reihe Bornimer Agrartechnische Berichte sind bisher erschienen | 160 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| AFR | Aufstromfeststoffreaktor |
| AG | Acrylglas |
| AG-O | Acrylglas, oberer Reaktorbereich |
| AG-U | Acrylglas, unterer Reaktorbereich |
| ARC | Archaea |
| BAC | Bacteria |
| ARC/BAC | Verhältnis Anzahl 16S rRNA Genkopien von Archaea zu Bacteria |
| bp | Basenpaare |
| BT | Blähton |
| ARC/BAC | Archaea zu Bacteria Verhältnis |
| B _R | Raumbelastung |
| CARD | <i>catalyzed reporter deposition</i> |
| CeBiTec | Center for Biotechnology, Universität Bielefeld |
| CH ₄ | Methan |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| COG | <i>clusters of orthologous groups of proteins</i> |
| CSB | Chemischer Sauerstoffbedarf |
| CSTR | <i>completely stirred tank reactor</i> (vollständig durchmischter Rührkesselreaktor) |
| cT | <i>cycle threshold</i> |
| EPS | extrazelluläre, polymere Substanzen |
| ES | Edelstahl |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> („und andere“) |
| FBR | Festbettreaktor |
| FISH | Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung |
| FK-M | Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 2,0 m, Biogastestanlage |
| FK-O | Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 4,0 m, Biogastestanlage |
| FK-U | Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 0,5 m, Biogastestanlage |
| FKM | Biofilm auf Polyethylen-Füllkörpern, Bioleaching System, mesophil |
| FKT | Biofilm auf Polyethylen-Füllkörpern, Bioleaching System, thermophil |
| FP | Prozessflüssigkeit des Methanreaktors, Biogastestanlage |
| FPM | Prozessflüssigkeit, Bioleaching System, mesophil |
| FPMA | Prozessflüssigkeit (Startphase), CSTR, mesophil |
| FPMB | Prozessflüssigkeit (Endphase), CSTR, mesophil |
| FPT | Prozessflüssigkeit, Bioleaching System, thermophil |
| FPTA | Prozessflüssigkeit (Startphase), CSTR, thermophil |
| FPTB | Prozessflüssigkeit (Endphase), CSTR, thermophil |
| GICON | Großmann Ingenieur Consult |
| GRM | Aufwuchs auf der pflanzlichen Biomasse, Bioleaching System, mesophil |
| GRT | Aufwuchs auf der pflanzlichen Biomasse, Bioleaching System, thermophil |
| HRT | <i>hydraulic retention time</i> (Verweilzeit) |

| | |
|--------------------|--|
| IC | Inoculum |
| <i>i.e.</i> | <i>id est</i> („das heißt“) |
| KTBL | Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft |
| LCA | <i>lowest common ancestor</i> Analyse |
| LSM | konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie |
| MCC | Methanococcales |
| MFGPs | <i>magnetic foam glass particles</i> |
| MPM | Biofilm auf magnetischen Aufwuchsträgern, CSTR, mesophil |
| MPT | Biofilm auf magnetischen Aufwuchsträgern, CSTR, thermophil |
| MV _{oTS} | Mischungsverhältnis der Substrate bezogen auf organische Trockensubstanz |
| n.b. | nicht bestimmt |
| N _{ges} | Anteil an Gesamtstickstoff |
| NH ₃ -N | Anteil an Ammoniakstickstoff |
| NH ₄ N | Anteil an Ammoniumstickstoff |
| oS | organische Substanz unter Einbeziehung der organischen Säuren, Alkohole |
| oTS _{FM} | organische Trockensubstanz bezogen auf die Frischmasse |
| OTU | <i>operational taxonomic unit</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PE | Polyethylen |
| PP | Polypropylen |
| PUR | Polyurethan |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| PVC-O | Polyvinylchlorid, oberer Reaktorbereich |
| PVC-U | Polyvinylchlorid, unterer Reaktorbereich |
| Q-PCR | Quantitative PCR |
| R ² | Bestimmtheitsmaß |
| rcf | <i>relative centrifugal force</i> |
| RWM | Biofilm der Reaktorwand, CSTR, mesophil |
| RWT | Biofilm der Reaktorwand, CSTR, thermophil |
| SG | Silikoglas |
| TS | Trockensubstanz |
| VFA | <i>volatile fatty acids</i> |
| y _B | Biogasausbeute |
| y _{CH4} | Methanausbeute |

Vorwort

Der anaerobe Abbau von pflanzlicher Biomasse zu Biogas wird durch zwei gänzlich unterschiedliche Gruppen von Mikroorganismen durchgeführt. Fermentative Bakterien katalysieren den Abbau der in der Biomasse enthaltenen hochmolekularen Verbindungen zu kurzkettigen Carbonsäuren, in erster Linie Essigsäure, sowie Gasen wie molekularem Wasserstoff und Kohlendioxid. Diese Abbauprodukte sind wiederum die Ausgangssubstrate für die eigentlichen Produzenten der energetischen Komponente im Biogas, des Methans. Zur Bildung von Methan sind nur einige wenige, hoch spezialisierte Vertreter aus der Gruppe der Archaeen befähigt.

Archaeen und Bakterien sind zwei gänzlich unterschiedliche prokaryotische Mikroorganismen mit deutlich unterscheidbarem Zellaufbau und Stoffwechsel. Es erstaunt daher nicht, dass die gärenden Bakterien eines Biogasreaktors andere Ansprüche an ihre Lebensumwelt aufweisen als die methanbildenden Archaeen.

Dieses Wissen hat dazu geführt, dass in den letzten Jahren verstärkt Konzepte und Konstruktionen zur Anpassung der Fermentationsbedingungen an den jeweiligen Abbauschritt und die jeweils dafür verantwortlichen Mikroorganismen entwickelt und teilweise bereits in der Praxis umgesetzt wurden. In erster Linie sind hierbei Biogasreaktorsysteme bestehend aus mindestens zwei individuell gesteuerten Fermentern zur Trennung von Biomasseaufschluss und Methanbildung zu nennen.

Eine vollständige Entkopplung der Methanogenese von den Gärungsprozessen im Fermenter ist jedoch nicht ohne eine deutliche Störung des gesamten Abbauprozesses erreichbar. Dieses hängt damit zusammen, dass selbst zwischen so unterschiedlichen Mikroorganismen wie Bakterien und Archaeen symbiotische Abhängigkeiten bestehen können. Diese Überlegung betont die Bedeutung der Biofilme auf den Oberflächen in einem Biogasreaktor. In diesen Biofilmen siedeln sich sowohl (sekundär gärende) Bakterien als auch methanbildende Archaeen in enger räumlicher Gemeinschaft an. Ähnlich zu Systemen der Abwasserreinigung (UASB-Reaktor, Anaerobfilter) ist auch für Biogasreaktoren auf Basis nachwachsender Rohstoffe zu erwarten, dass die gezielte Förderung der Biofilm-Bildung durch das Einbringen geeigneter Besiedlungsoberflächen in den Biogasreaktor eine Verbesserung der Prozessstabilität und/oder der Biomethanisierungsleistung zur Folge hat.

In dem dreijährigen Forschungsvorhaben, dessen Ergebnisse im Folgenden ausführlich dargestellt werden, sollte diese Hypothese untersucht werden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der erstmaligen Untersuchung und Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in den methanogenen Biofilmen unterschiedlicher Biogasreaktoren. Neben neuen mikrobiologischen Erkenntnissen über die Zusammensetzung und Entwicklung solcher Biofilme konnte insbesondere der Wert von Biofilmen für die Biomethanisierung nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse könnten dazu beitragen, biofilm-basierte Biogasreaktoren stärker als bisher in Praxisanwendungen zu überführen.

Dieses Forschungsvorhaben war nur dank der substantiellen finanziellen Unterstützung durch das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe des Bundesministeriums für Ernährung und Verbraucherschutz (BMEL) möglich. Zu Dank verpflichtet sind die Autoren ebenfalls dem Projektträger Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) für die freundliche Projektbegleitung.

Das Vorhaben wurde in der Abteilung Bioverfahrenstechnik am Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) durchgeführt. Die Autoren danken dem dortigen Team vielmals für die oftmals geleistete Unterstützung. Desweiteren konnten die Autoren auf die Unterstützung der IIT GmbH, Geschäftsbereich BioTech, Bielefeld, dem Center for Biotechnology (CeBiTec) an der Universität Bielefeld sowie der Großmann Ingenieur Consult (GICON) Bioenergie GmbH am Standort Cottbus zurückgreifen, die wertvolle Unterstützung für die Umsetzung einzelner Arbeitspakete leisteten. Die Autoren danken auch den dortigen Teams für die hilfreiche Zusammenarbeit.

Potsdam und Rom im Januar 2015

Michael Klocke und Ingo Bergmann

Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die Entwicklung von methanogenen Biofilmen in meso- und thermophilen ein- und zweistufigen Biogasreaktoren bei der Vergärung von Maissilage untersucht. Ziel war neben der kultivierungsunabhängigen Charakterisierung von Struktur und Dynamik der mikrobiellen Lebensgemeinschaften und ihrer Stoffwechseleigenschaften insbesondere auch die Entwicklung von Strategien zur Ansiedlung solcher Biofilme.

Alle untersuchten Reaktorsysteme wiesen hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer mikrobiellen Lebensgemeinschaften deutliche Unterschiede untereinander auf. Innerhalb eines Reaktors traten zudem je nach Mikrohabitat unterschiedlich strukturierte Gemeinschaften auf, wobei diese jeweils innerhalb eines Reaktors mehr Gemeinsamkeiten untereinander aufweisen als zu einem ähnlichen Mikrohabitat in einem anderen Reaktor mit deutlich anderen Prozessbedingungen. Zudem ließ sich in räumlich größeren Reaktoren eine Höhenzonierung hinsichtlich der Zusammensetzung der Biofilme beobachten, vermutlich aufgrund der Veränderung im Nährstoff- und Spurenelementegehalt in der Prozessflüssigkeit in Folge der Passage durch den Reaktor.

Unter mesophilem Temperaturregime (37°C) förderten Aufwuchsträger vorzugsweise aus Acrylglas und mit hoher Oberflächenrauigkeit sowohl in Rührkesselreaktoren (CSTR) als auch in zweistufigen Systemen die Ansiedlung acetoklastischer Methanbildner der Gattung *Methanosaeta*, wobei die Besiedlung in einem räumlich getrennten Festbettreaktor weitaus konzentrierter erfolgte als bei Applikation im dem Reaktorraum eines CSTR.

Unter thermophilen Temperaturbedingungen (55°C) förderten Aufwuchsträger im CSTR im ungestressten Zustand die Biodiversität hinsichtlich hydrogenotropher Methanbildner der Gattungen *Methanothermobacter* und *Methanoculleus*, im gestressten System dagegen die Anreicherung von mixotrophen Methanbildnern der Gattung *Methanosarcina*. Im zweistufigen System mit räumlich getrenntem Festbettreaktor war in den Biofilmen dagegen stets eine massive Anreicherung von Vertretern der Gattung *Methanosarcina* zu beobachten.

Eine Analyse des mikrobiellen Metagenoms wies für die bakterielle Begleitflora im mesophilen Biofilm vorrangig Vertreter der Gattungen *Syntrophus* (Deltaproteobacteria) und *Clostridium* (Firmicutes) nach, während im thermophilen Biofilm verstärkt Vertreter der Gattungen *Clostridium* und *Anaerobaculum* (Synergistetes) identifiziert wurden. Neben der bekannten Bedeutung der Clostridia für die Acidogenese unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung von Bakterien anderer taxonomischer Gruppen mit wahrscheinlich syntrophen Eigenschaften für die Biomethanisierung. Jedoch zeigten die Ergebnisse auch, dass nach wie vor der weitaus größere Teil der genetischen Information der Biogas-Biozönose als unbekannt gelten muss.

Um jedoch trotzdem methanogene Biozönosen besser miteinander vergleichen zu können, wird vorgeschlagen, in zukünftigen Studien immer auch das Verhältnis der Kopienzahl des Gens für die archaelle und die bakterielle 16S rRNA, ermittelt durch eine quan-

titative PCR im sog. „TaqMan-Assay“ (ARC/BAC), routinemäßig und standardisiert zu erfassen.

Das Einbringen von zusätzlichen Aufwuchsflächen zur Ansiedlung von methanogenen Biofilmen bewirkte in allen untersuchten Systemen eine Stabilisierung des Gärsäurespiegels und der Methanbildung. Insbesondere unter mesophilem Temperaturregime konnte zudem im Vergleich zu einer Kontrolle ohne zusätzliche Aufwuchsflächen eine deutlich erhöhte Biogas- und Methanbildung beobachtet werden. Daher sollte die Bereitstellung von geeigneten Aufwuchsflächen zur Etablierung methanogener Biofilme bei allen weiteren technischen Entwicklungen zur Optimierung von Biogasreaktoren unbedingt Berücksichtigung finden.

I Hintergrund

I.1 Aufgabenstellung

Die Produktion von Biogas aus landwirtschaftlich erzeugter Biomasse besitzt ein hohes Potential zur Erzeugung von regenerativer Energie, zur Reduzierung des CO₂-Ausstoßes sowie zur Fortentwicklung einer nachhaltigen Landwirtschaft. Die Biomethanisierung organischer Roh- und Reststoffe ist darüber hinaus wesentlicher Baustein bei der Etablierung von Stoff- und Wertschöpfungskreisläufen im Sinne einer nationalen Bioökonomie.

Die Bildung von Biogas erfolgt durch eine komplexe und teilweise syntrophe mikrobielle Gemeinschaft aus fermentativen Bakterien und methanogenen Archaea. Dabei kann die Methanbildung einerseits aus kurzkettigen organischen Säuren, vorrangig Acetat (acetoklastische Methanogenese), und andererseits aus molekularem Wasserstoff in Kombination mit Kohlendioxid oder alternativen C1-Verbindungen (hydrogenotrophe Methanogenese) erfolgen.

Acetat-verwertende methanbildende Archaea finden sich bevorzugt in Biofilmen auf Oberflächen in Biogasreaktoren (*Methanosaeta* spp.) sowie in makroskopischen Aggregaten wie Flocken oder Granules (*Methanosarcina* spp.). Biofilme und Aggregate unterstützen zudem, aufgrund der räumlichen Nähe zwischen den beteiligten Mikroorganismen, die Entwicklung von syntrophen Lebensgemeinschaften zwischen acetatoxidierenden Bakterien und hydrogenotrophen methanogenen Archaea. Aus verfahrenstechnischer Sicht wird durch die Entwicklung kompakter mikrobieller Strukturen in Form von Biofilmen und ähnlichen Aggregaten eine vielfach höhere Biomassekonzentration erreicht, wodurch wiederum die Leistungsfähigkeit eines Biogasreaktors entsprechend höher ausfällt.

Im Rahmen dieses Projektes sollten am Beispiel von Biogasreaktoren auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen die an der Ausbildung von Biofilmen beteiligten Bakterien und Archaea ermittelt werden. Hierzu sollte neben der molekulargenetischen Erfassung der mikrobiellen Biodiversität insbesondere die Erfassung der Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaften über fluoreszenz-mikroskopische Analysen (FISH-Technik) erfolgen. Technische Lösungen für eine effektive Ansiedlung und den Erhalt von Biofilmen und Aggregaten sollten erarbeitet werden. Hierzu sollten Systeme wie Festbettreaktoren und freischwimmende magnetische Aufwuchskörper verschiedener, neuartiger Ausprägung vergleichend untersucht und optimiert werden. Der Einfluss der Biofilmausprägung auf die Biogasausbeute sollte erfasst werden.

Zentrales Ziel dieses Forschungsvorhabens war neben der Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften und der durch sie bewirkten Stoffwandlungsprozesse insbesondere die Entwicklung von effektiven Strategien zur optimalen Ansiedlung mikrobieller Biomasse.

I.2 Voraussetzungen zur Durchführung des Vorhabens

Das Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) ist ein außeruniversitäres Forschungsinstitut der Leibniz-Gemeinschaft. Das ATB betreibt anwendungsorientierte Grundlagenforschung auf den Forschungsgebieten *Technik und Verfahren im Pflanzenbau und in der Tierhaltung, Qualität und Sicherheit von Lebens- und Futtermitteln, stoffliche und energetische Nutzung von Biomasse sowie Bewertung des Technikeinsatzes in Agrarsystemen*. Weitere Informationen zu dem Institut sowie zu der Forschung sind über die Internet-Präsenz des ATB unter www.atb-potsdam.de verfügbar.

Die Abteilung Bioverfahrenstechnik (Leitung: Prof. Dr. B. Linke) verfügt über langjährige Expertise in der Durchführung von experimentellen Arbeiten zur Biogasfermentation sowie zur Charakterisierung der beteiligten mikrobiellen Lebensgemeinschaften. Speziell zu dieser Thematik wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Forschungsvorhaben erfolgreich umgesetzt. Eine Übersicht über die diesbezüglichen Aktivitäten findet sich unter www.atb-potsdam.de/institut/fachabteilungen/bioverfahrenstechnik.html.

Die Abt. Bioverfahrenstechnik verfügt über folgende wissenschaftliche und verfahrenstechnische Ressourcen, welche größtenteils auch für dieses Forschungsvorhaben genutzt wurden:

- Biogastechnikum mit verschiedenen Versuchsständen zur Biomethanisierung;
- chemische Analytik zur kompletten Substrat- und Gasanalyse entsprechend DIN 38 414 bzw. VDI 4630;
- molekularbiologische Labore zur Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen;
- mikrobiologische Labore zur anaeroben und aeroben Kultivierung und Charakterisierung von Mikroorganismen;
- bioinformatische Plattformen zur Auswertung von Nukleinsäuresequenzen sowie von molekularen Fingerprintprofilen.

Die AG Mikrobielle Systemökologie (Leitung: Dr. M. Klocke) bearbeitet Fragestellungen aus dem Bereich der angewandten Mikrobiologie, schwerpunktmäßig im Zusammenhang mit der Biogaserzeugung. Zu den Arbeitsschwerpunkten gehören die Charakterisierung komplexer mikrobieller Biozönosen in agrarbiotechnologischen Anwendungen mittels molekularer Ansätze, die Entwicklung von markergestützten Nachweisverfahren für bioverfahrenstechnisch relevante Mikroorganismen sowie die Isolierung, Kultivierung und eingehende Charakterisierung von prozessrelevanten anaeroben Bakterien und Archaeen. Eine Übersicht über Projekte und Fachpublikationen der AG ist unter folgender URL abrufbar:

www.atb-potsdam.de/institut/ueber-uns/mitarbeiterinnen/portrait/portrait/michael-klocke.html.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Der Arbeitsplan beinhaltet vier zentrale Arbeitspakete:

- (1) Konstruktion, Betrieb und Optimierung von Modellbiogasreaktoren zur Biomethanisierung pflanzlicher Biomasse,
- (2) Analytik der Prozesschemie entsprechend VDI 4630,
- (3) kultivierungsunabhängige molekulargenetische Charakterisierung der mikrobiellen Biodiversität von methanogenen Biofilmen,
- (4) mikroskopische Analyse der Struktur von methanogenen Biofilmen.

Grundlage aller Versuche war der Betrieb von zwei unterschiedlichen Reaktorsystemen im Labormaßstab. Zum einen wurde ein einstufiges Rührkesselsystem (CSTR) verwendet, wie es in kommerziellen Praxisanlagen häufig zu finden ist. Als zweites Reaktorsystem wurde ein zweistufiges Bioleaching-System mit einer Hydrolysestufe und einem Anaerobfilter konzipiert, welches konstruktionsbedingt besonders zur Biomethanisierung von nachwachsenden Rohstoffen geeignet ist. Das Arbeitsvolumen der CSTR betrug 8 Liter. Das Arbeitsvolumen der Hydrolysestufe im Bioleaching-System betrug 27 Liter, das des Festbettreaktors 22 Liter.

Der Betrieb des CSTR-Versuchsstands erfolgte in jeweils zwei parallelen Ansätzen unter mesophilem (37°C) als auch thermophilem (55°C) Temperaturregime bei variablen Raumbelastungen. Als Gärsubstrate eingesetzt wurden, wie in der praktischen Anwendung üblich, Rinder- und Schweinegülle in Kovergärung mit Maissilage.

Als Referenzsystem sollte ein Bioleaching-System dienen, welches als essentiellen Bestandteil einen Anaerobfilter mit einer ausgeprägten Biofilmbildung enthält. Die Hydrolysestufe dieses Bioleaching-Systems sollte kontinuierlich im Aufstromverfahren erfolgen. Der Betrieb erfolgte in zwei parallelen Ansätzen sowohl mesophil als auch thermophil bei einer konstanten Raumbelastung. Als Substrate sollten vorrangig Maissilage sowie ergänzend Gras- und/oder Roggensilage verwendet werden.

In allen Modellreaktoren wurden grundsätzliche Prozessparameter wie pH-Wert, Gehalt an Fettsäuren, Werte für die Trockensubstanz und organische Trockensubstanz, Ammonium und Spurennährstoffen sowie die Biogasbildungsrate und Zusammensetzung des Biogases online bzw. in regelmäßigen Zeitabständen erfasst. Die chemische Analytik erfolgte mittels etablierter Standard-Verfahren nach VDI 4630. Ebenso wurde die Nährstoffzusammensetzung in den Gärsubstraten ermittelt.

In dem CSTR-Reaktorsystem sollten magnetische Aufwuchskörper entsprechend Patent DE 10 2005 024 886 die Etablierung von mikrobiellen Biofilmen fördern. Hierzu sollten verschiedene Materialien für die Aufwuchskörper erprobt werden. Entsprechend der Ergebnisse dieser Materialstudie sollten dann die Füllkörper in dem Anaerobfilter im Bioleaching-System angepasst werden.

In den zwei Reaktorsystemen sollte dann die mikrobielle Diversität in den sich entwickelnden Biofilmen untersucht werden. Insbesondere sollte der Aufwuchs auf den Füll-

körpern untersucht werden. Hierzu wurde ein polyphasischer Ansatz bestehend aus einer Kombination verschiedener kultivierungsunabhängiger Methoden verwendet:

- (1) Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie und konfokaler Laserscanningmikroskopie wurde die Struktur der Biofilme und die Zellform der assoziierten Mikroorganismen untersucht.
- (2) Mittels TRFLP- (*terminal restriction fragment length polymorphism*) Analyse auf Basis des Gens für die mikrobielle 16S rRNA wurde die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft hinsichtlich fermentativer Bacteria und methanogener Archaea charakterisiert.
- (3) Zur Ermittlung der Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea wurde das archaelle 16S rRNA Gen kloniert, sequenziert und die erhaltenen Nukleotidsequenzen phylogenetisch ausgewertet.
- (4) Mittels quantitativer „realtime“ PCR auf Basis des Gens für die mikrobielle 16S rRNA wurden die relativen Anteile von Bacteria und Archaea sowie ausgewählter taxonomischer Großgruppen von methanogenen Archaea ermittelt.
- (5) Zur Charakterisierung der Stoffwechseleigenschaften methanogener Biofilme erfolgte eine Erfassung des mikrobiellen Metagenoms in ausgewählten Biofilm-Proben mittels Hochdurchsatzsequenzierung.

Durch die zusammenfassende Auswertung der Daten zur Prozesschemie und -mikrobiologie können Aussagen über den Verlauf der Substratwandlung einerseits und über die Auswirkung der Mikrobiologie auf die Reaktoreffizienz andererseits getroffen werden.

Das Vorhaben wurde wie in der ursprünglichen Vorhabenbeschreibung dargestellt durchgeführt. Während der Projektlaufzeit ergaben sich nur wenige, im Folgenden dargestellte Aktualisierungen:

- Der Einsatz von magnetischen Aufwuchskörpern in den Reaktorsystemen wurde aus Kapazitätsgründen auf eine Partikelorte beschränkt, um die Auswirkung auf Biogasbildung und Systemmikrobiologie im Detail untersuchen zu können.
- Aufgrund der hohen Propionsäurewerte im CSTR-System unter thermophilen Bedingungen schon bei einer Raumbelastung von $3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ wurde die Raumbelastung auf $2,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ herabgesetzt. Alle nachfolgenden Untersuchungen für das CSTR-System unter thermophilen Temperaturbedingungen wurden somit bei einer geringeren Raumbelastung durchgeführt als ursprünglich geplant.
- Die Materialstudie zur Bildung von Biofilmen in Biogasfermentern wurde mit nicht-magnetischen Materialplatten durchgeführt, da Ziel dieses Forschungsvorhabens die Analyse des Aufwuchsverhaltens von Mikroorganismen auf Oberflächen ist. Als Werkstoffmaterialien wurden zudem vornehmlich Stoffe genutzt, die beim Bau von Reaktorkonstruktionen häufig Anwendung finden (z.B. Acrylglas, Polyvinylchlorid, Polyurethan oder Polypropylen). Der Einbau von Magneten soll erst nach Ermittlung des optimalen Oberflächenmaterials erfolgen.
- Die geplante Erfassung der Biodiversität des mikrobiellen Aufwuchses auf dem pflanzlichen Gärsubstrat im CSTR-System wurde aufgrund der kurzen Verweilzeit des pflanzlichen Materials im Rührkesselfermenter nicht durchgeführt. Stattdessen wurde die Flüssigphase im CSTR-System näher untersucht.

- In der ursprünglichen Planung waren keine TRFLP-Analysen enthalten. Dieses Fingerprint-Verfahren wurde jedoch als eine zusätzliche kultivierungsunabhängige semiquantitative Methode in die mikrobiologische Analytik aufgenommen, da sich mit diesem vergleichsweise zeitnah die Struktur und Entwicklung einer mikrobiellen Gemeinschaft ermitteln lässt. Ein entsprechendes Vorgehen wurde bereits als alternative Strategie bei der ursprünglichen Versuchsplanung vorgeschlagen.
- Die Hochdurchsatz-Sequenzierung zur Erfassung des mikrobiellen Metagoms in ausgewählten Biofilmen wurde bedingt durch den zwischenzeitlich erfolgten technischen Fortschritt auf einer MiSeq Personal Sequencer Plattform der Firma Illumina durchgeführt, da dieses System einen wesentlich höheren Anteil an Sequenzdaten liefert als die in der ursprünglichen Planung vorgesehene GS FLX Plattform von Roche Applied Science („454-Pyrosequenzierung“).
- Die untersuchten Modellreaktoren besaßen je nach Bauart ein Nutzvolumen zwischen 11 und 29 Litern. Wie in anderen biotechnologischen Systemen auch, können in einem kleinformatigen Modellsystem die in wesentlich größer dimensionierten Produktionssystemen stattfindenden Prozesse nur begrenzt nachvollzogen werden. Um einen ersten Eindruck von möglichen „*upscaling*“ Effekten bezüglich der Biofilmbildung zu gewinnen, wurde zusätzlich zu der ursprünglichen Projektplanung die Biofilmbildung in einem zweistufigen Biogasreaktorsystem (Nutzvolumen des Festbettreaktors 12 m³) der Firma Großmann Ingenieur Consult (GICON) Bioenergie GmbH am Standort Cottbus untersucht.

I.4 Stand der Wissenschaft und Technik auf dem dieses Vorhaben aufbaut

I.4.1 Mikrobiologie der Biomethanisierung

Die im Zuge der anaeroben Vergärung von Biomasse stattfindenden Prozesse lassen sich in vier Stufen unterteilen: (1) die Hydrolyse der makromolekularen Inhaltsstoffe in der Biomasse zu Mono-, Di- und Oligosacchariden, (2) die Acidogenese durch die anaerobe Vergärung dieser Zucker zu kurzkettigen organischen Verbindungen wie Fettsäuren (*volatile fatty acids*, VFA) aber auch Alkoholen, (3) die Acetogenese im Zuge der sekundären Vergärung dieser Verbindungen zu Acetat (CH₃COOH), Kohlendioxid (CO₂) und molekularem Wasserstoff (H₂), (4) die eigentliche Methanogenese, welche durch Reduktion von CO₂ oder Acetat zu Methan (CH₄) erfolgt.

Die Schritte (1) - (3) erfolgen durch Mikroorganismen der Domäne Bacteria. An diesen Prozessen sind insbesondere Angehörige der Klassen Clostridia und Bacilli (Stamm Firmicutes), verschiedene Proteobacteria, Spezies des Stammes Bacteroidetes sowie in geringerem Umfang auch Actinobacteria und Spirochaeten beteiligt [vgl. KLOCKE *et al.* 2007].

Im Unterschied zu Hydrolyse, Acidogenese und Acetogenese wird die Methanogenese ausschließlich von Mikroorganismen der Domäne Archaea durchgeführt. Bacteria sind aufgrund fehlender Enzyme grundsätzlich nicht in der Lage, Methan zu synthetisieren.

Verschiedene Archaea des Stammes Euryarchaeota sind in der Lage Methan als Endprodukt ihres Energiestoffwechsels zu produzieren: (1) acetoklastische Methanogene nutzen ausschließlich Acetat als Kohlenstoffdonor, (2) hydrogenotrophe Methanogene

reduzieren CO₂ oder Formiat unter Verwendung von H₂ als Elektronendonator, (3) methylotrophe Methanogene katabolisieren Methylverbindungen wie Methanol, methylierte Amine oder Methyl-Schwefel-Verbindungen. Vereinzelt sind manche Methanogene auch in der Lage eine Reihe verschiedener Substrate zur Methanogenese zu nutzen und stellen diesbezüglich Generalisten dar [BOONE *et al.* 2001].

Die meisten methanogenen Archaea erzeugen Methan im Zuge einer hydrogenotrophen Methanogenese. Vorrangig findet sich dieser Stoffwechselweg bei allen Gattungen der Ordnungen Methanobacteriales und Methanomicrobiales. Methylotrophe Methanogenese wird in erster Linie von Angehörigen der Ordnung Methanococcales, aber auch von bestimmten Gattungen der Ordnung Methanosarcinales (z.B. *Methanlobus*) betrieben. Zu der direkten Verwertung von Acetat sind nur vergleichsweise wenig Arten fähig. Bisher beschrieben ist diese Eigenschaft nur für verschiedene Arten der Gattungen *Methanosaeta* und *Methanosarcina* (Ordnung Methanosarcinales) [BOONE *et al.* 2001].

Zwischen den acetotrophen Methanogenen bestehen nach Stand der Literatur allerdings Unterschiede in der Art der Substratverwertung. *Methanosarcina* verstoffwechselt als Generalist Acetat nur, wenn dieses in erhöhten Konzentrationen ($K_M > 3.0$ mM) vorliegt. *Methanosaeta* dagegen ist an niedrige Acetat-Konzentrationen unterhalb von 10 µmol l⁻¹ (K_M 0.39 -1.2 mM) angepasst [JETTEN *et al.* 1990, FEY & CONRAD 2000, STAMS *et al.* 2003]. Das Wachstum von *Methanosaeta* sollte daher bevorzugt stattfinden, wenn wenig Acetat verfügbar ist [SCHMIDT & AHRING 1999]. Daher wird von manchen Autoren die Präsenz von *Methanosaeta* als Indiz für einen stabilen Biogasreaktor mit einer hohen Abbaurrate gewertet [z.B. MCHUGH *et al.* 2003].

In der Literatur wird häufig angenommen, dass in anaeroben methanogenen Umwelten 70% des in Methan fixierten Kohlenstoffs aus Acetat stammt, während CO₂ nur zu 30% als C-Donor für die Methanogenese genutzt wird [SIEGRIST *et al.* 2002, AHRING 2003, GAVALA *et al.* 2003, CHAN *et al.* 2005, KARAKASHEV *et al.* 2006]. Andere Arbeiten zeigten jedoch, dass das Verhältnis zwischen hydrogenotropher und acetoklastischer Methanogenese je nach Habitat verschieden sein kann [CONRAD 1999, CASTRO *et al.* 2004, CHAN *et al.* 2005]. Teilweise lassen sich in bestimmten Habitaten auch überhaupt keine acetoklastischen Methanogene nachweisen. So konnten die Antragsteller in verschiedenen Biogasreaktoren, sowohl im Labormaßstab wie auch in Praxisanlagen, überwiegend hydrogenotrophe seltener dagegen aber vereinzelt acetat-verwertende Methanogene nachweisen [KLOCKE *et al.* 2008b, NETTMANN *et al.* 2008].

Nach SCHNÜRER *et al.* [1994, 1999] kann bei einer Hemmung der acetotrophen Methanogenen, verursacht durch hohe VFA- oder Ammoniumkonzentrationen, die syntrophe Acetatoxidation zum Hauptweg des Essigsäureumsatzes werden. Die direkte Methanisierung von Acetat ist jedoch 10- bis 800-mal schneller.

In Vorarbeiten zu diesem Vorhaben konnten die Antragsteller zeigen, dass auf den Füllkörpern in methanogenen Anaerobfiltern verstärkt acetat-verwertende Methanogene der Gattung *Methanosaeta* als Oberflächenbewuchs auftreten, während in der wässrigen

Phase hydrogenotrophe Methanogene überwiegen [KLOCKE *et al.* 2008a]. In diesem Falle würde die Schaffung zusätzlicher Besiedlungsflächen im Biogasreaktor die Ansiedlung von acetat-verwertenden Methanbildnern forcieren.

Hydrogenotrophe Methanogene sind in vielen Biogasreaktorsystemen häufiger zu finden als acetotrophe Methanogene [KLOCKE *et al.* 2008a, NETTMANN *et al.* 2008]. In einzelnen Reaktoren konnten die Antragsteller bis zu 17 verschiedene taxonomische Gruppen (OTU) für hydrogenotrophe Methanogene nachweisen [KLOCKE *et al.* 2008b]. Bevorzugt scheinen hydrogenotrophe Methanogene in der Prozessflüssigkeit aufzutreten [KLOCKE *et al.* 2008a]. In diesem Falle würden die in der wässrigen Phase gelöst vorliegenden Gase H_2 bzw. HCO_3^- (oder Format) für die Methanogenese genutzt werden.

Aber auch für hydrogenotrophe Methanogene kann die Ansiedelung auf festen Aufwuchskörpern von Vorteil sein. Dieses ist insbesondere dann der Fall, wenn H_2 direkt von dem produzierenden Bakterium an das H_2 -verbrauchende Archaea weitergeleitet wird. Solche syntrophen Gemeinschaften sind bekannt für Assoziationen bestimmter VFA-degradierender Bacteria mit hydrogenotrophen Archaea [SCHINK 1997, SCHINK 2006]. Von essentieller Bedeutung für den Reaktorbetrieb sind hierbei insbesondere solche VFA-degradierenden Bacteria, welche in der Lage sind, das aufgrund seiner Hemmwirkung auf acetoklastische Archaea unerwünschte Propionat abzubauen [STAMS *et al.* 2003]. Stoffwechselendprodukt der VFA-degradierenden Bacteria ist Acetat.

Eine andere Art syntropher Lebensgemeinschaft unter Beteiligung von hydrogenotropher Archaea findet sich in Granules, makroskopischer Assoziationen aus Bacteria und Archaea, wie sie in *upflow anaerobic sludge bed* (UASB-) Reaktoren (s. Kap. I.4.2) zur Abwasserreinigung forciert gebildet werden. Hierbei wird H_2 von bestimmten Bacteria in der Oxidation von Acetat zu CO_2 gewonnen [AHRING 2003].

Es existieren nach dem Kenntnisstand der Antragsteller bislang keine Untersuchungen darüber, ob eine syntrophe hydrogenotrophe Methanogenese auch in den Biofilmen in Reaktorsystemen auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen existieren und, falls ja, in welchem Umfang diese erfolgt. Messungen der Abbaurate von VFA legen allerdings den Schluss nahe, dass syntrophe Prozesse auch in NawaRo-Systemen auftreten. Welche Mikroorganismen in welcher Art von Assoziation daran beteiligt sind, ist allerdings unbekannt.

I.4.2 Ein Modellsystem zur Anreicherung von mikrobieller Biomasse: Die Bildung von Granules

Es sind verschiedene technische Systeme bekannt, welche gezielt die Bildung makroskopischer Strukturen mikrobieller Assoziationen begünstigen. Ein klassisches Verfahren hierzu ist der *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) Reaktor, welches bislang überwiegend in der Abwasseraufbereitung eingesetzt wird [LETTINGA 1995]. Dieses System beruht auf der Immobilisierung mikrobieller Biomasse in Form von selbst aggregierenden makroskopischen Strukturen, den Granules. In Granules besteht eine enge, in

großen Teilen syntrophische Lebensgemeinschaft aus fermentativen, sowohl acidogenen als auch acetogenen Bacteria und methanogenen Archaea [ZHU *et al.* 1997]. Innerhalb der letzteren Gruppe haben verschiedene Autoren eine wesentliche formgebende Funktion für die Gattung *Methanosaeta* (alter Name *Methanothrix*) nachgewiesen [FORSTER 1991, WU *et al.* 1993, FANG *et al.* 1994, WU *et al.* 2001, SHIN *et al.* 2001, KEYSER *et al.* 2006, ZHENG *et al.* 2006, FERNANDEZ *et al.* 2008]. Neben diesen acetoklastischen Methanogenen können ebenfalls größere Anteile an Archaea der Gattung *Methanosarcina* beteiligt sein [FANG *et al.* 1995, KEYSER *et al.* 2006]. Unter bestimmten Umständen, wie z.B. bei Verwendung von bestimmten Substraten, können andererseits auch hydrogenotrophe Methanbildner wie *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* oder *Methanospirillum* als ausschließliche methanogene Species in die Bildung der Granules involviert sein [VEIGA *et al.* 1997, BHATTI *et al.* 1997, SEKIGUCHI *et al.* 1999, POL *et al.* 2004, KEYSER *et al.* 2006]. Innerhalb der Bacteria sind vorrangig Vertreter der Proteobacteria in Granules zu finden [WU *et al.* 2001, FERNANDEZ *et al.* 2008].

Die Zusammensetzung der an der Granules-Bildung beteiligten Methanogenen kann u.a. aufgrund der Substratzusammensetzung variieren [BHATTI *et al.* 1997, DIAZ *et al.* 2003]. Zudem kann die Bildung von Granules durch Zugabe von geeigneten Polymermatrices unterstützt werden [ZHU *et al.* 1997, EL-MAMOUNI *et al.* 1998, WANG *et al.* 2004, POL *et al.* 2004, TIWARI *et al.* 2004]. In jedem Fall ist jedoch die Formierung solcher Granules von entscheidendem Einfluss auf die Abbaurrate von organischen Substanzen und damit der Effizienz von UASB-Reaktoren [LETTINGA 1995]. Neben der Reduzierung der Länge der Startphase erhöht sich die maximale Belastungsrate mit organischem Material der Reaktoren. Weiterhin schützt die Formation von Granules die mikrobielle Gemeinschaft vor toxischen Ionen und Agenzien [BAE & LEE 1999, FANG 2000, BAE *et al.* 2002]. Granules erhöhen außerdem die Stabilität gegenüber Änderungen in der Substratzusammensetzung [FANG 2000]. Beide Faktoren tragen wesentlich zu der Reaktorstabilität bei.

Die Struktur der Granules kann jedoch durch mechanische Belastungen wie z.B. durch Rührwerke beeinträchtigt werden [PEREBOOM 1997]. Dabei können aber unterschiedlich strukturierte Granules unterschiedlich starken Belastungen ausgesetzt werden [PEREBOOM 1997]. Die physikalischen Bedingungen scheinen ebenfalls einen großen Einfluss auf die Granules-Vermehrung und -„Reifung“ zu haben [POL *et al.* 2004]. Andere Autoren vermuten als Grundlage der Granules-Bildung ausschließlich einen Prozess der zufälligen Aggregation der Mikroorganismen der wässrigen Phase [FANG 2000].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Bildung mikrobieller Aggregate die Abbauleistung in anaeroben Reaktoren forciert und entscheidend sowohl zur Reaktoreffizienz als auch -stabilität beiträgt. Das UASB-Prinzip ist jedoch nur anwendbar auf wässrige Medien mit einem vergleichsweise geringen Gehalt an organischen Substanzen. Für Substrate mit hohem Feststoffanteil wie nachwachsende Rohstoffe sind UASB-Reaktoren nur einsetzbar, wenn die Nährstoffe zunächst aus den NawaRo ausgelaugt werden. Diese ist in zweistufigen, zweiphasigen Verfahren mit getrennten Stufen zur Hydrolyse der NawaRo und Methanbildung der Fall.

I.4.3 Methanogene Biofilme in Anaerobsystemen

Neben *fluidized bed* Reaktoren mit frei schwebenden mikrobiellen Aggregationen und *sludge blanket* Reaktoren wie z.B. UASB-Reaktoren besteht eine weitere technische Lösung in der Füllung eines Reaktors mit unbeweglichen Aufwuchskörpern. Solche als *solid* oder *fixed bed* bezeichneten Reaktoren (SBR) weisen eine (idealerweise maximal) vergrößerte Oberfläche auf [z.B. WEILAND 1987, ANNACHATRE & BHAMIDIMARRI 1992]. Ebenso wie *fluidized bed* Reaktoren und UASB-Reaktoren können SBR nur mit feststoffarmen Flüssigkeiten betrieben werden. Zur Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen ist daher die Kopplung des SBR mit einer getrennten Hydrolyse- oder Acidifizierungsstufe zwingend erforderlich. In diesem Falle ist der SBR als Anaerobfilter (AF) konstruiert, welcher sowohl im Aufstrom- (*upflow*) als auch im Abstrom- (*downflow*) Verfahren betrieben werden kann [z.B. WEILAND 1987, KLOCKE *et al.* 2008b].

Auf den Aufwuchskörpern in AF bildet sich analog zu Granules innerhalb kurzer Zeit ein komplexer Biofilm aus verschiedenen Bacteria und Archaea aus [ANDERSON *et al.* 1994, RASKIN *et al.* 1995, KLOCKE 2008a]. Ebenso wie in Granules variiert die Zusammensetzung dieser Biofilme auf Gattungsebene. Je nach Reaktorsystem und Substrat beschreiben verschiedene Autoren unterschiedliche, den Biofilm dominierende Gruppen von methanogenen Archaea. ANDERSON *et al.* [1994] charakterisieren den Biofilm in dem von ihnen untersuchten System als eine Mischung verschiedener hydrogenotropher Methanogener bestehend aus *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina* und *Methanococcus*. INCE & INCE [2000] berichten von einem AF mit dominierender *Methanococcus*-Population. Die Antragsteller konnten dagegen in dem Biofilm in einem AF eines zweistufigen Reaktorsystems zur Vergärung von Roggensilage eine Mischung verschiedener hydrogenotropher und acetotropher Methanogener mit einem deutlich erhöhten Nachweis von ausschließlich acetotrophen *Methanosaeta* nachweisen [KLOCKE *et al.* 2008a]. *Methanococcus* konnte dagegen nie detektiert werden.

Ebenso weist die Zusammensetzung der Biofilme deutliche Unterschiede zu selbständig assemblierenden mikrobiellen Aggregaten wie Flocken auf [KITSOS *et al.* 1993]. Nicht nur die Bildung der Biofilme sondern auch deren Zusammensetzung kann durch die Beschaffenheit und das Material des Aufwuchsträgers innerhalb gewisser Grenzen beeinflusst werden [JIAN & PINDER 1992, PICANO *et al.* 2001]. Dieses konnte insbesondere für methanogene Archaea gezeigt werden [PICANO *et al.* 2001]. Statt künstlicher Aufwuchskörper können auch natürliche Aufwuchsträger wie z.B. Stroh verwendet werden [ANDERSON & BJORNSSON 2002].

Die spezifische Oberfläche der Füllkörper und deren Packungsdichte entscheidet über die für den Biofilm zur Verfügung stehende Fläche und damit über die Menge der in dem Biofilm gebundenen mikrobiellen Zellzahl, welche wiederum den Substratumsatz bedingt [z.B. PICANO *et al.* 2001]. Die Kapazität von Biofilmen zur Produktion von Biogas scheint grundsätzlich vergleichbar mit der von Granules in UASB-Reaktoren [JHUNG & CHOI 1994, GIJZEN & KANSIIME 1996, JAWED & TARE 1996]. Unter bestimmten Operationsbedingungen weisen allerdings sowohl biofilm-basierte Reaktoren wie auch UASB-

Reaktoren bessere Leistungsmerkmale auf: Es gibt Hinweise, dass biofilm-basierte Reaktoren eine kürzere Startphase besitzen [GIJZEN & KANSIIME 1996], besser geeignet sind, wechselnde Substratqualitäten umzusetzen [JHUNG & CHOI 1994] sowie bessere Ergebnisse bei höheren Belastungsraten erzielen [JAWED & TARE 1996]. UASB-Reaktoren zeigen dagegen einen besseren Substratabbau bei herabgesetzten Verweilzeiten [GIJZEN & KANSIIME 1996].

Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf zweistufige Reaktorssysteme zur Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen wurde bislang nicht geprüft. Ebenso fehlen aussagekräftige Untersuchungen darüber, welche Mikroorganismen an der Ausbildung der entsprechenden mikrobiellen Strukturen beteiligt waren. Es können daher keine Aussagen über die grundsätzliche Abhängigkeit der Reaktorleistung von der An- bzw. Abwesenheit bestimmter methanogener Spezies bzw. Lebensgemeinschaften getroffen werden.

1.4.4 Ansiedlung und Rückhaltung mikrobieller Biomasse bei der Vergärung nachwachsender Rohstoffe

Bei der Vergärung von pflanzlicher Biomasse kommen derzeit vorrangig einstufige Systeme in Form von komplett durchmischten Rührkesselreaktoren (*completely stirred tank reactor*, CSTR) zum Einsatz. In der Erprobungsphase befinden sich derzeit zweistufige Reaktorssysteme bestehend aus Hydrolyse- oder Acidifizierungsstufe und einer separaten Methanstufe (z.B. Anaerobfilter) [LINKE *et al.* 2006, MUMME *et al.* 2007b, MUMME 2008].

Während im Anaerobfilter die mikrobielle Biomasse fixiert in Form eines Biofilms auf der Oberfläche von Füllkörpern vorliegt, sind die Mikroorganismen in CSTR primär in der Prozessflüssigkeit suspensiert oder auf der Oberfläche des Pflanzenmaterials angesiedelt. In der Folge kommt es bei jeder Neubefüllung des Reaktors mit frischem pflanzlichem Substrat zu einem Austrag von mikrobieller Biomasse, wodurch sich stets eine Mikroorganismen-Konzentration unterhalb des technischen Optimums einstellt. Dieser Umstand reduziert die Biogasbildungsrate und damit auch die Effizienz und die Belastbarkeit des Reaktors.

Zur Verminderung des Austrages wurde am Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) ein System entwickelt, welches den Gehalt an mikrobieller Biomasse in einem CSTR regeln kann [TÖLLE *et al.* 2006]. Hierbei werden magnetische Partikel in den CSTR gegeben, an die sich die Mikroorganismen anlagern können [MUMME *et al.* 2007a]. Über ein magnetisches Rückhaltesystem können diese Magnetpartikel und damit die assoziierten Mikroorganismen dann aus dem Ablauf entnommen werden. Durch die Rückführung in den Reaktorraum wird so die Konzentration an aktiver mikrobieller Biomasse auch bei einem Austrag der Gärreste aufrecht erhalten. Entsprechend ist in der Folge eine wesentlich höhere Produktivität des Reaktors verglichen mit konventionellen Systemen zu beobachten.

Weiterer Optimierungsbedarf besteht auf technischer Ebene allerdings noch hinsichtlich Form, Größe und Material der Magnetpartikel sowie der Einsatzmenge. Ebenso existie-

ren keine Untersuchungen über die Art der mikrobiellen Biozönosen, welche sich auf den Magnetpartikeln ansiedeln, noch in wie weit die Struktur der Aufwuchskörper die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose bedingt.

I.4.5 Kultivierungsunabhängige molekulargenetische Verfahren zur Erfassung der mikrobiellen Diversität

Die Biodiversität innerhalb mikrobieller Biozönosen ist mit klassischen mikrobiologischen Methoden basierend auf der Anreicherung und Kultivierung einzelner Spezies oder Gruppen von Mikroorganismen nur unzureichend und mit verhältnismäßig großem Aufwand zu ermitteln. Aus diesem Grund haben sich in der mikrobiellen Ökologie molekulare Verfahren auf Basis der Beschreibung individueller Gensequenzen durchgesetzt [AMANN *et al.* 1995].

Ein Standardverfahren stellt die Analyse der Nukleotidsequenz einer Struktur-RNA (16S rRNA) in den Ribosomen bzw. des entsprechenden Gens dar. Diese Nukleotidsequenz ist bei allen prokaryotischen Mikroorganismen zu finden, weist aber auf Art-Ebene in den meisten Fällen genügend Unterschiede für eine taxonomische Klassifizierung auf. Üblicherweise wird eine Sequenzähnlichkeit über 3% als genügend groß für eine Differenzierung von Arten angesehen [z.B. ZUMSTEIN *et al.* 2000].

Unabhängig von solchen Unterschieden existieren in der 16S rRNA genügend konservierte Bereiche, welche auch innerhalb größeren taxonomischen Einheiten stets eine identische Nukleotidsequenz aufweisen. Solche konservierten Bereiche lassen sich gezielt zur Anreicherung der 16S rRNA Genequenzen einzelner Mikroorganismengruppen wie z.B. der methanogenen Archaea mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nutzen [BAKER *et al.* 2003].

Durch Klonierung der (selektiv) angereicherten 16S rRNA Gensequenzen kann eine Vereinzelung und gezielte Analyse der Nukleotidsequenzen erfolgen. Neben der direkten Sequenzierung der in einer solchen Klonbibliothek enthaltenen Sequenzen kann ein *Vor-Screening* der Bibliothek mittels eines Fingerprint-Verfahrens erfolgen. Hierzu wird die Sequenz der einzelnen Klone der Bibliothek ein zweites Mal durch eine PCR vermehrt und anschließend mittels einer Kombination verschiedener Restriktionsendonucleasen enzymatisch in kleinere Fragmente zerschnitten (*amplified 16S rDNA restriction analysis*, ARDRA) [LAGUERRE 1994]. Ein solches Fragmentmuster wird auch als PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (PCR-RFLP) bezeichnet und ist in den meisten Fällen charakteristisch für eine Gruppe eng verwandter Mikroorganismen [MCHUGH *et al.* 2003, SOUIDI *et al.* 2007]. Ein solches Vor-Screening reduziert die Sequenzierungskosten und gewährleistet eine gewisse statistische Absicherung, da mehr Klone bzw. 16S rRNA Gensequenzen einer Klonbibliothek bei gleichem Kostenaufwand aber ähnlichem Informationsgehalt analysiert werden können.

Unabhängig von einer Klonierung lässt sich die Diversität innerhalb der mikrobiellen 16S rRNA auch mittels einem direktem Verfahren analysieren. Weit verbreitet und in einer Vielzahl von Arbeiten verwendet ist die Analyse *via denaturing gradient gel*

electrophoresis (DGGE) [z.B. KEYSER *et al.* 2006, COLLINS *et al.* 2006] oder *terminal restriction fragment length polymorphism* (TRFLP) [z.B. COLLINS *et al.* 2006]. Beide Verfahren sind gut geeignet um Unterschiede oder Veränderungen innerhalb des 16S rRNA Pools und damit innerhalb einer Gruppe von Mikroorganismen anzuzeigen.

Eine Quantifizierung einzelner Gruppen von 16S rRNA Gensequenzen kann mittels quantitativer *realtime* PCR (Q-PCR, auch qPCR) erfolgen. Hierzu wird die Vervielfältigung der 16S rRNA Gene mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR-Green) bzw. eines fluoreszenten DNA-Sonden-Systems (5'-Nuclease-Assay oder Taqman-System) *online* detektiert. Aus dem Amplifikationsverhalten lässt sich die ursprünglich in der Probe vorliegende Genkopienzahl berechnen. Erste Studien zur Detektion von verschiedenen taxonomischen Gruppen methanogener Archaea in Fermentationsprozessen unter Verwendung von 5'-Nuclease-Assays wurden von YU *et al.* [2005a,b] publiziert. Diese Assays wurden von den Autoren dieser Studie verbessert und zur Analyse verschiedener Labor- und Praxisreaktoren genutzt [KLOCKE *et al.* 2008a,b, NETTMANN *et al.* 2008].

Neben solchen eher spezifischen Ansätzen erlauben es jüngste Entwicklungen auf dem Gebiet der ultra-schnellen Technologien zur DNA-Sequenzierung die Durchführung von Projekten zur Sequenzierung großer Teile der gesamten mikrobiellen Erbgutinformation in einer Umweltprobe (*large-scale environmental shotgun sequencing*). Die zum Zeitpunkt der Antragstellung 2008 aktuelle, dritte Generation der ultraschnellen Sequenzierungsplattformen, die 454-Pyrosequenzierung-Technologie, war in der Lage ca. 20 Millionen Basen in nur einem 4,5 Stunden dauernden automatisierten Versuchslauf zu erfassen. Die durchschnittliche Fragmentgröße, die auf dieser Plattform erzeugt werden konnte, lag bei 200 - 250 Basen [LIU *et al.* 2007]. Zum Zeitpunkt der Drucklegung verfügbare Verfahren wie der Illumina MiSeq Desktop Sequencer können lt. Herstellerangaben in einem Reaktionsansatz bis zu 25 Millionen Sequenzen mit zusammen 15 Milliarden Basen bei einer maximalen Leseweite von 2x 300 Basen erzeugen.

Über die Kombination verschiedener Sequenzfragmente mittels bioinformatischer Softwareprogramme [KRAUSE *et al.* 2006, RAES *et al.* 2007, KRAUSE *et al.* 2008] können größere Teile mikrobieller Chromosomen ermittelt werden, welche dann nicht nur taxonomisch-relevante Gensequenzen umfassen, sondern auch eine Vielzahl funktioneller Gene einschließen (Metagenom). Für angereicherte mikrobielle Gemeinschaften mit überschaubarer Artenzahl lassen sich so sogar ganze Chromosomen reassemblieren [SCHLÜTER *et al.* 2008].

1.4.6 Fluoreszenz-mikroskopische Verfahren zur Aufklärung von Biofilmstrukturen

Molekulargenetische Verfahren zur Beschreibung der mikrobiellen Biodiversität bieten grundsätzlich den Vorteil, dass potentiell alle in einer gegebenen Umwelt vorhandenen Arten detektiert werden können. Die Organisation mikrobieller Strukturen ist dagegen mit solchen Ansätzen nur schwerlich zu erfassen.

Das einzige Verfahren für die *in situ* Erfassung bestimmter Arten oder taxonomischer bzw. funktioneller Gruppen von Mikroorganismen ist die sondengestützte Fluoreszenz-Markierung der Zellen (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) und der nachfolgende Nachweis mittels bildgebender Verfahren (Fluoreszenz-Mikroskopie) oder automatisierter Systeme (Durchflusszytometrie).

Fluoreszenz-markierte Sondensysteme können einerseits auf Basis einer Markierung von Proteinen auf der Oberfläche der äußeren Zellmembran von Mikroorganismen mittels Antikörpern entwickelt werden. Dieses Verfahren ist zwar robust und erlaubt spezifische Markierungen, erfordert aber einen verhältnismäßig hohen Entwicklungsaufwand. Eine experimentelle weniger aufwändige Alternative stellt die Anwendung von Oligonukleotid-Sonden z.B. auf Basis der 16S rRNA dar. Eine umfangreiche Sammlung von Oligonukleotid-Sonden und entsprechender Versuchsprotokolle findet sich in der Datenbank Probase [LOY *et al.* 2007]. Alleine 16 getestete Sondensysteme sind dort für einzelne Gruppen der Euryarchaeota verzeichnet.

Die FISH-basierte Quantifizierung ist eine gut etablierte und häufig verwendete Methode in der Umweltmikrobiologie [ZWIRGELMAIER 2005, ZHOU *et al.* 2007]. In jüngerer Zeit werden verstärkt auch Arbeiten publiziert, welche diese Methode zur Analyse von mikrobiellen Lebensgemeinschaften in verschiedenen Typen anaerober Reaktoren verwenden [SEKIGUCHI *et al.* 1999, TAGAWA *et al.* 2000, TAY *et al.* 2001, DIAZ *et al.* 2003, IVANOV *et al.* 2004, COLLINS *et al.* 2006, DIAZ *et al.* 2006, STABNIKOVA *et al.* 2006, ZHENG *et al.* 2006, SONAKYA *et al.* 2007, SOUSA *et al.* 2007, FERMOSE *et al.* 2008]. Ein Schwerpunkt der Arbeiten liegt vor allem auf der Analyse mikrobieller Aggregate, sogenannter Granules. Biofilme wurden nach Kenntnis der Antragsteller wesentlich seltener und bislang nicht in Biogasreaktoren auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen untersucht.

Bedingt durch die Natur des Probenmaterials kommt es häufig zu einer Beeinträchtigung des Fluoreszenz-Signals z.B. durch eine hohe Hintergrundfluoreszenz in dem Probenmaterial. In diesem Falle lässt sich das Fluoreszenzsignal über ein gekoppeltes Reportersignal verstärken [KERSTENS *et al.* 1995, ISHII *et al.* 2004]. Eine solche *catalyzed reporter deposition* (CARD) FISH wurde ebenfalls bereits zur Analyse verschiedener methanogener Lebensgemeinschaften erfolgreich angewandt [FERNANDEZ *et al.* 2006, FERNANDEZ *et al.* 2008, KUBOTA *et al.* 2008].

Voraussetzung für die Erfassung der Struktur von Biofilmen und anderen räumlichen Aggregationen von Mikroorganismen ist die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM). Im Unterschied zu der klassischen Lichtmikroskopie besitzt die LSM eine Reihe von Vorteilen: (1) Durch das Abtasten des Objektes in beliebigen Ebenen kann ein dreidimensionales Bild generiert werden. (2) Durch die Verwendung eines Lasers wird ein Bild mit höherer Auflösung als in der Lichtmikroskopie möglich generiert. (3) Die Abbildungen der LSM sind aus dem gleichen Grunde auch kontrastreicher.

I.4.7 Offene Fragen und Ziele des Forschungsvorhabens

Nach dem Stand der Literatur sind insbesondere die mikrobiellen Aggregate und Biofilme innerhalb des Reaktors entscheidend für dessen Leistungsfähigkeit und Stabilität. Bezogen auf die Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen sind nach Ansicht der Antragsteller jedoch insbesondere die folgenden Aspekte bislang nicht oder nur ansatzweise untersucht und sollten daher Gegenstand dieses Forschungsvorhabens sein:

- (1) Wie sind die Biofilme in ein- und zweistufigen Reaktorsystemen zur Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen aufgebaut?
- (2) Welche Archaea sind in diesen Biofilmen zu finden und welche Art der Methanogenese wird von diesen durchgeführt?
- (3) Welche Art von syntrophen Bacteria mit welchen StoffwechsellLeistungen finden sich in solchen Biofilmen?
- (4) Existieren in den Biofilmen auch Mikroorganismen mit einer kompetitiven Stoffwechselaktivität zu methanogenen Archaea wie z.B. Sulfatreduzierer?
- (5) Welchen Einfluss hat die Ansiedlung und Zusammensetzung von Biofilmen und anderen mikrobiellen Aggregationen auf den Substratumsatz und damit auf die Reaktoreffizienz?
- (6) Mit welchen technischen Lösungen lassen sich die Ansiedlung und Immobilisierung von effektiven Mikroorganismen und effektiver mikrobieller Lebensgemeinschaften unterstützen?

I.4.8 Patentsituation

Die Arbeiten basierten u.a. auf dem Patent DE 10 2005 024 886 B3 (Patentinhaber ATB, HU Berlin). Die Erfinder (Dr. J. Mumme, Prof. Dr. B. Linke) waren an der Projektplanung und Antragstellung beteiligt und gestatteten die Forschung basierend auf dem patentierten System.

I.4.9 Verwendete Literatur

In Vorbereitung dieses Forschungsvorhabens erfolgte eine ausführliche Literaturrecherche unter Verwendung der Web of Science Literaturdatenbank der Fa. Thomson Reuters (<http://thomsonreuters.com/thomson-reuters-web-of-science>). Folgende Arbeiten bildeten die Grundlage zur Darstellung von dem Stand der Wissenschaft und Technik:

AHRING B. (2003): Perspectives for anaerobic digestion. Adv. Biochem. Eng./Biotechn. 81: 1-30.

AMANN R.I., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H. (1995): Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 143-169.

ANDERSON G.K., KASAPGIL B., INCE O. (1994): Microbiological study of 2-stage anaerobic-digestion during start-up. Water Res. 28: 2383-2392.

ANDERSSON J., BJÖRNSSON L. (2002): Evaluation of straw as a biofilm carrier in the methanogenic stage of two-stage anaerobic digestion of crop residues. Biores. Tech. 85: 51-56.

- ANNACHHATRE A.P., BHAMIDIMARRI S.M.R. (1992):** Microbial attachment and growth in fixed-film reactors - process startup considerations. *Biotechn. Adv.* 10: 69-91.
- BAE J.W., LEE S.T. (1999):** Layered structure of UASB granules gives microbial populations resistance to toxic chemicals. *Biotechn. Lett.* 21: 159-162.
- BAE J.W., RHEE S.K., KIM I.S., HYUN S.H., LEE S.T. (2002):** Increased microbial resistance to toxic wastewater by sludge granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *J. Microbiol. Biotechn.* 12: 901-908.
- BAKER G.C., SMITH J.J., COWAN D.A. (2003):** Review and re-analysis of domain specific 16S primers. *J. Microbiol. Meth.* 55: 541-555.
- BHATTI Z.I., FURUKAWA K., FUJITA M. (1997):** Microbial diversity in UASB reactors. *Pure Appl. Chem.* 69: 2431-2438.
- BOONE D.R., CASTENHOLZ R.W., GARRITY G.M. (2001):** *Bergey's manual of systematic bacteriology, Second Edition, Volume 1*, Springer, Berlin, 2001.
- CASTRO H., OGRAM A., REDDY K.R. (2004):** Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the Florida Everglades. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6559-6568.
- CHAN O.C., CLAUS P., CASPER P., ULRICH A., LUEDERS T., CONRAD R. (2005):** Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ. Microbiol.* 7: 1139-1149.
- COLLINS G., KAVANAGH S., MCHUGH S., CONNAUGHTON S., KEARNEY A., RICE O., CARRIGG C., SCULLY C., BHREATHNACH N., MAHONY T., MADDEN P., ENRIGHT A.M., O'FLAHERTY V. (2006):** Accessing the black box of microbial diversity and ecophysiology: Recent advances through polyphasic experiments. *J. Environ. Sci. Health Part A* 41: 897-922.
- CONRAD R. (1999):** Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28, 193-202.
- DIAZ E., AMILS R., SANZ J.L. (2003):** Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. *Water Sci. Techn.* 48: 57-64
- DIAZ E., STAMS A.J.A., AMILS R., SANZ J.L. (2006):** Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4942-4949.
- EL-MAMOUNI R., LEDUC R., GUIOT S.R. (1998):** Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Sci. Techn.* 38: 341-347.
- FANG H.H.P. (2000):** Microbial distribution in UASB granules and its resulting effects. *Water Sci. Techn.* 42: 201-208.
- FANG H.H.P., CHUI H.K., LI Y.Y. (1994):** Microbial structure and activity of UASB granules treating different wastewaters. *Water Sci. Techn.* 30: 87-96.
- FANG H.H.P., CHUI H.K., LI Y.Y. (1995):** Microstructural analysis of UASB granules treating brewery waste-water. *Water Sci. Techn.* 31: 129-135.
- FERMOSO F.G., COLLINS G., BARTACEK J., O'FLAHERTY V., LENS P. (2008):** Acidification of methanol-fed anaerobic granular sludge bioreactors by cobalt deprivation: Induction and microbial community dynamics. *Biotech. Bioeng.* 99: 49-58.
- FERNANDEZ N., SIERRA-ALVAREZ R., FIELD J.A., AMILS R., SANZ J.L. (2006):** Microbiological and structural aspects of granular sludge from autotrophic denitrifying reactors. *Water Sci. Tech.* 54: 11-17.
- FERNANDEZ N., SIERRA-ALVAREZ R., FIELD J.A., AMILS R., SANZ J.L. (2008):** Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere* 70: 462-474.

- FEY A., CONRAD R. (2000):** Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archaeal community in methanogenic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4790-4797.
- FORSTER C.F. (1991):** Anaerobic upflow sludge blanket reactors - aspects of their microbiology and their chemistry. *J. Biotechn.* 17: 221-232.
- GAVALA H.N., ANGELIDAKI I., AHRING B.K. (2003):** Kinetics and modeling of anaerobic digestion process. *Adv. Biochem. Eng./Biotechn.* 81: 57-93.
- GIJZEN H.J., KANSIIME F. (1996):** Comparison of start-up of an upflow anaerobic sludge blanket reactor and a polyurethane carrier reactor. *Wat. Sci. Tech.* 34: 509-515.
- INCE B.K., INCE O. (2000):** Changes to bacterial community make-up in a two-phase anaerobic digestion system. *J. Chem. Tech. Biotechn.* 75: 500-508.
- ISHII K., MUSSMANN M., MACGREGOR B.J., AMANN R. (2004):** An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 50: 203-212.
- IVANOV V.N., WANG J.Y., STABNIKOVA O.V., TAY S.T.L., TAY J.H. (2004):** Microbiological monitoring in the biodegradation of sewage sludge and food waste. *J. Appl. Microbiol.* 96: 641-647.
- JAWED M., TARE V. (1996):** Methanogenic activity and performance of UASB, DSFF and USFF reactors. *Wat. Sci. Tech.* 34: 483-487.
- JETTEN M.S.M., STAMS A.J.M., ZEHNDER A.J.B. (1990):** Acetate threshold and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 339-344.
- JIAN Y., PINDER K.L. (1992):** Buildup of symbiotic methanogenic biofilms on solid supports. *Biotechn. Lett.* 14: 989-994.
- JHUNG J.K., CHOI E. (1995):** A comparative study of UASB and anaerobic fixed film reactors with development of sludge granulation. *Wat. Res.* 29: 271-277.
- KARAKASHEV D., BATSTONE D.J., TRABLY E., ANGELIDAKI I. (2006):** Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5138-5141.
- KERSTENS H.M.J., PODDIGHE P.J., HANSELAAR A.G.J.M. (1995):** A novel in-situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 347-352.
- KEYSER M., WITTHUHN R.C., LAMPRECHT C., COETZEE M.P.A., BRITZ T.J. (2006):** PCR-DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules. *Sys. Appl. Microbiol.* 29: 77-78.
- KITSOS H.M., JONES W.J., ROBERTS R.S., TORNABENE T.G. (1993):** Anaerobic digestion of simulated distillery waste using flocculated and fixed cell reactors. *J. Environ. Sci. Health Part A* 28: 1099-1121.
- KLOCKE M., MÄHNERT P., MUNDT K., SOUIDI K., LINKE B. (2007):** Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Sys. Appl. Microbiol.* 30: 139-151.
- KLOCKE M., MUNDT K., NETTMANN E., SOUIDI K., BERGMANN I., MUMME J., SCHÖNBERG M., LINKE B. (2008 a):** Diversity of methanogenic Archaea in silage-utilizing two-phase biogas reactors. In: European Society of Agricultural Engineers [Ed.]: Proceedings of the International Conference on Agricultural Engineering & Industry Exhibition AgEng2008 - Agricultural and Biosystems Engineering for a Sustainable World, Hersonissos, Crete, Greece, 23. - 25. Juni 2008. Book of abstracts: P-144, Conference proceedings CD: 1143216 [13 Seiten].
- KLOCKE M., NETTMANN E., BERGMANN I., MUNDT K., SOUIDI K., MUMME J., LINKE B. (2008 b):** Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Sys. Appl. Microbiol.* 31: 190-205.

- KRAUSE L., DIAZ N.N., BARTELS D., EDWARDS R.A., PUHLER A., ROHWER F., MEYER F., STOYE J. (2006):** Finding novel genes in bacterial communities isolated from the environment. *Bioinformatics* 22: e281-e289.
- KRAUSE L., MCHARDY A.C., NATTKEMPER T.W., PUHLER A., STOYE J., MEYER F. (2007):** GIS-MO - gene identification using a support vector machine for ORF classification. *Nucleic Acids Res.* 35: 540-549.
- KUBOTA K., IMACHI H., KAWAKAMI S., NAKAMURA K., HARADA H., OHASHI A. (2008):** Evaluation of enzymatic cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens. *J. Microbiol. Meth.* 72: 54-59.
- LAGUERRE G., ALLARD M.R., REVOY F., AMARGER N. (1994):** Rapid identification of Rhizobia by restriction-fragment-length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S ribosomal-RNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 56-63.
- LETTINGA G. (1995):** Anaerobic digestion and waste water treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 3-28.
- LINKE B., HEIERMANN M., MUMME J. (2006):** Ergebnisse aus den wissenschaftlichen Begleitungen der Pilotanlagen Pirow und Clausnitz. *In: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. [Hrsg.]: Trockenfermentation - Stand der Entwicklungen und weiterer F&E-Bedarf. Gülzower Fachgespräche* 24: 95-102.
- MCHUGH S., CARTON M., MAHONY T., O'FLAHERTY V. (2003):** Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiol. Lett.* 219: 297-304.
- MUMME J. (2008):** Vergärung nachwachsender Rohstoffe im Aufstromverfahren. Dissertation. Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin. *im Druck*.
- MUMME J., LINKE B., TENNEMANN S. (2007 a):** Magnete halten Mikroorganismen im Fermenter - Höhere Effizienz von Biogasanlagen durch magnetische Partikel. *Neue Landwirtschaft*, 11: 96-98.
- MUMME J., LINKE B., BEYROW V. (2007 b):** Zweistufige Verfahren bringen mehr Gas - Steigerung der Produktivität und Energieeffizienz durch Hochleistungsverfahren zur Vergärung nachwachsender Rohstoffe. *Neue Landwirtschaft* 8: 78-80.
- NETTMANN E., BERGMANN I., MUNDT K., LINKE B., KLOCKE M. (2008):** Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *J. Appl. Microbiol.* *im Druck*.
- PEREBOOM J.H.F. (1997):** Strength characterisation of microbial granules. *Water Sci. Tech.* 36: 141-148.
- PICANO A.P., VALLERO M.V.G., GIANOTTI E.P., ZAIAT M., BLUNIDI C.E. (2001):** Influence of porosity and composition of supports on the methanogenic biofilm characteristics developed in a fixed bed reactor. *Water Sci. Tech.* 44: 197-204.
- POL L.W.H., LOPES S.I.D., LETTINGA G., LENS P.N.L. (2004):** Anaerobic sludge granulation. *Water Res.* 38: 1376-1389.
- RAES J., FOERSTNER K.U., BORK P. (2007):** Get the most out of your metagenome: computational analysis of environmental sequence data. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 490-498.
- RASKIN L., AMANN R.I., POULSEN L.K., RITTMANN B.E., STAHL D.A. (1995):** Use of ribosomal RNA-based molecular probes for characterization of complex microbial communities in anaerobic biofilms. *Water Sci. Tech.* 31: 215-225.
- SCHINK B. (1997):** Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 262-280.
- SCHINK B. (2006):** Syntrophic associations in methanogenic degradation. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 41: 1-19.

- SCHLÜTER A., BEKEL T., DIAZ N.N. et al. (2008):** The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J. Biotechnol.* 136: 77-90.
- SCHMIDT J.E., AHRING B.K. (1999):** Immobilisation patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilised in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1050-1054.
- SCHNÜRER A., HOUWEN F.P., SVENSSON B.H. (1994):** Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation by a triculture at high ammonium concentration. *Arch. Microbiol.* 162: 70-74.
- SCHNÜRER A., ZELLNER G., SVENSSON B.H. (1999):** Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 249-261.
- SEKIGUCHI Y., KAMAGATA Y., NAKAMURA K., OHASHI A., HARADA H. (1999):** Fluorescence in-situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiology* 65: 1280-1288.
- SHIN H.S., HAN S.K., SONG Y.C., LEE C.Y. (2001):** Performance of UASB reactor treating leachate from acidogenic fermenter in the two-phase anaerobic digestion of food waste. *Water Res.* 35: 3441-3447.
- SIEGRIST H., VOGT D., GRACIA-HERAS J.L., GUJER W. (2002):** Mathematical model for meso- and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Environ Sci. Tech.* 36: 1113-1123.
- SONAKYA V., RAIZADA N., HAUSNER M., WILDERER P.A. (2007):** Microbial populations associated with fixed- and floating-bed reactors during a two-stage anaerobic process. *Int. Microbiol.* 10: 245-251.
- SOUIDI K., MUMME J., MUNDT K., NETTMANN E., BERGMANN I., LINKE B., KLOCKE M. (2007):** Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure. *Agric. Eng. Res.* 13: 197-205.
- SOUSA D.Z., PEREIRA M.A., SMIDT H., STAMS A.J.M., ALVES M.M. (2007):** Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 252-265.
- STABNIKOVA O., LIU X.Y., WANG J.Y., IVANOV V. (2006):** Quantification of methanogens by fluorescence in situ hybridization with oligonucleotide probe. *Appl. Microbiol. Biotech.* 73: 696-702.
- STAMS A.J.M., OUDE-ELFERINK S.J.W.H., WESTERMANN P. (2003):** Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria. *Adv. Biochem. Eng./Biotechn.* 81: 31-93.
- TAGAWA T., SYUTSUBO K., SEKIGUCHI Y., OHASHI A., HARADA H. (2000):** Quantification of methanogen cell density in anaerobic granular sludge consortia by fluorescence in-situ hybridization. *Water Sci. Tech.* 42: 77-82.
- TAY T.L.S., IVANOV V., KIM I.S., FENG L., TAY J.H. (2001):** Quantification of ratios of Bacteria and Archaea in methanogenic microbial community by fluorescence in situ hybridization and fluorescence spectrometry. *World J. Microbiol. Biotechn.* 17: 583-589.
- TIWARI M.K., GUHA S., HARENDRANATH C.S. (2004):** Enhanced granulation in UASB reactor treating low-strength wastewater by natural polymers. *Water Sci. Tech.* 50: 235-240.
- TÖLLE R., MUMME J., LINKE B. (2006):** Verfahren zum Regeln eines Gehalts an mikrobieller Biomasse in einem oder mehreren Reaktoren einer Biogasanlage und Vorrichtung zum Erzeugen von Biogas. Patentschrift, Anmeldenummer DE 10 2005 024 886 B3.

