

Abschlussbericht

für das Niedersächsische Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft,
Verbraucherschutz und Landesentwicklung

zum Thema:

**Abundanz und Vielfalt von Clostridien in landwirtschaftlichen Biogasanlagen
unter Berücksichtigung von *Clostridium botulinum***

| | |
|------------------------|-------------------------|
| Förderkennzeichen | 105.3234/1-5(33) |
| Berichtszeitraum | 01.10.2011 – 31.12.2014 |
| Laufzeit des Vorhabens | 01.10.2011 – 31.12.2014 |

Zuwendungsempfänger



TI

Thünen-Institut für Biodiversität

Braunschweig



HAWK

Fakultät Ressourcenmanagement,
Fachgebiet NEUTec

Göttingen

Projektleitung

Prof. Dr. Christoph Tebbe

christoph.tebbe@thuenen.de

Prof. Dr.-Ing. Achim Loewen

achim.loewen@hawk-hhg.de

Abschlussbericht

über das Vorhaben

Abundanz und Vielfalt von Clostridien in landwirtschaftlichen Biogasanlagen unter Berücksichtigung von *Clostridium botulinum*

durch das

Thünen Institut für Biodiversität
- Molekularbiologische Untersuchungen -

Projektleiter: Prof. Dr. Christoph C. Tebbe

Bearbeiter: Dr. Anja B. Dohrmann

und die

Fakultät Ressourcenmanagement der HAWK, Fachgebiet NEUTec

- Gärversuche und chemische Analytik -

Projektleiter: Prof. Dr.-Ing. Achim Loewen

Bearbeiter: Meike Walz

Braunschweig, März 2016

Johann Heinrich von Thünen-Institut,
Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei
Bundesallee 50
38116 Braunschweig

Thünen-Institut für Biodiversität
Prof. Dr. Christoph C. Tebbe
Telefon +49 531 596 2553
Fax +49 531 596 2599
E-Mail christoph.tebbe@thuenen.de

HAWK Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst
Fakultät Ressourcenmanagement
Rudolf-Diesel-Straße 12
37075 Göttingen

Fachgebiet NEUTec, Nachhaltige Energie- und Umwelttechnik
Prof. Dr. Achim Loewen
Telefon +49 551 5032 257
E-Mail achim.loewen@hawk-hhg.de

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Zusammenfassung..... | 1 |
| 2 | Fazit | 5 |
| 3 | Einleitung..... | 7 |
| 3.1 | Stand des Wissens..... | 8 |
| 4 | Material und Methoden..... | 11 |
| 4.1 | Methoden zur chemischen Charakterisierung..... | 11 |
| 4.1.1 | Bestimmung des Trockensubstanz und der organischen Trockensubstanz | 11 |
| 4.1.2 | Bestimmung des FOS/TAC-Wertes..... | 12 |
| 4.1.3 | Bestimmung des Ammonium-Stickstoffes (NH ₄ -N)..... | 12 |
| 4.1.4 | Bestimmung der Carbonsäuren (C ₂ - C ₆)..... | 13 |
| 4.1.5 | Bestimmung des pH-Werts | 13 |
| 4.1.6 | Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit | 13 |
| 4.1.7 | Bestimmung der Elemente C und N | 14 |
| 4.1.8 | Bestimmung der Nährstoffe..... | 14 |
| 4.2 | Methoden zur mikrobiologischen Charakterisierung | 14 |
| 4.2.1 | Quantifizierung der mikrobiellen Gemeinschaft..... | 14 |
| 4.2.2 | Gruppenspezifische Hochdurchsatzsequenzierung zur Darstellung der Vielfalt innerhalb <i>Clostridium</i> Cluster I | 15 |
| 4.2.3 | Universelle Hochdurchsatzsequenzierung | 15 |
| 4.2.4 | Detektion von ribosomalen Markergenen mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zu potentiell pathogenen Clostridien | 15 |
| 4.2.5 | Nachweis von Botulinum Neurotoxin Genen..... | 16 |
| 4.2.6 | Nachweis von aktiven Botulinum Neurotoxinen | 16 |
| 4.3 | Aufbau der Batchversuche | 16 |
| 4.3.1 | Gasqualität und – quantität im Laborversuch..... | 18 |
| 4.4 | Aufbau der Quasikontinuierlichen Versuchsanlage | 18 |
| 4.4.1 | KI: Maissilage mit HTK | 19 |
| 4.4.2 | KII: Zuckerrübe mit HTK..... | 20 |
| 4.4.3 | KIII: Maissilage mit Rindergülle | 20 |
| 4.5 | Charakterisierung der Praxisbiogasanlagen | 21 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5 | Ergebnisse | 22 |
| 5.1 | Batchversuche | 22 |
| 5.1.1 | Chemische Charakterisierung - Batchversuche..... | 22 |
| 5.1.2 | Mikrobiologische Charakterisierung - Batchversuche | 26 |
| 5.2 | Quasikontinuierliche Versuche | 30 |
| 5.2.1 | Chemische Charakterisierung - quasikontinuierliche Versuche..... | 30 |
| 5.2.2 | Mikrobiologische Charakterisierung - quasikontinuierliche Versuche | 34 |
| 5.3 | Praxisanlagen | 40 |
| 5.3.1 | Chemische Charakterisierung - Praxisanlagen | 40 |
| 5.3.2 | Mikrobiologische Charakterisierung - Praxisanlagen | 42 |
| 6 | Danksagung | 49 |
| 7 | Literatur..... | 50 |
| 8 | Anhang | 53 |

1 Zusammenfassung

Teilergebnisse aus dieser Studie wurden bereits veröffentlicht:

- Dohrmann AB, Walz M, Loewen A, Tebbe C (2015) *Clostridium* cluster I and their pathogenic members in a full-scale operating biogas plant. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(8):3585-3598, doi:10.1007/s00253-014-6261-y
- Dohrmann und Tebbe (2016) Bakterienvielfalt und Nachweis potentiell pathogener Arten in einer landwirtschaftlichen Biogasanlage – Neue Erkenntnisse dank Hochdurchsatz DNA Sequenzierungen von rRNA-Gen Amplikons. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*. *In Druck*

In dem vorliegenden Projekt wurde mit einer bisher nicht erreichten hohen Nachweisempfindlichkeit nach pathogenen Clostridien, insbesondere *Clostridium botulinum* in landwirtschaftlichen Biogasanlagen gesucht. Für die Untersuchungen wurden die Clostridien-Populationen in ihrer Vielfalt (qualitativ) und ihre Abundanz (quantitativ) mit Hilfe moderner, spezifischer und effizienter molekularer Methoden charakterisiert. Diese Untersuchungen basieren auf dem Nachweis von spezifischen Markergenen. Dabei wurde auch direkt nach Genen für die verschiedenen Neurotoxine von *C. botulinum* gesucht.

Die Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften erfolgte ausnahmslos kultivierungsunabhängig anhand der vorhandenen DNA (Erbinformation). Dazu wurde die DNA der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft, die sich in einer Substrat- oder Gärprobe befanden, gewonnen und auf das Vorkommen bestimmter Markergene untersucht. Als Zielgene dienten dabei sowohl das 16S rRNA-Gen, das eine verwandtschaftliche Einordnung der nachgewiesenen Bakterien erlaubt, wie auch Toxin-Gene, die für problematischen Produkte von *C. botulinum* verantwortlich sind.

Inhaltlich lässt sich das Projekt in drei Teilbereiche gliedern. Im Teilbereich 1 wurden gängige Substrate aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen in **Batchversuchen** angesetzt und die mikrobiologische Zusammensetzung analysiert. Hauptaugenmerk lag auf Substraten wie Rinder- und Schweinegülle sowie Hühnertrockenkot. Anhand der Batchversuche konnten diejenigen Substrate identifiziert werden, die in der Fermentation hohe *Clostridium* Cluster I Gehalten bedingten. Im Teilbereich 2 wurden diese Substrate in einer **quasikontinuierlichen Versuchsanlage** gezielt eingesetzt, um das Vorkommen und die Vielfalt der Clostridien unter möglichst praxisnahen Bedingungen analysieren zu können. Im Teilbereich 3 erfolgten Beprobungen und Analysen von neun **Praxisanlagen**, um den Zustand und mögliche Sicherheitsgefährdungen durch pathogene Clostridien einzelner bestehender landwirtschaftlicher Biogasanlagen beschreiben und bewerten zu können. Hierfür wurden alle eingesetzten Substrate und Proben aus Fermentern, Nachgärern und Gärrestlagern auf das Vorkommen von *Clostridium* Cluster I untersucht und verglichen. Während die Analysen der Batchversuche auf spezifischen quantitativen PCR-Verfahren (engl. Polymerase Chain Reaction) basierten, stützten sich die Untersuchungen der quasikontinuierlichen Versuche und der Praxisanlagen auf die Sequenzierung ribosomaler Markergene

(16S rRNA) im Hochdurchsatzverfahren. Hieraus ließen sich Aussagen über Vorkommen und Vielfalt von potentiell pathogenen Clostridien in den analysierten Biogasanlagen ableiten.

In allen Materialien wurden die Anwesenheit von Bakterien und Archaeen kultivierungsunabhängig, durch quantitative PCR anhand der nachgewiesenen 16S rRNA Gen Kopienzahlen bestimmt. Zusätzlich wurden zwei Untergruppen der Clostridien spezifisch quantifiziert: Die Gruppe „*Clostridium* Cluster XIVa“, die Clostridien mit Präferenz für Fäkalien erfasst und somit auch in den zu untersuchenden Probenmaterialien zu erwarten waren, sowie die Gruppe „*Clostridium* Cluster I“, die unter anderem viele medizinisch relevante Arten wie z.B. *C. botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium chauvoei* und *Clostridium perfringens* beinhaltet.

Die mikrobiologische Charakterisierung der in die Biogasreaktoren eingegebenen Substrate (Inputsubstrate) **in den Batchversuchen** ergab keine Beziehung der Populationsgrößen der beiden Clostridien Gruppen Cluster I und XIVa, sodass im Weiteren nur Cluster I einer detaillierteren Betrachtung unterzogen wurde. Für die Art der Substrate ergaben sich z.T. signifikant unterschiedlich große Anteile an *Clostridium* Cluster I mit den höchsten Gehalten in Schweinegülle ($25,2 \pm 37,9\%$) und geringen Anteilen in Rindergülle ($2,1 \pm 2,5\%$) und Hühnertrockenkot ($0,08 \pm 0,05\%$). Ja nach Herkunft unterschieden sich die Gehalte in den verschiedenen Input-Substratchargen stark voneinander. D.h. der Gehalt an *Clostridium* Cluster I, der in die Biogasanlage eingebracht wurde, war stark von den individuellen Substratchargen abhängig und kann nicht aufgrund der hier vorgenommenen Analysen für Voraussagen, wie hoch der Clostridien-Titer in bestimmten Substraten ist, verallgemeinert werden.

Die Ergebnisse der Batchversuche zeigten, dass es zu keiner Anreicherung von *Clostridium* Cluster I während der Biogasbildung aus den unterschiedlichen Substraten und Substratmischungen kam. Der Vergleich der Anteile, die sich während der Batchversuche einstellten zeigte, dass die Anteile an *Clostridium* Cluster I bei der Umsetzung von Rindergülle am geringsten waren, während die größten Anteile in den Ansätzen mit Zuckerrübe erfasst wurden. Zu bemerken ist, dass die größten Anteile an *Clostridium* Cluster I (bis zu $6,3 \pm 2,3\%$ bei Zuckerrübe mit 25% Masthähnchenkot) bei der Fermentation von Substraten auftraten, die selbst kaum *Clostridium* Cluster I beinhalteten, wie Zuckerrübe oder Hühnertrockenkot in denen der Anteil maximal $0,04 \pm 0,01\%$ betrug.

Die Charakterisierung der Bakteriengemeinschaften in den kontinuierlichen Fermentationsprozessen (Labor und Praxis) stützte sich auf die Hochdurchsatz Sequenzierung ribosomaler Markergene und deren taxonomischer Zuordnung. Hierbei wurden drei Substratmischungen verglichen: KI bestand aus Maissilage mit Hühnertrockenkot (HTK), KII aus Zuckerrübe mit HTK und KIII aus Maissilage mit Rindergülle- Für alle **quasikontinuierlichen Fermenter** lag der Anteil an Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* im Bereich der Nachweisgrenze. In den 18,3 Millionen Sequenzen der ribosomale Markergene von Bakterien wurden nur 101 Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. botulinum* identifiziert. Diese Sequenzen verteilen sich auf alle vier phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen aus denen diese Pseudo-Art besteht. Im zeitlichen Verlauf der Fermentation kam es bei keiner der drei unterschiedlichen Substratmischungen die getestet wurden zu einer signifikanten Zunahme dieser Sequenzgruppe. Die zusätzliche Substratgabe während einer absichtlich herbeigeführten

Überlastungsphase führte ebenfalls zu keinen Veränderungen. Der Vergleich der Abundanz von Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zur *C. botulinum* Gruppe während der Fermentation der unterschiedlichen Substratmischungen ergab für alle drei Mischungen vergleichbare Anteile, die im Durchschnitt $0,0003 \pm 0,0005\%$ betragen. Auch der Anteil an Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. perfringens* lag mit insgesamt 77 Sequenzen im Bereich der Nachweisgrenze. Sowohl während der Fermentation der drei unterschiedlichen Substratmischungen, als auch in der Überlastungsphase zeigte sich keine signifikante Zunahme dieser Sequenzen. Der Vergleich der unterschiedlichen Substratmischungen ergab ähnliche Anteile für die Mischungen mit Hühnertrockenkot (KI und KII; $0,0005 \pm 0,0006\%$), und für die Fermentation von Maissilage mit Rindergülle einen gegenüber Zuckerrübe und Hühnertrockenkot signifikant geringeren Anteil. Der Anteil von Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. tetani* war etwa 80-fach größer als der von *C. botulinum* oder *C. perfringens*. Während der Fermentation kam es bei keiner der drei Substratmischungen zu einer Zunahme des Anteils dieser Sequenzen. Im Gegenteil zeigte sich bei zwei der drei Substratmischungen sogar eine Reduktion. Die zusätzliche Substratgabe während der Überlastungsphase bewirkte in allen Ansätzen eine Reaktion: in den Fermentern mit HTK kam es zu einem Anstieg des Anteils gegenüber früheren Zeitpunkten, während es bei der Umsetzung mit Rindergülle zu einer weiteren Reduktion kam.

Nicht nur die Substratmenge, auch die Art der Substratmischung hatte einen Einfluss auf den Anteil der Sequenzen einer hohen Ähnlichkeit zu *C. tetani*: so war der Anteil bei der Fermentation von Maissilage mit Hühnertrockenkot am höchsten ($0,10 \pm 0,3\%$). Unter der Fermentation von Zuckerrübe mit Hühnertrockenkot reduzierte sich der Anteil auf $0,04 \pm 0,01\%$ und bei der Fermentation von Maissilage Rindergülle lag er bei $0,005 \pm 0,002\%$. Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. chauvoei* wurden während keiner der quasikontinuierlichen Fermentationen identifiziert.

Für die Charakterisierung der Bakteriengemeinschaften in den neun **Praxisanlagen** wurden aus 21 Proben 20,4 Millionen ribosomale Markergene identifiziert und taxonomisch bewertet. In allen untersuchten Materialien ließen sich ribosomale Markergene mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* nachweisen. Im Allgemeinen war der Anteil dieser Gruppe an den Bakterien insgesamt jedoch sehr gering und häufig im Bereich der Nachweisgrenze. In den 20 Millionen ribosomalen Markergenen der Bakterien fanden sich 623 Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum*. Eine differenzierte Betrachtung der vier phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen von *C. botulinum* ergab, dass die vier Gruppen verschieden stark in den Bakteriengemeinschaften vertreten waren. Am häufigsten waren Sequenzen, die sich der Gruppe I zuordnen ließen und in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden konnten (330 Sequenzen). Am zweit stärksten waren Sequenzen aus der Gruppe IV vertreten. Die Gruppe II war mit 50 Sequenzen deutlich seltener vorhanden. Die Gruppe III wurde nur in einem Material durch 2 Sequenzen angezeigt. Alle vier Gruppen zusammen trugen im Mittel mit $0,003 \pm 0,004\%$ zu den Bakteriensequenzen bei. Ein Vergleich der Anteile in den Hauptfermentern der Praxisanlagen zeigte zum Teil signifikante Unterschiede in den einzelnen Praxisanlagen auf. Ein ursächlicher Einfluss, der auf den Zusatz eines bestimmten Substrates zurückgeht war jedoch nicht erkennbar. Die separate Betrachtung jeder Biogasanlage für sich ergab, dass es zu keiner signifikanten Zunahme während der Fermentation kam, da sich die Anteile in Haupt- und Nachfermenter jeweils nicht

voneinander unterschieden. Ein Zusammenhang des Anteils von Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* und der Populationsgröße der Klasse *Clostridia* sowie von *Clostridium* Cluster I ließ sich nicht erkennen, sodass letztere Populationsgrößen keine Vorhersage des Anteils von *C. botulinum* ähnlichen Sequenzen erlauben.

Auch der Nachweis von ribosomalen Markergenen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. perfringens* erfolgte mit insgesamt 244 Sequenzen am unteren Ende der Nachweisgrenze in allen Biogasanlagen und lag im Mittel bei $0,001 \pm 0,001\%$. Zwischen den Anlagen gab es z.T. signifikante Unterschiede, jedoch kam es in keiner der Anlagen während der Fermentation zu einer signifikanten Zunahme des Anteils. In den Proben aus den Praxisanlagen wurden nur zwei Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. chauvoei* identifiziert. Wie auch bei den quasikontinuierlichen Versuchen war der Anteil ribosomaler Markergenen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. tetani* im Vergleich zu den zuvor betrachteten Clostridien mit 3066 Sequenzen häufiger und lag im Mittel bei $0,014 \pm 0,017\%$. Unterschiede im Gehalt traten sowohl zwischen den Anlagen, als auch innerhalb einer Anlage zwischen den verschiedenen Fermentern bzw. Behältern auf, sodass sich diese Gruppe als empfindlich gegenüber den verschiedenen Prozessbedingungen erwies.

Für die Gene der Neurotoxintypen BoNT A, B, E und F, die den phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen I und II von *C. botulinum* zugeordnet werden, wurde jeweils ein PCR-basierter spezifischer Nachweis durchgeführt. Durch positive Kontrollen konnte die Sensitivität der ausgewählten Nachweissysteme für die Toxin-Gene abgesichert werden. Alle Tests mit Fermenterproben der kontinuierlichen Prozesse (Labor und Praxis) für die vier Neurotoxin Typen fielen negativ aus, d.h. es ergab sich in keiner Probe ein Hinweis auf das Vorkommen von Toxin-Genen aus dem *C. botulinum* Artenkomplex. Dabei lagen die Nachweisgrenzen für die vier Neurotoxin Typen im Bereich von $< 0,3$ bis < 30 Genkopien ng^{-1} DNA.

Basierend auf den positiven Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchungen für das Vorkommen von 16S rRNA Genen aus dem *C. botulinum* Artenkomplex wurden von den Praxisanlagen P1 und P2 Substrate und ein Fermenterinhalt auf die Anwesenheit aktiven Botulinum Neurotoxins mittels Maus-Bioassay untersucht. Dabei wurden zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit auch Anreicherungskulturen aus den Proben überprüft. Alle untersuchten Materialien erwiesen sich als frei von solchen Toxinen.

2 Fazit

Ziel des Projektes war es, die Populationsgröße der Clostridien, sowie den Anteil potentiell pathogener Vertreter während der Biogasbildung zu beschreiben und mögliche Unterschiede im Prozess der Biogasbildung als Steuergröße für diese Population zu charakterisieren. Die Untersuchungen führen zu folgenden Ergebnissen und Erkenntnissen:

- Für die kultivierungsunabhängigen Untersuchungen der potentiell pathogenen Clostridien konnten erfolgreich synthetische Kontrollen erstellt werden. Durch dieses methodische Vorgehen bestand keine Notwendigkeit, die Arbeiten in einem biologischen Sicherheitslaboratorium (L2) durchführen zu müssen. Damit konnten die Populationsgröße von *Clostridium* Cluster I durch quantitative PCR bestimmt werden. Außerdem wurden Kontrollen für den Nachweis von Neurotoxin Gene von *C. botulinum* der Neurotoxintypen BoNT A, B, E und F etabliert, sodass bei einer negativen Nachweisreaktion die Funktionalität der Reaktion belegt werden konnte.
- Die Klasse *Clostridium* trugen mit $46 \pm 9\%$ als größte Gruppe zu den Bakterienpopulationen in allen untersuchten Biogasanlagen bei.
- Die Populationsgrößen bestimmter Gruppen wie *Clostridium* Cluster XIVa und Cluster I bzw. einzelner Arten wie *C. botulinum* standen in keinem Zusammenhang. Somit ergab sich aus der Gesamtpopulation der Clostridien keine Vorhersagbarkeit des Anteils bestimmter Gruppen von Clostridien z.B. von *C. botulinum*.
- Der Anteil an *Clostridium* Cluster I in den unterschiedlichen Substraten, die aus verschiedenen Biogasanlagen stammten, hing von der Art der Substrate und, insbesondere, von deren Herkunft ab.
- Insgesamt wurden fast 70 Millionen Rohsequenzen ribosomaler Markergene zur Charakterisierung der Bakteriengemeinschaften in kontinuierlichen Fermentationsprozessen (Labor und Praxis) erzeugt und taxonomisch ausgewertet.
- Der Nachweis von ribosomalen Markergenen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* ($\geq 97\%$) erfolgte in allen kontinuierlichen Prozessen im Bereich der Nachweisgrenze. Es ergaben sich Hinweise auf das Vorkommen von allen vier phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen des *C. botulinum* Arten-Komplexes, deren gemeinsamer Anteil in den Praxisanlagen bei $0,003 \pm 0,004\%$ lag. Eine Zunahme des Anteils während der Biogasbildung fand nicht statt.
- Obwohl es z.T. signifikante Unterschiede im Anteil ribosomalen Markergenen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* in den Hauptfermentern verschiedener Anlagen gab, konnte kein Bezug zur Verwendung einzelner Substratkomponenten wie Rindergülle, Schweinegülle oder Hühnertrockenkot hergestellt werden. Keines dieser Substrate hat damit ein besonderes Risiko.
- Der PCR geführte Nachweis für die Botulinum Neurotoxingene der Typen A, B, E und F, fiel in allen Fermenterproben der kontinuierlichen Prozesse (Labor und Praxis) negativ aus. Durch den Einsatz einer synthetische Kontrolle, die jeder Nachweisreaktion zugesetzt wurde, konnte ein negativer Befund, der auf einer Hemmung der Nachweisreaktion basierte, ausgeschlossen werden.

- Einzelne Proben der Biogasanlage P1 wurden für den Nachweis von aktiven Botulinum Neurotoxinen im Maus-Bioassay ausgewählt und erwiesen sich als frei von solchen Toxinen.
- Der Nachweis ribosomalen Markergenen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. perfringens* und *C. chauvoei* erfolgte im Bereich der Nachweisgrenzen.
- Der Anteil von ribosomalen Markergenen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. tetani* war in allen Fermentern höher, als der Anteil der anderen Clostridien und lag in den Praxisanlagen bei $0,014 \pm 0,017\%$. Der Anteil unterlag einer gewissen Dynamik. So gab es Unterschiede im Anteil in Abhängigkeit der zugesetzten Substratmenge und der Substratmischung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Projekts in einer bislang in anderen Untersuchungen noch nicht erreichten Empfindlichkeit, dass in Biogasanlagen eng verwandte Bakterien von *C. botulinum* in sehr geringer Abundanz regelmäßig vorkommen können, diese jedoch in den bisher untersuchten Fällen keine Botulinum-Toxine bilden können. Ein direkter Zusammenhang der Beigabe einzelner Substratkomponenten wie Rindergülle, Schweinegülle oder Hühnertrockenkot auf den Anteil dieser Sequenzen konnte nicht festgestellt werden.

3 Einleitung

Die Gewinnung von Biogas aus organischen landwirtschaftlichen Produkten und Abfällen hat in den vergangenen Jahrzehnten in vielen Ländern, darunter auch in Deutschland, an Bedeutung gewonnen. Die Bildung von Biogas erfolgt dabei durch eine vielfältig zusammengesetzte Gemeinschaft von Mikroorganismen, denen auch die Clostridien in erheblichem Umfang angehören können. Da es unter den Clostridien auch einige pathogene Arten, wie z.B. *C. botulinum*, den Erreger des Botulismus, gibt, ist es aus Gründen der Gesundheitsvorsorge notwendig, Clostridien die sich bei der Betreibung von Biogasanlagen eventuell vermehren könnten, genauer zu charakterisieren.

Zu Beginn dieser Studie wurde in der Öffentlichkeit über eine neuartige chronische Erkrankung bei Rindern und deren Bezug zu Biogasanlagen und darin möglicher Weise enthaltenen Verursachern von Botulismus, *C. botulinum* diskutiert. Es stellte sich die Frage ob, und wenn ja, unter welchen spezifischen Bedingungen derartig problematische Vertreter der Clostridien sich bei dem Betrieb von landwirtschaftlichen Biogasanlagen vermehren können und so potenziell die Gesundheit von Mensch und Tier gefährden würden.

Zur Beantwortung der folgenden Fragen wurden verschiedene Methoden zur Erfassung der Vielfalt (Diversität) von Bakterien und Clostridien-Gemeinschaften in Biogasanlagen auf ihre Eignung hin geprüft, optimiert und angewendet:

- Bedingen bestimmte Substrate wie sie in unterschiedlichen Regionen Niedersachsens eingesetzt werden besonders hohe Populationen an Clostridien? Von besonderem Interesse waren der Zusatz von Rindergülle oder Hühnertrockenkot. Welcher Variabilität unterliegt die Größe der Populationen in unterschiedlichen Substratchargen?
- Welcher Dynamik unterliegen diese Populationen im Langzeitversuch?
- Wie verhält sich die Population nach einer Störung im Fermenter?
- Wie sind die Populationsgrößen in Biogasanlagen der Praxis?
- Lässt sich *C. botulinum* anhand seiner charakteristischen Neurotoxin-Gene während der Biogasbildung nachweisen?
- Welche Botulinum-Neurotoxingene sind ggf. in den Gärsubstraten vorhanden und wie wirkt sich die Verwendung unterschiedlicher Substrate in landwirtschaftlichen Biogasanlagen auf deren Quantität im Fermenter-Inhalt aus?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden im Labor Batch-Versuche und quasikontinuierliche Gärversuche durchgeführt, sowie neun Praxisanlagen aus Niedersachsen untersucht. Ziel der Arbeit war, ein Risikopotential durch das Betreiben einer Biogasanlage für Mensch und Tier im Hinblick auf ein unbeabsichtigtes Vorkommen von pathogenen Clostridien ableiten zu können.

Der methodisch entscheidende Schritt der in diesem Vorhaben eingesetzten mikrobiologischen Methoden bestand darin, kultivierungsunabhängige, molekulare Nachweisverfahren einzusetzen. Klassische mikrobiologische Verfahren beruhen darauf, dass Bakterien unter bestimmten Bedingungen

selektiv auf Nährmedien vermehrt und damit nachgewiesen werden. Diese Verfahren haben Nachteile: 1. Es müssen für jede spezifische Bakteriengruppe charakteristische Anreicherungsmedien eingesetzt werden, wobei Anreicherungen unter anaeroben Bedingungen besonders Zeit und Materialaufwändig sein können; 2. Für den Nachweis pathogener Bakterien durch Kultivierung sind erhebliche Sicherheitsanforderungen im Labor und besonders geschultes Personal notwendig; 3. Kultivierungsnachweise sind häufig nicht quantitativ zuverlässig, d.h. die Anzahl der nachgewiesenen Bakterien korreliert nicht unbedingt mit der Anzahl der in einer Umweltprobe tatsächlich vorhandenen.

