Schlussbericht

zum Vorhaben

Thema:	**Bedeutung der Milchsäure für die Bildung von methanogenen Substraten in Biogasanlagen; Teilvorhaben 2: Abbau von Milchsäure im Biogasprozess**
Zuwendungsempfänger:	**Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens e.V.**
Förderkennzeichen:	**12NR266 bzw. 22026612**
In Kooperation mit:	**Johannes Gutenberg-Universität Mainz (FKZ:22012412)**
Laufzeit:	**01.02.2013 – 31.03.2016**
Monat der Erstellung:	**Juni 2016**
Berichtsverfasser:	**Dr. Stefan Dröge**

Gefördert durch:

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

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

Inhalt

I. Ziele **5**

I.1 Aufgabenstellung **5**

I.2 Planung und Ablauf des Vorhabens **6**

I.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand **7**

I.3.1 Prozessbiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen 7

I.3.2 Bildung und Abbau von Milchsäure in anaeroben Ökosystemen 9

I.4 Nachweis der Fachliteratur **12**

II. Eingehende Darstellung – Ergebnisse **15**

II.1 Anreicherung, Isolierung und Charakterisierung milchsäureabbauender Bakterien aus Praxisanlagen **15**

II.1.1 Untersuchte Praxisanlagen und Probennahme 15

II.1.2 Medien und Wachstumssubstrate 15

II.1.3 Zellzahlen kultivierbarer milchsäureabbauender Bakterien 18

II.1.4 Anreicherung und Isolierung milchsäureabbauender Bakterien 24

II.1.5 Charakterisierung der gewonnenen Isolate 26

II.2 Monitoring der Praxisanlagen **35**

II.2.1 Anlagenparameter der Biogasanlagen 35

II.2.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung des Stärkegehaltes der Substrate 36

II.2.3 Prozessüberwachung und Substratanalytik der Praxisanlagen 38

II.3 Zusammenfassung **51**

II.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse **52**

II.5 Erkenntnisse von Dritten **53**

II.6 Veröffentlichungen **54**

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Abbaus von pflanzlichen Polymeren zu Methan und Kohlendioxid unter anaeroben Bedingungen. 8

Abbildung 2: MPN-Zahlen milchsäureabbauender Bakterien in 5 verschiedenen Biogasanlagen; Probennahme 1. BGA A = LieserArenrath; BGA B = Friedrich; BGA C = Neumann; BGA C-VH = Neumann VorhydrolyseBGA D-F = Glahn Fermenter; BGA D-NG = Glahn Nachgärer (thermophil); BGA E = Gebel/Obere Blies. 19

Abbildung 3: MPN-Zahlen milchsäureabbauender Bakterien in 5 verschiedenen Biogasanlagen; Probennahme 2. BGA A = Lieser/Arenrath; BGA B = Friedrich; BGA C = Neumann; BGA D-F = Glahn Fermenter; BGA D-NG = Glahn Nachgärer (thermophil); BGA E = Gebel/Obere Blies. 20

Abbildung 4: MPN-Zahlen milchsäureabbauender Bakterien in 5 verschiedenen Biogasanlagen; Probennahme 3. BGA A = Lieser/Arenrath; BGA B = Friedrich; BGA C = Neumann; BGA D-F = Glahn Fermenter; BGA D-NG = Glahn Nachgärer; BGA E = Gebel/Obere Blies. 21

Abbildung 5: MPN-Zahlen milchsäureabbauender Bakterien in 5 verschiedenen Biogasanlagen; Probennahme 4. BGA A = Lieser/Arenrath; BGA B = Friedrich; BGA C = Neumann; BGA D-F = Glahn Fermenter; BGA D-NG = Glahn Nachgärer; BGA E = Gebel/Obere Blies. 22

Abbildung 6: MPN-Zahlen milchsäureabbauender Bakterien in 5 verschiedenen Biogasanlagen; Probennahme 4. BGA A = Lieser/Arenrath; BGA B = Friedrich; BGA C = Neumann; BGA D-F = Glahn Fermenter; BGA D-NG = Glahn Nachgärer; BGA E = Gebel/Obere Blies. 23

Abbildung 7: Tiefagar-Verdünnungsreihe mit Kolonien (dunkle Punkte) nach drei Wochen Inkubation.....24

Abbildung 8: Chromatogramm einer hydrolysierten Maisprobe.....37

Abbildung 9: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH_4^+-N Gehaltes bei Anlage A.....39

Abbildung 10: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH4+-N Gehaltes bei Anlage B.....41

Abbildung 11: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH4+-N Gehaltes bei Anlage C.....43

Abbildung 12: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH4+-N Gehaltes beim Fermenter der Anlage D.....46

Abbildung 13: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH4+-N Gehaltes beim Nachgärer der Anlage D.....47

Abbildung 14: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH4+-N Gehaltes der Anlage E 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Morphologische und physiologische Charakteristika ausgewählter Spezies ... 10

Tabelle 2: Zusammensetzung der Medien MI. 16

Tabelle 3: Zusammensetzung der Spurenelementlösung. 16

Tabelle 4: Zusammensetzung der Vitaminlösung. 17

Tabelle 5: Zusammensetzung der Medien MII. 17

Tabelle 6: Kulturen milchsäureabbauender Bakterien aus Biogasanlagen 26

Tabelle 7: Morphologie und Abbauprodukte der Kulturen milchsäureabbauender Bakterien 27

Tabelle 8: Abhängigkeit des Wachstums vom pH-Wert 28

Tabelle 9: Abhängigkeit des Wachstums vom der Temperatur 29

Tabelle 10: Abhängigkeit des Wachstums vom Gehalt an NH4-N 30

Tabelle 11: Verwendete synthetische Oligonukleotide zur Sequenzierung bakterieller 16S rDNA 31

Tabelle 12: Reaktionsbedingungen einer PCR bakterieller 16S-rDNA. 32

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen einer PCR bakterieller 16S-rDNA. 32

Tabelle 14: Sequenzierungsergebnisse und systematischen Einordnung 33

Tabelle 15: Anlagenparameter der beteiligten Biogasanlagen. 35

Tabelle 16: Substratcharakteristik Anlage A 40

Tabelle 17: Substratcharakteristik Anlage B 42

Tabelle 18: Substratcharakteristik Anlage C 44

Tabelle 19: Substratcharakteristik Anlage D 48

Tabelle 20: Substratcharakteristik Anlage E 50

I. Ziele

I.1 Aufgabenstellung

Die Diversität der beteiligten Mikroorganismen und die entsprechenden biochemischen Mechanismen des mikrobiellen Abbaus von erneuerbarer Biomasse im Zuge der anaeroben Fermentation in landwirtschaftlichen Biogasanlagen sind nur in seinen Grundzügen bekannt. Einzelne Stufen dieses Abbaus wie die Methanogenese und der syntrophe Abbau von kurzkettigen Fettsäuren sind zum Teil besser untersucht und durch isolierte Mikroorganismen belegt. Relativ wenige Informationen liegen allerdings über die einleitenden Abbauschritte der Hydrolyse und der primären Gärung vor, bei der Zucker in kurzkettige Fettsäuren umgewandelt werden. Dies betrifft sowohl die beteiligten Mikroorganismen als auch die zu Grunde liegenden Stoffwechselleistungen. Die Bereitstellung methanogender Substrate, in erster Linie Kohlendioxid und Wasserstoff sowie Essigsäure, kann über eine Vielzahl verschiedener kurzkettiger Alkohole und Fettsäuren sowie Milchsäure als Zwischenprodukte erfolgen. Welche Stoffwechselwege unter welchen Bedingungen bevorzugt ablaufen hat einen erheblichen Einfluss auf den Abbaugrad, die Prozessstabilität und die Methanbildungsrate. So kann eine verstärkte Bildung bestimmter Fettsäuren wie Propionsäure und Buttersäure den Fermentationsverlauf verlangsamen, da diese Säuren nur über komplexe syntrophe Stoffwechselwege abgebaut werden können. Derzeit ist allerdings wenig darüber bekannt, unter welchen Prozessparametern im Fermenter und in Abhängigkeit von welchen Fütterungssubstraten bestimmte Zwischenprodukte bevorzugt gebildet werden.

Es gibt allerdings Hinweise, die durch eigene Untersuchungen belegt sind, dass die Milchsäure in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung sein könnte. Im Rahmen eines vom BMELV geförderten Verbundprojektes (FKZ 22004007 und 22003008) konnte gezeigt werden, dass beim Einsatz bestimmter Modellsubstrate eine verstärkte Milchsäurebildung auftritt. Darüber hinaus ergaben sich deutliche Hinweise auf eine erhöhte Propionsäurebildung im Zuge des Milchsäureabbaus. Dies ist insofern von Bedeutung, als das die Milchsäure nicht nur als Stoffwechselzwischenprodukt im Biogasfermenter entsteht, sondern typischerweise auch in großen Mengen über die Fütterung von z. B. Maissilagen zugeführt wird.

Vor diesem Hintergrund ist es das Ziel des vorliegenden Verbundvorhabens zwischen dem Prüf- und Forschungsinstitut in Pirmasens und dem Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz die mikrobiellen und biochemisch/ physiologischen Hintergründe der Bildung und des Abbaus von Milchsäure im Biogasprozess von laufenden NawaRo-Biogasanlagen zu beleuchten. Hierzu sollen Milchsäure-bildende Mikroorganismen aus Biogasfermentern isoliert und stoffwechselphysiologisch charakterisiert werden. Darüber hinaus

soll der Abbauweg der Milchsäure und die dabei entstehenden Produkte aufgeklärt werden. Die entsprechenden Untersuchungen werden dabei in Zusammenhang gesetzt mit den Betriebsparametern sowie den Fütterungssubstraten der jeweiligen Biogasanlagen. Auf diese Weise sollen der Einfluss von Input-Stoffen und der Betriebsweise von Biogasfermentern auf bestimmte mikrobielle Aktivitäten im Biogas-Prozess ermittelt werden. Insgesamt soll das Vorhaben dazu beitragen, ein vertieftes Verständnis bezüglich eines wichtigen komplexen mikrobiellen Abbauschrittes und der vielfältigen Interaktionen im Biogasprozess zu gewinnen. Hieraus sollen Ansätze zu einer Optimierung der Prozessmikrobiologie entwickelt werden, insbesondere im Hinblick auf eine Verbesserung der Prozessstabilität von Biogasanlagen.

Im Rahmen des Teilvorhabens 2 konzentrierten sich die Untersuchungen auf den Abbau von Milchsäure im Biogasfermenter. Hierbei galt es, Milchsäure-abbauende Bakterien im Biogasprozess zu isolieren, zu identifizieren und zu charakterisieren. Auf der Grundlage physiologischer Untersuchungen sollte ermittelt werden, auf welchen Stoffwechselwegen Milchsäure abgebaut werden kann. Ein wichtiger Punkt ist es hierbei zu ermitteln, unter welchen Bedingungen Milchsäure verstärkt in methanogene Substrate überführt wird (H2/CO2, Essigsäure) und wann es dagegen zunächst zu einer Bildung von Produkten kommt, welche die Prozessstabilität und Abbaugeschwindigkeit negativ beeinflussen können (z.B. Propionsäure).

I.2 Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Arbeitsprogramm des Teilvorhabens 2 orientierte sich an den im Rahmen der Antragsstellung formulierten Zielen und der festgelegten Aufgabenverteilung. Im Rahmen des Kick-off-Meetings wurden diese konkretisiert und ein detaillierter Arbeitsplan festgelegt. Die Fortschritte innerhalb der einzelnen Arbeitspakete sowie die Meilensteinplanung wurden im Rahmen regelmäßiger Projekt-Meetings überprüft.

I.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand

I.3.1 Prozessbiologie in landwirtschaftlichen Biogasanlagen

Die Produktion von Biogas in landwirtschaftlichen Biogasanlagen folgt dem generellen Prinzip des mehrstufigen Abbaus von organischem Material unter anaeroben Bedingungen, der im Labor und in anderen Biotopen ausgearbeitet wurde (Baader et al. 1978, Schink 1997, Zehnder 1988) und in laufenden NawaRo-Biogasanlagen zumindest in Teilen verifiziert wurde. Hinweise auf neuartige Mechanismen ergaben sich bei eigenen Studien des Abbaus der Propionsäure in Biogasanlagen. Der Abbauweg von pflanzlichen Substraten zu Methan und Kohlendioxid lässt sich formal je nach Betrachtungsweise in 3 bzw. 4 Stufen unterteilen (Abb. 1). In der ersten Stufe werden die pflanzlichen Polymere durch die Aktivitäten hydrolytischer Bakterien in oligomere sowie dimere und schließlich in monomere Bestandteile zerlegt.

In der zweiten Stufe werden die Hydrolyseprodukte der ersten Stufe fermentativ zu verschiedenen Zwischenprodukten abgebaut. Wesentliche Produkte dieser primären Gärungsreaktionen sind verschiedene kurzkettige Fettsäuren (z.B. Acetat, Propionat, Butyrat), Milchsäure und Alkohole (z.B. Ethanol, Propanol, Butanol) sowie Wasserstoff und Kohlendioxid. Die niedermolekularen Säuren und Alkohole der primären Gärung dienen in der Stufe IIb den sekundären Gärern als Substrate und werden im Wesentlichen zu $H_2 + CO_2$ und Acetat umgesetzt. Die sekundären Gärer sind als syntrophe Bakterien anzusehen, da der anaerobe Abbau von Substraten wie Propionat, Butyrat und Ethanol unter Standardbedingungen endergon ist und daher wasserstoffverbrauchende Partnerorganismen erfordert. Erst durch den Entzug des anfallenden Wasserstoffs aus dem Reaktionsgleichgewicht durch die Aktivität dieser Organismen wird die Energetik der Reaktionen so begünstigt, dass sie ablaufen können.

Die dritte und terminale Stufe des anaeroben Abbaus von organischem Material stellt schließlich die Methanogenese dar. Verschiedene systematische Gruppen von methanogenen Archaebakterien können hierbei $H_2 + CO_2$ und Formiat (hydrogenotrophe Methanogene) und/oder Acetat (acetoklastische Methanogene) als Substrat dienen. Neben den methanogenen Archaebakterien können auch sogenannte homoacetogene Bakterien Acetat aus CO_2 und H_2 (Acetogenese) bilden, während Sulfatreduzierer den Wasserstoff zur Reduktion von Sulfat (Sulfat-Atmung) nutzen und einige auch Acetat oxidieren können.

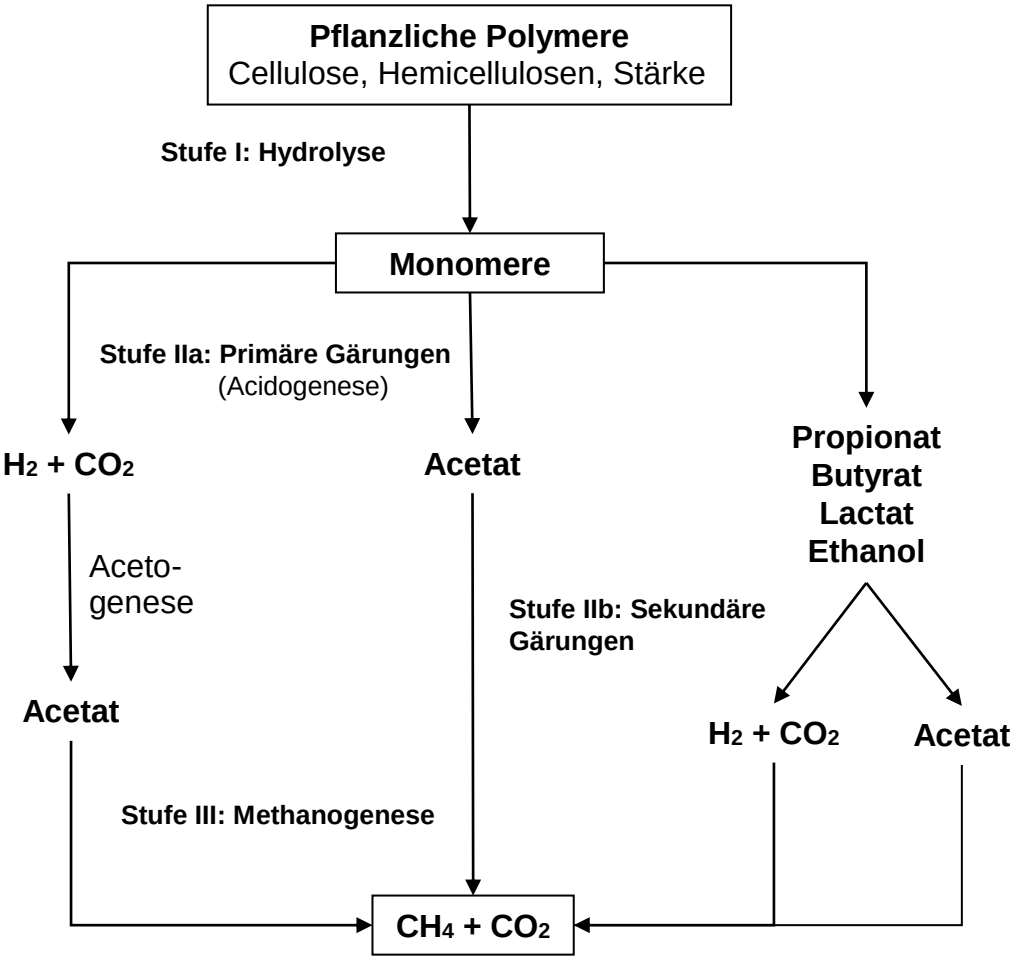

Abbildung 1 Schematische Darstellung des Abbaus von pflanzlichen Polymeren zu Methan und Kohlendioxid unter anaeroben Bedingungen.

