

Schlussbericht

zum Vorhaben

Verbundvorhaben Anaerkon: Anaerobe Konversion von Biomasse zu hochwertigen Energieträgern und Kohlenstoffsinken

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

Förderkennzeichen: 03SF0381A

Laufzeit: 01.10.2009 bis 31.12.2014

Projektleiter: Dr. Jan Mumme

Potsdam, Juli 2015



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Gefördert vom:

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren

Inhalt

1	KURZDARSTELLUNG.....	4
1.1	Aufgabenstellung	4
1.2	Voraussetzungen	5
1.3	Planung und Ablauf des Vorhabens	6
1.4	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	8
1.5	Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	9
2	EINGEHENDE DARSTELLUNG.....	10
2.1	Ergebnisse des Projekts.....	10
2.1.1	Übersicht APECS-Biomassemodell	10
2.1.2	TP2 Mikrobiologie	10
2.1.2.1	<i>Fermentermodell zur Vergärung von lignocellulosereicher Biomasse im Aufstromverfahren</i>	<i>11</i>
2.1.2.2	<i>Mikrobielle Diversität bei der Vergärung lignocellulosereicher Biomasse</i>	<i>22</i>
2.1.2.3	<i>Durchflusszytometrische Bestimmung der Mikroorganismenstruktur im Aufstromverfahren.....</i>	<i>31</i>
2.1.2.4	<i>Grundlagen der mikrobiellen Aktivierung von Biokohle</i>	<i>44</i>
2.1.2.5	<i>Grundlagen der bodenbiologischen Wirkung von Biokohle.....</i>	<i>46</i>
2.1.3	TP3 Anaerobtechnik	57
2.1.3.1	<i>Aufbau einer kleintechnischen Fermentationsanlage zum Aufstromverfahren.....</i>	<i>57</i>
2.1.3.2	<i>Vergärung von Weizenstroh im Aufstromverfahren.....</i>	<i>57</i>
2.1.3.3	<i>Vergärung von Rapsexpeller im Aufstromverfahren.....</i>	<i>61</i>
2.1.3.4	<i>Ansätze für die Modellierung und Regelung des Aufstromverfahrens.....</i>	<i>63</i>
2.1.3.5	<i>Vergärung flüssiger Reststoffe aus der hydrothermalen Karbonisierung und der Pyrolyse</i>	<i>66</i>
2.1.3.6	<i>Wirkung von Biokohle auf den Biogasprozess</i>	<i>71</i>
2.1.4	TP4 Thermochemische Karbonisierung und Systemintegration	80
2.1.4.1	<i>Aufbau und Betrieb der Versuchsanlagen.....</i>	<i>80</i>
2.1.4.2	<i>Wandlung von Gärrest mittels HTC.....</i>	<i>84</i>
2.1.4.3	<i>Wandlung von Gärrest mittels Pyrolyse</i>	<i>102</i>
2.1.4.4	<i>Adsorption von Nährstoffen an Biokohle</i>	<i>104</i>
2.1.4.5	<i>Energieflussanalyse des APECS-Modells.....</i>	<i>106</i>
2.1.5	TP5 Bodenwirkung von Biokohle	107

2.1.6 Fazit.....	111
2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.....	114
2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	115
2.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans.....	116
2.5 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	119
2.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses.....	120
2.7 Literaturverzeichnis	124

1 Kurzdarstellung

1.1 Aufgabenstellung

Gesamtziel des Vorhabens war es, die wissenschaftlichen und technischen Grundlagen für eine effiziente und nachhaltige Bereitstellung von Biomethan als hochwertigen Energieträger und Biokohle als Bodenverbesserungsmittel und Kohlenstoffsenke zu schaffen. Basis ist die intelligente Verknüpfung von Biokonversion und thermochemischer Karbonisierung zu einem innovativen und leistungsfähigen Hybridverfahren.

Angesichts von Klimawandel und Ressourcenknappheit sind weltweit Technologien gefragt, die Energie CO₂-neutral bereitstellen. Mit der integrierten Herstellung eines wertvollen Bodenhilfsstoffs auf Basis von stabilen Kohlenstoffträgern geht das vorgestellte Verfahrenskonzept, die kombinierte Biokonversion und Karbonisierung, noch einen wesentlichen Schritt weiter: Die Energiegewinnung kann hierdurch CO₂-negativ sein. In Anbetracht der zunehmenden Nutzungskonkurrenz zwischen Energie- und Nahrungs- bzw. Futterpflanzen ist im vorgestellten Verfahrenskonzept ausschließlich der Einsatz organischer Reststoffe vorgesehen.

Die wesentlichen Arbeitsziele waren:

- Signifikante Erhöhung der energetischen Gesamteffizienz gegenüber verfügbaren alternativen Verfahren
- Etablierung der Landwirtschaft als echte Kohlenstoff-Senke
- Erhaltung oder Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit unter den Einflüssen von Klimawandel und verminderter Biomasserückführung

Wissenschaftliche Ziele des Vorhabens waren:

- Identifikation, Beschreibung und Sicherstellung einer effektiven mikrobiologischen Struktur für die Vergärung von lignocellulosereichen Biomassen
- Optimierung der anaeroben Biokonversion von stickstoff- und faserreichen Reststoffen im innovativen Aufstromverfahren
- Analyse der Eignung unterschiedlicher Verfahren der Karbonisierung – Pyrolyse und Hydrothermale Karbonisierung (HTC) – für die Wandlung von Gärresten zu Biokohle
- Beschreibung der Biokohle-Eigenschaften und Untersuchung des Einsatzes als Additiv im Biogasprozess und zur Sorption von mineralischen Pflanzennährstoffen
- Bewertung der Eignung der Biokohle als Bodenhilfsstoff und zur Kohlenstoffsequestrierung

Um die Ziele zu erreichen, wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt. Hierzu gehörten Versuche zur Erzeugung von Biogas aus Stroh und Rapsexpeller, wofür das am ATB neuentwickelte Aufstromverfahren eingesetzt wurde. Die thermochemische Karbonisierung wurde experimentell durch unterschiedliche Anlagen für die HTC und Pyrolyse bearbeitet. Bodenversuche zur Wirkung von Biokohle wurden sowohl in Laborinkubationen als auch auf dem Feld durchgeführt. Ergänzend wurden vom Kooperationspartner Technische Universität Berlin Topfversuche durchgeführt. Die Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche erfolgten interdisziplinär durch biologische, chemische und ingenieurstechnische Methoden.

1.2 Voraussetzungen

Die ökonomischen Rahmenbedingungen der Biogaserzeugung werden durch das Erneuerbare-Energien-Gesetz (EEG) vorgegeben. Mit dem Ziel, die Einsatzstoffpalette der Biogaserzeugung zu erweitern, wurde in den vergangenen Jahren bis zur letzten Novelle des EEG im Jahr 2014 ein Bonus für verschiedene Einsatzstoffe gezahlt. Durch die jüngste Novellierung des EEG wurde dieser Bonus ersatzlos gestrichen. Für neue Anlagen wird seither nur noch die Grundvergütung gezahlt. Erhalten bleibt jedoch die 2012 eingeführte besondere Vergütung für Güllekleinanlagen bis zu 75 kW installierter elektrischer Leistung. Dies ist der Leistungsbereich, der für Festmist mit dem Aufstromverfahren gut erschlossen werden kann. Mit der Beantragung eines Patentes über das Aufstromverfahren zum 16.02.2006 wurde, wie im Antrag beschrieben, bereits frühzeitig die Sicherung der Schutzrechte eingeleitet. Das Patentverfahren wird vom ATB als Inhaber in Kooperation mit einer Patentverwertungsagentur fortgeführt. Mittlerweile erfolgte in den USA die Patenterteilung. Erste grundlegende Erkenntnisse zur Funktions- und Leistungsfähigkeit des Aufstromverfahrens konnten bereits in dem FNR-geförderten Vorläuferprojekt „Vergärung von nachwachsenden Rohstoffen im Aufstromverfahren, FKZ 22019507“ gewonnen werden. Hier zeigte sich für den Einsatz von Maissilage, dass das Aufstromverfahren sehr hohe Umsatzraten und Durchsätze ermöglicht, ohne dabei eine energieintensive Reaktordurchmischung zu erfordern.

Die Biokohle ist in ihrem Energiegehalt mit fossiler Kohle vergleichbar und kann prinzipiell in konventionellen Kraftwerken energetisch genutzt werden. Entsprechend dem Biomethan ist damit auch für die Biokohle eine mittel- und langfristige Absatzmöglichkeit gesichert. Die Erwartung, die Grundlage für dieses Projekt war, ist jedoch, dass diese nicht als Brennstoff, sondern als dauerstabiles Bodenverbesserungsmittel die größte Wertschöpfung erzielt. Vorbild hierfür sind die sehr fruchtbaren biokohlehaltigen Terra Preta Böden im Amazonasgebiet. In Bezug auf den Einsatz von Biokohlen in Böden der gemäßigten Klimazonen lag zum Projektbeginn 2009 noch kein für die Bewertung ausreichender Datenbestand vor. Der Wert der Biokohle als Bodenverbesserungsmittel resultiert in erster Linie aus der ertrags-

steigernden Wirkung im Boden. Gleichzeitig besteht die prinzipielle Möglichkeit, über die dauerhafte Kohlenstoff-Festlegung eine Wertschöpfung auf Basis des CO₂-Zertifikatehandels zu erzielen, eine entsprechende Zertifizierung vorausgesetzt.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Projekt und Nachwuchsgruppe firmierten nach innen und außen unter dem Titel „APECS – **A**naerobic **p**athways to renewable **e**nergies and **c**arbon **s**inks“. Planung und Ablauf des Vorhabens richteten sich nach den Vorgaben aus dem bewilligten Projektantrag. Zwischen den Verbundpartnern ATB und Technische Universität Berlin (TUB) erfolgten bis zum Auslaufen des von der TUB bearbeiteten Teilprojekts zum 31.12.2012 eine enge Abstimmung und ein intensiver fachlicher Austausch.

Entsprechend der in Kap. 1.1 vorgestellten Aufgabenstellung wies das Vorhaben einen breiten, interdisziplinären Forschungsansatz auf, der durch die Nachwuchsgruppe, aufgeteilt auf sechs eng miteinander verknüpfte Teilprojekte (TP), bearbeitet wurde. Folgende Teilprojekte wurden eingerichtet:

- TP1 Koordination und Verwertung:
Leitung des Verbunds und der Nachwuchsgruppe; Koordination der Ergebnisverwertung
- TP2 Mikrobiologie:
Mikrobiologische Beschreibung der methanogenen Fermentation von Lignocellulose; Grundlagen der biologischen Biokohleaktivierung und der bodenbiologischen Wirkung von Biokohle
- TP3 Anaerobtechnik:
Kinetische Beschreibung der Vergärung lignocellulosereicher Biomasse; Einsatz von Biokohle zur Verbesserung des Gärprozesses
- TP4 Karbonisierung und Systemintegration:
Wandlung von Gärrest zu Biokohle; Beschreibung der Prozesse und Produkte der Pyrolyse sowie der hydrothermalen Karbonisierung; Bewertung der Energieeffizienz sowie des Kohlenstoff-Sequestrierungspotenzials
- TP5 Bodenwirkung (Bearbeitung durch TUB):
Bestimmung des Einflusses von Biokohle auf Bodenfruchtbarkeit und Pflanzenwachstum
- TP6 Chemische Analytik
Zentral am ATB für alle TPs eingerichtete Charakterisierung prozessbeteiligter Stoffe

Für die Bearbeitung des Projekts wurde am ATB eine Nachwuchsgruppe eingerichtet, bestehend aus Herrn Mumme als Teamleiter sowie 3 PostDoc-Stellen, 4 Promotionsstellen, 5 technischen Stellen, einer Teamassistenz sowie 4 studentischen Hilfskräften. Entsprechend den Aufgaben des Projekts wurden die Stellen interdisziplinär mit Ingenieuren, Biologen und Chemikern besetzt. Als beratendes Gremium wurde ein 7-köpfiger wissenschaftlicher Projektbeirat eingerichtet, der 1- bis 2-mal jährlich tagte und die Arbeit der Nachwuchsgruppe durch kritische Begleitung und konstruktive Vorschläge unterstützend begleitete.

Der Ablauf des Projekts war gekennzeichnet durch eine Teilung in Aufbauphase, Hauptarbeitsphase und Schlussphase/Projektverlängerung. In der Aufbauphase, die sich z. T. in das 2. Projektjahr hineinstreckte, wurde die Nachwuchsgruppe personell besetzt und die technischen und methodischen Grundlagen gelegt.

Der Aufbau der Versuchsanlagen zur Biogaserzeugung konnte bereits zeitnah im ersten Projektjahr abgeschlossen werden. Für den Aufbau der Anlagen zur thermochemischen Karbonisierung wurde dagegen mehr Zeit benötigt, was dem Neuheitscharakter des Themas sowohl für das ATB als auch insgesamt in der Wissenschaft geschuldet war. Der zunächst beschaffte HTC-Reaktor im 1-L-Maßstab erwies sich als zu klein, um den Materialbedarf des Projekts zu befriedigen. Nach Genehmigung durch den PtJ, wurde daher als zusätzliche Investition ein zweiter, kleintechnischer HTC-Reaktor (ca. 19 L) angeschafft, der im zweiten Projektjahr in Betrieb genommen werden konnte. Bedingt durch eine Vielzahl technischer Probleme konnte das Pyrolyse-Drehrohr erst im fünften Projektjahr 2014 in Betrieb genommen werden. Aufgrund dieser Verzögerung wurden die Arbeiten zur Pyrolyse zugunsten der HTC reduziert. Die Ergebnisse der Pyrolyse wurden als Referenz für die HTC verwendet.

Entsprechend des schnelleren Aufbaus waren in den fermentationsbezogenen Teilprojekten TP2 und TP3 anfänglich schnellerer Arbeits- und Erkenntnisfortschritte möglich, als bei den biokohlebezogenen Teilprojekten TP4 und TP5. Ab dem zweiten Projektjahr konnte der Rückstand in TP4 und TP5 jedoch schnell aufgeholt werden, sodass zum ursprünglich geplanten Projektende (31.03.2014) die Projektziele weitestgehend erreicht wurden, wie beschrieben, mit Ausnahme der Pyrolyse bzw. der Bodenwirkung von Pyrolysekohle.

Verbunden mit der Aussicht, im Laufe des Projekts neu gewonnene Erkenntnisse in Bezug auf den Einsatz von Biokohle in der methanogenen Fermentation tiefergehend zu untersuchen und mögliches wirtschaftliches Potenzial in diesem Bereich zu erschließen, wurde ein entsprechend begründeter Antrag auf Projektverlängerung bis zum 31.12.2014 beim PtJ eingereicht und genehmigt. Bis zum Abschluss des Projekts wurden die gesetzten Ziele im Wesentlichen erreicht.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Arbeiten im Projekt setzten an, an den aktuellen Stand des Wissens und der Technologie. Hierzu wurde die internationale Fachliteratur in den relevanten Bereichen Mikrobiologie (u. a. Systematic and Applied Microbiology), Biomasse-Konversion (u. a. Bioresource Technology) und Bodenkunde (u. a. Geoderma) verwendet. Die Recherche erfolgte über die bekannten Portale wie Scopus und Web of Science.

Im Bereich der anaeroben Vergärung und der Biogas-Mikrobiologie lag bereits vor Projektstart eine umfangreiche Menge an Fachliteratur vor. Dabei bezieht sich der Hauptteil der Literatur auf die Vergärung von Klärschlamm, Wirtschaftsdüngern und Energiepflanzen (v. a. Maissilage). Vergleichsweise wenige Fachartikel beziehen sich auf die Technologie und Biologie der Vergärung von lignocellulosereicher Biomasse. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass diese aufgrund der biologisch stabilen Struktur bisher kaum für die Biogaserzeugung in Erwägung gezogen wurde.

Zur thermochemischen Wandlung von Biomasse zu Biokohle lagen zum Projektstart bereits einige dutzend relevante Fachartikel vor, insb. zur Pyrolyse. Die HTC, die nach der Erstbeschreibung durch den Nobelpreisträger Friedrich Bergius Anfang des 20. Jahrhunderts erst wieder seit etwa einer Dekade forschungsseitig bearbeitet wird, ist jedoch weit weniger umfangreich beschrieben. Dies gilt insbesondere für den Einsatz nativer organischer Stoffe, wie Gärrest.

Die Nutzung von Biokohle zur Bodenverbesserung hat u. a. in der Terra Preta, einem sehr fruchtbaren biokohlehaltenden Boden im Amazonasgebiet, ein historisches Vorbild, welches die Machbarkeit und Nachhaltigkeit der Maßnahme bestätigt. Zum Projektstart bereits experimentell gezeigt wurde die hohe Stabilität von Biokohle im Boden. Die Wirkung der Biokohle im komplexen System Boden ist jedoch nicht beschrieben. Es fehlen systematische Untersuchungen in Bezug auf die Böden gemäßigter Breiten. Insbesondere der Einsatz von HTC-Kohle zur Bodenverbesserung ist kaum beschrieben.

Das für die Erzeugung von Biogas aus Lignocellulosebiomasse eingesetzte Aufstromverfahren beruht auf einer Entwicklung des ATBs. Für dieses Verfahren wurde vom ATB 2006 Patentschutz beantragt (WO 2007/093138 A2). Kurz vor Projektstart wurde außerdem das Verfahren zur kombinierten Biogas- und Biokohleerzeugung unter PCT/EP2010/061794 zum Patent angemeldet. In den Bereichen Biogas, Karbonisierung und Bodenverbesserung wurde international in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von Patenten beantragt und teilweise auch erteilt. Nach eingehender Prüfung wurden für die Ziele und Aufgaben des Projekts keine wesentliche Beschränkung aufgrund bestehender externer Patente gesehen.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Mit den Zielen Synergien zu nutzen, die Ergiebigkeit und den Projektfortschritt zu fördern sowie die Sichtbarkeit des Projekts zu erhöhen, wurde von Beginn an angestrebt, Kooperationen mit nationalen und internationalen Partnern einzugehen. Nachfolgend werden die wichtigsten Kooperationspartner vorgestellt.

Bereich Biogas

- Universität Göttingen: Kooperationspartner in dem von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe gefördertem Verbundvorhaben „Effiziente energetische Verwertung von Pferdemist durch den Einsatz innovativer Techniken der kontinuierlichen Feststofffermentation und Gärreststabilisierung - Teilvorhaben 2“, FKZ 11NR312. Laufzeit: 01.11.2011 - 31.07.2014
- Tsinghua University Peking, China: Arbeit eines Gast-Doktoranden am ATB zur Vergärung von Mais-Stroh im Aufstromverfahren.

Bereich Biokohle

- Verbundprojekt „Biochar in Agriculture - Perspectives for Germany and Malaysia“, gefördert im Rahmen des wettbewerblichen Fördermechanismus SAW der Leibniz-Gemeinschaft. Koordination: Dr. Meyer-Aurich, ATB. Einsatz von Pyrolyse und HTC-Kohle zur Bodenverbesserung. Durchführung von Feldversuchen. Laufzeit: 01.02.2012 - 31.12.2015
- Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung Berlin: Charakterisierung flüchtiger organischer Verbindungen in der HTC-Kohle sowie der HTC-Flüssigkeit.
- EU COST Action TD1107 “Biochar as option for sustainable resource management”. Laufzeit: 01.03.2012 - 31.03.2016. Europäische Vernetzung im Bereich Biokohle.
- University of Edinburgh, Schottland, UK: Kooperation mit dem UK Biochar Research Centre im Bereich Biokohle-Herstellung. Wissenschaftler- und Studentenaustausch.

Bereiche Biogas & Biokohle

- Humboldt-Universität zu Berlin: Entwicklung einer messtechnischen Lösungen zur automatischen Erfassung kleiner Gasströme. Vermessung der Eigenschaften magnetischer Biokohle.
- Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie ICT in Pfinztal: Vermessung der Fermenterflüssigkeit hinsichtlich der Konzentration an organischen

Säuren mittels optischer Methoden. Und: Bestimmung der Materialeigenschaften von HTC-Kohle sowie der Zusammensetzung von HTC-Flüssigkeit mittels NIR.

- Ege University Izmir, Türkei: Arbeit von einer Gastdotorandin und zwei Forschungsstudenten am ATB zum Einsatz von Magnetpartikeln zur Immobilisierung von Mikroorganismen bzw. zur Erzeugung von HTC-Kohle aus Obstsafttrester.

2 Eingehende Darstellung

2.1 Ergebnisse des Projekts

2.1.1 Übersicht APECS-Biomassemodell

Eine Übersicht des dem Projekt zugrunde liegenden APECS-Biomassemodells zeigt Abb. 1.

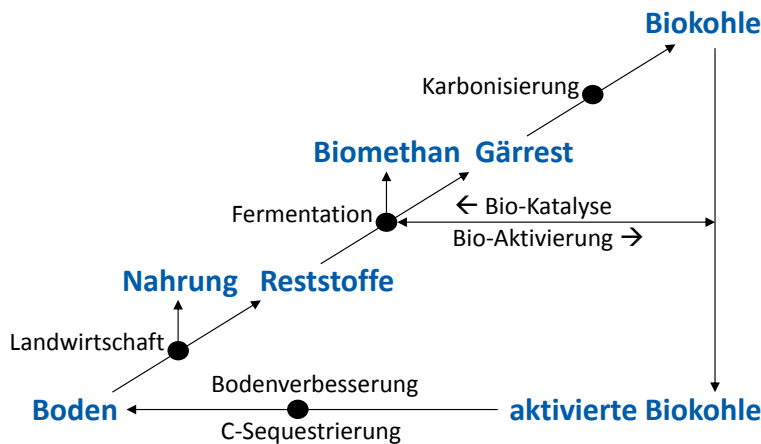


Abb. 1: Prozesse und Produkte im APECS-Biomassemodell

Wie bereits in Kap. 1.3 beschrieben, ist das Projekt in 6 Teilprojekte (TP) unterteilt (Tab. 1). Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse der wissenschaftlichen TPs 2 - 5 vorgestellt. Das TP5 „Bodenwirkung“ wurde maßgeblich vom Verbundpartner Technische Universität Berlin bearbeitet.

2.1.2 TP2 Mikrobiologie

Ziel von TP2 ist die Beschreibung einer optimalen mikrobiellen Lebensgemeinschaft für den Umsatz schwer aufschließbarer bzw. stickstoffhaltiger organischer Reststoffe

in Aufstrom-Biogasreaktoren (siehe Kap. 2.1.3.1). Hierzu gehören die Identifizierung der in der Biogasproduktion involvierten Mikroorganismen durch die Erstellung von 16S rRNA Genbibliotheken und nachfolgende bioinformatische Auswertung der ermittelten DNA-Sequenzen, die Analyse der Dynamik dieser Lebensgemeinschaft durch Verwendung der T-RFLP-Analytik und die Ermittlung der Aktivität ausgewählter Mikroorganismengruppen. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieses Projekts neben der Optimierung eines mikroskopischen Verfahrens zur Quantifizierung der nativen Zellen ein durchflusszytometrischer Ansatz etabliert. Im Laufe des Projekts neu aufgenommen wurden die Ziele, die biologische Aktivierung von Biokohle sowie ihre Bodenwirkung aus mikrobieller Sicht zu beschreiben.

2.1.2.1 Fermentermodell zur Vergärung von lignocellulosereicher Biomasse im Aufstromverfahren

Wichtige Grundlagen für das zu entwickelnde Fermentermodell wurden durch entsprechende Auswertungen der in TP3 gewonnenen Daten geschaffen. Zusätzlich wurde für die Generierung ergänzender Messdaten ein eigenes Fermentersystem für lignocellulosereicher Biomasse nach dem Aufstromverfahren eingerichtet (Abb. 2), mit Glasreaktoren im Labor-Maßstab von jeweils 4 bzw. 5,6 Litern.

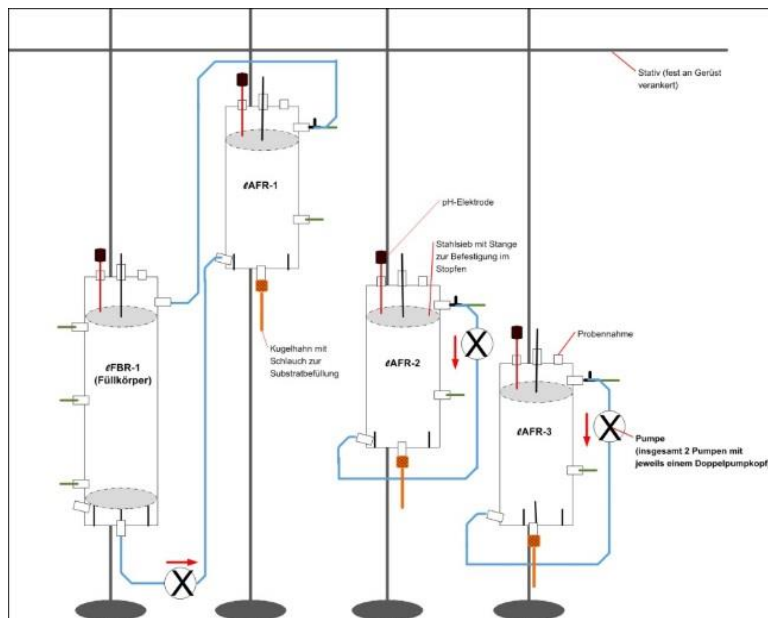


Abb. 2: Parallelaufbau der labortechnischen Reaktoren: AFR = Aufstromreaktor (4 Liter) FBR = Festbettreaktor (5,6 Liter). Die Beheizung des Systems erfolgte von außen über Heizmanschetten. AFR-1/IFBR-1 und AFR-2 ohne Spurenelementzugabe und AFR-3 mit Spurenelementzugabe.

Mit diesem System wurde eine Versuchsreihe über 36 Wochen zur Untersuchung des Einflusses von Spurenelementen auf die Vergärung von Weizenstroh, im Speziellen die in TP3 eingesetzte Spurenelementlösung (Tab. 1), auf die mikrobielle Biozönose und die Biogasproduktion in UASS Reaktorsystemen durchgeführt. Von dieser Spurenelementlösung wurden 0,01 ml/g oTS eingesetzt.

Tab. 1: Spurenelementlösung nach DSMZ-Medium 144 (*Thermoanaerobium* Medium)

Bezeichnung	Chemische Formel	Molmasse [g mol ⁻¹]	Molarität in 1 Liter [mM]	Menge für 1 Liter Lösung [g]
Nitrilotriacetic acid, 99%		191,14	66,97	12,80
Eisen-II-chlorid-Tetrahydrat	FeCl ₂ x 4 H ₂ O	198,81	1,01	0,20
Mangan-II-chlorid-Tetrahydrat	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	197,91	0,51	0,10
Cobalt-II-chlorid-Hexahydrat	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	237,93	0,71	0,17
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,01	0,68	0,10
Zinkchlorid	ZnCl ₂	136,30	0,73	0,10
Kupfer-II-chlorid-Hexahydrat	CuCl ₂	134,45	0,15	0,02
Nickel-II-chlorid-Hexahydrat	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	237,69	0,04	0,01
Sodium selenite pentahydrate p.a.	Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	263,01	0,04	0,01
Borsäure	H ₃ BO ₃	61,83	0,49	0,03
Natriumchlorid	NaCl	58,44	17,11	1,00
Natriummolybdat-2-hydrat	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	241,95	0,08	0,02

Nach einer vierwöchigen Anlaufphase mit einer Raumbelastung von 1,7 g/l*d wurde die Raumbelastung auf 2,5 g/l*d erhöht, somit wurden die Versuchsbedingungen an denen der kleintechnischen Reaktoren angepasst. Als Substrat wurde, wie auch für die kleintechnische Reaktoranlage, Weizenstroh verwendet. Folgende Analysen wurden während der Versuchsphase durchgeführt: Biogaszusammensetzung und -menge, chemische Analytik (u. a. Spurenelemente, oTS, FOS/TAC, Säuren, N, C, P, S), molekulargenetische Analyse der Struktur der mikrobiellen Lebensgemeinschaft auf Basis der T-RFLP (terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) Methode.

Einfluss von Spurenelementen auf die Prozessführung

Nach einer Laufzeit von 30 Wochen konnte ein rapider Anstieg des FOS/TAC Wertes bis auf ein Wert von 1,6 und ein Rückgang des pH-Werts im AFR-2 (ohne Spurenelemente) beobachtet werden, während das kombinierte System (AFR-1 und FBR-1) und AFR-3 (mit Spurenelementzugabe) annähernd gleich niedrige FOS/TAC-Werte

von $\leq 0,2$ aufwiesen (Abb. 3). Der FOS/TAC Wert ist ein Maß für das Verhältnis von freien flüchtigen organischen Fettsäuren (FOS) zum vorhandenen Puffervermögen im Fermenter, basierend auf dem Anteil an totalen anorganischen Carbonat (TAC). Allgemeinhin wird ein Wert von unter 0,3 als normal angesehen. Der erhöhte FOS/TAC-Wert im AFR-2 deutet auf eine Störung des Systems hin. Dies wird durch die niedrige Methanausbeute des AFR-2 verdeutlicht (Abb. 4). Erst durch die Zugabe von Spurenelementen ab der 30. Woche erholte sich der AFR-2, gezeigt durch die Verringerung des FOS/TAC Quotienten (Abb. 3) und einer Erhöhung der Methanausbeute (Abb. 4).

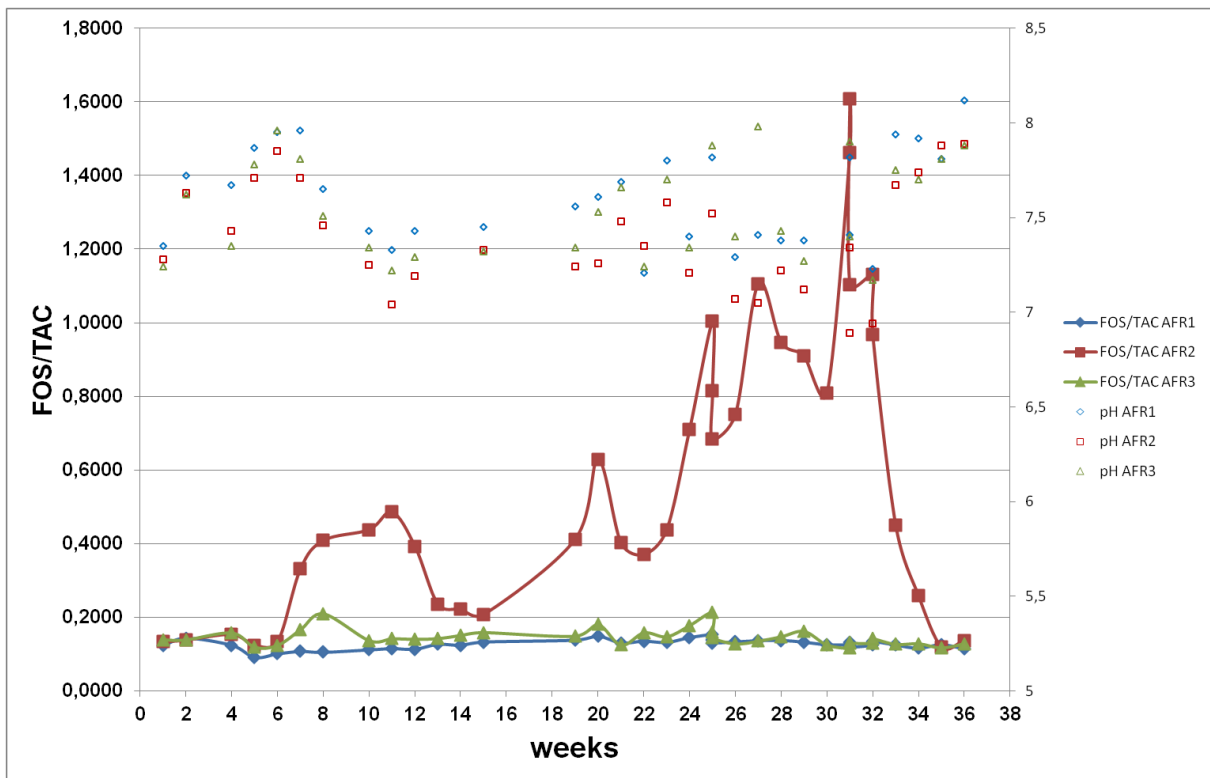


Abb. 3: Verlauf des FOS/TAC-Werts und des pH-Werts im 1-stufigen Aufstromreaktor ohne Spurenelement-(SE)-Zugabe (AFR-2), im 1-stufigen Aufstromreaktor mit ES-Zugabe (AFR-3) und im 2-stufigen Aufstromreaktor ohne ES-Zugabe (AFR-1)

Das kombinierte Reaktorsystem aus Aufstrom- und Festbettreaktor zeigte auch ohne zusätzliche Gabe von Spurenelementen bis zur 23. Woche eine wesentlich höhere Methanausbeute als die bei einzelnen Aufstromreaktoren. Dies kann auf zwei Ursachen zurückzuführen werden: 1) das kombinierte System hat insgesamt ein höheres Gesamtvolumen (9,6 Liter anstelle von 4 Liter), 2) die Kompartimentierung der Hydrolyse (AFR) und Methanogenese (FBR) führt zum gezielten Abbau der FOS im FBR und somit zur Verringerung einer Säureinhibition der Hydrolyse. Jedoch war

zu beobachten, dass ab der 28. Woche die Methanausbeute auch in diesem System stark zurückging und sich denen des AFR-3 angeglichen hat (Abb. 4).

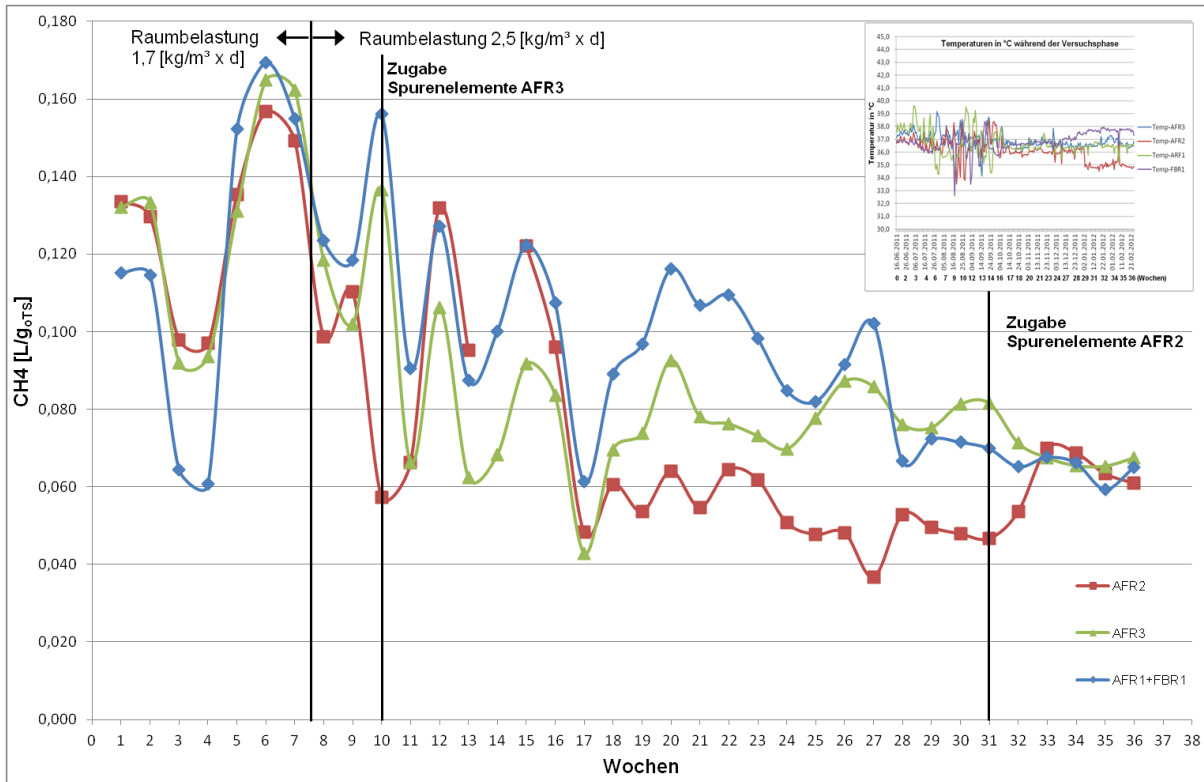


Abb. 4: Diagramm der ermittelten Methanausbeute bezogen auf organische Trockensubstanz (oTS) über den Zeitraum von 36 Wochen für die labortechnischen Reaktoren AFR-1/FBR-1 (ohne Spurenelemente), AFR-2 (bis zur 30. Woche ohne, danach mit Spurenelementen) und AFR-3 (ab der 9. Woche mit Spurenelementen).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Prozess im Aufstromreaktor nach Beginn der Zugabe von Spurenelementen und nach Beendigung der Temperaturschwankungen stabiler läuft (AFR-3). Der Aufstromreaktor mit nachgeschaltetem Festbettreaktor (AFR-1/FBR-1) zeigte diese Prozessstabilität weitestgehend auch ohne Spurenelementzugabe. Wohingegen der Aufstromreaktor ohne Spurenelementzugabe (AFR-2) zunehmend instabiler wurde und sich erst nach Beginn der Beimengung von Spurenelementen in der 31. Versuchswoche wieder stabilisierte (Abb. 3).

Während der Versuchsphase wurden die Gärreste und Prozessflüssigkeiten regelmäßig auf verschiedene chemische Parameter analysiert. Hierzu gehörten pH-Wert, oTS, NH₄-N, P, C, N, S, H, FOS/TAC, Gesamtsäuren und Spurenelemente (Fe, Mn, Co, Ca, Zn, Cu, B, Na, Ni, Mo, und Se).

Die Bilanzierung der Spurenelemente in der Spurenelementlösung und in dem Substrat (Weizenstroh) ergab, dass vor allem Co, Ni, Mo und Se mit über 96 % mit

der zugeführten Spurenelementlösung in den AFR-3 und später auch in den AFR-2 eingebracht wurden (Tab. 2).

Tab. 2: Prozentuale Anteile verschiedener Spurenelemente im Substrat und Spurenelementlösung

Spurenelement	Weizenstroh	Spurenelementlösung (Tab. 1)
Eisen (Fe)	94,69	5,31
Mangan (Mn)	95,14	4,86
Kobalt (Co)	3,06	96,94
Calcium (Ca)	99,94	0,06
Zink (Zn)	81,57	18,43
Kupfer (Cu)	83,56	16,44
Bor (B)	94,42	5,58
Natrium (Na)	63,69	36,31
Nickel (Ni)	0,08	99,92
Molybdän (Mo)	0,03	99,97
Selen (Se)	0,66	99,34

Die chemische Analyse der Gärreste und Prozessflüssigkeiten der drei Reaktorsysteme während der 36 Wochen zeigte, dass für folgende Elemente keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Reaktorsystemen sowohl in der Prozessflüssigkeit als auch in den Gärresten nachgewiesen werden konnten: Fe, Mn, Na, Zn, B und Ca. Dagegen wurde im Reaktor AFR-3 ab der 10. Woche, also nach der ersten Verabreichung der Spurenelementlösung, ein Anstieg in der Co-Konzentration gemessen. Ein solcher Anstieg konnte auch im Reaktor AFR-2 ab der 31. Woche, ebenfalls nach Beginn der Beimengung von Spurenelementen, gemessen werden (Abb. 5). Aus der Literatur ist bekannt, dass Nickel zu den für die Methanogenese wichtigen Spurenelementen zählt. Leider lag bei allen Proben der Messwert für Nickel unterhalb der Nachweisgrenze. Im Rahmen des Projekts konnte nicht geklärt werden, ob das Kobalt frei in der Prozessflüssigkeit oder in den Mikroorganismen gebunden vorlag. Anhand der erstellten Bilanz (Tab. 2) ist nachgewiesen worden, dass das Kobalt mit fast 97 % aus der zusätzlichen Spurenelementlösung stammte.

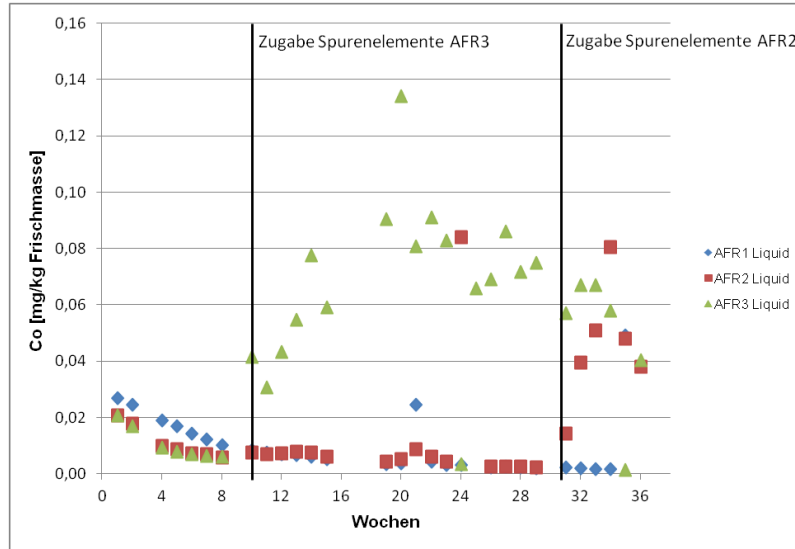


Abb.5: Kobalt (Co)-Konzentrationen in der Prozessflüssigkeit der Reaktorsysteme AFR-1/ FBR-1, AFR-2 und AFR-3.

Einfluss der Spurenelemente auf die Diversität der mikrobiellen Biozönosen

Im Rahmen der Versuchsreihe wurde auch die Diversität der mikrobiellen Biozönosen in den drei Reaktorsystemen betrachtet. Hierzu wurden DNA-basierende Analysen mittels der T-RFLP-Methode (T-RFLP = terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) wie unter Kap. 2.1.2.2 beschrieben durchgeführt. Dabei repräsentiert ein terminales Restriktionsfragment (T-RF) eine Spezies. Analysiert wurden Proben von Gärresten (D) und Prozessflüssigkeiten (L) aus den drei Aufstromreaktoren. Im Falle des kombinierten Systems 1, bestehend aus Aufstromreaktor (AFR-1) und nachgeschaltetem Festbettreaktor (FBR-1), wurden nur Proben aus ersterem analysiert. Die insgesamt 10 Proben wurden im Laufe von 36 Wochen zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen.

Für die Auswertung der Daten wurden für die Gruppe der Archaea alle T-RFs, die mindestens einmal in allen Proben mit über 8 % der Gesamtfluoreszenz nachgewiesen werden konnten, herangezogen. Für die Gruppe der Bacteria wurden alle T-RF mit über 4 % der Gesamtfluoreszenz für die Auswertung berücksichtigt, da die Gruppe der Bacteria wesentlich diverser ist als die der Archaea. Fragmente, die unterhalb des o. g. Schwellenwerts lagen und nicht in allen Reaktorsystemen nachgewiesen wurden, wurden als „Sonstige“ zusammengefasst. Für die Archaea wurden somit insgesamt 10 T-RFs und für die Bacteria insgesamt 20 T-RFs für die Auswertung herangezogen.

Auswertung Archaea (Abb. 6):

Das eingesetzte Inokulum, welches für alle drei Reaktorsysteme verwendet wurde, zeichnete sich durch eine hohe Diversität mit ca. 100 verschiedenen T-RFs aus (Daten nicht gezeigt). Fast 80 % aller im Inokulum ermittelten T-RFs waren nur mit einer prozentualen Häufigkeit von unter 1 % vertreten. Mit über 16 % war das T-RF A202 im Inokulum am häufigsten vertreten. Im Verlauf der Versuchsreihe wurde dieses T-RF in den Reaktorsystemen jedoch durch andere T-RFs verdrängt und war zu meist nur noch mit weniger als 1 % in den verschiedenen Biozönosen vertreten.

Die archaeelle Lebensgemeinschaft im AFR-1 unterscheidet sich sehr stark von der der beiden anderen Reaktoren AFR-2 und AFR-3. Dies kann damit begründet werden, dass das Reaktorsystem 1 aus zwei Komponenten, dem AFR-1 (Hydrolyse/Acidogenese) und dem FBR-1 (Methanogenese), besteht. Wie auch anhand der kleintechnischen Aufstromreaktorsysteme (TP3) gezeigt werden konnte, führt eine räumliche Trennung der Hydrolyse/Acidogenese von der Methanogenese zur Ausbildung einer an dem jeweiligen Teilprozess angepassten Biozönose in den verschiedenen Kompartimenten.

Diversität der Archaea-Biozönosen in den Prozessflüssigkeiten

Im AFR-1 konnten leichte Schwankungen in der Ausprägung von archaeellen Hauptgruppen im Verlauf der Versuchsphase nachgewiesen werden, die im Einklang mit der Prozessführung stehen. Bis zur 18. Woche traten mehr oder weniger starke Temperaturschwankungen in allen Reaktorsystemen auf, die sich ab der 20. Woche stabilisierten. Parallel dazu konnte auch in den Biozönosen aller drei Reaktorsysteme eine Änderung in der prozentualen Verteilung der T-RFs ab der 24. Woche beobachtet werden.

Wie bereits erwähnt, zeigten die Biozönosen zwischen AFR-1 und den beiden anderen Reaktoren starke Unterschiede in der prozentualen Zusammensetzung der T-RFs. AFR-2 und AFR-3 zeigten bis zur 14. Woche eine hohe Übereinstimmung in der Diversität mit dem T-RF A149 als Hauptgruppe in beiden Biozönosen. In dieser Zeit traten immer wieder starke Temperaturschwankungen auf und somit ständig wechselnde Lebensbedingungen für die Mikroorganismen. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich während dieser Versuchsphase Mikroorganismen durchgesetzt haben, die toleranter gegenüber solchen Temperaturschwankungen sind als andere Arten und sich somit stärker vermehren konnten. Ab der 24. Woche kristallisierten sich jedoch in den beiden Reaktorsystemen verschiedene archaeelle Hauptgruppen in ihren Biozönosen heraus. Während im AFR-3 das T-RF A472 die Hauptgruppe in der Biozönose darstellte, zeigte das T-RF A125 den höchsten prozentualen Anteil in der Biozönose von AFR-2. Generell zeigte die AFR-2 Biozönose größere Schwankungen in der prozentualen Zusammensetzung der T-

RFs als es im AFR-3 der Fall war. Zu diesem Zeitpunkt begann der FOS/TAC-Wert von AFR-2 stark zu steigen, bis er in der 30. Woche seinen Höchststand von 1,6 erreichte. Dagegen stabilisierte sich die Biozönose des AFR-3 von der 24. Woche an. Da beide Reaktoren unter annähernd gleichen Bedingungen betrieben wurden, kann die höhere Stabilität des Reaktors AFR3 auf die Zugabe der zusätzlichen Spurenelementlösung zurückgeführt werden. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass sich der AFR-2 ab der 32. Woche ebenfalls wieder stabilisierte (gleiche FOS/TAC-Werte von unter 0,2 wie bei den beiden anderen Reaktoren), nachdem diesem ebenfalls die Spurenelementlösung wöchentlich ab der 31. Woche verabreicht wurde. Es konnte dann ebenfalls die Tendenz einer Stabilisierung der Biozönose im AFR-2 beobachtet werden. Um dies eindeutig nachzuweisen, wäre jedoch eine Verlängerung der Versuchsphase um 2 bis 3 Wochen notwendig gewesen.

Diversität der Archaea-Biozönosen in den Gärresten.

Die Unterschiede in der prozentualen Verteilung der T-RFs in den Biozönosen der drei Reaktoren fielen bei den Gärresten nicht so stark aus wie im Fall der Prozessflüssigkeiten. Dies kann dadurch begründet werden, dass sich auf dem Weizenstroh Biofilme mit syntrophen Mikroorganismen angesiedelt haben. Durch die vielen positiven Effekte, die die Bildung einer Biofilmbiozönose mit sich bringt, sind diese Organismen gegenüber einer Verschlechterung der Umweltbedingungen besser geschützt als frei dissoziierte Organismen. Dennoch konnte beobachtet werden, dass alle drei archaeelle Biozönosen der Gärreste bis zur 24. Woche aufgrund der schwankenden Temperaturbedingungen auch in ihrer prozentualen Häufigkeit der T-RFs schwankten. Jedoch zeigte der Reaktor AFR-3 ab der 28. Woche die höchste Stabilität in seiner Gärrest-Biozönose im Vergleich zu den beiden anderen Reaktoren. Während die prozentuale Zusammensetzung der T-RFs in der Biozönose von AFR-1 durchweg Schwankungen über die gesamte Versuchsphase zeigte, stabilisierte sich die Gärrest-Biozönose des AFR-2 nach Zugabe der Spurenelementlösung ab der 32. Woche.

