

**Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen
Vorkommen von *Clostridium botulinum* in Substraten
und Gärrückständen von Biogasanlagen**

Projektförderung durch das
**Niedersächsische Ministerium für den ländlichen Raum,
Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz**

Abschlussbericht

Juni 2007

**Institut für Technologie und Biosystemtechnik
und
Institut für Agrarökologie**

Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)

Braunschweig

Abschlussbericht

über das Vorhaben

Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen Vorkommen von *Clostridium botulinum* in Substraten und Gärrückständen von Biogasanlagen

durch das

Institut für Technologie und Biosystemtechnik
- Gärversuche -

Projektleiter: Dir. u. Prof. Dr.-Ing. Peter Weiland
Bearbeiter: M.Sc. Lars Klingebiel

und das

Institut für Agrarökologie
- Molekularbiologische Untersuchungen -

Projektleiter: PD Dr.rer.nat. Christoph C. Tebbe
Bearbeiter: Dipl.-Biol. Anja-Bettina Dohrmann
Susann Baumert

Braunschweig, Juni 2007

Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
Bundesallee 50
38116 Braunschweig

Institut für Technologie und Biosystemtechnik
Abt. Technologie
Dir.u.Prof. Dr.-Ing. P. Weiland
Telefon: 0531/596-4131
Telefax: 0531/596-4199
E-Mail: peter.weiland@fal.de

Institut für Agrarökologie
PD Dr.rer.nat. Ch. C. Tebbe
Telefon: 0531/596-2553
Telefax: 0531/596-2599
E-Mail: christoph.tebbe@fal.de

1	Zusammenfassung	3
2	Fazit	6
3	Einleitung	8
3.1	Stand des Wissens	9
4	Material und Methoden	13
4.1	Versuchsaufbau	13
4.2	Kenndaten der Substrate	14
4.2.1	Trockenrückstand (TR) und organischer Trockenrückstand (oTR)	14
4.2.2	Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)	14
4.2.3	Gehalt an Gesamtstickstoff (Kjeldahl-Stickstoff)	15
4.2.4	Gehalt an Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N)	16
4.2.5	Gehalt an Ortho-Phosphat (PO ₄ -P)	16
4.2.6	FOS/TAC-Wert	17
4.2.7	Bestimmung der flüchtigen organischen Säuren (Säurespektrum)	17
4.3	pH-Wert	19
4.4	Die Bedeutung der Gaszusammensetzung	19
4.5	Versuchsparameter	19
4.5.1	Raumbelastung	19
4.5.2	Verweilzeit	20
4.5.3	Abbaugrad	21
4.5.4	Methanproduktivität	21
4.5.5	Methanausbeute	22
4.6	Probenaufbereitung zur molekularbiologischen Analyse	22
4.7	Extraktion von Nukleinsäuren	22
4.7.1	Test unterschiedlicher Extraktionsmethoden	22
4.7.2	Beurteilung der unterschiedlichen Extraktionsmethoden	24
4.7.3	Details der ausgewählten DNA Extraktionsmethode	25
4.8	Darstellung der Vielfalt der Bakteriengemeinschaften	26
4.8.1	PCR:	26
4.8.2	Auftrennung unterschiedlicher Produkte mit der SSCP-Methodik	27
4.9	Darstellung der Diversität der Clostridien des Cluster I	27
4.9.1	PCR:	28
4.9.2	SSCP-Methodik zur Auftrennung von clostridialen 16S rRNA Genen	28
4.10	Charakterisierung der Clostridien (Cluster I)	28
4.11	Quantifizierung der in Biogasreaktoren enthaltenen Clostridien	29
4.11.1	Real-time PCR	29
4.12	Nachweis von Botulinum Neurotoxin Genen der Typen A, B, E und F	29
4.12.1	Bedingungen der ersten PCR zur gemeinsamen Amplifikation der Neurotoxingene der Typen A, B, E und F	30
4.12.2	PCR zur Typisierung von BoNT A	31
4.12.3	PCR zur Typisierung von BoNT B	32
4.12.4	PCR zur Typisierung von BoNT E	32
4.12.5	PCR zur Typisierung von BoNT F	32

5	Ergebnisse.....	33
5.1	Verlauf der mesophilen Gärversuche.....	33
5.1.1	Raumbelastung und Verweilzeit.....	33
5.1.2	Ergebnisse der Flüssigphasenanalytik	35
5.1.3	Abbaugrad	46
5.1.4	Methanproduktivität und –ausbeute	47
5.2	Verlauf der thermophilen Gärversuche.....	55
5.2.1	Raumbelastung und Verweilzeit.....	55
5.2.2	Ergebnisse der Flüssigphasenanalytik	58
5.2.3	Abbaugrad	69
5.2.4	Methanproduktivität und –ausbeute	69
5.3	Nukleinsäure-Extraktion aus Proben aus der Biogasbildung.....	78
5.4	Vielfalt und Veränderlichkeit der dominanten Bakterien	80
5.4.1	Rindergülle	81
5.4.2	Schweinegülle	82
5.4.3	Hühnertrockenkot.....	83
5.4.4	Maissilage.....	84
5.4.5	Kleegrassilage	85
5.5	Die Diversität der Clostridien des Cluster I im mesophilen Verlauf	86
5.5.1	Schweinegülle	86
5.5.2	Rindergülle	87
5.6	Charakterisierung der Clostridien der mesophilen Biogasbildung	88
5.6.1	Rinder- und Schweinegülle	88
5.7	Die Bakterienvielfalt in den thermophilen Biogasreaktoren.....	92
5.7.1	Rindergülle	92
5.7.2	Schweinegülle	93
5.7.3	Maissilage.....	95
5.8	Die Diversität der Clostridien des Cluster I im thermophilen Verlauf	96
5.8.1	Rindergülle	96
5.8.2	Schweinegülle	97
5.8.3	Maissilage.....	98
5.9	Identifizierung von Clostridien im thermophilen Reaktorverlauf.....	99
5.10	Quantifizierung der Cluster I Clostridien	102
5.11	Nachweis von BoNT – Genen	104
5.11.1	Unspezifisch BoNT A, B, E oder F	104
5.11.2	Spezifisch BoNT A.....	105
5.11.3	Spezifisch BoNT B.....	106
5.11.4	Spezifisch BoNT E.....	106
5.11.5	Spezifisch BoNT F	107
6	Literaturverzeichnis	108

1 Zusammenfassung

Unter praxisnahen Bedingungen wurde die Biogasbildung aus tierischen und pflanzlichen Substraten landwirtschaftlicher Herkunft in kontinuierlichen Gärversuchen nachgestellt, um die Gemeinschaft der Bakterien zu untersuchen. Zur Anwendung kamen Rinder- und Schweinegülle sowie Hühnertrockenkot und als Energiepflanzen Mais- und Kleegrassilage. Die Gärversuche erfolgten unter mesophilen (37 °C) und thermophilen (55 °C) Betriebsbedingungen bei unterschiedlichen Raumbelastungen bzw. Substratverweilzeiten. Dabei war es von besonderem Interesse die Vielfalt der Clostridien zu charakterisieren und ihre Populationsgröße zu bestimmen. Vor allem ging es um die Frage, ob pathogene Clostridien, speziell *Clostridium botulinum*, in den untersuchten Materialien vorkommen oder sich im Laufe der Biogasbildung vermehren können.

Um die Bakteriengemeinschaften zu untersuchen, wurden neuartige, molekulare, kultivierungsunabhängige Nukleinsäure-basierende Methoden eingesetzt. Zur Extraktion und Reinigung der Nukleinsäureextrakte wurden 11 unterschiedliche Methoden getestet, wobei die Wahl für weitere Arbeiten auf eine Methode mit besonders guter Extraktionsausbeute für die Clostridien fiel.

Die gewonnenen Nukleinsäuren waren das Ausgangsmaterial für alle nachfolgenden molekularbiologischen Analysen. Je nach den experimentellen Fragestellungen wurden verschiedene Ziel-Gene mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) im Reagenzglas, ausgehend von den Nukleinsäureextrakten, vervielfältigt und die PCR-Produkte weiter analysiert, zum einen mit einer genetischen Fingerprinting-Technik (SSCP, Einzelstrang Konformationspolymorphismus) und zum anderen durch DNA-Sequenzierungen und bioinformatische Datenbankanalysen. Als Zielgene dienten dabei entweder die 16S rRNA-Gene, die eine verwandtschaftliche Einordnung der nachgewiesenen Bakterien erlaubt, und zum anderen Toxin-Gene, die für problematische Produkte von *C. botulinum* verantwortlich sind. Die genetischen Fingerprints wurden so durchgeführt, dass mit einer PCR spezifisch die dominanten Bakterien in den Prozessen dargestellt wurden und mit einer anderen gezielt die Clostridien.

In den Gärversuchen wurde bei unterschiedlichen Probenahmen die Vielfalt der dominanten Bakterien ermittelt und mit den jeweiligen metabolischen Aktivitäten, insbesondere der Biogasbildung, in Beziehung gesetzt. Hierbei zeigte sich, dass eine kontinuierliche und effiziente Biogasproduktion durch eine stabile und vielfältig zusammengesetzte

Bakteriengemeinschaft erfolgte. Während in der Anlaufphase die Bakteriengemeinschaft noch stark durch das Impfgut (in diesem Fall Klärschlamm) geprägt war, entwickelte sich später eine anders zusammengesetzte, wenig veränderliche Bakteriengemeinschaft. Effiziente Biogasproduktion verbunden mit stabilen Bakteriengemeinschaften wurden in mesophil betriebenen Fermentationen mit Rindergülle, Schweinegülle und Maissilage ermittelt, während sich in den Fermentationen von Hühnertrockenkot und Kleegrassilage die Bakteriengemeinschaften nicht stabilisieren konnten und die Biogasbildung sehr störanfällig war. Auch die thermophilen Umsetzungen von Rinder- und Schweinegülle sowie Maissilage waren leicht störanfällig. Die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften, die die verschiedenen Substrate umsetzen, war sowohl für die einzelnen Substrate als auch die Temperatur des Prozesses spezifisch.

In den Fällen, in denen sich bei der Untersuchung der dominanten Bakterien stabile Gemeinschaften etablierten, war auch die Vielfalt innerhalb der Clostridien stabil, wobei die Anpassung an die stabilen Verhältnisse während der mesophilen Fermentationen etwa zeitgleich geschah. Eine genauere Betrachtung der Clostridien im Verlauf der mesophilen Fermentation von Rinder- und Schweinegülle ergab, dass sich die Vielfalt in der stabilen Phase stark reduzierte und von nur einer bzw. von zwei „Arten“ dominiert wurde. Diese dominant vertretenen Arten ließen sich schon zu Beginn der Fermentation nachweisen und stammten vermutlich aus dem Impfschlamm und nicht aus den landwirtschaftlichen Substraten.

Die Identifizierung der an der Biogasbildung beteiligten Clostridien zeigte enge Verwandtschaften zu Clostridien, die in ähnlichen Habitaten wie anaeroben Schlämmen oder menschlichen Stuhlproben nachgewiesen wurden. Dabei gab es keine Indizien für die Anwesenheit pathogener Clostridien, wie z.B. *C. botulinum*.

Neben der Vielfalt wurde auch die Abundanz (quantitative Anwesenheit) der Clostridien untersucht. Erste Ergebnisse zeigten, dass die Clostridienpopulationen im Ausgangsmaterial Rindergülle deutlich größer waren als im Gärrückstand nach anaerober Behandlung unter praxisrelevanten Betriebsbedingungen. Dies zeigte, dass es nicht zu einer Vermehrung der Clostridien im Allgemeinen kam. Diese Erkenntnis bezieht sich bis jetzt jedoch nur auf Daten einzelner Proben der Fermentation von Rindergülle, da die Messmethode (quantitative PCR) mit dem Material aus diesen Untersuchungen nicht optimal arbeitet und einen hohen Analyseaufwand erfordert. Einzelne Proben aus den Gärsubstraten und Fermentern wurden außerdem gezielt auf das Vorkommen von *C. botulinum* untersucht. Im Gegensatz zu dem

amtlichen Verfahren zum Nachweis dieser gefährlichen Bakterien der Sicherheitsstufe L2, kommt die angewendete Methode ohne Tierversuche aus, weil sie die Gene für die Botulismus verursachenden Neurotoxine (BoNT) als einen Indikator für die Anwesenheit von *C. botulinum* nutzt. Der Nachweis von BoNT A, B, E oder F – den Neurotoxinen, die am häufigsten am Botulismus des Menschen beteiligt sind, fiel in den exemplarisch untersuchten Proben negativ aus. Dieses Ergebnis muss jedoch noch mit Vorbehalt betrachtet werden, da ein Einfluss möglicher Verunreinigungen aus dem Fermentermaterial zurzeit nicht ausgeschlossen werden kann (falsch negative Daten). Um eine solche Reaktion auszuschließen ist noch der Einbau einer positiven Kontrolle notwendig. Diese Kontrolle könnte durch ein molekulares Labor-DNA-Konstrukt in Zeitraum von ca. 3 Monaten hergestellt werden.

Insgesamt ergeben sich aus den bisherigen Untersuchungen keine konkreten Hinweise auf ein Vorkommen oder eine Vermehrung problematischer Clostridien in landwirtschaftlichen Gärsubstraten oder experimentellen Gärversuchen. Im Rahmen des Projekts wurde eine Nachweisteknik zur Untersuchung dieser Problematik etabliert, die es erlaubt, auch ohne ethisch bedenkliche Tierversuche eine große Probenvielfalt aus unterschiedlich betriebenen Prozessen zu analysieren. Die bisherigen Ergebnisse beziehen sich nur auf einen kleinen Ausschnitt von möglichen Substraten und Prozessbedingungen. Zur Erhöhung der Nachweissicherheit wäre der Einsatz der hier entwickelten molekularen Methodik auch zur Untersuchung von Biogasanlagen aus der landwirtschaftlichen Praxis möglich und wünschenswert.

2 Fazit

Ziel des Projekts war es, die bakteriologische Besiedlung von Gärsubstraten als Ausgangsmaterial und während der Fermentation zur Biogas-Bildung zu charakterisieren. Dabei sollten die quantitativ dominanten Bakterien erfasst und der Anteil von Clostridien ermittelt werden. Innerhalb der Clostridien sollte eine Differenzierung vorgenommen werden um ein mögliches Vorkommen von Vertretern mit Gesundheitsgefährdendem Potenzial, wie *C. botulinum*, zu ermitteln. Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen und Erkenntnissen:

- Es wurde eine Methodik zur routinemäßigen Untersuchung von Gärsubstraten vor und während der Biogasfermentation entwickelt, mit der die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft zuverlässig bestimmt werden kann.
- Es wurde ein Verfahren etabliert, mit dem das gesundheitsgefährdende Bakterium *C. botulinum* auch unabhängig von Tierversuchen nachgewiesen werden kann. Dabei werden sowohl die 16S rRNA Gene wie auch die tatsächlichen Toxin-Gene berücksichtigt. Dies eröffnet die Möglichkeit, eine Vielzahl von Proben auf die Anwesenheit dieses Organismus auch aus der landwirtschaftlichen Praxis zu untersuchen.
- Eine kontinuierliche Biogasbildung in Modellanlagen war immer mit einer stabil zusammengesetzten Bakteriengemeinschaft verknüpft. Konnte sich keine stabile Bakteriengemeinschaft etablieren, war der Prozess der Biogasbildung störanfällig.
- Die Gemeinschaft von Bakterien und Clostridien stabilisierten sich zeitgleich nach einem Neustart der Fermentation.
- Die Vielfalt (Diversität) der Clostridien war in der stabilen Phase der Biogasbildung gering. Während der Fermentation von Rinder- und Schweinegülle konnten keine der dominanten Clostridien als pathogen oder nahe Verwandte von *C. botulinum* charakterisiert werden.
- Im Vergleich zur Rindergülle wurde die Menge der Clostridien während der stabilen Fermentation von Rindergülle reduziert. Bislang können jedoch nur relative Angaben erfolgen, da ein zur absoluten Quantifizierung notwendiges Kalibriersystem noch nicht etabliert wurde.

- Der exemplarische Nachweis von *C. botulinum* in ausgewählten Proben fiel negativ aus. Für das zugrunde liegende System fehlt bislang noch eine Positivkontrolle, die zur Absicherung eines Negativ-Befundes notwendig ist.
- Die bisherigen Ergebnisse beziehen sich jeweils auf einzeln durchgeführte Modellvergärungen. Zur Erhöhung der Aussagekraft ist eine Erweiterung der Untersuchungen auf verschiedene Ausgangssubstrate, Prozessbedingungen notwendig.
- Die Ergebnisse basieren auf Biogasreaktoren im Modellmaßstab. Die bisherigen Erkenntnisse lassen sich nicht ohne weiteres direkt auf den Praxis-Maßstab einer landwirtschaftlichen Biogasanlage übertragen. Eine Methodik derartige Untersuchungen für die Praxis durchzuführen, steht zur Verfügung.

3 Einleitung

Durch die Implementierung des Erneuerbare Energien Gesetzes (EEG) im Jahr 2000 und durch die Novelle des EEG im Jahr 2004 ist die Biogastechnologie immer stärker in den Fokus der Öffentlichkeit gerückt; gerade auch vor dem Hintergrund endlicher Vorräte an fossilen Energieträgern sowie steigender Erdölpreise.

Die Bildung von Biogas erfolgt durch eine vielfältig zusammengesetzte Gemeinschaft von Mikroorganismen, denen auch die Clostridien angehören. 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.

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:

- Wie groß ist die Diversität innerhalb der Bakterien und Clostridien-Gemeinschaft in den Ausgangsmaterialien (Gärs substraten) und wie wird diese während der Biogasbildung in Abhängigkeit unterschiedlicher Substrate verändert?
- Wie verhalten sich diese Gemeinschaften nach dem Animpfen und während der unterschiedlichen Phasen einer Biogasbildung?
- Welche Clostridien dominieren die Gemeinschaften während solcher unterschiedlichen Phasen?
- Wie groß ist die Population von Clostridien während der Biogasbildung und verändert sie sich im Verlauf der Biogas-Fermentation?
- Lässt sich *C. botulinum* anhand seiner charakteristischen Neurotoxin-Gene aus Proben von Gärsubstraten 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 kontinuierliche Gärversuche in Laborfermentern

mit fünf verschiedenen und in der Praxis üblichen Substraten gestartet. Dabei wurden meso- und thermophile Bedingungen getestet. Ziel der Arbeit war, ein Risikopotential durch das Betreiben einer Biogasanlage für Mensch und Tier ableiten zu können.

3.1 Stand des Wissens

Die Biogasproduktion erfolgt durch eine vielfältig zusammengesetzte Gemeinschaft von Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und Archaeen (ehemals „Archaeobakterien“) unter anaeroben Bedingungen. 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, Methan (die entscheidende Komponente im Biogas) zu bilden. Die Clostridien vermehren sich nur unter anaeroben Bedingungen, jedoch sind sie in der Lage, Endosporen zu bilden. 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 Gärsubstraten in die jeweiligen Biogasanlagen eingebracht werden. Da es unter den Clostridien sowohl harmlose als auch krankheitserregende Arten gibt, ist eine differenziertere Betrachtung der an der Biogasproduktion beteiligten Arten geboten.

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 der „Clostridien, Cluster I“ geprägt. Zu den Clostridien im Cluster I gehören neben vielen harmlosen Vertretern auch medizinisch hoch brisante Arten wie z.B. *Clostridium tetani*, der Erreger des Wundstarrkrampfes (Tetanus), *Clostridium perfringens* der Verursacher des Gasbrands und *C. botulinum*, auf den der Botulismus zurückzuführen ist. Im Rahmen dieser Studie wurden daher die Clostridien des Cluster I untersucht.

Zurzeit wird in den Medien und der Öffentlichkeit diskutiert, ob von Biogasanlagen ein Gesundheitsrisiko für Mensch und landwirtschaftliche Tiere ausgehen kann, das auf eine unbeabsichtigte Massenvermehrung krankheitserregender Clostridien während der Fermentation in Biogasreaktoren zurückzuführen ist. Es wird dabei spekuliert, ob bestimmte Gärsubstrate und Gärrückstände krankheitserregenden Clostridien enthalten, die im Zuge eines Arbeitsumgangs in Biogasanlagen und bei der weiteren Nutzung der Gärrückstände

Krankheiten hervorrufen könnten.

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 insbesondere bei Wiederkäuern (viszeraler Botulismus bei Rindern (Böhnel et al., 2001)) und Pferden (Galey, 2001) 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 (schlafte 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 bei Botulismus von Tieren nachgewiesen wurden (CDC; 1998). Zurzeit ist noch ungeklärt, ob das Toxin vom Typ G tatsächlich Botulismus auslöst (Collins and East, 1998). 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 einem Plasmid kodiert (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 (Tabelle 1). 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 handelt.

Tabelle 1: Phänotypische Unterschiede von Organismen, die Botulinum Neurotoxin bilden

Eigenschaft	Gruppe				<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium baratii</i>
	I	II	III	IV		
Toxin Typen	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
Proteolyse ^a	+	-	-	+	-	-
Optimale Wachstumstemperatur	35-40 °C	18-25 °C	40 °C	37 °C	30-37 °C	30-45 °C
Minimale Wachstumstemperatur	10+ °C	3,3 °C	15 °C		10 °C	
Hitzeresistenz der Sporen	112 °C	80 °C	104 °C			

^a +, alle Stämme sind positiv; -, alle Stämme sind negativ

Diese Tabelle wurde reproduziert nach Tabelle 1 (Collins and East, 1998)

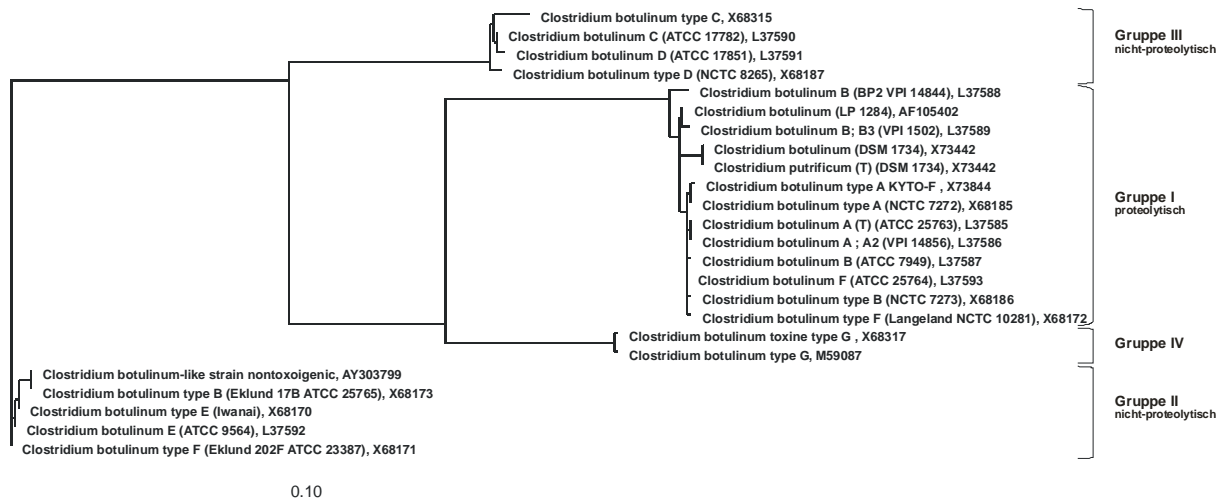


Abbildung 1: Dendrogramm zur Darstellung der phylogenetisch unterschiedlichen Positionen von *C. botulinum* der Gruppen I – IV

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, da sowohl pathogene, als auch nicht-pathogene Stämme sehr eng

mit einander verwandt sind. So finden sich in der Gruppe II sowohl Botulismus verursachende Stämme als auch nicht-pathogene Stämme (Abbildung 1). Zusätzlich wurden Neurotoxingene 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* unterscheiden.

Daher bietet es sich eher an, den Nachweis von neurotoxinbildenden Clostridien an deren Pathogenität zu koppeln. Im klassischen Verfahren wird das aktive Neurotoxin im Mäusetoxizitätstest nachgewiesen. Dieser Toxinnachweis im Tierversuch mit Mäusen ist bis heute die Referenzmethode und sensitiver als der Nachweis der Neurotoxine im ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Der Nachweis aktiven Toxins setzt jedoch voraus, dass zuvor Bedingungen geschaffen wurden, unter denen *C. botulinum* Neurotoxine gebildet hat. Da diese Bedingungen noch weitestgehend ungeklärt sind, ist eine Beurteilung der Präsenz Neurotoxin bildender Clostridien aufgrund des Toxinnachweises nur eingeschränkt möglich. Zusätzlich ist der Toxinnachweis im Tierversuch ethisch bedenklich, sowie zeit- und kostenintensiv und somit nicht zur Analyse zahlreicher Umweltproben ohne Verdachtsmoment geeignet.

Satt 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 Neurotoxingene 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 erbringen 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 ermöglichen es, eine große Menge an Proben ohne die Durchführung von Tierversuchen zu untersuchen.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsaufbau

Für die praxisnahe Nachstellung der in landwirtschaftlichen Biogasanlagen vorherrschenden Fermentationsbedingungen wurden kontinuierliche Gärversuche als Nassvergärung in vollständig durchmischten Laborfermentern durchgeführt. Als Laborfermenter wurden doppelwandige Rührreaktoren aus Plexiglas mit einem Volumen von ca. 18 Litern eingesetzt, die über Thermostaten beheizt werden.

Die Laborfermenter sind gasdicht verschlossen und werden vor Versuchsbeginn mit Stickstoff gespült, um den für die Bakterien schädlichen Sauerstoff zu verdrängen. Das entstehende Biogas wird in einen Gasbeutel gesammelt und in regelmäßigen Abständen auf Gasmenge und –zusammensetzung analysiert.

Für die Gärversuche wurden fünf verschiedene Substrate eingesetzt, die sich in der mikrobiellen Vorbelastung deutlich unterscheiden und in der Praxis von großer Bedeutung sind. Aus dem Bereich der Tierhaltung waren das Rindergülle, Schweinegülle und Hühnertrockenkot, aus dem Bereich der pflanzlichen Substrate Maissilage und Kleegrassilage. Alle Substrate haben nach den Regelungen des Erneuerbaren-Energien-Gesetzes Anspruch auf den NaWaRo-Bonus.