Obwohl der oben dargestellte prinzipielle Abbauweg von pflanzlicher Biomasse zu Biogas bekannt war, wird die Prozessbiologie in Biogasanlagen teilweise immer noch als *Black Box* betrachtet. Dies hatte im Wesentlichen damit zu tun, dass nur sehr wenige Informationen über die an den einzelnen Abbauschritten beteiligten Mikroorganismen in Biogasanlagen selbst vorliegen. In der jüngeren Vergangenheit wurden allerdings eine Reihe von grundlegenden Arbeiten durchgeführt, die sich mit der mikrobiellen Diversität in Biogasanlagen auf der Ebene der Gensequenzierungen beschäftigt haben. Ein Fokus lag auf Untersuchungen zur Diversität der methanbildenden Archaea. Schwerpunktmäßig wurden hierbei kultivierungsunabhängige molekularbiologische Untersuchungen auf Basis der 16S rDNA oder des *mcrA* Gens (α-Untereinheit der Methyl-Coenzyme-M Reduktase) durchgeführt (Klocke et al. 2008, Krause et al. 2008, Nettmann et al. 2008, Nettmann et al. 2010). Neben den rein molekularbiologischen Ansätzen konnten allerdings auch eine Reihe von methanogenen Archaea von unseren Arbeitsgruppen aus Praxisanlagen isoliert und charakterisiert werden (JGU & PFI 2011). Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass aus der Gruppe der

methanogenen Archaea Vertreter der Ordnungen Methanomicrobiales und Methanosarcinales in Biogasanlagen dominieren. Ob auch Vertreter der obligat acetoklastischen Gattung Methanosaeta in größerem Umfang vorkommen, scheint dagegen sehr stark von den Prozessbedingungen abzuhängen (Insbesondere vom Gehalt an Essigsäure und Ammonium-Stickstoff). Auf eine wichtige Rolle der Ordnungen Methanomicrobiales und Methanosarcinales deuten auch Ergebnisse einer Untersuchung hin, die sich mit dem syntrophen Fettsäureabbau beschäftigt hat (JGU & PFI 2011). In verschiedenen propionsäureabbauenden Konsortien, welche aus Praxisanlagen gewonnen wurden, wurden insbesondere Vertreter der Gattung *Methanoculleus* gefunden. Darüber hinaus wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die sich auf Basis molekularbiologischer Methoden mit der gesamten mikrobiellen Diversität beschäftigten. Neben den verschiedenen Vertretern der methanogenen Archaea wurden vor allen Bakterien der Phyla Firmicutes und Bacteroidetes gefunden (Kröber et al. 2009, Rademacher et al. 2012, Schlüter et al. 2008). Allerdings zeigten sich bei diesen Untersuchungen auch eine große Anzahl von 16S-rDNA-Sequenzen, die sich bislang beschriebenen Arten und Gattungen nicht eindeutig zuordnen lassen. Daher ist davon auszugehen, dass in Biogasanlagen eine erhebliche Anzahl von bisher nicht charakterisierten Mikroorganismen vorkommt.

I.3.2 Bildung und Abbau von Milchsäure in anaeroben Ökosystemen

Milchsäure als Gärungsprodukt wird insbesondere von einer bestimmten physiologischen Gruppe grampositiver Bakterien gebildet, den so genannten Milchsäurebakterien. Entsprechend den 16S rDNA-Sequenzanalysen gehören diese systematisch zu dem Ast der Gram-positiven Bakterien, der sich in den Clostridienast (e.g. *Lactobacillus*) und dem Actinomycetenast (e.g. *Bifidobacterium, Coriobacterium*) aufspaltet. Typischerweise handelt es sich bei Vertretern dieser Gruppe um obligate Gärer, welche aber zum Teil aerotolerant sind, d.h. sie sind anaerob, können aber unter Luftsauerstoff wachsen, oder nur unter striktem Ausschluss von Sauerstoff (e.g. *Bifidobacterium, Coriobacterium*) leben. Innerhalb dieser Gruppe im Clostridienast treten zwei verschiedene Gärungstypen auf. Bei der homofermentativen Milchsäuregärung werden Kohlenhydrate über den Fructosebisphosphat-Weg abgebaut und als hauptsächliches Stoffwechselprodukt (>85%) entsteht Lactat. Somit werden aus einem Mol Glukose zwei Mol Milchsäure gebildet. Den heterofermentativen Milchsäurebakterien fehlen dagegen Schlüsselenzyme des Fructosebisphosphat-Weges (*Aldolase* und *Triosephosphat-Isomerase*). Kohlenhydrate werden daher über den Pentosephosphat-Weg abgebaut. Dies hat zur Folge, dass neben Lactat verschiene Nebenprodukte gebildet werden, insbesondere Essigsäure, Ethanol und CO_2. Zentrale morphologische und physiologische Merkmale von Vertretern der

wichtigsten Gattungen der Milchsäurebakterien sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Typische Lebensräume der Milchsäurebakterien sind die verschiedenste Milchprodukte, Pflanzenmaterial sowie der Darm und die Schleimhäute von Menschen und Tieren.

Im Zusammenhang mit der Produktion von Biogas werden Milchsäurebakterien insbesondere im Hinblick auf ihre Rolle bei der Silierung von Substraten betrachtet. Die Milchsäuregärung ist der zentrale mikrobielle Prozess bei der Konservierung von Pflanzenmaterial, das zur Fütterung von Biogasanlagen eingesetzt wird. Insbesondere Maissilagen enthalten häufig hohe Anteile an Milchsäure, die durchaus 10 % der organischen Trockenmasse ausmachen können. Die Milchsäure hat somit einen erheblichen Anteil am Fütterungsmix vieler Biogasanlagen. Aufgrund neuerer Untersuchungen gibt es zudem Hinweise, dass Milchsäurebakterien auch im Biogasfermenter eine wichtige Rolle spielen. So konnten im Fermentersubstrat verschiedener Praxisanlagen hohe Lebendzellzahlen von Milchsäurebakterien der Gattung *Streptococcus* nachgewiesen werden (JGU & PFI 2011). Es ist bekannt, dass Vertreter dieser Gattung, insbesondere *Streptococcus bovis*, aufgrund der Zellzahlen und hoher Amylaseaktivität eine wichtige Rolle beim Stärkeabbau im Rinderpansen spielen (Cotta 1988, Cotta 1992, Tajima et al. 2001). Möglicherweise sind diese Organismen auch im Biogasfermenter von besonderer Bedeutung, insbesondere bei einem stärkereichen Fütterungsmix.

Tabelle 1 Morphologische und physiologische Charakteristika ausgewählter Spezies

Kokken	**Stäbchen**
Homofermentativ	
Lactococcus lactis *Pediococcus halophilus* *Pediococcus pentosaceus* *Enterococcus faecalis* *Streptococcus salivarius* *Streptococcus pyogenes*	1. Thermobakterien → Optimum 40°C, wachsen nicht bei 15°C *Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus salivarius* 2. Streptobakterien → Optimum 30 - 37°C, wachsen bei 15°C *Lactobacillus casei, Lactobacillus alimentaris, Lactobacillus plantarum*
Heterofermentativ	
Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc lactis, Oenococcus oeni	*Lactobacillus bifermentans, Lactobacillus brevis, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus viridescens*

Neben den Milchsäurebakterien bilden eine Reihe weiterer Bakterien Lactat als Stoffwechselprodukt. Neben verschiedenen Enterobacteriaceaen sind dies insbesondere Vertreter der Gattung *Clostridium*. So bilden celluloseabbauende Vertreter wie *Clostridium cellulolyticum* und

Clostridium thermocellum typischerweise neben CO_2 und H_2 sowie Essigsäure und Ethanol im erheblichen Umfang auch Lactat als Stoffechselprodukt (Petitdemange et al. 1984, Johnson 1981). Da verschiedene Untersuchungen darauf hindeuten, dass Clostridien in Biogasanlagen in hohen Zellzahlen vorkommen und eine wichtige Rolle beim Celluloseabbau spielen, kann man vermuten, dass auch diese Organismen eine Rolle bei der Milchsäurebildung spielen.

Über den Abbau von Milchsäure im Biogasfermenter und die hieraus resultierenden Stoffwechselprodukte gibt es bislang nur wenige Informationen. Bekannt ist, dass im Rinderpansen Milchsäure hauptsächlich von Vertretern der Gattungen *Selenomonas* und *Megasphaera* abgebaut wird (Therion et al. 1985). *Selenomonas lactilytica* bildet hierbei Acetat und Succinat als Gärungsprodukte, dagegen entsteht beim Abbau durch *Megasphaera elsdenii* ein komplexes Gemisch flüchtiger organischer Säuren (Acetat, Propionat, Butyrat u.a.) sowie H_2 und CO_2. Es ist allerdings bislang nicht bekannt, ob diese Vertreter in Biogasanlagen in signifikanten Zellzahlen vorkommen. Aktuelle Untersuchungen konnten zeigen, dass beim Milchsäureabbau durch mikrobielle Populationen aus Praxis-Biogasanlagen verstärkt Propionsäure entsteht (JGU & PFI 2011). Dies könnte auf einen Abbau durch Vertreter der Gattung *Clostridium* hindeuten, typisch ist dieses Gärungsmuster beispielsweise für *Clostridium propionicum* (Kuchta & Abeles 1985). Allerdings konnten die milchsäureabbauenden Bakterien in den Mischpopulationen in der oben genannten Untersuchung bisher nicht eindeutig identfiziert werden.

I.4 Nachweis der Fachliteratur

Baader, W., Dohne, E., Brenndörfer, M. (1978). Biogas in Theorie und Praxis. KTBL-Schrift Nr. 229, Darmstadt.

Breitig, G. & v. Trümping, W. (1982): Ausgewählte Methoden der Wasseruntersuchung, Band II, Kap. 1.3.21. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Breznak, JA, Switzer, JM, & Seitz, H-J. (1998). Sporomusa termitida sp. nov., an H2/CO2-utilizing acetogen isolated from termites. Arch Microbiol. 150, 282-288.

Boga, HI, Ludwig, W. & Brune, A. (2003). Sporomusa aerivorans sp. nov., an oxygen-reducing homoacetogenic bacterium from the gut of a soil-feeding termite. IJSEM 53, 1397-1404.

Cibis, K.G., Gneipel, A. & König, H. (2016). Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. J. Biotechnol. 220, 51-63

Cotta M.A. (1988). Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. Appl Environ Microbiol. 54:772-776.

Cotta M.A. (1992). Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. Appl Environ Microbiol. 58:48-54.

Hanreich, A., Schimpf, U., Zakrzewski, M., Schlüter, A., Benndorf, D., Heyer, R., Rapp, E., Pühler, A., Reichl, U., Klocke, M. (2013): Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. Syst Appl Microbiol. 36: 330-338.

Heeg K, Pohl M, Sontag M, Mumme J, Klocke M, Nettmann E. (2014) Microbial communities involved in biogas production from wheat straw as the sole substrate within a two-phase solid-state anaerobic digestion. Sys. Appl. Microbiol. 37, 590-600.

Johannes Gutenberg-Univerisität Mainz (Teilvorhaben 22004007), Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens (Teilvorhaben 22003008) (2011). Früherkennung und Behebung von Fehlgärungen zur Erhöhung der Prozeßsicherheit und Schadensverhütung in Biogasanlagen unter besonderer Berücksichtigung der Propionsäurebildung. Projekträger: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe.

Johnson E. A., Madia A., Demain A. L. (1981). Chemically defined minimal medium for growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum*. Appl Environ Microbiol 41: 1060–1062.

Kampmann K, Ratering S, Geißler-Plaum R, Schmidt M, Zerr W, Schnell S. (2014) Changes of the microbial population structure in an overloaded fed-batch biogas reactor digesting maize silage. Bioresour. Technol. 174, 108-117.

Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt K., Souidi, K., Mumme, J., & Linke, B. (2008). Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. Syst. Appl. Microbiol. 31:190-205.

Krause, L., Diaz, N.N., Edwards, R.A., Gartemann, K.H., Krömeke, H., Neuweger, H., Pühler, A., Runte, K.J., Schlüter, A., Stoye, J., Szczepanowski, R., Tauch, A., & Goesmann, A. (2008). Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. J Biotechnol. 31: 91-101.

Kröber, M., Bekel, T., Diaz, N.N., Goesmann, A., Jaenicke, S., Krause, L., Miller, D., Runte, K.J., Viehöver, P., Pühler, A., & Schlüter, A. (2009). Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. J Biotechnol. 142: 38-49.

Kuchta R.D., Abeles R.H. (1985). Lactate reduction in *Clostridium propionicum*. Purification and properties of lactyl-CoA dehydratase. J Biol Chem. 260:13181-9.

Maus I, Wibberg D, Stantscheff R, Cibis K, Eikmeyer F-G, König H, Pühler A, Schlüter A (2013) Complete genome sequence of the hydrogenotrophic archaeon *Methanobacterium* sp. Mb1, isolated from a production-scale biogas plant. J. Biotechnol 168, 734-736

Möller, B, Oßmer, R, Howard, BH, Gottschalk, G & Hippe, H. (1984). *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. Arch. Microbiol. 139, 388-396.

Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B., & Klocke M. (2008). Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. J Appl Microbiol.105:1835-1850.

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. BMN Microbiol. 4;13:278

Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties,V., Herrmann, C., & Klocke, M. (2010). Polyphasic Analyses of Methanogenic Archaeal Communities in Agricultural Biogas Plants. Appl Environ Microbiol. 76:2540–2548.

Prüf- und Forschungsinstitut Pirmasens, Johannes Gutenberg-Univerisität Mainz (2011). Charakterisierung der methanogenen Archaebakterien in landwirtschaftlichen NaWaRo-Biogasanlagen. Projektträger: Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation.

Petitdemange E., Caillet F., Giallo J., Gaudin C. (1984). *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic, mesophilic species from decayed grass. Int J Syst Bacteriol. 34:155–159.

Rademacher A., Zakrzewski M., Schlüter A., Schönberg M., Szczepanowski R., Goesmann A., Pühler A., & Klocke M. (2012). Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. FEMS Microbiol Ecol. 79:785-99.

Sass, H., Cypionka, H., and Babenzien, H.-D. (1997): Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. FEMS Microbiol. Ecol. 22: 245-255.

Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 262-280.

Schlüter A., Bekel T., Diaz N.N., Dondrup M, Eichenlaub R., Gartemann K.H., Krahn I., Krause L., Krömeke H., Kruse O., Mussgnug J.H., Neuweger H., Niehaus K., Pühler A., Runte K.J., Szczepanowski R., Tauch A., Tilker A., Viehöver P., & Goesmann A. (2008). The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. J Biotechnol.136:77-90.

Stantscheff R, Kuever J, Rabenstein A, Seyfarth K, Dröge S, König H (2014) Isolation and Differentiation of methanogenic Archaea from mesophilic corn-fed on-farm biogas plants with special emphasis on the genus *Methanobacterium*. Appl Microbiol Biotechnol. 98, 5719-5735.

Stolze Y, Zakrzewski M, Maus I, Eikmeyer F, Jaenicke S, Rottmann N, Siebner C, Pühler A, Schlüter A. (2015) Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. Biotechnol. Biofuels 8, 8-14

Tajima K., Aminov R.I., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M., Benno Y. (2001). Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Appl Environ Microbiol. 67:2766-2774.

Therion J.J., Kistner A., Kornelius J.H. (1985). Effect of pH on growth rates of rumen amylolytic and lactilytic bacteria. Appl Environ Microbiol. 44:428-34.

Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, WhitmanWB. (2009) Bergey‘s Manual of Systematic Bacteriology – Volume Three -The Firmicutes, 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg.

Ziganshin, A.M., Liebetrau, J., Pröter, J., Kleinsteuber, S. (2013): Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. Appl Microbiol Biotechnol. 97: 5164 – 5174.

Zehnder, A. J. B. (1988). Biology of anaerobic microorganisms. John Wiley & Sons. Toronto.

II. Eingehende Darstellung – Ergebnisse

II.1 Anreicherung, Isolierung und Charakterisierung milchsäureabbauender Bakterien aus Praxisanlagen

II.1.1 Untersuchte Praxisanlagen und Probennahme

Für die Isolierung von milchsäureabbauenden Bakterien wurden 5 landwirtschaftliche Biogasanlagen aus Rheinland-Pfalz und dem Saarland einbezogen. Die jeweilige Anlagenspezifikation sowie die Betriebsparameter der Anlagen sind der Tabelle 15 (siehe Punkt II.2.3) zu entnehmen. Die Fermenterproben für die Anreicherung und Kultivierung der Zielorganismen wurden vor Ort in gasdichte sterile Gefäße überführt und für die weitere Bearbeitung direkt ins Labor verbracht. Hier wurden die Proben unmittelbar aufgearbeitet und geeignete Wachstumsmedien mit dem Material angeimpft.

II.1.2 Medien und Wachstumssubstrate

Für die Anreicherung von milchsäureabbauenden Kulturen aus Praxis-Biogasanlagen wurden verschiedene Wachstumsmedien getestet, denen Milchsäure als C-Quelle zugesetzt wurde. Hierbei zeigte sich, dass in rein synthetischen Medien generell nur ein eingeschränktes Wachstum vorlag. Ein deutlich verbessertes Wachstum zeigte sich bei dem neu entwickelten Medium MI, dem komplexe Bestandteile zugegeben wurden. Neben Hefeextrakt wurde das Medium zusätzlich mit einem Filtrat aus Praxisbiogasfermentern supplementiert. Die Zusammensetzung des für die weiteren Versuche eingesetzten Mediums ist der nachfolgenden Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Medien MI.

Destilliertes Wasser	965 mL
KH_2PO_4	0,50 g
K_2HPO_4	0,50 g
NaCl	0,50 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,50 g
NH_4Cl	1,00 g
$NaHCO_3$	2,00 g
Hefeextrakt	0,20 g
DL-Milchsäure	2,00 g
Reaktorfiltrat[1)]	25 ml
Spurenelementlösung (Tab. 3)	5 ml
Vitaminlösung (Tab. 4)	5 ml
Cystein	0,50 g
Na_2Sx9H_2O	0,10 g
Resazurin	0,001 g

1) Gewonnen durch Filtration (0,2 µ) von Fermenterflüssigkeiten aus Praxisbiogasanlagen.

Die eingewogenen Medienbestandteile wurden unter Rühren zugegeben und gelöst. Anschließend wurde das Medium in einem Anaerobenzelt in Reagenzröhrchen überführt (jeweils 5 ml) welche mit Butylstopfen gasdicht verschlossen wurden.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Spurenelementlösung.

HCl (25 %; 7,7 M)	10 mL
$FeCl_2 \times 4\ H_2O$ [1)]	1,5 g
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	190 mg
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	10 mg
$MnCl_2 \times 2\ H_2O$	100 mg
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	120 mg
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	36 mg
$NiCl_2 \times 6\ H_2O$	100 mg
H_3BO_3	10 mg
Na_2SeO_3 x 5 H_2O	5 mg
Destilliertes Wasser	990 mL

1) Vor dem Zusetzten der anderen Bestandteile wurde das Eisenchlorid vollständig in der Salzsäure gelöst.