Kultivierungsunabhängige Methoden sind hier eindeutig im Vorteil: Die Nukleinsäuren der Bakteriengemeinschaften aus einer Umweltprobe werden direkt extrahiert und aus dem Gemisch der extrahierten genetischen Information (DNA) werden mit PCR gezielt nicht die Organismen, sondern lediglich ausgewählte Markergene nachgewiesen. Diese Verfahren haben kein Sicherheitsrisiko, da die Produkte nicht vermehrungsfähig sind. Die relevanten Markergene für die Untersuchungen in diesem Vorhaben waren zum einen die 16S rRNA Gene und zum anderen Gene, die für Botulinum-Toxine kodieren. Diese können gezielt mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) aus der direkt extrahierten DNA als PCR-Produkte (Amplikons) gewonnen werden. Über die Sequenzierung dieser Amplikons lassen sich alle Bakterien (und auch andere Organismen) im Hinblick auf ihre Identität (taxonomische Zugehörigkeit) erfassen und über bioinformatische Analysen charakterisieren. Dies geschieht nach der Sequenzierung der DNA, die heute dank der enormen Möglichkeiten der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierungen mit extrem hoher Effizienz kostengünstig erfolgen kann.

Der Nachteil der molekularen Verfahren mit 16S rRNA Genen besteht darin, dass sie häufig nicht direkt pathogene Organismen nachweisen können, denn die pathogenitäts-verursachenden Gene können bei manchen Arten vorhanden sein oder nicht. Daher ist zur Absicherung von Proben mit Verdachtsfällen ein weiterer Test notwendig: Proben mit höchsten Sequenz-Abundanzen von möglicherweise pathogenen Bakterien können z.B. für *Clostridium botulinum* (siehe auch 3.1) im Mäusetoxizitätstests direkt und nach Anreicherungskultivierung überprüft werden. Durch die Hochdurchsatz DNA Sequenzierung von 16S rRNA Gen PCR Produkten können pathogene Bakterien nicht direkt nachgewiesen werden. Jedoch ist nur so die gesamte Bakterienvielfalt aus einem komplexen Substrat wie es aus Biogasanlagen realistisch darstellbar. Über phylogenetische Analysen lassen sich so Hinweise auf potentiell pathogene Bakterien gewinnen, um damit gegebenenfalls verdächtige Proben für weitere diagnostische Verfahren auswählen zu können. Mit der Vorschaltung der hier beschriebenen DNA Analysen kann so auch der Einsatz von Tierversuchen zur Untersuchung von Umweltproben auf ein ethisch vertretbares Minimum eingeschränkt werden.

3.1 Stand des Wissens

Die Biogasproduktion erfolgt unter anaeroben Bedingungen durch eine vielfältig zusammengesetzte Gemeinschaft von Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und Archaeen. Einen natürlichen Teil dieser Gemeinschaft bilden die Clostridien - sie hydrolysieren komplexe Verbindungen und liefern so

Substrate für die methanogenen Archaeen, die einzigen Mikroorganismen, die in der Lage sind, die entscheidende Komponente im Biogas, das Methan, zu bilden. Die Clostridien vermehren sich nur unter anaeroben Bedingungen und sind in der Lage für sie ungünstige Bedingungen als Endosporen zu überleben. Im Gegensatz zu den vegetativen Zellen sind Endosporen unempfindlich gegenüber Sauerstoff. Tatsächlich sind Endosporen von Clostridien überall in der Umwelt vorhanden und können deshalb auch mit den Substraten in die Biogasanlagen eingebracht werden. Da es unter den Clostridien nicht nur harmlose sondern auch wichtige krankheitserregende Arten gibt, bedarf es einer differenzierten Betrachtung der an der Biogasproduktion beteiligten Arten.

Historisch bedingt umfasst der Gattungsname „*Clostridium*“ viele Arten, die nach neueren, molekularbiologischen Untersuchungen ihrer verwandtschaftlichen Beziehung, nicht der Gattung *Clostridium* zuzuordnen sind. Mehr als die Hälfte der Arten, die den Namen „*Clostridium*“ tragen sind kein *Clostridium*. Um die tatsächlichen miteinander verwandten Clostridium-Arten zu bezeichnen wurde für sie der Begriff „*Clostridium* Cluster I“ geprägt. Zu den Clostridien im Cluster I gehören neben vielen harmlosen Vertretern auch medizinisch wichtige Arten wie z.B. *Clostridium tetani*, der Erreger des Wundstarrkrampfes, *Clostridium perfringens* der Verursacher des Gasbrands, *Clostridium chauvoei*, der Erreger des Rauschbrandes und *C. botulinum*, auf den der Botulismus zurückzuführen ist. Im Rahmen dieser Studie wurden daher die Clostridien des Cluster I differenzierend untersucht.

C. botulinum verursacht Botulismus, die so genannte Wurst- und Fleischvergiftung, eine ernste aber verhältnismäßig seltene Krankheit. Botulismus der klassischen Form ist eine Vergiftung, die durch den Verzehr von Lebensmitteln, die mit Botulinum Toxin (BoNT) kontaminiert sind, verursacht wird (lebensmittelbedingter Botulismus). Hingegen kommt es beim Wundbotulismus und beim Säuglingsbotulismus zu einer Infektion der Wunde bzw. zu einer Besiedlung des Magen-Darmtraktes mit *C. botulinum* und infolge einer Toxinproduktion innerhalb des Körpers zu einer Vergiftung (Caya et al., 2004). Auch bei landwirtschaftlichen Nutztieren wie Rindern (Böhnel et al., 2001) und Pferden (Johnson et al., 2010) tritt Botulismus auf. Das von *C. botulinum* produzierte Gift gilt als das stärkste bekannte biologische Gift überhaupt (Caya et al., 2004). Es unterbindet die Erregungsübertragung von den Nervenzellen zu den Muskeln und führt so zu einer Lähmung, da die Muskelkontraktion verhindert wird (schlaffe Lähmung). In allen Fällen ist Botulismus eine Vergiftung und keine ansteckende Krankheit.

Unter dem Namen *C. botulinum* ist eine heterogene Gruppe von Bakterien zusammengefasst, die aufgrund der Fähigkeit ein Botulismus verursachendes Neurotoxin zu bilden vereint sind (Collins and East, 1998). Es werden sieben Varianten des Neurotoxins unterschieden, die mit den Buchstaben A bis G bezeichnet werden. In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass Botulismus beim Menschen durch Toxine der Typen A, B, E und seltener durch F verursacht wurde und dass die Toxine der Typen C, D und E in Zusammenhang zu Botulismus bei Tieren stehen (CDC; 1998). Für das Neurotoxin vom Typ G, das sich nur in Gruppe IV findet, ist die Pathogenität nicht belegt (Food and Drug Administration, 2012). Die Gene zur Toxinproduktion der Typen A, B und F sind chromosomal kodiert, die der Typen C, D und E auf Bakteriophagen und die Gene zur Synthese von Toxin Typ G sind auf Plasmiden lokalisiert (Caya et al., 2004).

Da alle Botulinum-Neurotoxin bildenden Clostridien als *C. botulinum* benannt wurden, vereint dieser Name Mikroorganismen mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften, die sich in folgende vier Gruppen aufteilen lassen: Die Gruppe I beinhaltet alle Stämme, die Toxin des Typs A bilden und die proteolytischen Stämme, die die Toxine B oder F produzieren. Die Gruppe II umschließt alle Stämme, die Toxin Typ E produzieren und die nicht-proteolytischen Stämme, die die Toxine B oder F produzieren. Die Stämme der Gruppe III sind nicht-proteolytisch und bilden die Toxine C oder D. Und die Stämme, die Toxin vom Typ G produzieren sind der Gruppe IV zugeordnet. Diese, auf Grund phänotypischer Unterschiede erstellte Gruppierung spiegelt sich auch in der tatsächlichen Verwandtschaft (Phylogenie), basierend auf den 16S rRNA Genen, wider (Collins and East, 1998) (Abbildung 1). Dabei zeigt sich, dass es sich bei *C. botulinum* tatsächlich nicht um eine, sondern um mehrere Arten, d.h. einen Artenkomplex handelt.

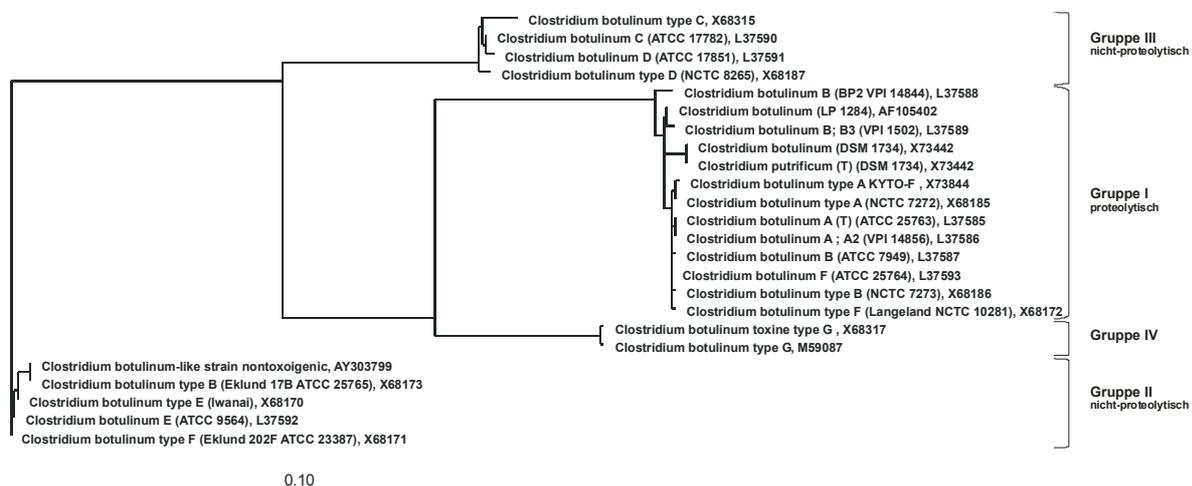


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum zur Darstellung der unterschiedlichen Positionen von *C. botulinum* der Gruppen I bis IV

Das Gen für die 16S rRNA ist ein gebräuchlicher Marker um Bakterien zu identifizieren. Im Falle von *C. botulinum* ist ein Nachweis alleine anhand der 16S rRNA jedoch nicht möglich, da von der Ähnlichkeit der 16S rRNA nicht auf eine mögliche Pathogenität geschlossen werden kann. Denn pathogene und nicht-pathogene Stämme können sehr eng mit einander verwandt sein. So finden sich in der Gruppe II sowohl Botulismus verursachende Stämme als auch nicht-pathogene Stämme (Abbildung 1). Zusätzlich wurden Neurotoxin-Gene auch in einzelnen Stämmen von *Clostridium baratii* und *Clostridium butyricum* nachgewiesen (Harvey et al., 2002; Paisley et al., 1995), Arten, die sich aufgrund der 16S rRNA von *C. botulinum* eindeutig unterscheiden.

Daher bietet es sich an, den Nachweis von neurotoxinbildenden Clostridien an deren Pathogenität zu koppeln. Im klassischen Verfahren wird das aktive Neurotoxin im Mäusetoxizitätstest nachgewiesen.

Dieser Toxin Nachweis im Tierversuch mit Mäusen ist bis heute die Referenzmethode. Da der Toxin Nachweis im Tierversuch jedoch ethisch bedenklich und auch zeit- und kostenintensiv ist, ist er nicht zur Analyse zahlreicher Umweltproben ohne Verdachtsmoment akzeptabel.

Statt des aktiven Toxins im Tierversuch können die zur Toxinsynthese notwendigen Gene nachgewiesen werden und als ein Indikator für die Präsenz neurotoxinbildender Clostridien dienen. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden können die Neurotoxin-Gene in einer PCR vervielfältigt und anschließend nachgewiesen werden. Dieser Nachweis ermöglicht auch eine Beurteilung von Proben, in denen aufgrund des physiologischen Zustandes der Zelle (z.B. Sporen) keine Toxinsynthese stattfindet.

Zahlreiche PCR-basierende Methoden wurden in den letzten Jahren entwickelt, um die verschiedenen Toxintypen in unterschiedlichstem Probenmaterial nachzuweisen (Craven et al., 2002; Dahlenborg et al., 2001; Fach et al., 2002; Lindström et al., 2001; Takeshi et al., 1996; Williamson et al., 1999). Darunter auch quantitative PCR Methoden mit deren Hilfe die Anzahl der Toxin Gene in einer Probe bestimmt werden kann (Kimura et al., 2001); ein Ergebnis, das der Mäusetoxizitätstest nicht leisten kann. So ermöglichen Analysen mit quantitativer PCR eine Aussage darüber, ob sich die Anzahl an Toxin-Genen während eines Prozesses verändert.

Diese PCR-basierten Methoden eröffnen daher die Möglichkeit, eine große Menge an Proben ohne die Durchführung von Tierversuchen zu untersuchen.

4 Material und Methoden

4.1 Methoden zur chemischen Charakterisierung

Im folgenden Kapitel werden Analysenmethoden vorgestellt, die zur Charakterisierung der Inputsubstrate sowie des Prozessverlaufs in den Batch- und quasikontinuierlichen Versuchen angewandt wurden. Ebenso wurden diese Analysen für die Untersuchung der Proben aus Praxisanlagen genutzt.

4.1.1 Bestimmung des Trockensubstanz und der organischen Trockensubstanz

Die Bestimmung der Trockensubstanz (TS) wurde nach DIN EN 12 880 durchgeführt. Hierzu wurde die eingewogene Probe (m_{feucht}) bei 105°C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das getrocknete Material wurde ausgewogen (m_{trocken}). Der Trockensubstanzgehalt wurde nach Gleichung 1 berechnet (DIN EN 12880:2001-02).

$$TS [\% FS] = \frac{(m_{\text{trocken}} - m_{\text{tara}})}{(m_{\text{feucht}} - m_{\text{tara}})} \times 100 \quad \text{Gleichung 1}$$

Zieht man den anorganischen Trockensubstanzgehalt (aTS) von der Trockensubstanz ab, erhält man nach Gleichung 2 die organische Trockensubstanz (oTS). Diese gibt Auskunft über den vergärbaren Anteil des Substrates. Zur Bestimmung der oTS wurde das getrocknete und gemahlene Probenmaterial in einem Muffelofen (Fa. Nabertherm) bei 550°C verglüht. Die Analyse erfolgt nach DIN EN 12 879 (DIN EN 12879:2001-02).

$$oTS [\% TS] = TS - aTS \quad \text{Gleichung 2}$$

4.1.2 Bestimmung des FOS/TAC-Wertes

Der FOS/TAC-Wert ist der Quotient der Menge an flüchtigen organischen Säuren (FOS) und dem anorganischen Gesamtkohlenstoff (Total anorganic carbon = TAC). Er gibt Auskunft über die Prozessstabilität in einem Biogasfermenter. Er wurde anhand von Gleichung 3 berechnet. Der FOS/TAC-Wert wurde am Tag der Probennahme ermittelt, um Lagerungseffekte auf das Ergebnis auszuschließen. Untersuchungen zu Lagerungseffekten des Carbonatpuffersystems von M. Hecht (2008) bestätigen dies.

$$FOS/TAC = \frac{FOS}{TAC} \quad \text{Gleichung 3}$$

Der FOS/TAC-Wert wurde mittels Titration bestimmt. Hierfür wurde die Fermenterprobe zentrifugiert und 5 ml Überstand mit 15 ml destilliertem Wasser in ein Becherglas pipettiert. Aus dieser Mischung wurde der Start-pH ermittelt (DIN EN 15933:2012-11) und mit 0,5 molarer Schwefelsäure (H₂SO₄) mittels einer Schnellbetriebsbürette bis zu einem pH-Wert von 5,0 (TAC) und dann weiter bis zu einem pH-Wert von 4,4 (FOS) titriert. Nach Erreichen des jeweiligen pH-Wertes wurde die Menge an verbrauchter Säure abgelesen und in ein Formblatt übertragen. Anhand der Gleichungen 4 und 5 wurden aus den verbrauchten Mengen an Säure die FOS- und TAC-Werte in mg/l errechnet. Die Messung wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Aus den berechneten Werten wurde dann der Mittelwert gebildet (Fritz; 2008).

$$TAC [mg/l] = m_{\text{Säure } 5,0} \times 250 \times Vf \quad \text{Gleichung 4}$$

$$FOS [mg/l] = ((m_{\text{Säure } 4,4} \times 1,66 \times Vf) - 0,15) \times 500 \quad \text{Gleichung 5}$$

Vf=Verdünnungsfaktor = 4

m_{Säure 5,0}= Verbrauch Säure bei der Titration auf pH-Wert 5,0

m_{Säure 4,4}= Verbrauch Säure bei der Titration von pH 5,0 auf pH 4,4

4.1.3 Bestimmung des Ammonium-Stickstoffes (NH₄-N)

Die Bestimmung des Ammoniumstickstoffgehaltes erfolgte nach DIN 38406 Teil 5 mittels fotometrischer Bestimmung. Die Fermenterprobe wurde 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der dekantierte Überstand nochmals 10 min bei gleicher Umdrehung. Der Überstand wurde mittels Membranfilter

(Porengröße 45 µm) filtriert. Dem Filtrat wurden 0,8 ml Salicylat-Citrat-Lösung und 0,8 ml Reagenzlösung zu pipettiert und auf 10 ml Gesamtvolumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Bei hohen NH₄ Konzentrationen mussten die Proben mit Natronlauge (10 mol/l) verdünnt werden. Anschließend wurden die Proben zusammen mit den Referenz- und Kontrollproben im Photometer gemessen. (DIN 38406-5:1983-10).

4.1.4 Bestimmung der Carbonsäuren (C2 - C6)

Das Säurespektrum umfasst die Carbonsäuren Essigsäure bis Capronsäure. Die Menge der einzelnen Säuren gibt Auskunft über den Substratabbau und somit über den Zustand des biologischen Prozesses in einer Biogasanlage. So weisen erhöhte Konzentrationen einzelner oder mehrerer Säuren auf eine Störung des Biogasprozesses hin. Die höheren flüchtigen Fettsäuren wie Buttersäure können ebenfalls ab einer gewissen Konzentration hemmend auf die Methanbildung wirken (FNR, 2010).

Das Säurespektrum wurde durch Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC/UV-Anlage UltiMate 3000, Fa. Dionex) gemessen. Hierfür wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorf-Gefäß filtriert. Die filtrierten Proben wurden mit 30 mM Methylsulfonsäure angesäuert. Die vorbereiteten Proben wurden dann zur Messung in den Autosampler des HPLC-Gerätes gestellt und der Messvorgang wurde gestartet (Feher, 2010).

4.1.5 Bestimmung des pH-Werts

Der pH-Wert wurde nach DIN EN 15933 mit einer Glaselektrode direkt in der flüssigen Probe gemessen. Der pH- Wert dient zur Überprüfung der Prozessstabilität im Gärbehälter. Der optimale Bereich liegt zwischen einem pH-Wert von 7,5 und 8. Bei den Proben aus den Batchversuchen sowie aus den Praxisanlagen wurde der pH-Wert mit einem Handmessgerät gemessen. Dazu wurde zu Beginn der Messung mit den Standardlösungen pH 4 und pH 9 kalibriert und dann an der Originalprobe der pH-Wert ermittelt. Bei den quasikontinuierlichen Versuchen wurde der pH-Wert über eine fest im Fermenter installierte Glaselektrode ermittelt und stündlich aufgezeichnet (DIN EN 15933:2012-11).

4.1.6 Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit

Für die Messung der Leitfähigkeit wurde ein Elektrodenpaar das in einen Messstab integriert war, eingesetzt. Die Flächen der einzelnen Elektroden und deren Abstand zueinander waren genau bekannt. Mit Hilfe einer Bezugslösung mit bekannter Leitfähigkeit wurde die Zellkonstante dieser Leitfähigkeitsmesszelle bestimmt, die bei den Bestimmungen berücksichtigt wurde. Das Leitfähigkeitsmessgerät wurde nach Kalibrierung in die Originalprobe eingetaucht. Der angezeigte Wert wurde abgelesen und in ein Formblatt übertragen (Zelinski, 2013).

4.1.7 Bestimmung der Elemente C und N

Die eingesetzten Inputsubstrate wurden mit einem Elementanalysator Vario EL (Fa. Elementar) auf ihre Kohlenstoff (C) und Stickstoff (N) Gehalte untersucht. Hierzu wurden 10 mg der getrockneten und gemahlten Probe in ein Zinnschiffchen eingewogen. Die Analyse wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Zinnschiffchen wurden bei 950°C verbrannt. Die entstandenen Stickoxide wurden im nachgeschalteten Reduktionsrohr zu Stickstoff reduziert. Das entstandene Gasgemisch wurde einem Trenn- und Messsystem zugeführt. Eine Software berechnete die Elementgehalte für C, H und N.

4.1.8 Bestimmung der Nährstoffe

In diesem Projekt wurden die, für den Biogasprozess wichtigen Makro- und Mikronährstoffe in den Inputsubstraten und auch in den Fermenter- und Nachgärerproben bestimmt.

Die Nährstoffe Natrium (Na), Kalium (K), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Mangan (Mn), und Eisen (Fe) wurden durch Flammen-Atomabsorptionsspektroskopie (F-AAS) quantitativ bestimmt. Dazu wurde die Probe aufgeschlossen und im SpectrAA 110 gemessen. Dieser Teil ist proportional zur Analytkonzentration, wodurch sich die Konzentration des jeweiligen Nährstoffs ermittelt ließ.

Die Nährstoffe Kupfer (Cu), Molybdän (Mo), Cobalt (Co) und Nickel (Ni), Zink (Zn) wurden mit Gas-Atomabsorptionsspektroskopie (G-AAS) bestimmt. Selen wurde nach DIN EN ISO 17294-2 analysiert.

4.2 Methoden zur mikrobiologischen Charakterisierung

In diesem Projekt erfolgt die Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaften ausnahmslos kultivierungsunabhängig anhand der vorhandenen DNA (Erbinformation). Dazu wird die DNA aller Mikroorganismen (Metagenom), die sich in einer Substrat- oder Gärprobe befinden, entsprechend der Methode von Dohrmann *et al.* (Dohrmann *et al.*, 2011) gewonnen und auf das Vorkommen bestimmter Markergene untersucht. Der Nachweis einzelner Gene erfolgt spezifisch durch die PCR.

4.2.1 Quantifizierung der mikrobiellen Gemeinschaft

Die Populationsgrößen von *Archaea* und *Bacteria* wurden durch quantitative PCR anhand der Kopienzahlen von 16S rRNA Genen bestimmt (Yu *et al.*, 2005). Zwei Untergruppen der Clostridien wurden zur gezielten Quantifizierung ausgewählt (Rinttilä *et al.*, 2004): Die Gruppe „*Clostridium* Cluster XIVa“ erfasst Clostridien, die mehrfach in Fäkalien nachgewiesen wurden und somit auch in den zu untersuchenden Probenmaterialien zu erwarten waren. Die zweite Untergruppe „*Clostridium* Cluster I“ umfasst unter anderem auch viele der medizinisch relevanten Arten wie z.B. *C. botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium chauvoei* und *Clostridium perfringens*. Viele dieser Bakterienstämme unterliegen einer erhöhten Sicherheitsstufe für den Umgang, sodass deren Erbsubstanz als Positivkontrolle der Nachweisreaktion nicht frei verfügbar ist. Darum wurde für die Quantifizierung der letzten Gruppe ein DNA-Standard entwickelt, der auf einem Stück synthetischer DNA basiert, das der DNA von *Clostridium perfringens* ATCC 13124 entspricht.

4.2.2 Gruppenspezifische Hochdurchsatzsequenzierung zur Darstellung der Vielfalt innerhalb *Clostridium* Cluster I

Die Darstellung der Vielfalt unterschiedlicher Arten innerhalb von *Clostridium* Cluster I sollte mit der Fingerprintmethode T-RFLP (engl. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) erfolgen, da letztere Methode den gleichzeitigen Vergleich einer großen Anzahl an Proben erlaubt. Ein entsprechendes System zur Darstellung der Vielfalt unterschiedlicher Arten innerhalb von *Clostridium* Cluster I wurde an Proben einer ausgewählten Praxisanlage exemplarisch getestet. Da die erzielten Ergebnisse in ihrer Aussagekraft nicht den zuvor erfolgten theoretischen Berechnungen entsprachen, wurden diese Untersuchungen zurückgestellt. Alternativ, wurde eine *Clostridium* Cluster I-spezifische Hochdurchsatzsequenzierung mit der Roche GS FLX+ (454) Sequenzierertechnologie gewählt. Die vorbereitenden Arbeiten für diese Hochdurchsatzsequenzierung gestalteten sich technisch problematisch und zeitintensiv. Zum einen lieferte die Synthese der notwendigen DNA-Stücke nur eine geringe Menge geeigneten Materials, da die Zielpopulation *Clostridium* Cluster I nur einen kleinen Anteil der Gesamtpopulation ausmachte. Zum anderen zerbrach ein Großteil der generierten DNA-Stücke und war so für die Sequenzierung unbrauchbar. Sie konnten jedoch nach verschiedenen Optimierungen erfolgreich abgeschlossen werden. Die Hochdurchsatzsequenzierung lieferte ein gutes Ergebnis und ermöglichte eine hoch empfindliche, tiefe Charakterisierung der Gemeinschaft von *Clostridium* Cluster I, da neben der Vielfalt auch die jeweilige Abundanz bestimmt werden konnte.

4.2.3 Universelle Hochdurchsatzsequenzierung

Zur Darstellung der mikrobiellen Vielfalt in allen Praxisanlagen und den quasikontinuierlichen Versuchen wurde eine universelle Art der Hochdurchsatzsequenzierung gewählt, die sowohl die Vielfalt der *Archaea* und der *Bacteria* erfasst (Li *et al.*, 2014). Dieses Vorgehen schließt auch die Analyse von *Clostridium* Cluster I ein, die für eine tiefergehende Analyse gezielt aus dem Datensatz gefiltert werden konnten. Für die Hochdurchsatzsequenzierung wurde die Illumina MiSeq Technologie gewählt, die in einem Lauf gleichzeitig bis zu 10 Millionen Sequenzen erzielt; dies sind 10-mal mehr Sequenzen als die 454 Technologie ermöglicht.

4.2.4 Detektion von ribosomalen Markergenen mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zu potentiell pathogenen Clostridien

Die Vorgehensweise zur Identifikation von Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu ribosomalen Markergenen von potentiell pathogenen *Clostridium* Spezies ist detailliert in der Veröffentlichung von Dohrmann *et al.* (Dohrmann *et al.*, 2015) dargelegt. Kurzgefasst wurden Sequenzen identifiziert, deren Ähnlichkeit zu ausgewählten repräsentativen Sequenzen $\geq 97\%$ Sequenzidentität betrug. Als Referenzsequenzen dienten für *Clostridium botulinum* Gruppe I die Sequenzen X68185, X68186, L37593, L37585 und X73442. Für *C. botulinum* Gruppe II: X68171 und X68173. Für *C. botulinum* Gruppe III: X68187 und X68315. Für *C. botulinum* Gruppe IV: X68316 und M59087. Für *Clostridium tetani*: X74770, für *Clostridium perfringens*: M59103 und für *Clostridium chauvoei*: U51843.