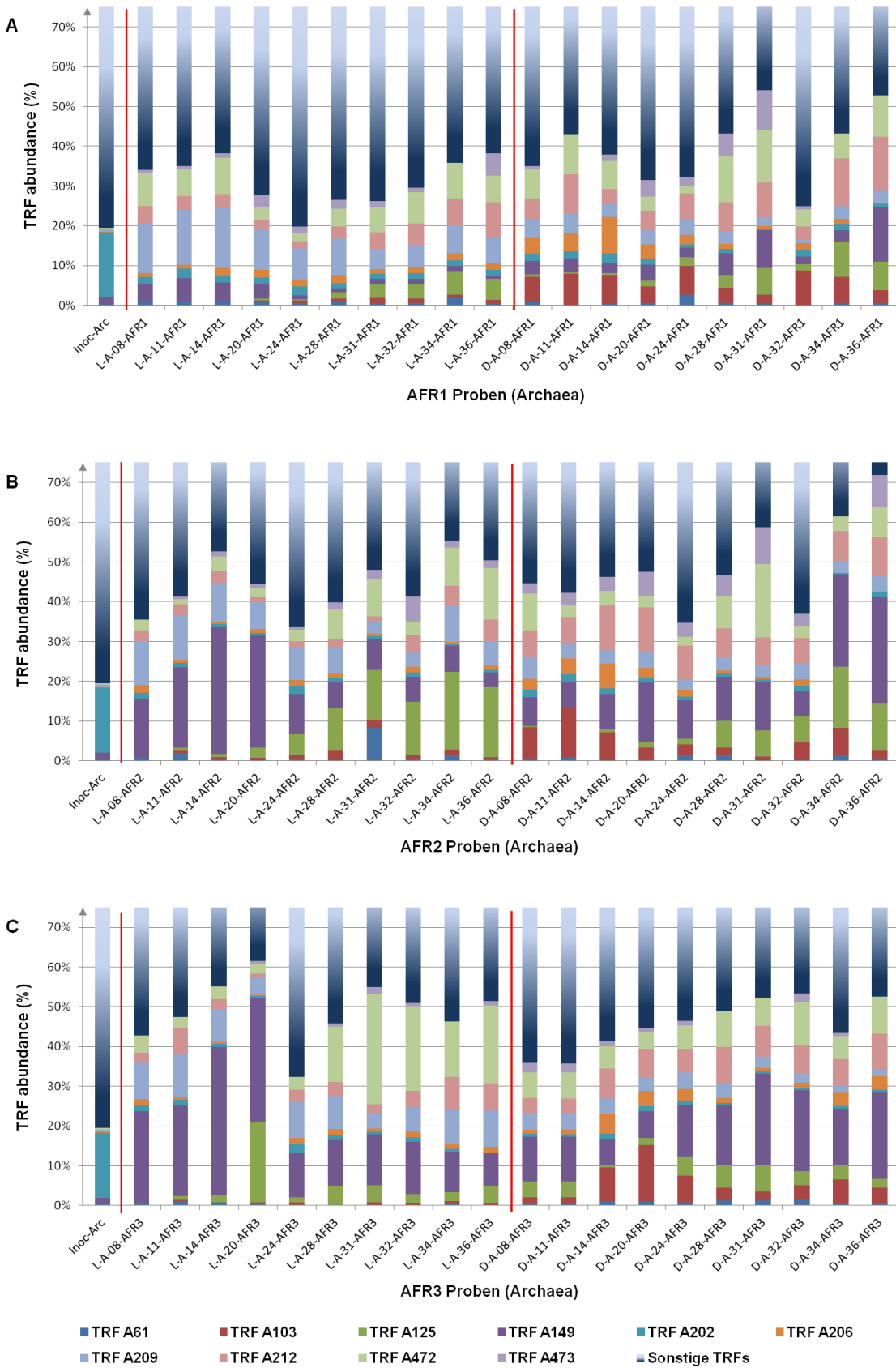


Abb.6: Vergleich der Archaea-Diversität in der Prozessflüssigkeit und den Gärresten der Reaktorsysteme AFR-1 (A), AFR-2 (B) und AFR-3 (C) über einen Zeitraum von 36

Wochen. Die Diversität ist als prozentuale Häufigkeit der ermittelten T-RFs angeben, die in unterschiedlicher Farbe dargestellt sind (siehe Farbcode unterhalb der Abbildung C). Die Proben sind wie folgt kodiert: Inoc-Arc = Inokulum Analyse für Archaea, L = Leachate (Prozessflüssigkeit), D = Digestate (Gärrest), A = Archaea, zweistellige Zahl = Woche des Reaktorbetriebs, in der die Probe genommen wurde, AFR-1 bis AFR-3 = Aufstromreaktoren 1 bis 3.

Auswertung Bacteria (Abb. 7):

Ebenso wie bei den archaeellen Biozönosen konnte für die Gruppe der Bacteria festgestellt werden, dass sich diese Gärrest- und Prozessflüssigkeit-Biozönosen bezüglich ihrer dominierenden T-RFs in allen drei Reaktorsystemen deutlich voneinander unterschieden, jedoch sehr hohe Übereinstimmungen zwischen den Biozönosen der jeweiligen Kompartimente Gärrest und Prozessflüssigkeit in den drei Reaktorsystemen vorlagen (Abb. 7). So dominierte in den Gärresten das T-RF B90 über die gesamte Versuchsphase in allen Reaktoren. In den Prozessflüssigkeiten der drei Reaktoren zeigten insbesondere die vier T-RFs B92, B97, B162 und B188 hohe prozentuale Häufigkeiten, deren Höhe jedoch in allen Reaktoren im Laufe der Versuchsreihe variierte. Zudem konnte in den Prozessflüssigkeiten eine höhere bakterielle Diversität nachgewiesen werden als in den Gärresten. In den unterschiedlichen Habitaten der Reaktoren haben sich demnach unterschiedliche Biozönosen ausgeprägt. Es kann vermutet werden, dass sich die Biozönosen im Gärrest überwiegend aus sessilen Organismen zusammensetzten, während sich in der Prozessflüssigkeit überwiegend freie bzw. aktiv bewegliche Organismen aufgehalten haben. Zur Verifizierung dieser Hypothese wären jedoch weitere Analysen, wie z. B. die taxonomische Zuordnung der verschiedenen Spezies auf Grundlage DNA-basierter Methoden (u. a. Analysen des Gens der 16S rRNA), notwendig gewesen.

Prinzipiell schwankte die prozentuale Häufigkeit der T-RFs in den Prozessflüssigkeiten stärker als in den Gärresten, was wiederum im Zusammenhang mit den positiven Eigenschaften von Biofilmen stehen kann. Entgegen den Ergebnissen für die Archaea konnte kein Einfluss der Beimengung von Spurenelementen auf die Prozessstabilität anhand der Diversität und der prozentualen Häufigkeit der bakteriellen T-RFs nachgewiesen werden. Die Spurenelemente hatten demzufolge nur einen direkten Einfluss auf die Archaea-Biozönose.

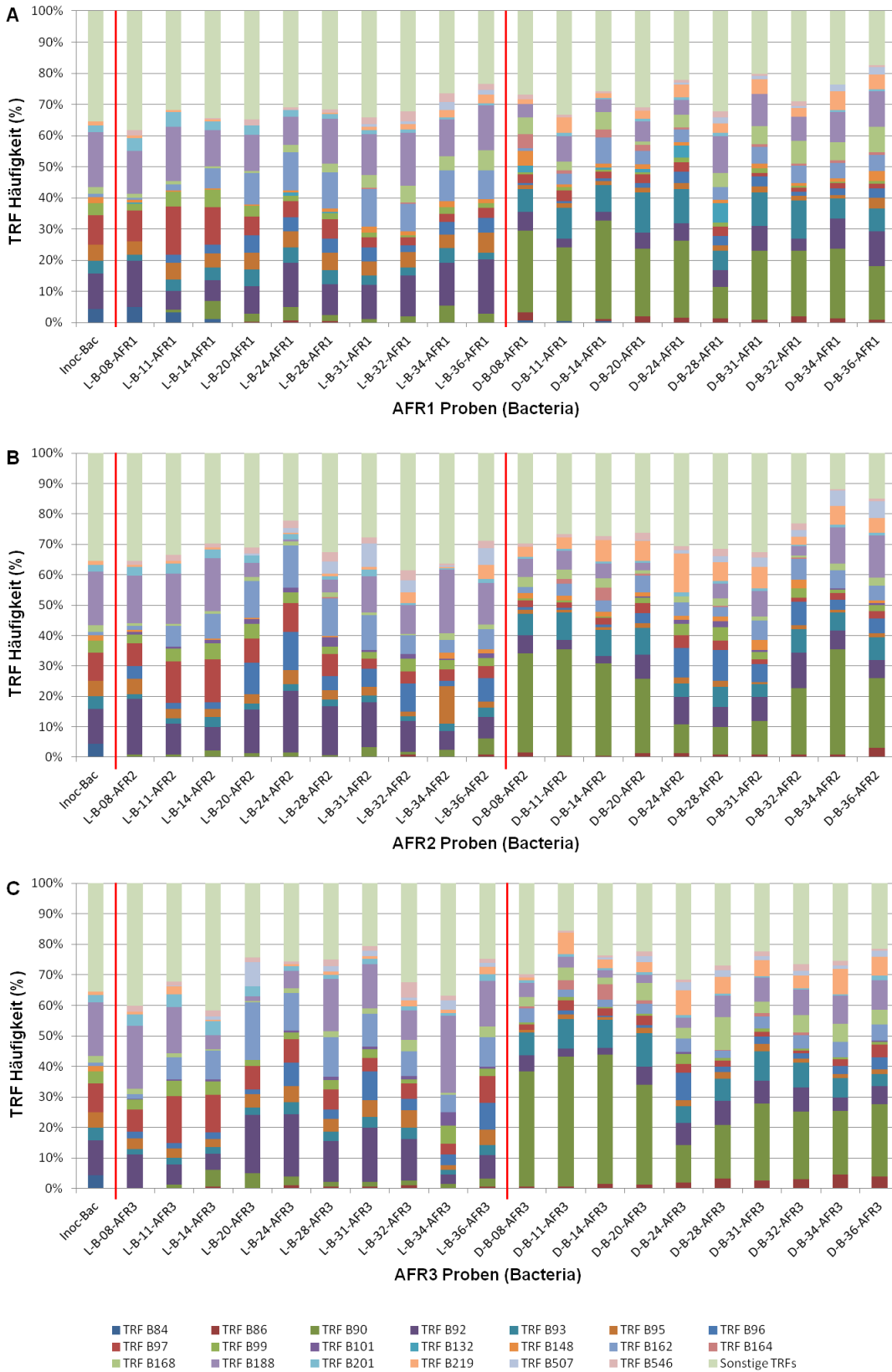


Abb.7: Vergleich der Bacteria-Diversität der Prozessflüssigkeit und den Gärresten in den Reaktorsystemen AFR-1 (A), AFR-2 (B) und AFR-3 (C) über einen Zeitraum von 36 Wochen. Die Diversität ist als prozentuale Häufigkeit der ermittelten T-RFs

angeben, die in unterschiedlicher Farbe dargestellt sind (siehe Farbcode unterhalb der Abbildung C). Die Proben sind wie folgt kodiert: Inoc-Bac = Inokulum Analyse für Bacteria, L = Leachate (Prozessflüssigkeit), D = Digestate (Gärrest), B = Bacteria, zweistellige Zahl = Woche des Reaktorbetriebs in der die Probe genommen wurde, AFR-1 bis AFR-3 = Aufstromreaktoren 1 bis 3.

Fazit der Versuchsreihe

Anhand der erfassten Daten dieser Versuchsreihe konnte nachgewiesen werden, dass die Beimengung von Spurenelementen eine Stabilisierung des Biogasprozesses bewirkt. Die Wirkung der Spurenelemente scheint auf die Stärkung und somit auf die Stabilisierung der methanogenen Biozönose zu beruhen. Dadurch kann der Abbau von Säuren, insbesondere von Acetat, zu Methan beschleunigt werden, was anhand der Methanausbeuten und den FOS/TAC-Werten der analysierten Reaktorsysteme ersichtlich ist. Der AFR-3 erzeugte in der stabilen Prozessphase (ab der 20. Woche) deutlich mehr Methan als der AFR-2. Ferner kann durch die Stärkung der methanogenen Mikroorganismen durch die Spurenelemente eine Versäuerung, wie sie im AFR2 zu beobachten war, unterbunden werden. Aufgrund der Trennung der Teilprozesse Hydrolyse (AFR-1) und Methanogenese (FBR-1) konnte im Reaktorsystem 1 ein ähnlicher Effekt erzielt werden. Dieses System zeigte zeitweise höhere Methanausbeuten als im AFR-3. Aber auch hier konnte eine Abnahme der Methanausbeute in den letzten Versuchswochen beobachtet werden.

Es bleiben weitere Fragen offen: Kann die Wirkung der Spurenelemente auch bei höheren Raumbelastungen bestehen? Wie würde sich eine Spurenelementzugabe auf ein kombiniertes Reaktorsystem wie AFR-1/FBR-1 auswirken? Auf welche Spezies wirken sich die Spurenelemente positiv aus und was bedeutet dies für syntrophe Beziehungen zu anderen Arten? Unklar ist weiterhin, ob alle zugeführten Spurenelemente für die Mikroorganismen frei verfügbar waren.

2.1.2.2 Mikrobielle Diversität bei der Vergärung lignocellulosereicher Biomasse

16S rRNA Genbibliothek

Die mikrobielle Diversität im System des Aufstromverfahrens wurde anhand eines kleintechnischen Versuchsstandes (s. Kap. 2.1.3.1) ermittelt, bestehend aus vier baugleichen Systemen aus jeweils einem AFR und einem Anaerobfilter AF (in Kap. 2.1.3 als Festbettreaktor FBR bezeichnet). Zur Beschreibung der unter steady-state Bedingungen an der Fermentation von Weizenstroh beteiligten Mikrobiologie wurden bei einer Raumbelastung von $2,5 \text{ g}_{\text{OTS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ für den 163. Versuchstag 16S rRNA Genbibliotheken erstellt. Es wurden dafür Genbanken der Bacteria und Archaea für

Gärreste, Prozessflüssigkeiten (Ablauf von AFR und AF) und AF-Aufwuchsträgerbiofilme erstellt, sowohl für ein meso- als auch ein thermophiles Reaktorsystem.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass sich trotz identischem Inokulum abhängig von der Prozesstemperatur zwei mikrobielle Gemeinschaften mit vollkommen anderer taxonomischer Zusammensetzung entwickelten. Bei beiden Temperaturen zeigten die Bacteria eine bedeutend höhere Anzahl verschiedener Phylotypen gegenüber den Archaea. Zudem konnte bei mesophiler Prozessführung eine deutlich höhere phylogenetische Diversität innerhalb der Bacteria als auch Archaea im Vergleich zu thermophilen Bedingungen nachgewiesen werden.

Die bakteriellen Gemeinschaften waren insbesondere durch das Phylum Firmicutes geprägt, welches eine Vielzahl cellulolytisch aktiver Vertreter beinhaltet (Abb. 8). Während die Firmicuten im thermophilen Reaktorsystem klar dominierten, deutet das verstärkte Auftreten der Bacteroidetes im mesophilen System auf eine prozessrelevante Funktion dieser Gruppe bei der mesophilen Vergärung hin.

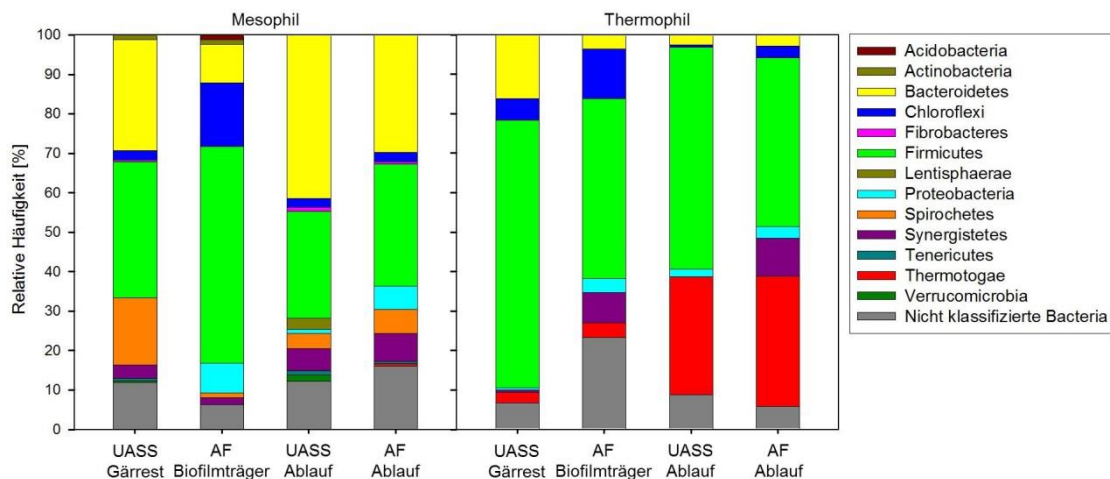


Abb. 8: Taxonomische Zusammensetzung der bakteriellen Biozönosen (UASS = AFR)

Direkte Zusammenhänge lassen sich zwischen der räumlichen Strukturierung der Archaea (Abb. 9) und den jeweiligen Anteilen von AFR und AF an der Biogasausbeute erkennen. Die deutliche Erhöhung der Biogasproduktion durch die Integration eines AF im mesophilen Temperaturbereich ist auf einen leistungsfähigen Biofilm im AF zurückzuführen, welcher sich überwiegend aus Mitgliedern der acetoclastischen Gattung *Methanosaeta* zusammensetzt. Dementgegen wurde trotz insgesamt höherer Biogasproduktionsleistung bei höherer Temperatur im thermophilen AF eine deutlich geringere Biogasmenge gebildet als im AF des mesophilen Systems. Bei thermophiler Prozessführung wurde folglich bereits im AFR der überwiegende Teil der entstehenden Metabolite weiter bis hin zum Methan umgesetzt. Entsprechend zeigte sich bereits im Festbett (Gärrest) des thermophilen AFR eine intensive Besiedelung

durch *Methanosarcina* sp., welche sowohl Acetat als auch CO_2/H_2 zur Methanbildung nutzen. Während bei einer Raumbelastung von $2,5 \text{ g}_{\text{OTS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ unter thermophilen Bedingungen noch alle Stoffwechselschritte größtenteils in einem Reaktionsraum ablaufen können, ermöglicht die zweistufige Betriebsweise im mesophilen Temperaturbereich durch eine effektive mikrobiologische Separierung von Hydrolyse (AFR) und Methanogenese (AF) bereits eine deutliche Steigerung der Biogasausbeute.

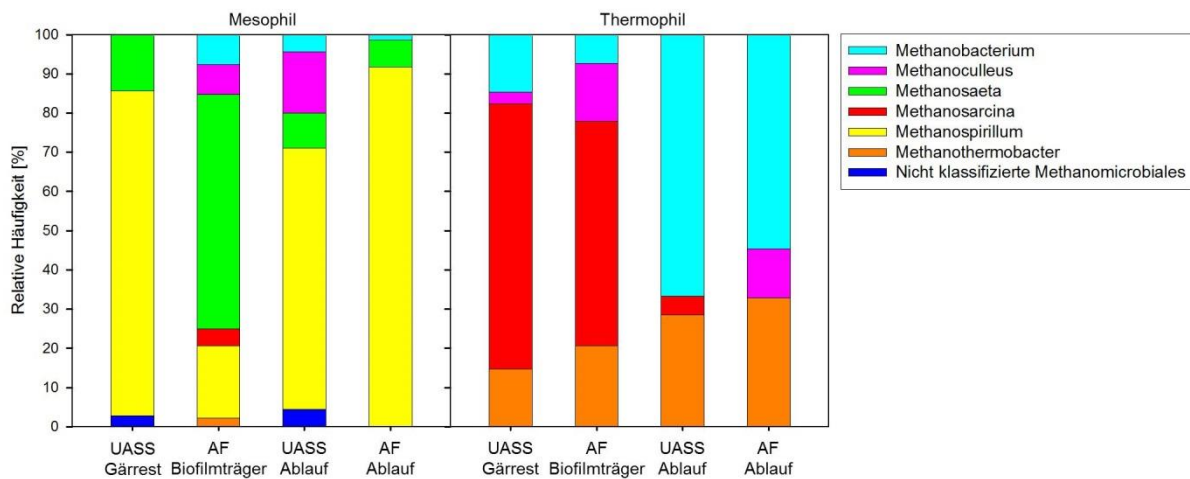


Abb. 9: Taxonomische Zusammensetzung der archaeellen Biozönosen (UASS = AFR)

Die Ergebnisse der 16S rRNA Genbibliotheken wurden in einer Publikation zusammengefasst (Heeg et al., 2014).

Dynamik der mikrobiellen Biozönose

Für die Aufklärung der Dynamik innerhalb der mikrobiellen Lebensgemeinschaften über die Zeit wurde die T-RFLP-Analyse sowohl für Bacteria als auch Archaea eingesetzt.

Während der Experimente zur Vergärung von reinem Weizenstroh sowie einer Weizenstroh-Rapsexpeller-Mischung (Versuche zur Stickstoffbelastung der Reaktorsysteme; s. Kap. 2.1.3.3) wurde jeweils ein Reaktor je Temperaturstufe regelmäßig für die T-RFLP-Analyse beprobt. Zur Minimierung von möglichen Fehlerquellen, welche während der Probenaufbereitung entstehen können, wurden die Profile aus triplikaten Ansätzen einer jeden Probe für die Auswertung herangezogen.

Eine erste Auswertung zur mikrobiellen Dynamik während der thermophilen Vergärung von Weizenstroh bei steigender Raumbelastung wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit erarbeitet. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die bakteriellen und archaeellen Lebensgemeinschaften bei einer Raumbelastung von 2,5 und

4,5 g_{oTS} L⁻¹d⁻¹ in allen untersuchten Reaktorproben relativ stabil verhielten. Dementsprechend wurden in diesem Zeitraum auch keine größeren Veränderungen bezüglich der Prozessparameter, wie Säurefracht oder pH-Wert, verzeichnet. Erst nach einer Raumbelastungserhöhung auf 8 g_{oTS} L⁻¹d⁻¹ ergaben sich deutliche Änderungen der Prozessparameter, wie z. B. ein sprunghafter Anstieg der Fettsäurekonzentration. Infolge dieser prägnanten Veränderungen kam es ebenfalls zu einer deutlichen Änderung der mikrobiellen Gemeinschaftsstrukturen. Exemplarisch sei dies anhand der bakteriellen Biozönose des Substratpfropfens gezeigt (Abb. 10).

Neben den Analysen zur zeitlichen Dynamik konnten am letzten Versuchstag auch räumliche Varianzen der Mikroflora untersucht werden. Dazu wurden Gärrestproben aus unterschiedlichen Schichttiefen sowie Aufwuchsträger aus zwei Höhen des Schüttungsbettes entnommen und analysiert.

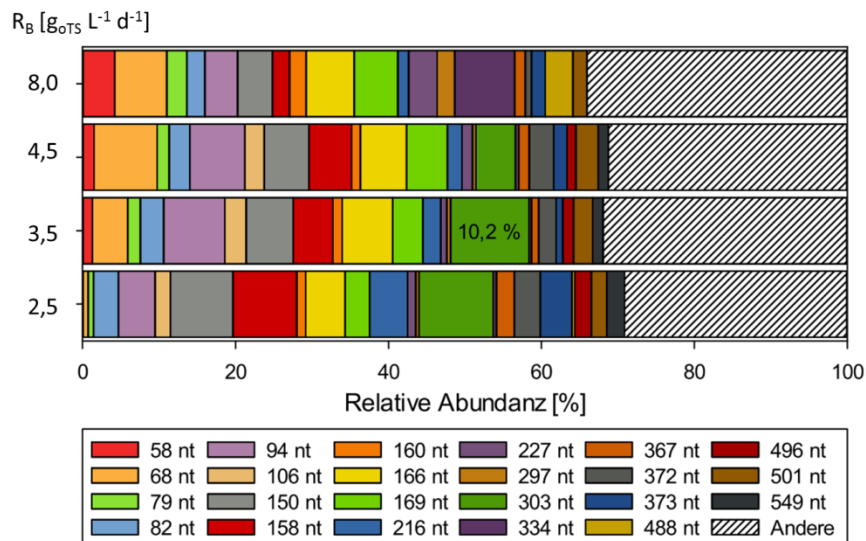


Abb. 10: Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora des Substratpfropfens über die Zeit bei steigender Raumbelastung. Dargestellt sind T-RFs, die zu mindestens einem Zeitpunkt einen relativen Anteil von 2,15 % an der Gesamtgemeinschaft bildeten.

Wie in Abbildungen 11 gezeigt ist, ergaben sich im Volumen des Substratpfropfens keine signifikanten Unterschiede in der strukturellen Zusammensetzung der Bacteria.

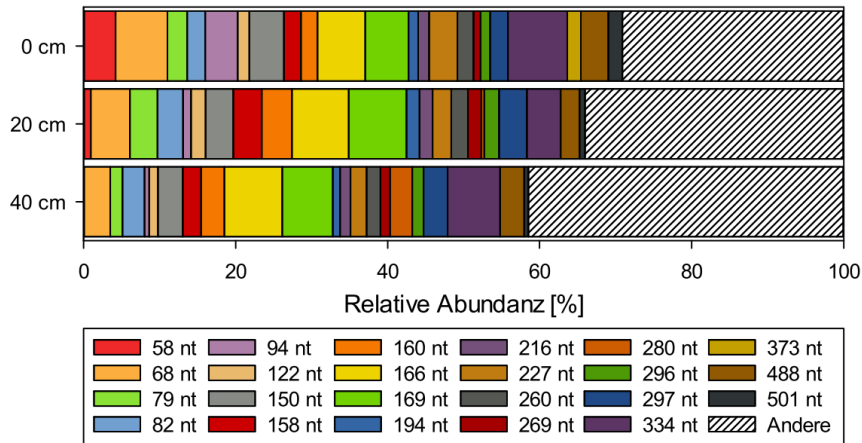


Abb. 11: Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora im Substratpfropfen des AFR in unterschiedlichen Schichttiefen. Dargestellt sind Fragmente, die in mindestens einem Profil einen relativen Anteil von mehr als 1,60 % an der Gesamtgemeinschaft darstellten.

Eine taxonomische Zuordnung der terminalen Fragmente ergab eine deutliche Dominanz von Vertretern aus dem Phylum Firmicutes. Stellvertretend sei dies anhand der in Abbildung 12 dargestellten bakteriellen Struktur des Substratpfropfens nach taxonomischer Einordnung der einzelnen terminalen Fragmente veranschaulicht. Auffällig ist, dass die durch die Raumbelastungssteigerung auf $8 \text{ g}_{\text{OTS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nach Tag 140 verursachte Verschiebung innerhalb der Biozönose (Abb. 10) auf Phylum-Ebene nicht nachvollziehbar ist (Abb. 12). Somit scheinen durch die veränderten Prozessbedingungen einige Gruppen der Firmicutes von anderen Vertretern aus diesem Phylum zurückgedrängt zu werden.

Weiterhin wurden bei der Auftrennung reiner 16S rRNA Gensequenzen das Entstehen sogenannter Pseudofragmente beobachtet. Darunter versteht man Fragmente, die nicht mit dem terminalen Restriktionsfragment aus dem *in silico* Verdau einer 16S rRNA Gensequenz übereinstimmen. Inwiefern sich dies auf die T-RFLP-Ergebnisse der Reaktorproben auswirkt, ist noch eingehender zu prüfen.

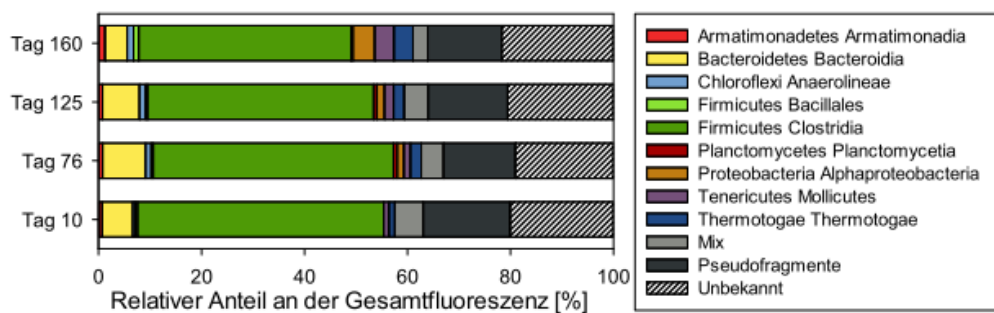


Abb. 12: Zusammensetzung der bakteriellen Biozönose im AFR-Substratpfropfen nach Identifizierung der T-RFs in den T-RFLP-Profilen

Metagenomanalyse - Vorgehen

Basierend auf den Messdaten der Verfahrenstechnik (s. Kap. 2.1.3.2) zeigte sich, dass eine thermophile Prozessführung für die Weizenstrohvergärung gegenüber der mesophilen Temperatur von klarem Vorteil ist. Weiterhin wurde beobachtet, dass bei dem thermophilen Weizenstrohabbau die Steigerung der Raumbelastung von 6 auf 8 $\text{g}_{\text{OTS}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ mit einem deutlichen Anstieg der Fettsäurekonzentration im UASS sowie einer deutlichen Verlagerung des Methanbildungsortes vom UASS in den AF einher geht. Mit diesen Beobachtungen konform gehend führte die beschriebene Steigerung der Fütterungsrate auch in der mikrobiellen Biozönose zu Veränderungen. Die T-RFLP-Profile zum Monitoring der Dynamik der hydrolytischen Mikroflora auf dem Gärrest zeigten, dass mit einer Steigerung der Raumbelastung von 6 auf 8 $\text{g}_{\text{OTS}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ eine moderate Änderung innerhalb Gemeinschaftsstruktur stattfand.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde eine Gärrestprobe bei einer Raumbelastung von 8 $\text{g}_{\text{OTS}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$ für die Metagenomanalyse ausgewählt, um die Phylogenie sowie das metabolische Potenzial dieser hydrolytischen Gemeinschaft näher charakterisieren zu können.

Im ersten Schritt wurde genomische DNA nach einem am ATB für Gärrestproben bereits etablierten Protokoll extrahiert. Diese DNA wurde dem Center für Biotechnologie (CeBiTec) an der Universität Bielefeld übergeben und dort mittels Paired End Sequenzierung auf der MiSeq-Plattform von Illumina sequenziert. Insgesamt wurden für dieselbe Probe drei Datensätze erzeugt, welche in Summe 17084953 Sequenz-Reads mit Längen von jeweils 200 bis ca. 350 Basen umfassen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Metagenomics-Analyseplattform MGX, welche dem Nutzer vom CeBiTec über ein Web-Interface bereitgestellt wird.

Phylogenetische Auswertung der Metagenomdaten

Die phylogenetische Zuordnung der 16S rRNA Gene kodierenden Metagenomsequenzen ergab eine den 16S rRNA Genbibliotheken sehr ähnliche Struktur. Bei den Bakterien wurden 79 verschiedene Familien identifiziert. Vertreter der *Ruminococcaceae*, eine Familie der in Biogasreaktoren stark verbreiteten Ordnung *Clostridiales*, zeigten sich auch im Weizenstrohabbau als besonders relevant. Etwa 70 % der 16S rRNA kodierenden Metagenomsequenzen wurden dieser Familie zugewiesen. Die in Abbildung 13 gezeigte Auswertung der Daten auf Artenebene zeigte, dass sich vor allem die Art *Clostridium clariflavum*, aber auch die Arten *Clostridium thermocellum* sowie *Petrotoga mobilis* (aus dem Phylum Thermotoga) im UASS-Reaktor etablieren konnten. Diesen drei Arten kann somit eine tragende Rolle beim anaeroben Weizenstrohabbau zugesprochen werden. Um weitere Informationen über das metabolische Potenzial und die genauen Varianten/Stämme dieser drei Arten im System zu erlangen, soll in weiteren Arbeitsschritten versucht werden,

die Genome dieser Arten komplett zu rekonstruieren. Aufgrund der vergleichsweise hohen Datendichte dieser Metagenomstudie stellt sich dieses Ziel als sehr erfolgsversprechend dar.

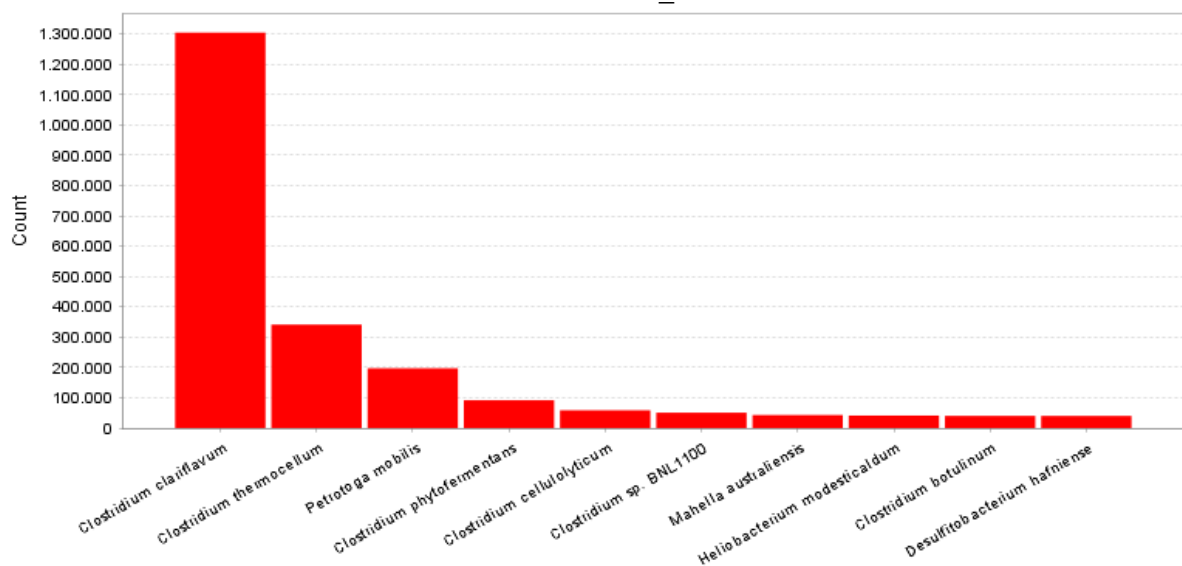


Abb. 13: Die zehn Arten der Bacteria mit den meisten Zuordnungen an Metagenomsequenzen.

Hinsichtlich der in Abb. 14 dargestellten Artenzusammensetzung der archaeellen Gemeinschaft zeigt sich eine deutliche Dominanz der Arten *Methanosarcina barkerii* sowie *Methanothermobacter marburgensis*. Dieses Ergebnis ähnelt der anhand von 16S rRNA Genbibliotheken ermittelten Struktur der archaeellen Gemeinschaft.

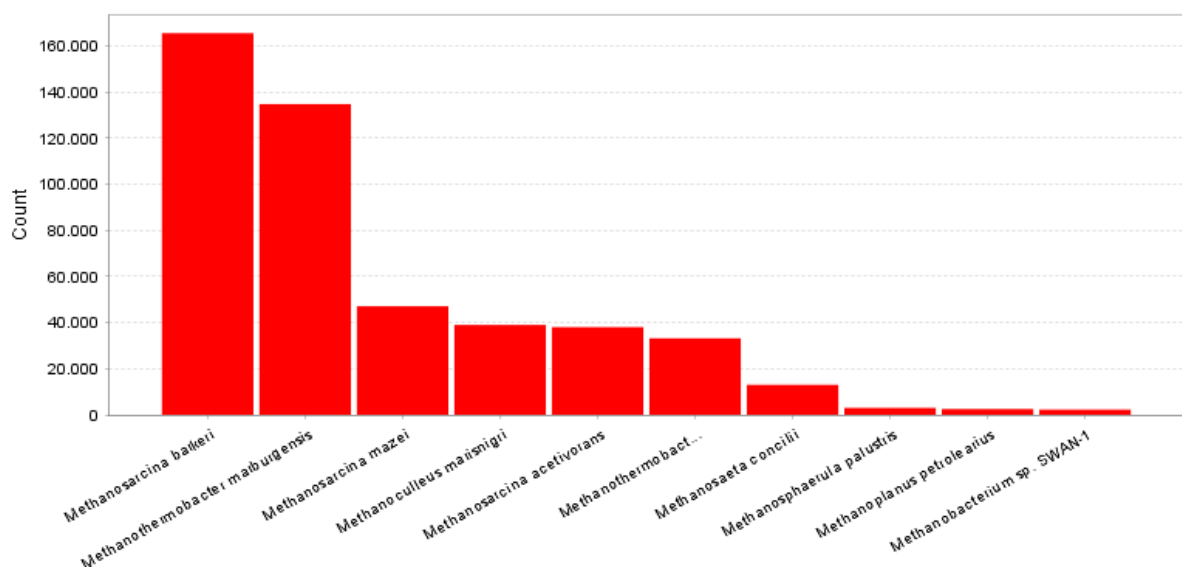


Abb. 14: Die zehn Arten der Archaea mit den meisten Zuordnungen an Metagenomsequenzen.

Analyse des metabolischen Potentials

Um einen Einblick in die biologischen Prozesse innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft zu erlangen, erfolgte eine Annotation der Metagenomsequenzen zu so genannten „Clusters of Orthologous Groups of proteins categories (COGs)“. Dies hat zum Ziel, den kodierenden Sequenzen eine vorhergesagte Funktion zuzuordnen. Die COG-Kategorisierung der Metagenomsequenzen der untersuchten Biogasprobe ist in Abbildung 15 dargestellt.

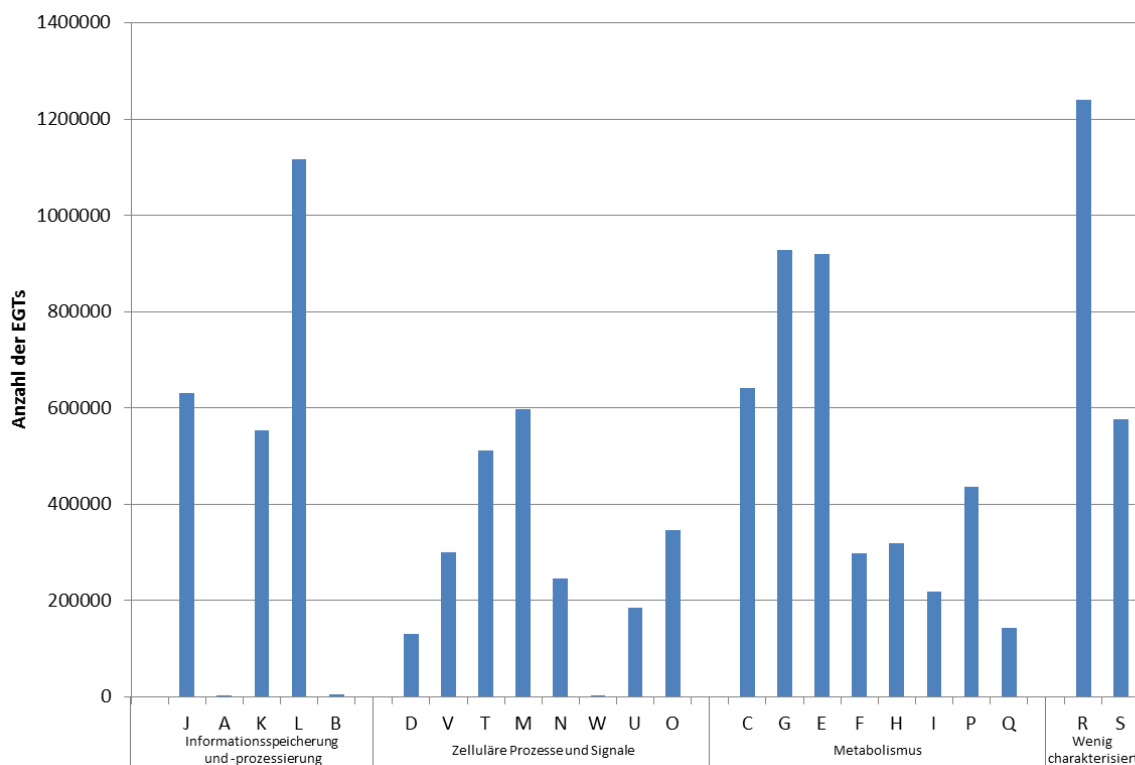


Abb.15: Kategorisierung der Metagenomsequenzen (Environmental Gene Tags, EGTs) gemäß der „Clusters of Orthologous Groups of proteins“ (COGs).

Unter den COG-Kategorien sind besonders die Gruppen „Energieproduktion und -konversion“ (C) sowie „Carbohydrat-Transport und -Metabolismus“ (G) von Interesse, da sich hier die wichtigen Funktionen der Konversion von Biomasse zu Methan wiederfinden. Einige häufig identifizierte und für den Biogasbildungsprozess wichtige COG-Gruppen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Auswahl an COG-Gruppen, welche häufig in den Metagenomen der untersuchten Biogasreaktorprobe identifiziert wurden.

COG category	COG accession	COG hits	
Energy production and conversion (C)			
Acetate production			
	COG0543	2-polyprenylphenol hydroxylase and related flavodoxin oxidoreductases	7 127
	COG1882	Pyruvate-formate lyase	7 799
	COG0282	Acetate kinase	5 742
	COG0280	Phosphotransacetylase	4 485
Carbohydrate transport and metabolism (G)			
Degradation of xylan			
	COG4213	ABC-type xylose transport system, periplasmic component	6 301
	COG3693	Beta-1,4-xylanase	15 831
	COG3664	Beta-xylosidase	2 444
	COG2115	Xylose isomerase	3 790
Degradation of polysaccharides and oligosaccharides			
	COG1363	Cellulase M and related proteins	9 794
	COG2730	Endoglucanase	22 828
	COG3405	Endoglucanase Y	2 533
	COG366	Glycosidases	17 884
Processing of disaccharides and monosaccharides			
	COG3345	Alpha-galactosidase	4 112
	COG1874	Beta-galactosidase	2 742
	COG1472	Beta-glucosidase-related glycosidases	23 980
	COG3459	Cellobiose phosphorylase	31 927
	COG0153	Galactokinase	3 630
	COG1904	Glucuronate isomerase	4 703
	COG2160	L-arabinose isomerase	4 121
General function prediction only (R)			
	COG3858	Predicted glycosyl hydrolase	15 806

Die häufig nachgewiesenen COGs der funktionellen Kategorie „Energieproduktion und -konversion“ (C) beziehen sich größtenteils auf Gene, welche in den Fermentationsprozess involviert sind. So konnten beispielsweise zahlreiche Sequenz-Reads den Enzymen Acetat-Kinase (COG0282) und Phosphotransacetylase (COG0280) zugeordnet werden. Die hohe Ausbildung dieser beiden Enzyme, welche den finalen

Schritt in der Acetatproduktion katalysieren, steht im Einklang mit der Tatsache, dass Acetat als Substrat für die Methanogenese dient.

Die COG-Kategorie „Carbohydrat-Transport und –Metabolismus“ (G) umfasst viele Enzyme, welche für die Aufspaltung von pflanzlichen Material – dem ersten Schritt des Biogasbildungsprozesses – wichtig sind. So wurden etwa Enzyme für den Abbau von Xylan, einem Heteropolysaccharid der pflanzlichen Zellwand, sehr häufig im Metagenom der analysierten Biogasprobe kodiert. Weiterhin wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren Funktion der Aufspaltung von Poly- und Oligosacchariden dient. Hierzu gehören hauptsächlich Mitglieder aus der Glycosyl-Hydrolase-Familie. In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist auch die COG-Gruppe „Predicted glycosyl hydrolase,, (COG3858), der zahlreiche Sequenzen zugeordnet wurden.

Weiterhin wurden mit dem Carbohydrat-Metabolismus in Verbindung stehende Enzyme identifiziert, welche für die Verarbeitung von Mono- und Disacchariden verantwortlich sind. Genannt werden können hier unter anderem die L-Arabinose-Isomerase, Galactokinase und Glucuronate-Isomerase. Zahlreiche Sequenz-Reads wurden der Cellobiose phosphorylase (COG3459) zugeordnet, einem unter anaeroben Bakterien weit verbreiteten, intrazellulären Enzym, das Cellobiose zu Glucose und Glucose-1-Phosphat spaltet.

2.1.2.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Mikroorganismenstruktur im Aufstromverfahren

Neben der Identifizierung der Mikroorganismen trägt deren quantitative Verteilung zu einem besseren Verständnis des Gesamtprozesses bei. Hierzu sollte im Rahmen des Projekts eine Methode entwickelt werden, die eine Quantifizierung prozessrelevanter, metabolisch aktiver Mikroorganismen mittels Durchflusszytometrie erlaubt.

Die Kombination von Fluoreszenz *in Situ* Hybridisierung (FISH) und Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen. Diese Technik wird als Flow-FISH bezeichnet und wurde bislang hauptsächlich für Reinkulturen eingesetzt. Dies liegt daran, dass sich in Umweltproben neben den Mikroorganismen auch andere biotische und abiotische Partikel befinden, die die Kapillare eines Durchflusszytometers blockieren können bzw. eine natürliche Fluoreszenz aufweisen, die die Ergebnisse einer Flow-FISH verfälschen würden. Darüber hinaus neigen viele Mikroorganismen in Umweltproben dazu, sich an diese Partikel anzuhafte, wodurch eine Zellquantifizierung mittels Durchflusszytometrie, aber auch mittels Fluoreszenzmikroskopie, erschwert oder verhindert wird. Daher war der erste Schritt zur Methodenetablierung die Entwicklung einer geeigneten Reinigungsprozedur für die AFR-Reaktorproben

A. Entwicklung einer Aufreinigungsmethode für AFR-Reaktorproben

Die Aufreinigungsmethode sollte die folgenden Eigenschaften besitzen:

- 1) Sie sollte die Ablösung adhäsiver Zellen von biotischen und abiotischen Partikeln ermöglichen.
- 2) Zellaggregate sollten aufgelöst werden.
- 3) Der Verlust von Zellen sollte möglichst gering sein.
- 4) Der Zeitaufwand für die Durchführung der Aufreinigung sollte gering sein.

Hierzu wurden insgesamt acht Aufreinigungsmethoden mit insgesamt 29 Modifikationen auf die oben beschriebenen Eigenschaften getestet (Tab. 4).

Tab. 4: Getestete Aufreinigungsmethoden mit ihren Referenzen und den durchgeführten Modifikationen

No.	Method (references)	Detergence	Concentration	Sonification	Homogenization	Filtration
A	S. B. Singh-Verma (1968), L.R. Bakken (1985)	Sodium hexametaphosphate	C1) 0,2%	S1) 40W, 1', 5 impulse/sec (different repeats)	H1) no	F1) no
			C2) 0,5%	S2) 65W, 1', 5 impulse/sec (different repeats)	H2) 1 min, speed 5 (different repeats)	F2) 12-15 µm filter
B	S. B. Singh-Verma (1968), L.R. Bakken (1985)	Bormhexine hydrochloride	C1) 0,2%	S1) 40W, 1' + 65 W, 1', 5 impulse/sec	H1) no	-
					H2) 2x 1', speed 5	
C	W. B. Yoon and R. A. Rosson (1990)	Tween 80	C1) 5 µg/ml	S1) 15W, 30", 5 impulse/sec	H1) no	-
			C2) 10 µg/ml	S2) 35W, 30", 5 impulse/sec	H2) 5', speed 5	
			C3) 25 µg/ml			
D	E. L. Schmidt (1974)	Tween 80 + 0.007g/ml ⁻¹ flocculation reagent (Ca(OH) ₂ :MgCO ₃ (2:5))	C1) 25 µl/ml	-	-	-
E	O. Resina-Pelfort et al. (2003)	Triton X-100	C1) 10 µg/ml	S1) 35W, 30", 5 impulse/sec	H1) no	-
			C2) 20 µg/ml	S2) 45W, 30", 5 impulse/sec	H2) 5', speed 5	
F	L. R. Bakken (1985)	Sodium pyrophosphat	C1) 0,2%	S1) 3x 40W, 1', 5 impulse/sec	H1) 3x 1', speed 5	-

Zur Kontrolle wurden Reinkulturen von *Escherichia coli* (*E. coli*) eingesetzt. Anhand dieser Kontrollen konnte ein möglicher Zellverlust während der Reinigungsprozeduren ermittelt werden. Mit Ausnahme von zwei Methoden war der Zellverlust durch die Aufreinigung bei allen anderen Methoden vernachlässigbar gering (Abb. 16). Die geringsten Zellverluste zeigten die Methoden mit den Detergenzien Natriumhexametaphosphat (Methode A) und Natriumpyrophosphat (Methode F).

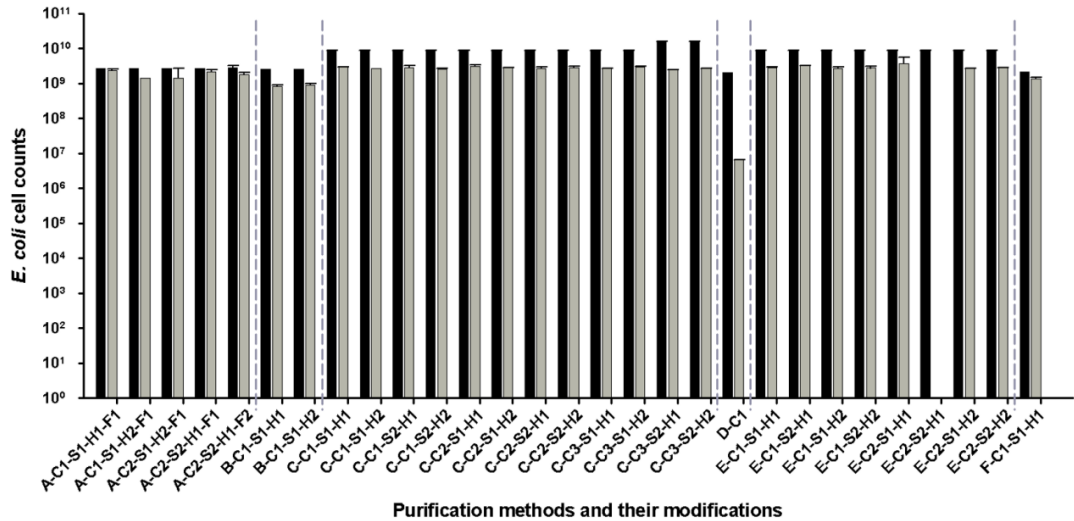


Abb. 16: Zellzahlermittlung von *E. coli* Kontrollkulturen vor (schwarze Balken) und nach (graue Balken) der Aufreinigung (Abkürzungen siehe Tabelle 1). Die Zellzählung erfolgte mittels Coulter Counter (Multisizer™ 3 Coulter Counter®, Beckman Coulter, Deutschland). Die Standardabweichungen beziehen sich auf drei unterschiedliche Messungen von Triplikaten.

Des Weiteren wurden die Proben vor und nach den Aufreinigungen mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Eignung untersucht, Zellaggregate aufzulösen und Zellen von biotischen und abiotischen Partikeln zu lösen (Tab. 5).

Die Größe der Zellaggregate wurde anhand von mikroskopischen Feldern bei einer 630-fachen Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Deutschland) ermittelt: 10 x 10 Felder = 144 µm², ein Feld = 5,76 µm², 2 x 2 Felder = 23,04 µm² und 4 x 4 Feldern = 51,84 µm².