- VEIGA M.C., JAIN M.K., WU W.M., HOLLINGSWORTH R.I., ZEIKUS J.G. (1997):** Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 403-407.
- WANG Y., SHOW K.Y., TAY J.H., SIM K.H. (2004):** Effects of cationic polymer on start up and granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *J. Chem. Tech. Biotech.* 79: 219-228.
- WEILAND P. (1987):** Development of anaerobic filters for treatment of high strength agro-industrial wastewaters. *Bioproc. Eng.* 2: 39-47.
- WU J.H., LIU W.T., TSENG I.C., CHENG S.S. (2001):** Characterization of microbial consortia in a telephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiol.* 147: 373-382.
- WU W.M., THIELE J.H., JAIN M.K., PANKRATZ H.S., HICKEY R.F., ZEIKUS J.G. (1993):** Comparison of rod-type versus filament-type methanogenic granules - microbial-population and reactor performance. *Appl. Microbiol. Biotechn.* 39: 795-803.
- YU Y., LEE C., HWANG S. (2005 a):** Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Sci. Techn.* 52: 85-91.
- YU Y., LEE C., KIM J., HWANG S. (2005 b):** Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechn. Bioeng.* 89: 670-679.
- ZHENG D., ANGENENT L.T., RASKIN L. (2006):** Monitoring granule formation in anaerobic upflow bioreactors using oligonucleotide hybridization probes. *Biotechn. Bioeng.* 94: 458-472.
- ZHOU Z., PONS M.N., RASKIN L., ZILLES J.L. (2007):** Automated image analysis for quantitative fluorescence in situ hybridization with environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2956-2962.
- ZHU J.R., HU J.C., GU X.S. (1997):** The bacterial numeration and an observation of a new syntrophic association for granular sludge. *Water Sci. Tech.* 36: 133-140.
- ZWIRGLMAIER K. (2005):** Fluorescence in situ hybridisation (FISH) - the next generation. *FEMS Microbiol. Lett.* 246: 151-158.

Weitere Arbeiten werden in der Ergebnisdarstellung und -diskussion zitiert.

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Einarbeitung des Projektbearbeiters erfolgte in Zusammenarbeit mit LEICA MICROSYSTEMS, Mannheim. Zusätzlich erfolgte eine Teilnahme 5th Advanced Biofilm Course (11.-16.10.10) an dem HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR UMWELTFORSCHUNG (UFZ), Department Fließgewässerökologie, Magdeburg.

Die Metagenomanalysen wurden in enger Zusammenarbeit mit der UNIVERSITÄT BIELEFELD, CENTRUM FÜR BIOTECHNOLOGIE (CeBiTec), Institut für Genomforschung und Systembiologie, Genomforschung Industrieller Mikroorganismen (Dr. Andreas Schlüter, Dr. Alexander Sczyrba, Prof. Dr. Alfred Pühler) und der IIT GmbH, Geschäftsbereich BioTech, Bielefeld, durchgeführt.

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Firma GICON - GROßMANN INGENIEUR CONSULT -BIOENERGIE GmbH konnte am Standort der Firma in Cottbus ein großtechnischer Experimentalreaktor beprobt werden.

II Ergebnisse

II.1 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

Um eine einheitliche und übersichtliche Darstellung der erzielten Ergebnisse mit der Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele zu gewährleisten, wurden die erzielten Ergebnisse den geplanten Meilensteinen zugeordnet. Folgende technisch-analytische Meilensteine sollten während des Vorhabens umgesetzt werden:

- (1) Aufbau und Betrieb von Biogasreaktoren im Labormodell,
- (2) Etablierung der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie zur FISH Analytik von Biofilmen,
- (3) Erfassung der mikrobiellen Diversität in Biofilmen,
- (4) Entwicklung von neuen Oligonukleotidsonden zur mikroskopischen Analyse von Biofilmen,
- (5) Materialstudien zur Entwicklung von neuen Füllkörpern,
- (6) Betrieb von optimierten Reaktorsystemen.

II.1.1 Aufbau und Betrieb von Biogasreaktoren im Labormodell

Als Grundlage für alle Versuche sollten zwei verschiedene Reaktorsysteme genutzt werden. Das einstufige Verfahren sollte mit Hilfe eines klassischen vollständig durchmischten Rührkesselfermenters (*completely stirred tank reactor*, Abk. CSTR) untersucht werden (**Abbildung 1A**). Hierzu wurden zunächst vier Rührkesselreaktoren mit einem Nutzvolumen von 11 Litern bei einem Arbeitsvolumen von 8 Litern konstruiert, aufgebaut und auf ihre Dichtigkeit überprüft. Anschließend wurden alle CSTR-Systeme in Betrieb genommen und unter kontinuierlicher Beschickung auf eine Raumbelastung (B_R) von $3,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ eingestellt. Der Abbau des eingesetzten Substrates (Rindergülle und Schweinegülle in Kovergärung mit Maissilage, MV_{oTS} [Mischungsverhältnis der Substrate bezogen auf die organische Trockensubstanz] = 45:45:10) fand unter mesophilem (37°C , CSTR-M1 und CSTR-M2) und thermophilem (55°C , CSTR-T1 und CSTR-T2) Temperaturregime mit jeweils zwei biologischen Replikaten (*i.e.* zwei CSTR je Temperaturregime) statt.

Als zweistufiges Verfahren wurde ein Bioleaching-System verwendet, welches aus einem Aufstromfeststoffreaktor (AFR) und einem Festbettreaktor (FBR) besteht. Das Nutzvolumen des AFR betrug 29 Liter (inkl. Kopfraum) bei einem Arbeitsvolumen von 27 Litern. Das Nutzvolumen des FBR lag bei 23 Litern mit 22 Litern Arbeitsvolumen. Insgesamt wurden zwei Bioleaching-Systeme aufgebaut, wobei eines unter mesophilen (AFR-M, FBR-M) und eines unter thermophilen Temperaturbedingungen (AFR-T, FBR-T) betrieben wurde. Als Substrate für die Biomethanisierung wurden Maissilage und Stroh ($MV_{\text{oTS}} = 95:5$) verwendet. Die Inbetriebnahme erfolgte mittels kontinuierlicher Belastungssteigerung auf $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

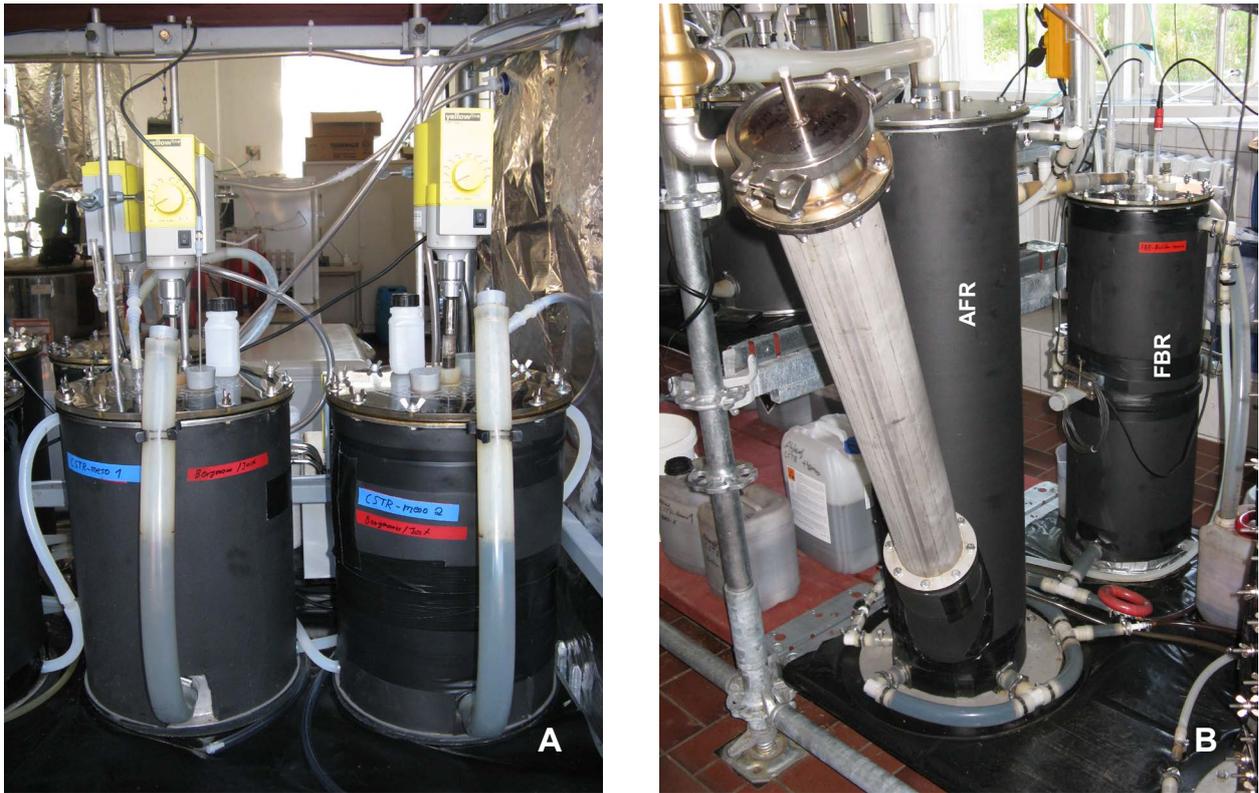


Abbildung 1: Versuchsstände zur einstufigen (A) und zweistufigen (B) Vergärung. Zur einstufigen Vergärung werden klassische Rührkesselfermenter (CSTR) verwendet. Das zweistufige Verfahren besteht aus einem Aufstromfeststoffreaktor (AFR) und einem Festbettreaktor (FBR).

CSTR-System: Effekt einer schrittweisen Erhöhung der Raumbelastung

Unter **mesophilen Temperaturbedingungen** konnte bei der Erhöhung der Raumbelastung (B_R) eine kontinuierliche Steigerung der Biogas- und Methanbildung beobachtet werden. So konnten Werte für die Biogasbildung von $1,5 - 1,7 \text{ l d}^{-1}$ ($B_R = 0,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) bis zu $6,3 - 6,4 \text{ l d}^{-1}$ ($B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) erreicht werden (**Abbildung 2A**). Diese Biogasbildung entspricht den durchschnittlichen Biogasbildungsraten des Kuratoriums für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft [KTBL 2010], was auf einen nahezu ungestörten Biogasbildungsprozess hindeutet (z.B. $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $\text{Biogasbildung}_{(\text{Versuch})} = 6,41 \text{ l d}^{-1}$, $\text{Biogasbildung}_{(\text{KTBL})} = 6,97 \text{ l d}^{-1}$).

Die Biogas- und Methanausbeuten nahmen mit steigender Raumbelastung ab (**Abbildung 2B**). Dieses ist zum einen auf die bei höheren B_R geringeren Verweilzeiten (*hydraulic retention time*, HRT) zurückzuführen ($B_R = 0,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, HRT = 67 d; $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, HRT = 29 d). Des Weiteren wurde durch den erhöhten Volumenausstrag bei Einstellung des definierten Reaktorinhalts mikrobielle Biomasse aus dem System entfernt, welche jedoch eine entscheidende Rolle bei dem Substratabbau und der Biomethanisierung spielt. Vor allem Methanbildner zeichnen sich durch langsame Wachstumsraten aus (Verdopplungszeit *Methanosarcina* sp. = 9 - 24 h, *Methanosaeta* sp. = 24 - 70 h), welches bei fortlaufendem Austrag mit dem Gärsubstrat zu einer sukzessiven Abnahme dieser Mikroorganismen im System führen kann [GARRITY & HOLT 2001].

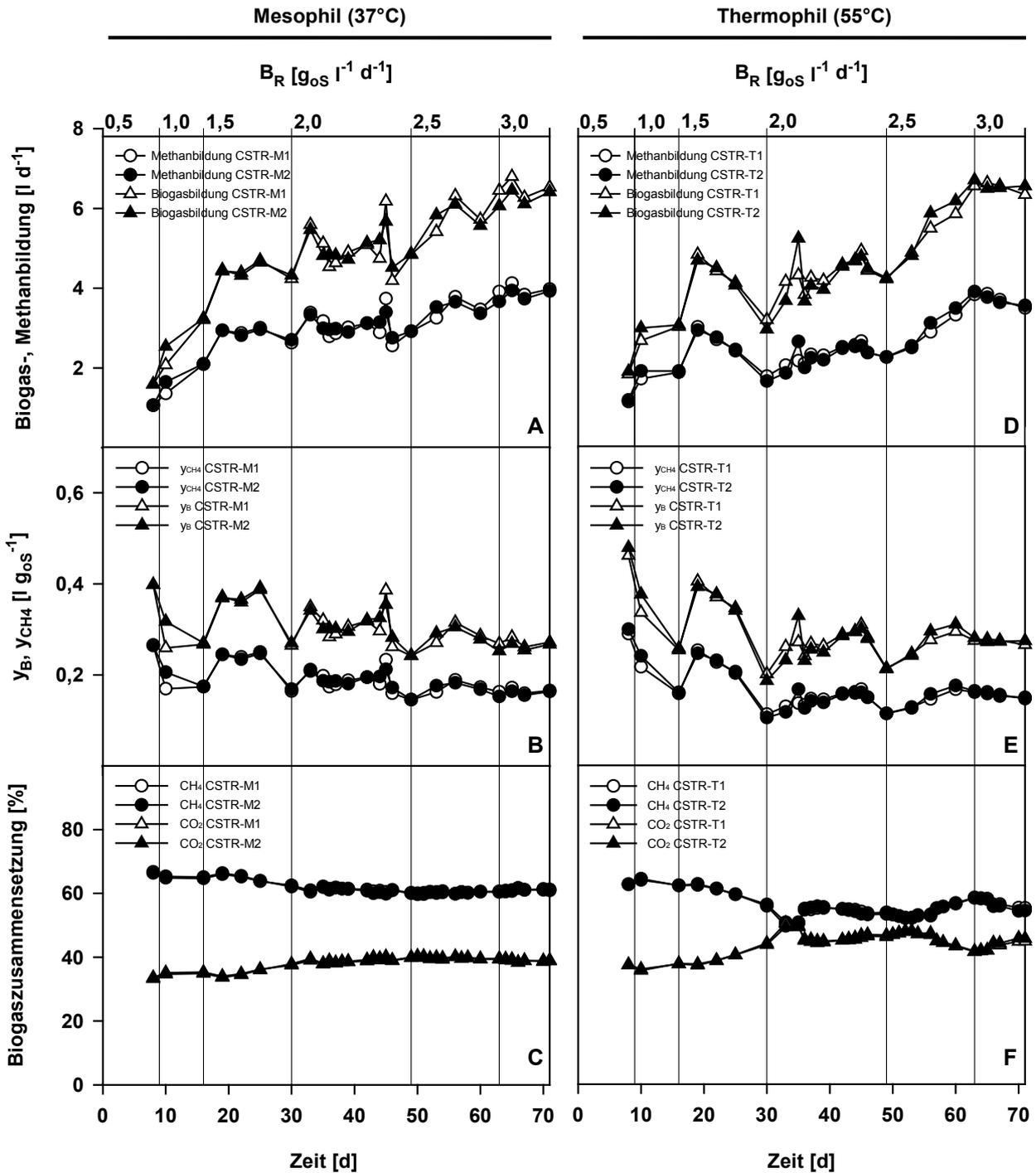


Abbildung 2: Biogasausbildung, -ausbeute (y_B) und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute (y_{CH_4}) in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R) im einstufigen CSTR-System. Die vertikalen Linienverläufe geben die Zeitpunkte einer Raumbelastungssteigerung von $B_R = 0,5 \text{ g}_{OS} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ an. (A, D) Biogas- und Methanbildung, (B, E) Biogas- und Methanausbeute sowie (C, F) Biogaszusammensetzung unter mesophilen (CSTR-M1, CSTR-M2) und thermophilen (CSTR-T1, CSTR-T2) Bedingungen. CH_4 = Methan, CO_2 = Kohlenstoffdioxid.

Durch die verminderte Anzahl an methanbildenden Mikroorganismen kann es grundsätzlich zu einer Reduzierung der Biogas- und vor allem der Methanausbeute kommen. Diese Annahme wird durch die ermittelten Werte der Biogaszusammensetzung gestützt. Bei Raumbelastungsraten von $B_R = 0,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ bis zu $B_R = 1,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ lagen im Biogas Methangehalte von 62 - 64% vor (**Abbildung 2C**). Ab einer Raumbelastung von $B_R = 2,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ reduzierten sich die Methangehalte auf 60%. Im Vergleich zu den von der KTBL angegebenen durchschnittlichen Methangehalten von Biogas konnten jedoch deutlich höhere Methangehalte erzielt werden ($\text{CH}_4 \text{ (Versuch)} = 60 - 64\%$; $\text{CH}_4 \text{ (KTBL)} = 57\%$) [KTBL 2010].

Wichtige Kenngrößen zur Einschätzung des Reaktorzustandes sind die Trockensubstanzbestimmung, die Aufnahme des Spektrum an kurzkettigen Carbonsäuren (*volatile fatty acids*, VFA) und die Ermittlung des Stickstoffgehaltes. Während der Belastungssteigerung konnte eine kontinuierliche Zunahme der Trockensubstanz (TS) und des Gehaltes an organischer Trockensubstanz (oT_{SFM}) beobachtet werden (**Abbildung 3A**).

Das Säurespektrum blieb über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant (**Abbildung 3B**), wohingegen eine deutliche Zunahme des Gehaltes an Gesamtstickstoff (N_{ges}) und Ammoniumstickstoff ($\text{NH}_4\text{-N}$) zu beobachten war ($B_R = 0,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $N_{\text{ges}} = 1,1 - 1,2 \text{ g l}^{-1}$, $\text{NH}_4\text{-N} = 0,8 \text{ g l}^{-1}$; $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $N_{\text{ges}} = 4,4 - 4,5 \text{ g l}^{-1}$, $\text{NH}_4\text{-N} = 3,1 - 3,2 \text{ g l}^{-1}$) (**Abbildung 3C**). Der Anteil an Ammoniakstickstoff ($\text{NH}_3\text{-N}$) im Reaktorsystem hat einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung der methanogenen Lebensgemeinschaft. *Methanosaeta* sp. toleriert nur geringe Konzentrationen an Ammoniakstickstoff ($\text{NH}_3\text{-N} \leq 1,1 \text{ g l}^{-1}$), wohingegen Vertreter der Methanosarcinaceae höhere Ammoniakstickstoffgehalte tolerieren ($\text{NH}_3\text{-N} = 2,5 - 8,0 \text{ g l}^{-1}$) [ANGELIDAKI & AHRING 1993, GALLERT & WINTER 1997, DE VRIEZE *et al.* 2012].

Neben den zur Einschätzung auf ein stabiles Reaktorsystem aufgenommenen physikalischen und chemischen Parametern wurden die Anwesenheit und die Entwicklung der verschiedenen Gruppen von methanogenen Archaea (Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanosarcinaceae, Methanosaetaceae) mit Hilfe eines quantitativen PCR-Assays (Q-PCR) überprüft. Ebenfalls wurde auf diese Weise das relative Verhältnis von Archaea zu Bacteria ermittelt [YU *et al.* 2005, BERGMANN *et al.* 2010].

Unter mesophilen Temperaturbedingungen konnte sich eine methanogene Lebensgemeinschaft entwickeln, in welcher alle Gruppen von Methanbildnern vertreten waren, wobei die acetatverwertenden Methanosaetaceae die vorherrschende Gruppe stellten (**Abbildung 4A**). Der Anteil an Ammoniakstickstoff ist offensichtlich noch im Toleranzbereich der Methanosaetaceae, da sich diese weiterhin im Reaktorsystem etablieren konnten.

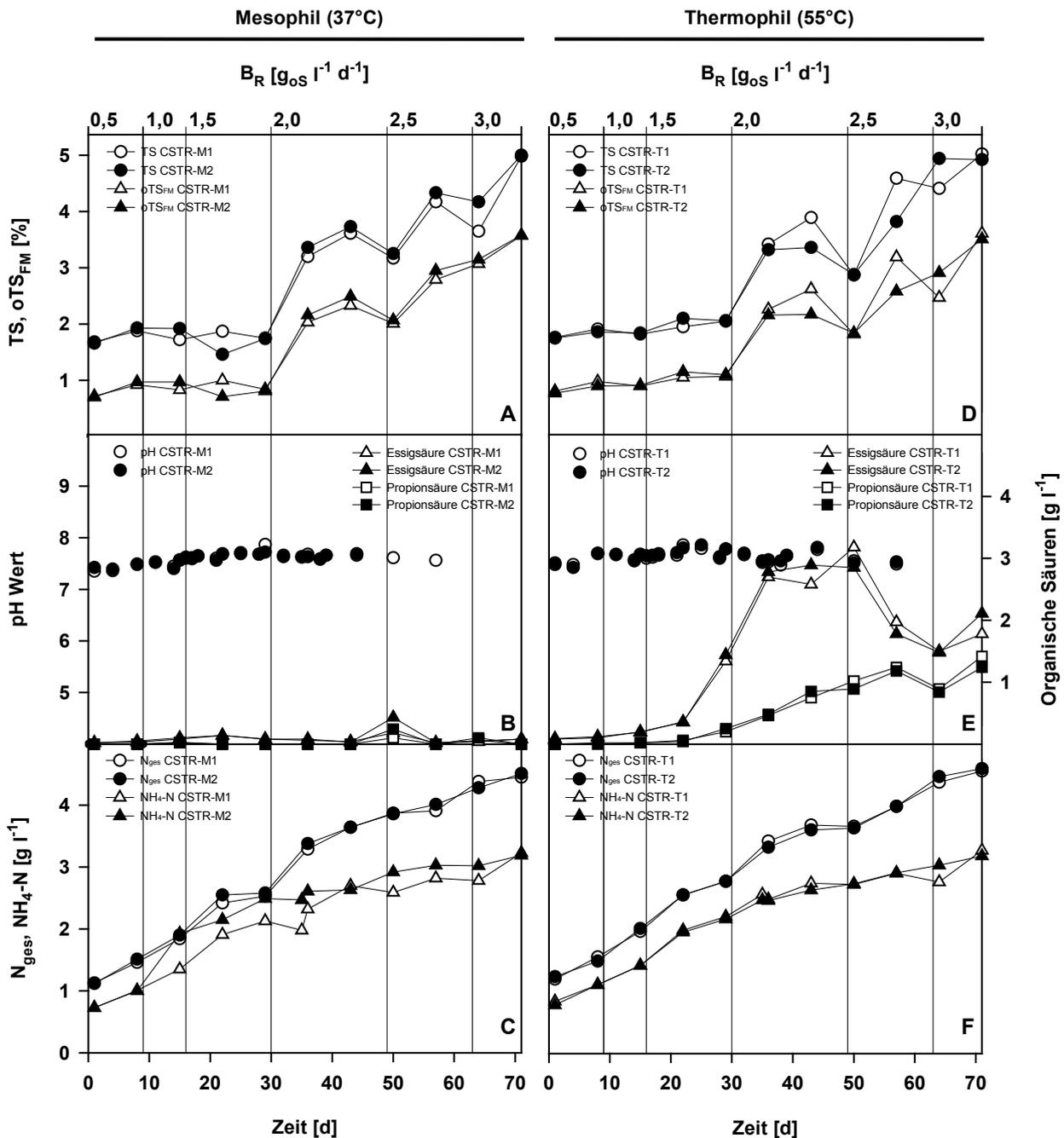


Abbildung 3: Physikalische und chemische Parameter in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R) im einstufigen CSTR-System. Die vertikalen Linienverläufe geben die Zeitpunkte einer Raumbelastungssteigerung von $B_R = 0,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ an. (A, D) Gehalt an Trockensubstanz (TS) und organischer Trockensubstanz (oTS_{FM}), (B, E) pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen sowie (C, F) Gehalte an Gesamtstickstoff (N_{ges}) und Ammoniumstickstoff ($\text{NH}_4\text{-N}$) unter mesophilen (CSTR-M1, CSTR-M2) und thermophilen (CSTR-T1, CSTR-T2) Bedingungen.

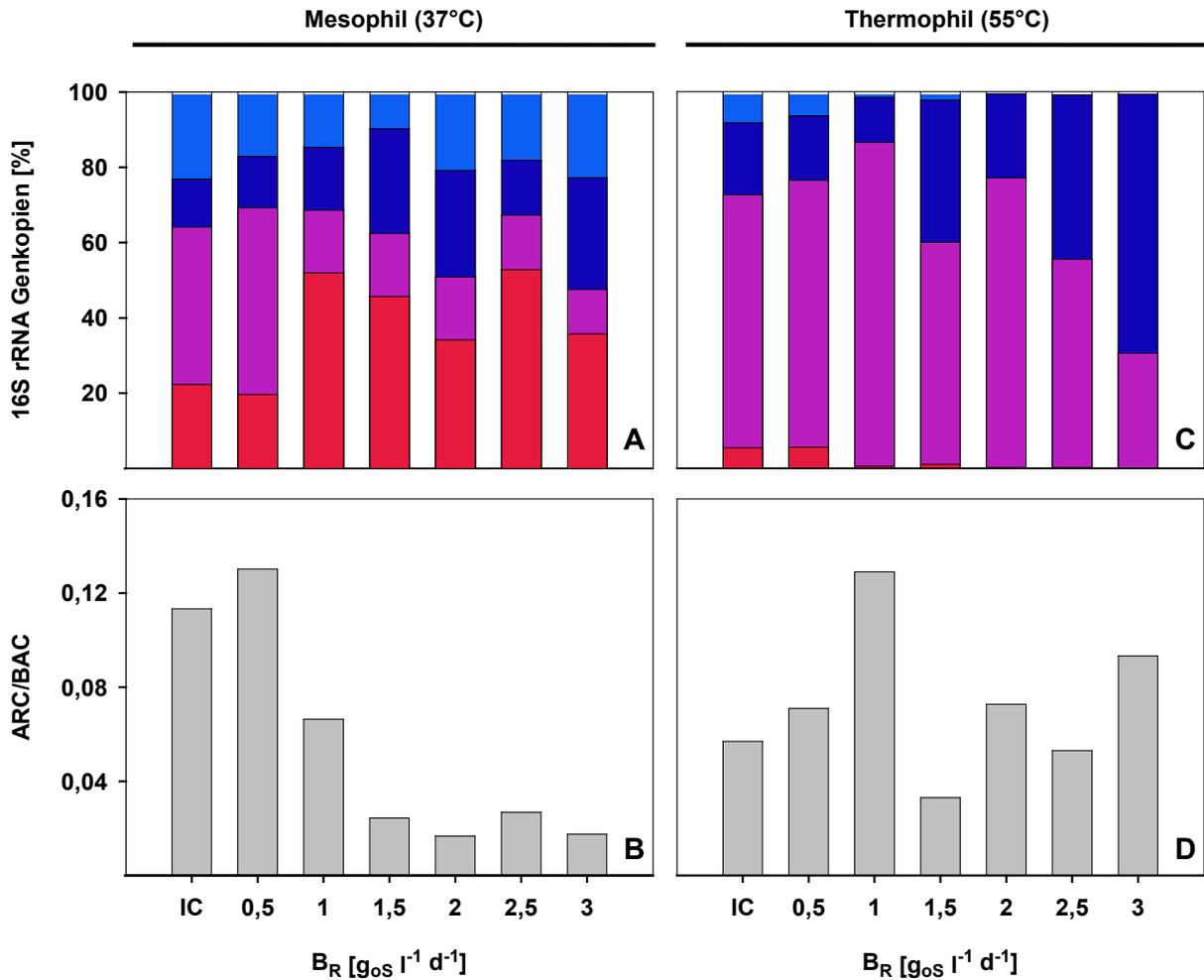


Abbildung 4: (A, C) Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung innerhalb der methanogenen Archaea-Gemeinschaft im CSTR-System ermittelt auf Basis der detektierten Kopienzahl des 16S rRNA Gens in einem Nanogramm genomischer DNA unter (A) mesophilen und (C) thermophilen Bedingungen in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R). Folgende taxonomische Gruppen wurden untersucht: Methanosaetaceae (rot), Methanosarcinaceae (violett), Methanobacteriales (dunkelblau), Methanomicrobiales (blau) und Methanococcales (nicht dargestellt, da nicht nachgewiesen). Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (*i.e.* technische Replikate). (B, D) Verhältnis Archaea zu Bacteria (ARC/BAC) anhand der detektierten Kopienzahl für das 16S rRNA Gen in einem Nanogramm genomischer DNA unter (B) mesophilen und (D) thermophilen Bedingungen in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R). IC = Inoculum. Für die Ermittlung des ARC/BAC Verhältnisses wurde jede DNA-Probe in jeweils drei Parallelen gemessen (*i.e.* technische Replikate).

Das Verhältnis von Archaea zu Bacteria nahm mit steigender Raumbelastung ab ($B_R = 0,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: ARC/BAC = 0,14; $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: ARC/BAC = 0,02), welches die Annahme einer kontinuierlichen Abnahme der Methanogenen durch einen erhöhten Volumenausstrom aus dem System bestätigt (**Abbildung 4B**).

Neben der Erfassung des VFA-Spektrums und des Stickstoffgehalts ist die Verfügbarkeit von Spurenelementen ein weiteres wichtiges Kriterium, welches über das Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein von bestimmten Mikroorganismen entscheidet. Um einen Spurenelementmangel im System zu vermeiden, wurde der Reaktorflüssigkeit kontinuierlich eine Spurenelementlösung hinzugefügt [ABDOUN & WEILAND 2009]. Während des gesamten Versuchszeitraumes kam es zu einer Anreicherung aller Spurenelemente, welches auf eine optimale Versorgung der Mikroorganismen im Reaktorsystem schließen lässt (**Tabelle 1**). Beide Versuchsreaktoren mit gleichen Beschickungsraten und gleichem Temperaturregime verhielten sich im Biogasbildungsverhalten nahezu identisch, so dass beide für die nachfolgenden Versuchsabläufe genutzt werden konnten.

Tabelle 1: Spurenelemente in der Prozessflüssigkeit im CSTR-System bei einer schrittweisen Erhöhung der Raumbelastung.

| Reaktor | Zeit [d] | B_R [$\text{g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$] | Cd | Cr | Cu | Zn | Ni | B | Mn | Fe | Pb | Co |
|---------|-------------|---|-------|------|-------|-------|------|------|-------|--------|-------|-------|
| | | | | | | | | | | | | |
| CSTR-M1 | 2 | 0,5 | 5,80 | 0,46 | 3,05 | 4,86 | 0,90 | 1,32 | 3,81 | 35,55 | <0,01 | <0,01 |
| | 71 | 3 | 28,30 | 2,03 | 16,54 | 63,54 | 1,52 | 6,96 | 69,04 | 140,48 | 0,20 | 0,54 |
| CSTR-M2 | 2 | 0,5 | 8,24 | 0,42 | 3,10 | 4,90 | 0,71 | 1,37 | 3,86 | 36,73 | <0,01 | <0,01 |
| | 71 | 3 | 29,50 | 1,88 | 15,14 | 58,06 | 1,29 | 6,37 | 62,52 | 194,39 | 0,19 | 0,49 |
| CSTR-T1 | 2 | 0,5 | 7,32 | 0,37 | 3,52 | 5,61 | 0,73 | 1,38 | 4,36 | 40,24 | <0,01 | <0,01 |
| | 71 | 3 | 28,50 | 1,61 | 15,09 | 59,00 | 1,21 | 6,49 | 60,44 | 172,17 | 0,20 | 0,49 |
| CSTR-T2 | 2 | 0,5 | 7,61 | 0,41 | 3,59 | 5,79 | 0,74 | 1,39 | 4,39 | 41,17 | <0,01 | <0,01 |
| | 71 | 3 | 20,50 | 1,58 | 13,34 | 55,19 | 1,12 | 8,30 | 54,39 | 63,38 | 0,14 | 0,44 |

Auch unter **thermophilen Temperaturbedingungen** konnte ein kontinuierlicher Anstieg der Biogas- und Methanbildung beobachtet werden ($B_R = 0,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: Biogasbildung = $1,7 - 1,8 \text{ l d}^{-1}$, Methanbildung = $1,4 - 1,5 \text{ l d}^{-1}$; $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: Biogasbildung = $6,1 - 6,8 \text{ l d}^{-1}$, Methanbildung = $3,7 - 3,8 \text{ l d}^{-1}$) (**Abbildung 2D**). Allerdings konnte unter den gewählten Prozessbedingungen eine größere Instabilität dieses Systems festgestellt werden. Bereits bei einer Raumbelastung von $B_R = 1,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ kam es zu einer deutlichen Abnahme der Biogas- und Methanbildung, und der Methanertrag nahm von 60% auf 50% ab (**Abbildung 2F**). Die drastische Abnahme der Methanbildung und des Methanertrages ging mit einem deutlichen Anstieg der Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen einher (**Abbildung 3E**).

Um eine Übersäuerung des Reaktorsystems zu vermeiden, wurde von einer dauerhaften Durchmischung des Reaktorsystems (100 rpm) abgesehen. Stattdessen wurde das Reaktorvolumen in konstant gehaltenen Zeitintervallen durchmischt (alle 2 h für 10 min

bei 100 rpm). Um eine Vergleichbarkeit der gewählten Reaktorbedingungen zu gewährleisten, wurden auch die Reaktorsysteme unter mesophiler Temperaturführung auf eine Intervalldurchmischung umgestellt.

Nach dem Umstellen der Reaktorsysteme auf eine gelegentliche Intervalldurchmischung konnte eine deutliche Biogas- und Methanbildungssteigerung beobachtet werden, und es konnten zudem deutlich höhere Methanerträge von bis zu 57% verzeichnet werden (**Abbildung 2D, 2F**).

Am Biogasbildungsprozess sind eine Vielzahl von Mikroorganismen in Form einer syntrophen Lebensgemeinschaft aus fermentativen, sowohl acidogenen als auch acetogenen, Bacteria und methanogenen Archaea beteiligt [ZHU *et al.* 1997, SCHNÜRER *et al.* 1999, LEVEN *et al.* 2007]. Biofilme, Granules und organische Substratpartikel sind geeignete Strukturen um die Entstehung einer stabilen syntrophen Lebensgemeinschaft zu fördern. Eine kontinuierliche, dauerhafte Durchmischung des Reaktorvolumens erschwert anscheinend die Bildung dieser Strukturen und wirkt somit einer optimalen Entwicklung einer syntrophen Lebensgemeinschaft entgegen.

Die neugewählten Reaktorbedingungen bewirkten allerdings nur bedingt die Abnahme des Anteils von organischen Säuren. Für die Essigsäurekonzentration konnte ein Rückgang von $3,2 \text{ g l}^{-1}$ auf $2,0 \text{ g l}^{-1}$ erzielt werden. Die Propionsäurekonzentration blieb allerdings konstant bei Werten zwischen $1,1$ und $1,3 \text{ g l}^{-1}$. Dadurch stieg das Verhältnis von Propionsäure zu Essigsäure im Reaktorsystem an. Dieses Verhältnis ist ein oft genutztes Maß, um den Stabilitätszustand eines Biogasreaktors einschätzen zu können [NIELSEN *et al.* 2007, BLUME *et al.* 2010]. Je höher dieses Verhältnis ausfällt, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit eines gestörten Biogasbildungsprozesses.

Da stabile Reaktorsysteme für den weiteren Projektverlauf von entscheidender Bedeutung waren, wurde sich dazu entschlossen alle folgenden Versuchsabläufe in den thermophilen Reaktorsystemen bei einer konstanten Raumbelastung von $B_R = 2,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ durchzuführen.

Die Zusammensetzung der methanogenen Lebensgemeinschaft in den thermophilen Reaktorsystemen zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zu den mesophilen Systemen (**Abbildung 4**). Die Gruppe der Methanosaetaceae wurde bereits ab einer Raumbelastung von $B_R = 1,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ vollständig verdrängt (**Abbildung 4C**). Dieses kann zum einen auf die erhöhten Säurekonzentrationen und zum anderen auf den deutlichen Anstieg des Ammoniakstickstoffs zurückgeführt werden. Für Vertreter der Methanosaetaceae ist bekannt, dass nur geringe Essigsäuremolaritäten von $7 - 70 \mu\text{M}$ benötigt werden, um eine effektive acetoklastische Methanoogenese durchführen zu können [CONRAD 1999]. Höhere Essigsäurekonzentrationen führen zur Herabsenkung bis zur vollständigen Einstellung des Substratumsatzes [STAMS *et al.* 2003, KARAKASHEV *et al.* 2006].

Zudem ist für thermophile Reaktorsysteme bekannt, dass die methanogene Lebensgemeinschaft vornehmlich von Vertretern der Methanosarcinaceae und der Methanobacteriales dominiert werden [HORI *et al.* 2006, RADEMACHER *et al.* 2012a]. Dieses konnte

auch in den im Projekt betriebenen thermophilen Biogasreaktoren nachgewiesen werden. Mit steigender Raumbelastung wurde eine deutliche Zunahme der Methanobacteriales beobachtet, welche bei einer Raumbelastung von $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nahezu 70% aller detektierten 16S rRNA Genkopien ausmachten (**Abbildung 4C**). Im Gegensatz zur mesophilen Betriebsweise konnte keine deutliche Änderung im Archaea zu Bacteria Verhältnis beobachtet werden (**Abbildung 4D**).

Die Verteilung der Spurenelemente war in den mesophil und thermophil betriebenen Reaktorsystemen nahezu identisch. Somit ist auch unter thermophiler Temperaturführung ein Mangel an Spurenelementen unwahrscheinlich. Beide unter thermophilen Reaktionsbedingungen betriebenen Reaktorsysteme reagierten auf die Erhöhung der Raumbelastung in vergleichbarer Weise, so dass auch diese für die weiteren Versuchsreihen zur Verfügung standen.

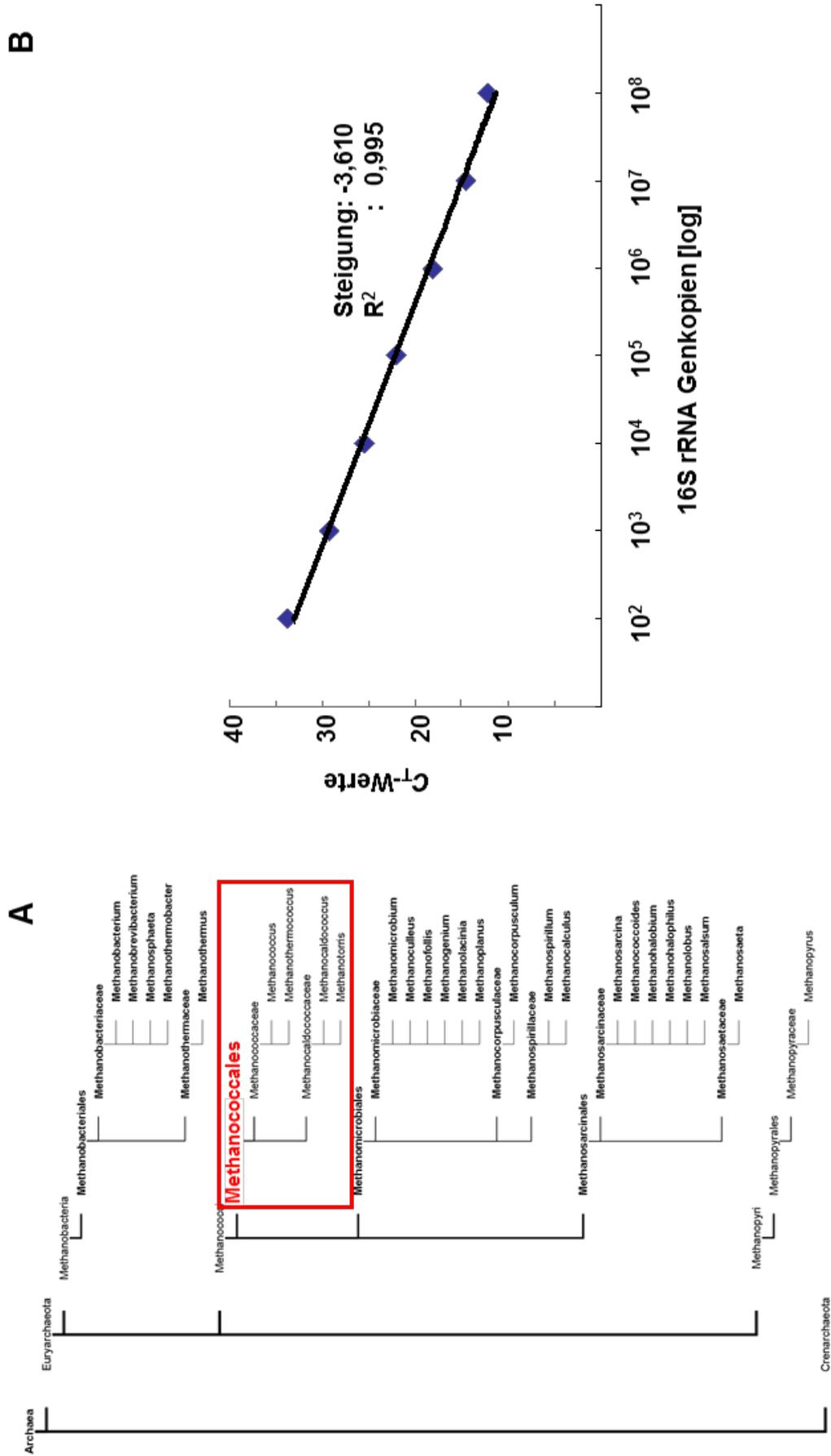
Exkurs Methodenetablierung: Etablierung eines spezifischen Q-PCR-Assays und Primersets zum Nachweis von Methanococcales

Um die Gesamtheit aller methanogenen Archaea zu erfassen, wurde das Primerset und Q-PCR-Assay zur Detektion der Methanococcales (MCC-Set), welches erstmals von Yu *et al.* [2005] beschrieben wurde, an die am ATB vorhandene Geräteplattform angepasst und optimiert (**Abbildung 5B**).

Ein linearer Verlauf der Standardkurve mit optimalen Standardkurvenparametern (Steigung = - 3,610, $R^2 = 0,995$) konnte mit folgendem PCR-Programm erreicht werden: (i) 2 min bei 50°C, (ii) 10 min bei 95°C und 45 Zyklen mit folgendem Temperatur- und Zeitregime (iii) 15 s bei 95°C, 30 s bei 54°C und 1 min bei 60°C.

Die erste Anwendung des optimierten MCC-Sets konnte mit der Analyse der Anwesenheit und Zusammensetzung der methanogenen Archaea während der Belastungssteigerung im CSTR-System verbunden werden. Es zeigte sich, dass sowohl unter meso- als auch unter thermophilen Temperaturbedingungen keine 16S rRNA Genkopien der Ordnung Methanococcales detektiert werden konnten.

Abbildung 5: Etablierung eines Q-PCR-Assays zur quantitativen Erfassung des 16S rRNA Genes der Ordnung Methanococcales. (A) Stammbaum der methanogenen Archaea. (B) Darstellung der Standardkurve und deren Bestimmtheitsmaß zur quantitativen Erfassung von Vertretern der Ordnung Methanococcales mit Hilfe des von Yu *et al.* [2005] entwickelten 5'-Nuclease-Assays MCC-Set. Jede DNA-Probe mit bekannter Kopienzahl wurde in jeweils drei parallelen gemessen, aus denen sich die in dem Graphen angegebene Standardabweichung ergibt.



Bioleaching-System: Effekt der schrittweisen Erhöhung der Raumbelastung

Unter **mesophilen Temperaturbedingungen** konnte auch im Bioleaching-System eine kontinuierliche Steigerung der Biogas- und Methanbildung mit zunehmender Raumbelastung beobachtet werden (**Abbildung 6A**). Der Hauptanteil des gebildeten Biogases entstand dabei im Aufstromfeststoffreaktor (83 - 86%).

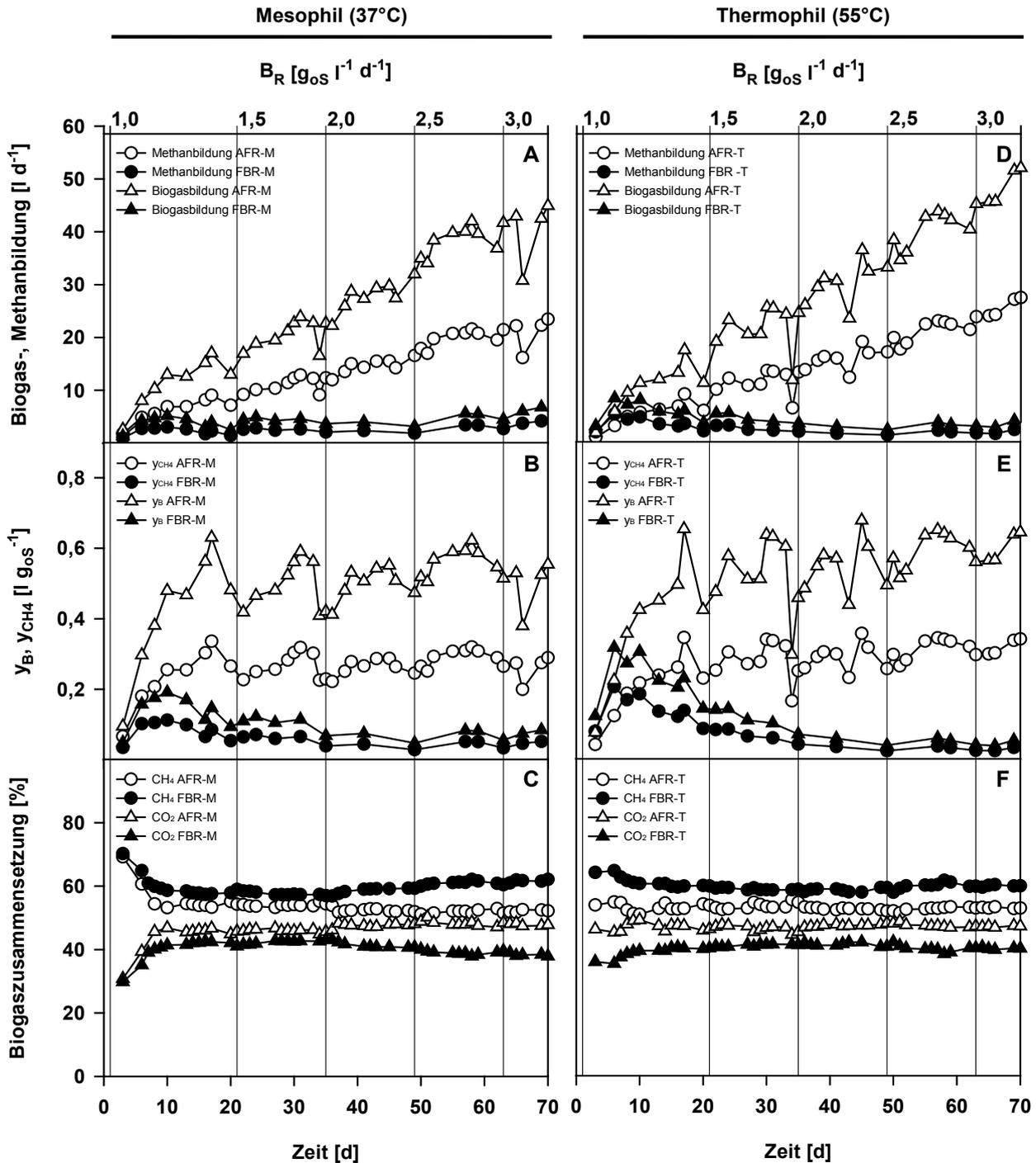


Abbildung 6: Biogasausbildung, -ausbeute (y_B) und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute (y_{CH_4}) im zweistufigen Bioleaching-System in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R). Die vertikalen Linienverläufe geben die Zeitpunkte einer Raumbelastungssteigerung von $B_R = 0,5 g_{OS} l^{-1} d^{-1}$ an. (A, D) Biogas- und Methanbildung, (B, E) Biogas- und Methan-Ausbeute sowie (C, F) Biogaszusammensetzung unter mesophilen (AFR-M, FBR-M) und thermophilen (AFR-T, FBR-T) Bedingungen. CH_4 = Methan, CO_2 = Kohlenstoffdioxid.

Im Gegensatz zum CSTR-System konnte im Bioleaching-System nur ein leichter Rückgang in der Methanausbeute bei steigenden Raumbelastungsraten verzeichnet werden ($B_R = 1,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $y_{\text{CH}_4} = 0,35 \text{ l g}_{\text{oS}}^{-1}$; $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $y_{\text{CH}_4} = 0,31 \text{ l g}_{\text{oS}}^{-1}$) (**Abbildung 6B**). Dieses kann darauf zurückgeführt werden, dass die Prozessflüssigkeit über den gesamten Versuchszeitraum weitestgehend ungestört und mit nur sehr geringen Austragsverlusten im Reaktorsystem zirkulieren konnte. Dadurch konnte sich die mikrobielle Lebensgemeinschaft kontinuierlich entwickeln und sich an die veränderten Reaktorbedingungen optimal anpassen. Zudem könnten längere Verweilzeiten der Substrate dazu geführt haben, dass die Methanausbeuten über den gesamten Versuchszeitraum nur geringfügig abgenommen haben. Eine genaue Berechnung der Verweilzeit konnte für das Bioleaching-System allerdings nicht erfolgen, da die Gärrestentnahmen diskontinuierlich erfolgten und das entnommene Gärrestvolumen variierte. Die diskontinuierliche Gärrestentnahme wiederum war notwendig, da sich mit steigender Raumbelastung der Substratpfropfen so stark verdichtete, dass es zur Entstehung eines Überdrucks im Aufstromfeststoffreaktor kam und der Prozessflüssigkeitsstrom im Reaktorsystem zum Erliegen kam. Durch das diskontinuierliche Auflockern des Substratpfropfens und einer Entnahme der obersten Substratschicht konnte eine kontinuierliche Betriebsweise des Reaktorsystems erreicht werden.

Für den Methanertrag in landwirtschaftlichen Biogasanlagen kann ein Richtwert von $y_{\text{CH}_4} = 0,31 \text{ l g}_{\text{oS}}^{-1}$ erzielt werden [KTBL 2010]. Somit konnten mit dem Bioleaching-System identische Methanerträge erreicht werden. Die gewünschte Methanertragssteigerung durch die Nachschaltung eines Festbettreaktors konnte nicht beobachtet werden [MUMME *et al.* 2010]. Allerdings konnte über den gesamten Versuchszeitraum eine Zunahme des Methananteils in der Biogaszusammensetzung im Festbettreaktor beobachtet werden ($B_R = 1,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $\text{CH}_4 = 58\%$; $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $\text{CH}_4 = 62\%$) (**Abbildung 6C**). Gleichzeitig nahm der Methananteil im Aufstromfeststoffreaktor mit steigender Raumbelastungsrate ab ($B_R = 1,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $\text{CH}_4 = 55\%$; $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $\text{CH}_4 = 52\%$) (**Abbildung 6C**).

Durch den erhöhten Substrateintrag kam es zu einer verstärkten Säurebildung im Reaktor, welche ein Absinken des pH-Wertes im Aufstromfeststoffreaktor bewirkte ($B_R = 1,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$; $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $\text{pH} = 6,8$) (**Abbildung 7B**). Es ist bekannt, dass viele Vertreter der Methanogenen sehr empfindlich auf Veränderungen im pH-Wert reagieren [GARRITY & HOLT 2001]. Somit könnten die im Festbettreaktor u.U. besseren Wachstumsbedingungen dazu geführt haben, dass mit steigender Raumbelastung eine höhere Methanogenese zu beobachten war. Zudem ist davon auszugehen, dass es mit zunehmender Reaktorlaufzeit zu einer mikrobiellen Biofilmbildung auf den Aufwuchsträgern im Festbettreaktor kam. Für acetatverwertende Methanogene konnte bereits ein verstärktes Auftreten auf Oberflächen nachgewiesen werden [KLOCKE *et al.* 2008, RADEMACHER *et al.* 2012a]. Durch die räumliche Nähe aller beteiligten am Biogasbildungsprozess Mikroorganismen in Biofilmen kann der Substratabbau effizienter erfolgen, was den Anteil an gebildetem Methan je Zeiteinheit erhöht.

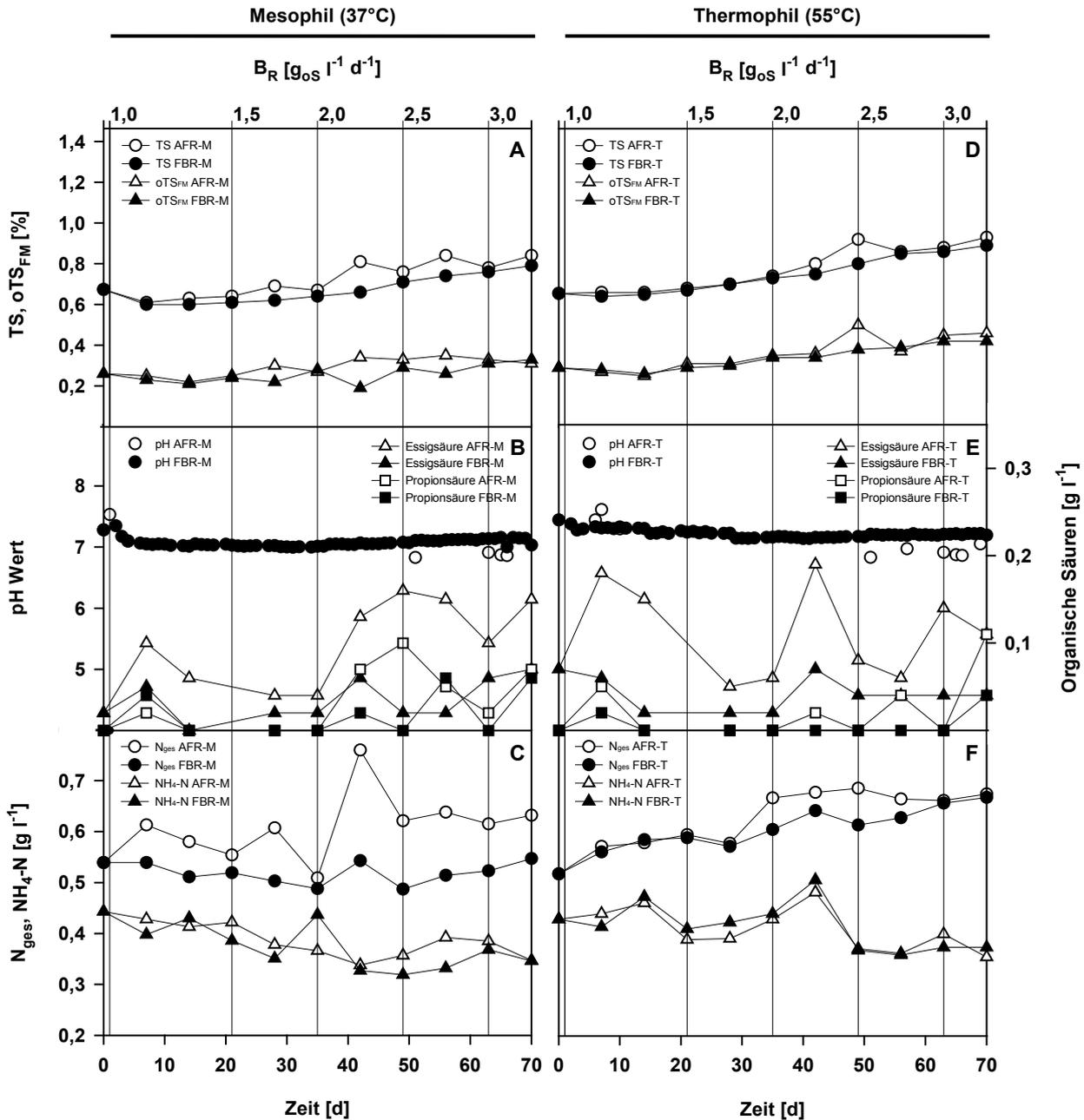


Abbildung 7: Physikalische und chemische Parameter im Biobleaching-System in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R). Die vertikalen Linienverläufe geben die Zeitpunkte einer Raumbelastungssteigerung um jeweils $0,5 g_{OS} l^{-1} d^{-1}$ an. (A, D) Gehalt an Trockensubstanz (TS) und organischer Trockensubstanz (oTS_{FM}), (B, E) pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen sowie (C, F) Gehalt an Gesamtstickstoff (N_{ges}) und Ammoniumstickstoff (NH_4-N) unter mesophilen (AFR-M, FBR-M) und thermophilen (AFR-T, FBR-T) Bedingungen.

Der Anteil an gebildeten organischen Säuren lag im Aufstromfeststoffreaktor durchschnittlich dreimal so hoch wie im nachgeschalteten Festbettreaktor (**Abbildung 7B**). Die erreichten Maximalwerte an organischen Säuren im Bioleaching-System waren mit denen im CSTR-System vergleichbar (vgl. **Abbildung 3B**, **Abbildung 7B**). Eine kontinuierliche Zunahme im Gesamtstickstoff- und Ammoniumstickstoffgehalt, wie sie im CSTR-System zu beobachten war, trat im zweistufigen Reaktorsystem nicht auf (**Abbildung 7C**).

Die Entwicklung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft verlief in beiden Reaktorkompartimenten nahezu identisch (**Abbildung 8A**, **8B**). Bis zu einer Raumbelastung von $B_R = 1,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nahm der Anteil an Methanosaetaceae kontinuierlich zu (Inoculum, 5% aller detektierten 16S rRNA Genkopien; $B_R = 1,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, 62% aller detektierten 16S rRNA Genkopien). Diese Entwicklung in der Zusammensetzung der methanogenen Lebensgemeinschaft konnte auch im CSTR-System beobachtet werden, wobei der prozentuale Anteil an detektierten 16S rRNA Genkopien deutlich niedriger ausfiel als im Bioleaching-System (vgl. **Abbildung 4A**). Eine entsprechende Dominanz an Methanosaetaceae wurde bereits für verschiedene mesophil betriebene Reaktorsysteme und Biogasanlagen nachgewiesen [NETTMANN *et al.* 2010, CHELLIAPAN *et al.* 2011, ZIGANSHIN *et al.* 2011].

Interessanterweise nahm der prozentuale Anteil an Methanomicrobiales ab einer Raumbelastung von $B_R = 2,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ deutlich zu (**Abbildung 8A**, **8B**). Eine mögliche Erklärung dafür könnte der zunehmende Säuregehalt im Aufstromfeststoffreaktor und das damit einhergehende leichte Absinken des pH-Wertes sein ($B_R = 1,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, pH = 7,4; $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, pH = 6,8). So werden viele Vertreter der Methanomicrobiales (z.B. *Methanoculleus bourgensis* DSM3045) im Kultivierungsmedium 332 angezogen, wobei pH-Werte zwischen 6,7 und 7,0 als optimal angesehen werden (DSMZ, Braunschweig). Im Gegensatz dazu werden die Methanosaetaceae bei sinkenden pH-Werten in ihrem Wachstum gehemmt (vgl. Kap. II.1.1.1). Das Kultivierungsmedium 334a, in welchem vornehmlich Vertreter der Methanosaetaceae (z.B. *Methanosaeta concilii* DSM2139) angezogen werden, besitzt optimale pH-Werte im Bereich zwischen 7,3 - 7,5. Diese pH-Werte konnten in den ersten Wochen der schrittweisen Erhöhung der Raumbelastung erreicht werden und somit zu einem geförderten Wachstum von Vertretern der Methanosaetaceae geführt haben. Interessanterweise fiel die Zunahme an Methanomicrobiales, trotz dauerhafter Zirkulation der Prozessflüssigkeit im Gesamtsystem, im nachgeschalteten Festbettreaktor niedriger aus als im Aufstromfeststoffreaktor. Durch den konstanten pH-Wert und die geringeren Säurekonzentrationen konnten sich hier die Vertreter der Methanosaetaceae weiterhin gegenüber den Vertretern der Methanomicrobiales durchsetzen.

Im Gegensatz zum CSTR-System konnte über den gesamten Versuchszeitraum eine kontinuierliche Steigerung des Archaea zu Bacteria Verhältnisses beobachtet werden (**Abbildung 8C**). Dieses kann auf den geringen Verlust an Prozessflüssigkeit aus dem Gesamtsystem zurückzuführen werden.

Auch im Bioleaching-System waren alle Spurenelemente über den gesamten Versuchszeitraum in ausreichenden Konzentrationen vertreten. Allerdings nahm der Anteil an verfügbaren Spurenelementen mit zunehmender Reaktorlaufzeit, im Gegensatz zum den CSTR-Systemen, deutlich ab, so dass bei einer mehrmonatigen Reaktorlaufzeit bei gleichbleibender Spurenelementdosierung ein Mangel nicht ausgeschlossen werden kann (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Spurenelementanalyse der Prozessflüssigkeit im Bioleaching-System bei einer schrittweisen Erhöhung der Raumbelastung.

| Reaktor | Zeit [d] | B_R [g _{OS} l ⁻¹ d ⁻¹] | Cd | Cr | Cu | Zn | [mg kg _{OS} ⁻¹] | | | | | |
|---------|-------------|---|-------|------|------|------|--------------------------------------|------|------|------|-------|-------|
| | | | | | | | Ni | B | Mn | Fe | Pb | Co |
| AFR-M | 8 | 1,0 | 1,01 | 0,05 | 0,40 | 0,89 | 0,15 | 0,57 | 0,66 | 5,10 | <0,01 | <0,01 |
| | 70 | 3,0 | <1,00 | 0,04 | 0,18 | 0,64 | 0,08 | 0,53 | 0,46 | 2,97 | 0,01 | 0,11 |
| FBR-M | 8 | 1,0 | 1,11 | 0,04 | 0,37 | 0,76 | 0,12 | 0,56 | 0,61 | 4,73 | <0,01 | <0,01 |
| | 70 | 3,0 | <1,00 | 0,02 | 0,15 | 0,51 | 0,06 | 0,51 | 0,40 | 2,38 | 0,01 | 0,10 |
| AFR-T | 8 | 1,0 | 1,64 | 0,05 | 0,65 | 1,44 | 0,16 | 0,61 | 0,63 | 6,39 | <0,01 | <0,01 |
| | 70 | 3,0 | <1,00 | 0,05 | 0,27 | 0,92 | 0,08 | 0,58 | 0,65 | 4,02 | 0,01 | 0,11 |
| FBR-T | 8 | 1,0 | 1,54 | 0,05 | 0,61 | 1,26 | 0,15 | 0,58 | 0,58 | 5,96 | <0,01 | <0,01 |
| | 70 | 3,0 | <1,00 | 0,02 | 0,20 | 0,68 | 0,07 | 0,56 | 0,54 | 3,26 | 0,01 | 0,11 |

Bei einer **thermophilen Temperatur** von 55°C konnten im Vergleich zur mesophilen Betriebsweise eine leicht erhöhte Methanbildung beobachtet werden (**Abbildung 6D**). Enzymatische Stoffwechselumsätze können bekanntermaßen durch höhere Temperaturen beschleunigt werden, wodurch ein höherer Substratumsatz je Zeiteinheit erfolgt. Zudem können Pflanzenfasern unter höheren Temperaturen besser aufquellen, so dass ein besserer enzymatischer Angriff erfolgen und das Fütterungssubstrat besser aufgeschlossen werden kann.

Durch den verbesserten Substratabbau konnten somit auch die Biogas- und Methan- ausbeuten grundsätzlich gesteigert werden (**Abbildung 6E**). Allerdings konnte unter thermophiler Temperaturführung auch ein leichtes Absinken der Methan- ausbeute mit zunehmender Raumbelastung beobachtet werden ($B_R = 1,0 \text{ g}_{OS} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $y_{CH_4} = 0,38 \text{ l g}_{OS}^{-1}$; $B_R = 3,0 \text{ g}_{OS} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $y_{CH_4} = 0,34 \text{ l g}_{OS}^{-1}$) (**Abbildung 6E**). Eine kontinuierliche Zunahme des Methangehaltes im Festbettreaktor mit steigender Raumbelastung konnte für das Bioleaching-System unter thermophiler Temperaturführung nicht nachgewiesen werden. Der Methangehalt variierte über den gesamten Versuchszeitraum nur geringfügig ($CH_4 = 59 - 61\%$) (**Abbildung 6F**). Der Hauptanteil des entstandenen Biogases (85 - 89%) wurde auch unter einem thermophilen Temperaturregime im Aufstromfeststoffreaktor gebildet (**Abbildung 6D, 6E**).

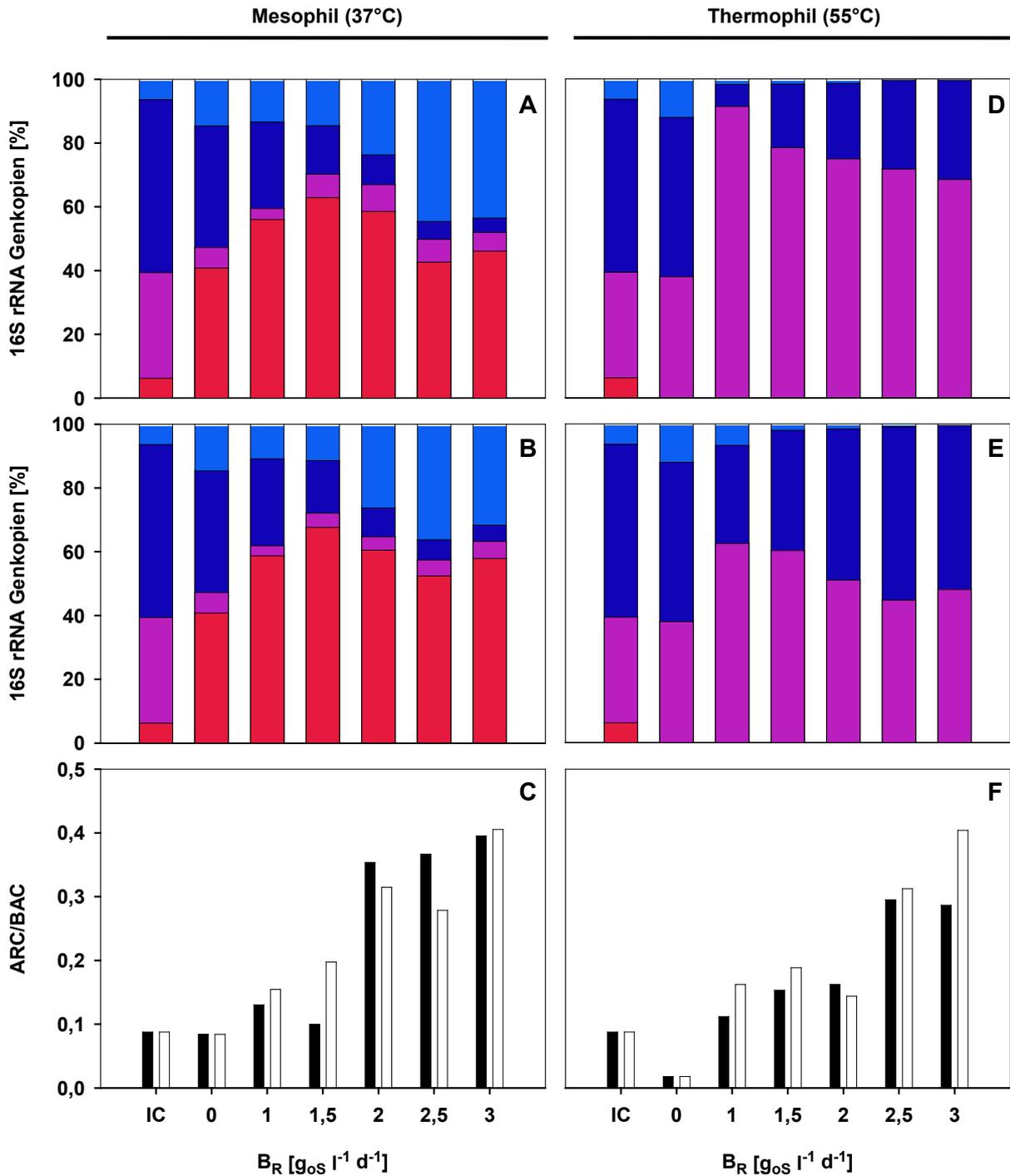


Abbildung 8: Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung innerhalb der methanogenen Archaea-Gemeinschaft im Bioleaching-System ermittelt auf Basis der detektierten Kopienzahl des 16S rRNA Gens in einem Nanogramm genomischer DNA im (A, D) Aufstromfeststoffreaktor und (B, E) Festbettreaktor unter (A, B) mesophilen und (D, E) thermophilen Bedingungen in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R). Folgende taxonomische Einheiten wurden untersucht: Methanosarcinaceae (rot), Methanosarcinaceae (violett), Methanobacteriales (dunkelblau), Methanomicrobiales (blau) und Methanococcales (nicht dargestellt, da nicht nachgewiesen). Jede DNA Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate). (C, F) Verhältnis Archaea zu Bacteria (ARC/BAC) anhand der detektierten Kopienzahl für das 16S rRNA Gen in einem Nanogramm genomischer DNA im Aufstromfeststoffreaktor (weiße Balken) und Festbettreaktor (schwarze Balken) unter (C) mesophilen und (F) thermophilen Bedingungen in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R). IC = Inoculum. Für die Ermittlung des ARC/BAC Verhältnisses wurde jede DNA-Probe in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate).

Im Gegensatz zum CSTR-System verlief der Biogasbildungsprozess mit steigender Raumbelastung stabil. Es konnte keine erhöhte Anreicherung an organischen Säuren festgestellt werden (**Abbildung 7E**). Allerdings sank der pH-Wert im Aufstromfeststoffreaktor mit zunehmender Raumbelastung deutlich ab, was vornehmlich auf eine reduzierte Pufferkapazität im System zurückzuführen ist ($B_R = 1,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, pH-Wert = 7,4; $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, pH-Wert = 6,7 l) (**Abbildung 7E**).

Für Vertreter der Methanosarcinaceae ist bekannt, dass sie auch bei niedrigen pH-Werten hohe Substratumsatzraten erreichen können [GARRITY & HOLT 2001]. Bereits bei einer Raumbelastung von $B_R = 1,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ setzte sich die methanogene Lebensgemeinschaft fast ausschließlich aus Vertretern dieser Familie im Aufstromfeststoffreaktor zusammen (**Abbildung 8D**). Im weiteren Betriebsverlauf nahm der Anteil an detektierten 16S rRNA Genkopien für die Methanosarcinaceae wieder leicht ab, wobei aber die Dominanz dieser Gruppe methanogener Archaea in diesem Reaktorkompartiment weiterhin gewahrt blieb.

Auch im Festbettreaktor konnten sich die Methanosarcinaceae mit zunehmender Raumbelastung im Reaktorsystem etablieren. Bei steigenden Raumbelastungsraten nahmen allerdings die Methanobacteriales ebenfalls zu, und zwar wesentlich deutlicher als im Aufstromreaktor, so dass diese Gruppe methanogener Archaeen bei $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ sogar häufiger als Methanosarcinaceae detektiert wurde (**Abbildung 8E**).

Methanosarcinaceae bilden häufig Zellkolonien auf Oberflächen [ARAUJO *et al.* 2000, FERNANDEZ *et al.* 2008]. Durch die Biofilmbildung auf den Aufwuchsträgern im Festbettreaktor ist eine bevorzugte Anreicherung der Methanosarcinaceae auf diesen Oberflächen vorstellbar. Da bei diesem Versuchsteil jedoch nur der Ablauf der Reaktoren, nicht aber der Biofilm beprobt wurde, ist es möglich, dass der Anteil an biofilmgebundenen Methanosarcinaceae nicht oder nur teilweise erfasst wurde.

Im thermophil betriebenen Reaktorsystem konnte mit zunehmender Reaktorlaufzeit eine Anreicherung von Archaea gegenüber Bacteria beobachtet werden (**Abbildung 8F**). Die möglichen Ursachen für diese Anreicherung wurden bereits bei der Betrachtung des Bioleaching-Systems unter mesophiler Temperaturführung ausführlich dargestellt und können auf das thermophil betriebene Reaktorsystem übertragen werden. Auch für die Spurenelementanalyse können die gleichen Aussagen getroffen werden wie unter mesophilen Temperaturbedingungen.

Beide, neu etablierten Bioleaching-Systeme zeigten einen stabilen Prozesszustand unabhängig von der Temperaturführungen. Weder hinsichtlich der physikalisch-chemischen Parameter noch hinsichtlich der Systemmikrobiologie wurden Auffälligkeiten beobachtet. Somit konnten beide Reaktorsysteme für weitergehende experimentelle Untersuchungen genutzt werden.

II.1.2 Etablierung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie zur FISH-Analytik von Biogasfilmen

Im Oktober 2010 erfolgten der Aufbau und die Inbetriebnahme eines konfokalen Laserscanningmikroskops der Fa. LEICA, Modell TCS SP5 II, sowie die Einrichtung eines entsprechenden Laborraumes. Die Finanzierung erfolgte aus zusätzlich eingeworbenen Drittmitteln.