4.2.5 Nachweis von Botulinum Neurotoxin Genen

Für den gezielten Nachweis der sieben unterschiedlichen Botulinum Neurotoxine (BoNT, Typen A, B, C, D, E, F, G) wurde eine Datenbank mit mehr als 200 Gensequenzen erstellt. Anhand dieser Datenbank wurde die Spezifität bereits veröffentlichter Nachweissysteme für die unterschiedlichen BoNT-Gene überprüft und für jeden der Neurotoxintypen zwei Nachweissysteme ausgewählt. Für eine besonders hohe Empfindlichkeit des Nachweises wurden die Reaktionen so gewählt, dass sie miteinander gekoppelt werden konnten (Nested PCR). Allgemein liegt die Empfindlichkeit einer einzelnen Reaktion bei ca. 100-1000 Genkopien in der Nachweisreaktion. Durch eine zweite nachgeschaltete Reaktion konnte die Empfindlichkeit unter diese Schwelle gesenkt werden. Begleitend wurde für jede einzelne Nachweisreaktion eine synthetische Kontrolle konstruiert. Hierdurch war es nicht erforderlich, die DNA aus dem pathogenen *C. botulinum* zu gewinnen. Durch dieses methodische Vorgehen bestand keine Notwendigkeit, die Arbeiten in einem biologischen Sicherheitslaboratorium (L2) durchführen zu müssen. Für die Nachweissysteme der Neurotoxintypen BoNT A, B, E und F, die auf der Veröffentlichung von Fach *et al.* (Fach *et al.*, 2002) basieren, konnten entsprechende Kontrollen erfolgreich etabliert werden und im Nested PCR Verfahren eingesetzt werden. Das gewählte Nachweissystem für BoNT C eignete letztendlich sich nicht für das Nested PCR Verfahren, da die synthetische Kontrolle in der zweiten PCR ein unspezifisches Produkt erzeugte, welches sich nicht von dem Produkt des Zielgens unterscheiden ließ. Die Nested PCR Systeme zum Nachweis von BoNT-Genen der Typen A, B, E und F konnte erfolgreich etabliert werden und alle Fermenterproben der quasikontinuierlichen Versuche sowie der Praxisanlagen wurden analysiert. Dabei lag die Nachweisgrenze für BoNT A und E bei je $< 0,3$ Genkopien ng^{-1} DNA und für BoNT F bei < 3 Genkopien ng^{-1} DNA. Für BoNT B lag die Nachweisgrenze in den Proben der Praxisanlagen bei < 3 Genkopien ng^{-1} DNA und bei < 30 Genkopien ng^{-1} DNA bei den Proben aus den quasikontinuierlichen Versuchen.

4.2.6 Nachweis von aktiven Botulinum Neurotoxinen

Der Nachweis von aktiven Botulinum Neurotoxinen erfolgte im Maus-Bioassay. Dafür wurden anhand der Ergebnisse aus den molekularbiologischen Untersuchungen einzelne Proben gezielt ausgewählt und dann durch ein für Tierversuche autorisiertes Labor analysiert (RIPAC-Labor GmbH, Potsdam).

4.3 Aufbau der Batchversuche

Zu Beginn des Projekts wurden sechs Gasertragstests im Batchansatz durchgeführt. Der erste Batchansatz wurde mit einer Laufzeit von 35 Tagen angesetzt. Die Batchbehälter wurden wöchentlich beprobt sowie chemisch und mikrobiologisch analysiert. Anhand des Bakterienwachstums konnte der Versuchszeitraum für die Batchversuche II-VI von 35 Tage auf 21 Tage eingegrenzt werden. Anhand der Untersuchung verschiedener Substrate im Batchsystem wurden die Substrate mit hohen *Clostridium* Cluster I - Populationen ausgewählt, die im quasikontinuierlichen Verfahren weitergehend analysiert wurden.

Für die Batchversuche wurden 30 L-Fässer, die mit einem Probennahmehahn und einem Gasanschluss versehen waren, mit Wasser, Impfschutt und den zu untersuchenden Substraten befüllt und in einer Klimakammer mit 38°C aufgestellt (Abbildungen 2 und 3). Die Batchversuche wurden in Anlehnung an die VDI-Norm 4630 durchgeführt. Je Batchansatz wurden drei Substrate in Dreifach-Wiederholung angesetzt. Zur Charakterisierung der eingesetzten Substrate und ihrer Vergleichbarkeit wurde an jedem Substrat der Trockensubstanzgehalt (TS) sowie die organische Trockensubstanz (oTS) bestimmt.



Abbildung 2:
Klimakammer mit Batchbehältern und Gassäcken



Abbildung 3:
Batchbehälter mit Probennahmehahn

Für die Batchversuche I bis III wurde von drei verschiedenen Biogasanlagen Maissilage (MS), Rindergülle (RG) und Schweinegülle (SG) bezogen, um die Heterogenität der Bakteriengemeinschaft innerhalb des jeweiligen Substrats zu untersuchen. Basierend auf diesen Ergebnissen (vgl. Kap.5.1.1) wurden zwei verschiedene Proben von Hühnertrockenkot (HTK) mit Maissilage oder Zuckerrübe (ZR) in Batchversuchen angesetzt und charakterisiert. Im Batchversuch IV wurde das Substrat Getreideganzpflanzensilage (GPS) vergoren, da GPS durch seinen dichteren Bestand und die Erntetechnik vermehrt Clostridien durch Erdanhang und Wildtierkadaver beinhalten kann (Schröder, 2009). Mit diesem Batchversuch wurde untersucht, ob sich die Bakteriengruppen von GPS deutlich von denen einer Maissilage unterscheiden und ob pathogene Clostridien auftreten könnten. In Batchansatz VI wurde schnell abbaubare Zuckerrübe mit HTK kombiniert. Die Substrate ergänzen sich in ihren Abbaueigenschaften sehr gut und werden in der Praxis in dieser Kombination eingesetzt. Der durchgeführte Versuchsplan ist in Tabelle 1 dargestellt.

Die Durchführung der Batchversuche fand in Anlehnung an VDI 4630 statt. Der TS-Gehalt in den Batchbehältern wurde aufgrund der Rührbarkeit auf 4% eingestellt. Von dem oTS-Verhältnis von Substrat zu Impfschlamm von 0,5 wurde bei Rinder- und Schweinegülle abgewichen. Das Verhältnis wurde auf 1 gesetzt. Das Impfschutt wurde nicht ausgehungert, da die Mikrobiologie der letzten aktiven Stufe der Spenderbiogasanlage unverändert eingesetzt werden sollte. Außerdem spielten die Gaserträge bei der Fragestellung nur eine untergeordnete Rolle. Die Versuche I-IV wurden in Dreifach-Wiederholung, Ansatz V und VI in Zweifach-Wiederholung durchgeführt. In Abhängigkeit von den

eingesetzten Substraten können hohe H₂S-Gehalte entstehen. Zur Bindung des entstehenden H₂S während der Versuchsdurchführung wurde ein Eisenhydroxidpräparat der Firma HeGo Biotech GmbH eingesetzt.

Als Impfsubstrat für die Batchversuche wurde Nachgärermaterial aus einer Biogasanlage eingesetzt, welche mit Maissilage, Ganzpflanzensilage (GPS) und Rindergülle betrieben wurde. Es wurde Material aus der letzten aktiven Vergärungsstufe verwendet. Die Biogasanlage ließ vor und während des Versuchszeitraumes regelmäßig gängige Prozessparameter analysieren.

Tabelle 1: Versuchsplan der Batchversuche I bis VI

| Batchversuch | Substrate | Wdh je Probe | Laufzeit [Tage] |
|--------------|--------------------------|--------------|-----------------|
| B I | MS I, RG I, SG I | 3 | 35 |
| B II | MS II, RG II, SG II | 3 | 21 |
| B III | MS III, RG III, SG III | 3 | 21 |
| B IV | GPS, MS IV, RG IV, SG IV | 3 | 21 |
| B V | MS V, HTK I, HTK II | 2 | 21 |
| B VI | ZR, HTKII | 2 | 21 |

4.3.1 Gasqualität und – quantität im Laborversuch

Die Gasqualität und die entstandene Gasmenge geben zum einen Auskunft über die Qualität des eingesetzten Ausgangssubstrates und zum anderen über den Prozessverlauf. Deshalb wurden Zusammensetzung und Menge des gebildeten Biogases arbeitstäglich analysiert. Die Zusammensetzung des Biogases wurde mit Hilfe eines Infrarot-Messgeräts (visit 03, Messtechnik EHEIM GmbH) gemessen. Es werden CH₄-, CO₂-, H₂-, H₂S- und O₂-Gehalte bestimmt. Das Biogas wurde vor der Messung durch eine Kondensatfalle entfeuchtet. Die Kalibrierung des Messgerätes wurde vor jeder Messung mittels Prüfgas (55% CH₄, 40% CO₂, 200ppm H₂S) durchgeführt. Die gebildete Gasmenge wurde über einen Trommelgaszähler (Ritter Apparatebau GmbH&Co.KG) bestimmt. Zur Umrechnung des Gases auf Normbedingungen (1013 mbar, 273 K) wurden bei jeder Messung auch die Temperatur des Gases und der Luftdruck erfasst. Die gemessenen Daten wurden in ein Exceldatenblatt übertragen und auf Normbedingungen umgerechnet.

4.4 Aufbau der Quasikontinuierlichen Versuchsanlage

Anhand der in Kapitel 3.1.1 aufgeführten Ergebnisse wurden Substrate, welche in den Batchversuchen erhöhte *Clostridium* Cluster I - Populationen aufwiesen in einer quasikontinuierlichen Versuchsanlage im

Technikumsmaßstab weiter untersucht. In Tabelle 2 ist der Versuchsplan der durchgeführten quasikontinuierlichen Versuche dargestellt.

Tabelle 2: Versuchsplan und Parameter der Quasikontinuierlichen Versuche KI-KIII

| Bezeichnung | KI | KII | KIII |
|-------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|
| Inputsubstrate | Maissilage HTK Mast | Zuckerrübe HTK Mast | Maissilage Rindergülle |
| Verhältnis [%FS] | 75/25 | 75/25 | 20/80 |
| Verhältnis [% oTS] | 70/30 | 55/45 | 40/60 |
| Laufzeit [Tage] | 218 | 158 | 100 |
| Verweilzeiten | 2 | 2 | 3 |
| Raumbelastung | 3 | 3 | 3 |
| Fütterungsmenge [g/Tag] | 240/80 | 336/112 | 211/845 |

Der Aufbau der quasikontinuierlichen Versuchsanlage erfolgte mit drei parallel betriebenen, liegenden Fermentern (K1 - K3). Die Fermenter befanden sich in einem beheizten Gehäuse. Die Fermenter hatten ein Nutzvolumen von ca. 39 Lund waren 660 mm lang. Zum Animpfen der Fermenter wurde Gärsubstrat aus einer Biogasanlage verwendet, welche mit Maissilage, Rinder- und Schweinegülle, Mist und HTK beschickt wurde. Der verwendete HTK sowie die Maissilage wurden auf derselben Biogasanlage entnommen, um eine schnelle Adaption der Mikroorganismen im Impfsubstrat an die zu testenden Substrate zu gewährleisten. Die in KIII verwendete Rindergülle stammte von einem Milchviehbetrieb. Wie in Abbildung 4 zu sehen, erfolgt die Fütterung über ein Fütterungsrohr, in welches die tägliche Substratmenge mit einem Stutzen eingebracht wurde. Der Fermenterinhalt wurde kontinuierlich durchmischt und die Temperatur, das Redoxpotential und der pH-Wert des Gärsubstrats wurden stündlich gemessen und aufgezeichnet. Die wöchentliche Probenahme und die Regulierung des Füllstands erfolgten über einen Kugelhahn an der Rückseite der Versuchsanlage. Die Messung und Erfassung der Biogasqualität und -quantität erfolgte täglich mittels eines Infrarot-Messgeräts (visit 03, Messtechnik Eheim GmbH) und über einen Trommelgaszähler (TG 25/2, Ritter Apparatebau GmbH & Co KG). Prozessbiologische Parameter wie FOS/TAC, org. Säuren, TS und NH₄-N wurden wöchentlich nach den in Kap. 4.1 erläuterten Methoden analysiert. Die Nährstoffgehalte wurden monatlich bestimmt.

4.4.1 KI: Maissilage mit HTK

Die quasikontinuierliche Versuchsreihe KI (MS, HTK) wurde am 08.05.2013 gestartet und erreichte an Tag 26 die geplanten Fütterungsmengen. Das erste zu testende Substrat in der quasikontinuierlichen Versuchsanlage war HTK. Aufgrund des hohen Stickstoffgehalts war HTK nicht als Monosubstrat vergärbar. Als Basissubstrat wurde Maissilage eingesetzt und HTK zugemischt. Aufgrund einer Ammoniumhemmung durch den eingebrachten HTK musste der Anteil an oTS aus HTK auf 15% reduziert werden. Es wurde eine Raumbelastung von 3 kg oTS/m³ realisiert und die Verweilzeit betrug 118 Tage.

Durch die Reduktion des HTK-Anteils verkürzte sich die Verweilzeit, bei gleichbleibender Raumbelastung, auf 115 Tage. Um einen Einfluss des Impfmaterials auszuschließen, wurde der Versuch KI über zwei Verweilzeiten durchgeführt.

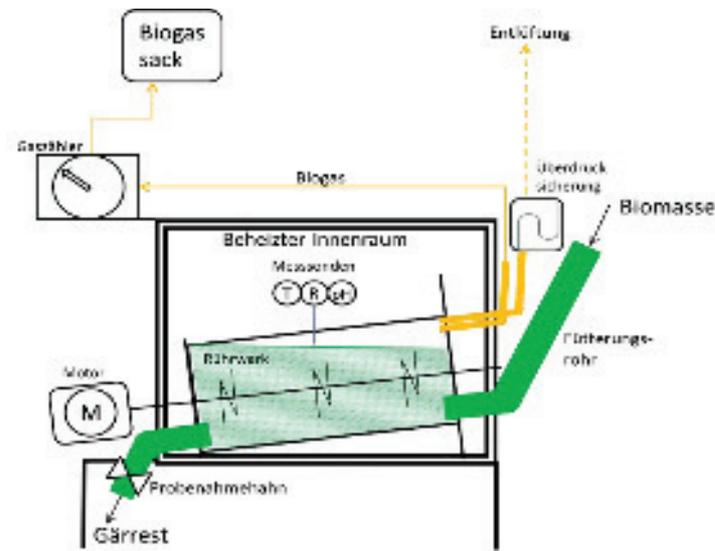


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der quasis kontinuierlichen Versuchsanlage (Seitenansicht)

4.4.2 KII: Zuckerrübe mit HTK

Im zweiten Versuch wurde ebenfalls HTK eingesetzt, jedoch in Kombination mit zerkleinerter und siliierter Zuckerrübe. Es wurde eine Raumbelastung von 3 kg OTS/m^3 realisiert und die Verweilzeit betrug 80 Tage.

4.4.3 KIII: Maissilage mit Rindergülle

Im dritten Versuch wurde Rindergülle untersucht. Da bei einer reinen Vergärung von Rindergülle in der Versuchsanlage die Verweilzeit zu kurz wäre und dadurch die Generationszeit einiger Mikroorganismen unterschritten werden würde, wurde der Rindergülle Maissilage zugemischt (Kaltschmitt et al, 2009). Die Verweilzeit betrug 35 Tage.

Bei allen drei Versuchsdurchläufen wurde in der letzten Woche eine gezielte Überlastung durch Erhöhung der Fütterungsmenge erzeugt. Die überlasteten Proben wurden mikrobiologisch untersucht um einen möglichen Einfluss einer Prozessstörung auf das Vorkommen von *Clostridium* Cluster I zu untersuchen (vgl. Kap. 4.2).

4.5 Charakterisierung der Praxisbiogasanlagen

Im Rahmen des Projekts wurden neun Biogasanlagen beprobt. Die Biogasanlagen wurden nach ihren gefütterten Substraten in die Gruppen NaWaRo, Rindergülle, Schweinegülle und HTK eingeteilt (Tabelle 3). Alle Biogasanlagen wurden prozessbiologisch charakterisiert (vgl. Anhang A1 und A2). Die Mikro- und Makronährstoffversorgung der beprobten Behälter sowie die Nährstoffgehalte der einzelnen Substrate sind ebenfalls im Anhang (A3-A6) und auszugsweise in Kap. 5.3 dargestellt.

Tabelle 3: Übersicht der beprobten Praxisanlagen und ihre eingesetzten Substrate

| Bezeichnung | Substrate |
|----------------------|---|
| NaWaRo | |
| P2 | Maissilage, GPS |
| Rindergülle | |
| P1 | Maissilage, GPS, Rindergülle |
| P7 | Maissilage, Grassilage, Rindergülle |
| P9 | Maissilage, Futterreste, Rindergülle |
| Schweinegülle | |
| P6 | Maissilage, R/S-Gülle, S-Mist |
| P8 | Maissilage, Schweinegülle, HTK |
| HTK | |
| P3 | Maissilage, Zuckerrübe, Rindermist, HTK |
| P4 | Maissilage, Rinder- und Schweinemist, Schweinegülle, HTK |
| P5 | Maissilage, GPS, Zuckerrübe, Schweinegülle, Rindermist, HTK |

Bei den Biogasanlagen P1-P3 und P5 wurden Hauptfermenter (HF) und Nachfermenter (NF) beprobt. Bei der Biogasanlage P4 wurde nur der Hauptfermenter beprobt. Bei den Biogasanlagen P6-P9 wurde neben Haupt- und Nachfermenter zusätzlich das Gärrestlager beprobt.

5 Ergebnisse

5.1 Batchversuche

5.1.1 Chemische Charakterisierung - Batchversuche

In Abbildung 5 sind die Verläufe der Gasertragskurven der eingesetzten Impfsubstrate dargestellt. Die Gaserträge lagen nach 21 Tagen zwischen 96 I_N/kg oTS und 148 I_N/kg oTS. Die TS-Gehalte der Impfsubstrate B II-V lagen zwischen 7,4% und 7,8%. Der TS-Gehalt des Impfsubstrats B-IG 1 lag bei 6,9%.

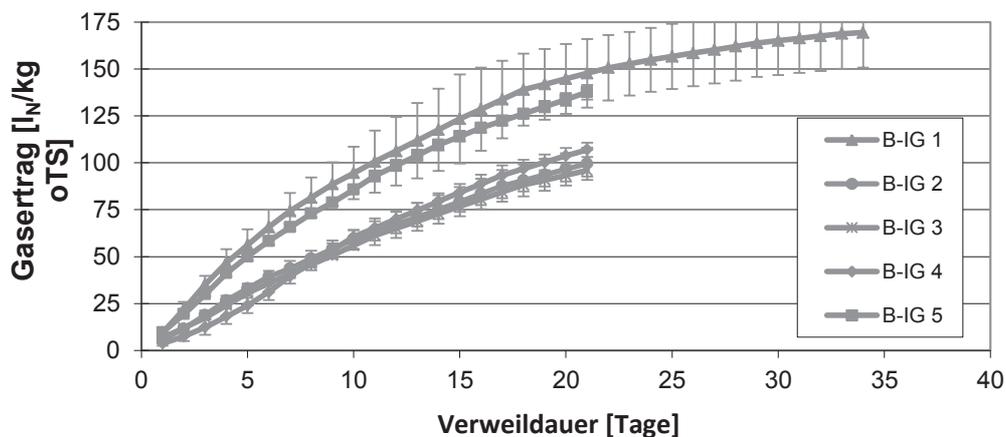


Abbildung 5: Gasertragskurven der Impfsubstrate in den Batchversuchen I-VI

Die in Abbildung 6 dargestellten Batchansätze I bis III mit Maissilage erreichten an Tag 21 Biogaserträge von 621 I_N/kg oTS bis 775 I_N/kg oTS. In allen drei Batchversuchen zeigten die Maissilagen (B-MS1 bis B-MS3) einen deutlichen Anstieg der Biogasertragskurve während der ersten 7 Tage. An B-MS1, mit einer Laufzeit von 35 Tagen wird deutlich, dass die Steigung der Gasertragskurve ab Tag 23 deutlich abfiel, was bedeutete, dass kaum mehr Biogas gebildet wurde und die leicht abbaubaren Substanzen (hier vor allem Stärke) zum größten Teil in Biogas umgesetzt wurden. Die jeweiligen Inputsubstrate wiesen aufgrund ihrer Herkunft, ihrer Zusammensetzung und ihrer Inhaltstoffe unterschiedliche Gaserträge auf. Die Biogasertragskurven der Batchversuch mit Rindergülle zeigten einen ähnlichen Verlauf. Die Gaserträge lagen zwischen 355 I_N/kg oTS und 417 I_N/kg oTS. Ab Tag 10 nahm die tägliche Zunahme an Biogas ab. Jedoch flachte die Kurve der Rindergülle 1 bis Tag 35 weniger stark ab, als die der Kurve Maissilage 1. Dies lag an der unterschiedlichen Zusammensetzung und den Anteilen an leicht und schwer abbaubaren Substanzen im jeweiligen Substrat. Die Batchversuche mit Schweinegülle (B-SG1 bis B-SG3) erreichten nach 21 Tagen Gaserträge zwischen 234 I_N/kg oTS und 355 I_N/kg oTS. Während die Gasertragskurve bei B-SG1 bis Tag 11 deutlich ansteigt, flacht sie bei B-SG3 bereits nach 6 Tagen deutlich ab. Die mittleren Methangehalte der Batchversuche mit Maissilage lagen bei 53% CH_4 , die Batchversuche mit Rindergülle bei 59- 60% CH_4 und die Methangehalte der Batchversuche mit Schweinegülle schwankten zwischen 59% und 69% CH_4 (vgl. Anhang A7).

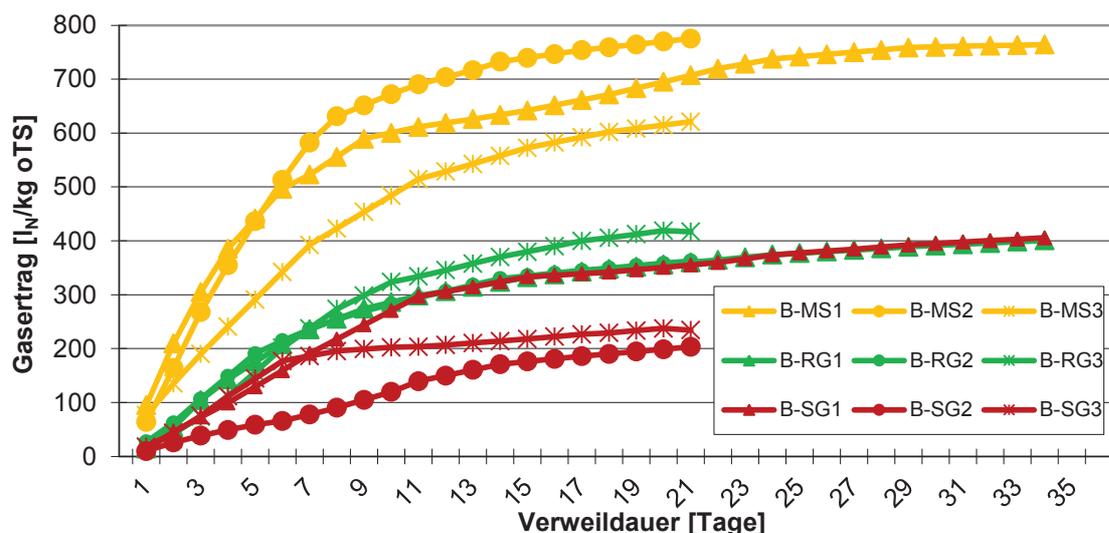


Abbildung 6: Gasertragskurven der Maissilagen, Rinder- und Schweinegülle aus den Batchversuchen I - III

Die TS- und oTS Werte der eingesetzten Substrate in den Batchversuchen I-III sind in Tabelle 4 dargestellt. Hierbei fiel auf, dass die Trockensubstanzgehalte der Gülle in Batchversuch II mit 2,4% bzw. 2,2% deutlich niedriger und im Batchversuch III mit 9,3% bzw. 9,7% höher lagen als der angegebene KTBL-Durchschnitt.

Tabelle 4: TS- und oTS-Werte der Inputsubstrate für die Batchversuche I-III

| Bezeichnung | TS [% FS] | oTS [% TS] | TS KTBL | oTS KTBL |
|-----------------|-----------|------------|---------|----------|
| Maissilage 1 | 31,2 | 94,1 | 30 | 96 |
| Maissilage 2 | 33,0 | 94,1 | 30 | 96 |
| Maissilage 3 | 35,7 | 96,5 | 30 | 96 |
| Schweinegülle 1 | 8,1 | 91,9 | 6 | 80 |
| Schweinegülle 2 | 2,4 | 69,2 | 6 | 80 |
| Schweinegülle 3 | 9,3 | 66,8 | 6 | 80 |
| Rindergülle 1 | 7,2 | 92,8 | 8 | 80 |
| Rindergülle 2 | 2,2 | 72,5 | 8 | 80 |
| Rindergülle 3 | 9,7 | 81,4 | 8 | 80 |

In Abbildung 7 sind die Gaserträge aus Schweinegülle IV mit Maissilage IV und Rindergülle IV mit Maissilage zu sehen. Ebenso der Gasertrag von Roggen- Ganzpflanzsilage (GPS). Die TS-Gehalte der eingesetzten Inputsubstrate sind in Tabelle 5 dargestellt. Der Gasertrag für die GPS-Probe betrug nach 21 Tagen 406 l_N/kg oTS, für die Mischung aus Schweinegülle und Maissilage (B-SGMS) 336 l_N/kg oTS und für die Mischung aus Rindergülle und Maissilage (B-RGMS) 224 l_N/kg oTS (vgl. Anhang A8).

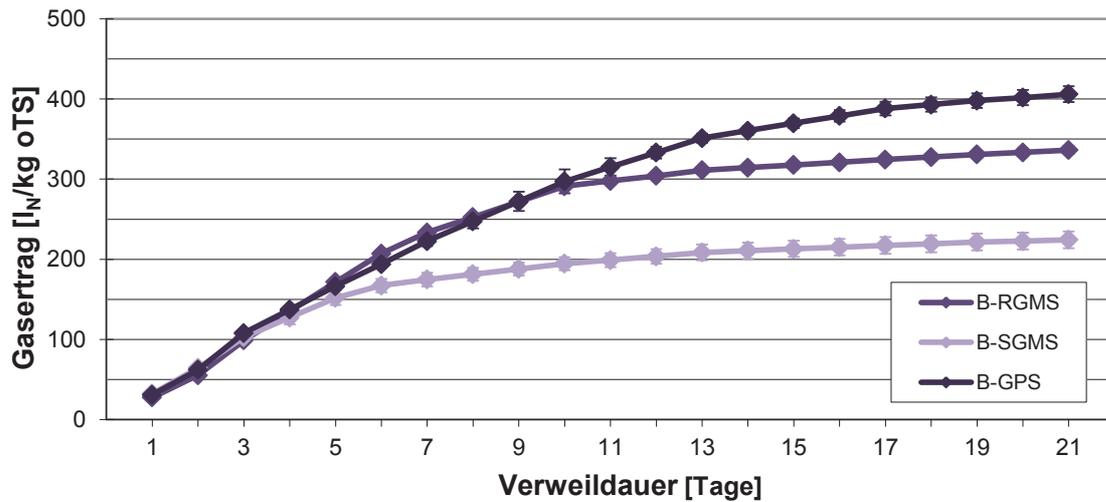


Abbildung 7: Gasertragskurven von Rinder- und Schweinegülle mit Maissilage und GPS

In Abbildung 8 sind die Biogasertragskurven aus Batchversuch V dargestellt. Der Gasertrag aus Maissilage V betrug nach 21 Tagen 640 l_N/kg oTS, der aus Zuckerrübe mit Legehennen-HTK I 578 l_N/kg oTS und der aus Zuckerrübe mit Masthähnchen-HTK II 541 l_N/kg oTS (vgl. Anhang A9).