Als Impfschlamm wurde bei allen Gärversuchen ein speziell vorbehandelter Faulschlamm aus einer kommunalen Kläranlage verwendet, um jeweils eine gleiche bakterielle Hintergrundbelastung zu erhalten. Im Klärschlamm sind alle für die Fermentation benötigten Bakterienstämme vorhanden. Die Populationsgröße und die Stoffwechselaktivität der Bakterien sind jedoch relativ gering.

Die jeweiligen Substrate wurden täglich zugeführt, der Gasertrag und die Gaszusammensetzung täglich gemessen. Die anfangs geringe Raumbelastung wurde bei stabilen Verhältnissen erhöht. Zur Beschreibung der Milieubedingungen wurden zum Zeitpunkt der Probenahme und bei Erhöhung der Raumbelastung Proben aus den Reaktoren entnommen und diese auf pH-Wert, Trockenrückstandsgehalt, organischen Trockenrückstandsgehalt, Chemischen Sauerstoffbedarf (CSB), den Hauptnährstoffen N und P, Ammonium und das Spektrum der niederen organischen Säuren analysiert.

Die Gärversuche wurden sowohl unter mesophilen (37 °C) als auch thermophilen

Betriebsbedingungen (55 °C) durchgeführt. Unter mesophilen Betriebsbedingungen wird in der Regel nur eine teilweise Inaktivierung von seuchenhygienisch relevanten Organismen erreicht. Unter thermophilen Bedingungen kann dagegen von einer erheblichen Inaktivierung seuchenhygienisch relevanter Organismen ausgegangen werden. Die Reduktion der Keimzahl ist dabei in erheblichen Umfang von der Verweilzeit im Fermenter abhängig.

4.2 Kenndaten der Substrate

4.2.1 Trockenrückstand (TR) und organischer Trockenrückstand (oTR)

Eine anaerobe Vergärung ist bis zu einem TR-Gehalt von 40 % möglich. Zu der Bestimmung des TR-Gehalts werden die Substratproben bei 105°C für 48 Stunden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der TR-Gehalt aus den Messwerten errechnet sich nach Gleichung 1.

$$TR = \frac{\text{Masse der getrockneten Probe}}{\text{Feuchtmasse der Probe}} \times 100 \quad \text{Gl. 1}$$

Für die thermophilen Gärversuche konnten nur der Hühnertrockenkot und die Kleegrassilage aus der mesophilen Versuchsreihe verwendet werden. Durch die Lagerung hatten sich die TR-Gehalte verändert. Beim Hühnertrockenkot verringerte sich dieser, wogegen bei der Kleegrassilage der TR-Gehalt anstieg. Die anderen Substrate mussten neu angeschafft werden. Die TR-Gehalte waren jeweils geringer als beim mesophilen Gärversuch (Tabelle 2).

Der organische Trockenrückstand ist ein wichtiger Parameter zur Bestimmung der Raumbelastung. Die Rückstandsproben aus der TR-Bestimmung werden bei 550°C in einem Muffelofen für sechs Stunden verascht. Dabei werden alle organischen Bestandteile verbrannt. Als Rückstand verbleiben nur die mineralischen Bestandteile. Den oTR-Gehalt errechnet sich aus den Messwerten gemäß Gleichung 2.

$$oTR = \frac{\text{Masse der getrockneten Probe} - \text{Masse der veraschten Probe}}{\text{Feuchtmasse der Probe}} \times 100 \quad \text{Gl. 2}$$

4.2.2 Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)

Anhand der CSB-Konzentration lässt sich die organische Schmutzfracht eines Substrats bestimmen. Dies geschieht, indem alle Kohlenstoffverbindungen vollständig oxidiert werden.

Der CSB-Wert zeigt die Menge an Sauerstoff an, die für die vollständige Oxidation des Substrats notwendig ist. Deswegen kann er auch als Wert der chemischen Energie interpretiert werden.

Pro Gramm CSB können 0,35 l Methan gebildet werden. Dieser Wert ergibt sich daraus, dass für die Verbrennung von einem Molekül Methan zwei Moleküle Sauerstoff benötigt werden:



1 Mol CH₄ entspricht einem Volumen von 22,4 l

2 Mol O₂ entsprechen einer Masse von 64 g

$$1 \text{ g CSB} = 22,4 \text{ l CH}_4 / 64 \text{ g O}_2 = 0,35 \text{ l CH}_4 / \text{g O}_2$$

Für den aeroben Abbau von 22,4 l Methan werden also 64 g Sauerstoff benötigt. Dieses entspricht einem Verhältnis Methan : Sauerstoff von 0,35:1, was mit einer Methanproduktion von 0,35 l Methan aus 1 g CSB gleichgesetzt werden kann. Dieser Wert wird in der Praxis aber nicht erreicht, da zum einen bei der Bestimmung auch Stoffe erfasst werden, die den Bakterien nicht zur Verfügung stehen (z.B. Lignin) und darüber hinaus bestimmte Verbindungen, die biologisch abbaubar sind, nicht erfasst werden, zum anderen ca. 10 % des CSB für die Neubildung der Bakterienmasse benötigt wird. Daher wird eine theoretisch maximale Methanproduktion von 0,32 l Methan je Gramm CSB zu Grunde gelegt.

Die für den thermophilen Gärversuch neu beschafften Substrate Rindergülle, Schweinegülle und Maissilage hatten jeweils niedrigere CSB-Werte als die jeweiligen für den mesophilen Gärversuch (Tabelle 2 und Tabelle 3).

4.2.3 Gehalt an Gesamtstickstoff (Kjeldahl-Stickstoff)

Der organische gebundene Stickstoff ist die Quelle für das Ammonium, das für das Bakterienwachstum wichtig ist. Der Gehalt an Kjeldahl-Stickstoff (nach Johann Kjeldahl (1849 – 1900), Dänemark) ist die Summe aus organisch gebundenem Stickstoff und Ammonium-Stickstoff.

Der in der Landwirtschaft auch als Stickstoffdünger verwendete Hühnertrockenkot war hier mit dem hohen Gehalt besonders auffällig.

Auch die N-Gehalte waren bei den für den thermophilen Gärversuch neu beschafften

Substraten jeweils niedriger als die für den mesophilen Gärversuch. Dafür war der Stickstoffgehalt des Impfschlammes höher (Tabelle 2 und Tabelle 3).

4.2.4 Gehalt an Ammonium-Stickstoff (NH₄-N)

Für das Bakterienwachstum ist Ammonium als Stickstoffquelle von großer Bedeutung. Dafür wird im Fermentationsprozess organischer Stickstoff zum überwiegenden Teil in Ammonium-Stickstoff umgewandelt. Dennoch wirken zu hohe Ammoniumkonzentrationen toxisch auf die Bakterien, da Ammonium in einer Gleichgewichtsbeziehung zu Ammoniak liegt. Ein Teil des Ammoniaks liegt in Abhängigkeit von pH-Wert und der Temperatur als freies Ammoniak vor. Steigen pH-Wert und Temperatur, verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung des Ammoniaks, der schon ab einer Konzentration von 0,15 g/l toxisch für die Bakterien wirkt.

Auch hier hatte der Hühnertrockenkot den höchsten NH₄-N-Gehalt. Die Silagen hatten die niedrigsten NH₄-N-Gehalte. Beim Klee als Leguminose war der größte Teil des Stickstoffs organisch gebunden. Die NH₄-N-Gehalte waren bei den für die thermophilen Gärversuche neu beschafften Substraten jeweils niedriger als die bei den mesophilen Gärversuchen. (Tabelle 2 und Tabelle 3).

4.2.5 Gehalt an Ortho-Phosphat (PO₄-P)

Für die Bakterien wird Phosphat als Nährstoff benötigt. Auch hier hatte der Hühnertrockenkot den höchsten PO₄-P-Gehalt, der von Rindergülle war am niedrigsten. Auch beim thermophilen Gärversuch war der PO₄-P-Gehalt der Rindergülle am niedrigsten, bei der Schweingülle war dieser höher. Die Gehalte der neu beschafften Substrate waren jeweils niedriger, beim Impfschlamm jedoch höher (Tabelle 2 und Tabelle 3).

Tabelle 2: Ausgangsdaten der Substrate des mesophilen Gärversuchs

	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt-N (g/kg)	NH₄-N (g/kg)	PO₄-P (g/kg)
Impf Schlamm	1,65	1,00	16,50	1,46	0,77	0,453
Rindergülle	8,80	7,05	115,83	4,17	2,13	0,565
Schweinegülle	6,68	4,70	64,60	6,31	4,04	1,055
Hühnertrockenkot	69,80	55,57	721,91	25,95	6,16	11,087
Maissilage	35,01	33,81	439,40	4,40	0,71	0,733
Kleegrassilage	33,29	29,61	381,64	9,69	1,20	1,193

Tabelle 3: Ausgangsdaten der Substrate des thermophilen Gärversuchs

	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt-N (g/kg)	NH₄-N (g/kg)	PO₄-P (g/kg)
Impf Schlamm	1,65	1,30	17,45	2,12	1,30	0,537
Rindergülle	8,80	5,08	86,29	3,55	2,06	0,399
Schweinegülle	6,68	4,37	58,13	4,69	2,79	1,205
Hühnertrockenkot	69,80	49,91	721,91	25,95	6,16	11,087
Maissilage	35,01	32,23	364,46	4,20	0,65	0,701
Kleegrassilage	33,29	29,86	381,64	9,69	1,20	1,193

4.2.6 FOS/TAC-Wert

Der FOS/TAC-Wert gibt das Verhältnis der flüchtigen organischen Säuren (FOS) zu totalen anorganischen Kohlenstoff (TAC) des Systems an. Durch den FOS/TAC-Wert lassen sich Aussagen über die Stabilität des Prozesses treffen. Ein Wert unter 0,35, bei gleichzeitiger guter Biogasproduktion, deutet auf einen stabilen Prozessablauf hin. Steigt der FOS-Wert, reichern sich die niederen organischen Säuren an und es kommt zur Hemmung des Prozesses. Der TAC-Wert gibt die Konzentration an $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ und CaCO_3 im System. Die Carbonate können ein Abfallen des pH-Wertes bei steigendem FOS-Wert durch Binden der frei werdenden H^+ -Ionen verhindern.

4.2.7 Bestimmung der flüchtigen organischen Säuren (Säurespektrum)

Ein stabiler Fermentationsprozess muss eine niedrige Säurekonzentration aufweisen. Mit steigender Konzentration an flüchtigen organischen Säuren wird der Abbauprozess zunehmend gehemmt und instabil, bevor er ganz zum Erliegen kommt.

Die Bestimmung des Säurespektrums erfolgt mit einer Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC). Mit dieser Methode können organische Säuren wie Milch-, Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter- und Valeriansäure qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Die Substrate wiesen folgende Säurespektren auf (Tabelle 4 und 5):

Tabelle 4: Säurespektren der Substrate zu Beginn des mesophilen Gärversuchs

	Milch- säure (g/kg)	Ameisen- säure (g/kg)	Essig-säure (g/kg)	Propion- säure (g/kg)	n-Butter- säure (g/kg)	i-Butter- säure (g/kg)	n-Valerian- säure (g/kg)	i-Valerian- säure (g/kg)	Gesamt (g/kg)
Impf Schlamm	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Rindergülle	-	-	4,9989	0,9563	0,543	1,602	0,4589	0,167	8,7261
Schweinegülle	-	0,508	0,3415	0,032	-	-	-	-	0,8815
Hühnertrockenkot	1,902	26,8516	-	1,0023	1,235	0,189	-	1,583	32,7629
Maissilage	14,337	0,5001	9,1204	9,487	2,0089	0,1963	0,5587	2,1174	38,3258
Kleegrassilage	40,8963	4,4058	12,089	4,836	-	-	-	-	62,2271

-: nicht nachgewiesen

Tabelle 5: Säurespektren der Substrate zu Beginn des thermophilen Gärversuchs

	Milch- säure (g/kg)	Ameisen- säure (g/kg)	Essig-säure (g/kg)	Propion- säure (g/kg)	n-Butter- säure (g/kg)	i-Butter- säure (g/kg)	n-Valerian- säure (g/kg)	i-Valerian- säure (g/kg)	Gesamt (g/kg)
Impf Schlamm	-	-	0,0668	-	-	-	-	-	0,0668
Rindergülle	-	-	6,182	1,2594	0,428	1,553	0,583	0,2986	8,9063
Schweinegülle	-	0,599	0,3077	0,0493	-	-	-	0,0219	0,9379
Hühnertrockenkot	1,895	30,5066	-	1,2879	37,0418	0,263	-	1,7866	28,6046
Maissilage	13,8818	0,3677	9,7927	10,3423	2,5724	0,2475	0,6883	2,3513	40,244
Kleegrassilage	41,288	4,0475	12,1394	5,0277	-	-	-	-	62,4976

-: nicht nachgewiesen

Die Rinder- und Schweinegülle hatten im Vergleich zu den anderen Substraten insgesamt wenige Säuren. Beim Hühnertrockenkot gab es einen hohen Anteil an Ameisensäure. Die Silagen hatten einen hohen Anteil an Milchsäure (Tabelle 4).

Die Säurespektren der Substrate für den thermophilen Gärversuch waren denen des mesophilen ähnlich (Tabelle 5).

4.3 pH-Wert

Der pH-Wert ist ein Indikator für den problemlosen Abbauprozess im Fermenter. Zwischen den einzelnen Prozessstufen besteht eine direkte pH-Abhängigkeit. Die methanogenen Bakterien benötigen einen pH-Wert zwischen 6,5 und 8. Außerhalb dieses pH-Bereichs werden die Bakterien in ihrem Wachstum gehemmt und der Fermentationsprozess kommt durch eine Akkumulation von Säuren zum Erliegen.

4.4 Die Bedeutung der Gaszusammensetzung

Mit der Zusammensetzung des Biogases kann man die Situation des anaeroben Abbauprozesses im Fermenter beurteilen und eventuelle Störungen erkennen. Dabei wird die Zusammensetzung von der Wahl und der Beschaffenheit des Substrats sowie der von der Prozessstabilität beeinflusst. Bei einem stabilen Biogasprozess liegt der Methangehalt im Biogas abhängig vom verwendeten Substrat in der Regel über 50 Vol.-%. Eine Methankonzentration unterhalb 50 Vol.-% deutet auf eine Hemmung der methanogenen Phase und einen instabilen Prozessablauf.

Die Konzentration von Schwefelwasserstoff im Biogas sollte möglichst niedrig sein. Eine zu hohe Schwefelwasserstoff-Konzentration wirkt toxisch auf die Methanbakterien.

4.5 Versuchsparameter

4.5.1 Raumbelastung

Die Raumbelastung eines Fermenters ist definiert als die Menge an organischen Stoffen, die dem Reaktor je Zeit und Volumeneinheit zugeführt wird. Die Menge an organischen Stoffen wird in g oTR angegeben. Über die festgelegte Raumbelastung wird die täglich benötigte Substratmenge errechnet.

Die Formel zur Berechnung der Raumbelastung lautet:

$$B_R = m_{(\text{org. Sub.})} / V_R * t \quad \text{Gl. 4}$$

- B_R = Raumbelastung [g oTR/l*d]
 $m_{\text{org.Sub}}$ = Masse des organischen Stoffes [g]
 V_R = Reaktorvolumen [l]
 t = Zeit [d]

Bei den Gärversuchen wurde mit einer Raumbelastung von 0,5 g oTR/l*d begonnen und bei einem stabilen Fermentationsprozess jeweils um 0,5 g oTR/l*d erhöht.

Folgende Frischmassen wurden den Reaktoren bei 0,5 g oTR/l*d Raumbelastung zugeführt:

Tabelle 6: Frischmassenzugabe bei einer Raumbelastung von 0,5 oTR/l*d

	Mesophil (g)	Thermophil (g)
Rindergülle	106,36	147,61
Schweinegülle	159,44	171,58
Hühnertrockenkot	13,50	15,03
Maissilage	22,18	25,65
Kleegrassilage	26,48	26,48

4.5.2 Verweilzeit

Die Verweilzeit gibt die mittlere Aufenthaltszeit eines zugeführten Stoffes im Reaktor vom Zeitpunkt des Eintrags bis zum Moment des Austrags an (SRT: solid retention time).

Die Formel für die Verweilzeit lautet:

$$SRT = V_R / V_{ZU} \quad \text{Gl. 5}$$

- V_R = Reaktorvolumen [l]
 V_{ZU} = Volumenstrom des zugegebenen Substrats [l/d]

Der Volumenstrom des zugeführten Substrats ist gleich der täglichen Substratmenge. Somit nimmt die Verweilzeit mit steigender Raumbelastung ab.

4.5.3 Abbaugrad

Der Abbaugrad gibt an, wie weit das zugegebene Substrat bei einer definierten Raumbelastung abgebaut wird.

Die Formel für den Abbaugrad lautet:

$$\eta(CSB) = \frac{CSB(Sub.) * m(zu) - CSB(end) * m(ab)}{CSB(Sub.) * m(zu)} * 100 \quad \text{Gl. 6}$$

$\eta(CSB)$	=	Abbaugrad über die Flüssigphase [%]
$m(zu)$	=	zugeführte Substratmenge [g/d]
$m(ab)$	=	abgefaltete Substratmenge [g/d]
$CSB(Sub.)$	=	Chemischer Sauerstoffbedarf des Substrats [g/l]
$CSB(end)$	=	Chemischer Sauerstoffbedarf des Ablaufs [g/l]

Statt des CSB-Werts kann auch mit dem oTR-Wert der Abbaugrad errechnet werden.

4.5.4 Methanproduktivität

Die Methanproduktivität ist abhängig von der gebildeten Methanmenge je Liter Reaktorvolumen und Zeiteinheit:

$$P_{(CH_4)} = V_{(CH_4)} / V_R * t \quad \text{Gl. 7}$$

$P_{(CH_4)}$	=	Methanproduktivität [l CH ₄ /l*d]
$V_{(CH_4)}$	=	gebildete Methanmenge [l CH ₄]
V_R	=	Reaktorvolumen [l]
t	=	Zeit [d]

Die Methanproduktivität steigt mit zunehmender Raumbelastung zunächst an. Durch die immer kürzer werdenden Verweilzeiten kann das zugeführte Substrat jedoch nur noch unvollständig abgebaut werden. Fällt die Methanproduktivität trotz steigender Raumbelastung, ist dies ein Anzeichen für eine Überlastung des Fermenters.

4.5.5 Methanausbeute

Die Methanausbeute errechnet sich nach der unten stehenden Formel und beschreibt die Methanmenge, die aus der zugeführten Menge an organischer Fracht gebildet wurde. Die Methanausbeute kann maximal 0,32 l Methan je g CSB betragen und ist somit, ähnlich wie der Abbaugrad, ein Parameter zur Charakterisierung der Vergärbarkeit eines Substrates.

$$A_{(CH_4)} = \frac{V_{(CH_4)}}{CSB_{(Sub)} * m_{(Sub)}} \quad \text{Gl. 8}$$

$A_{(CH_4)}$	=	Methanausbeute [l CH ₄ /g CSB]
$V_{(CH_4)}$	=	gebildete Methanmenge [l/d]
$m_{(Sub)}$	=	zugeführte organische Schmutzfracht [kg/d]
$CSB_{(Sub)}$	=	CSB-Wert des Substrats [g/kg]

Um die Methanausbeute anhand der organischen Trockensubstanz auszurechnen, wird der CSB-Wert mit dem oTR-Wert des Substrats ersetzt.

4.6 Probenaufbereitung zur molekularbiologischen Analyse

Aus den laufenden Reaktorversuchen wurde Probenmaterial entnommen und sofort aufgearbeitet. Die Mikroorganismen und feste Bestandteile des Reaktorinhaltes wurden 30 min bei 11800 x g abzentrifugiert und anschließend zweimal mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in isotonischer KCl-Lösung (0,85 % (w/v) KCl) resuspendiert und eine differenzielle Zentrifugation durchgeführt, um die festen Bestandteile von den freien Mikroorganismen zu trennen. Die festen Bestandteile wurden 10 min bei 500 xg sedimentiert (500 x g – Fraktion) und die Mikroorganismen im Überstand ein weiteres Mal für 30 min bei 11800 xg zentrifugiert (11800 x g - Fraktion). Von beiden Pellets wurden Aliquots abgenommen und bei -70°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

4.7 Extraktion von Nukleinsäuren

4.7.1 Test unterschiedlicher Extraktionsmethoden

Für die routinemäßig durchgeführten Analysen wurden Nukleinsäuren aus den Pellets der 11800 xg - Fraktionen extrahiert. Es wurden unterschiedliche Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Umweltproben getestet. Dabei stand im Vordergrund eine Methode

auszuwählen, die die besonders widerstandsfähigen Zellwände der Gram-positiven Clostridien effizient aufbricht. Gleichzeitig sollten Substanzen, die sich hemmend auf die nachfolgenden Reaktionen auswirken können, entfernt werden. Diesbezüglich wurden 11 unterschiedliche DNA-Extraktions Methoden an Klärschlammproben getestet.

1. FastDNA[®] SPIN Kit for Soil von Bio101 (Qbiogene, Irvine, USA) mit einem Beadbeating Schritt von 30 s auf Stufe 5,5.
2. FastDNA[®] SPIN Kit for Soil von Bio101 (Qbiogene, Irvine, USA) mit zwei Beadbeating Schritten a 30 s auf Stufe 5,5.
3. MOBIO UltraClean[™] Soil DNA Kit (MOBIO, Carlsbad, USA). Die Bearbeitung erfolgte laut beigefügter Arbeitsvorschrift mit einer Zellyse durch 10 min vortexen. Die ausgefällte DNA wurde gewaschen und anschließend gelöst.
4. MOBIO UltraClean[™] Soil DNA Kit (MOBIO, Carlsbad, USA). Die Bearbeitung erfolgte laut beigefügter Arbeitsvorschrift mit einer Zellyse durch 10 min vortexen. Die ausgefällte DNA wurde ohne waschen wieder gelöst.
5. MOBIO UltraClean[™] Soil DNA Kit (MOBIO, Carlsbad, USA). Die Bedingungen für die Zellyse wurden verschärft durch zwei Beadbeating Schritte a 30 s auf Stufe 5,5. Die ausgefällte DNA wurde gewaschen und anschließend gelöst.
6. MOBIO UltraClean[™] Soil DNA Kit (MOBIO, Carlsbad, USA). Die Bedingungen für die Zellyse wurden verschärft durch zwei Beadbeating Schritte a 30 s auf Stufe 5,5. Die ausgefällte DNA wurde ohne waschen wieder gelöst.
7. ExtractMaster[™] Fecal DNA Extraction Kit (EPICENTRE, Madison, USA).
8. DNA Extraktion nach Lueders et al. (Lueders et al., 2004) mit Zirkonia-Beads und zwei Beadbeating Schritten a 30 s auf Stufe 5,5. Die DNA wurde mit PEG aus der wässrigen Extraktionsphase ausgefällt.
9. DNA Extraktion nach Lueders et al. (Lueders et al., 2004) mit Zirkonia-Beads und zwei Beadbeating Schritten a 30 s auf Stufe 5,5. Die wässrige Phase mit der DNA wurde zur weiteren Aufreinigung in den „peqGOLD Tissue DNA Mini Kit“ (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) eingesetzt.
10. DNA Extraktion nach Lueders et al. (Lueders et al., 2004) mit 0,5 mm Glaskügelchen und zwei Beadbeating Schritten a 30 s auf Stufe 5,5. Die DNA wurde mit PEG aus der wässrigen Extraktionsphase ausgefällt.
11. DNA Extraktion nach Lueders et al. (Lueders et al., 2004) mit 0,5 mm Glaskügelchen und zwei Beadbeating Schritten a 30 s auf Stufe 5,5. Die wässrige Phase mit der DNA wurde zur weiteren Aufreinigung in den „peqGOLD Tissue DNA Mini Kit“ (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) eingesetzt.

4.7.2 Beurteilung der unterschiedlichen Extraktionsmethoden

Die Beurteilung der erhaltenen DNA erfolgte zum einen visuell durch eine elektrophoretische Auftrennung der DNA in einem 0,8 %-igem Agarosegel in 1x TBE. Dazu wurden 8 µl DNA-Extrakt mit 2 µl 5x DNA-Ladepuffer gemischt und bei 60V für 2,5 h aufgetrennt. Die DNA wurde durch den DNA-Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt und konnte so hinsichtlich Qualität und Quantität beurteilt werden.

Des Weiteren wurde die Amplifizierbarkeit der DNA-Extrakte getestet. Dazu wurde ein Abschnitt des Genes der 16S rRNA einer weiter gefassten Gruppe von Clostridien in einer PCR vervielfältigt (siehe 4.7.2.1) und die Effizienz der Reaktion anhand der erhaltenen Produktmenge abgeschätzt. Um die Menge an enthaltene DNA von Clostridien des Cluster I zu beurteilen wurde in einer weiteren PCR (siehe 4.9.1) ebenfalls ein Abschnitt des Genes für die 16S rRNA vervielfältigt und die Produktmenge als ein Indikator für die Effizienz des Zellaufschlusses dieser Gruppe Clostridien bewertet.

4.7.2.1 PCR zur Validierung der Extraktionsmethode

Die Amplifikation der 16S rRNA erfolgte mit für Clostridien (nicht *Clostridium* Cluster I) spezifischen Primern unter den folgenden Reaktionsbedingungen:

Primer	Primersequenz (5'-3')	Literatur
Matsuki g-Ccoc-F	AAA TGA CGG TAC CTG ACT AA	(Matsuki et al., 2004)
Matsuki g-Ccoc-R	CTT TGA GTT TCA TTC TTG CGA A	

Reaktionsansatz:

Komponente	Endkonzentration/Volumen
H ₂ O	auf 25 µl auffüllen
10 x Buffer	1 x mit 1,5 mM MgCl ₂
dNTP's	je 200 µM
Matsuki g-Ccoc-F	0,5 µM
Matsuki g-Ccoc-R	0,5 µM
HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Deutschland)	0,025 U µL ⁻¹
Template (DNA-Lösung)	1 µL (je 25 µL-Ansatz)

PCR-Bedingungen:

94 °C	15 min
30 Zyklen:	
94 °C	20 s
50 °C	20 s
72 °C	50 s
72 °C	5 min

4.7.3 Details der ausgewählten DNA Extraktionsmethode

Die im Abschnitt 4.7.1 unter Punkt 9 vorgestellte Methode hat sich im Vergleich zu den anderen Methoden, als am effizientesten erwiesen, so dass alle Proben aus den Fermentationen nach der im folgenden detailliert dargestellten Methode aufgearbeitet wurden.