Die Gasphase (ca. ¾ des Kulturröhrchens) wurde gegen ein Gemisch aus Stickstoff und Kohlendioxid (80 / 20) ausgetauscht und die Röhrchen anschließend autoklaviert. Der pH-Wert des fertigen Mediums lag zwischen 7,2 und 7,4.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Vitaminlösung.

p-Aminobenzoesäure	5 mg
D (+)-Biotin	2 mg
Folsäure	2 mg
Liponsäure	5 mg
Nikotinsäure	5 mg
Riboflavin	5 mg
Ca-D (+)-Pantothenat	5 mg
Pyridoxinhydrochlorid	10 mg
Thiamin-HCl × $2H_2O$	5 mg
Vitamin B_{12}	1 mg
Destilliertes Wasser	1000 ml

Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Im Rahmen der weiteren Medienoptimierung wurde das Medium leicht modifiziert, hierbei wurde der Anteil des Reaktorfiltrats von 2,5 % auf 5 % erhöht sowie die Einwaage des Hefeextrakts von 0,2 g/L auf 1 g/L und des Ammoniumchlorids von 1 auf 2 g/l erhöht. Die Zusammensetzung des Medium MII ist der nachfolgenden Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Medien MII.

Destilliertes Wasser	940 mL
KH_2PO_4	0,50 g
K_2HPO_4	0,50 g
NaCl	0,50 g
$MgSO_4$ × 7 H_2O	0,50 g
NH_4Cl	2,00 g
$NaHCO_3$	2,00 g
Hefeextrakt	1,00 g
DL-Milchsäure	2,00 g
Reaktorfiltrat[1)]	50 ml
Spurenelementlösung (Tab. 3)	5 ml
Vitaminlösung (Tab. 4)	5 ml
Cystein	0,50 g
Na_2Sx9H_2O	0,10 g
Resazurin	0,001 g

1) Gewonnen durch Filtration (0,2 µ) von Fermenterflüssigkeiten aus Praxisbiogasanlagen.

II.1.3 Zellzahlen kultivierbarer milchsäureabbauender Bakterien

Die Lebendzellzahlen der kultivierbaren milchsäureabbauenden Bakterien in den untersuchten Anlagen wurde mit Hilfe des MPN-Verfahrens (*Most Probable Number*; Breitig & v.Tümpling 1982) mit dem Medien MI und MII bestimmt. Ziel war es, die häufigsten kultivierbaren Milchsäureabbauer aus den jeweiligen Praxisanlagen zu gewinnen. Zur Durchführung der MPN-Versuche wurde aus den Fermenterproben der untersuchten Anlagen jeweils 1 cm^3 Fermentersubstrat steril entnommen und in Serumflaschen mit 9 ml der Wachstumsmedien verdünnt. Diese erste Verdünnung dienten als Ausgangspunkt für eine serielle Verdünnung von 10^{-2} bis 10^{-9}. Diese erfolgte im dreifachen Parallelansatz in 15 ml Hungate-Röhrchen. Sämtliche Proben wurden bei 40 °C für 4 - 8 Wochen im Dunkeln inkubiert. Ausnahme waren die Proben aus dem Nachgärer der Anlage D welche im Rahmen der ersten beiden Probenahmen genommen wurden. Da die Fermentationsstufe zu diesen Zeiträumen thermophil betrieben wurde, wurden die Ansätze bei 52 °C inkubiert.

Bei der Auswertung galten diejenigen Kulturröhrchen als bewachsen, bei denen infolge von Bakterienwachstum ein Niederschlag sichtbar sowie ein Abbau von Milchsäure mittels HPLC-Analyse nachweisbar war. Für die Ermittlung der jeweiligen MPN-Zahl wurden die bewachsenen Röhrchen der drei höchsten Verdünnungsstufen gezählt. Hieraus ergab sich eine dreistellige Zahl, deren erste Ziffer die Anzahl bewachsener Röhrchen der dritthöchsten positiven Verdünnungsstufe wiedergibt, die zweite diejenige der zweithöchsten und die dritte die der höchsten positiven Verdünnungsstufe. Aus einer MPN-Tabelle wurde die zugehörige MPN-Zahl abgelesen und mit dem Reziprokwert der mittleren der drei herangezogenen Verdünnungsstufen multipliziert (Sass 1997).

Im Rahmen des Projektverlaufs wurde die Lebendkeimzahlbestimmung auf Grundlage des MPN-Verfahrens mit den Medien MI und MII an vier Probennahmeterminen bei allen untersuchten Anlagen durchgeführt. Bei der Anlage C wurde neben dem Fermenter auch einmalig die Vorhydrolyse untersucht. Weiterhin wurde bei der Anlage D zusätzlich der Nachgärer untersucht, da dieser zeitweise thermophil (52 °C) betrieben wurde. Die erste Probenahme fand im April/Mai 2013 statt, die hierbei ermittelten Zellzahlen sind der Abbildung 2 zu entnehmen. Die MPN-Zahlen bei den in die Untersuchung einbezogenen Fermentern bewegten sich in einer Größenordnung von $2{,}1 \times 10^6$ – $4{,}7 \times 10^7$. Die höchsten Zellzahlen wurden hierbei bei den Anlage B und C bzw. C-VH ermittelt (jeweils > 10^7 Zellen/ml), während die Zellzahlen der Anlagen A, D und E um bis zu einer Potenz niedriger lagen. Insgesamt deutlich niedrigere Zellzahlen wurden für den thermophilen Nachgärer der Anlage D ermittelt ($7{,}5 \times 10^5$ Zellen/ml). Aufgrund der vom Projektpartner ermittelten Gesamtzellzahlen in den Biogasanlagen (1 - 2,5

x 10^9 Zellen/cm^3) lag der Kultivierbarkeit der milchsäureabbauenden Bakterien bei bis zu 1 % in Bezug auf die Gesamtpopulation.

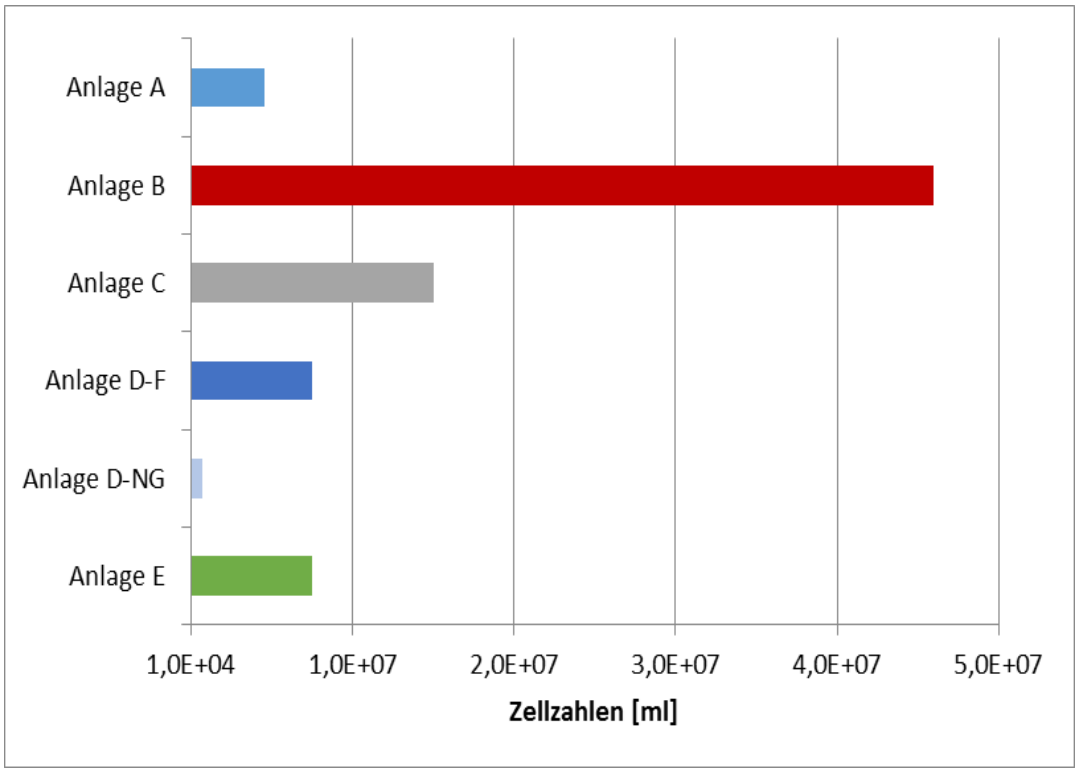

Abbildung 2: MPN-Zahlen milchsäureabbauender Bakterien in 5 verschiedenen Biogasanlagen; Probennahme 1. BGA A = LieserArenrath; BGA B = Friedrich; BGA C = Neumann; BGA C-VH = Neumann VorhydrolyseBGA D-F = Glahn Fermenter; BGA D-NG = Glahn Nachgärer (thermophil); BGA E = Gebel/Obere Blies.

Zur Überprüfung der ersten MPN-Serie erfolgte im Dezember 2013 eine zweite Probennahme bei allen in das Projekt einbezogenen Biogasanlagen. In der Tendenz zeigten sich hierbei Zellzahlen in ähnlicher Größenordnung wie bei der ersten Untersuchung. Eine stärkere Abweichung war lediglich bei Anlage A feststellbar, welche beim der zweiten Probenahme deutlich höhere MPN-Zahlen aufwies. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass bei der Anlage A im Vorfeld der zweiten Probenahme für ca. 4 Wochen Getreideschrot eingesetzt wurde (ca. 5 % Anteil an der Gesamtdosierung inkl. 35 % Gülleanteil). Eine Untersuchung der Vorhydrolyse der Anlage C war beim zweiten Probenahmetermin nicht möglich, da die Stufe zum dem Zeitpunkt aufgrund von Umbauarbeiten außer Betrieb war.

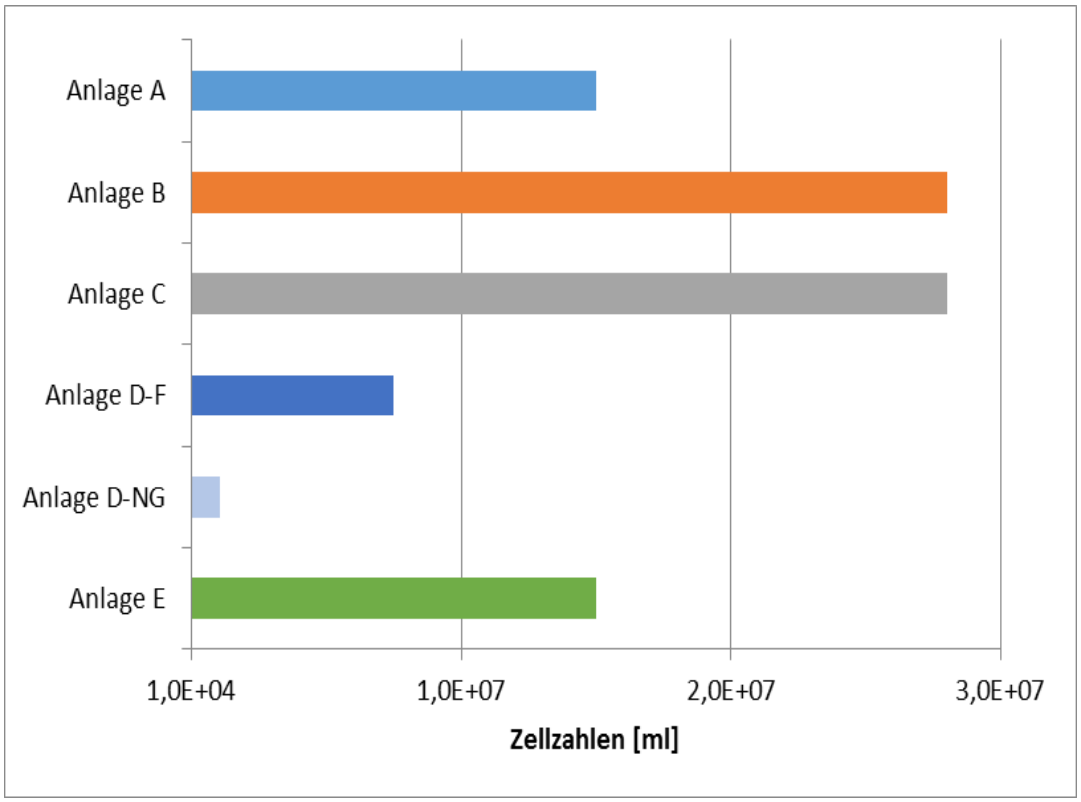

Abbildung 3: MPN-Zahlen milchsäureabbauender Bakterien in 5 verschiedenen Biogasanlagen; Probennahme 2. BGA A = Lieser/Arenrath; BGA B = Friedrich; BGA C = Neumann; BGA D-F = Glahn Fermenter; BGA D-NG = Glahn Nachgärer (thermophil); BGA E = Gebel/Obere Blies.

Im Juni 2014 erfolgte eine dritte Probenahme bei allen in das Projekt einbezogenen Biogasanlagen. Für die Ermittlung der MPN-Zellzahlen wurde das modifizierte Medium MII eingesetzt. Hierbei zeigten sich, abgesehen von Anlage E, generell leicht höhere Zellzahlen als bei der vorherigen Untersuchung. Dies dürfte im Wesentlichen auf das modifizierte Wachstumsmedium zurückzuführen sein. Ein deutlicherer Anstieg war beim Nachgärer der Anlage D feststellbar (siehe Abb. 4, Anlage D-NG). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass diese Fermentationsstufe bei der dritten Probenahme mesophil betrieben wurde, während bei den früheren Untersuchungen eine thermophile Fahrweise vorlag.

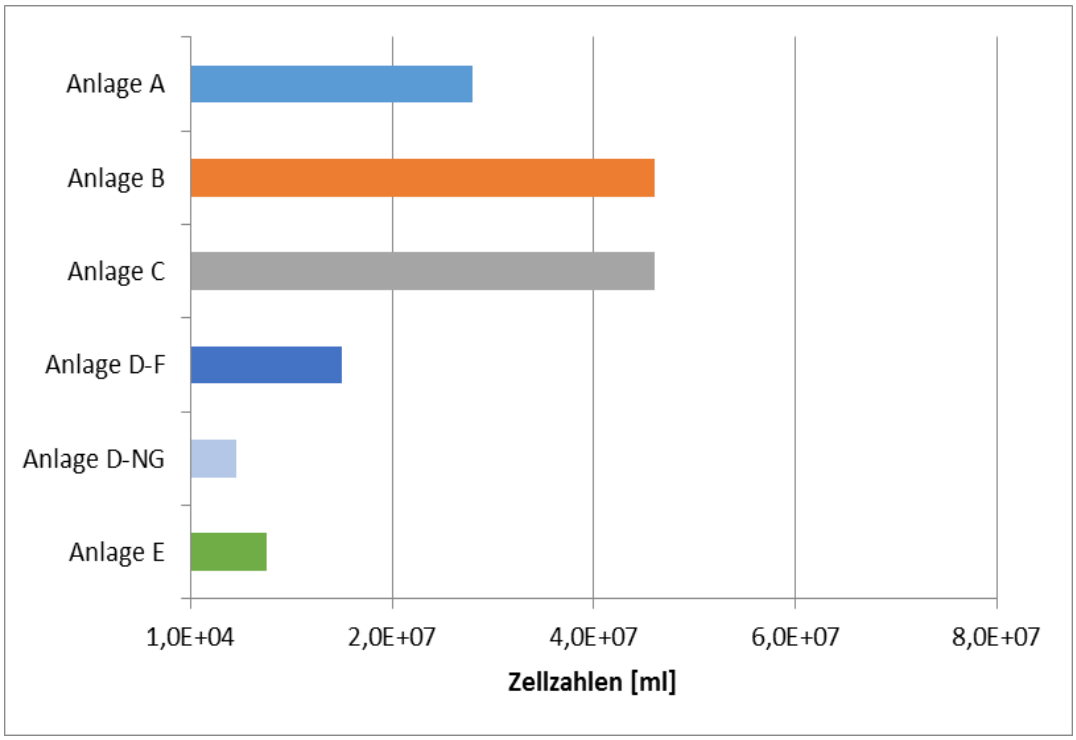

Abbildung 4: MPN-Zahlen milchsäureabbauender Bakterien in 5 verschiedenen Biogasanlagen; Probennahme 3. BGA A = Lieser/Arenrath; BGA B = Friedrich; BGA C = Neumann; BGA D-F = Glahn Fermenter; BGA D-NG = Glahn Nachgärer; BGA E = Gebel/Obere Blies.

Eine vierte und abschließende Bestimmung der MPN-Zahlen aus den Praxisanlagen erfolgte im Juni 2015. Hierbei wurde wiederum das modifizierte Medium MII als Wachstumssubstrat eingesetzt. Im Vergleich zur dritten MPN-Serie welche ebenfalls mit dem Medium MII durchgeführt wurde lagen die Abweichungen innerhalb der methodisch bedingten typischen Schwankungsbreite.

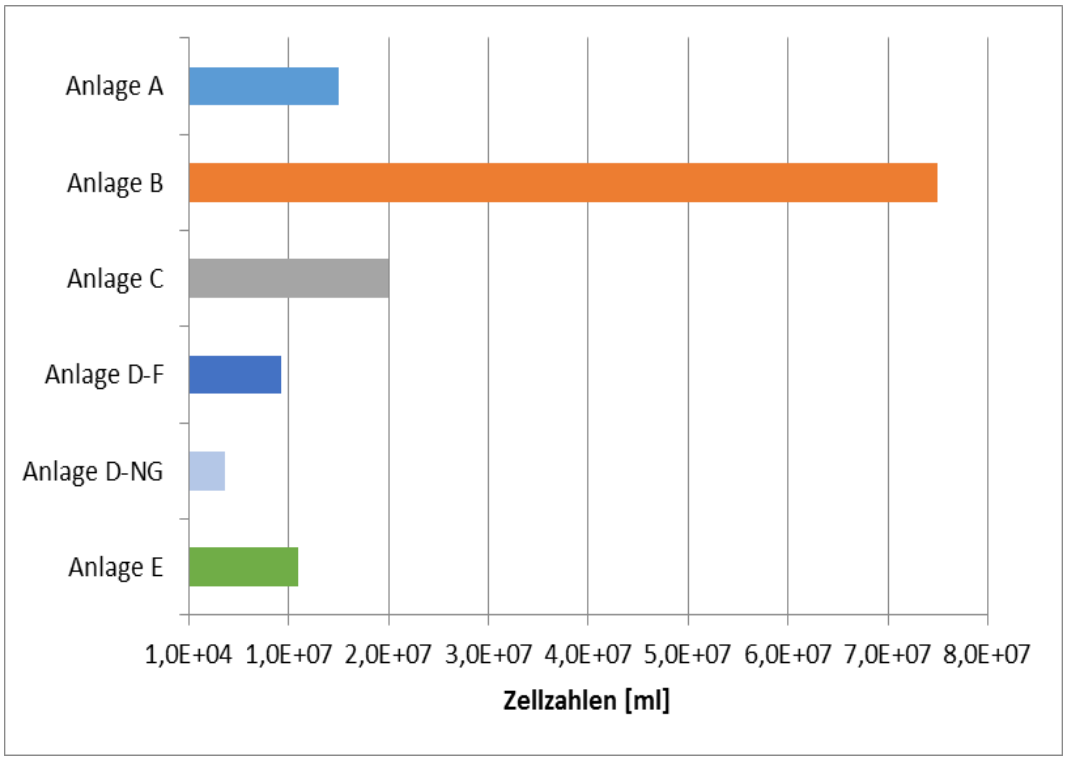

Abbildung 5: MPN-Zahlen milchsäureabbauender Bakterien in 5 verschiedenen Biogasanlagen; Probennahme 4. BGA A = Lieser/Arenrath; BGA B = Friedrich; BGA C = Neumann; BGA D-F = Glahn Fermenter; BGA D-NG = Glahn Nachgärer; BGA E = Gebel/Obere Blies.