Dabei zeigte sich, dass die meisten getesteten Methoden und ihre Modifikationen keinen adäquaten positiven Effekt auf die Auflösung von Zellaggregaten und die Ablösung der Zellen von Partikeln besaßen. Die Methode A war die einzige, bei der Zellen erfolgreich von Partikeln gelöst werden konnten. Darüber hinaus zeigten die Modifikationen A-C2-S2-H1-F1 und A-C2-S2-H1-F2 der Methode A (Tab. 5) die höchste Rate für die Auflösung von Zellaggregaten, da nur hier eine sehr geringe Anzahl von sehr kleinen Zellaggregaten nach der Reinigung der AFR-Proben nachweisbar war.

Beide Prozeduren umfassten die Behandlung der Proben mit 0,5 % des Detergenz Natriumhexatmetaphosphat und einer zweimaligen Ultraschallbehandlung bei 65 W. Bei der Prozedur A-C2-S2-H1-F2 wurden mit einer finalen Filtration kleinere, nicht bewachsene Partikel aus der Probe entfernt, die sich störend auf eine durchflusszytometrische Messung ausgewirkt hätten. Auch hier wurde ein möglicher Zellverlust, verursacht durch die Filtration, mit Hilfe von *E. coli* Kontrollen überprüft. Es konnte

festgestellt werden, dass durch die abschließende Filtration ein vernachlässigbarer Zellverlust auftrat (Abb. 17).

Tab. 5: Analyse und Auswertung der Aufreinigungsmethoden und ihrer Modifikationen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Method	Cell aggregates present ?	Maximum cell aggregate size	Non-microbial particles present ?	Non-microbial particles covered with cells?
A-C1-S1-H1-F1	yes	+++	yes	no
A-C1-S1-H2-F1	yes	++	yes	no
A-C2-S1-H1-F1	yes	++	yes	no
A-C2-S1-H2-F1	yes	+	yes	no
A-C2-S2-H1-F1	no	-	yes	no
A-C2-S2-H1-F2	no	-	no	no
B-C1-S1-H1	yes	+++	yes	yes
B-C1-S1-H2	yes	+++	yes	yes
C-C1-S1-H1	yes	+++	yes	yes
C-C1-S1-H2	yes	++	yes	yes
C-C1-S2-H1	yes	++	yes	yes
C-C1-S2-H2	yes	+	yes	yes
C-C2-S1-H1	yes	+++	yes	yes
C-C2-S1-H2	yes	++	yes	yes
C-C2-S2-H1	yes	++	yes	yes
C-C2-S2-H2	yes	++	yes	yes
C-C3-S1-H1	yes	++	yes	yes
C-C3-S1-H2	yes	++	yes	yes
C-C3-S2-H1	yes	++	yes	yes
C-C3-S2-H2	yes	+	yes	yes
D-C1-H1	yes	+++	yes	yes
E-C1-S1-H1	yes	+++	yes	yes
E-C1-S2-H1	yes	+++	yes	yes
E-C1-S1-H2	yes	++	yes	yes
E-C1-S2-H2	yes	++	yes	yes
E-C2-S1-H1	yes	+++	yes	yes
E-C2-S2-H1	yes	+++	yes	yes
E-C2-S1-H2	yes	++	yes	yes
E-C2-S2-H2	yes	+	yes	yes
F-C1-S1-H1	yes	++	yes	yes

+ = $\geq 6 \mu\text{m}^2$; ++ = $\geq 24 \mu\text{m}^2$; +++ = $\geq 52 \mu\text{m}^2$

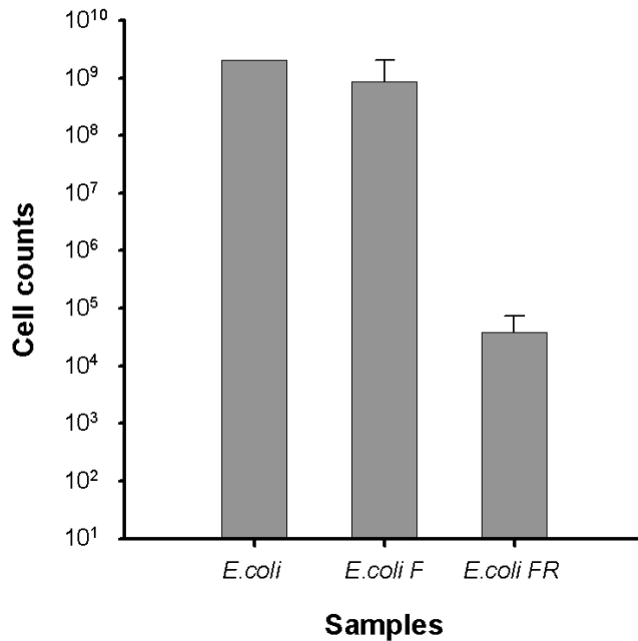


Abb. 17: Vergleich der Zellzahlen von *E. coli* Kontrollen, die nach der Methode A-C2-S2-H1-F2 behandelt wurden, vor und nach der Filtration: Frische *E. coli* Zellen (links), Filtrat (F, mittlerer Balken) und Filtrerrückstand (FR, rechts). Die Standardabweichungen beziehen sich auf drei unterschiedliche Messungen von Triplikaten, mit Ausnahme der frischen *E. coli* Probe, bei der nur eine Messung von Triplikaten durchgeführt wurde. Die Messungen erfolgten mit einem Coulter Counter (Multisizer™ 3 Coulter Counter®, Beckman Coulter, Deutschland).

Auf Grundlage der geforderten Eigenschaften einer Aufreinigungsmethode für die AFR-Reaktorproben wurde die Methode A-C2-S2-H1-F2 für die weiteren Analysen als Standardmethode ausgewählt. Die Abbildung 18 zeigt zwei unterschiedlichen AFR-Proben vor und nach der Aufreinigung mittels Methode A-C2-S2-H1-F2.

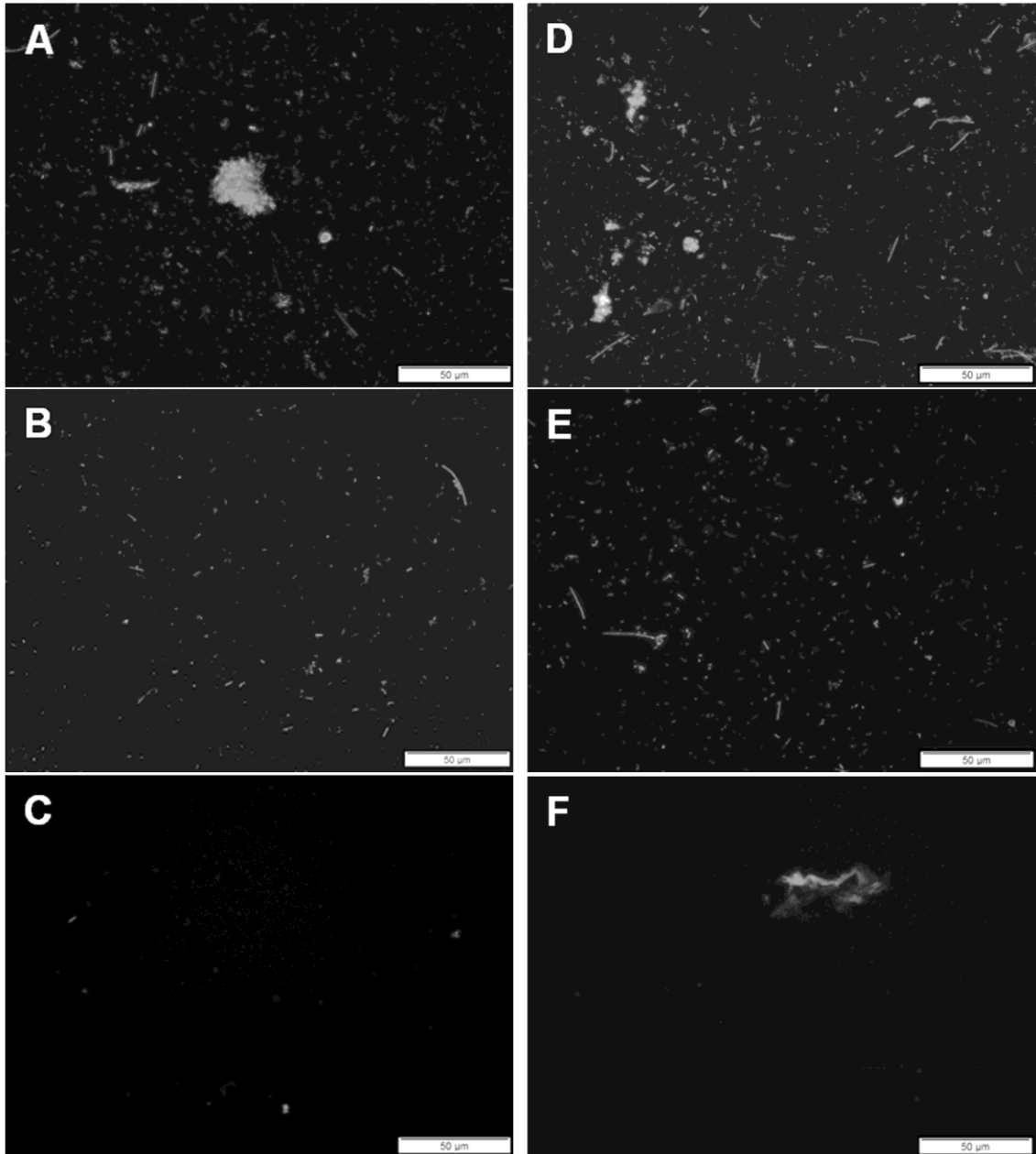


Abb. 18 Mikroskopische Verifizierung der Auffreinigungsprozedur A-C2-S2-H1-F2. Die Fotos zeigen AFR-Reaktorproben (A-C: AFR-1 und D-F: AFR-2) vor (A,D) und nach der Auffreinigung (B,E), sowie die Filterrückstände (C, F). Die Proben wurden 500-fach verdünnt und die Zellen mit DAPI angefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Olympus BX51 Fluoreszenzmikroskopsystem unter Verwendung des Filtermoduls U-MWU2 bei einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Im Folgenden wird die Kurzvorschrift der Methode A-C2-S2-H1-F2 aufgeführt:

- 10 ml fixierte AFR-Probe zentrifugieren (8.000 × g, 20 min), Pellet mit 1 x PBS waschen und wieder zentrifugieren (8.000 × g, 20 min)
- Pellet in 10 ml sterilem 0,5 % *Natriumhexametaphosphat* (pH 8,5) resuspendieren und 10 min inkubieren
- Probe 1 min bei 65 W (5 Intervalle/s) auf Eis sonifizieren
- Zentrifugation bei 650 × g für 2 min
- Überstand in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß sammeln
- Pellet in 10 ml sterilem 0,5 % *Natriumhexametaphosphat* resuspendieren und 10 min inkubieren
- Wiederholung von Sonifizierung des resuspendierten Pellets
- Zentrifugation bei 650 × g für 2 min
- Überstand in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß sammeln
- Pellet in 10 ml sterilem 0,5 % *Natriumhexametaphosphat* resuspendieren und 10 min inkubieren
- Wiederholung von Sonifizierung der Pelletprobe (insgesamt 5 x – hängt vom Verschmutzungsgrad der Probe ab und kann ggf. variieren)
- Nach 5-maligen Sonifizieren das Pellet in 10 ml 0,5 % Natriumhexametaphosphat (pH 8,5) resuspendieren und 10 min inkubieren
- Zentrifugation bei 650 × g für 2 min (*Optional: Pellet mikroskopieren; Zellen zählen und Probe charakterisieren*)
- Gesammelte Überstände in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß vereinigen und bei 8.000 × g für 20 min zentrifugieren
- Pellet in 10 ml 1 x PBS aufnehmen und bei 8.000 × g, 20 min zentrifugieren
- Pellet in 10 ml 1 x PBS aufnehmen (= Gereinigte Probe zur weiteren Verwendung)
- *Optional: Pellet nach 14.000 x g Zentrifugation mikroskopieren (Zellen zählen und Probe charakterisieren)*
- Filtration: 8 - 12 µm Filter, Probe langsam und in die Mitte des Filters bei eingeschalteter Vakuumpumpe überführen und mit mindestens 50 ml 1 x PBS pH 7,4 nachspülen
- Filtrat bei 8.000 × g 20 min zentrifugieren, Pellet in 10 ml 1 x PBS pH 7,4 aufnehmen (*optional: mikroskopisch auswerten bzw. Reinkultur-Kontrollen per Multisizer auswerten*)
- *Optional: Benutzte Filter in 50 ml Reaktionsgefäß überführen, 9 ml 1 x PBS pH 7,4 zugeben und bei Raumtemperatur im „Karussell“ im Hybridisierungs-ofen 20 min. waschen lassen. Danach Filter vorsichtig mit 1 ml 1 x PBS pH 7,4 abspülen und nun die 10 ml Filterprobe mikroskopisch auswerten/überprüfen.*

B. Flow-FISH

Das optische Prinzip der Durchflusszytometrie ähnelt stark dem der Fluoreszenzmikroskopie. Jedoch können mit dem Durchflusszytometer bis zu 1000 Zellen/Sekunde typisiert und quantifiziert werden. Somit stellt die Durchflusszytometrie eine leistungsstarke Hochdurchsatztechnik dar.

In Kombination mit der FISH-Technik kann neben einer Quantifizierung auch eine Identifizierung der Zellen erfolgen. Zunächst wurden zur Markierung der 16S rRNA mittels fluoreszenzmarkierter Oligonukleotidsonden (EUB338, Arch915 und NonEUB338, markiert mit Alexa488) bislang veröffentlichte Protokolle getestet. Jedoch zeigte sich, dass während der Zelldehydrierungsschritte und den damit verbundenen Zentrifugationen ein hoher Anteil von Zellen verloren ging (Abb. 19).

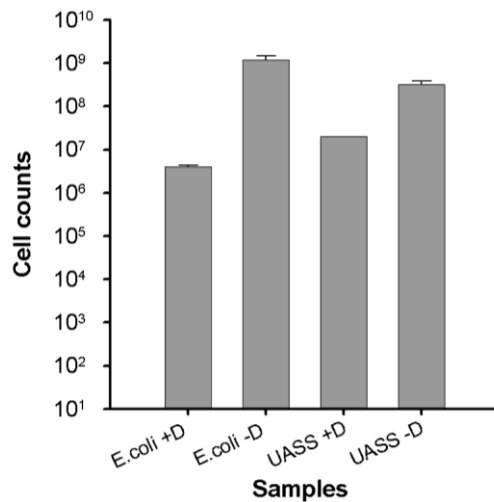


Abb. 19 Vergleich der Zellzahlen von aufgereinigten und mit der EUB338-Sonde hybridisierten *E. coli* Reinkulturen und AFR-Reaktorproben mit (+D) und ohne (-D) Dehydrierungsschritte während der FISH-Prozedur. Die Standardabweichungen wurden auf Grundlage von drei unterschiedlichen Messungen von Triplikaten ermittelt, mit Ausnahme der AFR +D Probe, bei der nur einmalig Triplikate gemessen wurden. Die Messungen wurden mittels Coulter Counter (Multisizer™ 3 Coulter Counter®, Beckman Coulter, Germany) durchgeführt.

Zur Vermeidung hoher Zellverluste wurde folgendes FISH-Protokoll entwickelt und erfolgreich getestet: 250 µl einer fixierten und aufgereinigten Probe wurden bei 8.000 × g für 20 min zentrifugiert. Anstelle einer Dehydrierung mittels 50 %, 80 % und 96 % Ethanol für jeweils 3 min wurde das Pellet direkt in 221 µl eines auf 46 °C vorgewärmten Hybridisierungspuffers (0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 7,2), 0,1 % SDS und 50 % Formamid) aufgenommen und 21 µl einer FISH-Sonde (50 ng/µl) dazugegeben (EUB338-, ARCH915- oder NonEUB338-Sonden). Die Hybridisierung erfolgte bei 46 °C für 2 Stunden in einem Wasserbad. Die Proben wurden während der

Inkubation ein- bis zweimal invertiert. Es folgte eine Zentrifugation bei $8.000 \times g$ für 20 min. Das Pellet wurde in $500 \mu\text{l}$ $0,05 \text{ M}$ PBS (pH 7,0) gewaschen und anschließend bei $8.000 \times g$ für 20 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet wiederum in $0,05 \text{ M}$ PBS (pH 7,0) aufgenommen. Dabei sollte das Volumen so gewählt werden, dass ca. 106 ml der Lösung vorliegen.

Der Effekt der Dehydrierung oder Nicht-Dehydrierung auf die Hybridisierungsrate der FISH-Sonde EUB338 wurde mit zwei verschiedenen Reinkulturen untersucht: *E. coli* und *Pseudomonas fluorescens* (Abb. 20). Während für *P. fluorescens* kein Einfluss der Dehydrierung auf die FISH-Hybridisierungsrate festgestellt werden konnte, zeigten die *E. coli* Proben mit Dehydrierungsschritten eine leicht höhere Hybridisierungsrate als ohne Dehydrierung (Abb. 20).

Um das entwickelte FISH-Protokoll auf mögliche Fehlhybridisierungen spezifischer FISH-Sonden mit Nicht-Zielorganismen zu überprüfen, wurde bei der Mischkultur *Methanosarcina barkeri* plus *Propionibacterium acne* und bei einer AFR-Probe die FISH-Sonde NonEUB338 eingesetzt. Diese Nonsens-Sonde ist komplementär zur EUB338-Sonde und hat somit keine 16S rRNA Bindestelle. Während die Flow-FISH Arch915 bei der Mischkultur *Methanosarcina barkeri* plus *Propionibacterium acne* eine Hybridisierungsrate von ca. 80 % ergab, konnte bei der Hybridisierung mit der NonEUB338 Sonde keine Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden (Abb. 20). Auch konnte bei der AFR1 Probe nur eine sehr geringe Anzahl fluoreszierender Zellen mittels Flow-FISH ermittelt werden, die aber vernachlässigbar ist. Bei beiden Proben wurde keine bzw. nur eine geringe Fluoreszenz mittels Flow-FISH nachgewiesen (Abb. 20). Darüber hinaus wurden bei allen Versuchen Kontrollen ohne Zusatz einer FISH-Sonde durchgeführt, um mögliche Hintergrundfluoreszenzen der Proben zu ermitteln. Nur bei der Mischkultur *Methanosarcina barkeri*/ *Propionibacterium acne* wurde eine nennenswerte Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Da jedoch die Werte dieser Proben stark schwankten, kann diese ermittelte Fluoreszenz von *P. acne* herrühren, die unter bestimmten Bedingungen eine rote Autofluoreszenz emittieren können.

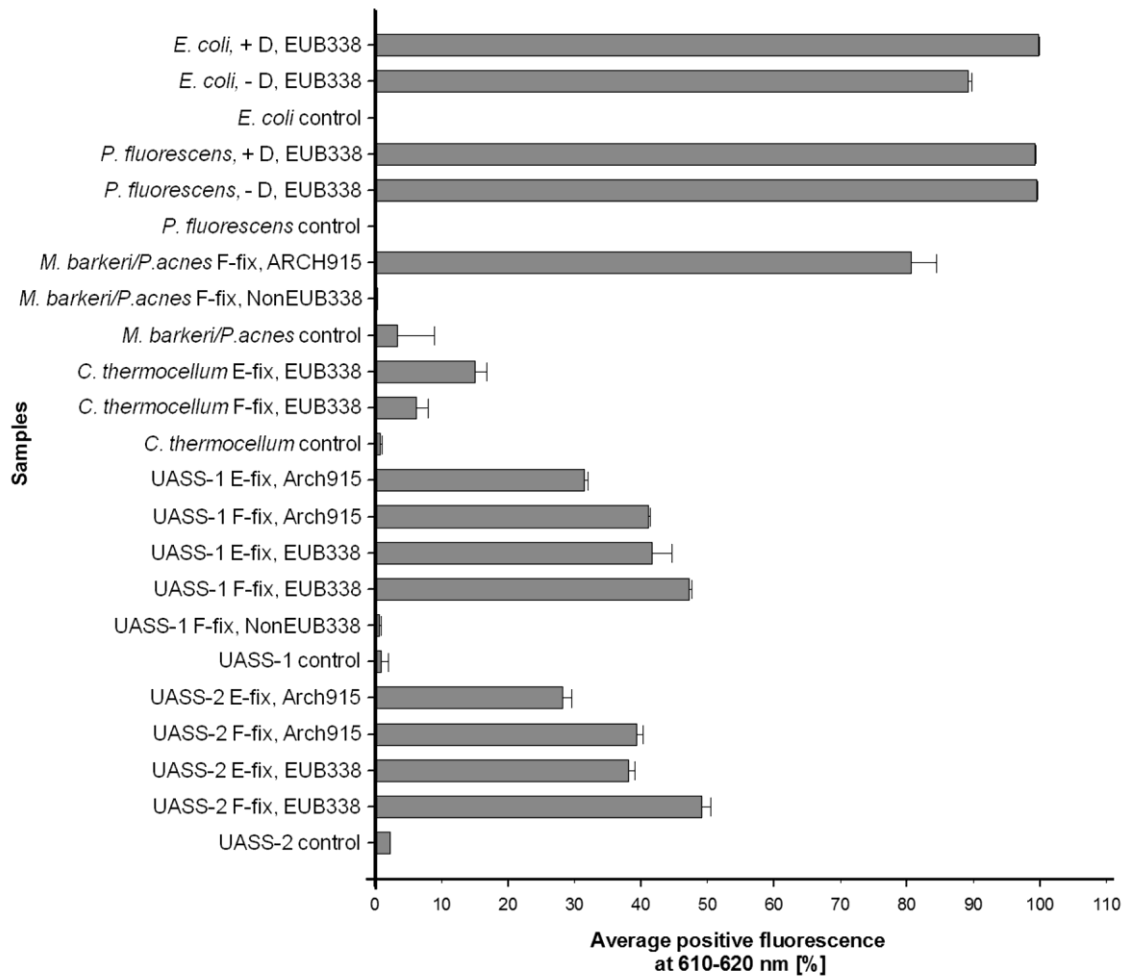


Abb. 20: Ergebnisse der Flow-FISH. Gezeigt werden Durchschnittswerte von positiven Fluoreszenzsignalen in Prozent von verschiedenen Proben: *Methanosarcina barkeri/Propionibacterium acne* Mischkultur, *Clostridium thermocellum*, *Pseudomonas fluorescens* und *Escherichia coli* Reinkulturen sowie zwei AFR (=UASS) Proben (1 und 2; aus den kleintechnischen Reaktoren), die zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen wurden. F-fix: Proben wurden mit 3,7 % Formaldehyd fixiert, E-fix: Proben wurden mit 50 % Ethanol fixiert, +D: mit Dehydrierungsschritten während der FISH, -D: ohne Dehydrierungsschritten während der FISH. Die verwendeten FISH-Proben Arch915, EUB338 und NonEUB338 waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 markiert. Die Fluoreszenz wurde bei 488 nm angeregt und die Emission bei einer Wellenlänge von 525 ± 25 nm (Cytomics FC500) oder bei 536 ± 40 nm (CyFlow ML). Die Standardabweichungen wurden anhand von drei unterschiedlichen Messungen ermittelt.

Die Ergebnisse der Kontrollen und der Hybridisierungen mit der NonEUB338-Sonde zeigen, dass die Hybridisierungsbedingungen optimal waren und zu keiner Cross-Hybridisierung führen.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Methode zur Zellfixierung nach der Probenahme untersucht. Es ist bekannt, dass Gram-positive Bakterien mit Ethanol fixiert werden sollten, während eine Fixierung mit Formaldehyd für Gram-negative Bakterien angezeigt ist. Da in Umweltproben beide Gruppen von Bakterien vorkommen, sollten diese Proben mit beiden Methoden fixiert werden.

Als Kontrollorganismus für Gram-positive Bakterien, die in Biogasreaktoren vorkommen können, wurde *Clostridium thermocellum* ausgewählt. Hier konnte ein positiver Effekt auf die Hybridisierungsrate mit der EUB338-Sonde durch die Zellfixierung mit Ethanol ermittelt werden (Abb. 20). Bei den AFR-Proben konnte festgestellt werden, dass die Fixierung der Proben mit Ethanol dagegen geringere Hybridisierungsraten aufwies als bei einer Fixierung mit 3,7 % Formaldehyd, und das sowohl bei Hybridisierungen mit Arch915- als auch EUB338-Sonden. Demnach sind Gram-positive Bakterien in den AFR-Proben nicht stark vertreten.

Generell konnte sowohl bei *Clostridium thermocellum* als auch bei den AFR-Reaktorproben eine geringe Hybridisierungsrate mittels Flow-FISH ermittelt werden, was verschiedene Ursachen haben kann. Mikroorganismen in Umweltproben können in verschiedenen physiologischen Stadien vorliegen: hochaktiv, im Ruhestadium, im Hungerzustand oder im Zustand geringer physiologischer Aktivität. In den letzteren Stadien besitzen die Mikroorganismen nur eine geringe Anzahl von 16S rRNA Molekülen. Dies führt zu einer geringen Hybridisierung mit den FISH-Sonden, sodass nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal von den Zellen emittiert wird, welches mittels Durchflusszytometrie, aber auch mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht mehr erfasst werden kann.

Durch diesen Sachverhalt lässt sich die auffällige prozentuale Verteilung der fluoreszierenden Archaea und Bacteria, die mittels Flow-FISH in den AFR-Proben nachgewiesen wurden, erklären (Abb. 20). Die Ergebnisse zeigen, dass in den AFR-Proben ca. 50 % der mit Formaldehyd fixierten Mikroorganismen zu der Domäne der Bacteria zählten und ca. 40 % zu der Domäne der Archaea. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass in Biogasreaktoren die Anzahl der Archaea meist eine log-Stufe unterhalb der Bacteria liegt. Die in dieser Studie ermittelten Zahlen für die beiden Gruppen repräsentieren allerdings nur physiologisch aktive Mikroorganismen in der analysierten Biozönose.

C. Analyse der physiologischen Aktivität von Mikroorganismen

Um Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in den AFR Proben sowie der verwendeten Reinkulturen zu erhalten, wurden diese mittels Analyse der zellulären Dehydrogenaseaktivität bestimmt. Hierzu wurden Proben aus Wachstumsreihen über 36 Stunden von *E. coli* und *C. thermocellum* Reinkulturen (Abb. 21) sowie Proben aus einem AFR-Biogasreaktor während einer

Zeitperiode von 24 Stunden ab Substratzugabe (Probenahme alle 2 Stunden) mit CTC (5-Cyano-2,3-di-tolyl-tetrazoliumchlorid) behandelt. Das Verfahren ermöglicht die direkte mikroskopische oder durchflusszytometrische Erfassung stoffwechselaktiver Mikroorganismen und gibt somit Auskunft über die Anzahl aktiver Mikroorganismen in einer Lebensgemeinschaft. Für den Nachweis der Stoffwechselaktivität in Bakterien wurde das Tetrazoliumsalz CTC eingesetzt. Der Nachweis erfolgt über die Reduktion des CTC durch das Elektronentransportsystem in den Zellen zu Formazankristallen, die in den Bakterienzellen mikroskopisch als Rotfärbung zu erkennen sind und mittels durchflusszytometrischer Analyse nachgewiesen werden können.

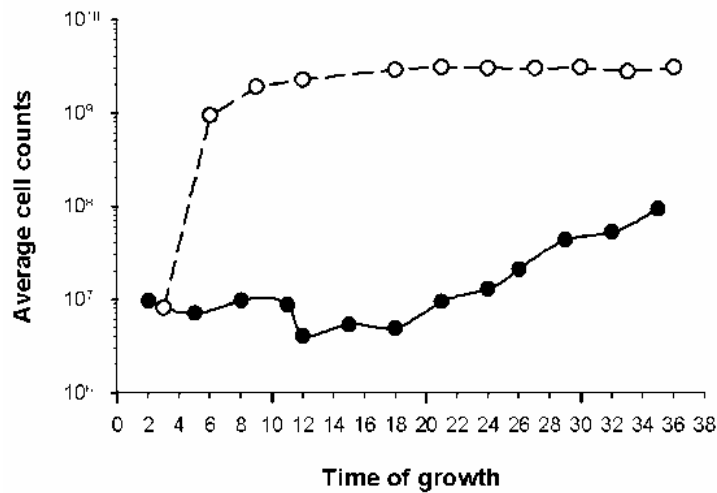


Abb. 21: Zellzahlen von *E. coli* (-○-) und *C. thermocellum* (-●-) Wachstumsreihen 36 Stunden. Die Messungen wurden an Triplikaten mittels Coulter Counter (Multisizer™ 3 Coulter Counter®, Beckman Coulter, Germany) durchgeführt. An jedem Datenpunkt wurde zudem die Zellaktivität mittels CTC-Inkubation analysiert (s. Abb. 22).

Die Ergebnisse der CTC-Behandlung von *E. coli* zeigten bei der durchflusszytometrischen Messung, dass die höchste Dehydrogenaseaktivität und damit die höchste physiologische Zellaktivität zwischen drei und sechs Stunden Wachstum erreicht ist und ab neun Stunden Wachstum beginnt abzuschwächen. Darüber hinaus konnten die Messdaten der Zellzahlermittlung durch den Coulter Counter bestätigt werden (Abb. 22).

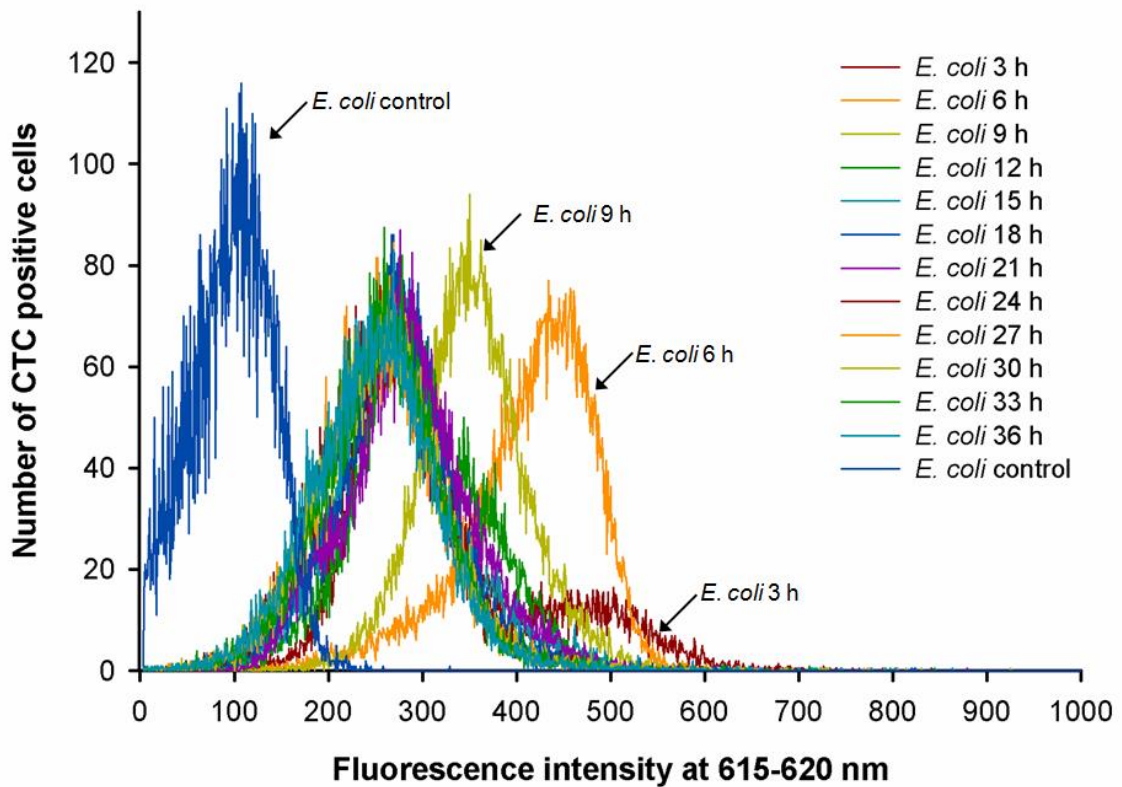


Abb. 22: Durchflusszytometrie-Ergebnisse der CTC-Behandlung zum Nachweis der Dehydrogenaseaktivität von Zellen einer *E. coli* Reinkultur während einer 36 Stunden dauernden Wachstumsreihe. Alle 3 Stunden wurden Proben genommen. Eine frische unbehandelte *E. coli* Probe wurde als Kontrolle eingesetzt und diente als Nullwert für die Messung. Die Formazanfluoreszenz wurde bei 488 nm angeregt und die Formazanemission bei 615 - 620 nm detektiert. Die Messungen wurden mit dem Durchflusszytometer Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Deutschland) durchgeführt.

Da zu befürchten war, dass durch die Aufreinigung der AFR-Proben für die durchflusszytometrische Messung Formazankristalle aus den Zellen gewaschen und somit die Zellen zerstört werden könnten, wurden diese Proben nur mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (TCS SP5, Leica, Deutschland) untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in dem analysierten AFR Biogasreaktor im Schnitt nur zu 43 bis 60 % eine physiologische Aktivität zeigten. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen der nachgewiesenen Aktivität und dem Zeitpunkt der Probennahme nach der Substratzugabe festgestellt werden.

D. Zusammenfassung

Es konnte eine Aufreinigungsmethode für die Flüssigproben aus einem AFR-Reaktorsystem etabliert werden. Durch diese Methode, die auf die Behandlung mit

Natriumhexametaphosphat und Ultraschall sowie einer finalen Filtration beruht, konnten bei einem minimalen Zellverlust erfolgreich Zellaggregate aufgelöst und an Partikel assoziierte Mikroorganismen von diesen abgelöst werden. Die Dauer der Aufreinigungsprozedur variierte dabei je nach Ausprägung der Heterogenität der Proben. Mit diesen Methoden ist es nun möglich, Zellen aus dem AFR-Reaktorsystemen mittels durchflusszytometrischer Messung zu quantifizieren.

Ferner konnte ein FISH-Protokoll erfolgreich etabliert werden, mit dem physiologisch aktive Organismen der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in den AFR Reaktoren auf taxonomischer Ebene identifiziert werden können.

Die Kombination aus den beiden neu etablierten Techniken, der Aufreinigungsprozedur und dem Flow-FISH Protokoll, trägt entscheidend dazu bei, dass aktive Mikroorganismen in Biozönosen in heterogenen Umweltproben zukünftig simultan quantifiziert und identifiziert werden können.

Die Ergebnisse wurden in einer Publikation bei einem internationalen *peer-review* Journal veröffentlicht (Nettmann et al.).

2.1.2.4 Grundlagen der mikrobiellen Aktivierung von Biokohle

Es ist bekannt, dass Biokohlen labile sowie stabile Kohlenstofffraktionen enthalten. Eine Aufkonzentrierung des stabilen Kohlenstoffanteils der Rohkohlen kann durch eine nachgeschaltete mikrobiell-anaerobe Fermentation im Biogasreaktor erfolgen. Durch den Abbau des labilen organischen Kohlenstoffs wird gleichzeitig Methan, eine alternative Energiequelle, produziert. Darüber hinaus ermöglicht diese Art der Nachbehandlung ein Entfernen von adhärennten Verunreinigungen, wie Phenolen und Furfuralen. Dies ist unbedingt notwendig, wenn die Biokohle als Bodenzusatzstoff genutzt werden soll.

Für die wissenschaftliche Analyse der anaerob-mikrobiologischen Behandlung von Biokohle musste zunächst eine geeignete Methodik entwickelt werden, inkl. der Auswahl eines geeigneten Substrats.

Für den Versuch zur Fermentation von Biokohle wurde wie folgt vorgegangen: Herstellung der HTC-Kohle aus Gärresten bei 230 °C für 6 Stunden. Herstellung der Pyrolyse-Kohle aus Holz bei 700 °C für 25 Minuten. Die Biokohle wurde mit H₂O-verdünntem Misch-Inokulum (Verhältnis 1:16) aus verschiedenen Biogasanlagen angeimpft und dann für 5, 7,5 und 10 Wochen in 1 L Weithalsflaschen inkubiert. Als eine Fütterung notwendig wurde, erfolgte dies durch Zugabe eines Modell-Mais-Mediums.

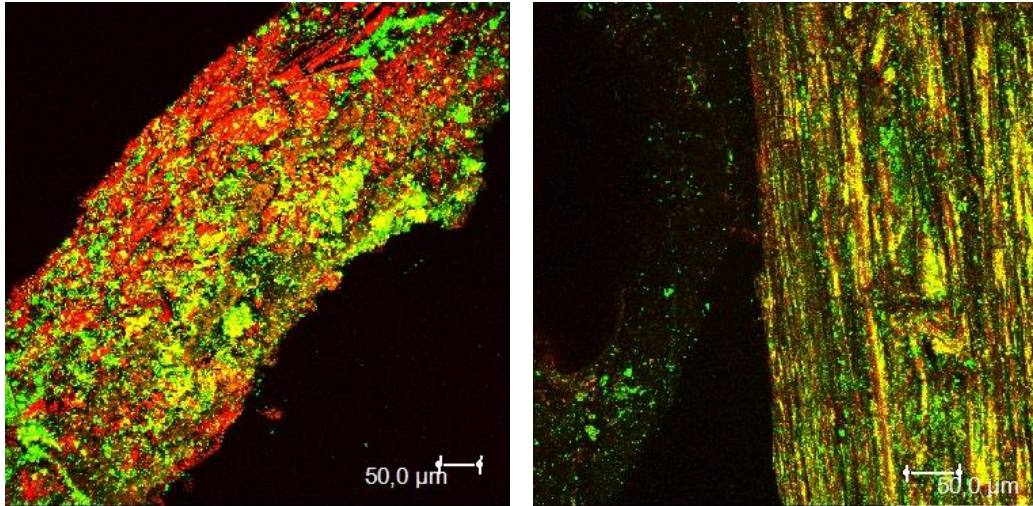


Abb. 23: Durch anaerobe Mikroorganismen besiedelte Pyrolysekohle (links) und HTC-Kohle (rechts)

Während der anaeroben Behandlung der Biokohle nahm die Konzentration anhaftender Zellen deutlich zu, wie anhand des DNA-Gehalts gezeigt werden konnte. Wie Abb. 24 zeigt, erreichte das Ausmaß der mikrobiellen Besiedelung bei der HTC-Kohle ein höheres Niveau als bei der Pyrolysekohle.

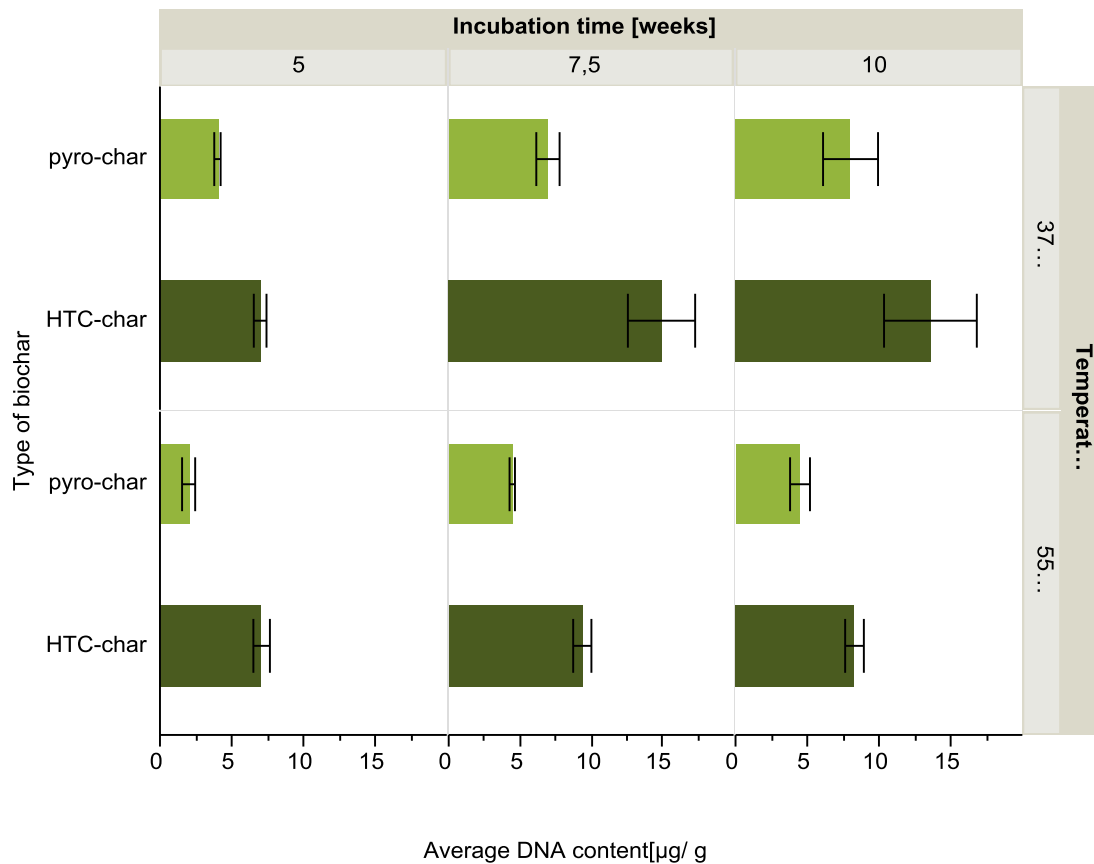


Abb. 24: Quantifizierung der mikrobiellen Besiedelung von Pyrolyse- und HTC-Kohle anhand des DNA-Gehalts bei mesophilen und thermophilen Temperaturen

Des Weiteren wurde festgestellt, dass unter thermophilen Bedingungen (55 °C) die Konzentration an mikrobiellen Zellen geringer ist, als bei mesophiler Temperatur (37 °C).

Anhand der Gasbildungskurve (Abb. 25) kann vermutet werden, dass die höhere Labilität der HTC-Kohle, veranschaulicht durch die höhere Biogasausbeute, der Hauptgrund für die gegenüber der Pyrolysekohle höhere mikrobielle Aktivität ist.

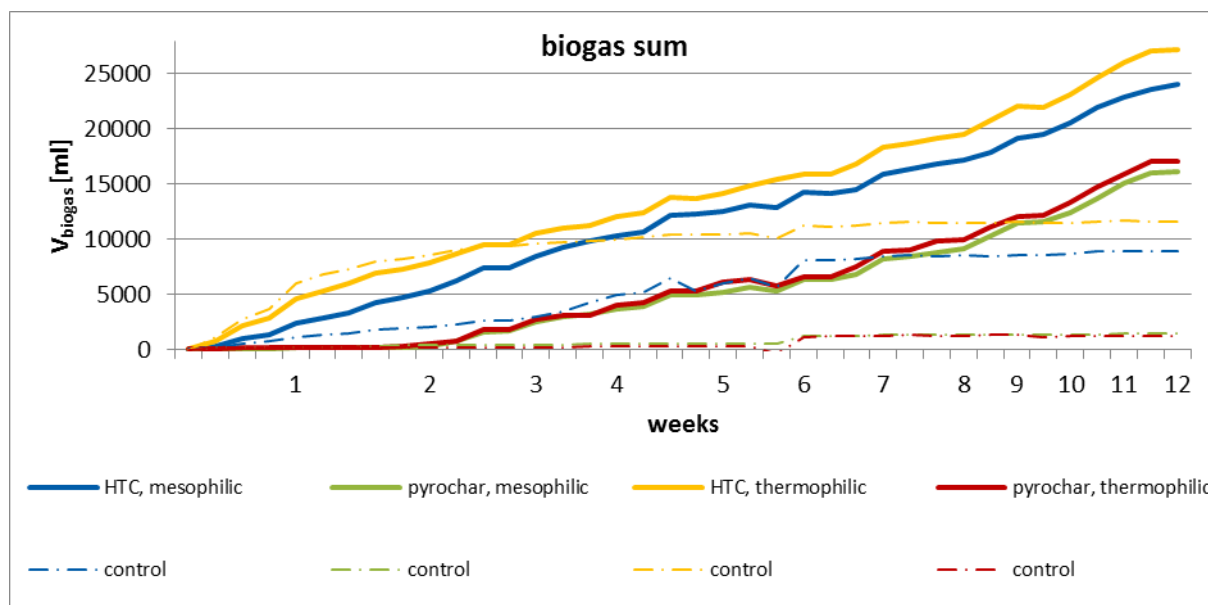


Abb. 25: Verlauf der Biogassumme bei der Fermentation von Pyrolyse- und HTC-Kohle bei mesophilen und thermophilen Temperaturen

Nachfolgend erfolgte eine tiefgehende Analyse der Wirkung von Biokohle im Biogasprozess im Rahmen von TP3 (s. Kap. 2.1.3.6).

2.1.2.5 Grundlagen der bodenbiologischen Wirkung von Biokohle

Mikroorganismen wird eine zentrale Funktion bei der Wahrung der allgemeinen Ökosystemleistung des Bodens zugeschrieben. Untersuchungen konnten zeigen, dass die mikrobielle Aktivität und Biomasse durch Zugabe von Biokohle in den Boden gesteigert werden kann. Die Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Mikroorganismen nach Zugabe von Biokohle in den Boden sind allerdings bislang wenig erforscht.

Daher wurden Mikrokosmen mit Standardboden (20 g) mit niedrigem Kohlenstoffgehalt (0.94 %) unter Zugabe von Biokohle aus Pyrolyse bzw. hydrothermalen Karbonisierung bis zu einem finalen Gesamtkohlenstoffgehalt von 2 % hergestellt. Als wichtige Stellschrauben der mikrobiellen Aktivität werden der Wassergehalt sowie die

Stickstoffverfügbarkeit angesehen. Aus diesem Grund wurde der Wassergehalt durch die Einstellung von verschiedenen Sättigungsgraden der Wasserhaltekapazität (30 %, 50 %, 70 %) und der Stickstoffgehalt durch zwei verschiedene Düngungsstufen (mit und ohne Dünger, +N; -N) variiert (Abb. 26). Als Dünger wurde NH_4NO_3 verwendet.

Über die 80-tägige Inkubationszeit im Dunkeln bei 10 °C wurden mehrfach die Treibhausgase CO_2 , N_2O und CH_4 gemessen, wobei die CO_2 -Emission auch als Indikator für die mikrobielle Aktivität betrachtet werden kann. Durch regelmäßige Belüftung wurde die Entstehung von anaeroben Bedingungen vermieden.

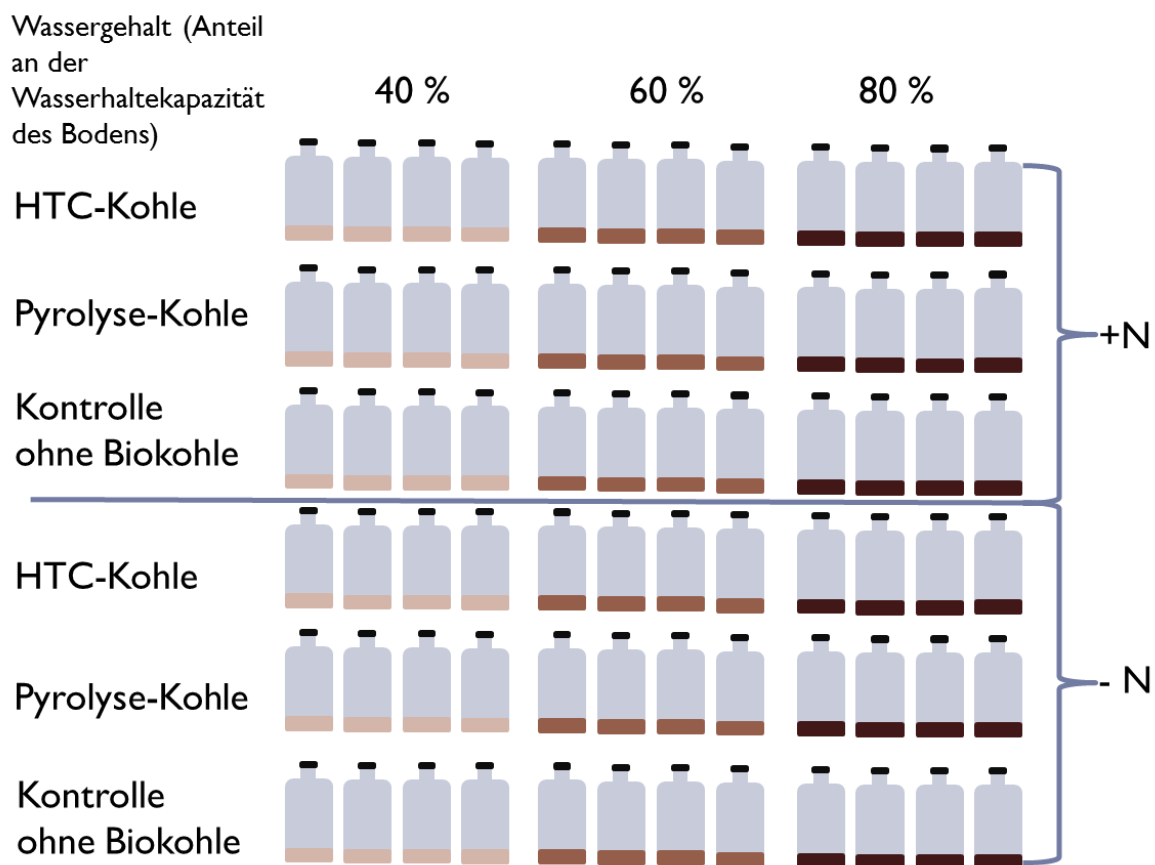


Abb. 26: Versuchsaufbau der Inkubationsversuche von Boden und Biokohle

Treibhausgasemissionen

Während der Inkubation wurde die Bildung der Treibhausgase N_2O , CO_2 und CH_4 mit Hilfe eines Gaschromatografen verfolgt. In den ersten drei Tagen der Inkubation war die Emission der Treibhausgase am höchsten (Abb. 27).