1. 0,7 g 0,1 mm Zirconia/Silica beads (www.biospec.com – Roth N033.1) in ein 2 ml Schraubdeckelröhrchen füllen
2. Proben-Pellet in 500 µl NaPO₄ Puffer (pH 8) resuspendieren und in das Schraubdeckelröhrchen geben
3. 250 µl TNS-Lösung zugeben
4. ggf. noch weitere 250 µl NaPO₄ Puffer zugeben (die Röhrchen sollten nicht mehr als bis zur Hälfte des Riffelrandes befüllt sein)
5. Bead beating 45 sec bei 6.5 m/s, Proben auf Eis
6. 4 min bei 13000 rpm & 4°C zentrifugieren (wie alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte)
7. 900 µl Überstand in ein 2 ml – Safelock geben
8. Extraktion mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25/24/1) pH 8, kurz vortexen 4 min zentrifugieren
9. 800 µl Überstand in ein 2 ml “Phase lock Gel Heavy” Tube (Eppendorf) geben
10. mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalcohol (24/1) pH 8 extrahieren, kurz vortexen, 4 min zentrifugieren
11. 1,5 ml E-cup leer wiegen
12. Wässrige Phase abnehmen und in das 1,5 ml E-cup geben.
13. das E-Cup wieder wiegen und aus der Differenz das Volumen der wässrigen Phase bestimmen.
14. Die weitere Aufreinigung der wässrigen Phase erfolgt mit dem „peqGOLD Tissue DNA Mini Kit“ (Peqlab)
15. Wässrigen Überstand aus der Chloroform Extraktion (~700 µl) und 1 Volumen BL-Puffer in 2 ml-Safelock geben – sanft von Hand umschwenken

16. 10 min bei 70°C inkubieren
17. 500 µl EtOH dazu geben – sanft umschwenken bis keine Schlieren mehr da sind
18. Lösung auf eine HiBind Säule geben (je 750 µl; zwei- bis drei-mal) ggf. auch das Präzipitat
19. 1 min bei 8000 x g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen; nach der letzten Zentrifugation das Sammel tube verwerfen und durch ein neues ersetzen
20. 750 µl DNA-Waschpuffer auf die HiBind Säule geben
21. 1 min bei 8000 x g zentrifugieren; Durchfluss verwerfen;
22. die Schritte 20 und 21 wiederholen
23. 2 min bei maximaler Geschwindigkeit (20800 x g) zentrifugieren
24. Säule in ein 1,5 ml-Saflock setzen
25. 50 µl Elutionspuffer (70°C) auf die Säule geben
26. 3 min bei 70°C inkubieren
27. 1 min 8000 x g zentrifugieren
28. Eluat erneut auf die Säule geben
29. 3 min bei 70°C inkubieren
30. 1 min 8000 x g zentrifugieren
31. DNA Lösung aufteilen und bei -20°C bzw. im Kühlschrank lagern

120 mM NaPO ₄ Puffer	112.87 mM Na ₂ HPO ₄ , 7.12 mM NaH ₂ PO ₄ , (pH 8) autoklaviert
TNS-solution	500 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10% SDS (w/v), pH-Wert mit HCl einstellen, autoklavieren

Alle weiteren Puffer oder Lösungen sind in dem zur Aufreinigung benötigtem System „peqGOLD Tissue DNA Mini Kit“ enthalten.

4.8 Darstellung der Vielfalt der Bakteriengemeinschaften

Die Diversität der bakteriellen Gemeinschaften in den Ausgangsmaterialien und in den Biogasanlagen im Verlauf der Fermentation wurde ohne Kultivierung der beteiligten Mikroorganismen in Form genetischer Fingerabdrücke dargestellt. Dazu wurde aus den DNA-Extrakten ein Abschnitt von 400 bp des 16S rRNA Genes in einer PCR vervielfältigt und das Produkt anschließend sequenzspezifisch in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die so angefertigten SSCP (single-strand conformation polymorphism) Profile spiegeln die Diversität der am häufigsten vertretenen Bakterien wider.

4.8.1 PCR:

Die Amplifikation der 16S rRNA erfolgte mit für Bakterien spezifischen Primern unter den

folgenden Reaktionsbedingungen:

Primer	Primersequenz (5'-3')	Literatur
Com1	CAG CAG CCG CGG TAA TAC	(Schwieger and Tebbe, 1998)
Com2-Ph	CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	

Reaktionsansatz:

Komponente	Endkonzentration/Volumen
H ₂ O	auf 50 µl auffüllen
10 x Buffer	1 x mit 1,5 mM MgCl ₂
dNTP's	je 200 µM
Com1	0,5 µM
Com2-Ph	0,5 µM
HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Deutschland)	0,025 U µL ⁻¹
Template (DNA-Lösung)	1 µL (je 50 µL-Ansatz)

Je Probe wurden drei Wiederholungen a 50 µl angesetzt und zur weiteren Aufarbeitung vereinigt.

PCR-Bedingungen:

95 °C	15 min
30 Zyklen	
	94 °C 60 s
	50 °C 60 s
	72 °C 70 s
72 °C	5 min

4.8.2 Auftrennung unterschiedlicher Produkte mit der SSCP-Methodik

Die Prozedur zur Erstellung von SSCP-Profilen besteht aus dem Verdau eines Stranges des doppelsträngigen PCR-Produktes und einer elektrophoretischen Auftrennung der verbleibenden einzelsträngigen DNA. Ein detailliertes Protokoll ist bei Dohrmann und Tebbe (Dohrmann and Tebbe, 2004) veröffentlicht. Die Elektrophorese erfolgte in einem 0,4 mm dicken Gel aus 0,625-fach konzentrierter MDE-Lösung für 6800Vh bei 20°C in 1 x TBE-Puffer.

4.9 Darstellung der Diversität der Clostridien des Cluster I

Zur Darstellung der Diversität der Clostridien des Cluster I in den Proben wurde ein für diese Clostridien typischer Abschnitt des 16S rRNA Genes mittels PCR vervielfältigt.

4.9.1 PCR:

Die Amplifikation eines 670 bp langen Abschnittes der 16S rRNA erfolgte mit Primern die selektiv die 16S rRNA Gene der Clostridien des Cluster I vervielfältigen.

Primer	Primersequenz (5'-3')	Literatur
P930	GTG AAA TGC GTA GAG ATT AGG AA	(Le Bourhis et al., 2005)
P932-Ph	GAT YYG CGA TTA CTA GYA ACT	

Reaktionsansatz:

Komponente	Endkonzentration/Volumen
H ₂ O	auf 50 µl auffüllen
10 x Buffer	1 x mit 1,5 mM MgCl ₂
dNTP's	je 200 µM
P930	0,5 µM
P932-Ph	0,5 µM
HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Deutschland)	0,025 U µL ⁻¹
Template (DNA-Lösung)	1 µL (je 50 µL-Ansatz)

Je Probe wurden drei Wiederholungen a 50 µl angesetzt und zur weiteren Aufarbeitung vereinigt.

PCR-Bedingungen:

95 °C	15 min
30 Zyklen	
94 °C	20 s
58 °C	30 s
72 °C	30 s
72 °C	5 min

4.9.2 SSCP-Methodik zur Auftrennung von clostridialen 16S rRNA Genen

Die SSCP-Methodik folgte demselben Protokoll wie in 4.8.2 jedoch wurde die Elektrophorese für 9600 Vh betrieben.

4.10 Charakterisierung der Clostridien (Cluster I)

Um einzelne, an der Biogasbildung beteiligt Clostridien zu identifizieren, wurden die dominanten Banden aus den entsprechenden SSCP-Profilen ausgeschnitten und die DNA wieder gewonnen. Nach einer erneuten Vervielfältigung der DNA wurde diese cloniert und sequenziert. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenz zu Sequenzen bekannter Organismen, die in öffentlichen Datenbanken hinterlegt sind, ermöglicht eine phylogenetische Einordnung der an der Biogasbildung beteiligten Clostridien.

4.11 Quantifizierung der in Biogasreaktoren enthaltenen Clostridien

Zur mengenmäßigen Erfassung der Clostridien in den Proben wurde ein real-time PCR-System angewendet. Dabei wird in einer PCR die gebildete Produktmenge zeitabhängig online erfasst. Aus dem Zeitpunkt der Produktbildung kann auf die ursprünglich vorhandene Menge der amplifizierten DNA geschlossen werden.

4.11.1 Real-time PCR

In der real-time PCR wird von einer Subpopulation der Clostridien des Cluster I ein ~120 bp langer Abschnitt des 16S rRNA Genes vervielfältigt.

Primer	Primersequenz (5'-3')	Literatur
F Cl.perfringes	ATG CAA GTC GAG CGA KG	(Rinttila et al., 2004)
R Cl.perfringes	TAT GCG GTA TTA ATC TYC CTT	

Reaktionsansatz:

Komponente	Endkonzentration/Volumen
H ₂ O	auf 25 µl auffüllen
10 x Buffer	1 x mit 1,5 mM MgCl ₂
MgCl ₂	1,5 mM MgCl ₂ (zusätzlich)
dNTP's	je 200 µM
F Cl.perfringes	0,5 µM
R Cl.perfringes	0,5 µM
1x SybrGreen	1/75000
HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Deutschland)	0,025 U µL ⁻¹
Template (DNA-Lösung)	1 µL (je 25 µL-Ansatz)

PCR-Bedingungen:

94 °C	15 min		
40 Zyklen			
	94 °C	15 s	
	55 °C	20 s	
	72 °C	30 s	
	80°C	30 s	Signaldetektion
72 °C	5 min		

4.12 Nachweis von Botulinum Neurotoxin Genen der Typen A, B, E und F

Der Nachweis von Genen der Neurotoxine (BoNT) der Typen A, B, E und F in Nukleinsäureextrakten aus Probenmaterial erfolgte durch zwei nacheinander geschaltete

PCRs. In der ersten PCR wurde ein Primersystem angewendet, dass alle Neurotoxingene der vier genannten Typen erfasste. Das erhaltene Produkt wurde anschließend in einer weiteren, jeweils nur ein Norotoxin-Gen vervielfältigenden PCR eingesetzt. Dieses System erhöht zum einen die Sensitivität der Nachweisreaktion, zum anderen erlaubt es eine Typisierung dieser vier Neurotoxintypen.

Zu Beginn dieser Arbeiten wurden eine Suche nach allen in internationalen DNA-Datenbank hinterlegten Sequenzen von Botulinum-Neurotoxin-Genen durchgeführt und die von Fach et al. 2002 veröffentlichten Primer auf ihre Aktualität hin überprüft. In den Datenbanken fanden sich 108 Sequenzen der betroffenen Gene. Die Primer der ersten PCR wurden wie veröffentlicht beibehalten. Von den Primern der zweiten nachgeschalteten PCR wurden die Primer zur Detektion der Toxine B und E unverändert übernommen, die Primer zur Detektion der Toxine A und F wurden modifiziert.

4.12.1 Bedingungen der ersten PCR zur gemeinsamen Amplifikation der Neurotoxingene der Typen A, B, E und F

Primer	Primersequenz (5'-3')	Literatur
CB1	AWA ATA ATT CRG GAT GGA AAR TAT C	(Fach et al., 2002)
P261	KRT ATR YHH RAT CDT YHT TTC TAA C	

Reaktionsansatz:

Komponente	Endkonzentration/Volumen
H ₂ O	auf 25 µl auffüllen
10 x Buffer	1 x mit 1,5 mM MgCl ₂
dNTP's	je 200 µM
CB1	0,5 µM
P261	0,5 µM
HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Deutschland)	0,025 U µL ⁻¹
Template (DNA-Lösung)	1 µL (je 25 µL-Ansatz)

PCR-Bedingungen:

94 °C	15 min
5 Zyklen	
95 °C	15 s
45 °C	15 s
72 °C	30 s
35 Zyklen	
95 °C	15 s
48 °C	15 s
72 °C	30 s
72 °C	10 min

4.12.2 PCR zur Typisierung von BoNT A

Primer	Primersequenz (5'-3')	Literatur
CB1	AWA ATA ATT CRG GAT GGA AAR TAT C	(Fach et al., 2002)
CBA-mod	CAY TAC GCT ACC TCT AGG CCC	Diese Arbeit

*die in rot geschriebenen Nukleotide wurden gegenüber der von Fach et al., veröffentlichten Sequenz verändert.

Reaktionsansatz:

Komponente	Endkonzentration/Volumen
H ₂ O	auf 25 µl auffüllen
10 x Buffer	1 x mit 1,5 mM MgCl ₂
dNTP's	je 200 µM
CB1	0,5 µM
CBA	0,5 µM
HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Deutschland)	0,025 U µL ⁻¹
Template (PCR-Produkt aus 4.12.1)	1 µL (je 25 µL-Ansatz)

PCR-Bedingungen:

95 °C	15 min
5 Zyklen	
95 °C	15 s
58 °C	15 s
72 °C	30 s
30 Zyklen	
95 °C	15 s
60 °C	15 s
72 °C	30 s
72 °C	10 min

4.12.3 PCR zur Typisierung von BoNT B

Primer	Primersequenz (5'-3')	Literatur
CB1	AWA ATA ATT CRG GAT GGA AAR TAT C	(Fach et al., 2002)
CBB	GAA TTT TGA TTA TAT TTG CTA CGT G	

Reaktionsansatz:

Wie in 4.12.2 jedoch mit den Primern CB1 und CBB.

PCR-Bedingungen:

Wie in 4.12.2.

4.12.4 PCR zur Typisierung von BoNT E

Primer	Primersequenz (5'-3')	Literatur
CB1	AWA ATA ATT CRG GAT GGA AAR TAT C	(Fach et al., 2002)
CBE	GCT TCT TAT ATT ATT AAT GCT TAA AGT AG	

Reaktionsansatz:

Wie in 4.12.2 jedoch mit den Primern CB1 und CBE.

PCR-Bedingungen:

Wie in 4.12.2.

4.12.5 PCR zur Typisierung von BoNT F

Primer	Primersequenz (5'-3')	Literatur
CB1	AWA ATA ATT CRG GAT GGA AAR TAT C	(Fach et al., 2002)
CBF	CTG TAG RWC CAT TTT TTC TTA TAA TAA C*	Diese Arbeit

*die in rot geschriebenen Nukleotide wurden gegenüber der von Fach et al., veröffentlichten Sequenz verändert.

Reaktionsansatz:

Wie in 4.12.2 jedoch mit den Primern CB1 und CBF.

PCR-Bedingungen:

Wie in 4.12.2.

5 Ergebnisse

5.1 Verlauf der mesophilen Gärversuche

Die mesophilen Gärversuche liefen vom 15. November 2005 bis zum 18. Juli 2006 und dauerten 246 Tage. Der Gärversuch der Kleegrassilage konnte erst drei Wochen später beginnen und wurde nach 228 Tagen beendet.

5.1.1 Raumbelastung und Verweilzeit

Die Gärversuche starteten mit einer Raumbelastung von 0,5 g oTR/l*d und wurden bei einem stabilen Fermentationsprozess und gleich bleibender Gasproduktion um 0,5 g oTR/l*d erhöht.

Die Reaktoren zur Biogasbildung aus Rindergülle und aus Schweinegülle liefen sehr stabil, die Raumbelastung konnte ohne Unterbrechung erhöht werden. Zum Ende des Versuchs liefen die Reaktoren der Rindergülle und Schweinegülle auf einer Raumbelastung von 4,5 g oTR/l*d.

Die Raumbelastung wurde in folgenden Zeiträumen erhöht:

Tabelle 7: Erhöhungen der Raumbelastungen

B_R (g oTR/l*d)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5
Versuchsdauer (d)	1.-20.	21.-49.	50.-66.	67.-79.	80.-93.	94.-109.	110.-129.	130.-156.	157.-246.

Die Biogasbildung aus Hühnertrockenkot, Mais- und Kleegrassilage war dagegen instabil und musste kurzzeitig unterbrochen und in der Raumbelastung heruntergestuft werden.

Beim Hühnertrockenkot war die Raumbelastung bis zum 109. Tag gleich die der Rinder- und Schweinegülle. Eine Erhöhung auf eine Raumbelastung von 3,5 g oTR/l*d konnte aber nicht geschehen, weil die Methankonzentration ab dem 108. Tag unter 48 % sank. Gleichzeitig stieg die Schwefelwasserstoffkonzentration auf 450 ppm und der Gehalt an Ammonium-Stickstoff auf 4,14 g/kg, was toxisch auf die Methanbakterien wirkte. Der FOS/TAC hatte einen Wert von 0,46. Die weitere Zuführung an Hühnertrockenkot wurde ab dem 113. Tag unterbrochen. Die Schwefelwasserstoffkonzentration stieg innerhalb der fünf Tage auf 580 ppm und die Methankonzentration sank weiter auf 38 %. Ein Versuch, am 184. Tag die Fermentation bei einer Raumbelastung von 1 g oTR/l*d wieder neu zu starten, musste

nach vier Tagen wegen der erneut sinkenden Methankonzentration wieder abgebrochen werden. Eine Zuführung des Hühnertrockenkots bei einer Raumbelastung von 0,5 g oTR/l*d vom 207. Tag konnte bis zum Ende betrieben werden. Aber auch hier sank die Methankonzentration am Ende unter 50 %.

Bei der Maissilage konnte die Erhöhung der Raumbelastung von 1 auf 1,5 g oTR/l*d erst am 67. Tag geschehen. Zuvor lag die Methankonzentration unter 50 %. Danach war die Methanproduktion aber stabil und die Raumbelastung wurde am 80. und 94. Tag des Gärversuchs auf 2,5 g oTR/l*d erhöht. Durch das Sinken des Methangehalts am 110. Tag unter 48 % und einem FOS/TAC-Wert von 0,57, musste die Raumbelastung auf 1,75 g oTR/l*d herabgesetzt werden. Nach einer Erholung wurde die Raumbelastung am 123. auf 2, am 130. Tag auf 2,5 g oTR/l*d und am 157. Tag auf 3 g oTR/l*d erhöht. Wegen der erneut sinkenden Methankonzentration musste die Raumbelastung ab dem 177. Tag wieder auf 2,5 g oTR/l*d gesenkt werden.

Der Gärversuch der Kleegrassilage war bis zum 98. Tag stabil und konnte auf eine Raumbelastung von 2,5 g oTR/l*d gesteigert werden. Ein FOS/TAC-Wert von 0,38 und ein Absinken der Methankonzentration auf unter 48 % zwangen zu einem zwischenzeitlichen Absinken auf 1,75 und 2 g oTR/l*d. Ab dem 113. Tag war die Raumbelastung wieder auf 2,5 g oTR/l*d, die ab dem 140. Tag auf 3 g oTR/l*d erhöht wurde und bis zum 174. Tag beibehalten. Durch ein erneutes Absinken der Methankonzentration auf 46 % musste die Raumbelastung nach 174 Tagen Versuchsdauer wieder auf 2,5 g oTR/l*d gesenkt werden, die bis um Ende des Versuchs nicht mehr geändert wurde.

Die Verweilzeiten gingen mit zunehmender Raumbelastung zurück (Abbildung 2). Die längste Verweilzeit hatte der Hühnertrockenkot (HTK). Durch die hohe organische Trockensubstanz wurde beim Hühnertrockenkot weniger Frischmasse dem Reaktor zugeführt. Die Rinder- (RG) und Schweinegülle (SG) mit ihrer geringen oTR hatten die geringste Verweilzeit. Die Mais- (SM) und Kleegrassilage (KGS) sind in ihrem Verlauf sehr ähnlich.

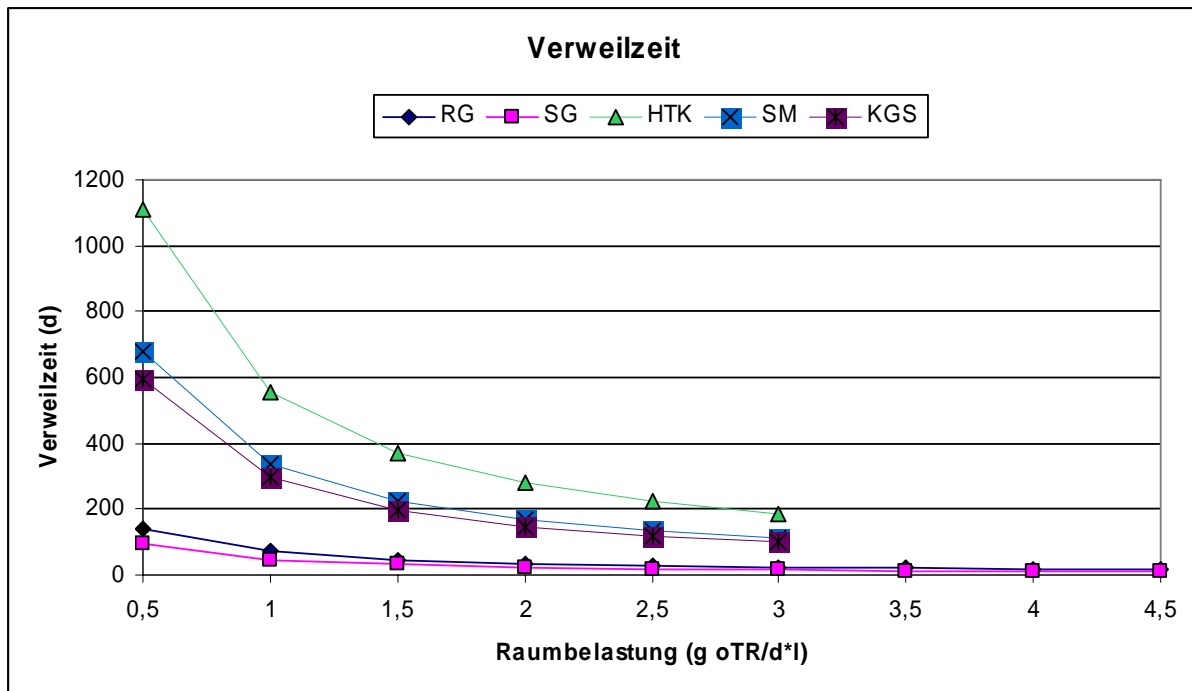


Abbildung 2: Verweilzeiten der Substrate des mesophilen Gärversuchs

5.1.2 Ergebnisse der Flüssigphasenanalytik

Zu jeder Belastungsstufe wurde eine komplette Analyse durchgeführt. Analysiert wurden der Trockenrückstand (TR), der organische Trockenrückstand (oTR), der chemische Sauerstoffbedarf (CSB), der Gehalt an Gesamtstickstoff (Gesamt-N), der Gehalt an Ammonium-Stickstoff (NH₄-N) und der Gehalt an Ortho-Phosphat (PO₄-P). 300 Tage nach Ende des mesophilen Gärversuchs wurden die gelagerten Substrate noch einmal auf TR, oTR, Gesamt-N und NH₄-N analysiert.

5.1.2.1 Rindergülle

Die untersuchten Parameter stiegen alle mit steigender Raumbelastung kontinuierlich an (Tabelle 8). Dies ist auf den Austausch des Impfschlammes durch die Zugabe der Rindergülle zurückzuführen, da die Ausgangswerte des Impfschlammes niedriger waren als die der Rindergülle (Tabelle 2). Ab der Raumbelastung von 3,5 g oTR/l*d stiegen die Parameter kaum noch an. Beim CSB gab es einen geringen Rückgang bei der Erhöhung der Raumbelastung von 3,5 auf 4 g oTR/l*d, der jedoch dann wieder anstieg. Nach 300 Tagen Lagerung sind die untersuchten Parameter Trockenrückstand, organischer Trockenrückstand und die Gehalte an Gesamt- und Ammonium-Stickstoff jeweils niedriger gewesen, als zum Ende der Rindergüllezuführung. Die Gärrückstände wurden in Fässern gelagert. Trotz des Rührens bei

den Probenahmen wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit keine gute Durchmischung erreicht, so dass die schwereren Bestandteile des Gärrückstandes am Boden des Fasses blieben. So ist auch der Starke Rückgang des Trockenrückstandes zu erklären. Dieses Problem gilt auch für die anderen Gärendlager des mesophilen Gärversuchs.

Tabelle 8: Flüssigphasenanalytik des Gärrückstands bei Einsatz von Rindergülle

Versuchs- dauer (d)	B_R (g oTR/l*d)	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt-N (g/kg)	NH₄-N (g/kg)	PO₄-P (g/kg)
20	0,5	2,12	1,53	24,46	1,79	1,07	0,464
49	1	3,34	2,41	36,83	2,44	1,42	0,480
66	1,5	4,37	3,24	49,71	2,87	1,66	0,505
79	2	5,02	3,76	57,46	3,19	1,84	0,508
93	2,5	5,53	4,11	61,23	3,45	1,98	0,511
109	3	6,18	4,64	73,91	3,70	2,12	0,544
129	3,5	6,99	5,34	82,89	3,93	2,23	0,582
156	4	7,08	5,38	80,24	4,11	2,42	0,585
246	4,5	7,10	5,44	89,26	4,12	2,48	0,621
546	Endlager	4,80	2,51	-	3,51	2,24	-

-: nicht nachgewiesen

Die Menge an Säuren des mesophilen Gärversuchs mit Rindergülle war während der gesamten Versuchsdauer sehr gering (Tabelle 9). Die Menge an Säuren war immer niedriger als 1 g/kg. Erst ab der Belastungsstufe von 3,5 g oTR/l*d erhöhte sich die Menge auf 0,8 g/kg. Der pH-Wert war immer im neutralen Bereich.