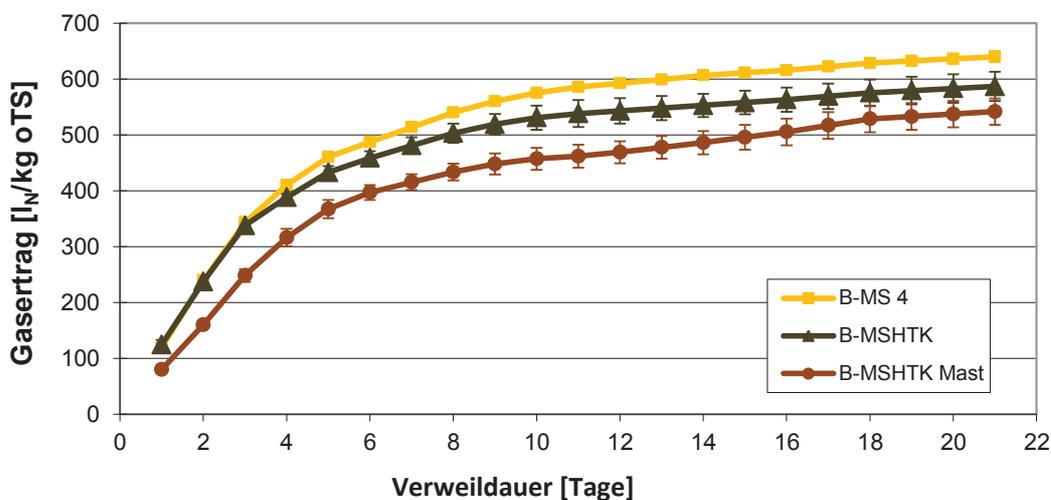


Abbildung 8: Gasertragskurven von Maissilage und Maissilage mit Legehennenkot (HTK I) und Masthähnchenkot (HTK II)

In Abbildung 9 sind die Biogasertragskurven aus Batchversuch VI dargestellt. Der Gasertrag aus Zuckerrübe betrug nach 21 Tagen 695 l_N/kg oTS, der aus Zuckerrübe mit 25% HTK 640 l_N/kg oTS und der aus Zuckerrübe mit 45% HTK 583 l_N/kg oTS.

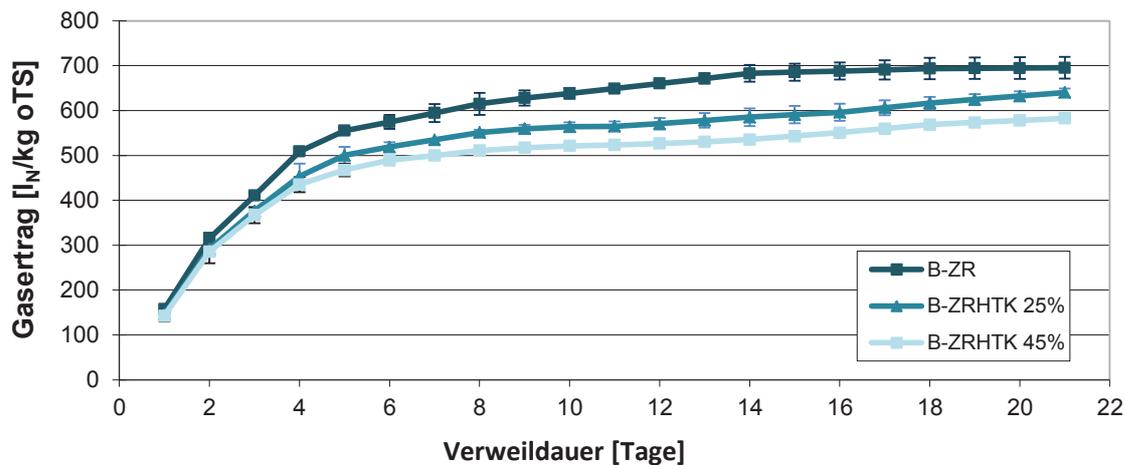


Abbildung 9: Gasertragskurven von Zuckerrübe und Zuckerrübe mit HTK

Die Trockensubstanzgehalte (TS) und org. Trockensubstanzen (oTS) der Inputsubstrate aus den Batchversuchen IV, V und VI sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Trockensubstanz der eingesetzten Zuckerrübe war sehr hoch bei gutem oTS-Gehalt. Die org. Trockensubstanz des Legehennen-HTK war mit 69,2% deutlich geringer als der des Masthähnchen-HTK mit 87,0%. Der Trockensubstanzgehalt des Legehennenkots (HTK I) und des Masthähnchenkots (HTK II) variierte ebenfalls stark. Der TS und oTS-Gehalt der eingesetzten Ganzpflanzensilage (GPS) fiel deutlich niedriger aus, als der von der KTBL angegebenen Durchschnittswerte. Der geringe oTS-Gehalt sowie der geringe Gasertrag der Schweinegülle, lassen vermuten, dass Wasser oder Verunreinigungen wie Sand oder Erdanhang in der Gülle waren(vgl. Anhang A9).

Tabelle 5: Trockensubstanz und org. Trockensubstanz der eingesetzten Inputsubstrate in den Batchversuchen I- VI

| Bezeichnung | TS [% FS] | oTS [% TS] | TS [% FS] (KTBL) | oTS [% TS] (KTBL) |
|---------------------|-----------|------------|---------------------|----------------------|
| Rindergülle IV | 8,8 | 80,9 | 8 | 80 |
| Schweinegülle IV | 5,1 | 66,5 | 6 | 80 |
| GPS | 28,1 | 88,6 | 35 | 94 |
| Maissilage IV | 35,0 | 96,0 | 30 | 96 |
| Maissilage V | 32,8 | 95,5 | 30 | 96 |
| Zuckerrübe | 30,8 | 91,4 | 23 | 92 |
| HTK II Masthähnchen | 58,3 | 87,0 | 45 | 75 |
| HTK I Legehennen | 29,5 | 69,2 | 45 | 75 |

5.1.2 Mikrobiologische Charakterisierung - Batchversuche

Die mikrobiologische Charakterisierung der Inputsubstrate ergab für alle unterschiedlichen Substrate einen vergleichbaren Gehalt an nachgewiesenen Genkopien für *Bacteria* von ca. 10^6 ng^{-1} DNA. Der Gehalt an *Archaea* hingegen war unterschiedlich mit den höchsten Gehalten von ca. 10^5 ng^{-1} DNA in Rinder (RG)- und Schweinegülle (SG) und geringen Gehalten von 10^3 ng^{-1} DNA in Maissilage (MS) und Hühnertrockenkot (HTK). Auch der Anteil von *Clostridium* Cluster XIVa variierte in den unterschiedlichen Substraten; z.T. sogar signifikant: Die höchsten Gehalte wurden in RG ($9,2 \pm 6,2\%$ der *Bacteria*) und SG ($4,1 \pm 1,4\%$) detektiert. Dies entsprach den Erwartungen, da die Gruppe *Clostridium* Cluster XIVa Clostridien umfasst, die mehrfach in Fäkalien nachgewiesen wurden. Die geringsten Gehalte wurden an Zuckerrüben (ZR) mit $0,006 \pm 0,001\%$ gemessen. Obwohl HTK den Fäkalien zugerechnet wird, war der Anteil von *Clostridium* Cluster XIVa hier mit $0,06 \pm 0,04\%$ eher niedrig. Ein Einfluss der Herkunft konnte nur für die Lieferung von einer Biogasanlage nachgewiesen werden mit signifikant höheren Gehalten in RG bzw. MS. Auch der Anteil von *Clostridium* Cluster I in RG, SG und in Ganzpflanzensilage (GPS) dieser Lieferung wurde signifikant durch die Herkunft beeinflusst. So wurden in der SG ein Cluster I Anteil von 77% der *Bacteria* ermittelt, eine andere SG hatte jedoch nur 0,8%. Die Art der Substrate beeinflusst den Anteil an Cluster I ebenfalls z.T. signifikant; mit den höchsten Gehalten in der SG mit $25,2 \pm 37,9\%$ und geringen Anteilen in ZR ($0,04 \pm 0,01\%$) und HTK ($0,08 \pm 0,05\%$) (Abbildung 10). Für RG lag der Anteil zwischen 0,2% und 7,9% bei einem Mittleren Anteil von $2,1 \pm 2,5\%$. Ein Zusammenhang der Anteile von Clostridien der beiden Cluster XIVa und Cluster I konnte nicht festgestellt werden. Darum werden hier im Folgenden nur noch die Werte der Cluster I Clostridien dargestellt.

Während der Fermentation von RG, SG oder MS als Monosubstrat in den Batchversuchen I-III ergab sich ein Anteil *Clostridium* Cluster I von 0,4% der *Bacteria* der sich über den zeitlichen Verlauf in den jeweiligen Batchansätzen nicht signifikant veränderte (Abbildung 11). Ein Effekt der jeweiligen Inputsubstrate zeigte sich nach 14 Tagen der Fermentation: Hier war der Anteil von Cluster I in den mit SG bzw. mit MS beschickten Fermentern signifikant erhöht gegenüber dem Anteil in den mit RG bzw. reiner Impfgülle (IG) beschickten Fermentern. Ein signifikanter Einfluss der Herkunft der jeweiligen Substrate ließ sich nach 21 Tagen Fermentation für IG, RG und SG feststellen.

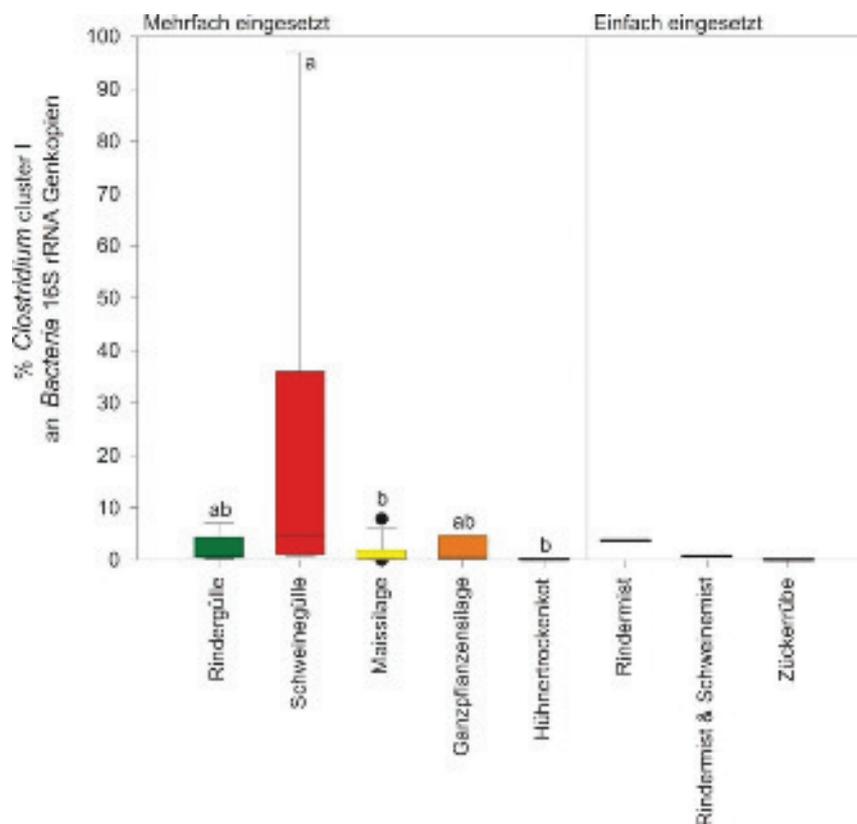


Abbildung 10: Gehalt an *Clostridium* Cluster I in unterschiedlichen Substraten (Batch I – IV und Praxisanlagen P1 – P4)

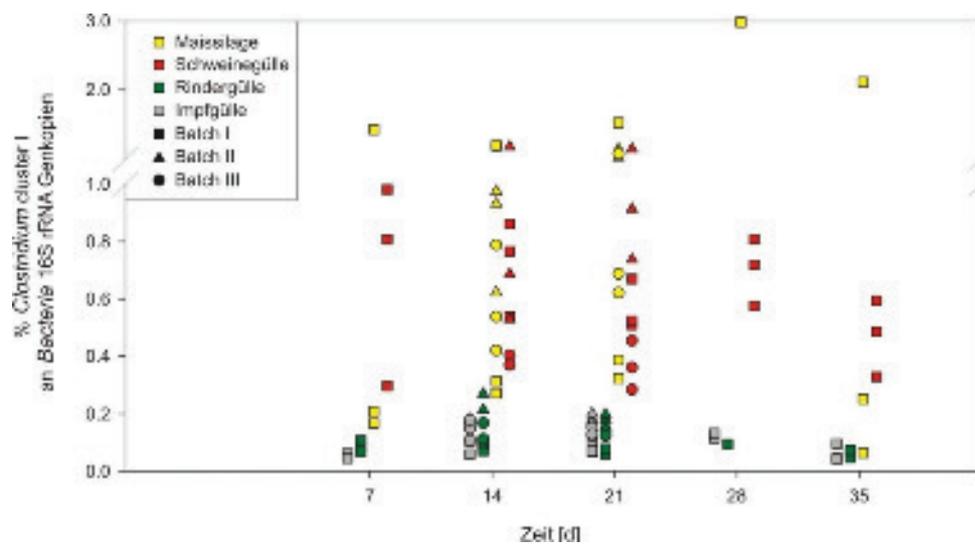


Abbildung 11: Gehalt an *Clostridium* Cluster I in den Batchfermentern aus den Versuchsreihen Batch I-III

Für eine bessere Beurteilung der Entwicklung der Clostridienpopulationen wurden den Ansätzen aus Batch IV auch Proben unmittelbar nach Zugabe der Inputsubstrate entnommen (Abbildung 12, 0d). So konnte gezeigt werden, dass nach 14 Tagen der Anteil an *Clostridium* Cluster I in Fermentern die mit „Rindergülle mit Maissilage“ bzw. mit „Schweinegülle mit Maissilage“ beschickt wurden, gegenüber der Anfangsmischung signifikant reduziert war. Ein Effekt der Inputsubstrate zeigte sich nur an Tag 21 bei der Fermentation von „Schweinegülle mit Maissilage“ wo der Anteil der *Clostridium* Cluster I signifikant gegenüber den anderen Substraten erhöht war.

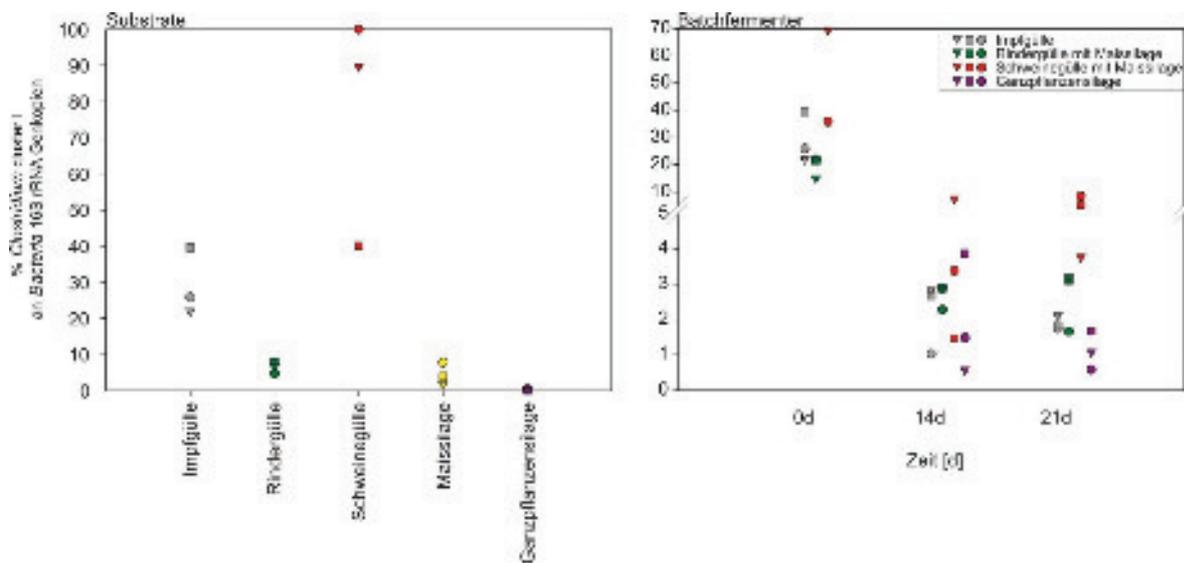


Abbildung 12: Gehalt an *Clostridium* Cluster I in den Substraten und Fermentern aus Batch IV

In den Batchversuchen V und VI wurde der gezielt der Einfluss von Hühnertrockenkot (HTK) untersucht (Abbildung 13). Zum einen wurden zweierlei Arten HTK von Legehennen bzw. von Masthähnchen in Kombination mit Maissilage fermentiert. Es zeigte sich, dass die Art des HTKs zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf den Anteil an *Clostridium* Cluster I hatte. Dieser blieb über den gesamten Zeitraum unverändert und unterschied sich auch nicht von dem der Umsetzung reiner Maissilage. Zum anderen wurde Masthähnchenkot in unterschiedlichen Anteilen mit Zuckerrübe umgesetzt. Der Anteil von *Clostridium* Cluster I war unabhängig von der Menge an zugesetztem HTK und auch im zeitlichen Verlauf ergaben sich keine signifikanten Veränderungen.

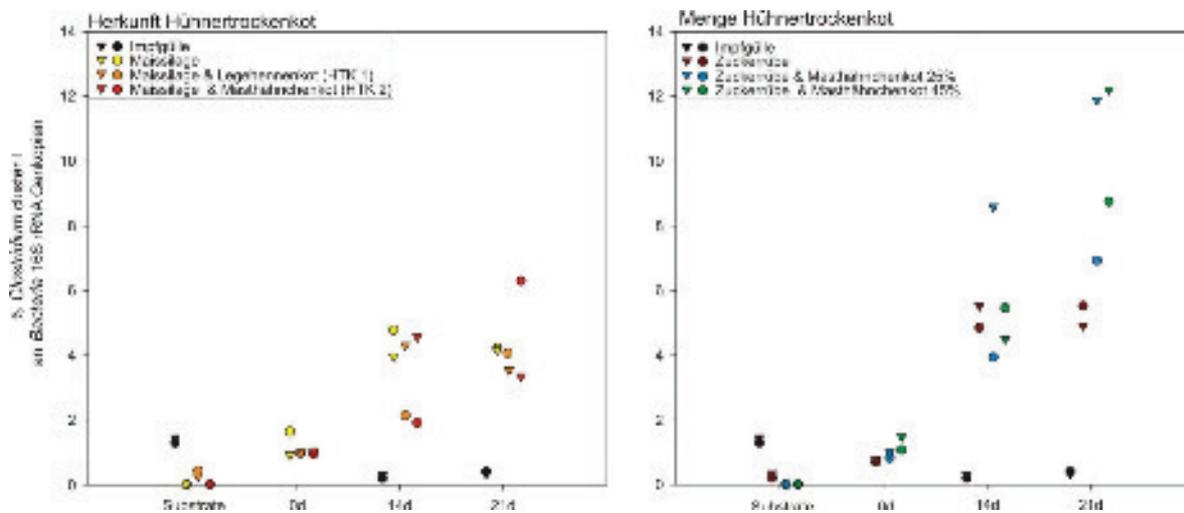


Abbildung 13: Gehalt an *Clostridium* Cluster I während der Umsetzung von Hühnertrockenkot (Batch V und IV)

Der Vergleich aller in den Batchversuchen eingesetzter Substrate zeigte sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen, dass beim Einsatz von ZR signifikant mehr *Clostridium* Cluster I vorkommen, als beim Einsatz von RG (Abbildung 14). Die Zugabe von HTK zu ZR hatte keinen weiteren Effekt. Für alle anderen Substrate und Vergleich ergaben sich nach 14 bzw. 21 Tagen keine signifikanten Unterschiede.

Insgesamt haben die Batchversuche gezeigt, dass es zu keiner Anreicherung von *Clostridium* Cluster I während der Biogasbildung aus verschiedensten Substraten und Substratmischungen kam. Sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen wurden die geringsten Anteile an *Clostridium* Cluster I bei der Umsetzung von RG beobachtet, während die größten Anteile in den Ansätzen mit ZR erfasst wurden. Zu bemerken ist, dass die größten Anteile an *Clostridium* Cluster I bei der Fermentation von Substraten auftraten, die selbst kaum *Clostridium* Cluster I beinhalten wie ZR oder HTK.

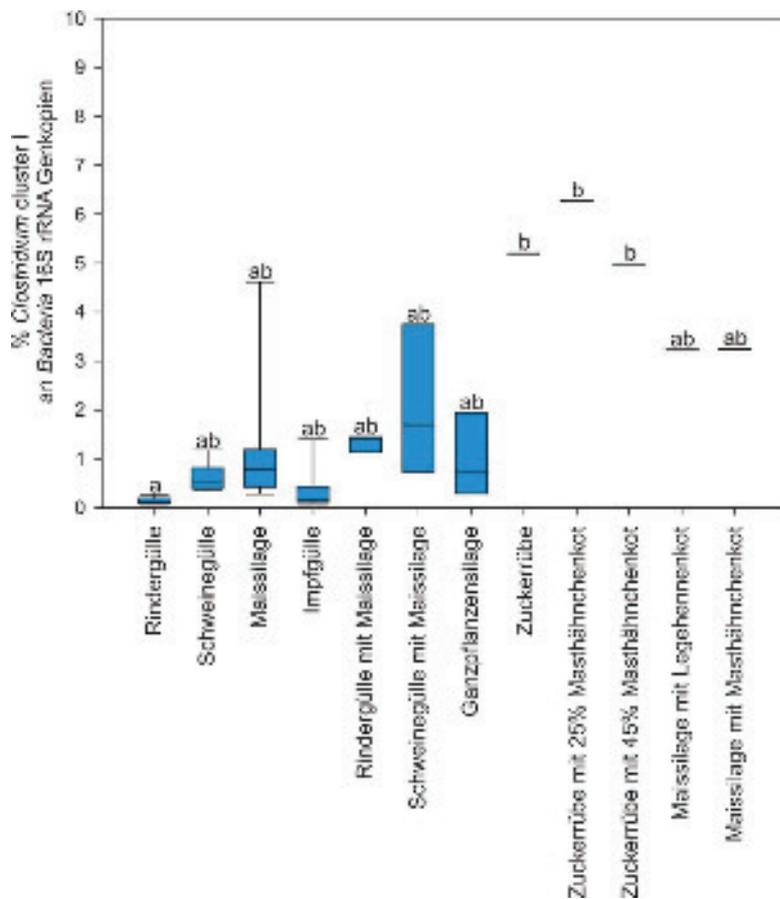


Abbildung 14: Gehalt an *Clostridium* Cluster I während der Umsetzung unterschiedlicher Substrate im Batchversuch nach 14 Tagen

5.2 Quasikontinuierliche Versuche

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der drei quasikontinuierlichen Versuche KI (Maissilage mit HTK), KII (Zuckerrübe mit HTK) und KIII (Maissilage mit Rindergülle) dargestellt.

5.2.1 Chemische Charakterisierung - quasikontinuierliche Versuche

In den quasikontinuierlichen Versuchen KI bis KIII wurden die in Kap. 4.4 beschriebenen Inputsubstrate verwendet. Die Charakterisierung der Inputsubstrate sowie des verwendeten Impfmateri- als in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Trockensubstanz und org. Trockensubstanz der Inputsubstrate für die quasikontinuierlichen Versuche KI - KIII

| Bezeichnung | TS [% FS] | oTS [% TS] |
|--------------------------------------|-----------|------------|
| Impfsubstrat KI | 12,0 | 76,5 |
| Impfsubstrat KII | 10,3 | 78,0 |
| Impfsubstrat KIII | 12,8 | 75,2 |
| Maissilage KI | 35,1 | 95,5 |
| Maissilage KIII | 31,0 | 96,1 |
| Zuckerrübe KII (ohne Säurekorrektur) | 21,5 | 64,5 |
| HTK KI | 49,8 | 73,6 |
| HTK KII | 55,0 | 74,8 |
| Rindergülle KIII | 8,7 | 84,3 |

Quasikontinuierlicher Versuch KI: Maissilage mit HTK

Der tägliche Gasertrag von KI (MS, HTK) ist in Abbildung 15 dargestellt und zeigte einen durchschnittlichen Gasertrag von 63 l_N /Tag (ausgenommen der Phase zwischen Tag 80 und 140). Dies entsprach einem durchschnittlichen Gasertrag von 572 l_N /kg oTS. bzw. 196 l_N /kg FS. Der pH-Wert lag bei $8,0 \pm 0,3$. Der Trockensubstanzgehalt der Fermenterinhalt war $13,8 \pm 1,5\%$ und $78 \pm 2\%$ war der oTS-Wert.

Der Ammonium-Stickstoffgehalt stieg durch die Zugabe von HTK von 4 g/l auf 7,5 g/l. Durch die Reduktion von HTK ab Tag 100 sank der NH_4-N Gehalt auf 6 g/l ab. Nach Literaturangaben kann eine Hemmung durch Ammonium bereits ab 3g/l auftreten. Jedoch konnte in der Praxis eine gute Adaption der Mikroorganismen an höhere Ammonium-N Konzentrationen bis 8 g/l beobachtet werden (Eder, 2012; FNR, 2005).

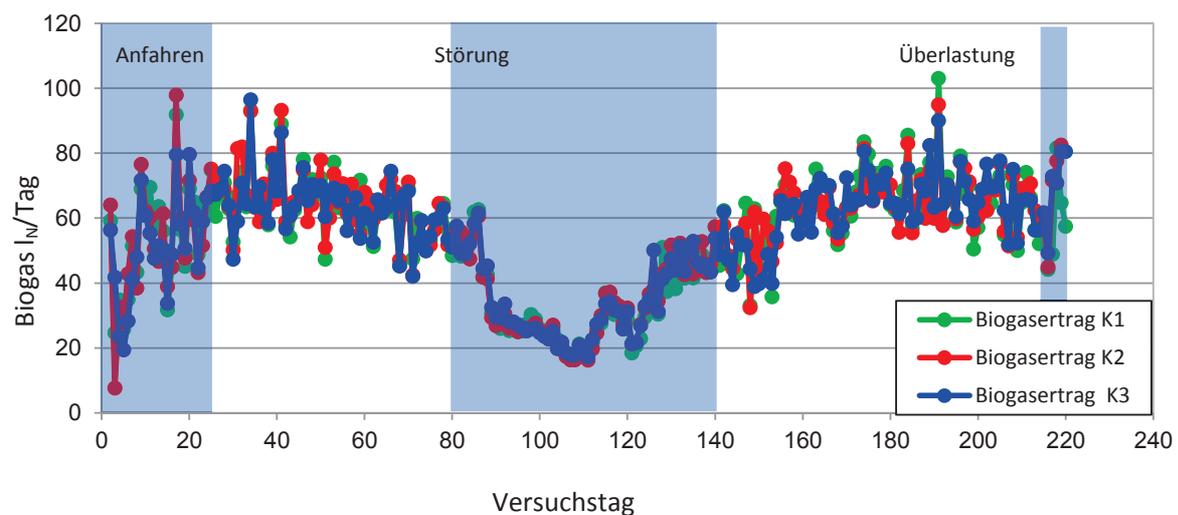


Abbildung 15: Täglicher Gasertrag der Fermenter K1-K3 im quasikontinuierlichen Versuch KI (MS,HTK)

Die Stabilität des biologischen Prozesses wird in Abbildung 16 durch den FOS, TAC bzw. den FOS/TAC Wert dargestellt. Der steigende FOS/TAC-Wert zeigte in den Tagen 75 bis 90 eine Prozessstörung an. Durch eine Reduktion der täglich zugegebenen Menge an HTK und Reduktion der Fütterung während der Akutphase an den Tagen 80 bis 110 sank der FOS/TAC-Wert wieder ab. Die täglich gebildete Gasmenge sank während dieser Zeit deutlich.