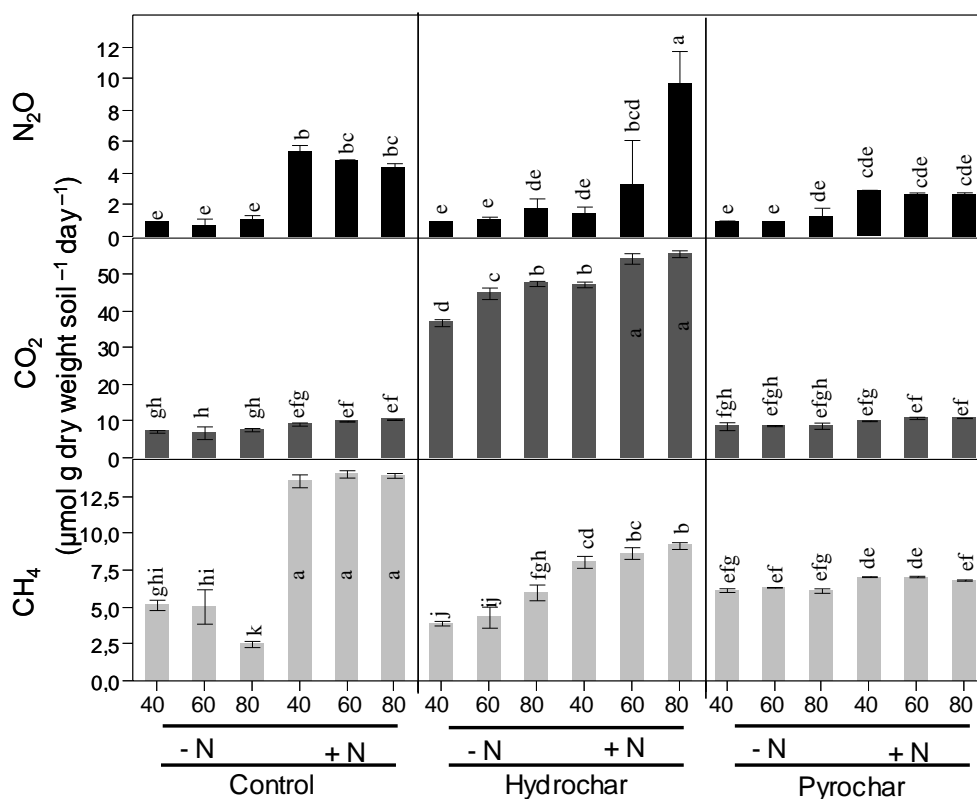


Abb. 27: Treibhausgasemissionen in den ersten drei Tagen der Inkubation. Die Zahlen an der X-Achse entsprechen dem Wassergehalt als dem Anteil der Gesamtwasserhaltekapazität des Bodens. Behandlungen mit und ohne N-Dünger sind mit – N bzw. + N gekennzeichnet. Control, Hydrochar und Pyrochar entsprechen Kontrolle, HTC-Kohle und Pyrolyse-Kohle. Signifikante Unterschiede (Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-HSD-post hoc-Test zum Vergleich der Mittelwerte) sind mit unterschiedlichen Buchstaben über den Balken bezeichnet.

Die N₂O-Emissionen waren ca. 2 – 4 mal höher, die CO₂-Emissionen 3 – 4 mal höher und die CH₄-Emissionen sogar bis zu 10 mal höher verglichen mit durchschnittlichen Tagesraten über die gesamte Inkubationszeit (Abb. 28). Betrachtet man die gesamte Inkubationszeit von 80 Tagen, waren die N₂O-Emissionen in den Proben mit den höchsten Wassergehalten am stärksten, unterschieden sich aber nicht signifikant zu den Emissionen bei den nächstniedrigeren Wassergehalten.

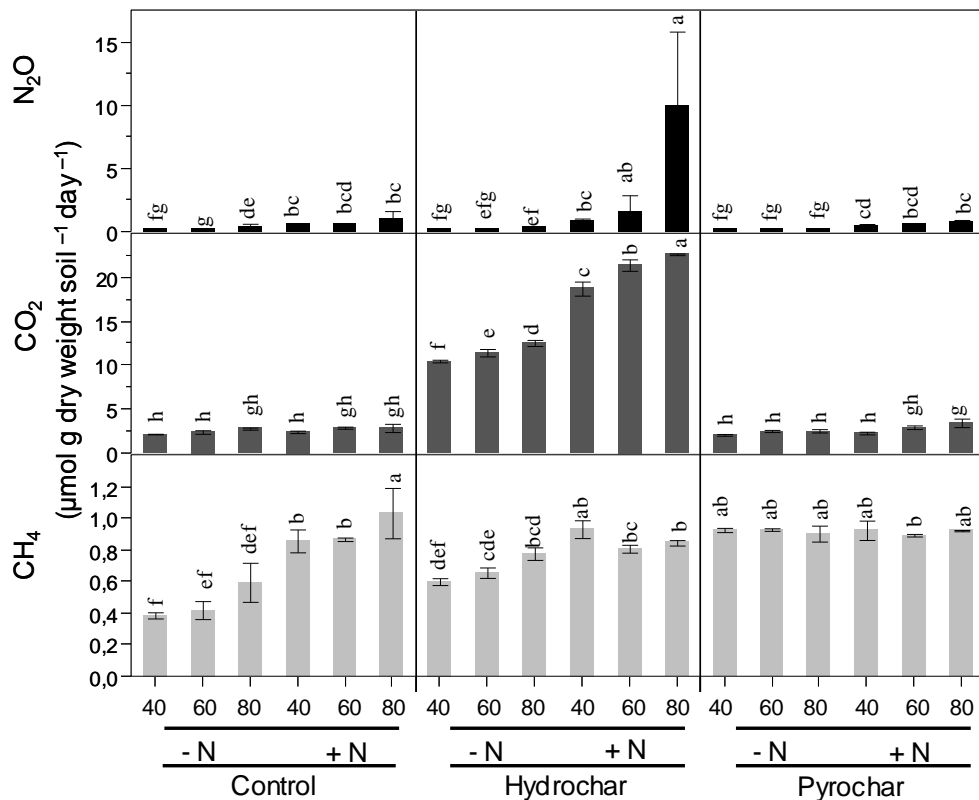


Abb. 28: Treibhausgasemissionen in der gesamten Inkubationszeit von Boden mit Biokohle. Die Zahlen an der X-Achse entsprechen dem Wassergehalt als dem Anteil der Gesamtwasserhaltekapazität des Bodens. Behandlungen mit und ohne N-Dünger sind mit – N bzw. + N gekennzeichnet. Control, Hydrochar und Pyrochar entsprechen Kontrolle, HTC-Kohle und Pyrolyse-Kohle-Behandlung. Signifikante Unterschiede (Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-HSD-post hoc-Test zum Vergleich der Mittelwerte) sind mit unterschiedlichen Buchstaben über den Balken bezeichnet.

Die N-Düngung erhöhte die N₂O-Emission in allen Proben 2,5-fach im Vergleich mit den entsprechenden ungedüngten Behandlungen signifikant ($P < 0,001$). N₂O-Emissionen in den Pyrolysekohlebehandlungen hatten ein ähnliches Ausmaß wie in den Kontrollbehandlungen ohne Biokohle. Steigender Wassergehalt ging in den gedüngten Behandlungen mit leicht höheren N₂O-Emissionen einher. Während die N₂O-Emissionen in den nicht gedüngten HTC-Biokohle-Behandlungen genauso niedrig waren wie in den entsprechenden Behandlungen der Kontrolle und Pyrolysekohle, waren die Emissionen in den gedüngten Varianten bei 60 % und 80 % der Wasserhaltekapazität besonders hoch. Jedoch ergab sich durch die starke Abweichung jeweils eines Replikats eine hohe Standardabweichung. Trotzdem unterschied sich die gedüngte Variante bei 80 % der Wasserhaltekapazität signifikant von allen anderen Behandlungen ($P < 0,001$ bis 0,05).

Auch die CO₂-Emissionen aus den HTC-behandelten Proben unterschieden sich mit bis zu 8-fach höheren Emissionen von den Pyrolyse- und Kontrollbehandlungen. Die Emissionen stiegen mit höherem Wassergehalt und waren nach Düngung ca. doppelt so hoch wie in den entsprechenden ungedüngten Varianten. Die CO₂-Emissionen der Kontroll- und Pyrolysekohlebehandlungen waren ähnlich und zeigten keine signifikanten Unterschiede innerhalb und zwischen den Behandlungen.

Die niedrigsten CH₄-Emissionen wurden in den ungedüngten Kontrollbehandlungen gemessen. Die gedüngten Behandlungen emittierten ungefähr 1,5 bis 2,6-fach mehr CH₄ als die entsprechenden ungedüngten Varianten. Weiterhin führte ein steigender Wassergehalt zu steigenden Methanemissionen in den Kontrollen und HTC-Kohle behandelten Mikrokosmen. Im Gegensatz dazu konnten keine wasser- oder dünger-relevanten Unterschiede in den Pyrolyse-Behandlungen festgestellt werden. Insgesamt konnten zwischen allen düngemittel-behandelten Mikrokosmen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der CH₄-Emissionen festgestellt werden.

Mikrobielle Enzymaktivität

Die mikrobielle Enzymaktivität wurde mit Hilfe des Fluorescein-Diacetat-Assays nach 80 Tagen Inkubation untersucht. Die Reaktion der Gesamtzymaktivität der Kontrollbehandlungen war ähnlich der Pyrolysekohlebehandlungen und nicht signifikant verschieden in Bezug auf dieselbe Düngestufe oder denselben Wassergehalt (Abb. 29). Kontroll- und Pyrolysebehandlungen wiesen nach Düngung eine geringere Enzymaktivität auf, verglichen mit den jeweiligen Behandlungen mit gleichem Wassergehalt.

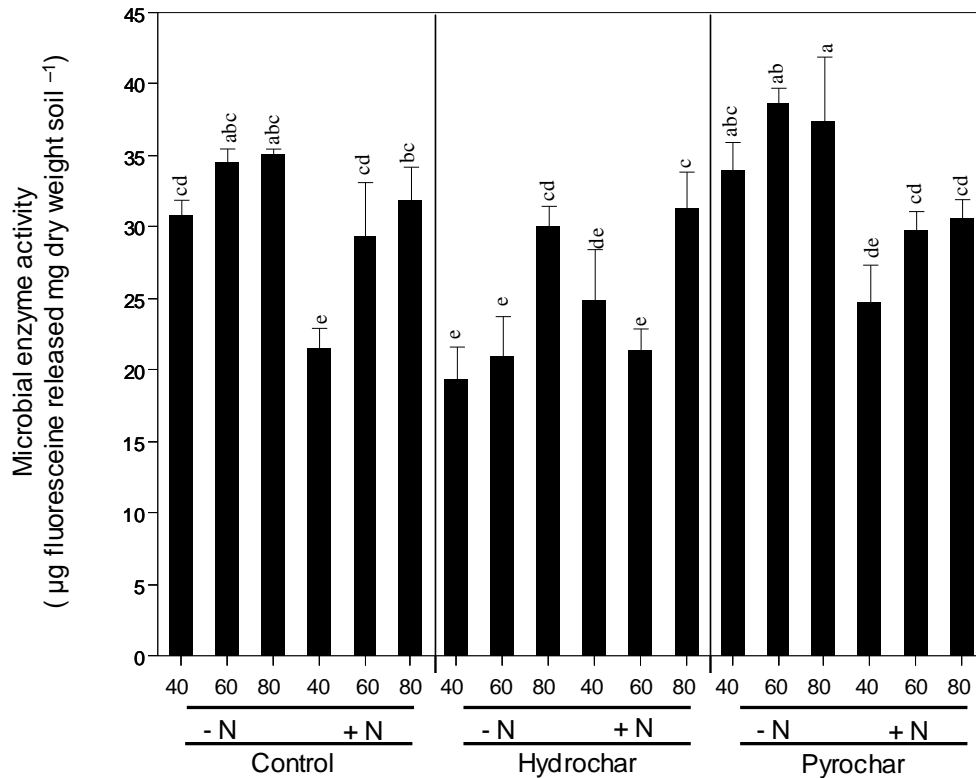


Abb. 29: Mikrobielle Enzymaktivität. Die Zahlen an der X-Achse entsprechen dem Wassergehalt als dem Anteil der Gesamtwasserhaltekapazität des Bodens. Behandlungen mit und ohne N-Dünger mit – N bzw. + N gekennzeichnet. Control, Hydrochar und Pyrochar entsprechen Kontrolle, HTC-Kohle und Pyrolyse-Kohle-Behandlung. Signifikante Unterschiede (Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-HSD-post hoc-Test zum Vergleich der Mittelwerte) sind mit unterschiedlichen Buchstaben über den Balken bezeichnet.

Weiterhin stieg die Enzymaktivität für beide Behandlungen mit steigendem Wassergehalt an. Dieser Effekt war besonders deutlich in den Pyrolysekohle-Behandlungen mit einer bis zu 1,4-fachen Steigerung. In der Kontrolle zeigte nur die Behandlung mit dem geringsten Wassergehalt signifikante Unterschiede zwischen der gedüngten und der ungedüngten Variante ($P < 0,001$). Im Gegensatz dazu waren alle Unterschiede in den Pyrolysekohlebehandlungen beim Vergleich der jeweils selben Wassergehaltsstufe von ungedüngten und gedüngten Varianten signifikant ($P < 0,001$ bis $0,01$). Die Behandlung mit HTC-Kohle ohne Dünger resultierte in einer signifikant niedrigeren Enzymaktivität in den ungedüngten Varianten verglichen mit Kontrolle und Pyrolyse-Kohle-Behandlungen bei entsprechendem Wassergehalt ($P < 0,001$). HTC-Kohle in Kombination mit Dünger resultierte in ähnlichen Enzymaktivitäten wie in entsprechenden Behandlungen der Kontrolle oder mit Pyrolysekohle.

Abundanz von Bakterien und Archaeen

Um die Auswirkung der unterschiedlichen Behandlungen auf die Abundanz von Bakterien und Archaeen zu untersuchen, wurde nach 80 Tagen Inkubation eine 16S rRNA-Gen basierte quantitative PCR durchgeführt. Die bakterielle Abundanz in den HTC-Kohlen behandelten Mikrokosmen war leicht geringer als in den Pyrolyse-Kohlen und Kontroll-Mikrokosmen (Abb. 30).

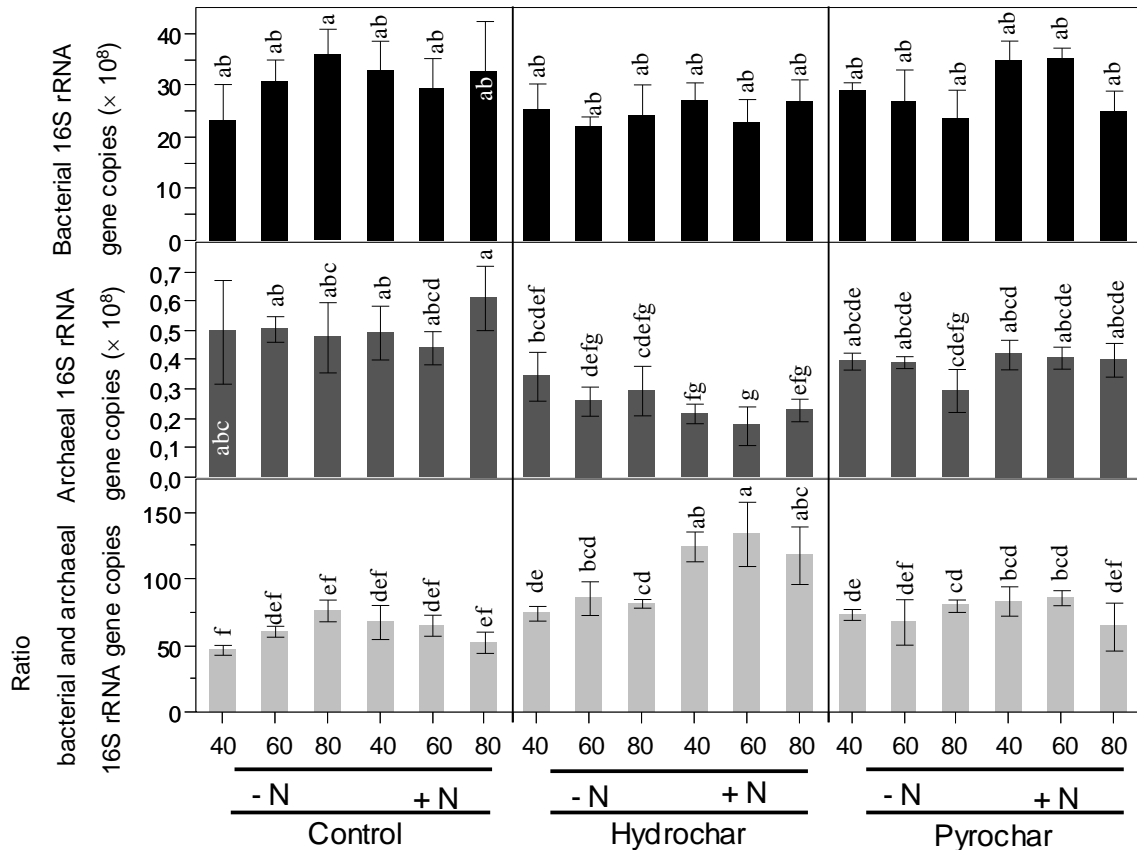


Abb. 30: Abundanz der bakteriellen und archaeellen 16S rRNA Genkopien nach 80 Tagen Inkubation. Die Zahlen an der X-Achse entsprechen dem Wassergehalt als dem Anteil der Gesamtwasserhaltekapazität des Bodens. Behandlungen mit und ohne N-Dünger sind mit – N bzw. + N gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede (Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-HSD-post hoc-Test zum Vergleich der Mittelwerte) sind mit unterschiedlichen Buchstaben über den Balken bezeichnet.

Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die höchste Abundanz wurde in der ungedüngten Kontrolle mit dem höchsten Wassergehalt gemessen ($3,6 \times 10^9 \pm 5,3 \times 10^8$), gefolgt von den gedüngten Pyrolyse-Kohle-Behandlungen bei 40 % und 60 % der Wasserhaltekapazität ($3,5 \times 10^9 \pm 3,7 \times 10^8$ und $3,5 \times 10^9 \pm 2,2 \times 10^8$). Nur in den nichtgedüngten Kontrollen konnten Effekte des Wassergehalts beobachtet werden mit steigender bakterieller Abundanz bei steigendem Wassergehalt. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Insgesamt war die archaeelle Abundanz

etwa zwei Größenordnungen niedriger als die der Bakterien. Es konnten bei den Archaeen zudem keine Effekte, verursacht durch unterschiedliche Wassergehalte, beobachtet werden. Die Abundanz in den gedüngten HTC-Kohlen behandelte Mikrokosmen war leicht, aber nicht signifikant niedriger verglichen mit den entsprechenden ungedüngten Varianten. Weiterhin wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen entsprechenden Behandlungen der Kontrolle, Pyrolyse und HTC-Kohlebehandlungen gefunden. Jedoch waren die Anzahl der Kopien des archaealen 16S rRNA-Gens in den HTC-Kohle-Behandlungen niedriger als in der Kontrolle. Die Unterschiede waren in den gedüngten Varianten der HTC-Kohle-Mikrokosmen, verglichen mit den korrespondierenden Proben der Kontrolle, besonders groß und bewegten sich jeweils im Bereich von $1,8 \times 10^7 \pm 6,6 \times 10^6$ bis $2,3 \times 10^7 \pm 3,8 \times 10^6$ und $4,4 \times 10^9 \pm 5,6 \times 10^8$ bis $6,1 \times 10^9 \pm 1,1 \times 10^8$ archaealer 16S rRNA Genkopien ($P < 0,0001$ bis $0,0013$). In den Pyrolysebehandlungen schienen die Archaeen weniger abundant zu sein als in der Kontrolle, jedoch ergab nur der Vergleich der Mikrokosmen mit dem jeweils höchsten Wassergehalt signifikante Unterschiede ($P = 0,03$). Das Verhältnis der bakteriellen und archaealen Abundanz in den Pyrolyse- und Kontroll-Behandlungen war sehr ähnlich und bewegte sich im Bereich von $47,0 \pm 3,7$ to $86,2 \pm 5,6$. Die besonders niedrige Abundanz der Archaeen in den gedüngten HTC-Kohlebehandlungen führte zu hohen Raten, die signifikant unterschiedlich zu allen anderen Behandlungen waren ($P < 0,028$).

Einfluss der Kohlebehandlungen auf die bakterielle und archaeelle Gemeinschaft

Um den Einfluss auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft zu untersuchen, wurden T-RFLP-Profile von allen Behandlungen erstellt. Um Effekte sichtbar zu machen, wurden die Ergebnisse im Anschluss durch nicht-metrische multidimensionale Skalierungs-Analyse statistisch ausgewertet. Für Bakterien und Archaeen wurden keine Effekte infolge unterschiedlicher Wassergehalte oder Düngung detektiert. Daher wurden die unterschiedlichen Proben nicht gruppiert dargestellt bezüglich der jeweiligen Behandlung, sondern nur nach Kontrolle, HTC-Kohle und Pyrolyse-Kohle-Behandlung (Abb. 31 a, b).

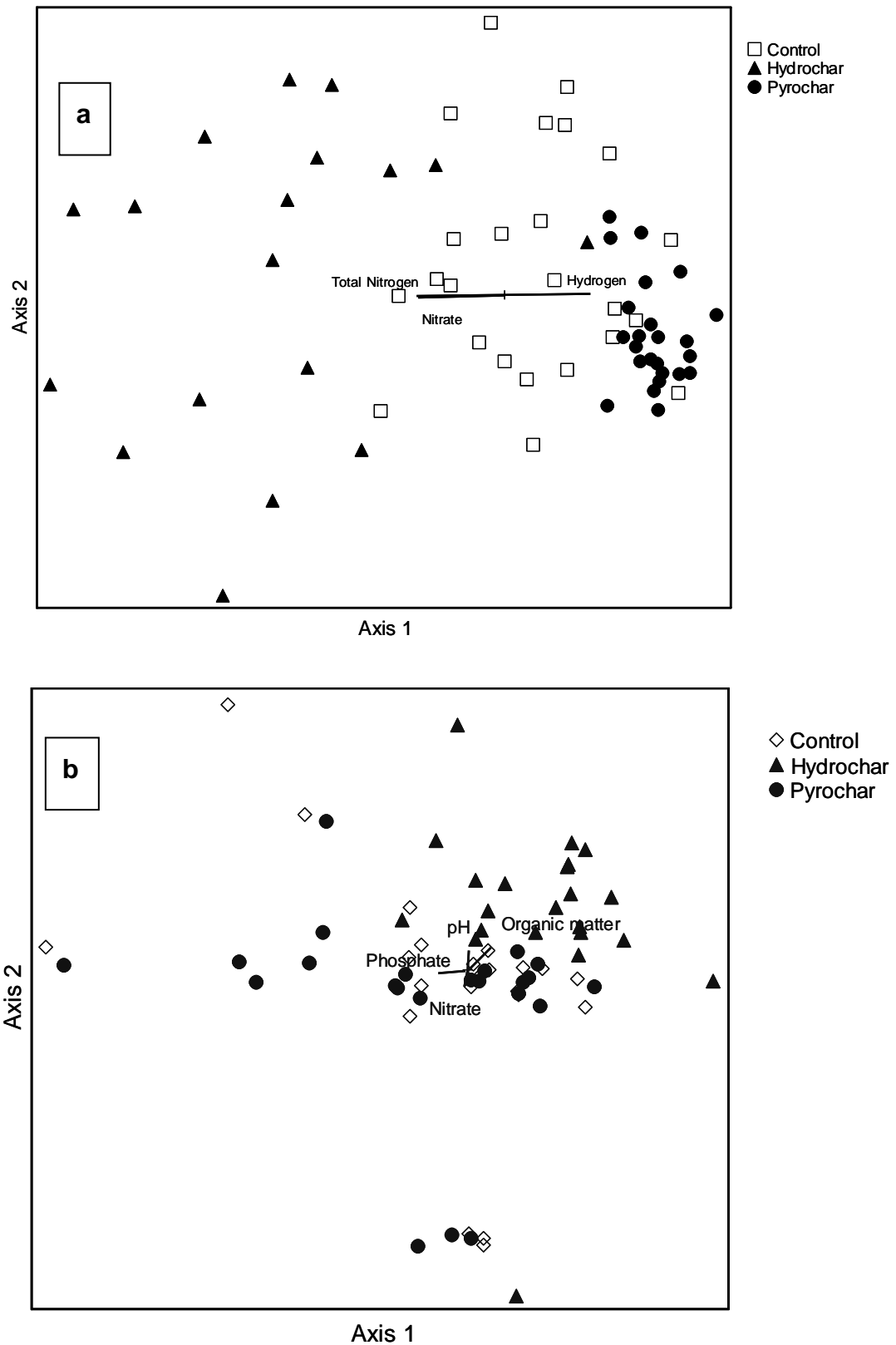


Abb. 31: Ordinationsdiagramme der bakteriellen (a) und archaeellen (b) T-RFLP-Profile basierend auf dem 16S rRNA Gen aus Kontroll-, Pyrolyse-Kohle und HTC-Kohle-Behandlungen nach Non-Metrischer Multidimensionaler Skalierungs-Analyse.

Das Ordinationsdiagramm basierend auf den bakteriellen T-RFLP-Profilen zeigt eine separate Gruppierung von jeweils Kontroll-, HTC-Kohle- und Pyrolyse-Kohle-behandelten Proben, was auf die Ausbildung von unterschiedlichen bakteriellen Gemeinschaften schließen lässt. Die Variation innerhalb der Pyrolyse-Kohle-Behandlungen war kleiner als in den HTC-Kohle- und Kontrollbehandlungen, da die Gruppierung in dem Ordinationsdiagramm stärker fokussiert war. Jedoch formten auch die Kontroll-Mikrokosmen eine definierte Gruppe. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde durch Multi-Response-Permutation-Prozedur (MRPP) verifiziert. Die daraus resultierenden A-Werte von 0,10 ($P < 0,0001$), 0,11 ($P < 0,0001$) und 0,24 ($P < 0,0001$) jeweils aus paarweisen Vergleichen von Kontrolle und HTC-Kohle-Behandlung, Kontrolle und Pyrolyse-Kohle-Behandlung und HTC-Kohle und Pyrolyse-Kohle-Behandlung deuten auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hin. Archaeelle T-RFLP-Profile zeigten eine Gruppierung von jeweils HTC-Kohle-Behandlungen und Pyrolyse-Kohlebehandlungen in den Ordinationsdiagrammen. Jedoch gruppieren die Kontroll-Proben mit den Pyrolyse-Kohle-Behandlungen, was auf sehr ähnliche mikrobielle Gemeinschaften schließen lässt. Diese Ergebnisse wurden durch die MRPP-Analyse gestützt, die signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und HTC-Behandlungen ($A = 0,08$; $P < 0,0001$) und HTC-Kohle- und Pyrolyse-Kohle-Mikrokosmen ($A = 0,10$; $P < 0,0001$) ergaben. Im Gegensatz dazu resultierten keine signifikanten Unterschiede aus dem Vergleich von Kontroll- und Pyrolyse-Kohlebehandlungen ($A = 0,01$; $P = 0,15$).

Bakterielle Klonbibliotheken aus gepoolten Proben von jeweils Kontrolle und Pyrolyse-Kohlebehandlungen zeigten, dass Proteobakterien die bakterielle Gemeinschaft dominierten und 22 % bzw. 29 % der gesamten Klone in der jeweiligen Klonbibliothek ausmachten (Abb. 32). Acidobakterien waren mit 13 % und 16 % der Gesamtklone das zweitdominanteste Phylum in diesen Klonbibliotheken. 46 % der Klone in der Klonbibliothek von gepoolten HTC-Kohle-Proben wurden den Proteobakterien zugeordnet. Nur 3 % der Klone konnten in der HTC-Kohle-Klonbibliothek den Acidobakterien zugeordnet werden.

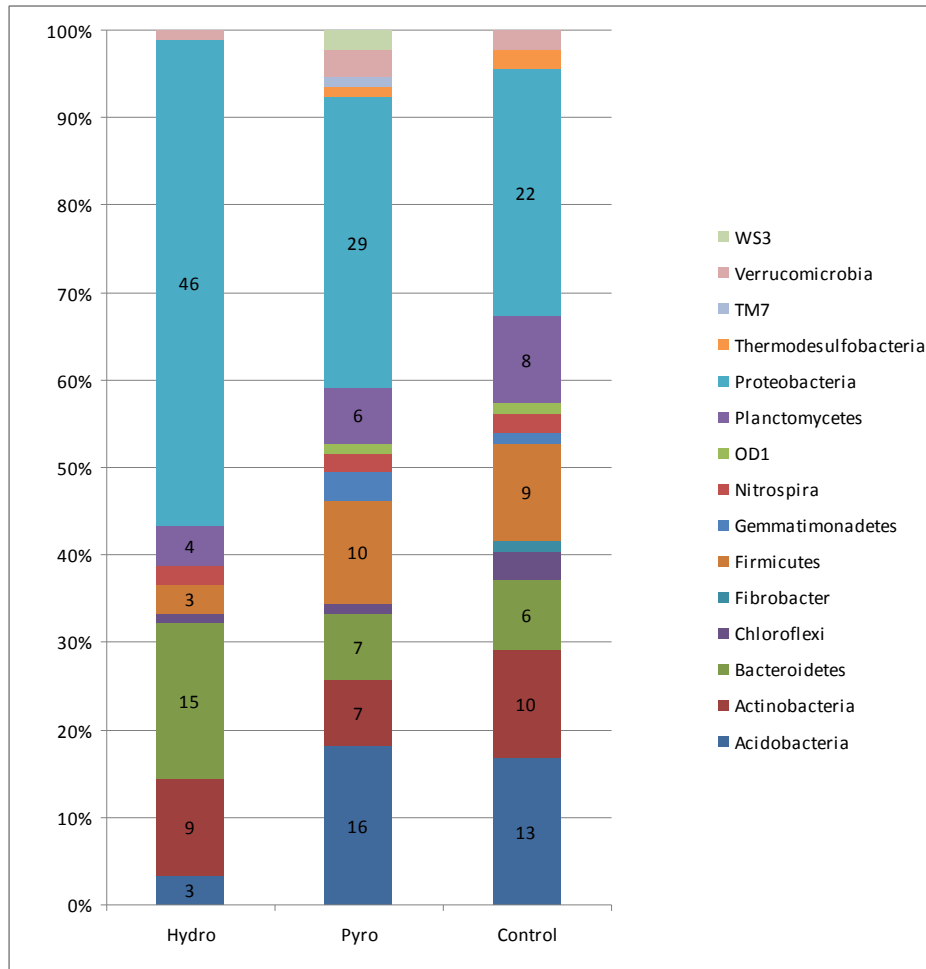


Abb. 32: Darstellung der Verteilung der Phyla in den auf das 16S rRNA Gen basierenden Klonbibliotheken aus gepoolten Proben von jeweils Kontroll- (Control), Pyrolyse-Kohle (Pyro) und HTC-Kohle-(Hydro)behandlungen.

Die Bacteroidetes waren mit 15 % das zweithäufigste Phylum dieser Klonbibliothek und machte nur jeweils 6 % und 7 % in der Kontroll- bzw. Pyrolysekohle-Klonbibliothek aus. Firmicutes umfassten 9 % und 10 % der Klone in den Klonbibliotheken aus Kontroll- und HTC-Kohle-Behandlungen, waren jedoch mit 3 % weniger häufig in den Pyrolyse-Kohle-Klonbibliotheken vertreten. Planktomyzeten Planctomycetes erreichten 6 %, 8 % und 4 % der Gesamtklone in den Klonbibliotheken aus Pyrolyse-Kohle-, Kontroll- und HTC-Kohlebehandlungen.

Trotz mehrfacher Versuche wurden mit den Archaeenklonbibliotheken keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt.

Systeme bei 55 °C (thermophil) betrieben. Dieser Versuch dauerte insgesamt über 180 Tage, wobei für den Großteil des Zeitraums die einheitliche AFR-bezogene Raumbelastung von $2,5 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gewählt wurde. Später wurde die Raumbelastung schrittweise erhöht. Außerdem wurde eine weitere Temperatur von 60 °C erprobt. Grundsätzlich wurde jede Versuchsvariante parallel, zur statistischen Absicherung, in zwei Reaktorsystemen durchgeführt (Wiederholungsvariante). Die insg. 4 Reaktorsysteme ermöglichten somit die zeitgleiche Erprobung von je 2 Versuchsvarianten.

Während der Fermentationsversuche wurde die Gasbildung aller 8 Reaktoren kontinuierlich erfasst. Die auf das Reaktorvolumen bezogene Gasbildungsrate ist ein wesentlicher Parameter zur Beurteilung der Prozessleistung. Abb. 34 zeigt die Biogasrate der vier kleintechnischen Versuchsreaktorsysteme (ktV, bestehend aus einem AFR und einem FBR) im zeitlichen Verlauf.

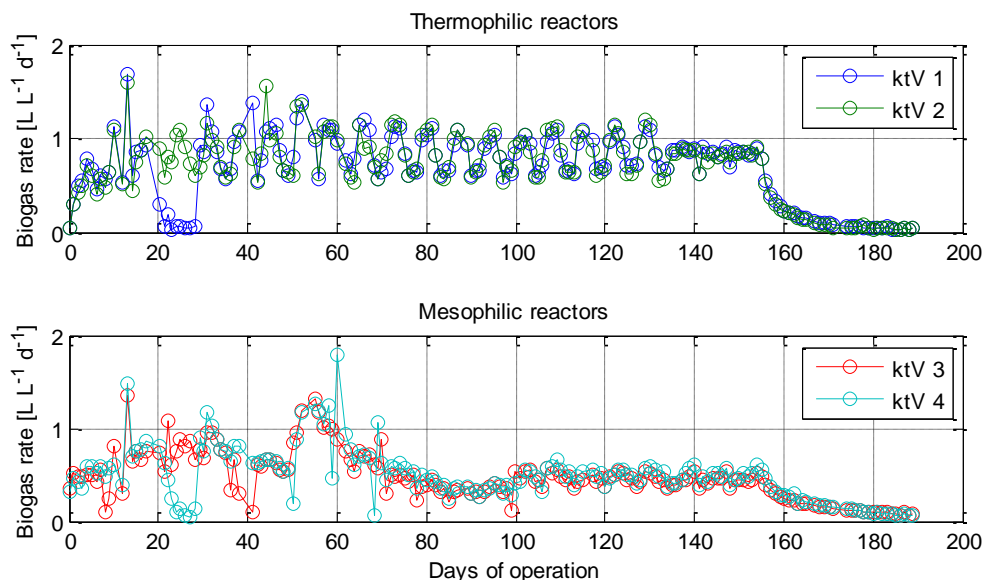


Abb. 34: Zeitlicher Verlauf der Gasbildungsrate in den thermophilen Reaktorsystemen ktV1+2 und den mesophilen Reaktorsystemen ktV3+4 bei einheitlicher Raumbelastung der AFRs mit Stroh von $2,5 \text{ g oTS L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Wie aus Abb. 34 hervorgeht, können sowohl im zeitlichen Verlauf als auch zwischen den Varianten „thermophil“ und „mesophil“ deutliche Variationen in der Gasbildung unterschieden werden. Im zeitlichen Verlauf der Gasbildung fallen Phasen unterschiedlicher Raten und ausgeprägter Schwankungen auf. Wesentliche Ursachen für die vergleichsweise großen Schwankungen zu Beginn der Versuche liegen in technischen Störungen, biologischer Adaption und schwankenden Füllständen der AFRs mit fermentierendem Stroh. Ab Tag 80 wurde der Feststofffüllstand auf einen einheitlichen Minimal- und Maximalwert begrenzt. Technische Störungen, wie beispiels-

weise im Zeitraum Tag 20 bis 30, werden offenbart durch Abweichungen innerhalb der identisch betriebenen Reaktorsysteme. Insgesamt sind die Abweichungen zwischen den beiden Wiederholungsvarianten jedoch sehr gering, insbesondere, wenn man die naturgemäß hohe Komplexität und Dynamik biologischer Prozesse zugrunde legt. Vergleicht man die Ganglinien der mesophilen und thermophilen Reaktoren, so fallen in der thermophilen Variante generell höhere Gasraten sowie stärkere Wochenschwankungen auf. Beide Beobachtungen deuten auf eine unter thermophilen Bedingungen erheblich höhere Abbaugeschwindigkeit hin. Die Wochenschwankungen sind auf die bis zum Tag 135 nicht täglich erfolgte Zugabe von Biomasse zurückzuführen. Ab Tag 135 wurde von einer 5-maligen Zugabe (Mo - Fr) auf eine 7-malige Zugabe (Mo - So) gewechselt. Daraufhin ging die Schwankungsbreite deutlich zurück.

Der Vergleich zwischen thermophilen und mesophilen Prozessbedingungen ist idealer Weise anhand von Mittelwerten üblicher Leistungsparameter durchzuführen (Tabelle 6).

Tab. 6: Mittlere Kenngrößen der beiden thermophilen und mesophilen Reaktorsysteme

Parameter	Einheit	Mesophil	Thermophil
AFR			
oTS-Raumbelastung	$g_{oTS} * L^{-1} * d^{-1}$	2,5	2,5
Methanrate*	$L * L^{-1} * d^{-1}$	0,23	0,40
Hydrolysekonstante	d^{-1}	0,07	0,19
FBR			
Hydraulische Verweilzeit	d	1,0	1,0
Methanrate*	$L * L^{-1} * d^{-1}$	0,086	0,051
Gesamtsystem			
Methanrate*	$L * L^{-1} * d^{-1}$	0,32	0,45
Methanausbeute*	$L * g_{oTS}^{-1}$	0,12	0,18

Betrachtet man zunächst die Aufstromreaktoren (AFR), so ist zu erkennen, dass bei thermophiler Betriebsweise (55 °C) eine nahezu doppelte Methanrate und dreifache Hydrolysekonstante erreicht werden kann. Die mit den AFRs verbundenen Festbettreaktoren (FBR) zeigten dagegen bei mesophiler Betriebsweise von AFR und FBR die höhere Methanrate. Da sich jedoch die Versorgung der FBRs mit abbaubarer organischer Substanz aus der Differenz von Hydrolyse- und Methanbildungsleistung

der angeschlossenen AFRs ergibt, kann eine höhere Methanbildung des FBRs auch als eine geringere methanogene Leistungsfähigkeit des AFRs gedeutet werden. Eindeutig zu bewerten sind dagegen die auf das Gesamtsystem bezogenen Parameter Methanrate und Methanausbeute. Beide fallen im thermophilen System um etwa 50 % höher aus. Damit konnte eindeutig belegt werden, dass thermophile Temperaturen (55 °C) den anaeroben Abbau von Stroh beschleunigen. Basierend auf der Hydrolysekonstante kann gegenüber mesophilen Temperaturen eine Verdreifachung der Abbaugeschwindigkeit erwartet werden.

Leistungsparameter

Nachdem der Langzeitversuch zur Vergärung von Weizenstroh bei meso- und thermophiler Temperaturen mit einer konstanten Raumbelastung von $2,5 \text{ g oTS L}^{-1}\text{d}^{-1}$ mit sehr aussagekräftigen Ergebnissen abgeschlossen wurde, wurde nachfolgend in einem erneuten Langzeitversuch zur thermophilen Vergärung von Weizenstroh über 6 Monate das Prozessverhalten bei Steigerung der Raumbelastung untersucht. Das Ergebnis in Bezug auf die Entwicklung der Methanausbeute zeigt Abb. 35.

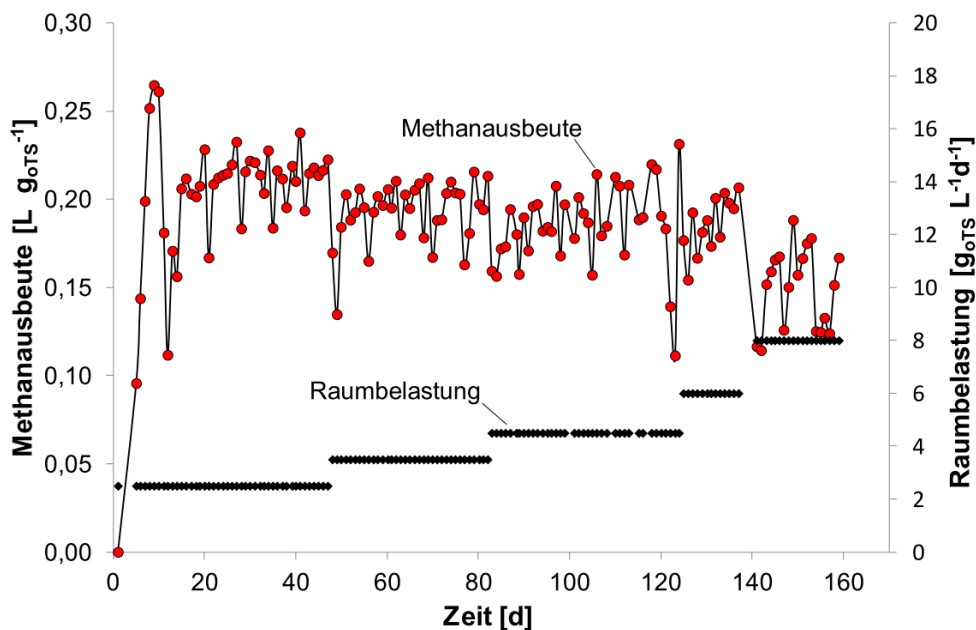


Abb. 35: Aufbau des kleintechnischen Fermentationssystems nach dem Aufstromverfahren mit kleintechnischem Aufstromreaktor (AFR) und Festbettreaktor (FRB)

Die schrittweise Erhöhung der oTS-Raumbelastung von $2,5$ auf $8 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ergab einen Rückgang der Methanausbeute von $0,21$ auf $0,17 \text{ L g}^{-1}$ (Tab. 7).

Tab. 7: Reaktion der oTS-Methanausbeute und der Verweilzeit bei Erhöhung der oTS-Raumbelastung

oTS-Raumbelastung (g L⁻¹d⁻¹)	oTS-Methanausbeute (L g⁻¹)	Feststoff-Verweilzeit (d)
2,5	0,21	14 - 21 d
4,5	0,19	7 - 14 d
8,0	0,17	3 - 7 d

Wie aus Tab. 7 zu entnehmen ist, geht die Methanausbeute zwar mit Erhöhung der Raumbelastung zurück, bemerkenswert ist jedoch, dass die Verweilzeit gleichzeitig überproportional zurückgeht, auf zuletzt nur 3 bis 7 Tage. Bemerkenswert auch deshalb, weil für die Vergärung von Stroh, das als besonders schwer abbaubar gilt, eine Verweilzeit von 100 Tagen und mehr üblich ist, für Ausbeuten in ähnlicher Höhe.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Aufstromreaktor eine hocheffiziente und aufwandsarme Vergärung von Stroh erlaubt. Ein vorgeschalteter Faseraufschluss ist nicht erforderlich. Die Produktivität der Gasbildung kann Größenordnungen wie bei der Maisvergärung erreichen, wobei aufgrund der geringeren Ausbeute etwa 30 bis 50 % mehr Stroh eingesetzt werden muss.

2.1.3.3 Vergärung von Rapsexpeller im Aufstromverfahren

Nach zwei Versuchsreihen, in welchen die Monovergärung von Stroh betrachtet wurde, schloss sich in 2012 ein dritter Langzeitversuch zur Kofermentation von Stroh und Rapsexpeller an, mit dem Ziel, die Verträglichkeit des Systems gegenüber hohen Stickstoff- und Ammoniumkonzentrationen zu bestimmen. Dieser erstreckte sich über ca. 14 Monate. Rapsexpeller stellt aufgrund seines hohen Stickstoffgehaltes ein Problem in herkömmlichen Biogasanlagen dar und sollte in einer geeigneten Mischung mit Stroh unter analogen Bedingungen zur zweiten Versuchsreihe untersucht werden. Die Wahl fiel auf Rapsexpeller, da er den Nährstoffmangel des Strohs gut kompensieren kann und gegenüber anderen stickstoffreichen Substraten wie Geflügelmist hygienisch unbedenklich ist. Das Gemisch aus Stroh und Raps sollte bei meso- und thermophiler Betriebsweise auf seine Eignung für die Nutzung im Aufstromverfahren untersucht werden. Des Weiteren wurde im Versuchsverlauf die Raumbelastung (B_R) sukzessive von $2,5 \text{ g}_{\text{oTS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf $6 \text{ g}_{\text{oTS}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erhöht.

Das Mischungsverhältnis der beiden Substrate wurde so eingestellt, dass ein für das Mikroorganismenwachstum geeignetes Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff erreicht wurde. Die Konzentration von Ammonium-Stickstoff in der Prozessflüssigkeit stieg dabei in Bereiche, welche eine Stickstoffhemmung vermuten lassen. Diese

waren jedoch in den Kennzahlen des Prozesses nicht wiederzufinden, was sowohl bei meso- als auch bei thermophiler Betriebsweise für eine hohe Stickstofftoleranz des Aufstromverfahrens spricht und ein zusätzliches Stripping in den untersuchten Regionen unnötig macht. Im Versuchsverlauf stieg der Ammonium-Stickstoffgehalt von rund 650 mg L^{-1} auf über 1600 mg L^{-1} .

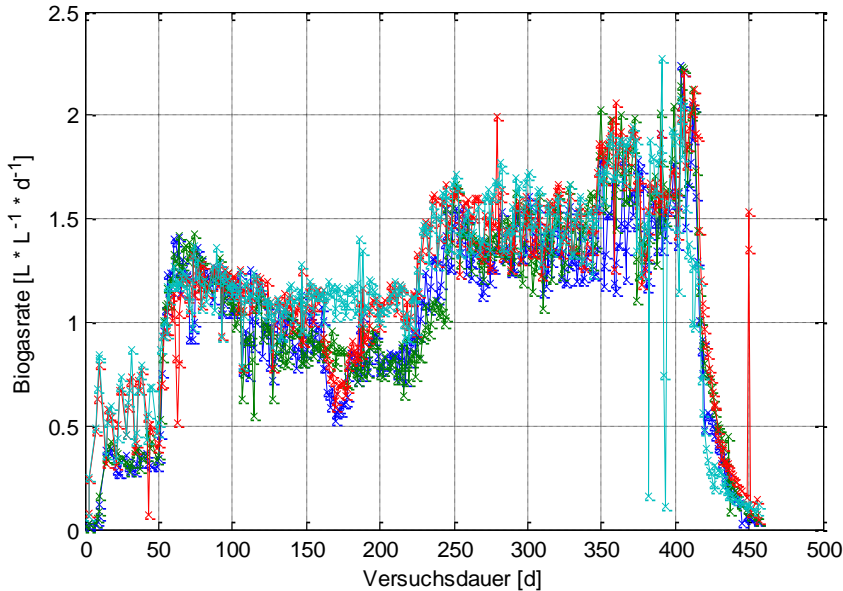


Abb. 36: Biogasraten der Gesamtsysteme bestehend aus kleintechnischem Aufstrom- (AFR) und Festbettreaktor (FRB)

Erwartungsgemäß stiegen mit der organischen Fracht die Biogasraten der Systeme (Abb. 36) und die Methanausbeuten nahmen ab (Tab. 8). Zum einen ist die Abnahme der Ausbeuten der verkürzten Verweilzeit der Feststoffe bei höherer B_R zuzuschreiben, zum anderen hat sich der Methangehalt des Biogases der AFRs bei höherer Raumbelastung reduziert. Zwar stieg parallel dazu der Methangehalt der FRBs, dies konnte den Effekt der Verweilzeit jedoch nicht kompensieren (Tab. 8). Der Methangehalt bei der Kofermentation war jedoch durchgehend geringer als bei der Monovergärung von Stroh.

Tab. 8: Reaktion der oTS-Methanausbeute bei Erhöhung der oTS-Raumbelastung

BR [$\text{g}_{\text{oTS}} \text{L}^{-1} \text{d}^{-1}$]	Methanausbeute [$\text{L g}_{\text{oTS}}^{-1}$]	
	mesophil	thermophil
2,5	0,229	0,245
3,5	0,227	0,232
4,5	0,202	0,199
6	0,179	0,153

Der Vorteil des Aufstromverfahrens, der Abbau von Biomasse bei vergleichsweise kurzer Feststoffverweilzeit, bleibt auch bei der Kofermentation mit Rapsexpeller bestehen. Die Methanausbeute der Systeme reduziert sich nicht im gleichen Maße, wie die Verweilzeit der Feststoffe im Reaktor sinkt. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Aufstromreaktor auch für Kofermentationen mit geeigneten Substraten eine hocheffiziente und aufwandsarme Vergärung erlaubt. Eine Vorbehandlung zum Aufschluss der Substrate, wie bei anderen Fermentertypen üblich, scheint nicht von Nöten zu sein.

Abbildung 37 stellt die Ausbeuten der Kofermentation denen der Monovergärung von Weizenstroh gegenüber. Es wird ersichtlich, dass die Kofermentation höhere Gaserträge erlaubt. Hierfür sind jedoch die Biogasbildungspotenziale der einzelnen Bestandteile maßgebend.

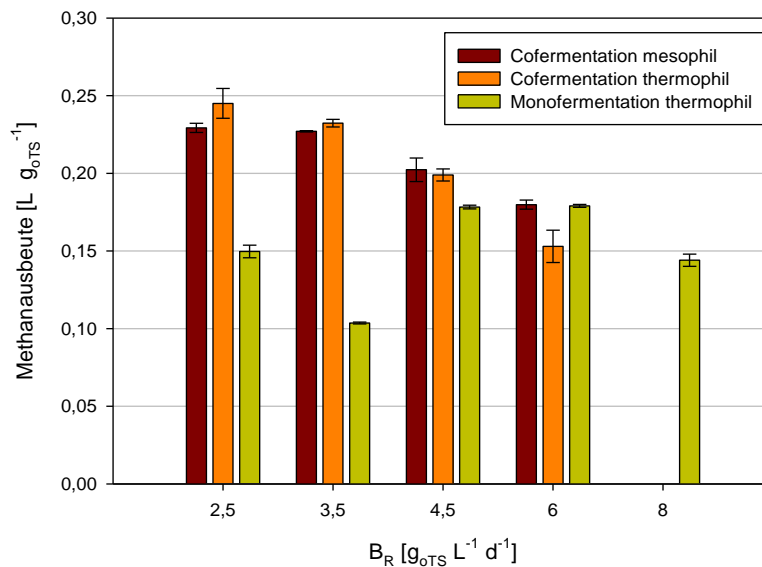


Abb. 37: Methanausbeuten des Gesamtsystems aus AFR und FBR

2.1.3.4 Ansätze für die Modellierung und Regelung des Aufstromverfahrens

Modell- und kinetische Ansätze

Bestandteil von TP3 war die Formulierung eines möglichst allgemeingültigen Modells zur Feststoffvergärung im Aufstromverfahren. Angestrebt wurde die Nutzung des von Batstone et al. (2002) aufgestellten ADM1-Modells, da sich dieses in der Literatur gegenüber anderen Modellen, vor allem wegen geringerer Allgemeingültigkeit oder hoher Substratspezifität, durchgesetzt hat. Das System aus Differentialgleichungen und algebraischen Gleichungen konnte in Matlab implementiert werden. Auch ein

geeigneter DGL-Löser, welcher eine ausreichende Genauigkeit der Ergebnisse bei kurzer Rechenzeit erlaubt, ist gefunden worden.