In Abbildung 6 sind die, zu den vier unterschiedlichen Probenahmeterminen, ermittelten MPN-Zahlen der untersuchten Praxisanlagen zusammengefasst. Über die methodisch bedingten typischen Schwankungen sowie den Einfluss unterschiedlicher Wachstumsmedien hinaus ließen sich anhand der ermittelten Zellzahlen anlagenspezifische Tendenzen aufzeigen.

So lagen die Zellzahlen milchsäureabbauender Organismen in den Anlagen B und C bei allen vier Probennahmen oberhalb der entsprechenden Zahlen der Anlagen A, D, und E. Beide Anlagen wiesen gleichzeitig auch den höchsten Stärkeanteil in Bezug auf die zugeführte Menge an organische Trockensubstanz auf (siehe II.2.1). Auch Schwankungen beim Stärkeanteil an Fütterung einzelner Anlagen zwischen den verschiedenen Probenahmezeitpunkten hatten in der Tendenz Einfluss auf die Abundanz milchsäureabbauender Bakterien. So korrespondierten sowohl bei der Anlage A als auch bei der Anlage C die höchsten MPN-Zahlen mit einem zum jeweiligen Zeitpunkt erhöhten Stärkeanteil bei der Fütterung. Im Vergleich sehr niedrige Zellzahlen zeigten sich im Gegensatz hierzu insbesondere im Nachgärer der Anlage D.

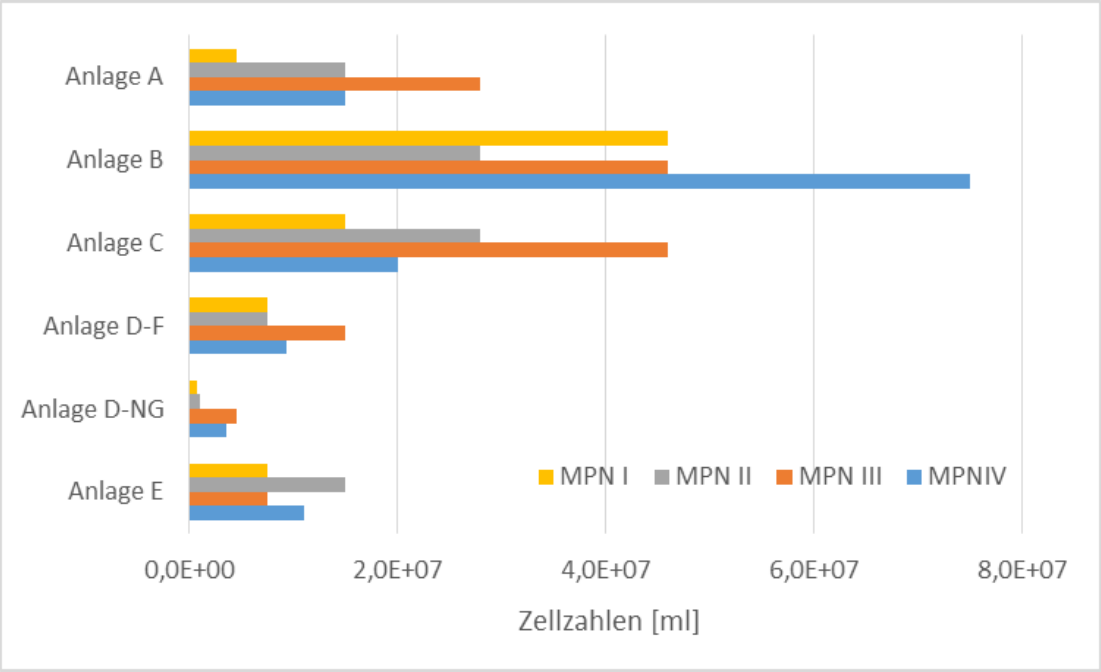

Abbildung 6: MPN-Zahlen milchsäureabbauender Bakterien in 5 verschiedenen Biogasanlagen; Probennahme 4. BGA A = Lieser/Arenrath; BGA B = Friedrich; BGA C = Neumann; BGA D-F = Glahn Fermenter; BGA D-NG = Glahn Nachgärer; BGA E = Gebel/Obere Blies.

Darüber hinaus war ein deutlicher Einfluss der Temperatur auf die ermittelten Zellzahlen feststellbar. Bei dieser Anlage lag die Besonderheit vor, dass der Nachgärer zum Zeitpunkt der ersten beiden Probenahmen thermophil betrieben wurde. Im späteren Verlauf stellte der Betreiber auf eine mesophile Fahrweise um. Dies hatte einen deutlichen Einfluss auf die ermittelten Zellzahlen, unter den Bedingungen eines thermophil betriebenen Nachgärers (Fermenter mesophil) lagen diese deutlich niedriger als beim mesophilen Betrieb beider Fermentationsstufen.

II.1.4 Anreicherung und Isolierung milchsäureabbauender Bakterien

Zur Anreicherung und Isolierung milchsäureabbauender Bakterien aus den verschiedenen Anlagen wurden zunächst flüssige Subkulturen aus den jeweils höchsten bewachsenden Verdünnungsstufen der MPN-Serien angelegt. Nach Anwachsen der Subkulturen und des Nachweises des Milchsäureabbaus mittels HPLC erfolgte die weitere Isolierung mittels der Tiefagar-Verdünnungsmethode. Hierzu wurden den Medien MI und MII Agar mit einer Endkonzentration von 1,3 % (w/v) zugesetzt. Jeweils 6 ml des Mediums wurden in gasdicht verschließbare Reagenzgläser mit Butylstopfen überführt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das noch flüssige Medium im Wasserbad auf 50 °C temperiert. Im Anschluss erfolgte eine serielle Verdünnung aus den jeweiligen Anreicherungskulturen. Direkt nach der Beimpfung wurden die Reagenzgläser mehrfach gewendet, um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen zu gewährleisten. Im Anschluss erfolgte ein schnelles Aushärten des Agars im (Eis-)Wasserbad. Die Kulturen wurden im Anschluss für 2 – 5 Wochen im Dunkeln bei 40 °C inkubiert, bis bakterielle Kolonien sichtbar waren (siehe Abb. 7)

Abbildung 7: Tiefagar-Verdünnungsreihe mit Kolonien (dunkle Punkte) nach drei Wochen Inkubation.

Sichtbare Kolonien wurden im Anschluss mit einer sterilen Kanüle aus den Agar einzeln herausgezogen und in frisches flüssiges Medium überführt. Dieses Vorgehen wurde 3 bis 4x wiederholt um Reinkulturen bzw. hochangereicherte Kulturen zu gewinnen. Als ein Problem erwies sich, dass eine Reihe von Anreicherungskulturen und Isolate mit dem Medium MI nach mehrmaligen Transfer nur noch schwaches bzw. kein Wachstum mehr zeigten. Vor diesem Hintergrund wurde im weiteren Projektverlauf das modifizierte Medium MII eingesetzt (siehe Tab. 5). Diese Medium kam auch bei der dritten MPN-Serie und vierten MPN-Serie zum Einsatz um das Spektrum der Kulturen zu erweitern. Auf dieser Grundlage wurden im Projektverlauf 16 Isolate und 4 stabile Anreicherungsskulturen milchsäureabbauender Bakterien gewonnen.

II.1.5 Charakterisierung der gewonnenen Isolate

Die Bezeichnung der im Rahmen des Projektes gewonnenen Kulturen, das eingesetzte Medium für die Anreicherung und Kultivierung, die Verdünnungsstufe der MPN-Serie sowie die die Herkunft sind in der nachfolgenden Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Kulturen milchsäureabbauender Bakterien aus Biogasanlagen

Kultur	Medium	Verdünnungsstufe	Gewonnen aus BGA
Ar6A-1	MI	10^{-6}	Anlage A
Ar6B-1	MI	10^{-6}	Anlage A
Ar6C-1	MI	10^{-6}	Anlage A
Ar7A-2	MII	10^{-7}	Anlage A
Ar7B-3	MII	10^{-7}	Anlage A
Fr6A-2	MII	10^{-6}	Anlage B
Fr6B-1	MI	10^{-6}	Anlage B
Fr6C-1	MI	10^{-6}	Anlage B
Fr5B-1	MI	10^{-5}	Anlage B
Nm5B-1	MI	10^{-5}	Anlage C
Nm6B-2	MII	10^{-6}	Anlage C
Nm6A-1	MI	10^{-6}	Anlage C
Gf5A-1	MI	10^{-5}	Anlage D
Gf5B-1	MI	10^{-5}	Anlage D
Gf6A-2	MII	10^{-6}	Anlage D
Gf6C-2	MII	10^{-6}	Anlage D
Gf6B-3	MII	10^{-6}	Anlage D
Ob6B-1	MI	10^{-6}	Anlage E
Ob7B-1	MI	10^{-7}	Anlage E
Ob6A-3	MII	10^{-6}	Anlage E

In Bezug auf die Morphologie und die Stoffwechselprodukte aus dem Milchsäureabbau ließen sich die gewonnenen Kulturen in mehrere Gruppen einteilen. Unbewegliche Stäbchen mit einer Zelllänge von 3 – 5 µm und den Stoffwechselprodukten Acetat und Propionat. Das molare Verhältnis der Stoffwechselprodukte aus dem Milchsäureabbau bewegte sich in dieser Gruppe in einen relativ engen Bereich. Je Mol Milchsäure wurden zwischen 0,4 und 0,45 Mol Acetat sowie 0,48 und 0,54 Mol Propionsäure gebildet. Eine weitere morphologische Gruppe bildeten

Kurzstäbchen mit einer Zelllänge von 1 – 3 µm, welche neben Acetat und Propionat zum Teil auch Butyrat als Abbauprodukte bildeten (siehe Tab. 7).

Tabelle 7: Morphologie und Abbauprodukte der Kulturen milchsäureabbauender Bakterien

Kultur	Morphologie	Stoffwechselprodukte
Ar6A-1*	Kokken, Aggregate, unbeweglich	Acetat, Propionat Butyrat
Ar6B-1	Stäbchen unbeweglich	Acetat, Propionat
Ar6C-1	Stäbchen unbeweglich	Acetat, Propionat
Ar7A-2*	Kokken, Aggregate, unbeweglich	Acetat, Propionat Butyrat
Ar7B-3	Stäbchen unbeweglich	Acetat, Propionat
Fr6A-2	Stäbchen, gekrümmt beweglich	Acetat, Propionat Succinat
Fr6B-1	Stäbchen unbeweglich	Acetat, Propionat
Fr6C-1	Stäbchen unbeweglich	Acetat
Fr5B-1*	Kokken, Ketten unbeweglich	Acetat, Propionat, Butyrat, Valerat
Nm5B-1*	Kokken, Ketten, unbeweglich	Acetat, Propionat, Butyrat
Nm6B-2	Stäbchen unbeweglich	Acetat
Nm6A-1	Stäbchen unbeweglich	Acetat, Propionat
Gf5A-1	Kurzstäbchen, beweglich	Acetat, Propionat, Butyrat
Gf5B-1	Kurzstäbchen, beweglich	Acetat, Propionat, Butyrat
Gf6A-2	Stäbchen, unbeweglich	Acetat, Propionat,
Gf6C-2	Stäbchen, gekrümmt, beweglich	Acetat, Propionat,Succinat
Gf6B-3	Stäbchen unbeweglich	Acetat, Propionat
Ob6B-1	Stäbchen, unbeweglich	Acetat, Propionat
Ob7B-1	Kurzstäbchen, unbeweglich	Acetat, Propionat
Ob6A-3	Stäbchen unbeweglich	Acetat, Propionat

*Anreicherungskultur

Hierbei wurden jeweils ca. 0,38 Mol Acetat und Propionat sowie 0,1 Mol Butyrat je Mol Milchsäure gebildet. Beim dritten Morphotyp handelte es sich um Kokken mit ca. 1 – 2 µm Durchmesser, welche Ketten sowie größere Zellaggregate bildeten. Als Stoffwechselprodukte traten Acetat, Propionat, Butyrat und Valerat auf. Auch bei dieser Gruppe waren Acetat und Propionat generell die Hauptabbauprodukte während Butyrat und Valerat in geringeren

Konzentrationen als Nebenprodukte gebildet wurden. Die vierte Gruppe bildeten bewegliche, gekrümmte Stäbchen mit einer Zelllänge von 3 -5 µm und den Stoffwechselprodukten Acetat, Propionat und z. T. Succinat und Butyrat. Im Gegensatz zu den anderen Kulturen bildeten diese Kulturen allerdings überwiegend Acetat und die weiteren organischen Säuren nur in geringen Mengen.

Im weiteren Verlauf der Charakterisierung wurde das Wachstum in Abhängigkeit vom pH-Wert überprüft. Bei den untersuchten Biogasanlagen, aus den die Kulturen gewonnen wurden, schwankten die pH-Werte im Untersuchungszeitraum überwiegend zwischen 7,5 und 8. Werte unterhalb von pH 7 traten generell nicht auf. Werte oberhalb von pH 8 zeigten sich vereinzelt bei den Anlagen A und D. Die Wachstumsexperimente wurden mit dem Medium MII durchgeführt, die Einstellung der pH-Werte erfolgte mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH.

Tabelle 8: Abhängigkeit des Wachstums vom pH-Wert

Kultur	pH 6	pH 6,5	pH 7,2	pH 8	pH 8,5
Ar6A-1	++	++	++	++	+
Ar6B-1	+	++	++	+	+
Ar6C-1	+	++	++	+	+
Ar7A-2	++	++	++	++	+
Ar7B-3	+	+	++	++	-
Fr6A-2	+-	+	++	++	+
Fr6B-1	+	++	++	++	+
Fr6C-1	-	-	+	+	-
Fr5B-1	+	++	++	+	+
Nm5B-1	+	++	++	++	+
Nm6B-2	+-	+	++	+	-
Nm6A-1	-	+	+	+	+
Gf5A-1	-	-	++	++	++
Gf5B-1	-	+	++	++	+
Gf6A-2	-	+	+	+	+
Gf6C-2	+	++	++	++	++
Gf6B-3	+	+	++	+	+-
Ob6B-1	-	+	++	+	+
Ob7B-1	-	+	++	+	+
Ob6A-3	+	+	++	++	+-

Bei der überwiegenden Anzahl der Kulturen war ein relativ breites pH-Spektrum feststellbar. Abgesehen von Fr6C-1 und Gf5A-1 zeigten alle Kulturen Wachstum zwischen pH 6,5 und pH 8. Bei pH 6 war bei insgesamt 10 der 20 Kulturen kein oder nur noch schwaches Wachstum feststellbar (siehe Tab. 8). Im basischen Bereich bei pH 8,5 war bei 16 Kulturen noch signifikantes Wachstum feststellbar.

Als weiterer Parameter wurde das Wachstum in Abhängigkeit von der Temperatur überprüft. Bei den Fermentern der untersuchten Biogasanlagen liegt die Solltemperatur generell bei 40 °C. Im laufenden Anlagenbetrieb traten hierbei typischerweise Schwankungen im Bereich zwischen 38 – 42 °C auf. Eine Ausnahme bildete zeitweilig der Nachgärer der Anlage D welcher in der ersten Phase des Projektes thermophil (52 °C) betrieben wurde. Aus dieser Anlagenstufe konnten während der thermophilen Fahrweise zwar mehrere Anreicherungskulturen gewonnen werden, diese ließen sich aber nicht dauerhaft kultivieren.

Tabelle 9: Abhängigkeit des Wachstums vom der Temperatur

Kultur	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	52 °C
Ar6A-1	+	+	++	++	-
Ar6B-1	+	+	++	+	-
Ar6C-1	+	+	++	+	-
Ar7A-2	+	+	++	+	-
Ar7B-3	+	+	++	+	-
Fr6A-2	+	+	++	++	-
Fr6B-1	+	+	++	+	-
Fr6C-1	-+	+	+	+	-
Fr5B-1	+	+	++	+	-
Nm5B-1	+	+	++	++	+
Nm6B-2	+	+	++	+	-
Nm6A-1	+	+	+	+	-
Gf5A-1	+	+	++	++	+
Gf5B-1	+	+	++	+	+
Gf6A-2	+	+	+	+	-
Gf6C-2	+	+	++	++	-
Gf6B-3	+	+	++	+	-
Ob6B-1	+	+	++	+	-
Ob7B-1	+	+	++	+	-
Ob6A-3	+	+	++	+	-

Bis auf eine Ausnahme zeigten alle untersuchten Kulturen signifikantes Wachstum im Temperaturbereich zwischen 30 und 45 °C. Lediglich bei der Kultur Fr6C-1 war bei 30 °C nur ein sehr schwaches Wachstum feststellbar. Zu berücksichtigen ist allerdings das bei diesem Stamm generell nur relativ geringe Zelldichten auftraten. Das Wachstumsoptimum der untersuchten Stämme lag typischerweise im Bereich zwischen 40 und 45 °C (siehe Tab. 9). Wachstum unter thermophilen Bedingungen (52 °C) konnte nur bei 4 Stämmen nachgewiesen werden.