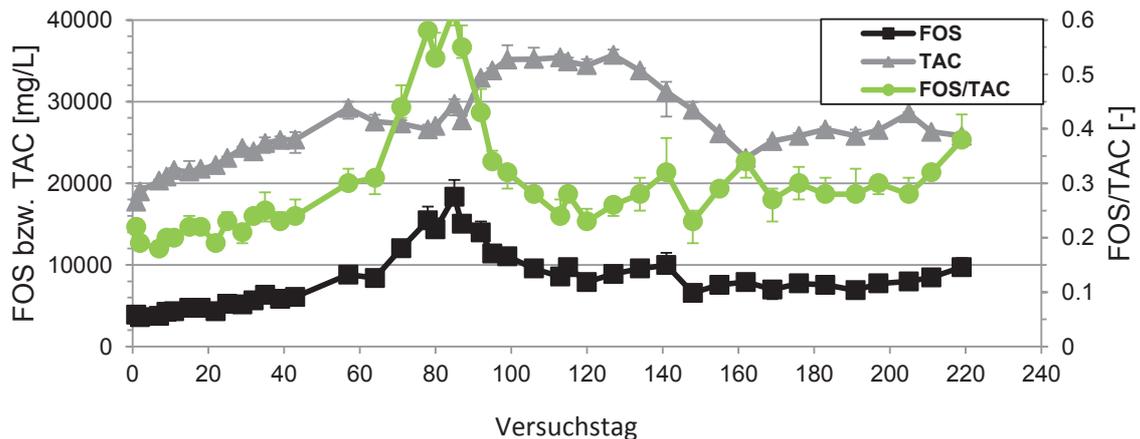


Abbildung 16: Verlauf von FOS, TAC und FOS/TAC-Werte während des Versuchs KI

Wie in Kapitel 4.1.4 erläutert weist das Auftreten von Butter-, Valerian-, und Capronsäure ebenfalls auf eine Störung der Fermenterbiologie hin. Im Säurespektrum der quasikontinuierlichen Versuche war während der prozessgestörten Phase an zwei Tagen iso-Buttersäure nachweisbar. An den Tagen 92 bis 176 wurden sehr hohe Gehalte an iso-Valeriansäure gemessen. In der Praxis werden ebenfalls Zusammenhänge zwischen Ammoniumhemmung und den Valeriansäuregehalten beobachtet.

Quasikontinuierlicher Versuch KII: Zuckerrübe mit HTK

Die quasikontinuierliche Versuchsreihe KII (ZR, HTK) wurde am 31.12.2013 gestartet und erreichte an Tag 17 die geplanten Fütterungsmengen. Durch die Kombination von HTK mit Zuckerrübe stieg der Ammonium-Stickstoffgehalt auf 6,2 g/l geringer an, als im quasikontinuierlichen Versuch K I. In Abbildung 17 ist der Verlauf der täglichen Gasbildungsrate von KII (ZR, HTK) dargestellt und zeigt einen durchschnittlichen Gasertrag von 71 l_N/Tag. Dies entsprach einem durchschnittlichen Gasertrag von 158 l_N/kg FS. Der pH-Wert lag bei 8,1 ± 0,1. Der Trockensubstanzgehalt der Fermenterinhalt war 12,6 ± 0,7% und der oTS-Wert war 60,3 ± 6%.

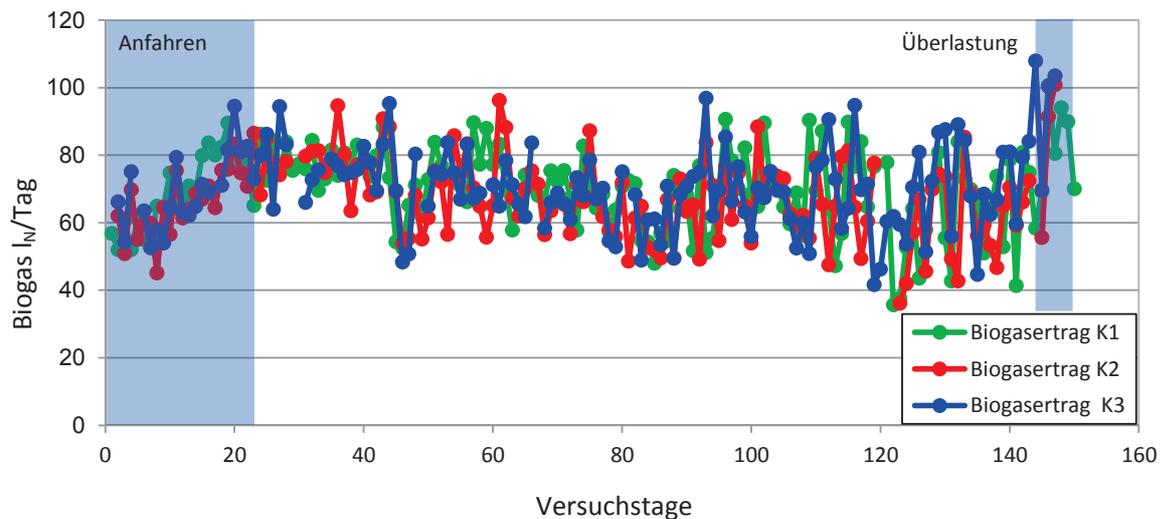


Abbildung 17: Täglicher Gasertrag der Fermenter K1-K3 im quasikontinuierlichen Versuch KII (ZR, HTK)

Der Verlauf in KII war störungsfrei. In Abbildung 18 sind die Verläufe von FOS, TAC und dem FOS/TAC dargestellt. Aufgrund des hohen HTK-Anteils stieg der TAC-Wert von 18 g/l auf 29 g/l an und pendelt sich nach der Anfahrphase bei $0,19 \pm 0,02$ ein.

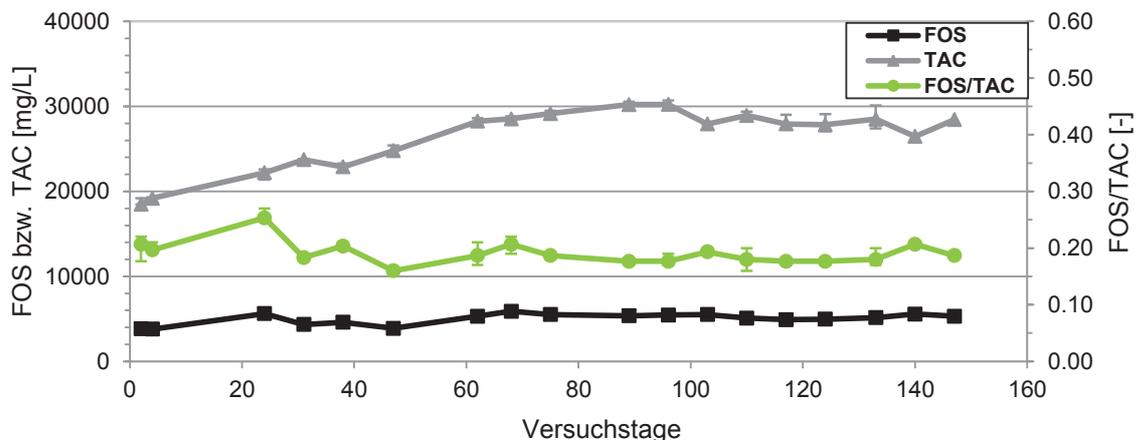


Abbildung 18: Verlauf von FOS, TAC und FOS/TAC-Werte während des Versuchs KII

Bei der Analyse des Säurespektrums wurde an den Tagen 89 und 96 in zwei der drei Behälter iso-Valeriansäure in Konzentrationen von 300 mg/l festgestellt. Dabei lagen die FOS/TAC-Werte bei 0,18 und es traten leicht höhere Essigsäuregehalte von 900 mg/l auf.

Quasikontinuierlicher Versuch KIII: Maissilage mit Rindergülle

Der quasikontinuierliche Versuch KIII startete am 20.05.2014. Die geplante Fütterungsmenge wurde an Tag 14 erreicht. An den Tagen 19 bis 26 wurde die Fütterungsmenge aufgrund eines ansteigenden FO/TAC-Wertes leicht zurückgenommen. In Abbildung 19 ist der Verlauf der täglichen Gasbildungsrate dargestellt.

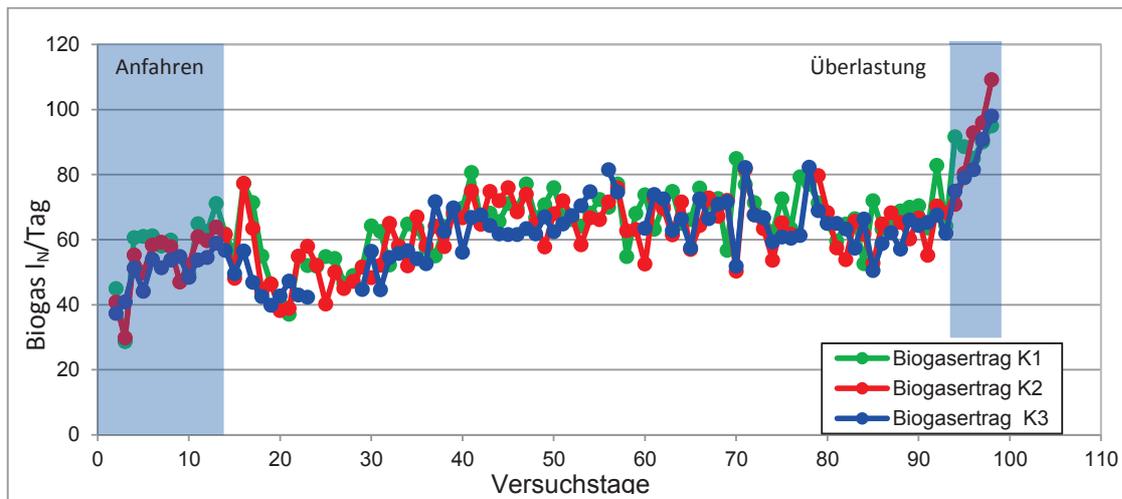


Abbildung 19: Täglicher Gasertrag der Fermenter K1-K3 im quasikontinuierlichen Versuch KIII (RG, MS)

Zu Beginn des Versuchs KIII wurde ein Anstieg der flüchtigen organischen Säuren (FOS) und somit des FOS/TAC-Werts beobachtet (Abbildung 20). Ab Tag 33 pendelte sich der FOS/TAC-Wert bei $0,19 \pm 0,01$ ein. Der pH-Wert lag durch die geringeren $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentrationen und somit auch durch die geringere Pufferkapazität mit $7,7 \pm 0,1$ leicht unter den Werten der Versuchsreihen KI und KII. Der mittlere Trockensubstanzgehalt der Fermenter-inhalte lag bei $8,3 \pm 0,9\%$ und der oTS-Wert bei $78,7 \pm 0,7\%$.

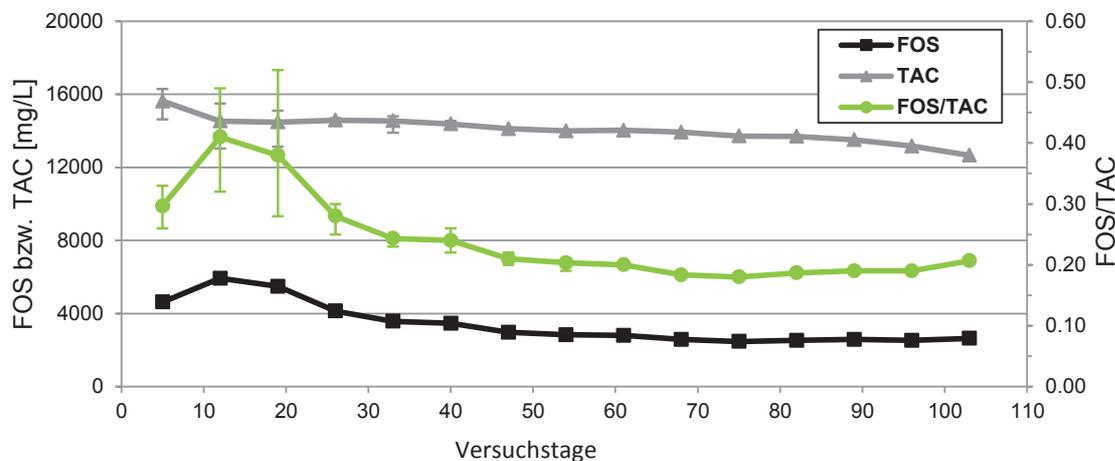


Abbildung 20: Verlauf von FOS, TAC und FOS/TAC-Werte während des Versuchs KIII

5.2.2 Mikrobiologische Charakterisierung - quasikontinuierliche Versuche

Zur Charakterisierung der Bakteriengemeinschaften in den quasikontinuierlichen Versuchen wurden an vier Zeitpunkten Proben aus den drei parallel betriebenen Fermentern genommen. Die ersten Probenahmen erfolgte nachdem die geplante Substratmenge dem Fermenter zugesetzt werden konnte und sich der Betrieb stabilisiert hatte. Nachdem eine Verweildauer durchlaufen wurde, wurden die

zweiten Proben entnommen und 3 bis 6 Wochen später die dritten. Mit der dritten Probenahme setzte die Überlastung der Fermenter ein. Angepasst an die Länge der Verweildauer erfolgte die Probenahme ein bis zwei Wochen nach Beginn der Überlastung.

Für jede Probe wurde die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften in dreifacher Wiederholung analysiert. Für jeden der drei quasikontinuierlichen Versuche wurden somit 36 Datensätze mittels Hochdurchsatz Sequenzierung analysiert. Insgesamt konnten die Bakteriengemeinschaften in den drei quasikontinuierlichen Versuchen durch 18,3 Millionen ribosomale Markergene charakterisiert werden.

Quasikontinuierlicher Versuch KI: Maissilage mit HTK

Im quasikontinuierlichen Versuch der Fermentation von Maissilage und HTK wurden insgesamt 4.663.735 ribosomale Markergene von Bakterien analysiert, sodass im Durchschnitt jeder Datensatz auf 130.000 Sequenzen basierte. Im Mittel ließen sich 35% der Sequenzen der Klasse der *Clostridia* zuordnen und 5% dem Cluster I der *Clostridien*.

In den 36 Datensätzen wurden 24 Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* identifiziert, die sich auf alle vier phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen von *C. botulinum* verteilten (Abbildung 21). Dies war am unteren Ende der Nachweisgrenze. Auffallend war, dass die meisten Sequenzen am Anfang des Fermentationsprozesses identifiziert wurden ($0,0014 \pm 0,0008\%$ der Bakterien) und es dann zu einer signifikanten Reduktion kam, sodass sich im weiteren Verlauf der Fermentation nur noch einzelne Sequenzen nachweisen ließen. Auch der Nachweis von Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. perfringens* erfolgte am Rande der Nachweisgrenze, da nur 25 Sequenzen identifiziert wurden. Während der Fermentation gab es keine signifikanten Veränderungen, so dass der mittlere Anteil bei $0,0005 \pm 0,0008\%$ lag. Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. chauvoei* wurden nicht identifiziert. Der Nachweis von Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. tetani* war mit 4.280 Sequenzen im Vergleich häufiger. Während der Fermentation gab es keine signifikanten Veränderungen und der Anteil lag bei $0,08 \pm 0,03\%$ der Bakterien. Nur nach der induzierten Überlastung stieg der Anteil auf $0,14 \pm 0,02\%$ an und war somit gegenüber den Anfangswerten nach 36 und 183 Tagen signifikant erhöht.

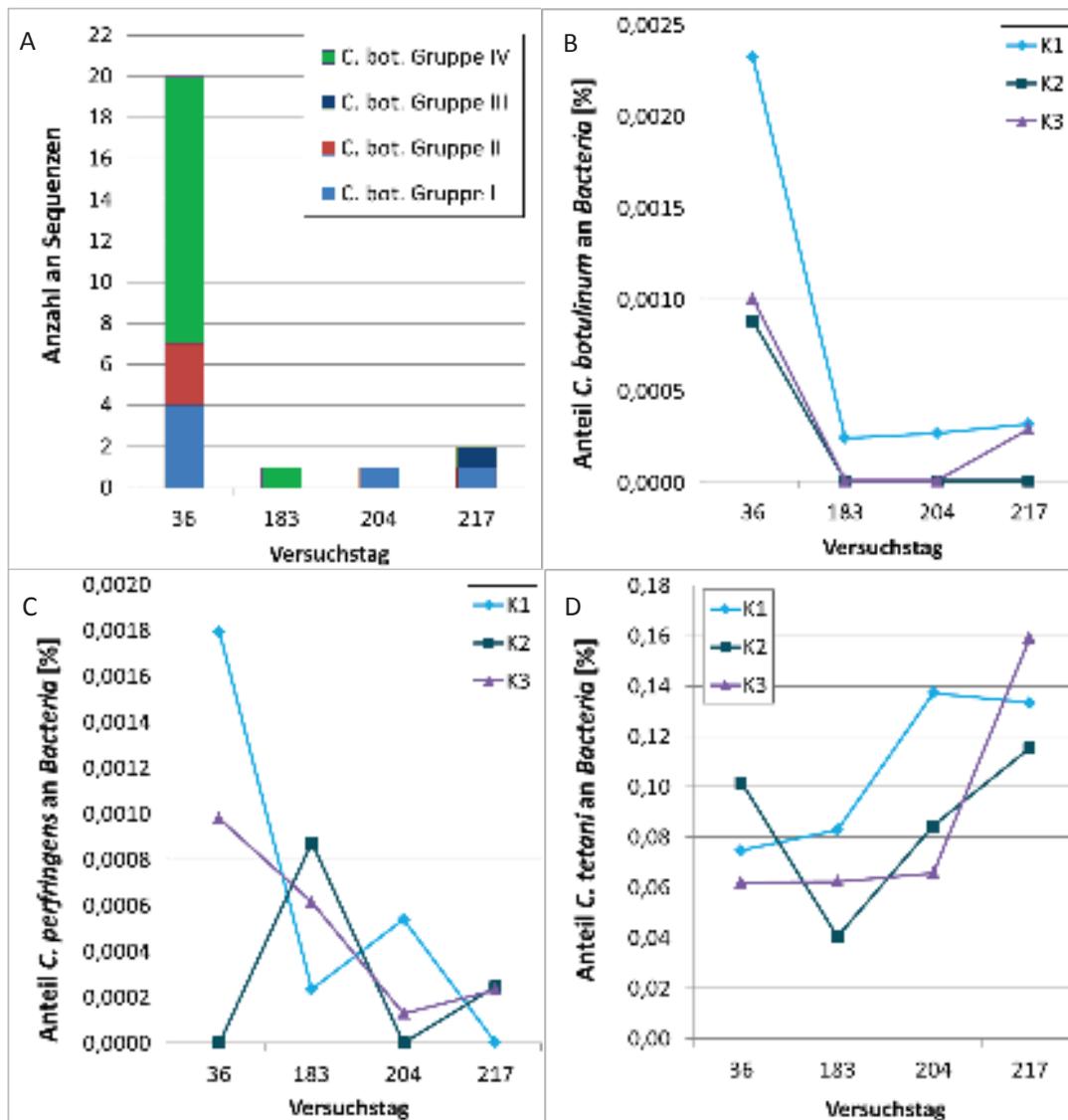


Abbildung 21: Vorkommen von ribosomalen Markergenen im quasikontinuierlichem Versuch KI. Anzahl (A) und relative Abundanz (B, C, D) von Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit ($\geq 97\%$) zu *C. botulinum* (A, B), *C. perfringens* (C) und *C. tetani* (D).

Quasikontinuierlicher Versuch KII: Zuckerrübe mit HTK

Insgesamt wurden aus dem Versuch der quasikontinuierlichen Fermentation von Zuckerrübe mit HTK 5.940.804 ribosomale Markergene von Bakterien analysiert, sodass jeder Datensatz auf ca. 165.000 Sequenzen basierte. Der Anteil der Sequenzen, die sich der Klasse der *Clostridia* zuordnen ließen lag bei 54% und der Anteil von *Clostridium* Cluster I bei 1%.

Der Nachweis von Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* erfolgte nah an der Nachweisgrenze. Insgesamt wurden in den 36 Datensätzen 53 Sequenzen identifiziert, die sich den phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen I, II und IV von *C. botulinum* zuordnen ließen (Abbildung 22). Während der gesamten Versuchsdauer gab es keine signifikanten Unterschiede des Anteils von $0,0010 \pm 0,0019\%$ der Bakterien. Auch der Anteil der Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. perfringens* lag während der gesamten Versuchsdauer unverändert bei $0,0008 \pm 0,0011\%$ und war mit insgesamt 46 Sequenzen kaum nachweisbar. Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. chauvoei* wurden nicht erkannt. Insgesamt 3.408 Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. tetani* wurden identifiziert. Deren Anteil lag während der Fermentation stabil bei $0,06 \pm 0,03\%$ und stieg nach der induzierten Überlastung im Vergleich zu vorher (Tag 144) signifikant auf $0,07 \pm 0,01\%$ an.

Quasikontinuierlicher Versuch KIII: Maissilage mit Rindergülle

Aus dem Versuch der quasikontinuierlichen Fermentation von Maissilage mit Rindergülle wurden insgesamt 7.694.261 ribosomale Markergene von Bakterien gewonnen. Dies waren im Durchschnitt 214.000 Sequenzen je Datensatz. Durchschnittlich 43% der Bakterien wurden der Klasse *Clostridia* zugeordnet und 3% dem Cluster I der Clostridien.

Wie bei den anderen quasikontinuierlichen Fermentern erfolgte auch hier der Nachweis von Sequenzen einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* mit 24 Sequenzen nah an der Nachweisgrenze (Abbildung 23). Die Sequenzen ließen sich den phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen I und II von *C. botulinum* zuordnen. Während der gesamten Versuchsdauer blieb der Anteil unverändert bei $0,0003 \pm 0,0004\%$ der Bakterien. Auch der Nachweis von Sequenzen einer hohen Ähnlichkeit zu *C. perfringens* erfolgte mit ein oder zwei Sequenzen je Datensatz an der Nachweisgrenze. Insgesamt wurden 6 Sequenzen identifiziert, sodass sich eine mittlere Abundanz von $0,00008 \pm 0,00022\%$ ergab. Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. chauvoei* wurden nicht identifiziert. Insgesamt wurden 469 Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. tetani* erkannt. Der Anteil war zu Beginn mit $0,013 \pm 0,002\%$ am höchsten und reduzierte sich dann signifikant auf $0,006 \pm 0,002\%$. Die Überlastung führte zu einer weiteren Reduktion auf $0,002 \pm 0,001\%$.

Grundsätzlich lag der Anteil an Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* und *C. perfringens* in allen quasikontinuierlichen Fermentern im Bereich der Nachweisgrenze. In den 18,3 Millionen Sequenzen der ribosomale Markergene von Bakterien wurden nur 101 Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. botulinum* bzw. 77 Sequenzen mit einer Ähnlichkeit zu *C. perfringens* identifiziert. Bei *C. botulinum* verteilen sich die Sequenzen auf alle 4 phylogenetischen Gruppen, wobei Gruppe III, die mit den Botulinum Neurotoxinen Typen C und D assoziiert ist, nur durch eine Sequenz angezeigt war. Am stärksten war Gruppe IV mit 56 Sequenzen vertreten. Gruppe IV ist mit dem Neurotoxin Typ G assoziiert dessen Pathogenität nicht belegt ist (Food and Drug Administration, 2012). Die verbleibenden 31 und 13 Sequenzen fallen auf die Gruppen I bzw. II, die mit den Botulinum Neurotoxinen Typen A, B, E und F assoziiert sind. Für diese Neurotoxintypen wurde jeweils ein PCR-basierter spezifischer Nachweis durchgeführt, der in allen Proben für die vier Neurotoxin Typen negativ ausfiel. Während der Fermentation der drei unterschiedlichen Substratmischungen KI, KII und KIII zeigte sich keine signifikante

Zunahme der Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu *C. botulinum* und *C. perfringens*. Die zusätzliche Substratgabe während der Überlastungsphase führte ebenfalls zu keinen Veränderungen.

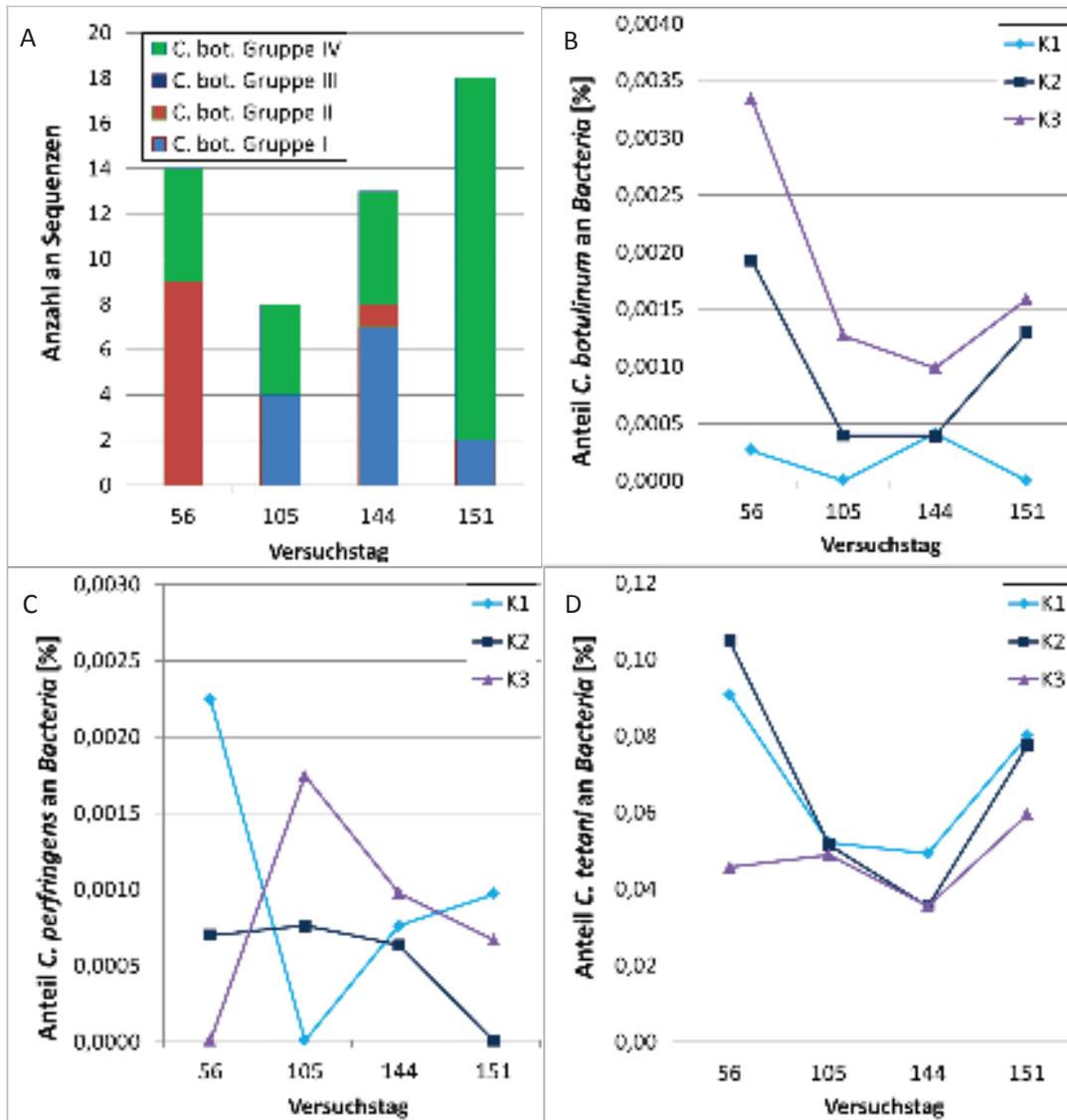


Abbildung 22: Vorkommen von ribosomalen Markergenen im quasikontinuierlichem Versuch KII. Anzahl (A) und relative Abundanz (B, C, D) von Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit ($\geq 97\%$) zu *C. botulinum* (A, B), *C. perfringens* (C) und *C. tetani* (D).