Tabelle 9: Säurespektrum des Gärückstands bei Einsatz von Rindergülle

Versuchs- dauer	B_R	pH	Milch- säure	Ameisen- säure	Essig- säure	Propion- säure	n-Butter- säure	i-Butter- säure	n- Valerian- säure	i- Valerian- säure	Gesamt
(d)	(g oTR/l*d)		(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)
20	0,5	7,18	-	-	0,0213	-	-	-	-	-	0,0213
49	1	7,20	-	-	0,0278	-	0,0788	-	-	0,0225	0,2294
66	1,5	7,15	-	0,0134	0,0487	0,1020	0,0666	-	0,1360	0,0390	0,4057
79	2	7,23	-	0,0204	0,0768	0,1105	-	0,0484	0,0556	0,0965	0,4082
93	2,5	7,24	-	0,0236	0,0964	0,1136	0,0421	0,0632	-	0,1122	0,4511
109	3	7,28	-	0,0299	0,1556	0,1589	-	0,0232	-	0,1258	0,4934
129	3,5	7,24	-	0,0286	0,2431	0,2456	-	-	0,1530	0,1863	0,8566
156	4	7,22	-	0,0355	0,1894	0,3668	-	-	-	0,1552	0,7469
246	4,5	7,20	-	0,0389	0,2001	0,2450	-	0,0830	0,2014	0,1769	0,9453

-: nicht nachgewiesen

5.1.2.2 Schweinegülle

Beim Gärversuch mit Schweinegülle stiegen der Trockenrückstand und der organische Trockenrückstand wie bei der Rindergülle kontinuierlich mit dem zunehmender Raumbelastung an. Ab der Raumbelastung von 3 g oTR/l*d stieg die Raumbelastung nur noch gering an. Der chemische Sauerstoffbedarf stieg ab der Raumbelastung von 2 g oTR/l*d kaum noch an. Der CSB-Wert war bei der Raumbelastung von 3,5 g oTR/l*d am höchsten, fiel danach aber wieder. Beim Gesamtstickstoff und beim Ortho-Phosphat gab es ab 3 g oTR/l*d keine Veränderungen mehr. Der Gehalt an Ammonium-Stickstoff war bei 3 g oTR/l*d am höchsten, sank dann aber wieder und war am Ende des Versuchs auf dem Niveau von 2 g oTR/l*d. Auch bei der Schweinegülle waren die untersuchten Parameter nach 300 Tagen der Lagerung zurückgegangen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Flüssigphasenanalytik des Gärrückstands bei Einsatz von Schweinegülle

Versuchsdauer (d)	B _R (g oTR/l*d)	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt-N (g/kg)	NH ₄ -N (g/kg)	PO ₄ -P (g/kg)
20	0,5	2,05	1,33	19,23	2,39	1,62	0,593
49	1	3,30	2,10	29,68	4,15	3,05	0,895
66	1,5	3,87	2,45	39,43	5,05	3,88	0,839
79	2	4,37	2,77	46,27	5,74	4,39	1,144
93	2,5	4,85	3,08	43,04	6,19	4,73	1,188
109	3	5,07	3,24	47,02	6,48	4,97	1,341
129	3,5	5,12	3,27	51,03	6,47	4,86	1,345
156	4	5,34	3,50	48,20	6,48	4,75	1,357
246	4,5	5,38	3,85	46,21	6,45	4,31	1,340
546	Endlager	4,17	2,92	-	4,93	4,19	-

-: nicht nachgewiesen

Auch beim Gärversuch mit Schweinegülle war die Menge an Säuren gering. Ab der Raumbelastung von 3 g oTR/l*d gab es gesamt über 1 g/kg, ab 4 g oTR/l*d über 2 g/kg an Säuren. Der pH-Wert war immer im neutralen Bereich (Tabelle 11).

Tabelle 11: Säurespektrum des Gärrückstands bei Einsatz von Schweinegülle

Versuchs- dauer	B_R	pH	Milch- säure	Ameisen- säure	Essig- säure	Propion- säure	n-Butter- säure	i-Butter- säure	n- Valerian- säure	i- Valerian- säure	Gesamt
(d)	(g oTR/l*d)		(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)
20	0,5	7,25	-	0,1556	0,0273	-	-	-	-	-	0,1829
49	1	7,29	-	0,2558	0,0298	-	-	-	-	-	0,2856
66	1,5	7,30	-	0,6559	0,0564	0,0258	-	-	0,1548	0,0245	0,9174
79	2	7,28	-	0,5423	0,0831	0,0369	0,0456	-	0,1356	-	0,8435
93	2,5	7,25	-	0,8114	0,0966	0,0443	-	-	-	0,0320	0,9843
109	3	7,31	-	-	1,2350	0,0645	-	0,0523	0,2860	0,0504	1,6882
129	3,5	7,26	-	-	1,1487	0,1558	-	-	0,2236	-	1,5281
156	4	7,24	-	-	1,7732	0,5320	-	-	-	0,0754	2,3806
246	4,5	7,25	-	-	1,5563	0,4632	-	-	0,2758	0,0650	2,2603

-. nicht nachgewiesen

5.1.2.3 Hühnertrockenkot

Beim Gärversuch des Hühnertrockenkots stiegen alle untersuchten Parameter kontinuierlich an (Tabelle 12). Einen starken Anstieg gab es jeweils von der Unterbrechung des Versuchs bei der Raumbelastung von 3 g oTR/l*d bis zum Ende des Versuchs. Nach 300 Tagen Lagerung war der Trockenrückstand nur noch halb so groß wie zum Ende des Versuchs, was eventuell auch mit der geringeren Durchmischung bei der Probennahme zu tun hat. Die Gehalte an Gesamt- und Ammonium-Stickstoff gingen kaum zurück und waren immer noch höher, als zur Unterbrechung des Versuchs bei der Raumbelastung von 3 g oTR/l*d.

Tabelle 12: Flüssigphasenanalytik des Gärrückstands bei Einsatz von Hühnertrockenkot

Versuchsdauer (d)	B _R (g oTR/l*d)	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt-N (g/kg)	NH ₄ -N (g/kg)	PO ₄ -P (g/kg)
20	0,5	2,01	1,21	20,14	1,92	1,09	0,595
49	1	3,14	1,86	30,02	2,89	1,67	0,912
66	1,5	4,16	2,52	38,43	3,67	2,10	1,152
79	2	5,03	3,03	47,76	4,37	2,47	1,463
93	2,5	6,13	3,81	57,23	5,18	3,00	1,748
109	3	6,25	3,90	61,56	5,29	4,14	1,801
246	0,5	9,64	5,63	82,52	8,19	5,87	2,573
546	Endlager	4,80	2,51	-	7,33	5,57	-

-: nicht nachgewiesen

Bis zur Raumbelastung von 2 g oTR/l*d lagen die Säuregehalte unterhalb der Messgrenze. Danach stieg die Menge stark an und hatte zur Unterbrechung des Versuchs eine von über 8 g/kg, wobei 7,5 g/kg Essigsäure war. Der pH-Wert war immer im neutralen Bereich, zum Zeitpunkt der Unterbrechung lag er knapp unter 7 (Tabelle 13).

Tabelle 13: Säurespektrum des Gärrückstands bei Einsatz von Hühnertrockenkot

Versuchs- dauer	B_R (g oTR/l*d)	pH	Milch- säure (g/kg)	Ameisen- säure (g/kg)	Essig- säure (g/kg)	Propion- säure (g/kg)	n-Butter- säure (g/kg)	i-Butter- säure (g/kg)	n- Valerian- säure (g/kg)	i- Valerian- säure (g/kg)	Gesamt (g/kg)
20	0,5	7,03	-	-	0,0404	-	-	-	-	-	0,0404
49	1	7,05	-	0,0300	0,0568	-	-	-	-	-	0,0869
66	1,5	7,14	-	0,0494	0,0908	-	-	-	-	-	0,1402
79	2	7,21	-	0,0610	0,1434	-	-	-	-	-	0,2044
93	2,5	7,19	0,1306	2,2325	0,1075	0,1628	-	-	1,8354	-	4,3088
113	3	6,99	-	0,1070	7,5047	0,1621	0,1312	0,2991	-	0,1912	8,1817
246	0,5	7,05	-	0,1160	0,9558	0,0541	-	-	0,0930	-	1,2189

-: nicht nachgewiesen

5.1.2.4 Maissilage

Auch beim Gärversuch mit Maissilage stiegen die untersuchten Parameter mit der Zunahme der Raumbelastung an (Tabelle 14). Einen starken Anstieg gab es jeweils ab der Raumbelastung von 2 g oTR/l*d. Die Anteile des Trockenrückstandes, des organischen Trockenrückstandes und der Gehalt des chemischen Sauerstoffbedarfs haben sich in diesem Zeitraum mehr als verdoppelt. Auch die Gehalte des Gesamt- und des Ammonium-Stickstoffs stiegen stärker an. Die Gehalte an Stickstoff waren im Vergleich zu den anderen Gärversuchen die niedrigsten. Der Gehalt an Gesamt-Stickstoff ging nach 300 Tagen kaum zurück, der Gehalt an Ammonium-Stickstoff war sogar höher als zum Ende des Versuchs. Auch die Anteile an Trockenrückstand und organischen Trockenrückstand gingen weniger stark zurück.

Tabelle 14: Flüssigphasenanalytik des Gärrückstands bei Einsatz von Maissilage

Versuchsdauer (d)	B _R (g oTR/l*d)	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt-N (g/kg)	NH ₄ -N (g/kg)	PO ₄ -P (g/kg)
20	0,5	1,72	1,08	16,43	1,53	0,85	0,451
66	1	2,33	1,62	25,37	1,90	0,96	0,470
79	1,5	2,76	1,97	30,47	2,11	1,05	0,495
93	2	2,96	2,13	32,46	2,24	1,08	0,518
109	2,5	4,69	3,70	50,70	3,00	1,17	0,603
177	3	5,24	4,21	60,12	3,22	1,28	0,625
246	2,5	5,83	4,74	74,90	3,59	1,37	0,647
546	Endlager	4,70	3,68	-	3,43	1,47	-

-: nicht nachgewiesen

Der Gesamtgehalt an organischen Säuren stieg nach 93 Tagen bei der Raumbelastung von 2 g oTR/l*d kurzfristig aufgrund des hohen Anteils an Essigsäure auf über 3 g/kg und ging später wieder zurück. Zum Versuchsende lag der Gesamtsäuregehalt bei 2,5 g/kg. Der pH-Wert war anfangs unter 7, stieg aber mit der Dauer des Versuchs leicht an (Tabelle 15).

Tabelle 15: Säurespektrum des Gärrückstands bei Einsatz von Maissilage

Versuchs- dauer	B_R	pH	Milch- säure	Ameisen- säure	Essig- säure	Propion- säure	n-Butter- säure	i-Butter- säure	n- Valerian- säure	i- Valerian- säure	Gesamt
(d)	(g oTR/l*d)		(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)
20	0,5	6,92	-	0,0237	-	-	-	-	-	-	0,0237
66	1	7,01	-	0,0194	0,0505	-	-	-	-	-	0,0699
79	1,5	6,99	-	0,0193	0,0390	-	-	-	-	-	0,0583
93	2	7,00	-	0,0187	0,4096	-	0,2732	-	-	0,0730	0,8428
113	2,5	7,08	-	0,0320	3,1242	0,0406	0,2170	-	-	0,1064	3,5203
177	3	7,12	0,0258	0,0225	1,3260	0,1554	0,4825	0,4636	0,1145	0,1583	2,7386
246	2,5	7,11	-	0,0432	0,9989	0,1693	0,4633	0,5839	0,1963	-	2,4549

-: nicht nachgewiesen

5.1.2.5 Kleegrassilage

Beim Gärversuch mit Kleegrassilage stiegen die untersuchten Parameter mit der Zunahme der Raumbelastung an (Tabelle 16). Die Anteile des Trockenrückstandes, des organischen Trockenrückstandes und der Gehalt des chemischen Sauerstoffbedarfs stiegen bis zur Raumbelastung von 1,5 g oTR/l*d nur leicht an. Ab der Raumbelastung von 2 g oTR/l*d gab es einen starken Anstieg. Der Anteil des Trockenrückstands und der Gehalt des chemischen Sauerstoffbedarfs haben sich bis zum Ende der Substratzuführung mehr als verdoppelt, der organische Trockenrückstand hat sich verdreifacht. Die Gehalte an Gesamt- und Ammonium-Stickstoff stiegen ab der Raumbelastung von 2,5 g oTR/l*d stärker an. Auch hier haben sich die Gehalte bis zum Ende mehr als verdoppelt. Der Gehalt des Ortho-Phosphats blieb ab der Raumbelastung von 2,5 g oTR/l*d ungefähr gleich. Im Gärendlager gingen die Anteile des Trockenrückstandes und des organischen Trockenrückstandes wieder um mehr als die Hälfte zurück. Die Stickstoffgehalte waren dagegen noch höher als zur Raumbelastung von 3 g oTR/l*d.

Tabelle 16: Flüssigphasenanalytik des Gärrückstands bei Einsatz von Kleegrassilage

Versuchsdauer (d)	B _R (g oTR/l*d)	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt-N (g/kg)	NH ₄ -N (g/kg)	PO ₄ -P (g/kg)
33	0,5	1,95	1,23	21,63	1,81	1,03	0,269
49	1	2,23	1,41	26,89	1,95	1,15	0,468
66	1,5	2,33	1,41	28,32	2,26	1,27	0,523
77	2	3,46	2,32	41,84	2,58	1,41	0,562
98	2,5	6,41	4,51	74,74	2,73	1,71	0,662
174	3	8,10	5,81	82,15	4,20	2,52	0,673
246	2,5	9,69	6,99	87,99	5,52	3,68	0,650
546	Endlager	4,55	2,81	-	4,71	3,37	-

-: nicht nachgewiesen

Die größte Menge an Säuren gab es nach 98 Tagen bei der Raumbelastung von 2,5 g oTR/l*d mit gesamt über 4,7 g/kg. Auch hier war der größte Anteil Essigsäure. Am Ende waren 2,2 g/kg Säuren. Der pH-Wert lag immer im neutralen Bereich (Tabelle 17).

Tabelle 17: Säurespektrum des Gärrückstands bei Einsatz von Kleegrassilage

Versuchs- dauer	B_R (g oTR/l*d)	pH	Milch- säure (g/kg)	Ameisen- säure (g/kg)	Essig- säure (g/kg)	Propion- säure (g/kg)	n-Butter- säure (g/kg)	i-Butter- säure (g/kg)	n- Valerian- säure (g/kg)	i- Valerian- säure (g/kg)	Gesamt (g/kg)
33	0,5	7,17	-	0,0209	-	-	-	-	-	-	0,0209
49	1	7,10	-	0,0206	0,0333	-	-	-	-	-	0,0539
66	1,5	7,25	-	0,0227	-	-	-	-	-	-	0,0227
77	2	7,28		0,0630	0,5659		0,4429	-	-	-	1,0638
98	2,5	7,37	-	-	2,4259	0,0459	1,0116	-	1,2644	-	4,7278
113	2,5	7,20	-	-	3,2369	0,0665	-	-	0,3887	-	3,6921
174	3	7,26	0,5432	0,0780	2,8912	0,0856	-	0,0663	0,2531	0,3556	4,2728
246	2,5	7,30	-	0,0561	1,6352	0,0245	0,0550	0,0514	0,1269	0,2369	2,1860

-: nicht nachgewiesen

5.1.3 Abbaugrad

Die Silagen und der Hühnertrockenkot wiesen die die höchsten Abbaugrade auf. Diese sanken mit Zunahme der Raumbelastung. Bis zur Raumbelastung von 1,5 g oTR/l*d lagen ihre Abbaugrade noch über 90 %. Ab der Raumbelastung von 2 g oTR/l*d sank der Abbaugrad der Kleegrassilage stärker als der des Hühnertrockenkots und der Maissilage. Bei der Raumbelastung von 3 g oTR/l*d lag der Abbaugrad der Kleegrassilage unter 80 %.

Die Abbaugrade der Rinder- und Schweinegülle lagen bei einer Raumbelastung von 0,5 g oTR/l*d bei 78 bzw. 71 % und sanken bis zur Raumbelastung von 3,5 g oTR/l*d auf 28 bzw. 22 %. Beim weiteren Anstieg der Raumbelastung stiegen auch die Abbaugrade wieder an, der jedoch bei der Rindergülle mit der Raumbelastung 4,5 g oTR/l*d wieder fiel. Der Abbaugrad der Rindergülle lag dort bei 23 % und unter dem der Schweinegülle mit 28 %.

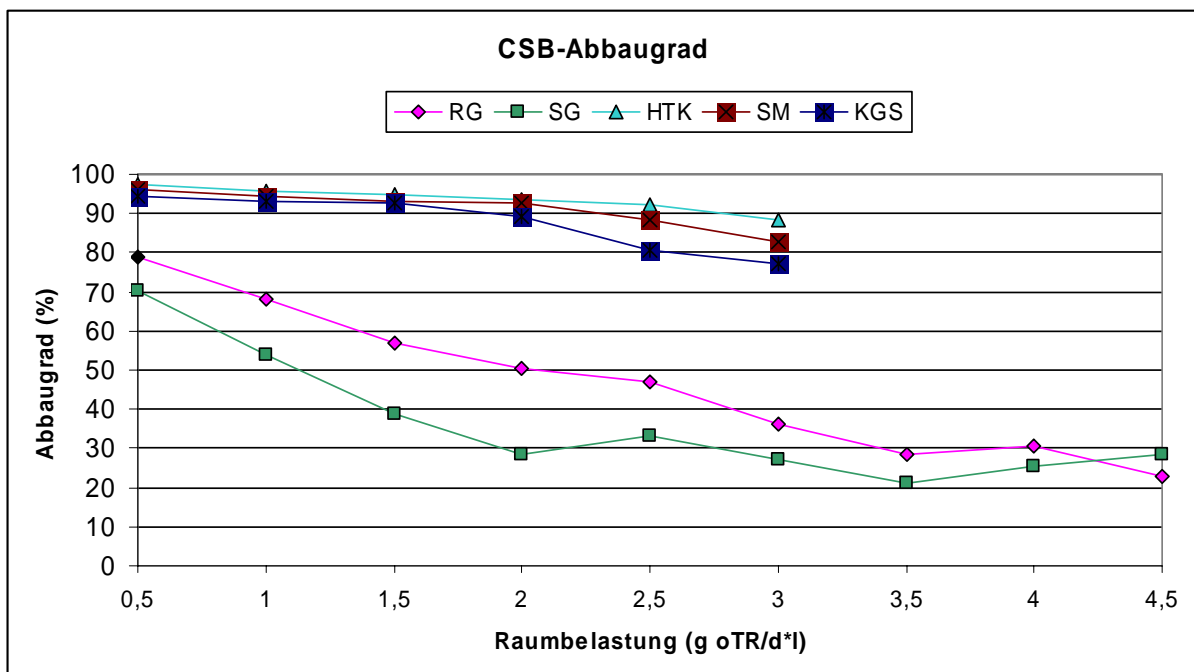


Abbildung 3: CSB-Abbaugrade der Substrate bei mesophilen Betriebsbedingungen

5.1.4 Methanproduktivität und -ausbeute

5.1.4.1 Rindergülle

Die Methanproduktivität (Abbildung 4) stieg bis zur Raumbelastung von 4 g oTR/l*d stetig an. Die Steigerung auf 4,5 g oTR/l*d hatte auf die Produktivität keine Auswirkung mehr und pendelte sich rund 0,5 l CH₄/l*d ein. Die höchste Methanproduktion war am 191. Tag mit 8,26 l/d bei einer Raumbelastung von 4,5 g oTR/l*d. Die Produktivität lag dort bei 0,55 l CH₄/l*d.

Die höchste Methanausbeute war am 7. Tag mit 0,21 l CH₄/g oTR (Abbildung 5). Bis zur Raumbelastung auf 2,5 g oTR/l*d kam es zu täglichen Schwankungen in der Höhe der Methanausbeute. Bei einer Erhöhung der Raumbelastung sank die Ausbeute anfangs stark ab. Ab dem 80. Tag lag die Ausbeute bis zum Schluss bei 0,1-0,12 l CH₄/g oTR.

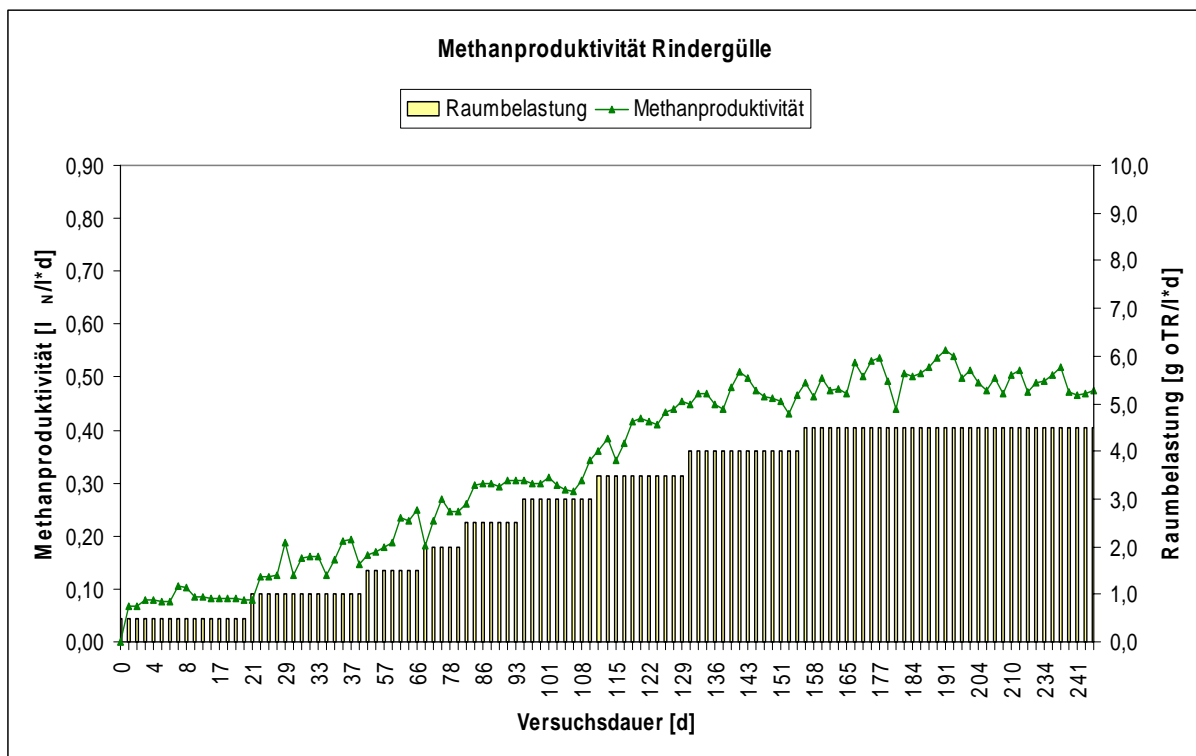


Abbildung 4: Methanproduktivität der Rindergülle bei mesophilen Betriebsbedingungen

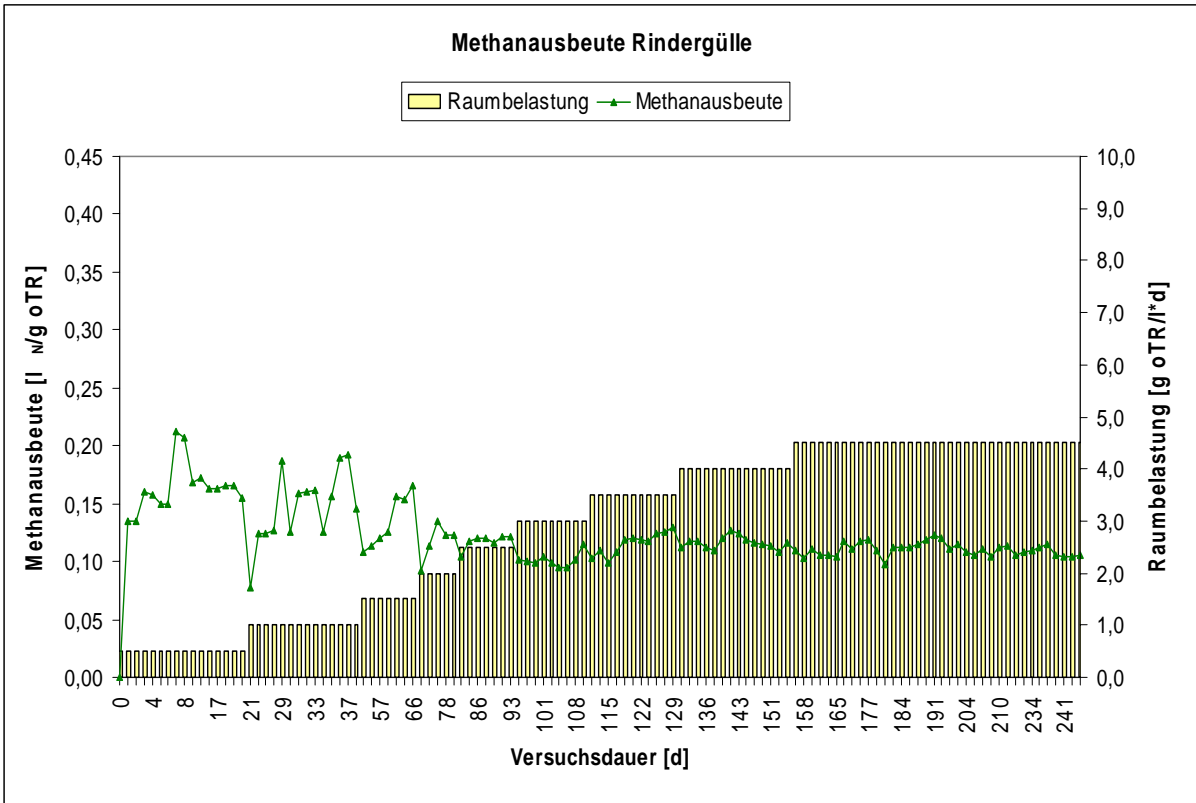


Abbildung 5: Methanausbeute der Rindergülle bei mesophilen Betriebsbedingungen

5.1.4.2 Schweinegülle

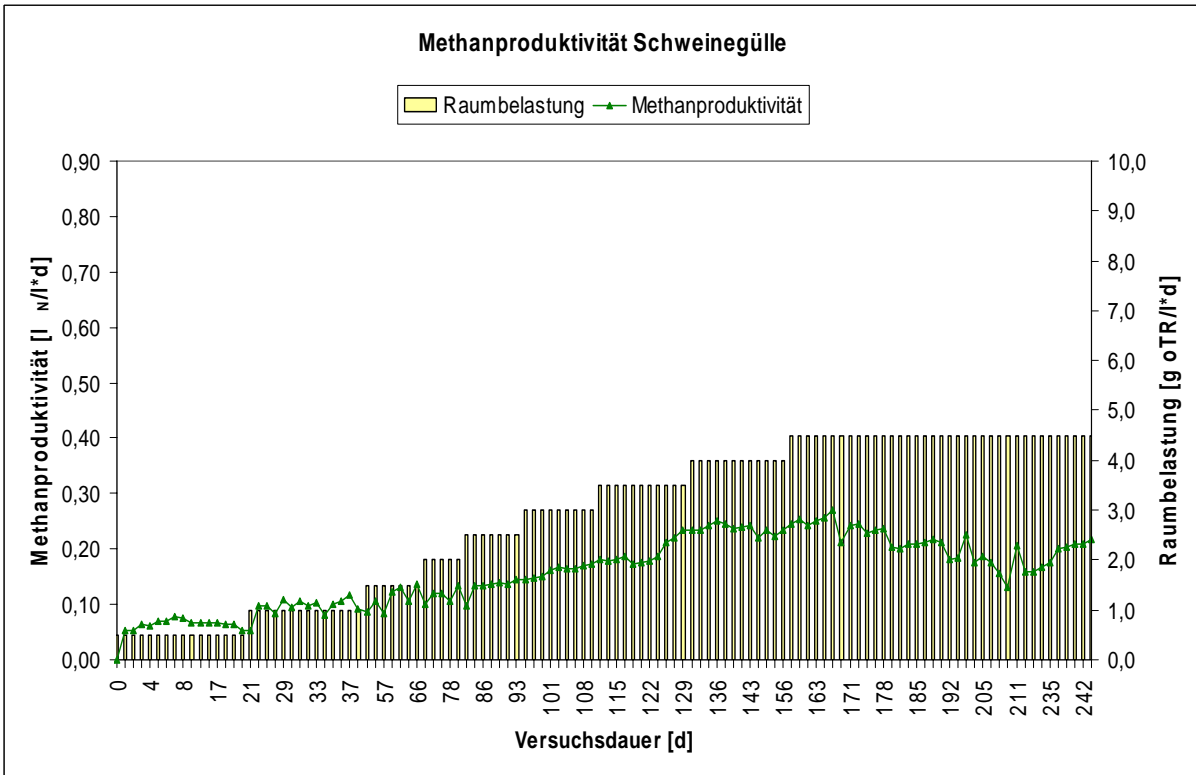


Abbildung 6: Methanproduktivität der Schweinegülle bei mesophilen Betriebsbedingungen

Wie bei der Rindergülle stieg auch bei der Schweinegülle die Methanproduktivität (Abbildung 6) bis zu einer Raumbelastung von 4 g oTR/l*d stetig an auf ca. 0,25 l CH₄/l*d. Die Erhöhung der Raumbelastung auf 4,5 g oTR/l*d brachte nur zu Anfang eine Steigerung der Produktivität auf 0,27 l CH₄/l*d, fiel danach jedoch langsam bis auf 0,13 l CH₄/l*d am 207. Tag. Ab dann stieg die Produktivität wieder langsam auf 0,22 l CH₄/l*d zum Ende des Versuchs.