Neben Temperatur und pH-Wert wird die Prozessbiologie in den Biogasfermentern vom Gehalt an Ammonium-Stickstoff (NH4-N) beeinflusst. Bei den Fermentern der verschiedenen Anlagen schwankten die NH4-N-Gehalte im Untersuchungszeitraum über ein relativ breites Spektrum von ca. 1600 mg/kg bei der Anlage B bis maximal 3500 mg/kg bei der Anlage A.

Tabelle 10: Abhängigkeit des Wachstums vom Gehalt an NH4-N

Kultur	Kontrolle	1500 mg/l NH4-N	3000 mg/l NH4-N	5000 mg/l NH4-N
Ar6A-1	++	++	++	++
Ar6B-1	++	++	++	+
Ar6C-1	++	++	++	+
Ar7A-2	++	++	++	++
Ar7B-3	++	++	++	++
Fr6A-2	++	++	++	++
Fr6B-1	++	++	+	+-
Fr6C-1	+	+	+-	-
Fr5B-1	++	++	++	+-
Nm5B-1	++	++	+	-
Nm6B-2	++	++	++	++
Nm6A-1	+	++	++	++
Gf5A-1	++	++	+	-
Gf5B-1	++	++	+-	-
Gf6A-2	+	+	+	-
Gf6C-2	++	++	++	+
Gf6B-3	++	++	++	+
Ob6B-1	++	++	+-	-
Ob7B-1	++	++	+	+
Ob6A-3	++	++	++	+

Die Unterschiede sind hierbei im Wesentlichen auf die Stickstofffrachten der jeweiligen Einsatzstoffe zurückzuführen und somit fütterungsbedingt (siehe II.2.3 Monitoring Praxisanlagen). Zur Durchführung der Wachstumsexperimente wurde dem Medium MII unterschiedliche Konzentrationen an Ammoniumchlorid zugegen bis der jeweilige Zielwert an NH4-N erreicht war. Als Kontrolle diente das unveränderte Medium MII mit einem NH4-N-Gehalt von rund 750 mg/l (einschließlich der Stickstoffgehalte des Reaktorfiltrats und des Hefeextraktes) Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich bei den Stamm Nm6A-1 beim Ansatz mit 1500 mg/l ein verstärktes Wachstum mit höheren Zelldichten. Bei den übrigen Stämmen war kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Bei einer NH4-N-Konzentration von 3000 mg/l zeigte sich bei verschiedenen Stämmen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Wachstumshemmung. Feststellbar war dies bei den Stämmen Fr6B-1, Fr6C-1, Nm5B-1, Gf5A-1, Gf5B-1, Ob6B-1 und Ob7B-1. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 5000 mg/l war bei diesen Stämmen kein bzw. nur noch sehr schwaches Wachstum feststellbar. Auf der anderen Seite zeigte verschiedene Stämme eine ausgeprägte Toleranz bezüglich der Ammoniumkonzentration. So war das Wachstum der Stämme Ar6A-1, Ar7A-2, Ar7B-3, Fr6A-2 und Nm6B-2 von den unterschiedlichen NH4-N Konzentrationen wenig beeinflusst.

Neben der physiologischen Charakterisierung war die molekularbiologische Charakterisierung der vorliegenden Kulturen Teil des Arbeitspaktes 3. Das Ziel bezüglich der molekularbiologischen Charakterisierung beruht auf der phylogenetische Einordnung der gewonnenen Stämme auf Basis vergleichender datenbankbasierter Analysen von Teilsequenzen der 16S rDNA.
Für die Isolierung der genomischen DNA wurden hierbei jeweils 1 ml der Flüssigkulturen zentrifugiert und das Pellet anschließend 2x in PBS-Puffer gewaschen. Die anschließende Isolierung und Reinigung der DNA erfolgte mit dem *peq Gold Bacterial DNA Kit* (peqlab Biotechnologie GmbH) nach dem vorgegebenen Protokoll.
Die für die Amplifizierung von Teilsequenzen der 16S rDNA mittels PCR verwendeten Primer sind der nachfolgenden Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Verwendete synthetische Oligonukleotide zur Sequenzierung bakterieller 16S rDNA

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	bp	GC [%]	T_m [°C][a]
Eub 338 f	GCT-GCC-TCC-CGT-AGG-AGT	18	66	60
Eub 1392r	CCA-CGG-GCG-GTG-TGT-AC	17	70	58

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes unter Verwendung der oben aufgeführten Primer ist der nachfolgenden Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Reaktionsbedingungen einer PCR bakterieller 16S-rDNA.

Reagenz	Volumen [µl]
Primer Eub 338f [10 µM]	2
Primer Eub 1392r [10 µM]	2
dNTP-Lösung [10 mM]	3
10-fach Puffer [peqlab high yield]	5
Taq DNA-Polymerase [5 u/µl]	0,2
dH_2O	37
Template DNA	1

Die PCR-Reaktion erfolgte in einen Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf AG). Die Reaktionsbedingungen der PCR sind der nachfolgenden Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen einer PCR bakterieller 16S-rDNA.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	1	30
Anlagerung	56	1	30
Elongation	72	1,5	30
Abschließende Extension	72	10	1
Gesamt-Zyklen			30

Die Überprüfung der PCR-Reaktion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Anfärbung des PCR-Produktes mit Ethidiumbromid. Bei erfolgreicher Amplifikation der Zielsequenz wurde die PCR-Produkte mit dem *peqGold MicroSpin Cycle-Pure Kit* (peqlab Biotechnologie GmbH) auf gereinigt und anschließend sequenziert.

Die im Rahmen des Projektverlaufes ermittelten Sequenzen wurden mit den hinterlegten Sequenzen der Datenbank *GenBank* (Genbank sequence database; National Center for Biotechnology Information [NCBI]) verglichen um eine vorläufige phylogenetische Einordnung der Stämme vorzunehmen. Eine Übersicht bezüglich der identifizierten Stämme ist der nachfolgenden Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Sequenzierungsergebnisse und systematischen Einordnung

Kultur	Sequenzlänge [bp]	Nächstverwandter Mikroorganismus (16S rDNA)	Übereinstimmung [%]
Ar6B-1	682	*Clostridium sporosphaeroides DSM 1294 [NR044835]*	98
Ar6C-1	707	*Clostridium sporosphaeroides DSM 1294 [NR044835]*	99
Ar7B-3	707	*Clostridium aminovalericum JCM 11016 [NR113199]*	99
Fr6A-2	695	*Sporomusa termitida [NR117581]*	92
Fr6B-1	712	*Clostridium sporosphaeroides DSM 1294 [NR044835]*	98
Fr6C-1	710	*Clostridium sporosphaeroides DSM 1294 [NR044835]*	98
Nm6B-2	697	*Clostridium sporosphaeroides DSM 1294 [NR044835]*	99
Nm6A-1	709	*Sporomusa sphaeroides DSM 2875 [NR117664]*	96
Gf5A-1	705	*Sporomusa sphaeroides DSM 2875 [NR117664]*	96
Gf5B-1	699	*Sporomusa sphaeroides DSM 2875 [NR117664]*	95
Gf6A-2	700	*Clostridium sporosphaeroides DSM 1294 [NR044835]*	97
Gf6C-2	695	*Sporomusa termitida [NR117581]*	91
Gf6B-3	705	*Clostridium aminovalericum JCM 11016 [NR113199]*	98
Ob6B-1	703	*Clostridium sporosphaeroides DSM 1294 [NR044835]*	98
Ob7B-1	699	*Clostridium sporosphaeroides DSM 1294 [NR044835]*	99
Ob6A-3	700	*Clostridium aminovalericum JCM 11016 [NR113199]*	99

Die Sequenzierung der gewonnenen Kulturen ergab bei einer morphologischen Gruppe generell heterogene Sequenzen. Dies betraf den Morphotyp der in Ketten oder Aggregaten auftretenden Kokken. Es ist daher davon auszugehen, dass hierbei nicht um Reinkulturen handelt. Eine Isolierung und phylogenetische Identifizierung konnte im Rahmen des Projektes nicht durchgeführt werden.

Bei den auf Basis der 16S rDNA identfizierten Isolaten aus den handelte es sich überwiegend um Vertreter der Gattung *Clostridium*. Der phylogenetisch nächste verwandte der meisten identifizierten Stämme war *Clostridium sporosphaeroides* (DSM 1294). Entsprechende Vertreter konnten aus allen 5 untersuchten Anlagen isoliert werden. Die Sequenzübereinstimmung auf Basis von ca. 700 bp lag zwischen 97 und 99 %. Vertreter dieser Spezies konnten bereits aus Biogasanlagen isoliert werden und wurden auch molekularbiologisch nachgewiesen (Cibis et al. 2016; Kröber et al. 2009). Neben dem Abbau von Aminosäuren ist in der Literatur auch der

Abbau von Lactat beschrieben (Vos et al. 2009). Auch zwei weitere Isolate welche der Spezies *Clostridium amniovalericum* zuzuordnen sind konnten aktuell in Biogasanlagen identifiziert werden (Cibis et al. 2016). Darüber hinaus konnten verschiedene Vertreter der Gattung *Sporomusa* identifiziert werden. Bekannt ist bei Vertretern dieser Gattung die die Fähigkeit zur Homoacetogenese (u.a. Möller et al. 1984; Breznak et al. 1988). Allerdings ist in der Literatur auch der Abbau von Lactat beschrieben (Boga et al. 2003).

II.2 Monitoring der Praxisanlagen

II.2.1 Anlagenparameter der Biogasanlagen

Für die vorgesehenen Untersuchungen an Praxisanlagen wurden im Rahmen des Projektes insgesamt 5 Biogasanlagen aus Rheinland-Pfalz und dem Saarland einbezogen. Der Untersuchungszeitraum des Anlagen- und Substratmonitorings ersteckte erstreckte sich zunächst über 15 Monate von März 2013 bis Juni 2014. Die maßgeblichen Anlagenparameter des Untersuchungszeitraumes sind der Tabelle 15 zu entnehmen. Bei vier der untersuchten Anlagen handelt es sich bei den jeweiligen Fermentationsstufen um klassische Rührkesselfermenter mit Langachs- und Tauchmotorrührwerken. Abweichend hiervon sind bei der Anlage B Edelstahl-Hochfermenter mit Zentralrührwerk im Einsatz.

Tabelle 15: **Anlagenparameter der beteiligten Biogasanlagen.**

	Anlage A Lieser	Anlage B Friedrich	Anlage C Neumann	Anlage D Glahn	Anlage E Gebel
Fermenter	Rührkessel	Hochfermenter	Rührkessel	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	LRW/TMRW[1)]	Zentralrührwerk	TMRW[1)]	LRW/TMRW[1)]	LRW/TMRW[1)]
V_{brutto} [m³]	1 x 1.400	2 x 1000	1 x 1.200	1 x 1.250	2 x 1.260
Nachgärer	Rührkessel	Rührkessel	Entfällt	Rührkessel	Rührkessel
Rührung	TMRW[1)]	LRW	Entfällt	TMRW[1)]	TMRW[1)]
V_{brutto} [m³]	1 x 1.400	1 x 1.000	Entfällt	1 x 1.250	1 x 1.260
Hydrolyse	Entfällt	Entfällt	Ring in Ring	Entfällt	Entfällt
V_{brutto} [m³]			500		
Leistung	535 Pel [kW]	550 Pel [kW]	400 Pel [kW]	500 Pel [kW]	345 Pel [kW]
Inputstoffe					
Fest	MS[2)]/GS[2)]/HM[2)]/	MS	MS/GPS	MS/GS	MS/GS/FM
Flüssig[m³/d]	GeS		RG/GeS	SG	RG
	RG[2]				
Maisanteil	50 %	>95 %	61 %	52 %	35 %
	[34 – 60 %][4]		[56 -63 %][4]	[50 – 55%][4]	[30 – 45 %][4]
Temperatur	40 °C	40 °C	40 °C	40 / 52 °C[3)]	40 °C

1) LRW = Langachsrührwerk; TMRW = Tauchmotorrührwerk
2) MS = Maissilage; GS = Grassilage; RG = Rindergülle; SG = Schweinegülle; GPS = Ganzpflanzensilage; FM = Festmist; HM = Hähnchenmist; GeS = Getreideschrot
3) Nachgärer thermophil [zeitweise]
4) Monatliche Schwankungsbreite innerhalb Untersuchungszeitraumes

Eine Besonderheit der Anlage C ist der Betrieb einer sauren Vorhydrolyse mit einem Gesamtvolumen von 500 m³ (Zweikammerfermenter; Ring in Ring). Ein besonderes Kennzeichen der Anlage D war der zeitweilige Betrieb eines thermophilen Nachgärers (52 °C).

Allerdings wurde der Nachgärer während des Untersuchungszeitraumes von der thermophilen auf eine mesophile Fahrweise umgestellt (März/April 2014).

Der Maisanteil an der gesamten Fütterungsmenge (einschließlich Gülle- und Mistanteile) schwankte bei den untersuchten Anlagen im ersten Untersuchungszeitraum zwischen 35 % bei Anlage E und über 95 % bei Anlage B. Als weitere Substrate kamen insbesondere Grassilage zum Einsatz sowie zum Teil Ganzpflanzensilage (Triticale GPS; Anlage C) und Getreideschrot (Anlage A und C). Abgesehen von Anlage B setzten alle Anlagen Rinder- oder Schweinegülle mit einen Massenanteil von >30 % ein, darüber hinaus kamen Hähnchenmist (Anlage A) sowie Rinderfestmist (Anlage E) zum Einsatz. Stärkere Schwankungen bezüglich der eingesetzten Substrate innerhalb des Untersuchungszeitraums zeigten sich bei den Anlagen, die höhere Grasanteile an der Gesamtfütterung aufweisen. Dies betraf insbesondere die Anlagen A und E. Hier schwankte der Maisanteil an der Gesamtfütterung auf Monatsbasis im Bereich zwischen 34 und 60 % (Anlage A) bzw. zwischen 30 und 45 % (Anlage E). Bei den Anlagen C und D lagen die Schwankungen beim Maisanteil an der Gesamtfütterung innerhalb relativ enger Grenzen um den Mittelwert.

Eine zweite Phase des Anlagen- und Substratmonitorings erfolgte zwischen April und Oktober 2015. In Bezug auf die eingesetzten Substratklassen sowie die technischen und verfahrenstechnischen Parameter ergaben sich zum vorherigen Untersuchungszeitraum keine signifikanten Änderungen. In Bezug auf den Maisanteil an der Gesamtfütterung ergab sich für die Anlage A ein Rückgang von ca. 50 % (siehe Tab. 15) auf rund 45 % während bei der Anlage E der Maisanteil von 35 % auf ca. 40 % anstieg. Bei den Anlagen C und D zeigten sich nur geringe Schwankungen im Vergleich zur ersten Phase. Bei der Anlage B wurde unverändert ausschließlich Maissilage gefüttert. Im Rahmen des Anlagenmonitorings erfolgten eine regelmäßige prozessbiologische Überwachung der Praxisanlagen sowie eine chemische Analyse der Inputstoffe.

II.2.2 Methodenentwicklung zur Bestimmung des Stärkegehaltes der Substrate

Ein besonderes Augenmerk im Forschungsprojekt liegt auf der Fragestellung, ob sich zwischen dem Vorkommen bestimmter Mikroorganismen und dem Stärkegehalt der Inputsubstrate ein Zusammenhang herstellen lässt. Hierzu galt es zunächst eine geeignete Methode zur Stärkebestimmung am Institut zu etablieren.

Eine klassische Methode zur Stärkebestimmung ist die sogenannte Luff-Schoorl-Methode. Nach vorheriger Extraktion werden mit dieser Methode alle reduzierenden Zucker reduktometrisch in Summe erfasst. Intramolekulare Halbacetale werden in alkalischer Lösungen gespalten, womit

die reduzierende Aldehydgruppe freigelegt wird. Kettenbrüche der Zucker an ihren Doppelbindungen finden während der Epimerisierung der Zucker über ihre Endiolform statt. Hierbei entstehen kurzkettige Hydroxyaldehyde und –ketone. Diese Verbindungen werden in der Hitze mit überschüssigen Kupfer(II)-Ionen oxidiert. Kupfer(II)-Ionen werden zu Kupfer(I) reduziert. Dabei fällt CuO_2 aus, während das Cu^{2+} durch einen Citratkomplex in Lösung gehalten wird. Diese nicht verbrauchten Cu^{2+}-Ionen oxidieren überschüssiges Kaliumiodid zu Jod. Dieses wird mit Natriumthiosulfat titriert. Durch den Verbrauch an Thiosulfat kann die Menge an Zucker aus einer Tabelle abgelesen werden.

Bevor man nach der Methode Luff-Schoorl titrieren kann, müssen zunächst die Zucker in der Probenlösung mit Salzsäure und unter Hitze erneut hydrolysiert werden. Ebenfalls müssen Aminosäuren und Proteine durch eine Klärungslösung entfernt werden, da sie die Fällung von Cu_2O beeinflussen. Dies geschieht vor der oben erwähnten erneuten Hydrolyse. Der entstehende Niederschlag während der Klärung wurde mit einem Membranfilter aus der Lösung entfernt.

Da die Titration nach Luff-Schoorl sehr zeitaufwendig ist, wurde eine alternative Methode auf Basis einer Zuckerbestimmung mittels HPLC entwickelt. Diese hat den Vorteil, dass auf alle Schritte nach der Klärung und Filtration verzichtet werden kann. Die Probe wird direkt nach der enzymatischen Verzuckerung und Filtration mittels HPLC gemessen. Der Vorteil der HPLC ist, dass alle Abbauprodukte der Stärke wie z.B. Maltose und Glucose genau erfasst werden können. Eine Umrechnung in die Stärkekonzentration ist einfach und präzise. Abbildung 8 zeigt beispielhaft das Chromatogramm einer entsprechend behandelten Maisprobe. Deutlich wird hieran, dass im Verlauf der enzymatischen Hydrolyse die Stärke nicht vollständig zum Monosaccharid gespalten wird. Zusätzlich liegt in einem erheblichen Umfang auch das Disaccharid Maltose vor (siehe Abb. 8).