Als Datengrundlage für die Modellierung dienen die durchgeführten kontinuierlichen Versuche. Diese erlauben die Ermittlung verfahrenstechnischer Kenngrößen des Prozesses ebenso wie die Ableitung für die Modellierung wichtiger kinetischer Parameter der nachzubildenden Stoffumsetzungen.

Im Zuge der Auswertung der Versuchsreihe aus dem Jahre 2011 (Steigerung der Raumbelastung bei Monovergärung von Weizenstroh) wurden kinetische Parameter der anaeroben Vergärung mit Hilfe der CSB-Bilanz aus dem verfahrenstechnischen Gleichgewichtszustand der Systeme gewonnen. Unter der in der Literatur weit verbreiteten Annahme, dass der Aufschluss der Biomasse der geschwindigkeitsbestimmende Schritt auf dem Weg zur Methanbildung ist, wurde die Geschwindigkeitskonstante dieses Schrittes (Hydrolysekonstante k_H) ermittelt (Abb. 38).

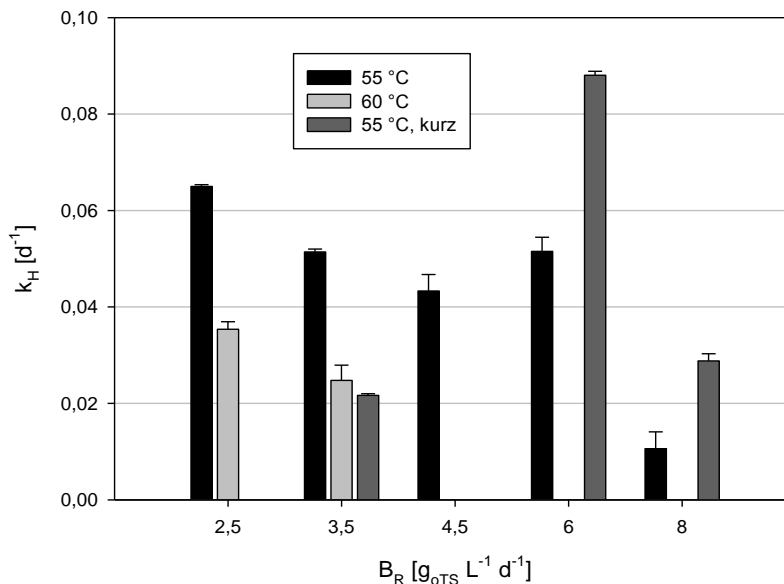


Abb. 38: Hydrolysekonstante k_H in Abhängigkeit von Temperatur, Häcksellänge und Raumbelastung

Dieser Ansatz wird dadurch bestätigt, dass sich die ermittelten Werte in derselben Größenordnung bewegen, wie die in der ersten Versuchsreihe aus der Abklingphase der Aufstromreaktoren ermittelten Hydrolysekonstanten. Generell zeigt sich, dass die Erhöhung der Reaktortemperatur von 55 auf 60 °C einen negativen Einfluss auf den Aufschluss der Biomasse gehabt hat. Eine kürzere Häcksellänge des Strohs hingegen beschleunigte über die vergrößerte Oberfläche den Abbau.

Weitere Schritte der Modellierung konnten im Rahmen des Projekts aus Zeitgründen nicht realisiert werden. Die grundsätzliche Möglichkeit, das Aufstromverfahren mit

einem Modell wie dem ADM1 zu beschreiben, kann nach dem erreichten Erkenntnisstand jedoch als gesichert gelten.

Optische Vermessung der Prozessflüssigkeit

Mit dem Ziel einen fundierten Ansatz zur sensorbasierten Steuerung des Aufstromreaktors aufzufinden, wurde eine Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Chemische Technologie (ICT) in Pfinztal begonnen. Die Hypothese: Mithilfe optischer Verfahren lässt sich der Biogasprozess robust und schnell hinsichtlich der Prozessstabilität kennzeichnen, wodurch aufwendige laborgestützte Analysen wie das Säurespektrum eingespart werden können. Hierzu wurde eine gemeinsam betreute Bachelorarbeit durchgeführt, zum Thema „*Online Spektroskopie von organischen Säuren zur Prozesskontrolle und Optimierung der Biogasproduktion*“. Hierfür wurde vom ATB ein labortechnischer Aufstromreaktor an das ICT ausgeliehen, wo sowohl Online- als auch Offline-Messungen mit UV/VIS- sowie RAMAN-Spektren durchgeführt wurden.

Zur Optimierung der Online-Messungen erfolgte die Konstruktion einer Durchflussmesszelle, um die Biofilmbildung und Partikelabsetzung an der Sonde zu vermeiden. Mithilfe von multivariater Datenanalyse erfolgte die Auswertung. Es zeigte sich, dass sowohl die RAMAN-Spektren eine Korrelation zum Redoxpotenzial (als bekannte Referenz für die Prozessstabilität) besitzen (Abb. 39) als auch die UV/VIS-Spektren (Abb. 40).

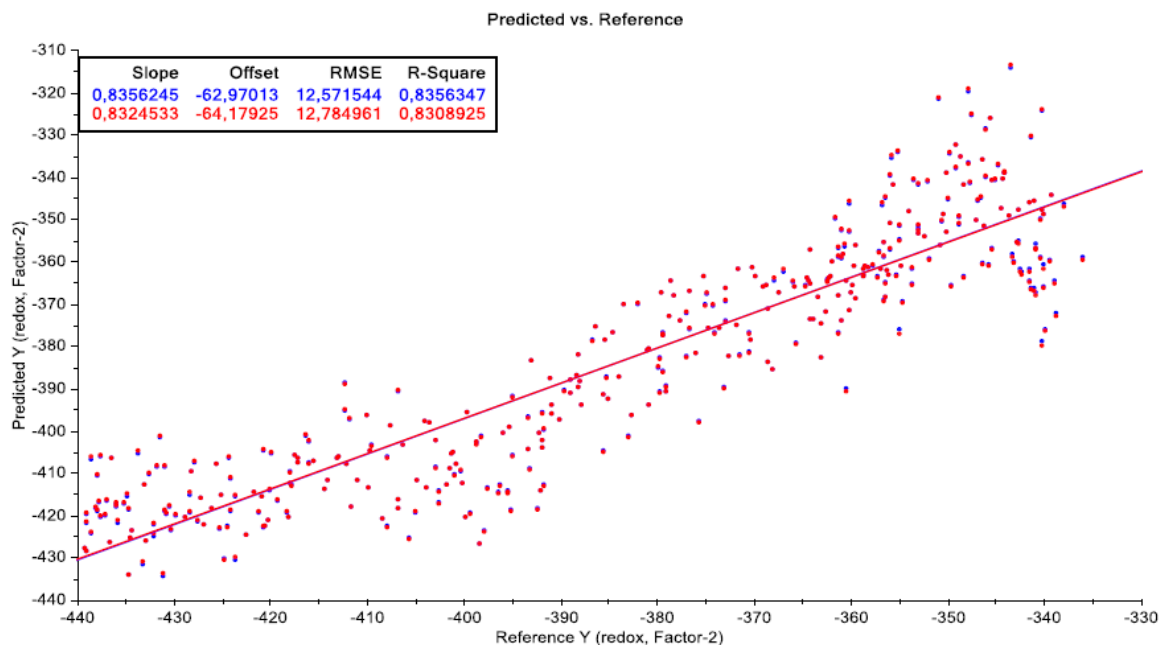


Abb. 39: Korrelation von RAMAN-Spektren mit dem Redoxpotenzial

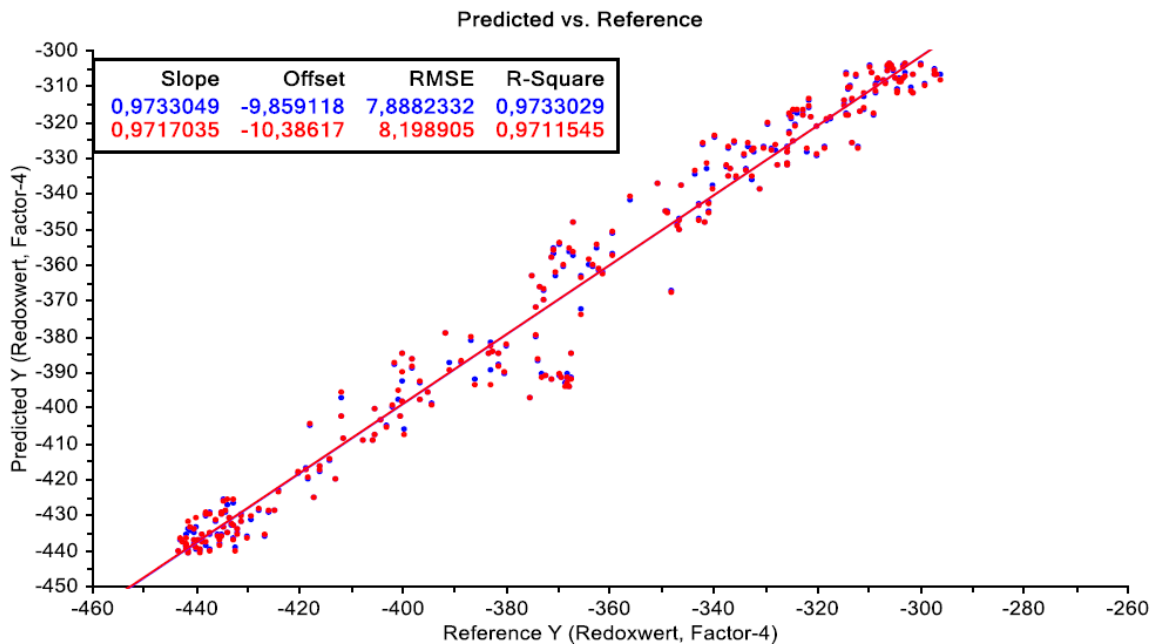


Abb. 40: Korrelation von UV/VIS-Spektren mit dem Redoxpotenzial

Die allgemeine Anwendbarkeit ist sowohl bei der UV/VIS wie auch bei der RAMAN-Spektroskopie gegeben. Durch die hohe finanzielle Investition wird ein RAMAN-Spektrometer in Zukunft eher weniger in Biogasanlagen eingesetzt werden. Ansonsten schneiden die beiden Spektroskopiearten in den ersten Versuchsreihen sehr gut ab. Durch weitere Optimierungen im Prozess können noch bessere Ergebnisse erreicht werden.

2.1.3.5 Vergärung flüssiger Reststoffe aus der hydrothermalen Karbonisierung und der Pyrolyse

Ziel dieses Arbeitspaketes war es, zu analysieren, inwieweit das bei der hydrothermalen Karbonisierung (HTC) anfallende Prozesswasser sowie die bei der Pyrolyse anfallenden Kondensate durch Vergärung zu Biogas umgesetzt werden können.

Vergärung von HTC-Prozessflüssigkeit

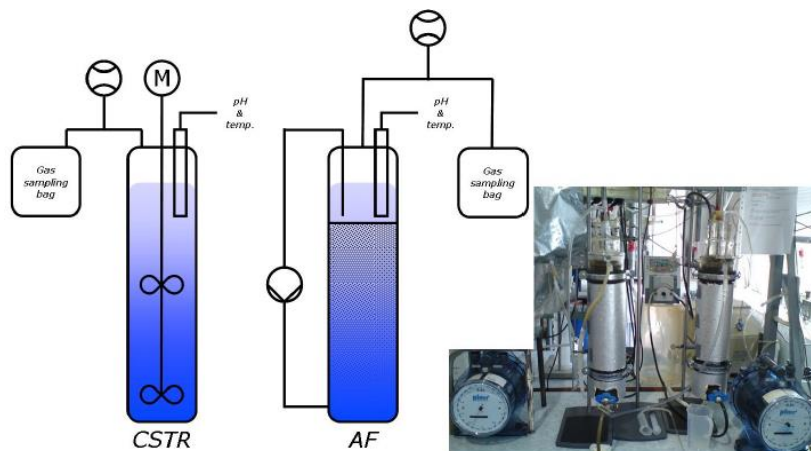
Das Arbeitspaket *Vergärung von HTC-Prozessflüssigkeit* konnte durch die Vergabe einer entsprechenden Masterarbeit (Wirth, 2012) intensiv bearbeitet werden. Im Mittelpunkt der Masterarbeit stand die Erprobung der kontinuierlichen Vergärung von Abwasser einer großtechnischen HTC-Anlage der Firma AVA-CO2 Schweiz AG, Zug und der Vergleich zweier unterschiedlicher Biogasreakortypen, dem Rührkesselreaktor und dem Festbettreaktor. Tab. 9 zeigt die Eigenschaften des HTC-Abwassers.

Tab. 9: Eigenschaften der extern bezogenen HTC-Prozessflüssigkeit

Parameter	Einheit	Wert
pH		3,88
TS	%	2,80
oTS	%	2,21
TOC	g L ⁻¹	15,66
CSB	g L ⁻¹	41,35
Essigsäure	g L ⁻¹	5,26
Propionsäure	g L ⁻¹	0,34
Phenolindex	g L ⁻¹	0,29

Wie aus Tab. 9 hervorgeht, weist die HTC-Prozessflüssigkeit mit einem CSB von über 40 g L⁻¹ eine hochgradige Belastung mit organischen Verbindungen auf sowie einen relativ sauren pH-Wert. Auch Phenole sind enthalten.

Der Versuchsaufbau mit den beiden Reaktoren Rührkesselreaktor (CSTR = Completely stirred tank reactor) und Festbettreaktor (AF = Anaerobic filter) kann aus Abb. 41 entnommen werden.

**Abb. 41:** Versuchsaufbau zur Vergärung von HTC-Abwasser mit Rührkesselreaktor (CSTR) und Festbettreaktor (AF)

Zum Umfang der prozessbegleitenden Analysen gehörten die Erfassung der Gasbildung und der Gaszusammensetzung sowie die Charakterisierung der Fermenterflüssigkeit hinsichtlich der prozessrelevanten Milieuparameter sowie der Leistungskenngrößen CSB- und TOC-Ablaufkonzentration.

Der Gasbildungsverlauf eines 3-monatigen Gärversuchs mit einer konstanten CSB-Raubelastung von $1 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ sowie einer Zieltemperatur von 37 °C ist aus Abb. 42 zu entnehmen.

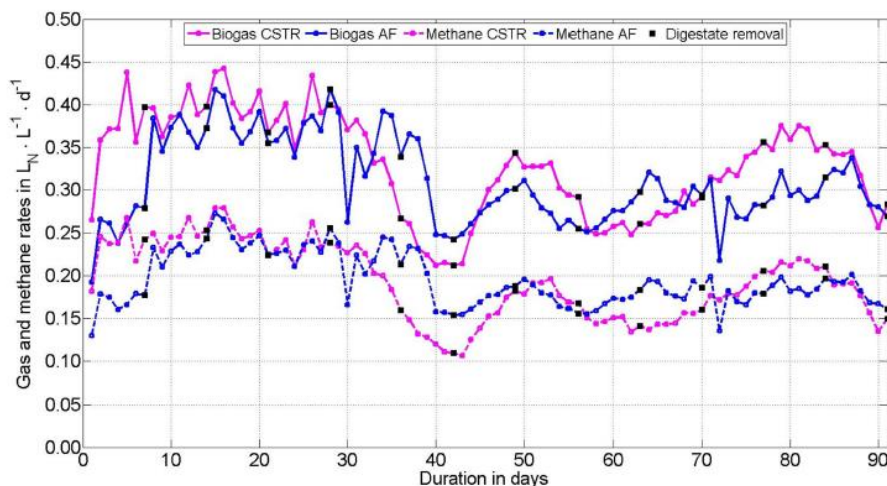


Abb. 42: Verlauf der Biogas und Methanbildungsraten während eines 3-monatigen Gärversuchs mit HTC-Flüssigkeit und einer CSB-Raubelastung von $1 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$

Wie der Verlauf der Gasbildung zeigt, ist die kontinuierliche Vergärung von HTC-Abwasser durchaus möglich. Wie sich herausstellte und anhand der stark schwankenden Werte zu erkennen ist, verlief der Prozess wenig stabil. Es wird vermutet, dass es sich dabei eher um einen Mangel an verfügbaren Nährstoffen handelte und weniger um eine Hemmung durch organische Verbindungen. So bewirkte die Zugabe einer Spurenelementlösung zumindest eine vorübergehende Stabilisierung des Biogasprozesses.

Als grundlegende Schwierigkeit kann der bemerkenswerte hohe Eisengehalt des HTC-Abwassers (500 mg L^{-1}) eingestuft werden. Es kann vermutet werden, dass durch Ausfällung von Schwefel und Phosphor eine Prozessbeeinträchtigung durch Nährstoffmangel hervorgerufen wurde. Bei der Herstellung von HTC-Kohle sollte daher zukünftig auf die Konzentration an Eisen und ggf. anderer Schwermetallgehalte geachtet werden und ggf. Maßnahmen zur Senkung getroffen werden.

Die im ersten Versuch erreichten CSB- und TOC-Abbaugrade lassen mit Werten von 40 - 80 % bzw. 30 - 60 % erwarten, dass der Prozess der Vergärung prinzipiell eine sehr gut geeignete Methode der Abwasserreinigung ist (Abb. 43).

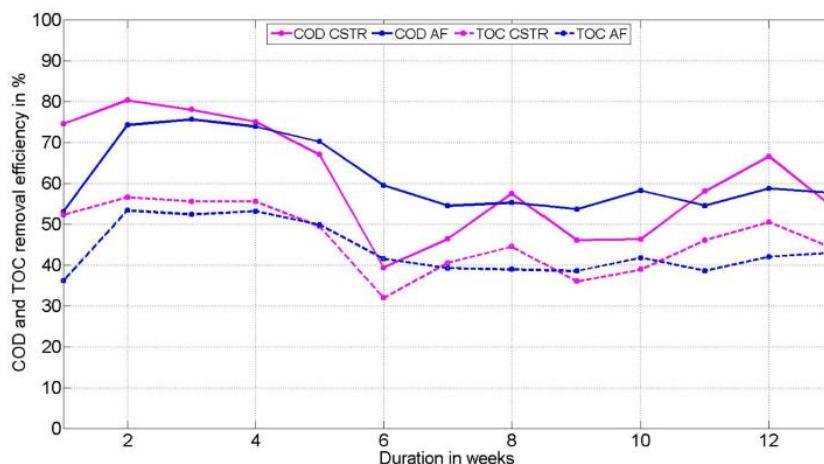


Abb. 43: Verlauf der CSB- und TOC-Abbaugrade während eines 3-monatigen Gärversuchs mit HTC-Flüssigkeit und einer CSB-Raumbelastung von $1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Vergärung von Pyrolysekondensat

Neben der HTC-Prozessflüssigkeit wurden auch die wasserlöslichen Kondensate aus der Pyrolyse auf die Eignung als Biogas-Substrat untersucht. Die Prozessbedingungen, unter denen die Kondensate hergestellt wurden, sind in Kap. 2.1.4.3 näher beschrieben. Die Eigenschaften der Pyrolysekondensate sowie des Inokulums weist Tab. 10 aus.

Tab. 10: Einfluss der Pyrolysetemperatur auf die Materialeigenschaften der wasserlöslichen Kondensate (NA = nicht analysiert)

Parameter	Inokulum	Pyrolysetemperatur			
		330°C	430°C	530°C	
pH	-	7.70	$3,88 \pm 0,08$	$4,31 \pm 0,14$	$4,83 \pm 0,14$
TS	%wt	5.16	$1,31 \pm 0,11$	$1,44 \pm 0,11$	$0,80 \pm 0,31$
VS	%TS	67.3	$95,0 \pm 1,1$	$96,2 \pm 0,8$	$92,3 \pm 3,3$
N_{Kiel}	g kg^{-1}	3.6	NA	NA	NA
$\text{NH}_4\text{-N}$	g kg^{-1}	1.48	NA	NA	NA
CSB	g L^{-1}	61.9	$74,3 \pm 10,1$	$75,6 \pm 8,2$	$48,5 \pm 15,9$
TOC	g L^{-1}	NA	$24,7 \pm 3,8$	$25,2 \pm 2,1$	$14,5 \pm 5,1$
Milchsäure	g L^{-1}	NA	$4,3 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
Essigsäure	g L^{-1}	0.07	$9,2 \pm 1,4$	$8,9 \pm 1,2$	$4,6 \pm 1,1$
Propionsäure	g L^{-1}	<0.02	$1,2 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$

Die Vergärung wurde mithilfe von Spritzenfermentern durchgeführt (s. Kap. 2.1.3.6). Neben den bei unterschiedlicher Pyrolysetemperatur erzeugten Kondensaten wurde auch die CSB-Startkonzentration variiert, in den Stufen 3, 6, 12 und 30 g L^{-1} .

Wesentliche Ergebnisse waren, dass das wasserlösliche Pyrolysekondensat grundsätzlich für die Vergärung geeignet ist. Während die Pyrolysetemperaturen 330 °C und 430 °C ähnlich hohe CSB- und TOC-Abbaugrade besaßen, war bei 530 °C ein deutlicher Rückgang zu beobachten (Tab. 11).

Tab. 11: CSB- und TOC-Elimination des Kondensats in Abhängigkeit der Pyrolysetemperatur und der CSB-Startkonzentration.

Nr.	Probe		Startwerte			End-	Eliminationsrate	
	Menge mL	CSB _s	TOC _s	pH	pH	CSB _s	TOC _s	
		g L ⁻¹	g L ⁻¹	-	-	%	%	
330/3	0,86	3,0	1,0	7,38	7,65	56,1±1,6	52,9±1,7	
330/6	1,71	5,7	1,9	7,20	7,56	51,7±3,6	49,4±3,0	
330/12	4,49	12,0	3,9	6,97	7,54	62,9±1,0	51,2±1,6	
330/30	17,96	30,8	10,1	6,34	5,88	NA	1,2±0,4	
430/3	0,79	3,0	1,0	7,54	7,59	50,5±1,8	49,8±1,2	
430/6	1,59	5,7	1,8	7,25	7,57	53,8±0,6	47,0±0,6	
430/12	4,60	12,4	4,3	7,08	7,63	62,0±2,0	43,6±1,0	
430/30	18,39	31,8	11,1	6,38	6,30	NA	0,4±0,4	
530/3	0,93	3,0	0,9	7,58	7,56	38,6±8,2	40,1±8,6	
530/6	1,86	5,7	1,7	7,48	7,60	32,7±1,8	28,6±2,1	
530/12	9,12	13,1	3,9	7,24	7,55	39,5±3,9	31,2±3,1	
530/30	36,49	26,9	8,1	6,61	6,35	NA	<0,1	

Dieses Verhalten kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass bei höheren Temperaturen zunehmend aromatische Verbindungen auftreten, die von den anaeroben Mikroorganismen nur schwer oder gar nicht umgesetzt werden können. Die Biogasbildung verlief bei höheren CSB-Startkonzentrationen zunehmend verzögert und kam bei 30 g L⁻¹ praktisch zum Erliegen. Grundsätzlich kann jedoch gefolgert werden, dass die Vergärung einen interessanten Ansatz bietet, um vermeintlich hochbelastetes Abwasser aus der Pyrolyse einer Verwertung zuzuführen, auch wenn nach der Vergärung noch eine weitere Aufbereitungsstufe nachgeschaltet werden muss. Weitere Ergebnisse (u. a. zur Biogasbildung) können der Publikation Hübner und Mumme (2015) entnommen werden.

2.1.3.6 Wirkung von Biokohle auf den Biogasprozess

Fermentationsversuche im Labormaßstab

Für eine erste Analyse der Wirkung von Biokohle auf den Biogasprozess wurden Fermentationsversuche im Labormaßstab durchgeführt. Zentrale Fragen betrafen hierbei die Abbaubarkeit von Biokohle sowie die eventuelle Minderung einer Ammoniumhemmung durch Adsorption oder Biofilmbildung an den Kohlepartikeln.

Untersucht wurden zwei unterschiedliche Biokohlen: Eine HTC-Biokohle, hergestellt aus Stroh-Gärrest (230 °C, 6 h) sowie eine Pyrolysebiokohle, hergestellt aus einer Mischung aus Abfallpapierschlamm und Weizenspreu (500 °C, 20 min). Als Referenzvariante wurde zudem ein natürliches Zeolith (Korngröße <100µm) eingesetzt.

Die Versuche wurden nach der VDI-Richtlinie 4630 durchgeführt, unter Verwendung von 100 ml Glasspritzen entsprechend dem Hohenheimer Biogasertragstest (HBT) (Helffrich und Oechsner, 2003). Die Spritzen-Reaktoren wurden mit jeweils 30 g Impfmateriale und 2 g Biokohle befüllt. Als Substrat wurde Cellulose verwendet. Über einen Zeitraum von 63 Tagen wurden die Spritzen bei 42 °C inkubiert. Dabei wurden die Gasbildung sowie die Methankonzentration regelmäßig ermittelt. Nach Versuchsende wurden zudem die Materialeigenschaften der Fermenterflüssigkeit bestimmt. Weitere Details zur Methodik und den Eigenschaften der verwendeten Materialien können dem Artikel *Use of biochars in anaerobic digestion* im Journal *Bioresource Technology* entnommen werden (Mumme et al., 2014).

Der Verlauf der Biogasbildung (Abb. 44) zeigt zunächst, dass weder durch die Pyrolyse- noch durch die HTC-Kohle eine Prozesshemmung sichtbar wurde. Des Weiteren verlaufen Pyrolyse-Kohle und Kontrolle (ohne Additive) annähernd simultan, während die HTC-Kohle zu deutlich höheren Gaserträgen führte.

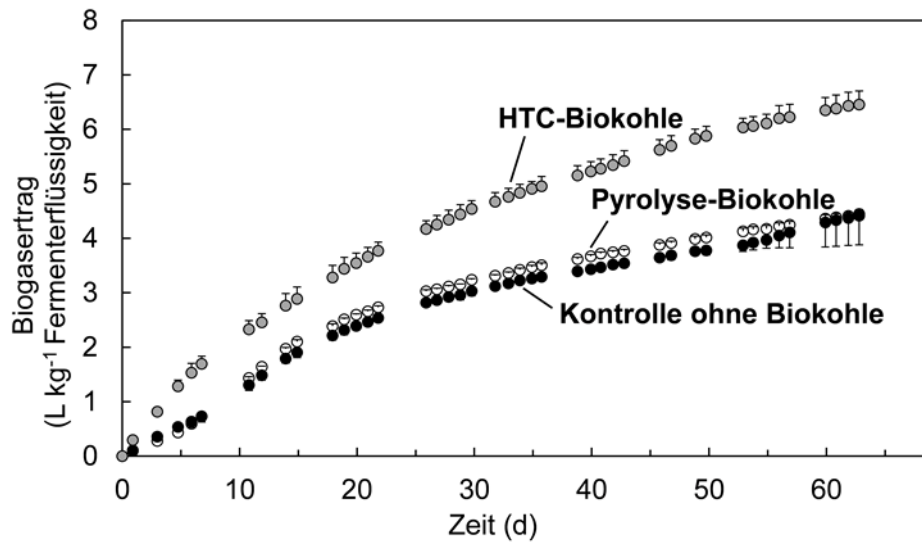


Abb. 44: Wirkung der Zugabe von HTC- und Pyrolyse-Biokohle auf die Biogasausbeute von Fermenterflüssigkeit. Mittelwerte und Standardabweichungen.

Im Ergebnis wurde die Methanausbeute durch HTC-Kohle um 32 % erhöht. Diese Zunahme kann auf einen teilweisen Abbau der HTC-Kohle zurückgeführt werden. Durch Kurvenanpassung an die gemessenen gasförmigen C-Verluste berechnet sich für den Kohlenstoffgehalt der HTC-Kohle eine anaerobe Abbaubarkeit von etwa 10 %. Für die Pyrolyse-Kohle wurde hingegen nur 0,6 % labiler Kohlenstoff ermittelt.

Für die Untersuchung einer potenziell förderlichen Wirkung von Biokohle auf einen ammoniumgehemmten Biogasprozess wurde die Originalkonzentration des Inokulums an Ammonium-N (1626 mg kg^{-1}) in vier Stufen erhöht. Aus der Biogasbildungskurve wurde dann die Abbaukinetik nach einer Reaktion 1. Ordnung bestimmt und danach ermittelt, um wieviel Prozent die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante bei höheren Ammoniumgehalten abnimmt (Abb. 45).

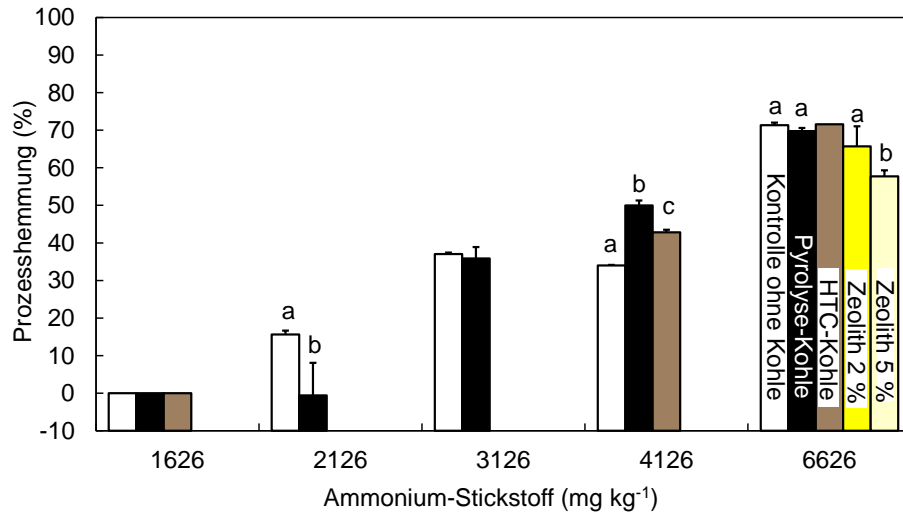


Abb. 45: Wirkung von Pyrolyse- und HTC-Biokohle auf einen unterschiedlich stark gehemmten Biogasprozess (Minderung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante). Mittelwerte und Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede ($P < 0,05$).

Gegenüber der Kontrolle wurde bei einer Ammoniumkonzentration von 2126 mg kg⁻¹ in Anwesenheit von Pyrolysekohle eine signifikant geringere Hemmung festgestellt. Bei höheren Ammoniumkonzentrationen trat diese Wirkung dagegen nicht auf. Bei der Ammoniumkonzentration von 4126 mg kg⁻¹ lag die Hemmung in der Pyrolysekohle-Variante sogar über der Kontrolle. Hierzu ist jedoch anzumerken, dass die Kontrolle eine unerwartet geringe Hemmung aufwies. Diese lag unter der Hemmung der geringeren Ammoniumkonzentration von 3126 mg kg⁻¹. Zu erwarten wäre eine Hemmung, die sich zwischen der Hemmung der Stufen 3126 und 6626 mg kg⁻¹ bewegt hätte. Für dieses Phänomen lässt sich anhand der Daten keine Ursache isolieren.

HTC-Kohle, die nur bei den Ammonium-Stufen 1626 mg kg⁻¹, 4126 mg kg⁻¹ und 6626 mg kg⁻¹ untersucht wurde, zeigte bei 4126 mg kg⁻¹ gegenüber Pyrolysekohle eine leichte aber signifikante Minderung der Hemmung. In der Variante mit der höchsten Ammoniumkonzentration wurde nur durch die Zugabe von 5 % Zeolith eine signifikante Wirkung beobachtet.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass beide Biokohlen die Entwicklung einer archaenreichen Mikroflora fördern und die Menge an Ammonium in der Fermenterflüssigkeit reduzieren können. Weitere Details zu den Ergebnissen können bei Mumme et al. (2014) entnommen werden.

Versuche im kleintechnischen Maßstab

Nach den Versuchen im Labormaßstab wurden die Untersuchungen des Einsatzes von Biokohle bei der Vergärung im kleintechnischen Maßstab fortgesetzt, mit dem Ziel, das Verhalten und die Wirkung der Biokohle bei der kontinuierlichen Substratvergärung zu Biogas zu erproben.

Dabei wurde sowohl eine HTC- als auch eine Pyrolysekohle verwendet. Beide Kohlen wurden aus demselben Gärrest aus der mesophilen Vergärung von Weizenstroh hergestellt. Die HTC-Kohle wurde bei 230 °C und 6 h Haltezeit und die Pyrolysekohle bei 500 °C und 1 h Haltezeit produziert.

Als Fermentertyp wurde ein Gas-Lift-Reaktor eingesetzt (s. Abb. 46). Dieser erlaubt eine besonders schonende und reibungsarme Umwälzung des Fermenterinhalt, sodass die Bildung von Biofilmen nicht gestört wird. Zudem wird die Entstehung von Sink- und Schwimmschichten effektiv verhindert.

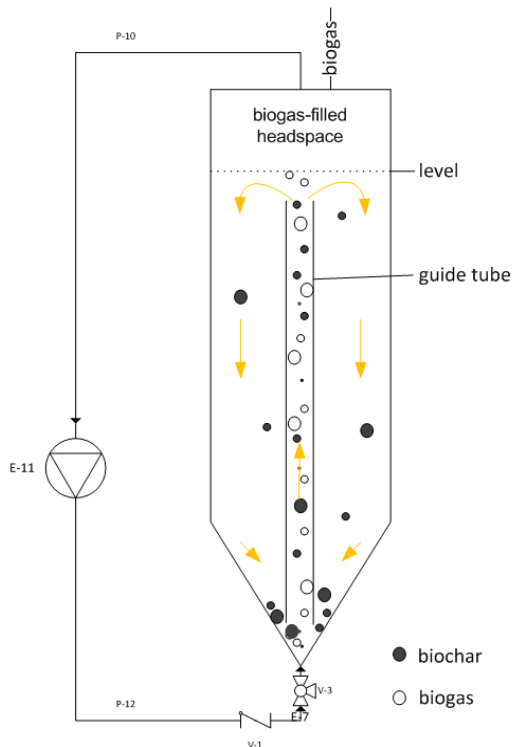


Abb. 46: Gas-Lift-Reaktor zur Erprobung des Einsatzes von Biokohle bei der kontinuierlich-beschickten Biogaserzeugung

Für die Versuche wurden drei Reaktoren aufgebaut – ein 65 L Reaktor (GLR 1) sowie zwei baugleiche Fermenter mit jeweils 35 L Fassungsvermögen (GLR 2, GLR 3). Die Reaktoren wurden einheitlich bei 37 °C, einer Biokohle-Startkonzentration von 89 g L⁻¹ Fermenterinhalt und einer Gaszirkulationsrate von 33 L h⁻¹ betrieben. Über den ebenfalls einheitlichen Versuchszeitraum von 175 Tagen wurde als Substrat ein synthetischer Modell-Mais, zusammengestellt nach Pobeheim et al. (2010), 2-mal wöchentlich in der konstanten Raumbelastung von 0.25 g_{oTS} L⁻¹d⁻¹ zugeführt. Die drei

wesentlichen Gründe für die Verwendung eines synthetisch zusammengestellten Modell-Maises waren die dadurch gleichbleibende Qualität während der Versuchsdauer, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie der verminderte Störeinfluss durch unverdaute Maispartikel bei der anschließenden Analytik.

Die zu testende Biokohle wurde einmalig zum Versuchsstart in alle drei Fermenter gegeben. Der erste Versuch über 175 Tage wurde mit HTC-Kohle durchgeführt, der zweite Versuch im Anschluss mit Pyrolysekohle, ebenfalls über 175 Tage. Biokohle wurde während des Versuchs nicht nachgefüllt. Während der Versuche wurde die Gasbildung kontinuierlich aufgezeichnet und regelmäßig die Eigenschaften des Fermenterinhalt (insb. der Biokohle) chemisch und mikrobiologisch untersucht.

Die Auswertung der aufgezeichneten Biogasbildung (Abb. 47) zeigte über den gesamten Zeitraum für beide Biokohlen eine sehr konstante Biogasbildung.

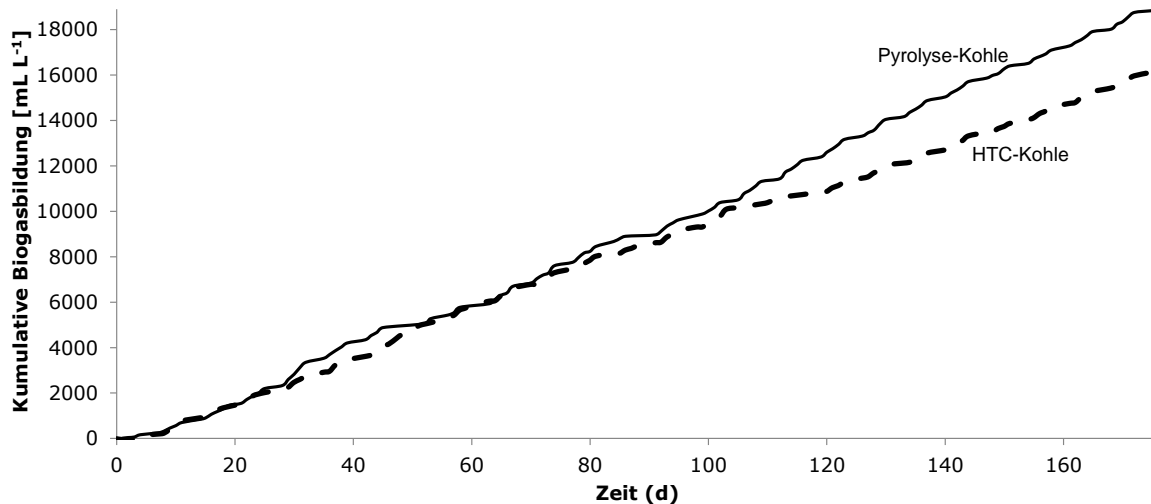


Abb. 47: Verlauf der kumulativen Gasbildung im Gas-Lift-Reaktor (Mittelwert aus GLR 1-3) in Anwesenheit von Pyrolyse- und HTC-Kohle.

Leichte Unterschiede in der Gasbildung treten zwischen den beiden Kohlevarianten erst ab Tag 100 auf. Zum Versuchsende nach 175 Tagen lag die Menge an gebildetem Biogas bei Pyrolysekohle 14 % über der Variante mit HTC-Kohle. Der Verlauf der an den Biokohlen anhaftenden mikrobiellen Biomasse, ermittelt über die Menge an DNA (Abb. 48), zeigt interessante Gegensätze.

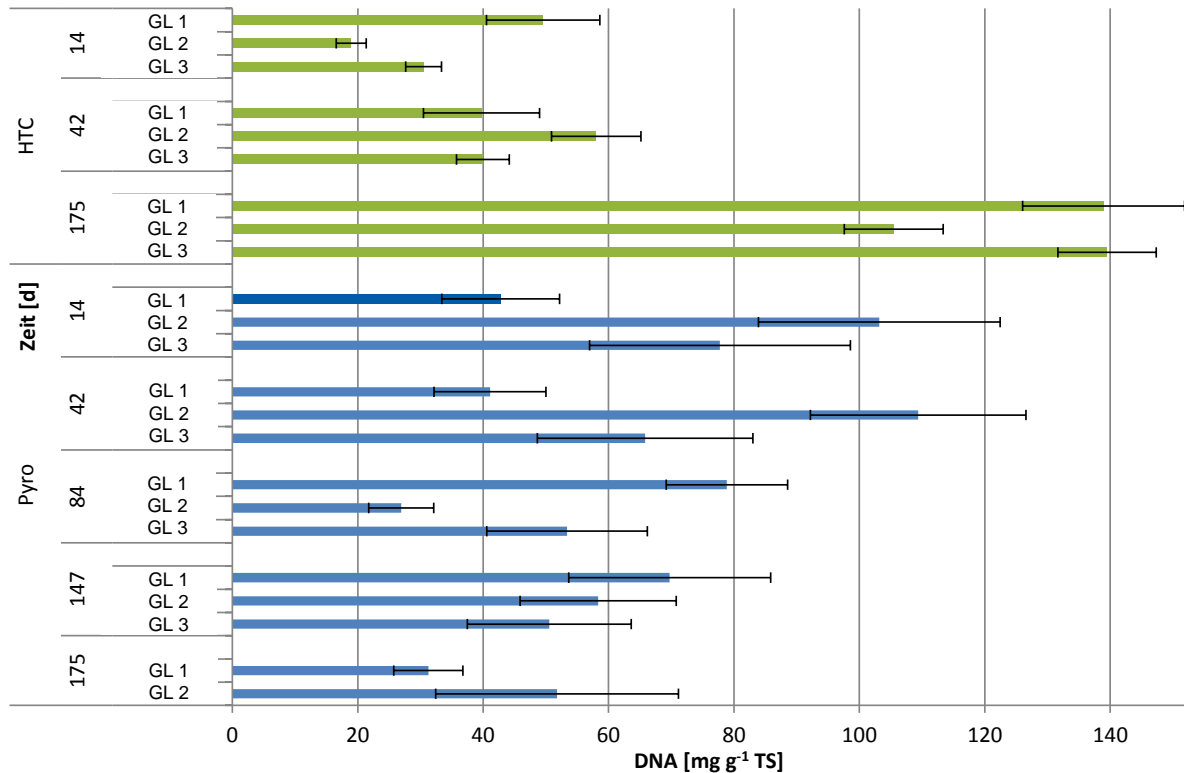


Abb. 48: Wirkung von Pyrolyse- und HTC-Biokohle auf die Menge und den Verlauf anhaftender DNA, untersucht in drei Gas-Lift-Reaktoren (GLR 1-3). Mittelwerte und Standardabweichung.

Zu vermuten ist, dass die HTC-Kohle aufgrund der geringeren Oberfläche (HTC-Kohle: $8,39 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; Pyrolyse-Kohle: $151,231 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) und ggf. anhaftenden organischen Hemmstoffen anfänglich weniger attraktiv für die Biofilmbildung war als die Pyrolysekohle. Der weitere Verlauf kann vermutlich über die unterschiedliche biologische Abbaubarkeit der Kohlen erklärt werden. Pyrolysekohle ist biologisch sehr stabil. Das kann dazu geführt haben, dass die Nährstoffversorgung aus der Biokohle heraus nach anfänglicher Anreicherung durch Adsorption im Laufe des Versuchs nicht mehr ausreichte, um einen Biofilm mit größerer Dicke zu tragen. Von der HTC-Kohle ist, wie bereits gezeigt, eine wesentlich höhere Abbaubarkeit zu erwarten und damit auch eine wesentlich stärkere Nachlieferung von Makro- und Mikronährstoffen. Die leicht geringere Biogasbildung bei Verwendung von HTC-Kohle könnte somit dadurch begründet sein, dass gegenüber der Pyrolyse-Kohle mehr Kohlenstoff für das Zellwachstum und weniger für die Biogasbildung verwendet wurde. Hierzu sind jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Magnetische Kohle

Basierend auf der Aussicht, Biokohlen gezielt als mikrobielle Aufwuchsträger in Biogasanlagen einzusetzen, wurde untersucht, inwieweit magnetische Biokohlen

erzeugt und verwendet werden können. Diese sollten durch magnetische Rückhaltung wesentlich länger im Fermenter gehalten werden können, wodurch sich zum einen stabilere und leistungsfähigere Biofilme ausbilden können und zum anderen die Kosten für den Biokohleeinsatz sinken. Bereits erfolgreich erprobt wurde der Einsatz von magnetischen Glaspartikeln (Ramm et al., 2014). Um die Frage zu analysieren, in wie weit dieses Prinzip auf biokohlebasierte magnetische Aufwuchsträger übertragbar ist, wurden erneut Spritzenversuche entsprechend des HBTs durchgeführt.

Untersucht wurde Biokohle, die basierend auf Cellulose (50 g) und dem weichmagnetischen Stoff Ferrit (33,4 g) mittels HTC (250 °C, 1 h) hergestellt wurde. Die Grundlagen der Herstellung von magnetischer HTC-Kohle werden in Kap. 2.1.4.2 beschrieben. Neben der so hergestellten magnetischen HTC-Kohle (MHC) wurde eine nicht magnetische Referenz-HTC-Kohle (HC) unter ansonsten identischen Bedingungen hergestellt. Weitere Angaben zur Herstellung von MHC und HC können einer aktuellen Veröffentlichung entnommen werden (Reza et al., 2015).

Die Spritzenversuche wurden neben den Biokohlen erneut mit Zeolith (zeolite) als weitere Referenz- und ohne Additive als Kontrollvariante (control) durchgeführt. Die Spritzen wurden einheitlich mit jeweils 30 g Impfmateriale (Gärrest aus früheren Fermentationsversuchen) und 2 g Additiv befüllt. Die Fermentationstemperatur betrug 42 °C bei einer Versuchsdauer von 158 Tagen. Um die Wirkung bei erhöhter Ammoniumkonzentration zu untersuchen, wurden die Spritzenfermenter auf eine hemmende Ammonium-N-Konzentration von 5 g kg⁻¹ angehoben.

Im Gegensatz zum ersten Spritzenversuch wurde in diesem Versuch zu zwei Zeitpunkten (Tag 20 und 87) Rübensilage als Substrat zugeführt. Weitere Angaben zum Versuchs- und Messprogramm können ebenfalls der Publikation Reza et al. (2015) entnommen werden.

Abb. 49 zeigt die wesentlichen Ergebnisse des Versuchs.

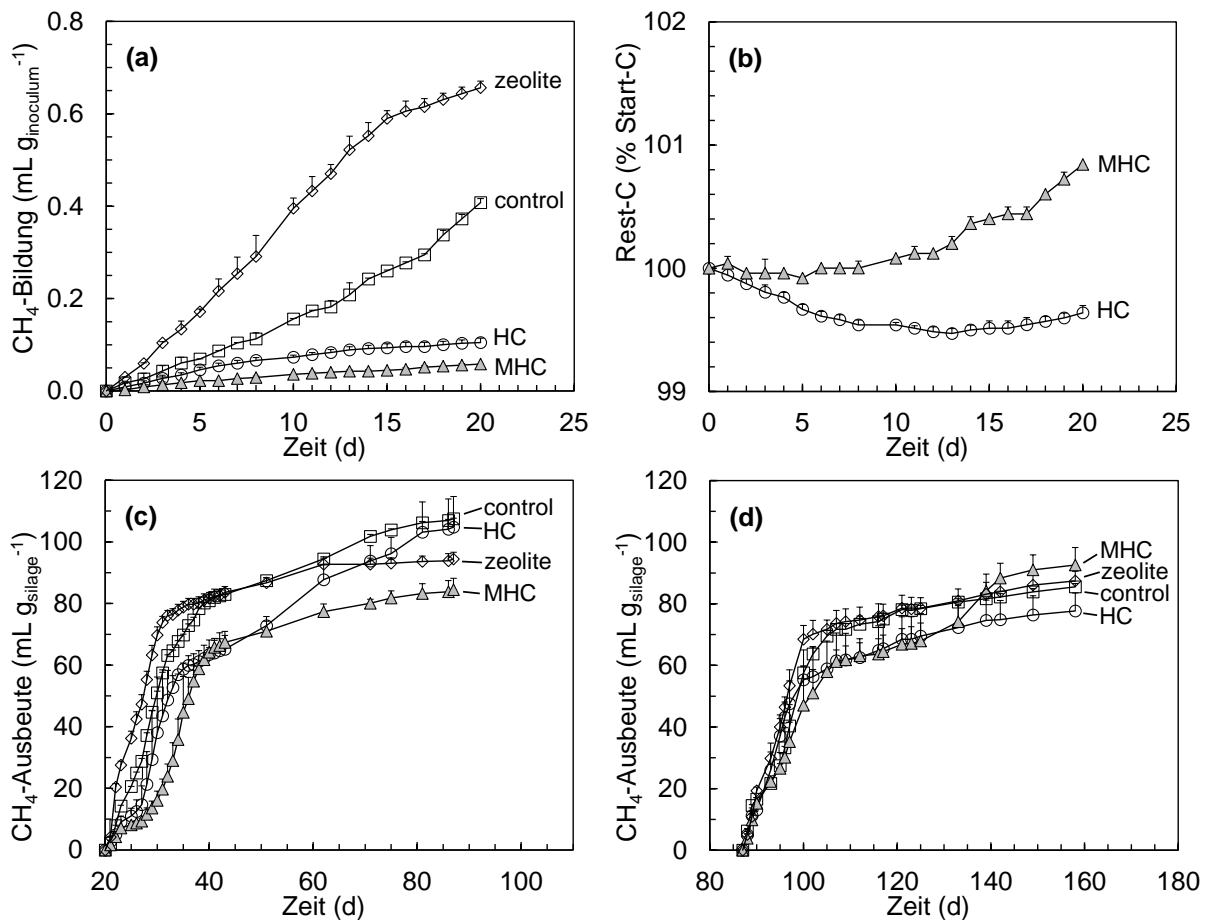


Abb. 49: (a) Einfluss von MHC, HC und Zeolith auf die Methanbildung; (b) C-Abbau von HC und MHC; (c und d) Verlauf der Methanausbeute. Mittelwerte und Standardabweichung.