Die höchste Methanproduktion war am 165. Tag mit 4,05 l/d bei einer Raumbelastung von 4,5 g oTR/l*d. Am Ende war die Methanproduktion auf 3,25 l/d gesunken.

Die höchste Methanausbeute war am 7. Tag mit 0,16 l CH₄/g oTR (Abbildung 7). Bis zur Raumbelastung auf 2 g oTR/l*d kam es zu täglichen Schwankungen in der Höhe der Methanausbeute, die jedoch kleiner als bei der Rindergülle waren. Bei einer Erhöhung der Raumbelastung sank die Ausbeute anfangs stark ab. Ab dem 80. Tag lag die Ausbeute bis zum Schluss bei 0,05-0,06 l CH₄/g oTR.

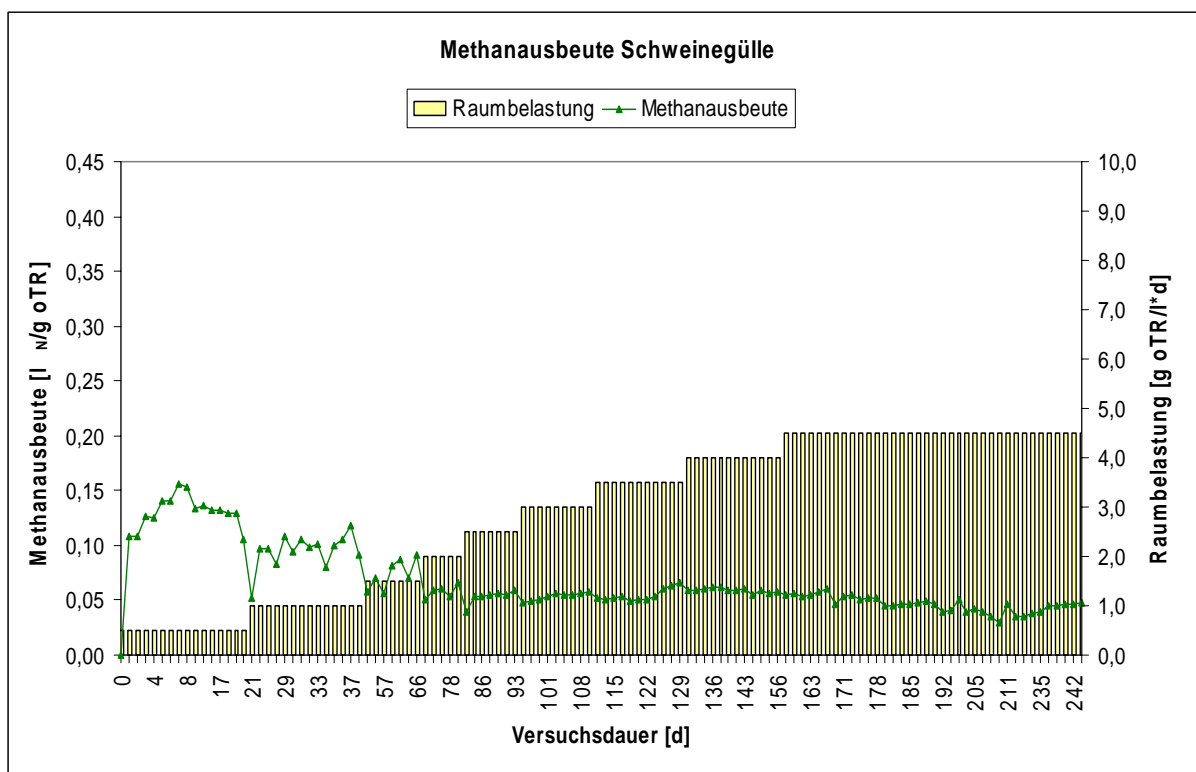


Abbildung 7: Methanausbeute der Schweinegülle bei mesophilen Betriebsbedingungen

5.1.4.3 Hühnertrockenkot

Die Methanproduktivität (Abbildung 8) des Hühnertrockenkots stieg bei den Raumbelastungen 2,5 und 3 g oTR/l*d stark an auf Höchstwerte von 0,56 CH₄/l*d am 101. Tag. Die Methanproduktion lag bei 8,44 l/d. Aufgrund des gleichzeitigen Anstiegs der Schwefelwasserstoffkonzentration auf 600 ppm und der Ammoniumkonzentration auf über 4 g/kg, die sich toxisch auf die Methanbakterien auswirkten, sank die Produktivität innerhalb der darauf folgenden zwei Wochen stark ab und lag beim Abbruch des Versuchs am 113. Tag bei nur noch 0,34 CH₄/l*d. Die Methanproduktion sank auf 5,15 l/d, die Methankonzentration lag bei nur noch 38%. Die flüchtigen organischen Säuren (FOS) verdoppelten sich innerhalb 2 Wochen. Der FOS/TAC-Wert lag bei 0,46. Die erneute Zugabe von Hühnertrockenkot mit einer Raumbelastung von 1 g oTR/l*d am 184. Tag musste nach einer Woche wegen erneuten Abfalls der Methankonzentration unter 40% wieder unterbrochen werden. Ab dem 207.Tag wurde die Fütterung mit 0,5 g oTR/l*d Raumbelastung begonnen, die bis zum Versuchsende beibehalten wurde. Am Ende lag die Methankonzentration wieder bei 48%. Die Methanproduktivität sank von 0,2 auf 0,15 CH₄/l*d.

Die Methanausbeute stieg bis zum 7. Tag auf 0,37 l CH₄/g oTR an (Abbildung 9). Bis zur Raumbelastung von 3 g oTR/l*d kam es zu starken Schwankungen in der Höhe der Methanausbeute. Am Tag der Unterbrechung der Substratzugabe lag die Ausbeute bei nur noch 0,11 l CH₄/g oTR. Bei der erneuten Zugabe des Substrats am 207. Tag stieg die Ausbeute wieder auf 0,36 l CH₄/g oTR an.

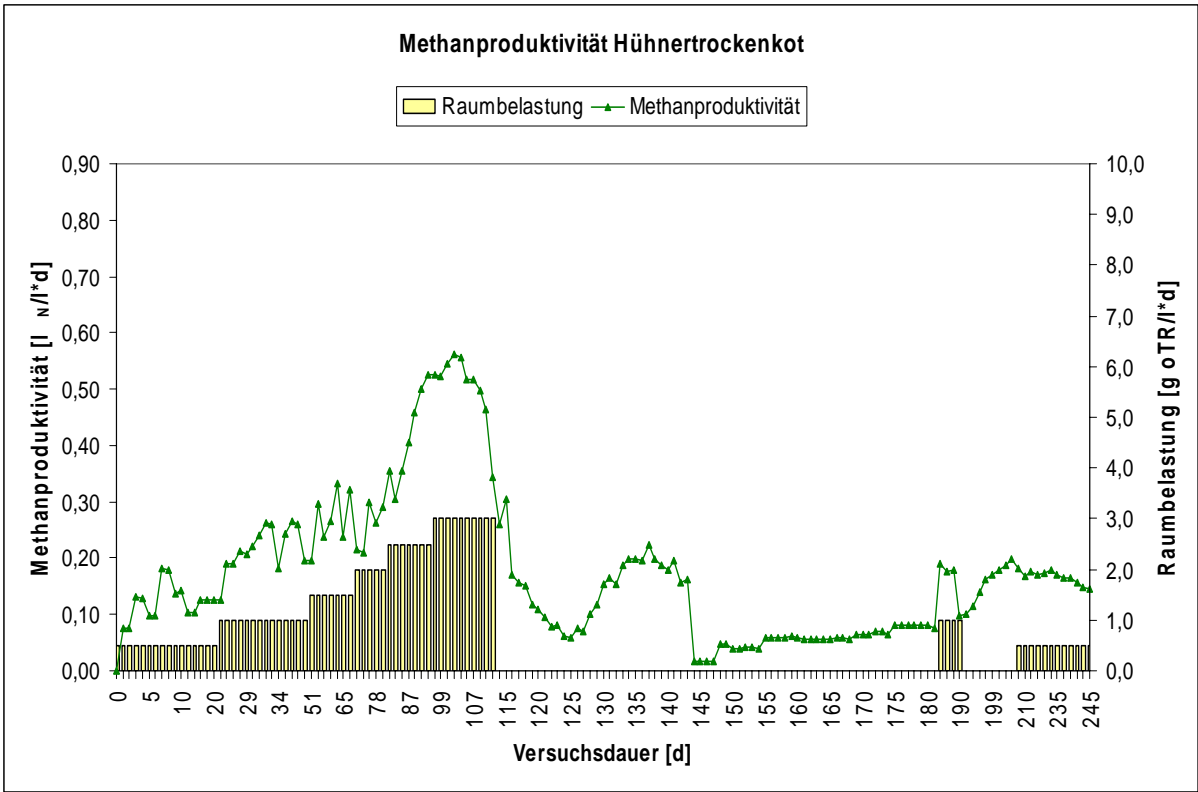


Abbildung 8: Methanproduktivität von Hühnertrockenkot bei mesophilen Betriebsbedingungen

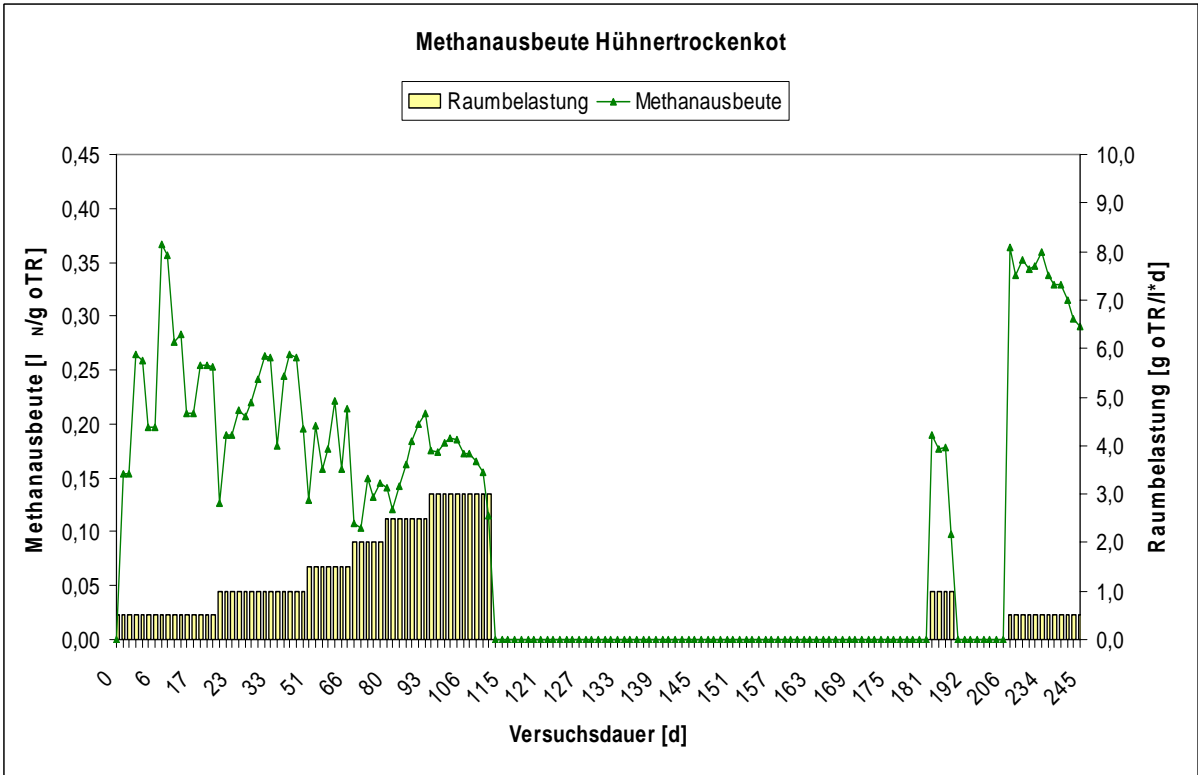


Abbildung 9: Methanausbeute von Hühnertrockenkot bei mesophilen Betriebsbedingungen

5.1.4.4 Maissilage

Die Methanproduktivität (Abbildung 10) stieg zur Raumbelastung von 2 g oTR/l*d gleichmäßig an. Die Erhöhung auf 2,5 g oTR/l*d ließ die Produktivität zu Anfang auf 0,88 CH₄/l*d am 101. Tag ansteigen. Die Methanproduktion stieg auf einen Höchstwert von 13,24 l/d. Ab dem 109. Tag gab es aber einen starken Abfall der Produktivität. Die Raumbelastung musste auf 1,75 g oTR/l*d gesenkt werden, die Produktivität sank bis zum 120. Tag auf 0,4 CH₄/l*d. Die Methanproduktion sank auf 5,97 l/d bei einem FOS/TAC-Wert von 0,69. Nach einer kurzen Erholungsphase konnte die Raumbelastung am 130. Tag wieder auf 2,5 g oTR/l*d erhöht werden. Die Produktivität stieg wieder stark an, erreichten aber nicht mehr das vorherige Niveau. Eine Erhöhung der Raumbelastung auf 3 g oTR/l*d am 157. Tag ließ die Produktivität anfangs absinken, die sich eine Woche später auf 0,6 CH₄/l*d einpendelte und lag damit niedriger, als bei der Raumbelastung zuvor. Nach drei Wochen musste die Raumbelastung wegen Absinken der Methankonzentration 43% wieder erniedrigt werden und lag bis zum Schluss bei 2,5 g oTR/l*d. Die Produktivität stieg bei größeren Schwankungen am Ende auf 0,73 CH₄/l*d an.

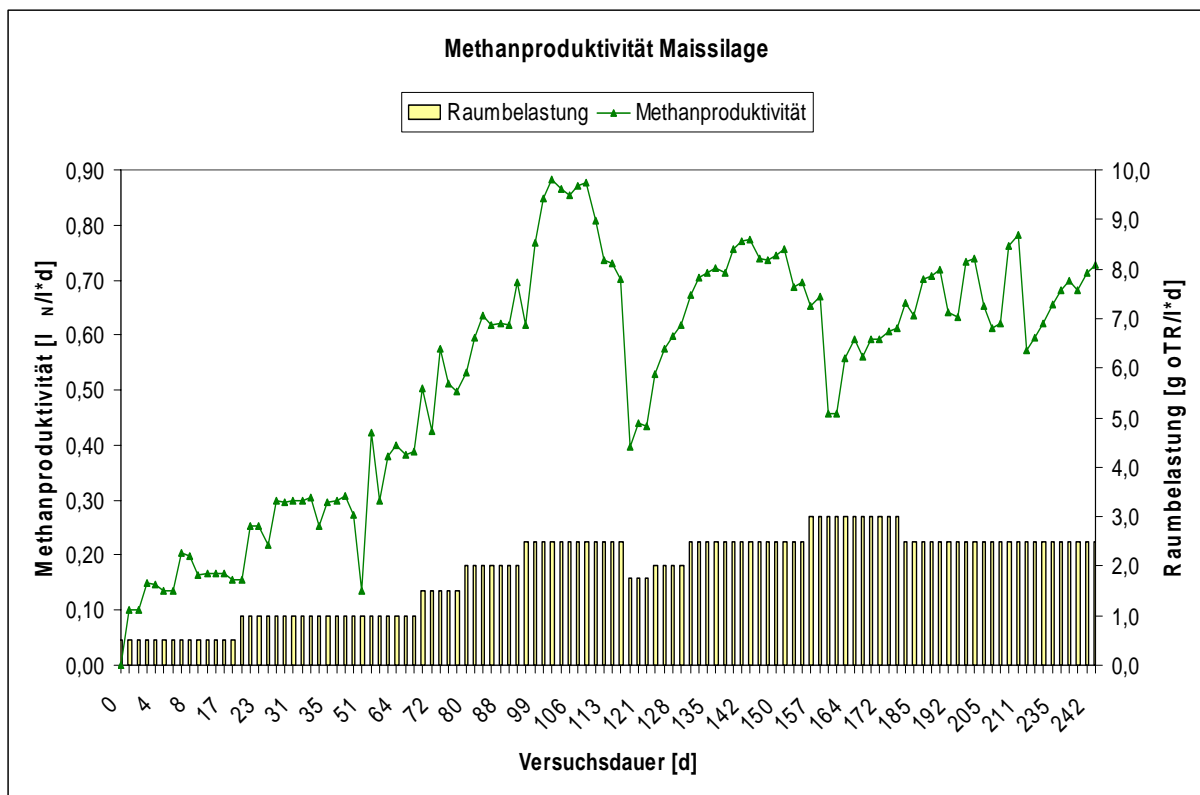


Abbildung 10: Methanproduktivität von Maissilage bei mesophilen Betriebsbedingungen

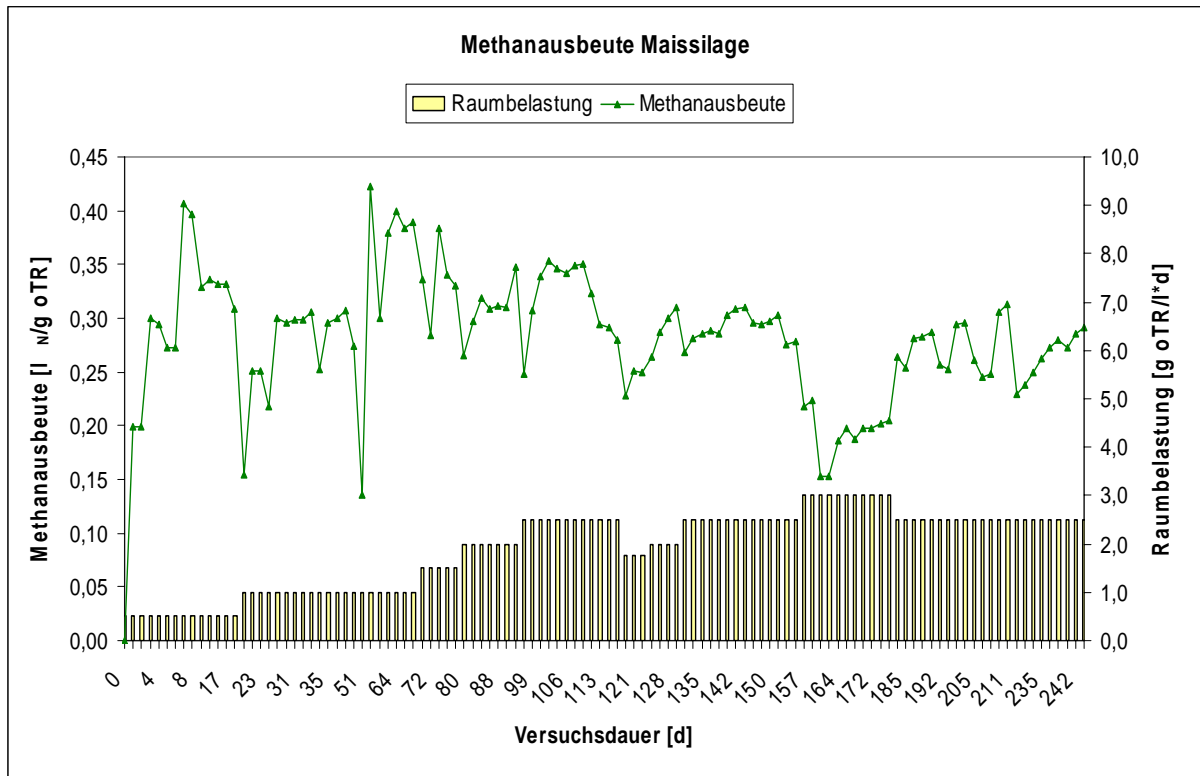


Abbildung 11: Methanausbeute von Maissilage bei mesophilen Betriebsbedingungen

Die höchste Methanausbeute war mit 0,42 l CH₄/g oTR am 52.Tag. Mit zeitweiligen größeren Schwankungen lag die Ausbeute zum Ende des Versuchs bei 0,3 l CH₄/g oTR. Bei Erhöhung der Raumbelastung auf 3 g oTR/l*d sank die Ausbeute zwischenzeitlich auf 0,15 l CH₄/g oTR ab.

5.1.4.5 Kleegrassilage

Bis zur Raumbelastung von 2,5 g oTR/l*d stieg die Methanproduktivität (Abbildung 12) stetig an. Wie bei der Maissilage gab es ab den 97. Tag einen Einbruch der Produktivität. Am 103. Versuchstag musste die Raumbelastung auf 1,75 g oTR/l*d gesenkt werden. Die Produktivität sank von 0,72 auf 0,42 l CH₄/l*d und die Methanproduktion von 10,79 auf 6,34 l/d. Der FOS/TAC-Wert lag bei kritischen 0,38. Nach 10 Tagen konnte die Raumbelastung wieder auf 2,5 g oTR/l*d erhöht werden. Die Produktivität erreichte wieder das vorherige Niveau. Eine weitere Erhöhung der Raumbelastung auf 3 g oTR/l*d am 145. Tag wirkte sich negativ auf die Produktivität aus. Die Methanproduktion sank über 4 l/d auf 7,53 l/d. Die Methankonzentration sank auf 44,5%. Der Gehalt an Schwefel stieg innerhalb von vier Tagen von 45 auf 185 ppm. Danach erholte sich der Fermenter wieder bei einer Produktivität um die 0,7 l CH₄/l*d. Wegen erneuten Abfalls der Methankonzentration unter 48% wurde die Raumbelastung am 175. Tag wieder auf 2,5 g oTR/l*d gesenkt, die bis zum Schluss

beibehalten wurde. Ab den 188. Tag sank die Produktivität auf 0,5 l CH₄/l*d, die trotz Schwankungen auf diesem Niveau blieb.

Die höchste Methanausbeute war am 49. Tag mit 0,38 l CH₄/g oTR. Bei einer Raumbelastung von 1 g oTR/l*d. Bis zur Erhöhung der Raumbelastung auf 3 g oTR/l*d pendelte die Ausbeute um die 0,3 l CH₄/g oTR. Durch die Erhöhung der Raumbelastung auf 3 g oTR/l*d sank die Ausbeute auf 0,17 l CH₄/g oTR. Trotz eines kurzzeitigen Anstiegs der Gasproduktion blieb die Ausbeute im Durchschnitt auf einem Niveau zwischen 0,2 und 0,25 l CH₄/g oTR.