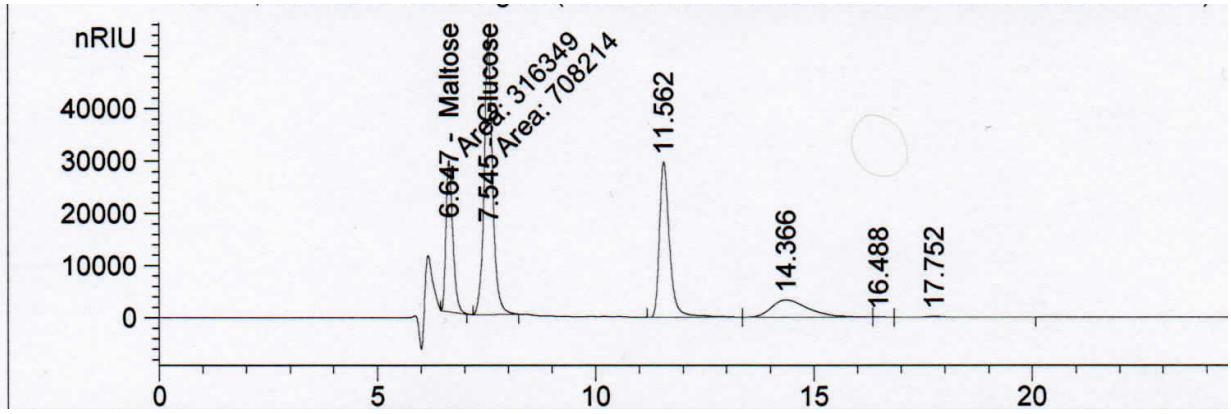

Abbildung 8: Chromatogramm einer hydrolysierten Maisprobe

Durch Addition der Maltose- und Glucosekonzentration und anschließende Multiplikation mit dem Faktor 0,9 lässt sich der Stärkegehalt berechnen. Ein Vergleich des mit der Luff-Schoorl-Methode und der HPLC-Methode ermittelten Stärkegehaltes einer Maisprobe ergab Werte von 31,8 % TS und 32,1 % TS. Die ermittelte Abweichung der beiden Methoden war somit sehr gering und für die Substratuntersuchungen im Rahmen des Anlagenmonitorings wurde im Projektverlauf die HPLC-Methode eingesetzt.

II.2.3 Prozessüberwachung und Substratanalytik der Praxisanlagen

Im Rahmen der Prozessüberwachung erfolgte eine regelmäßige Analyse der flüchtigen organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des Gehaltes an Ammonium-Stickstoff in den Fermentern der Praxisanlagen. Weiterhin erfolgte eine chemische Analyse der pflanzlichen Inputstoffe.

In Abbildung 9 ist der Verlauf der für die Prozessüberwachung relevanten Parameter der Anlage A über den Untersuchungszeitraum von März 2013 bis Juni 2014 dargestellt. Auffällig war eine prozessbiologische Störung zwischen Ende Juli und Anfang August 2013 mit deutlich erhöhten Essigsäure- und Propionsäurewerten. Ursächlich hierfür waren allerdings in erster Linie technische Anlagenprobleme nach Wartungsarbeiten. Im sonstigen Beobachtungszeitraum lagen die Essigsäuregehalte in einer Spannbreite zwischen 100 und 500 mg/kg während die Propionsäurewerte in der Regel unterhalb von 100 mg/kg lagen. Die TS-Gehalte schwankten über den Untersuchungszeitraum im Bereich zwischen 8 und 10 %. Die NH4-N Gehalte zeigten insgesamt eine ansteigende Tendenz von rund 2200 mg/kg zu Beginn der Untersuchung auf zuletzt knapp 3300 mg/kg.

Im zweiten Untersuchungszeitraum zwischen April und Oktober 2015 lagen die Konzentrationen der flüchtigen organischen Säuren generell auf einem niedrigen Niveau. Der Essigsäuregehalt schwankte zwischen 100 und 200 mg/kg während Propionsäure generell nicht nachweisbar war. Der Gehalt an NH4-N lag zwischen 2900 und 3100 mg/kg.

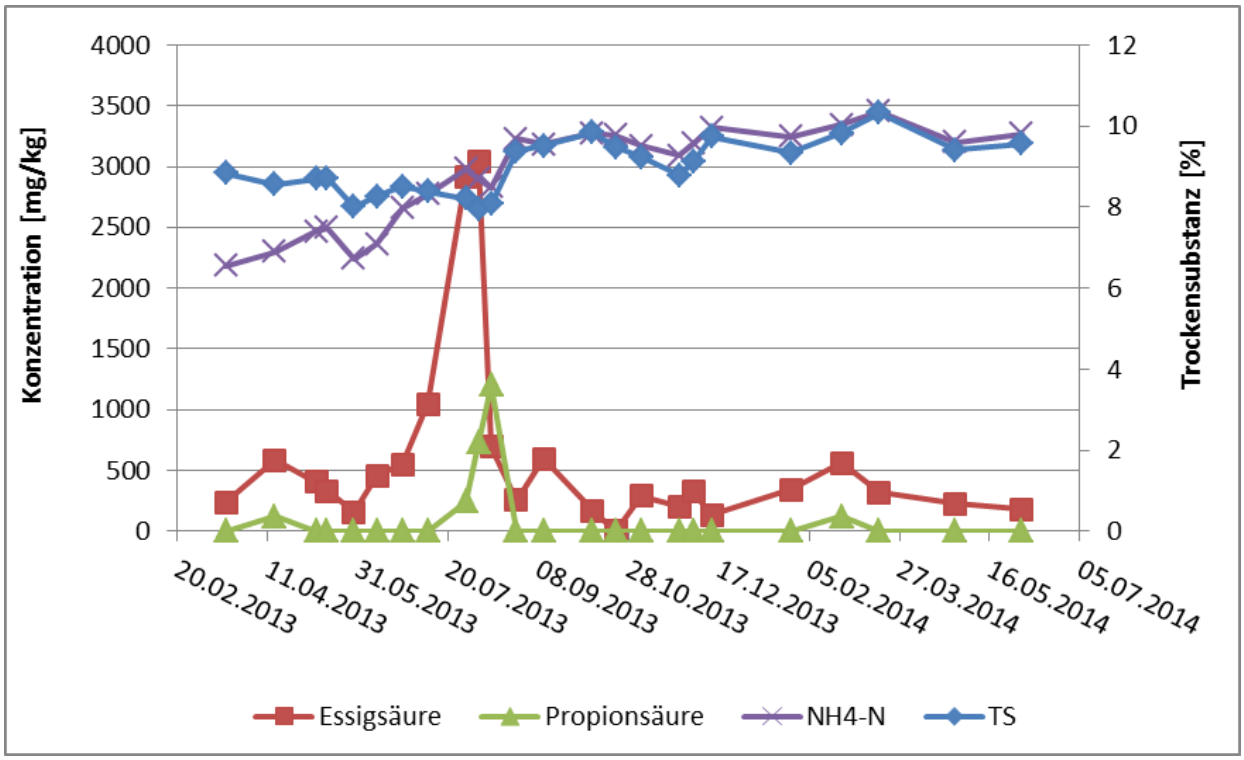

Abbildung 9: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH_4^+-N Gehaltes bei Anlage A

Neben dem Fermenterinhalt wurden regelmäßig Chargen der eingesetzten pflanzlichen Fütterungssubstrate chemisch charakterisiert. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der untersuchten Substratproben zusammengefasst. Bei der eingesetzten Maissilage schwankte der TS-Gehalt über den Untersuchungszeitraum zwischen knapp 29 % und 36 %. Der Milchsäuregehalt bezogen auf den TS-Gehalt der Maissilagen lag in einer Spannbreite von 4,6 % und 7,5 %. Der Stärkegehalt der Maissilagen lag zwischen 29 % und 38 %. Im Durchschnitt lag der Maisanteil an der Gesamtfütterungsmenge im Beobachtungszeitraum bei ca. 50 %. Der Stärkeanteil in Bezug auf die Gesamtfütterungsmenge lag bei durchschnittlich 21 % oTS. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass bei dieser Anlage die Zusammensetzung der Fütterungssubstrate im Beobachtungszeitraum relativ starken Schwankungen unterlegen war. Insbesondere wurde im Vorfeld der zweiten Probennahme für die MPN Zellzahlbestimmungen für einen begrenzten Zeitraum Getreideschrot zugefüttert (~ 5 % der täglichen Frischmassefütterung). Gleichzeitig lag im selben Zeitraum ein überdurchschnittlicher Maisanteil an der Fütterung von rund 55 % vor. Daher ist davon auszugehen, dass zu diesem Zeitpunkt der Stärkeanteil an der Gesamtfütterungsmenge deutlich erhöht war. Eine genaue Bilanzierung ist allerdings nicht möglich, da von dem nur kurzfristig eingesetzten Getreideschrot kein Probenmaterial vorlag. Auch im Vorfeld der dritten Probenahme für MPN-Zellzahlbestimmungen lag der Maisanteil an der Fütterung mit ca. 54 % oberhalb des Durchschnitts. Allerdings fand hier keine zusätzliche Zugabe von Getreideschrot statt.

Tabelle 16: **Substratcharakteristik Anlage A**

Nr.	Substrat	TS [%][1)]	GV [1), 2)] [% TS]	Milchsäure [mg/kg]	FOS[3)] [mg/kg]	Ethanol [mg/kg]	Stärke [% TS]
1	Maissilage Probe 1	33,39	97,1	25775	6123	12050	30,7
2	Maissilage Probe 2	29,52	96,5	22326	10439	1809	32,7
3	Maissilage Probe 3	36,01	96,8	16546	6397	1075	30,6
4	Maissilage Probe 4	28,81	97,3	21533	4656	6329	29,1
5	Maissilage Probe 5	29,91	95,2	14236	5896	2145	29,9
6	Maissilage Probe 6	31,26	96,1	19820	4722	4586	29,6
7	Maissilage Probe 7	30,06	96,7	19621	4552	4786	30,1
8	Maissilage Probe 8	29,22	97,2	17321	3862	3289	30,8
9	Maissilage Probe 9	31,22	96,2	20555	4082	3978	33,1
10	Maissilage Probe 10	34,23	96,5	16505	4856	4217	35,2
11	Maissilage Probe 11	35,36	97	25153	1759	2401	38,3
12	Maissilage Probe 12	32,54	97,1	17959	2802	2235	39,3
13	Maissilage Probe 13	38,3	96,7	26803	4666	1881	38,0
14	Maissilage Probe 14	36,7	96,2	20588	3452	2444	36,2
15	Grassilage Probe 1	27,36	92,6	8123	19188	1540	Nb
16	Grassilage Probe 2	27,82	93,2	10278	12589	891	Nb
17	Grassilage Probe 3	29,88	91,8	12685	13145	1682	Nb
18	Grassilage Probe 4	27,98	92,2	13111	8417	3118	Nb
19	Grassilage Probe 5	34,77	93,2	15588	7988	3364	Nb
20	Grassilage Probe 6	30,16	92,6	13422	9908	2934	Nb
21	Grassilage Probe 7	33,47	92,7	13347	9467	2198	Nb
22	Grassilage Probe 8	30,88	93,1	18059	8876	3021	Nb
23	Grassilage Probe 9	32,11	90,7	28698	7150	2616	Nb
24	Grassilage Probe 10	34,06	90,9	24787	7501	2514	Nb
25	Grassilage Probe 11	31,11	89,7	15411	5201	1514	Nb

[1)] Korrigiert um FOS und Ethanol; [2)] Glühverlust; [3)] Flüchtige organische Säuren; [4)] Nb. = Nicht bestimmt.

Im Zeitraum der vierten MPN-Zellzahlbestimmung lag der Maisanteil mit rund 45 % niedriger als im ersten Untersuchungszeitraum, allerdings wies der eingesetzte Mais im Durchschnitt einen höheren Trockensubstanzgehalt sowie einen höheren Stärkegehalt auf (siehe Substrat Nr. 13 und 14). Der berechnete Stärkegehalt an der Gesamtfütterung lag mit rund 23 % leicht oberhalb des Durchschnitts der ersten Untersuchungsphase.

Abbildung 10 zeigt den Verlauf der für die Prozessüberwachung relevanten Parameter der Anlage B zwischen April 2013 und Juni 2014. Im Beobachtungszeitraum zeigten sich hierbei keine besonderen Auffälligkeiten. Die Essigsäuregehalte schwankten zwischen 300 und 700 mg/kg und die Propionsäurewerte lagen generell unterhalb von 100 mg/kg. Die TS-Gehalte schwankten innerhalb einer relativ schmalen Bandbreite zwischen 9 und knapp 10 %. Auch die NH_4^+-N Gehalte zeigten insgesamt einen relativ konstanten Verlauf im Bereich zwischen 1600 und 1750 mg/kg

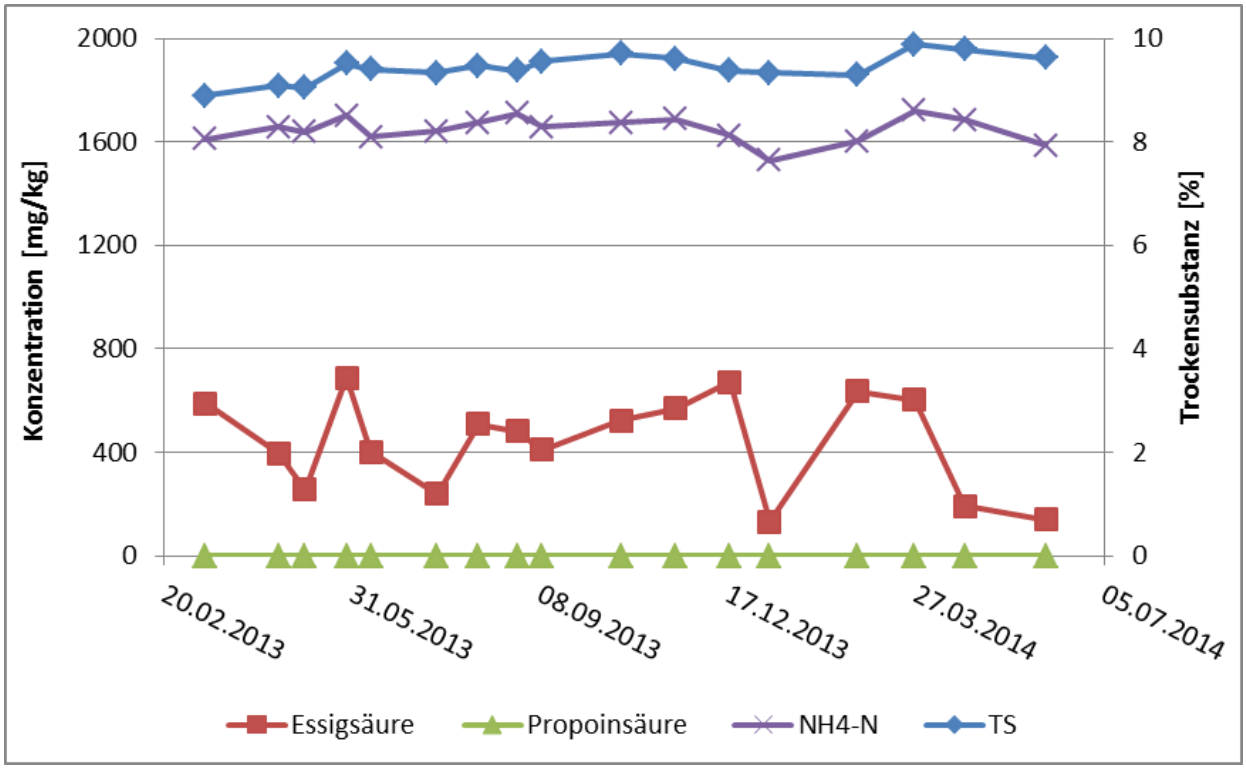

Abbildung 10: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH4+-N Gehaltes bei Anlage B

Im zweiten Beobachtungszeitraum zwischen April und Oktober 2015 lagen die ermittelten Essigsäuregehalte weiterhin auf einem niedrigen Niveau. Allerdings traten im Juli/August Propionsäurekonzentrationen zwischen 100 und 360 mg/kg auf. Im gleichen Zeitraum lag auch der Stärkeanteil an der Gesamtfütterung auf einem überdurchschnittlichen hohen Niveau. Im ersten Beobachtungszeitraum lagen die TS-Gehalte der untersuchten Chargen zwischen 28 % und 33 %. Der Milchsäuregehalt bezogen auf den TS-Gehalt der Maissilagen lag in einer

Spannbreite von 6,7 % und 9,5 %. Der Stärkegehalt der Maissilagen lag zwischen 30 % und 35. Der Stärkeanteil in Bezug auf die Gesamtfütterungsmenge lag durchschnittlich bei ca. 33,5 % oTS. In der oben genannten Phase auftretender Propionsäuregehalte lagen der durchschnittliche TS-Gehalt der eingesetzten Maissilage bei rund 36 %. Unter Berücksichtigung des Stärkegehaltes lag der Stärkeanteil an der Gesamtfütterung in diesem Zeitraum bei ca. 36 %.

Tabelle 17: **Substratcharakteristik Anlage B**

Nr.	Substrat	TS [%][1)]	GV [1), 2)] [% TS]	Milchsäure [mg/kg]	FOS[3)] [mg/kg]	Ethanol [mg/kg]	Stärke [% TS]
1	Maissilage Probe 1	28,54	95	22420	4582	3896	32,3
2	Maissilage Probe 2	29,66	96,3	20001	5139	4511	34,7
3	Maissilage Probe 3	30,12	96,9	27501	5564	3890	34,2
4	Maissilage Probe 4	29,81	97,3	27559	6470	4903	32,1
5	Maissilage Probe 5	27,77	97	25444	4018	3681	30,9
6	Maissilage Probe 6	31,02	97,1	27022	5045	1966	32,9
7	Maissilage Probe 7	30,22	96,6	28240	6213	1696	33,5
8	Maissilage Probe 8	29,12	95,7	24711	5623	3178	30,1
9	Maissilage Probe 9	30,07	97	27520	4256	2786	32,7
10	Maissilage Probe 10	32,02	96,5	25532	5812	2541	29,1
11	Maissilage Probe 11	31,26	95,2	29851	6912	1852	33,6
12	Maissilage Probe 12	33,2	96,7	22568	6458	2682	31,4
13	Maissilage Probe 13	33,8	97,2	24201	5455	1902	34,2
14	Maissilage Probe 14	39,68	96,6	28520	4562	2145	35,7
15	Maissilage Probe 15	34,87	96,2	25475	3991	1808	34,9

[1)] Korrigiert um FOS und Ethanol; [2)] Glühverlust; [3)] Flüchtige organische Säuren; [4)] Nb. = Nicht bestimmt.