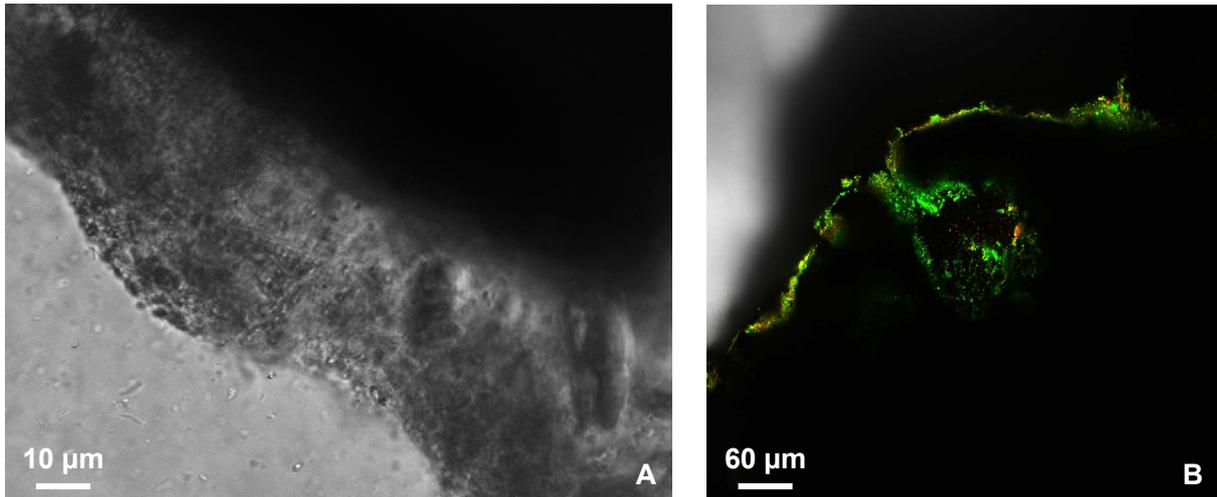


Abbildung 9: Konfokale Laserscanningmikroskopie von magnetischen Aufwuchsträgern. (A) Durchlichtmikroskopieaufnahme vom Biofilm eines magnetischen Aufwuchsträgers, welcher aus einem thermophilen Biogasreaktor nach 13 Wochen entnommen wurde. (B) Kombinierte Laserscanningmikroskopieaufnahme einer Durchlicht- und einer Fluoreszenzmikroskopieaufnahme vom Biofilm eines magnetischen Aufwuchsträgers, welcher aus einem mesophilen Biogasreaktor nach 12 Wochen entnommen wurde. Extrazelluläre, polymere Substanzen (Grünfärbung unter Verwendung des lectingebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Alexa488), mikrobielle Lebensgemeinschaft (Rotfärbung unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYTO60).

In den ersten Wochen fand eine Einarbeitung in das Gerät und deren Software statt. Zudem erfolgten verschiedene Schulungsmaßnahmen in Magdeburg und Mannheim, um eine schnelle und effektive Nutzung des Gerätes zu ermöglichen.

Um eine Biofilmentwicklung auf Aufwuchsträgern optisch nachverfolgen zu können, sollte ein Arbeitsprotokoll erstellt werden, welches eine Gesamtbetrachtung des Biofilmes über die Zeit zulässt. Eine nahezu unbeschädigte Strukturdarstellung des hydrierten Biofilmes konnte nur durch eine schonende Behandlung des Probenmaterials gewährleistet werden.

Zur Strukturaufklärung der hydrierten Biofilme wurde zunächst ein proteingelabelter Farbstoff (lectingebundenes Alexa488) verwendet, der sich an die Polysaccharide der EPS-Struktur eines Biofilms anlagert [STAUDT *et al.* 2004, GARNY *et al.* 2008]. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl der mikrobiellen Lebensgemeinschaft konnte ein Färbeprotokoll mit dem nukleinsäurebindenden SYTO60 etabliert werden. Durch die Doppelfärbung eines hydrierten Biofilms mit dem proteingelabelten Alexa488 und dem nuklein-

säurebindenden SYTO60 war es möglich innerhalb des Biofilms zwischen vornehmlich durch Bacteria und Archaea bzw. EPS-Strukturen bestimmte Bereiche unterscheiden zu können (**Abbildung 9**). Das ausführliche Arbeitsprotokoll ist in **Abbildung 10** dargestellt.

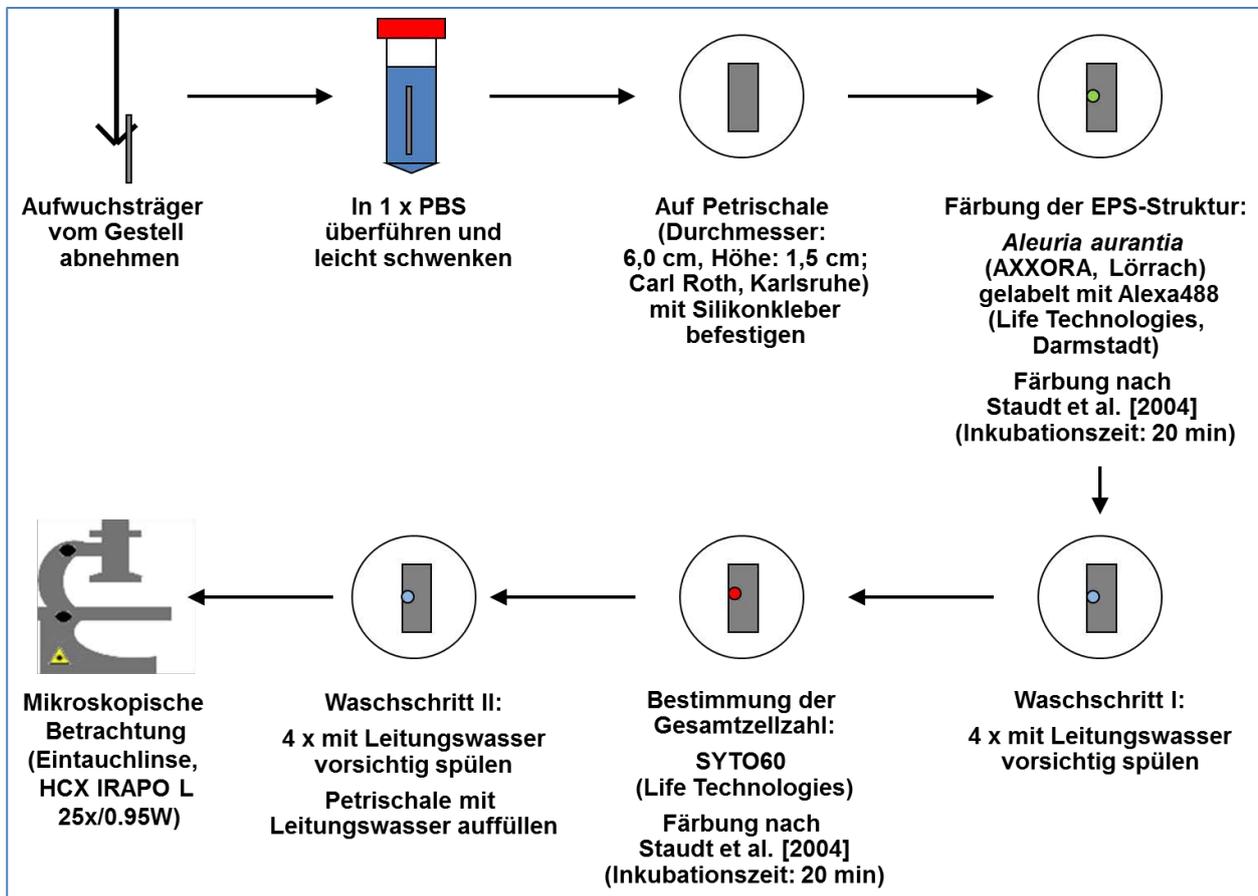


Abbildung 10: Protokoll zur Lebendbiofilmbetrachtung am Beispiel eines Aufwuchsträgermaterials.

Da mit diesem Versuchsprotokoll keine Unterscheidung zwischen spezifischen taxonomischen Einheiten innerhalb der mikrobiellen Lebensgemeinschaft möglich war, sollte in einem zweiten experimentellen Ansatz ein Methodenprotokoll erstellt werden, welches eine systematische Differenzierung von Mikroorganismen innerhalb eines Biofilms ermöglicht.

Eine solche Unterscheidung kann mit der Anwendung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) erreicht werden [ISHII *et al.* 2004, CROCKETT *et al.* 2006, NETTMANN *et al.* 2010]. Bei der Etablierung eines Arbeitsprotokolls sollten hohe Hybridisierungsraten mit einer gleichzeitig schonenden Behandlung der Biofilme einhergehen. Für die Entwicklung eines geeigneten Methodenprotokolls kamen die spezifischen Hybridisierungssonden der Bacteria (EUB338, EUB338-II, EUB338-III) und der Archaea (ARC915) zum Einsatz [AMANN *et al.* 1990, RASKIN *et al.* 1994, DAIMS *et al.* 1999].

Dehydrierung:

- Aufwuchsträger mit 1000 µl 50% Ethanol befüllen → 3 min inkubieren
- Überstand vorsichtig abpipettieren
- Aufwuchsträger mit 1000 µl 80% Ethanol befüllen → 3 min inkubieren
- Überstand vorsichtig abpipettieren
- Aufwuchsträger mit 1000 µl 96% Ethanol befüllen → 3 min inkubieren
- Überstand vorsichtig abpipettieren
- Bei 46°C trocknen lassen

Hybridisierung:

- Aufwuchsträger in 900 µl Hybridisierungspuffer (50% Formamid*) und 100 µl DOPE-FISH-Sonde (50 ng/ml) aufnehmen
- Im Dunkeln für 2-3 h bei 46°C inkubieren
- Hybridisierungspuffer verwerfen
- In 1000 µl auf 48°C vorgewärmten Waschpuffer aufnehmen
- Inkubation für 15 min bei 48°C im Wasserbad
- Überstand verwerfen
- Aufwuchsträger in 1000 µl eiskaltem MilliQ-Wasser aufnehmen und nach ca. 3 s Überstand vorsichtig abpipettieren, trocknen lassen
- Einfrieren bei -20°C
- *Wichtig:* Die Formamidkonzentration richtet sich nach verwendeter FISH-Sonde (z. B. 50% für EUB338, EUB338-II, EUB338-III und ARCH915)
- Herstellung der Hybridisierungs- und Waschpuffer nach Nettmann et al. [2010]

Mikroskopie:

- Aufwuchsträger auf Petrischale aufbringen (vgl. Abbildung 10)
- Gesamtzellzahlfärbung mit SYTO60 (vgl. Abbildung 10)

Abbildung 11: Protokoll zur Differenzierung von spezifischen taxonomischen Einheiten innerhalb der mikrobiellen Lebensgemeinschaft eines Biofilms.

In einem ersten Versuchsansatz wurde in Anlehnung an DAIMS *et al.* [1999] und NETTMANN *et al.* [2010] ein Hybridisierungsprotokoll erstellt, welches Zentrifugationsschritte (1.800 rcf) beinhaltete. Es zeigte sich, dass die gewählte Zentrifugationsgeschwindigkeit bereits zu einer kompletten Ablösung des Biofilms führte und somit keine Mikroorganismen mehr auf den Aufwuchsträgern nachgewiesen werden konnten. Bei der Erstellung eines zweiten Methodenprotokolls wurde daher auf Zentrifugationsschritte komplett verzichtet, um den Biofilm auf dem Aufwuchsträger halten zu können. Das Arbeitsprotokoll ist in **Abbildung 11** dargestellt.

Auch mit diesem Protokoll war es nur bedingt möglich eine Aussage über die Verteilung von Archaea und Bacteria innerhalb des Biofilms treffen zu können. Trotz einer schonenden Behandlung konnten nur noch Fragmente des Basisbiofilms nach der Durchführung der FISH nachgewiesen werden. Allerdings konnte in diesen verbliebenen Basisbiofilmbereichen eine erfolgreiche Hybridisierung beobachtet werden (**Abbildung 12**). So konnten einige Zellaggregate eindeutig der Domäne Archaea zugeordnet werden (**Abbildung 12A-C**). Zudem konnten Zellstrukturen ausfindig gemacht werden, die kein positives Hybridisierungssignal mit der archaeaspezifischen Sonde zeigten (**Abbildung 12D-F**). Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Zellformationen um Vertreter der Domäne Bacteria handelt.

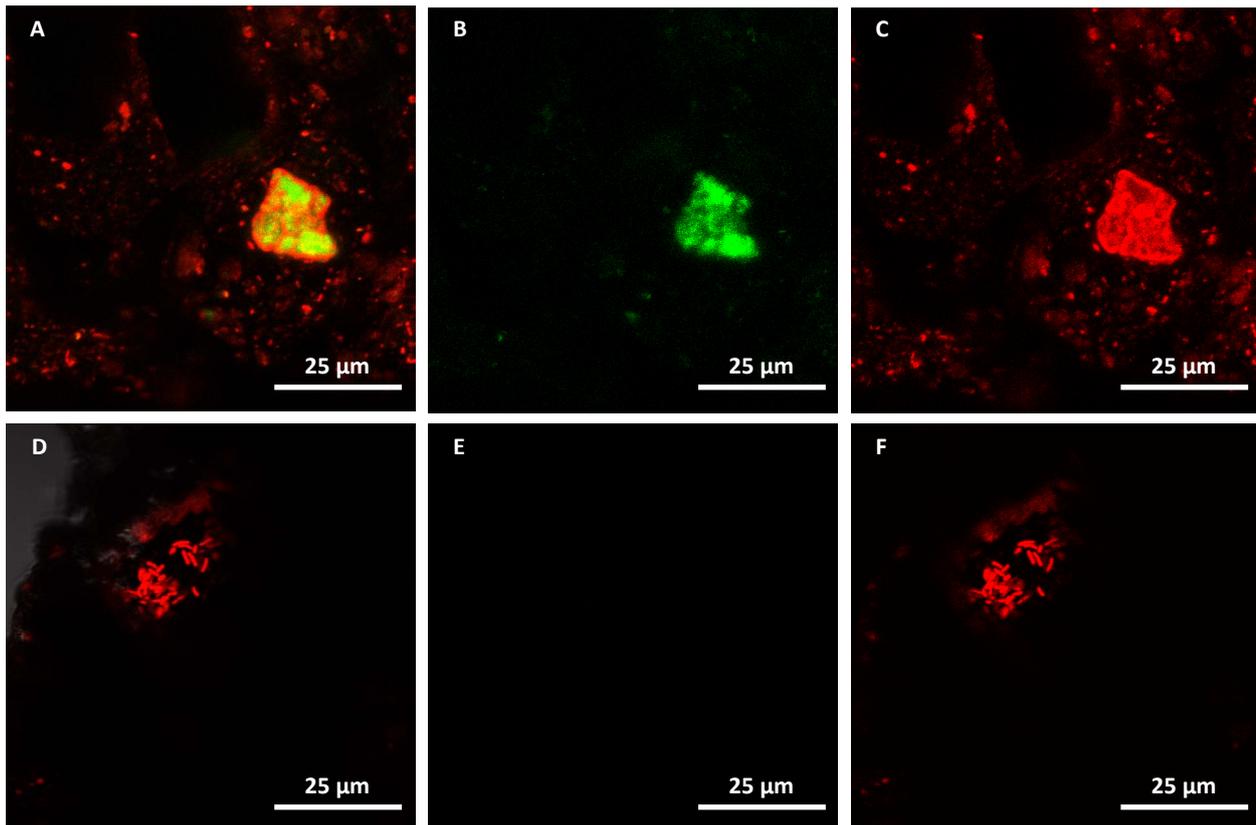


Abbildung 12: Konfokale Laserscanningmikroskopie von magnetischen Aufwuchsträgern. (A, D) Maximumprojektion aller Farbkanäle (Durchlichtmikroskopieaufnahme [Schwarz/Weißfärbung], Fluoreszenzmikroskopie [Grünfärbung unter Verwendung einer Cy3-markierten ARC915 Hybridisierungssonde, Rotfärbung unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYTO60] vom Biofilm eines magnetischen Aufwuchsträgers, welcher aus einem thermophilen Biogasreaktor nach 18 Wochen entnommen wurde. (B, E) Maximumprojektion der Fluoreszenzmikroskopie (ARC915). (C, F) Maximumprojektion der Fluoreszenzmikroskopie (SYTO60).

Abschließend lässt sich feststellen, dass die entstandenen Biofilme auf Aufwuchsträgern in Biogasreaktoren nur mit sehr geringen Kräften am Trägermaterial haften. Selbst der Basisbiofilm, der dem Trägermaterial direkt aufliegt, wird schon bei geringer Krafteinwirkung vom Material entfernt. Das Erstellen eines Methodenprotokolls zum Nachweis von spezifischen Mikroorganismengruppen innerhalb eines Biofilms ohne Verwendung eines Einbettungsmediums erscheint somit grundsätzlich als sehr schwierig.

Um eine erfolgreiche Aufklärung der mikrobiellen Biofilmmzusammensetzung zu erwirken, könnte die Anwendung von Paraffinwachs mit anschließender Microtomschnittbehandlung eine Möglichkeit sein, um Syntrophien innerhalb der mikrobiellen Lebensgemeinschaft besser aufklären zu können [O'REILLY *et al.* 2009].

Neben der Quantifizierung von bestimmten taxonomischen Einheiten der Bacteria bzw. Archaea in Biofilmen sollte die FISH-Methode auch für die unterschiedlichen Prozessflüssigkeiten von Biogasreaktoren optimiert werden. Zunächst wurde sich mit der Aufarbeitung der Prozessflüssigkeit aus dem Bioleaching-System befasst, da diese Proben

im Vergleich zum CSTR-System einen geringeren Anteil an organischen Flocken und Feststoffpartikeln aufwiesen, welche den Verlauf einer erfolgreichen Hybridisierung negativ beeinflussen können.

Aufgrund der schwankenden Gesamtzellzahlen in der Reaktorprobe (mit zunehmender Raumbelastung steigende Gesamtzellzahlen) sollte für jede Belastungsstufe die geeignetste Verdünnungsstufe gefunden werden, um ein optimales Quantifizieren der Bacteria- und Archaeagemeinschaft in Biogasreaktorproben zu gewährleisten. Das Festlegen einer geeigneten Verdünnungsstufe je Belastungsstufe war allerdings nur bedingt möglich, da auch innerhalb eines jeden Reaktors die Gesamtzellzahl stark variierte.

Eine Vorabbestimmung der Gesamtzellzahl für jede Reaktorprobe ist somit notwendig, um optimale Quantifizierungsbedingungen für die FISH zu erreichen. Die daran anschließende FISH wurde nach dem Protokoll von NETTMANN *et al.* [2010] durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Hybridisierungsraten von verschiedenen Prozessflüssigkeiten teilweise sehr unterschiedlich ausfielen. Gründe für die stark variierenden Hybridisierungsraten könnten Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Prozessflüssigkeiten sein. Durch den Einsatz der CARD-FISH konnten für einige Prozessflüssigkeiten deutlich höhere Hybridisierungsraten erreicht werden [KUNDU *et al.* 2013]. Die Erstellung eines generell standardisierten FISH-Protokolls für die Bandbreite unterschiedlicher Reaktorflüssigkeiten insbesondere für die stark mit Humin- und Feststoffpartikeln angereicherten Prozessflüssigkeiten in CSTR-Systemen erscheint aufgrund dieser Ergebnisse jedoch als sehr schwierig umsetzbar und wurde aufgrund der begrenzten Projektlaufzeit und der begrenzt zur Verfügung stehenden Personalkapazitäten hier nicht weiter verfolgt.

II.1.3 Erfassung der mikrobiellen Biodiversität in Biofilmen

Die Erfassung der mikrobiellen Diversität erfolgte in beiden Reaktorsystemen sowohl für das mesophile als auch für das thermophile Temperaturregime. Bei konstanter Raumbelastung sollte vorrangig die Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Gemeinschaft in Biofilmen auf unterschiedlichen Bewuchsoberflächen (Reaktorwand, magnetische Aufwuchsträger, Polyethylen-Füllkörper, Aufwuchs auf pflanzlicher Biomasse) ermittelt werden. Für die bessere Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Mikrohabitate wurde zudem die archaeelle Diversität in der Prozessflüssigkeit bestimmt. Die Ermittlung der Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea erfolgte mittels Klonierung und Sequenzierung des archaeellen 16S rRNA Gens.

Archaeelle Biodiversität im CSTR-System bei konstanter Raumbelastung

Um die Biofilmbildung auf verschiedenen Oberflächen über die Zeit zu überprüfen, wurden den Reaktorsystemen CSTR-M1 und CSTR-T1 zu Beginn der Versuchsreihe zwei Volumenprozent (bezogen auf das Reaktorvolumen) magnetische Aufwuchsträger (*Magnetic foam glass particles* = MFGPs) entsprechend Patent DE 10 2005 024 886 hinzugefügt (Clariant Produkte Deutschland GmbH, Frankfurt am Main). Die Reaktoren CSTR-M2 und CSTR-T2 dienten als biologische Kontrollen und wurden ohne Partikelzusatz betrieben.

Aufgrund der hohen Propionsäurewerte bei einer Raumbelastung von $3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im CSTR-System unter thermophilen Bedingungen wurde die Raumbelastung auf $2,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ herabgesetzt (vgl. Kap. II.1.1). Somit wurden alle nachfolgenden Untersuchungen für das CSTR-System unter thermophilen Temperaturbedingungen bei einer geringeren Raumbelastung durchgeführt als ursprünglich geplant.

Über den gesamten Versuchszeitraum konnten gleichbleibend konstante Biogas- und Methanbildungsraten, sowohl unter mesophilen als auch unter thermophilen Temperaturbedingungen, beobachtet werden (**Abbildung 13A, 13D**). Die erzielten Biogas- und Methanausbeuten lagen dabei im Bereich eines effizienten Substratabbaus, was auf einen ungestörten Biogasbildungsprozess hindeutet (**Abbildung 13B, 13E**, vgl. Kap. II.1.1). Dabei konnten unter thermophilen Temperaturbedingungen höhere Biogas- und Methanausbeuten erzielt werden im Vergleich zu den Reaktorsystemen mit mesophiler Temperaturführung ($T = 37^\circ\text{C}$: $y_{\text{B}} = 0,28 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$, $y_{\text{CH}_4} = 0,17 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$; $T = 55^\circ\text{C}$: $y_{\text{B}} = 0,32 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$, $y_{\text{CH}_4} = 0,20 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$). Dieses kann zum einen auf eine längere Verweilzeit der Substrate und zum anderen auf die wahrscheinlich höhere Reaktionsgeschwindigkeit des enzymatischen Substratabbaus unter thermophilen Temperaturbedingungen zurückgeführt werden.

Der durchschnittliche Methananteil im Biogas lag allerdings in den mesophil betriebenen Versuchsreaktoren höher als in den CSTR-Systemen unter thermophiler Temperaturführung ($T = 37^\circ\text{C}$, $\text{CH}_4 \approx 62\%$; $T = 55^\circ\text{C}$, $\text{CH}_4 = 58\%$) (**Abbildung 13C, 13F**). Dieses kann darin begründet liegen, dass die hydrolytischen Bacteria im Vergleich zu den methanogenen Archaea höhere Substratumsatz- und niedrigere Wachstumsraten aufweisen [BATSTONE *et al.* 2002]. Der Anteil an Methan im Biogas wird durch den abschließenden Schritt des anaeroben Abbaus, der Methanogenese, bestimmt. Durch eine Disproportionalität im Substratabbau von hydrolytischen Bacteria und methanogenen Archaea bei steigender Temperaturführung könnte es zu einer Anreicherung des Kohlenstoffdioxids im Biogas kommen. Durch diese Anreicherung würde der durchschnittliche Methananteil im Biogas sinken, und es könnten in der Folge geringe Methankonzentrationen im Biogas auftreten.

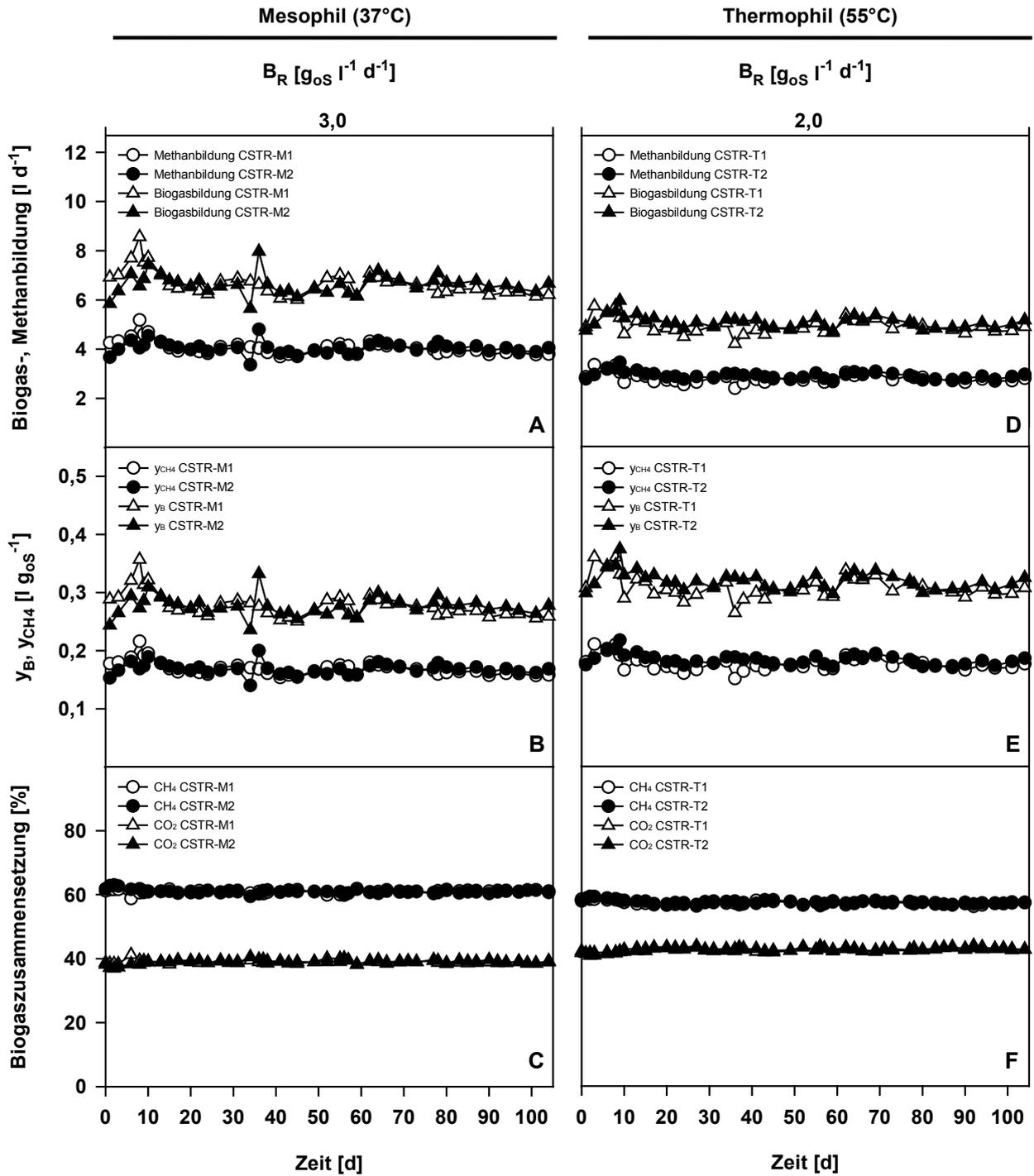


Abbildung 13: Biogasausbildung, -ausbeute (y_B) und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute (y_{CH_4}) bei konstanter Raumbelastung (B_R) im CSTR-System. (A, D) Biogas- und Methanbildung, (B, E) Biogas- und Methanausbeute sowie (C, F) Biogaszusammensetzung unter mesophilen (CSTR-M1, CSTR-M2) und thermophilen (CSTR-T1, CSTR-T2) Bedingungen. CH_4 = Methan, CO_2 = Kohlenstoffdioxid.

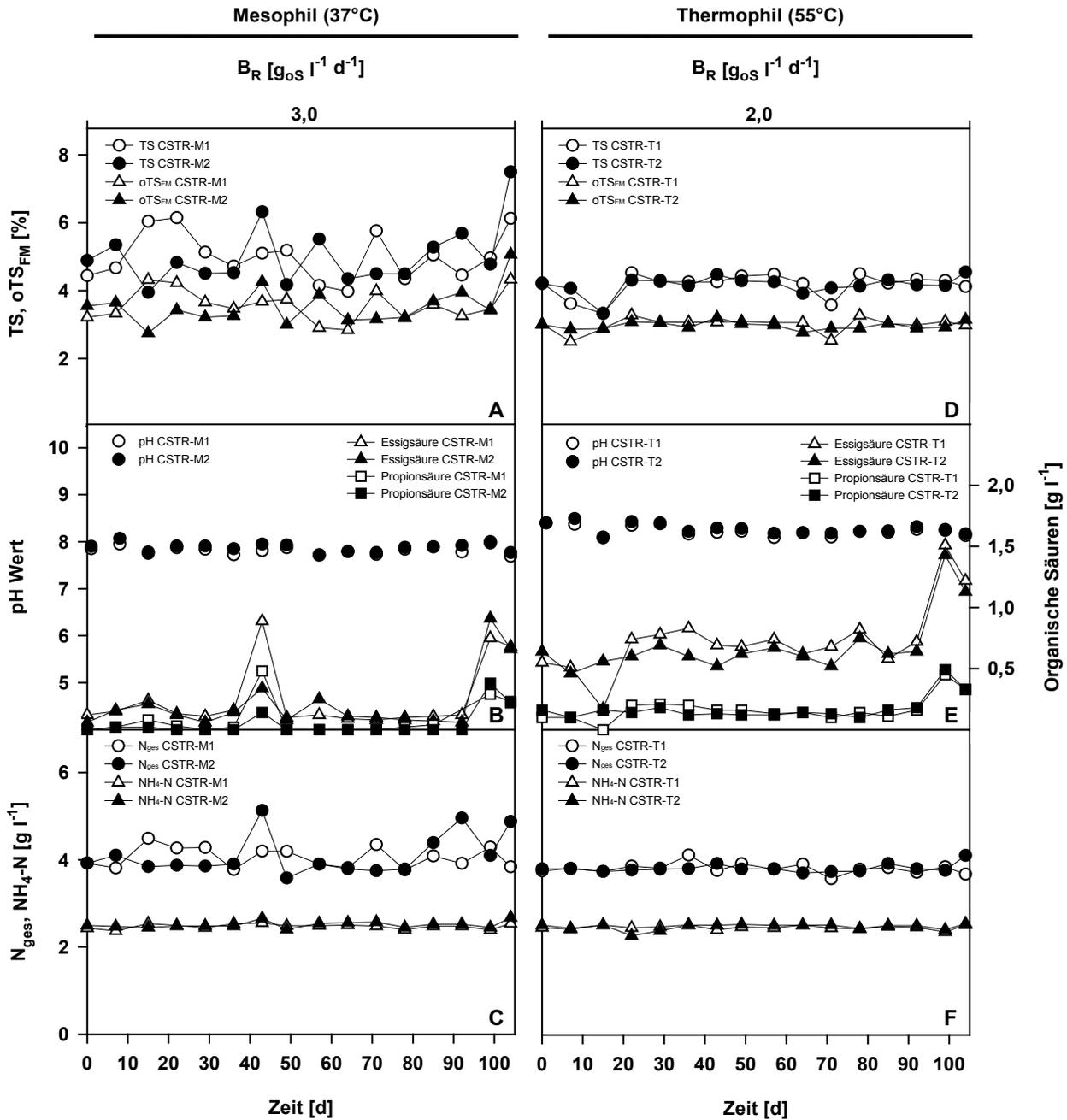


Abbildung 14: Physikalische und chemische Parameter bei konstanter Raumbelastung (B_R) im CSTR-System. (A, D) Trockensubstanz (TS)- und organische Trockensubstanzgehalte (oTS_{FM}), (B, E) pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen sowie (C, F) Gesamtstickstoff (N_{ges}) und Ammoniumstickstoffgehalte (NH₄-N) unter mesophilen (CSTR-M1, CSTR-M2) und thermophilen (CSTR-T1, CSTR-T2) Bedingungen.

Tabelle 3: Spurenelementanalyse der Prozessflüssigkeit im CSTR-System bei einer konstanten Raumbelastung in einem zeitlichen Abstand von 104 Tagen.

| Reaktor | Zeit [d] | B _R [g _{os} l ⁻¹ d ⁻¹] | Cd | Cr | Cu | Zn | Ni | [mg kg _{os} ⁻¹] | | | | |
|---------|-------------|--|-------|------|-------|-------|------|--------------------------------------|-------|-------|------|------|
| | | | | | | | | B | Mn | Fe | Pb | Co |
| CSTR-M1 | 0 | 3,0 | 13,90 | 2,95 | 13,13 | 38,86 | 1,72 | 1,89 | 21,86 | 86,59 | 0,06 | 0,23 |
| | 104 | 3,0 | 15,46 | 0,38 | 17,05 | 54,56 | 0,47 | 0,93 | 31,34 | 74,83 | 0,08 | 0,25 |
| CSTR-M2 | 0 | 3,0 | 14,60 | 0,33 | 13,65 | 41,66 | 0,38 | 1,94 | 23,10 | 77,80 | 0,06 | 0,23 |
| | 104 | 3,0 | 18,25 | 0,54 | 22,05 | 72,11 | 0,67 | 0,95 | 40,94 | 58,70 | 0,10 | 0,28 |
| CSTR-T1 | 0 | 2,0 | 13,70 | 0,32 | 12,63 | 37,00 | 0,36 | 1,99 | 20,17 | 69,31 | 0,06 | 0,23 |
| | 104 | 2,0 | 13,59 | 0,27 | 13,79 | 44,87 | 0,35 | 0,96 | 21,51 | 52,20 | 0,07 | 0,22 |
| CSTR-T2 | 0 | 2,0 | 13,70 | 0,54 | 12,57 | 37,02 | 0,47 | 1,97 | 20,01 | 70,91 | 0,06 | 0,23 |
| | 104 | 20,0 | 15,70 | 0,50 | 15,47 | 50,56 | 0,51 | 1,23 | 25,78 | 43,57 | 0,08 | 0,24 |

Für eine gleichbleibend konstante Biogasbildung im Reaktorsystem ist eine stabile und nahezu unveränderte Reaktorchemie von entscheidender Bedeutung. Sowohl die Gehalte an Fettsäuren und Spurenelementen als auch die Konzentrationen an Gesamt- und Ammoniumstickstoff variierten über den gesamten Versuchsablauf nur geringfügig, so dass von dauerhaft konstanten Umgebungsparametern für die Biofilmbildung auf den magnetischen Aufwuchsträgern ausgegangen werden kann (**Abbildung 14, Tabelle 3**).

Interessanterweise konnten sowohl hinsichtlich der Biogas- und Methanbildung als auch hinsichtlich der Reaktorchemie keine Unterschiede zwischen den CSTR-Systemen mit und ohne Zugabe von magnetischen Aufwuchsträgern beobachtet werden.

Zur Erfassung der archaeeellen Diversität wurden für die Reaktorsysteme CSTR-M1 und CSTR-T1 jeweils vier 16S rRNA Genbibliotheken angelegt. Die Beprobung der Versuchsreaktoren fand an zwei unterschiedlichen Versuchszeitpunkten statt. Um den Ausgangszustand der archaeeellen Zusammensetzung zu bestimmen, wurde den Reaktorsystemen vor der magnetischen Aufwuchsträgerzugabe Prozessflüssigkeit entnommen (mesophil, FPMA; thermophil, FPTA). Eine weitere Beprobung fand 104 Tage nach der Zugabe der magnetischen Aufwuchsträger statt. Neben der Prozessflüssigkeit (mesophil, FPMB; thermophil, FPTB) wurden die Biofilme der Aufwuchsträger (mesophil, MPM; thermophil, MPT) und der Reaktorwand (mesophil, RWM; thermophil, RWT) auf ihre archaeeelle Diversität hin überprüft. Die Probenaufarbeitung und das Anlegen der 16S rRNA Genbibliotheken erfolgten nach NETTMANN *et al.* [2010].

Unter **mesophilen Temperaturbedingungen** dominierten Vertreter der Methanosaetaceae und der Methanobacteriales die methanogene Lebensgemeinschaft (**Tabelle 4**). Sowohl vor als auch nach der Aufwuchsträgerzugabe konnten 43% aller 16S rRNA Genfragmente, die aus der Analyse der Prozessflüssigkeit stammten, den Methanosaetaceae zugeordnet werden.

Tabelle 4: Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea in einem Rührkesselsystem (CSTR) unter mesophilen Temperaturbedingungen (37°C) ermittelt durch Klonierung und Sequenzierung des archaeellen 16S rRNA Gens. Für die einzelnen taxonomischen Einheiten ist jeweils die Anzahl der nachgewiesenen *operational taxonomic units* (OTUs) sowie deren jeweiliger prozentualer Anteil in der Genbibliothek dargestellt. n.d. = nicht detektiert.

| | CSTR (37 °C) | | | |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---|
| | Prozessflüssigkeit | | Biofilm | |
| | Vor Partikelzugabe (FPMA) | Nach Partikelzugabe (FPMB) | Reaktor- wandung (RWM) | Magnetischer Aufwuchsträger (MPM) |
| Archaea-Klone | 129 | 151 | 166 | 180 |
| Archaea OTUs | 8 | 14 | 9 | 12 |
| Methanomicrobiales | 1 (4%) | 3 (11%) | 2 (23%) | 3 (1%) |
| <i>Methanospirillum</i> sp. | n.d. | 1 (2%) | 1 (16%) | 1 (1%) |
| <i>Methanoculleus</i> sp. | 1 (4%) | 2 (9%) | 1 (7%) | 2 (1%) |
| Unbekannte Methanomicrobiales | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanobacteriales | 4 (51%) | 9 (46%) | 6 (19%) | 8 (18%) |
| <i>Methanobacterium</i> sp. | 1 (22%) | 3 (16%) | 1 (10%) | 2 (3%) |
| <i>Methanothermobacter</i> sp. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| <i>Methanobrevibacter</i> sp. | 2 (25%) | 4 (24%) | 4 (8%) | 5 (14%) |
| <i>Methanosphaera</i> sp. | 1 (4%) | 2 (6%) | 1 (1%) | 1 (1%) |
| Methanosarcinales | 2 (44%) | 2 (44%) | 1 (58%) | 1 (81%) |
| <i>Methanosaeta</i> sp. | 1 (43%) | 1 (43%) | 1 (58%) | 1 (81%) |
| <i>Methanosarcina</i> sp. | 1 (1%) | 1 (1%) | n.d. | n.d. |
| Methanococcales | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanocellales | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanopyrales | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Sonstige Archaea | 1 (1%) | n.d. | n.d. | n.d. |
| Arch-1-Cluster | 1 (1%) | n.d. | n.d. | n.d. |
| Unbekannte Euryarchaeota | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |

Eine Dominanz dieser acetoklastischen Methanogenen konnte schon für verschiedene vergleichbare Reaktorsysteme nachgewiesen werden [NARIHIRO *et al.* 2009, NELSON *et al.* 2011]. Interessanterweise lag der Anteil an Methanosaetaceae in den Biofilmen deutlich höher als in der Prozessflüssigkeit (RWM = 58%, MPM = 81%). Dieses spricht für eine ungleichförmige Verteilung der methanogenen Archaea im Reaktorsystem. MUHA *et al.* [2012] prognostizierten bereits eine solche Ungleichverteilung anhand von mathematischen Modellberechnungen. Für Methanosaetaceae ist bekannt, dass sie sich vornehmlich auf Oberflächen und organischen, makroskopischen Granules ansiedeln [ZHENG *et al.* 2006, FERNANDEZ *et al.* 2008, SHAO *et al.* 2011]. Die Organisation und die Ansiedlung in Biofilmen bieten den Methanosaetaceae viele Vorteile. Zum einen sind sie durch die Einbettung in eine organische Matrix besser vor plötzlichen Veränderungen in der Umgebungsstruktur geschützt. Zum anderen wird durch die räumliche Nähe von essigsäurebildenden Bacteria und Methanosaetaceae die syntrophe Wechselwirkung gefördert.

Noch deutlicher zeigte sich die Ungleichverteilung der methanogenen Archaea im Reaktorsystem anhand der Methanobacteriales. Während nahezu die Hälfte aller sequenzierten 16S rRNA Genfragmente aus der Prozessflüssigkeit den Methanobacteriales zugeordnet werden konnte, entfielen auf die Biofilme lediglich 19% (RWM) bzw. 18% (MPM).

Neben den deutlichen Unterschieden in der Zusammensetzung der methanogenen Archaea zwischen Reaktorflüssigkeit und Biofilmen wurden auch Unterschiede in der archaeellen Diversität innerhalb der Biofilme festgestellt. So konnte ein großer Anteil an 16S rRNA Gensequenzen, welche aus der Aufarbeitung des Reaktorbiofilmes stammten, den Methanospirillaceae zugeordnet werden (RWM = 16%). Im Aufwuchsträgerbiofilm nahmen diese methanogenen Vertreter hingegen nur einen sehr geringen Anteil ein (MPM = 1%). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Oberflächenbeschaffenheit und die chemische Zusammensetzung des zu besiedelnden Materials einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft haben. Bereits HABOUZIT *et al.* [2011] zeigten deutlich, dass die Wahl des Aufwuchsträgermaterials einen entscheidenden Einfluss auf die Biofilmausprägung hat.

Zur besseren Interpretation der gewonnenen Ergebnisse der 16S rRNA Genbibliotheken wurden mittels statistischer Analysen der Stichprobenumfang (CHAO-I Index, Coverage) und die Diversität (SIMPSON Index, SHANNON Index, Evenness) innerhalb einer 16S rRNA Genbibliothek näher betrachtet (**Tabelle 5**).

Tabelle 5: Statistische Auswertung der 16S rRNA Genbibliothek der Analyse eines Rührkesselsystems (CSTR) unter mesophilen Temperaturbedingungen (37°C). Die Werte in Klammern stellen die Grenzen eines Konfidenzintervalls von 95% dar. Die Coverage wurde nach GOOD [1953] berechnet.

| | | Simpson Index | Shannon Index | Evenness | Chao-I Index | Coverage |
|---------------------------|--|---------------|---------------|----------|--------------|----------|
| Prozessflüssigkeit | Vor Partikelzugabe (FPMA) | 0,71 | 1,48 | 0,55 | 8 (8/8) | 99% |
| | Nach Partikelzugabe (FPMB) | 0,75 | 1,77 | 0,42 | 16 (14/30) | 97% |
| Biofilm | Reaktorwandung (RWM) | 0,62 | 1,38 | 0,62 | 9 (9/9) | 100% |
| | Magnetischer Aufwuchsträger (MPM) | 0,34 | 0,79 | 0,18 | 26 (15/79) | 96% |

Für alle 16S rRNA Genbibliotheken war der Umfang der Stichprobe ausreichend, um ein reales Bild der Archaea-Diversität zu erhalten (Coverage zwischen 96-100%). Aufgrund der Dominanz der Methanosaetaceae auf den magnetischen Aufwuchsträgern ist die Diversität dieser archaeellen Lebensgemeinschaft deutlich geringer als im Biofilm der Reaktorwand oder in der Prozessflüssigkeit (vgl. SIMPSON-Index, SHANNON-Index, **Tabelle 5**).

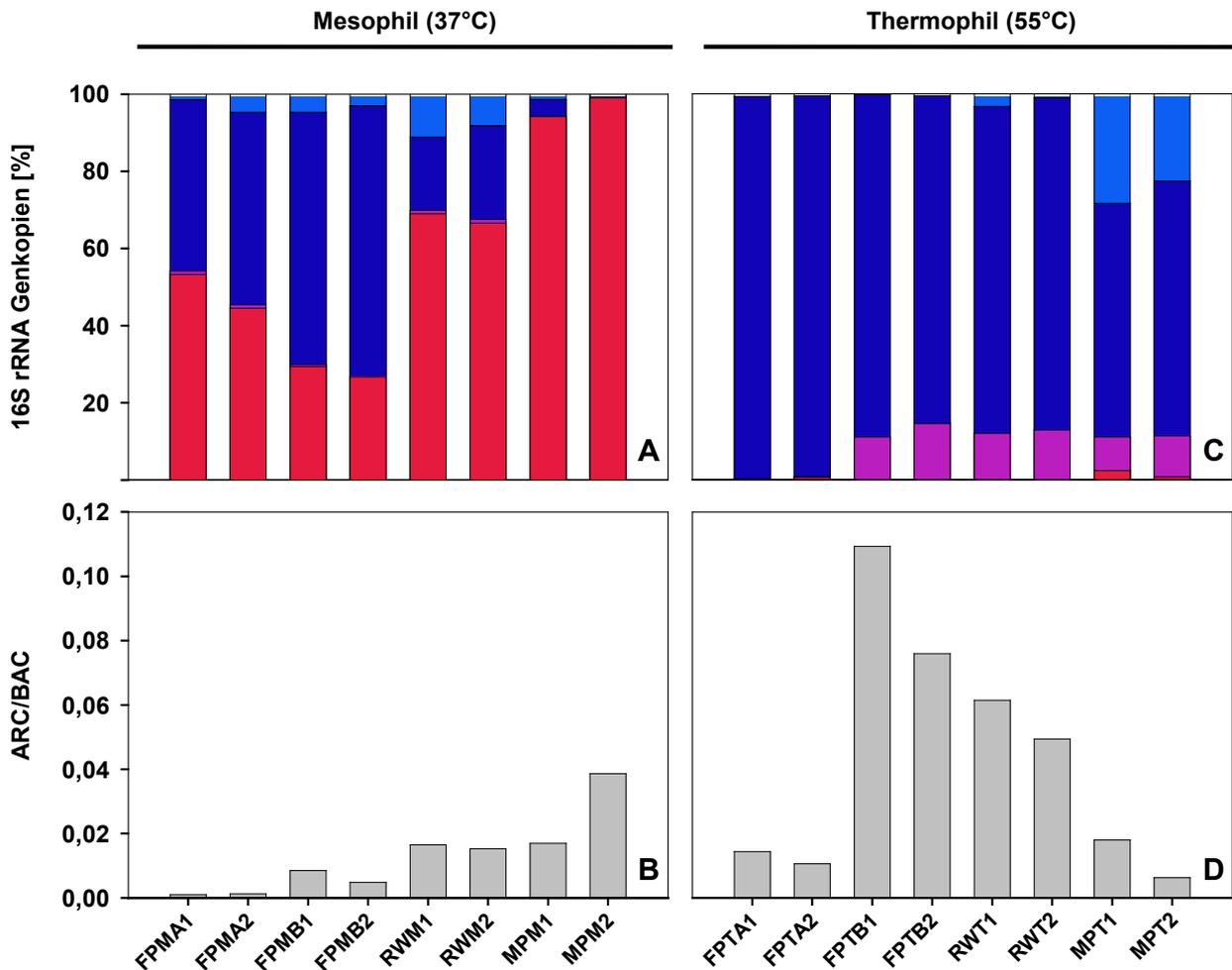


Abbildung 15: (A, C) Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung der methanogenen Archaea anhand der detektierten Kopienzahl des 16S rRNA Genes in einem Nanogramm genomischer DNA im CSTR-System unter (A) mesophilen und (C) thermophilen Bedingungen. Folgende taxonomische Gruppen wurden untersucht: Methanosetaeaceae (rot), Methanosarcinaceae (violett), Methanobacteriales (dunkelblau) und Methanomicrobiales (blau). Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (i.e. technische Replikate). (B, D) Verhältnis Archaea zu Bacteria (ARC/BAC) anhand der detektierten Kopienzahl für das 16S rRNA Gen in einem Nanogramm genomischer DNA unter (B) mesophilen und (D) thermophilen Bedingungen. Für die Ermittlung des ARC/BAC Verhältnisses wurde jede DNA-Probe in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate). FPMA = Prozessflüssigkeit Startphase, mesophil; FPMB = Prozessflüssigkeit Endphase, mesophil; RWM = Biofilm Reaktorwand, mesophil; MPM = Biofilm magnetischer Aufwuchsträger, mesophil; FPTA = Prozessflüssigkeit Startphase, thermophil; FPTB = Prozessflüssigkeit Endphase, thermophil; RWT = Biofilm Reaktorwand, thermophil; MPT = Biofilm magnetischer Aufwuchsträger, thermophil. Die Probenbezeichnungen 1 und 2 beziehen sich auf zwei parallele Transformationsansätze, die für die Erstellung der 16S rRNA Genbibliotheken genutzt wurden.

Um eine genauere Aussage über die quantitative Zusammensetzung der methanogenen Archaea treffen zu können, wurden Q-PCR-Analysen auf der Grundlage des 16S rRNA Gens mit den Primersets Methanomicrobiales, Methanobacteriales, Methanococcales, Methanosaetaceae und Methanosarcinaceae durchgeführt (vgl. Kap. II.1.1). Auch mit dieser molekulargenetischen Nachweismethode konnten deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der methanogenen Archaea, bezogen auf den Probenahmestandort, festgestellt werden (**Abbildung 15A**).

Tabelle 6: Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea in einem Rührkesselsystem (CSTR) unter thermophilen Temperaturbedingungen (55°C) ermittelt durch Klonierung und Sequenzierung des archaeellen 16S rRNA Gens. Für die einzelnen taxonomischen Einheiten ist jeweils die Anzahl der nachgewiesenen *operational taxonomic units* (OTUs) sowie deren jeweiliger prozentualer Anteil in der Genbibliothek dargestellt. n.d. = nicht detektiert.

| | CSTR (55 °C) | | | |
|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---|
| | Prozessflüssigkeit | | Biofilm | |
| | Vor Partikelzugabe (FPTA) | Nach Partikelzugabe (FPTB) | Reaktor- wandung (RWT) | Magnetischer Aufwuchsträger (MPT) |
| Archaea-Klone | 182 | 170 | 167 | 179 |
| Archaea OTUs | 7 | 10 | 10 | 10 |
| Methanomicrobiales | n.d. | 2 (2%) | 1 (8%) | 2 (54%) |
| <i>Methanospirillum</i> sp. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| <i>Methanoculleus</i> sp. | n.d. | 2 (2%) | 1 (8%) | 2 (54%) |
| Unbekannte Methanomicrobiales | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanobacteriales | 4 (97%) | 5 (88%) | 8 (77%) | 4 (37%) |
| <i>Methanobacterium</i> sp. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| <i>Methanothermobacter</i> sp. | 1 (87%) | 3 (83%) | 3 (74%) | 1 (31%) |
| <i>Methanobrevibacter</i> sp. | 3 (10%) | 2 (5%) | 3 (2%) | 3 (6%) |
| <i>Methanosphaera</i> sp. | n.d. | n.d. | 2 (1%) | n.d. |
| Methanosarcinales | 2 (3%) | 3 (10%) | 1 (14%) | 4 (9%) |
| <i>Methanosaeta</i> sp. | 1 (2%) | n.d. | n.d. | 1 (1%) |
| <i>Methanosarcina</i> sp. | 1 (1%) | 3 (10%) | 1 (14%) | 3 (8%) |
| Methanococcales | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanocellales | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanopyrales | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Sonstige Archaea | 1 (1%) | n.d. | n.d. | n.d. |
| Arch-1-Cluster | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Unbekannte Euryarchaeota | 1 (1%) | n.d. | n.d. | n.d. |

So lag der Anteil an detektierten 16S rRNA Genkopien der Methanosaetaceae in der Prozessflüssigkeit zwischen 30% (FPMB) und 55% (FPMA), wohingegen die Biofilme fast ausschließlich von Vertretern dieser methanogenen Familie dominiert wurden (RWM = 65 - 6 8%, MPM = 94 - 98%). Vertreter der Methanobacteriales konnten vornehmlich in der Prozessflüssigkeit nachgewiesen werden, wobei der prozentuale Anteil an detektierten 16S rRNA Genkopien mit steigender Reaktorlaufzeit deutlich zunahm (FPMA = 48%, FPMB = 70%). Interessanterweise konnte diese Veränderung mit der

semiquantitativen Nachweismethode der 16S rRNA Genbibliotheken nicht festgestellt werden (**Tabelle 4**). Vertreter der Methanomicrobiales scheinen nur in den Biofilmen der Reaktorwand eine größere Rolle zu spielen (RWM = 15%).

An allen Probenahmestandorten fiel das Verhältnis von Archaea zu Bacteria sehr gering aus (**Abbildung 15C**). In den Biofilmen konnten deutlich höhere ARC/BAC-Verhältnisse nachgewiesen werden, was für eine Akkumulation an Methanogenen in den Biofilmen spricht (FPM \leq 0,01, RWM = 0,02, MPM = 0,03).

Unter **thermophilen Temperaturbedingungen** konnte eine deutliche Dominanz der hydrogenotrophen Methanbildner verzeichnet werden. Mit prozentualen Anteilen von 97% (FPTA) und 88% (FPTB) aller gewonnenen Archaea-Klone setzte sich die methanogene Lebensgemeinschaft der Prozessflüssigkeit fast ausschließlich aus Vertretern der Methanobacterales zusammen, wobei der größte Anteil der sequenzierten 16S rRNA Genfragmente der Gattung *Methanothermobacter* sp. zugeordnet werden konnte (**Tabelle 6**). Aufgrund der Detektion einer nur sehr geringen Anzahl an OTUs für diese Gattung fielen die Diversitätsindizes für die Prozessflüssigkeit nur sehr gering aus (SIMPSON Index = 0,24 - 0,36; SHANNON Index = 0,56 -0,85) (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Statistische Auswertung der 16S rRNA Genbibliothek der Analyse eines Rührkesselsystems (CSTR) unter thermophilen Temperaturbedingungen (55°C). Die Werte in Klammern stellen die Grenzen eines Konfidenzintervalls von 95% dar. Die Coverage wurde nach GOOD (1953) berechnet.

| | | Simpson Index | Shannon Index | Evenness | Chao-1 Index | Coverage |
|--------------------|-----------------------------------|---------------|---------------|----------|--------------|----------|
| Reozessflüssigkeit | Vor Partikelzugabe (FPTA) | 0,24 | 0,56 | 0,25 | 7 (6/17) | 98% |
| | Nach Partikelzugabe (FPTB) | 0,36 | 0,85 | 0,23 | 20 (12/62) | 97% |
| Biofilm | Reaktorwandung (RWT) | 0,59 | 1,27 | 0,36 | 12 (10/26) | 98% |
| | Magnetischer Aufwuchsträger (MPT) | 0,62 | 1,27 | 0,36 | 11 (10/21) | 98% |

Auch im Biofilm der Reaktorwand konnten 74% aller analysierten 16S rRNA Gensequenzen der Gattung *Methanothermobacter* zugeordnet werden. Dass eine solche Dominanz dieser methanogenen Gattung in thermophilen Reaktorsystemen kein Einzelfall ist, zeigen Studien wo bei der Vergärung verschiedenster Substrate wie Karbonfaser-textilien, Futter- und Zuckerrübensilage oder Roggensilage mit Strohzusatz ähnliche Verhältnisse ermittelt werden konnten [AHRING *et al.* 1995, KRAKAT *et al.* 2010, SASAKI *et al.* 2011, RADEMACHER *et al.* 2012a].

Interessanterweise zeigte die Zusammensetzung des Biofilms auf dem magnetischen Aufwuchsträger eine deutlich andere methanogene Diversität. Mit 54% aller gewonnenen Archaea-Klone dominierten hier Vertreter der *Methanoculleus* sp. (Methanomicrobiales). Dieses Ergebnis unterstreicht ein weiteres Mal die Annahme von HAUBIZIT *et al.* [2011], dass die Oberflächenbeschaffenheit und die chemische Zusammensetzung des

Aufwuchsträgermaterials einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft hat.

In beiden Biofilmproben konnten im Vergleich zu den Prozessflüssigkeitsproben deutlich höhere Diversitätsindizes erreicht werden, was auf eine stabilere mikrobielle Lebensgemeinschaft in den Biofilmen schließen lässt (SIMPSON Index = 0,24 (RWT), 0,62 (MPT); SHANNON Index = 1,27) (**Tabelle 7**). Im gesamten Reaktorsystem scheint den Vertretern der Methanosarcinales nur eine geringe Bedeutung zuzukommen (**Tabelle 6**).

Die aus der 16S rRNA Sequenzanalyse gewonnenen Erkenntnisse konnten mit der Analyse der quantitativen Zusammensetzung der methanogenen Lebensgemeinschaft weitestgehend bestätigt werden (**Abbildung 15C**). Auch hier konnte eine deutliche Dominanz an Methanobacteriales im thermophilen CSTR-System nachgewiesen werden (FPTA = 98%, FPTB = 84%, RWT = 84%). Ein deutlich höherer Anteil an detektierten 16S rRNA Genkopien der Methanomicrobiales konnte im Biofilm des magnetischen Aufwuchsträgers nachgewiesen werden, was auf eine deutlich veränderte methanogene Lebensgemeinschaft im Gegensatz zur Prozessflüssigkeit und zum Biofilm der Reaktorwand hindeutet. Allerdings fiel der Anteil an detektierten 16S rRNA Genkopien im Vergleich zu den sequenzierten 16S rRNA Genfragmenten deutlich geringer aus (Q-PCR = 31%, Genbibliothek = 54%).

Diese Unterschiede können zum Teil damit begründet werden, dass es sich bei den prozentual ermittelten Werten der 16S rRNA Genbibliothek nur um eine semiquantitative Abschätzung der methanogenen Zusammensetzung handelt. Zudem können unterschiedliche Primerbindungsaffinitäten der verwendeten Primersets zu diesen Unterschieden geführt haben.

Auch unter thermophilen Temperaturbedingungen konnten nur sehr niedrige ARC/BAC-Verhältnisse ermittelt werden (**Abbildung 15D**). Die höchsten Werte wurden dabei in der Prozessflüssigkeit (Endphase) erreicht (FPTB \approx 0,10). Über den gesamten Versuchszeitraum kam es zu einer deutlichen Erhöhung des ARC/BAC-Verhältnisses, was auf optimale Wachstumsbedingungen der dominanten Methanbildner schließen lässt. Die kontinuierliche Intervalldurchmischung des Substrates scheint dabei keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung der methanogenen Lebensgemeinschaft im Reaktorsystem zu haben.

Archaeelle Biodiversität im Bioleaching-System bei konstanter Raumbelastung

Im Bioleaching-System wurden der Aufwuchs auf der pflanzlichen Biomasse (mesophil, GRM; thermophil, GRT), der Aufwuchs von Polyethylenfüllkörpern (mesophil, FKM; thermophil, FKT) und die Prozessflüssigkeit (mesophil, FPM; thermophil, FPT) nach einer Reaktorlaufzeit von 72 Tagen ($B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) hinsichtlich ihrer Archaea-Diversität näher untersucht.

Über den gesamten Versuchszeitraum konnten sowohl unter mesophilen als auch unter thermophilen Temperaturbedingungen konstante Biogas- und Methanausbeuten beobachtet werden (**Abbildung 16B, 16E**). Bei einer Temperaturführung von 37°C konnten durchschnittliche Methanertragswerte von $0,38 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$ erzielt werden, was einer leichten Methanertragssteigerung gegenüber den durchschnittlichen Methanertragsrichtwerten in landwirtschaftlichen Biogasanlagen entspricht (vgl. Kap. II.1.1). Zwei Drittel des Methans wurden dabei im Aufstromfeststoffreaktor gebildet. Der restliche Anteil entstand im nachgeschalteten Festbettreaktor ($y_{\text{CH}_4} (\text{AFR-M}) = 0,26 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$; $y_{\text{CH}_4} (\text{FBR-M}) = 0,12 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$) (**Abbildung 16B**).

Auch unter thermophilen Temperaturbedingungen konnten vergleichbare Methanerträge für das Gesamtsystem erzielt werden ($y_{\text{CH}_4} = 0,37 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$) (**Abbildung 16E**). Interessanterweise wurde in diesem Reaktorsystem das Methan fast ausschließlich im AFR gebildet ($y_{\text{CH}_4} (\text{AFR-T}) = 0,32 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$; $y_{\text{CH}_4} (\text{FBR-T}) = 0,05 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$). Dieses spricht dafür, dass dem Festbettreaktor eine größere Bedeutung unter mesophilen Temperaturbedingungen beigemessen werden kann. Eine mögliche Erklärung könnte die erhöhte Substratumsatzgeschwindigkeit unter thermophilem Temperaturregime sein. Durch den schnellere Verwertung des Substrates kann der Prozess des anaeroben Abbaus fast ausschließlich im Aufstromfeststoffreaktor erfolgen. Unter mesophilen Temperaturbedingungen hingegen wandern viele der gebildeten Zwischenprodukte des anaeroben Substratumsatzes in den Festbettreaktor, wo sie dann durch die dort anwesende mikrobielle Lebensgemeinschaft in Methan umgesetzt werden können. Diese Annahme wird durch die Analyse der Biogaszusammensetzung gestützt. So lag der durchschnittliche Methanwert im FBR-M bei 63,3% wohingegen im FBR-T nur 61,0% erzielt werden konnten (**Abbildung 16C, 16F**).

Dass der Biogasbildungsprozess über den gesamten Versuchszeitraum unter nahezu vergleichbaren Umgebungsparametern stattfand, konnte mit den Ergebnissen aus der Analytik der Reaktionschemie bestätigt werden (**Abbildung 17**). Das pH-Wert-Verhalten und der Anteil an gebildeten VFA blieben sowohl unter mesophilen als auch unter thermophilen Reaktionsbedingungen über den gesamten Versuchszeitraum auf konstantem Niveau (**Abbildung 17B, 17C**).

Lediglich im Gehalt des Gesamtstickstoffs und des Ammoniumstickstoffs konnte eine geringfügige kontinuierliche Zunahme beobachtet werden. Bei einer Temperaturführung von 37°C stieg der Gehalt des Ammoniumstickstoffs von $\text{NH}_4\text{-N} = 0,37 \text{ g l}^{-1}$ auf $\text{NH}_4\text{-N} = 0,42 \text{ g l}^{-1}$ (**Abbildung 17C**). Unter thermophilem Temperaturregime konnte eine Gehaltszunahme von Ammoniumstickstoff von $\text{NH}_4\text{-N} = 0,39 \text{ g l}^{-1}$ auf $\text{NH}_4\text{-N} = 0,51 \text{ g l}^{-1}$ beobachtet werden (**Abbildung 17F**). Die erzielten Höchstwerte lagen allerdings deutlich unter den von methanogenen Archaea tolerierten Konzentrationsgrenzen, so dass über den gesamten Reaktorverlaufszeitraum von optimalen Umgebungsbedingungen für die Entwicklung der Methanogenen ausgegangen werden kann (vgl. Kap. II.1.1). Ebenfalls unter beiden Temperaturführungen nahezu identisch war der Anteil an verfügbaren Spurenelementen zu Ende des Reaktorbetriebes (**Tabelle 8**).

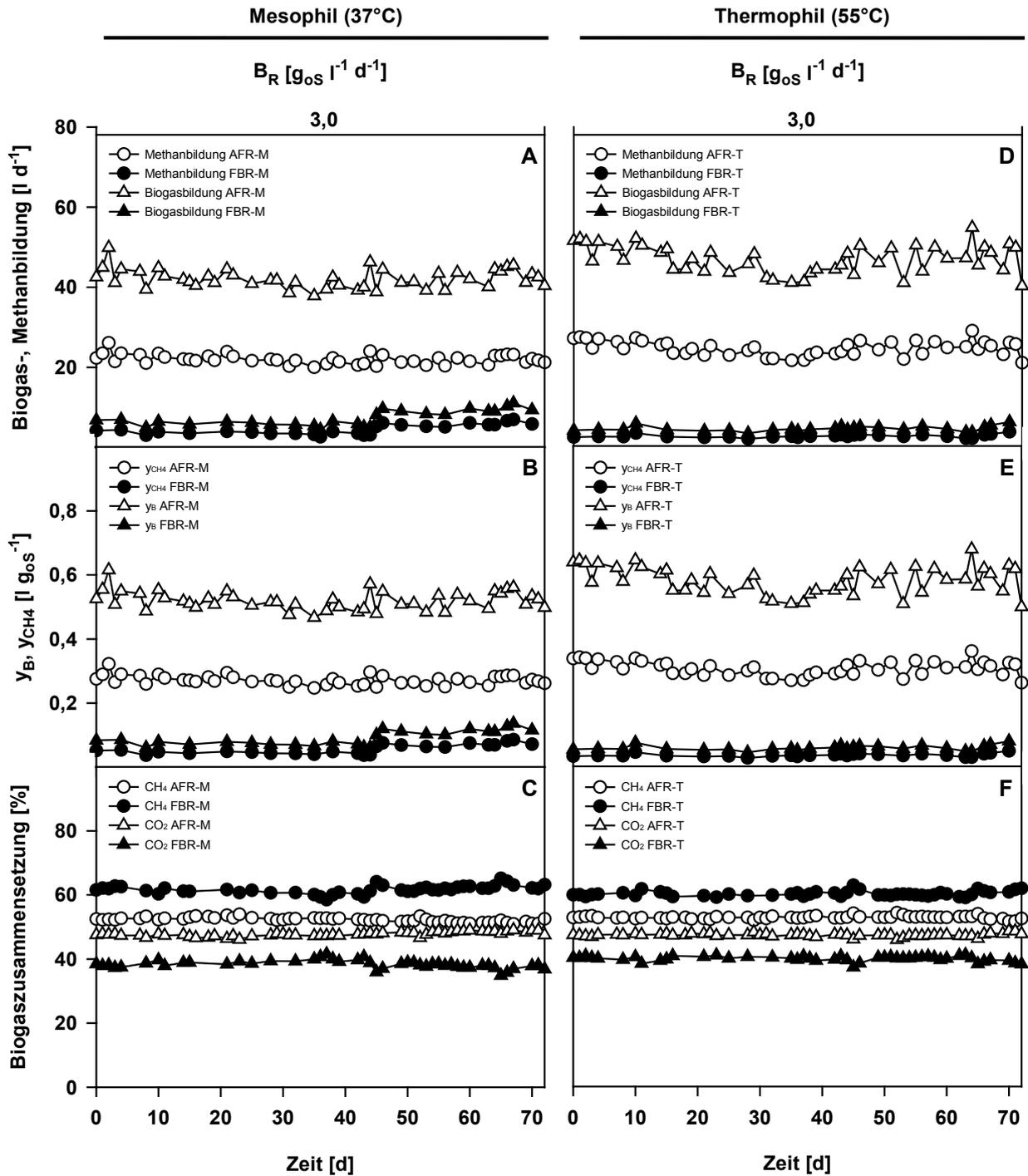


Abbildung 16: Biogasausbildung, -ausbeute (y_B) und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute (y_{CH_4}) im Bioleaching-System bei konstanter Raumbelastung (B_R). (A, D) Biogas- und Methanbildung, (B, E) Biogas- und Methanausbeute sowie (C, F) Biogaszusammensetzung unter mesophilen (AFR-M, FBR-M) und thermophilen (AFR-T, FBR-T) Bedingungen. CH₄ = Methan, CO₂ = Kohlenstoffdioxid.

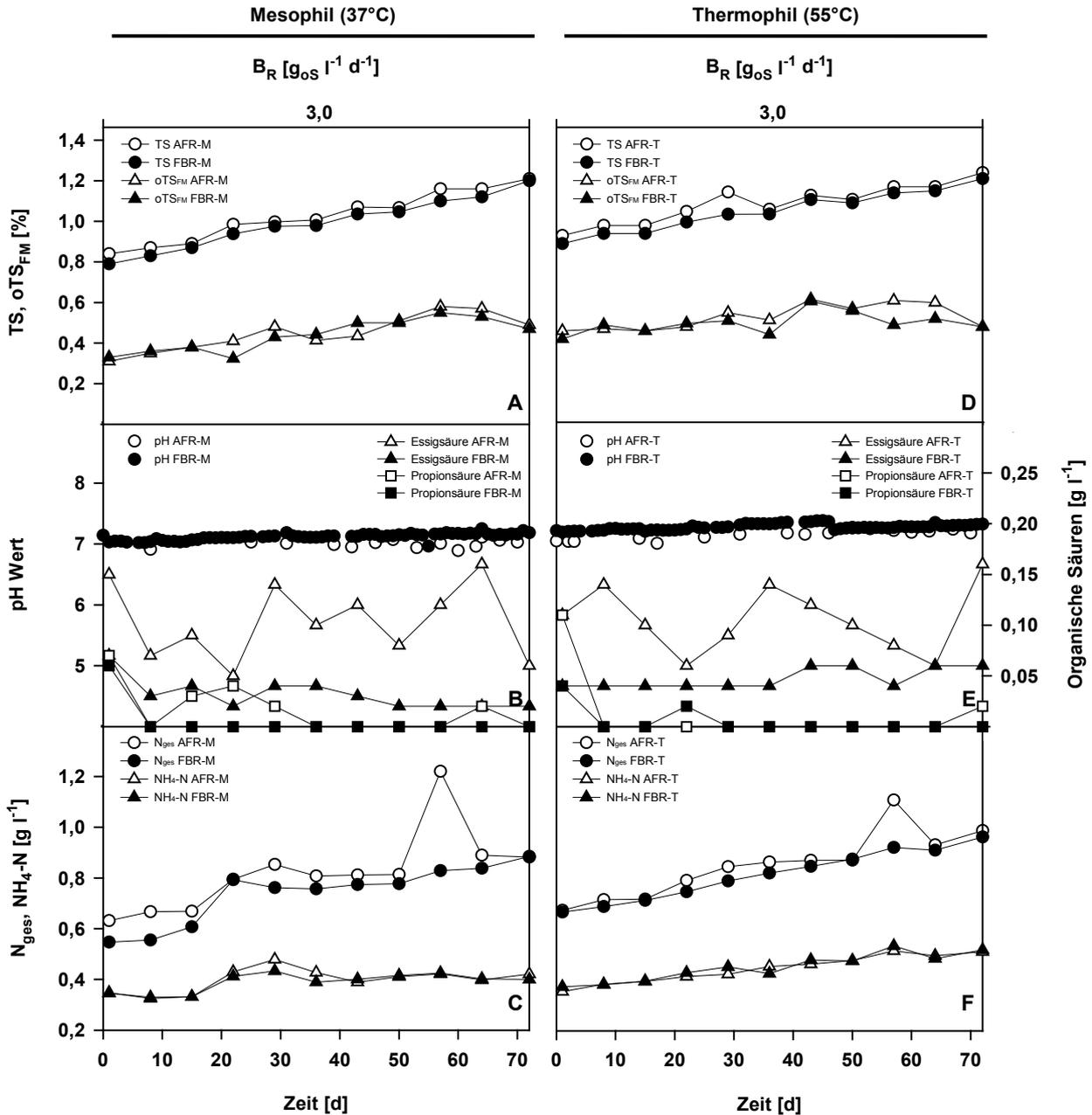


Abbildung 17: Physikalische und chemische Parameter im Bioleaching-System bei konstanter Raumbelastung (B_R). (A, D) Gehalt an Trockensubstanz (TS) und organischer Trockensubstanz (oTS_{FM}), (B, E) pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen sowie (C, F) Gehalt an Gesamtstickstoff (N_{ges}) und Ammoniumstickstoff ($\text{NH}_4\text{-N}$) unter mesophilen (AFR-M, FBR-M) und thermophilen (AFR-T, FBR-T) Bedingungen.

Tabelle 8: Spurenelementanalyse der Prozessflüssigkeit im Bioleaching-System bei einer konstanten Raumbelastung in einem zeitlichen Abstand von 71 Tagen.

| Reaktor | Zeit [d] | B _R [g _{os} l ⁻¹ d ⁻¹] | Cd | Cr | Cu | Zn | [mg kg _{os} ⁻¹] | | | | | |
|---------|-------------|--|--------|------|------|------|--------------------------------------|--------|------|------|------|------|
| | | | | | | | Ni | B | Mn | Fe | Pb | Co |
| AFR-M | 1 | 3,0 | < 1,00 | 0,04 | 0,18 | 0,64 | 0,08 | 0,53 | 0,46 | 2,97 | 0,01 | 0,11 |
| | 72 | 3,0 | < 1,00 | 0,03 | 0,19 | 0,84 | 0,07 | < 1,00 | 0,65 | 3,40 | 0,01 | 0,31 |
| FBR-M | 1 | 3,0 | < 1,00 | 0,02 | 0,15 | 0,51 | 0,06 | 0,51 | 0,40 | 2,38 | 0,01 | 0,10 |
| | 72 | 3,0 | < 1,00 | 0,03 | 0,19 | 0,90 | 0,07 | < 1,00 | 0,72 | 3,58 | 0,01 | 0,32 |
| AFR-T | 1 | 3,0 | < 1,00 | 0,05 | 0,27 | 0,92 | 0,08 | 0,58 | 0,65 | 4,02 | 0,01 | 0,11 |
| | 72 | 3,0 | < 1,00 | 0,04 | 0,18 | 0,88 | 0,06 | < 1,00 | 0,82 | 3,45 | 0,01 | 0,27 |
| FBR-T | 1 | 3,0 | < 1,00 | 0,02 | 0,20 | 0,68 | 0,07 | 0,56 | 0,54 | 3,26 | 0,01 | 0,11 |
| | 72 | 3,0 | < 1,00 | 0,02 | 0,15 | 0,76 | 0,04 | < 1,00 | 0,74 | 3,04 | 0,01 | 0,27 |

Auch im Bioleaching-System konnten deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der methanogenen Lebensgemeinschaft, bezogen auf den Probenahmestandort, festgestellt werden. In **Tabelle 9** sind die Ergebnisse der 16S rRNA Genbibliotheken für das Bioleaching-System unter mesophiler Temperaturführung zusammenfassend dargestellt.

An allen drei Probenahmeorten konnte eine Dominanz der acetoklastischen Methanosaetaceae beobachtet werden, wobei der Anteil an detektierten 16S RNA Sequenzen im Biofilm des Füllkörpers um ca. 30% höher lag als in der Prozessflüssigkeit oder im Biofilm des Gärrestes. Mögliche Ursachen für ein bevorzugtes Vorkommen der Methanosaetaceae in Biofilmen wurden bereits bei der Betrachtung der Ergebnisse für das CSTR-System unter mesophilen Temperaturbedingungen ausführlich diskutiert (vgl. Kap. II.1.3).

Dass eine solche Dominanz an Methanosaetaceae in den Biofilmen des Gärrestes nicht beobachtet werden konnte, könnte zum einen an der Behandlung des Substrates während der Reaktorlaufzeit liegen. Um eine Verdichtung des Substrates im AFR-Kopf zu vermeiden, wurde der Substratpfropfen in unregelmäßigen Abständen manuell aufgelockert. Zu diesem Zweck musste der Aufstromfeststoffreaktor geöffnet werden, so dass in diesem Zeitraum Sauerstoff in das Reaktorkompartiment gelangen konnte. Dieser könnte das Entwickeln der Biofilme auf dem Substrat negativ beeinflusst haben, da bereits geringste Sauerstoffmengen den Stoffwechsel der methanogenen Archaea beeinträchtigen oder sogar ganz unterbinden können [GARRITY & HOLT 2001].