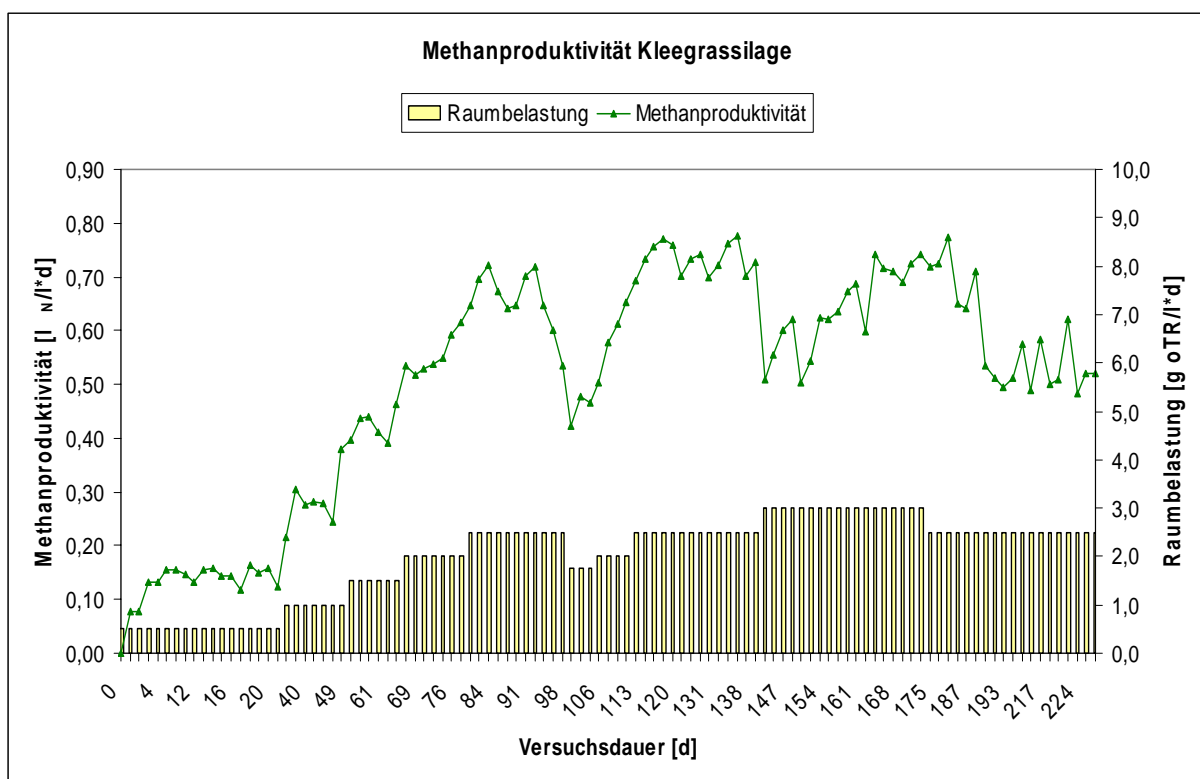


Abbildung 12: Methanproduktivität von Kleegrassilage bei mesophilen Betriebsbedingungen

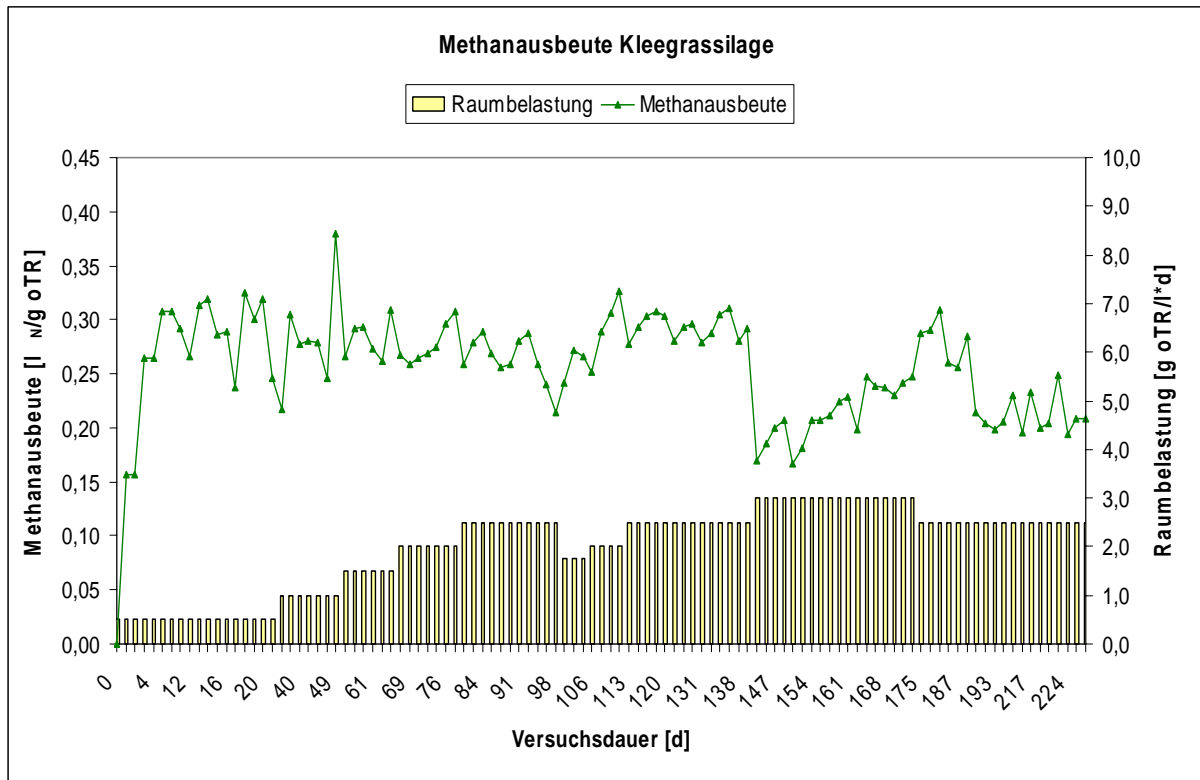


Abbildung 13: Methanausbeute von Kleegrassilage bei mesophilen Betriebsbedingungen

5.2 Verlauf der thermophilen Gärversuche

Die thermophilen Gärversuche liefen vom 09. Oktober 2006 bis zum 13. März 2007 und dauerten 155 Tage. Bei allen Fermentern waren die pH-Werte höher als bei den mesophilen Gärversuchen.

5.2.1 Raumbelastung und Verweilzeit

Die Gärversuche starteten mit einer Raumbelastung von 0,5 g oTR/l*d und wurden bei einem stabilen Fermentationsprozess und gleich bleibender Gasproduktion um 0,5 g oTR/l*d erhöht.

Im Gegensatz zum mesophilen konnte der thermophile Gärversuch mit Rindergülle nur bis zu einer maximalen Raumbelastung von 2,5 g oTR/l*d erhöht werden. Bis zu einer Raumbelastung von 2 g oTR/l*d war die Fermentation stabil. Die Erhöhung auf 2,5 g oTR/l*d am 65. Tag musste nach 10 Tagen wegen einer Methankonzentration bei nur 45 % und einem FOS/TAC-Wert von 0,44 wieder rückgängig gemacht werden. Ein erneuter Versuch bei einer Raumbelastung von 2,3 g oTR/l*d schlug ebenfalls fehl, so dass am 93. Tag die Substratzufuhr für einen Tag unterbrochen werden musste. Die Methankonzentration lag wieder bei nur 45 % und der FOS/TAC-Wert bei 0,45. Gleichzeitig stieg die

Schwefelkonzentration auf 1100 ppm (Abbildung 14). Die Bakterien erholten sich sehr schnell, so dass die Raumbelastung am 97. Tag wieder auf 2 g oTR/l*d erhöht werden konnte. Die Raumbelastung wurde am 114. Tag erneut auf 2,5 g oTR/l*d erhöht. Doch auch diesmal stieg die Schwefelkonzentration wieder an, während die Methankonzentration auf 48 % sank. Die Raumbelastung wurde wieder auf 2 g oTR/l*d gesenkt und bis zum Abbruch des Versuchs beibehalten.

Die Schwefelwasserstoffkonzentration war beim thermophilen Gärversuch besonders hoch (Abbildung 14). Eine Erhöhung der Raumbelastung größer 2 g oTR/l*d ließ den Gehalt an Schwefelwasserstoff auf über 1000 ppm ansteigen. Dieses wirkte toxisch auf die Methanbakterien, die Methanproduktion ging zurück. Beim mesophilen Gärversuch lag der Höchstwert an H₂S bei 230 ppm bei einer Raumbelastung von 4,5 g oTR/l*d.

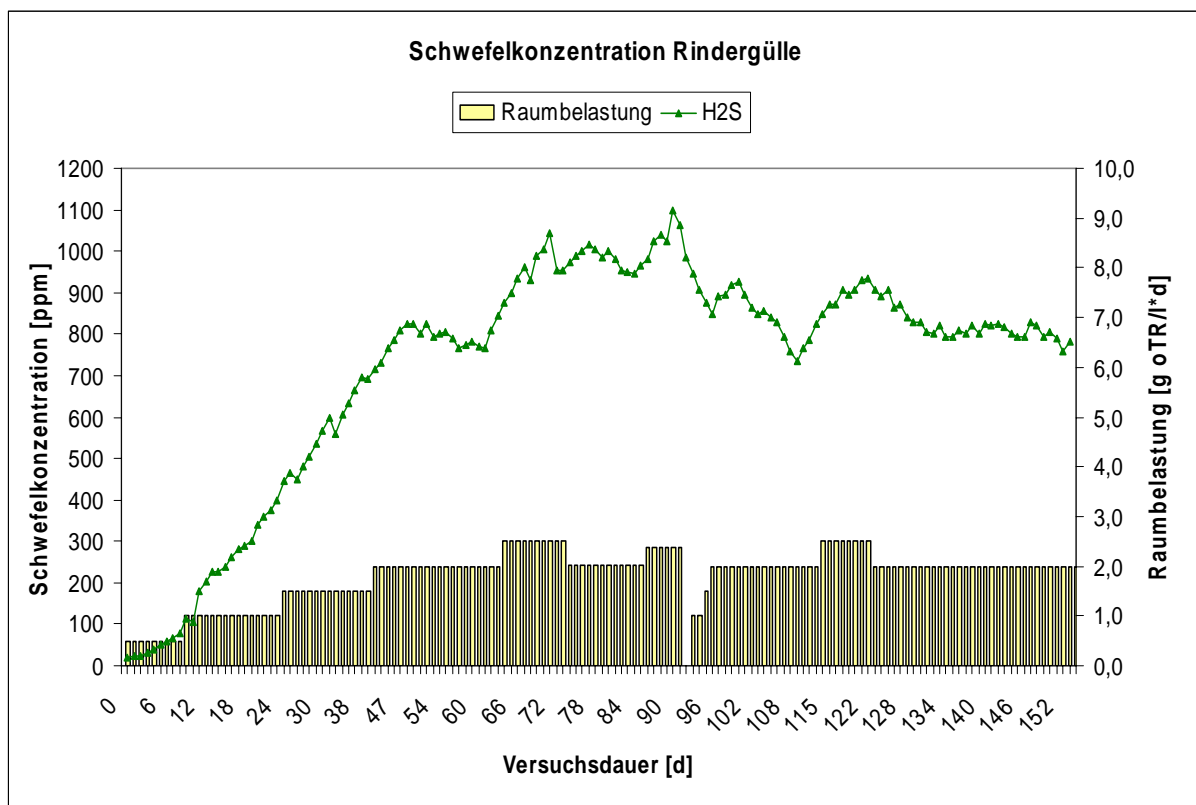


Abbildung 14: Schwefelwasserstoffkonzentration bei mesophiler Vergärung von Rindergülle

Auch die thermophile Fermentation der Schweinegülle war viel instabiler als die mesophile. Schon die Erhöhung der Raumbelastung auf 2 g oTR/l*d am 45. Tag wirkte sich negativ auf die Methankonzentration aus, die auf 41 % sank. Am 56. Tag musste die Substratzufuhr für 4 Tage unterbrochen werden und wurde bei einer Raumbelastung von 1 g

oTR/l*d neu gestartet und am 65. Tag wieder auf 1.5 g oTR/l*d erhöht. Am 101. Tag wurde die Raumbelastung wieder auf 2 g oTR/l*d erhöht. Die Fermentation blieb stabil. Eine Erhöhung auf 2,5 g oTR/l*d am 115. Tag musste eine Woche später aber wieder rückgängig gemacht werden. Die Methankonzentration fiel unter 41 %. Die Substratzufuhr wurde für einen Tag unterbrochen und bei einer Raumbelastung von 2 g oTR/l*d wieder eingesetzt, die bis zum Ende bestehen blieb.

Der thermophile Gärversuch mit Hühnertrockenkot war ebenfalls sehr instabil. Nach Erhöhung der Raumbelastung auf 2 g oTR/l*d am 44. Tag musste die Substratzufuhr nach sechs Tagen, wegen sinkender Methankonzentration auf unter 46 %, unterbrochen werden. Ein Versuch, nach zwei Tagen Pause die Fermentation bei einer Raumbelastung von 2 g oTR/l*d weiterzuführen scheiterte erneut. Die Methankonzentration sank auf 42 %. Am 61. Tag wurde der Gärversuch mit einer Raumbelastung von 1 g oTR/l*d fortgeführt. Doch auch bei dieser Raumbelastung sank die Methankonzentration unter 46 % und die Substratzufuhr musste am 110. Tag erneut unterbrochen werden. Der Schwefelgehalt lag bei 425 ppm und der Gehalt an Ammonium-Stickstoff über 3,9 g/kg (Tabelle 22). Die Methanbakterien erholten sich bis zum Ende des Gärversuchs nicht mehr. Die Substratzufuhr musste trotz der geringen Raumbelastung von 0,5 g oTR/l*d immer wieder unterbrochen werden.

Der thermophile Gärversuch mit Maissilage lief sehr stabil und konnte bis zu einer Raumbelastung von 3,5 g oTR/l*d am 115. Tag ohne Zwischenfälle erhöht werden. Bei dieser Belastungsstufe fiel die Methankonzentration aber erstmalig unter 48 % und musste trotz eines Tages ohne Substratzufuhr nach einer Woche wieder auf 3 g oTR/l*d gesenkt werden. Diese Raumbelastung konnte aber bis zum Ende beibehalten werden.

Der thermophile Gärversuch mit Kleegrassilage lief wenig stabil. Schon die Steigerung der Raumbelastung auf 2 g oTR/l*d ließ die Methankonzentration nach 50 Tagen auf 43 % sinken, konnte aber nach zwei Tagen ohne Substratzufuhr bei gleicher Belastungsstufe weiterbetrieben werden. Wegen der erneut sinkenden Methankonzentration auf 48 % wurde am 75. Tag die Raumbelastung auf 1,6 g oTR/l*d herabgesetzt. Nachdem die Raumbelastung auf 1,75 g oTR/l*d wieder erhöht wurde, sank auch diesmal die Methankonzentration auf 41 % am 92. Tag. Gleichzeitig stieg der Gehalt an H₂S auf 415 ppm. Nach erneuter Unterbrechung der Substratzufuhr wurde bei einer Belastungsstufe von 0,5 bzw. 0,75 g oTR/l*d neu begonnen, doch jede Erhöhung auf 1 g oTR/l*d ließ die Methankonzentration wieder sinken. Der H₂S-Gehalt lag ab dem 125. Tag meistens zwischen 230 und 250 ppm.

Die Verweilzeiten gingen mit zunehmender Raumbelastung zurück (Abbildung 15). Die

längste Verweilzeit hatte der Hühnertrockenkot (HTK). Durch die hohe organische Trockensubstanz wurde beim Hühnertrockenkot weniger Frischmasse dem Reaktor zugeführt. Die Rinder- (RG) und Schweinegülle (SG) mit ihrer geringen oTR hatten die geringste Verweilzeit. Die Verweilzeiten der Rinder- und Schweinegülle und die der Mais- (SM) und Kleegrassilage (KGS) sind wegen ihrer geringen oTR-Unterschiede in ihrem Verlauf sehr ähnlich.

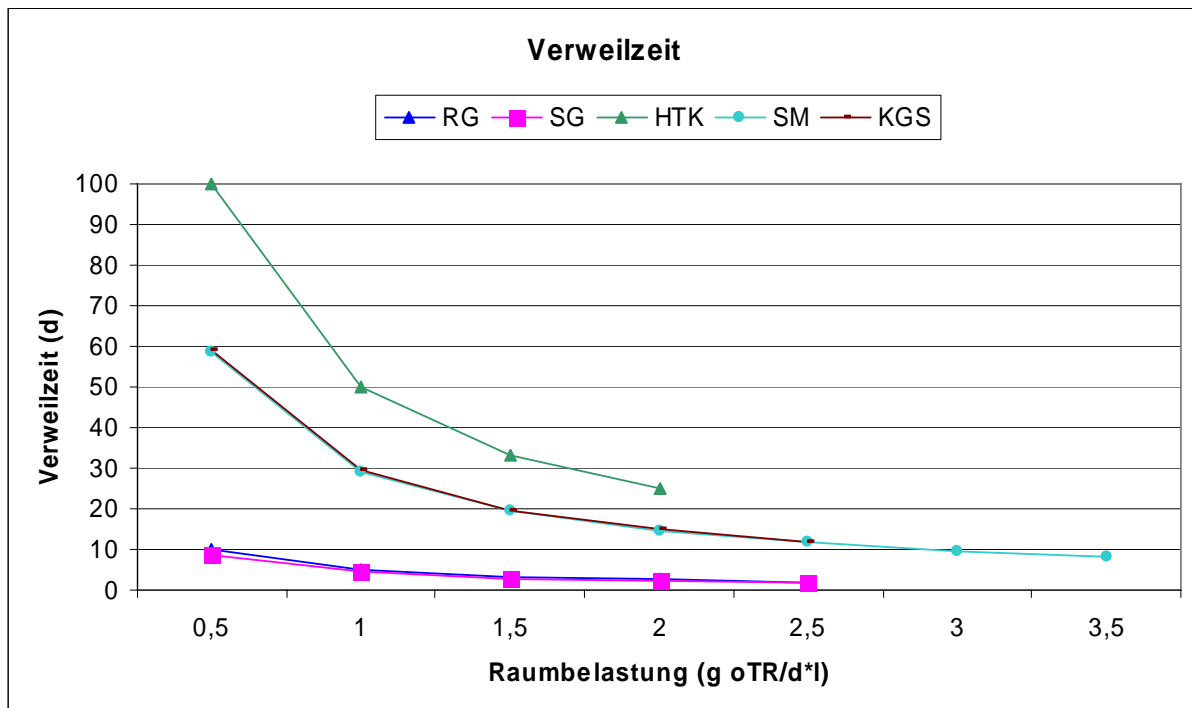


Abbildung 15: Verweilzeiten der Substrate des thermophilen Gärversuchs

5.2.2 Ergebnisse der Flüssigphasenanalytik

Zu jeder Belastungsstufe wurde eine komplette Analyse durchgeführt.

5.2.2.1 Rindergülle

Die Anteile an Trockenrückstand, organischen Trockenrückstand, sowie die Gehalte an dem Chemischen Sauerstoffbedarf, Gesamt- und Ammonium-Stickstoff stiegen mit fortlaufender Versuchsdauer an (Tabelle 18). Der Gehalt an Gesamt-Stickstoff erreichte am Ende des Versuchs den Ausgangswert der Rindergülle. Beim TR und oTR gab es ab dem 107. Tag bis zum Schluss kaum eine Veränderung. Der CSB-Wert ging in diesem Zeitraum leicht zurück. Die Stickstoffgehalte stiegen ab dem 92. Tag kaum noch an. Der Gehalt an Ortho-Phosphat ging sogar mit der Dauer des Versuchs und Erhöhung der Raumbelastung zurück. Dies ist auf den Austausch des Impfschlammes durch die Zugabe der Rindergülle

zurückzuführen. Der Ausgangswert der Rindergülle war niedriger als der des Impfschlammes (Tab. 2). Am Ende des Versuchs gab es einen kleinen Anstieg des Gehalts an Ortho-Phosphat.

Der Gehalt an flüchtigen organischen Säuren war zum 92. Tag am höchsten. Trotz des gleichzeitigen Anstiegs des Carbonatpuffers (TAC) lag der FOS/TAC-Wert mit 0,44 am 71. und 0,45 am 92. Tag über dem kritischen Bereich von 0,35 (Tabelle 18).

Tabelle 18: Flüssigphasenanalytik des Gärrückstands bei Einsatz von Rindergülle

Versuchs- dauer (d)	B _R (g oTR/ l*d)	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt- N (g/kg)	PO ₄ -P (g/kg)	NH ₄ - N (g/kg)	TAC (mg CaCO ₃ /l)	FOS (mg Hac/l)	FOS/ TAC
9	0,5	2,53	1,61	26,36	2,47	0,581	1,51	5400	655,40	0,12
24	1	3,29	2,19	31,73	2,69	0,544	1,72	6970	1120,20	0,16
44	1,5	4,23	2,94	45,49	3,07	0,521	1,90	8270	2481,40	0,30
56	2	n	n	n	n	n	1,98	9020	2514,60	0,28
71	2,5	5,05	3,59	53,21	3,37	0,436	2,06	9260	4041,80	0,44
92	2,3	n	n	n	n	n	2,12	10140	4539,80	0,45
107	2	5,43	3,84	64,89	3,49	0,383	2,13	10320	3643,40	0,35
112	2	n	n	n	n	n	2,15	10880	3012,60	0,28
119	2,5	n	n	n	n	n	2,16	10580	3344,60	0,32
155	2	5,44	3,94	64,41	3,56	0,424	2,22	10890	3245,00	0,30

-: nicht nachgewiesen, n: nicht bestimmt

Die Menge an Säuren des thermophilen Gärversuchs mit Rindergülle (Tabelle 19) war deutlich höher als beim mesophilen Gärversuch. Schon bei Raumbelastung von 1,5 g oTR/l*d war der Gesamtgehalt über 2 g/kg. Am meisten Säuren gab es am 92. Tag mit 3,3 g/kg, wovon 2,3 g/kg Essigsäure waren. Dies bestätigte den FOS-Wert. Am Ende des Versuchs ging der Gehalt an Säuren mit 1,6 g/kg wieder deutlich zurück. Der pH-Wert war während des gesamten Versuchs deutlich höher als beim mesophilen Gärversuch.

Tabelle 19: Säurespektrum des Gärrückstands bei Einsatz von Rindergülle

Versuchs- dauer (d)	B_R (g oTR/l*d)	pH	Milch- säure (g/kg)	Ameisen- säure (g/kg)	Essig- säure (g/kg)	Propion- säure (g/kg)	n-Butter- säure (g/kg)	i-Butter- säure (g/kg)	n- Valerian- säure (g/kg)	i- Valerian- säure (g/kg)	Gesamt (g/kg)
9	0,5	7,99	-	0,0160	0,0417	-	-	-	0,0888	-	0,1465
24	1	8,13	-	-	0,1692	-	-	-	0,1835	0,0689	0,4216
44	1,5	8,14	-	0,0234	1,7071	0,1291	-	-	0,1389	0,0806	2,0791
56	2	8,16	-	0,0297	1,6135	0,3502	-	0,0448	-	0,1607	2,1989
71	2,5	8,24	-	0,0229	2,2986	0,5077	0,0638	0,0745	0,1534	0,1112	3,2321
92	2,3	8,10	-	0,0256	2,3790	0,5667	0,0701	0,1202	-	0,1507	3,3123
107	2	8,22	-	0,0375	1,7502	0,7616	-	0,0422	-	0,3268	2,9183
112	2	8,30	-	0,0267	1,7502	0,8131	-	-	0,2044	0,3698	3,1642
119	2,5	8,15	-	-	1,2998	0,8260	-	-	0,1953	0,0581	2,3792
155	2	8,30	-	0,0157	0,9962	0,3492	-	-	-	0,2665	1,6276

-: nicht nachgewiesen

5.2.2.2 Schweinegülle

Die untersuchten Parameter TR, oTR, CSB, Gesamt-N und NH₄-N stiegen mit der Dauer des Versuchs und Erhöhung der Raumbelastung kontinuierlich an (Tabelle 20). Der Gehalt an Gesamt-Stickstoff erreichte am Ende fast den Ausgangswert der Schweinegülle. Der Gehalt an Ortho-Phosphat ging am 107. Tag leicht zurück, stieg zum Ende des Versuchs aber wieder an. Der FOS/TAC-Wert erreichte zu keiner Zeit des Versuchs einen kritischen Bereich.

Tabelle 20: Flüssigphasenanalytik des Gärrückstands bei Einsatz von Schweinegülle

Versuchs- dauer (d)	B _R (g oTR/ l*d)	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt- N (g/kg)	PO ₄ -P (g/kg)	NH ₄ - N (g/kg)	TAC (mg CaCO ₃ /l)	FOS (mg Hac/l)	FOS/ TAC
9	0,5	1,96	1,23	19,06	2,38	0,614	1,59	5450	788,20	0,14
24	1	2,51	1,60	22,87	2,94	0,692	2,13	7380	1020,60	0,14
44	1,5	2,90	1,84	29,07	3,69	0,761	2,80	9450	1651,40	0,17
56	2	n	n	n	n	n	2,95	9360	2249,00	0,24
71	2,5	2,98	1,89	33,10	3,97	0,788	3,06	10200	2149,40	0,21
92	2,3	n	n	n	n	n	3,13	10650	2348,60	0,22
107	2	3,05	1,90	33,59	4,25	0,728	3,32	11140	2049,80	0,18
112	2	n	n	n	n	n	3,19	11130	2415,00	0,22
119	2,5	n	n	n	n	n	3,43	10870	2448,20	0,23
155	2	3,93	2,62	44,72	4,48	0,941	3,49	11680	2581,00	0,22

-: nicht nachgewiesen, n: nicht bestimmt

Den Höchstwert an Säuren gab es nach 44 Tagen Versuchsdauer bei der Raumbelastung von 1,5 g oTR/l*d mit über 3,3 g/kg. Den größten Anteil hatte die Ameisensäure. Mit Senkung der Raumbelastung von 2 auf 1,5 g oTR/l*d sank auch die Menge an Säuren unter 2 g/kg. Eine Erhöhung auf 2,5 g oTR/l*d ließ diese auf 2,3 g/kg wieder ansteigen.

Tabelle 21: Säurespektrum des Gärrückstands bei Einsatz von Schweinegülle

Versuchs- dauer (d)	B_R (g oTR/l*d)	pH	Milch- säure (g/kg)	Ameisen- säure (g/kg)	Essig- säure (g/kg)	Propion- säure (g/kg)	n-Butter- säure (g/kg)	i-Butter- säure (g/kg)	n- Valerian- säure (g/kg)	i- Valerian- säure (g/kg)	Gesamt (g/kg)
9	0,5	8,12	-	0,2578	0,0569	-	-	-	-	0,0679	0,3826
24	1	8,20	-	0,9875	0,0825	-	0,2424	-	-	-	1,3124
44	1,5	8,12	-	1,8043	0,7820	0,0377	0,5158	-	0,1739	-	3,3137
56	2	8,17	-	0,6362	1,9670	0,1745	-	-	0,0905	0,0859	2,9541
71	1,5	7,75	-	0,9099	0,6487	0,2863	-	-	0,1376	-	1,9825
92	1,75	8,32	-	0,6786	1,1045	0,0899	-	-	-	-	1,8730
107	2	8,23	-	-	1,6950	0,2412	-	-	0,2413	-	2,1775
112	2	8,28	-	-	1,2116	0,1086	0,1499	-	0,2705	-	1,7406
119	2,5	8,16	-	-	1,7419	0,2370	-	0,0465	0,2768	0,0727	2,3749
155	2	8,21	-	-	1,1190	0,3351	-	-	-	0,0508	1,5049

-: nicht nachgewiesen

5.2.2.3 Hühnertrockenkot

Alle untersuchten Parameter stiegen mit Fortdauer des Versuchs stetig an (Tabelle 22). Der FOS/TAC-Wert war trotz der instabilen Fermentation bis auf die Schlussanalyse immer unter dem kritischen Bereich von 0,35. Am Ende lag der FOS/TAC-Wert, wegen des starken Anstiegs der flüchtigen organischen Säuren, bei 0,53. Die Anteile des TR, oTR und die Gehalte an CSB und PO₄-P waren denen des mesophilen Gärversuchs ähnlich. Die Gehalte an Gesamt-N waren beim thermophilen Gärversuch höher.