Die Anlage C zeigte in Bezug auf den Verlauf der organischen Säuren größere Schwankungen (siehe Abb. 11). Dies betraf insbesondere die Essigsäure welche zu Beginn des Monitoring erhöhte Werte im Bereich von 1500 mg/kg zeigte. Auch der TS-Gehalt und der NH_4^+-N zeigten über den Untersuchungszeitraum relativ starke Schwankungen von 7,0 bis 10 % bzw. 1400 bis 2300 mg/kg. Im Wesentlichen sind die Schwankungen hierbei darauf zurückzuführen, dass aufgrund verschiedener Umbau- und Wartungsarbeiten die Vorhydrolysestufe mehrfach außer

Betrieb genommen wurde. Darüber hinaus traten zu Beginn des Jahres 2014 größere technische Probleme beim BHKW auf was wiederholt zu Ausfallzeiten führte.

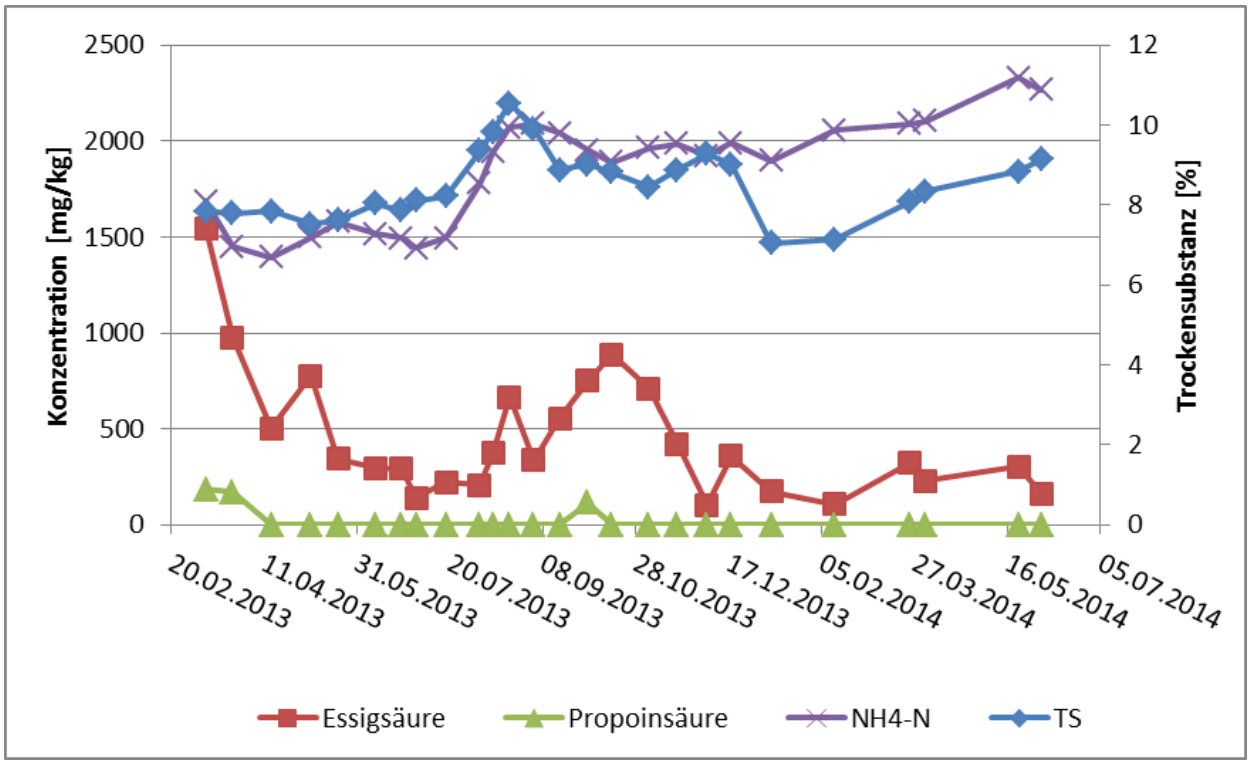

Abbildung 11: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH4+-N Gehaltes bei Anlage C

In der zweiten Untersuchungsphase zwischen April und Oktober traten insgesamt geringe Schwankungen auf. Der Essigsäuregehalt bewegte sich zwischen 200 und 900 mg/kg während die Propionsäurekonzentration generell unterhalb von 100 mg/kg lag. Der TS-Gehalt schwankte geringfügig zwischen 8,5 und 9,2 %. Der Ammoniumgehalt war über den Beobachtungszeitraum insgesamt rückläufig von 2600 mg/kg auf ca. 2100 mg/kg. Dies dürfte im Wesentlichen auf den veränderten Anteil an Getreideschrot zurückzuführen sein. So wurde bis einschließlich Mai 2015 täglich 1 Tonne Getreideschrot gefüttert, im Anschluss wurde dieser Anteil zurückgefahren und teilweise durch GPS ersetzt.

In Bezug auf die Zusammensetzung der Inputstoffe zeigte die Anlage im Verlauf des Jahres 2013 eine hohe Konstanz mit weitgehend gleichbleibenden Anteilen von Maissilage, GPS und Rindergülle. Im Untersuchungszeitraum von Anfang 2014 bis Juni 2014 lag eine veränderte Zusammensetzung der Einsatzsubstrate vor. In diesem Zeitraum wurde keine Ganzpflanzensilage (GPS) eingesetzt, dafür kam ein erhöhter Maisanteil sowie im begrenzten Umfang (4 – 5 % Anteil an der Frischmasse) Getreideschrot zum Einsatz. Die Ergebnisse der chemischen Charakterisierung der pflanzlichen Inputstoffe sind in der nachfolgenden Tabelle 18

zusammengefasst. In Zeitraum April bis Oktober 2015 wurde anfangs noch Getreideschrot eingesetzt, dann aber im weiteren Verlauf durch GPS ersetzt.

Tabelle 18: **Substratcharakteristik Anlage C**

Nr.	Substrat	TS [%][1)]	GV [1), 2)] [% TS]	Milchsäure [mg/kg]	FOS[3)] [mg/kg]	Ethanol [mg/kg]	Stärke [% TS]
1	Maissilage Probe 1	31,36	98,1	25775	6123	2050	33,4
2	Maissilage Probe 2	33,98	96,2	30456	5342	2704	34,8
3	Maissilage Probe 3	29,99	97,2	26121	5864	3370	31,2
4	Maissilage Probe 4	32,29	96,5	22855	4391	5347	35,5
5	Maissilage Probe 5	33,01	94,6	30125	3108	3877	36,7
6	Maissilage Probe 6	30,02	95,8	19822	6544	4586	36,1
7	Maissilage Probe 7	29,14	97,3	25868	3777	2908	32,1
8	Maissilage Probe 8	34,56	96,14	19856	6584	4123	32,9
9	Maissilage Probe 9	32,87	97,2	28912	5471	2472	31,8
10	Maissilage Probe10	33,11	96,2	27540	4986	2581	32,7
11	Maissilage Probe 11	29,98	97,1	24409	5134	3008	28,9
12	Maissilage Probe 12	31,65	96,7	20573	5517	3864	31,8
13	Maissilage Probe 13	30,41	96,9	18027	5450	3930	34,2
14	Maissilage Probe 14	31,08	97,1	15934	4853	3809	38,2
15	Maissilage Probe 15	35,52	96,6	28486	4527	3470	32,0
16	Maissilage Probe 16	33,11	97,0	26544	3874	2956	32,7
17	Maissilage Probe 17	36,79	96,2	23684	6322	3258	32,3
18	GPS Probe 1	31,08	94,3	21051	4515	2010	32,1
19	GPS Probe 2	29,42	95,7	23789	4370	1461	30
20	GPS Probe 3	30,47	95,1	25079	3633	3042	29,5
21	GPS Probe 4	31,05	95,3	26155	3177	3709	33,7
22	GPS Probe 5	30,63	94,2	28653	7022	3320	31,4
23	GPS Probe 6	28,78	94,6	18989	4208	1998	29,5
24	GPS Probe 7	27,96	95,2	20008	3087	2361	30,2

25	GPS Probe 8	29,05	93,9	24186	2852	1745	28,4
26	Getreide-schrot Pr.1	88,23	98,2	0	0	0	74,7
27	Getreide-schrot Pr.2	86,74	98	0	0	0	70,5
28	Getreide-schrot Pr.3	90,55	98,7	0	0	0	72,4
29	Getreide-schrot Pr.4	88,07	98,2	0	0	0	73,0

[1)] Korrigiert um FOS und Ethanol; [2)] Glühverlust; [3)] Flüchtige organische Säuren; [4)] Nb. = Nicht bestimmt.

Im Untersuchungszeitraum bis Juni 2014 schwankten die TS-Gehalt der untersuchten Maissilagen zwischen 29 % und 34,5 % und bei den GPS-Proben zwischen 28,8 und 31 %. Der Milchsäuregehalt bezogen auf den TS-Gehalt der Maissilagen lag in einer Spannbreite von 5,1 % und 9,2 %. Die entsprechenden Werte der GPS-Proben lagen zwischen 6,6 und 9,4 %. Der TS-Gehalt des Getreideschrots schwankte zwischen 86 und 90 %. Der Stärkegehalt der Maissilagen und GPS-Proben lag zwischen 31 % und 36,7 bzw. 29,5 und 33,7 %. Der Stärkegehalt des Getreideschrots im Bereich zwischen 70 und 75 %. Der Stärkeanteil in Bezug auf die Gesamtfütterungsmenge lag im Untersuchungszeitraum bis Ende 2013 durchschnittlich bei ca. 31 % oTS. Im Untersuchungszeitraum Januar bis Juni 2014 erhöhte sich dieser Wert durch die geänderte Mischung der Einsatzstoffe auf ca. 36 % oTS. Im Zeitraum zwischen April und Oktober 2015 war der Stärkeanteil durch die geänderte Zusammensetzung der Einsatzsubstrate wieder leicht rückläufig und lag im Durchschnitt bei ca. 33 % oTS

Bei der Anlage D erfolgte die prozessbiologische Überwachung von Fermenter und Nachgärer, da beide Anlagen im Hinblick auf die Zellzahlbestimmung und die Isolierung milchsäureabbauender Bakterien beprobt wurden (siehe Abb.12 und 13). Beim Fermenter waren sämtliche Parameter über den Untersuchungszeitraum unauffällig. So lagen die Konzentrationen der Essig- und Propionsäure generell unterhalb von 500 mg/kg bzw. unterhalb von 100 mg/kg. Die TS-Gehalte lagen zwischen 7 und 8,3 % und der Gehalte an Ammonium-Stickstoff schwankten zwischen 2000 und 2400 mg/kg.

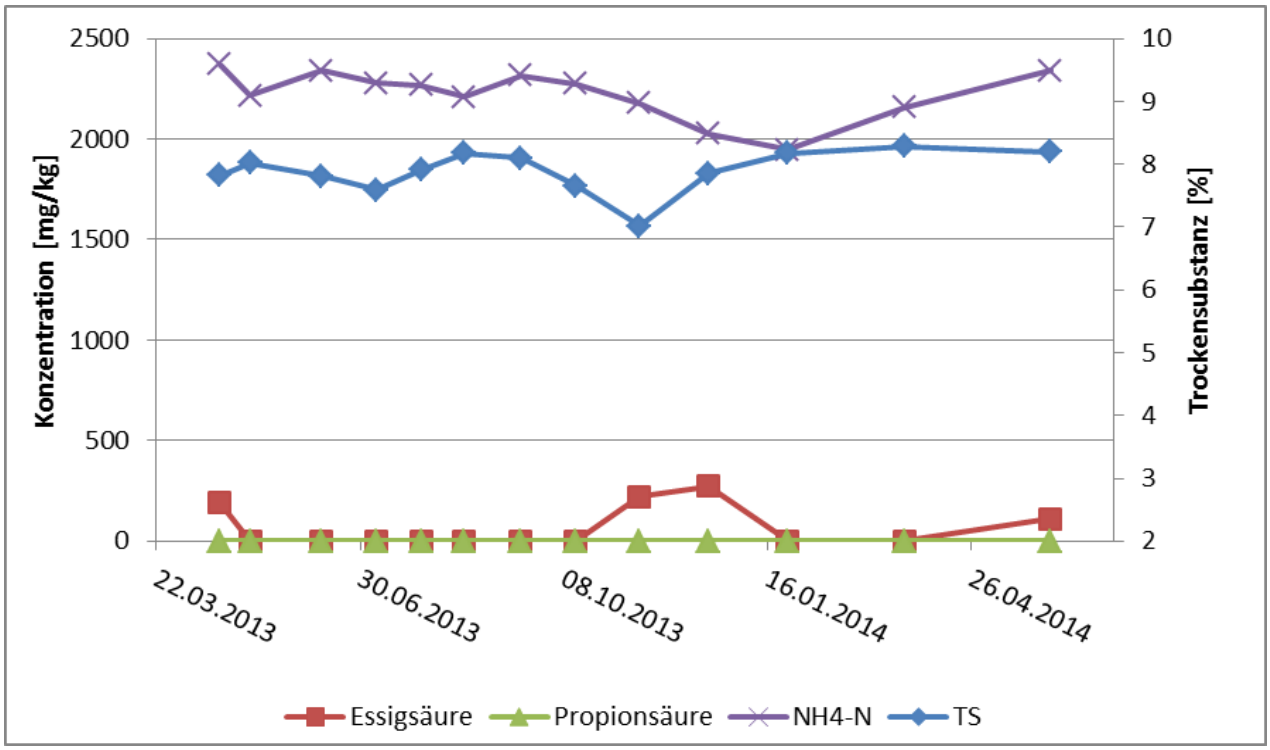

Abbildung 12: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH4+-N Gehaltes beim Fermenter der Anlage D

Beim Nachgärer traten mit Essigsäuregehalten zwischen 200 und 1100 mg/kg hingegen größere Schwankungen auf. Dies dürfte auf die zeitweilige thermophile Fahrweise des Nachgärer bis Anfang 2014 zurückzuführen sein.

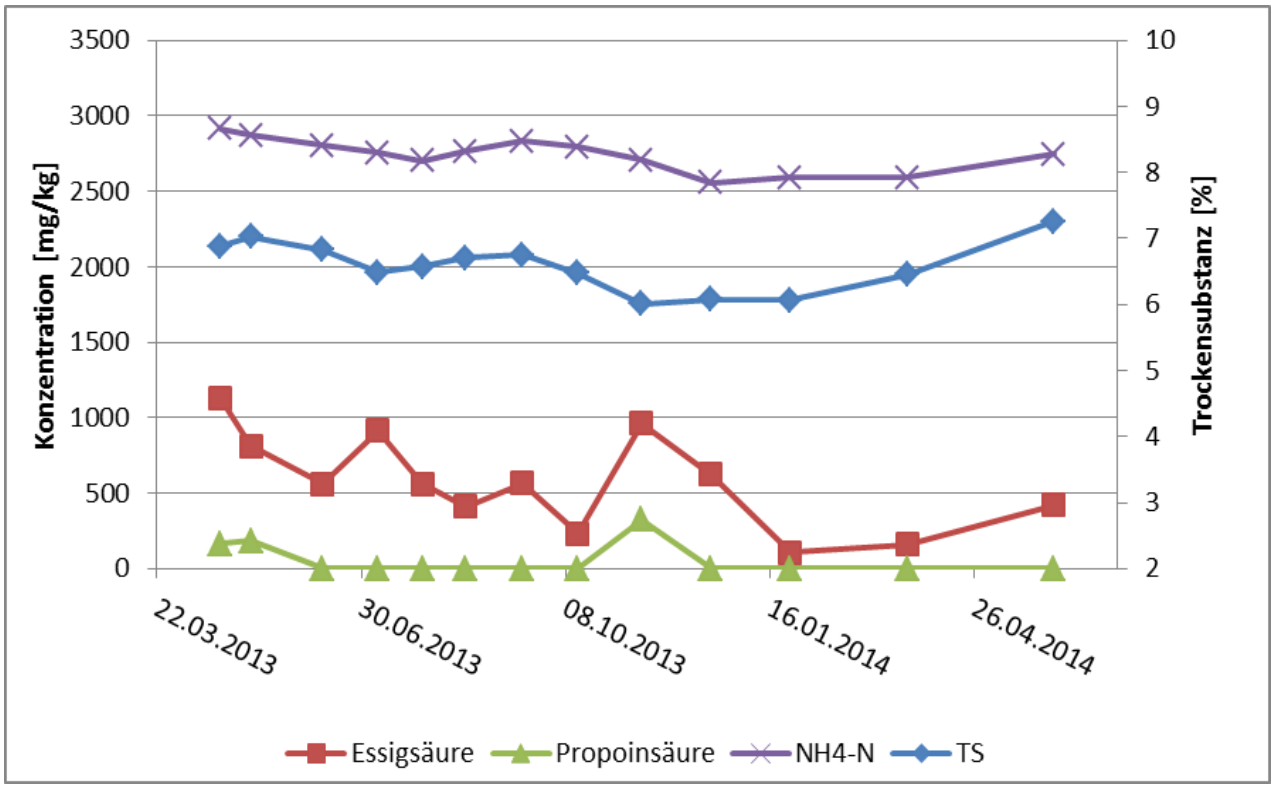

Abbildung 13: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH4+-N Gehaltes beim Nachgärer der Anlage D

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der untersuchten Substratproben der Anlage D zusammengefasst. Bei der Anlage wurden im Beobachtungszeitraum Maissilage und Grassilage sowie Schweinegülle als Fütterungssubstrate eingesetzt. Die TS-Gehalte der untersuchten Maissilagen schwankten 28,2 % und 35,2 %. Der Milchsäuregehalt bezogen auf den TS-Gehalt der Maissilagen lag in einer Spannbreite von 4,2 % und 9,1 %. Der Stärkegehalt der Maissilagen lag zwischen 26 % und 36,5 %. Der Stärkeanteil in Bezug auf die Gesamtfütterungsmenge lag durchschnittlich bei ca. 25 % oTS.