Neben dem oxidativen Stress unterlagen die Biofilme des Gärrestes des Weiteren einem mechanischen Stress. Mit der Durchmischung des Substratpfropfens wurden bestehende Biofilmstrukturen beschädigt oder sogar ganz vom Substrat entfernt. Auch der Einfluss höherer VFA Konzentrationen im Substratpfropfen auf die sich entwickelnde methanogene Lebensgemeinschaft kann nicht ausgeschlossen werden. Im Substratpfropfen finden zunächst die ersten Schritte des anaeroben Substratabbaus statt (Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese). Da die hydrolytischen Bacteria gegenüber den me-

thanogenen Archaea schnellere Substratumsatz- und Wachstumsraten besitzen, ist eine lokale Anreicherung an VFA im Substrat nicht auszuschließen. Eine veränderte Umgebungschemie z.B. erhöhte Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen kann einer kontinuierlichen Entwicklung der Methanosaetaceae entgegenwirken (vgl. Kap. II.1.1).

Tabelle 9: Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea in einem zweistufigen Bioleaching-System unter mesophilen Temperaturbedingungen (37°C) ermittelt durch Klonierung und Sequenzierung des archaeellen 16S rRNA Gens. Für die einzelnen taxonomischen Einheiten ist jeweils die Anzahl der nachgewiesenen *operational taxonomic units* (OTUs) sowie deren jeweiliger prozentualer Anteil in der Genbibliothek dargestellt. n.d. = nicht detektiert.

| | Bioleachingsystem (37 °C) | | |
|-------------------------------|----------------------------------|------------------|---------------------|
| | Prozess- flüssigkeit (FPM) | Biofilm | |
| | | Gärrest (GRM) | Füllkörper (FKM) |
| Archaea-Klone | 181 | 177 | 184 |
| Archaea OTUs | 10 | 11 | 13 |
| Methanomicrobiales | 3 (37%) | 5 (40%) | 4 (16%) |
| <i>Methanospirillum</i> sp. | 3 (37%) | 3 (37%) | 2 (9%) |
| <i>Methanoculleus</i> sp. | n.d. | 1 (2%) | 1 (6%) |
| Unbekannte Methanomicrobiales | n.d. | 1 (1%) | 1 (1%) |
| Methanobacteriales | 3 (2%) | 3 (4%) | 2 (2%) |
| <i>Methanobacterium</i> sp. | 3 (2%) | 3 (4%) | 2 (2%) |
| Methanosarcinales | 3 (58%) | 3 (56%) | 6 (80%) |
| <i>Methanosaeta</i> sp. | 3 (58%) | 2 (54%) | 4 (79%) |
| <i>Methanosarcina</i> sp. | n.d. | 1 (2%) | 2 (1%) |
| Methanococcales | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanocellales | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanopyrales | n.d. | n.d. | n.d. |
| Sonstige Archaea | 1 (3%) | n.d. | 1 (2%) |
| Arch-1-Cluster | 1 (3%) | n.d. | 1 (2%) |
| Unbekannte Euryarchaeota | n.d. | n.d. | n.d. |

Aufgrund der Dominanz der Methanosaetaceae auf den Füllkörpern ist die Diversität dieser archaeellen Lebensgemeinschaft deutlich geringer als im Biofilm des Gärrestes oder in der Prozessflüssigkeit (vgl. SIMPSON-Index, SHANNON-Index, **Tabelle 10**).

Neben den Methanosaetaceae konnten noch Vertreter der Ordnung Methanomicrobiales in größeren Anteilen detektiert werden. *Methanospirillum* war dabei die am häufigsten vertretene Gattung. Interessanterweise konnte dieser Vertreter im Biofilm des Gärrestes mit einem prozentualen Anteil von 37% aller gewonnenen Archaea-Klone nachgewiesen werden, wobei nur lediglich 9% aller analysierten Archaea-Klone des Füllkörperbiofilms auf diese Gattung entfielen.

Tabelle 10: Statistische Auswertung der 16S rRNA Genbibliothek der Analyse eines zweistufigen Bioleaching-Systems unter mesophilen Temperaturbedingungen (37°C). Die Werte in Klammern stellen die Grenzen eines Konfidenzintervalls von 95% dar. Die Coverage wurde nach GOOD (1953) berechnet.

| | Simpson Index | Shannon Index | Evenness | Chao-I Index | Coverage |
|--------------------------|---------------|---------------|----------|--------------|----------|
| Prozessflüssigkeit (FPM) | 0,64 | 1,29 | 0,36 | 13 (10/33) | 98% |
| Biofilm Gärrest (GRM) | 0,67 | 1,44 | 0,38 | 12 (11/19) | 99% |
| Füllkörper (FKM) | 0,5 | 1,19 | 0,25 | 16 (13/30) | 97% |

Biofilme durchlaufen während ihres Bildungsprozesses unterschiedliche Entwicklungsstadien (Anlagerungs-, Verdichtungs- und Reifungsphase). Mit dem Erreichen einer jeweilig neuen Entwicklungsstufe kann sich die mikrobielle Zusammensetzung gravierend verändern. So analysierten FERNANDEZ *et al.* [2008] die unterschiedlichen Bildungsstadien von Biofilmen in einem UASB Reaktor, welcher mit Brauereiabwasser gespeist wurde. Dabei zeigte sich, dass während der Verdichtungsphase ($t = 36$ h) vornehmlich *Methanospirillum*-ähnliche Methanogene im Biofilm nachgewiesen werden konnten. Erst im Reifungsprozess ($t \geq 4$ d) konnten die ersten acetoklastischen Methanogenen (*Methanosarcina* sp.) im Biofilm detektiert werden. Im Bioleaching-System konnte die Biofilmbildung im Festbettreaktor ungestört ablaufen, da dieses Reaktorkompartiment über den gesamten Versuchszeitraum nicht geöffnet wurde. So konnte sich hier über die Zeit eine Biofilmstruktur ausbilden, die fast ausschließlich von Vertretern der Methanosaetaceae dominiert wurde.

Durch die Störprozesse im Aufstromfeststoffreaktor wurde hier die kontinuierliche Biofilmentwicklung unterbrochen, so dass der Biofilm im Entwicklungsstadium der Verdichtungsphase verbleibt und den Reifungsprozess nicht erreicht. Außerdem scheinen in diesem Reaktorsystem Vertreter der Methanobacteriales nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die mittels der 16S rRNA Sequenzanalyse ermittelten Verhältnisse hinsichtlich der Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Gemeinschaft konnten mit den Daten aus der Q-PCR bestätigt werden (**Abbildung 18**). Die Analysen des Archaea zu Bacteria Verhältnisses zeigten eine deutliche Anreicherung der Archaeen auf den Füllkörpern im Vergleich zur Prozessflüssigkeit und zum Biofilm des Gärrestes, welche durch die räumliche Trennung von Hydrolyse und Methanstufe, einem weitgehend ungestörten Prozessablauf sowie der Bereitstellung einer optimierten Oberflächenstruktur zur Ansiedlung methanogener Archaea erreicht wurde (**Abbildung 18B**).

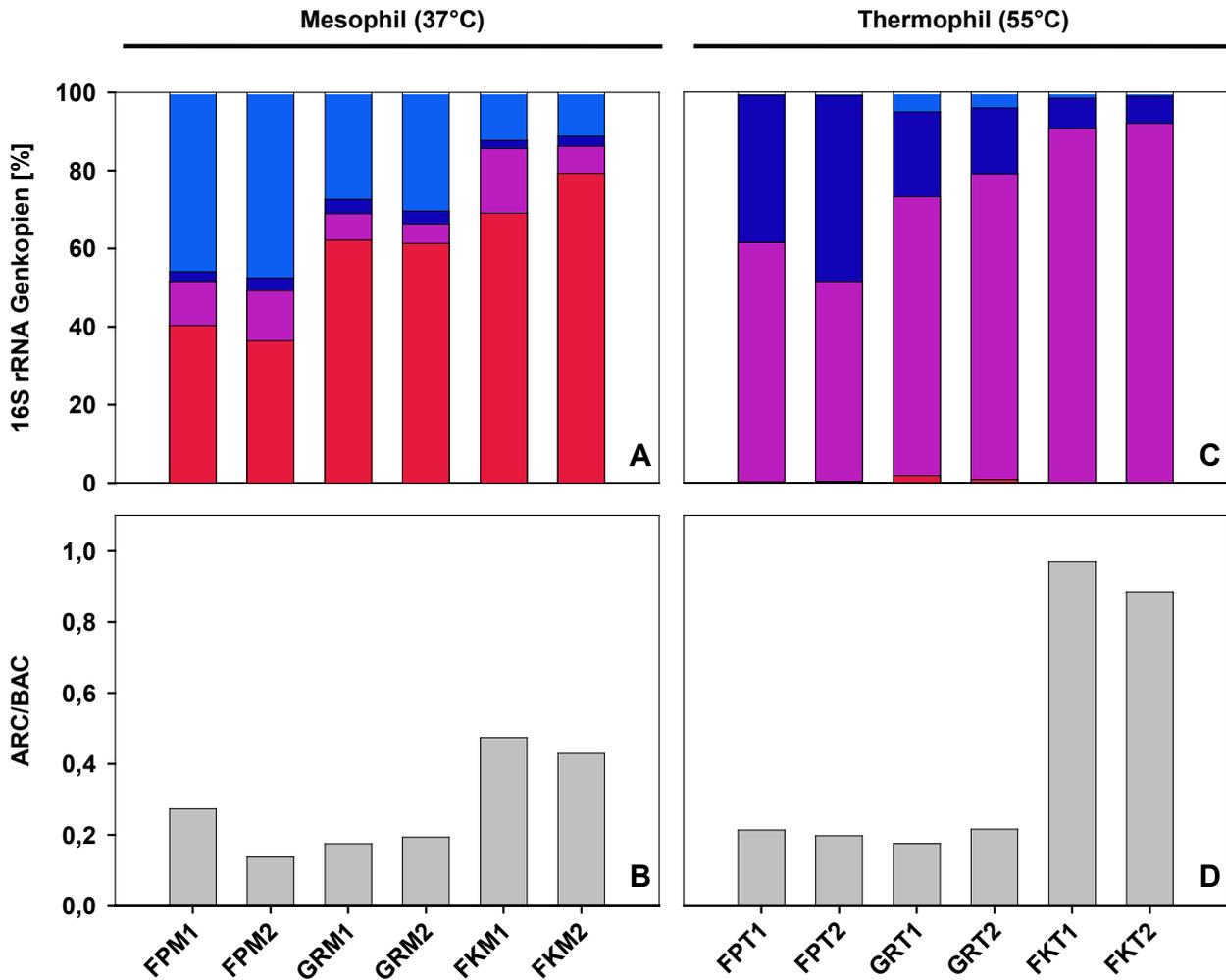


Abbildung 18: Quantitative Zusammensetzung der methanogenen Archaea in einem zweistufigen Bioleaching-System unter mesophilen (37°C) und thermophilen (55°C) Temperaturbedingungen. (A) Relative Verteilung der 16S rRNA Genkopien für die methanogenen Archaea der Methanosaeetaceae (rot), Methanosarcinaceae (violett), Methanobacteriales (dunkelblau), Methanomicrobiales (blau) in der Prozessflüssigkeit (FP1/FP2), auf dem Gärrest des Aufstromfeststoffreaktors (GR1/GR2) und auf Füllkörpern (FK1/FK2) des Festbettreaktors. Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (*i.e.* technische Replikate). (B) Verhältnis der detektierten Anzahl von 16S rRNA Genkopien der Archaea zu der detektierten Anzahl von 16S rRNA Genkopien der Bacteria. Für die Ermittlung des ARC/BAC Verhältnisses wurde jede DNA-Probe in jeweils drei Parallelen gemessen (*i.e.* technische Replikate).

Unter thermophilen Bedingungen waren an allen drei Probenahmeorten Vertreter der Gattung *Methanosarcina* vorherrschend. Im Biofilm des Gärrestes nahmen sie einen prozentualen Anteil von 78% ein, welches zu einer geringeren Diversität führte im Vergleich mit den Ergebnissen, die sich aus der 16S rRNA Genbibliothekenanalyse des Füllkörperbiofilms und der Prozessflüssigkeit ergaben (vgl. **Tabelle 11, 12**).

Auch die Analyse mittels Q-PCR bestätigte die Befunde aus der 16S rRNA Sequenzanalyse (**Abbildung 18C, 18D**, vgl. **Tabelle 11**). Mit über 90% aller detektierten 16S rRNA Genkopien setzten sich die Methanogenen im Biofilm des Füllkörpers fast ausschließlich aus Vertretern der Methanosarcinaceae zusammen.

Tabelle 11: Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea in einem zweistufigen Bioleaching-System unter thermophilen Temperaturbedingungen (55°C) ermittelt durch Klonierung und Sequenzierung des archaeellen 16S rRNA Gens. Für die einzelnen taxonomischen Einheiten ist jeweils die Anzahl der nachgewiesenen *operational taxonomic units* (OTUs) sowie deren jeweiliger prozentualer Anteil in der Genbibliothek dargestellt. n.d. = nicht detektiert.

| | Bioleachingsystem (55 °C) | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|------------------|---------------------|
| | Prozess- flüssigkeit (FPT) | Biofilm | |
| | | Gärrest (GRT) | Füllkörper (FKT) |
| Archaea-Klone | 169 | 169 | 120 |
| Archaea OTUs | 6 | 7 | 7 |
| Methanomicrobiales | 1 (2%) | 1 (7%) | 2 (21%) |
| <i>Methanospirillum</i> sp. | n.d. | n.d. | n.d. |
| <i>Methanoculleus</i> sp. | 1 (2%) | 1 (7%) | 2 (21%) |
| Unbekannte Methanomicrobiales | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanobacteriales | 3 (51%) | 2 (15%) | 3 (27%) |
| <i>Methanothermobacter</i> sp. | 2 (42%) | 2 (15%) | 2 (24%) |
| <i>Methanobacterium</i> sp. | 1 (9%) | n.d. | 1 (3%) |
| Methanosarcinales | 2 (47%) | 4 (78%) | 2 (52%) |
| <i>Methanosaepta</i> sp. | 1 (<1%) | n.d. | 1 (4%) |
| <i>Methanosarcina</i> sp. | 1 (47%) | 4 (78%) | 1 (48%) |
| Methanococcales | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanocellales | n.d. | n.d. | n.d. |
| Methanopyrales | n.d. | n.d. | n.d. |
| Sonstige Archaea | n.d. | n.d. | n.d. |
| Arch-1-Cluster | n.d. | n.d. | n.d. |
| Unbekannte Euryarchaeota | n.d. | n.d. | n.d. |

Im Gärrest konnten hingegen nur 77% aller detektierten 16S rRNA Genkopien den Methanosarcinaceae zugeordnet werden. Somit kann auch bei thermophiler Temperaturführung davon ausgegangen werden, dass sich über die Zeit in einem kontinuierlich arbeitenden Reaktorsystem die acetoklastischen Methanogenen im Biofilm durchsetzen.

Neben der Gattung *Methanosarcina* konnten auch Vertreter der Gattung *Methanothermobacter* an allen drei Probenahmestandorten in größeren Anteilen nachgewiesen werden (15 - 51% aller detektierten Archaea-Klone). Den Methanomicrobiales kann im thermophilen Bioleaching-System eine untergeordnete Rolle zugeschrieben werden. Nur im Biofilm des Füllkörpers entfielen 21% aller detektierten Archaea-Klone auf diese phylogenetische Gruppe (**Tabelle 11**).

Auch unter thermophilen Temperaturbedingungen konnte das höchste Archaea zu Bacteria Verhältnis in den Biofilmen des Füllkörpers festgestellt werden (**Abbildung 18D**). Dabei lag hier der Anteil an Archaea gegenüber den Bacteria um ein Fünffaches höher als im Biofilm des Gärrestes oder in der Prozessflüssigkeit. Die theoretisch denkbaren Ursachen, die bereits für das höhere Archaea zu Bacteria Verhältnis im Biofilm des

Füllkörpers im mesophil betriebenen Bioleaching-System diskutiert wurden, sind auch für das thermophil betriebene Reaktorsystem vorstellbar.

Tabelle 12: Statistische Auswertung der 16S rRNA Genbibliothek der Analyse eines zweistufigen Bioleaching-Systems unter thermophilen Temperaturbedingungen (55°C). Die Werte in Klammern stellen die Grenzen eines Konfidenzintervalls von 95% dar. Die Coverage wurde nach Good (1953) berechnet.

| | Simpson Index | Shannon Index | Evenness | Chao-I Index | Coverage |
|---------------------------------|---------------|---------------|----------|--------------|----------|
| Prozessflüssigkeit (FPT) | 0,6 | 1,07 | 0,48 | 7 (6/20) | 99% |
| Biofilm Gärrest (GRT) | 0,4 | 0,86 | 0,34 | 10 (7/32) | 98% |
| Füllkörper (FKT) | 0,69 | 1,44 | 0,6 | 7 (7/7) | 99% |

Im Vergleich der Bioleaching-Systeme bei unterschiedlicher Temperaturführung konnten Unterschiede in der archaeellen Zusammensetzung für das jeweilige Temperaturregime nachgewiesen werden, wobei die Diversität in beiden Systemen vergleichbar war. Zudem konnte in beiden Systemen keine uniforme Verteilung der methanogenen Archaea nachgewiesen werden, welches für eine zonale Ungleichverteilung der Methanogenen im Reaktorsystem spricht.

Trotz des hohen relativen Anteils an methanogenen Archaea wurde im FBR vergleichsweise wenig Biogas und Methan gebildet (**Abbildung 16A,D**). Hierbei handelt es sich offensichtlich um einen Gegensatz, der mit den im Rahmen dieser Versuchsreihe erhobenen Daten jedoch nicht aufgeklärt werden kann. Grundsätzlich muss bei dieser Frage berücksichtigt werden, dass mittels des gewählten methodischen Ansatzes weder absolute Zelldichten noch der Anteil methabolisch aktiver Zellen ermittelt wurden. In zukünftigen Forschungsvorhaben sollte daher mindestens die Frischmasse des Biofilms ermittelt werden, idealerweise zusätzlich auch die Zelldichte metabolisch aktiver Zellen.

Um die methanogene Diversität aller 16S rRNA Genbibliotheken miteinander vergleichen zu können, wurden auf der Grundlage der ermittelten OTUs die BRAY-CURTIS Ähnlichkeitsindizes berechnet (**Tabelle 13, Abbildung 19**). Hierbei konnte zunächst festgestellt werden, dass sich die methanogene Diversität bei einer Temperaturführung von 37°C deutlich von denen unter thermophilen Temperaturbedingungen unterscheidet.

Tabelle 13: BRAY-CURTIS Ähnlichkeitsindizes aller methanogenen Archaea-Gemeinschaften basierend auf der mittels Analyse von 16S rRNA Genbibliotheken ermittelten Biodiversität. Bio-leaching-System: FPM = Prozessflüssigkeit, mesophil; GRM = Aufwuchs auf der pflanzlichen Biomasse, mesophil; FKM = Biofilm des Polyethylenfüllkörpers, mesophil; FPT = Prozessflüssigkeit, thermophil; GRT = Aufwuchs auf der pflanzlichen Biomasse, thermophil; FKT = Biofilm des Polyethylenfüllkörpers, thermophil. CSTR-System: FPMA = Prozessflüssigkeit (Startphase), mesophil; FPMB = Prozessflüssigkeit (Endphase), mesophil; RWM = Biofilm der Reaktorwand, mesophil; MPM = Biofilm auf magnetischen Aufwuchsträgern, mesophil; FPTA = Prozessflüssigkeit (Startphase), thermophil; FPTB = Prozessflüssigkeit (Endphase), thermophil; RWT = Biofilm der Reaktorwand, thermophil; MPT = Biofilm auf magnetischen Aufwuchsträgern, thermophil.

| | FPM | GRM | FKM | FPT | GRT | FKT | FPMA | FPMB | RWM | MPM | FPTA | FPTB | RWT | MPT |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| FPM | | 0,899 | 0,663 | 0,011 | 0,040 | 0,000 | 0,367 | 0,404 | 0,530 | 0,493 | 0,022 | 0,000 | 0,000 | 0,011 |
| GRM | 0,899 | | 0,659 | 0,029 | 0,067 | 0,040 | 0,404 | 0,457 | 0,507 | 0,476 | 0,028 | 0,040 | 0,041 | 0,051 |
| FKM | 0,663 | 0,659 | | 0,011 | 0,046 | 0,068 | 0,414 | 0,466 | 0,634 | 0,725 | 0,027 | 0,023 | 0,068 | 0,077 |
| FPT | 0,011 | 0,029 | 0,011 | | 0,581 | 0,562 | 0,020 | 0,013 | 0,006 | 0,006 | 0,410 | 0,501 | 0,554 | 0,379 |
| GRT | 0,040 | 0,067 | 0,046 | 0,581 | | 0,581 | 0,064 | 0,052 | 0,042 | 0,040 | 0,152 | 0,234 | 0,293 | 0,207 |
| FKT | 0,000 | 0,040 | 0,068 | 0,562 | 0,581 | | 0,047 | 0,075 | 0,066 | 0,006 | 0,091 | 0,195 | 0,298 | 0,218 |
| FPMA | 0,367 | 0,404 | 0,414 | 0,020 | 0,064 | 0,047 | | 0,705 | 0,473 | 0,523 | 0,122 | 0,093 | 0,074 | 0,117 |
| FPMB | 0,404 | 0,457 | 0,466 | 0,013 | 0,052 | 0,075 | 0,705 | | 0,662 | 0,574 | 0,126 | 0,081 | 0,101 | 0,152 |
| RWM | 0,530 | 0,507 | 0,634 | 0,006 | 0,042 | 0,066 | 0,473 | 0,662 | | 0,642 | 0,057 | 0,042 | 0,090 | 0,110 |
| MPM | 0,493 | 0,476 | 0,725 | 0,006 | 0,040 | 0,006 | 0,523 | 0,574 | 0,642 | | 0,105 | 0,063 | 0,029 | 0,078 |
| FPTA | 0,022 | 0,028 | 0,027 | 0,410 | 0,152 | 0,091 | 0,122 | 0,126 | 0,057 | 0,105 | | 0,824 | 0,602 | 0,382 |
| FPTB | 0,000 | 0,040 | 0,023 | 0,501 | 0,234 | 0,195 | 0,093 | 0,081 | 0,042 | 0,063 | 0,824 | | 0,742 | 0,447 |
| RWT | 0,000 | 0,041 | 0,068 | 0,554 | 0,293 | 0,298 | 0,074 | 0,101 | 0,900 | 0,029 | 0,602 | 0,742 | | 0,474 |
| MPT | 0,011 | 0,051 | 0,077 | 0,379 | 0,207 | 0,218 | 0,117 | 0,152 | 0,110 | 0,078 | 0,382 | 0,447 | 0,474 | |

Auch beim Vergleich der BRAY-CURTIS Indizes aller 16S rRNA Genbibliotheken von Bio-leaching- und CSTR-System unter mesophiler Temperaturführung konnte die Unähnlichkeit in der Diversität der methanogenen Archaea, bezogen auf das jeweilige Reaktorsystem, klar herausgestellt werden. Unter thermophilen Temperaturbedingungen fallen die Unterschiede in der methanogenen Zusammensetzung eindeutig geringer aus. Dieses kann darauf zurückgeführt werden, dass unter thermophiler Temperaturführung viele 16S rRNA Gensequenzen beider Reaktorsysteme einer gemeinsamen OTU zugeordnet werden konnten.

Die zonale Ungleichverteilung innerhalb eines Reaktorsystems konnte mit der Ähnlichkeitsanalyse bestätigt werden. So konnten beispielsweise für das CSTR-System bei einer Temperaturführung von 55°C große Ähnlichkeitsunterschiede in der Zusammensetzung der methanogenen Diversität zwischen dem Biofilm des magnetischen Aufwuchsträgers und denen der Prozessflüssigkeit bzw. des Biofilms der Reaktorwand nachgewiesen werden.

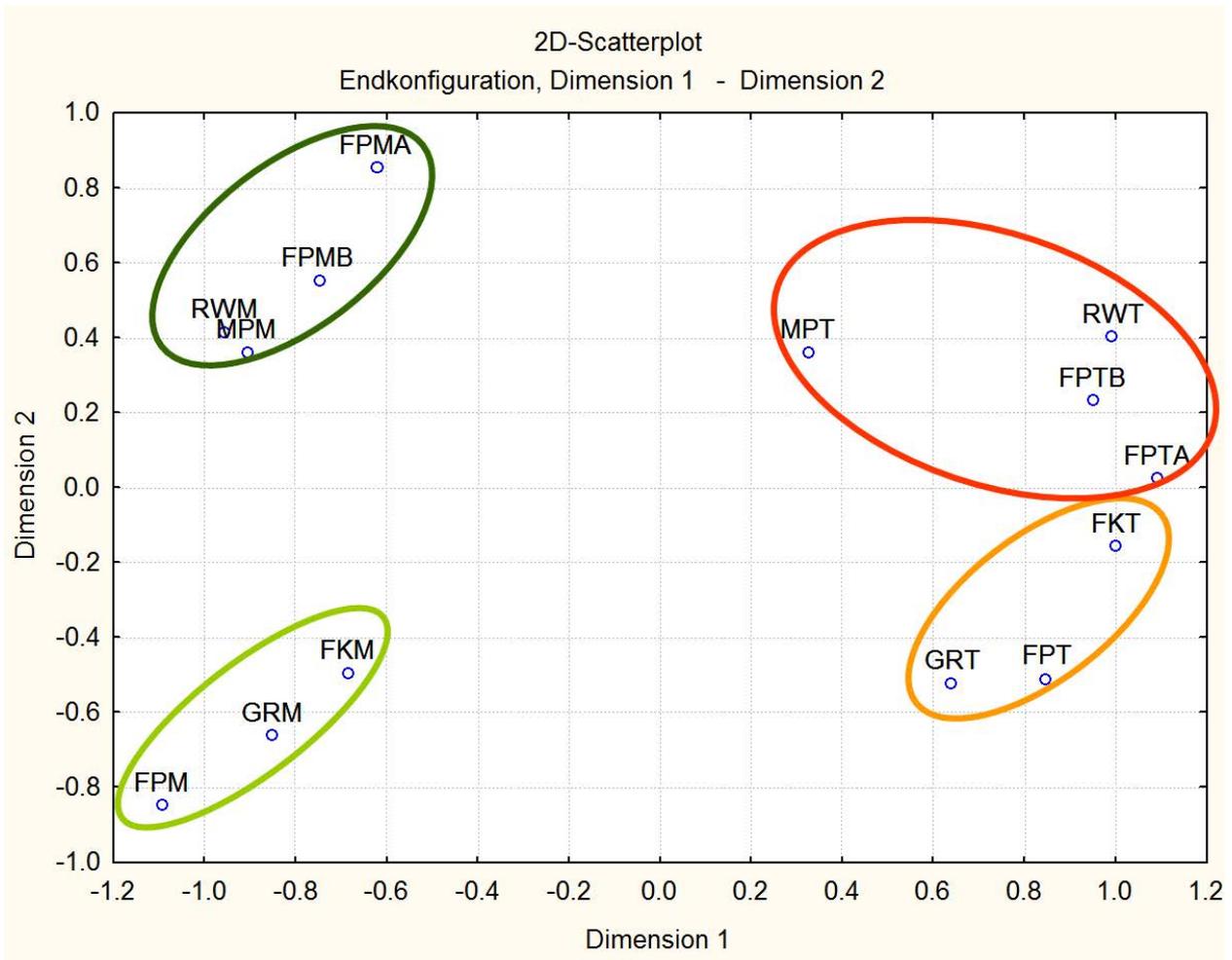


Abbildung 19: Multidimensionale Skalierung der BRAY-CURTIS Ähnlichkeitsindizes aus **Tabelle 13**. Die BRAY-CURTIS Ähnlichkeitsindizes wurden auf der Grundlage der ermittelten OTUs errechnet. Der relative Abstand zweier Datenpunkte verdeutlicht die Unterschiedlichkeit der untersuchten Reaktorproben (s. **Tabelle 13**) hinsichtlich der Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Gemeinschaft. Alle 16S rRNA Genbibliotheken, die in einem farbig markierten Kreis zusammengefasst sind, stammen von einem Reaktorsystem (dunkelgrün = CSTR-System, mesophil; orange = CSTR-System, thermophil; hellgrün = Bioleaching-System, mesophil; gelb = Bioleaching-System, thermophil). OTU = *operational taxonomic unit*.

Analyse des mikrobiellen Metagenoms anhand zweier ausgewählter Biofilmproben aus dem Bioleaching-System

Für zwei Biofilmproben aus dem Festbettreaktor im Bioleaching-System unter mesophiler (FKM) und thermophiler Betriebsweise (FKT) wurde eine Analyse des mikrobiellen Metagenoms durchgeführt. Die Entnahme der Polyethylenfüllkörper erfolgte zeitgleich mit dem Versuchsende für die Erfassung der archaeellen Diversität bei konstanter Raumbelastung (Probenahmetag 72, vgl. Kap. II.1.3). Alle Informationen zur Reaktorfahrweise und zur Analytik der Reaktorchemie wurden bereits in jenem Kapitel ausführlich dargestellt und diskutiert.

Die Hochdurchsatz-Sequenzierung erfolgte in Kooperation mit der IIT GMBH, Geschäftsbereich BioTech, Bielefeld, und dem CENTER FOR BIOTECHNOLOGY (CeBiTec), UNIVERSITÄT BIELEFELD. Beide Metagenomerfassungen wurden auf einer MiSeq Personal Sequencer Plattform der Firma Illumina durchgeführt, da dieses System einen wesentlich höheren Anteil an Sequenzdaten liefert als die ursprünglich vorgesehene GS FLX Plattform von ROCHE APPLIED SCIENCE. Durch den erhöhten Datenumfang wurde die Entwicklung eines neuen Softwarepaketes (MGX-Software) durch das CeBiTec notwendig, um eine optimale Bearbeitung der Sequenzdaten zu gewährleisten.

Insgesamt konnten für beide Biofilme 8.483.036 (FKT) bzw. 11.130.967 (FKM) Sequenzfragmente (*reads*) aufgenommen werden (**Tabelle 14**). Für die Identifizierung der ermittelten *reads* wurde die naive Methode der *lowest common ancestor* (LCA) Analyse verwendet. Diese Analyse bezieht sich auf alle Sequenzinformationen, die in der NCBI Datenbank zusammengestellt sind. Unter Zuhilfenahme dieses Auswertmoduls konnten insgesamt 2.135.302 (FKT) und 2.517.452 (FKM) *reads* einzelnen taxonomischen Einheiten zugeordnet werden. Dieses entspricht einer Identifizierung von 25,17% (FKT) bzw. 22,62% (FKM) aller erhaltenen *reads*.

Tabelle 14: Ermittelte und identifizierte DNA-Sequenzen (*reads*) für das mikrobielle Metagenom der Biofilmproben des Festbettreaktors im Bioleaching-System unter mesophiler (FKM) und thermophiler (FKT) Temperaturführung.

| | FKT | | FKM | |
|-----------------------------------|---------|----------------|----------|----------------|
| | Reads | Verteilung [%] | Reads | Verteilung [%] |
| Reads (Gesamt) | 8483036 | 100,00 | 11130967 | 100,00 |
| Identifizierte reads (LCA) | 2135302 | 25,17 | 2517452 | 22,62 |

Auch wenn der Anteil an identifizierten *reads* verhältnismäßig gering erscheint, so konnte aufgrund eines verbesserten biomathematischen Auswertmoduls eine deutliche Steigerung in der Zuordnung gegenüber älteren Arbeiten erzielt werden. So konnten RADEMACHER *et al.* [2012b], welche die bakterielle Gemeinschaft in Biofilmen eines thermo-

philen Bioleaching-Systems mittels 454-Pyrosequenzierung untersuchten, lediglich 10% aller sequenzierten *reads* einer taxonomischen Einheit zuordnen.

Die meisten der ermittelten *reads* umfassten Sequenzlängen zwischen 303 und 318 bp (FKM) bzw. 280 und 293 bp (FKT) (**Abbildung 20**). Dabei lagen die durchschnittlichen Sequenzlängen des Biofilms, welcher unter thermophilen Temperaturbedingungen gebildet wurde, deutlich höher als die des Biofilms unter mesophiler Temperaturführung.

Je länger ein detektiertes Sequenzfragment ist, umso genauer lässt sich dieses einer bestimmten taxonomischen Einheit zuordnen. Voraussetzung dafür ist, dass die gebildete Sequenz einem bereits bekannten Mikroorganismus zugeordnet werden kann. Dieses könnte einer der Gründe dafür sein, dass aus dem Biofilm des thermophilen Reaktorsystems ein höherer Anteil an *reads* mit der LCA Analyse identifiziert werden konnte (vgl. **Tabelle 14, Abbildung 20**).

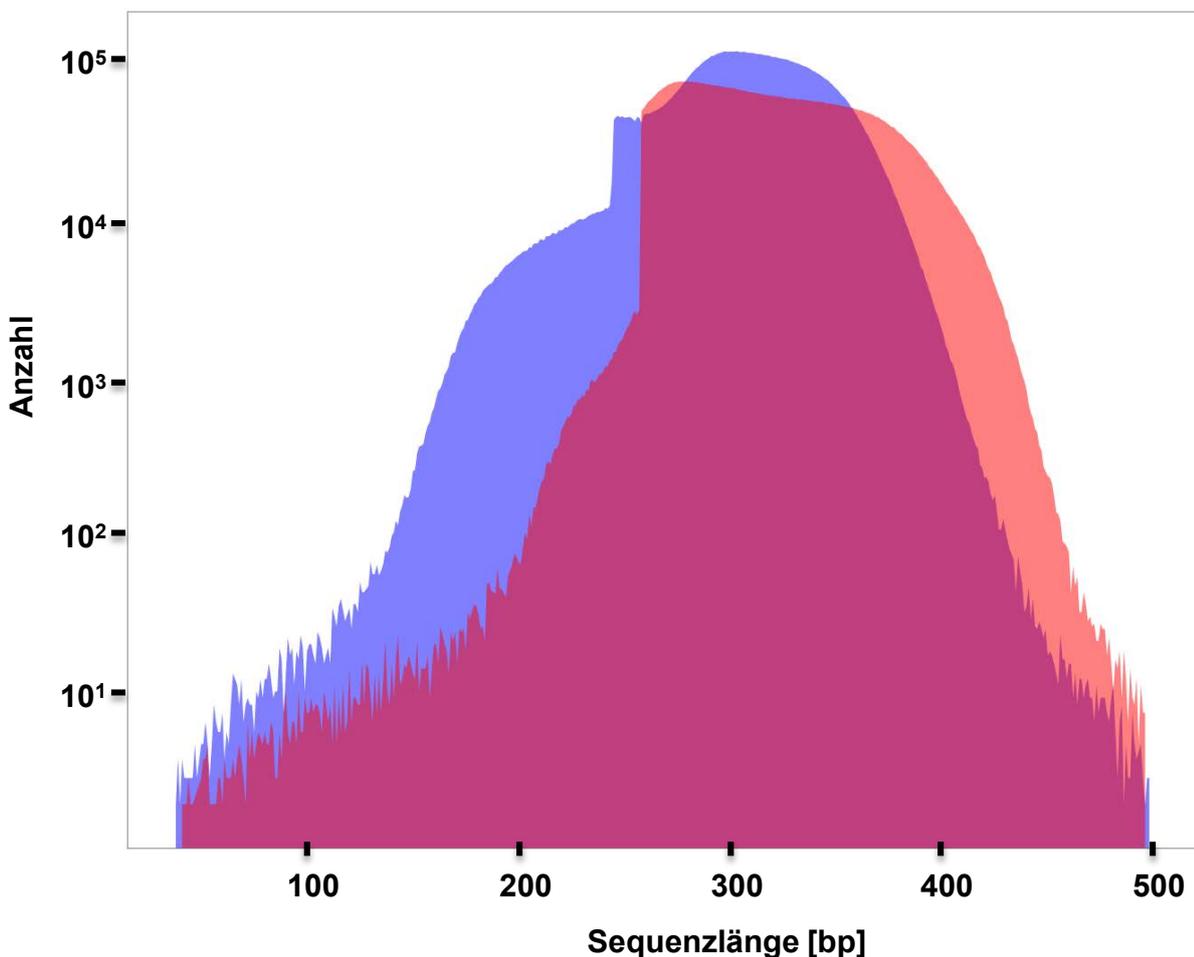


Abbildung 20: Längenverteilung der ermittelten DNA-Sequenzen (*reads*) aus den Biofilmproben unter mesophilen (FKM, blau) und thermophilen (FKT, rot) Temperaturbedingungen. FKM = Biofilm des Polyethylenfüllkörpers, mesophil; FKT = Biofilm des Polyethylenfüllkörpers, thermophil.

Tabelle 15: Verteilung der in dem mesophilen (FKM) und thermophilen (FKT) Biofilm des Festbettreaktors im Bioleaching-System vorherrschenden mikrobiellen Ordnungen. LCA = *lowest common ancestor* Analyse.

| Mesophiler Biofilm (FKM) | | | Thermophiler Biofilm (FKT) | | |
|--------------------------------|-----------|-------|--------------------------------|-----------|-------|
| Taxonomische Zuordnung | LCA Hits | | Taxonomische Zuordnung | LCA Hits | |
| Methanosarcinales | 1.833.588 | 72,8% | Methanosarcinales | 1.402.559 | 65,7% |
| Methanomicrobiales | 68.554 | 2,7% | Methanobacteriales | 141.266 | 6,6% |
| Methanobacteriales | 2.375 | 0,1% | Methanomicrobiales | 31.395 | 1,5% |
| | | | Methanococcales | 1.886 | 0,1% |
| Actinomycetales | 62.259 | 2,5% | Clostridiales | 203.339 | 9,5% |
| Syntrophobacteriales | 58.619 | 2,3% | Synergistales | 58.264 | 2,7% |
| Clostridiales | 42.900 | 1,7% | Bacillales | 13.118 | 0,6% |
| Burkholderiales | 11.915 | 0,5% | Thermoanaerobacteriales | 11.579 | 0,5% |
| Rhizobiales | 9.773 | 0,4% | Actinomycetales | 8.961 | 0,4% |
| Desulfuromonadales | 8.711 | 0,3% | Thermotogales | 5.840 | 0,3% |
| Bacillales | 7.106 | 0,3% | Rhizobiales | 4.644 | 0,2% |
| Desulfovibrionales | 5.415 | 0,2% | Lactobacillales | 2.858 | 0,1% |
| Bacteroidales | 5.045 | 0,2% | Burkholderiales | 2.856 | 0,1% |
| Pseudomonadales | 4.667 | 0,2% | Nitrospirales | 2.485 | 0,1% |
| Enterobacteriales | 4.440 | 0,2% | Enterobacteriales | 1.889 | 0,1% |
| Myxococcales | 4.349 | 0,2% | Spirochaetales | 1.536 | 0,1% |
| Desulfobacteriales | 4.137 | 0,2% | Desulfobacteriales | 1.388 | 0,1% |
| Spirochaetales | 3.842 | 0,2% | Pseudomonadales | 1.088 | 0,1% |
| Flavobacteriales | 3.565 | 0,1% | Fusobacteriales | 1.041 | 0,0% |
| Thermoanaerobacteriales | 3.559 | 0,1% | Nostocales | 908 | 0,0% |
| Rhodospirillales | 2.736 | 0,1% | Galliformes | 897 | 0,0% |
| Lactobacillales | 2.688 | 0,1% | Desulfuromonadales | 880 | 0,0% |
| Thermotogales | 2.668 | 0,1% | Flavobacteriales | 858 | 0,0% |
| Cytophagales | 2.170 | 0,1% | Chroococcales | 843 | 0,0% |
| Planctomycetales | 2.167 | 0,1% | Halanaerobiales | 841 | 0,0% |
| Chromatiales | 2.160 | 0,1% | | | |

Anhand aller identifizierten *reads* konnte für beide Biofilmproben ein Archaea zu Bacteria Verhältnis von 3 zu 1 ermittelt werden. Der deutlich höhere Anteil an Archaeasequenzen könnte zum einen auf ein zahlenmäßiges Übergewicht methanogener Archaea in den untersuchten Biofilmen hinweisen. Andererseits kann hierfür auch eine Ungleichverteilung bekannter bzw. beschriebener Arten in der NCBI Genbank ursächlich sein. So kann davon ausgegangen werden, dass für die vergleichsweise kleine Gruppe methanogener Euryarchaeota die meisten Arten bereits beschrieben sind, während der Großteil anaerober Bacteria noch als unbekannt bzw. auf genetischer Ebene als nicht ausreichend charakterisiert gelten muss. Dementsprechend ist die Wahrscheinlichkeit eine Sequenz von einem methanogenen Archaea zu identifizieren wahrscheinlich deutlich größer als eine Sequenz einem fermentativen Bakterium zu ordnen zu können. So konnten dann auch in dieser Studie 75% aller ermittelten Sequenzen keiner konkreten

taxonomischen Einheit zugeordnet werden. Insofern stellt das Archaea zu Bacteria Verhältnis hier nur ein relatives Maß dar.

Im thermophilen Biofilm dominierten auf der taxonomischen Ebene der Ordnung Vertreter der Methanosarcinales (FKT = 65,68%) (**Tabelle 15**). Innerhalb dieser Ordnung entfielen 63,77% auf die Gattung der *Methanosarcina*. Damit wurden die Ergebnisse der 16S rRNA Sequenzanalyse und des Q-PCR-Assays bestätigt (vgl. Kap. II.1.3). Das Vorkommen dieser Gattung in Biofilmen thermophiler Biogasreaktoren eine besondere Bedeutung zukommt, konnten bereits RADEMACHER *et al.* [2012b] zeigen. Auch hier stellte *Methanosarcina* mit 31,30% aller identifizierten reads den größten Anteil innerhalb der methanogenen Archaea-Gemeinschaft.

Neben *Methanosarcina* konnten im Biofilm auch noch Vertreter der Gattungen *Methanothermobacter* (FKT = 6,12%) und *Methanoculleus* (FKT = 1,35%) in größeren Anteilen nachgewiesen werden (**Tabelle 16**). Interessanterweise scheinen insgesamt aber nur vergleichsweise wenige Arten am Methanbildungsprozess beteiligt zu sein. Der Biofilm scheint somit eine sehr spezialisierte mikrobielle Gemeinschaft mit wahrscheinlich optimierten biochemischen Umsatzraten zu enthalten.

Innerhalb der Gruppe der fermentativen Bacteria entfielen die meisten Nachweise auf die Gattungen *Clostridium* (FKT = 8,11%), *Anaerobaculum* (FKT = 2,70%), *Microvirus* (FKT = 0,41%), *Bacillus* (FKT = 0,37%) und *Syntrophothermus* (FKT = 0,31%). Dass den Clostridien eine besondere Bedeutung beim anaeroben Abbau organischen Materials in Biogasreaktoren zukommt, ist seit längerem bekannt [ZVERLOV *et al.* 2010, DOHRMANN *et al.* 2011, WESTERHOLM *et al.* 2012]. Zudem konnte für *Clostridium ultunense* gezeigt werden, dass er in syntropher Wechselwirkung mit hydrogenotrophen Methanogenen steht [SCHNÜRER *et al.* 1996]. Gerade in Biofilmen sind solche Syntrophien von entscheidender Bedeutung, um einen möglichst schnellen und effizienten Substratabbau gewährleisten zu können.

Auch im mesophilen Biofilm dominierten die Vertreter der Methanosarcinales (FKM = 72,84%) (**Tabelle 15**). Allerdings entfielen in diesem Biofilm nur 1,14% aller identifizierter reads auf die Gattung der *Methanosarcina* (**Tabelle 16**). Mit 71,51% war *Methanosaeta* die vorherrschende methanogene Gattung. Dieses Ergebnis unterstreicht das bevorzugte Vorkommen von *Methanosaeta* in Biofilmen mesophiler Reaktorsysteme und bestätigt ebenfalls die Befunde der 16S rRNA Sequenzanalyse und des Q-PCR-Assays (vgl. Kap. II.1.3).

Neben *Methanosaeta* und *Methanosarcina* konnten im Biofilm des mesophilen Reaktorsystems als weitere methanbildende Mikroorganismen noch Vertreter der Gattungen *Methanoculleus* (FKM = 2,37%) und *Methanospirillum* (FKM = 0,20%) nachgewiesen werden.

Tabelle 16: Verteilung der in dem mesophilen (FKM) und thermophilen (FKT) Biofilm des Festbettreaktors im Bioleaching-System vorherrschenden mikrobiellen Gattungen. LCA = *lowest common ancestor* Analyse.

| Mesophiler Biofilm (FKM) | | | Thermophiler Biofilm (FKT) | | |
|-------------------------------|-----------|-------|------------------------------|-----------|-------|
| Taxonomische Zuordnung | LCA Hits | | Taxonomische Zuordnung | LCA Hits | |
| <i>Methanosaeta</i> | 1.800.251 | 71,5% | <i>Methanosarcina</i> | 1.361.664 | 63,8% |
| <i>Methanoculleus</i> | 59.680 | 2,4% | <i>Methanothermobacter</i> | 130.701 | 6,1% |
| <i>Methanosarcina</i> | 28.771 | 1,1% | <i>Methanoculleus</i> | 28.855 | 1,4% |
| <i>Methanospirillum</i> | 4.959 | 0,2% | <i>Methanosaeta</i> | 6.042 | 0,3% |
| | | | <i>Methanobacterium</i> | 3.088 | 0,1% |
| | | | <i>Methanobrevibacter</i> | 2.126 | 0,1% |
| | | | <i>Methanosalsum</i> | 1.742 | 0,1% |
| | | | <i>Methanohalophilus</i> | 1.313 | 0,1% |
| | | | <i>Methanococcus</i> | 1.070 | 0,1% |
| | | | <i>Methanothermus</i> | 1.057 | 0,0% |
| <i>Syntrophus</i> | 56.711 | 2,3% | <i>Clostridium</i> | 173.088 | 8,1% |
| <i>Clostridium</i> | 17.208 | 0,7% | <i>Anaerobaculum</i> | 57.646 | 2,7% |
| <i>Geobacter</i> | 5.550 | 0,2% | <i>Microvirus</i> | 8.774 | 0,4% |
| <i>Streptomyces</i> | 4.075 | 0,2% | <i>Bacillus</i> | 7.985 | 0,4% |
| <i>Desulfovibrio</i> | 3.977 | 0,2% | <i>Syntrophothermus</i> | 6.545 | 0,3% |
| <i>Propionibacterium</i> | 3.782 | 0,2% | <i>Petrotoga</i> | 3.875 | 0,2% |
| <i>Pseudomonas</i> | 3.643 | 0,1% | <i>Thermoanaerobacter</i> | 2.351 | 0,1% |
| <i>Bacillus</i> | 3.130 | 0,1% | <i>Thermoanaerobacterium</i> | 2.292 | 0,1% |
| <i>Cellulosilyticum</i> | 3.113 | 0,1% | <i>Coprothermobacter</i> | 2.179 | 0,1% |
| <i>Microvirus</i> | 2.985 | 0,1% | <i>Thermodesulfovibrio</i> | 2.056 | 0,1% |
| <i>Candidatus Cloacamonas</i> | 2.915 | 0,1% | <i>Desulfotomaculum</i> | 1.903 | 0,1% |
| <i>Saccharomonospora</i> | 2.906 | 0,1% | <i>Pelotomaculum</i> | 1.586 | 0,1% |
| <i>Pelobacter</i> | 2.824 | 0,1% | <i>Saccharomonospora</i> | 1.404 | 0,1% |
| <i>Corynebacterium</i> | 2.594 | 0,1% | <i>Cellulosilyticum</i> | 1.147 | 0,1% |
| <i>Mycobacterium</i> | 2.553 | 0,1% | <i>Streptococcus</i> | 1.034 | 0,0% |
| <i>Burkholderia</i> | 2.426 | 0,1% | | | |
| <i>Desulfotomaculum</i> | 2.376 | 0,1% | | | |
| <i>Arthrobacter</i> | 1.989 | 0,1% | | | |
| <i>Bacteroides</i> | 1.904 | 0,1% | | | |
| <i>Sphaerochaeta</i> | 1.622 | 0,1% | | | |
| <i>Mesotoga</i> | 1.494 | 0,1% | | | |

Beim Vergleich der 25 vorherrschenden Gattungen beider Biofilme wird deutlich, dass im Biofilm des thermophilen Reaktorsystems 10 Gattungen für methanogene Archaea gefunden wurden. Im Biofilm des mesophilen Reaktorsystems konnten dagegen lediglich vier Gattungen den Methanogenen zugeschrieben werden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die methanogene Vielfalt im Biofilm unter thermophilen Temperaturbedingungen höher ist als unter mesophiler Temperaturführung (**Tabelle 16**). Diese Behauptung wird durch die Ergebnisse der 16S rRNA Klonierung und Sequenzierung gestützt. Hier lag der SHANNON Index für die methanogene Diversität des entstandenen Biofilms unter thermophiler Temperaturführung bei 1,44, wohingegen im Biofilm des

mesophilen Reaktorsystems nur ein Wert von 1,19 erreicht werden konnte (vgl. Kap. II.1.3).

Für fermentative Bacteria wurden im Biofilm des mesophilen Reaktorsystems Vertreter der Gattungen *Syntrophus* (FKM = 2,25%), *Clostridium* (FKM = 0,68%) und *Geobacter* (FKM = 0,22%) am häufigsten nachgewiesen. Bereits früher konnten DOJKA *et al.* [1998] einen engen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *Syntrophus* und *Methanosaeta* in einem kohlenwasserstoff- und chlorbelastetem Wasserversorgungssystem feststellen. Sie vermuteten hierbei eine syntrophe Wechselwirkung beider Organismengruppen. Diese Erkenntnis wird durch die Ergebnisse der Metagenomanalyse bekräftigt, da auch hier sowohl *Methanosaeta* in der Domäne der Archaea als auch *Syntrophus* in der Domäne der Bacteria, die jeweils vorherrschenden Gattungen sind. Somit scheint der Syntrophie zwischen *Syntrophus* und *Methanosaeta* eine besondere Bedeutung in Biofilmen mesophiler Reaktorsysteme beizukommen.

Um eine phylogenetische Klassifizierung der wichtigsten Proteine des Methanogenese-stoffwechsels durchführen zu können, wurden die erhaltenen *reads* der Metagenomanalyse in *clusters of orthologous groups of proteins* (COGs) Kategorien eingeteilt und anschließend ausgewertet [MULLER *et al.* 2010]. Für die Einteilung und die anschließende Analyse der COGs wurde die Datenbank NCBI Genbank verwendet. Die Ergebnisse der COG Analyse sind in **Tabelle 17** zusammengefasst.

Sowohl für die acetoklastische als auch für die hydrogenotrophe Methanogenese konnten in beiden Biofilmen charakteristische COGs nachgewiesen werden. Der hydrogenotrophe Stoffwechsel ist vor allem durch die Enzyme Formylmethanofuran-Dehydrogenase (Untereinheiten A-E) und Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase (Untereinheiten A-H) gekennzeichnet. In beiden Biofilmen waren die relativen Anteile dieser Enzyme in Relation zur Summe aller identifizierten COGs nahezu identisch.

Die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase ist typischer Bestandteil der acetoklastischen Methanogenese. Auch für diese Proteinfamilie konnten keine gravierenden Unterschiede zwischen mesophiler bzw. thermophiler Temperaturführung beobachtet werden. Interessanterweise waren aber die Proteine der acetoklastischen Methanogenese im mesophilen Biofilm nicht überproportional vertreten, obwohl in den vorherigen Untersuchungen Vertreter der acetoklastischen *Methanosaeta* als eindeutig dominierende Gattung im mesophilen Biofilm nachgewiesen werden konnten.

Zusammenfassend lassen sich weder Unterschiede in der Proteinzusammensetzung von Biofilmen aus mesophilen und thermophilen Reaktorsystemen noch Unterschiede hinsichtlich des bevorzugten Methanbildungsweges feststellen.

Tabelle 17: In dem mesophilen (FKM) und thermophilen (FKT) Biofilm des Festbettreaktors im Bioleaching-System identifizierte COG Kategorien für die Methanogenese. COG = *clusters of orthologous groups of proteins*.

| COG- Nummer | Motiv / Funktion | Zugeordnete Sequenzen | | | |
|---|--|-----------------------------|----------|-------------------------------|----------|
| | | Mesophiler Biofilm (FKM) | | Thermophiler Biofilm (FKT) | |
| Hydrogenotrophe Methanogenese | | | | | |
| COG1229 | Formylmethanofuran-Dehydrogenase, Untereinheit A | 1.874 | 0,0003% | 3.422 | 0,0006% |
| COG1029 | Formylmethanofuran-Dehydrogenase, Untereinheit B | 2.367 | 0,0004% | 7.076 | 0,0012% |
| COG2218 | Formylmethanofuran-Dehydrogenase, Untereinheit C | 1.692 | 0,0003% | 3.691 | 0,0006% |
| COG1153 | Formylmethanofuran-Dehydrogenase, Untereinheit D | 679 | 0,0001% | 2.316 | 0,0004% |
| COG2191 | Formylmethanofuran-Dehydrogenase, Untereinheit E | 1.874 | 0,0003% | 3.422 | 0,0006% |
| COG5643 | <i>Protein containing a metal-binding domain shared with formylmethanofuran dehydrogenase subunit E</i> | 1.567 | 0,0003% | 3.965 | 0,0007% |
| COG2037 | Formylmethanofuran:Tetrahydromethanopterin-Formyltransferase | 1.112 | 0,0002% | 2.639 | 0,0005% |
| COG4074 | H ₂ -freisetzende N5,N10-Methylen tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase | 21 | <0,0001% | 384 | <0,0001% |
| COG4063 | Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase, Untereinheit A | 936 | 0,0002% | 2.408 | 0,0004% |
| COG4062 | Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase, Untereinheit B | 271 | <0,0001% | 610 | 0,0001% |
| COG4061 | Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase, Untereinheit C | 604 | 0,0001% | 1.688 | 0,0003% |
| COG4060 | Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase, Untereinheit D | 594 | <0,0001% | 1.554 | 0,0003% |
| COG4059 | Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase, Untereinheit E | 793 | 0,0001% | 1.821 | 0,0003% |
| COG4218 | Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase, Untereinheit F | 170 | <0,0001% | 445 | <0,0001% |
| COG4064 | Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase, Untereinheit G | 260 | <0,0001% | 495 | <0,0001% |
| COG1962 | Tetrahydromethanopterin-S-Methyltransferase, Untereinheit H | 1.512 | 0,0003% | 3.920 | 0,0007% |
| COG3252 | Methenyltetrahydromethanopterin-Cyclohydrolase | 1.044 | 0,0002% | 2.472 | 0,0004% |
| COG3259 | Coenzym F420 reduzierende Hydrogenase, α-Untereinheit | 1.671 | 0,0003% | 4.114 | 0,0007% |
| COG1035 | Coenzym F420 reduzierende Hydrogenase, β-Untereinheit | 2.294 | 0,0004% | 6.234 | 0,0011% |
| COG1941 | Coenzym F420 reduzierende Hydrogenase, γ-Untereinheit | 982 | 0,0002% | 2.381 | 0,0004% |
| COG1908 | Coenzym F420 reduzierende Hydrogenase, δ-Untereinheit | 3.328 | 0,0006% | 4.467 | 0,0008% |
| COG2141 | Coenzym F420 abhängige N5,N10-Methylen tetrahydro-methanopterin-Reduktase und verwandte Flavin-abhängige Oxidoreduktasen | 1.981 | 0,0003% | 4.246 | 0,0007% |
| COG1927 | Coenzym F420 abhängige N5,N10-Methenyltetrahydro-methanopterin-Dehydrogenase | 770 | 0,0001% | 1.912 | 0,0003% |
| Hydrogenotrophe und acetoklastische Methanogenese | | | | | |
| COG4058 | Methyl-Coenzym-M-Reduktase, α-Untereinheit | 1.501 | 0,0003% | 3.939 | 0,0007% |
| COG4054 | Methyl-Coenzym-M-Reduktase, β-Untereinheit | 1.291 | 0,0002% | 3.349 | 0,0006% |
| COG4057 | Methyl-Coenzym-M-Reduktase, γ-Untereinheit | 740 | 0,0001% | 1.537 | 0,0003% |
| COG4056 | Methyl-Coenzym-M-Reduktase, Untereinheit C | 545 | <0,0001% | 1.182 | 0,0002% |
| COG4052 | <i>Uncharacterized protein related to methyl coenzyme M reductase, subunit C</i> | 730 | 0,0001% | 1.839 | 0,0003% |
| COG4055 | Methyl-Coenzym-M-Reduktase, Untereinheit D | 416 | <0,0001% | 1.026 | 0,0002% |
| Acetoklastische Methanogenese | | | | | |
| COG282 | Acetat-Kinase | 2.121 | 0,0004% | 3.261 | 0,0006% |
| COG1152 | CO-Dehydrogenase / Acetyl-CoA-Synthase, α-Untereinheit | 2.438 | 0,0004% | 4.093 | 0,0007% |
| COG1614 | CO-Dehydrogenase / Acetyl-CoA-Synthase, β-Untereinheit | 2.316 | 0,0004% | 2.733 | 0,0005% |
| COG1456 | CO-Dehydrogenase / Acetyl-CoA-Synthase, γ-Untereinheit (Corrinoid-Fe-S-Protein) | 2.359 | 0,0004% | 2.811 | 0,0005% |
| COG2069 | CO-Dehydrogenase / Acetyl-CoA-Synthase, δ-Untereinheit (Corrinoid-Fe-S-Protein) | 1.706 | 0,0003% | 2.459 | 0,0004% |
| COG1880 | CO-Dehydrogenase / Acetyl-CoA-Synthase, ε-Untereinheit | 579 | 0,0001% | 805 | 0,0001% |
| COG3640 | CO-Dehydrogenase-Reifungsfaktor | 3.179 | 0,0006% | 4.613 | 0,0008% |
| Energieerzeugung in Zusammenhang mit der Methanogenese | | | | | |
| COG1148 | Heterodisulfid-Reduktase, Untereinheit A und verwandte Polyferredoxine | 7.229 | 0,0013% | 6.559 | 0,0012% |
| COG2048 | Heterodisulfid-Reduktase, Untereinheit B | 1.916 | 0,0003% | 3.730 | 0,0007% |
| COG1150 | Heterodisulfid-Reduktase, Untereinheit C | 1.185 | 0,0002% | 2.333 | 0,0004% |

II.1.4 Entwicklung von neuen Oligonukleotidsonden zur mikroskopischen Analyse von Biofilmen

Basierend auf den Ergebnissen der 16S rRNA Sequenzanalyse sollte ein neues Set an Oligonukleotidsonden für die FISH erstellt werden. Die Entwicklung neuer SONDENSYSTEME gewährleistet eine umfassende Detektion der in den Biogasreaktoren auftretenden methanogenen Archaea. Das Kernziel dieser Versuchsreihe bestand darin, eine Quantifizierung aller im Biofilm und in der Prozessflüssigkeit vorhandenen methanogenen Archaea, entweder entsprechend ihrer jeweiligen Stoffwandlungseigenschaften (acetotrophe bzw. hydrogenotrophe Methanogenese) oder nach taxonomischen Einheiten (klassen-, ordnungs-, familienspezifisch), zu erreichen.

Zunächst erfolgte ein Abgleich aller gewonnenen 16S rRNA Genfragmente mit bereits publizierten Oligonukleotidsonden (**Tabelle 18**). In den 14 angefertigten 16S rRNA Genbibliotheken konnten 2.325 Sequenzen der Domäne Archaea zugeordnet werden. Ein Abgleich mit der Archaea-spezifischen Oligonukleotidsonde ARC915 ergab eine vollständige Übereinstimmung mit 2.319 16S rRNA Gensequenzen. In lediglich sechs Sequenzen konnten Unterschiede zur Basenabfolge der ARC915 Oligonukleotidsonde festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass unter der Anwendung dieser von STAHL & AMANN [1990] entwickelten Oligonukleotidsonde nahezu alle bisher bekannten Archaea in Biogasreaktoren detektiert werden können. Die Entwicklung eines neuen SONDENSYSTEMS ist somit nicht erforderlich.

Auch für die aus den 16S rRNA Genbibliotheken ermittelten Sequenzen der Methanosarcinaceae konnte eine nahezu vollständige Übereinstimmung aller gewonnenen 16S rRNA Genfragmente mit dem MS821 SONDENSYSTEM (Zielgruppe = Methanosarcinaceae) erreicht werden. Insgesamt konnten dieser methanogenen Familie 334 16S rRNA Gensequenzen zugeschrieben werden, wobei nur lediglich eine Sequenz deutliche Unterschiede in der Oligonukleotidabfolge im Vergleich zum MS821 SONDENSYSTEM aufwies.

Der von RASKIN *et al.* [1994] entwickelten spezifischen Oligonukleotidsonde für die Methanosaetaceae konnten 669 der insgesamt 721 ermittelten Methanosaetaceae-zugehörigen 16S rRNA Gensequenzen zugeordnet werden. In 51 16S rRNA Genfragmenten konnte der Unterschied eines Oligonukleotids festgestellt werden (vgl. **Tabelle 18**). Durch die Anwendung einer Sondenmischung aus MX825 und einer modifizierten MX825 Oligonukleotidsonde an der 11. Basenposition (Adenin ersetzt Guanin) können nahezu alle bislang bekannten Methanosaetaceae in Biogassystemen detektiert werden. Aufgrund dessen kann auch für diese methanogene Familie auf die Entwicklung einer neuen Oligonukleotidsonde verzichtet werden.

Tabelle 18: Oligonukleotidabgleich aller ermittelten 16S rRNA Gensequenzen aus den Genbibliotheken mit bereits publizierten, gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden. bp = Basenpaare, NA = Sondenposition liegt außerhalb des amplifizierten Bereiches des 16S rRNA Genfragmentes. [] = Position eines Oligonukleotidunterschiedes zwischen 16S rRNA Genfragment und Oligonukleotidsonde.

| Sonde | Sequenz [5' → 3'] | Sondenlänge [bp] | Fehlpaarungen mit Sequenzen aus 16S rRNA Genbibliotheken | Anzahl ermittelter aus 16S rRNA | Zielgruppe | Referenz |
|--------|---------------------------------|---------------------|---|------------------------------------|------------------------------|---|
| MX825 | GCT AGG TGT CCG CCA CGG TGC GA | 23 | MX825 [11] MX825 [10;15] | 669 51 1 | <i>Methanosaeetaceae</i> | Raskin et al. 1994, Crocetti et al. 2006 |
| | GCT AGG TGT CCG CCA CGG TGC GA | | | | | |
| | GCT AGG TGT TAG CCA CGG TGC GA | | | | | |
| | GCT AGG TGT TGG CCC CGG TGC GA | | | | | |
| MS821 | GCT CGC TAG GTG TCA GGC ATG GCG | 24 | MS821 > 5 | 333 1 | <i>Methanosarcinaceae</i> | Raskin et al. 1994 |
| | GCT CGC TAG GTG TCA GGC ATG GCG | | | | | |
| MB311 | GGA GAT GGA ACC TGA GAC AAG GT | 23 | MB310 [5;9;10;11;23] | 871 17 | <i>Methanobacteriales I</i> | Raskin et al. 1994 (modifiziert MB310) |
| | GGA GAT GGA ACC TGA GAC AAG GT | | | | | |
| | GGA GTT GGG GAC TGA GAC AAG GC | | | | | |
| MB1174 | GAG GAA GGA GTG GAC GAC GGT A | 21 | NA | 888 | <i>Methanobacteriales II</i> | Raskin et al. 1994 |
| MG1200 | CAG CAT GCC CCG AAT TAT CCG | 21 | NA | 381 | <i>Methanomicrobiales</i> | Raskin et al. 1994 |
| ARC915 | AGG AAT TGG CCG GGG AGC AC | 20 | ARC915 [1;3;5] ARC915 [15] ARC915 [16;17;18;19;20] ARC915 [1;3;4;15] ARC915 > 5 | 2319 1 1 1 1 2 | <i>Archaea</i> | Stahl & Amann 1990 |
| | AGG AAT TGG CCG GGG AGC AC | | | | | |
| | GGA ATT TGG CCG GGG AGC AC | | | | | |
| | AGG AAT TGG CCG GG- AGC AC | | | | | |
| | AGG AAT TGG CCG GGG GAG C- | | | | | |
| | CG- -AT TGG CCG GG- AGC AC | | | | | |

Die Detektion der Methanobacteriales kann weitestgehend durch das Sondensystem MB311 abgedeckt werden. 871 der insgesamt 888 den Methanobacteriales zugeschriebenen 16S rRNA Sequenzen fanden eine identische Übereinstimmung mit diesem Sondensystem. 17 Sequenzen wiesen fünf Oligonukleotidunterschiede in der Sequenzabfolge im Vergleich zur MB311 Sonde auf. Somit ist auch für das vollständige Detektieren aller am Biogasbildungsprozess beteiligten Methanobacteriales die Anwendung eines SONDENGEMISCHES, bestehend aus der MB311 und einer MB311 modifizierten Oligonukleotidsonde, von Vorteil.

Für die MG1200 Oligonukleotidsonde (Zielgruppe = Methanomicrobiales) konnte kein Abgleich mit den gewonnenen Sequenzen aus den 16S rRNA Genbibliotheken erfolgen, da sich die Sondenposition außerhalb des in dieser Studie untersuchten Bereichs des 16S rRNA Genfragmentes befand. Da allerdings die MG1200 Oligonukleotidsonde aus 16S rRNA Gensequenzen der methanogenen Gattungen *Methanomicrobium*, *Methanogenium*, *Methanoculleus*, *Methanospirillum*, *Methanocorpusculum* und *Methanoplanus* abgeleitet wurde, welches auch die vorherrschenden Gattungen im Biogasreaktor waren, ist davon auszugehen, dass auch dieses Sondensystem nahezu alle wichtigsten Vertreter der Methanomicrobiales detektiert.

Der Abgleich aller gewonnenen Sequenzen aus der Analyse der 16S rRNA Genbibliotheken mit den bereits publizierten gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden der methanogenen Archaea zeigte, dass der größte Anteil an vorherrschenden Methanogenen im Biogasreaktor mit den bekannten Sondensystemen nachgewiesen werden kann. Die Entwicklung von neuen Oligonukleotidsonden erscheint aufgrund dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung des aktuellen Wissensstands nicht notwendig.

II.1.5 Materialstudien zur Entwicklung von neuen Füllkörpern

Die Materialstudie zur Eignung bestimmter Aufwuchsmaterialien zur Bildung von Biofilmen wurde zunächst in klassischen **Rührkesselreaktoren (CSTR)** durchgeführt. Acht unterschiedliche Materialien, welche beim Bau von Reaktorkonstruktionen häufig Anwendung finden, wurden dabei näher untersucht (**Abbildung 21A**). Um möglichst gleiche Ausgangsbedingungen in der Reinheit der Oberflächenstrukturen der einzelnen Werkstoffe gewährleisten zu können, wurden alle Aufwuchsmaterialien vor dem Einsatz einer mehrfachen Waschprozedur mit einer 2% RB35 Lösung unterzogen [MEYLHEUC *et al.* 2006, HABOUZIT *et al.* 2011].

Zunächst fanden Kurzzeitversuche statt, in denen die Materialien für 2 bzw. 24 Stunden in das Reaktorsystem eingebracht wurden. Diese Adhäsionsversuche wurden sowohl unter mesophilen als auch unter thermophilen Bedingungen durchgeführt. Alle wichtigen Prozessparameter bzw. Biogas- und Methanbildungsraten während der Versuchsphase sind in den **Tabellen 19 - 22** ausführlich dargestellt. Nach Ablauf der Einbringungszeit im Reaktorsystem wurden die unterschiedlichen Trägermaterialien mittels Trockenmassebestimmung und konfokaler Laserscanningmikroskopie auf ihre Erstad-

häSION von Biofilmen untersucht. Zudem wurden Q-PCR Analysen durchgeführt, um das Verhältnis von Archaea zu Bacteria im Biofilm zu bestimmen.

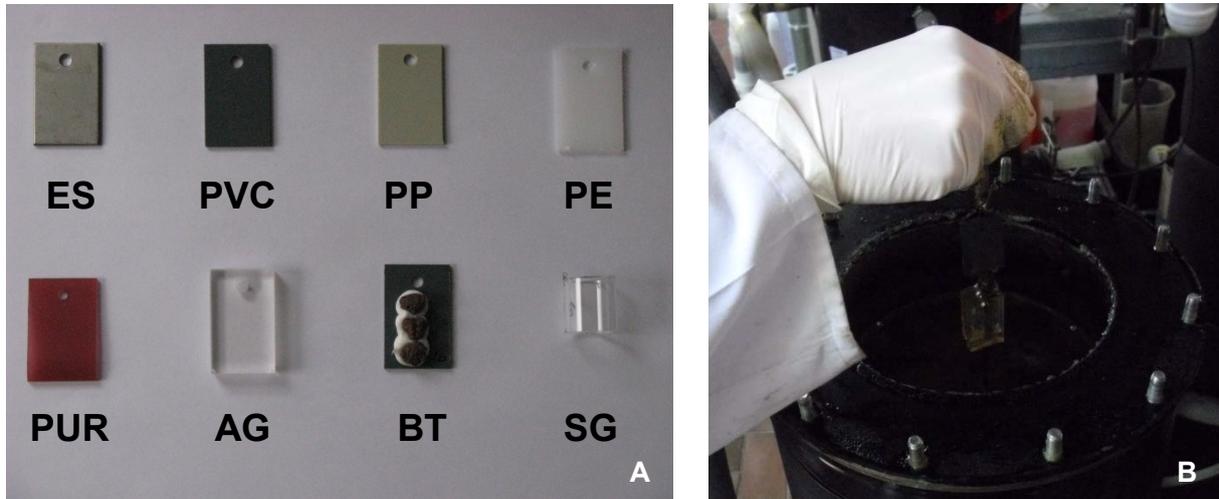


Abbildung 21: Materialstudie zur Bildung von Biofilmen in Biogasfermentern. (A) Werkstoffe, welche für die Materialstudie genutzt wurden: ES = Edelstahl, PVC = Polyvinylchlorid, PP = Polypropylen, PE = Polyethylen, PUR = Polyurethan, AG = Acrylglas, BT = Blähton (aufgebracht auf PVC Plättchen), SG = Silikoglas. (B) Einbringen verschiedenen Materialien in den Biogasfermenter.