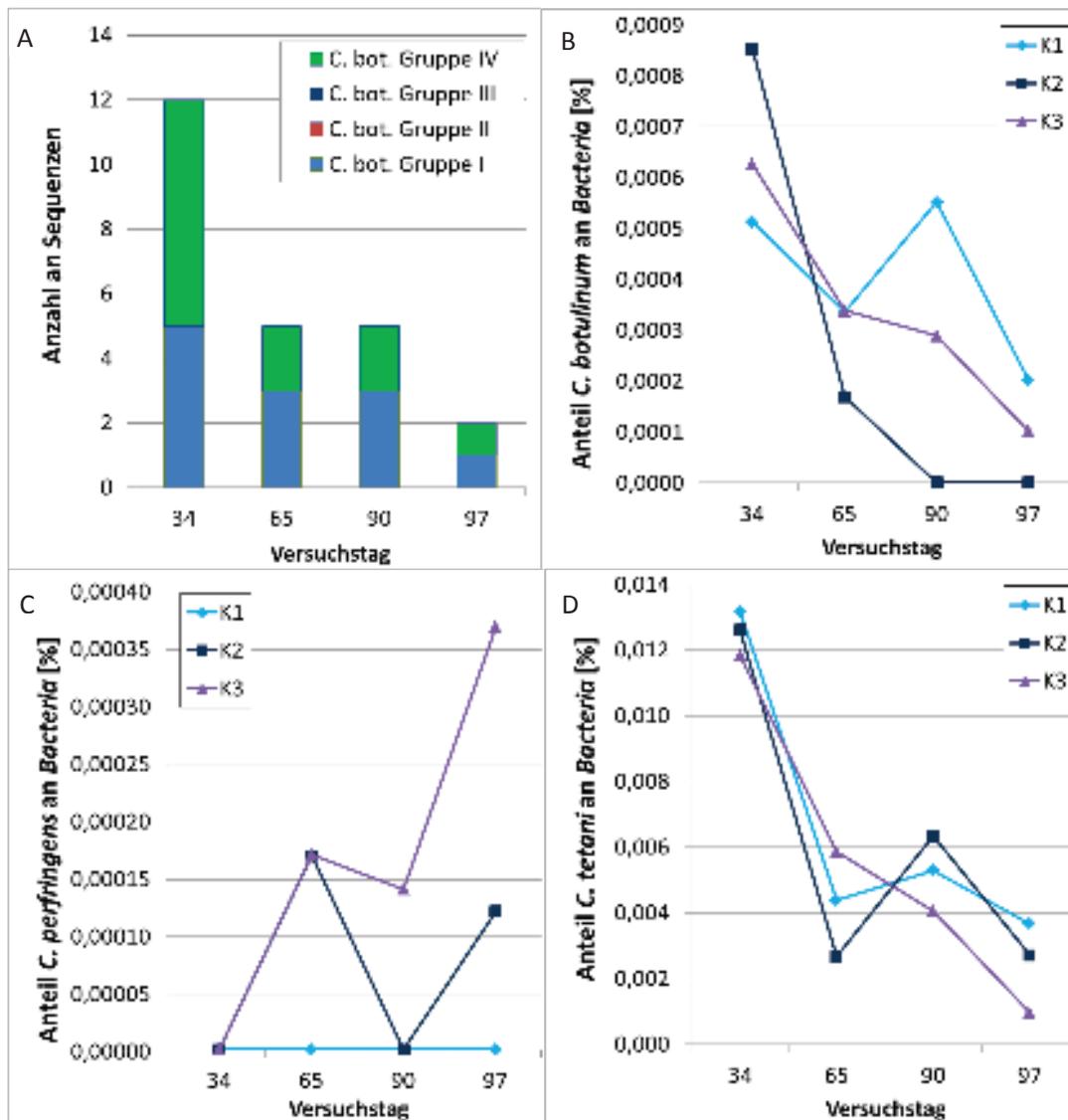


Abbildung 23: Vorkommen von ribosomalen Markergenen im quasikontinuierlichem Versuch KIII. Anzahl (A) und relative Abundanz (B, C, D) von Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit ($\geq 97\%$) zu *C. botulinum* (A, B), *C. perfringens* (C) und *C. tetani* (D).

Auch für die Anteile der Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu *C. tetani* ergab sich bei keiner der Substratmischungen eine Zunahme während der Fermentation. Im Gegenteil; es kam bei den Substratmischungen in KII und KIII sogar zu einer Reduktion der Anteile. Die zusätzliche Substratgabe während der Überlastungsphase folgte keinem allgemeinen Schema, denn in den Fermentern, in denen HTK mit umgesetzt wurde (KI und KII) ergab sich ein Anstieg des Anteils gegenüber früheren Zeitpunkten, während es bei der Umsetzung mit Rindergülle (KIII) zu einer weiteren Reduktion kam.

Um den Einfluss der unterschiedlichen Substratmischungen, die in KI, KII und KIII eingesetzt wurden, zu beurteilen, wurden die Abundanzen zum Zeitpunkt der dritten Probenahme, also unter stabilen Produktionsbedingungen, verglichen. Es zeigte sich, dass die Abundanz von Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* für die drei Substratmischungen vergleichbar war ($0,0003 \pm 0,0005\%$). Dies war auch in den beiden Substratmischungen mit HTK (KI und KII) für die Anteile von *C. perfringens* der Fall ($0,0005 \pm 0,0006$). Jedoch war der Anteil während der Fermentation von Zuckerrübe und HTK (KII) gegenüber dem der Fermentation von Maissilage mit Rindergülle (KIII) signifikant erhöht. Der Anteil von *C. tetani* war stark durch die jeweiligen Substratmischungen beeinflusst und bei der Fermentation von Maissilage mit HTK (KI) am höchsten ($0,10 \pm 0,3\%$). Unter der Fermentation von Zuckerrübe mit HTK (KII) reduzierte sich der Anteil auf $0,04 \pm 0,01\%$ und bei der Fermentation von Maissilage Rindergülle (KIII) lag er bei $0,005 \pm 0,002\%$.

5.3 Praxisanlagen

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der neun untersuchten Biogasanlagen dargestellt. Die prozessbiologischen Parameter (pH, FOS/TAC, Säurespektrum, $\text{NH}_4\text{-N}$) wiesen je nach Inputsubstraten, unterschiedliche Werte auf. Die Biogasanlagen wurden anhand der gefütterten Substrate in NaWaRo, Rindergüllen, Schweinegüllen und HTK Biogasanlagen aufgeteilt (vgl. Tab.3)

5.3.1 Chemische Charakterisierung - Praxisanlagen

Für alle Praxisanlagen P1-P9 wiesen die untersuchten Proben keine eindeutige Prozessstörung auf. Der FOS/TAC-Wert lag in den Fermentern zwischen 0,15 und 0,24. Der Fermenter der Praxisanlage P6 wies mit einem FOS/TAC-Wert von 0,33 und einem Essigsäurewert von 1.427 mg/l im Säurespektrum auf eine mögliche leichte Störung hin. In allen untersuchten Proben waren keine Störsäuren (Butter-, Valerian- und Capronsäure) nachweisbar, bis auf einen Wert von 48 mg/l iso-Buttersäure im Fermenter der Biogasanlage P8. Dieser Wert lag jedoch sehr knapp über der Nachweisgrenze von 30 mg/l. Die Ammonium-N Gehalte schwankten je nach Inputsubstraten zwischen 1,2 g/l und 3,9 g/l. Die höchsten $\text{NH}_4\text{-N}$ -Werte wiesen Fermenter und Nachgärer der Biogasanlage P4 auf. Dies ließ sich durch den Anteil an Mist, Gülle und HTK an der Gesamtfütterungsmenge erklären. Der pH-Wert der Hauptfermenter lag zwischen 7,6 und 7,9. Die Analysenparameter der einzelnen Biogasanlagen sind in den Anhängen A 1 bis A6 detailliert dargestellt. Die Makro- und Mikronährstoffversorgung der untersuchten Behälterinhalte ist in den Abbildungen 24 und 25 dargestellt.

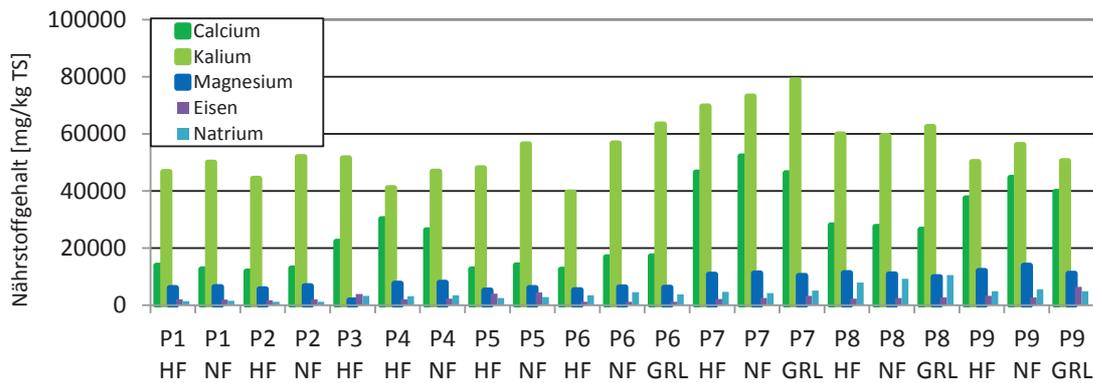


Abbildung 24: Makronährstoffversorgung der untersuchten Fermenter (HF), Nachgärer (NF) und Gärrestlager (GRL). Die unterschiedlichen Zahlen bezeichnen verschiedene Praxisanlagen in Niedersachsen

Die Gehalte an Magnesium und Calcium waren in der Biogasanlage P7 am höchsten und in der Biogasanlage P6 am geringsten. Durch die unterschiedlichen Inputs substrate der einzelnen Anlagen variierte der Nährstoffgehalt deutlich. Des Weiteren wurden von den meisten Biogasanlagenbetreibern Spurenelementpräparate zugesetzt, welche die Nährstoffkonzentration beeinflussten.

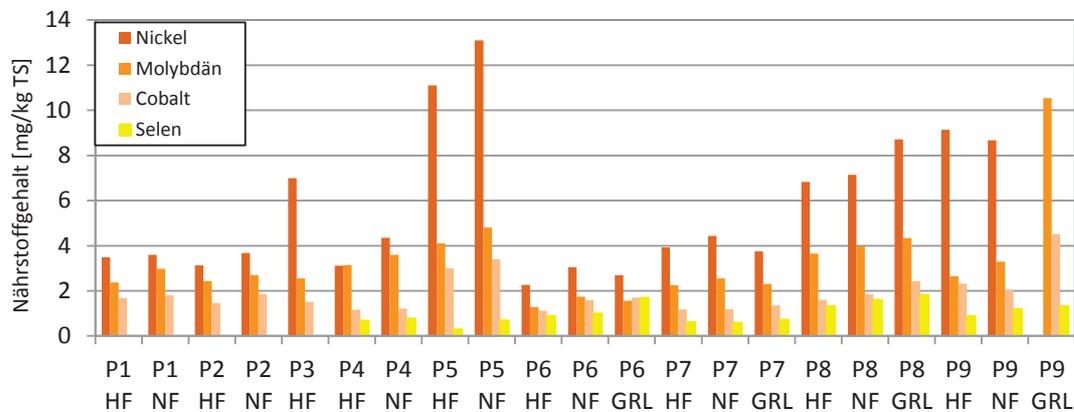


Abbildung 25: Mikronährstoffversorgung der untersuchten Fermenter, Nachgärer und Gärrestlager

In der Biogasanlage P5 und P8 wurden hohe Nickel- und Molybdänkonzentrationen gemessen. Die Biogasanlage P9 wies ebenfalls hohe Nickelkonzentrationen auf. Die Biogasanlagen P5 und P8 erhielten neben Maissilage auch Schweinegülle und HTK und die Biogasanlage P9 bekam einen hohen Anteil an Rindergülle. In der Literatur wurden ebenfalls deutliche Konzentrationsunterschiede der einzelnen Elemente, je nach Substrat festgestellt (Sauer, 2009). Die Werte beziehen sich jedoch auf kg TS, dabei ist zu berücksichtigen, dass sich in Bezug auf die Frischmassen, die Konzentrationen, vor allem durch den

hohen Wassergehalt von Gülle, ändern. Die analysierten Werte sind in den Anhängen A3 und A4 bezogen auf Trockensubstanz und Frischmasse dargestellt.

5.3.2 Mikrobiologische Charakterisierung - Praxisanlagen

Die mikrobiologische Charakterisierung der Praxisanlagen ergab für alle Fermenterproben einen vergleichbaren Gehalt an ribosomalen Markergenen für *Bacteria* von ca. 10^6 ng⁻¹ DNA und für *Archaea* von ca. 10^5 ng⁻¹ DNA.

5.3.2.1 Gruppenspezifische Hochdurchsatzsequenzierung zur Darstellung der Vielfalt innerhalb *Clostridium* Cluster I

Zur Darstellung der Vielfalt von *Clostridium* Cluster I in den Praxisanlagen P1 und P2 wurde eine für diese Gruppe spezifische Hochdurchsatzsequenzierung angewandt. Beide Anlagen waren baugleich und wurden mit identischen Chargen an Maissilage und Getreideganzpflanzensilage beschickt, wobei nur die Anlage P1 zusätzlich Rindergülle erhielt. Die hier erzielten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht:

- Dohrmann AB, Walz M, Loewen A, Tebbe C (2015) *Clostridium* cluster I and their pathogenic members in a full-scale operating biogas plant. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(8):3585-3598, doi:10.1007/s00253-014-6261-y

und lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Insgesamt wurden 581.934 ribosomale Markergensequenzen zur Charakterisierung von *Clostridium* Cluster I aus den drei Substraten Maissilage, Ganzpflanzensilage und Rindergülle, sowie aus Haupt- und Nachfermentern beider Praxisanlagen gewonnen. Es zeigte sich, dass sich die Zusammensetzung der Gemeinschaft von *Clostridium* Cluster I in den Substraten und auch in allen vier Fermentern voneinander unterschied.

Ribosomale Markergensequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit ($\geq 97\%$) zu *C. perfringens*, *C. chauvoei* und *C. tetani* wurden nicht identifiziert. Der Nachweis von Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* erfolgte nah an der Nachweisgrenze in allen Substraten und Fermentern und machte weniger als 0,01% der *Clostridium* Cluster I Sequenzen aus. Es ergab sich kein Hinweis auf eine unbeabsichtigte Vermehrung dieser Gruppe von Bakterien im Verlauf der Fermentation vom Hauptgärer zum Nachgärer. Ebenso ergab sich kein Hinweis auf einen Anstieg dieser Sequenzen durch die Zugabe von Rindergülle. Die gezielte Untersuchung ausgewählter Substrate und einer Fermenterprobe auf die Anwesenheit aktiven Botulinum Neurotoxins im Maus-Bioassay war negativ.

5.3.2.2 Universelle Hochdurchsatzsequenzierung der Bakterien

Zur Charakterisierung der Gemeinschaft von *Clostridium* Cluster I wurde eine universal alle Bakterien erfassende Hochdurchsatzsequenzierung ausgewählt, da sich die gruppenspezifische Hochdurchsatzsequenzierung als problematisch erwies. Technische Entwicklungen der

Sequenziertechnologien ermöglichten zudem die Sequenzierung von ca. 10-mal mehr Sequenzen, sodass trotz des universalen Ansatzes mit einer ausreichenden Anzahl an Sequenzen von *Clostridium* Cluster I zu rechnen war.

Die Bakteriengemeinschaften wurden in insgesamt 21 Proben aus Fermentern und Gärresten der Praxisanlagen bestimmt. Dafür wurden von jedem Material zwei unabhängige DNA-Extrakte gewonnen, die in je drei-facher Wiederholung sequenziert wurden. So wurden insgesamt 126 Datensätze mit Sequenzen gewonnen, die jedes Material in sechsfache Wiederholung beschreiben.

Insgesamt wurden die 21 Proben durch 20.399.452 ribosomale Markergene von Bakterien charakterisiert, sodass im Durchschnitt jeder Datensatz auf 162.000 Sequenzen basierte und somit knapp eine Million Sequenzen zur Charakterisierung jeder Probe zur Verfügung standen (Abbildung 26). Die Größe der Datensätze ermöglichte es, den Großteil der erwarteten Vielfalt von Bakterien zu beschreiben. Es ist davon auszugehen, dass im Durchschnitt $95 \pm 1\%$ der Vielfalt erfasst wurden (Abbildung 27).

Im Mittel ließen sich $46 \pm 9\%$ der Sequenzen der Klasse *Clostridia* zuordnen wobei die Werte im Bereich von 32% bis zu 64% lagen (Abbildung 28). Der Anteil der Sequenzen die *Clostridium* Cluster I zugeordnet wurden lag im Bereich von 0,3% bis zu 28% bei einem Durchschnitt von $6,2 \pm 6,9\%$ (Abbildung 29). Ein Zusammenhang beider Populationen ließ sich nicht erkennen, sodass die Populationsgröße der Klasse *Clostridia* keine Vorhersage des Anteils von *Clostridium* Cluster I erlaubt.

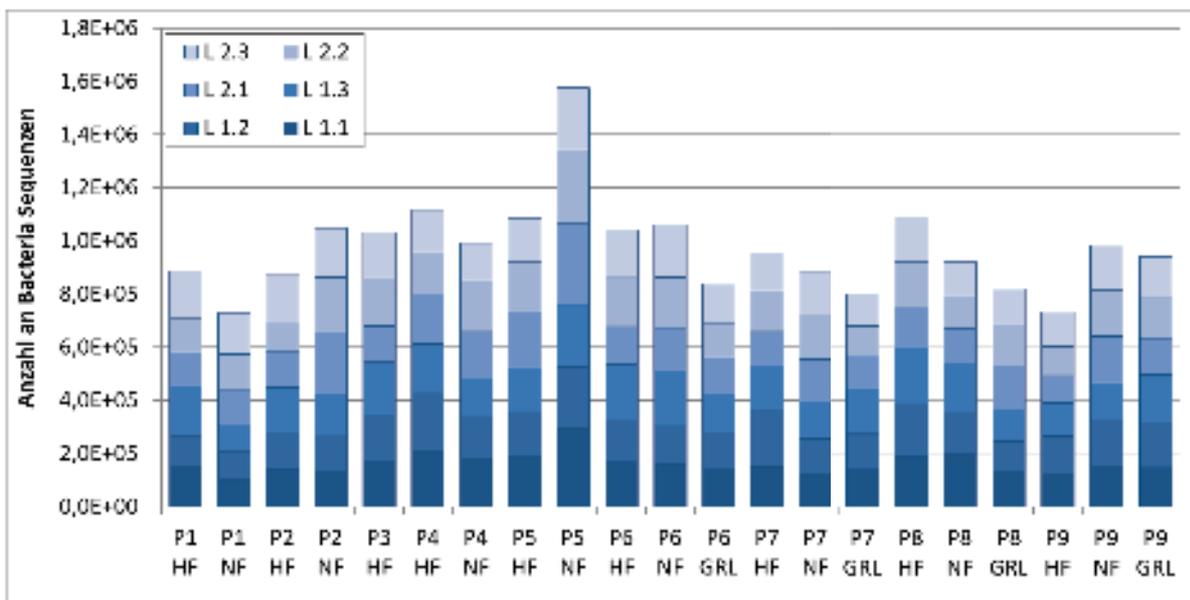


Abbildung 26: Anzahl an bakteriellen 16S rRNA Gen Sequenzen die für jede Biogasanlage generiert wurden. Aufsummierung von je 6 Sequenzierreaktionen. Für Abkürzungen vgl. Abb. 24

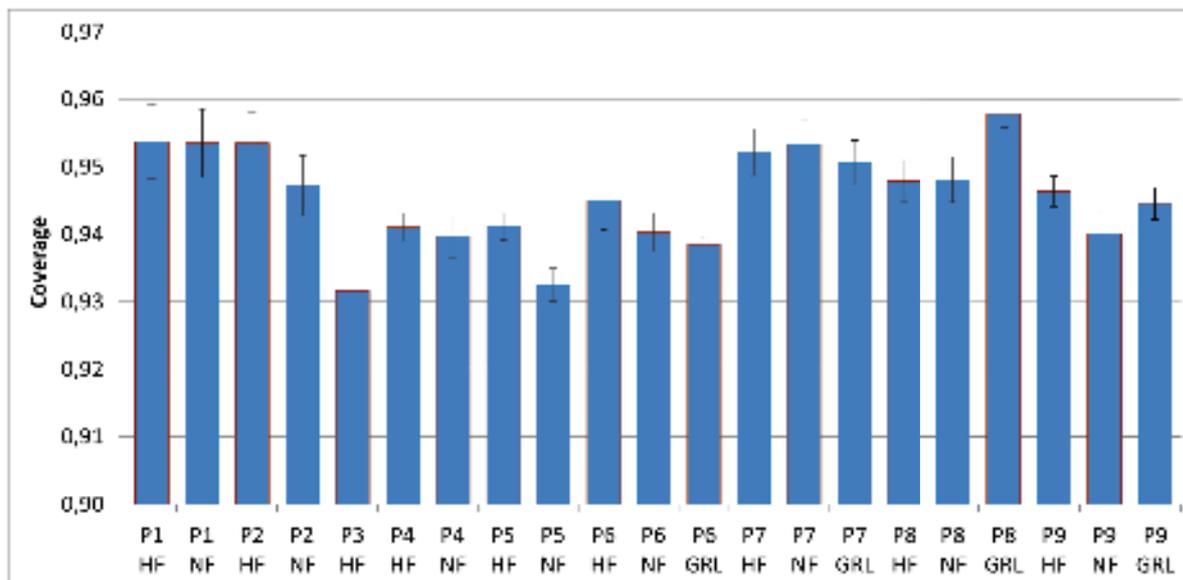


Abbildung 27: Good's Coverage. Die Coverage gibt Auskunft darüber, wie viel von der theoretisch zu erwartenden bakteriellen Vielfalt durch den Datensatz beschrieben wurde.

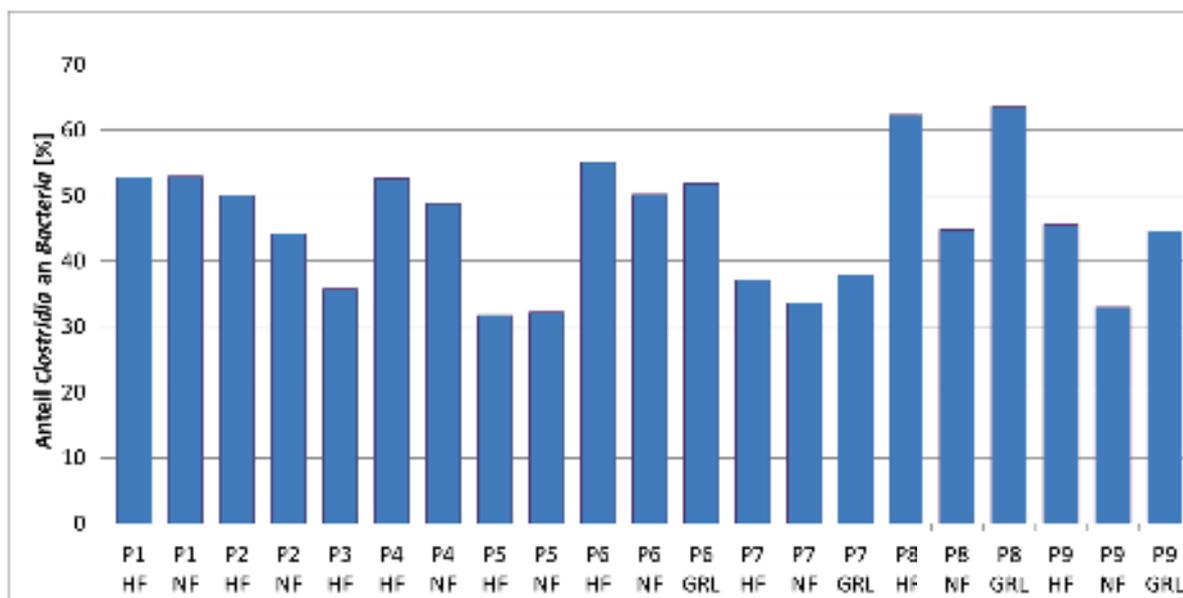


Abbildung 28: Anteil der Sequenzen die der Klasse der *Clostridia* zugeordnet wurden. Für Abkürzungen vgl. Abb. 24

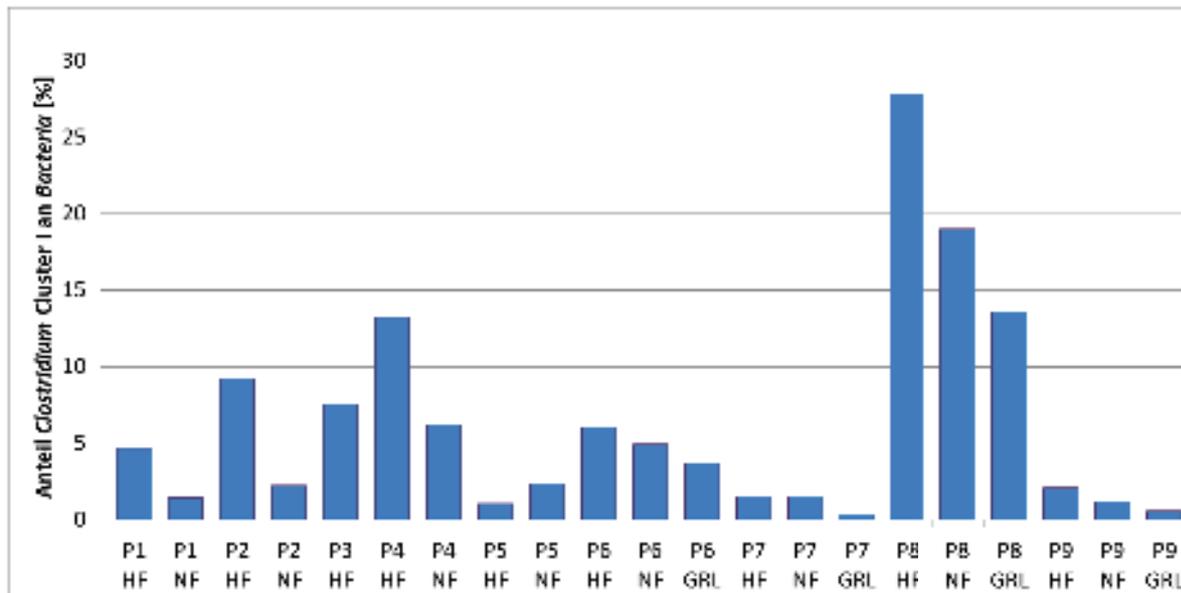


Abbildung 29: Anteil der Sequenzen die der Gattung der *Clostridium* Cluster I zugeordnet wurden. Für Abkürzungen vgl. Abb. 24

In allen untersuchten Materialien ließen sich ribosomale Markergene mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* nachweisen. Im Allgemeinen war der Anteil dieser Gruppe an den Bakterien sehr gering und häufig am Rande der Nachweisgrenze. So konnte für die 20 Millionen ribosomalen Markergenen der Bakterien nur für 623 Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit zu *C. botulinum* berechnet werden (Abbildung 30). Eine differenzierte Betrachtung der vier phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen von *C. botulinum* ergab, dass die vier Gruppen unterschiedlich stark in den Bakteriengemeinschaften vertreten waren. Am häufigsten waren Sequenzen, die sich der Gruppe I zuordnen ließen und in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden konnten (330 Sequenzen). Am zweit stärksten waren Sequenzen vertreten, die sich der Gruppe IV zuordnen ließen. Diese Gruppe konnte außer am Standort der Anlagen P1 und P2 an allen anderen Standorten und dort in allen Materialien nachgewiesen werden (241 Sequenzen). Die Gruppe II war deutlich seltener vorhanden: nur 50 Sequenzen ließen sich dieser Gruppe zuordnen. Trotzdem wurde Gruppe II an allen Standorten nachweisen, jedoch nicht in allen untersuchten Materialien. Die Gruppe III wurde nur in einem Material durch 2 Sequenzen angezeigt.