Aufgrund der hohen Ammoniumkonzentration zeigt die Kontrollvariante ohne Additive anfänglich eine deutliche Hemmung der Methanbildung (Abb. 49a). Zeolith ermöglichte dagegen einen augenscheinlich weit weniger gehemmten Prozessverlauf. Bemerkenswert ist die deutlich stärkere Hemmung durch MHC und HC. Die Ursache hierfür könnte in der Anwesenheit organischer Hemmstoffe bei MHC und HC liegen. Die Bildung entsprechender Stoffe in der HTC und die Kontamination der HTC-Kohlen wurde bereits zuvor beschrieben (Becker et al., 2013). Wie Becker et al. (2013) zeigten, hat die HTC-Temperatur einen erheblichen Einfluss auf die Menge und Zusammensetzung der an der HTC-Kohle anhaftenden organischen Verbindungen. Der Einfluss der Temperatur könnte daher erklären, warum im ersten Spritzen-Gärversuch mit HTC-Kohle, die bei der geringeren Temperatur von 230 °C produziert wurde, keine kohlebasierete Hemmung beobachtet wurde.

Der starke Einfluss der Temperatur zeigte sich auch in Bezug auf die biologische Stabilität von MHC und HC, die anhand der gasförmigen C-Verluste (CO₂ und CH₄) gegenüber der Kontrolle ermittelt wurde (Abb. 49b). Es kann angenommen werden,

dass die gegenüber dem ersten Versuch deutlich höhere Stabilität sowohl auf Hemmeffekte als auch auf eine geringere biologische Verfügbarkeit der Kohle zurückzuführen ist. Die mit höherer HTC-Temperatur ansteigende biologische Stabilität wurde bereits zuvor in bodenbasierten Inkubationsversuchen beobachtet (s. Kap. 2.1.4.2).

Im weiteren Verlauf des Versuchs nimmt die Hemmung durch die HTC-Kohle deutlich ab und es werden Methanausbeuten aus der Rübensilage in ähnlicher Höhe wie in der Kontrolle erreicht (Abb. 49c, d). Es kann angenommen werden, dass die hemmenden organischen Stoffe entweder abgebaut wurden oder sich die Mikroflora daran adaptierte.

Die nach Abschluss des Versuchs durchgeführte chemische Analyse zeigt einen deutlichen Rückgang der Ammoniumkonzentration, sowohl in der flüssigen als auch der festen Phase. Dies kann zurückgeführt werden auf mikrobielles Wachstum. Mikroskopische Aufnahmen der MHC-Oberflächen zeigen einen sehr gleichmäßigen Biofilmbewuchs. Weitere Ergebnisse des Versuchs können aus der Publikation Reza et al. (2015) entnommen werden.

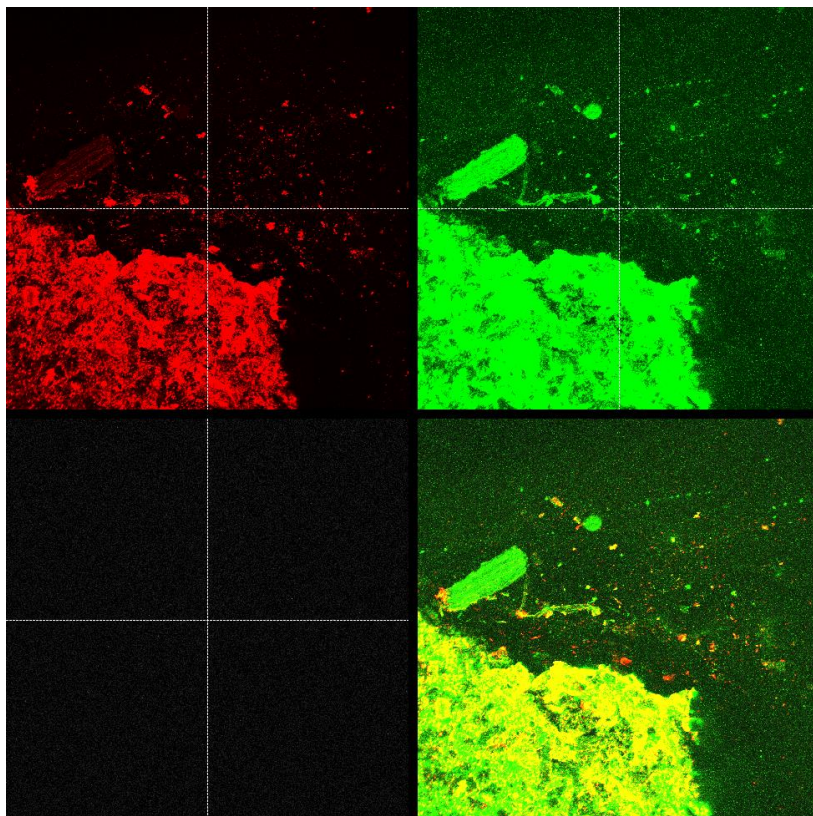


Abb. 50: Laser-scanning Mikroskop-Aufnahme (LSM) von MHC (200-fach, rot = DNA, grün = Extrazelluläre polymere Substanzen).

Fazit

Die Versuche zeigen, dass Biokohlen aus HTC und Pyrolyse generell geeignet sind, um in Biogasanlagen nützliche Funktionen zu erfüllen. Hierbei ist vor allem die Biofilmbindung von Interesse. Im Rahmen der Versuche nicht gezeigt werden konnte, inwieweit diese Biofilmbildung tatsächlich die Stabilität und Leistungsfähigkeit der Biogasbildung erhöht. Hierzu sind weitere Arbeiten erforderlich. Da die Verwendung von Biofilmen in anaeroben Reaktoren jedoch seit langem zum bewährten Stand der Technik gehört, kann prinzipiell von einer wertgebenden Anwendung der Biokohlen ausgegangen werden. Aus diesem Grund wurden die Herstellung von magnetischer HTC-Kohle und der Einsatz von magnetischer HTC-Kohle in Biogasanlagen jeweils zum Patent angemeldet. Insgesamt kann jedoch von einem noch erheblichen Forschungsbedarf ausgegangen werden, v. a. in Bezug auf die Herstellung von Biokohlen mit idealen Besiedlungseigenschaften sowie, in Bezug auf magnetische Kohle, die Rückhaltung der Partikel im Fermenter.

2.1.4 TP4 Thermochemische Karbonisierung und Systemintegration

Ziele und Aufgaben von TP4 sind der Aufbau und der Betrieb der Anlagen zur Bereitstellung von Probenmaterial und Daten für andere Teilprojekte (TP2, TP3 und TP5), experimentelle und theoretische Arbeiten zur Integration von Energie- und Stoffströmen im Gesamtverfahren sowie die Optimierung der thermochemischen Wandlung von Gärresten zu Biokohle hinsichtlich der Eignung für die Bodenverbesserung.

2.1.4.1 Aufbau und Betrieb der Versuchsanlagen

Plangemäß wurden Anlagen sowohl zur Pyrolyse als auch zur HTC am ATB aufgebaut. Hierfür wurde am ATB ein eigenes Biokohletechnikum eingerichtet.

HTC-Anlagen

Der zunächst beschaffte gerührte labortechnische HTC-Reaktor (Serie 4520 der Firma Parr Moline, IL, USA) mit einem Fassungsvermögen von 1 L konnte zeitnah zum Projektstart in Betrieb genommen werden. Abb. 51 zeigt den Aufbau mit den Komponenten Gestell (1), Kopfteil (2), Druckbehälter (3), Split-Ring (4), Widerstandsheizung (5) und dem zugehörigen Controller (6).



Abb. 51: Aufbau des labortechnischen 1-L HTC-Reaktors

Erste Versuche zur hydrodermalen Karbonisierung (HTC) bestätigten zeitnah dessen prinzipielle Anwendbarkeit für Gärreste. Aufgrund unvorhergesehener technischer Restriktionen lag die Produktionskapazität für die HTC-Biokohle jedoch deutlich unter den Erwartungen. So beträgt das nutzbare Fassungsvermögen nur 600 mL. Zudem erlauben die sehr langen Aufheiz- und Abkühlzeiten im Regelfall nur einen Durchlauf pro Tag. Die maximale tägliche Produktion beläuft sich auf etwa 100 g trockene Biokohle. Da für die Folgeuntersuchungen zur Sorptionsfähigkeit und Bodenwirkung Mindestmengen im Kilogramm Bereich vorgesehen waren, wurde beim PtJ die Anschaffung einer zweiten größeren HTC-Anlage im Technikumsmaßstab beantragt, welche auch genehmigt wurde.

Diese Technikums-HTC (mit einem Gesamtvolumen von etwa 19 L) konnte planmäßig im Juli 2011 nach erfolgreicher Abnahme durch eine zugelassene Überwachungsstelle in Betrieb genommen werden (s. Abb. 52).



Abb. 52: Technikumsanlage zur hydrothermalen Karbonisierung (HTC)

Im Jahr 2013 wurde aufgrund neuer Erkenntnisse eine Vorrichtung zur Probenahme der HTC-Flüssigkeit im laufenden Betrieb ergänzt. Diese Aufrüstungsmaßnahme wurde erforderlich, nachdem festgestellt wurde, dass sich neben der gewünschten Biokohle diverse lösliche organische Verbindungen, wie Phenole, im HTC-Prozess bilden, die teilweise erhebliches Schadpotenzial für den angestrebten landwirtschaftlichen Einsatz der HTC-Biokohle aufweisen (Becker et al., 2014). Gleichzeitig bilden sich im HTC-Prozess jedoch auch verschiedene als Basis- und Feinchemikalien bekannte werthaltige Stoffe, wie z. B. 5-HMF (Reza et al., 2014). Das Ziel der eingerichteten Probenahmeverrichtung war, ein genaueres Bild über die Entstehungsprozesse und -dynamiken einzelner Stoffe und Stoffgruppen im HTC-Prozess zu bekommen, verbunden mit der Frage, wie der HTC-Prozess gestaltet werden muss, um möglichst schadstofffreie Biokohle zu erhalten bzw. in wie weit sich der HTC-Prozess eventuell um eine integrierte Gewinnung hochwertiger Chemikalien im Sinne einer Bioraffinerie erweitern lässt.

Die aufgebaute Vorrichtung (Abb. 53 und Abb. 54) ermöglichte es, während des laufenden Betriebs unter erhöhtem Druck und erhöhten Temperaturen Proben des Reaktionsmediums zu entnehmen.

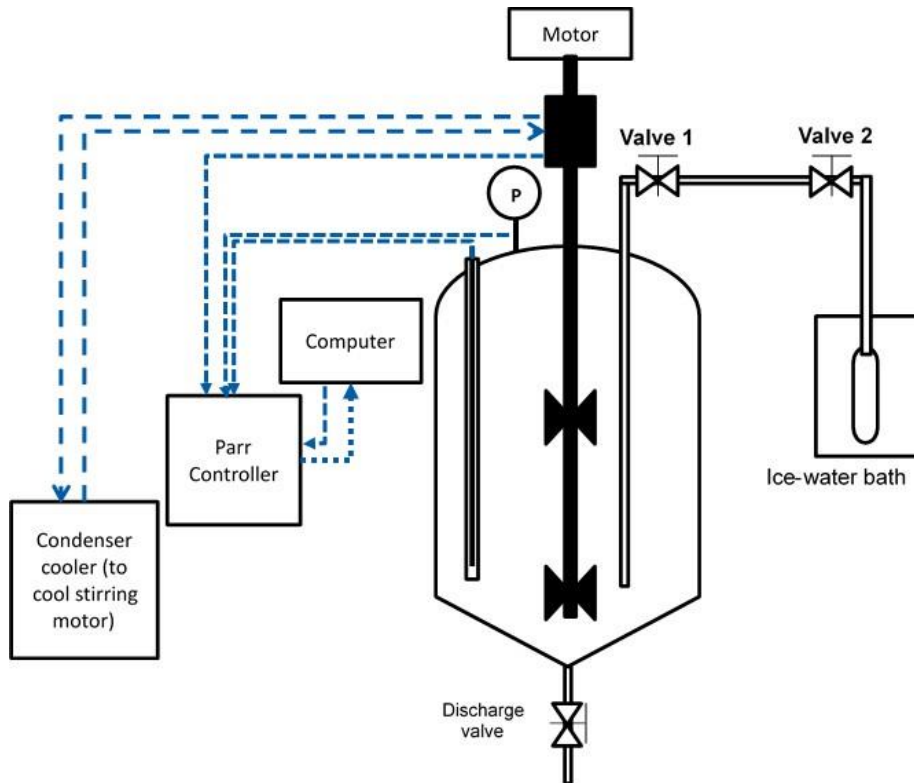


Abb. 53: Schematische Darstellung des 19 L HTC-Reaktors nach Aufrüstung durch eine Apparatur zur Beprobung des Reaktorinhalts im laufenden Betrieb



Abb. 54: Probenahmebehälter für den HTC-Reaktorinhalt

Pyrolyseanlage

Für die Durchführung von Pyrolyseversuchen wurde plangemäß ein Pyrolysedrehrohr (Abb. 55) der Firma HTM Reetz (Berlin) beschafft (Model: Klappofen LK1100).



Abb. 55: Drehrohrpyrolyseofen

Es zeigten sich jedoch bald einige technische Probleme, die die Inbetriebnahme der Anlage erheblich verzögerten. So erwies sich das Dosierfördersystem als ungeeignet für das vorgesehene Substrat (getrocknete Gärreste aus der anaeroben Vergärung von Stroh). Weitere Probleme bestanden in der Bildung von Materialverstopfungen im Rohr, einem durch zu hohe mechanische Belastung gesplitterten Ende des Quarzrohres sowie der unerwünschten Kondensation von flüchtigen organischen Verbindungen (u. a. PAKs) auf der Biokohle. Nach zahlreichen Umbauten konnte das Pyrolysedrehrohr erst im Jahr 2014 vollständig in Betrieb genommen werden. Aufgrund dieser Verzögerung wurde die Erzeugung von Pyrolyse-Biokohle aus Gärresten nicht im gleichen Umfang betrachtet wie die HTC-Kohle und daher auf die Funktion als Referenzvariante reduziert.

2.1.4.2 Wandlung von Gärrest mittels HTC

Ziel dieses Arbeitspaktes war es, die hydrothermale Karbonisierung von Gärresten hinsichtlich der Prozess- und Produktcharakteristika zu untersuchen. Hierzu wurden sowohl experimentelle Arbeiten durchgeführt als auch modellbasierte Analysen. Im Vordergrund stand dabei die Anwendung der HTC-Biokohle zur Bodenverbesserung.

Einfluss der Prozessbedingungen auf die Kohle-Ausbeute und den Grad der Karbonisierung

Basierend auf dem Einsatz von Gärrest aus Maissilage (pH: 8,72; TS: 15,3 %_{wt}; oTS: 88,5 %_{TS}; Stickstoff: 2,87 %_{TS}) wurden systematische HTC-Versuche zum

Einfluss der Parameter Temperatur (190, 230 und 270 °C), Start-pH (3, 5 und 7) und Reaktionsdauer (2, 6 und 10 h) durchgeführt. Als experimentelle Grundlage wurde hierfür der labortechnische 1 L HTC-Reaktor eingesetzt. Um die Anzahl der erforderlichen Einzelversuche zu reduzieren, wurde ein teilfaktorieller Versuchsplan nach Box-Behnken verwendet. Die Anzahl der HTC-Experimente wurde dadurch von 27 auf 15 reduziert, einschließlich 3 Center-Punkt Läufe. Als Referenzvariante wurde neben dem Gärrest mikrokristalline Cellulose verwendet.

Vor jedem HTC-Versuch wurde der Gärrest (302 g) mit 198 g Wasser versetzt, wodurch eine einheitliche C-Konzentration von 42,3 g L⁻¹ eingestellt wurde. Die Mischung wurde anschließend mit dem Mixer GM200 (Retsch, Germany) homogenisiert, in Stufen von 5000 U min⁻¹ (2 min) und 7000 U min⁻¹ (2 min). Um die vorgesehene pH-Stufe zu erreichen, wurde der Mischung gezielt Zitronensäure zugeführt. Während der HTC wurde der Reaktorinhalt kontinuierlich gerührt bei 90 U min⁻¹. Je nach Zieltemperatur wurde diese nach 60 – 90 min erreicht. Anschließend wurde diese entsprechend der vorgegebenen Zeit gehalten. Danach wurde die Heizung ausgeschaltet und der Heizmantel entfernt. Die Abkühlung dauerte ca. 15 Stunden. Der HTC-Schlamm wurde anschließend durch einen Papierfilter in eine feste Phase (HTC-Kohle) und eine flüssige Phase (HTC-Flüssigkeit) getrennt. Die feuchte HTC-Kohle wurde anschließend für 48 Stunden per 60 °C getrocknet. Das Messprogramm umfasste die Ausbeute an Biokohle, die elementare Zusammensetzung, den pH-Wert, den Aschegehalt sowie die Porosität. Eine detaillierte Beschreibung des Versuchs- und Messprogramms kann der Publikationen Mumme et al. (2011) entnommen werden.

Die wichtigsten Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

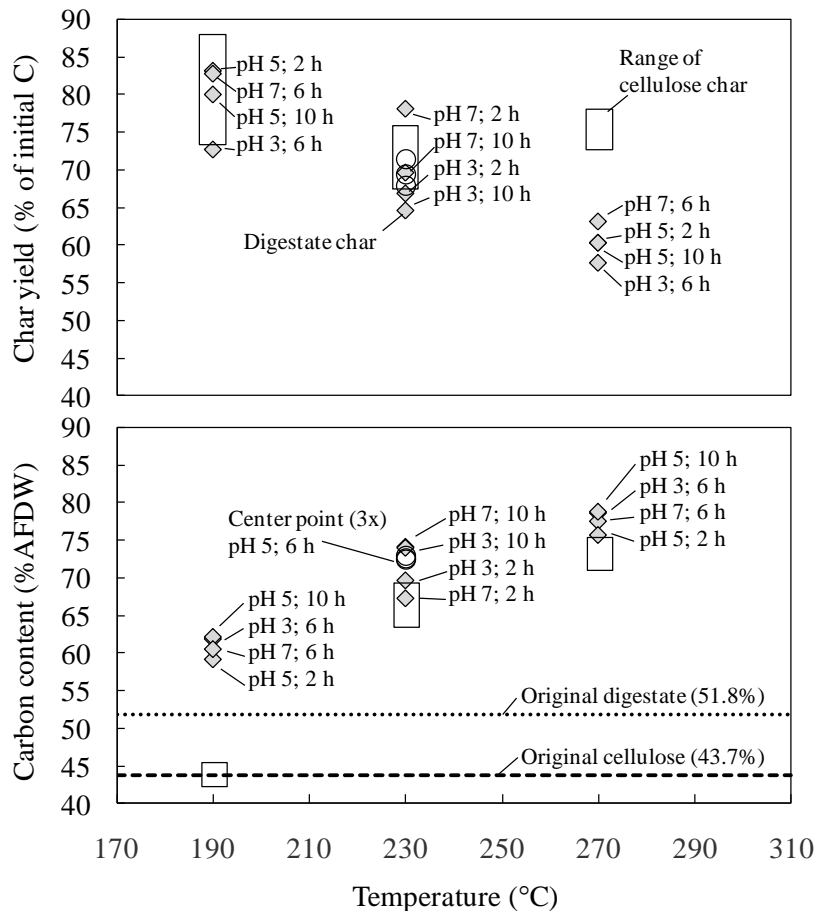


Abb. 56: Einfluss von Prozesstemperatur, Start-pH und Reaktionszeit auf die Ausbeute an HTC-Biokohle und dessen Kohlenstoffgehalt beim Einsatz von Gärrest und Cellulose

Wie Abb. 56 zeigt, ist die Temperatur der bei weitem wichtigste Einflussfaktor sowohl auf den Ertrag an HTC-Biokohle als auch auf den Kohlenstoffgehalt der HTC-Biokohle. Beim Umsatz von Gärrest ist deutlich zu erkennen, dass sich eine zunehmende Temperatur erhöhend auf den Kohlenstoffgehalt und vermindern auf den Ertrag auswirkt. Beim Vergleich der gärrest- und zellulosebasierten HTC fällt auf, dass die Cellulose als Referenzmaterial erst bei höheren Temperaturen karbonisiert. So war bei einer Temperatur von 190 °C keine Erhöhung des Kohlenstoffgehaltes festzustellen. Ein zweiter deutlicher Unterschied betrifft den Ertrag bei einer Temperatur von 270 °C. Während der auf Kohlenstoff bezogene Ertrag an HTC-Biokohle für Gärrest zwischen 190 und 270 °C einen näherungsweise linearen Rückgang beschreibt, scheint der zellulosebasierte Ertrag nach einem Rückgang bei 230 °C wieder zuzunehmen. Die Wiederholung einzelner Versuche (Center Points) ergab in Bezug auf Ausbeute und Kohlenstoffgehalt sehr ähnliche Werte. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kann damit als gesichert eingestuft werden.

Neben dem Kohlenstoffgehalt ist für die Charakterisierung von Inkohlungsprozessen das atomare H/C und O/C-Verhältnis der Biokohle von hoher Aussagekraft. Überträgt man die experimentellen Ergebnisse in das so genannte Van Krevelen Diagramm, so zeigen sich für Gärrest und Cellulose grundlegend verschiedene Muster der Inkohlung (Abb. 57).

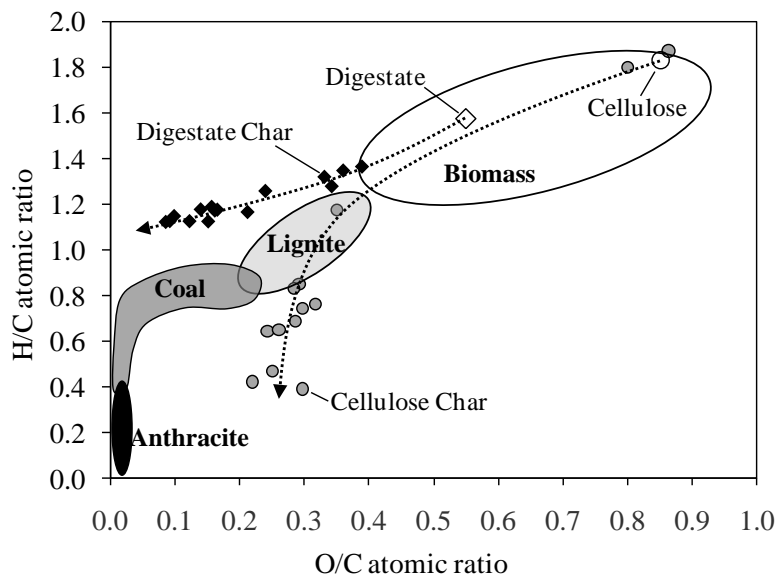


Abb. 57: Veränderung der atomaren Zusammensetzung von Cellulose und Gärrest im Van Krevelen Diagramm. Pfeile markieren zunehmend harsche Prozessbedingungen (höhere Temperatur, längere Haltezeit).

Hinsichtlich der cellulosebasierten Biokohle wurden bei Temperaturen von 230 °C und 270 °C Verhältnisse an H/C (0,39 – 1,17) und O/C (0,22 – 0,35) gemessen, die bereits von anderen Gruppen berichtet wurden (Schuhmacher et al., 1960; Sevilla und Fuertes, 2009). Die Gärrest-Karbonisierung führte dagegen zu atomaren Proportionen (1,13 – 1,26 bzw. 0,09 – 0,24), die bislang nicht berichtet wurden. Eine Studie von Cao et al. (2011), bei der Schweinegülle bei 250 °C und 20 h hydrothermal karbonisiert wurde, ergab trotz einer zum Gärrest ähnlichen Beschaffenheit noch deutlich abweichende Werte (H/C = 1,50, O/C = 0,57). Festzustellen ist damit, dass die HTC vom Gärrest mit einer starken Decarboxylierung einhergeht, während die Dehydratisierung vergleichsweise schwach ausfällt. Die Ursache hierfür lässt sich weder anhand der vorliegenden experimentellen Daten noch anhand des Literaturstandes eindeutig identifizieren. Für die Prozess- und Produktoptimierung der HTC von Gärrest ist der grundlegende chemische Konversionsprozess jedoch von entscheidender Bedeutung und erfordert daher eine weitergehende Analyse.

Eine nähere Analyse der untersuchten Einflussfaktoren Prozesstemperatur q_p , Haltezeit t_r und pH auf die HTC von Gärrest erlaubt das Hilfsmittel der Regressions-

analyse. Geht man von einer einfachen linearen Regression aus, so können der Kohlenstoffgehalt der Kohle (w_C) und der Ertrag an festem Kohlenstoff (y_C) wie folgt beschrieben werden:

$$w_C = a + b \cdot \mathcal{G}_p + c \cdot t_r + d \cdot pH \quad (1)$$

$$y_C = a + b \cdot \mathcal{G}_p + c \cdot t_r + d \cdot pH \quad (2)$$

Wobei a der Schnittpunkt mit der Y-Achse und b , c , d die einzelnen Regressionskoeffizienten sind. Basierend auf dem $\alpha = 0.05$ Wahrscheinlichkeitsniveau waren alle Einflussfaktoren als signifikant einzustufen, mit Ausnahme des Einflusses des pH-Werts auf den Kohlenstoffgehalt. Dies führte unter Berücksichtigung aller signifikanten Größen zu folgenden beiden Gleichungen:

$$w_C = -38.4 + 0.21\mathcal{G}_p + 0.54t_r \quad (3)$$

$$y_C = 184 - 0.24\mathcal{G}_p - 0.44t_r + 2pH \quad (4)$$

In Bezug auf den Kohlenstoffgehalt zeigen sich in Eq. 3 positive Korrelationen mit Temperatur und Haltezeit. Die Ausbeute an festem Kohlenstoff korreliert dagegen mit diesen beiden Faktoren negativ, während der pH-Wert positiv einfließt. In Bezug auf die Cellulose wurde als einzig signifikante Beziehung die Korrelation von Kohlenstoffgehalt und Temperatur aufgefunden. Die damit relativ gut zu parametrisierende HTC-Wandlung von Gärrest erscheint sehr beachtlich, da Gärrest weitaus komplexer aufgebaut ist als Cellulose. Dies zeigt weiter, dass die HTC von Gärrest vermutlich mit relativ einfachen Gleichungen ausreichend genau modelliert werden kann. Weitere Details zu den Ergebnissen können der Publikation Mumme et al. (2011) entnommen werden.

Bodenbezogene Eigenschaften der HTC-Kohle: Nährstoffe, Oberfläche, Schadstoffe und Kohlenstoffstabilität im Boden

Nachdem erste Versuche die generelle Machbarkeit der Karbonisierung von Gärresten gezeigt haben, wurde der Fokus auf die Beschreibung und Optimierung der Reaktionsparameter für den geplanten Einsatz der HTC-Kohle als Bodenverbesserer gelegt. Wichtig für die Beurteilung des Gesamtkonzepts ist dabei u. a. das Verhalten der Nährstoffe Stickstoff und Phosphor.

Wie auch bei der Kohleausbeute und -zusammensetzung erwies sich die Temperatur als wichtiger Einflussparameter auf den Gehalt der untersuchten Nährstoffe in der produzierten HTC-Kohle (s. Abb. 58). Dabei zeigten sich bedeutende Unterschiede zwischen unterschiedlichen Ausgangsmaterialien (Stroh, Gärreste aus Stroh, Pappelholz). Insgesamt war bei der Bilanzierung zu beobachten, dass sich die

prozentuale Verteilung von Stickstoff und Phosphor zwischen der festen und flüssigen Phase jedoch nicht signifikant änderte.

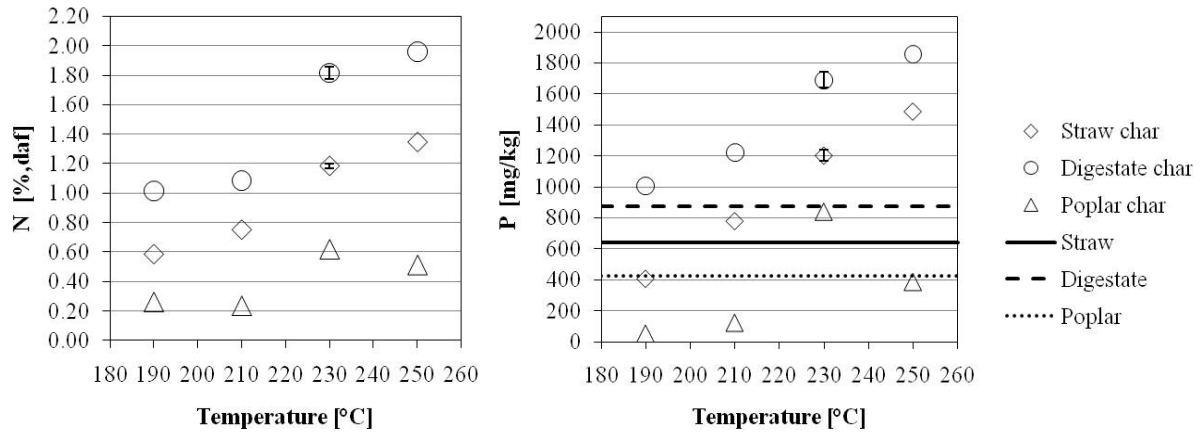


Abb. 58: Gehalt produzierter HTC-Kohle an elementarem Stickstoff und Phosphor für unterschiedliche Ausgangsmaterialien (Funke et al., 2013)

Untersucht wurde auch der Einfluss der Temperatur bei der hydrothermalen Karbonisierung auf die Oberfläche der produzierten Kohle. Diese dient als Indiz für ihre Adsorptionskapazität und ist daher ein wichtiger Parameter für den Einsatz im Boden (Adsorption von Nährstoffen und Wasser). Entgegen der Tatsache, dass bei der Pyrolyse die Oberfläche im Vergleich zur Ausgangsbiomasse um mehrere Größenordnungen steigen kann, ist bei der hydrothermalen Karbonisierung zwar eine signifikante Vergrößerung zu beobachten, die sich aber auf den Temperaturbereich um 200 °C beschränkt (s. Abb. 59). Im Vergleich zur Oberfläche von Pyrolysekohle oder gar Aktivkohle ist die Oberfläche von HTC-Kohle als sehr klein einzustufen.

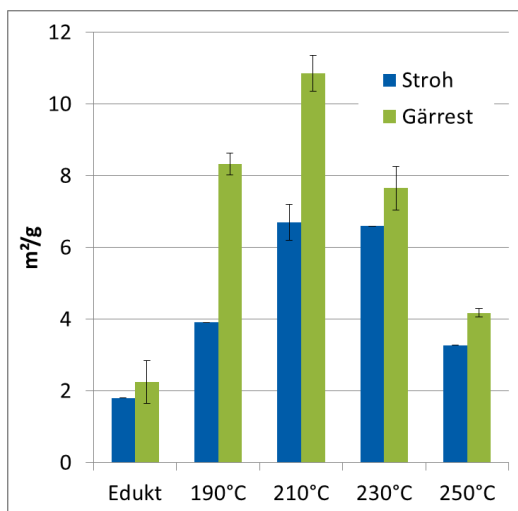


Abb. 59: BET-Oberfläche produzierter HTC-Kohle in Abhängigkeit von der Prozesstemperatur (Koon, 2011)

Von entscheidender Bedeutung für den Einsatz im Boden ist der Gehalt der Kohle an potenziellen Schadstoffen. Hierbei ist zwischen anorganischen und organischen Schadstoffen zu unterscheiden. Während bei der Karbonisierung keine anorganischen Schadstoffe entstehen können, sondern vielmehr ihre Verteilung zwischen den Produkten beeinflusst wird, können signifikante Mengen organischer Schadstoffe bei den angewandten Produktionsbedingungen entstehen. Es müssen zwar sämtliche Schadstoffe genauestens betrachtet werden; da jedoch bei dem im Projekt APECS eingesetzten Substrat (Stroh, Rapsschrot) keine erhöhten Belastungen anorganischer Schadstoffe zu erwarten sind, wurde hier zunächst der Fokus auf die organischen Schadstoffe gelegt.

In Kooperation mit der Bundesanstalt für Materialforschung (BAM) wurde im Rahmen einer Masterarbeit unterschiedlich hergestellte HTC-Kohle analysiert. Dabei konnte eine signifikante Abhängigkeit der Schadstoffkonzentration von der Temperatur festgestellt werden (s. Abb. 60). Je nach untersuchter Substanz sind dabei gegenläufige Trends zu beobachten, was eine Optimierung der Reaktionsbedingungen erschwert. Da insbesondere Furaldehyd als hoch reaktives Zwischenprodukt bei der hydrothermalen Karbonisierung gilt, bleibt zu prüfen, ob durch eine Erhöhung der Verweildauer dessen Konzentration deutlich verringert werden kann, ohne zusätzlich Phenol und Cyclopentene zu produzieren. Die Arbeit umfasste darüber hinaus eine Auflistung weiterer organischer Substanzen in bis dato nicht bekannter Tiefe, auf die hier im Detail nicht eingegangen werden kann (Helmis, 2011).

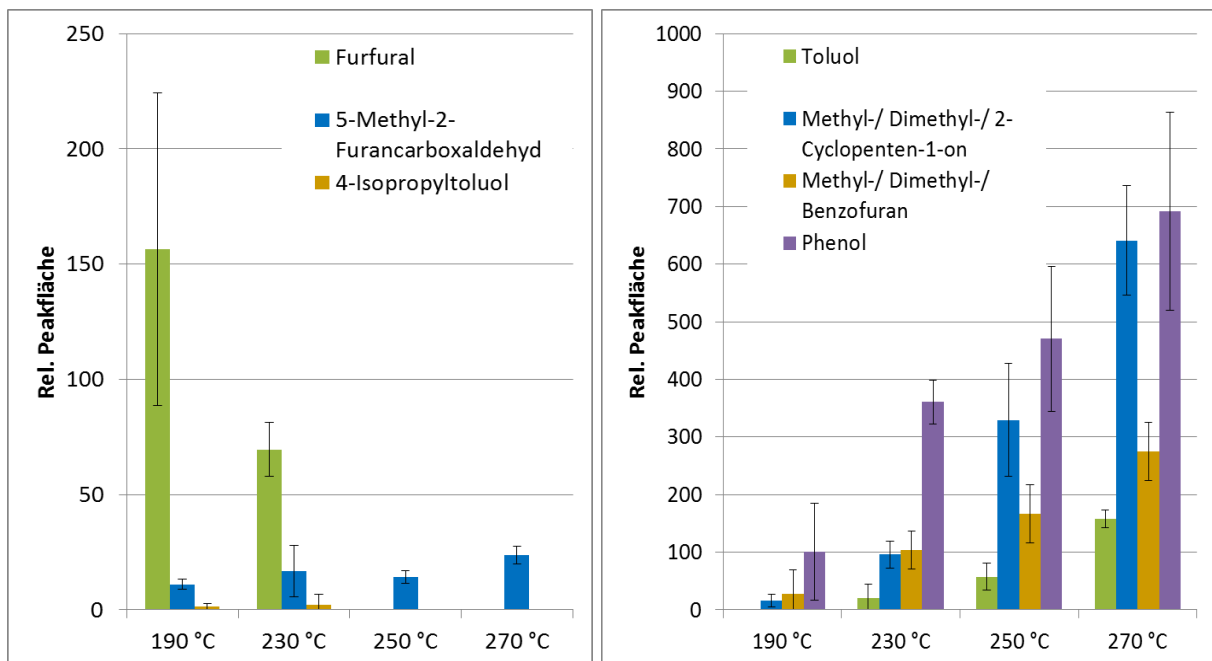


Abb. 60: Ausgewählte organische Substanzen in HS-GC/MS Messungen von HTC-Kohle und ihre Abhängigkeit von der Prozesstemperatur der Karbonisierung (Helmis, 2011)

Eine Auswertung der beobachteten Effekte zeigt deutlich, dass im Temperaturbereich um 210 - 230 °C bedeutende Unterschiede in der produzierten Kohle entstehen. Dabei verhalten sich positive und negative Eigenschaften z. T. ähnlich, d. h., dass bei einer Erhöhung der Temperatur die Qualität der Kohle in einer Hinsicht steigen kann (z. B. durch geringere Konzentrationen an Furaldehyd) und gleichzeitig in anderer Hinsicht sinken kann (z. B. durch eine Verringerung der Oberfläche). Weitere Ergebnisse zum Verhalten der flüchtigen organischen Verbindungen in der HTC-Kohle und der HTC-Flüssigkeit wurden in Fachzeitschriften publiziert (Becker et al., 2013, 2014).

Um Aussagen zur Stabilität der HTC-Kohle im Boden machen zu können, die hinsichtlich der Bewertung des CO₂-Minderungs- und C-Akkumulationspotenzials im Boden essentiell sind, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit ein 120-tägiger Boden-Inkubationsversuch in Inkubationsfläschchen durchgeführt. Hauptgegenstand war dabei die Betrachtung von HTC-Kohle aus Stroh-Gärrest (SGR), ergänzt um die Vergleichs- und Kontrollvarianten Pappel (frisch und karbonisiert), Gärrest (frisch) und Boden (pur). Während der Versuchsdauer wurde die Gaszusammensetzung im Inkubationsfläschchen regelmäßig erfasst, wodurch sich der Verlust an Kohlenstoff im zeitlichen Verlauf bilanzieren lässt. Eine Gegenüberstellung des Anteils des sofort verfügbaren Kohlenstoffs und der mittlerer Verweilzeit (MRT) des Gesamtkohlenstoffs von HTC-Kohlen zeigt Abb. 61.

Aus dieser ist zu entnehmen, dass die HTC zu einer deutlichen Stabilisierung von Gärresten führt – der Anteil sofort umsetzbarer Substanz wird stark reduziert, die mittlere Verweilzeit von unter einem Jahr auf bis zu 25 Jahre erhöht. Als hinsichtlich der Stabilität förderlich zeigten sich folgende Maßnahmen: Erhöhung der HTC-Temperatur, H₂O-Wäsche der Kohle (Entfernung löslicher organischer Verbindungen) und die Rezirkulation der HTC-Prozessflüssigkeit. Eine ausführlichere Beschreibung der Ergebnisse wurde zur Veröffentlichung eingereicht (Schulze et al., 2015).

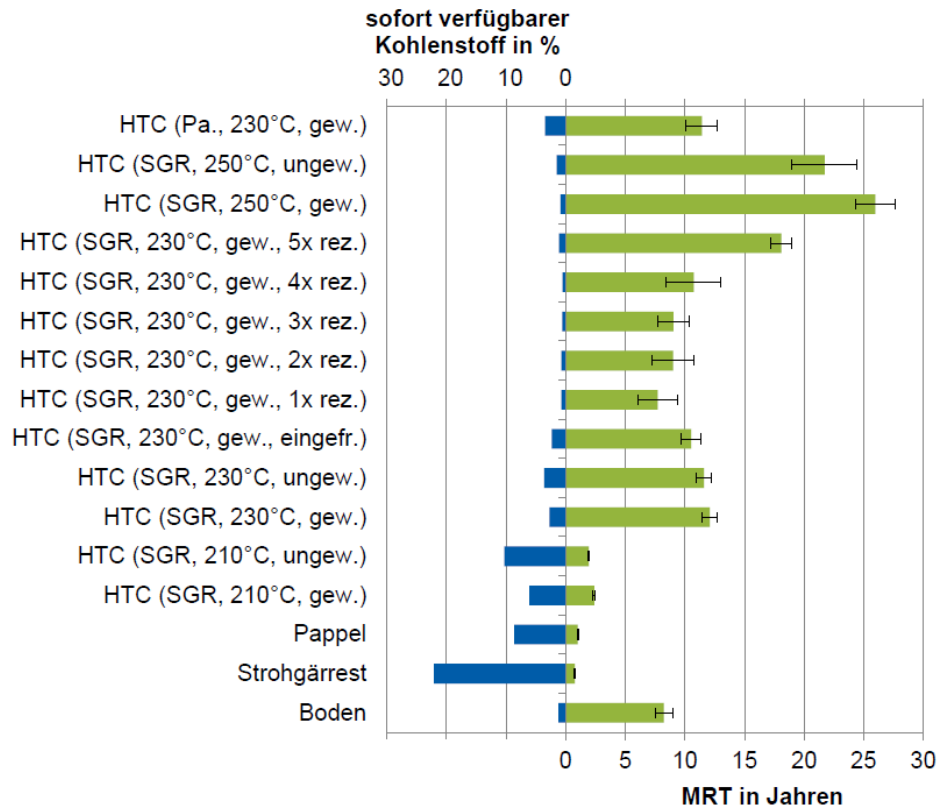


Abb. 61: Gegenüberstellung des Anteils des sofort verfügbaren Kohlenstoffs und der mittleren Verweilzeit (MRT) des Gesamtkohlenstoffs von HTC-Kohlen aus Stroh-Gärrest (SGR) unter Variation der HTC-Bedingungen (Temperatur, Anzahl der Zyklen der Prozesswasserrückführung) und der Kohle-Nachbehandlung (H₂O gewaschen/ nicht H₂O gewaschen, eingefroren/ nicht eingefroren) (Schulze et al., 2013)

Eine auf den Ergebnissen basierende Rechnung ergab, dass bei kontinuierlicher Anwendung der Gärrest-HTC im praktischen Einsatz der Boden deutlich mit Kohlenstoff angereicht werden kann (Abb. 62). Als Vergleichsvariante wurde in die Rechnung auch die Wandlung zu Pyrolyse-Kohle (biochar_B) betrachtet. Hierfür wurde eine mittlere Verweilzeit von 50 Jahren angenommen. Für die HTC-Kohle (biochar-A) wurden dagegen 10 Jahren angenommen.

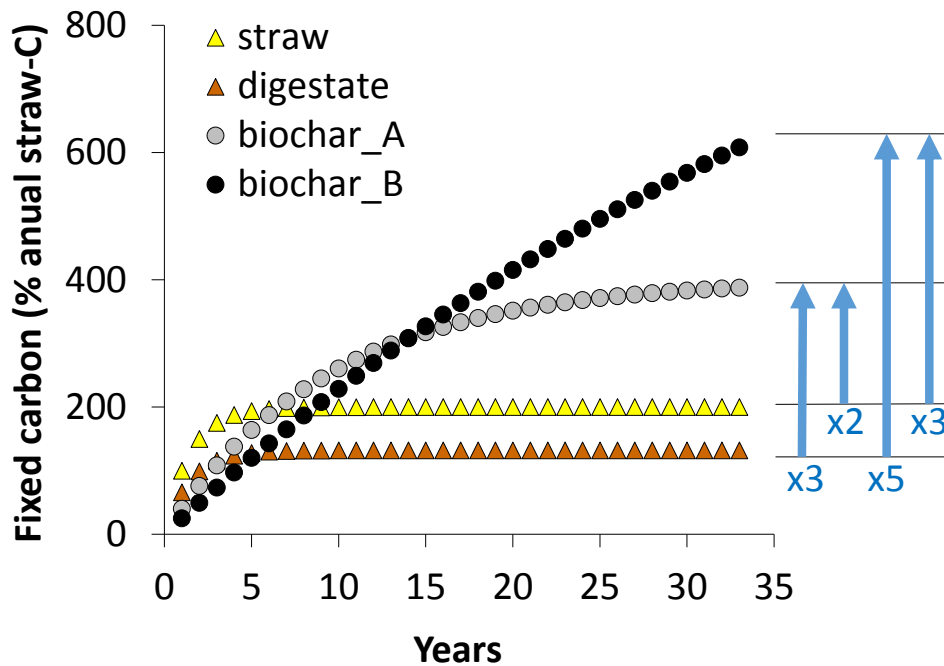


Abb. 62: Menge an im Boden fixierten Kohlenstoff (in Prozent des jährlichen Anfalls an Stroh-C auf dem Feld) bei Verbleib des Strohs (straw) auf dem Boden, Vergärung des Strohs zu Stroh-Gärrest (digestate) und dessen Ausbringung sowie die Behandlung des Stroh-Gärrestes mittels HTC (biochar_A) und Pyrolyse (biochar_B) vor der Ausbringung.

Während unbehandelter Gärrest aufgrund des C-Verlustes bei der Biogaserzeugung ein geringeres C-Akkumulationspotenzial als Stroh besitzt, kann die dauerhafte Karbonisierung des Gärrestes vor der Ausbringung das C-Akkumulationspotenzial um das Mehrfache erhöhen. Aufgrund des zusätzlichen C-Verlustes bei der Karbonisierung ist die C-Akkumulation in den ersten Jahren nach Einführung dieses Verfahrens geringer als die direkte Ausbringung des Gärrestes. Nach einigen Jahren erhöht sich jedoch die C-Akkumulation entsprechend der C-Stabilität.

Energiebilanz der HTC

Die Karbonisierung von dem in TP3 produzierten Gärrest ermöglichte auch eine Beurteilung der Gesamteffizienz des APECS-Konzeptes. Dabei wird deutlich, dass nach der Vergärung des Strohs immer noch rund 2/3 dessen Energiegehalts im Gärrest enthalten sind. Bei diesem Substrat lohnt es sich also besonders, eine anschließende Verwertung des Gärrestes durch Karbonisierung vorzunehmen, weil dadurch der Gesamtprozess eine Effizienz von nahezu 70 % erreicht (s. Abb. 63).

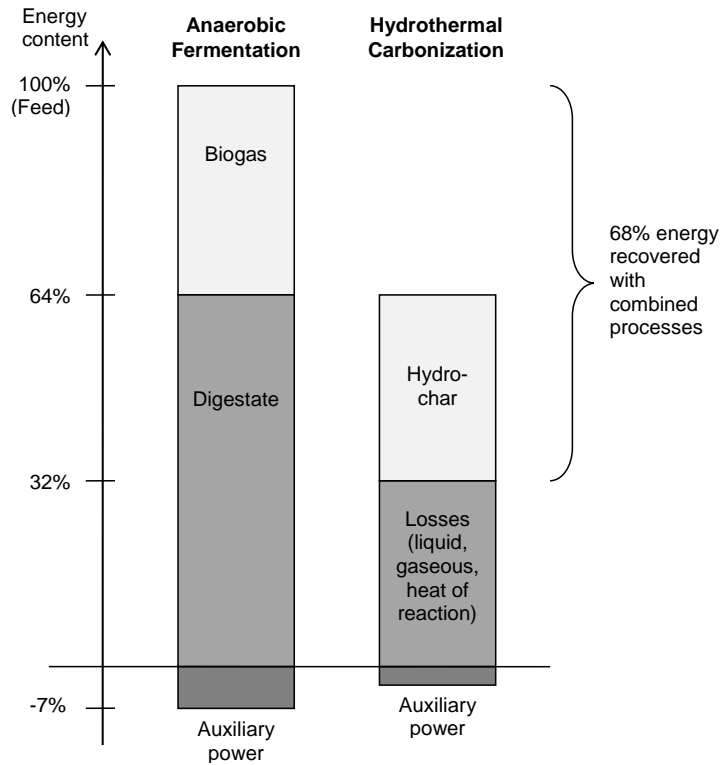


Abb. 63: Energetische Bewertung des APECS-Konzeptes am Beispiel von Stroh (Funke et al., 2013)

Abb. 64 zeigt die Ergebnisse der Energiebilanzierung für die HTC bei Variation des TS-Gehaltes im Reaktor (experimentelle Erhebung) sowie die unterschiedlichen Annahmen für den Grad der Wärmerückgewinnung. Es wurden drei Stufen des Wassergehalts betrachtet: 5 % TS (HTC), 25 % (VTC = vapo-thermale Karbonisierung) und 100 % (Pyrolyse). Die Auswertung der Energiebilanz erfolgte über die elementare Zusammensetzung der Kohle.

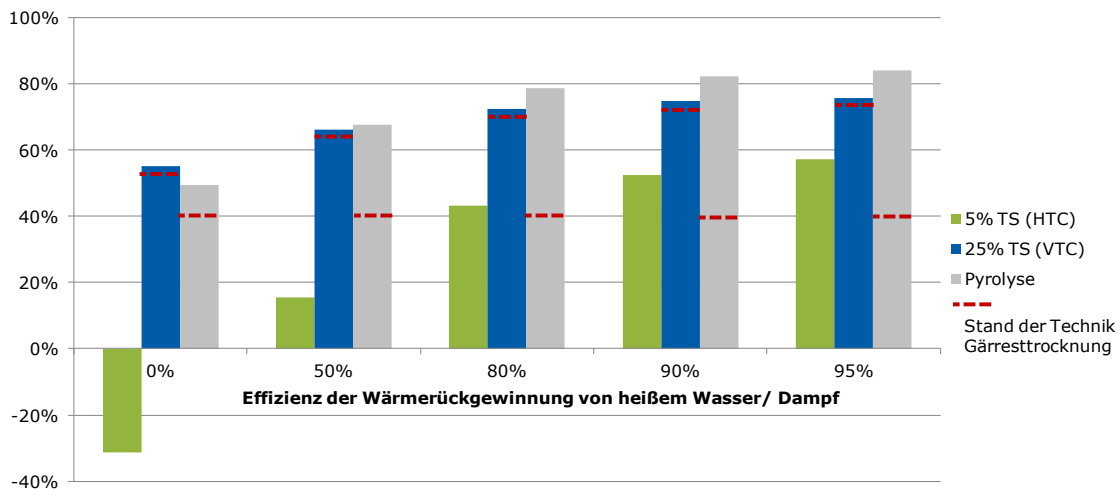


Abb. 64: Einfluss der Wärmerückgewinnung und des TS-Gehaltes im HTC-Reaktor auf die energetische Effizienz

Die Ergebnisse zeigen, dass die energetische Effizienz im starken Maße durch den TS-Gehalt im HTC-Reaktor beeinflusst wird. Dabei steigt der Einfluss mit geringerem Grad der Wärmerückgewinnung. Am deutlichsten ist der Effekt in dem Fall, dass keine Wärmerückgewinnung eingerichtet ist – Während bei 5 % TS noch ein Energiedefizit von 30 % besteht, liegt der Wirkungsgrad bei 25 % TS schon bei 55 %. Erwartungsgemäß verbessert sich der Wirkungsgrad mit zunehmender Wärmerückgewinnung. Bei der Betrachtung der Pyrolyse, deren E-Bilanz tendenziell überlegen ist, muss berücksichtigt werden, dass feuchte Biomassen zuvor aufwendig thermisch getrocknet werden müssen. Für den Einsatz von Gärrest reduziert sich die Effizienz der Pyrolyse daher auf die Hälfte oder mehr. Um von den für Gärrest üblichen 5 % TS auf 25 % für die VTC zu kommen, ist dagegen der Einsatz einer energetisch weit weniger aufwendigen mechanischen Entwässerung möglich. Mittleren TS-Gehalten in Verbindung mit einer VTC kann somit aus energetischer Sicht eine relative Vorzüglichkeit bescheinigt werden. Dabei ist jedoch auch zu erwähnen, dass der höhere TS-Gehalt den Anspruch an die Anlagentechnik erhöht und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Produktqualität beeinflusst.