Tabelle 19: Erstbesiedlung (2 Stunden) von Aufwuchsträgermaterialien im CSTR-System durch die mikrobielle Lebensgemeinschaft. Biogasbildung und -ausbeute (y_B) sowie Methanbildung, -anteil und -ausbeute (y_{CH_4}) unter mesophilen (CSTR-M1) und thermophilen (CSTR-T1) Bedingungen. ES = Edelstahl, PVC = Polyvinylchlorid, PP = Polypropylen, PE = Polyethylen, PUR = Polyurethan, AG = Acrylglas, BT = Blähton, SG = Silikoglas.

| Reaktor | Material | B_R [d] | Biogasbildung | | y_B [l g ⁻¹] | Methanbildung | | Methananteil [%] |
|---------|----------|--------------|--|----------------------|-------------------------------|----------------------|------------------------------------|---------------------|
| | | | [g _{OS} l ⁻¹ d ⁻¹] | [l g ⁻¹] | | [l g ⁻¹] | [l g _{OS} ⁻¹] | |
| CSTR-M1 | ES | 3,0 | 5,75 | 0,239 | 3,39 | 0,141 | 59,0 | |
| | PVC | 3,0 | 5,75 | 0,239 | 3,39 | 0,141 | 59,0 | |
| | PE | 3,0 | 5,20 | 0,217 | 3,15 | 0,131 | 60,6 | |
| | PP | 3,0 | 5,20 | 0,217 | 3,15 | 0,131 | 60,6 | |
| | PUR | 3,0 | 6,00 | 0,250 | 3,69 | 0,154 | 61,4 | |
| | AG | 3,0 | 6,00 | 0,250 | 3,69 | 0,154 | 61,4 | |
| | SG | 3,0 | 6,00 | 0,250 | 3,69 | 0,154 | 61,4 | |
| | BT | 3,0 | 5,20 | 0,217 | 3,15 | 0,131 | 60,6 | |
| CSTR-T1 | ES | 2,0 | 4,60 | 0,287 | 2,53 | 0,158 | 54,9 | |
| | PVC | 2,0 | 4,60 | 0,287 | 2,53 | 0,158 | 54,9 | |
| | PE | 2,0 | 4,13 | 0,258 | 2,20 | 0,138 | 53,4 | |
| | PP | 2,0 | 4,13 | 0,258 | 2,20 | 0,138 | 53,4 | |
| | PUR | 2,0 | 5,22 | 0,326 | 3,01 | 0,188 | 57,6 | |
| | AG | 2,0 | 5,22 | 0,326 | 3,01 | 0,188 | 57,6 | |
| | SG | 2,0 | 5,22 | 0,326 | 3,01 | 0,188 | 57,6 | |
| | BT | 2,0 | 4,13 | 0,258 | 2,20 | 0,138 | 53,4 | |

Tabelle 20: Erstbesiedlung (2 Stunden) von Aufwuchsträgermaterialien im CSTR-System durch die mikrobielle Lebensgemeinschaft. Trockensubstanz (TS)- und organische Trockensubstanzgehalte (oTS_{FM}), pH-Wert, Essigsäure (ES)- und Propionsäurekonzentrationen (PS) sowie Gesamtstickstoff (N_{ges})- und Ammoniumstickstoffgehalte ($\text{NH}_4\text{-N}$) unter mesophilen (CSTR-M1) und thermophilen (CSTR-T1) Bedingungen. ES = Edelstahl, PVC = Polyvinylchlorid, PP = Polypropylen, PE = Polyethylen, PUR = Polyurethan, AG = Acrylglas, BT = Blähton, SG = Silikoglas.

| Reaktor | Material | B_R | pH | ES | PS | N_{ges} | $\text{NH}_4\text{-N}$ | TS | oTS_{FM} |
|---------|----------|--|------|---------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|------|--------------------------|
| | [d] | $[\text{g}_{\text{os}} \text{l}^{-1} \text{d}^{-1}]$ | | $[\text{g l}^{-1}]$ | $[\text{g l}^{-1}]$ | $[\text{g l}^{-1}]$ | $[\text{g l}^{-1}]$ | [%] | [%] |
| CSTR-M1 | ES | 3,0 | 7,73 | 0,06 | 0,00 | 3,87 | 2,03 | 5,97 | 4,00 |
| | PVC | 3,0 | 7,73 | 0,06 | 0,00 | 3,87 | 2,03 | 5,97 | 4,00 |
| | PE | 3,0 | 7,60 | 0,08 | 0,00 | 4,23 | 2,15 | 6,98 | 4,83 |
| | PP | 3,0 | 7,60 | 0,08 | 0,00 | 4,23 | 2,15 | 6,98 | 4,83 |
| | PUR | 3,0 | 7,73 | 0,06 | 0,00 | 3,87 | 2,03 | 5,97 | 4,00 |
| | AG | 3,0 | 7,73 | 0,06 | 0,00 | 3,87 | 2,03 | 5,97 | 4,00 |
| | SG | 3,0 | 7,73 | 0,06 | 0,00 | 3,87 | 2,03 | 5,97 | 4,00 |
| | BT | 3,0 | 7,60 | 0,08 | 0,00 | 4,23 | 2,15 | 6,98 | 4,83 |
| CSTR-T1 | ES | 2,0 | 8,14 | 0,31 | 0,05 | 3,21 | 2,05 | 3,91 | 2,82 |
| | PVC | 2,0 | 8,14 | 0,31 | 0,05 | 3,21 | 2,05 | 3,91 | 2,82 |
| | PE | 2,0 | 7,97 | 0,55 | 0,06 | 3,76 | 2,07 | 4,78 | 3,33 |
| | PP | 2,0 | 7,97 | 0,55 | 0,06 | 3,76 | 2,07 | 4,78 | 3,33 |
| | PUR | 2,0 | 8,14 | 0,31 | 0,05 | 3,21 | 2,05 | 3,91 | 2,82 |
| | AG | 2,0 | 8,14 | 0,31 | 0,05 | 3,21 | 2,05 | 3,91 | 2,82 |
| | SG | 2,0 | 8,14 | 0,31 | 0,05 | 3,21 | 2,05 | 3,91 | 2,82 |
| | BT | 2,0 | 7,97 | 0,55 | 0,06 | 3,76 | 2,07 | 4,78 | 3,33 |

Tabelle 21: Biofilmbildung nach 24 Stunden auf ausgewählten Aufwuchsträgermaterialien. Biogasbildung und -ausbeute (y_B) sowie Methanbildung, -anteil und -ausbeute (y_{CH_4}) unter mesophilen (CSTR-M1) und thermophilen (CSTR-T1) Bedingungen. ES = Edelstahl, PVC = Polyvinylchlorid, PP = Polypropylen, PE = Polyethylen, PUR = Polyurethan, AG = Acrylglas, BT = Blähton, SG = Silikoglas.

| Reaktor | Material | B_R | Biogasbildung | y_B | Methanbildung | y_{CH_4} | Methananteil |
|---------|----------|--|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|--------------|
| | [d] | $[\text{g}_{\text{os}} \text{l}^{-1} \text{d}^{-1}]$ | $[\text{l g}^{-1}]$ | $[\text{l g}_{\text{os}}^{-1}]$ | $[\text{l g}^{-1}]$ | $[\text{l g}_{\text{os}}^{-1}]$ | [%] |
| CSTR-M1 | ES | 3,0 | 5,81 | 0,242 | 3,48 | 0,145 | 59,9 |
| | PVC | 3,0 | 5,78 | 0,241 | 3,37 | 0,141 | 58,4 |
| | PE | 3,0 | 5,78 | 0,241 | 3,37 | 0,141 | 58,4 |
| | PP | 3,0 | 5,78 | 0,241 | 3,37 | 0,141 | 58,4 |
| | PUR | 3,0 | 5,81 | 0,242 | 3,48 | 0,145 | 59,9 |
| | AG | 3,0 | 5,13 | 0,214 | 3,07 | 0,128 | 59,9 |
| | SG | 3,0 | 5,81 | 0,242 | 3,48 | 0,145 | 59,9 |
| | BT | 3,0 | 5,13 | 0,214 | 3,07 | 0,128 | 59,9 |
| CSTR-T1 | ES | 2,0 | 4,46 | 0,279 | 2,35 | 0,147 | 52,7 |
| | PVC | 2,0 | 4,53 | 0,283 | 2,35 | 0,147 | 51,9 |
| | PE | 2,0 | 4,53 | 0,283 | 2,35 | 0,147 | 51,9 |
| | PP | 2,0 | 4,53 | 0,283 | 2,35 | 0,147 | 51,9 |
| | PUR | 2,0 | 4,46 | 0,279 | 2,35 | 0,147 | 52,7 |
| | AG | 2,0 | 4,43 | 0,277 | 2,49 | 0,155 | 56,0 |
| | SG | 2,0 | 4,46 | 0,279 | 2,35 | 0,147 | 52,7 |
| | BT | 2,0 | 4,43 | 0,277 | 2,49 | 0,155 | 56,0 |

Tabelle 22: Biofilmbildung nach 24 Stunden auf ausgewählten Aufwuchsträgermaterialien. Trockensubstanz (TS)- und organische Trockensubstanzgehalte (oTS_{FM}), pH-Wert, Essigsäure (ES)- und Propionsäurekonzentrationen (PS) sowie Gesamtstickstoff (N_{ges})- und Ammoniumstickstoffgehalte ($\text{NH}_4\text{-N}$) unter mesophilen (CSTR-M1) und thermophilen (CSTR-T1) Bedingungen. ES = Edelstahl, PVC = Polyvinylchlorid, PP = Polypropylen, PE = Polyethylen, PUR = Polyurethan, AG = Acrylglas, BT = Blähton, SG = Silikoglas.

| Reaktor | Material [d] | B_R [g _{os} l ⁻¹ d ⁻¹] | pH | ES [g l ⁻¹] | PS [g l ⁻¹] | N_{ges} [g l ⁻¹] | $\text{NH}_4\text{-N}$ [g l ⁻¹] | TS [%] | oTS_{FM} [%] |
|---------|-----------------|---|------|----------------------------|----------------------------|---|--|-----------|---------------------------------|
| CSTR-M1 | ES | 3,0 | 7,60 | 0,08 | 0,00 | 4,23 | 2,15 | 6,98 | 4,83 |
| | PVC | 3,0 | 7,60 | 0,08 | 0,00 | 4,23 | 2,15 | 6,98 | 4,83 |
| | PE | 3,0 | 7,60 | 0,08 | 0,00 | 4,23 | 2,15 | 6,98 | 4,83 |
| | PP | 3,0 | 7,60 | 0,08 | 0,00 | 4,23 | 2,15 | 6,98 | 4,83 |
| | PUR | 3,0 | 7,60 | 0,08 | 0,00 | 4,23 | 2,15 | 6,98 | 4,83 |
| | AG | 3,0 | 7,70 | 0,05 | 0,00 | 3,26 | 1,98 | 4,21 | 3,06 |
| | SG | 3,0 | 7,60 | 0,08 | 0,00 | 4,23 | 2,15 | 6,98 | 4,83 |
| | BT | 3,0 | 7,70 | 0,05 | 0,00 | 3,26 | 1,98 | 4,21 | 3,06 |
| CSTR-T1 | ES | 2,0 | 7,97 | 0,55 | 0,06 | 3,76 | 2,07 | 4,78 | 3,33 |
| | PVC | 2,0 | 7,97 | 0,55 | 0,06 | 3,76 | 2,07 | 4,78 | 3,33 |
| | PE | 2,0 | 7,97 | 0,55 | 0,06 | 3,76 | 2,07 | 4,78 | 3,33 |
| | PP | 2,0 | 7,97 | 0,55 | 0,06 | 3,76 | 2,07 | 4,78 | 3,33 |
| | PUR | 2,0 | 7,97 | 0,55 | 0,06 | 3,76 | 2,07 | 4,78 | 3,33 |
| | AG | 2,0 | 8,07 | 0,22 | 0,02 | 3,20 | 2,09 | 4,12 | 2,94 |
| | SG | 2,0 | 7,97 | 0,55 | 0,06 | 3,76 | 2,07 | 4,78 | 3,33 |
| | BT | 2,0 | 8,07 | 0,22 | 0,02 | 3,20 | 2,09 | 4,12 | 2,94 |

Sowohl unter mesophilem als auch unter thermophilem Temperaturregime zeigten Acrylglas (AG), Polyvinylchlorid (PVC) und Polyurethan (PUR) die schnellsten Biofilmbildungsraten. So konnten mit der Laserscanningmikroskopie bereits nach 24 Stunden feine Biofilmstrukturen mit durchschnittlichen Höhen von 4 - 6 μm ausgemacht werden (**Abbildung 24A-C, 25A-C**). Dass sowohl die Rauheit als auch weitere Oberflächenmerkmale einen entscheidenden Einfluss auf die Biofilmbildung haben, wird vor allem bei der Betrachtung von **Abbildung 24B** deutlich. Hier wurde die Abbruchkante eines PVC-Plättchens, welche große Unebenheiten in der Oberflächenstruktur aufwies, auf Biofilmbildung überprüft. Es zeigte sich, dass vor allem in tieferen Senken eine Biofilmausprägung begünstigt wird. Dieses ist damit zu erklären, dass die Strömungswiderstände in den Vertiefungen andere sind als auf der eigentlichen Oberfläche des Materials. Die Vertiefung schützt den entstehenden Biofilm vor frühzeitiger Abtragung und gewährleistet so eine ungestörte Entwicklung [STOODLEY *et al.* 2002]. Da für die Materialstudie in dieser Studie planungsgemäß noch keine Perthometer- bzw. Kontaktwinkelmessungen durchgeführt wurden, können nur bedingt Aussagen zur Oberflächenbeschaffenheit der getesteten Aufwuchsmaterialien getroffen werden [VAN OSS *et al.* 1988, GADELMAWLA *et al.* 2002].

Neben den mikroskopischen Analysen fand außerdem eine Bestimmung der Trockenmasse statt, um die Gesamtheit aller aufgelagerten Stoffe auf den Testmaterialien erfassen zu können. Der Trockensubstanzanteil wurde nach BERGMANN *et al.* [2008] be-

stimmt. Die höchsten Trockenmassewerte nach einer Einbringungszeit von 2 bzw. 24 Stunden wurden sowohl unter mesophilen als auch unter thermophilen Temperaturbedingungen bei den Aufwuchsträgermaterialien Acrylglas (AG) und Polyurethan (PUR) erzielt (**Abbildung 26A, 26C**). Die Biofilmbildung auf PUR wurde durch eine feine Rillenstruktur auf der Materialoberfläche begünstigt und erklärt damit die weitaus höheren Trockenmassewerte auf diesem Werkstoff im Vergleich zu allen anderen eingesetzten Kunststoffwerkstoffen. Interessanterweise konnten sich auf PVC größere Biofilmstrukturen ausbilden als auf den Kunststoffen Polypropylen (PP) und Polyethylen (PE).

HAUBIZIT *et al.* [2011] konnten unter mesophilen Temperaturbedingungen und einer Einbringungszeit der Materialien von 2 h genau Gegenteiliges beobachten. So lag der prozentuale Anteil an mit Biofilm besiedelter Oberfläche bei $1,37 \pm 0,44\%$ (PP) bzw. $1,29 \pm 0,28\%$ (PE). Auf PVC konnte hingegen nur ein Anteil von $0,19 \pm 0,12\%$ der Gesamtoberfläche besiedelt werden. Auch in diesem Fall kann die Oberflächenbeschaffenheit (mehr oder weniger strukturiert) des angewandten Aufwuchsträgermaterials als Grund für die Unterschiede in der Biofilmbildung herangezogen werden.

Neben AG und PUR fand auch auf Blähton (BT) eine schnelle Erstadhäsion statt. Da der BT allerdings auf PVC-Plättchen aufgebracht war, konnte hier keine Trockenmassebestimmung durchgeführt werden. Des Weiteren war durch die Eigenfluoreszenz von Materialien, die sich auf bzw. im BT befanden, eine genauere Analyse der Biofilmbildung auf diesem Material mittels Laserscanningmikroskopie nur bedingt möglich.

Auf Edelstahl (ES) und Silikoglas (SG) fand nahezu keine Biofilmbildung statt.

Das Archaea zu Bacteria Verhältnis fiel bei allen angewandten Testmaterialien sehr niedrig aus (mesophil, ARC/BAC = 0,004 - 0,025; thermophil, ARC/BAC = 0,002 - 0,010) (**Abbildung 27A-B**). Unter mesophilen Bedingungen konnten für die Kurzzeitversuche die höchsten ARC/BAC Verhältnisse für die Aufwuchsmaterialien BT, PE und PUR ermittelt werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass bei einer erhöhten Rauheit des Aufwuchsträgermaterials die Biofilmbildung begünstigt wird (PUR = Rillenstrukuroberfläche, BT = körnige Oberflächenstruktur). Die Unebenheiten auf der Materialoberfläche bieten optimale Entwicklungsbedingungen für makroskopische, aggregierende Strukturen, in welchen sich die syntrophen Lebensgemeinschaften aus fermentativen, acidogenen und acetogenen Bacteria sowie methanogenen Archaea ungestört entwickeln können [ZHU *et al.* 1997].

Das niedrigste ARC/BAC Verhältnis konnte für den Werkstoff Silikoglas (SG) ermittelt werden (vgl. **Abbildung 27A**). Dieses Ergebnis unterstützt die von HAUBIZIT *et al.* [2011] gewonnenen Erkenntnisse, dass Glas nur bedingt für eine Biofilmbildung in Reaktorsystemen geeignet ist. So wurden auch in dieser Studie auf Borosilikatglas die geringsten ARC/BAC Verhältnisse im Vergleich zu allen anderen getesteten Aufwuchsträgermaterialien ermittelt.

Unter thermophilen Temperaturbedingungen konnten für alle untersuchten Werkstoffe ARC/BAC Verhältnisse zwischen 0,002 - 0,010 erzielt werden (**Abbildung 27B**). Insgesamt fielen die ARC zu BAC Anteile unter thermophilen Bedingungen für alle Aufwuchs-

trägermaterialien niedriger aus als unter mesophilem Temperaturregime (vgl. **Abbildung 27A-B**). Ein ähnlicher Effekt konnte bereits für die magnetischen Aufwuchsträger bei der Erfassung der mikrobiellen Diversität beobachtet werden (vgl. Kap. II.1.3).

Nach dem Abschluss der Kurzzeitversuche wurden die drei Materialien, welche die beste ErstadhäSION gezeigt hatten (AG, PUR, PVC), in einem Langzeitversuch auf ihre Biofilmbildung hin untersucht. Die wichtigsten Daten zur Prozessführung der mesophilen und thermophilen CSTR-Systeme sind in **Abbildung 22** und **23** zusammengefasst. Über den gesamten Versuchszeitraum von 35 Tagen konnten stabile Biogasbildungsraten und eine weitestgehend konstante Reaktorchemie beobachtet werden. Somit fand die Biofilmentwicklung unter konstanten Bedingungen statt.

Nach Abschluss des Langzeitexperimentes unter mesophilen Bedingungen befanden sich die größten Anteile an organischer und anorganischer Substanz auf Acrylglas (AG) und Polyurethan (PUR) (**Abbildung 24D, F**). Im Gegensatz zu den Kurzzeitversuchen, wo maximale Biofilmhöhen zwischen 4 und 6 μm erreicht wurden, konnten nach 35 Tagen Schichtdicken von 15 - 20 μm ermittelt werden. Sowohl auf AG als auch auf PUR bildeten sich inselförmige Biofilmstrukturen aus. Auf PVC hingegen betrug die maximale Biofilmhöhe 6 μm , und es konnten mittels der konfokalen Laserscanningmikroskopie keine größeren, zusammenhängenden Biofilmaggregate nachgewiesen werden (**Abbildung 24E**). Auch die Ergebnisse der Trockenmassebestimmung zeigten, dass sich auf der Materialoberfläche von AG und PUR ein erheblich höherer Anteil an organischen und anorganischen Feststoffen befand als auf den PVC-Plättchen (**Abbildung 26A**).

Interessanterweise konnten keine Unterschiede in der Trockenmassebestimmung zwischen den Lang- und Kurzzeitversuchen ausgemacht werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Beobachtungen aus der Laserscanningmikroskopie, wo eine deutliche Zunahme der Biofilmstrukturen nachgewiesen werden konnte.

Eine mögliche Erklärung für die ermittelten Unterschiede könnte in der Aufarbeitung des Aufwuchsträgermaterials für die Trockenmassebestimmung liegen. Nach der Entnahme der Aufwuchsträgermaterialien aus dem Reaktorsystem wurden diese zunächst in ein Reaktionsgefäß, welches mit einer 1 x PBS Lösung befüllt war, überführt. Für die Biofilmbetrachtung unter der Verwendung der konfokalen Laserscanningmikroskopie wurden die Aufwuchsträgermaterialien direkt aus diesem Reaktionsgefäß entnommen und nach der Durchführung des Protokolls zur Lebendbiofilmbetrachtung bildgebend ausgewertet (vgl. Kap. II.1.2). Für die Trockenmassebestimmung unterlagen die Biofilme, während der Aufarbeitungszeit zur Analyse, einer größeren mechanischen Beanspruchung. Ein Ablösen an locker gebundenen Biofilmstrukturen kann somit nicht ausgeschlossen werden. Der Basisbiofilm blieb hingegen erhalten und konnte als Trockenmasse auf dem Trägermaterial nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich der Basisbiofilm über einen Versuchszeitraum von 35 Tagen nur geringfügig bis gar nicht verändert hat (**Abbildung 26A**). Für zukünftige Trockenmassebestimmungen sollte eine Überarbeitung des Versuchsprotokolls dahingehend erfolgen, dass die Arbeits-

schritte einer mechanischen Beanspruchung des Biofilmmaterials möglichst gering gehalten werden.

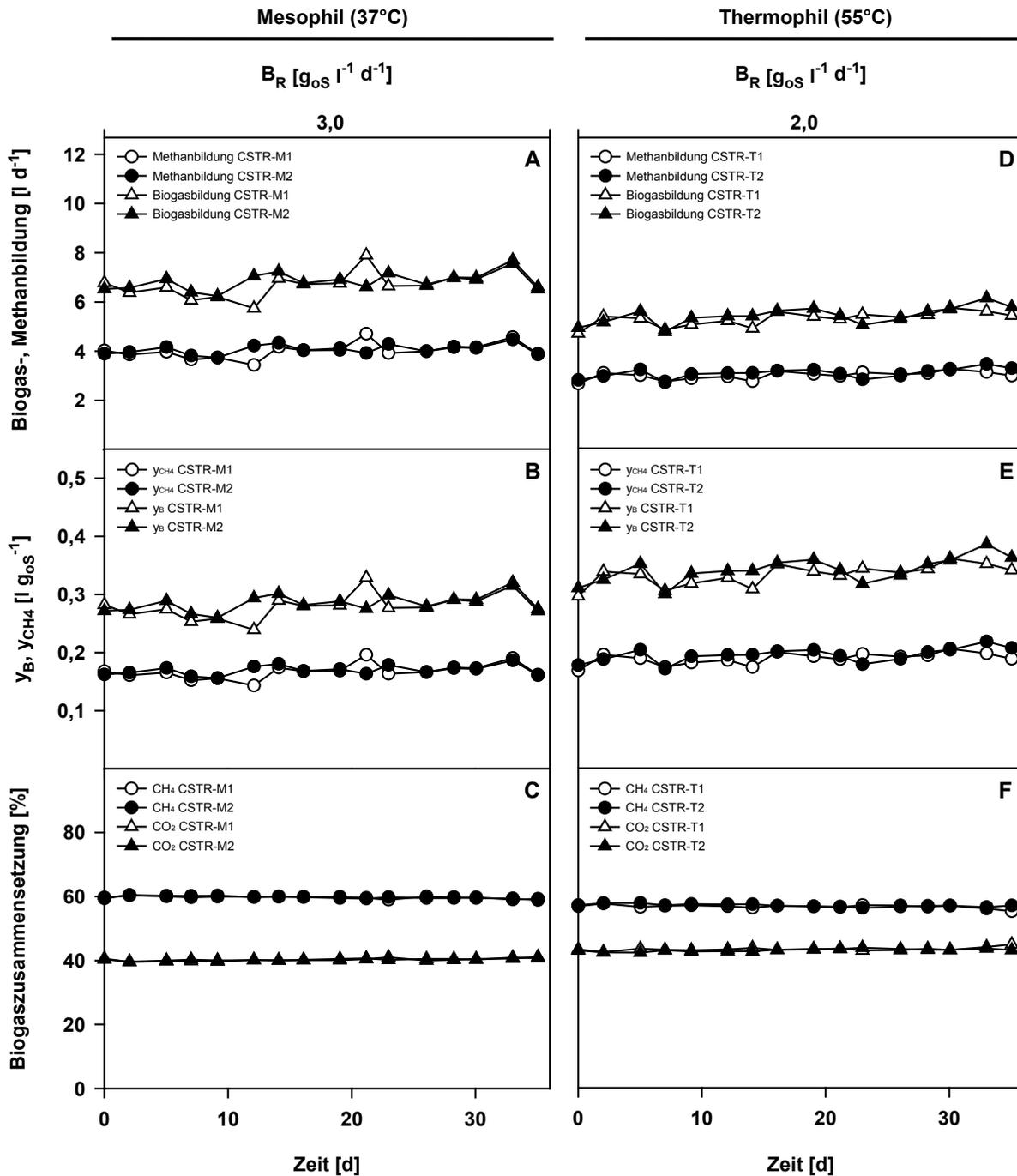


Abbildung 22: Biofilmausbildung nach 35 Tagen auf ausgewählten Aufwuchsträgermaterialien (PVC, PUR, AG). Biogasbildung, -ausbeute (y_B) und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute (y_{CH_4}) bei konstanter Raumbelastung (B_R) im CSTR-System. (A,D) Biogas- und Methanbildung, (B,E) Biogas- und Methanausbeute sowie (C,F) Biogaszusammensetzung unter mesophilen (CSTR-M1, CSTR-M2) und thermophilen (CSTR-T1, CSTR-T2) Bedingungen. CH_4 = Methan, CO_2 = Kohlenstoffdioxid. PVC = Polyvinylchlorid, PUR = Polyurethan, AG = Acrylglas.

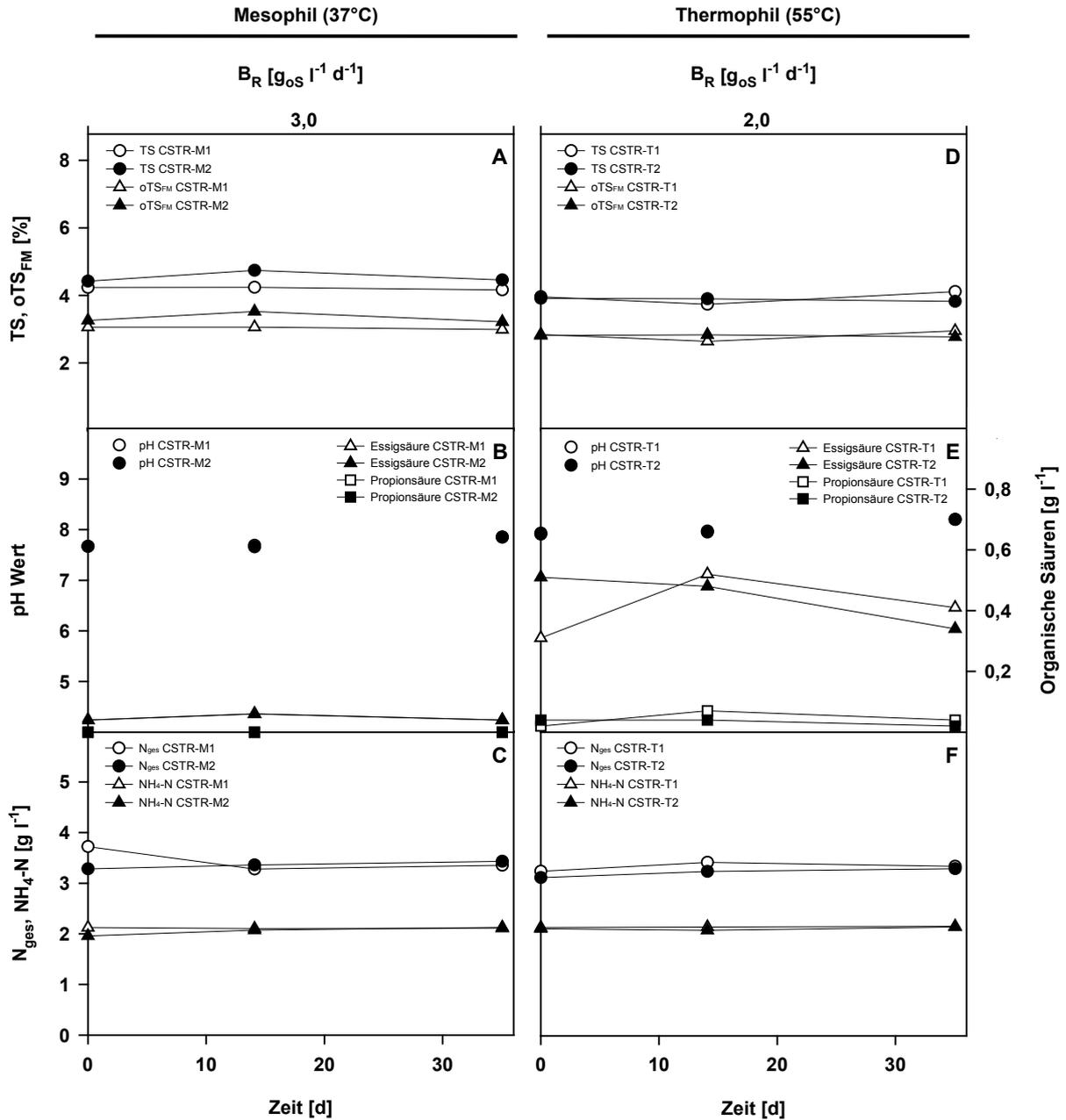


Abbildung 23: Biofilmbildung nach 35 Tagen auf ausgewählten Aufwuchsträgermaterialien (PVC, PUR, AG). (A, D) Trockensubstanz (TS)- und organische Trockensubstanzgehalte (oTS_{FM}), (B, E) pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen sowie (C, F) Gesamtstickstoff (N_{ges}) und Ammoniumstickstoffgehalte (NH₄-N) unter mesophilen (CSTR-M1, CSTR-M2) und thermophilen (CSTR-T1, CSTR-T2) Bedingungen. PVC = Polyvinylchlorid, PUR = Polyurethan, AG = Acrylglas.

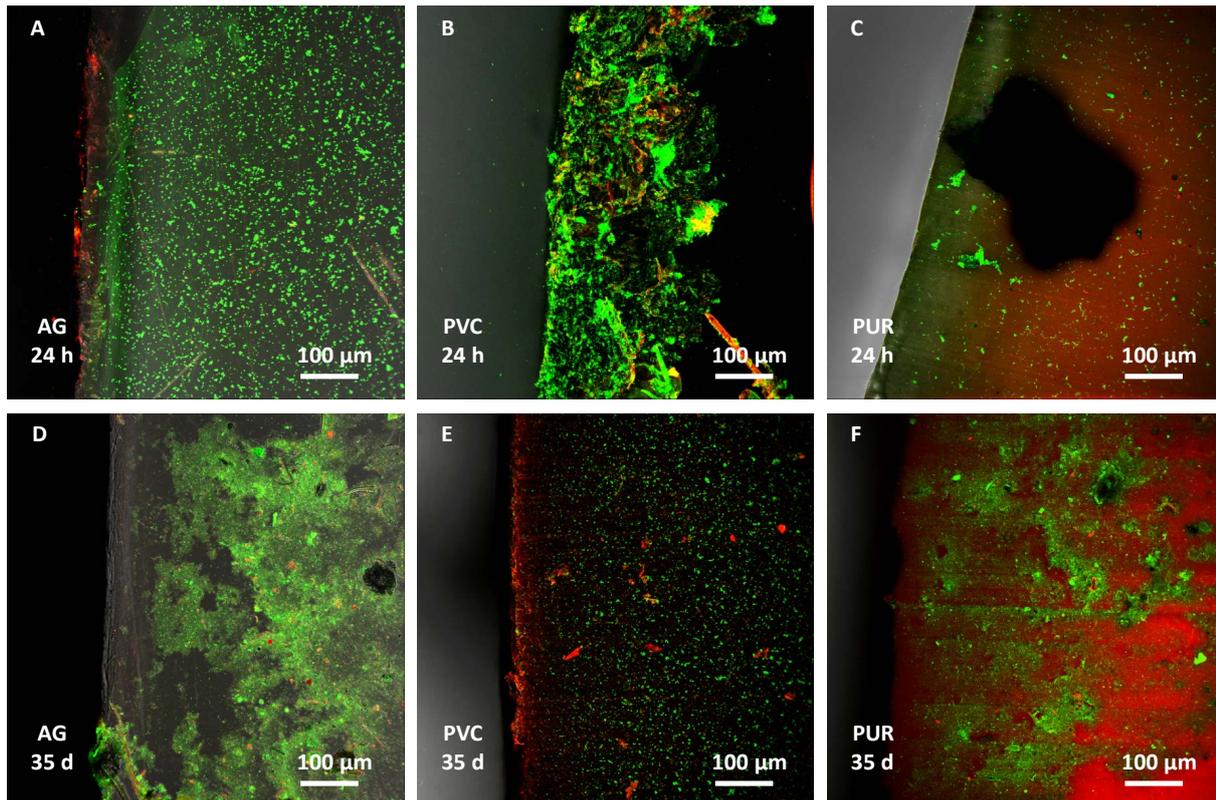


Abbildung 24: Konfokale Laserscanningmikroskopie von Biofilmen auf Aufwuchsträgermaterialien unter mesophilen Temperaturbedingungen. (A, D) Biofilmentwicklung auf Acrylglas (AG), (B, E) Polyvinylchlorid (PVC) und (C, F) Polyurethan (PUR) nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 35 d. Bei allen mikroskopischen Aufnahmen handelt es sich um die Maximumprojektion aller Farbkanäle (Durchlichtmikroskopieaufnahme [Schwarz/Weißfärbung], Fluoreszenzmikroskopie [Grünfärbung unter Verwendung des lectingebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Alexa488 für den Nachweis von extrazellulären, polymeren Substanzen, Rotfärbung unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYTO60 für den Nachweis von Mikroorganismen]).

In Bezug auf das ARC/BAC Verhältnis konnte nur für AG eine leichte Zunahme beobachtet werden (ARC/BAC = 0,009, t = 24 h; ARC/BAC = 0,019, t = 35 d) (**Abbildung 27A**). Das ARC/BAC Verhältnis im Biofilm der Testmaterialien PUR und PVC nahm hingegen geringfügig ab.

Unter thermophiler Temperaturführung zeigte AG den größten Zuwachs an Biofilmstrukturen (**Abbildung 25D**). Auch hier bildeten sich verschiedenartig große Biofilminseln aus, welche mit denen unter mesophilen Temperaturbedingungen vergleichbar waren (**Abbildung 25D, Abbildung 26D**). Auf PUR konnten diese Biofilmaggregate nicht beobachtet werden (**Abbildung 26F**). Nach 35 Tagen wurden lediglich maximale Biofilmhöhen von bis zu 8 µm erreicht. Zudem zeigte die Anwendung von PUR unter thermophilen Bedingungen, dass das Material nicht für eine längerfristige Einbringung in das Reaktorsystem geeignet ist, da das Material teilweise angegriffen und beschädigt wurde. Diese Beobachtung muss bei der Auswertung der Trockenmassewerte besondere Berücksichtigung finden.

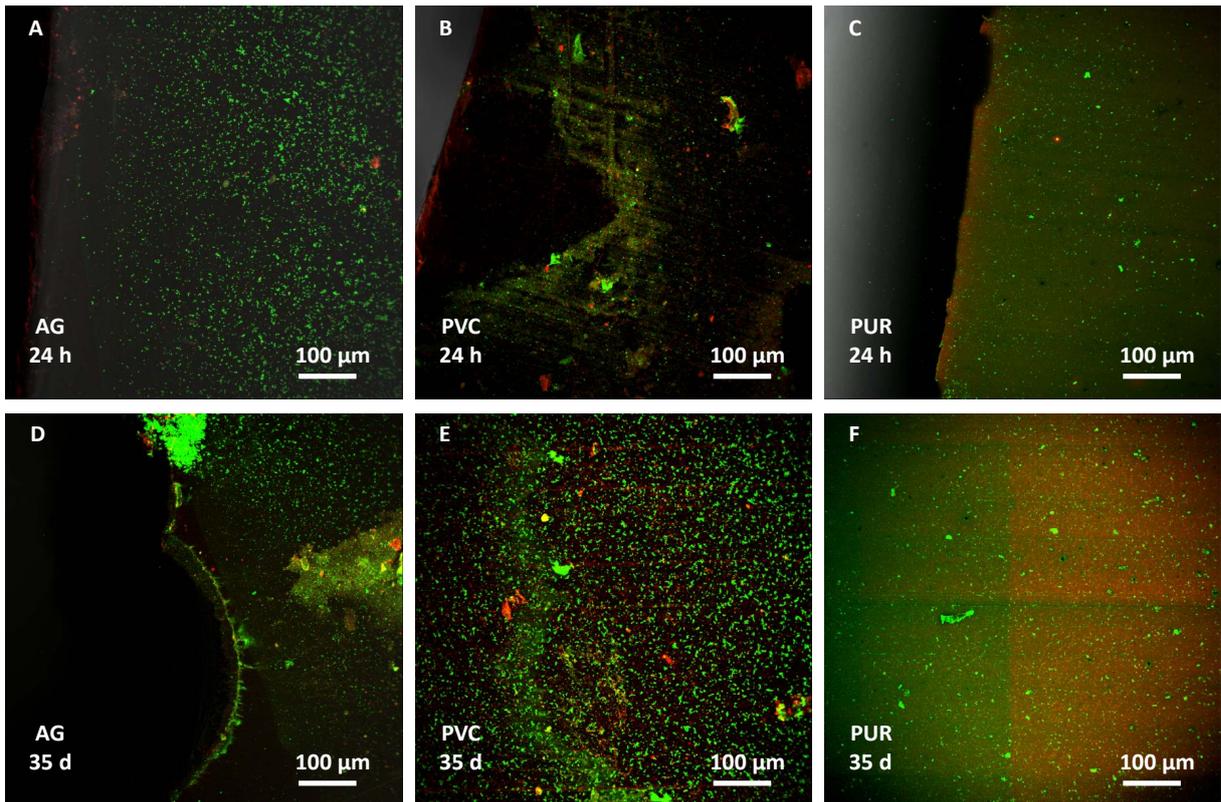


Abbildung 25: Konfokale Laserscanningmikroskopie von Biofilmen auf Aufwuchsträgermaterialien unter thermophilen Temperaturbedingungen. (A, D) Biofilmentwicklung auf Acrylglas (AG), (B, E) Polyvinylchlorid (PVC) und (C, F) Polyurethan (PUR) nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 35 d. Bei allen mikroskopischen Aufnahmen handelt es sich um die Maximumprojektion aller Farbkanäle (Durchlichtmikroskopieaufnahme [Schwarz/Weißfärbung], Fluoreszenzmikroskopie [Grünfärbung unter Verwendung des lectingebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Alexa488 für den Nachweis von extrazellulären, polymeren Substanzen, Rotfärbung unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYTO60 für den Nachweis von Mikroorganismen]).

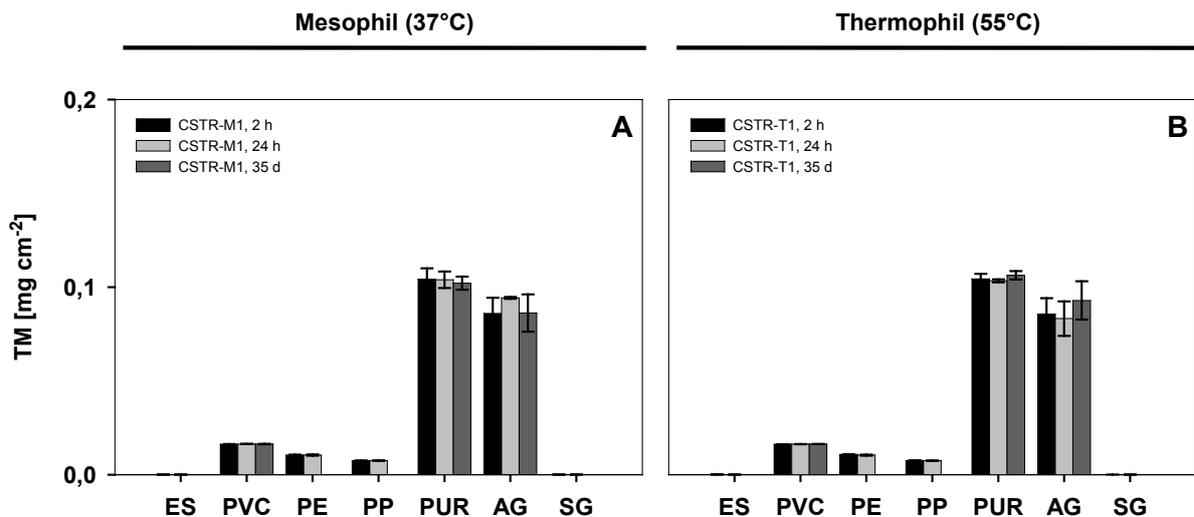


Abbildung 26: Bestimmung der Trockenmasse (TM) des gebildeten Biofilms bezogen auf die Fläche (1 cm²) nach 2 h, 24 h und 35 d unter (A) mesophilen und (B) thermophilen Bedingungen. ES = Edelstahl, PVC = Polyvinylchlorid, PP = Polypropylen, PE = Polyethylen, PUR = Polyurethan, AG = Acrylglas, SG = Silikoglas. Jede Probe wurde in jeweils zwei Parallelen gemessen (technische Replikate).

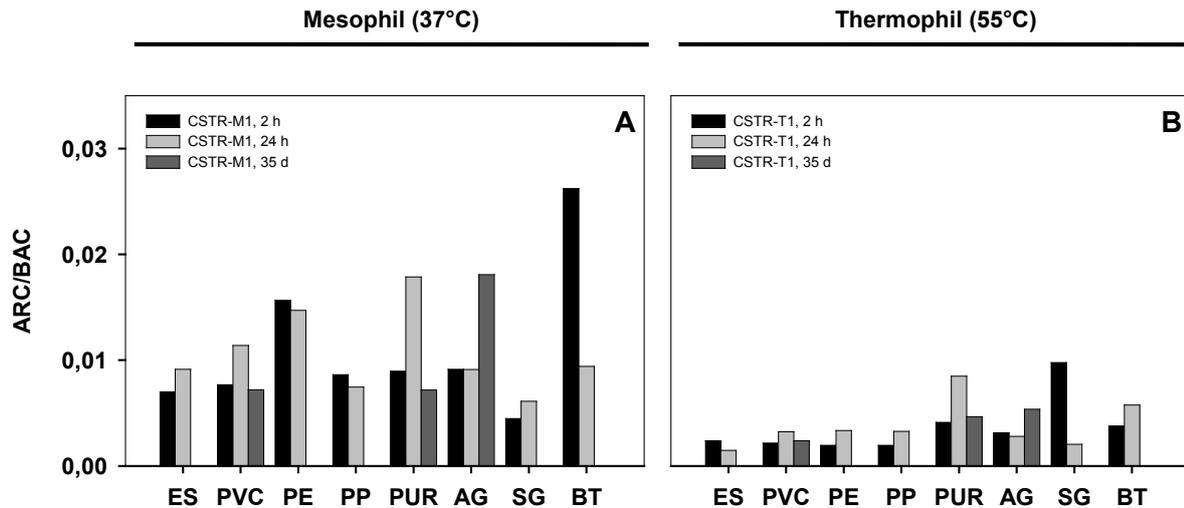


Abbildung 27: Verhältnis Archaea zu Bacteria (ARC/BAC) im gebildeten Biofilm nach 2 h, 24 h und 35 d anhand der detektierten Kopienzahl für das 16S rRNA Gen in einem Nanogramm genomischer DNA unter (A) mesophilen und (B) thermophilen Bedingungen. ES = Edelstahl, PVC = Polyvinylchlorid, PP = Polypropylen, PE = Polyethylen, PUR = Polyurethan, AG = Acrylglas, BT = Blähton, SG = Silikoglas. Für die Ermittlung des ARC/BAC Verhältnisses wurde jede DNA-Probe in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate).

Der hohe Wert in der Trockenmassebestimmung könnte somit durch Materialverluste des eigentlichen Trägermaterials entstanden sein. Im Vorfeld der Versuchsdurchführung wurden alle Aufwuchsträgermaterialien auf ihre Wärmebeständigkeit ($T = 110^{\circ}\text{C}$, $t = 3\text{ h}$) überprüft. Für keines der Trägermaterialien konnte ein Masseverlust nachgewiesen werden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es bei einer dauerhaften Temperaturführung von 55°C und einer ständigen mechanischen Beanspruchung durch den Reaktorinhalt (Mikroorganismen, organische Säuren, makroskopische Feststoffpartikel) zu einer Schädigung der Trägermaterialien kommen kann.

Auf PVC trat sowohl unter thermophilen als auch unter mesophilen Temperaturbedingungen eine nahezu identische Biofilmbildung auf (**Abbildung 24F**, **Abbildung 25F**, **Abbildung 26**).

In der Gesamtbetrachtung aller Ergebnisse der Materialstudie im CSTR-System lässt sich feststellen, dass die Reaktortemperatur einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung von Biofilmstrukturen und das auf den unterschiedlichsten Substraten hat. Zudem fördern Unebenheiten auf der Materialoberfläche die Biofilmbildung. Bei zukünftigen Untersuchungen zur Auswahl eines geeigneten Aufwuchsträgermaterials für ein bestimmtes Reaktorsystem sollte daher unbedingt auf vergleichbare Oberflächeneigenschaften der Trägermaterialien geachtet werden, um den direkten Einfluss des Aufwuchsträgermaterials besser interpretieren zu können. Da der Grad der Rauheit einen wesentlichen Einfluss auf die Biofilmbildung hat, wären Kenntnisse zur Biofilmausprägung bei verschiedenen Rauheitsgraden des gleichen Trägermaterials von großer Bedeutung und sollten in weiterführenden Studien Berücksichtigung finden.

Während im CSTR-System die Eignung unterschiedlicher Aufwuchsmaterialien zur Bildung von Biofilmstrukturen näher untersucht wurde, diente die Materialstudie im **Bio-leaching-System** dazu, die Biofilmentwicklung in verschiedenen Höhen des Festbettreaktors unter thermophilen Temperaturbedingungen näher zu betrachten. Als Aufwuchsträgermaterialien dieser Versuchsreihe wurden AG und PVC verwendet.

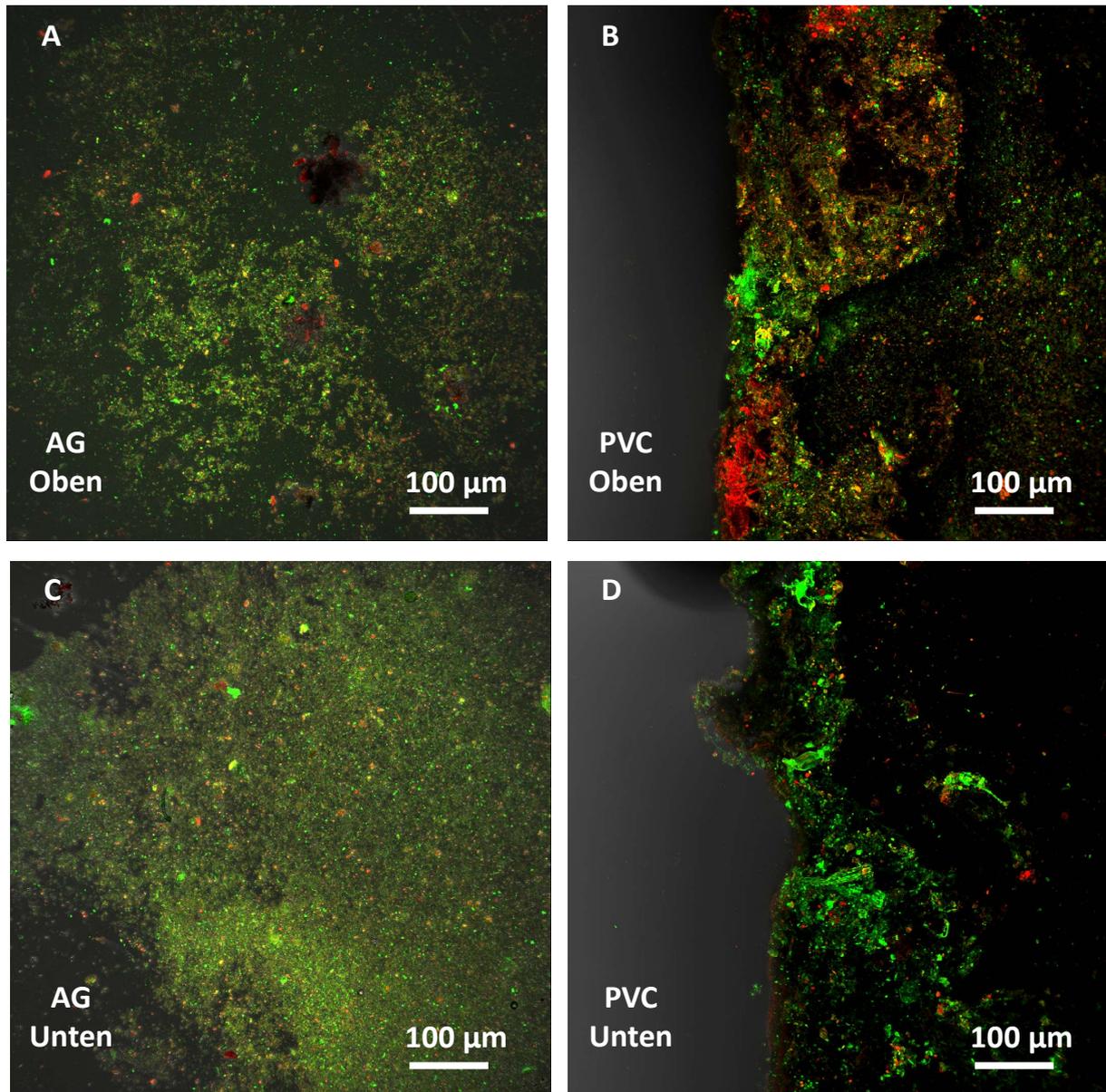


Abbildung 28: Konfokale Laserscanningmikroskopie von Biofilmen auf Aufwuchsträgermaterialien unter thermophilen Temperaturbedingungen. Biofilmentwicklung auf Acrylglas (AG) und Polyvinylchlorid (PVC) im (A, B) oberen und (C, D) unteren Reaktorbereich des Festbettreaktors nach einer Inkubationszeit von 98 d. Bei allen mikroskopischen Aufnahmen handelt es sich um die Maximumprojektion aller Farbkanäle (Durchlichtmikroskopieaufnahme [Schwarz/Weißfärbung], Fluoreszenzmikroskopie [Grünfärbung unter Verwendung des lectingebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Alexa488 für den Nachweis von extrazellulären, polymeren Substanzen, Rottfärbung unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYTO60 für den Nachweis von Mikroorganismen]).

Das Bioleaching-System war so konzipiert, dass die im AFR durch die Hydrolyse mit organischen Säuren angereicherte Prozessflüssigkeit über ein Schlauchsystem in den FBR-Kopf überführt wurde (vgl. Kap. II.1.1). Durch ein installiertes Pumpensystem zirkulierte die Prozessflüssigkeit von dort in den unteren Bereich des FBR-Kompartiments und wurde von dort wieder in den AFR überführt. Somit erfolgte die Strömungsrichtung der Prozessflüssigkeit im FBR von oben nach unten. Innerhalb des FBRs wurden zwei Höhenhorizonte (oberer Reaktorbereich = 68 cm, unterer Reaktorbereich = 15 cm) festgelegt, in denen die Aufwuchsträger eingebracht wurden. Die Gesamthöhe des FBRs betrug 80 cm.

Über einen Zeitraum von 98 Tagen wurden die Trägermaterialien im Reaktorsystem belassen. Alle Untersuchungen zur Höhenzonierung fanden unter thermophilen Temperaturbedingungen statt. Die ausgewählten Aufwuchsträgermaterialien wurden ausschließlich dem Bioleaching-System 1 (AFR-T1, FBR-T1) zugeführt. Das Bioleaching-System 2 (AFR-T2, FBR-T2) diente als Kontrolle. Eine ausführliche Darstellung zur Biogasbildung und Reaktorchemie dieser Systeme erfolgt in Kapitel II.1.6. Aufgrund der Platzlimitierung innerhalb des FBR-Kompartiments konnte nur eine geringfügige Anzahl an Aufwuchsträgern in das System eingebracht werden, welche für die Aufklärung der Biofilmstruktur (konfokale Laserscanningmikroskopie) und der mikrobiellen Zusammensetzung (ARC/BAC Verhältnis, Q-PCR) genutzt wurden. Auf eine Trockenmassebestimmung musste in dieser Versuchsreihe verzichtet werden.

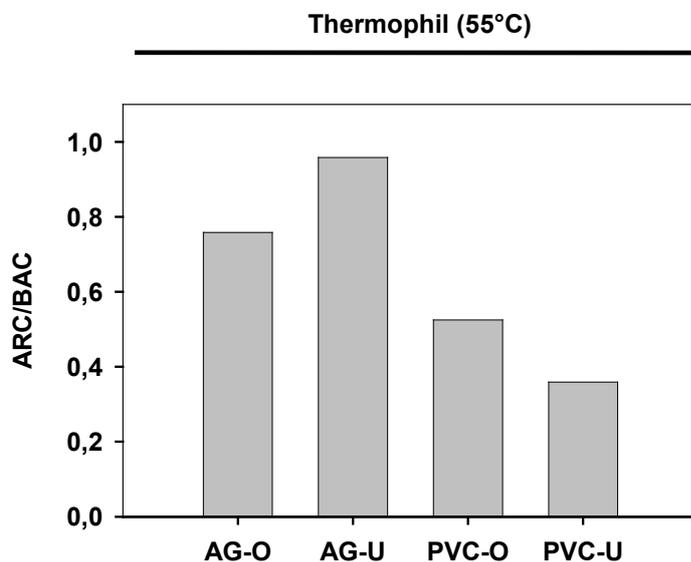


Abbildung 29: Verhältnis Archaea zu Bacteria (ARC/BAC) im gebildeten Biofilm auf den Aufwuchsträgermaterialien Acrylglas (AG) und Polyvinylchlorid (PVC) im oberen und unteren Bereich des Festbettreaktors nach 98 d anhand der detektierten Kopienzahl für das 16S rRNA Gen in einem Nanogramm genomischer DNA unter thermophilen Bedingungen. AG-O = Acrylglas, oberer Reaktorbereich, AG-U = Acrylglas, unterer Reaktorbereich, PVC-O = Polyvinylchlorid, oberer Reaktorbereich, PVC-U = Polyvinylchlorid, unterer Reaktorbereich. Für die Ermittlung des ARC/BAC Verhältnisses wurde jede DNA-Probe in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate).

Nach Beendigung der Versuchslaufzeit wurden auf Acrylglas (AG) Biofilmhöhen zwischen 16 μm und 25 μm gemessen. Dabei wiesen die Biofilme auf den oberen Aufwuchsträgern (AG-O) eine geringere Mächtigkeit auf als jene, welche sich im unteren Reaktorbereich (AG-U) befanden (AG-O, $h = 19 - 21 \mu\text{m}$; AG-U, $h = 22 - 26 \mu\text{m}$) (**Abbildung 28A, 28C**). Für AG-O konnte ein ARC/BAC Verhältnis von 0,76 ermittelt werden (**Abbildung 29**). Im Gegensatz dazu war das ARC/BAC Verhältnis auf AG-U leicht erhöht (AG-U, ARC/BAC = 0,92). Im Vergleich zu den AG-Aufwuchsträgern, welche sich im CSTR-System befanden, konnten im Bioleaching-System deutlich höhere ARC/BAC Verhältnisse erzielt werden (vgl. **Abbildung 27B, Abbildung 29**). Dieses kann darauf zurückgeführt werden, dass die Biofilme im FBR einer geringeren mechanischen Beanspruchung und einer stabileren Reaktorchemie ausgesetzt waren (vgl. Kap. II.1.1 und II.1.2).

Interessanterweise verhielt sich die Biofilmbildung auf PVC genau entgegengesetzt zur Biofilmbildung auf AG. Auf den PVC-Plättchen, welche sich im oberen Reaktorbereich (PVC-O) befanden, konnten Biofilmhöhen zwischen 18 μm und 21 μm ermittelt werden, wohingegen auf den unteren PVC-Aufwuchsträgern (PVC-U) maximale Biofilmhöhen von 14 μm erreicht werden konnten (**Abbildung 28B, 28D**). Eine Aussage zur bevorzugten Biofilmbildung innerhalb eines FBR-Kompartiments lässt sich somit nicht treffen. Allerdings scheint mit steigender Biofilmhöhe, wie schon auf den AG-Aufwuchsträgern nachgewiesen, das ARC/BAC Verhältnis zuzunehmen. So konnte für die Biofilme der PVC-O Aufwuchsträger ein ARC/BAC Verhältnis von 0,54 ermittelt werden (**Abbildung 29**). Im Gegensatz dazu betrug das ARC/BAC Verhältnis auf den PVC-U Plättchen 0,39.

Im Vergleich beider Aufwuchsträgermaterialien konnte im Bioleaching-System eine bevorzugte Biofilmbildung auf Acrylglas (AG) beobachtet werden. Dieses bestätigt die Ergebnisse der Materialstudie im CSTR-System, wo auch eine bevorzugte Biofilmbildung auf AG im Vergleich zum Aufwuchsträger PVC festgestellt werden konnte.

II.1.6 Betrieb von optimierten Reaktorsystemen

Biofilmbildung auf magnetischen Aufwuchsträgern im CSTR-System bei kontinuierlicher Raumbelastung (B_R)

Alle Parameter zur chemischen Zusammensetzung und zur Oberflächenbeschaffenheit der in dieser Studie verwendeten magnetischen Aufwuchsträger wurden von RAMM *et al.* [2014] zusammenfassend dargestellt. Da der Prozess der Biofilmbildung zu dieser Versuchsreihe bereits in Kapitel II.1.3 ausführlich beschrieben wurde, soll im Folgenden vorrangig auf die Biofilmbildung auf dem magnetischen Trägermaterial eingegangen werden.

Um den Biofilmzuwachs genau bestimmen zu können, wurde wöchentlich die organische Trockensubstanz bezogen auf die Frischmasse ($o\text{TS}_{\text{FM}}$) analysiert (**Abbildung 30**). Unter **mesophilen Temperaturbedingungen** konnte für die beobachteten

Zeiträume nur eine geringe Zunahme der oTS_{FM} nachgewiesen werden ($t = 7 \text{ d}$: $\text{oTS}_{\text{FM}} = 0,95\%$; $t = 104 \text{ d}$: $\text{oTS}_{\text{FM}} = 1,44\%$). Bestätigung fanden diese Ergebnisse in den mikroskopischen Analysen der gebildeten Biofilme. So konnten über den gesamten Versuchszeitraum Biofilmhöhen zwischen $12 \mu\text{m}$ und $21 \mu\text{m}$ beobachtet werden. Dass die Oberflächenbeschaffenheit einen entscheidenden Einfluss auf die Biofilmausprägung hat, konnte bereits in der Materialstudie zur Eignung bestimmter Trägermaterialien für die Biofilmbildung deutlich gezeigt werden (vgl. Kap. II.1.5). Hier zeigte sich, dass die Mächtigkeit eines Biofilms in den durch den Herstellungsprozess bedingten Senken und Porenräumen des Materials deutlich höher lag als auf der eigentlichen Partikeloberfläche. Ein kontinuierlicher Zuwachs in der Biofilmhöhe mit der Zeit konnte nicht festgestellt werden.

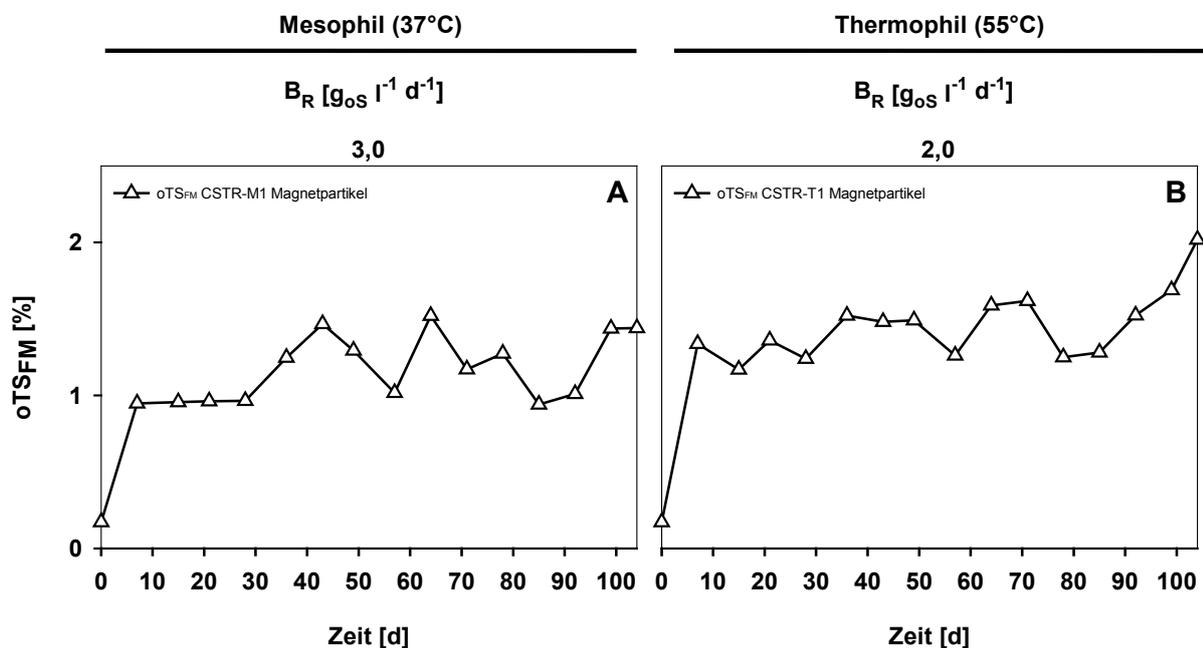


Abbildung 30: Organische Trockensubstanzgehalte (oTS_{FM}) der aufgelagerten Biofilme der magnetischen Aufwuchsträger bei konstanter Raumbelastung (B_R) im CSTR-System unter (A) mesophilen (CSTR-M1) und (B) thermophilen (CSTR-T1) Bedingungen.

Auch die quantitative Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Gemeinschaft änderte sich über die Zeit nur geringfügig (**Abbildung 31A**). Über 80% aller detektierten 16S rRNA Genkopien der methanogenen Archaea entfielen auf Vertreter der Gattung *Methanosaetaceae*. Ab dem 57. Versuchstag konnten sogar über 90% aller archaeellen 16S rRNA Genkopien dieser methanogenen Familie zugeordnet werden. Die Gründe für das bevorzugte Vorkommen von *Methanosaetaceae* auf Oberflächenstrukturen wurden bereits an früherer Stelle ausführlich diskutiert (vgl. Kap. II.1.3).

Neben *Methanosaetaceae* konnten noch in geringen Anteilen Vertreter der *Methanomicrobiales* und *Methanobacteriales* detektiert werden. *Methanosarcinaceae* wurden auf den Aufwuchsträgern nur vereinzelt nachgewiesen ($< 1\%$). Somit scheint dieser me-

thanogenen Gruppe in den unter mesophilen Temperaturbedingungen entstandenen Biofilmen nur eine geringe Bedeutung beizukommen.

Im Gegensatz zu der kaum veränderten quantitativen Zusammensetzung der methanogenen Archaea konnte eine kontinuierliche Zunahme des ARC/BAC Verhältnisses festgestellt werden ($t = 7$ d: ARC/BAC = 0,006; $t = 99$ d: ARC/BAC = 0,026) (**Abbildung 31B**). Lediglich am 28. bzw. 92. Versuchstag wurde eine zeitweilige Abnahme des ARC/BAC Verhältnisses beobachtet. Eine mögliche Erklärung dafür könnte im sprunghaften Anstieg der Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen liegen (vgl. **Abbildung 14B**). So konnten BLUME *et al.* [2010] eine deutliche Abnahme an Methanosaetaceae während einer Belastungssteigerung eines mesophil betriebenen CSTR-Systems (ausschließliches Gärsubstrat: Maissilage) feststellen, noch bevor der eigentliche Anstieg an Propion- und Essigsäure im System analytisch nachgewiesen werden konnte. Als Schlussfolgerung aus diesen Beobachtungen gaben sie an, dass womöglich die An- bzw. Abwesenheit von Methanosaetaceae insbesondere in mesophil betriebenen Reaktorsystemen als Indikator für eine beginnende Versäuerung genutzt werden könnte.

Da sich die methanogene Lebensgemeinschaft in den Biofilmen der magnetischen Aufwuchsträger fast ausschließlich aus Vertretern der Methanosaetaceae zusammensetzte, kann von einem vergleichbaren Einfluss der steigenden Säurekonzentrationen auf diese methanogenen Vertreter ausgegangen werden. Mit der Abnahme der Säurekonzentrationen im Reaktorsystem konnte sich die methanogene Lebensgemeinschaft wieder erholen, so dass es zu einem erneuten Anstieg des ARC/BAC Verhältnisses kam (vgl. **Abbildung 14B, Abbildung 31B**).

Um eine detaillierte Kenntnis über die archaeelle und bakterielle Vielfalt des Biofilms zu erhalten, fanden über den gesamten Versuchszeitraum *terminal restriction fragment length polymorphism* (TRFLP) Fingerprintanalysen statt. Die Durchführung dieser Methode erfolgte nach RADEMACHER *et al.* [2012a]. Für die graphische Darstellung der detektierten *terminal restriction fragments* (TRFs) fanden nur jene Fragmente Berücksichtigung, deren prozentual detektierter Anteil im Biofilm über 3% lag.

Das am häufigsten detektierte archaeelle TRF war TRF107 (**Abbildung 32A**). Über den gesamten Versuchszeitraum konnte eine kontinuierliche Zunahme dieses Fragmenttyps beobachtet werden. RADEMACHER *et al.* [2012a] konnten dieses TRF-Fragment den taxonomischen Gattungen *Methanosaeta*, *Methanobacterium* und *Methanoculleus* zuordnen. Aus den ermittelten Ergebnissen der Q-PCR kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den detektierten TRF107 vornehmlich um *Methanosaeta* sp. handelt (vgl. **Abbildung 31A**). Auch mit der Q-PCR konnte ein leichter Zuwachs an 16S rRNA Genkopien dieser methanogenen Vertreter über die Zeit festgestellt werden.

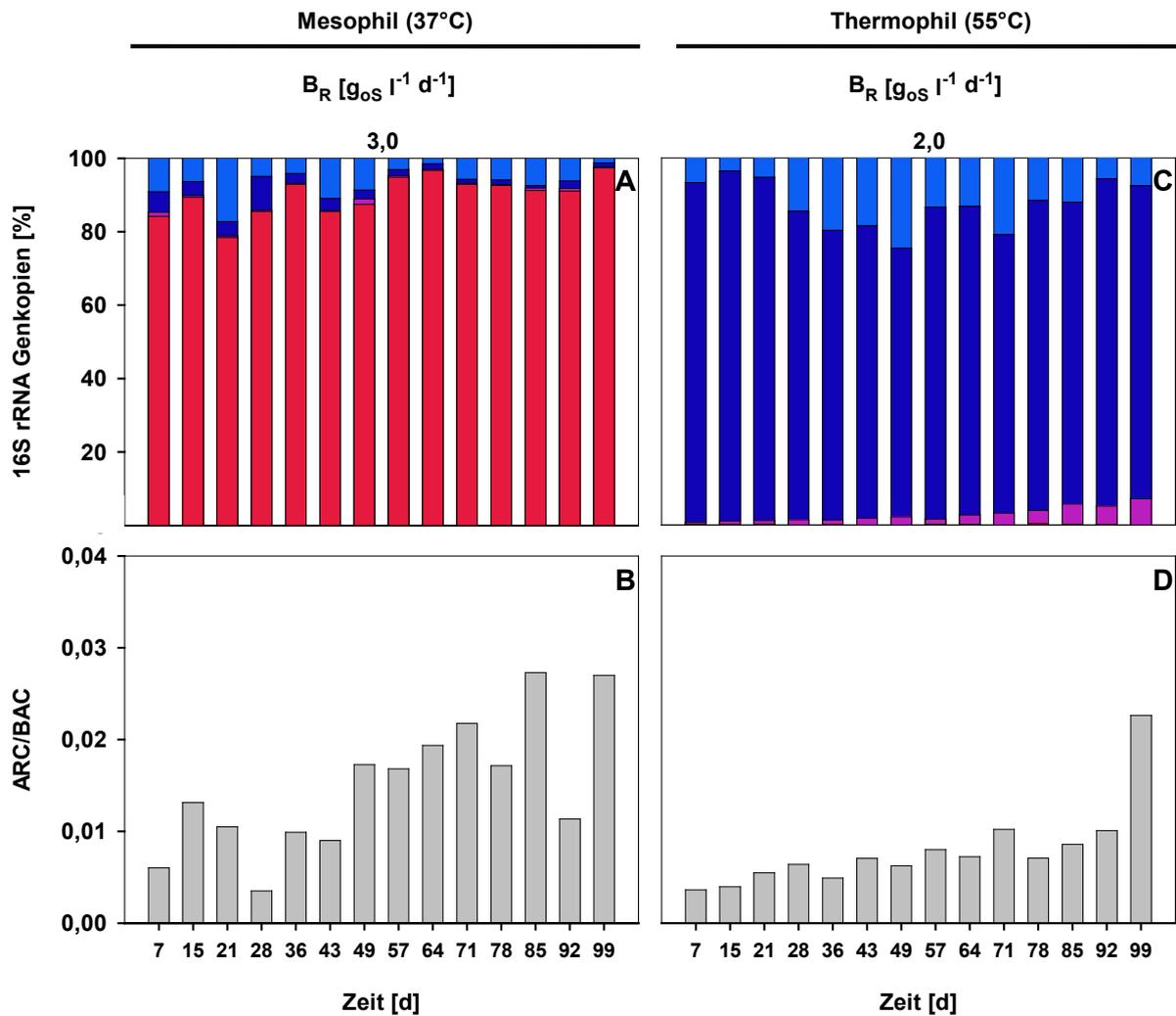


Abbildung 31: Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung in der methanogenen Archaea-Gemeinschaft auf Basis der detektierten Menge des 16S rRNA Genes in einem Nanogramm genomischer DNA in einem CSTR unter (A) mesophilen und (C) thermophilen Bedingungen bei kontinuierlicher Raumbelastung (B_R). Folgende taxonomische Einheiten wurden untersucht: Methanosarcinaceae (violett), Methanobacteriales (dunkelblau), Methanomicrobiales (blau) und Methanosaetaceae (rot). Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate). Entwicklung des Archaea zu Bacteria Verhältnisses (ARC/BAC) anhand der detektierten Menge des 16S rRNA Genes in einem Nanogramm genomischer DNA unter (B) mesophilen und (D) thermophilen Bedingungen bei kontinuierlicher Raumbelastung (B_R). Für die Ermittlung des ARC/BAC Verhältnisses wurde jede DNA-Probe in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate).

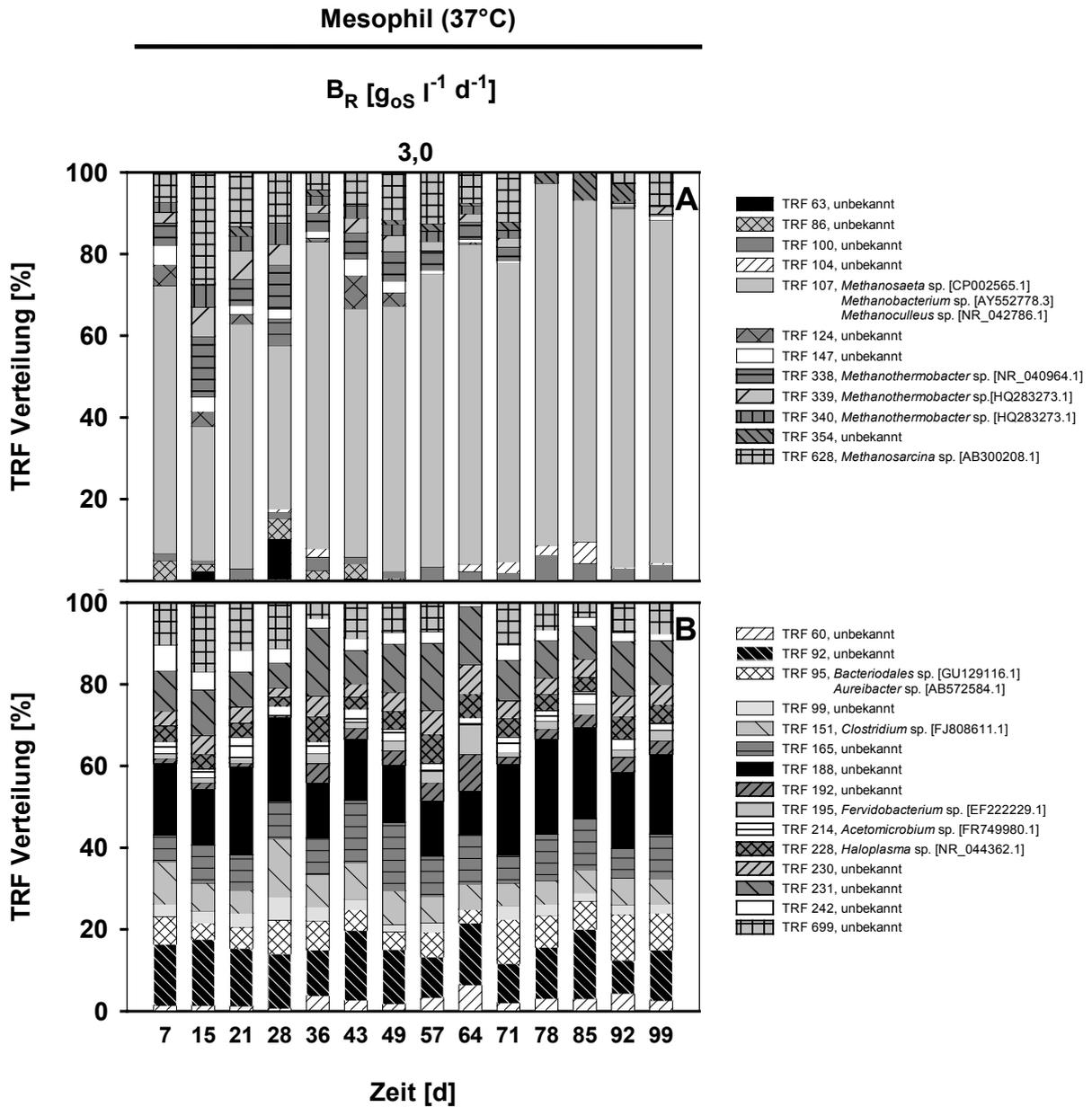


Abbildung 32: Entwicklung der (A) archaeellen und (B) bakteriellen Lebensgemeinschaft in einem mesophilen Biofilm (CSTR). Dargestellt wurden nur jene TRFs, welche mit einem relativen Anteil > 3% an der Gesamtfluoreszenz detektiert wurden. Die Angabe in eckigen Klammern [] in der Legende bezieht sich auf die Akzessionsnummer des nächst verwandten Eintrags in der Datenbank NCBI Genbank ermittelt aus einem Vergleich der partiellen 16S rRNA Gensequenzen unter Verwendung der NCBI *nr/nt database* mit Ausschluss aller Sequenzen für bislang nicht kultivierte Arten. Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate).

Neben TRF107 konnte noch TRF628 in größeren Anteilen detektiert werden. Dieses kann den acetoklastischen Methanosarcinaceae zugeordnet werden [RADEMACHER *et al.* 2012a]. Der prozentuale Anteil an detektierten TRF628 lag deutlich höher als die ermittelten quantitativen Mengenverhältnisse von Methanosarcinaceae mittels Q-PCR. Allerdings handelt es sich bei der TRFLP Analyse um eine semiquantitative Nachweismethode, so dass dieses zu Verschiebungen in den nachgewiesenen Mengenverhältnissen der einzelnen methanogenen Gruppen zwischen Q-PCR und TRFLP Analyse führen kann.

Interessanterweise konnten im mesophilen CSTR-System auch TRF338, TRF339 und TRF340, allerdings jeweils nur in geringen Anteilen, nachgewiesen werden. RADEMACHER *et al.* [2012a] identifizierten diese TRFs als *Methanothermobacter* sp. Dass es sich bei diesen TRF Profilen tatsächlich um *Methanothermobacter* sp. handelt erscheint hier eher unwahrscheinlich, da die physikalischen Umgebungsparameter, insbesondere die Temperatur, gegen ein Vorkommen dieses methanogenen Vertreters sprechen. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei diesem TRF um einen bisher noch unbekannt methanogenen Vertreter handelt, der ähnliche Sequenzeigenschaften wie *Methanothermobacter* sp. besitzt. Bereits die Analysen zum TRF107 zeigten, dass ein TRF nicht zwangsläufig nur einer taxonomischen Einheit zugeordnet werden kann.

Die Vielfalt innerhalb der Bacteria blieb über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant. Als dominierende TRFs wurden TRF92, TRF151, TRF165, TRF188, TRF231 und TRF699 ermittelt. Eine detaillierte Identifizierung der einzelnen TRFs fand für diese Versuchsreihe aus Zeit- und Kostengründen nicht statt.