Fasst man alle vier Gruppen zusammen, so lag der Anteil im Mittel bei $0,003 \pm 0,004\%$ und reichte von $0,001\%$ bis $0,02\%$ (Abbildung 31). Ein Vergleich der Anteile in den Hauptfermentern (HF) zeigte zum Teil signifikante Unterschiede in den einzelnen Praxisanlagen auf, da der Anteil in P3 signifikant höher war, als in den Anlagen P5, P6 und P7. In den Nachfermentern (NF) war in Anlage P9 der Anteil signifikant höhere als in P2. Ein ursächlicher Einfluss, der auf den Zusatz eines bestimmten Substrates zurückgeht war jedoch nicht erkennbar. Die separate Betrachtung jeder Biogasanlage für sich ergab, dass es zu keiner signifikanten Zunahme während der Fermentation kam, da sich die Anteile in Haupt- und Nachfermenter jeweils nicht voneinander unterschieden. In P9 zeigte sich jedoch ein Einfluss der

Lagerung, da der Anteil im Gärrestlager gegenüber den Anteilen in den Fermentern signifikant erhöht war. Dieser Anstieg war allein durch Sequenzen von *C. botulinum* Gruppe IV verursacht. Ein Zusammenhang des Anteils von Sequenzen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. botulinum* und der Populationsgröße der Klasse *Clostridia* sowie von *Clostridium* Cluster I ließ sich nicht erkennen, sodass letztere Populationsgrößen keine Vorhersage des Anteils von *C. botulinum* ähnlichen Sequenzen erlauben.

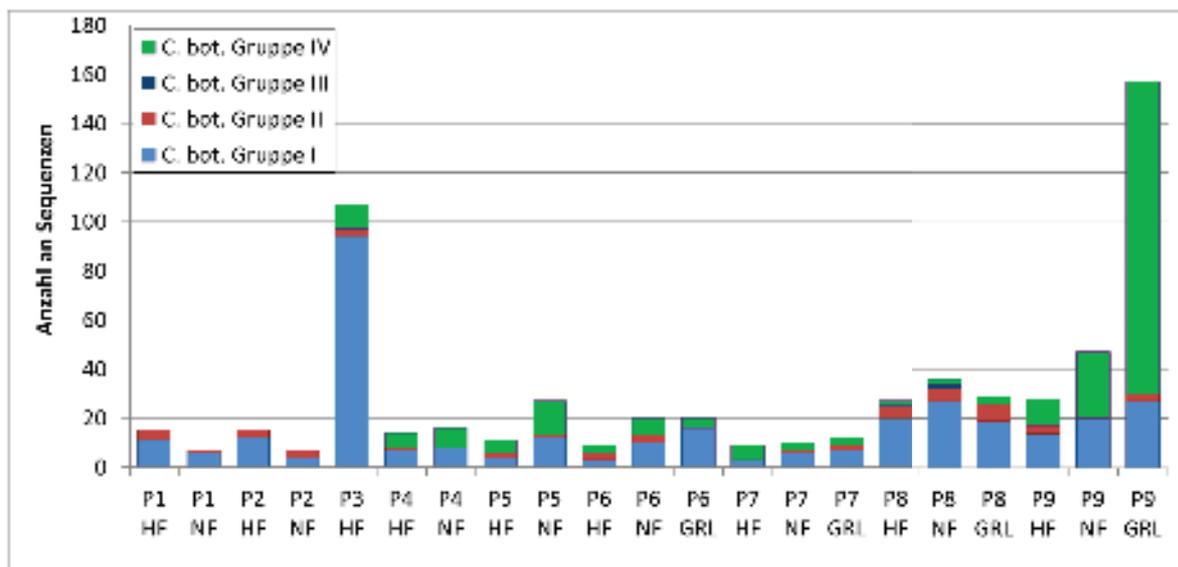


Abbildung 30: Anzahl von Sequenzen mit einer Sequenzähnlichkeit $\geq 97\%$ zu 16S rRNA Genen von *C. botulinum* in den Praxisanlagen. Aufgliederung entsprechend der vier phylogenetisch unterschiedlichen Gruppen von *C. botulinum*. Summe aus den 6 Sequenzierreaktionen. Für Abkürzungen siehe Abb. 24

Auch der Nachweis von ribosomalen Markergenen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. perfringens* erfolgte mit insgesamt 244 Sequenzen am unteren Ende der Nachweisgrenze. Die Sequenzen wurden in allen Biogasanlagen nachgewiesen, am Standort der Anlage P8 jedoch nur in den Gärresten und nicht in den Fermentern. So lag der Anteil im Mittel bei $0,001 \pm 0,001\%$ und schwankte bei positivem Nachweis zwischen $0,0001$ bis $0,004\%$ (Abbildung 32). Für die individuellen Anlagen ergaben sich zum Teil signifikante Unterschiede. So war der Anteil im Hauptfermenter (HF) der Anlage P4 signifikant höher als in P7 und P8. Bei den Nachfermentern (NF) zeigten sich in P1 und P4 jeweils höhere Anteile als in P7 und P8. Die separate Betrachtung jeder Biogasanlage für sich ergab, dass es zu keiner signifikanten Zunahme während der Fermentation kam, da sich die Anteile in Haupt- und Nachfermenter jeweils nicht voneinander unterschieden. In P8 zeigte sich jedoch ein Einfluss der Lagerung, da der Anteil im Gärrestlager gegenüber dem Anteil im Hauptfermenter signifikant erhöht war.

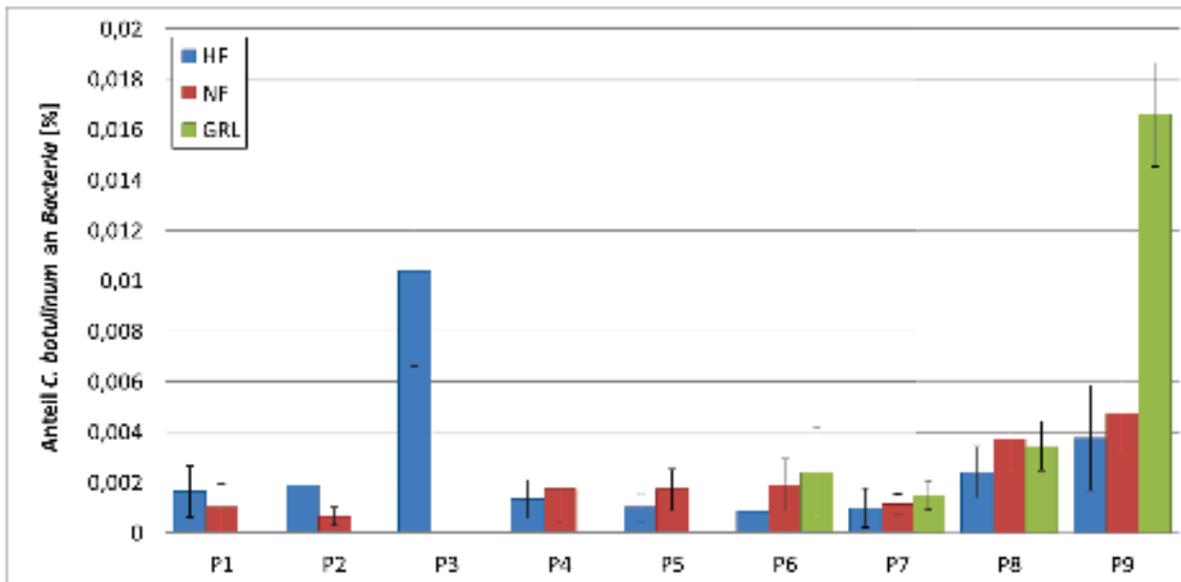


Abbildung 31: Relative Abundanz von Sequenzen mit einer Sequenzähnlichkeit $\geq 97\%$ zu 16S rRNA Genen von *C. botulinum* in den Praxisanlagen. Die Zahlen bezeichnen unterschiedliche Biogasanlagen

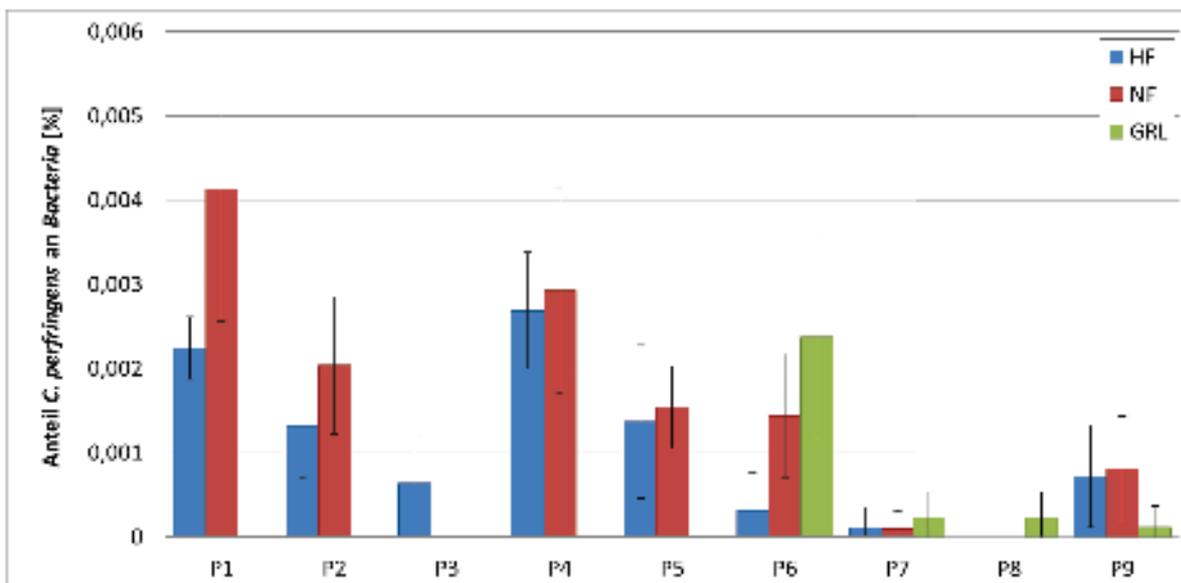


Abbildung 32: Relative Abundanz von Sequenzen mit einer Sequenzähnlichkeit $\geq 97\%$ zu 16S rRNA Genen von *C. perfringens* in den Praxisanlagen. Die Zahlen bezeichnen unterschiedliche Biogasanlagen

Der Nachweis von ribosomalen Markergenen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. tetani* erfolgte im Vergleich zu den beiden anderen Clostridien *C. botulinum* und *C. perfringens* mit 3066 Sequenzen häufiger. Der Anteil lag im Mittel bei $0,014 \pm 0,017\%$ und schwankte im Bereich von 0,0001 bis 0,074% (Abbildung 33). Unterschiede im Gehalt traten sowohl zwischen den Anlagen, als auch innerhalb einer Anlage zwischen den verschiedenen Fermentern bzw. Behältern auf. So war der Anteile im Hauptfermenter (HF) der Anlagen P3 und P4 signifikant höher als in P7. Und in den Nachfermentern (NF) der Anlagen P4 und P5 waren die Anteile jeweils signifikant höher als in P7 und P9. Ein Einfluss durch den Prozess zeigte sich in den Anlagen P4 und P9, wo es zu einer signifikanten Reduktion des Anteils vom Hauptfermenter zum Nachfermenter kam, während der Anteil in Anlage P5 zunahm. Auch während der Lagerung gab es noch Veränderungen. So erfolgte in den Anlagen P6 und P8 eine Reduktion, da die Anteile in den jeweiligen Gärrestlagern signifikant kleiner waren als während der Biogasbildung in den Fermentern.

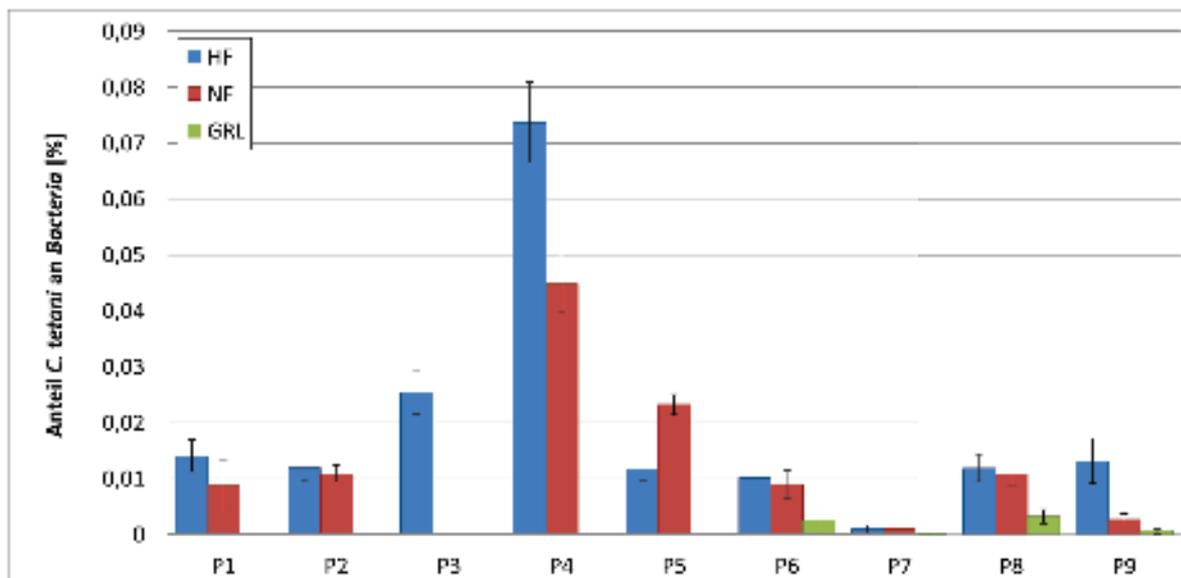


Abbildung 33: Relative Abundanz von Sequenzen mit einer Sequenzähnlichkeit $\geq 97\%$ zu 16S rRNA Genen von *C. tetani* in unterschiedlichen Praxisanlagen (P1 bis P9).

Der Nachweis von ribosomalen Markergenen mit einer hohen Ähnlichkeit zu *C. chauvoei* war nur im Hauptfermenter der Biogasanlage P7 positiv, wo im Datensatz 2 Sequenzen identifiziert werden konnten (Abbildung 34). In allen anderen Anlagen war der Nachweis negativ.

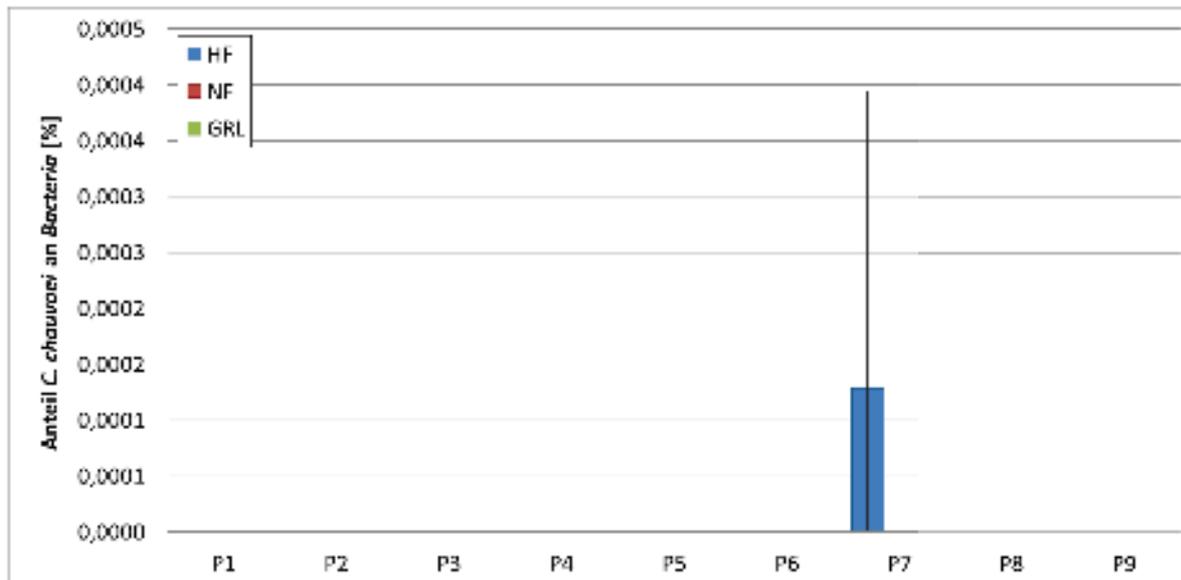


Abbildung 34: Relative Abundanz von Sequenzen mit einer Sequenzähnlichkeit $\geq 97\%$ zu 16S rRNA Genen von *C. chauvoei* in den Praxisanlagen. Für Abkürzungen siehe Abb. 24.

Für die Botulinum Neurotoxinen Typen A, B, E und F, die mit den phylogenetischen Gruppen I und II von *C. botulinum* assoziiert sind, wurde jeweils ein PCR-basierter spezifischer Nachweis durchgeführt, der in allen Proben für die vier Neurotoxin Typen negativ ausfiel. Zudem wurde für jedes dieser vier Toxine eine synthetische Kontrolle generiert, die jeder Nachweisreaktion zugesetzt wurde. Somit konnte ein negativer Befund, der auf einer Hemmung der Nachweisreaktion basierte, ausgeschlossen werden.

6 Danksagung

Wir danken Britta Müller, Karin Trescher und Jana Usarek für exzellente technische Unterstützung und Dr. Astrid Näther für die Hilfe bei den Probenahmen. Martin Bolz (Thünen Institut) danken wir für seine Unterstützung im IT Bereich. Besonders möchten wir uns bei den Anlagenbetreibern der untersuchten Biogasanlagen für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und Unterstützung dieses Projektes bedanken. Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Rottmann-Meyer vom Kompetenzzentrum 3N, die bei der Kontaktaufnahme zu den Biogasanlagen behilflich war. Diese Untersuchungen wurden durch die finanzielle Förderung des Niedersächsischen Ministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Hannover, unter dem Förderkennzeichen 105.3234/1-5(33) ermöglicht, wofür wir uns ausdrücklich bedanken möchten.

7 Literatur

Böhnel, H., Schwagerick, B., and Gessler, F. (2001) Visceral botulism - A new form of bovine *Clostridium botulinum* toxication. *Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine* **48**: 373-383.

Caya, J.G., Agni, R., and Miller, J.E. (2004) *Clostridium botulinum* and the clinical laboratorian - A detailed review of botulism, including biological warfare ramifications of botulinum toxin. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **128**: 653-662.

Centers for Disease Control and Prevention (1998) Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers, Atlanta, GA. Centers for Disease Control and Prevention

Collins, M.D., and East, A.K. (1998) Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 5-17.

Craven, K.E., Ferreira, J.L., Harrison, M.A., and Edmonds, P. (2002) Specific detection of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F using the polymerase chain reaction. *Journal of AOAC International* **85**: 1025-1028.

Dahlenborg, M., Borch, E., and Radstrom, P. (2001) Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4781-4788.

DIN EN 12880:2001-02: Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts. Deutsche Fassung. Beuth Verlag. 2001

DIN EN 12879:2001-02: Charakterisierung von Schlämmen – Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse. Deutsche Fassung. Beuth Verlag. 2001

DIN EN 15933:2012-11: Schlamm, behandelter Bioabfall und Boden - Bestimmung des pH-Werts. Deutsche Fassung. Beuth Verlag. 2012.

DIN 38406-5:1983-10:Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-,Abwasser- und Schlammuntersuchung; Kationen (Gruppe E); Bestimmung des Ammonium-Stickstoffs (E5). Beuth Verlag. 1983.

DIN EN ISO 11885:2009-09: Wasserbeschaffenheit – Bestimmung von ausgewählten Elementen durch induktiv gekoppelte Plasma-Atom-Emissionsspektrometrie (ICP-OES). Deutsche Fassung. Beuth Verlag. 2009.

DIN EN ISO 17294-2: Wasserbeschaffenheit – Anwendung der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS)- Teil 2. Bestimmung von 62 Elementen. Deutsche Fassung. 2005

- Dohrmann, A.B., Baumert, S., Klingebiel, L., Weiland, P., and Tebbe, CC. (2011) Bacterial community structure in experimental methanogenic bioreactors and search for pathogenic clostridia as community members. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**:1991-2004, doi:10.1007/s00253-010-2955-y
- Dohrmann, A.B., Walz, M., Loewen, A., and Tebbe, CC. (2015) *Clostridium* cluster I and their pathogenic members in a full-scale operating biogas plant. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**:3585-3598. doi:10.1007/s00253-014-6261-y
- Eder, B. (Hrsg.). (2005) Biogaspraxis, Grundlagen, Planung, Anlagenbau, Beispiele, Wirtschaftlichkeit, Umwelt. 5. Auflage, Ökobuch Verlag.
- Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Dargaignaratz, C., Botella, L., Gourreau, J.M., Carlin, F., Popoff, M.R., and Broussolle, V. (2002) Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(12):5870-5876.
- Feher, A. und Zelinski, V. (2010) Bestimmung von Carbonsäuren (C2-C6) mittels HPLC-UV. Standardarbeitsanweisung. Version C. HAWK Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst. 02.11.2010.
- FNR (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, Hrsg.). (2005) Handreichung. Biogasgewinnung und –nutzung.
- FNR (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, Hrsg.). (2010) Leitfaden Biogas, Von der Gewinnung bis zur Nutzung, 5. Auflage. S.25+S.90.
- Food and Drug Administration. (2012) Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. *Clostridium botulinum*, pp.108
- Fritz, T. und Zelinski, V. (2008) Bestimmung des FOS/TAC-Verhältnisses mittels Titration. Standardarbeitsanweisung. Version A. HAWK Hochschule für angewandte Wissenschaft und Kunst. 02.04.2008.
- Hecht, M. (2008) Bedeutung des Carbonatpuffersystems für die Stabilität des Gärprozesses landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Dissertation. Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Johnson, A. L., McAdams, S. C., and Whitlock, R. H. (2010). Type A botulism in horses in the United States: A Review of the past Ten Years (1998–2008). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **22**, 165–173.
- Kaltschmitt, M., Hartmann, H., and Hofbauer, H. (2009) Energie aus Biomasse. Grundlagen, Techniken und Verfahren. 2. Auflage. S. 860- 881. Springer Verlag.

Kimura, B., Kawasaki, S., Nakano, H., and Fujii, T. (2001) Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmosphere-packaged fish. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 206-216.

KTBL (Hrsg.) (2007) Faustzahlen Biogas. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V.(KTBL). Darmstadt.

Le Bourhis, A.G., Saunier, K., Dore, J., Carlier, J.P., Chamba, J.F., Popoff, M.R., and Tholozan, J.L. (2005) Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:29-38

Li, J., Rui, J., Pei, Z., Sun, X., Zhang, S. et al. (2014) Straw- and slurry-associated prokaryotic communities differ during co-fermentation of straw and swine manure. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **98**:4771-80. doi:10.1007/s00253-014-5629-3

Lindström, M., Keto, R., Markkula, A., Nevas, M., Hielm, S., and Korkeala, H. (2001) Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5694-5699.

Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L., Palva, A. (2004) Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* **97**:1166-1177. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x

Sauer, B. (2009) Elementgehalte und Stoffströme bei der Strom- und Wärmegewinnung im Bioenergiedorf Jühnde. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen. Ibeg Institut für Bioenergiedörfer e.V. Schriftenreihe Fortschritt neu denken, 2.

Schröer, J. (2009) Dem Wild zuliebe. Schützen und Retten. Vortrag der Landesjägerschaft Niedersachsen. Veranstaltung Blühende Landschaften. Veranstalter: 3N (Nachwachsende Rohstoffe in Niedersachsen). Werlte. 24.09.2009

Takeshi, K., Fujinaga, Y., Inoue, K., Nakajima, H., Oguma, K., Ueno, T. et al. (1996) Simple method for detection of *Clostridium botulinum* type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction. *Microbiology and Immunology* **40**: 5-11.

Williamson, J.L., Rocke, T.E., and Aiken, J.M. (1999) In situ detection of the *Clostridium botulinum* type C-1 toxin gene in wetland sediments with a nested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3240-3243.

Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. (2005) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* **89**:670-679. doi:10.1002/bit.20347

Zelinski, V. (2013) Bestimmung der Leitfähigkeit. Hauptseminar Umwelttechnik. Umweltanalytisches Praktikum.