Tabelle 19: **Substratcharakteristik Anlage D**

Nr.	Substrat	TS [%][1)]	GV [1), 2)] [% TS]	Milchsäure [mg/kg]	FOS[3)] [mg/kg]	Ethanol [mg/kg]	Stärke [% TS]
1	Maissilage Probe 1	29,75	95	25054	7380	4042	32,1
2	Maissilage Probe 2	32,23	96,3	27441	7052	3475	33,8
3	Maissilage Probe 3	30,18	96,9	25666	6109	3981	32,1
4	Maissilage Probe 4	33,36	96,5	30588	3579	2488	36,5
5	Maissilage Probe 5	32,86	97,1	28991	5107	4970	33,8
6	Maissilage Probe 6	28,19	96,2	17881	7346	2862	25,9
7	Maissilage Probe 7	27,89	95,1	16423	8520	3694	27,1
8	Maissilage Probe 8	32,58	96,5	19943	7684	2670	33,8
9	Maissilage Probe 9	34,78	96,6	14769	14367	2324	31,3
10	Maissilage Probe 10	35,19	97	28732	9341	4343	32,0
11	Grassilage Probe 1	34,19	90,9	16390	11817	2899	Nb
12	Grassilage Probe 2	30,98	91,7	15410	12581	3627	Nb
13	Grassilage Probe 3	37,48	92,3	12984	12254	3362	Nb
14	Grassilage Probe 4	40,07	91	18963	4123	2111	Nb
15	Grassilage Probe 5	34,37	91,71	13861	6487	732	Nb
16	Grassilage Probe 6	31,38	92,9	19011	8757	1111	Nb
17	Grassilage Probe 7	27,23	91,1	16808	7560	1892	Nb

[1)] Korrigiert um FOS und Ethanol; [2)] Glühverlust; [3)] Flüchtige organische Säuren; [4)] Nb. = Nicht bestimmt.

Die Anlage E zeigte in Bezug auf den Verlauf der organischen Säuren zu Beginn des Monitoring erhöhte Werte im Bereich von bis zu 1200 mg/kg Essigsäure. Im Anschluss waren die Werte allerdings deutlich rückläufig und blieben bis zum Ende des gesamten Betrachtungszeitraumes auf einem niedrigen Niveau (siehe Abb.14).

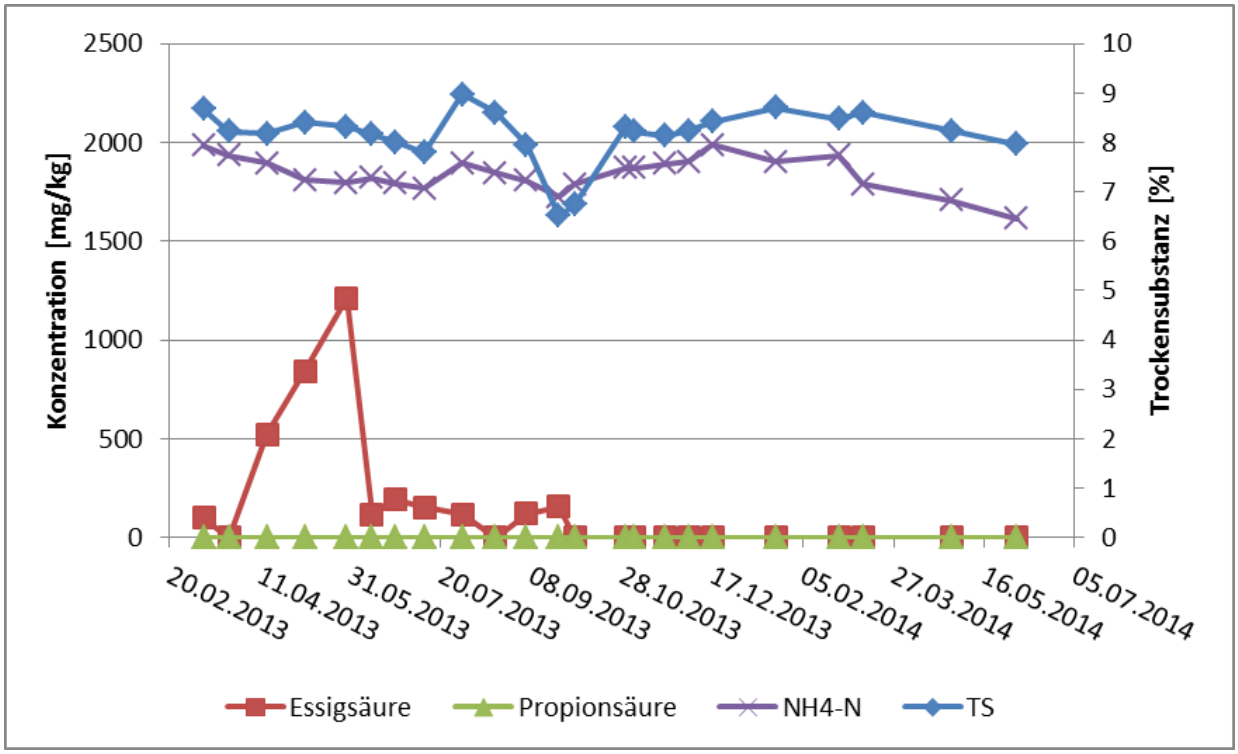

Abbildung 14: Verlauf der organischen Säuren, des TS-Gehaltes und des NH4+-N Gehaltes der Anlage E

In der zweiten Untersuchungsphase traten im Juli kurzeitig deutlich erhöhte Essigsäurewerte von bis zu 3600 mg/kg auf. Propionsäure trat allerdings nicht auf. Durch eine Zugabe von Spurenelemente kam es zu einem relativ schnellen Rückgang der Essigsäurekonzentrationen. Inwieweit ein Fütterungswechsel oder ein Spurenelementmangel für die Prozessstörung verantwortlich war konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Im übrigen Untersuchungszeitraum traten nur geringe Schwankungen auf. Der Essigsäuregehalt bewegte sich zwischen 100 und 400 mg/kg, Propionsäure war generell nicht nachweisbar. Der TS-Gehalt schwankte geringfügig zwischen 8,0 und 9,5 %. Der Ammoniumgehalt war über den Beobachtungszeitraum relativ konstant im Bereich von ca. 2000 mg/kg.

Bei der Anlage E wurden im ersten Beobachtungszeitraum Maissilage und Grassilage sowie Rindergülle und Rinderfestmist als Fütterungssubstrate eingesetzt. Die TS-Gehalte der untersuchten Maissilagen schwankten hierbei in einem relativ breiten Spektrum zwischen 22,3 % und 30,6 % (siehe Tab. 20). Der Milchsäuregehalt bezogen auf den TS-Gehalt der Maissilagen lag in einer Spannbreite von 4,0 % und 10,9 %. Der Stärkegehalt der Maissilagen

lag zwischen 20 % und 31,8 %. Der Stärkeanteil in Bezug auf die Gesamtfütterungsmenge lag durchschnittlich bei ca. 11,5 % oTS.

Im Zeitraum zwischen April und Oktober 2015 war der der durchschnittliche Maisanteil an der Fütterung mit ca. rund 40 % etwas höher als in der vorherigen Beobachtungsphase (~35 %). Der kalkulatorische Stärkegehalt an der Gesamtfütterungsmenge bei 20,6 %. Allerdings wurden im zweiten Beobachtungszeitraum nur einmalig Substratproben untersucht, so dass die Berechnung mit Unsicherheiten behaftet ist.

Tabelle 20: **Substratcharakteristik Anlage E**

Nr.	Substrat	TS [%][1)]	GV [1), 2)] [% TS]	Milchsäure [mg/kg]	FOS[3)] [mg/kg]	Ethanol [mg/kg]	Stärke [% TS]
1	Maissilage Probe 1	30,57	97,1	25455	5959	3690	28,4
2	Maissilage Probe 2	28,66	95,9	19887	8522	3705	26,7
3	Maissilage Probe 3	28,15	96,8	21128	5208	4566	28,7
4	Maissilage Probe 4	28,87	96,4	17856	6352	5712	31,8
5	Maissilage Probe 5	24,7	97,2	20425	3512	7523	19,9
6	Maissilage Probe 6	22,3	96,1	24256	5584	10949	21,7
7	Maissilage Probe 7	22,9	95,4	8991	16610	385	20,7
8	Maissilage Probe 8	27,74	97	11230	16583	893	25,2
9	Maissilage Probe 9	29,65	96,2	17119	5352	1718	27,2
10	Maissilage Probe 10	36,91	96,7	20209	5622	1312	34,2
10	Grassilage Probe 1	24,22	92,8	11594	12132	1591	Nb
11	Grassilage Probe 2	24,98	92,6	11008	8907	3213	Nb
12	Grassilage Probe 3	30,41	91,8	13908	10008	2873	Nb
13	Grassilage Probe 4	30,47	91,12	8963	10263	2384	Nb
14	Grassilage Probe 5	27,00	87,6	19612	9601	1329	Nb
15	Grassilage Probe 6	35,62	92,1	14019	10327	829	Nb

[1)] Korrigiert um FOS und Ethanol; [2)] Glühverlust; [3)] Flüchtige organische Säuren; [4)] Nb. = Nicht bestimmt.

II.3 Zusammenfassung

Ziel des vorliegenden Forschungsprojektes war die Bestimmung von Zellzahlen kultivierbarer milchsäureabbauender Bakterien aus Praxisbiogasanlagen mit unterschiedlichen Einsatzstoffen. Hierbei sollte insbesondere überprüft werden ob der Stärkeanteil an der Gesamtfütterungsmenge einen Einfluss auf das Vorkommen und die Häufigkeit milchsäureabbauender Bakterien hat. Darüber hinaus wurde die Zielsetzung verfolgt milchsäureabbauende Bakterien aus den Anlagen zu isolieren und physiologisch und phylogenetisch zu charakterisieren.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen des Projektes insgesamt vier MPN-Serien zur Ermittlung der Lebendkeimzahlen kultivierbarer michsäureabbauender Bakterien mit Probenmaterial aus 5 Praxisanlagen durchgeführt. Um den oben genannten Zusammenhang zwischen den ermittelten Zellzahlen und den Stärkeanteil an der Fütterung zu prüfen, erfolgte parallel ein intensives Anlagen- und Substratmonitoring zur Charakterisierung der eingesetzten pflanzlichen Fütterungssubstrate. Bei den untersuchten Anlagen schwankte Stärkeanteil an der Gesamtfütterung bezogen auf die organische Trockensubstanz zwischen 11 und 36 %. Die bei den verschiedenen Anlagen ermittelten Zellzahlen milchsäureabbauender Bakterien lagen in einem relativ breiten Spektrum von 7,5 x 10^5 bis 7,5 x 10^7 Zellen/ml ermittelt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in den Anlagen mit dem höchsten Stärkeanteil auch die höchsten Zellzahlen kultivierbarer milchsäureabbauender Bakterien vorlagen. Auch zeigte sich ein Einfluss von Schwankungen beim Stärkeanteil an Fütterung einzelner Anlagen zwischen den verschiedenen Probenahmezeitpunkten auf die Abundanz milchsäureabbauender Bakterien.

Für die Isolierung und Charakterisierung milchsäureabbauender Bakterien aus den höchsten Verdünnungsstufen der MPN-Serien erfolgte die Entwicklung eines geeigneten Wachstumsmedium mit Milchsäure als einziger Kohlenstoffquelle. Mit dem eingesetzten Medien MI und MII wurden 16 Isolate und 4 stabile Anreichungskulturen aus den untersuchten Anlagen gewonnen. Auf Grundlage morphologischer und physiologischer Merkmale ließen sich die Kulturen in vier Gruppen einteilen. Als zentrale Stoffwechselprodukte aus dem Milchsäureabbau traten Acetat und Propionat auf, daneben bei einigen Kulturen als Nebenprodukte Butyrat, Valerat und Succinat. Die physiologischen Untersuchungen bezüglich der Abhängigkeit des Wachstums von zentralen Anlagenparametern zeigten ein relativ breites pH-Spektrum von 6 bzw. 6,5 bis 8,5 sowie Temperaturoptimum das bei den meisten Kulturen im mesophilen Bereich lag. Wachstum unter thermophilen Bedingungen (> 50 °C) konnte nur bei drei Stämmen nachgewiesen werden. Bezüglich des Parameters Ammoniumstickstoff zeigte sich bei einer Reihe von Stämmen eine zumindest teilweise Hemmung des Wachstums ab 3000 mg NH4-N/kg.

Auf Grundlage der molekularbiologischen Identifizierung der aus den Praxisanlagen gewonnenen Kulturen wurden überwiegend Vertreter der Gattung *Clostridium* isoliert. Besonders häufig traten hierbei Spezies auf die sich *Clostridium sporosphaeroides* zuordnen ließen. Daneben wurden verschiedene Vertreter der Gattung *Sporomusa* identifiziert. Bei den isolierten Bakterien handelte es sich somit nicht um klassische milchsäureabbauende Bakterien welche u.a. aus dem Rinderpansen bekannt sind (insbesondere Vertreter der Gattungen *Selemonas* oder *Megasphaera*). Ein weiterer Aspekt des Vorhabens war es zu prüfen, ob sich direkte Zusammenhänge zwischen der Fütterung, der Abundanz milchsäureabbauender Bakterien und dem Auftreten flüchtiger organischer Säuren aufzeigen lassen. Zwar zeigten sich vereinzelt entsprechende Tendenzen (Propionsäureanstieg nach erhöhter Stärkezufuhr), eindeutige Zusammenhänge konnten allerdings im Rahmen des Projektes nicht ermittelt werden. Hauptproblem war hierbei, dass prozessbiologische Störungen bei den Anlagen im Untersuchungszeitraum nur vereinzelt auftraten und sich die Ursachen nicht eindeutig ermitteln ließen.

Die vom Projektpartner Universität Mainz durchgeführten Untersuchungen zum Vorkommen und zur Häufigkeit von milchsäurebildenden Bakterien in den Praxisanlagen konnten die Bedeutung der Milchsäure als wichtiges Stoffwechselzwischenprodukt bestätigen. So wurden in allen Anlagen relevante Zellzahlen milchsäurebildender Bakterien nachgewiesen (siehe Abschlussbericht TV1; FKZ 22012412). Weiterhin konnten zahlreiche Isolate der Gattung *Bacillus* gewonnen werden welche Milchsäure als Produkt aus dem Stärkeabbau bildeten. Die Unterschiede der ermittelten Zellzahlen milchsäurebildender Bakterien in den verschiedenen Anlagen waren allerdings weniger ausgeprägt. So war ein signifikanter Einfluss der jeweiligen Fütterungssubstrate auf die entsprechenden Zellzahlen nicht eindeutig nachweisbar.

II.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Im Rahmen des Projektes konnten Zusammenhänge zwischen dem Stärkeanteil an der Fütterungsmenge und dem Vorkommen und der Häufigkeit milchsäureabbauender Mikroorganismen ermittelt werden. Darüber hinaus konnten mittels Isolation und Charakterisierung der entsprechenden Bakterien Acetat und Propionsäure als die zentralen Stoffwechselprodukte aus dem Milchsäureabbau ermittelt werden. Hieraus lässt sich Schlussfolgern das die Prozessstabilität von landwirtschaftlichen Biogasanlagen, insbesondere im Hinblick auf immer wieder auftretende erhöhte Konzentrationen flüchtiger organischer Säuren, neben dem Prozess des syntrophen Fettsäureabbau, auch von der Bildung und dem Abbau von Milchsäure aus stärkehaltigen Substraten deutlich beeinflusst wird. Insbesondere bei einem Fütterungswechsel von stärkearmen bzw. stärkefreien Substraten zu stärkereichen Substraten

(z.B. Grassilage /Mais oder Getreideschrot) dürfte dies von besonderer Bedeutung sein. Die entsprechen Erkenntnisse aus dem Projekt werden vom PFI in Zukunft verstärkt bei der Beratung landwirtschaftlicher Biogasanlagen hinsichtlich des Fütterungsmanagement berücksichtigt werden. Unterstützt wird dies durch neue analytische Dienstleistungen zur Charakterisierung von Einsatzstoffen die im Rahmen des Projektes etabliert wurden.
Weiterhin konnten im Rahmen des Projektes neue wissenschaftliche Erkenntnisse zum Vorkommen und zur Häufigkeit milchsäureabbauender Bakterien gewonnen werden. Die hierbei ermittelten Zellzahlen deuten darauf hin, dass die identifizierten Organismen eine relevante Rolle beim Abbau von Zwischenprodukten im Biogasprozess spielen.

II.5 Erkenntnisse von Dritten

Während der Projektlaufzeit wurden verschiedene Untersuchungen veröffentlicht, die sich mit der mikrobiellen Diversität in Biogasanlagen beschäftigt haben. Hierbei wurden zum einen methodische Ansätze zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft auf Basis der FISH-Methode (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) in Biogasanlagen verfolgt (Nettmann *et al.* 2013). Des Weiteren haben sich mehrere Arbeiten mit der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in Biogasanlagen auf der Basis verschiedener molekularbiologischer Methoden beschäftigt (u.a. Hanreich et al. 2013; Ziganshin et al. 2013). Zielsetzung dieser Arbeiten war allerdings eine eher generelle Analyse der Populationen. Ein Schwerpunkt wurde hierbei auf denjenigen mikrobiellen Gruppen gelegt die vermutlich für den Cellulose und Hemicelluloseabbau von besonderer Bedeutung sind (v.a. *Clostridia*, *Bacteroidetes*) sowie auf die methanogenen Archaea (v.a. *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*) (Maus et *al*. 2013; Stantscheff et *al*., 2014). Darüber hinaus wurden verschiedene Arbeiten veröffentlicht welche sich mit Populationsanalysen in Abhängigkeit von bestimmten Einsatzstoffen (z.B. Weizenstroh), Prozesszuständen sowie unterschiedlichen Fermentationsverfahren (Vergleich Nass- und Trockenfermentation) beschäftigten (u.a. Heeg et al. 2014; Kampmann et al. 2014; Stolze et al. 2015). Eine aktuelle Untersuchung zeigte, dass essigsäure-, buttersäure- und propionsäurebildende Bakterien zum Teil Milchsäure verwerten können (Cibis et al., 2016). Weitere Arbeiten die sich mit der Thematik der Bildung und des Abbaus von Stoffwechselzwischenprodukten im Biogasprozess beschäftigten wurden nach vorliegendem Kenntnisstand nicht veröffentlicht.

II.6 Veröffentlichungen

Bohn J, Dröge S, König H (2014a) The importance of lactic acid for the formation of methanogenic substrates in biogas plants. Poster. Gemeinsame Jahrestagung der DGHM der VAAM, 05.10.2014- 08.10.2014, Dresden

Bohn J, Dröge S, König H (2014b) Lactic acid formation in biogas plants. Poster. Biogas Science 2014 - International Scientific Conference on Anaerobic Digestion, 26.10.2014 – 30.10.2014, Wien

Des Weiteren ist eine Publikation in Bearbeitung:

Bohn J, Dröge S, König H (2014b) Lactic acid formation in biogas plants. In process.