Unter **thermophiler Temperaturführung** konnte eine stärkere Zunahme der oTS_{FM} im Vergleich zu dem mesophilen Biofilm beobachtet werden ($t = 7$ d: $oTS_{FM} = 1,34\%$; $t = 104$ d: $oTS_{FM} = 2,02\%$) (**Abbildung 30B**). Die ermittelten oTS_{FM} Werte lagen dabei um durchschnittlich 30% höher als unter mesophilen Temperaturbedingungen (**Abbildung 30**). Diese Ergebnisse fanden in den mikroskopischen Analysen ihre Bestätigung. So konnten unter thermophiler Temperaturführung Biofilmdicken von bis zu 25 μm ermittelt werden. Im Gegensatz dazu betrug die maximale Biofilmhöhe unter mesophilen Temperaturbedingungen lediglich 21 μm .

Die methanogene Gemeinschaft in den bei 55°C entstandenen Biofilmen bestand vornehmlich aus Vertretern der Methanobacteriales (**Abbildung 31C**). In den ersten drei Wochen entfielen über 90% aller detektierten archaeellen 16S rRNA Genkopien auf diese methanogene Ordnung. Im weiteren Verlauf nahm der Anteil an Methanobacteriales leicht ab, und es kam zu einer deutlichen Zunahme an Methanomicrobiales in den Biofilmstrukturen ($t = 7$ d: 7%; $t = 49$ d: 25%) (**Abbildung 31C**).

Ab dem 57. Versuchstag nahm der Anteil an Methanomicrobiales im Biofilm wieder ab, und es konnte eine kontinuierliche Zunahme an detektierten 16S rRNA Genkopien für Angehörige der Familie Methanosarcinaceae festgestellt werden ($t = 57$ d: 1%; $t = 99$ d: 7%). Diese Ergebnisse bestätigen die bereits in Kapitel II.1.3 diskutierte Annahme, dass der Biofilm ein gewisses Entwicklungsstadium erreicht haben muss, bevor sich die Me-

thanosarcinaceae in diesem Mikrohabitat gegenüber anderen vorherrschenden methanogenen Archaea behaupten können. Während der Entstehung eines Biofilms sind die ersten gebildeten Strukturen anfangs noch sehr empfindlich gegenüber den einwirkenden Scherkräften des umgebenden Reaktorinhalts. Erst mit dem Entstehen einer Primärstruktur (Netzwerk an EPS-Strukturen und Mikroorganismen) können sich größere Zellaggregate im Biofilmverband entwickeln.

Dass sich Methanosarcinaceae vor allem in Koloniestrukturen gut entwickeln können, konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden [ARAUJO *et al.* 2000, GARRITY & HOLT 2001, DIAZ *et al.* 2006]. Zudem besitzen hydrogenotrophe Methanogene schnellere Wachstumsraten im Vergleich zu den acetoklastischen Methanogenen (hydrogenotrophe Methanogene: $\mu = 2,0 \text{ d}^{-1}$; acetoklastische Methanogene: $\mu = 0,4 \text{ d}^{-1}$) [BATSTONE *et al.* 2002]. So können diese durch Abrasion verlorengegangenen Zellen schneller wieder ersetzen als strikt acetoklastische methanogene Arten.

Das ARC/BAC Verhältnis nahm über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich zu (t = 7 d: ARC/BAC = 0,004; t = 99 d: ARC/BAC = 0,020) (**Abbildung 31D**). Im Vergleich zum mesophilen Temperaturregime wurden insgesamt jedoch deutlich geringere ARC/BAC Verhältnisse gefunden (**Abbildung 31B, 31D**).

Mit der TRFLP Analyse konnten die mittels Q-PCR-Assay gewonnenen Erkenntnisse weitestgehend bestätigt werden. Als hauptsächliche TRFs für Archaea konnten TRF107, TRF108, TRF336, TRF337, TRF338 und TRF628 ermittelt werden (**Abbildung 33A**). Interessanterweise zeigte die prozentuale Verteilung von TRF107 eine nahezu identische Übereinstimmung mit dem Verlauf der detektierten Anteile an 16S rRNA Genkopien der Methanomicrobiales. Dieses lässt darauf schließen, dass der größte Anteil an TRF107 im thermophilen Reaktorsystem den *Methanoculleus* sp. zugeordnet werden können (vgl. RADEMACHER *et al.* [2012a]). Auch die kontinuierliche Zunahme an Methanosarcinaceae im untersuchten Biofilm konnte mit der TRFLP Analyse bestätigt werden (t = 7 d: <1%; t = 49 d: 9%,).

Wie bereits unter mesophilen Temperaturbedingungen beobachtet konnten auch unter thermophilem Temperaturregime im Beobachtungszeitraum nahezu keine gravierenden Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft nachgewiesen werden (**Abbildung 33B**). Lediglich am 78. Versuchstag kam es zu einer deutlichen Verschiebung in den prozentualen Mengenverhältnissen der vorherrschenden TRFs. Die physikalischen und chemischen Prozessparameter lassen keine Rückschlüsse auf den Grund für die plötzliche Veränderung in der bakteriellen Lebensgemeinschaft zu (vgl. **Abbildung 14D-F**). Am 99. Versuchstag stellte sich dann die anfängliche Verteilung in den TRFs wieder ein. Als vorherrschende TRFs konnten TRF151, TRF374 und TRF375 ausgemacht werden, wobei der größte Anteil auf TRF151 (*Clostridium* sp.) entfiel.

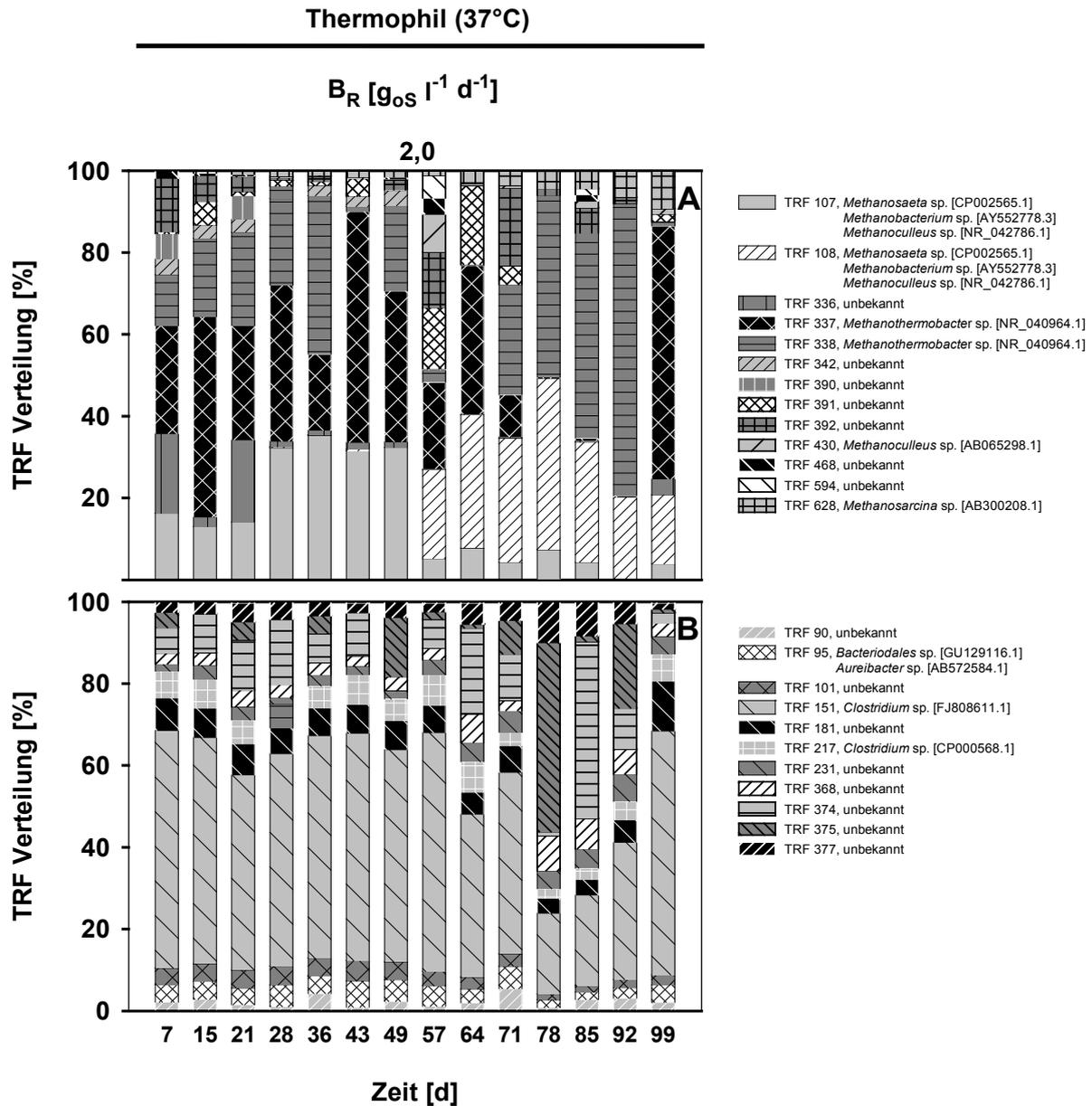


Abbildung 33: Entwicklung der (A) archaellen und (B) bakteriellen Lebensgemeinschaft in einem thermophilen Biofilm (CSTR). Dargestellt wurden nur jene TRFs, welche mit einem relativen Anteil > 3% an der Gesamtfluoreszenz detektiert wurden. Die Angabe in eckigen Klammern [] in der Legende bezieht sich auf die Akzessionsnummer des nächst verwandten Eintrags in der Datenbank NCBI Genbank ermittelt aus einem Vergleich der partiellen 16S rRNA Gensequenzen unter Verwendung der NCBI nr/nt database mit Ausschluss aller Sequenzen für bislang nicht kultivierte Arten. Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (*i.e.* technische Replikate).

Biofilmbildung auf magnetischen Aufwuchsträgern im Bioleaching-System bei kontinuierlicher Raumbelastung (B_R)

Nach Beendigung der Arbeiten zur Bestimmung der archaeellen Diversität wurde das Bioleaching-System, welches bei einer Temperaturführung von 37°C betrieben wurde, auf thermophilen Betrieb umgestellt. Nach einer Adaptationszeit von 53 Wochen wurde dieses System als Versuchsreaktor für die Magnetpartikel- und Materialstudie verwendet (AFR-T1, FBR-T1). Das zweite Bioleaching-System diente wiederum als Kontrolle (AFR-T2, FBR-T2).

Nach dem Einbringen der magnetischen Aufwuchsträger in den FBR des Versuchsreaktors wurden diesem alle zwei Wochen magnetische Aufwuchsträger für die Biofilmanalysen entnommen. Auf eine wöchentliche Beprobung wurde verzichtet, da hierfür ein Öffnen des Reaktorkompartiments notwendig war, so dass in diesem Zeitraum die mikrobielle Lebensgemeinschaft aeroben Bedingungen ausgesetzt war. Zudem erfolgte die Bewertung der Biofilmbildung auf magnetischen Aufwuchskörpern und den ausgewählten Werkstoffen (AG, PVC) für die Materialstudie in einem parallel verlaufenden Versuchsansatz (vgl. Kap. II.1.5).

Über den gesamten Versuchszeitraum konnte in beiden Bioleaching-Systemen eine nahezu konstante Biogas- und Methanbildung beobachtet werden (**Abbildung 34A, 34D**). Dabei wurden für den Kontrollreaktor größere Schwankungen in der Biogasbildung beobachtet als bei dem Versuchsreaktor. Dieses liegt darin begründet, dass sich der Substratpfropfen im Kontrollreaktor stärker verdichtete als im Versuchsreaktor. Um einen Überdruck im Bioleaching-System zu vermeiden, war eine manuelle Auflockerung des Substrates notwendig, welches zu einem erhöhten Sauerstoffeintrag in das Reaktorsystem führte und somit die Biogasbildung negativ beeinflusste (vgl. Kap. II.1.1). Im FBR des Versuchsreaktors kam es in den ersten Versuchstagen zu einer deutlichen Abnahme in der Biogas- und Methanbildung.

Auch dieser Rückgang ist auf die erhöhten Sauerstoffkonzentrationen zurückzuführen, da das System beim Einbringen der Aufwuchsmaterialien einem hohen Sauerstoffstress ausgesetzt war. Ab dem 10. Versuchstag konnte aber wieder eine stabile Biogasproduktion beobachtet werden.

In beiden Reaktorsystemen wurden durchschnittliche Methanertragswerte von $0,34 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$ erzielt. Vergleichbare Methanertragswerte konnten auch während der Diversitätsanalyse im thermophilen Bioleaching-System beobachtet werden (vgl. **Abbildung 16E**). Allerdings verschob sich der Anteil an gebildetem Methan vom AFR in den nachgeschalteten FBR. Während der Diversitätsstudie betrug die durchschnittliche Methanausbeute im FBR lediglich $0,05 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$, wohingegen während dieser Versuchsreihe zur Entwicklung von Biofilmstrukturen auf unterschiedlichen Aufwuchsmaterialien Methanausbeuten von bis zu $0,12 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$ festgestellt werden konnten (**Abbildung 34B, 34E**).

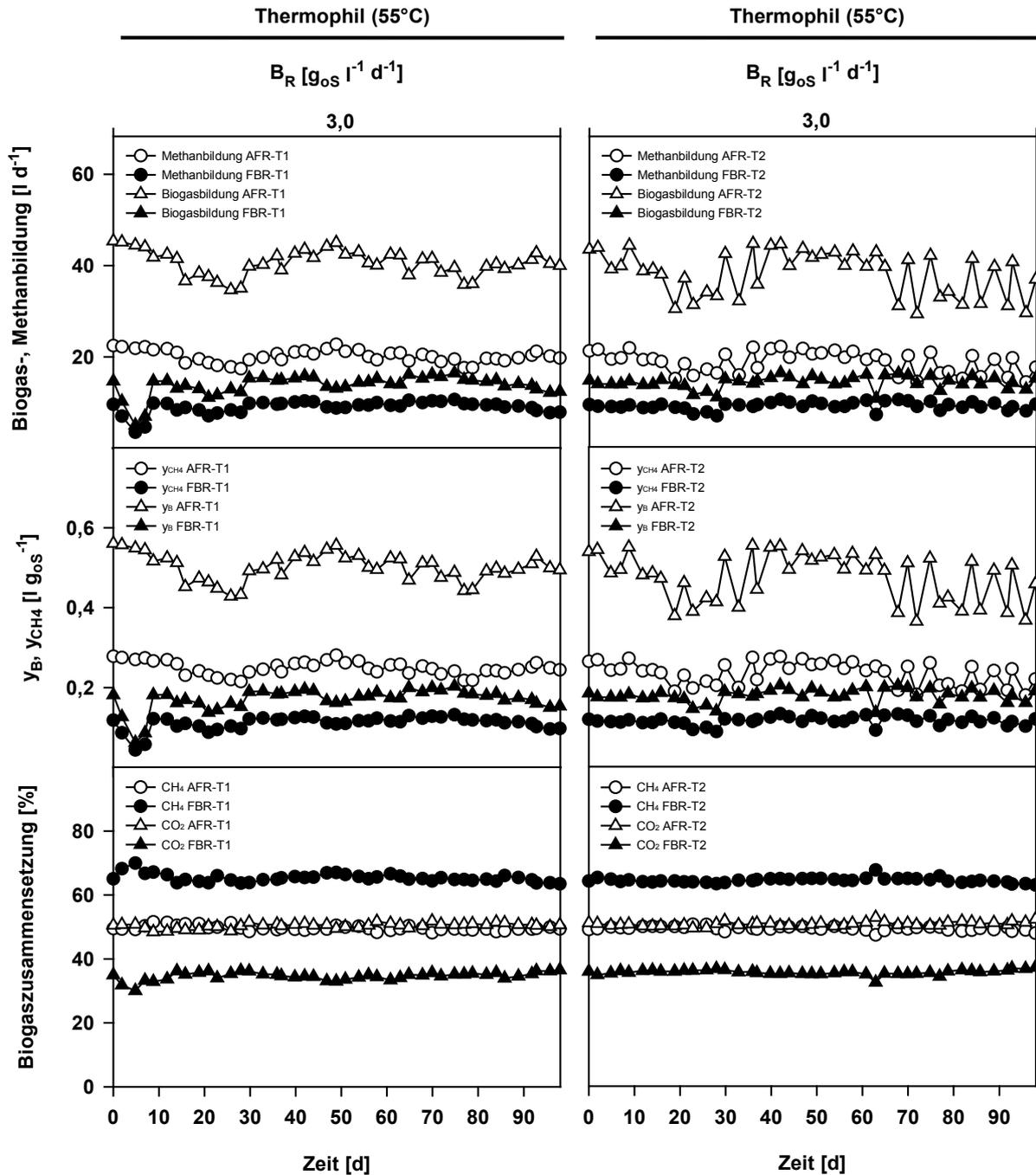


Abbildung 34: Biogasausbildung, -ausbeute (y_B) und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute (y_{CH_4}) im Biobleaching-System bei konstanter Raumbelastung (B_R). (A, D) Biogas- und Methanbildung, (B, E) Biogas- und Methanausbeute sowie (C, F) Biogaszusammensetzung des Versuchs- (AFR-T1, FBR-T1) und Kontrollreaktors (AFR-T2, FBR-T2) unter thermophilen Bedingungen. CH_4 = Methan, CO_2 = Kohlenstoffdioxid.

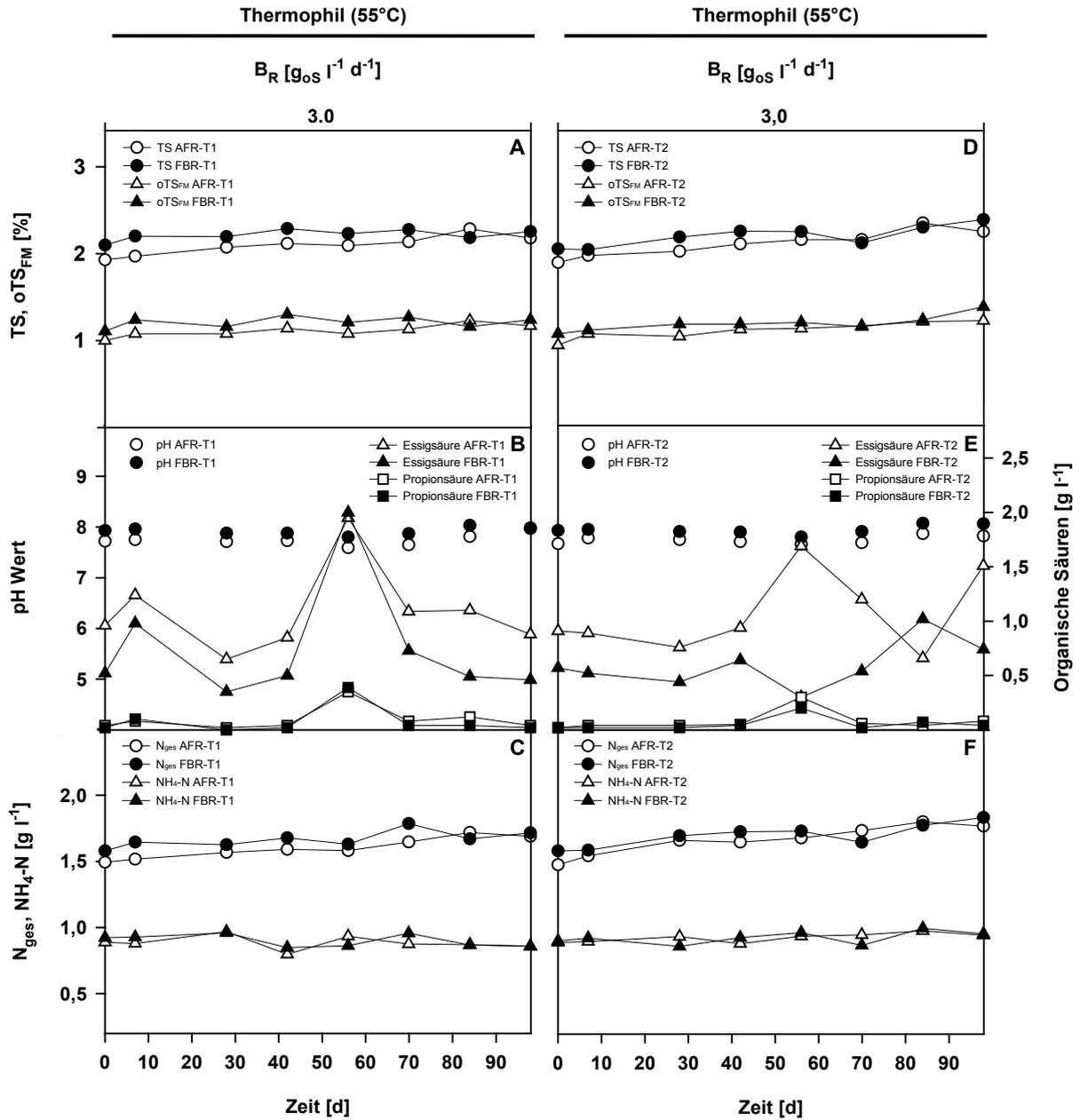


Abbildung 35: Physikalische und chemische Parameter im Bioleaching-System bei konstanter Raumbelastung (B_R). (A, D) Gehalt an Trockensubstanz (TS) und organischer Trockensubstanz (oTS_{FM}), (B, E) pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen sowie (C, F) Gehalt an Gesamtstickstoff (N_{ges}) und Ammoniumstickstoff (NH_4-N) des Versuchs- (AFR-T1, FBR-T1) und Kontrollreaktors (AFR-T2, FBR-T2) unter thermophilen Bedingungen.

Eine mögliche Ursache für diese Verschiebung in der Methanbildung könnte die Biofilmbildung auf den Polypropylenfüllkörpern des FBRs sein. Über einen Zeitraum von 53 Wochen konnten sich wahrscheinlich stabile Biofilmstrukturen ausbilden. Mit der Optimierung der mikrobiellen Zusammensetzung des Biofilms und damit dem Zusammenspiel zwischen Bacteria und Archaea könnte ein effizienterer Substratabbau innerhalb dieser organischen Strukturen stattfinden, womit auch die Verlagerung der Methanbildung vom AFR in den FBR erklärt wäre. Die Biogaszusammensetzung war über den gesamten Versuchszeitraum in beiden Bioleaching-Systemen konstant und miteinander vergleichbar (AFR: CH₄ ≈ 48%; FBR: CH₄ ≈ 63%) (**Abbildung 34C, 34F**).

Der weitestgehend ungestörte Biogas- und Methanbildungsprozess konnte mit der Analyse der physikalischen und chemischen Parameter in den Bioleaching-Systemen bestätigt werden (**Abbildung 35**). Lediglich im Säureverhalten zeigten sich über die Zeit geringfügige Veränderungen (**Abbildung 35B, 35E**). So nahmen die Essig- und Propionsäurewerte am 56. Tag im Versuchsreaktor deutlich zu (t = 42 d: Essigsäure (AFR-T1) = 0,50 g l⁻¹; t = 56 d: Essigsäure (AFR-T1) = 2,00 g l⁻¹; t = 42 d: Propionsäure (AFR-T1) = 0,02 g l⁻¹; t = 56 d: Propionsäure (AFR-T1) = 0,39 g l⁻¹). Eine Auswirkung der Säureakkumulation auf den Biogasbildungsprozess konnte nicht festgestellt werden. Im weiteren Versuchsablauf gingen die Essig- und Propionsäurekonzentrationen dann wieder auf ihr ursprüngliches Niveau zurück.

Auch im Kontrollreaktor konnten Unterschiede in den Säurekonzentrationen beobachtet werden. Allerdings fielen auch hier die Veränderungen so gering aus, dass die Biogasbildung unbeeinflusst blieb (vgl. **Abbildung 34D, 34E; Abbildung 35E**).

Des Weiteren konnte über den gesamten Versuchszeitraum kein Spurenelementmangel in den Bioleaching-Systemen beobachtet werden. Die Zusammensetzung der Spurenelemente blieb über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant (**Tabelle 23**). Lediglich für die Spurenelemente B, Cr, Pb und Zn konnte ein geringfügiger Anstieg über die Zeit ermittelt werden

Tabelle 23: Spurenelementanalyse der Prozessflüssigkeit im Bioleaching-System bei konstanter Raumbelastung untersucht in einem zeitlichen Abstand von 91 Tagen.

| Reaktor | Zeit [d] | B _R | B | Ca | Cd | Co | Cr | Cu | Fe | K | Mg | Mn | Na | Ni | Pb | Zn |
|---------|-------------|--|------|--------|-------|------|-------|------|------|------------------------|--------|------|-------|-------|-------|------|
| | | [g _{os} l ⁻¹ d ⁻¹] | | | | | | | | [mg kg _{os}] | | | | | | |
| AFR-T1 | 7 | 3,0 | 0,84 | 231,50 | <0,01 | 0,50 | <0,01 | 0,49 | 5,77 | 2834,00 | 119,50 | 2,44 | 81,60 | <0,01 | <0,01 | 1,37 |
| | 98 | 3,0 | 3,07 | 207,30 | <0,01 | 0,46 | 0,02 | 0,47 | 6,59 | 2246,00 | 108,30 | 2,61 | 91,18 | <0,01 | 0,04 | 4,38 |
| FBR-T1 | 7 | 3,0 | 0,91 | 289,60 | <0,01 | 0,53 | <0,01 | 0,67 | 8,43 | 2893,00 | 125,70 | 3,09 | 82,57 | <0,01 | <0,01 | 1,99 |
| | 98 | 3,0 | 3,22 | 222,00 | <0,01 | 0,53 | 0,05 | 0,57 | 7,69 | 2259,00 | 110,90 | 2,84 | 90,96 | <0,01 | 0,05 | 4,86 |
| AFT-T2 | 7 | 3,0 | 0,89 | 219,60 | <0,01 | 0,51 | <0,01 | 0,28 | 5,66 | 2854,00 | 115,90 | 2,32 | 82,51 | <0,01 | <0,01 | 1,19 |
| | 98 | 3,0 | 3,48 | 208,10 | <0,01 | 0,48 | 0,02 | 0,40 | 6,60 | 2391,00 | 102,60 | 2,65 | 88,85 | <0,01 | 0,05 | 5,00 |
| FBR-T2 | 7 | 3,0 | 0,95 | 251,90 | <0,01 | 0,52 | <0,01 | 0,37 | 7,07 | 2843,00 | 124,60 | 2,66 | 83,41 | <0,01 | <0,01 | 1,57 |
| | 98 | 3,0 | 3,28 | 254,70 | <0,01 | 0,48 | 0,10 | 0,51 | 8,33 | 2247,00 | 124,00 | 3,11 | 87,88 | <0,01 | 0,05 | 5,05 |

Um die Biofilmbildung auf den magnetischen Aufwuchsträgern untersuchen zu können wurden auch in diesem Versuchsansatz zuerst die oTS_{FM} Werte für die Magnetpartikel

bestimmt. Dabei konnte eine kontinuierliche Zunahme der ermittelten oTS_{FM} über den gesamten Versuchszeitraum festgestellt werden ($t = 14 \text{ d}$: $\text{oTS}_{\text{FM}} = 1,48\%$; $t = 98 \text{ d}$: $\text{oTS}_{\text{FM}} = 2,47\%$) (**Abbildung 36**). Die Biofilmausprägung auf den magnetischen Aufwuchskörpern verlief im Bioleaching-System nahezu identisch wie im CSTR-System (vgl. **Abbildung 30B**). Durch die identischen Material- und Oberflächenstrukturen der Magnetpartikel bieten sich den Mikroorganismen vergleichbare Ausgangsbedingungen für eine Biofilmbildung und erklären damit die Parallelen im Entwicklungsprozess dieser Strukturen. Unterschiede konnten lediglich in den ermittelten Biofilmhöhen ausgemacht werden. So betrug die durchschnittliche Biofilmhöhe im Bioleaching-System zwischen $16 - 30 \mu\text{m}$, wohingegen im CSTR-System nur Biofilmhöhen zwischen $13 - 25 \mu\text{m}$ erreicht werden konnten. Dieser Unterschied kann mit den auftretenden Scherkräften in den Reaktorsystemen erklärt werden. Durch die kontinuierliche Durchmischung des Substrates wurden die magnetischen Aufwuchsträger im CSTR-System ständig in Bewegung gehalten. Die Strömungswiderstände erschweren eine Biofilmbildung in diesem Reaktorsystem. Im Bioleaching-System befanden sich die magnetischen Aufwuchsträger dagegen auf einer im FBR-Kompartiment befestigten Siebplatte. Durch den gleichförmigen Volumenstrom der Prozessflüssigkeit wurde die Lage der einzelnen magnetischen Aufwuchskörper nur geringfügig verändert. So war die Biofilmbildung wesentlich ungestörter.

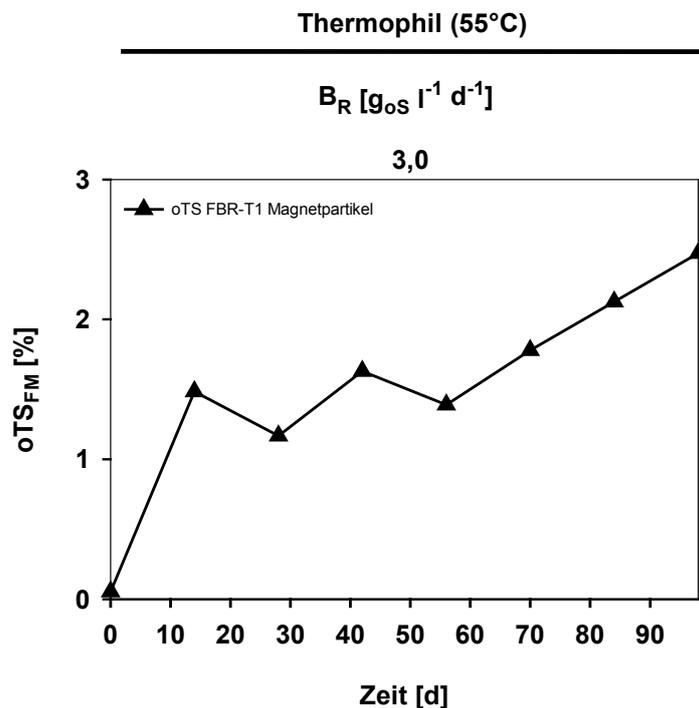


Abbildung 36: Organische Trockensubstanzgehalte (oTS_{FM}) der Biofilme aufgelagert auf magnetische Aufwuchsträger im Bioleaching-System unter thermophilen (FBR-T1) Bedingungen bei konstanter Raumbelastung (B_R).

Hinsichtlich der mengenmäßigen Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Population konnten über den gesamten Versuchszeitraum hinweg keine Unterschiede festgestellt werden (**Abbildung 37A**). Die methanogene Lebensgemeinschaft setzte

sich vornehmlich aus Vertretern der Methanosarcinaceae (38%) und Methanobacteriales (39%) zusammen. Des Weiteren konnten im Biofilm Methanomicrobiales (18%) und Methanosaetaceae (5%) nachgewiesen werden.

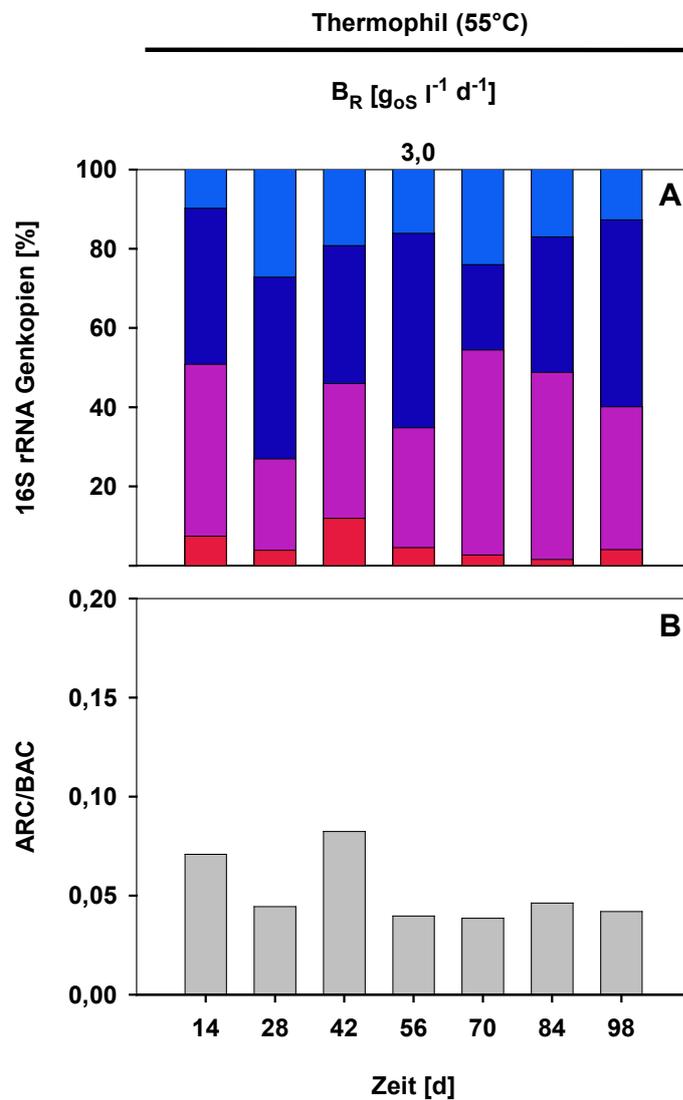


Abbildung 37: Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Gemeinschaft (A) anhand der detektierten Menge des 16S rRNA Genes in einem Nanogramm genomischer DNA unter thermophilen Bedingungen im FBR des Bioleaching-Systems bei kontinuierlicher Raumbelastung (B_R). Folgende taxonomische Einheiten wurden untersucht: Methanosaetaceae (rot), Methanosarcinaceae (violett), Methanobacteriales (dunkelblau), Methanomicrobiales (blau) und Methanococcales (nicht dargestellt). Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate). Entwicklung des Archaea zu Bacteriaverhältnisses (ARC/BAC) (B) anhand der detektierten Menge des 16S rRNA Genes in einem Nanogramm genomischer DNA unter thermophilen Bedingungen bei kontinuierlicher Raumbelastung (B_R). Für die Ermittlung des ARC/BAC Verhältnisses wurde jede DNA-Probe in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate).

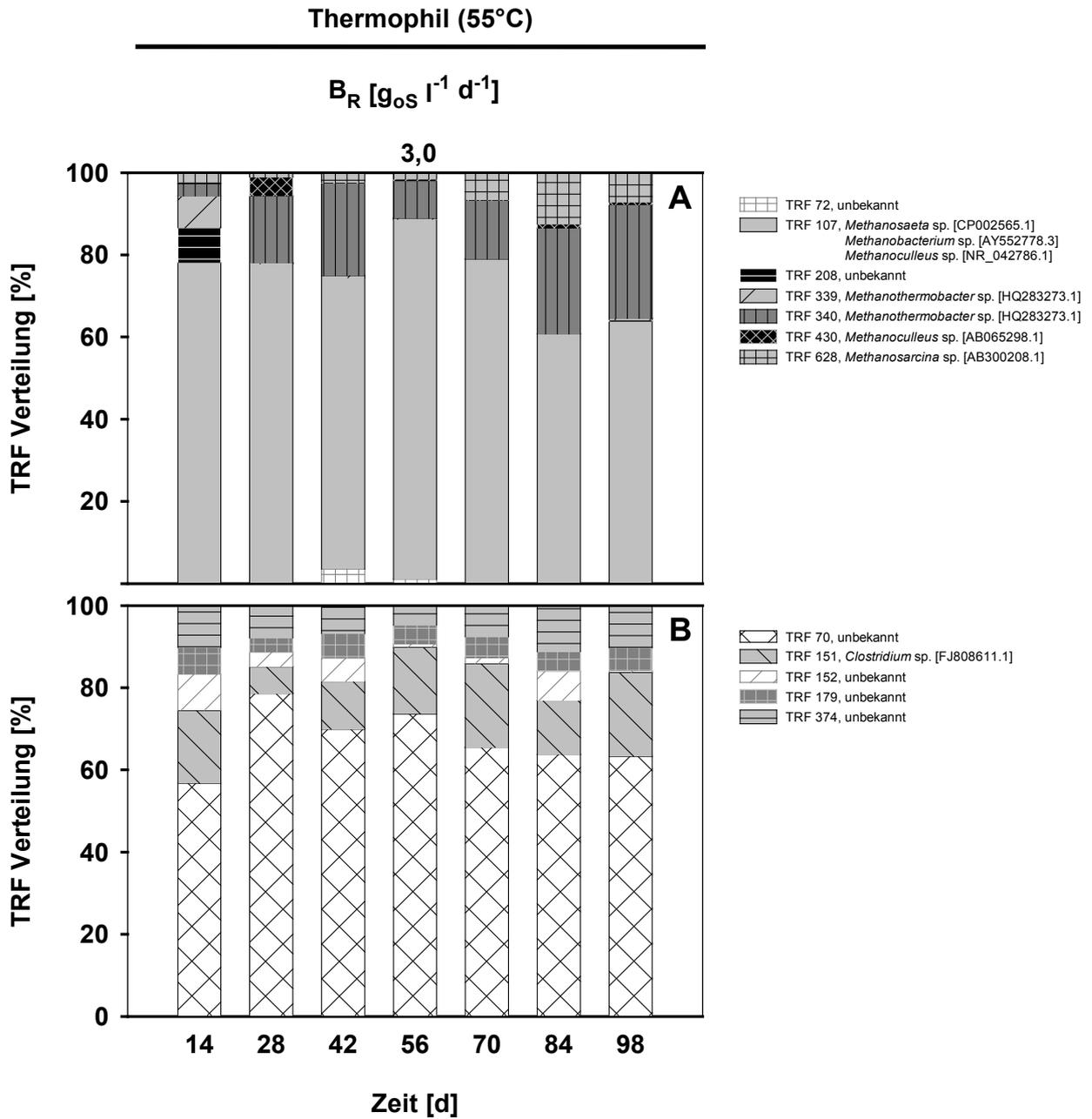


Abbildung 38: Entwicklung der (A) archaellen und (B) bakteriellen Lebensgemeinschaft in einem thermophilen Biofilm im FBR des Bioleaching-Systems. Dargestellt wurden nur jene TRFs, welche mit einem relativen Anteil > 3% an der Gesamtfluoreszenz detektiert wurden. Die Angabe in eckigen Klammern [] in der Legende bezieht sich auf die Ak-zessionsnummer des nächst verwandten Eintrags in der Datenbank NCBI Genbank ermittelt aus einem Vergleich der partiellen 16S rRNA Gensequenzen unter Verwendung der NCBI nr/nt database mit Ausschluss aller Sequenzen für bislang nicht kultivierte Arten. Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate).

Interessanterweise zeigte die Zusammensetzung der methanogenen Archaea auf den magnetischen Aufwuchskörpern deutliche Unterschiede zur methanogenen Lebensgemeinschaft auf den Polypropylenfüllkörpern (vgl. **Abbildung 18C**, **Abbildung 37A**). Diese Beobachtung bekräftigt die Aussagen der Einflussnahme von Materialeigenschaften und Oberflächenbeschaffenheit der unterschiedlichen Trägermaterialien auf die Ausprägung von Biofilmstrukturen (vgl. Kap. II.1.5). Zudem fanden diese Aussagen Bestätigung in den ermittelten ARC/BAC Verhältnissen. So konnten für die magnetischen Aufwuchsträger im Bioleaching-System nur sehr geringe ARC/BAC Verhältnisse ermittelt werden (ARC/BAC = 0,05 - 0,08) (**Abbildung 37B**). Auf Acrylglas (AG) und PVC hingegen wurden unter identischen Umgebungsbedingungen und Prozessparametern deutlich höhere ARC/BAC Verhältnisse erzielt (ARC/BAC = 0,40 - 1,00) (**Abbildung 29**).

Auch mit der TRFLP Technik konnten nur geringfügige Veränderungen in der Zusammensetzung der Archaea-Gemeinschaft nachgewiesen werden (**Abbildung 38**). Mit über 70% der prozentualen TRF Verteilung dominierte über den gesamten Versuchszeitraum das TRF107. Da mit der Q-PCR bereits gezeigt werden konnte, dass sich sowohl Methanosaetaceae als auch Methanomicrobiales und Methanobacteriales in den Biofilmstrukturen der magnetischen Aufwuchsträger befanden, kann davon ausgegangen werden, dass sich Vertreter aus allen drei methanogenen Gruppen in diesem TRF wiederfinden. Zudem konnten TRF339 und TRF340, welche den *Methanothermobacter* sp. zugeordnet werden können, in größeren Anteilen detektiert werden (vgl. RADEMACHER *et al.* [2012a]).

Der Anteil an *Methanosarcina* sp. fiel hingegen deutlich geringer aus als der ermittelte prozentuale Anteil mit der Q-PCR (TRFLP = 2 - 12%; Q-PCR = 34 - 54%) (**Abbildung 37A**, **Abbildung 38A**). Die möglichen Gründe für diese detektierten Unterschiede wurden bereits bei der Betrachtung der TRFLP Ergebnisse im CSTR-System diskutiert.

Auch für die bakterielle Lebensgemeinschaft konnten über den gesamten Prozessverlauf hinweg keine Unterschiede in der Diversität festgestellt werden (**Abbildung 38B**). TRF70 war das am häufigsten detektierte Fragment innerhalb der Bacteria (56 - 78%). Zudem konnten in geringeren Anteilen auch TRF151, TRF152, TRF179 und TRF374 nachgewiesen werden. Im Vergleich zum CSTR-System fiel die bakterielle Vielfalt auf den magnetischen Aufwuchsträgern deutlich geringer aus (vgl. **Abbildung 33B**, **Abbildung 38B**).

Biofilmbildung auf magnetischen Aufwuchsträgern im CSTR-System bei kontinuierlicher Steigerung der Raumbelastung bis zum Eintritt einer Überlastung

Für die Belastungssteigerung wurden in die Reaktorsystemen CSTR-M1 und CSTR-T1 bei einer Raumbelastung von $2,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ magnetische Aufwuchsträger (MFGPs, zwei Volumenprozent bezogen auf das Reaktorvolumen) eingebracht (vgl. Kap. II.1.3). Die Reaktoren CSTR-M2 und CSTR-T2 dienten weiterhin als biologische Kontrollen und wurden ohne Partikelzusatz betrieben. Nach einer Adaptationszeit von 14 Wochen erfolgte die schrittweise Erhöhung der Raumbelastung um $0,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in einem zweiwöchigen Rhythmus.

Durch eine technische Störung, *i.e.* einem Ausfall der Rührsysteme, wurde der Biogasbildungsprozess bei einer Raumbelastung von $4,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ stark beeinträchtigt und zeitweise sogar unterbrochen. Zum Wiedererlangen einer Grundstabilität in den CSTR-Systemen wurde deshalb die Gesamtlaufzeit dieser Belastungsstufe auf einen Zeitraum von 4 Wochen ausgeweitet. Die kontinuierliche Belastungssteigerung wurde bis zu einer Raumbelastung von $8,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ durchgeführt.

Unter **mesophilen Temperaturbedingungen** nahmen Biogas- und Methanbildung in beiden CSTR-Systemen bis zu einer Raumbelastung von $6,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ kontinuierlich zu (**Abbildung 39A**). Im CSTR-M1 blieben die Biogas- und Methanbildung bei Raumbelastungsraten zwischen $6,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und $7,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nahezu auf konstantem Niveau. Mit der Steigerung auf eine Raumbelastung von $8,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnte ein leichter Rückgang in der Biogasbildung beobachtet werden. Im Kontrollreaktor ohne Partikelzusatz kam es hingegen bereits bei einer Raumbelastung von $6,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ zu einer deutlichen Abnahme der Biogasbildung. Im weiteren Verlauf der Prozessführung stiegen die Biogas- und Methanbildungswerte wieder an, wobei die Maximalwerte, die bei einer Raumbelastung von $6,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erzielt wurden, nicht mehr erreicht werden konnten.

Interessanterweise konnten bereits ab einer Raumbelastung von $4,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ leicht erhöhte Werte der Biogas- und Methanbildung des CSTR-Reaktors mit Partikelzusatz im Vergleich zum Kontrollreaktor ohne Aufwuchsträgermaterial festgestellt werden (z.B. $B_{\text{R}} = 4,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, Methanbildung (CSTR-M1) = $4,50 \text{ l d}^{-1}$, Methanbildung (CSTR-M2) = $3,72 \text{ l d}^{-1}$). Die effizientere Biogasbildung im CSTR-M1 System kann auf die Biofilmentwicklung auf den magnetischen Aufwuchsträgern zurückgeführt werden. Bereits Ramm *et al.* [2014] konnten während der Belastungssteigerung eines mit Zuckerrübensilage gespeisten CSTR-Systems einen stabileren Biogasbildungsprozess in jenem Reaktorsystem beobachten, welchem magnetische Aufwuchsträger vor der kontinuierlichen Erhöhung der Raumbelastung zugesetzt wurden.

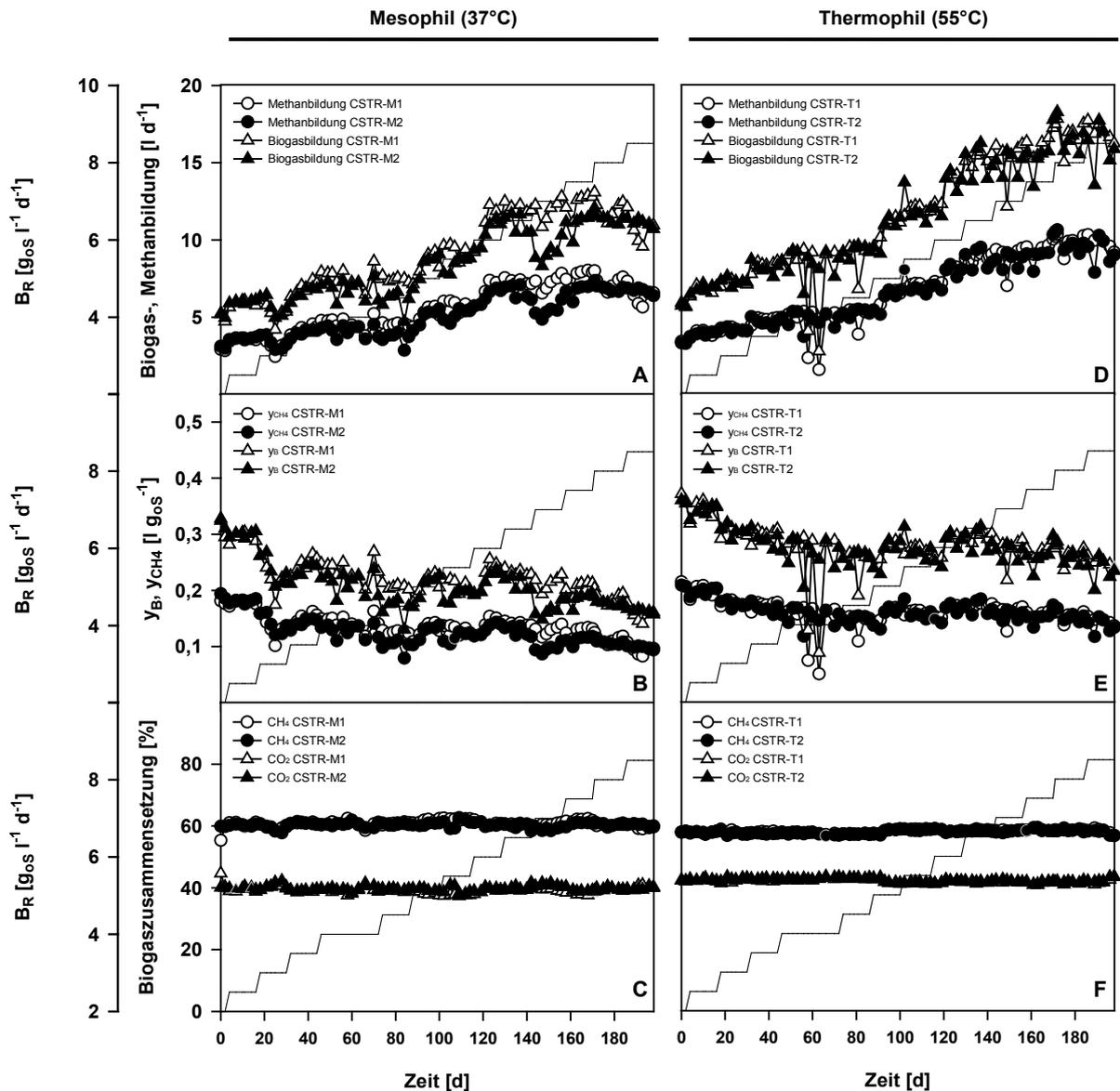


Abbildung 39: Biogasausbildung, -ausbeute (y_B) und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute (y_{CH_4}) in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R) in CSTR-M1 und CSTR-T1 (mit MFGPs) sowie CSTR-M2 und CSTR-T2 (biologische Kontrollen ohne MFGPs). Im Hintergrund in Stufen dargestellt ist die Raumbelastung, welche alle 14 d um $0,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gesteigert wurde. (A, D) Biogas- und Methanbildung, (B, E) Biogas- und Methanausbeute sowie (C, F) Biogaszusammensetzung unter mesophilen (CSTR-M1, CSTR-M2) und thermophilen (CSTR-T1, CSTR-T2) Bedingungen. CH₄ = Methan, CO₂ = Kohlenstoffdioxid.

Der Vorteil an einer Biofilmbildung liegt u.U. in dem Entstehen von Mikrohabitaten, die sich strukturell und chemisch von denen des eigentlichen Makrohabitats unterscheiden. So gaben LERM *et al.* [2012] an, dass durch das Zusammenspiel von mineralischen Komponenten und einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Biofilmen beispielsweise Entsäuerungsprozesse begünstigt werden, so dass in unmittelbarer Umgebung der mikrobiellen Flora andere Umgebungsbedingungen herrschen als in der im Reaktorsystem befindlichen Prozessflüssigkeit. Durch die Bildung der Mikrohabitate wäre die mikrobielle Lebensgemeinschaft somit besser an plötzliche physikalische und chemische Veränderungen im Reaktorsystem angepasst.

Beim Vergleich der Biogasbildungswerte mit den durchschnittlich ermittelten Biogasbildungsraten der KTBL konnten bis zu einer Raumbelastung von $3,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nahezu vergleichbare Biogasbildungsraten erzielt werden (z.B. $B_{\text{R}} = 2,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: Methanbildung_(Versuch) = $4,96 \text{ l d}^{-1}$, Methanbildung_(KTBL) = $5,52 \text{ l d}^{-1}$). Dieses bestätigt den ungestörten und effizienten Biogasbildungsprozess. Im weiteren Verlauf der Belastungssteigerung nahmen die Biogasbildungswerte der Versuchsreihe deutlich ab, so dass bei einer Raumbelastung von $8,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ lediglich 10% der von der KTBL ermittelten durchschnittlichen Biogasgasbildungsrate erreicht werden konnte. Die deutliche Abnahme in der Biogasbildungseffizienz spiegelt sich zudem in den Werten der Biogas- und Methanausbeute wieder. Über den gesamten Versuchszeitraum konnte eine kontinuierliche Abnahme in der Biogas- und Methanausbeute für beide CSTR-Systeme festgestellt werden (**Abbildung 39B**). So sank beispielsweise die Methanausbeute des CSTR-M1 Systems von $0,181 \text{ l g}_{\text{oS}}^{-1}$ ($B_{\text{R}} = 2,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) auf $0,096 \text{ l g}_{\text{oS}}^{-1}$ ($B_{\text{R}} = 8,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Die Ursachen für den Rückgang in der Methanausbeute liegen auch in dieser Versuchsreihe wieder in der deutlichen Verkürzung der Verweilzeiten der Substrate im Reaktor ($B_{\text{R}} = 2,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: HRT = 47 d; $B_{\text{R}} = 8,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: HRT = 10 d) sowie dem Verlust an Mikroorganismen durch den erhöhten Reaktorvolumenausstrom begründet (vgl. Kap. II.1.1).

Interessanterweise konnte selbst bei einer Raumbelastung von $8,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ keine völlige Überlastung der CSTR-Systeme erreicht werden. Die Biogaszusammensetzung verhielt sich über den gesamten Versuchszeitraum in beiden CSTR-Systemen nahezu konstant ($\text{CH}_4 = 60 - 62\%$; $\text{CO}_2 = 38 - 40\%$) (**Abbildung 39C**). Dieses Ergebnis überrascht zunächst, da in vergleichbaren Reaktorsystemen mit deutlich geringeren Raumbelastungsraten ein Abbruch im Biogasbildungsprozess durch die starke Anreicherung an organischen Säuren im Reaktorsystem herbeigeführt werden konnte [MÄHNERT 2007].

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liegt in der Reaktorvorlaufzeit und der damit verbundenen Biofilmbildung begründet. So scheinen nicht nur die Biofilme auf den magnetischen Aufwuchsträgern eine wichtige Rolle im Reaktorsystem zu spielen, sondern auch jene, welche sich innerhalb des Reaktors ausbilden konnten. So bieten die Rührwerke (Acrylglas), die Reaktorwand (Edelstahl) oder auch schwer abbaubare, organische Substanzen wie Keratin (Schweineborsten) und Lignin (Maissilage) optimale Nischen zur Biofilmbildung.

Vor der Magnetpartikelzugabe liefen die hier untersuchten Reaktorsysteme über einen Zeitraum von 10 Monaten unter konstanten Bedingungen. In dieser Zeit konnte sich eine mikrobielle Gemeinschaft in den CSTR-Systemen entwickeln, die optimal an die Umgebungsbedingungen und die eingesetzten Substrate angepasst ist. Durch die Biofilmbildung konnte der Biogasbildungsprozess selbst unter verschlechterten Milieubedingungen, wie z.B. einem steigenden Propionsäure- zu Essigsäureverhältnis, aufrechterhalten werden (**Abbildung 40B**). Ein hoher Anteil an Propionsäure kann grundsätzlich zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Stoffwechselprozesse von Mikroorganismen im Reaktorsystem führen [NIELSEN *et al.* 2007, ILLMER & GSTRALTHALER 2009]. Im CSTR-M2 (Kontrolle ohne Aufwuchsträger) konnte bei einer Raumbelastung von $8,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ein Propionsäure- zu Essigsäureverhältnis von 12,92 ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wurde im CSTR-M1 (mit magnetischen Auswuchsträgern) lediglich ein Verhältnis von 2,78 erreicht. Dieses spricht für einen deutlich besseren Abbau an organischen Säuren im CSTR-System mit Magnetpartikelzusatz, bedingt durch die zusätzlich gewonnenen Biofilmstrukturen auf den Aufwuchsträgern.

Dass der Substratabbau im Reaktorsystem mit Partikelzusatz effizienter verlief als im Kontrollreaktor, konnte mit der Analyse der TS und oTS_{FM} Werte bestätigt werden. So konnten ab einer Raumbelastung von $6,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ deutlich geringe TS und oTS_{FM} Werte im CSTR-M1 ermittelt werden im Vergleich zum CSTR-M2 (z.B. $B_{\text{R}} = 8,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: oTS_{FM} (CSTR-M1; mit magnetischen Aufwuchsträgern) = 4,13%, oTS_{FM} (CSTR-M2, Kontrolle ohne Aufwuchsträger) = 4,65%) (**Abbildung 40A**).

Der Gehalt an Ammoniumstickstoff war hingegen über den gesamten Versuchszeitraum in beiden CSTR-Systemen nahezu identisch (**Abbildung 40C**). Auch konnten keine Unterschiede in der Spurenelementzusammensetzung der Prozessflüssigkeiten festgestellt werden (**Tabelle 24**). Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Spurenelementzusammensetzung konnte lediglich eine geringfügige Abnahme des Eisenanteils in beiden CSTR-Reaktoren beobachtet werden. Im CSTR-M1 fiel der Rückgang deutlicher aus als im CSTR-M2 ($B_{\text{R}} = 2,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: Fe (CSTR-M1) = 63,16 $\text{mg kg}_{\text{OS}}^{-1}$, Fe (CSTR-M2) = 72,91 $\text{mg kg}_{\text{OS}}^{-1}$; $B_{\text{R}} = 8,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: Fe (CSTR-M1) = 49,74 $\text{mg kg}_{\text{OS}}^{-1}$, Fe (CSTR-M1) = 68,02 $\text{mg kg}_{\text{OS}}^{-1}$). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte in der Einbettung des freiverfügbaren Eisens in die Biofilmstrukturen liegen. Um diese Aussage bekräftigen zu können, müssten weitere Versuchsreihen zum Verbleib des Eisens in den Reaktorsystemen erfolgen.

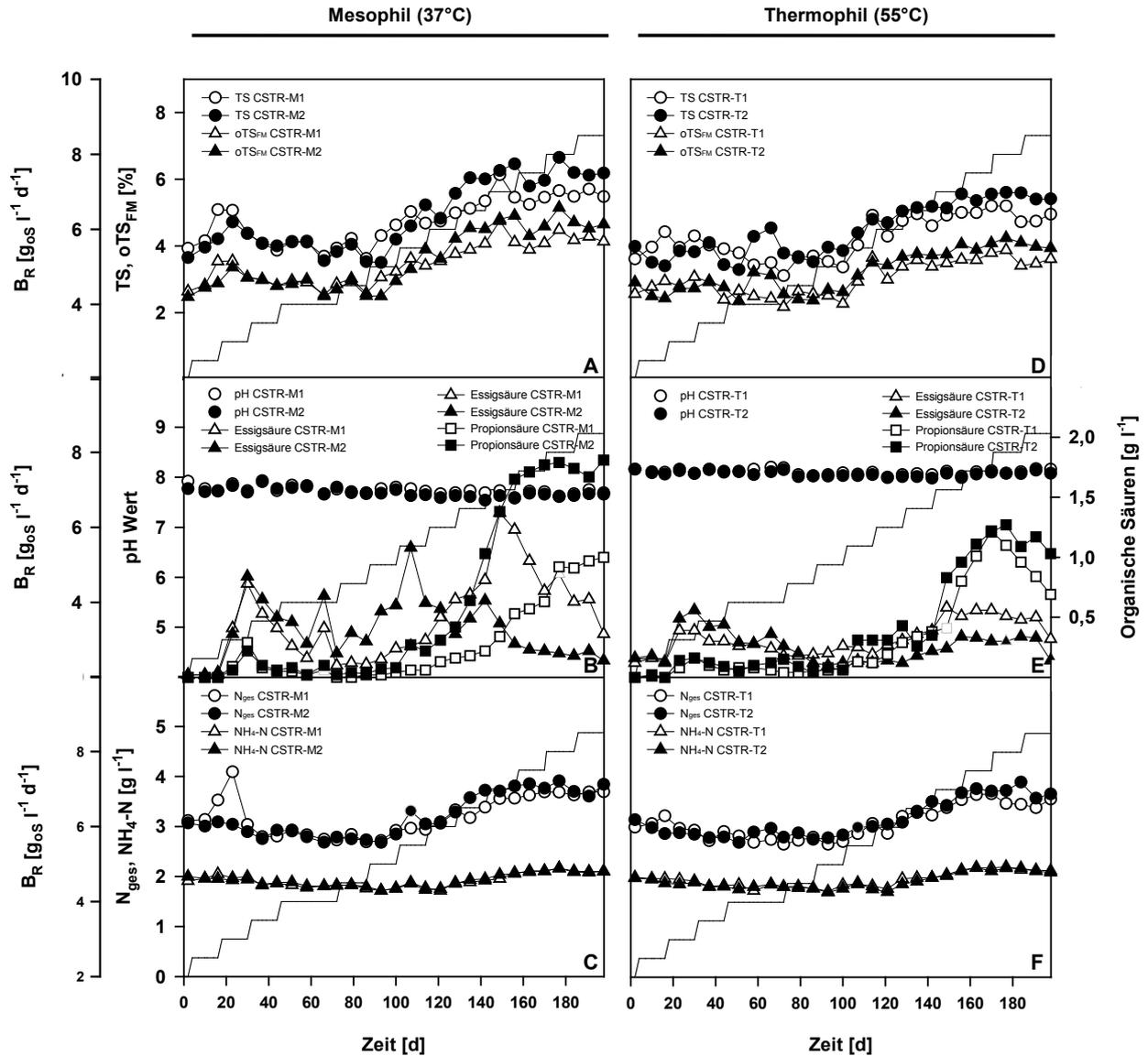


Abbildung 40: Physikalische und chemische Parameter in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R) in CSTR-M1 und CSTR-T1 (mit MFGPs) sowie CSTR-M2 und CSTR-T2 (biologische Kontrollen ohne MFGPs). Im Hintergrund in Stufen dargestellt ist die Raumbelastung, welche alle 14 d um $0,5 \text{ g}_{\text{os}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gesteigert wurde. (A, D) Gehalt an Trockensubstanz (TS) und organischer Trockensubstanz (oTS_{FM}), (B, E) pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen sowie (C, F) Gehalte an Gesamtstickstoff (N_{ges}) und Ammoniumstickstoff ($\text{NH}_4\text{-N}$) unter mesophilen (CSTR-M1, CSTR-M2) und thermophilen (CSTR-T1, CSTR-T2) Bedingungen.

Tabelle 24: Spurenelementanalyse der Prozessflüssigkeit im CSTR-System zu Beginn ($d = 0$) und am Ende ($d = 198$) der kontinuierlichen Steigerung der Raumbelastung bis zum Eintritt einer Überlastung. N.A. = Nicht analysiert.

| Reaktor | Zeit [d] | B_R [g _{OS} l ⁻¹ d ⁻¹] | Cd | Cr | Cu | Zn | Ni | [mg kg _{OS} ⁻¹] | | | | |
|---------|-------------|---|--------|--------|-------|-------|--------|--------------------------------------|-------|-------|------|------|
| | | | | | | | | B | Mn | Fe | Pb | Co |
| CSTR-M1 | 0 | 2,0 | < 0,01 | < 0,01 | 13,60 | 47,16 | < 0,01 | 1,93 | 22,93 | 63,16 | 0,03 | N.A. |
| | 198 | 8,5 | < 0,01 | 0,25 | 19,81 | 53,06 | < 0,01 | 2,30 | 28,67 | 49,74 | 0,31 | 0,21 |
| CSTR-M2 | 0 | 2,0 | < 0,01 | < 0,01 | 14,52 | 50,52 | < 0,01 | 2,04 | 26,50 | 72,91 | 0,04 | N.A. |
| | 198 | 8,5 | < 0,01 | 0,10 | 20,43 | 53,78 | < 0,01 | 2,33 | 30,13 | 68,02 | 0,28 | 0,21 |
| CSTR-T1 | 0 | 2,0 | < 0,01 | < 0,01 | 14,06 | 48,06 | < 0,01 | 2,08 | 22,58 | 64,69 | 0,04 | N.A. |
| | 198 | 8,5 | < 0,01 | 0,13 | 19,93 | 52,22 | < 0,01 | 2,30 | 28,41 | 63,97 | 0,26 | 0,21 |
| CSTR-T2 | 0 | 2,0 | < 0,01 | < 0,01 | 13,51 | 46,77 | < 0,01 | 2,02 | 21,15 | 62,18 | 0,03 | N.A. |
| | 198 | 8,5 | < 0,01 | 0,18 | 19,98 | 52,14 | < 0,01 | 2,29 | 30,27 | 69,35 | 0,29 | 0,21 |

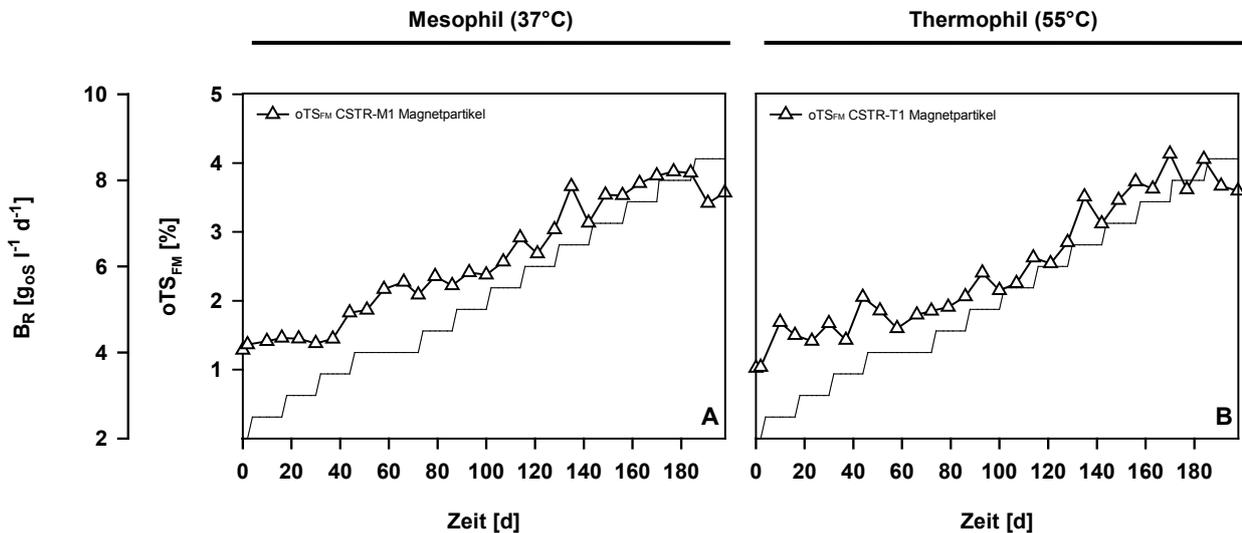


Abbildung 41: Organische Trockensubstanzgehalte (oTS_{FM}) der aufgelagerten Biofilme der magnetischen Aufwuchsträger in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R) im CSTR-System unter (A) mesophilen (CSTR-M1) und (B) thermophilen (CSTR-T1) Bedingungen.

Um die Biofilmbildung auf den magnetischen Aufwuchskörpern besser charakterisieren zu können, wurden auch in dieser Versuchsreihe die oTS_{FM} Werte der aufgelagerten Biofilme der Magnetpartikel bestimmt. Zunächst konnte mit steigender Raumbelastung eine deutliche Zunahme in den oTS_{FM} Gehalten festgestellt werden (**Abbildung 41A**). Dieses spricht für ein kontinuierliches Biofilmwachstum auf den magnetischen Aufwuchsträgern. Bei Raumbelastungsraten zwischen $7,5 \text{ g}_{OS} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und $8,0 \text{ g}_{OS} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnten nur noch geringfügige Veränderungen in den ermittelten oTS_{FM} Gehalten festgestellt werden.

In der letzten Belastungsstufe wurde dann ein deutlicher Rückgang in den oTS_{FM} Gehalten verzeichnet. Diese Beobachtungen können zum einen mit den Biofilmbildungsstadien und zum zweiten durch die veränderten Umgebungsbedingungen erklärt werden (vgl. Kap. II.1.3) [COSTERTON 1999]. Mit dem Erreichen des Reifungsprozesses

verändert sich die Biofilmgröße nur noch geringfügig, da Anlagerungs- und Abtragungsprozesse zu gleichen Anteilen verlaufen. Mit dem Erreichen eines solchen Stadiums würde sich auch der oTS_{FM} Gehalt dieser organischen Strukturen nur noch geringfügig verändern. Dieses könnte ein Grund für die konstanten oTS_{FM} Gehalte in den hohen Belastungsstufen sein.

Allerdings kann auch ein Einfluss der sich verändernden physikalischen und chemischen Parameter der Prozessflüssigkeit auf die mikrobielle Lebensgemeinschaft nicht ausgeschlossen werden. So können durch andauernd höhere Säurekonzentrationen in der Prozessflüssigkeit die Außenstrukturen des Biofilms angegriffen werden. Mit dem Eindringen der Prozessflüssigkeit in die Biofilmstruktur ist die Schutzfunktion des Biofilms für die Mikroorganismen aufgehoben. Diese werden dann direkt mit den neuen Umgebungsbedingungen konfrontiert, was von einer verminderten Stoffwechselfähigkeit bis hin zum Absterben einzelner Mikroorganismengruppen führen kann. Beides würde wiederum zu einer deutlichen Abnahme in der Biogasbildung führen (vgl. **Abbildung 39A-B, Abbildung 40B, Abbildung 41A**).

Auch mit der konfokalen Laserscanningmikroskopie konnten deutliche Unterschiede in der Biofilmausprägung über die Zeit beobachtet werden. In den ersten 20 Wochen bildete sich ein umfassender Biofilmrasen auf den magnetischen Aufwuchsträgern aus, welcher hauptsächlich durch EPS-Strukturen mit sich darin vereinzelt befindenden Mikroorganismen charakterisiert war (**Abbildung 42A-B**). Im weiteren Prozessverlauf bildeten sich dann kolonieartige, kettenförmige Mikroorganismenstrukturen aus, die mit steigender Raumbelastungsrate an Größe und Dimension zunahmten (**Abbildung 42C-F, Abbildung 46**). Insgesamt konnten Biofilme bis zu einer Höhe von 35 μm nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Mikroorganismen eine bestimmte Zeit benötigen, um sich in größeren Strukturen auf den magnetischen Aufwuchsträgern zu organisieren.

Bei den kettenförmigen Mikroorganismenstrukturen, die mit der Laserscanningmikroskopie nachgewiesen werden konnten, könnte es sich um Methanosaetaceae handeln. So setzte sich die methanogene Lebensgemeinschaft auf den magnetischen Aufwuchsträgern fast ausschließlich aus Vertretern dieser Familie zusammen (98-99%) (**Abbildung 43A**). Lediglich ab einer Raumbelastung von $6,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnten in geringen Anteilen Vertreter der Methanomicrobiales und Methanobacteriales nachgewiesen werden.

Dass mit steigender Raumbelastung unter mesophilen Temperaturbedingungen der Anteil an Methanomicrobiales und Methanobacteriales gegenüber den acetoklastischen Methanogenen kontinuierlich zunimmt, konnte bereits in verschiedenen Reaktorsystemen nachgewiesen werden [HAO *et al.* 2013, KUNDU *et al.* 2013, WILLIAMS *et al.* 2013, ZHAO *et al.* 2013]. So zeigten ZHAO *et al.* [2013], dass bei einer Belastungssteigerung in einem mesophil betriebenen Festbettreaktor, ein bevorzugtes Anlagern von Methanomicrobiales an Trägermaterialien aus Karbonfasern zu beobachten war. Die steigenden Säurekonzentrationen im CSTR-System könnten für die Abnahme der Metha-

nosaetaceae in den Biofilmstrukturen verantwortlich sein (vgl. Kap. II.1.1) [BLUME *et al.* 2010, NETTMANN *et al.* 2010, WILLIAMS *et al.* 2013].

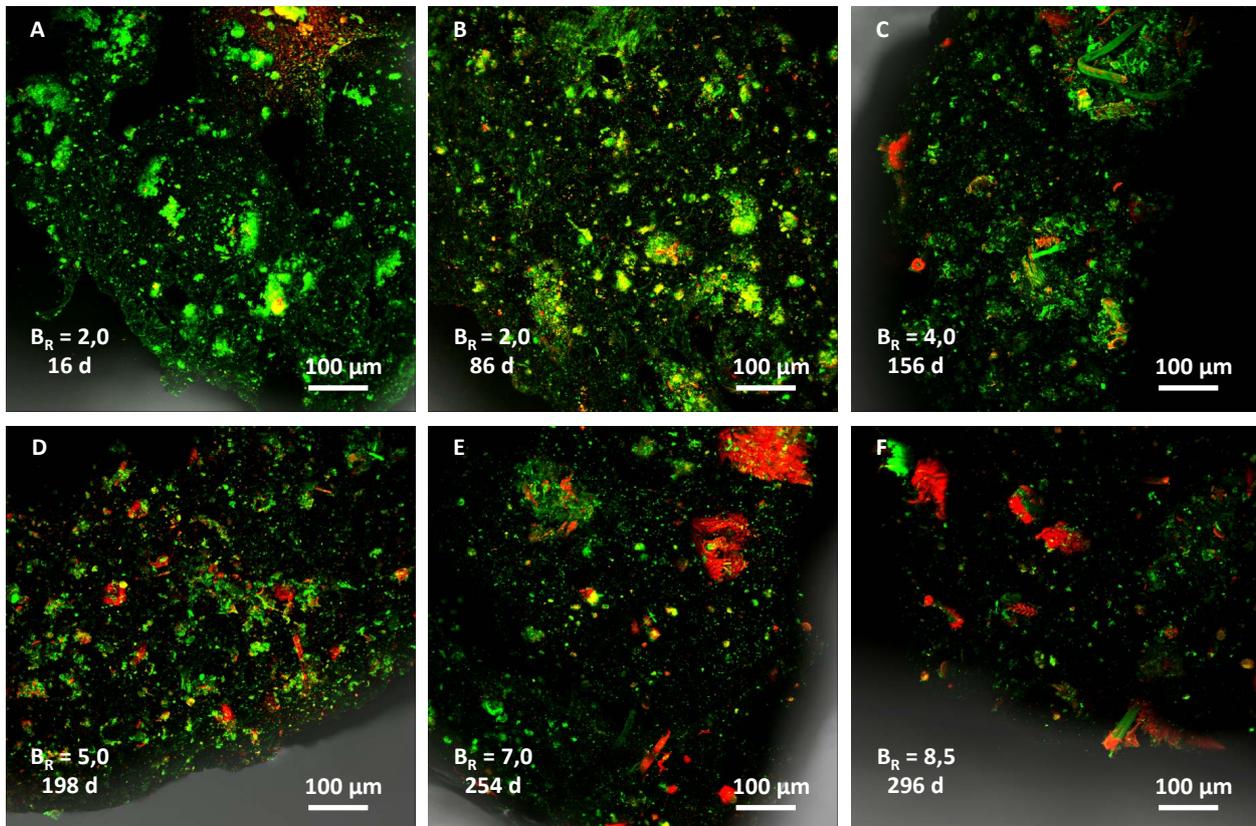


Abbildung 42: Konfokale Laserscanningmikroskopie der aufgelagerten Biofilme der magnetischen Aufwuchsträger in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R) im CSTR-System (CSTR-M1) unter mesophilen Temperaturbedingungen nach (A) 16, (B) 86, (C) 156, (D) 198, (E) 254 und (F) 296 Tagen (d). Bei allen mikroskopischen Aufnahmen handelt es sich um die Maximumprojektion aller Farbkanäle (Durchlichtmikroskopieaufnahme [Schwarz/Weißfärbung], Fluoreszenzmikroskopie [Grünfärbung unter Verwendung des lectingebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Alexa488 für den Nachweis von extrazellulären, polymeren Substanzen, Rotfärbung unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYTO60 für den Nachweis von Mikroorganismen]). Die Angabe der B_R in den Abbildungen bezieht sich auf die Einheit $\text{g}_{\text{OS}} \text{l}^{-1} \text{d}^{-1}$.