8 Anhang

A1: Prozessbiologische Parameter der Biogasanlagen P1-P5

| | | P1 HF | P1 NF | P2 HF | P2 NF | P3 HF | P4 HF | P4 NF | P5 HF | P5 NF | P6 HF |
|--------------------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Probe vom | - | 05.06.12 | 05.06.12 | 05.06.12 | 05.06.12 | 10.12.12 | 14.05.13 | 14.05.13 | 02.12.13 | 02.12.14 | 03.02.14 |
| pH | [-] | 7,6 | 7,6 | 7,6 | 7,7 | 7,9 | 8,0 | 8,1 | 7,7 | 7,7 | 7,7 |
| FOS | [mg/L] | 1917 | 1917 | 1834 | 2083 | 3079 | 4490 | 3494 | 2249 | 2083 | 3328 |
| TAC | [mg/L] | 11600 | 11600 | 12000 | 12300 | 16250 | 19000 | 20400 | 11300 | 11950 | 10000 |
| FOS/TAC | [-] | 0,17 | 0,16 | 0,15 | 0,17 | 0,19 | 0,24 | 0,17 | 0,20 | 0,17 | 0,33 |
| TS | [%FM] | 9,0 | 7,7 | 8,9 | 7,7 | 10,7 | 12,3 | 10,3 | 9,9 | 7,9 | 8,5 |
| oTS | [%TS] | 82,0 | 79,8 | 81,9 | 79,5 | 66,6 | n.b | n.b. | 66,5 | 62,3 | 81,8 |
| NH ₄ -N | [mg/L] | 1727 | 1925 | 1786 | 1997 | 2834 | 3603 | 3995 | 1609 | 1878 | 1546 |
| Milchsäure | [mg/L] | 92 | 92 | 92 | 99 | < 30 | 289 | 227 | < 30 | 35 | 167 |
| Essigsäure | [mg/L] | 43 | < 30 | 52 | < 30 | 32 | 976 | 191 | 105 | 100 | 1427 |
| Propionsäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | 175 | 53 | < 30 | < 30 | 198 |
| iso-Buttersäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | 74 | < 30 |
| Buttersäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |
| iso-Valeriansäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |
| Valeriansäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |
| Capronsäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |

A2:Prozessbiologische Parameter der Biogasanlagen P6-P9

| | | P6 NF | P6 GRL | P7 HF | P7 NF | P7 GRL | P8 HF | P8 NF | P8 GRL | P9 HF | P9 NF | P9 GRL |
|--------------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|--------|
| Probe vom | - | 03.02.14 | 03.02.14 | 23.07.14 | 23.07.14 | 23.07.14 | 23.07.14 | 23.07.14 | 23.07.14 | 29.07.14 | 22386 | 22387 |
| pH | [-] | 8,1 | 7,6 | 7,9 | 7,9 | 7,9 | 7,9 | 8,0 | 7,9 | 7,8 | 7,8 | 7,3 |
| FOS | [mg/L] | 2249 | 1917 | 1419 | 1751 | 1585 | 2913 | 1917 | 1917 | 2166 | 2000 | 755 |
| TAC | [mg/L] | 13000 | 12100 | 11750 | 11350 | 11200 | 13300 | 14450 | 14350 | 10250 | 11400 | 4450 |
| FOS/TAC | [-] | 0,17 | 0,16 | 0,12 | 0,15 | 0,14 | 0,22 | 0,13 | 0,13 | 0,21 | 0,18 | 0,17 |
| TS | [%FM] | 6,1 | 5,0 | 5,9 | 6,2 | 5,7 | 7,4 | 6,7 | 4,9 | 6,6 | 5,5 | 2,7 |
| oTS | [%TS] | 76,6 | 75,9 | 72,4 | 72,9 | 73,3 | 78,0 | 75,5 | 71,9 | 70,6 | 71,2 | 73,2 |
| NH ₄ -N | [mg/L] | 2268 | 2200 | 1913 | 1847 | 1869 | 2668 | 2865 | 2926 | 1603 | 1891 | 1205 |
| Milchsäure | [mg/L] | 146 | 119 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |
| Essigsäure | [mg/L] | 47 | 66 | < 30 | < 30 | < 30 | 437 | < 30 | < 30 | 190 | 38 | 35 |
| Propionsäure | [mg/L] | 79 | 44 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |
| iso-Buttersäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | 48 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |
| Buttersäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |
| iso-Valeriansäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |
| Valeriansäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |
| Capronsäure | [mg/L] | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 | < 30 |

A3: Mikro- und Makronährstoffe der Biogasanlagen P1-P5

| | | P1 HF | P1 NF | P2 HF | P2 NF | P3 HF | P4 HF | P4 NF | P5 HF | P5 NF |
|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Probe vom | - | 05.06.2012 | 05.06.2012 | 05.06.2012 | 05.06.2012 | 10.12.2012 | 14.05.2013 | 14.05.2013 | 02.12.2013 | 02.12.2014 |
| TS | [%FM] | 9,0 | 7,7 | 8,9 | 7,7 | 10,7 | 12,3 | 10,3 | 9,9 | 7,9 |
| oTS | [%TS] | 82,0 | 79,8 | 81,9 | 79,5 | 66,6 | 0,0 | 0,0 | 66,5 | 62,3 |
| Calcium | [mg/kg TS] | 13840 | 12600 | 11850 | 12900 | 22220 | 30200 | 26300 | 12563 | 13965 |
| Kalium | [mg/kg TS] | 46750 | 50000 | 44300 | 51900 | 51460 | 41100 | 46800 | 47995 | 56369 |
| Magnesium | [mg/kg TS] | 6020 | 6340 | 5620 | 6750 | 1760 | 7600 | 7900 | 5208 | 6014 |
| Eisen | [mg/kg TS] | 2010 | 1950 | 1670 | 2060 | 3940 | 2080 | 2270 | 4040 | 4407 |
| Natrium | [mg/kg TS] | 1430 | 1460 | 1140 | 1180 | 3290 | 3100 | 3500 | 2481 | 2753 |
| Mangan | [mg/kg TS] | 36 | 238 | 203 | 245 | 556 | 255 | 268 | 285 | 318 |
| Kupfer | [mg/kg TS] | 39 | 38 | 32 | 42 | 38 | 59 | 92 | 32 | 41 |
| Zink | [mg/kg TS] | 86 | 254 | 189 | 221 | 428 | 320 | 330 | 127 | 137 |
| Nickel | [mg/kg TS] | 3,49 | 3,59 | 3,13 | 3,68 | 6,99 | 3,11 | 4,35 | 11,10 | 13,10 |
| Molybdän | [mg/kg TS] | 2,37 | 2,97 | 2,42 | 2,70 | 2,55 | 3,14 | 3,59 | 4,10 | 4,80 |
| Cobalt | [mg/kg TS] | 1,69 | 1,81 | 1,46 | 1,86 | 1,51 | 1,16 | 1,22 | 3,00 | 3,40 |
| Selen | [mg/kg TS] | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,68 | 0,78 | 0,30 | 0,70 |
| Calcium | [mg/kg FM] | 1241 | 975 | 1052 | 992 | 2371 | 3709 | 2709 | 1244 | 1103 |
| Kalium | [mg/kg FM] | 4193 | 3870 | 3934 | 3991 | 5491 | 5047 | 4820 | 4752 | 4453 |
| Magnesium | [mg/kg FM] | 540 | 491 | 499 | 519 | 188 | 933 | 814 | 516 | 475 |
| Eisen | [mg/kg FM] | 180 | 151 | 148 | 158 | 420 | 255 | 234 | 400 | 348 |
| Natrium | [mg/kg FM] | 128 | 113 | 101 | 91 | 351 | 381 | 361 | 246 | 218 |
| Mangan | [mg/kg FM] | 3,2 | 18,4 | 18,0 | 18,8 | 59,3 | 31,3 | 27,6 | 28,2 | 25,1 |
| Kupfer | [mg/kg FM] | 3,5 | 2,9 | 2,9 | 3,2 | 4,1 | 7,2 | 9,4 | 3,1 | 3,2 |
| Zink | [mg/kg FM] | 7,7 | 19,7 | 16,8 | 17,0 | 45,7 | 39,3 | 34,0 | 12,6 | 10,8 |
| Nickel | [mg/kg FM] | 0,31 | 0,28 | 0,28 | 0,28 | 0,75 | 0,38 | 0,45 | 1,10 | 1,03 |
| Molybdän | [mg/kg FM] | 0,21 | 0,23 | 0,21 | 0,21 | 0,27 | 0,39 | 0,37 | 0,41 | 0,38 |
| Cobalt | [mg/kg FM] | 0,15 | 0,14 | 0,13 | 0,14 | 0,16 | 0,14 | 0,13 | 0,30 | 0,27 |

A4: Mikro- und Makronährstoffe der Biogasanlagen P6-P9

| | | P6 HF | P6 NF | P6 GRL | P7 HF | P7 NF | P7 GRL | P8 HF | P8 NF | P8 GRL | P9 HF | P9 NF | P9 GRL |
|-----------|------------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
| TS | [%FM] | 8,5 | 6,1 | 5,0 | 5,9 | 6,2 | 5,7 | 7,4 | 6,7 | 4,9 | 6,6 | 5,5 | 2,7 |
| oTS | [%TS] | 81,8 | 76,6 | 75,9 | 72,4 | 72,9 | 73,3 | 78,0 | 75,5 | 71,9 | 70,6 | 71,2 | 73,2 |
| Calcium | [mg/kg TS] | 12500 | 16800 | 17100 | 46492 | 52162 | 46315 | 28067 | 27481 | 26537 | 37429 | 44625 | 39775 |
| Kalium | [mg/kg TS] | 39500 | 56700 | 63400 | 69652 | 73184 | 78760 | 59921 | 59297 | 62492 | 50220 | 56154 | 50564 |
| Magnesium | [mg/kg TS] | 5300 | 6300 | 6200 | 10692 | 11172 | 10294 | 11246 | 10895 | 9831 | 12019 | 13857 | 11057 |
| Eisen | [mg/kg TS] | 1200 | 1200 | 1200 | 2106 | 2510 | 3279 | 2260 | 2515 | 2698 | 3268 | 2651 | 6337 |
| Natrium | [mg/kg TS] | 3500 | 4500 | 3800 | 4620 | 4168 | 5086 | 7964 | 9191 | 10519 | 4911 | 5473 | 4843 |
| Mangan | [mg/kg TS] | 178 | 233 | 234 | 251 | 249 | 246 | 299 | 339 | 374 | 314 | 365 | 422 |
| Kupfer | [mg/kg TS] | 24 | 36 | 32 | 122 | 111 | 110 | 55 | 62 | 76 | 285 | 286 | 377 |
| Zink | [mg/kg TS] | 210 | 300 | 380 | 294 | 205 | 462 | 340 | 382 | 463 | 308 | 374 | 486 |
| Nickel | [mg/kg TS] | 2,26 | 3,04 | 2,69 | 3,93 | 4,43 | 3,75 | 6,82 | 7,14 | 8,71 | 9,14 | 8,67 | - |
| Molybdän | [mg/kg TS] | 1,28 | 1,74 | 1,56 | 2,25 | 2,55 | 2,30 | 3,65 | 3,97 | 4,33 | 2,64 | 3,29 | 10,53 |
| Cobalt | [mg/kg TS] | 1,12 | 1,59 | 1,70 | 1,18 | 1,19 | 1,35 | 1,60 | 1,85 | 2,43 | 2,31 | 2,04 | 4,52 |
| Selen | [mg/kg TS] | 0,89 | 1,00 | 1,70 | 0,62 | 0,58 | 0,72 | 1,32 | 1,60 | 1,82 | 0,88 | 1,20 | 1,32 |
| Calcium | [mg/kg FM] | 1063 | 1025 | 855 | 2743 | 3234 | 2640 | 2077 | 1841 | 1300 | 2470 | 2454 | 1074 |
| Kalium | [mg/kg FM] | 3358 | 3459 | 3170 | 4109 | 4537 | 4489 | 4434 | 3973 | 3062 | 3315 | 3088 | 1365 |
| Magnesium | [mg/kg FM] | 451 | 384 | 310 | 631 | 693 | 587 | 832 | 730 | 482 | 793 | 762 | 299 |
| Eisen | [mg/kg FM] | 102 | 73 | 60 | 124 | 156 | 187 | 167 | 168 | 132 | 216 | 146 | 171 |
| Natrium | [mg/kg FM] | 298 | 275 | 190 | 273 | 258 | 290 | 589 | 616 | 515 | 324 | 301 | 131 |
| Mangan | [mg/kg FM] | 15,2 | 14,2 | 11,7 | 14,8 | 15,5 | 14,0 | 22,1 | 22,7 | 18,3 | 20,7 | 20,1 | 11,4 |
| Kupfer | [mg/kg FM] | 2,1 | 2,2 | 1,6 | 7,2 | 6,9 | 6,3 | 4,1 | 4,1 | 3,7 | 18,8 | 15,7 | 10,2 |
| Zink | [mg/kg FM] | 17,9 | 18,3 | 19,0 | 17,3 | 12,7 | 26,3 | 25,1 | 25,6 | 22,7 | 20,4 | 20,6 | 13,1 |
| Nickel | [mg/kg FM] | 0,19 | 0,19 | 0,13 | 0,23 | 0,27 | 0,21 | 0,50 | 0,48 | 0,43 | 0,60 | 0,48 | - |
| Molybdän | [mg/kg FM] | 0,11 | 0,11 | 0,08 | 0,13 | 0,16 | 0,13 | 0,27 | 0,27 | 0,21 | 0,17 | 0,18 | 0,28 |
| Cobalt | [mg/kg FM] | 0,10 | 0,10 | 0,09 | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,15 | 0,11 | 0,12 |

A5: Gasertragsergebnisse der Batchversuche I und II

| Batch I | Probenbezeichnung | TS | oTS | Biogasmenge | | Methanmenge | | Methan- gehalt | |
|---------|--|--------------|--------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------------|---------|
| | | [Masse-% FM] | [Masse-% TS] | [IN/kg oTS] | [IN/kg FM] | [IN/kg oTS] | [IN/kg FM] | [Vol-%] | STABW % |
| 1 | Impfsubstrat (Gärrest aus NG1) I | 6,8% | 79,6% | 286 | 15 | 160 | 9 | 58% | 1 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Rindergülle I | 7,2% | 79,6% | 405 | 23 | 241 | 14 | 58% | 5 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Schweinegülle I | 8,1% | 75,4% | 433 | 26 | 298 | 18 | 69% | 3 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Maissilage I | 31,2% | 94,1% | 765 | 225 | 406 | 119 | 53% | 1 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |

| Batch II | Proben-bezeichnung | TS | oTS | Biogasmenge | | Methanmenge | | Methan- gehalt | |
|----------|--------------------|--------------|--------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------------|---------|
| | | [Masse-% FM] | [Masse-% TS] | [IN/kg oTS] | [IN/kg FM] | [IN/kg oTS] | [IN/kg FM] | [Vol-%] | STABW % |
| 1 | Impfsubstrat II | 7,4% | 77,0% | 99 | 6 | 56 | 3 | 62% | 11 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Rindergülle II | 2,2% | 72,5% | 363 | 6 | 258 | 4 | 67% | 2 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Schweinegülle II | 2,4% | 69,2% | 203 | 3 | 129 | 2 | 65% | 3 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Maissilage II | 33,0% | 94,1% | 775 | 241 | 409 | 127 | 52% | 1 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |

A6: Gasertragsergebnisse der Batchversuche III und IV

| Batch III | Proben-bezeichnung | TS | oTS | Biogasmenge | | Methanmenge | | Methan-gehalt | |
|-----------|--------------------|--------------|--------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|---------|
| | | [Masse-% FM] | [Masse-% TS] | [l _N /kg oTS] | [l _N /kg FM] | [l _N /kg oTS] | [l _N /kg FM] | [Vol-%] | STABW % |
| 1 | Impfsubstrat III | 7,7% | 78,1% | 91 | 5 | 51 | 3 | 58% | 4 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Rindergülle III | 9,6% | 81,4% | 417 | 33 | 246 | 19 | 58% | 3 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Schweinegülle III | 9,3% | 66,8% | 216 | 15 | 168 | 11 | 76% | 14 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Maissilage III | 35,7% | 96,5% | 621 | 214 | 325 | 112 | 53% | 2 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |

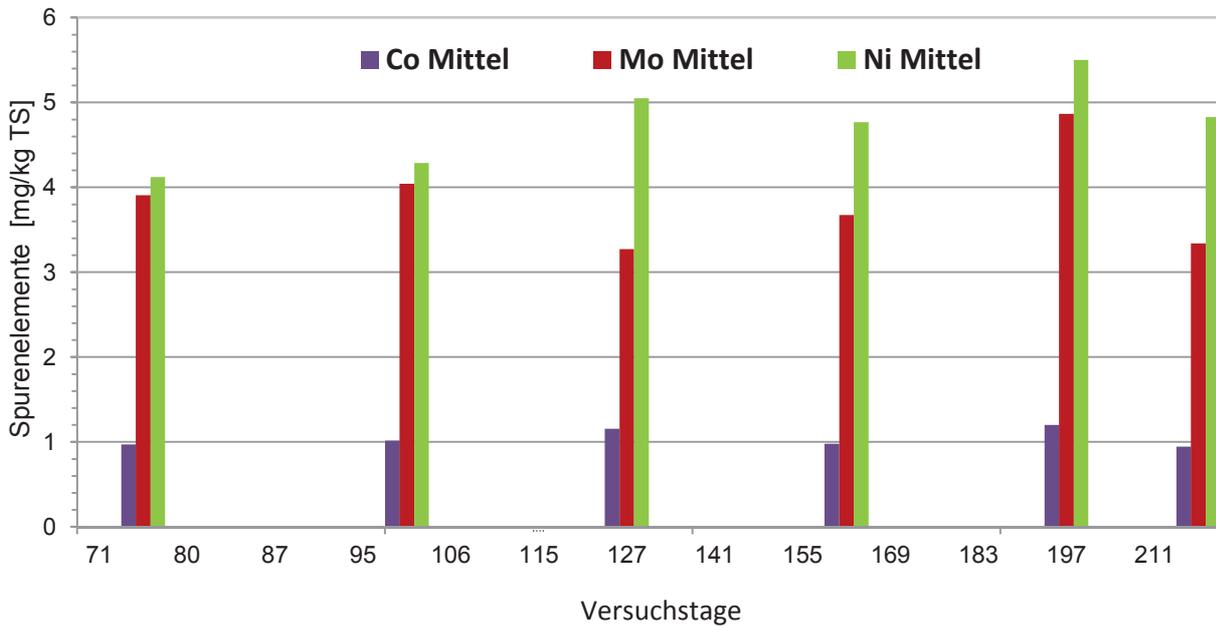
| Batch IV | Probenbezeichnung | TS | oTS | Biogasmenge | | Methanmenge | | Methan-gehalt | |
|----------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------|---------|
| | | [Masse-% FM] | [Masse-% TS] | [l _N /kg oTS] | [l _N /kg FM] | [l _N /kg oTS] | [l _N /kg FM] | [Vol-%] | STABW % |
| 1 | Impfsubstrat IV | 7,7% | 77,2% | 107 | 6 | 61 | 4 | 57% | 4 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Rindergülle IV 80%, Mais IV 20% | 14,1% | 83,0% | 336 | 24 | 194 | 14 | 58% | 2 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | Schweinegülle IV 80%, Mais IV 20% | 11,0% | 79,1% | 224 | 8 | 129 | 4 | 58% | 6 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |
| 1 | GPS I | 28,1% | 88,6% | 406 | 101 | 225 | 56 | 55% | 8 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | |

A7: Gasertragsergebnisse der Batchversuche V und VI

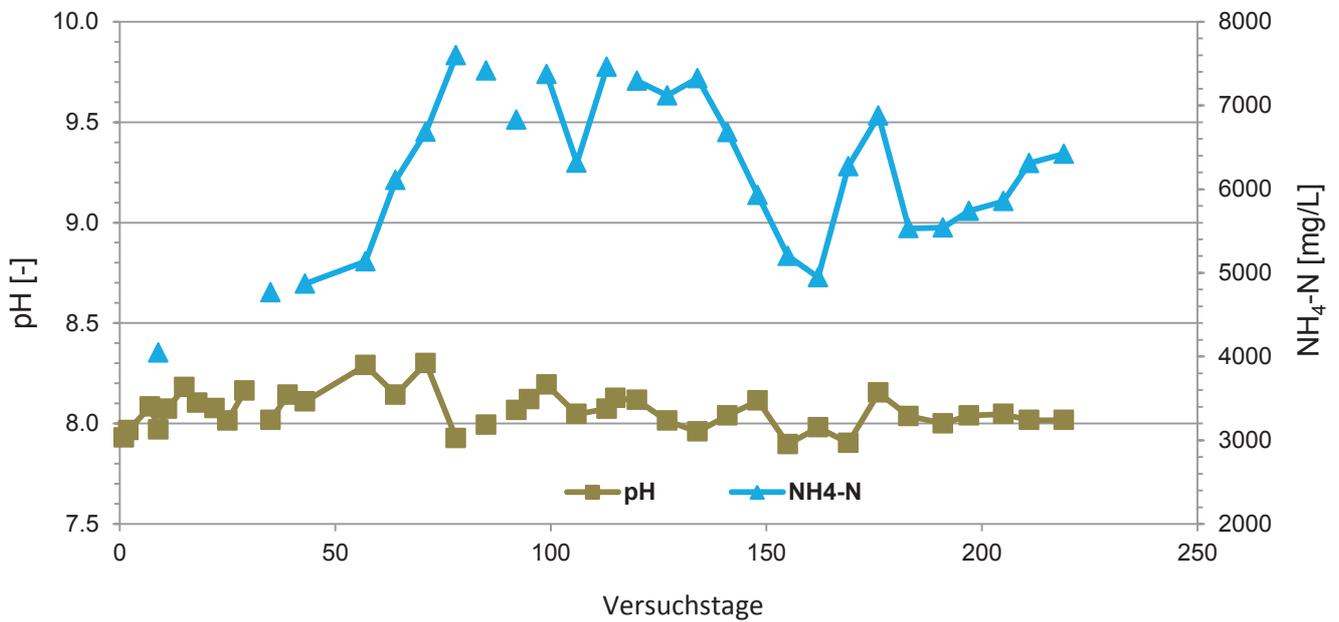
| Batch V | Probenbezeichnung | TS | oTS | Biogasmenge | | Methanmenge | | Methan- gehalt | |
|---------|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------|---------|
| | | [Masse-% FM] | [Masse-% TS] | [l _N /kg oTS] | [l _N /kg FM] | [l _N /kg oTS] | [l _N /kg FM] | [Vol-%] | STABW % |
| 1 | Impfsubstrat V (Batch I u. VI) | 8,0% | 76,0% | 138 | 8 | 74 | 5 | 54% | 4 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 1 | Zuckerrübe I | 30,8% | 91,4% | 695 | 196 | 352 | 99 | 52% | 5 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 1 | Zuckerrübe I+HTK II 20% | 34,2% | 90,9% | 640 | 199 | 336 | 104 | 52% | 2 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 1 | Zuckerrübe+ HTK II 40% | 38,6% | 90,2% | 583 | 203 | 309 | 108 | 54% | 0 |
| 2 | | | | | | | | | |

| Batch VI | Probenbezeichnung | TS | oTS | Biogasmenge | | Methanmenge | | Methan- gehalt | |
|----------|----------------------|--------------|--------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------|---------|
| | | [Masse-% FM] | [Masse-% TS] | [l _N /kg oTS] | [l _N /kg FM] | [l _N /kg oTS] | [l _N /kg FM] | [Vol-%] | STABW % |
| 1 | Maissilage | 32,8% | 95,5% | 583 | 182 | 309 | 97 | 55% | 0 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 1 | Maissilage+ HTK I | 31,2% | 82,8% | 640 | 165 | 353 | 91 | 60% | 2 |
| 2 | | | | | | | | | |
| 1 | Maissilage+ HTK II | 41,7% | 88,4% | 587 | 216 | 352 | 130 | 60% | 6 |
| 2 | | | | | | | | | |

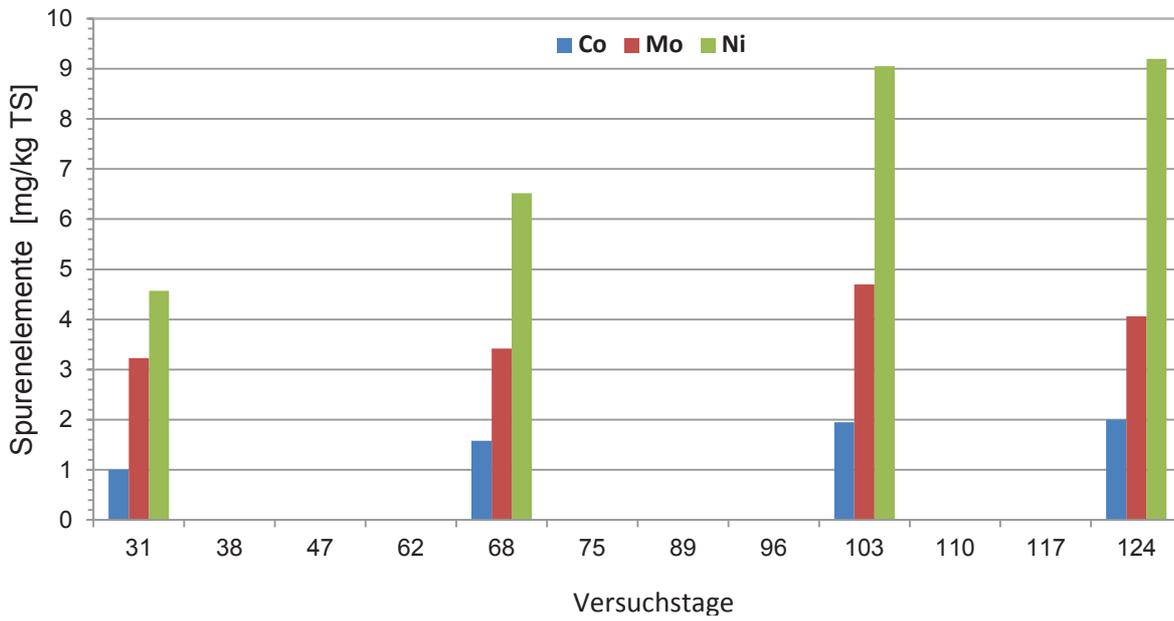
A8: Mittlere Nährstoffgehalte von Mo, Co und Ni im quasikontinuierlichen Versuch KI



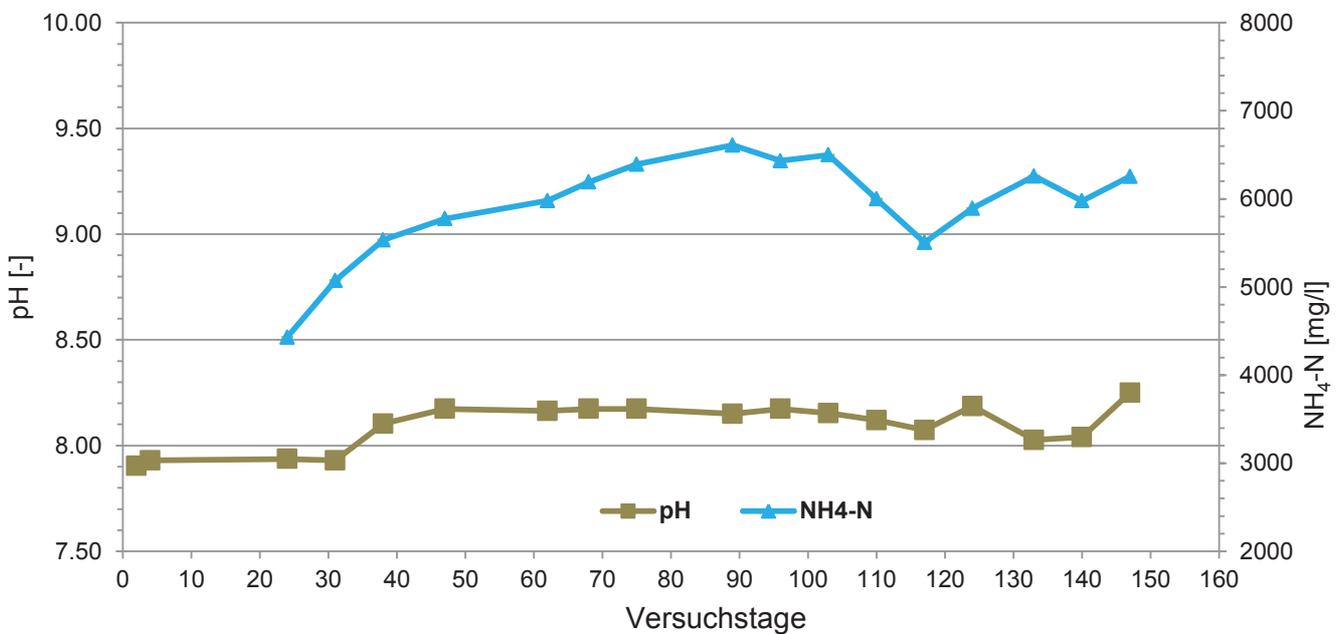
A9: Mittlere pH- und NH₄-N-Werte im quasikontinuierlichen Versuch KI



A10: Mittlere Nährstoffgehalte von Mo, Co und Ni im quasikontinuierlichen Versuch KII



A11: Mittlere pH- und NH₄-N-Werte im quasikontinuierlichen Versuch KII



A14: Mittlere pH- und NH₄-N-Werte im quasikontinuierlichen Versuch KIII