Tabelle 22: Flüssigphasenanalytik des Gärückstands bei Einsatz von Hühnertrockenkot

Versuchs- dauer (d)	B _R (g oTR/ l*d)	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt- N (g/kg)	PO ₄ -P (g/kg)	NH ₄ - N (g/kg)	TAC (mg CaCO ₃ /l)	FOS (mg Hac/l)	FOS/ TAC
9	0,5	1,93	1,20	18,86	2,29	0,603	1,40	4960	655,40	0,13
24	1	2,64	1,65	24,43	2,79	0,783	1,75	6210	954,20	0,15
44	1,5	3,74	2,30	33,91	3,88	1,197	2,34	8630	1319,40	0,15
56	2	n	n	n	n	n	2,61	9240	2049,80	0,22
71	2,5	4,76	3,01	46,03	4,65	1,366	2,79	10310	2879,80	0,28
92	2,3	n	n	n	n	n	3,46	12360	2946,20	0,24
107	2	6,70	4,10	60,59	6,34	1,859	3,88	13710	3809,40	0,28
112	2	n	n	n	n	n	3,91	13820	3709,80	0,27
119	2,5	n	n	n	n	n	4,08	14130	4373,80	0,31
155	2	7,01	4,25	68,40	7,01	1,993	4,56	15060	7926,20	0,53

-: nicht nachgewiesen, n: nicht bestimmt

Im Laufe des Versuchs stieg Menge an Säuren stetig an (Tabelle 23). Ab dem 71. Tag waren jeweils alle Säuren, die bei der HPLC-Messung erfasst werden konnten, vorhanden. Neben der Essigsäure stieg die Menge der Propionsäure kontinuierlich an. Die hohe Gesamtmenge an Säuren mit mehr als 8,3 g/kg am letzten Tag des Versuchs bestätigte den hohen FOS-Wert.

Tabelle 23: Säurespektrum des Gärrückstands bei Einsatz von Hühnertrockenkot

Versuchs- dauer (d)	B_R (g oTR/l*d)	pH	Milch- säure (g/kg)	Ameisen- säure (g/kg)	Essig- säure (g/kg)	Propion- säure (g/kg)	n-Butter- säure (g/kg)	i-Butter- säure (g/kg)	n- Valerian- säure (g/kg)	i- Valerian- säure (g/kg)	Gesamt (g/kg)
9	0,5	8,08	-	-	0,2760	-	-	-	-	-	0,2760
24	1	8,18	-	0,0223	0,0420	-	-	-	-	-	0,0643
44	1,5	8,11	-	0,0198	0,3259	0,0509	-	-	0,1599	-	0,5565
56	2	8,15	-	0,0698	1,6876	0,0440	-	-	0,0902	-	1,8913
71	1	8,38	-	0,0512	1,2536	0,1984	0,1121	0,0886	0,2189	0,1612	2,0840
92	1,14	8,40	0,0287	0,0818	1,0631	0,4912	0,0979	0,2227	0,2623	0,0773	2,3250
107	1	8,30	0,0381	0,0575	1,8286	0,9227	-	0,4304	0,1715	0,3422	3,7910
112	0,5	8,35	0,0282	0,0786	1,9678	0,9892	0,0924	0,2718	0,4066	0,3717	4,2063
119	1	8,33	0,0422	0,0688	2,0382	1,0580	0,1633	0,4306	0,4624	0,3810	4,6445
155	0,5	8,32	0,0276	0,0575	4,4863	1,3720	0,4815	0,4477	0,7727	0,7518	8,3971

-: nicht nachgewiesen

5.2.2.4 Maissilage

Alle untersuchten Parameter stiegen mit Fortdauer des Versuchs stetig an (Tabelle 24). Der FOS/TAC-Wert erreichte bei der Raumbelastung von 3 g oTR/l*d den kritischen Bereich von 0,35. Doch erst bei der Erhöhung auf 3,5 g oTR/l*d stieg der FOS/TAC-Wert auf 0,64. Dieser hohe Wert entstand neben dem starken Anstieg an flüchtigen organischen Säuren auch wegen des gleichzeitigen Abfalls des Carbonatpuffers.

Tabelle 24: Flüssigphasenanalytik des Gärrückstands bei Einsatz von Maissilage

Versuchs- dauer (d)	B _R (g oTR/ l*d)	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt- N (g/kg)	PO ₄ -P (g/kg)	NH ₄ - N (g/kg)	TAC (mg CaCO ₃ /l)	FOS (mg Hac/l)	FOS/ TAC
9	0,5	1,85	1,17	18,06	2,12	0,537	1,27	4470	622,20	0,14
24	1	2,18	1,49	21,41	2,17	0,514	1,38	4370	522,60	0,12
44	1,5	2,60	1,85	29,23	2,45	0,558	1,35	4780	555,80	0,12
56	2	n	n	n	n	n	1,29	4590	489,40	0,11
71	2,5	3,34	2,53	40,31	2,71	0,497	1,32	4990	1153,40	0,23
92	2,8	n	n	n	n	n	1,25	4910	1120,20	0,23
107	3	5,39	4,34	66,71	3,36	0,617	1,18	4490	1585,00	0,35
112	3	n	n	n	n	n	1,09	4680	1651,40	0,35
119	3,5	n	n	n	n	n	1,09	3620	2315,40	0,64
155	3	7,21	6,14	102,19	3,90	0,654	1,22	3960	1485,40	0,38

-: nicht nachgewiesen, n: nicht bestimmt

Die Gesamtmenge an Säuren stieg bei der Erhöhung der Raumbelastung auf 3,5 g oTR/l*d von 1 auf 2,6 g/kg, wovon 1,6 g/kg von der Essigsäure kamen. In der Schlussanalyse gab es einen starken Anstieg an Propionsäure auf 3,2 g/kg, bei einer Gesamtmenge an Säuren von 5,6 g/kg (Tabelle 25).

Tabelle 25: Säurespektrum des Gärrückstands bei Einsatz von Maissilage

Versuchs- dauer (d)	B _R (g oTR/l*d)	pH	Milch- säure (g/kg)	Ameisen- säure (g/kg)	Essig- säure (g/kg)	Propion- säure (g/kg)	n-Butter- säure (g/kg)	i-Butter- säure (g/kg)	n- Valerian- säure (g/kg)	i- Valerian- säure (g/kg)	Gesamt (g/kg)
9	0,5	8,10	-	-	-	-	-	-	-	0,0854	0,0854
24	1	8,15	-	-	-	-	0,1277	-	-	-	0,1277
44	1,5	8,20	-	-	-	-	0,2585	-	-	-	0,2585
56	2	7,80	-	-	1,8127	-	-	-	-	-	1,8127
71	2,5	8,36	-	0,0188	0,0313	-	0,4577	-	-	-	0,5078
92	2,8	7,79	-	-	0,2629	-	0,7591	-	-	-	1,0220
107	3	8,10	-	-	0,7674	0,1487	0,0792	-	0,2186	-	1,2139
112	3	7,70	-	-	0,6593	0,1086	0,1499	-	0,1661	-	1,0839
119	3,5	7,44	-	-	1,6341	0,3883	0,4259	0,0829	0,1027	-	2,6339
155	3	7,70	0,0275	0,1630	0,3718	3,2302	0,4798	0,5476	0,3803	0,4821	5,6823

-: nicht nachgewiesen

5.2.2.5 Kleegrassilage

Die untersuchten Parameter TR, oTR, CSB, Gesamt-N und NH₄-N stiegen mit der Dauer des Versuchs (Tabelle 26). Der Gehalt an Ortho-Phosphat veränderte sich ab dem 71. Tag kaum noch. Ab dem 56. Tag, als der Substratzufuhr zum ersten Mal unterbrochen werden musste, lag der FOS/TAC-Wert bis zum Schluss trotz mehrmaliger Unterbrechungen der Substratzugabe und Senkungen der Raumbelastung immer über den kritischen 0,35. Die Menge an flüchtigen organischen Säuren stieg stark an. Am 107. und 112. Versuchstag war die Menge an FOS sogar größer als die des Carbonatpuffers. Der FOS/TAC-Wert lag jeweils über 1.

Tabelle 26: Flüssigphasenanalytik des Gärrückstands bei Einsatz von Kleegrassilage

Versuchs- dauer (d)	B _R (g oTR/ l*d)	TR (%)	oTR (%)	CSB (g/kg)	Gesamt- N (g/kg)	PO ₄ -P (g/kg)	NH ₄ - N (g/kg)	TAC (mg CaCO ₃ /l)	FOS (mg Hac/l)	FOS/ TAC
9	0,5	2,01	1,27	20,01	2,28	0,551	1,33	4940	755,00	0,15
24	1	2,52	1,61	26,52	2,54	0,581	1,57	6230	655,40	0,11
44	1,5	3,47	2,31	38,38	3,25	0,601	1,90	8100	1784,20	0,22
56	2	n	n	n	n	n	2,10	8370	3809,40	0,46
71	2,5	4,44	3,03	53,27	3,88	0,676	2,20	9270	5137,40	0,55
92	2,3	n	n	n	n	n	2,82	10130	9055,00	0,89
107	2	5,95	4,10	80,52	4,87	0,681	3,13	9720	11047,00	1,14
112	2	n	n	n	n	n	3,11	10290	10914,20	1,06
119	2,5	n	n	n	n	n	3,23	10880	9984,60	0,92
155	2	6,56	4,62	90,14	5,34	0,680	3,56	11090	9387,00	0,85

-: nicht nachgewiesen, n: nicht bestimmt

Die Gesamtmenge an Säuren stieg mit der Versuchsdauer. Schon am 56. Tag war diese bei über 4,8 g/kg. Die höchsten Anteile hatten davon jeweils die Essig- und die Propionsäure. Ameisensäure wurde nur am 112. Tag gemessen, Milchsäure war dagegen ab dem 71. Tag immer vorhanden. Ab dem 92. Tag, als die Substratzufuhr erneut unterbrochen und von dort an die jede Erhöhung der Raumbelastung auf 1 g oTR/l*d dauerhaft misslang, lag die Gesamtmenge an Säuren über 11 g/kg. Am Ende des Versuchs stieg diese auf über 16 g/kg.

Tabelle 27: Säurespektrum des Gärrückstands bei Einsatz von Kleegrassilage

Versuchs- dauer (d)	B_R (g oTR/l*d)	pH	Milch- säure (g/kg)	Ameisen- säure (g/kg)	Essig- säure (g/kg)	Propion- säure (g/kg)	n-Butter- säure (g/kg)	i-Butter- säure (g/kg)	n- Valerian- säure (g/kg)	i- Valerian- säure (g/kg)	Gesamt (g/kg)
9	0,5	8,13	-	-	-	-	-	-	-	-	0
24	1	8,35	-	-	0,0397	-	-	-	-	-	0,0397
44	1,5	8,34	-	-	1,2490	0,2096	-	-	0,2504	-	1,7090
56	2	8,25	-	-	2,5517	0,8720	0,1545	0,1954	0,5514	0,5104	4,8354
71	2	8,17	0,0199	-	2,2288	1,7375	0,5122	0,4673	1,3921	0,5148	6,8726
92	1,75	8,20	0,1831	-	4,6912	2,4392	0,5178	0,6661	1,9657	1,044	11,5071
107	1	8,36	0,2618	-	6,8812	2,7777	0,6858	0,8988	1,1789	1,3517	14,0359
112	0,5	8,15	0,2053	0,0315	6,4093	2,8151	1,5256	0,8320	1,3334	2,1482	15,3004
119	1	8,23	0,0435	-	5,4934	2,8481	1,5207	0,9086	0,9201	1,6930	13,4304
155	1	8,27	0,2402	-	7,3633	3,2836	1,0358	1,1295	1,5404	1,7183	16,3111

-: nicht nachgewiesen

5.2.3 Abbaugrad

Wie beim mesophilen Gärversuch hatte die Silage und der Hühnerkot wegen des hohen Trockenrückstandsgehalts und damit resultierenden geringen Zugabe an Frischmasse die höchsten Abbaugrade. Diese sanken mit Zunahme der Raumbelastung. Bis zur Raumbelastung von 1,5 g oTR/l*d lagen ihre Abbaugrade noch über 90 %.

Die Schweinegülle hat ab der Raumbelastung von 1,5 g oTR/l*d einen höheren Abbaugrad als die Rindergülle. Wegen des hohen Anstiegs des CSB bei der Raumbelastung 2,5 g oTR/l*d sank der Abbaugrad der Schweinegülle nur noch wenig. Bei der Maissilage stieg der CSB mit der Raumbelastung von 3,5 g oTR/l*d so stark, dass die Abbaugrade bei den Raumbelastungen 3 und 3,5 g oTR/l*d gleich groß waren.

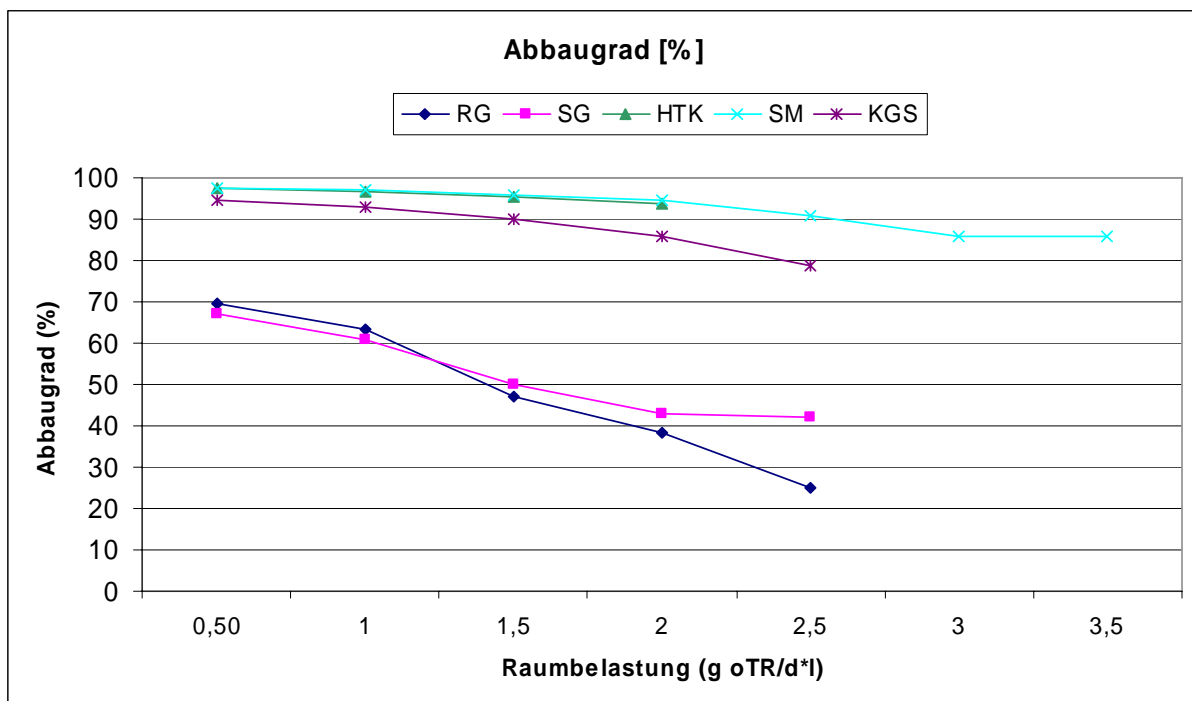


Abbildung 16: Abbaugrade der Substrate des thermophilen Gärversuchs

5.2.4 Methanproduktivität und –ausbeute

5.2.4.1 Rindergülle

Die Methanproduktivität (Abbildung 17) stieg bis zum 56. Tag mit 0,26 l CH₄/l*d bei einer Raumbelastung von 2 g oTR/l*d stetig an. Mit der Steigerung auf 2,5 g oTR/l*d fiel die Produktivität auf 0,16 l CH₄/l*d zurück. Einen Anstieg der Produktivität gab es erst wieder

bei einer Raumbelastung von 2 g oTR/l*d. Auch bei der zweiten Erhöhung der Raumbelastung auf 2,5 g oTR/l*d am 115. Tag viel die Produktivität wieder. Mit dem Höchstwert von 0,3 l CH₄/l*d am 125. Tag bei einer Raumbelastung von 2 g oTR/l*d und einer Methanproduktion von 4,43 l/d war die Methanproduktivität so groß wie beim mesophilen Gärversuch bei gleicher Belastungsstufe.

Die höchste Methanausbeute war am 8. Tag mit 0,19 l CH₄/g oTR (Abbildung 18) und war damit etwas niedriger als beim mesophilen Gärversuch (Höchstwert 0,21 l CH₄/g oTR). Mit Zunahme der Raumbelastung ging die Methanausbeute zurück. Ab dem 124. Tag bei der Raumbelastung von 2 g oTR/l*d lag die Methanausbeute zwischen 0,12 und 0,15 l CH₄/g oTR.

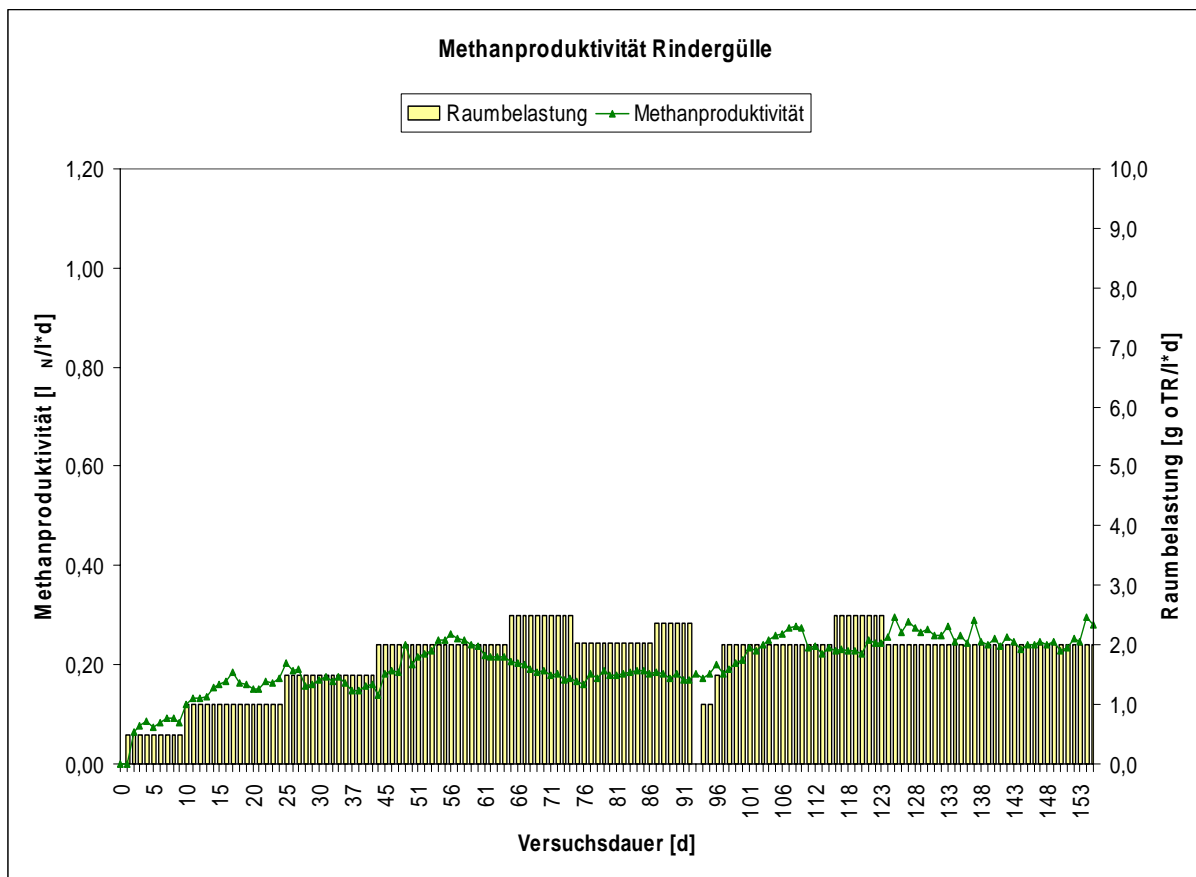


Abbildung 17: Methanproduktivität bei thermophiler Vergärung von Rindergülle

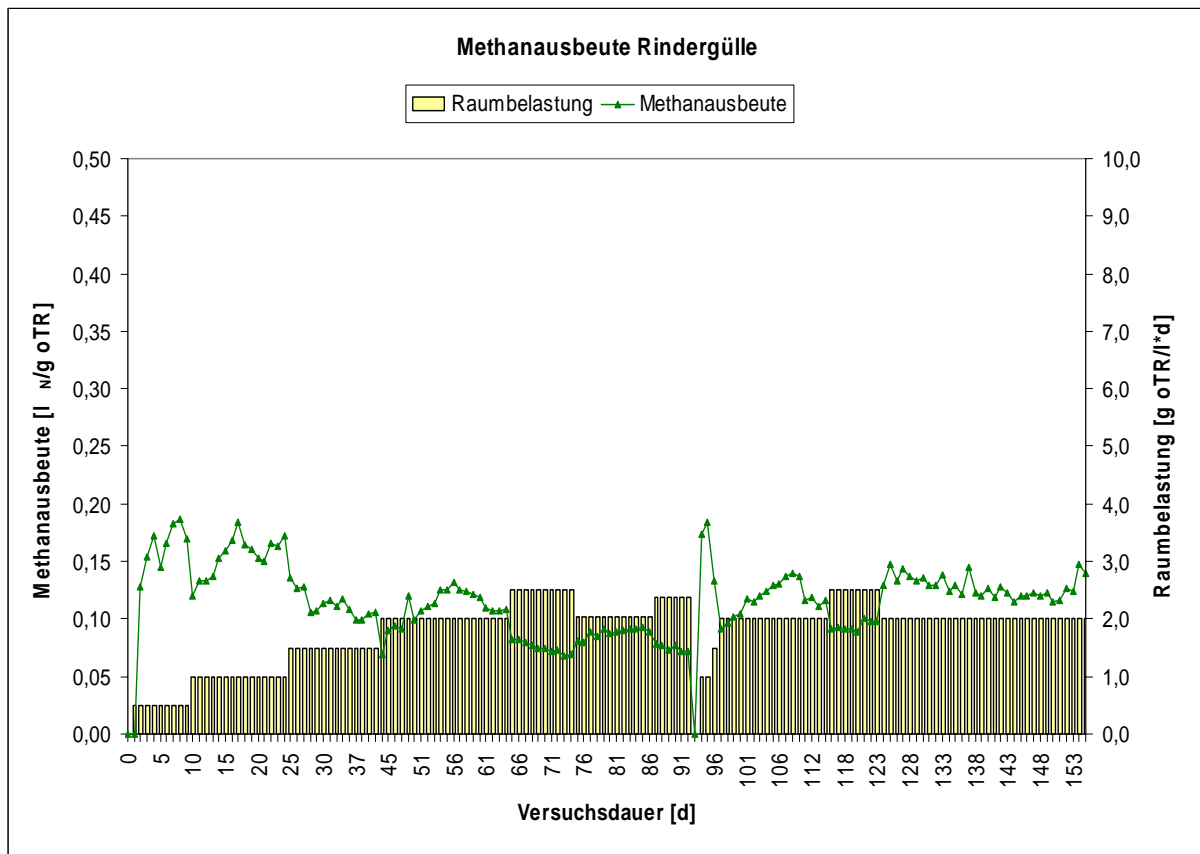


Abbildung 18: Methanausbeute der thermophiler Vergärung von Rindergülle

5.2.4.2 Schweinegülle

Die Methanproduktivität (Abbildung 19) stieg bis zum 26. Tag mit 0,19 l CH₄/l*d bei einer Raumbelastung von 1,5 g oTR/l*d stetig an. Mit der Steigerung auf 2 g oTR/l*d fiel die Produktivität jedoch auf 0,07 l CH₄/l*d zurück. Einen Anstieg der Produktivität gab es erst wieder bei einer Raumbelastung von 1,5 g oTR/l*d. Auch bei der zweiten Erhöhung der Raumbelastung auf 2,5 g oTR/l*d am 115. Tag fiel die Produktivität wieder. Nach Erholung der Fermentation blieb die Produktivität trotz unterschiedlicher Raumbelastungen zwischen 0,12 und 0,15 l CH₄/l*d relativ konstant. Erst am 134. Tag stieg die Produktivität auf den Höchstwert von 0,22 l CH₄/l*d, bei einer Methanproduktion von 3,24 l/d, und blieb bis zum Schluss zwischen 0,18 und 0,19 l CH₄/l*d. Bei der Raumbelastung von 2 g oTR/l*d war die Methanproduktivität größer als beim mesophilen Gärversuch bei gleicher Belastungsstufe, die dort nur bei 0,12 l CH₄/l*d lag.

Die höchste Methanausbeute war am 22. Tag mit 0,19 l CH₄/g oTR (Abbildung 20) und war damit etwas höher als beim mesophilen Gärversuch (Höchstwert 0,16 l CH₄/g oTR). Mit Zunahme der Raumbelastung ging die Methanausbeute zurück. Die niedrigste Ausbeute war

zur ersten Erhöhung der Raumbelastung auf 2 g oTR/l*d mit 0,04 l CH₄/g oTR. Ab dem 127. Tag bei der Raumbelastung von 2 g oTR/l*d blieb die Methanausbeute zwischen 0,08 und 0,10 l CH₄/g oTR relativ konstant.