Dass der Anteil an Methanosaetaceae im Biofilm abgenommen haben muss, wird auch bei der Betrachtung der ARC/BAC Verhältnisse deutlich. Zunächst kann ein kontinuierlicher Anstieg des ARC/BAC Verhältnisses bis zu einer Raumbelastung von $4,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{l}^{-1} \text{d}^{-1}$ beobachtet werden (ARC/BAC = 1,29) (**Abbildung 43B**). Danach nimmt das ARC/BAC Verhältnis deutlich ab und erreicht bei einer Raumbelastung von $8,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{l}^{-1} \text{d}^{-1}$ nur noch einen Wert von 0,53.

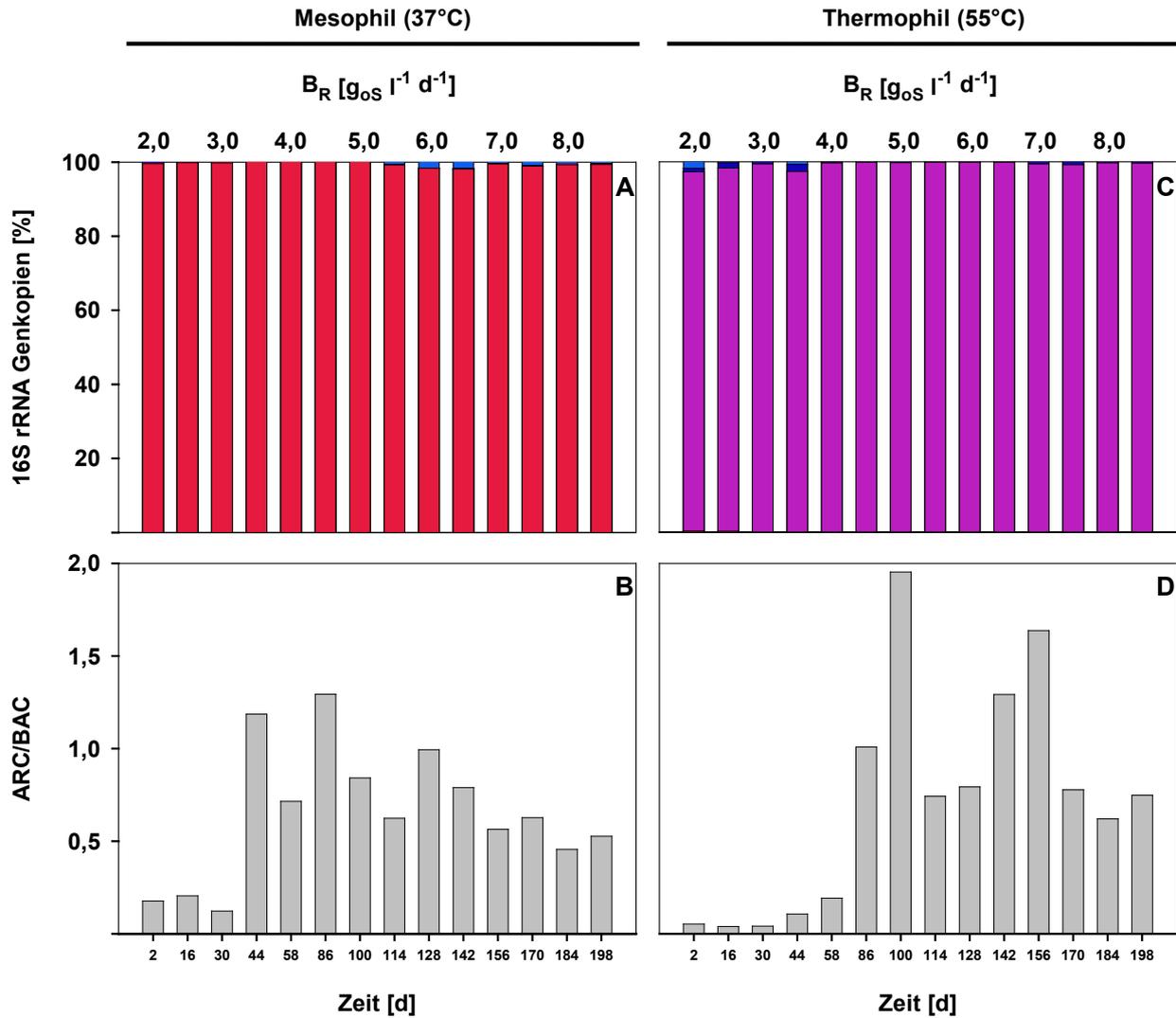


Abbildung 43: Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung der methanogenen Archaea-gemeinschaft in den Biofilmen der magnetischen Aufwuchsträger im CSTR-System anhand der detektierten Kopienzahl des 16S rRNA Genes in einem Nanogramm genomischer DNA unter (A) mesophilen und (C) thermophilen Bedingungen in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R). Folgende taxonomische Gruppen wurden untersucht: Methanosaetaceae (rot), Methanosarcinaceae (violett), Methanobacteriales (dunkelblau), Methanomicrobiales (blau) und Methanococcales (nicht dargestellt, da nicht nachgewiesen). Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate). Verhältnis Archaea zu Bacteria (ARC/BAC) anhand der detektierten Kopienzahl für das 16S rRNA Gen in einem Nanogramm genomischer DNA unter (B) mesophilen und (D) thermophilen Bedingungen in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R). Für die Ermittlung des ARC/BAC Verhältnisses wurde jede DNA-Probe in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate).

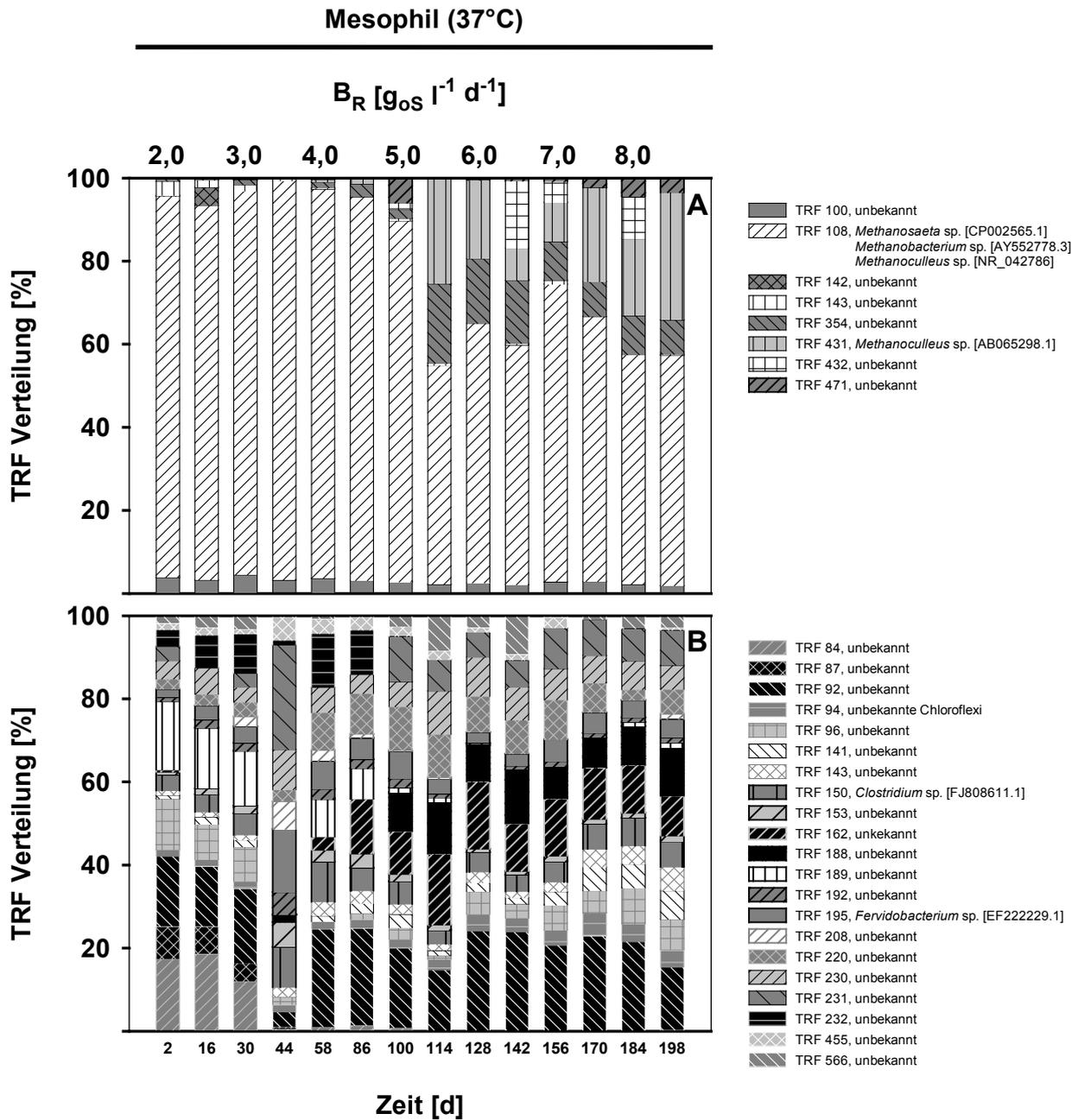


Abbildung 44: Entwicklung der (A) archaeellen und (B) bakteriellen Lebensgemeinschaft in dem Biofilm des mesophilen CSTR-Systems (CSTR-M1). Dargestellt wurden nur jene TRFs, welche mit einem relativen Anteil > 3% an der Gesamtfluoreszenz detektiert wurden. Die Angabe in eckigen Klammern [] in der Legende bezieht sich auf die Akzessionsnummer des nächst verwandten Eintrags in der Datenbank NCBI Genbank ermittelt aus einem Vergleich der partiellen 16S rRNA Gensequenzen unter Verwendung der der NCBI nr/nt database mit Ausschluss aller Sequenzen für bislang nicht kultivierte Arten. Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate).

Auch die Ergebnisse der TRFLP Analyse lassen auf eine Zunahme an Methanomicrobiales bei steigender Raumbelastung gegenüber den Methanosaetaceae im Biofilm schließen (**Abbildung 44A**). Bis zu einer Raumbelastung von $4,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ dominierte mit weit über 90% das TRF108, welches den Vertretern *Methanosaeta* sp., *Methanobacterium* sp. und *Methanoculleus* sp. zugeordnet werden kann [vgl. RADEMACHER *et al.* 2012a]. Aufgrund der mikroskopischen und Q-PCR gestützten Analysen erscheint hier eine Zuordnung zu *Methanosaeta* aber am wahrscheinlichsten. Ab einer Raumbelastung von $4,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnte dann die kontinuierliche Zunahme des TRF431 festgestellt werden, welches ausschließlich *Methanoculleus* sp. zugeschrieben werden kann ($B_R = 4,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, TRF431 = 1,42%; $B_R = 8,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, TRF431 = 30,77%). Neben dem TRF431 nahmen auch die Anteile an TRF345 und TRF471 mit steigenden Raumbelastungsraten zu. Allerdings konnten diesen Fragmenten bislang keine bekannten taxonomischen Einheiten zugeordnet werden.

Auch in der Zusammensetzung der Bacteria konnte eine deutliche Veränderung mit zunehmender Belastungssteigerung festgestellt werden (**Abbildung 45B**). Bis zu einer Raumbelastung von $3,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ wurden nahezu die gleichen TRF Profile mit vergleichbaren Anteilen im Biofilm nachgewiesen. Im Bereich zwischen $3,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und $6,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ fand eine deutliche Umverteilung der bereits vorhandenen TRFs statt und es konnten neue TRF Profile in der TRF-Verteilung ausgemacht werden. Ab einer Raumbelastung von $6,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ änderte sich die Zusammensetzung der bakteriellen TRFs nur noch geringfügig.

Unter **thermophilen Temperaturbedingungen** konnten deutlich höhere Biogas- und Methanbildungswerte als unter mesophiler Reaktorfahrweise festgestellt werden (vgl. Kap. II.1.3) (**Abbildung 39A, 39D**). So nahm die Biogasbildung bis zu einer Raumbelastung von $8,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ kontinuierlich zu und es konnten Maximalwerte von $18,27 \text{ l d}^{-1}$ erreicht werden. Ab einer Raumbelastung von $8,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ fiel die Biogasbildung leicht ab. Interessanterweise konnten unter thermophiler Temperaturführung keine Unterschiede in der Biogasbildung zwischen dem Reaktorsystem mit bzw. ohne Magnetpartikelzusatz festgestellt werden. Somit scheint die Biofilmbildung auf den magnetischen Aufwuchsträgern nur einen geringen Einfluss auf die Biogasbildung und -ausbeute zu haben (**Abbildung 39D-E**). Allerdings übernehmen die Biofilme auch in thermophilen Reaktorsystemen eine Schutzfunktion für die mikrobielle Lebensgemeinschaft gegenüber sich verändernden Umgebungsbedingungen, da auch hier der Biogasbildungsprozess trotz Anreicherung der Prozessflüssigkeit an organischen Säuren ungehindert weiterlaufen konnte.

Während der Anfahrphase der thermophilen Reaktorsysteme konnte bereits ein Rückgang in der Biogasbildung bei einer Raumbelastung von $3,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden alle folgenden Versuchsreihen bei Raumbelastungsraten von $2,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ durchgeführt, um eine Überlastung der Systeme zu vermeiden (vgl. Kap. II.1.1 und II.1.3). Durch den kontinuierlichen Betrieb der thermophilen Reaktorsysteme über einen Zeitraum von 10 Monaten konnte sich eine stabile Mikroorganismengemeinschaft sowohl in der Prozessflüssigkeit als auch in den Biofilmen des

Reaktors entwickeln, welche an die Veränderungen im Reaktormilieu besser adaptiert war (vgl. mesophile Reaktorsysteme).

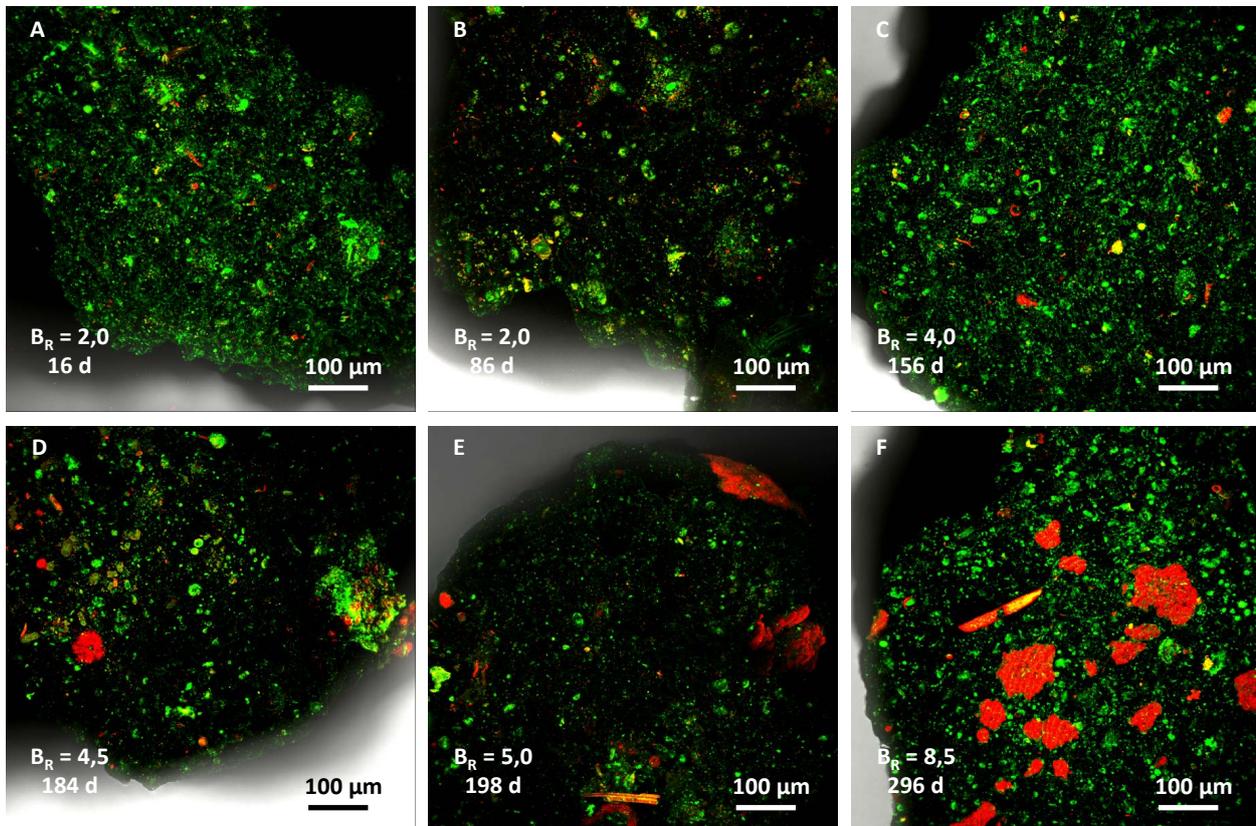


Abbildung 45: Konfokale Laserscanningmikroskopie der aufgelagerten Biofilme der magnetischen Aufwuchsträger in Abhängigkeit von der Raumbelastung (B_R) im CSTR-System (CSTR-T1) unter thermophilen Temperaturbedingungen nach (A) 16, (B) 86, (C) 156, (D) 184, (E) 198 und (F) 296 Tagen (d). Bei allen mikroskopischen Aufnahmen handelt es sich um die Maximumprojektion aller Farbkanäle (Durchlichtmikroskopieaufnahme [Schwarz/Weißfärbung], Fluoreszenzmikroskopie [Grünfärbung unter Verwendung des lectingebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Alexa488 für den Nachweis von extrazellulären, polymeren Substanzen, Rotfärbung unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYTO60 für den Nachweis von Mikroorganismen]). Die Angabe der B_R in den Abbildungen bezieht sich auf die Einheit $g_{OS} l^{-1} d^{-1}$.

Wie bereits unter mesophiler Temperaturführung beobachtet, nahmen auch bei einer Temperaturführung von $55^\circ C$ die Biogas- und Methanausbeuten mit steigender Raumbelastung ab (z.B. $B_R = 2,0 g_{OS} l^{-1} d^{-1}$, $y_{CH_4} (CSTR-T1) = 0,213 l g_{OS}^{-1}$; $B_R = 8,5 g_{OS} l^{-1} d^{-1}$, $y_{CH_4} (CSTR-T1) = 0,135 l g_{OS}^{-1}$). Die Gründe für den deutlichen Rückgang in der Biogas- und Methanausbeute wurden bereits bei der Betrachtung der Ergebnisse der mesophil betriebenen CSTR-Systeme ausführlich diskutiert und können auf die Reaktorsysteme mit thermophiler Temperaturführung übertragen werden.

Die Biogaszusammensetzung änderte sich in den beiden Reaktorsystemen über den gesamten Versuchszeitraum nur geringfügig (**Abbildung 39F**). Bei einer Raumbelastung von $8,5 g_{OS} l^{-1} d^{-1}$ konnte ein leichter Rückgang des Methananteils beobachtet wer-

den ($B_R = 8,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $\text{CH}_4 = 58\text{-}59\%$; $B_R = 8,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $\text{CH}_4 = 56\text{-}57\%$). Somit kann aus der Abnahme der Biogasbildung und des Methananteils im Biogas in dieser Belastungsstufe auf eine beginnende Beeinträchtigung des Biogasbildungsprozesses geschlossen werden.

Diese Beeinträchtigung kann vor allem auf den Anstieg an organischen Säuren, i. e. S. Propionsäure, in den Reaktorsystemen zurückgeführt werden (vgl. mesophile Reaktorsysteme) (**Abbildung 40E**). So stieg das Propionsäure- zu Essigsäureverhältnis im CSTR-T1 (mit Aufwuchsträger) von 0,08 auf 2,16 an. Im CSTR-T2 (Kontrolle ohne Aufwuchsträger) konnte sogar ein Anstieg des Verhältnisses bis auf einen Wert von 7,36 nachgewiesen werden. Diese Analysen weisen darauf hin, dass auch unter thermophilen Temperaturbedingungen ein verbesserter Umsatz der gebildeten Propionsäure im CSTR-System mit Partikelzusatz stattfand.

Die deutlich geringeren TS und oTS_{FM} Gehalte der Prozessflüssigkeit in den thermophil betriebenen Reaktorsystemen gegenüber denen unter mesophiler Temperaturführung liegen in der effizienteren Biogasbildung begründet (vgl. **Abbildung 39A, 39D; Abbildung 40A, 40D**). So konnte für das CSTR-M1 System bei einer Belastungsrate von $8,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ein oTS_{FM} Gehalt von 4,13% bestimmt werden, wohingegen im CSTR-T1 nur ein Wert von 3,61% erreicht werden konnte. Interessanterweise lagen die TS und oTS_{FM} Gehalte des CSTR-Systems mit Partikelzusatz ab einer Raumbelastung von $6,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ deutlich unter denen des Kontrollreaktors (**Abbildung 40D**). Diese Beobachtung lässt zunächst auf einen verbesserten Substratumsatz im CSTR-T1 schließen. Allerdings konnte diese Annahme keine Bestätigung im Vergleich der ermittelten Biogasausbeuten beider CSTR-Systeme finden (vgl. **Abbildung 39D-E**).

Die Spurenelementzusammensetzung änderte sich über den gesamten Versuchszeitraum in beiden Reaktorsystemen nur geringfügig (**Tabelle 24**). Auch der ermittelte Rückgang des Eisenanteils, welcher in den Prozessflüssigkeiten der mesophil betriebenen CSTR-Systeme nachgewiesen werden konnte, fand unter thermophiler Temperaturführung nicht statt.

Die Biofilmentwicklung auf den magnetischen Aufwuchsträgern unter thermophiler Temperaturführung verlief nahezu identisch wie unter mesophilen Temperaturbedingungen (**Abbildung 41**). Bis zu einer Raumbelastung von $7,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ konnte eine kontinuierliche Zunahme in den oTS_{FM} Gehalten der magnetischen Aufwuchsträger festgestellt werden. Mit der Erhöhung auf eine Raumbelastung von $8,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ sanken die oTS_{FM} Gehalte der Magnetpartikel leicht ab ($B_R = 8,0 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $\text{oTS}_{\text{FM}} = 4,06\%$; $B_R = 8,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: $\text{oTS}_{\text{FM}} = 3,60\%$).

Auch bei der mikroskopischen Betrachtung der Biofilmentwicklung konnten Parallelen zur Biofilmbildung unter mesophiler Temperaturführung beobachtet werden. So bildeten sich ab einer Raumbelastung von $4,5 \text{ g}_{\text{oS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ zusammenhängende Mikroorganismengemeinschaften aus, welche sich mit steigender Raumbelastung flächenartig ausbreiteten (**Abbildung 45**). Allerdings bestanden diese mikrobiellen Lebensgemeinschaften im Unterschied zu der Entwicklung bei mesophilen Biofilmen vornehmlich aus kokkoiden

Vertretern (**Abbildung 47**). Kettenbildende Zellaggregate konnten hingegen nicht nachgewiesen werden (vgl. **Abbildung 46**, **Abbildung 47**).

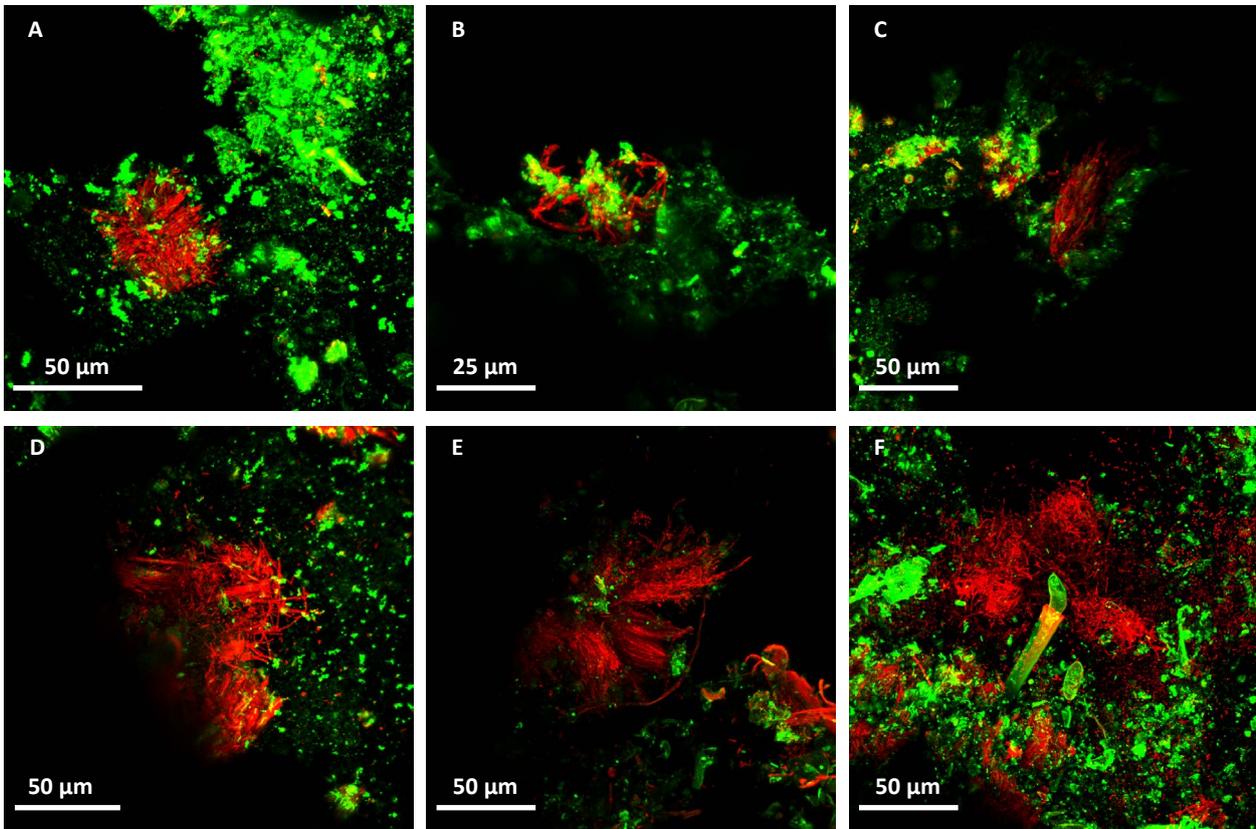


Abbildung 46: Typische Biofilmstrukturen (kettenbildende Zellkolonien) auf den magnetischen Aufwuchsträgern im CSTR-System (CSTR-M1) unter (A-F) mesophilen Temperaturbedingungen. Bei allen mikroskopischen Aufnahmen handelt es sich um die Maximumprojektion aller Farbkanäle (Durchlichtmikroskopieaufnahme [Schwarz/Weißfärbung], Fluoreszenzmikroskopie [Grünfärbung unter Verwendung des lectingebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Alexa488 für den Nachweis von extrazellulären, polymeren Substanzen, Rotfärbung unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYTO60 für den Nachweis von Mikroorganismen]).

Da mittels Q-PCR-Assay gezeigt werden konnte, dass die archaeelle Lebensgemeinschaft auf den Magnetpartikeln sich bei einer Temperaturführung von 55°C fast ausschließlich aus Vertretern der Methanosarcinaceae zusammensetzte, könnte ein großer Anteil der kokkoiden Zellstrukturen auf diese methanogene Familie zurückfallen, zumal das ARC/BAC Verhältnis in diesen Biofilmen teilweise über 1,5 lag (**Abbildung 43C-D**).

Bis zu einer Raumbelastung von 3,5 g_{OS} l⁻¹ d⁻¹ konnten in den thermophilen Biofilmstrukturen noch Vertreter der Methanobacteriales und Methanomicrobiales nachgewiesen werden. Ab einer Raumbelastung von 4,0 g_{OS} l⁻¹ d⁻¹ entfielen weit über 99% aller detektierten 16S rRNA Genkopien der methanogenen Archaea auf die Methanosarcinaceae. Da Vertreter dieser methanogenen Familie sowohl hohe Ammoniumkonzentrationen (7.000 mg l⁻¹) als auch hohe Essigsäurekonzentrationen (15.000 mg COD l⁻¹) und sprunghafte Veränderungen im pH-Wert Verhalten (0,8 - 1,0 Einheiten) tolerieren, kön-

nen sich diese Methanogenen besonders gut an Veränderungen im Reaktormilieu anpassen [DE VRIEZE *et al.* 2012].

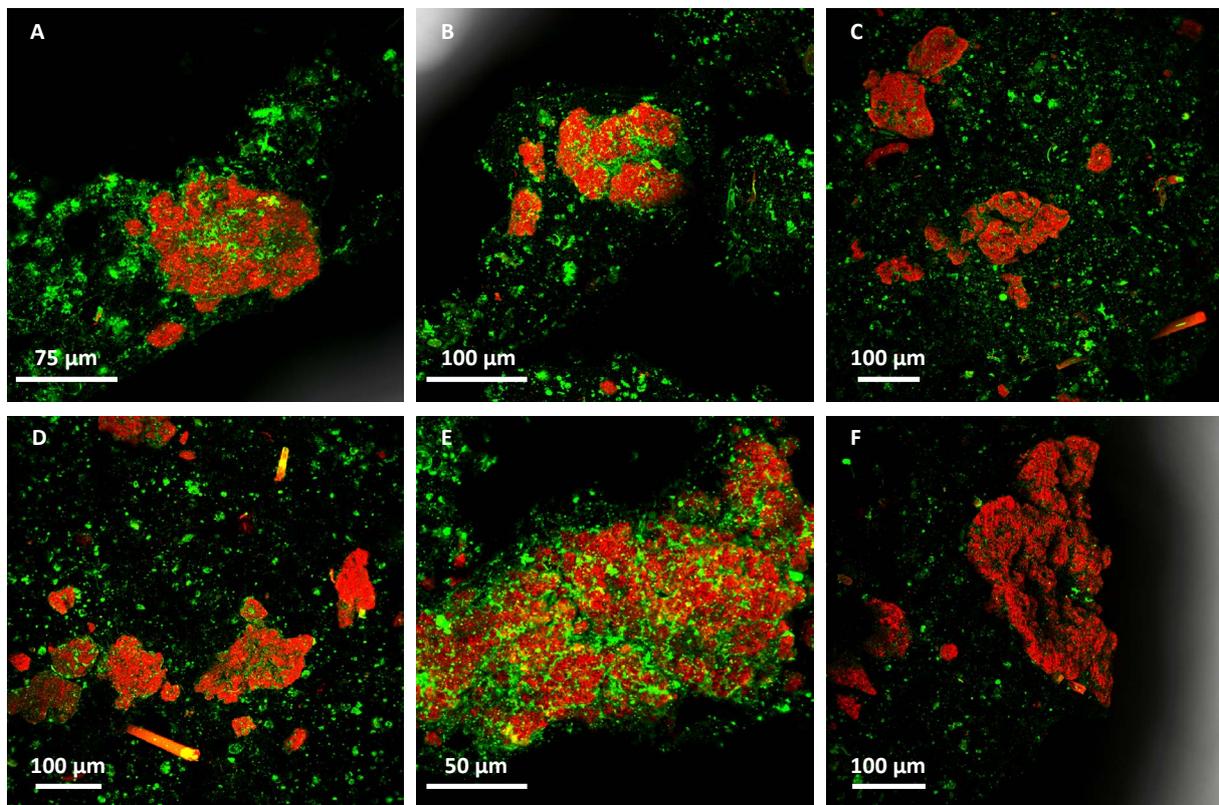


Abbildung 47: Typische Biofilmstrukturen (kokkenförmige Zellkolonien) auf den magnetischen Aufwuchsträgern im CSTR-System (CSTR-T1) unter (A-F) thermophilen Temperaturbedingungen. Bei allen mikroskopischen Aufnahmen handelt es sich um die Maximumprojektion aller Farbkanäle (Durchlichtmikroskopieaufnahme [Schwarz/Weißfärbung], Fluoreszenzmikroskopie [Grünfärbung unter Verwendung des lectingebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Alexa488 für den Nachweis von extrazellulären, polymeren Substanzen, Rotfärbung unter Verwendung des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYTO60 für den Nachweis von Mikroorganismen]).

Zudem konnten ABBASSI-GUENDOZ *et al.* [2013] nachweisen, dass eine durch Methanobacteriales dominierende, methanogene Lebensgemeinschaft sich bei steigenden TS Gehalten des Reaktorinhalts in eine Methanosarcinaceae dominierende Lebensgemeinschaft verändert. Sowohl eine Zunahme an organischen Säuren als auch der Anstieg des TS Gehaltes konnten im CSTR-T1 festgestellt werden (**Abbildung 40D-E**). Dieses könnte zur deutlichen Dominanz der Methanosarcinaceae in den Biofilmstrukturen des thermophil betriebenen CSTRs geführt haben. Die Präferenz der Koloniebildung von Methanosarcinaceae auf Oberflächen wurde bereits mehrfach diskutiert (vgl. Kap. II.1.1).

Die aus der Biofilmbetrachtung und Q-PCR gewonnenen Erkenntnisse konnten mit den Ergebnissen aus der TRFLP Analyse bestätigt werden. Bis zu einer Raumbelastung von $3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ entfiel der größte Anteil der detektierten TRFs auf TRF108 (55-93%)

(Abbildung 48A). Durch die Ergebnisse aus der Q-PCR ist davon auszugehen, dass es sich hierbei vornehmlich um Vertreter der *Methanoculleus* sp. und *Methanobacterium* sp. handelt.

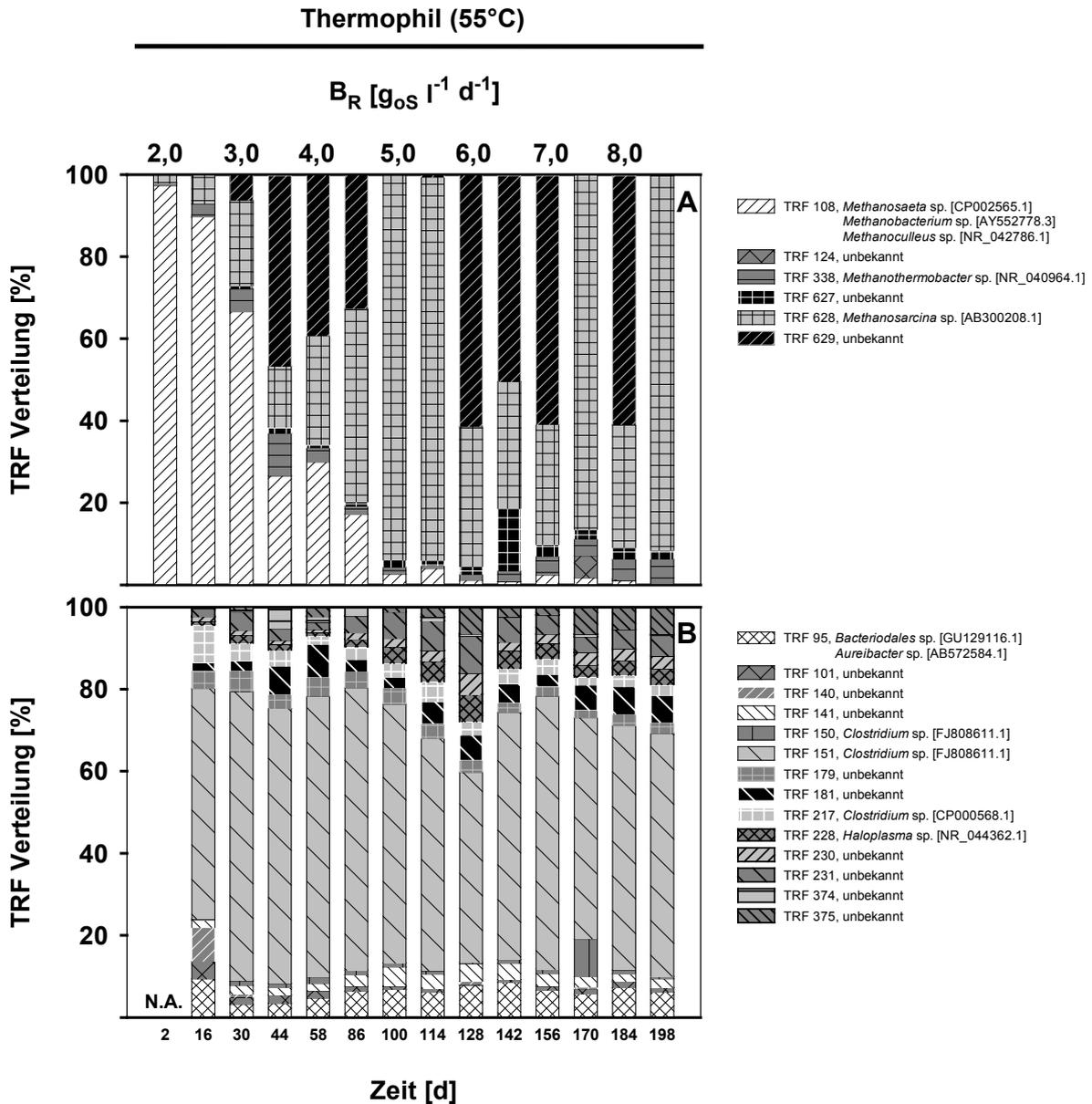


Abbildung 48: Entwicklung der (A) archaellen und (B) bakteriellen Lebensgemeinschaft in dem Biofilm des thermophilen CSTR-Systems (CSTR-T1). Dargestellt wurden nur jene TRFs, welche mit einem relativen Anteil > 3% an der Gesamtfluoreszenz detektiert wurden. Die Angabe in eckigen Klammern [] in der Legende bezieht sich auf die Akzessionsnummer des nächst verwandten Eintrags in der Datenbank NCBI Genbank ermittelt aus einem Vergleich der partiellen 16S rRNA Gensequenzen unter Verwendung der der NCBI nr/nt database mit Ausschluss aller Sequenzen für bislang nicht kultivierte Arten. Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (*i.e.* technische Replikate). N.A. = nicht analysiert.

Ab einer Raumbelastung von $3,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nimmt dann der Anteil an TRF628 und TRF629 deutlich zu. TRF628 konnte als *Methanosarcina* sp. identifiziert werden. Somit bestätigt dieser Ansatz die deutliche Zunahme an *Methanosarcina* sp. im Biofilmverband bei steigender Raumbelastung ($B_{\text{R}} = 3,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: TRF628 = 14%; $B_{\text{R}} = 8,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$: TRF628 = 91,64%).

Auch wenn TRF629 bislang keiner taxonomischen Einheit zugeordnet werden konnte, liegt es nahe davon auszugehen, dass es sich auch bei diesem Fragment um einen Vertreter der Gattung *Methanosarcina* handelt. In anderen TRFLP Analysen konnten für TRFs mit nur um eine Base unterschiedlicher Fragmentlänge enge Verwandtschaften nachgewiesen werden. Beispiele dafür finden sich bei RADEMACHER [2013], z.B. die Paare TRF107 und TRF108 bzw. TRF337 und TRF338. Nichtsdestotrotz sind weitere Analysen erforderlich um diese Annahme zu bestätigen.

Im Gegensatz zur archaeellen Lebensgemeinschaft konnten kaum Veränderungen in der Zusammensetzung der fermentativen Bacteria-Gemeinschaft festgestellt werden (**Abbildung 48B**). Mit über 46% war TRF151 dominierend während des gesamten Versuchszeitraums. Dieses Fragment konnte in früheren Studien als Vertreter der Clostridien (*Clostridium* sp. str. FJ808611.1) identifiziert werden [RADEMACHER 2013].

Des Weiteren wurden TRF95, TRF181, TRF228 und TRF231 in größeren Anteilen im Biofilm nachgewiesen. Insgesamt fiel jedoch die bakterielle Diversität unter thermophilen Temperaturbedingungen deutlich geringer aus als unter mesophiler Temperaturführung (vgl. **Abbildung 44B**, **Abbildung 46B**).

Abschließend lässt sich feststellen, dass sich die Biofilmbildung sowohl unter mesophilen als auch unter thermophilen Temperaturbedingungen positiv auf den Biogasbildungsprozess ausgewirkt hat. So konnte eine nahezu unbeeinträchtigte Biogasbildung bis zu einer Raumbelastung von $7,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ festgestellt werden. Für das mesophile CSTR-System konnte mit dem Einsatz von magnetischen Aufwuchsträgern sogar eine Effizienzsteigerung in der Biogasausbeute erzielt werden.

II.1.7 Biofilme in einer großtechnischen Forschungsanlage

Während der Projektlaufzeit bot sich die Gelegenheit die Biofilmbildung auf Polypropylenfüllkörpern eines *downflow*-Festbettreaktors („Methanreaktor“) im vergrößerten Maßstab (Arbeitsvolumen 12 m³) einer Biogasforschungsanlage der Firma GICON - GROßMANN INGENIEUR CONSULT -BIOENERGIE GMBH, Cottbus, näher zu untersuchen (**Abbildung 49**).

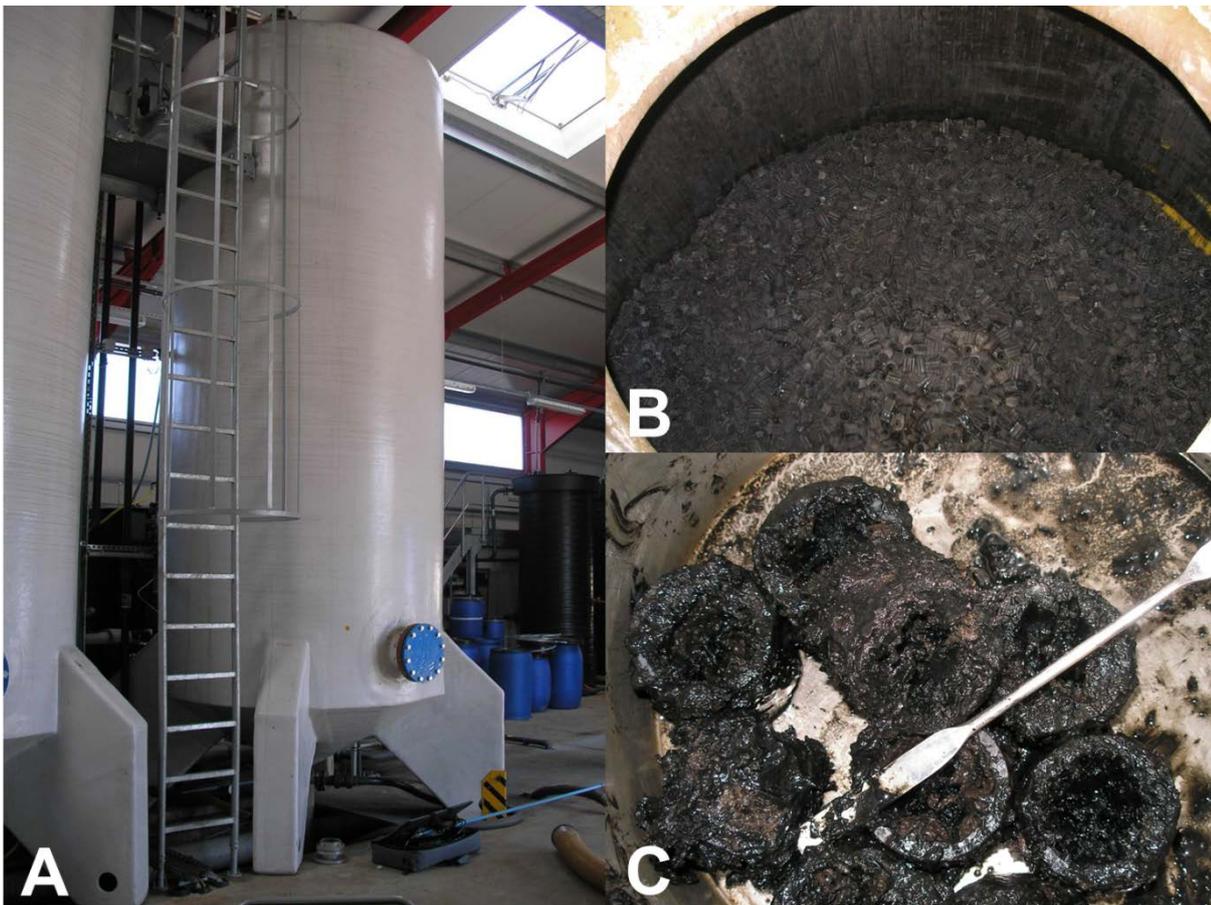


Abbildung 49: Großtechnische Biogas-Forschungsanlage der Firma GICON - Großmann Ingenieur Consult -Bioenergie GmbH am Standort Cottbus. (A) downflow-Festbettreaktor mit ca. 4 m Höhe und einem Volumen von ca. 12 m³. (B) Füllung des Festbettreaktors ohne Prozessflüssigkeit von oben gesehen. (C) Einzelne Füllkörper mit Biofilm-Bewuchs nach mehrwöchigem Betrieb. [Quelle: Schönberg / BTU Cottbus / GICON]

Bei der Versuchsanlage handelte es sich um ein zweistufiges Reaktorsystem, in welchem die Aufschlussprozesse des organischen Materials (Perkolatorkompartimente, Hydrolyse) und der Prozess der eigentlichen Methanbildung (Methanreaktoren, Methanogenese) wie in dem zuvor untersuchten Bioleaching-System räumlich voneinander getrennt waren, um so eine bessere Optimierung der einzelnen Abbaustufen erreichen zu können. Die Funktionsweise des Reaktorsystems sowie eine detaillierte Beschreibung der Betriebsweise wurden von BUSCH *et al.* [2009] publiziert.

Zum Probenahmezeitpunkt wurde das Reaktorsystem mesophil bei 37°C betrieben. Als Gärsubstrat wurde ausschließlich Maissilage verwendet (Substratzugabe ca. 1.400 m⁻³ a⁻¹). Die Gesamtbio gasausbeute betrug 500 NI kg_{CSB}⁻¹, wobei sich die Methan ausbeute auf 350 NI_{CH₄} kg_{CSB}⁻¹ belief. Bei einer Raumbelastung von 20 kg_{CSB}⁻¹ m⁻³ d⁻¹ mit einer Verweilzeit von 12 h wurde über mehrere Wochen hinweg die Biogasbildung im Reaktorsystem verfolgt.

Für die Untersuchung des Biofilms wurden dem Methanreaktor (Flüssigkeitsvolumen = 12 m³) Prozessflüssigkeit (FP) sowie Füllkörper mit mikrobiellem Bewuchs entnommen (**Abbildung 49B,C**). Die Entnahme der Aufwuchsträger erfolgte in unterschiedlichen Höhen (FK-O = 4 m, FK-M = 2 m, FK-U = 0,5 m).

Bei der Betrachtung der chemischen Parameter konnten keine Unterschiede im Säuerungsverhalten zwischen Prozessflüssigkeit und den gebildeten Biofilmen festgestellt werden (**Tabelle 25**). Der Ammoniumstickstoffgehalt hingegen lag in den Biofilmen deutlich höher als in der Prozessflüssigkeit (NH₃-N (FP) = 0,62 g kg_{FM}⁻¹, NH₃-N (Biofilme) = 1,11 - 2,21 g kg_{FM}⁻¹). Dabei konnte der höchste Gehalt in jenen Biofilmen nachgewiesen werden, welche sich im mittleren Bereich des Methanreaktors ausbildeten. Im Gegensatz dazu wiesen diese Biofilme die geringsten Konzentrationen an fast allen analysierten Spurenelementen auf (**Tabelle 26**).

Tabelle 25: Physikalische und chemische Parameter der gebildeten Biofilme auf den Aufwuchsträgern und der Prozessflüssigkeit. N_{ges} = Gehalt an Gesamtstickstoff, NH₄-N = Gehalt an Ammoniumstickstoff, TS = Gehalt an Trockensubstanz, oTS_{FM} = Gehalt an organischer Trockensubstanz, pH = pH-Wert, FP = Prozessflüssigkeit des Methanreaktors, FK-O = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 4,0 m, FK-M = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 2,0 m, FK-U = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 0,5 m, n.b. nicht bestimmt.

| | pH | Essig-säure [g l ⁻¹] | Propion-säure [g l ⁻¹] | N _{ges} [g kg _{FM} ⁻¹] | NH ₄ -N [g kg _{FM} ⁻¹] | TS _{60 °C} [%] | TS _{105 °C} [%] | oTS _{FM} [%] |
|--------------------------------|------|-------------------------------------|---------------------------------------|---|---|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Prozessflüssigkeit (FP) | 7,81 | 0,04 | < 0,02 | 0,62 | 0,45 | n.b. | 0,56 | 0,21 |
| Biofilme | | | | | | | | |
| Füllkörper Oben (FK-O) | n.b. | 0,04 | < 0,04 | n.b. | 1,11 | 24,00 | n.b. | n.b. |
| Füllkörper Mitte (FK-M) | n.b. | 0,04 | < 0,04 | n.b. | 2,21 | 27,00 | n.b. | n.b. |
| Füllkörper Unten (FK-U) | n.b. | 0,04 | < 0,04 | n.b. | 1,62 | 18,06 | n.b. | n.b. |

Tabelle 26: Spurenelementanalyse der gebildeten Biofilme auf den Aufwuchsträgern. FK-O = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 4,0 m, FK-M = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 2,0 m, FK-U = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 0,5 m.

| | Al | As | B | Ca | Cd | Co | Cu | Fe | K | Mg | Mn | Na |
|-------------------------|--------------------------------------|------|-------|-----------|------|------|-------|----------|----------|----------|---------|--------|
| | [mg kg _{os} ⁻¹] | | | | | | | | | | | |
| Füllkörper Oben (FK-O) | 549,86 | 1,12 | 27,11 | 162200,00 | 0,26 | 5,71 | 8,16 | 23765,00 | 8032,00 | 19376,00 | 2363,00 | 756,00 |
| Füllkörper Mitte (FK-M) | 375,17 | 0,47 | 25,97 | 160544,00 | 0,23 | 5,07 | 5,03 | 22103,00 | 7808,00 | 26309,00 | 2571,00 | 771,00 |
| Füllkörper Unten (FK-U) | 521,51 | 0,92 | 28,22 | 102601,00 | 0,39 | 5,61 | 22,40 | 25796,00 | 10667,00 | 35428,00 | 2346,00 | 694,00 |

| | P | Zn | Cr | Mo | Ni | Pb | Se | W | C | N | S | H |
|-------------------------|--------------------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| | [mg kg _{os} ⁻¹] | | | | | | | | [%] | | [%] | |
| Füllkörper Oben (FK-O) | 65539,00 | 477,00 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | 17,77 | 2,82 | 1,08 | 3,05 |
| Füllkörper Mitte (FK-M) | 84040,00 | 292,00 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | 15,65 | 2,67 | 1,45 | 3,05 |
| Füllkörper Unten (FK-U) | 77632,00 | 385,00 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 | 17,24 | 3,12 | 1,17 | 3,49 |

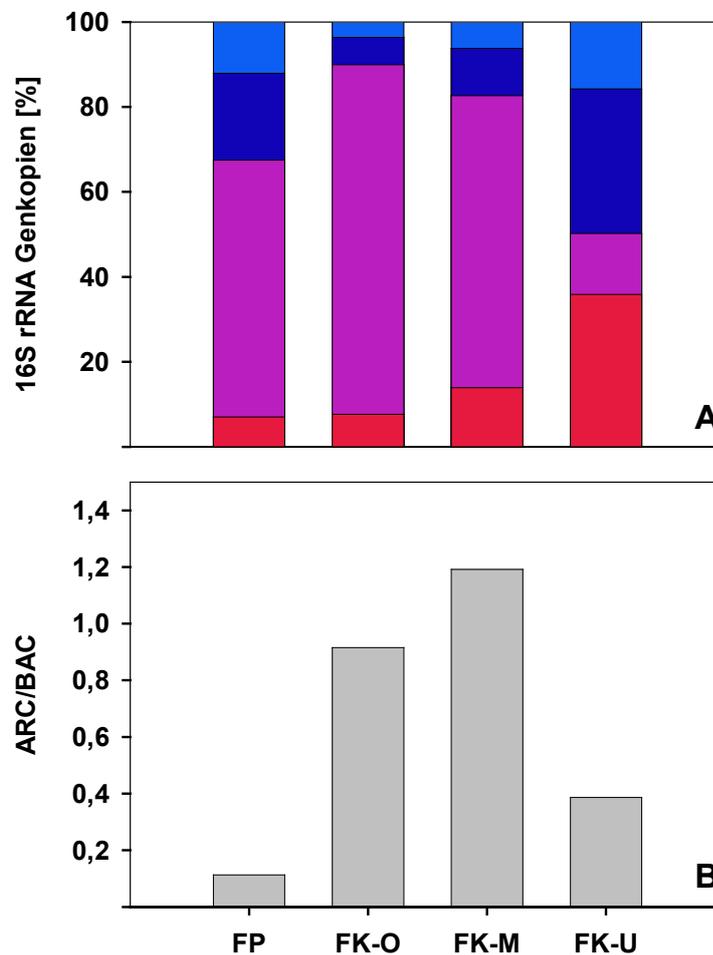


Abbildung 50: (A) Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Gemeinschaft sowie (B) Darstellung des Archaea zu Bacteria Verhältnisses (ARC/BAC) in den Biofilmen der Füllkörper und der Prozessflüssigkeit unter mesophilem Temperaturregime ermittelt auf Basis der detektierten Menge des 16S rRNA Genes in einem Nanogramm genomischer DNA. Folgende taxonomische Einheiten wurden untersucht: Methanosaetaceae (rot), Methanosarcinaceae (violett), Methanobacteriales (dunkelblau), Methanomicrobiales (blau) und Methanococcales (nicht dargestellt). Jede DNA-Probe wurde in jeweils 3 Parallelen gemessen (*i.e.* technische Replikate). FP = Prozessflüssigkeit des Methanreaktors, FK-O = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 4,0 m, FK-M = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 2,0 m, FK-U = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 0,5 m.

Lediglich für die Elemente Mn, Na, S und P konnten im Vergleich mit den Biofilmen oben und unten im Reaktor höhere Konzentrationen gemessen werden.

Mit steigender Reaktorhöhe konnte eine deutliche Verarmung hinsichtlich des Gehalts für das Spurenelement Mg festgestellt werden.

Bei der Betrachtung der quantitativen Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Gemeinschaft konnten deutliche Unterschiede in den Biofilmen der einzelnen Höhenstufen festgestellt werden (**Abbildung 50A**). Auf den Füllkörpern, die sich im oberen Bereich des Methanreaktors befanden, konnte eine Dominanz an Methanosarcinaceae beobachtet werden (82%). Mit zunehmender Entnahme-Tiefe nahm der Anteil an Methanosarcinaceae kontinuierlich ab, so dass bei einer Reaktorhöhe von 0,50 m lediglich 14% aller archaeellen detektierten 16S rRNA Genkopien auf diese methanogene Familie entfielen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte am Zirkulationsstrom der Prozessflüssigkeit liegen. So gelangte das Hydrolysat, welches mit organischen Säuren angereichert war, durch den Methanreaktorkopf in das Reaktorkompartiment. Somit ist davon auszugehen, dass die Prozessflüssigkeit im oberen Bereich des Methanreaktors größeren physikalischen und chemischen Schwankungen unterlegen war als im tieferen Bereich. Die Fähigkeit von Methanosarcinaceae sich schnell an verändernde Reaktorbedingungen anzupassen, ermöglicht somit eine Dominanz dieser Methanogenen [DE VRIEZE *et al.* 2012].

Die höchsten ARC/BAC Verhältnisse konnten für die Biofilme, welche sich im mittleren Reaktorbereich bildeten, nachgewiesen werden (ARC/BAC (FK-M) = 1,19) (**Abbildung 50B**). Somit scheinen hier die günstigsten Bedingungen für das Wachstum der methanogenen Archaea vorzuliegen. Die niedrigsten Verhältnisse wurden in der Prozessflüssigkeit erreicht, welches die Bedeutung der Bereitstellung von Oberflächenstrukturen für eine Biofilmbildung unterstreicht, um die Entstehung von stabilen Mikroorganismengemeinschaften für einen effizienten Substratumsatz zu gewährleisten (ARC/BAC (FP) = 0,11).

Die Erkenntnisse aus den Q-PCR Daten fanden in den Ergebnissen der TRFLP-Technik ihre Bestätigung. So konnte zunächst für die Untersuchung der archaeellen Vielfalt in den Biofilmen eine kontinuierliche Abnahme an TRF628, welches *Methanosarcina* sp. zugeordnet werden kann, mit zunehmender Reaktortiefe beobachtet werden (TRF628 (FK-O) = 37%, TRF628 (FK-U) = 2%) (**Abbildung 51A**). Gleichzeitig nahm der Anteil an TRF108, welches sowohl Vertretern der Methanomicrobiales als auch den der Methanobacteriales und Methanosaetaceae zugeschrieben werden kann, mit steigender Reaktortiefe deutlich zu (TRF108 (FK-O) = 46%, TRF108 (FK-U) = 85%). In der Prozessflüssigkeit konnte zudem das TRF429, welches keinem bislang bekannten Methanogenen zugeordnet werden konnte, in größeren Anteilen nachgewiesen werden (TRF429 (FP) = 16%).

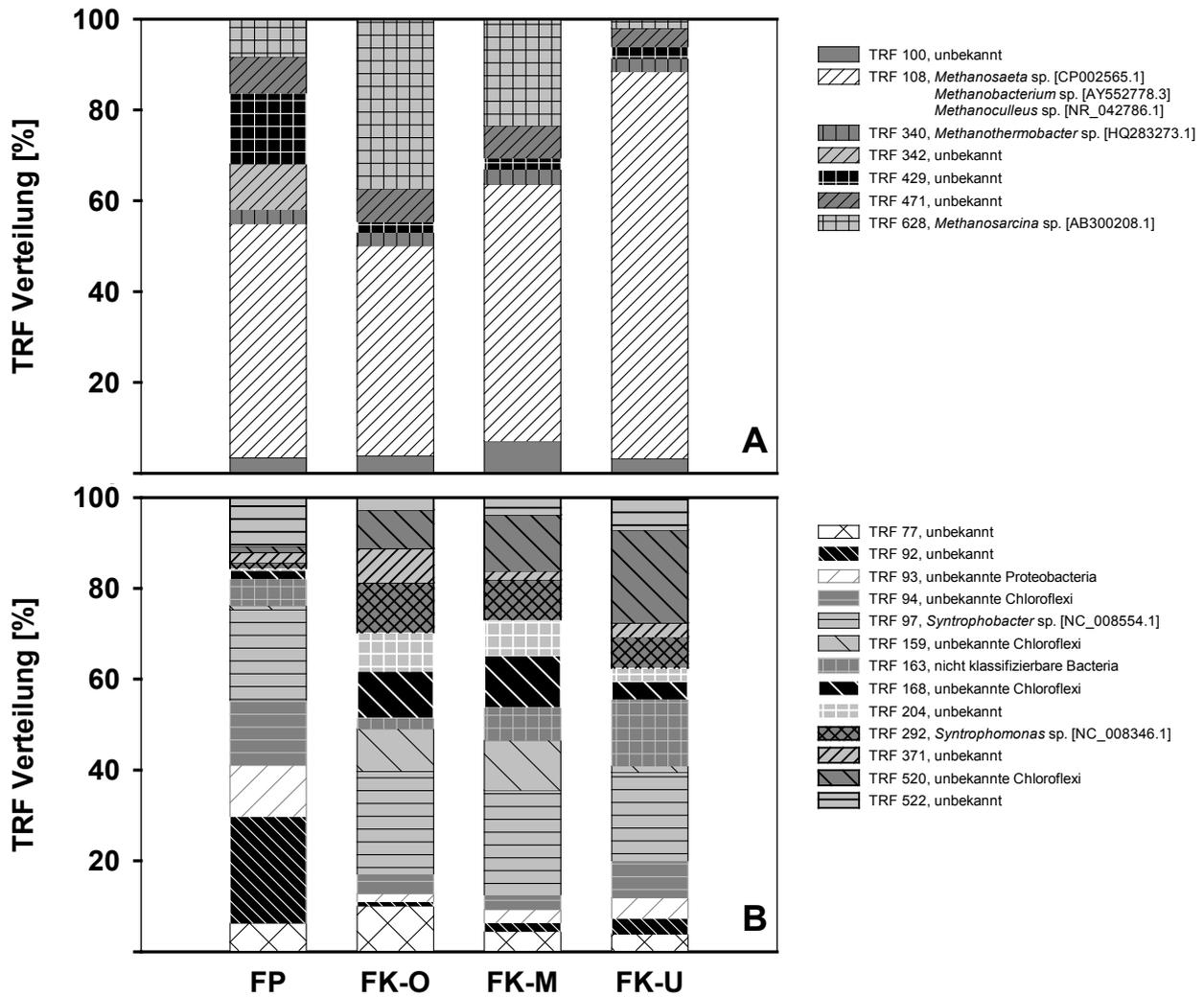


Abbildung 51: Zusammensetzung der (A) archaeellen und (B) bakteriellen Lebensgemeinschaft in den Biofilmen der Aufwuchsträger und der Prozessflüssigkeit unter mesophilen Temperaturbedingungen. Es wurden nur jene TRFs in die graphische Auswertung mit aufgenommen, welche mit einer relativen Verteilung der Gesamtfluoreszenz von > 3% detektiert werden konnten. Die Angabe in eckigen Klammern [] in der Legende bezieht sich auf die Accession Nr. des nächsten Verwandten, ermittelt aus einem Sequenzabgleich (16S rRNA Gen) mit der NCBI Datenbank unter Verwendung der NCBI nr/nt database unter Ausschluss aller Sequenzen, welche aus unkultivierten Stämmen bzw. Umweltproben gewonnen werden konnten. FP = Prozessflüssigkeit des Methanreaktors, FK-O = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 4,0 m, FK-M = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 2,0 m, FK-U = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 0,5 m. Jede DNA-Probe wurde in jeweils drei Parallelen gemessen (technische Replikate).

Auch in der Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaften konnten deutliche Unterschiede zwischen Prozessflüssigkeit und den Biofilmen ausgemacht werden (**Abbildung 51B**). So dominierten TRF92, TRF94 sowie TRF522 in der Prozessflüssigkeit, wohingegen in den Biofilmen TRF159, TRF163, TRF168, TRF292 und TRF520 die am häufigsten detektierten TRFs waren. Lediglich TRF97 konnte sowohl in der Prozessflüssigkeit als auch in den Biofilmen nahezu in gleichen Verhältnissen detektiert werden (TRF97 (FP) = 7%, TRF (Biofilme) = 7 - 9%).

Durch den Abbau der organischen Säuren in der Prozessflüssigkeit verringerten sich deren Konzentrationen während der Passage durch den Festbettreaktor. Diese Verarmung der Prozessflüssigkeit an organischen Verbindungen ging mit einem Anstieg an Methanosaetaceae einher. So konnten in den Biofilmen, welche sich in 4,0 m Reaktorhöhe ausbildeten nur 7% aller detektierten archaeellen 16S rRNA Genkopien dieser methanogenen Familie zugeschrieben werden. Bei einer Reaktorhöhe von 0,5 m betrug ihr Anteil hingegen 36%. Dieses zeigt deutlich, dass sich die Methanosaetaceae unter mesophilen Bedingungen und geringen Säurekonzentrationen gegenüber den Methanosarcinaceae behaupten können (vgl. Kapitel II.1.1, Kapitel II.1.3). Interessanterweise konnten Methanosaetaceae auch bei höheren Ammoniumstickstoffgehalten, die bereits Hemmungen im Wachstum dieser methanogenen Gruppe bewirken können, in den Biofilmstrukturen nachgewiesen werden (vgl. Kapitel II.1.1). Ebenso konnte für hydrogenotrophe Methanbildner der Ordnungen Methanobacteriales und Methanomicrobiales eine Zunahme mit zunehmender Reaktortiefe beobachtet werden.

Um eine Identifizierung der vorherrschenden bakteriellen TRFs zu ermöglichen, wurde eine 16S rRNA Genbibliothek des im mittleren Reaktorbereich entstandenen Biofilms (FK-M) mit 89 Klonen erstellt (**Tabelle 27**). Die bakterielle Lebensgemeinschaft wurde durch Vertreter der Proteobacteria, Chloroflexi und Firmicutes dominiert. Des Weiteren konnten Vertreter der Thermotogae, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Actinobacteria und Bacteroidetes nachgewiesen werden. Der CHAO-I Index (105) und die Coverage (71%) zeigen deutlich, dass die Anzahl an analysierten Klonen zu gering war, um eine eindeutige Aussage über die Verteilung der unterschiedlichen Bacteria-Arten in den Biofilmen treffen zu können (**Tabelle 28**).

Da aber die Erstellung der 16S rRNA Genbibliothek in erster Linie der Identifizierung der dominanten TRFs dienen sollte und für diese die Analyse von 89 Bacteria-Klonen genügten, wurde auf die Analyse weiterer Bacteria-Klone verzichtet.

So konnte das TRF97, welches sowohl im Biofilm als auch in der Prozessflüssigkeit häufig vertreten war, *Syntrophobacter* sp. zugeordnet werden (**Abbildung 51B**). Dieser Vertreter der Proteobacteria ist in der Lage Propionsäure in Anwesenheit eines wasserstoffverwertenden Mikroorganismus zu verwerten [BOONE & BRYANT 1980].

Da sowohl in der Prozessflüssigkeit als auch in den Biofilmen Methanobacteriales und Methanomicrobiales nachgewiesen werden konnten, scheint die Syntrophie dieser Organismengemeinschaft nicht auf eine Biofilmbildung angewiesen zu sein, um einen optimalen Substratumsatz und -austausch erreichen zu können. Im Gegensatz dazu

scheint das Zusammenspiel von *Syntrophomonas* sp. und hydrogenotrophen Methanogenen durch Biofilmstrukturen gefördert zu werden [ZHANG *et al.* 2004, HATAMOTO *et al.* 2007].

So wurde das TRF292, welches *Syntrophomonas* sp. zugeordnet werden konnte, kaum in der Reaktorflüssigkeit nachgewiesen, wohingegen im Biofilm deutlich höhere Anteile dieses TRFs detektiert werden konnten (**Abbildung 51B**).

Tabelle 27: Biodiversität innerhalb der Bacteria in einer Biogastestanlage (GICON BIOENERGIE GMBH, Cottbus) unter mesophilen Temperaturbedingungen (37°C) ermittelt durch Klonierung und Sequenzierung des bakteriellen 16S rRNA Gens. Für die einzelnen taxonomischen Einheiten ist jeweils die Anzahl der nachgewiesenen *operational taxonomic units* (OTUs) sowie deren jeweiliger prozentualer Anteil in der Genbibliothek dargestellt. FK-M = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 2,0 m.

| Biofilm Füllkörper Mitte (FK-M) | | | |
|---------------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------|
| Bacteria-Klone | 89 | | |
| Bacteria OTUs | 40 | | |
| Firmicutes | 9 (17%) | Bacteroidetes | 2 (2%) |
| <i>Clostridium</i> sp. | 1 (5%) | Unbekannte Bacteroidetes | 2 (2%) |
| <i>Syntrophomonas</i> sp. | 1 (5%) | Proteobacteria | 8 (23%) |
| Unbekannte Firmicutes | 7 (7%) | <i>Syntrophobacter</i> sp. | 1 (13%) |
| Chloroflexi | 11 (38%) | <i>Bordetella</i> sp. | 1 (1%) |
| Unbekannte Chloroflexi | 11 (38%) | Unbekannte Proteobacteria | 6 (9%) |
| Synergistetes | 2 (2%) | Thermotogae | 1 (2%) |
| <i>Aminobacterium</i> sp. | 1 (1%) | <i>Mesotoga</i> sp. | 1 (2%) |
| <i>Anaerobaculum</i> sp. | 1 (1%) | Gemmatimonadetes | 1 (1%) |
| Actinobacteria | 3 (6%) | Unbekannte Gemmatimonadetes | 1 (1%) |
| Unbekannte Actinobacteria | 3 (6%) | Planctomycetes | 1 (1%) |
| Sonstige Bacteria | 2 (8%) | Unbekannte Planctomycetes | 1 (1%) |

Tabelle 28: Statistische Auswertung der bakteriellen 16S rRNA Genbibliothek eines Methanreaktors unter mesophilen Temperaturbedingungen (37°C). Die Werte in Klammern stellen die Grenzen eines Konfidenzintervalls von 95% dar. Die Coverage wurde nach GOOD (1953) berechnet. FK-M = Füllkörper entnommen aus einer Reaktorhöhe von 2,0 m.

| | Simpson Index | Shannon Index | Evenness | Chao-I Index | Coverage |
|--|----------------------|----------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Biofilm Füllkörper Mitte (FK-M) | 0,95 | 3,31 | 0,69 | 105 (62/227) | 71% |

Zusammengefasst unterstreichen diese Ergebnisse deutlich, dass die Struktur der komplexen Gemeinschaft aus fermentativen Bakterien und methanogenen Archaea nicht nur von der unmittelbaren abiotischen Umgebung abhängig ist, sondern dass auch die Anwesenheit einzelner trophischer Gruppen die Etablierung anderer, z.B. syntropher Mikroorganismen fördert oder bedingt.

II.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie wurde die Entwicklung methanogener Biofilme in Biogasreaktoren bei der Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen untersucht. Ziel war neben der Charakterisierung von Struktur und Dynamik der mikrobiellen Lebensgemeinschaften und ihrer Stoffwechseleigenschaften insbesondere auch die Entwicklung von Strategien zur Ansiedlung solcher Biofilme.

- Als Modellsysteme wurden vollständig durchmischte Rührkesselfermenter (*completely stirred tank reactor*, Abk. CSTR) sowie zweistufige, zweiphasige Bioleaching Systeme, bestehend aus einem Aufstromfeststoffreaktor (AFR) für die Hydrolyse/Acidogenese und einem Festbettreaktor (FBR) für die Methanogenese, verwendet. Der Betrieb der Reaktoren erfolgte in parallelen Ansätzen mesophil (37°C) und thermophil (55°C). Als Gärsubstrat wurde in den CSTR Rindergülle und Schweinegülle in Kovergärung mit Maissilage eingesetzt. In dem Bioleaching-System erfolgte die Vergärung von Maissilage und Stroh ohne Güllezugabe. Die Struktur und Entwicklung der methanogenen Gemeinschaft in diesen Modellreaktoren wurde in einem polyphasischen Ansatz, basierend auf der Kombination verschiedener kultivierungsunabhängiger mikroskopischer und molekulargenetischer Verfahren, untersucht.
- Die Anfahrphase erfolgte über einen Zeitraum von 70 Tagen bis zu einer Raumbelastung von $B_R = 3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die Biogasbildung in den mesophil betriebenen CSTR lag zu diesem Zeitpunkt bei $6,4 \text{ l d}^{-1}$ bei einem Methangehalt von 60 - 64%. Die Werte entsprechen damit in etwa den KTBL-Werten. Zwischen den biologischen Replikaten waren keine Unterschiede zu beobachten. Die methanogene Archaea-Gemeinschaft bestand aus hydrogenotrophen Methanobacteriales und Methanomicrobiales, mixotrophen Methanosarcinaceae sowie acetoklastischen Methanosaetaceae, wobei die relativen Anteile der einzelnen Gruppen während der Anfahrphase variierten. In der Summe überwogen jedoch mixotrophe bzw. acetoklastische Methanbildner. Die Zusammensetzung des Inokulums blieb bei veränderten Anteilen grundsätzlich bestehen. Während der Anfahrphase nahm jedoch das Verhältnis der 16S rRNA Genkopien zwischen methanogenen Archaea und fermentativen Bacteria (ARC/BAC) kontinuierlich von 0,14 auf 0,02 ab.
- Die thermophil aber ansonsten unter gleichen Bedingungen betriebenen CSTR wiesen während der Anfahrphase bei einer vergleichbaren Biogasbildung deutlich geringere Methananteile im Biogas (ca. 50%) auf. Ebenfalls traten nahezu während der gesamten Anfahrphase deutlich erhöhte Werte in den Gärsäuren Essigsäure und in geringerem Umfang Propionsäure auf. Dieser Effekt konnte mit einer Umstellung der Durchmischung von Dauer- zu Intervallmischung soweit reduziert werden, dass gegen Ende der Anfahrphase $6,1 - 6,8 \text{ l d}^{-1}$ Biogas bei einem Methangehalt von ca. 57% erzeugt wurde. Um im Folgenden solche Übersäuerungszustände zu vermeiden, wurde die Raumbelastung für die weiteren Versuche von $3,0$ auf $2,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ herabgesetzt. Während der Anfahrphase wurden unter thermophilen Bedingungen mixotrophe Methanosarcinaceae und hydrogenotrophe Methanobacteriales angerei-

chert, wobei letztere gegen Ende der Anfahrphase knapp 70% der Archaea-Gemeinschaft stellen. Das ARC/BAC-Verhältnis war zudem deutlich größer als unter mesophilen Bedingungen und blieb während der Anfahrphase im Wesentlichen konstant (ARC/BAC = 0,08).