Massebilanz der HTC

Zur Ermittlung der Massebilanz für die wichtigsten Elemente C, N und P wurden systematische HTC-Versuche mit Stroh-Gärrest unter Variation der Temperatur und Haltezeit durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 65.

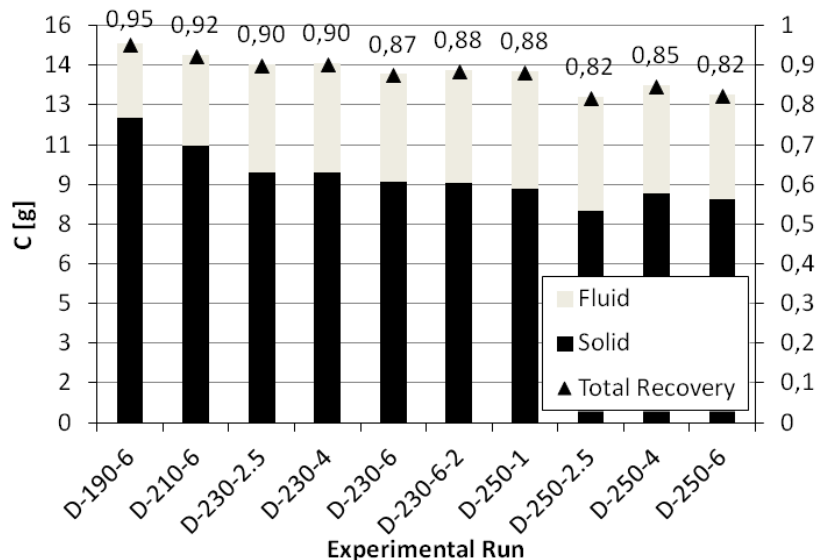


Abb. 65: Kohlenstoffbilanz der HTC von Gärrest unter Variation der Temperatur (190 – 250 °C) und der Haltezeit (1 - 6 h) (Lauf D-230-6-„2“ stellt eine Wiederholung dar) (Funke et al., 2013)

Es ist zu erkennen, dass die C-Ausbeute fester Produkte mit zunehmender Temperatur und zunehmender Haltezeit abnimmt. Die Ausbeute an flüssigen bzw. gelösten C-Produkten steigt ab 210 °C deutlich an, bleibt jedoch bei 230 und 250 °C konstant. Gleichzeitig steigt bei höheren Temperaturen der Anteil hier nicht direkt erfasster, gasförmiger Produkte.

Abb. 66 ist zu entnehmen, dass die N-Bilanz weitgehend ausgeglichen ist, was die Zulässigkeit der angewendeten Methode bestätigt. In Bezug auf die Aufteilung des nach Kjeldahl-Methode bestimmten Gesamtstickstoffs ist zu erkennen, dass bei höherer Temperatur der N-Anteil in (oder an) der Kohle zunimmt. Dies erscheint interessant, vor allem dadurch, dass diese Entwicklung gegenläufig zum Kohlenstoff verläuft.

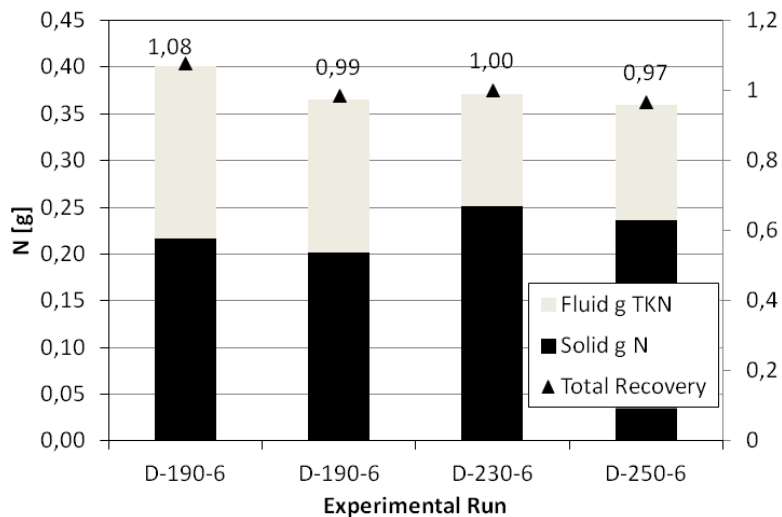


Abb. 66: Stickstoffbilanz der HTC von Gärrest unter Variation der Temperatur (190 – 250 °C) bei einer Haltezeit von 6 h (Funke et al., 2013)

In Bezug auf die Wiederfindung von Phosphor ist keine klare Tendenz auszumachen (Abb. 67). Dabei ist die Bilanzierung nahezu ähnlich ausgeglichen wie beim Stickstoff.

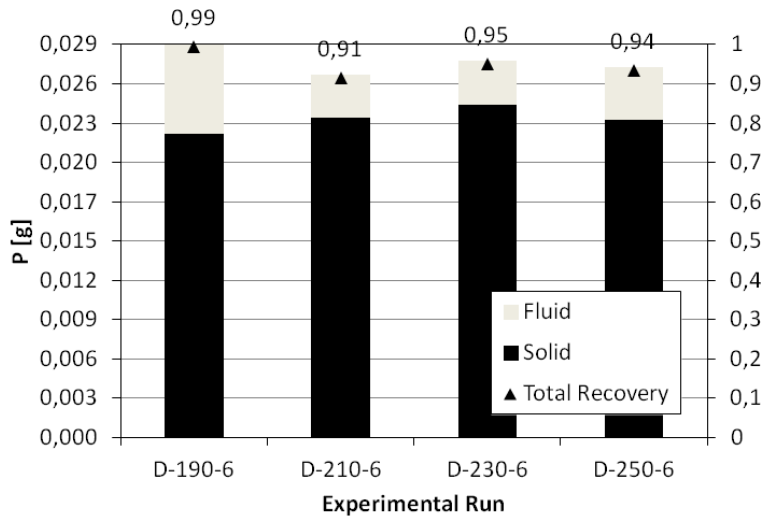


Abb. 67: Phosphorbilanz der HTC von Gärrest unter Variation der Temperatur (190 – 250 °C) bei einer Haltezeit von 6 h (Funke et al., 2013)

Die Ergebnisse zur Energie- und Massebilanzierung wurden in einem referierten Journal veröffentlicht (Funke et al., 2013).

Verbleib von Nährstoffen in der HTC

Abb. 68 zeigt den Einfluss der HTC auf die Wiederfindungsrate der Nährstoffe N und P in der Prozessflüssigkeit unter Berücksichtigung unterschiedlicher Bindungsformen und im Vergleich einer reinen Lösung und einer Lösung mit Cellulose.

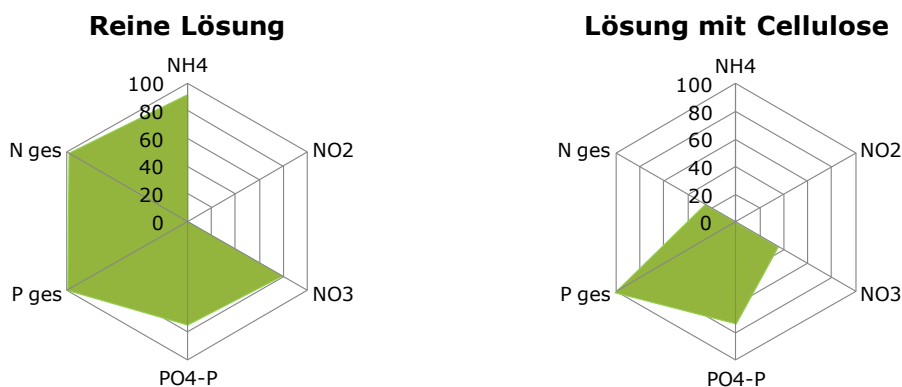


Abb. 68: Verbleib von Nährstoffen während der HTC in % (grün = Wiederfindungsrate in der Flüssigphase)

In der reinen Nährstofflösung sind mit Ausnahme des Verschwindens von Nitrit keine gravierenden Änderungen der Stoffkonzentrationen festzustellen. Anders dagegen in

der cellulosehaltigen Lösung. Große Teile, vor allem der N-Bindungsformen, scheinen in die Festphase überzugehen, während die P-Moleküle zum großen Teil in der Flüssigphase wiedergefunden werden. Dies entspricht nicht der gängigen Theorie, wonach vor allem Phosphor in Suspensionen überwiegend an partikulären Stoffen gebunden ist. Aufgrund der hohen Bedeutung der Nährstoffverfügbarkeit für die landwirtschaftliche Nutzung erscheint eine vertiefende Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen sehr empfehlenswert.

Ansatz zur Prozesssteuerung der HTC mittels NIR

Die neueingerrichtete kontinuierliche Probenahmemöglichkeit am kleintechnischen HTC-Reaktor ermöglichte die Ermittlung der Dynamik einzelner Intermediate im Prozess. Am Beispiel vom 5-HMF ist zu erkennen, dass diese Konzentration sowohl von der Temperatur als auch von der Verweilzeit im HTC-Reaktor beeinflusst wird (Abb. 69).

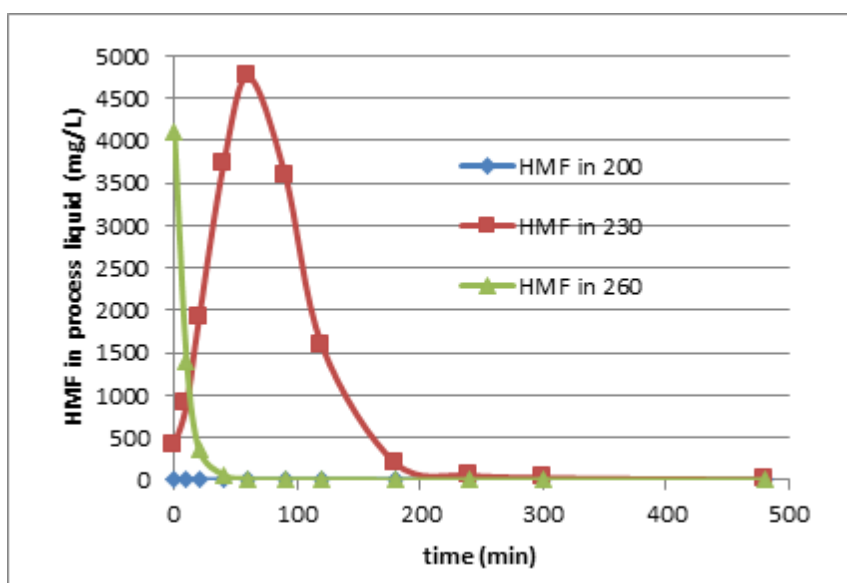


Abb. 69: Verlauf der Konzentration an 5-HMF im HTC-Prozess in Abhängigkeit von der Temperatur, basierend auf der Konversion von Cellulose

Für die praktische Anwendung der HTC wird daraus gleichzeitig deutlich, dass neben der Herstellung von HTC-Kohle ein enormes Potenzial in der Herstellung von Basis- und Feinchemikalien liegen könnte.

In Kooperation mit dem Fraunhofer Institut für Chemische Technologie (ICT) in Pfinztal wurde der Frage nachgegangen, ob, gerade im Hinblick auf die praktische Realisierung einer auf Feinchemikalien ausgerichteten HTC, eine Überwachung und Steuerung der Produktion mittels der in der Industrie etablierten Nahinfrarot-

Spektroskopie (NIR) möglich ist. Die hierzu erfolgten Arbeiten ergaben äußerst vielversprechende Ergebnisse, die bereits im Fachjournal *Bioresource Technology* veröffentlicht wurden (Reza et al., 2014). Exemplarisch zeigt Abb. 70 die gute Korrelation der NIR-Signale mit HMF.

Aus den Ergebnissen lässt sich somit folgern, dass die NIR-basierte HTC-Steuerung einen sehr aussichtsreichen Ansatz dafür bietet, als Neben- oder sogar Hauptprodukt der HTC wertvolle Feinchemikalien gezielt zu erzeugen und auszukoppeln. Weitere Ergebnisse, auch bezogen auf die NIR-Vermessung der Kohleeigenschaften, können der genannten Publikation entnommen werden (Reza et al., 2014).

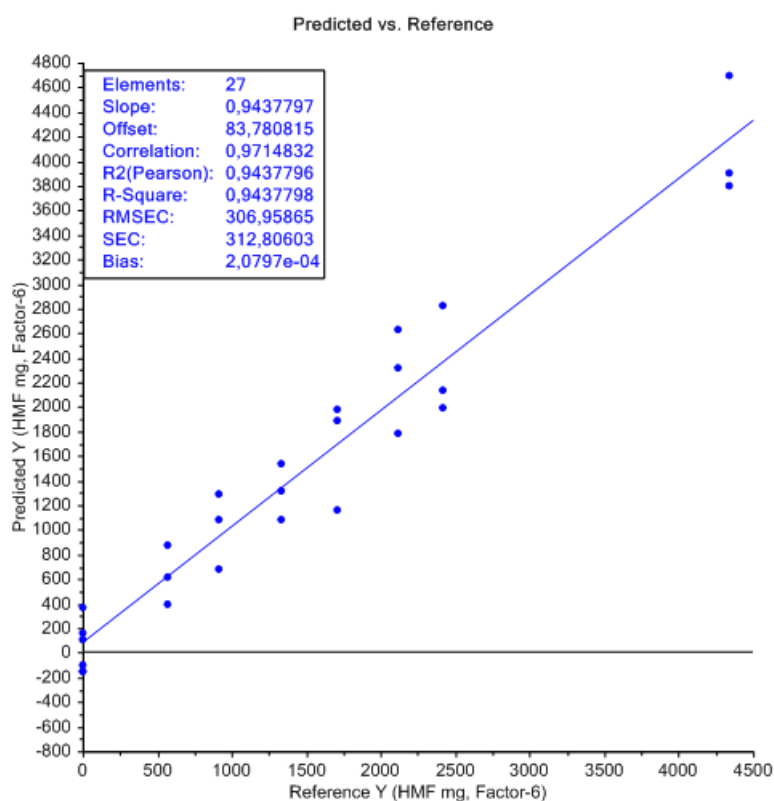


Abb. 70: Ergebnisse einer PLS-Regression für HMF mit dem NIR-Spektrum der HTC-Prozessflüssigkeit

Einsatz von Ferrit zur Erzeugung magnetischer HTC-Kohle

Wie zuvor in Kap. 2.1.3.6 beschrieben, wurde getestet, ob magnetische HTC-Kohle im Biogasreaktor als biofilmtragendes Additiv in Frage kommt. Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, inwieweit der HTC-Prozess durch Ferrit katalysiert wird. Eine modellhafte Vorstellung zur Bildung entsprechend magnetischer HTC-Kohlen ist in Abb. 71 dargestellt. Für einen entsprechenden Versuch wurden 50 g industriell hergestellte mikrokristalline Cellulose (Avicel PH 101; Sigma Aldrich, Schweiz) zusammen mit 450 ml deionisiertem Wasser in einem 1-Liter-Hochdruck-Hochtemperaturreaktor (Parr-Reaktor) gefüllt. Für die hydrothermale Reaktion mit oxidischen

Ferriten wurden weiterhin 33,4 g Mangan-Zink-Ferritpulver (Tridelta Weichferrite GmbH, 30 - 80 µm) hinzugegeben. Das Gemisch wurde eine Minute lang manuell gerührt, um eine Blockade des Rührers zu verhindern.

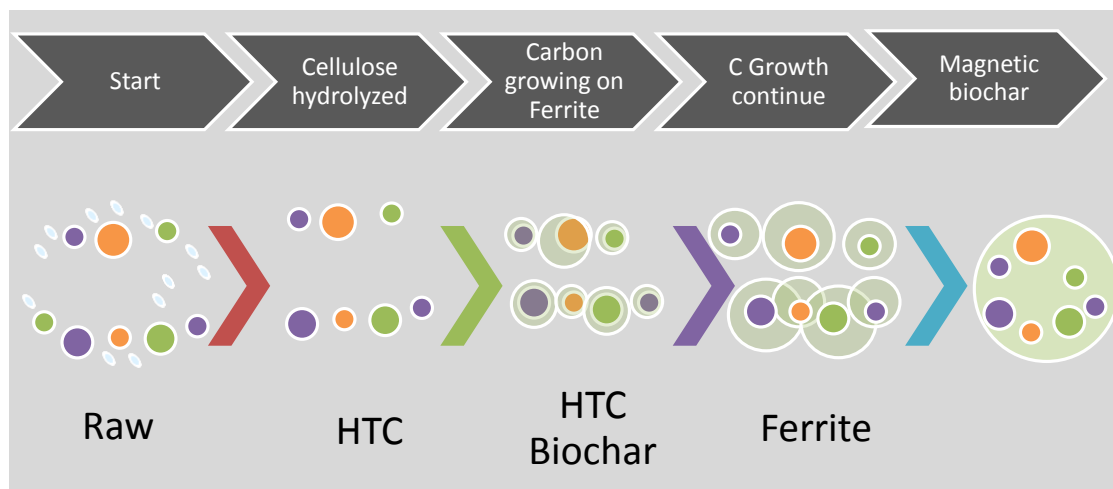


Abb. 71: Prozessverlauf zur Herstellung von magnetischer Biokohle mittels HTC

Als Versuchsbedingungen wurden eine Temperatur von 250 °C und eine Reaktionszeit von 5 Stunden mit einer Heizrate von 3 °C min⁻¹ gewählt. Die Reaktionstemperatur wurde mit einem PID-Temperaturregler (Parr) gesteuert. Die Genauigkeit des Reglers wurde auf ± 1 °C gesetzt. Der Druck wurde nicht gesteuert, sondern während der Reaktion aufgezeichnet. Das Gemisch wurde kontinuierlich während der gesamten hydrothermalen Behandlung bei 90 U min⁻¹ gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Heizgerät ausgeschaltet und man ließ den Reaktor abkühlen. Im Allgemeinen dauert es 3 - 4 Stunden bis der Reaktor von 250 °C auf 25 °C abgekühlt ist, während der Druck von 4 - 4,5 MPa auf 0,2 - 0,5 MPa fällt. Man ließ das gasförmige Produkt unter einem Abzug austreten und das feste Produkt wurde mittels eines Faltenfilters (ROTH, Filter Typ 113 P) 20 Minuten lang filtriert. Die Prozessflüssigkeit wurde bei 4 °C im Kühlschrank bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Das feste Produkt wurde in einem Ofen bei 105 °C über Nacht getrocknet. Das getrocknete feste Produkt wurde in einem wieder verschließbaren Beutel für die weitere Verwendung aufbewahrt.

Es wurden verschiedene Methoden angewandt, um die physikalisch-chemischen Eigenschaften zu charakterisieren. Es wurde ein einfacher Test durchgeführt, um den Nachweis zu erbringen, dass alle produzierten Partikel magnetisch sind. Ferromagnetische Biokohle ist viel dunkler als unbehandelte Cellulose, aber heller als die eingesetzten oxidischen Ferrite. Eine Probe der ferromagnetischen Partikel wurde in Wasser eingetaucht, einige Minuten lang kräftig geschüttelt und eine Woche lang stehen gelassen. Der Hauptteil der Partikel wurde am Boden des Gefäßes gefunden und diese sind weiterhin magnetisch, was mit Hilfe eines einfachen Dauermagneten festgestellt werden konnte.

Abb. 72 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der entstandenen Kohlepartikel.

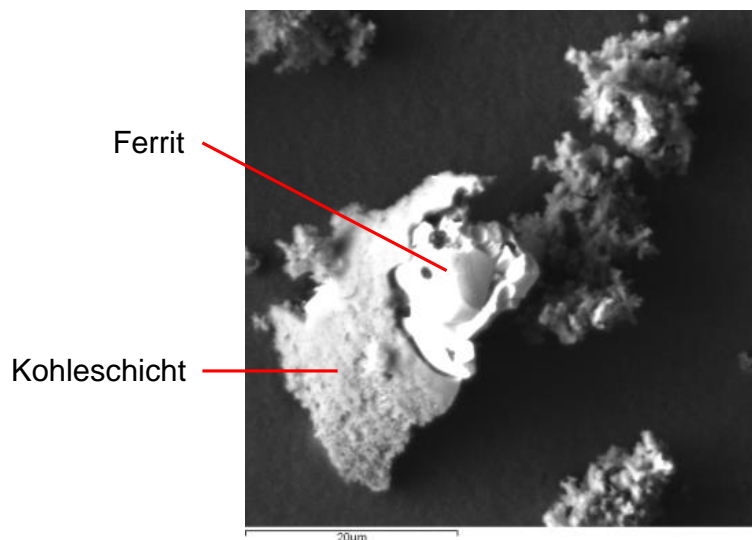


Abb. 72: Magnetische Biokohle bestehend aus Ferritpartikeln mit Kohlemantel

Tab. 12 zeigt die Massenausbeute an Asche, Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Stickstoff (N), Schwefel (S) und den aschebereinigten Brennwert ("Higher Heating Value", HHV) der trockenen magnetischen Biokohle, der unbehandelten Cellulose und der hydrothermal behandelten Cellulose ohne Ferritpulver.

Tab. 12: Physikochemische Eigenschaften von fester Biokohle aus der hydrothermalen Behandlung von Cellulose

	Massen- ausbeute (%)	Asche (%)	N %	C %	S %	H %	O %	HHV (MJ/Kg)
Cellulose	100	0,3	0,0	44,0	0,2	4,8	51,0	15,4
HTC-Cellulose	54,1	0,3	0,0	71,1	0,2	3,0	25,7	25,7
Magnetische	70,1	72,8	0,0	80,4	0,2	3,6	15,8	30,7

Hydrothermal behandelte Cellulose hat eine Massenausbeute von 54,1%, der Aschegehalt ist sehr niedrig. Der Gehalt an elementarem Kohlenstoff ist gestiegen, während der Sauerstoffgehalt verringert ist. Dass die magnetische Kohle einen sehr hohen Gehalt an Asche aufweist, ist aufgrund der Ferritzugabe nicht überraschend. Bezogen auf die aschefreie Substanz hat die magnetische HTC-Biokohle einen sehr viel geringeren Sauerstoffgehalt und einen sehr hohen Gehalt an Kohlenstoff, was in einem hohen HHV-Wert resultiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von Ferrit in den HTC-Prozess tatsächlich zu stabilen magnetischen HTC-Kohlepartikeln führt. Zudem wird der HTC-Prozess

katalysiert, wodurch voraussichtlich erhebliche Mengen an Hilfsenergie eingespart werden können. Inwieweit diese neuen Kohleprodukte geeignet sind, um prozessunterstützend im Biogasprozess zu wirken, wurde anhand von Gärversuchen untersucht (s. Kap. 2.1.3.6). Wie bereits in Kap. 2.1.3.6 beschrieben, wurde für die Herstellung magnetischer HTC-Kohle Patentschutz beantragt. Die Ergebnisse zur Herstellung und Wirkung magnetischer HTC-Kohle im Biogasprozess wurden in einem referierten Journal veröffentlicht (Reza et al., 2015).

2.1.4.3 Wandlung von Gärrest mittels Pyrolyse

Wie zuvor in Kap. 2.1.4.1 ausgeführt, kam es bei der Einrichtung der Pyrolyseanlage zu erheblichen Verzögerungen, weshalb die Pyrolyse von Gärrest nicht im selben Umfang wie die HTC bearbeitet wurde. Nichtsdestotrotz konnten wie geplant Referenzuntersuchungen zur Herstellung von Pyrolysekohle durchgeführt werden. Die Experimente dienten dabei im Wesentlichen der Ermittlung der Pyrolysekohle-Eigenschaften sowie der Ausbeute an Biokohle.

In einer Versuchsreihe wurden je 500 g trockener Gärrest aus einer Praxisbiogasanlage, die Mais und Rindergülle vergärt, bei drei verschiedenen Temperaturen (330, 430 und 530 °C) unter Inertgas (N_2 ; 120 L min^{-1}) pyrolysiert (Haltezeit $45 \pm 15 \text{ min}$) und die entstandene Biokohle charakterisiert (Tab. 13; Abb. 73) und quantifiziert (Abb. 74).

Tab. 13: Einfluss der Pyrolysetemperatur auf die Materialeigenschaften der Pyrolysekohle (db = trocken; daf = trocken und aschefrei)

Temperatur	Asche	C	H	O	N
°C	%db	%daf	%daf	%daf	%daf
Gärrest	10,4	53,2	7,9	36,4	2,1
330	20,6	68,9	5,3	21,9	3,3
430	24,6	72,5	4,5	19,3	3,1
530	26,9	79,9	3,6	12,7	3,1

Deutlich zu erkennen ist die Zunahme des Karbonisierungsgrads bei höherer Temperatur. Dies wird auch anhand des Van Krevelen Diagramms deutlich (Abb. 73).

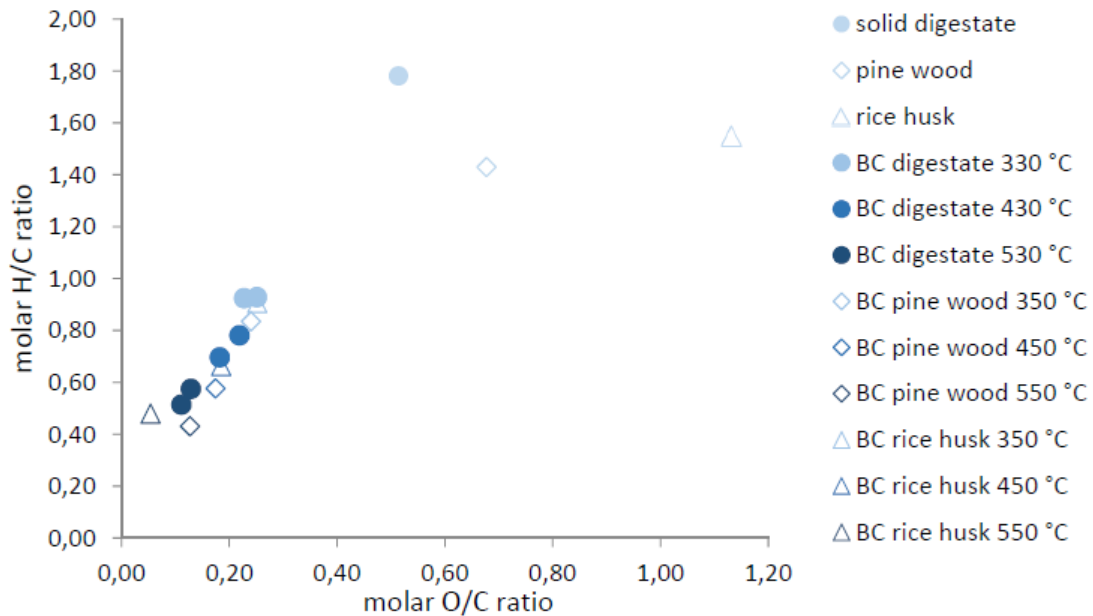


Abb. 73: Atomares Verhältnis von H/C zu O/C von Gärrest (solid digestate), Pyrolyse-Kohle aus Gärrest (BC digestate) und Referenz-Biokohlen aus der Literatur (Crombie et al., 2013).

Das Ergebnis entspricht der Erwartung, nach der beide atomaren Verhältnisse O/C und H/C bei höherer Pyrolysetemperatur abnehmen (Lehmann und Joseph, 2009). Das geringste H/C Verhältnis von 0,55 und das geringste O/C Verhältnis von 0,12 wurde jeweils bei einer Temperatur von 530 °C beobachtet. Diese Werte entsprechen den Ergebnissen von Crombie et al. (2013) in Bezug auf die Pyrolyse von Kiefernholz und Reisspelzen (s. Abb. 73). Im Vergleich zu der HTC-Kohle (s. Kap. 2.1.4.2) wurden in beiden Verfahren ähnliche O/C-Verhältnisse erreicht, die H/C-Verhältnisse waren bei HTC-Kohle jedoch wesentlich höher (>1). Daraus kann gefolgert werden, dass die Pyrolyse des Gärrestes einen wesentlich höheren Grad der Aromatisierung und Kondensation erlaubt und damit auch eine höhere Stabilität im Boden.

Zusätzlich zur Materialcharakterisierung wurde die Ausbeute an Biokohle und der Kondensate ermittelt. Die Kohle wurde in einem Glasbehälter aufgefangen und der Abgasstrom durch eine Waschflasche (gekühlt auf <12 °C) geleitet, um kondensierbare Gasbestandteile auszukondensieren. Die Ergebnisse (Abb. 74) zeigen, dass die Kohleausbeute mit steigender Temperatur sinkt. Der Anfall an Kondensaten, sowohl wasserlöslich als auch unlöslich, zeigte dagegen keine eindeutige Tendenz. Geht man davon aus, dass der Rest von 100% den Pyrolysegasen (im Wesentlichen CO, CO₂ und H₂) zugeordnet werden kann, dann steigt die Ausbeute an Gasen mit höherer Temperatur deutlich an. Diese Verschiebung der festen zugunsten der gasförmigen Produkte bei höheren Pyrolysetemperaturen ist in der Literatur gut beschrieben (u. a. Lehmann und Joseph, 2009; Crombie et al., 2013).

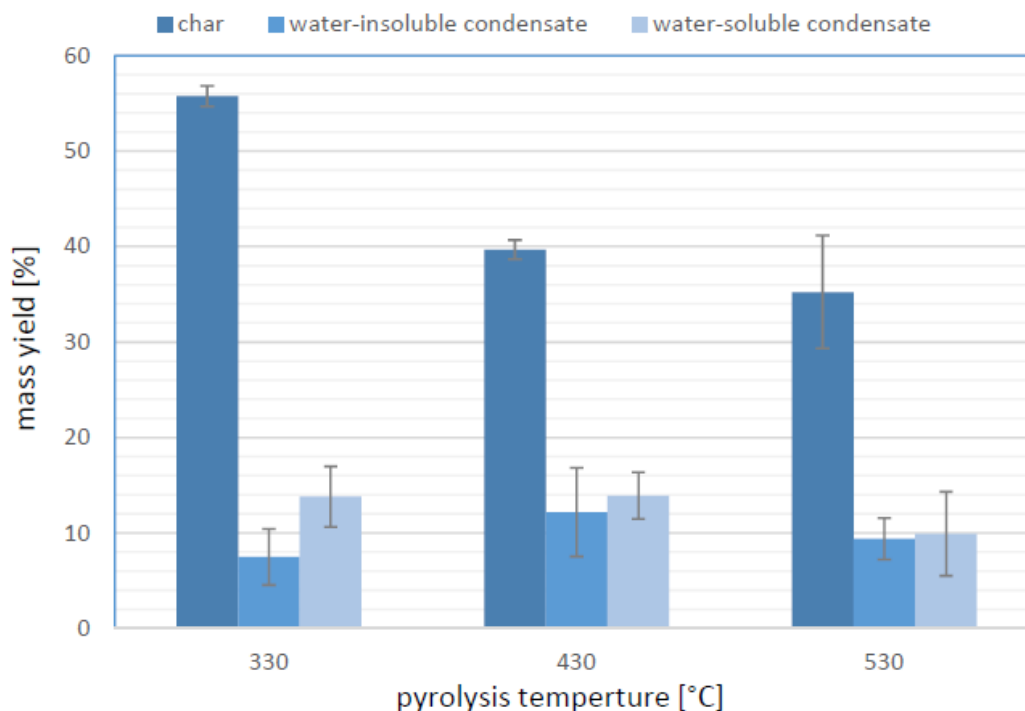


Abb. 74: Masseausbeute an Kohle (in %) aus Gärrest (Trockenmasse) bei verschiedenen Pyrolysetemperaturen

Mit dem Ziel, die Abbaubarkeit der wasserlöslichen Kondensate zu Biogas zu analysieren, wurden anhand der aufgefangenen Kondensate Gärtests durchgeführt (s. Kap. 2.1.3.5).

2.1.4.4 Adsorption von Nährstoffen an Biokohle

Die Frage, in welcher Höhe die im flüssigen Gärrest enthaltenen Nährstoffe N, P und K an HTC und Pyrolysekohle adsorbiert werden können, wurde am ATB durch eine Diplomarbeit bearbeitet (Gömmel, 2012).

Neben einer Pyrolysekohle aus Kompostrückstand und Holzschnitzel (Pyrolysetemperatur: 700 – 850 °C; Partikelgröße: 63 - 200 µm; BET: 222 m²g⁻¹; pH_{PZC}: 8,2) und einer HTC-Kohle aus Oliventrestler (HTC-Temperatur: 230 °C; Partikelgröße: 63 - 200 µm; BET: 30 m²g⁻¹; pH_{PZC}: 3,3) wurde eine kommerzielle Aktivkohle (Aktivierungsmittel H₃PO₄; Partikelgröße: 10 - 75 µm; BET: 1400 m²g⁻¹; pH_{PZC}: 1,5) als Referenzvariante verglichen. pH_{PZC} ist der Point of Zero Charge. Der flüssige Gärrest (pH: 8,14; TS: 3,0) enthielt Mineral-Starkgehalte von 833 mg L⁻¹ NH₄-N, 0,5 mg L⁻¹ NO₃-N, 2700 mg L⁻¹ K und 20 mg L⁻¹ PO₄-P. Die Bestimmung der Adsorptionsfähigkeit erfolgte mittels Schüttelversuchen (24 h, 20 °C). Abb. 75 zeigt die ermittelten Ergebnisse.

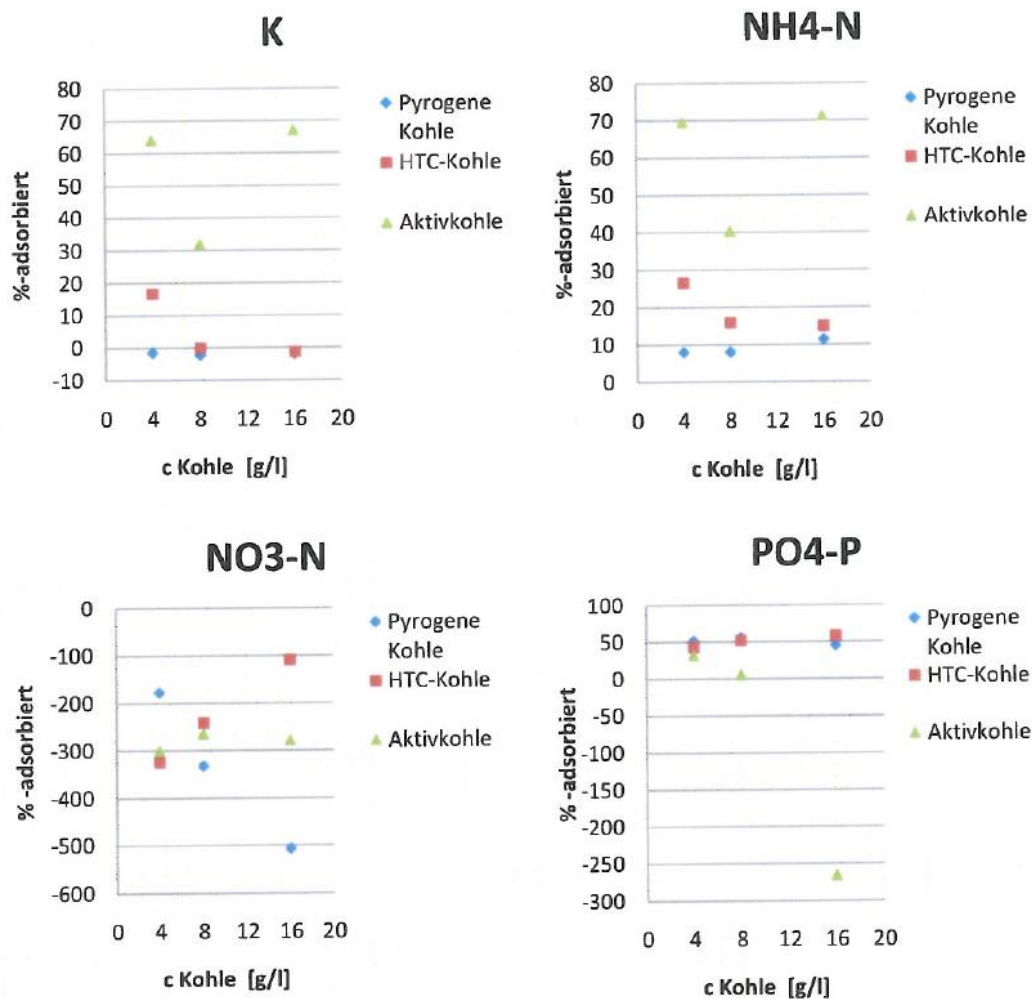


Abb. 75: Anteil der durch Kohle adsorbierten Nährstoffe aus Gärflüssigkeit (Gömmel, 2012)

Die Ergebnisse zeigten insgesamt eine große Schwankungsbreite, was darauf schließen lässt, dass die angewendete Methodik einer weiteren Optimierung bedarf. Dennoch wird deutlich, dass die Aktivkohle-Referenz wesentlich mehr K und NH₄-N aufnehmen kann als pyrogene Kohle und HTC-Kohle. Die HTC-Kohle scheint in Bezug auf NH₄-N eine etwas höhere Sorptionsfähigkeit zu besitzen als Pyrolysekohle. Die Auswertung der NO₃-N Adsorption ergab in allen Varianten eine Aufkonzentrierung in der Prozessflüssigkeit bedingt durch die Oxidation von NH₄-N während der Versuche. Die relativ größte Entfrachtung wurde jedoch mit HTC-Kohle (Dosierung 16 g L⁻¹) gemessen. Für PO₄-P wurde überwiegend ein Adsorptionsgrad von 50 % festgestellt. Ausnahmen waren höhere Konzentrationen von Aktivkohle, bei denen eine Nachlieferung aus der Kohle in die Prozessflüssigkeit zu beobachten war. Die Ergebnisse zeigen, dass eine selektive Nährstoffadsorption an HTC- und pyrogenen Kohle prinzipiell möglich ist, wobei diese im Vergleich zur Aktivkohle in der Ausprägung deutlich eingeschränkt ist. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit die

Roh-Biokohlen durch eine nachgeschaltete Aktivierung gezielt modifiziert werden können, um höhere Mengen an Nährstoffen aufzunehmen.

2.1.4.5 Energieflussanalyse des APECS-Modells

Basierend auf den experimentellen Ergebnissen wurde eine Energieflussanalyse der Behandlung von Stroh durch Vergärung und HTC im integrierten System durchgeführt (Abb. 76). Aufgrund der verzögerten Inbetriebnahme der Pyrolyseanlage konnte selbiges für die Pyrolyse nicht im Rahmen des Projekts durchgeführt werden.

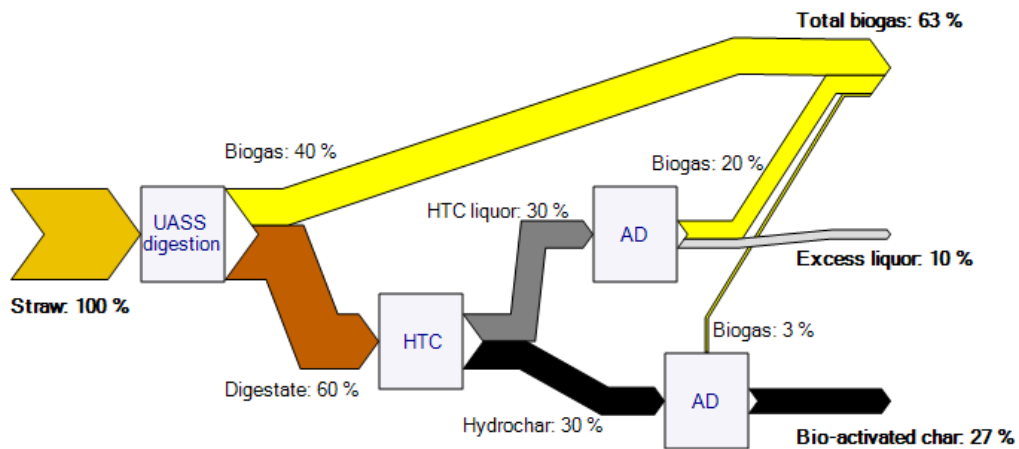


Abb. 76: Vereinfachtes Energieflussdiagramm des integrierten Systems aus Vergärung (AD) und HTC zur Konversion von Stroh.

Es wird deutlich, dass durch das integrierte Verfahren potenziell wesentlich höhere Anteile der im Stroh gespeicherten Energie nutzbar gemacht werden können, als durch die einfache Vergärung von Stroh. Der Biogasertrag kann um 50 % gesteigert werden. Nimmt man die Biokohle in die Betrachtung hinzu, so können bis zu 90 % der Energie genutzt werden. Natürlich würde bei einer energetischen Nutzung der HTC-Biokohle die Fermentation der Biokohle entfallen.

Für die Ermittlung der Energieeffizienz des Systems muss der Bedarf an Hilfsenergie berücksichtigt werden. Als Kalkulationsgrundlage können für die Erzeugung von Biogas 25 % des produzierten Biogases (Gerin et al., 2008) und für die HTC 10 % der HTC-Kohle (Stemann und Ziegler, 2011) verwendet werden. Hierdurch reduziert sich die energetische Gesamteffizienz von 90 % auf etwa 70 %. Dies ist jedoch noch immer wesentlich höher als die alleinige Strohvergärung. Zudem sind sowohl die Vergärung als auch die HTC prinzipiell exothermisch und die Gesamteffizienz lässt sich durch eine effektive Wärmedämmung, Wärmerückführung und geschickte Prozessintegration noch weiter steigern.

2.1.5 TP5 Bodenwirkung von Biokohle

Erkenntnisse des Projektpartners Technische Universität Berlin

Ziel von TP5 ist die Bewertung der Eignung der Biokohle als Bodenhilfsstoff und Düngemittel. Primär ist die Bearbeitung Aufgabe der TU Berlin. In Ergänzung der Arbeiten an der TU Berlin (Inkubation, Topfversuche) wurden vom ATB eigene Parzellenversuche angelegt. Bekanntermaßen konzentrieren sich die Arbeiten im Rahmen des APECS-Projekts auf die HTC-Kohle. Seit 2012 werden im Rahmen des im wettbewerblichen Verfahren von der Leibniz-Gemeinschaft geförderten Verbundprojekts „Biokohle in der Landwirtschaft - Perspektiven für Deutschland und Malaysia“ (Koordination ATB) jedoch auch Pyrolysekohlen auf ihren Bodeneinsatz hin untersucht. Zentrale Fragestellung sowohl der von der TU Berlin als auch der vom ATB durchgeführten Arbeiten ist neben der Stabilität der Biokohle die Aufklärung der Pflanzenwirkung. Nachdem frühzeitig festgestellt wurde, dass unbehandelte Biokohle das Pflanzenwachstum negativ beeinflussen kann, wurden neben den Roh-Kohlen auch verschiedene behandelte Varianten getestet.

Für die Durchführung der Gefäßversuche zur Bodenwirkung wurden der TU Berlin ausreichend hohe Mengen an HTC-Kohle für Topfversuche übergeben. Im Berichtszeitraum, der das Auslaufen des Teilprojekts TP5 zum 31.12.2012 umfasste, wurden die experimentellen Arbeiten an der TU Berlin abgeschlossen. Die Ergebnisse der TU Berlin, bezogen auf das Sproßwachstum von Mais nach 10 Wochen, zeigen deutlich, dass der Einsatz von HTC-Kohle aus Gärresten negative Effekte auf das Pflanzenwachstum ausüben kann. Als Gegenmaßnahme erwies sich eine Behandlung mit der Prozessflüssigkeit einer Biogasanlage als wirkungsvoll. Eine einfache Wäsche mit H₂O ergab dagegen eine deutlich negative Wirkung. Die Kontrollvariante „Einsatz von unbehandeltem Gärrest“ erzielte von allen Varianten den höchsten Biomasseaufwuchs. Es ist daher zu vermuten, dass die negative Wirkung von HTC-Kohle nicht allein durch die Anwesenheit von Hemmstoffen, sondern auch durch einen Mangel an pflanzenverfügbaren Nährstoffen bedingt ist. Eine detaillierte Beschreibung der wissenschaftlichen Ergebnisse und der weiteren Ereignisse kann dem Abschlussbericht der TU Berlin entnommen werden.

Parzellenversuche mit HTC-Biokohle

Am Versuchsstandort Berge b. Nauen (Betreiber: Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte, IASP) wurden vom ATB und IASP in den Jahren 2011 - 2013 Parzellenversuche mit HTC-Kohle durchgeführt.

Hierfür wurde eine HTC-Kohle verwendet, die aus Maissilage (210 °C, 5 h) hergestellt wurde (pH: 4,45; TS: 87 %_{wt}; C: 54,6 %_{TS}; Asche: 5,3 %_{TS}; NH₄-N: 68 mg kg⁻¹).

Zum Einsatz kam dabei ein satzweise beschicktes Verfahren der Firma AVA-CO2 Schweiz AG, Zug. Aufgrund der Erfahrung, dass frische HTC-Kohle das Pflanzenwachstum hemmen kann, wurde die HTC-Kohle neben der unbehandelten Qualität auch im fermentierten Zustand (pH: 5,69; TS: 16 %_{wT}, C: 59,3 %_{TS}; Asche: 9,3 %_{TS}; NH₄-N: 1041 mg kg⁻¹) erprobt. Die Fermentation wurde am ATB durch Vermischung mit Gärrest und weitgehend gasdichter Aufbewahrung (3 Wochen) im Stahlbehälter bei mesophilen Temperaturen durchgeführt.

Berge ist im langjährigen Mittel (1971 bis 2000) durch eine Jahresdurchschnittstemperatur von 9,3 °C und einer Jahresniederschlagshöhe von 501,9 mm gekennzeichnet. Der Versuch wurde als Blockanlage mit vier Wiederholungen angelegt. Die Parzellen hatten eine Größe von 5 m² (1,5 m breit, 3,33 m lang) und zwischen zwei behandelten Parzellen wurde jeweils ein unbehandelter Streifen belassen, um Überlagerungseffekte zu vermeiden. Der Versuch wurde auf einem sandigen Standort (Bodenart SI3D, 35 Bodenpunkte) auf der Nauener Platte durchgeführt. Der Boden wies folgende Merkmale zu Beginn des Versuchs auf: pH-Wert: 6,07; P-Gehalt: 19,03 mg/100 g; K-Gehalt: 17,35 mg/100 g; Mg-Gehalt: 5,66 mg/100 g; Ct-Gehalt: 0,74 %. Die Ausbringung der zu prüfenden Dünger / Bodenverbesserer wurde einmalig im Jahr 2011 durchgeführt. Als Mineraldünger wurde Kalkammonsalpeter (KAS) verwendet. Anschließend erfolgte ein Nährstoffausgleich in allen Parzellen außer in denen der unbehandelten Kontrolle.

Folgende Varianten wurden eingerichtet:

- Kontrolle, keine Biokohle, kein Dünger
- Mineraldüngung, ortsüblich
- Biokohle unbehandelt, auf 1 % Gesamtkohlenstoff im Oberboden (15 cm)
- Biokohle unbehandelt, auf 2 % Gesamtkohlenstoff im Oberboden (15 cm)
- Biokohle aktiviert, 1 % Gesamtkohlenstoff im Oberboden (15 cm)
- Biokohle aktiviert, 2 % Gesamtkohlenstoff im Oberboden (15 cm)

Folgende Fruchtfolge wurde gewählt: Hirse, Grünroggen, Mais und Weizen. Alle Kulturen, mit Ausnahme des Weizens, wurden als Ganzpflanze geerntet. Beim Weizen wurden sowohl der Korn- als auch der Strohertrag erfasst. Die Ergebnisse des Biomasseertrags der vier Kulturen sind im folgenden Diagramm zusammengefasst.

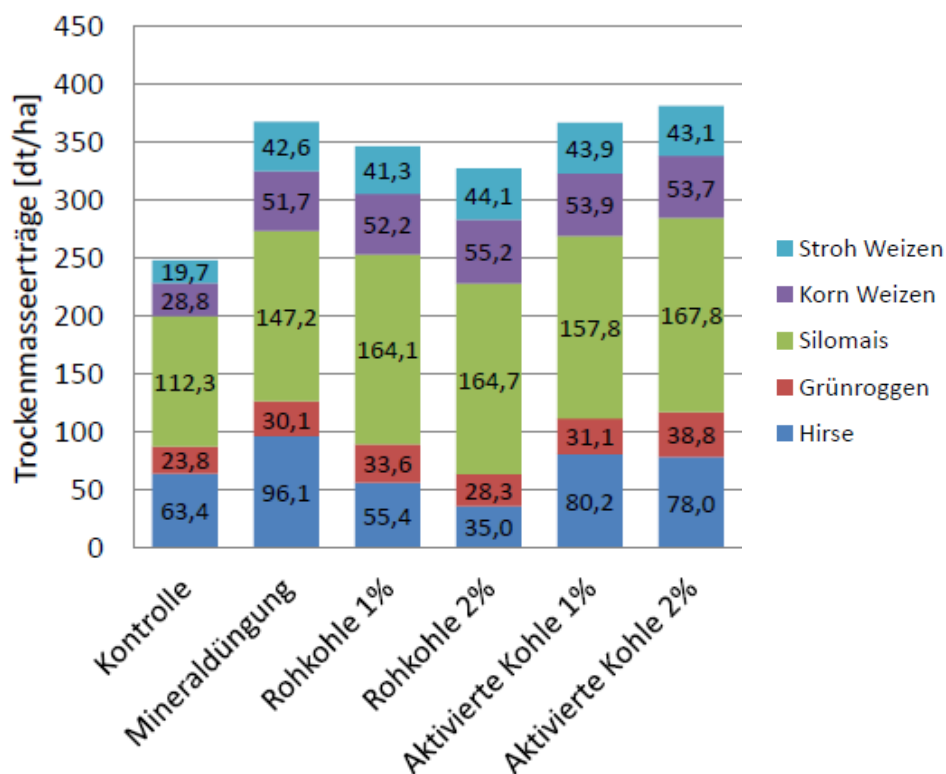


Abb. 77: Kumulative Gesamtpflanzen-Erträge (Mittelwerte) der Versuchsvarianten

Wie erwartet, führte die Applikation von frischer HTC-Kohle zu einer deutlichen Minderung des Ganzpflanzenertrags von Hirse als erste Kultur. Die aktivierte Kohle zeigte dagegen deutlich höhere Erträge, aber noch nicht in dem Bereich der Mineraldünger-Variante. Bei Grünroggen und Silomais führten die Kohlevarianten überwiegend zu höheren Erträgen. Der Korn und Strohertrag von Weizen als 4. Kultur wurde dann bei allen Varianten, mit Ausnahme der ungedüngten Kontrolle, wieder in ähnlicher Höhe aufgefunden. Daraus kann geschlossen werden, dass sowohl hemmende als auch wachstumsfördernde Effekte temporären Charakter besaßen. Zu vermuten ist, dass die Hemmung sowohl durch organische Hemmstoffe der frischen Biokohle als auch Nährstoffmangel (v. a. Stickstoff) hervorgerufen wurde. Als Grund für die Ertragssteigerung wird eine bessere Verfügbarkeit von Nährstoffen durch die Nachlieferung aus der Biokohle (insb. Stickstoff) angenommen. Bodenchemische Analyseergebnisse zeigt Tab. 14.

Tab. 14: Bodenchemischer Zustand 2012 und 2013

Variante	C _t (%)		N _t (%)		P _{DL} * (mg je 100g Boden)		pH	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Kontrolle	0,82	0,84	0,08	0,07	17,6	18,1	5,9	6,0
Mineraldüngung	0,83	0,86	0,08	0,07	18,9	17,6	5,8	6,1
Kohle 1%	1,08	1,10	0,10	0,08	16,7	13,1	5,7	5,9
Kohle 2%	1,70	1,48	0,13	0,10	21,3	22,5	6,0	6,2
Aktiv. Kohle 1%	1,10	1,07	0,10	0,08	17,6	17,6	5,9	6,0
Aktiv. Kohle 2%	1,94	1,49	0,17	0,10	21,1	22,6	6,0	6,2

* DL = Doppel-Laktat-Verfahren (pflanzenverfügbarer Phosphor)

In Bezug auf den Kohlenstoffgehalt des Bodens gab es die interessante Beobachtung, dass in den 1%-Varianten kein deutlicher Abbau nach der Applikation im Jahr 2011 zu sehen ist, weder in 2012 noch in 2013. Die 2%-Varianten nehmen dagegen deutlich ab, während die Kontrolle und die Mineraldüngervariante konstant bleiben. Zu vermuten ist, dass die Kohlenstoffmenge der 1%-Varianten durch die Bindung an mineralische Bodenfraktionen vor Abbau und Verlagerung geschützt ist. Die 2%-Variante scheint dagegen nicht ausreichend im Bodengefüge stabilisiert zu sein, um diese sichtbar vor Abbau oder Verlagerung zu schützen. In der Frage, wie Biokohlen in die Bodenmatrix integriert werden und welche Funktion sie dort erfüllen, besteht noch erheblicher Forschungsbedarf.

Der N-Gehalt ist am deutlichsten in der aktivierten 2%-Variante im Jahr 2012 erhöht. Es ist davon auszugehen, dass dies auf den hohen N-Gehalt der Kohlen und deren gute N-Haltbarkeit zurückzuführen ist. Es scheint wahrscheinlich, dass dies ein wesentlicher Grund für die zwischenzeitlich erhöhten Ernteerträge ist. Auch sichtbar ist, dass sich 2013 die N-Gehalte der Varianten deutlich einander angenähert haben. Der Phosphorgehalt ist in beiden 2%-Varianten deutlich und nachhaltig erhöht. Allerdings ist die Grundversorgung des Bodens bereits recht hoch, sodass positive Ertragseffekte durch noch höhere P-Gehalte eher nicht zu erwarten sind. Der pH-Wert zeigte keine Abhängigkeit von der Versuchsvariante.

Als wesentliche Erkenntnis lässt sich aus den Ergebnissen ableiten: Die biologische Nachbehandlung der HTC-Kohle sowie die „Reifung“ im Boden beeinflussen die Wirkung der Biokohle auf das Pflanzenwachstum positiv. Insgesamt kann daher

tatsächlich davon ausgegangen werden, dass durch den Einsatz von HTC-Kohle das Ertragspotenzial landwirtschaftlich genutzter Böden gesteigert werden kann. Auch erscheint eine nachhaltige Sequestrierung von Kohlenstoff basierend auf den Ergebnissen trotz der gegenüber Pyrolysekohle geringen biologischen Stabilität nicht ausgeschlossen. Die dabei zugrundeliegenden Wirkmechanismen bedürfen jedoch noch einer genauen Analyse und Bewertung auch hinsichtlich möglicher negativer Effekte wie der Anreicherung von organischen Schadstoffen.

2.1.6 Fazit

Der wissenschaftliche Stand zu den bearbeiteten Forschungsfragen konnte durch das Projekt im erheblichen Umfang erweitert werden. Dies betrifft alle Bereiche: Erzeugung von Biogas, Thermochemische Karbonisierung und Systemintegration sowie die Bodenwirkung von Biokohle. Nachfolgend werden die wesentlichen neuen Erkenntnisse aufgeführt.

Erzeugung von Biogas:

- Das neuentwickelte Aufstromverfahren erlaubt eine effiziente Vergärung von Weizenstroh. Die Produktivität des Verfahrens bezogen auf die volumenbezogene Hydrolyse- und Biogasbildungsrate liegt im üblichen Bereich für Biogasanlagen. Die Methanausbeute entspricht etwa 60 % der für Maissilage üblichen Ausbeute. Das Verfahren ermöglicht sehr kurze Verweilzeiten des Strohs von unter einer Woche
- Auch stickstoffreiche Substrate, wie Rapsexpeller, können in Mischung mit Weizenstroh effektiv zu Biogas vergoren werden.
- Die Methanausbeuten aus Stroh können durch höhere Temperaturen (thermophil statt mesophil), 2-stufige Verfahrensgestaltung (Aufstromreaktor plus Festbettreaktor), kürzere Häcksellängen, Zumischung von weiteren Substraten (z. B. Rapsexpeller) gesteigert werden.
- Die alleinige Vergärung von Stroh erfordert die Zuführung von Nährstoffen (v. a. Stickstoff und Spurenelemente).
- Der chemische Sauerstoffbedarf bietet eine aussichtsreiche Grundlage für eine exakte Modellierung des Prozesses. Anhand optischer Verfahren (v. a. UV/VIS und RAMAN) lassen sich organische Säuren in der Fermenterflüssigkeit gut erfassen, woraus sich ein interessanter Ansatz für eine Online-Steuerung des Aufstromverfahrens ergibt.
- Die Vergärung von Stroh im Aufstromverfahren besitzt eine sehr spezifische Mikroflora. Die bei höherer Raumbelastung zunehmende Phasenseparation

in Hydrolyse (Aufstromreaktor) und Methanbildung (Festbettreaktor) spiegelt sich in der mikrobiellen Struktur der Bakterien und Archaeen wider.

- Die Kombination von Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) und Durchflussszytometrie ermöglicht einen aussichtsreichen Ansatz für die schnelle und simultane Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen in der Flüssigphase des Aufstromsystems.
- Die flüssigen Nebenprodukte der HTC (Prozesswasser) und Pyrolyse (Kondensat) können effektiv zu Biogas vergoren werden. Eine Hemmwirkung durch organische Hemmstoffe trat nur bei sehr hohen Start- bzw. Zulaufkonzentrationen auf.
- Der Einsatz von Biokohle in Biogasanlagen kann die Biogasausbeute erhöhen (Abbau von HTC-Kohle), eine leichte Ammoniumhemmung aufheben (gezeigt für Pyrolysekohle) und die Mikroflora zugunsten der Archaea beeinflussen (Pyrolyse- und HTC-Kohle). Außerdem entwickeln sich auf beiden Kohlen methanogene Biofilme, die potenziell die Leistungsfähigkeit des Biogasprozesses verbessern können.

Thermochemische Karbonisierung von Gärrest und Systemintegration:

- Die HTC ist prinzipiell geeignet, um Gärrest zu Biokohle zu wandeln. Im Gegensatz zur Pyrolyse ist hierfür keine energieaufwendige Trocknung des Gärrests erforderlich.
- Die Prozesstemperatur übt den größten Einfluss auf die Prozess- und Produkteigenschaften der HTC auf. Bei höherer Temperatur steigen Kohlenstoff- und Energiegehalt der HTC-Kohlen. Gleichzeitig sinkt die Ausbeute.
- HTC-Kohle aus Strohgarrest besitzt nennenswerte Gehalte der Pflanzennährstoffe Stickstoff, Phosphor und Kalium. Die Oberfläche der HTC-Kohle ist bei einer mittelhohen HTC-Temperatur von 210 °C am höchsten. Mit ca. $10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ jedoch deutlich geringer als Pyrolysekohle (in der Regel $>100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$).
- Bei höherer HTC-Temperatur (insb. $>230^\circ\text{C}$) bilden sich zunehmend organische Nebenprodukte (u. a. Phenol), die sowohl in der HTC-Prozessflüssigkeit vorliegen als auch den HTC-Kohlen anhaften.
- Die Stabilität der HTC-Kohle im Boden in Bezug auf den Kohlenstoff steigt mit höherer Temperatur (z. B. 2 y mittlere Verweilzeit (MRT) bei 210 °C und 25 y bei 250 °C). Kohlenstoff von Pyrolysekohlen ist mit in der Regel über 100 y MRT deutlich stabiler. Bei kontinuierlicher Karbonisierung des an-

fallenden Stroh-Gärrests vor der Ausbringung kann langfristig deutlich mehr Kohlenstoff im Boden gespeichert werden als ohne Karbonisierung.

- Durch die kombinierte Behandlung von Stroh durch Vergärung und HTC kann die Energieausbeute in etwa verdoppelt werden. Die Effizienz lässt sich weiter steigern durch Reduzierung des Wasseranteils in der HTC, durch Wärmerückgewinnung und energetischer Integration der beiden Verfahren und durch die Vergärung der HTC-Flüssigkeit zu Biogas.
- Alternativ zur HTC erlaubt auch die Pyrolyse die Wandlung von Gärrest zu Biokohle. Wie bei der HTC, so bestimmt auch bei der Pyrolyse die Temperatur die Eigenschaften der Biokohle. Generell liegt der Kohlenstoffgehalt der Pyrolysekohlen über dem der HTC-Kohlen, während die Kohleausbeute sowie das atomare H/C-Verhältnis niedriger liegen.
- Für Pyrolyse- und HTC-Kohle wurde die Fähigkeit zur Adsorption von Ammonium und Phosphat festgestellt.

Wirkung von Biokohle im Boden:

- Laborinkubation: Pyrolysekohle ist stabiler als HTC-Kohle. HTC-Kohle beeinflusst die Struktur der Mikroflora stärker als Pyrolysekohle. Die CO₂-Emissionen steigen durch HTC-Kohle an. Die N₂O und CH₄-Emissionen reagieren jeweils uneinheitlich auf HTC- und Pyrolysekohle.
- Topfversuche (TU Berlin): Frische HTC-Kohle hemmt das Pflanzenwachstum. Als Gegenmaßnahme erwies sich eine Behandlung mit der Prozessflüssigkeit einer Biogasanlage als wirkungsvoll. Eine einfache Wäsche mit H₂O ergab dagegen eine deutlich negative Wirkung.
- Parzellenversuche: Im ersten Anbaujahr erfolgte durch frische HTC-Kohle eine deutliche und durch fermentierte HTC-Kohle eine leichte Ertragsminderung gegenüber der Mineraldüngervariante. Ab dem zweiten Jahr kam es zu ähnlichen oder höheren Erträgen durch HTC-Kohle. Der höchste Ertragszuwachs war durch fermentierte HTC-Kohle in hoher Dosierung (2 % Gesamt-C im Boden) in der zweiten Kultur zu beobachten. Als wesentliche Ursachen für die temporären Minder- und Mehrerträge werden organische Hemmstoffe der HTC-Kohle, Nachlieferung von Pflanzennährstoffen aus der Kohle bzw. Nährstoffmangel durch Nährstoffadsorption an die HTC-Kohle angenommen.

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse wurden in über 30 referierten Publikationen veröffentlicht (s. Kap. 2.6).

Die wesentlichen technischen Ergebnisse waren:

- Feststellung der Funktionsfähigkeit des Aufstromverfahrens für die Vergärung von lignocellulosereichen und N-reichen Biomassen.
- Feststellung der Funktionsfähigkeit der HTC für die Wandlung von Gärresten zu Biokohle.
- Bestätigung der Nützlichkeit des Einsatzes von Biokohle und flüssigen Biokohle-Nebenprodukten in Biogasanlagen.
- Beantragung von 5 Patenten zu i) Integration der Verfahren Biokohle und Biogas, ii) Reaktorlösung zur Biokohlefermentation, iii) Erzeugung von magnetischer HTC-Kohle, iv) Einsatz von magnetischer HTC-Kohle in Biogasanlagen und v) Erfassung kleiner Gasmengen aus der Fermentation (s. auch Kap. 2.4).

2.2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Für die Realisierung des Vorhabens entstanden plangemäß Kosten in unterschiedlichen Positionen des Finanzierungsplans. Insgesamt wurden Ausgaben i. H. v. etwa 3,20 Mio. € getätigt, die den Rahmen des Gesamtfinanzierungsplans i. H. v. ca. 3,18 Mio. € leicht um etwa 0,6 % überstiegen. Im Folgenden werden die wichtigsten Positionen erläutert.

Personal

Zur Koordination und Bearbeitung des Projekts wurden mehrere Wissenschaftlerstellen eingerichtet und besetzt. Hierzu gehörten neben dem Projektleiter, Dr. Jan Mumme, 3 PostDocs (anfänglich 2) sowie 4 Doktoranden. Plangemäß übernahmen die PostDocs koordinative Aufgaben in ihren jeweiligen Teilprojekten, u. a. die Betreuung der Doktoranden und Studenten sowie die Koordination der Arbeit mit dem technischen Personal. Das gesamte wissenschaftliche Personal zeichnete sich aus durch die engagierte Forschung auf ihren jeweiligen Gebieten, die produktive Publikation der Ergebnisse sowie die aktive Vertretung der Nachwuchsgruppe nach außen.

Für die technische Bearbeitung der Projektaufgaben wurden 2 Versuchsingenieure (anfänglich 1), 1 Techniker (zum Ende 2) und 2 Laboranten im Projekt beschäftigt. Des Weiteren wurde eine Teamassistentin beschäftigt, um die Verwaltungsaufgaben innerhalb der Nachwuchsgruppe zu unterstützen. Die Aufgaben der Versuchsingenieure betrafen im Wesentlichen den Aufbau der Versuchsanlagen zur Biogaserzeugung und der thermochemischen Karbonisierung sowie die Entwicklung und Umsetzung von Mess-, Steuer- und Regelkonzepten. Die Aufgabe der Techniker

bestand vor allem in dem Betrieb der Versuchsanlagen sowie der Datenerfassung und -aufbereitung für die nachfolgende wissenschaftliche Auswertung. Die Laboranten analysierten in den chemisch-biologischen bzw. mikrobiologisch-molekulargenetischen Laboren die Beschaffenheit der unterschiedlichen Materialien der bearbeiteten Prozesse. Trotz des hohen Neuheitsgrades und der Fülle heterogener Messdaten gelang es dem technischen Personal zeitnah wirkungsvolle Konzepte und Methoden zu entwickeln und umzusetzen, sodass die Wissenschaftler und Doktoranden frühzeitig mit validen Messdaten versorgt werden konnten. Die Teamassistentin sorgte erfolgreich dafür, dass die Verwaltungsaufgaben, insb. des Projektleiters und der PostDocs, effizient und zeitnah erfüllt werden konnten, sodass diese ausreichend Zeit für wissenschaftliche Tätigkeiten zur Verfügung hatten.

Für unterstützende Arbeiten in den unterschiedlichen Teilprojekten wurde eine Reihe von wissenschaftlichen und studentischen Hilfskräften beschäftigt. Zusätzlich schrieben im Laufe des Projekts 20 Studierende ihre Diplom-, Bachelor- und Masterarbeiten. Dadurch konnte die Breite und Tiefe der Forschung erheblich ausgebaut werden.

Verwaltungsausgaben und Investitionen

Wesentliche Einzelposten im Rahmen der Verwaltungsausgaben entfielen auf eine Lizenz für die Modellierungs- und Simulationssoftware Aspen Plus sowie einen Auftrag zur Herstellung eines Messsystems für geringe Gasströme durch die Humboldt-Universität zu Berlin. Hinzu kamen Ausgaben für die Informationsvermittlung an die Öffentlichkeit (u. a. Website und Informationsmaterial), Verbrauchsmaterial für die experimentellen und messtechnischen Aufgaben, Dienstreisen zum Kooperationspartner TUB sowie zu Tagungen und Konferenzen.

Für die Einrichtung der experimentellen und messtechnischen Versuchsbasis wurde zum Projektstart eine Reihe von Investitionen getätigt. Wesentliche Positionen waren labor- und kleintechnische Anlagen für die Fermentation und die thermochemische Karbonisierung sowie Analysegeräte (u. a. Ionenchromatograph und ICP-OES Spektrometer) zur Bestimmung der biologischen, chemischen und physikalischen Materialeigenschaften.

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die geleistete Arbeit war in Art und Umfang angemessen, um die gesteckten Ziele zu erreichen. Der vergleichsweise hohe Aufwand, der hierfür erforderlich war, resultierte zum einen aus der betrachteten breiten Systemebene des APECS-Biomassemodells mit den unterschiedlichen Gebieten Biogas, Biokohle und Boden und zum anderen aus der hohen Interdisziplinarität (u. a. Mikro-/Molekularbiologie, Chemie, Biover-

fahrenstechnik, Bodenkunde) sowie der Verknüpfung von grundlagen- und anwendungsorientierter Forschung. Hinzu kommt der technologische und methodische Neuheitscharakter, insb. in Bezug auf die Herstellung und Anwendung von Biokohle sowie die Mono-Vergärung von Stroh. Nach allgemeiner Kenntnis, erfordert die Analyse und Optimierung komplexer Konzepte der Biomassenutzung ein stark systematisches Vorgehen. Die theoretische Nutzung von einzelnen unverknüpften Studien auf den bearbeiteten Gebieten bietet daher keine Alternative zu dem in diesem Projekt verfolgten Ansatz und dem hierfür erforderlichen Zeit-, Personal- und Kostenaufwand.

Die durch Anzahl und Sichtbarkeit der von der Nachwuchsgruppe erzielten über 30 Publikationen in referierten Fachzeitschriften und 5 Patente bestätigen zusammen mit der Nachfrage, die das Projekt aus der Wirtschaft, der Politik sowie der Öffentlichkeit erfahren hat, den hohen Grad der Ergiebigkeit, Innovation und Relevanz der erarbeiteten Ergebnisse.

2.4 Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Ergebnisse des Projekts haben einen vielfältigen Nutzen für die Gesellschaft. Plangemäß entfällt dieser zunächst primär auf die wissenschaftliche Community in den bearbeiteten Disziplinen sowie auf die im Bereich der Bioökonomie tätige Wirtschaft.

Von der wissenschaftlichen Community wurden mehrere im Rahmen des Projekts neuentwickelte analytische Methoden übernommen. Dies gilt insb. für das im Rahmen von TP2 entwickelte *Flow-Fluorescence in situ hybridization* Protokoll (Nettmann et al., 2013) sowie die Bestimmung des Verhaltens von Biokohle in der methanogenen Fermentation (Mumme et al., 2014).

Der Wirtschaft wurden eine Reihe von innovativen Verfahren und Produkten bereitgestellt. Folgende Patente wurden beantragt, z. T. in Partnerschaft mit Dritten:

- 1) Mumme, J., Linke, B., Tölle R. (Eingetragen: 2009): Verfahren und Vorrichtung zur Erzeugung von Biogas und Biokohle sowie zur Veredelung der Biokohle. Patentanmeldung EP 2284141.
- ➔ Integrierte Erzeugung von Biogas und Biokohle nach APECS-Konzept. Gemeinsame Entwicklung von ATB und Humboldt-Universität zu Berlin. Status: Anmeldung.

- 2) Tölle, R., Huth, M., Mumme, J., Linke, B. (Eingetragen: 2010): Flaschen-Siphon zur Gasmessung in Biogasversuchen. EP 10158842.
 - ➔ Messtechnische Lösung zur Bestimmung kleiner Gasmengen aus Gärversuchen. Gemeinsame Entwicklung von ATB und Humboldt-Universität zu Berlin. Status: Anmeldung
- 3) Karagöz, Y., Mumme J., Werner, M. (Eingetragen: 2013): Verfahren und Vorrichtung zur Erzeugung von Biogas. DE 102013108867.
 - ➔ Aktivierung von Biokohle und Katalyse der Biogaserzeugung in EINEM Fermenter. Stand: Anmeldung
- 4) Reza, T.M., Mumme, J. (Eingetragen: 2014): Magnetisierbare Kohlenstoffpartikel, Verfahren zu deren Herstellung sowie deren Verwendung. DE 102014100850. Stand: Patent erteilt.
 - ➔ Herstellung magnetischer Kohle für div. Anwendung u. a. Immobilisierung von Enzymen
- 5) Mumme, J., Reza, T.M. (Eingetragen: 2014): Verfahren und Vorrichtung zur Erzeugung von Biogas. 10 2014 100 849. Stand: Anmeldung.
 - ➔ Einsatz magnetischer Kohle als Biofilmträger in Biogasanlagen

Die Erfindung 1 schützt das Grundkonzept des APECS-Biomassemodells, die kombinierte Erzeugung von Biogas und Biokohle. Kurz- und mittelfristiges Verwertungspotenzial besteht in der Landwirtschaft vor allem in den Regionen, in denen große Mengen an Gärrest und anderen Wirtschaftsdüngern anfallen und die direkte Ausbringung aufgrund der begrenzten Flächenverfügbarkeit problematisch ist. Die Erfindung ermöglicht die Produktion eines biokohlegetragerten Düngemittels aus den Reststoffen bestehender Biogasanlagen. Weiteres Verwertungspotenzial besteht in der Wertschöpfung durch die dauerhafte Kohlenstoffsequestrierung im Rahmen des internationalen CO₂-Zertifikatehandels und entspricht der Dekarbonisierungsabsicht der Bundesregierung.

Die Erfindung 2 „Flaschen-Siphon zur Gasmessung in Biogasversuchen“ diene als eine Grundlage für die Ausgründung der Firma promethano GmbH aus der Humboldt-Universität zu Berlin. Die in Berlin ansässige Firma promethano (www.promethano.de) stellt messtechnische Lösungen und Software für die Lebenswissenschaften her und startete mit einem Produkt für die präzise Messung geringer Gasvolumenströme, die u. a. bei Biogasversuchen auftreten, aber auch bei einer Reihe weiterer mikrobiologischer Prozesse (z. B. Kompostierung und Bodenatmung).

Erfindung 3 erweitert Erfindung 1 um eine neue effiziente Anlage, in der Biokohle biologisch aktiviert und mit Pflanzennährstoffen (v. a. N, P, K) angereichert werden

kann und gleichzeitig die Biogaserzeugung durch Bindung von Hemmstoffen (v. a. Ammonium) sowie die Bildung stabiler und leistungsfähiger Biofilme auf der Biokohleoberfläche gefördert wird. Verwertungspotenzial besteht vor allem bei der Biogaserzeugung aus Stoffen, die aufgrund hoher Ammoniumgehalte (u. a. Geflügelkot) bisher nicht oder nur sehr eingeschränkt eingesetzt werden konnten. Wie bei Erfindung 1 skizziert, kann die Biokohle mit dem adsorbierten Ammonium anschließend als Düngemittel vermarktet werden.

Die Erfindungen 4 und 5 beschreiben die Produktion und die Anwendungen von magnetischer Biokohle mittels HTC bzw. die konkrete Anwendung magnetischer Biokohle als Additiv in Biogasanlagen. Für magnetische Biokohle sind zahlreiche Anwendungsfelder im Bereich der chemischen Produktion (v. a. Katalyse und Separation) sowie im Umwelt- und Landwirtschaftsbereich (u. a. Reinigung von Abwässern durch Adsorption oder Immobilisierung von Mikroorganismen sowie die Entfernung von Schadstoffen aus Böden) vorhanden. Der Einsatz magnetischer Biokohle hat gegenüber nichtmagnetischer Biokohle in Biogasanlagen den Vorteil, dass diese im Fermenter auch dann zurückgehalten werden kann, wenn die Viskosität der Fermenterflüssigkeit keine schwerkraftgetriebene Separation erlaubt. Dies betrifft nahezu alle landwirtschaftlichen Biogasanlagen.

Neben den neuen Patenten wurde die bestehende Erfindung zum Aufstromverfahren durch die Demonstration der Machbarkeit der Monovergärung von Stroh aufgewertet. Das Patent wurde Anfang 2015 in den USA erteilt. Weltweit besteht durch das hohe Aufkommen von Stroh ein immenses wirtschaftliches Potenzial für das Aufstromverfahren. Zudem konnte in einem weiteren Projekt zusammen mit der Universität Göttingen zum Einsatz von Pferdemit im Aufstromverfahren (s. Kap. 1.5) gezeigt werden, dass sich auch strohbasierter Stallmist für die Biogaserzeugung im Aufstromverfahren eignet. Eine bereits zusammen mit einer Firma geplante Pilotanlage zum Aufstromverfahren konnte aufgrund der Insolvenz der Firma als Folge der Novellierung des Erneuerbaren Energien Gesetzes (EEG) nicht realisiert werden. Es bestehen jedoch Gespräche mit einer Reihe weiterer interessierter Firmen. Wie in Kap. 1.5 beschrieben, wird das Aufstromverfahren derzeit zusammen mit einem chinesischen Forschungspartner für die Vergärung von Maisstroh erprobt.

Aufgrund der globalen Notwendigkeit, in Zukunft die landwirtschaftliche Produktion zu steigern, die produzierte Biomasse effizienter zu nutzen, die Energie- und Rohstoffversorgung auf erneuerbare Quellen umzustellen, wirksame Maßnahmen zur Wiederherstellung und Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit umzusetzen sowie Kohlenstoff dauerhaft zu sequestrieren, ist absehbar, dass das APECS-Biomassemodell eine wichtige Vorbild- und Orientierungsfunktion für zukünftige Entwicklungen in diesen Bereichen erhält.

2.5 Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Bedingt durch die hohe gesellschaftliche Relevanz der bearbeiteten Themen Bereitstellung regenerativer Energie, Bodenverbesserung und Kohlenstoffsequestrierung wurde im Zeitraum des Projekts weltweit eine Vielzahl an relevanten Studien erstellt, u. a. in Bezug auf die Biogaserzeugung, die thermochemische Karbonisierung und den Einsatz von Biokohle zur Bodenverbesserung. Hierzu gehören auch nationale und im europäischen Rahmen geförderte Forschungsprojekte. Eine Studie, die eine Systemlösung entsprechend dem APECS-Modell analysiert, ist jedoch von anderer Stelle nicht bekannt geworden.

In Bezug auf die Erzeugung von Biogas wurden deutliche Fortschritte bei der Beschreibung der Prozessbiologie sowie der Prozessführung und Prozesssteuerung gemacht. Dies gilt auch für den Aufschluss von Stroh, mit dem Ziel der nachgeschalteten Fermentation zu Ethanol oder Biogas (Khoo, 2015). Zur Vergärung von Stroh im Originalzustand und damit ohne aufwendigen Faseraufschluss sind jedoch nur wenige Arbeiten bekannt geworden (u. a. Cui et al., 2011). Wie in den Kap. 1.5 und 2.4 beschrieben, konnte in Zusammenarbeit mit der Universität Göttingen gezeigt werden, dass sich neben reinem Stroh auch strohbasierter Stallmist für den Einsatz im Aufstromverfahren eignet, wodurch das Anwendungspotenzial des Verfahrens deutlich steigt.

Im Bereich der thermochemischen Erzeugung von Biokohle und deren Einsatz zur Bodenverbesserung hat die Anzahl der jährlichen Publikationen während der Projektlaufzeit erheblich zugenommen. Aus einer Metaanalyse aus dem Jahr 2011 von Jeffery et al. geht hervor, dass im Mittel aller Studien durch Biokohle eine Ertragssteigerung um 10 % bewirkt wurde. Allerdings besteht eine große Spanne von -28 bis +39 % und die den Effekten zugrunde liegenden Mechanismen bleiben auch weiterhin weitgehend unbekannt. Eine Kosten-Nutzen Analyse von Dickinson et al. (2015) zeigte, dass sich wirtschaftlich rentable Szenarien für den Einsatz von Biokohle vor allem in tropischen Zonen ergeben, während in gemäßigten Breiten negative ökonomische Bedingungen bestehen. Daraus wird deutlich, dass Biokohle als ein speziell für die Bodenverbesserung produzierter Hilfsstoff gegenwertig nur begrenzt wirtschaftlich einsetzbar ist. Auswege hieraus können sich aus der kaskadischen Nutzung und Aufwertung von Biokohle ergeben, wie sie das APECS-Biomassemodell vorsieht, in dem die Biokohle zunächst in einem Biogasfermenter die Erzeugung von Biogas fördert und dabei gleichzeitig mit Pflanzennährstoffen beladen wird. Darüber hinaus würde die Wirtschaftlichkeit der Biokohlenutzung als Bodenhilfsstoff erheblich steigen, wenn wie in Kap. 2.4 geschildert, sich der Wert durch die erbrachte Kohlenstoffsequestrierung erhöhen würde.

2.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Die von der Nachwuchsgruppe erarbeiteten Ergebnisse wurden in einer Reihe von wissenschaftlichen Artikeln veröffentlicht. Nachfolgend sind die Publikationen in referierten Fachzeitschriften sowie einer Auswahl weiterer Veröffentlichungen aufgeführt.

Publikationen in referierten Fachzeitschriften

- 1) Andert, J., Mumme, J. (under review): Impact of pyrolysis and hydrothermal biochar on gas-emitting activity of soil microorganisms and bacterial and archaeal community composition. *Applied Soil Ecology*.
- 2) Sänger, A., Reibe, K., Mumme, J., Kaupenjohann, M., Ellmer, F., Ro, C.-L., Meyer-Aurich, A. (under review): Biochar application to sandy soil: Effects on soil properties and winter wheat production. *Agriculture, Ecosystems & Environment*.
- 3) Schulze, M., Mumme, J., Kern, J., Funke, A. (under review): Effects of selected process conditions on the stability of hydrochar in low-carbon sandy soil. *Geoderma*.
- 4) Raposo, F., Borja, R., Cacho, J.A., Mumme, J., Fernández-Mohedano, A., Battimelli, A., Bolzonella, D., Schuit, A.D, Nogueroles-Arias, J., Frigon, J.-C., Peuelo, G.A., Muehlenberg, J. (under review): Harmonization of the quantitative determination of volatile fatty acids profile in aqueous matrix samples by direct injection using GC and HPLC techniques: Multi-laboratory validation study. *Journal of Chromatography A*
- 5) Böske, J., Mumme, J., Berg, W., Wirth, B., Garlipp, F., Van den Weghe, H. (under revision): Gas emissions during storage of solid horse manure digestate. *Journal of Environmental Quality*.
- 6) Erdogan, E., Atila, B., Mumme, J., Reza, M.T., Toptas, A., Elibol, M., Yanik, J. (in press): Characterization of products from hydrothermal carbonization of orange pomace including anaerobic digestibility of process liquor. *Bioresource Technology*. DOI:10.1016/j.biortech.2015.06.115.
- 7) Reza, M.T., Rottler, E., Herklotz, L., Wirth, B. (2015) Hydrothermal carbonization (HTC) of wheat straw: Influence of feedwater pH prepared by acetic acid and potassium hydroxide. *Bioresource Technology* 182, 336 – 344.
- 8) Dicke, C., Luhr, C., Ellerbrock, R., Mumme, J., Kern, J. (2015): Effect of hydrothermally carbonized hemp dust on the soil emissions of CO₂ and N₂O. *BioResources* 10, 3210 - 3223.
- 9) Reza, M.T., Rottler, E., Tölle, R., Werner, M., Ramm, P., Mumme, J. (2015): Production, characterization, and biogas application of magnetic hydrochar from cellulose. *Bioresource Technology* 186, 34 - 43.
- 10) Reza, M. T., Mumme, J., Ebert, A. (2015): Characterization of hydrochar from hydrothermal carbonization of wheat straw digestate. *Biomass Conversion and Biorefinery*. DOI: 10.1007/s13399-015-0163-9

- 11) Reza, M.T., Emerson, R., Gresham, G., Coronella, C. (2015): Reduction of Corn Stover by Mild Hydrothermal Preprocessing. *Biomass Conversion and Biorefinery* 5, 21 - 31. DOI: 10.1007/s13399-014-0122-x.
- 12) Hübner, T., Mumme, J. (2015): Integration of pyrolysis and anaerobic digestion - use of aqueous liquor from digestate pyrolysis for biogas production. *Bioresource Technology* 183, 86 - 92.
- 13) Böske, J., Wirth, B., Garlipp, F., Mumme, J., Van den Weghe, H. (2015): Upflow anaerobic solid-state (UASS) digestion of horse manure: Thermophilic vs. mesophilic performance. *Bioresource Technology* 175, 8 - 16.
- 14) Dicke, C., Lanza, G., Mumme, J., Ellerbrock, R., Kern, J. (2014): Effect of HTC-char application on trace gas emissions in two sandy soil horizons. *Journal of Environmental Quality* 43, 1790 - 1798.
- 15) Reza, M.T., Wirth, B., Lüder, U., Werner, M. (2014): Behavior of selected hydrolyzed and dehydrated products during hydrothermal carbonization of biomass. *Bioresource Technology* 169, 352 – 361.
- 16) Reza, M.T., Werner, M, Pohl, M., Mumme, J. (2014): Evaluation of Integrated Anaerobic Digestion and Hydrothermal Carbonization for Bioenergy Production. *Journal of Visualized Experiments*. DOI: 10.3791/51734
- 17) Heeg, K.; Pohl, M.; Sontag, M.; Mumme, J.; Klocke, M.; Nettmann, E. (2014): Microbial communities involved in biogas production from wheat straw as sole substrate within a two-phase solid-state anaerobic digestion. *Systematic and Applied Microbiology* 37, 590 - 600.
- 18) Becker, R., Dorgerloh, U., Paulke, E., Mumme, J., Nehls, I. (2014): Hydrothermal carbonization of biomass: Major organic components of the aqueous phase. *Chemical Engineering & Technology* 37, 511 - 518.
- 19) Reza, M.T.; Uddin, M.H.; Lynam, J.G.; Hoekman, S.K.; Coronella, C. (2014): Hydrothermal carbonization of loblolly pine: Reaction chemistry and water balance. *Biomass Conversion and Biorefinery*. DOI: 10.1007/s13399-014-0115-9.
- 20) Reza, T., Becker, W., Sachsenheimer, K., Mumme, J. (2014): Hydrothermal Carbonization (HTC): Near Infrared Spectroscopy and Partial Least-Squares Regression for determination of Selective Components in HTC Solid and Liquid Products. *Bioresource Technology* 161, 91 - 101.
- 21) Reza, M.T. Uddin, M.H., Lynam, J.G., Coronella, C. (2014): Engineered pellets of dry torrefied and HTC biochar blend. *Biomass and Bioenergy* 63, 229 – 238.
- 22) Reza, M.T., Andert, J., Wirth, B., Bunsch, D., Pielert, J., Lynam, J.G., Mumme, J. (2014): Review article. Hydrothermal Carbonization of Biomass for Energy and Crop Production. *Appl. Bioenergy* 1, 11 - 29.
- 23) Mumme, J., Srocke, F., Heeg, K., Werner, M. (2014): Use of biochars in anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 164, 189 - 197.

- 24) Böske, J., Wirth, B., Garlipp, F., Mumme, J., Van den Weghe, H. (2014): Anaerobic digestion of horse dung mixed with different bedding materials in an upflow solid-state (UASS) reactor process at mesophilic conditions. *Bioresource Technology*. 158, 111 - 118.
- 25) 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. *Journal of Renewable Energy*. Article ID 208718, 10 pages, DOI: 10.1155/2014/208718.
- 26) Wirth, B., Mumme, J. (2013): Anaerobic digestion of waste water from hydrothermal carbonization of corn silage. *Applied Bioenergy* 1, 1 - 10.
- 27) Diakité, M., Paul, A., Jäger, C., Pielert J., Mumme, J. (2013): Chemical and morphological changes in hydrochars derived from microcrystalline cellulose and investigated by chromatographic, spectroscopic and adsorption techniques. *Bioresource Technology* 150, 98 - 105.
- 28) Funke, A., Reeb, F., Kruse, A. (2013): Experimental comparison of hydrothermal and vapothermal carbonization. *Fuel Processing Technology* 115, 261 - 269.
- 29) Kruse, A., Funke, A., Titirici, M.-M. (2013): Hydrothermal conversion of biomass to fuels and energetic materials. *Current opinion in chemical biology* 17, 515 - 521.
- 30) Funke, A., Mumme, J., Koon, M., Diakité, M. (2013): Cascaded production of biogas and hydrochar from wheat straw: energetic potential and recovery of carbon and plant nutrients. *Biomass and Bioenergy* 56, 229 - 237.
- 31) Uddin, M. H., Reza, M. T., Lynam, J. G. and Coronella, C. J. (2013): Effects of water recycling in hydrothermal carbonization of loblolly pine. *Environ. Prog. Sustainable Energy*. DOI: 10.1002/ep.11899.
- 32) Raposo, F., Borja, R., Cacho, J. A., Mumme, J., Orupöld, K., Esteves, S., Nogueroles-Arias, J., Nielfa, A., Scherer, P., Wierinck, I., Aymerich, E., Cavinato, C., Rodríguez, D.C., García-Mancha, N., Lens, P.N.T., Fernández-Cegrí, V. (2013): First international comparative study of volatile fatty acids in aqueous samples by chromatographic techniques: Evaluating sources of error (Review). *Trends in Analytical Chemistry* 51, 127 - 144.
- 33) Becker, R., Dorgerloh, U., Helms, M., Mumme, J., Diakité, M., Nehls, I. (2013): Hydrothermally carbonized plant materials: patterns of volatile organic compounds. *Bioresource Technology* 130, 621 - 628.
- 34) Pohl, M., Heeg, K., Mumme, J. (2013): Anaerobic digestion of wheat straw - Performance of continuous solid-state digestion. *Bioresource Technology* 146, 408 - 415.
- 35) Nettmann, E., Fröhling, A., Heeg, K., Klocke, M., Schlüter O., Mumme, J. (2013): Development of a Flow-Fluorescence in situ hybridization protocol for the analysis of microbial communities in anaerobic fermentation liquor. *BMC Microbiology* 13:278.

- 36) Pohl, M., Mumme, J., Heeg, K., Nettmann, E. (2012): Thermo- and mesophilic anaerobic digestion of wheat straw by the upflow anaerobic solid-state (UASS) process. *Bioresource Technology* 124, 321 - 327.
- 37) Contreras Velázquez L. M., Mumme, J., Pereda Reyes I., Romero Romero O. (2012): Tratamiento de la paja de arroz mediante fermentación anaerobio en estado seco. *Ingeniería Química* 41. (http://www.aiqu.org.uy/edicion_41.php)
- 38) Mumme, J., Eckervogt, L., Pielert, J., Diakité, M., Rupp, F., Kern, J. (2011): Hydrothermal carbonization of anaerobically digested maize silage. *Bioresource Technology* 102, 9255 - 9260.

Weitere Publikationen (Auswahl)

- 1) Mumme, J.; Wirth, B.(2015): Behandlung von Abwässern aus hydrothermalen Prozessen in Kläranlagen und im Biogasprozess. In: Nelles, M.; Klemm, M.(eds.): Tagungsband. Ergebnistreffen HTP-Innovationsforum. Leipzig, S. 24 - 25.
- 2) Foltan, H. (2015): Magnetische Kohle für mehr Biogas. *ChemieXtra* 4/2015, S. 10 - 11.
- 3) Hübner, T., Mumme, J., (2015): Einfache mikrobiologische Umwandlung von Reststoffen aus der Biokohleproduktion. *labor&more* 5/2015, S. 30 - 25.
- 4) Mumme J, Wirth, B. (2015): The APECS-biomass model. Extended Abstract. In: Kuehle-Weidemeier, M. Balhar, M. (Eds.) *Proceedings of Waste-to-Resources 2015. VI International Symposium MBT and MRF. Cuvillier Göttingen. S. 291 - 292.*
- 5) Mumme, J., Funke. A., Neubauer, Y., Karagöz, Y. (2015): Herstellung von Biokohlen. In: Haubold-Rosar, M.; Kern, J.; Reinhold, J. (eds.): Chancen und Risiken des Einsatzes von Biokohle und anderer „veränderter“ Biomasse als Bodenhilfsstoffe oder für die C-Sequestrierung in Böden. Umweltbundesamt Dessau-Roßlau. S. 5 - 17.
- 6) Pohl, M.; Heeg, K.; Mumme, J. (2013): Vergärung von Stroh im zweiphasigen Aufstromverfahren. In: VDI Verlag Gruppe (ed.): 7. Fachtagung Biogas 2013 - Energieträger der Zukunft, Nürtingen, 12.-13.06.2013, VDI-Berichte, VDI Verlag GmbH, Düsseldorf, 2013, S. 61 – 70.
- 7) Mumme, J. (2012): Mit Biokohle aus Gärresten die Bodenfruchtbarkeit steigern - das APECS-Konzept. In: *Proceedings "BiogasPOTENZIALE: Erkennen, Erforschen, Erwirtschaften. 2. Öffentliches Symposium des Biogas Competence Networks (BCN) und 7. Fachtagung Biogas 2012 von ETI und LUGV"*, Potsdam, 29.10.2012, Bornimer Agrartechnische Berichte, Heft 79, Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Potsdam, 2012, (ISSN 0947-7314), S. 162 – 170.
- 8) Pohl, M.; Mumme, J.; Heeg, K.; Nettmann, E. (2012): Vergärung von Weizenstroh im Aufstromverfahren. In: *Proceedings "BiogasPOTENZIALE: Erkennen,*

Erforschen, Erwirtschaften. 2. Öffentliches Symposium des Biogas Competence Networks (BCN) und 7. Fachtagung Biogas 2012 von ETI und LUGV", Potsdam, 29.10.2012, Bornimer Agrartechnische Berichte, Heft 79, Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., ISSN 0947-7314, S. 58 – 65.

- 9) Wirth, B.; Mumme, J.; Erlach, B. (2012): Anaerobic Treatment of Waste Water derived from Hydrothermal Carbonization. Proceedings of the 20th European Biomass Conference and Exhibition (EU BC&E). 20th European Biomass Conference and Exhibition, Milan, 18. - 22.06.2012, Proceedings, Milan (Italien), 2012, S. 683 - 692.
- 10) Kern, J.; Dicke, C.; Libra, J.; Mumme, J. (2011): Biokohle: ein Kohlenstoffspeicher, der die Böden verbessert. Forschungsreport 22, S. 28 – 30.
- 11) Linke, B.; Mumme, J.; Mähnert, P.; Plogsties, V. (2011): Grundlagen und Verfahren der Biogasgewinnung. In: Energie Technologie Initiative Brandenburg, P. (eds.): Biogas in der Landwirtschaft - Leitfaden für Landwirte im Land Brandenburg. 4. überarbeitete Auflage, S. 12 – 28.
- 12) Foltan, H.; Mumme, J. (2010): Mit Biogas und Biokohle zur Kohlenstoffsенke. Forschungsreport 21, S. 52.
- 13) Mumme, J.; Linke, B.; Tölle, R. (2009): Continuous two-phase solid-state anaerobic digestion: Model-based optimization. In: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (ed.): Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, Erding, 02. - 04.12.2009, Band 1, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising-Weihenstephan, ISSN 1611-4159, S. 163 – 178.

2.7 Literaturverzeichnis

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). The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Science and Technology* 45, 65-73.

Becker, R., Dorgerloh, U., Helmig, M., Mumme, J., Diakité, M., Nehls, I. (2013): Hydrothermally carbonized plant materials: patterns of volatile organic compounds. *Bioresource Technology* 130, 621 - 628.

Becker, R., Dorgerloh, U., Paulke, E., Mumme, J., Nehls, I. (2014): Hydrothermal carbonization of biomass: Major organic components of the aqueous phase. *Chemical Engineering & Technology* 37, 511 - 518.

Cao, X., Ro, K.S., Chappell, M., Li, Y., Mao, J. (2011): Chemical Structures of Swine-Manure Chars Produced under Different Carbonization Conditions Investigated by Advanced Solid-State ¹³C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. *Energy Fuels* 25. 388-397.

Crombie, K., Mašek, O., Sohi, S.P., Brownsort, P., Cross, A. (2013): The effect of pyrolysis conditions on biochar stability as determined by three methods. *GCB Bioenergy* 5, 122 - 131.

Cui, Z., Shi, J., Li, Y. (2011): Solid-state anaerobic digestion of spent wheat straw from horse stall. *Bioresource Technology* 102, 9432 - 9437.

- Dickinson, D., Balduccio, L., Buysse, J., Ronsse, F., van Huylbroeck, G., Prins, W. (2012): Cost-benefit analysis of using biochar to improve cereals agriculture. *GCB Bioenergy* 7, 850–864.
- Funke, A., Mumme, J., Koon, M., Diakité, M. (2013): Cascaded production of biogas and hydrochar from wheat straw: energetic potential and recovery of carbon and plant nutrients. *Biomass and Bioenergy* 56, 229 - 237.
- Gerin, P.A., Viiegen, F., Jossart, J.M. (2008): Energy and CO₂ balance of maize and grass as energy crops for anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 99, 2620 - 2627.
- Gömmel, M. (2012): Adsorption von NO₃, NH₄, K, PO₄ an HTC- und pyrogener Kohle. Diplomarbeit an der Universität Potsdam, Institut für Erd- und Umweltwissenschaften.
- Heeg, K.; Pohl, M.; Sonntag, M.; Mumme, J.; Klocke, M.; Nettmann, E. (2014): Microbial communities involved in biogas production from wheat straw as sole substrate within a two-phase solid-state anaerobic digestion. *Systematic and Applied Microbiology* 37, 590 - 600.
- Helffrich, D., Oechsner, H. (2003): Hohenheimer biogas yield test – comparing various laboratory methods on biomass fermentation. *Landtechnik* 58, 148 - 149.
- Helmis, M. (2011): Charakterisierung flüchtiger und extrahierbarer organischer Bestandteile thermochemischer Umwandlungsprodukte von Biomassen mittels GC/MS, Masterarbeit an der Beuth Hochschule für Technik Berlin, Fachbereich II Mathematik - Physik – Chemie.
- Hübner, T., Mumme, J., (2015): Einfache mikrobiologische Umwandlung von Rest-stoffen aus der Biokohleproduktion. *labor&more* 5/2015, 30 - 25.
- Jeffery, S., Verheijen, F.G.A., van der Velde, M., Bastos, A.C. (2011): A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 144, 175 - 187.
- Khoo, H.H. (2015): Review of bio-conversion pathways of lignocellulose-to-ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 46, 100 - 119.
- Koon, M. (2011): Recovery of Carbon and Nutrients in Lignocellulosic Biomass during Hydrothermal Carbonization, Masterarbeit an der Universität Hamburg, Integrated Climate System Sciences
- Lehmann, D.J., Joseph, S. (2009): *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*. Earthscan.
- Mumme, J., Eckervogt, L., Pielert, J., Diakité, M., Rupp, F., Kern, J. (2011): Hydrothermal carbonization of anaerobically digested maize silage. *Bioresource Technology* 102, 9255 - 9260.
- Mumme, J., Srocke, F., Heeg, K., Werner, M. (2014): Use of biochars in anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 164, 189 - 197.
- Nettmann, E., Fröhling, A., Heeg, K., Klocke, M., Schlüter O., Mumme, J. (2013): Development of a Flow-Fluorescence in situ hybridization protocol for the analysis of microbial communities in anaerobic fermentation liquor. *BMC Microbiology* 13:278.
- Pobeheim, H., Munk, B., Johansson, J., Guebitz, G.M. (2010): Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage. *Bioresource Technology* 101, 836 - 839.

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. *Journal of Renewable Energy*. Article ID 208718, 10 pages, doi:10.1155/2014/208718.

Reza, M. T., Rottler, E., Tölle, R., Werner, M., Ramm, P., Mumme, J. (2015): Production, characterization, and biogas application of magnetic hydrochar from cellulose. *Bioresource Technology* 186, 34 - 43.

Reza, M.T., Wirth, B., Lüder, U., Werner, M. (2014): Behavior of selected hydrolyzed and dehydrated products during hydrothermal carbonization of biomass. *Bioresource Technology* 169, 352 - 361

Schuhmacher, J.P., Huntjens, F.J., von Krevelen, D.W. (1960): Chemical structure and properties of coal XXVI – studies on artificial coalification. *Fuel* 39, 223 - 234.

Schulze, M. (2013): Hydrothermale Karbonisierung – Einfluss ausgesuchter Parameter bei der Produktion von Biokohlen auf ihre Stabilität im Boden. Diplomarbeit am Institut für Erd- und Umweltwissenschaften der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät an der Universität Potsdam.

Schulze, M., Mumme, J., Kern, J., Funke, A. (2015, under review): Effects of selected process conditions on the stability of hydrochar in low-carbon sandy soil. *Geoderma*.

Sevilla, M., Fuertes, A.B., (2009): The production of carbon materials by hydrothermal carbonization of cellulose. *Carbon* 47, 2281 - 2289.

Stemann J., Ziegler F. (2011): Assessment of the energetic efficiency of a continuously operating plant for hydrothermal carbonisation of biomass. In: Moshfegh, B. (Ed.) *World renewable energy congress WREC 2011: proceedings of the world renewable energy congress; 2011 May 8 - 11; Linköping, Sweden*. Linköping University Electronic Press, 125 - 132.

Wirth (2012): Anaerobic Digestion of Waste Water from Hydrothermal Carbonization of Corn Silage. Masterarbeit an der Technischen Universität Berlin, Fakultät V – Verkehrs- und Maschinensystem.