- In dem unter mesophilem Temperaturregime betriebenen zweistufigen Biogasreaktorsystem wurden während der Anfahrphase Methanausbeuten zwischen 0,31 - 0,35 l g_{OS}⁻¹ erzielt, was ebenfalls den KTBL-Werten entspricht. 83 - 86% des gebildeten Biogases entstand dabei im Aufstromfeststoffreaktor, während im nachgeschalteten Festbettreaktor Biogas mit deutlich höherem Methananteil gebildet wurde (max. 62% zum Ende der Anfahrphase). Eine deutliche Trennung der Abbauphasen trat nicht auf, jedoch kam es im Aufstromfeststoffreaktor zu einer leichten Versäuerung (min. pH 6,8 zum Ende der Anfahrphase). Die Konzentrationen an Gärssäuren waren mit denen im CSTR vergleichbar. Eine kontinuierliche Zunahme im Ammoniumstickstoffgehalt, wie sie im CSTR zu beobachten war, trat nicht auf. In beiden Reaktoren kam es während der Anfahrphase zu einer Anreicherung von hydrogenotrophen Methanomicrobiales und acetoklastischen Methanosaetaceae, wobei letztere zum Ende der Anfahrphase bis zu 62% Anteil auf Ebene der 16S rRNA Genkopien hatten. Im Unterschied zum CSTR konnte über den gesamten Versuchszeitraum eine kontinuierliche Steigerung des Archaea zu Bacteria Verhältnisses bis auf Werte um 0,4, also deutlich höher als im CSTR, beobachtet werden.
- Unter thermophilen Bedingungen konnten im zweistufigen System geringfügig höhere Methanbildungsraten erzielt werden ($y_{CH_4} = 0,34 - 0,38 \text{ l g}_{OS}^{-1}$). Der Methangehalt im Biogas variierte über den gesamten Versuchszeitraum nur geringfügig und war vergleichbar mit den übrigen Systemen (CH₄ = 59 - 61%). Der Hauptanteil des entstandenen Biogases (85 - 89%) wurde wiederum im Aufstromfeststoffreaktor gebildet. Im Gegensatz zum thermophilen CSTR-System verlief der anaerobe Abbau mit steigender Raumbelastung stabil. Es konnte keine erhöhte Anreicherung an organischen Säuren festgestellt werden (**Abbildung 7E**). Allerdings nahm der pH im Aufstromfeststoffreaktor wie im mesophilen zweistufigen System mit zunehmender Raumbelastung ebenfalls ab (min. pH 6,7 zum Ende der Anfahrphase). Wie im thermophilen CSTR aber im Unterschied zum mesophilen zweistufigen Verfahren kam es im thermophilen zweistufigen System während der Anfahrphase zu einer Anreicherung von mixotrophen Methanosarcinaceae und hydrogenotrophen Methanobacteriales, wobei letztere im Aufstromreaktor überwiegen. Wie im mesophilen zweistufigen System, wenn auch nicht ganz so deutlich, konnte auch hier eine kontinuierliche Steigerung des Archaea zu Bacteria Verhältnisses bis auf Werte um 0,4 beobachtet werden.
- Um die Biofilmentwicklung in Biogasreaktoren nachverfolgen zu können, wurden verschiedene fluoreszenz-mikroskopische Verfahren etabliert. Durch die Doppelfärbung mit lectingebundenem Alexa488-Farbstoff und nukleinsäurebindenden SYTO60-Farbstoff konnte innerhalb eines hydrierten Biofilms zwischen Mikroorganismen und extrazellulären EPS-Polysacchariden unterschieden werden. Parallel wurde die mik-

robielle Biodiversität in den Biofilmen mittels Klonierung und Sequenzierung des mikrobiellen 16S rRNA Gens bzw. mittels TRFLP-Community-Fingerprints charakterisiert.

- Zur Entwicklung von Biofilmen wurden einem mesophilen und einem thermophilen CSTR bei einer Raumbelastung von 3,0 (mesophil) bzw. 2,0 (thermophil) $\text{g}_{\text{OS}} \text{l}^{-1} \text{d}^{-1}$ zwei Volumenprozent (bezogen auf das Reaktorvolumen) magnetische Aufwuchsträger (MFGPs) entsprechend Patent DE 10 2005 024 886 hinzugefügt. Jeweils ein CSTR verblieb als Kontrolle ohne eine entsprechende Zugabe. Über den gesamten Versuchszeitraum (>104 d) konnten für alle CSTR gleichbleibend konstante Biogas- und Methanbildungsraten beobachtet werden. Dabei konnten unter thermophilem Temperaturregime geringfügig höhere Biogas- und Methanausbeuten erzielt werden ($y_{\text{B}} = 0,32 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$, $y_{\text{CH}_4} = 0,20 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$), wobei unter mesophilen Bedingungen ein höherer Methananteil im Biogas auftrat (ca. 62%). Die in der Anfahrphase eingestellten Bedingungen konnten somit über den gesamten Versuchszeitraum konstant gehalten werden.
- Sowohl hinsichtlich der Biogas- und Methanbildung als auch hinsichtlich der Reaktorchemie konnten unabhängig von der Temperatur keine Unterschiede zwischen den CSTR-Systemen mit und ohne Zugabe von magnetischen Aufwuchsträgern beobachtet werden.
- Unter mesophilen Bedingungen bestand der methanogene Bewuchs auf den Aufwuchsträgern hauptsächlich aus acetoklastischen *Methanosaeta* sp., während in der Prozessflüssigkeit überwiegend hydrogenotrophe Vertreter der Methanobacteriales aus den Gattungen *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium* und *Methanosphaera* vorlagen. Interessanterweise wies der Biofilm auf den Aufwuchsträgern ebenfalls deutliche Unterschiede zu dem Biofilm auf der Reaktorwandung auf. Auf der Reaktorwandung siedelten sich neben *Methanosaeta* sp. und verschiedenen Arten der Methanobacteriales auch Methanomicrobiales, insbesondere der ebenfalls hydrogenotrophen Gattung *Methanospirillum*, an. In den Biofilmen konnten mit Werten von 0,02 bis 0,03 deutlich höhere ARC/BAC Verhältnisse als in der Prozessflüssigkeit ($\leq 0,01$) nachgewiesen werden, was für die Anreicherung von methanogenen Archaea in den Biofilmen spricht. Durch die Bereitstellung von Aufwuchsträgern kann somit im mesophilen CSTR der Anteil an acetoklastischen methanbildenden Archaea stabilisiert und sogar erhöht werden.
- In dem thermophilen CSTR fand eine massive Anreicherung von hydrogenotrophen Vertretern der Methanobacteriales, insbesondere der Gattung *Methanothermobacter*, statt. Lediglich in dem Biofilm auf den Aufwuchsträgern, nicht aber in dem Biofilm auf der Reaktorwandung, fanden sich nennenswerte Anteile anderer, ebenfalls hydrogenotropher Methanbildner vorrangig der Gattung *Methanoculleus* (Ordnung Methanomicrobiales). Die bereits während der Anfahrphase erkennbare Verdrängung mixotropher Methanosarcinales setzte sich in diesem Beobachtungszeitraum fort. In der Prozessflüssigkeit wurde ein ARC/BAC Verhältnis von teilweise bis zu 0,11 ge-

messen, wodurch die Werte der Anfahrphase stabilisiert wurden. Dagegen wies der ARC/BAC in dem Biofilm auf den Aufwuchsträgern mit Werten deutlich unter 0,02 auf wesentlich geringere Archaea-Anteile in dem thermophilen Biofilm als in mesophilen CSTR-Biofilmen oder in der thermophilen Prozessflüssigkeit hin. Offensichtlich ist die hauptsächliche methanbildende Spezies in dem thermophilen CSTR, *Methanothermobacter* spp., besser angepasst auf eine planktonische Lebensweise. Durch die Bereitstellung von Aufwuchsträgern kann somit im thermophilen CSTR nur die Biodiversität hinsichtlich hydrogenotropher Methanbildner gesteigert und stabilisiert werden.

- Im zweistufigen Reaktorsystem wurde die Biofilmbildung auf den Polyethylenfüllkörpern des nachgeschalteten Festbettreaktors nach 72 Tagen bei einer Raumbelastung von $3,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ hinsichtlich ihrer Archaea-Diversität näher untersucht. Unabhängig von dem Temperaturregime wurden in den zweistufigen Systemen Methanerträge von durchschnittlich $0,38 \text{ l g}_{\text{OS}}^{-1}$ erzielt, wobei in dem mesophilen System rund ein Drittel des Methans in dem Festbettreaktor erzeugt wurde. Im Unterschied dazu wurde in dem thermophilen System Methan fast ausschließlich nur in dem vorgegeschalteten Aufstromreaktor produziert (>86%).
- Unter mesophilen Bedingungen siedeln sich im Biofilm im zweistufigen Reaktorsystem vorrangig acetoklastische *Methanosaeta* spp. an. Diese Anreicherung fällt dabei in dem Biofilm auf den Polyethylenfüllkörpern des Aufstromreaktors noch deutlicher aus als in dem Biofilm auf den Gärresten. Auf den Füllkörpern stellte sich zudem das höchste ARC/BAC Verhältnis mit Werten über 0,4 ein. Hydrogenotrophe Methanbildner wurden vorrangig in der Prozessflüssigkeit und aus der Gattung *Methanospirillum* (Ordnung Methanobacteriales) nachgewiesen. Unter mesophilem Temperaturregime fördern Aufwuchsträger sowohl im CSTR als auch in zweistufigen Systemen die Ansiedlung acetoklastischer Methanbildner der Gattung *Methanosaeta*, wobei die Besiedlung in einem räumlich getrennten Festbettreaktor weitaus konzentrierter als im CSTR-Reaktorraum erfolgt.
- Unter thermophilen Bedingungen kam es im gesamten zweistufigen System zu einer Anreicherung von Vertretern der mixotrophen Gattung *Methanosarcina* (Ordnung Methanosarcinales), während in der Anfahrphase, zumindest in dem Biofilm auf den Polyethylenfüllkörpern des Aufstromreaktors, noch hydrogenotrophe Methanbildner der Ordnung Methanobacteriales überwogen. Auch in dem thermophilen System unterschied sich der Biofilm auf den Füllkörpern des Aufstromreaktors von dem auf den Gärresten im Aufstromreaktor hinsichtlich Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea und dem ARC/BAC Verhältnis. Der Biofilm auf den Füllkörpern wies die deutlichste Anreicherung mit mixotrophen *Methanosarcina* sp. bei dem höchsten gemessenen ARC/BAC Verhältnis von über 0,9 auf. Unter thermophilem Temperaturregime tritt im Biofilm auf den Aufwuchsträgern im Aufstromreaktor eines zweistufigen Biogasreaktors ein gegenteiliger Effekt zu dem Biofilm auf Aufwuchsträgern im CSTR auf, nämlich eine massive Anreicherung von Vertretern der mixotrophen Gat-

tung *Methanosarcina*. Allerdings scheint dieser biologische Effekt ohne Bedeutung für die Methanproduktion zu sein.

- Alle untersuchten Reaktorsysteme weisen hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Methanbildner-Populationen deutliche Unterschiede untereinander auf. Innerhalb eines Reaktors finden sich je nach Mikrohabitat ebenfalls unterschiedlich strukturierte Gemeinschaften, wobei diese jeweils in einem Reaktor mehr Gemeinsamkeiten untereinander aufweisen als zu einem ähnlichen Mikrohabitat in einem anderen Reaktor bei deutlich unterschiedlichen Prozessbedingungen.
- Zur Erfassung des genetischen Potentials der methanogenen Biofilme in den Festbettreaktoren des mesophilen und thermophilen zweistufigen Systems wurde eine Hochdurchsatzsequenzierung und Analyse des mikrobiellen Metagenoms von den jeweiligen Biofilmen durchgeführt. Insgesamt konnten 11.130.967 Sequenzen für den mesophilen Biofilm und 8.483.036 Sequenzen für den thermophilen Biofilm erzeugt werden. Von diesen konnten lediglich 22,62% (mesophil) bzw. 25,17% (thermophil) mittels *lowest common ancestor* Analyse und unter Verwendung der NCBI GenBank als Referenz-Datenbank identifiziert werden. Der weitaus größere Teil der genetischen Information der Biogas-Biozönose muss nach wie vor als unbekannt gelten.
- Mittels der Metagenomanalyse konnte die massive Anreicherung von acetoklastischen *Methanosaeta* im mesophilen Biofilm und von mixotrophen *Methanosarcina* im thermophilen zweistufigen System nochmals bestätigt werden. Als bakterielle Begleitflora wurden im mesophilen System vorrangig Vertreter der Gattungen *Syntrophus* (Deltaproteobacteria) und *Clostridium* (Firmicutes) nachgewiesen, während im thermophilen System verstärkt Vertreter der Gattungen *Clostridium* und *Anaerobaculum* (Synergistetes) identifiziert wurden. Neben der bekannten Bedeutung der Clostridia für die Acidogenese unterstreichen diese Ergebnisse auch die Bedeutung von Bakterien anderer taxonomischer Gruppen mit wahrscheinlich syntrophen Eigenschaften für die Biomethanisierung.
- TRFP-Fingerprint-Analysen zeigen eine über längere Zeit (> 60 d) stabile bakterielle Begleitflora hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und der relativen Anteile einzelner Arten. Dennoch wurden insbesondere unter thermophilen Bedingungen Verschiebungen innerhalb der Anteile einzelner Arten beobachtet, jedoch traten parallel keine Veränderungen in den physikalisch/chemischen Prozessparameter auf. In dem beobachteten Fall erfolgte eine selbstregulierende Kompensierung, so dass nach ca. 14 Tagen wieder die ursprüngliche Gemeinschaft hergestellt war. Es ist jedoch denkbar, dass von einer solchen kurzfristigen Instabilität der mikrobiellen Gemeinschaft vielleicht größere Störungen der Systemmikrobiologie ausgehen können, wenn die Selbstregulation der mikrobiellen Gemeinschaft versagt. Zur Klärung dieser These wären jedoch weitere Arbeiten erforderlich.
- Der Abgleich aller in dieser Studie gewonnenen Sequenzen für die 16S rRNA der in Biogasreaktoren auftretenden methanogenen Euryarchaeota mit publizierten gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden zur FISH-Analytik zeigte, dass die bekannten

Sondensystemen bestens geeignet sind zum Nachweis aller in Biogasreaktoren vorherrschenden Methanbildner. Eine weitere methodische Entwicklung hierzu ist nicht erforderlich. Jedoch fehlen bislang nach wie vor Protokolle, die eine gleichbleibend hohe Hybridisierungsrate von Oligonukleotidsonden *in situ* unabhängig von der Art und Qualität des zu untersuchenden Probenmaterials aus Biogasreaktoren mit unterschiedlichen Gärsubstraten und Abbauzuständen erlauben. Speziell zur Analyse von hydratisierten Biofilmen ist zudem die Entwicklung von geeigneten Einbettungsverfahren notwendig.

- Zur Optimierung der für Aufwuchsträger verwendeten Materialien wurden verschiedene Materialien (Edelstahl, Polyvinylchlorid, Polypropylen, Polyethylen, Polyurethan, Acrylglas, Blähton) in mesophile und thermophile CSTR eingebracht und die Biofilmbildung verfolgt. Sowohl unter mesophilem als auch unter thermophilem Temperaturregime zeigten Polyurethan und Acrylglas die schnellste Biofilmbildung (nach 24 Std: 4 - 6 μm), die meiste Trockenmasse (0,09 - 0,1 mg cm^{-2}) sowie die durchschnittlich höchsten ARC/BAC-Werte. Unter thermophilen Bedingungen wird Polyurethan jedoch angegriffen, so dass die Anwendung von Polyurethan in thermophilen Reaktoren nicht empfohlen werden kann. Sowohl auf Polyurethan als auch auf Acrylglas bildeten sich die Biofilmstrukturen inselförmig aus. Die Biofilmbildung scheint daher neben der Art des Aufwuchsträgermaterials insbesondere von dessen Rauheit begünstigt zu werden. Zur Verifizierung dieser These sind allerdings weitere Studien unter Einbeziehung von Perthometer- bzw. Kontaktwinkelmessungen erforderlich.
- Das in der Studie als optimal ermittelte Material für Aufwuchsträger, Acrylglas, wurde in einem Langzeitversuch (98 d) in den *Downflow*-Festbettreaktor eines thermophilen zweistufigen Reaktorsystems zur Ermittlung der Biofilmzusammensetzung eingebracht. Als Kontrollvariante zum Material diente PVC. Insgesamt konnten die Ergebnisse der vorherigen Versuche bestätigt werden. Die Biofilmbildung erfolgte auch in diesem Reaktorsystem auf Acrylglas wesentlich besser als auf PVC. Nach 98 d hatte sich auf Acrylglas ein Biofilm mit einer Dicke von bis zu 26 μm und einem ARC/BAC Verhältnis von 0,92 gebildet, während auf PVC maximal eine Dicke von 21 μm bei einem ARC/BAC Verhältnis von 0,54 erreicht wurde. Auffälligerweise kam es zu einer Zonierung innerhalb des *Downflow*-Reaktors. Auf Acrylglas erfolgte im unteren Bereich eine dickere Biofilmbildung, auf PVC dagegen im oberen Bereich. Es ist zu vermuten, dass für diese Entwicklung Unterschiede in der Zusammensetzung des Biofilms auf Artebene ursächlich sind. Zur Verifizierung dieser These sind jedoch weitere experimentelle Arbeiten notwendig.
- Um den Effekt von Aufwuchsträgern bei Stressbedingungen zu untersuchen wurde bei den meso- und thermophilen CSTR eine Belastungssteigerung beginnend bei einer Raumbelastung von 2,0 $\text{g}_{\text{oS}} \text{l}^{-1} \text{d}^{-1}$ mit einer schrittweise Erhöhung um 0,5 $\text{g}_{\text{oS}} \text{l}^{-1} \text{d}^{-1}$ in einem zweiwöchigen Rhythmus durchgeführt. In jeweils einen Reaktor wurden magnetische Aufwuchsträger [MFGPs, zwei Volumenprozent bezogen auf

das Reaktorvolumen] eingebracht, ein Reaktor je Temperaturregime verblieb ohne Zugabe als Kontrolle.

- Bei einer Belastungssteigerung im CSTR unter mesophilem Temperaturregime konnten bereits ab einer Raumbelastung von $4,0 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ leicht erhöhte Werte in der Biogas- und Methanbildung des CSTR mit Aufwuchsträger im Vergleich zum Kontrollreaktor ohne Aufwuchsträger festgestellt werden (ca. 20%). Zudem blieb die Biogas- und Methanbildung im CSTR mit Aufwuchsträgern bis zu einer Raumbelastung von $7,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nahezu auf konstantem Niveau, während es im Kontrollreaktor ohne Aufwuchsträger bereits bei niedrigeren Raumbelastungen zu Unregelmäßigkeiten in der Biogasproduktion kam. Unter mesophilen Bedingungen scheint die Bereitstellung von zusätzlichen Aufwuchsflächen im CSTR die Biomethanisierung sowohl zu fördern als auch zu stabilisieren. Insbesondere unter extremen Stressbedingungen, in diesem Fall einer Raumbelastung von $8,5 \text{ g}_{\text{OS}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, scheinen Biofilme den anaeroben Abbau zu stabilisieren. Dieses spiegelt sich insbesondere an dem Verhältnis der Gärsäuren Propionsäure zu Essigsäure wieder, dass bei dieser Raumbelastung im CSTR mit Aufwuchsträgern bei 2,78 lag und somit einen ausgeglichene Abbauprozess anzeigte, während in der Kontrolle ohne Aufwuchsträger ein Verhältnis von 12,92 und somit typische Anzeichen einer Fehlvergärung und Übersäuerung vorlagen.
- Während der Belastungssteigerung im CSTR unter mesophilem Temperaturregime entwickelten sich auf den Aufwuchsträgern Biofilme bis zu $35 \mu\text{m}$. Mikroskopische und molekulargenetische Analysen zeigten, dass die methanogene Komponente dieses Biofilms selbst unter Stressbedingungen bei höchster Raumbelastung nahezu vollständig aus acetoklastischen *Methanosaeta* sp. bestand, welche normalerweise sehr sensibel auf erhöhte Konzentrationen an Gärsäuren reagieren. Auffälligerweise kam es während der Belastungssteigerung zu einer Veränderung in dem ARC/BAC-Verhältnis beginnend bei 0,2 bis maximal 1,29 bei mittlerer Raumbelastung. Dieses unterstreicht die massive Anreicherung von methanogenen Archaea in dem Biofilm. Interessanterweise konnten zudem während der Belastungssteigerung Änderungen in der Struktur der bakteriellen Begleitflora beobachtet werden. Über die Auswirkung auf Acidogenese und Methanogenese kann jedoch nur spekuliert werden.
- Bei einer Belastungssteigerung im CSTR unter thermophilem Temperaturregime konnten keine Unterschiede in der Biogasbildung zwischen dem Reaktorsystem mit und ohne Aufwuchsträgerzugabe beobachtet werden. Jedoch scheinen die Biofilme auch in dem thermophilen CSTR die Acidogenese zu stabilisieren. In dem CSTR mit Aufwuchsträgern wurde während der Belastungssteigerung ein Propionsäure zu Essigsäure Verhältnis von maximal 2,16 erreicht, während in der Kontrolle ohne Aufwuchsträger ein wesentlich höheres Verhältnis von bis zu 7,36 vorlag. Unter thermophilen Bedingungen scheint die Bereitstellung von zusätzlichen Aufwuchsflächen im CSTR die Biomethanisierung nicht zu fördern, stabilisiert jedoch den Gärsäurespiegel. Es ist zu vermuten, dass dadurch Fehlvergärungen und Übersäuerungen vorgebeugt wird.

- Interessanterweise bestand der thermophile Biofilm während der Belastungssteigerung im Unterschied zu den Vorversuchen nicht aus hydrogenotrophen *Methanothermobacter* sp. (Ordnung Methanobacteriales), sondern aus Vertretern der mixotrophen Gattung *Methanosarcina* (Ordnung Methanosarcinales). Da letztere allgemein über die höhere Stresstoleranz bezogen auf die Konzentration an Ammonium und Essigsäure verfügt und zudem besser an ein Leben in Biofilmen angepasst ist, führt die Belastungssteigerung zu einer Anreicherung dieser Mikroorganismen in den thermophilen Biofilmen. Dass es sich hierbei um einen Zuwachs und nicht um eine Verdrängung handelt, geht aus dem massiven Anstieg des ARC/BAC Verhältnisses von Werten $>0,1$ auf Werte bis zu $>1,9$ hervor. Auch dieser Effekt ist ein Indiz dafür, dass die Ausbildung von Biofilmen im CSTR auch unter thermophilen Bedingungen die Stabilität der mikrobiellen Biozönose nicht nur hinsichtlich des Gärsäurespiegels sondern auch hinsichtlich der Biomethanisierung stabilisiert.
- In Biogasreaktoren im Technikumsmaßstab können die in größeren Produktionsanlagen auftretenden Effekte nur begrenzt simuliert werden. Deshalb wurde ebenfalls der methanogene Biofilm in dem vier Meter hohen *Downflow*-Festbettreaktor eines zweistufigen Biogasreaktorsystems der Firma GICON BIOENERGIE GmbH, Cottbus, untersucht. Hierbei wurde eine Höhenzonierung innerhalb des Reaktors beobachtet, vermutlich als Folge der veränderten Gehalte an Nährstoffen und Spurenelementen in der Prozessflüssigkeit während der Passage durch den Reaktor. Im oberen Bereich des Reaktors bei vergleichsweise hohen Säuregehalten überwogen säuretolerante mixotrophe Methanosarcinaceae, während im unteren Bereich verstärkt acetoklastische Methanosaetaceae und hydrogenotrophe Methanobildner der Ordnungen Methanobacteriales und Methanomicrobiales auftraten. Das höchste ARC/BAC Verhältnis im Biofilm wurde im mittleren Bereich des Reaktors gemessen. Hinsichtlich der bakteriellen Begleitflora traten in dem untersuchten System neben Firmicutes vorrangig auch Vertreter der Chloroflexi und der Proteobacteria auf, wobei ein großer Anteil der nachgewiesenen Arten nicht genauer identifiziert werden konnte. Jedoch scheinen syntrophe Mikroorganismen wie *Syntrophobacter* sp. (Proteobacteria) und *Syntrophomonas* (Firmicutes) verstärkt in den Biofilmen aufzutreten.
- Bislang fehlt eine einfach zu ermittelnde, robuste Größe um methanogene Biozöno- sen miteinander vergleichen zu können. In dieser Studie hat sich das Verhältnis der Kopienzahl des Gens für die archaelle und die bakterielle 16S rRNA ermittelt durch eine quantitative PCR im sog. „TaqMan-Assay“ (ARC/BAC) als ein gutes Maß zum Vergleich der methanogenen Gemeinschaften in Biofilmen und Prozessflüssigkeiten herausgestellt. Es wird daher vorgeschlagen, in zukünftigen Studien immer auch diesen ARC/BAC Wert routinemäßig und standardisiert zu erfassen, um eine bessere Vergleichbarkeit unterschiedlicher Arbeiten zur Biogas-Mikrobiologie zu erreichen.

II.1.9 Literaturverzeichnis zur Ergebnisdarstellung

- ABBASSI-GUENDOUZ A., TRABLY E., HAMELIN J., DUMAS C., STEYER J.P., DELGENES J.P., ESCUDIE R. (2013):** Microbial community signature of high-solid content methanogenic ecosystems. *Bioresource Technology* 133, 256-262.
- ABDOUN E., WEILAND P. (2009):** Optimierung der Monovergärung von nachwachsenden Rohstoffen durch Zugabe von Spurenelementen. In: *Wieviel Biogas steckt in den Pflanzen. Symposium des „Biogas-Crops-Network“ (BCN): 7. Mai 2009, Bornimer Agrartechnische Berichte* 68, 69-78.
- AHRING B.K., SANDBERG M., ANGELIDAKI I. (1995):** Volatile fatty-acids as indicators of process imbalance in anaerobic digesters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 559-565.
- AMANN R.I., BINDER B.J., OLSON R.J., CHRISHOLM S.W., DEVEREUX R., STAHL D.A. (1990):** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology* 56, 1919-1925.
- ANGELIDAKI I., AHRING B.K. (1993):** Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 560-564.
- ARAUJO J.C., BRUCHA G., CAMPOS J.R., VAZOLLER R.F. (2000):** Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Water Science and Technology* 41, 69-77.
- BATSTONE D.J., KELLER J., ANGELIDAKI I., KALYUZHNYI S.V., PAVLOSTATHIS S.G., ROZZI A., SANDERS W.T.M., SIEGRIST H., VAVILIN V.A. (2002):** Anaerobic digestion model no.1. In *Scientific and Technical Report No.13 ed. IWA Task Group for Mathematical Modeling*, pp. 1-77. London: IWA Publishing.
- BERGMANN I., GEISS-BRUNSCHWEIGER U., HAGEMANN M., SCHOOR A. (2008):** Salinity tolerance of the chlorophyll b-synthesizing cyanobacterium *Prochlorothrix hollandica* strain SAG 10.89. *Microbial Ecology* 55, 685-696.
- BERGMANN I., MUNDT K., SONTAG M., BAUMSTARK I., NETTMANN E., KLOCKE M. (2010):** Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Systematic and Applied Microbiology* 33, 78-84.
- BOONE D.R., BRYANT M.P. (1980):** Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen., from methanogenic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 626-632.
- BUSCH G., GROßMANN J., SIEBER M., BURKHARDT M. (2009):** A new and sound technology from solid waste and biomass. *Water Air & Soil Pollution* 9, 89-97.
- CHELLIAPAN S., WILBY T., YUZIR A., SALLIS P.J. (2011):** Influence of organic loading on the performance and microbial community structure of an anaerobic stage reactor treating pharmaceutical wastewater. *Desalination* 271, 257-264.
- CONRAD R. (1999):** Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 193-202.
- COSTERTON J.W. (1999):** Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11, 217-221.
- CROCETTI G., MURTO M., BJORNSSON L. (2006):** An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Journal of Microbiological Methods* 65, 194-201.
- DAIMS H., BRÜHL A., AMANN R., SCHLEIFER K.H., WAGNER M. (1999):** The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 434-444.

- DAIMS H., STOECKER K., WAGNER M. (2005):** Fluorescence in situ hybridisation for the detection of prokaryotes, 213-239. In *Advanced Methods in Molecular Microbial Ecology* ed. A.M. Osborn und C.J. Smith Abingdon, UK: BIOS Scientific Publishers.
- DE VRIEZE J., HENNEBEL T., BOON N., VERSTRAETE W. (2012):** *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology* 112, 1-9.
- DIAZ E.E., STAMS A.J.A., AMILS R., SANZ J.L. (2006):** Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4942-4949.
- DOHRMANN A.B., BAUMERT S., KLINGBIEL L., WEILAND P., TEBBE C.C. (2011):** Bacterial community structure in experimental methanogenic bioreactors and search for pathogenic clostridia as community members. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 1991-2004.
- DOJKA M.A., HUGENHOLTZ P., HAACK S.K., PACE N.R. (1998):** Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3869-3877.
- FERNÁNDEZ N., DÍAZ E.E., AMILS R., SANZ J.L. (2008):** Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial Ecology* 56, 121-132.
- GADELMAWLA E.S., KOURA M.M., MAKSoud T.M.A., ELEWA I.M., SOLIMAN H.H. (2002):** Roughness parameters. *Journal of Materials Processing Technology* 123, 133-145.
- GALLERT C., WINTER J. (1997):** Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48, 405-410.
- GARNY K., HORN H., NEU T.R. (2008):** Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31 619-629.
- GARRITY G., HOLT J.G. (2001):** Euryarchaeota. In *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. I ed. Boone, D.R. and Castenholz, R.W. pp. 211-354. New York: Springer Verlag.
- GOOD I.J. (1953):** The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 40, 237-264.
- HABOUZIT F., GÉVAUDAN G., HAMELIN J., STEYER J.P., BERNET N. (2011):** Influence of support material properties on the potential selection of Archaea during initial adhesion of a methanogenic consortium. *Bioresource Technology* 102, 4054-4060.
- HAO L., LU F., LI L., WU Q., SHAO L., HE P. (2013):** Self-adaption of methane-producing communities to pH disturbance at different acetate concentrations by shifting pathways and population interaction. *Bioresource Technology* 140, 319-327.
- HATAMOTO M., IMACHI H., FUKAYO S., OHASHI A., HARADA H. (2007):** *Syntrophomonas palmitatica* sp. nov., an anaerobic, syntrophic, long chain fatty-acid-oxidizing bacterium isolated from methanogenic sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2137-2142.
- HORI T., HARUTA S., UENO Y., ISHII M., IGARASHI Y. (2006):** Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1623-1630.
- ILLMER P., GSTRALTHALER G. (2009):** Effect of seasonal changes in quantities of biowaste on full scale anaerobic digester performance. *Waste Management* 29, 162-167.
- ISHII K., MUSSMANN M., MACGREGOR B.J., AMANN R. (2004):** An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 50, 203-212.

- KARAKASHEV D., BATSTONE D.J., TRABLY E., ANGELIDAKI I. (2006):** Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5138-5141.
- KLOCKE M., NETTMANN E., BERGMANN I., MUNDT K., SOUIDI K., MUMME J., LINKE B. (2008):** Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 190-205.
- KRAKAT N., WESTPHAL A., SCHMIDT S., SCHERER P. (2010):** Anaerobic digestion of renewable biomass: thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 1842-1850.
- KTBL (2010):** Gasausbeute in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. pp. 1-31. Darmstadt: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V..
- KUNDU K., BERGMANN I., HAHNKE S., KLOCKE M., SHARMA S., SREEKRISHNAN T.R. (2013):** Carbon source - A strong determinant of microbial community structure and performance of an anaerobic reactor. *Journal of Biotechnology* 168, 616-624.
- LERM S., KLEYBOECKER A., MIETHLING-GRAFF R., ALAWI M., KASINA M., LIEBRICH M., WUERDEMANN H. (2012):** Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload. *Waste Management* 32, 389-399.
- LEVEN L., ERIKSSON A.R.B., SCHNÜRER A. (2007):** Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 683-693.
- MÄHNERT P. (2007):** Kinetik der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen und Gülle. PhD thesis 1-167. Berlin: Humboldt Universität zu Berlin.
- MEYLHEUC T., RENAULT M., BELLON-FONTAINE M.N. (2006):** Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 109, 71-78.
- MUHA I., GRILLO A., HEISIG M., SCHÖNBERG M., LINKE B., WITTUM G. (2012):** Mathematical modeling of process liquid flow and acetoclastic methanogenesis under mesophilic conditions in a two-phase biogas reactor. *Bioresource Technology* 106, 1-9.
- MUMME J., LINKE B., TÖLLE R. (2010):** Novel upflow anaerobic solid-state (UASS): reactor. *Bioresource Technology* 101, 592-599.
- NARIHIRO T., TERADA T., OHASHI A., WU J.H., LIU W.T., ARAKI N., KAMAGATA Y., NAKAMURA K., SEKIGUCHI Y. (2009):** Quantitative detection of culturable methanogenic archaea abundance in anaerobic treatment systems using the sequence-specific rRNA cleavage method. *ISME Journal* 3, 522-535.
- NELSON M.C., MORRISON M., YU Z.T. (2011):** A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology* 102, 3730-3739.
- NETTMANN E., BERGMANN I., PRAMSCHUFER S., MUNDT K., PLOGSTIES V., HERRMANN C., KLOCKE M. (2010):** Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2540-2548.
- NIELSEN H.B., UELLEND AHL H., AHRING B.K. (2007):** Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. *Biomass & Bioenergy* 31, 820-830.
- O'REILLY J., LEE C., COLLINS G., CHINALIA F., MAHONY T., O'FLAHERTY (2009):** Quantitative and qualitative analysis of methanogenic communities in mesophilically and psychrophilically cultivated anaerobic granular biofilms. *Water Research* 43, 3365-3374.
- RADEMACHER A. (2013):** Microbiology of phase-separated reactor systems for biomethanation at high temperatures (55-75°C):. PhD thesis 1-151. Berlin: Technische Universität Berlin.
- RADEMACHER A., NOLTE C., SCHONBERG M., KLOCKE M. (2012a):** Temperature increases from 55 to 75 A degrees C in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within

the bacterial and archaeal community structure. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96, 565-576.

- RADEMACHER A., ZAKRZEWSKI M., SCHLÜTER A., SCHONBERG M., SZCZEPANOWSKI R., GOESMANN A., PÜHLER A., KLOCKE M. (2012b):** Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiology Ecology* 79, 785-799.
- RAMM P., JOST C., NEITMANN E., SOHLING U., MENHORN O., WEINBERGER K., MUMME J., LINKE B. (2014):** Magnetic biofilm carriers: The use of novel magnetic foam glass particles in anaerobic digestion of sugar beet silage. *Journal of Renewable Energy*, Article ID 208718, 1-10.
- RASKIN L., STROMLEY J.M., RITTMANN B.E., STAHL D. (1994):** Group-specific 16S ribosomal-RNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1232-1240.
- SASAKI K., MORITA M., HIRANO S., OHMURA N., IGARASHI Y. (2011):** Decreasing ammonia inhibition in thermophilic methanogenic bioreactors using carbon fiber textiles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 1555-1561.
- SCHNÜRER A., SCHINK B., SVENSSON B.H. (1996):** *Clostridium ultunense* sp. nov.; a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 1145-1152.
- SCHNÜRER A., ZELLNER G., SVENSSON B.H. (1999):** Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiology Ecology* 29, 249-261.
- SHAO X.W., PENG D., ZHANG Y., WANG J. (2011):** Formation of granules with filamentous microorganisms abundant in anaerobic sequencing batch reactor. *International Journal of Environment and Pollution* 45, 47-57.
- STAHL D.A., AMANN R. (1991):** Development and application of nucleic acid probes, 205-248. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* ed. E. Stackebrandt und M. Goodfellow Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.
- STAMS A.J.A., OUDE-ELFERINK S.J.W.H., WESTERMANN P. (2003):** Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria. *Advanced Biochemical Engineering Biotechnology* 81, 31-93.
- STAUDT C., HORN H., HEMPEL D.C., NEU T.R. (2004):** Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 585-592.
- STOODLEY P., SAUER K., DAVIES D.G., COSTERTON J.W. (2002):** Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* 56, 187-209.
- VAN OSS C.J., CHAUDHURY M.K., GOOD R.J. (1988):** Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews* 88, 927-941.
- WESTERHOLM M., LEVEN L., SCHNÜRER A. (2012):** Bioaugmentation of syntrophic acetate-oxidizing culture in biogas reactors exposed to increasing levels of ammonia. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 7619-7625.
- WILLIAMS J., WILLIAMS H., DINSDALE R., GUWY A., ESTEVES S. (2013):** Monitoring methanogenic population dynamics in a full-scale anaerobic digester to facilitate operational management. *Bioresource Technology* 140, 234-242.
- YU Y., LEE C., KIM J., HWANG S. (2005a):** Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89, 670-679.
- ZHANG C., LIU X., DONG X. (2004):** *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 969-973.

- ZHAO H., LI J., LI J., YUAN X., PIAO R., ZHU W., LI H., WANG X., CUI Z. (2013):** Organic loading rate shock impact on operation and microbial communities in different anaerobic fixed-bed reactors. *Bioresource Technology* 140, 211-219.
- ZHENG D., ANGENENT L.T., RASKIN L. (2006):** Monitoring granule formation in anaerobic upflow bioreactors using oligonucleotide hybridization probes. *Biotechnology and Bioengineering* 94, 458-472.
- ZHU J.R., HU J.C., GU X.S. (1997):** The bacterial numeration and an observation of a new syntrophic association for granular sludge. *Water Science and Technology* 36, 133-140.
- ZIGANSHIN A.M., SCHMIDT T., SCHOLWIN F., IL'INSKAYA O.N., HARMS H., KLEINSTEUBER S. (2011):** Bacteria and archaea involved in anaerobic digestion of distillers grains with solubles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89, 2039-2052.
- ZVERLOV V.V., HIEGL W., KOCK D.E., KELLERMANN J., KOLLMEIER T., SCHWARZ W.H. (2010):** Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass. *Engineering in Life Sciences* 10, 528-536.

II.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Alle Arbeiten wurden wie ursprünglich in der Vorhabenbeschreibung dargestellt durchgeführt. Änderungen im Arbeitsprogramm wurden in den jährlichen Zwischenberichten sowie in Kap. I.3 dargestellt.

Die finanzielle Abwicklung erfolgte zentral durch die Buchhaltung des ATB. Hierzu folgt ein gesonderter Verwendungsnachweis. Aus Sicht der Projektleitung erfolgten jedoch alle Ausgaben entsprechend der Vorhabenbeschreibung und bestimmungsgemäß.

II.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

In diesem Forschungsvorhaben sollten im Wesentlichen folgende Arbeitspakete umgesetzt werden:

- (1) Konstruktion, Betrieb und Optimierung von Modellbiogasreaktoren zur Biomethanisierung pflanzlicher Biomasse,
- (2) Analytik der Prozesschemie entsprechend VDI 4630,
- (3) kultivierungsunabhängige molekulargenetische Charakterisierung der mikrobiellen Biodiversität von methanogenen Biofilmen,
- (4) mikroskopische Analyse der Struktur von methanogenen Biofilmen.

Die hierzu durchgeführten Arbeiten waren notwendig zur Erreichung der eingangs genannten zentralen Ziele dieses Forschungsvorhabens und aus Sicht der Projektleitung in ihrem Umfang und Kostenumfang voll und ganz angemessen.

II.4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

II.4.1 Publikationsstrategie

Dieses Forschungsvorhaben ist im Bereich der anwendungsorientierten Grundlagenforschung angesiedelt. Die erarbeiteten Ergebnisse sollen daher primär als wissenschaftli-

che Fachpublikationen (Schlussbericht, Tagungsteilnahmen, Artikel in Fachzeitschriften) der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt werden.

Aufgrund der Fülle der erzielten Ergebnisse erfolgte bislang keine Vorab-Veröffentlichung einzelner Ergebnisse. Die primäre Veröffentlichung ist daher dieser Schlussbericht, welcher in der Reihe Bornimer Agrartechnische Berichte (www.atb-potsdam.de/publikationen/schriftenreihen/bornimer-agrartechnische-berichte.html) publiziert werden soll.

Aufgrund des hohen Neuheitswerts der Ergebnisse ist darüberhinaus eine zeitnahe Publikation der wesentlichen Ergebnisse in internationalen Fachzeitschriften sowie auch in Form einer populärwissenschaftlichen Darstellung für den Anwender beabsichtigt.

Nach Auswertung der Daten sollen alle genombasierten Daten in öffentlichen Datenbanken hinterlegt werden, um sie so für weitere wissenschaftliche Arbeiten zur Verfügung zu stellen. Die weltweit größte Datenbank hierfür ist die GenBank-Datenbank des US-National Center for Biotechnology Information (NCBI).

II.4.2 Wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Ein wesentliches Ergebnis dieses Vorhabens ist die Bestätigung, dass das Einbringen von zusätzlichen Aufwuchsflächen die Ansiedlung von methanogenen Biofilmen effektiv unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch in allen untersuchten Systemen eine Stabilisierung des Gärsäurespiegels und der Methanbildung erreicht wurde. Insbesondere unter mesophilem Temperaturregime konnte zudem eine deutlich erhöhte Biogas- und Methanbildung im Vergleich zu einer Kontrolle ohne zusätzliche Aufwuchsflächen erzielt werden.

Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten zur Anwendung dieser Erkenntnisse sind mittel- bis langfristig als hoch einzuschätzen. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass durch die Ansiedlung spezialisierter sessiler mikrobieller Gemeinschaften sich eine effektive Komplementierung der vorhandenen, überwiegend planktonischen Biozönose erreichen lässt. Neben der generellen Erhöhung der Prozessstabilität und damit der Reduzierung von Ausfallkosten ist ebenfalls, insbesondere für mesophile Systeme, welche nach wie vor den größten Marktanteil besitzen, eine Erhöhung der Biogasproduktionsrate bei einer praxisnahen Umsetzung der Ergebnisse dieser Studie zu erwarten.

Zur weiteren Umsetzung der in dieser Studie erzielten Ergebnisse zur Verfahrenstechnik von Biogassystemen in praxisnahe Anwendungen bestehen von Seiten des ATB (Koordinator: P. RAMM) u.a. Kooperationen mit den Firmen CLARIANT PRODUKTE GmbH (Moosburg) und DENNERT PORAVER GmbH (Postbauer-Heng).

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden ebenfalls Arbeiten zur Verbesserung der mikrobiologischen Diagnostik hinsichtlich mikroskopischer und molekulargenetischer Verfahren durchgeführt. Insbesondere der Messgröße des Verhältnisses in der Kopienzahl für das Gen für die mikrobielle 16S rRNA zwischen methanogenen Archaea und fermentativen Gärungsbakterien, ermittelt durch eine quantitative PCR im sog.

„TaqMan-Assay“ (ARC/BAC), besitzt ein großes Potential für neuartige Ansätze zur Beurteilung der Systemmikrobiologie von Biogasanlagen.

Zur Überführung dieser Ergebnisse in praxisnahe Anwendungen bestehen von Seiten der Projektbearbeiter (Koordination von Seiten des ATB: M. KLOCKE) Kooperationen mit den Firmen AJ INNUSCREEN GmbH (Berlin), Bio-H₂ Energy GmbH (Jena), FORSCHUNGSZENTRUM FÜR MEDIZINTECHNIK UND BIOTECHNOLOGIE (FZMB) GmbH (Bad Langensalza), MOLDIAX GmbH (Jena) und SENOVA GESELLSCHAFT FÜR BIOWISSENSCHAFT UND TECHNIK mbH (Weimar), u.a. im Rahmen eines Verbundvorhabens zur Entwicklung eines PCR-basierten Analyse-Kits für Faulungsanlagen (Förderkennzeichen 16KN017629) mit Förderung durch das BUNDESMINISTERIUM FÜR WIRTSCHAFT UND ENERGIE (BMWi) im Rahmen des Förderprogramms ZENTRALES INNOVATIONSPROGRAMM MITTELSTAND (ZIM).

II.4.3 Wissenschaftliche und technische Anschlussfähigkeit

Die im Rahmen dieses Vorhabens erzielten mikrobiologischen Erkenntnisse bieten Anknüpfungspunkte für eine Reihe weiterer wissenschaftlicher und technischer Forschungsarbeiten zu den Grundlagen der Biogas-Mikrobiologie insbesondere zu folgenden Fragestellungen:

- Notwendig ist eine weitere methodische Entwicklung zur Etablierung von Protokollen, die eine gleichbleibend hohe Hybridisierungsrate von Oligonukleotidsonden in situ unabhängig von der Art und Qualität des zu untersuchenden Probenmaterials aus Biogasreaktoren mit unterschiedlichen Gärsubstraten und Abbauzuständen erlauben. Speziell zur Analyse von hydratisierten Biofilmen ist zudem die Entwicklung von geeigneten Einbettungsverfahren notwendig.
- In dieser Studie hat sich das Verhältnis der Kopienzahl des Gens für die archaelle und die bakterielle 16S rRNA, ermittelt durch eine quantitative PCR im sog. „TaqMan-Assay“ (ARC/BAC), als ein gutes Maß zum Vergleich der methanogenen Gemeinschaften in Biofilmen und Prozessflüssigkeiten herausgestellt. Hierzu sollte eine substantiellere Validierung dieser Messgröße mit verschiedenen Prozesszuständen und der Biogasproduktion möglichst unter Praxisbedingungen erfolgen. Ebenso sollten Messverfahren für eine möglichst laborunabhängige Erfassung dieser Größe etabliert werden. Weiterhin wäre zu erwägen, ob eine gleichartige Bestimmung von Teilgrößen wie z.B. hinsichtlich unterschiedlicher taxonomischer oder metabolischer Gruppen innerhalb der Archaea und/oder der Bacteria zur Beurteilung der Systemmikrobiologie geeignet ist.
- Die Biofilmbildung scheint neben der Art des Aufwuchsträgermaterials insbesondere von dessen Rauheit begünstigt zu werden. Zur Verifizierung dieser These sind allerdings weitere Studien unter Einbeziehung von Perthometer- bzw. Kontaktwinkelmessungen erforderlich. Ebenso wurde für unterschiedliche Materialien insbesondere im Festbettreaktor des zweistufigen Systems ein unterschiedliches Besiedlungsverhalten beobachtet. Auf Acrylglas erfolgte im unteren Bereich eine dickere Biofilmbildung, auf PVC dagegen im oberen Bereich. Es ist zu vermuten, dass für diese Entwicklung Unterschiede in der Zusammensetzung des Biofilms auf Artebene ursächlich sind. Zur Verifizierung dieser These sind jedoch ebenfalls weitere experimentelle Arbeiten notwendig.

- Alle untersuchten Reaktorsysteme weisen hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer mikrobiellen Gemeinschaften deutliche Unterschiede untereinander auf. Offensichtlich bestehen innerhalb eines Reaktors Mikrohabitate mit lokal adaptierten Gemeinschaften. Die Zonierung von Mikroorganismen innerhalb eines Biogasreaktors ist bislang nur ansatzweise untersucht.
- Die Analysen des mikrobiellen Metagenoms zeigen, dass der weitaus größere Teil der genetischen Information der Biogas-Biozönose nach wie vor als unbekannt gelten muss. Große Teile der beteiligten Mikroorganismen sowie ihr genetisches Potential sind unbekannt. Daher sollten verstärkt Anstrengungen zur Kultivierung und zur Sequenzierung der Genome der am anaeroben Abbau und der Biomethanisierung beteiligten Mikroorganismen unternommen werden.
- Die Metagenomanalyse legte eine besondere Bedeutung von Bakterien anderer taxonomischer Gruppen insbesondere von solchen mit syntrophen Eigenschaften für die Biomethanisierung nahe. Zur Aufklärung der Funktion solcher Mikroorganismen im Biogassystem sind ebenfalls weitere mikro- und molekularbiologische Forschungsarbeiten erforderlich.
- Die TRFP-Fingerprint-Analysen lassen eine gewisse Variabilität oder auch Instabilität der mikrobiellen Gemeinschaft vermuten. Es ist denkbar, dass von einer solchen kurzfristigen Instabilität der mikrobiellen Gemeinschaft u.U. größere Störungen der Systemmikrobiologie ausgehen können, wenn die Selbstregulation der mikrobiellen Gemeinschaft versagt. Andererseits könnte es gerade die Variabilität sein, welche es der Systemmikrobiologie ermöglicht, auf Stresssituationen zu reagieren. Die Abgrenzung dieser zwei unterschiedlichen Phänomene und deren grundlegender Erforschung erfordern jedoch ebenfalls weitere experimentelle Arbeiten.

Von Seiten der Projektbearbeiter wird mittelfristig die Bearbeitung dieser Fragestellungen im Rahmen von Anschluss- bzw. Folgevorhaben angestrebt.

II.5 Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Eine Abfrage in der Literaturodatenbank Web-of-Knowledge der Fa. Thompson-Reuters am 17.07.2014 für die Stichwörter „*biogas*“ AND „*biofilm*“ unter Ausschluss (NOT) der Stichwörter „*wastewater*“ und „*waste*“ in der Rubrik „*Topic*“ ergab 36 Einträge. Alle diese Arbeiten wiesen jedoch keine Redundanz zu dieser Studie auf.

Von besonderem Interesse ist jedoch insbesondere die 2013 erschienene Studie von WEIß *et al.* [Appl. Microbiol. Biotechnol. 97:3225-3238], welche die Entwicklung von Biofilmen auf Zeolit bei der Monovergärung von Grasssilage bei 45°C mittels einem alternativen analytischen Ansatz verfolgten. Diese Studien ermittelten u.a. Vertreter der Gattungen *Clostridium*, *Pseudomonas* und *Methanoculleus* als hauptsächliche Bestandteile des Biofilms.

Im Unterschied zu der Studie von WEIß *et al.* offenbaren die in dieser Studie erzielten Ergebnisse die Variabilität der mikrobiellen Biofilme in Abhängigkeit unterschiedlicher Prozessfaktoren.

II.6 Veröffentlichungen

Bislang wurden die hier vorgestellten Ergebnisse weder ganz noch in Auszügen publiziert. Das Prinzip und die Bedeutung der Biofilmbildung wurde 2013 auf der KTBL-Tagung "Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven" vorgestellt.

KLOCKE M., RADEMACHER A., BERGMANN I. (2013): Mikrobielles Leben im Biogasfermenter. In: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (KTBL) [Eds.]: Biogas in der Landwirtschaft - Stand und Perspektiven. Proceedings of the Conference, Kassel, 10. - 11.09.13. S. 71-80.

Eine Übersicht über die weiteren Publikationen der Autoren zu der Mikrobiologie der Biomethanisierung ist unter folgender URL erhältlich:

www.atb-potsdam.de/institut/ueber-uns/mitarbeiterinnen/portrait/portrait/michael-klocke.html

Verzeichnis der Abbildungen

| | | |
|----------------------|--|----|
| Abbildung 1: | Versuchsstände zur einstufigen und zweistufigen Vergärung | 33 |
| Abbildung 2: | Biogasausbildung, -ausbeute und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute im einstufigen CSTR-System | 34 |
| Abbildung 3: | Physikalische und chemische Parameter im CSTR-System..... | 36 |
| Abbildung 4: | Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung innerhalb der methanogenen Archaea-Gemeinschaft im CSTR-System ermittelt auf Basis der Kopienzahl des 16S rRNA Gens..... | 37 |
| Abbildung 5: | Etablierung eines Q-PCR-Assays zur quantitativen Erfassung des 16S rRNA Gens der Ordnung Methanococcales | 41 |
| Abbildung 6: | Biogasausbildung, -ausbeute und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute im zweistufigen Bioleaching-System | 42 |
| Abbildung 7: | Physikalische und chemische Parameter im Bioleaching-System | 44 |
| Abbildung 8: | Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung innerhalb der methanogenen Archaea-Gemeinschaft im Bioleaching-System ermittelt auf Basis der Kopienzahl des 16S rRNA Gens | 47 |
| Abbildung 9: | Konfokale Laserscanningmikroskopie von magnetischen Aufwuchsträgern | 49 |
| Abbildung 10: | Protokoll zur Lebendbiofilmbetrachtung | 50 |
| Abbildung 11: | Protokoll zur Differenzierung von spezifischen taxonomischen Einheiten innerhalb der mikrobiellen Lebensgemeinschaft eines Biofilms..... | 51 |
| Abbildung 12: | Konfokale Laserscanningmikroskopie von magnetischen Aufwuchsträgern | 52 |
| Abbildung 13: | Biogasausbildung, -ausbeute und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute bei konstanter Raumbelastung im CSTR-System..... | 55 |
| Abbildung 14: | Physikalische und chemische Parameter bei konstanter Raumbelastung im CSTR-System | 56 |
| Abbildung 15: | Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung der methanogenen Archaea | 60 |
| Abbildung 16: | Biogasausbildung, -ausbeute und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute im Bioleaching-System bei konstanter Raumbelastung | 65 |
| Abbildung 17: | Physikalische und chemische Parameter im Bioleaching-System bei konstanter Raumbelastung | 66 |
| Abbildung 18: | Quantitative Zusammensetzung der methanogenen Archaea im Bioleaching-System | 70 |
| Abbildung 19: | Multidimensionale Skalierung der BRAY-CURTIS Ähnlichkeitsindices | 74 |
| Abbildung 20: | Längenverteilung der ermittelten DNA-Sequenzen aus den Biofilmprouben. | 76 |
| Abbildung 21: | Materialstudie zur Bildung von Biofilmen in Biogasfermentern | 85 |
| Abbildung 22: | Biofilmbildung nach 35 Tagen auf ausgewählten Aufwuchsträgermaterialien | 90 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 23: Biofilmbildung nach 35 Tagen auf ausgewählten Aufwuchsträgermaterialien..... | 91 |
| Abbildung 24: Konfokale Laserscanningmikroskopie von Biofilmen auf Aufwuchsträgermaterialien unter mesophilen Temperaturbedingungen..... | 92 |
| Abbildung 25: Konfokale Laserscanningmikroskopie von Biofilmen auf Aufwuchsträgermaterialien unter thermophilen Temperaturbedingungen..... | 93 |
| Abbildung 26: Bestimmung der Trockenmasse des gebildeten Biofilms..... | 93 |
| Abbildung 27: Verhältnis Archaea zu Bacteria im gebildeten Biofilm..... | 94 |
| Abbildung 28: Konfokale Laserscanningmikroskopie von Biofilmen auf Aufwuchsträgermaterialien unter thermophilen Temperaturbedingungen..... | 95 |
| Abbildung 29: Verhältnis Archaea zu Bacteria im gebildeten Biofilm..... | 96 |
| Abbildung 30: Organische Trockensubstanzgehalte der aufgelagerten Biofilme der magnetischen Aufwuchsträger bei konstanter Raumbelastung im CSTR-System..... | 98 |
| Abbildung 31: Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung in der methanogenen Archaea-Gemeinschaft..... | 100 |
| Abbildung 32: Entwicklung der archaellen und bakteriellen Lebensgemeinschaft in einem mesophilen Biofilm (CSTR)..... | 101 |
| Abbildung 33: Entwicklung der archaellen und bakteriellen Lebensgemeinschaft in einem thermophilen Biofilm (CSTR)..... | 104 |
| Abbildung 34: Biogasausbildung, -ausbeute und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute im Bioleaching-System bei konstanter Raumbelastung..... | 106 |
| Abbildung 35: Physikalische und chemische Parameter im Bioleaching-System bei konstanter Raumbelastung..... | 107 |
| Abbildung 36: Organische Trockensubstanzgehalte der Biofilme aufgelagert auf magnetische Aufwuchsträger im Bioleaching-System unter thermophilen Bedingungen bei konstanter Raumbelastung..... | 109 |
| Abbildung 37: Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Gemeinschaft..... | 110 |
| Abbildung 38: Entwicklung der archaellen und bakteriellen Lebensgemeinschaft in einem thermophilen Biofilm im Festbettreaktor des Bioleaching-Systems..... | 111 |
| Abbildung 39: Biogasausbildung, -ausbeute und -zusammensetzung sowie Methanbildung und -ausbeute in Abhängigkeit von der Raumbelastung in den einstufigen CSTR-Systemen..... | 114 |
| Abbildung 40: Physikalische und chemische Parameter in Abhängigkeit von der Raumbelastung in den CSTR-Systemen..... | 117 |
| Abbildung 41: Organische Trockensubstanzgehalte der aufgelagerten Biofilme der magnetischen Aufwuchsträger in Abhängigkeit von der Raumbelastung im CSTR-System unter mesophilen und thermophilen Bedingungen..... | 118 |
| Abbildung 42: Konfokale Laserscanningmikroskopie der aufgelagerten Biofilme der magnetischen Aufwuchsträger in Abhängigkeit von der Raumbelastung im CSTR-System unter mesophilen Temperaturbedingungen..... | 120 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 43: Entwicklung der quantitativen Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Gemeinschaft in den Biofilmen der magnetischen Aufwuchsträger im CSTR-System..... | 121 |
| Abbildung 44: Entwicklung der archaeellen und bakteriellen Lebensgemeinschaft in dem Biofilm des mesophilen CSTR-Systems..... | 122 |
| Abbildung 45: Konfokale Laserscanningmikroskopie der aufgelagerten Biofilme der magnetischen Aufwuchsträgern in Abhängigkeit von der Raumbelastung im CSTR-System unter thermophilen Temperaturbedingungen | 124 |
| Abbildung 46: Typische Biofilmstrukturen auf den magnetischen Aufwuchsträgern im CSTR-System unter mesophilen Temperaturbedingungen | 126 |
| Abbildung 47: Typische Biofilmstrukturen auf den magnetischen Aufwuchsträgern im CSTR-System unter thermophilen Temperaturbedingungen..... | 127 |
| Abbildung 48: Entwicklung der archaeellen und bakteriellen Lebensgemeinschaft in dem Biofilm des thermophilen CSTR-Systems..... | 128 |
| Abbildung 49: Großtechnische Biogas-Forschungsanlage der Firma GICON..... | 130 |
| Abbildung 50: Zusammensetzung der methanogenen Archaea-Gemeinschaft sowie Darstellung des Archaea zu Bacteria Verhältnisses in den Biofilmen der Füllkörper und der Prozessflüssigkeit unter mesophilem Temperaturregime | 132 |
| Abbildung 51: Zusammensetzung der archaeellen und bakteriellen Lebensgemeinschaft in den Biofilmen der Aufwuchsträger und der Prozessflüssigkeit unter mesophilen Temperaturbedingungen..... | 134 |

Verzeichnis der Tabellen

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tabelle 1: | Spurenelemente in der Prozessflüssigkeit im CSTR-System bei einer schrittweisen Erhöhung der Raumbelastung | 38 |
| Tabelle 2: | Spurenelementanalyse der Prozessflüssigkeit im Bioleaching-System bei einer schrittweisen Erhöhung der Raumbelastung..... | 46 |
| Tabelle 3: | Spurenelementanalyse der Prozessflüssigkeit im CSTR-System bei einer konstanten Raumbelastung..... | 57 |
| Tabelle 4: | Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea in einem Rührkesselsystem (CSTR) unter mesophilen Temperaturbedingungen ermittelt durch Klonierung und Sequenzierung des archaellen 16S rRNA Gens | 58 |
| Tabelle 5: | Statistische Auswertung der 16S rRNA Genbibliothek der Analyse eines Rührkesselsystems (CSTR) unter mesophilen Temperaturbedingungen..... | 59 |
| Tabelle 6: | Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea in einem Rührkesselsystem (CSTR) unter thermophilen Temperaturbedingungen ermittelt durch Klonierung und Sequenzierung des archaellen 16S rRNA Gens | 61 |
| Tabelle 7: | Statistische Auswertung der 16S rRNA Genbibliothek der Analyse eines Rührkesselsystems (CSTR) unter thermophilen Temperaturbedingungen | 62 |
| Tabelle 8: | Spurenelementanalyse der Prozessflüssigkeit im Bioleaching-System bei einer konstanten Raumbelastung | 67 |
| Tabelle 9: | Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea in einem zweistufigen Bioleaching-System unter mesophilen Temperaturbedingungen ermittelt durch Klonierung und Sequenzierung des archaellen 16S rRNA Gens | 68 |
| Tabelle 10: | Statistische Auswertung der 16S rRNA Genbibliothek der Analyse eines zweistufigen Bioleaching-Systems unter mesophilen Temperaturbedingungen..... | 69 |
| Tabelle 11: | Biodiversität innerhalb der methanogenen Archaea in einem zweistufigen Bioleaching-System unter thermophilen Temperaturbedingungen ermittelt durch Klonierung und Sequenzierung des archaellen 16S rRNA Gens | 71 |
| Tabelle 12: | Statistische Auswertung der 16S rRNA Genbibliothek der Analyse eines zweistufigen Bioleaching-Systems unter thermophilen Temperaturbedingungen..... | 72 |
| Tabelle 13: | BRAY-CURTIS Ähnlichkeitsindizes aller methanogenen Archaea-Gemeinschaften basierend auf der mittels Analyse von 16S rRNA Genbibliotheken ermittelten Biodiversität | 73 |
| Tabelle 14: | Ermittelte und identifizierte DNA-Sequenzen für das mikrobielle Metagenom der Biofilmproben des Festbettreaktors im Bioleaching-System unter mesophiler (FKM) und thermophiler (FKT) Temperaturführung..... | 75 |
| Tabelle 15: | Verteilung der in dem mesophilen und thermophilen Biofilm des Festbettreaktors im Bioleaching-System vorherrschenden mikrobiellen Ordnungen..... | 77 |
| Tabelle 16: | Verteilung der in dem mesophilen und thermophilen Biofilm des Festbettreaktors im Bioleaching-System vorherrschenden mikrobiellen Gattungen..... | 79 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Tabelle 17: | In dem mesophilen und thermophilen Biofilm des Festbettreaktors im Bioleaching-System identifizierte COG Kategorien für die Methanogenese | 81 |
| Tabelle 18: | Oligonukleotidabgleich aller ermittelten 16S rRNA Gensequenzen aus den Genbibliotheken mit bereits publizierten, gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden | 83 |
| Tabelle 19: | Erstbesiedlung von Aufwuchsträgermaterialien im CSTR: Biogasbildung und -ausbeute sowie Methanbildung, -anteil und -ausbeute. | 85 |
| Tabelle 20: | Erstbesiedlung von Aufwuchsträgermaterialien im CSTR-System: Trockensubstanz- und organische Trockensubstanzgehalte, pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen sowie Gesamtstickstoff- und Ammoniumstickstoffgehalte | 86 |
| Tabelle 21: | Biofilmbildung nach 24 Stunden auf ausgewählten Aufwuchsträgermaterialien: Biogasbildung und -ausbeute sowie Methanbildung, -anteil und -ausbeute..... | 86 |
| Tabelle 22: | Biofilmbildung nach 24 Stunden auf ausgewählten Aufwuchsträgermaterialien: Trockensubstanz- und organische Trockensubstanzgehalte, pH-Wert, Essigsäure- und Propionsäurekonzentrationen sowie Gesamtstickstoff- und Ammoniumstickstoffgehalte | 87 |
| Tabelle 23: | Spurenelementanalyse der Prozessflüssigkeit im Bioleaching-System bei konstanter Raumbelastung | 108 |
| Tabelle 24: | Spurenelementanalyse der Prozessflüssigkeit im CSTR-System zu Beginn und am Ende der kontinuierlichen Steigerung der Raumbelastung bis zum Eintritt einer Überlastung | 118 |
| Tabelle 25: | Physikalische und chemische Parameter der gebildeten Biofilme auf den Aufwuchsträgern und der Prozessflüssigkeit | 131 |
| Tabelle 26: | Spurenelementanalyse der gebildeten Biofilme auf den Aufwuchsträgern | 132 |
| Tabelle 27: | Biodiversität innerhalb der Bacteria in einer Biogastestanlage (GICON BIOENERGIE GMBH, Cottbus) unter mesophilen Temperaturbedingungen | 136 |
| Tabelle 28: | Statistische Auswertung der bakteriellen 16S rRNA Genbibliothek eines Methanreaktors unter mesophilen Temperaturbedingungen | 136 |

In der Reihe Bornimer Agrartechnische Berichte

sind bisher erschienen:

| | | |
|---------|---|------|
| Heft 1 | Technik und Verfahren der Landschaftspflege | 1992 |
| Heft 2 | Beiträge zur Lagerung und Verarbeitung pflanzenbaulicher Produkte | 1993 |
| Heft 3 | Technik und Verfahren in der Tierhaltung | 1993 |
| Heft 4 | Technik und Verfahren der Landschaftspflege und für die Verwendung der anfallenden Materialien | 1994 |
| Heft 5 | Verfahrenstechnik der Aufbereitung, Lagerung und Qualitätserhaltung pflanzlicher Produkte | 1994 |
| Heft 6 | Biokonversion nachwachsender Rohstoffe und Verfahren für Reststoffbehandlung | 1994 |
| Heft 7 | Preußische Versuchs- und Forschungsanstalt für Landarbeit und Schlepperprüffeld in Bornim 1927 bis 1945 | 1995 |
| Heft 8 | Qualitätssicherung und Direktvermarktung | 1996 |
| Heft 9 | Konservierende Bodenbearbeitung auf Sandböden | 1996 |
| Heft 10 | Anwendung wärme- und strömungstechnischer Grundlagen in der Landwirtschaft | 1996 |
| Heft 11 | Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1996 | 1996 |
| Heft 12 | Aufbereitung und Verwertung organischer Reststoffe im ländlichen Raum | 1996 |
| Heft 13 | Wege zur Verbesserung der Kartoffelqualität durch Verminderung der mechanischen Beanspruchung | 1997 |
| Heft 14 | Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1997 | 1997 |
| Heft 15 | Technische und ökonomische Aspekte der Nutztierhaltung in großen Beständen | 1997 |
| Heft 16 | 11. Arbeitswissenschaftliches Seminar | 1997 |
| Heft 17 | Nachwachsende Rohstoffe im Land Brandenburg Stand Aktivitäten und Perspektiven einer zukunftsfähigen und umweltgerechten Entwicklung | 1998 |
| Heft 18 | Qualität von Agrarprodukten | 1998 |
| Heft 19 | Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1998 | 1998 |
| Heft 20 | Beiträge zur teilflächenspezifischen Bewirtschaftung | 1998 |
| Heft 21 | Landnutzung im Spiegel der Technikbewertung – Methoden Indikatoren, Fallbeispiele | 1998 |

| | | |
|---------|---|------|
| Heft 22 | Kriterien der Nachhaltigkeit in der Verfahrensentwicklung für die Nutztierhaltung | 1999 |
| Heft 23 | Situation und Trends in der Landtechnik / Erneuerbare Energien in der Landwirtschaft | 1999 |
| Heft 24 | Institut für Landtechnik der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin 1951 bis 1965 | 1999 |
| Heft 25 | Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 1999 / 2000 | 2000 |
| Heft 26 | Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2001 | 2001 |
| Heft 27 | Approaching Agricultural technology and Economic Development of Central and Eastern Europe | 2001 |
| Heft 28 | 6 th International Symposium on Fruit, Nut, and Vegetable Production Engineering | 2001 |
| Heft 29 | Measurement Systems for Animal Data and their Importance for Herd Management on Dairy Cow Farms | 2002 |
| Heft 30 | Produktion, Verarbeitung und Anwendung von Naturfasern | 2002 |
| Heft 31 | Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2002 | 2002 |
| Heft 32 | Biogas und Energielandwirtschaft - Potenzial, Nutzung, Grünes Gas TM , Ökologie und Ökonomie | 2003 |
| Heft 33 | Sozioökonomische Aspekte zu Perspektiven des Offenlandmanagements | 2003 |
| Heft 34 | Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2003 | 2003 |
| Heft 35 | Energieholzproduktion in der Landwirtschaft Potenzial, Anbau, Technologie, Ökologie und Ökonomie | 2004 |
| Heft 36 | High-Tech Innovationen für Verfahrensketten der Agrarproduktion. Statusseminar 2003 | 2004 |
| Heft 37 | Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2004 | 2004 |
| Heft 38 | Die Landmaschinenprüfung in der DDR 1951-1991 und ihre Vorgeschichte | 2004 |
| Heft 39 | Energieverlust und Schimmelpilzentwicklung bei der Lagerung von Feldholz-Hackgut | 2005 |
| Heft 40 | Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2005 | 2005 |
| Heft 41 | Demonstration der Langzeitwirkung bedarfsorientierter Fungizidbehandlung mit dem CROP-Meter | 2005 |
| Heft 42 | Biochemicals and Energy from Sustainable Utilization of herbaceous Biomass (BESUB) | 2005 |

| | | |
|---------|---|------|
| Heft 43 | Ozontes Waschwasser zur Qualitätssicherung leichtverderblicher Produkte - Entwicklung einer <i>Fuzzy-Logic</i> -Steuerung des Waschprozesses | 2005 |
| Heft 44 | Messsystem zur Bewertung des Unkrautvorkommens | 2005 |
| Heft 45 | Anwendung der Thermographie zur Optimierung der Belüftungssteuerung bei der Lagerhaltung landwirtschaftlicher Produkte | 2005 |
| Heft 46 | Membranbioreaktor zur Aufbereitung von Schlachthofabwässern Prozesssteuerung von Biogasanlagen mit Kofermentation | 2005 |
| Heft 47 | Verschleißeinfluss auf das Förderverhalten von Drehkolbenpumpen | 2005 |
| Heft 48 | Qualitätserhaltung und Qualitätssicherung von Bioobst und Biogemüse in der Nachernte | 2005 |
| Heft 49 | Miniaturisiertes Datenerfassungs-System zum Implantieren in Früchte und zur Messung ihrer mechanischen Belastung durch Ernte- und Nachernteverfahren | 2005 |
| Heft 50 | Prozesskontrolle der Qualität von frischem Obst und Gemüse mit Hilfe eines Multigas-Sensors | 2005 |
| Heft 51 | Entwicklung eines Echtzeitsensors für die Stärkebestimmung bei Kartoffeln als funktionaler Bestandteil eines optoelektronischen Verleseautomaten | 2005 |
| Heft 52 | Optimierte Steuerung von Getreide-Schachttrocknern | 2005 |
| Heft 53 | Möglichkeiten und Grenzen der energetischen Nutzung von Rizinusöl | 2005 |
| Heft 54 | Non-Destructive Methods for Detecting Health-Promoting Compounds COST Action 924 Working Group Meeting | 2005 |
| Heft 55 | 4 th IFAC / CIGR Workshop Control Applications in Post - Harvest and Processing Technology (CAPPT 2006) 26th - 29th March 2006, Potsdam, GERMANY | 2006 |
| Heft 56 | Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft Workshop 2006 | 2006 |
| Heft 57 | Kontrolle der Frische in der Nacherntekette von Ökogemüse | 2006 |
| Heft 58 | Entwicklung eines innovativen Dekontaminationsverfahrens als Technologieantwort auf zukünftiges Qualitätsmanagement im Nacherntebereich | 2006 |
| Heft 59 | Experimental Studies and Mathematical Modelling of Solar Drying System for Production of High Quality Dried Tomato | 2007 |
| Heft 60 | 13. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft & 4. Workshop Precision Farming | 2007 |

| | | |
|---------|---|------|
| Heft 61 | Energiepflanzen im Aufwind Wissenschaftliche Ergebnisse und praktische Erfahrungen zur Produktion von Biogaspflanzen und Feldholz | 2007 |
| Heft 62 | 14. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft | 2008 |
| Heft 63 | Experten-Workshop Lagerung von Holzhackschnitzeln | 2008 |
| Heft 64 | Postharvest unlimited 2008 | 2008 |
| Heft 65 | Vom Agrarrohstoff zu neuen Produkten – Verfahrenstechnische Forschung im Nacherntebereich | 2009 |
| Heft 66 | 16. Arbeitswissenschaftliches Kolloquium des VDI-MEG Arbeitskreises Arbeitswissenschaften im Landbau | 2009 |
| Heft 67 | Monitoring der methanbildenden Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen im ländlichen Raum: Analyse des Ist-Zustandes und Entwicklung eines quantitativen Nachweissystems | 2009 |
| Heft 68 | Wieviel Biogas steckt in Pflanzen? Abschluss- Symposium des "Biogas-Crops-Network" (BCN) 7. Mai 2009 Potsdam | 2009 |
| Heft 69 | Image Analysis for Agricultural Products and Processes 27 to 28. Aug. 2009 Potsdam | 2009 |
| Heft 70 | 5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management 31. Aug. to 02. Sept. 2009 Potsdam | 2009 |
| Heft 71 | Einsatz von Biogas in PEM-Brennstoffzellen | 2009 |
| Heft 72 | Teilflächenspezifische Grunddüngung | 2009 |
| Heft 73 | 16. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 04. Mai 2010 Braunschweig | 2010 |
| Heft 74 | Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien <i>-Prozesskette Getreide-</i> | 2010 |
| Heft 75 | Erschließung von Nachhaltigkeitspotenzialen durch Nutzung innovativer Sensortechnologien <i>-Prozesskette pflanzliche Frischeprodukte-</i> | 2010 |
| Heft 76 | International Workshop The future of the quarter individual milking 14. – 15. September 2010 Potsdam | 2010 |
| Heft 77 | A flow cytometric approach to monitor the effects of gentle preservation techniques in the postharvest chain | 2011 |
| Heft 78 | 17. und 18. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 05. Mai 2011 Stuttgart und 09. Mai 2012 Osnabrück | 2012 |

| | | |
|---------|---|------|
| Heft 79 | 2. Öffentliches Symposium des „BCN“ BiogasPOTENZIALE Erkennen, Erforschen, Erwirtschaften | 2012 |
| Heft 80 | Mechanisms of Bacillus spore germination and inactivation during high pressure processing | 2013 |
| Heft 81 | 19. Workshop Computer-Bildanalyse in der Landwirtschaft 2. Workshop Unbemannte autonom fliegende Systeme in der Landwirtschaft 06. – 07. Mai 2013 Berlin | 2013 |
| Heft 82 | 3rd Global Workshop on Proximal Soil Sensing | 2013 |
| Heft 83 | 19. Arbeitswissenschaftliches Kolloquium des VDI-MEG Arbeitskreises Arbeitswissenschaften im Landbau 11. – 12. März 2014 Dresden | 2014 |
| Heft 84 | Prozessmikrobiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen Schlussbericht zum Forschungsverbund BIOGAS-BIOCOENOSIS | 2014 |
| Heft 85 | Sensoren. Modelle. Erntetechnik Kolloquium zur Verabschiedung von Dr. Ehler 27. Mai 2014, Potsdam-Bornim | 2014 |
| Heft 86 | Phosphor für die Landwirtschaft – Strategien für eine endliche Ressource 11. Juni 2014, Potsdam-Bornim | 2014 |
| Heft 87 | Biofilme in Biogasanlagen - Struktur, Einfluss auf die Bio- gasausbeute und Optimierung technischer Systeme zur Rückhaltung der mikrobiellen Biomasse BIOGAS-BIOFILM | 2015 |

Interessenten wenden sich an:

Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V.
Max-Eyth-Allee 100
14469 Potsdam

Tel.: (0331) 5699-820
Fax.: (0331) 5699-849
E-Mail: atb@atb-potsdam.de

Schutzgebühr: 13,- €