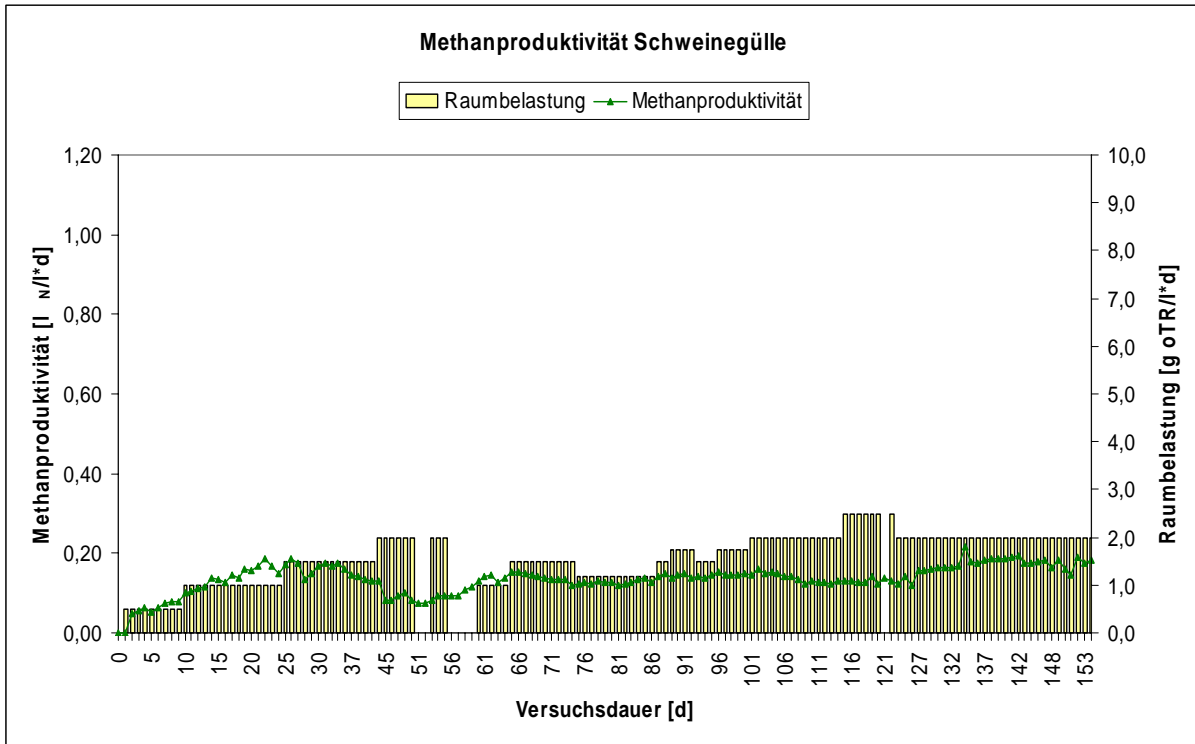


Abbildung 19: Methanproduktivität bei thermophiler Vergärung von Schweinegülle

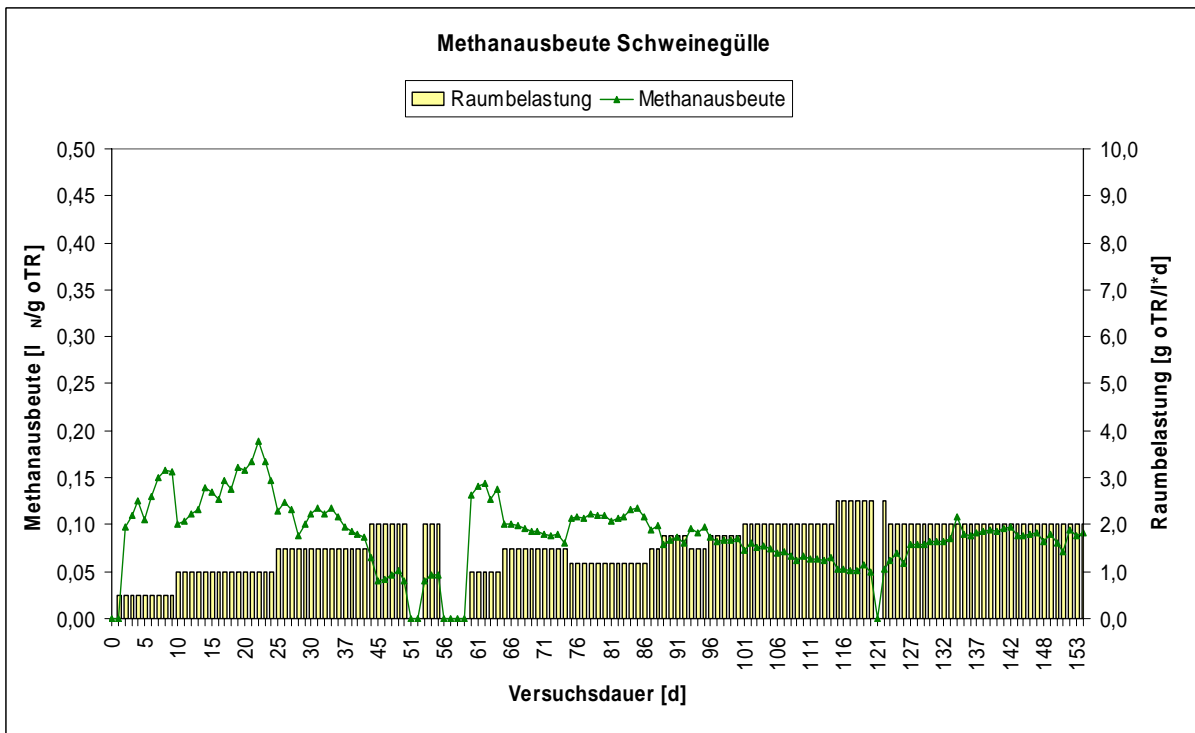


Abbildung 20: Methanausbeute bei thermophiler Vergärung von Schweinegülle

5.2.4.3 Hühnertrockenkot

Bis zum 31. Tag des Versuchs stieg die Methanproduktivität stetig an und erreichte den Höchstwert des Versuchs von 0,3 l CH₄/l*d bei einer Raumbelastung von 1,5 g oTR/l*d (Abbildung 21). Die Methanproduktion war 4,43 l/d. Mit der Steigerung auf 2 g oTR/l*d fiel die Produktivität auf 0,13 l CH₄/l*d zurück. Erst beim Neustart der Substratzufuhr bei Raumbelastung von 1 g oTR/l*d stieg auch die Produktivität bis zu 0,25 l CH₄/l*d wieder an. Ab den 71. Tag fiel die Methanproduktivität aber kontinuierlich auf nur noch 0,03 l CH₄/l*d am Ende des Versuchs. Die Methanproduktivität war etwa so groß wie die beim mesophilen Gärversuch bei gleicher Belastungsstufe.

Die höchste Methanausbeute war am 94. Tag mit 0,43 l CH₄/g oTR (Abbildung 22) nach der Herabsetzung der Raumbelastung von 1 auf 0,5 g oTR/l*d. Wegen der vielen Unterbrechungen der Substratzugabe gab es ab den 110. Tag große Schwankungen in der Methanausbeute, die aber stetig kleiner wurden. Am Ende des Versuchs war die Methanausbeute bei nur noch 0,06 l CH₄/g oTR.

Die Methanausbeute des Hühnertrockenkots bei thermophilen Betriebsbedingungen war bei gleicher Raumbelastung durchschnittlich kleiner als bei mesophiler Betriebsweise.

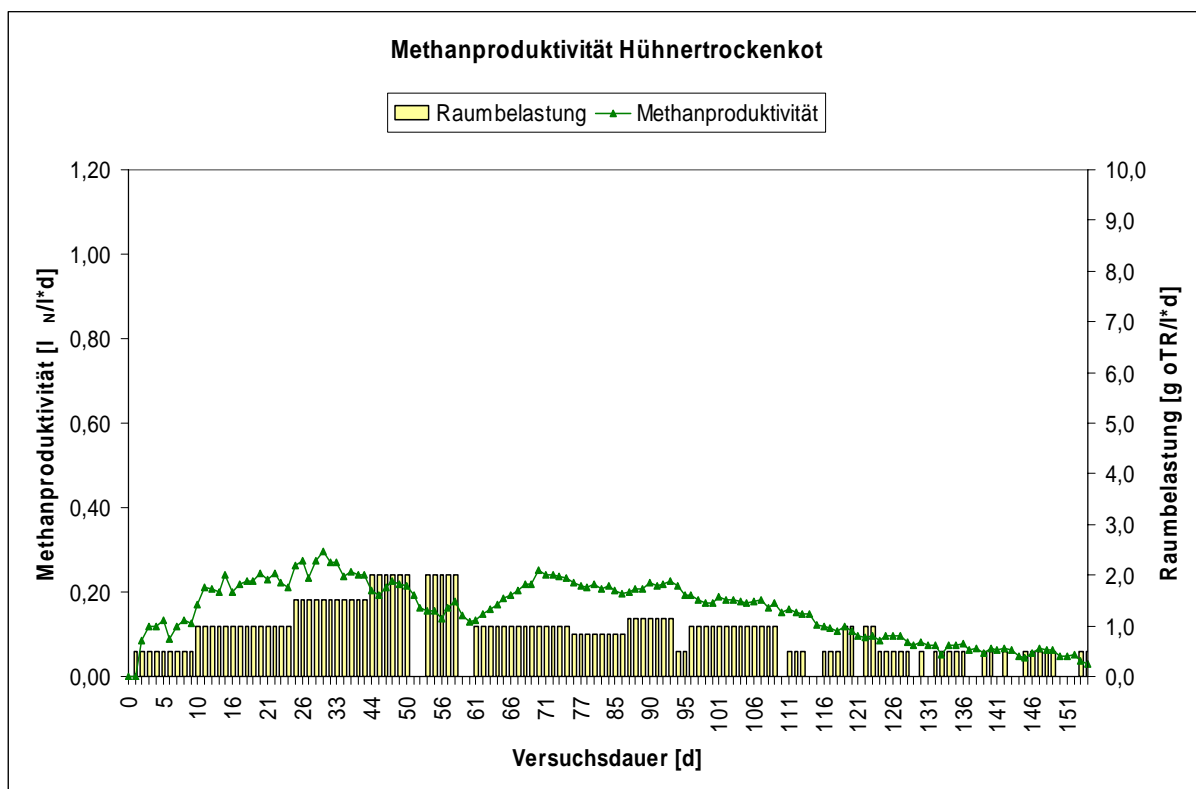


Abbildung 21: Methanproduktivität bei thermophiler Vergärung von Hühnertrockenkot

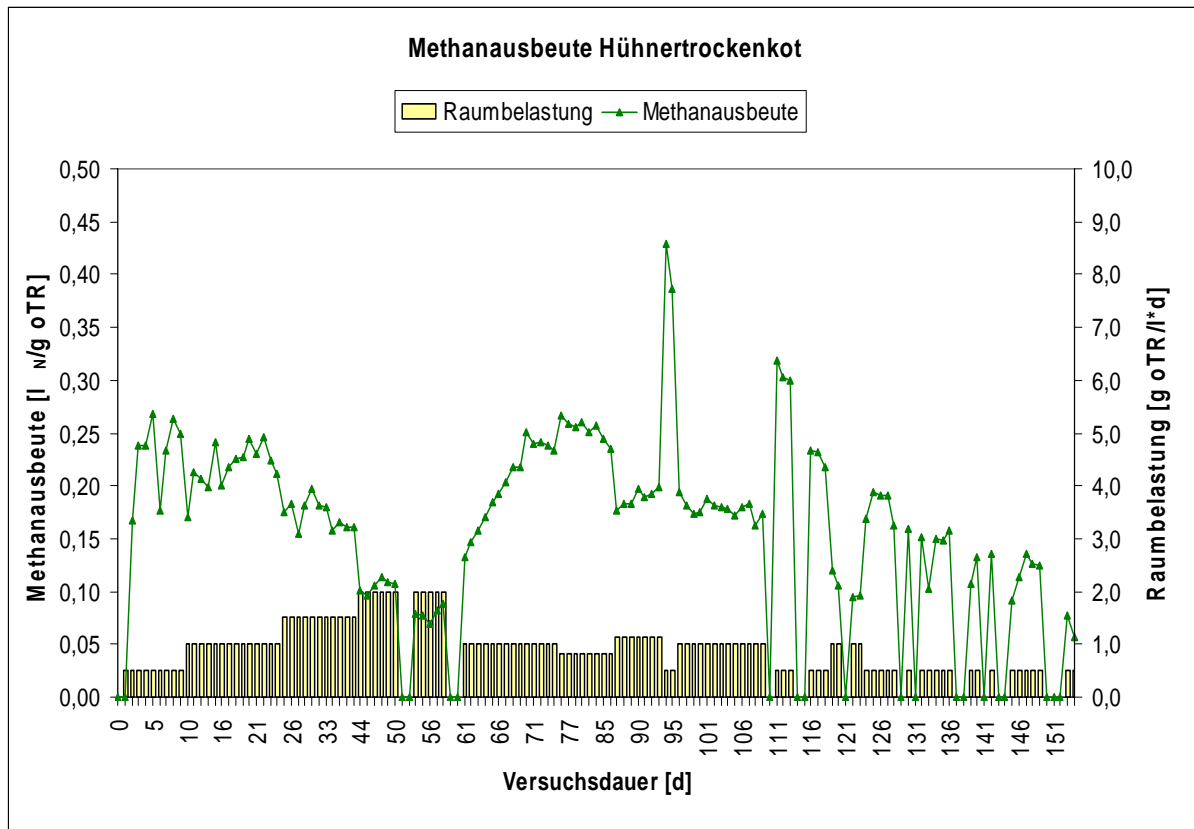


Abbildung 22: Methanausbeute bei thermophiler Vergärung von Hühnertrockenkot

5.2.4.4 Maissilage

Die Methanproduktivität stieg bis zur Raumbelastung von 3 g oTR/l*d stetig an und erreichte am 107. Tag einen Höchstwert von 1,21 l CH₄/l*d bei einer Methanproduktion von 18,13 l/d. Mit der Steigerung auf 3,5 g oTR/l*d fiel die Produktivität. Nach der Senkung der Raumbelastung auf 3 g oTR/l*d lag die Produktivität zwischen 0,9 und 1 l CH₄/l*d, das Niveau vor der Erhöhung auf 3,5 g oTR/l*d wurde aber nicht mehr erreicht (Abbildung 23). Der thermophile Gärversuch mit Maissilage war stabiler als der mesophile und hatte eine höhere Produktivität bei gleicher Raumbelastung.

Die Methanausbeute lag bis zur Raumbelastung auf 3 g oTR/l*d meistens zwischen 0,35 und 0,4 l CH₄/g oTR (Abbildung 24). Erst die Erhöhung auf 3,5 g oTR/l*d ließ die Methanausbeute unter 0,3 l CH₄/g oTR senken. Nachdem die Raumbelastung wieder auf 3 g oTR/l*d gesenkt wurde, lag die Methanausbeute meistens nur noch zwischen 0,3 und 0,35 l CH₄/g oTR. Die höchste Methanausbeute war am 76. Tag mit 0,51 l CH₄/g oTR bei einer Raumbelastung von 2,2 g oTR/l*d. Die Methanausbeute des thermophilen Gärversuchs war insgesamt höher die des mesophilen.

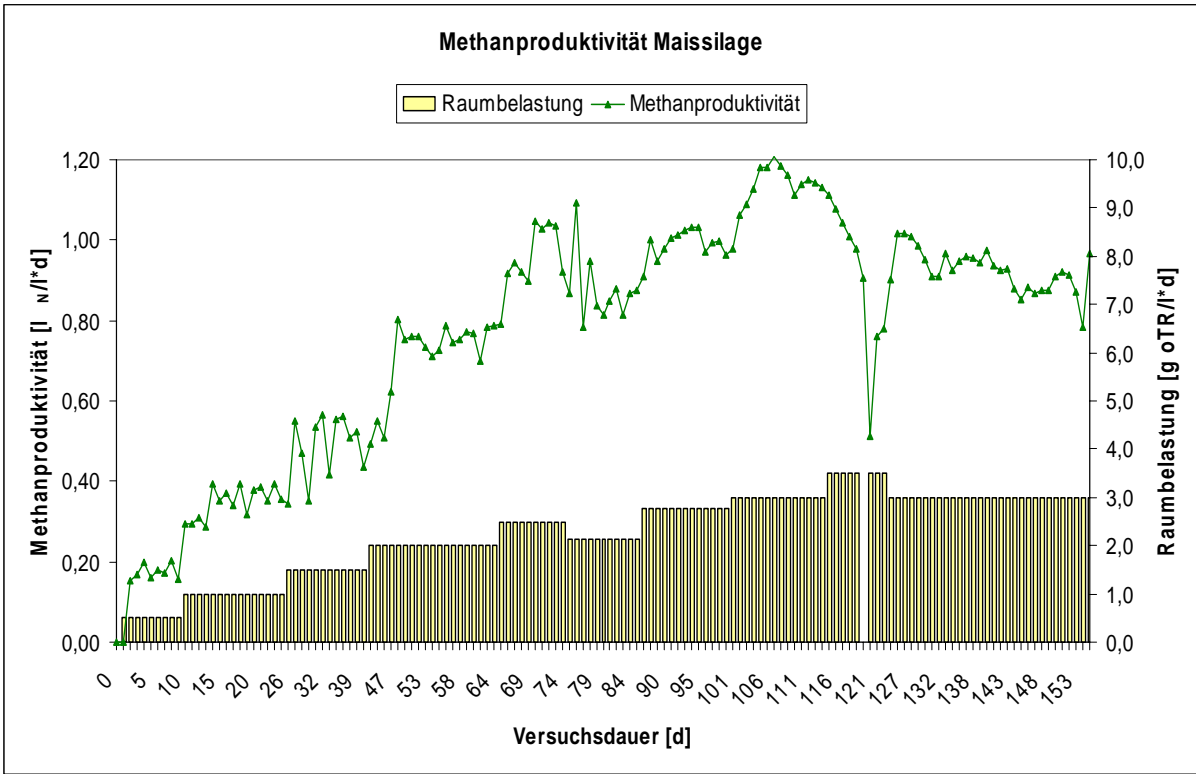


Abbildung 23: Methanproduktivität bei thermophiler Vergärung von Maissilage

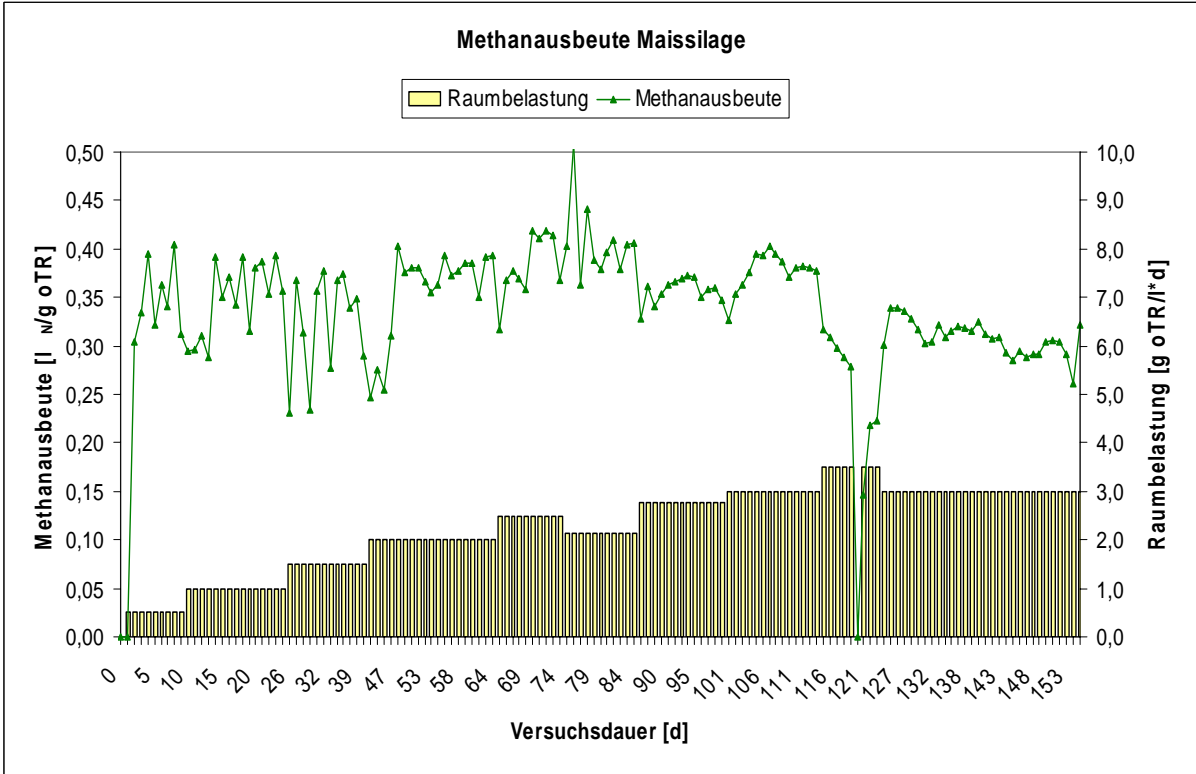


Abbildung 24: Methanausbeute von Maissilage bei thermophiler Vergärung

5.2.4.5 Kleegrassilage

Die Methanproduktivität stieg bei Erhöhung der Raumbelastung treppenstufig an. Ab der Raumbelastung von 2 g oTR/l*d sank die Produktivität, stieg aber nach der Unterbrechung der Substratzufuhr am 56. Tag wieder an und erreichte einen Höchstwert von 0,6 l CH₄/l*d am 59. Tag. Danach fiel die Produktivität aber stetig bis zu 0,16 l CH₄/l*d am 108. Tag. Ab dann lag die Methanproduktivität meistens zwischen 0,2 und 0,22 l CH₄/l*d. Bis zum Höchstwert war die Methanproduktivität der Kleegrassilage des thermophilen Gärversuchs dem des mesophilen bei gleicher Raumbelastung ähnlich hoch (Höchstwert 0,61 l CH₄/l*d bei einer Raumbelastung von 2 g oTR/l*d).

Bis zum 40. Tag lag die Methanausbeute meistens zwischen 0,36 und 0,4 l CH₄/g oTR. Ab der Erhöhung der Raumbelastung auf 2 g oTR/l*d sank die Ausbeute aber auf 0,19 l CH₄/g oTR vor der ersten Unterbrechung der Substratzufuhr. Danach stieg die Ausbeute wieder, blieb aber unter 0,3 l CH₄/g oTR. Wegen der vielen Unterbrechungen der Substratzugabe gab es ab den 92. Tag große Schwankungen in der Methanausbeute, die aber stetig kleiner wurden. Den höchste Methanausbeute war am 94. Tag mit 0,51 l CH₄/g oTR, nachdem die Substratzufuhr unterbrochen und mit der Raumbelastung von 0,5 g oTR/l*d wieder begonnen wurde.

Bei gleicher Raumbelastung war die Methanausbeute der Kleegrassilage des thermophilen Gärversuchs durchschnittlich höher als beim mesophilen.

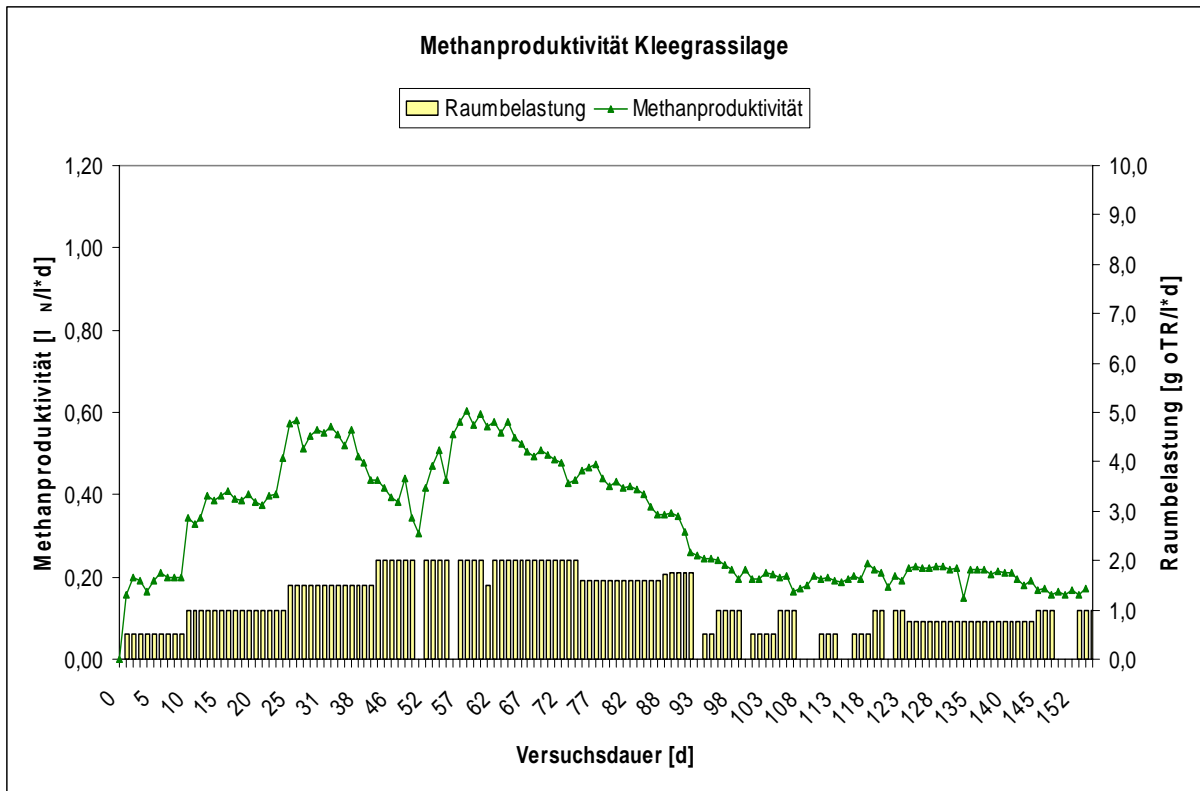


Abbildung 25: Methanproduktivität von Kleegrassilage bei thermophiler Betriebsweise

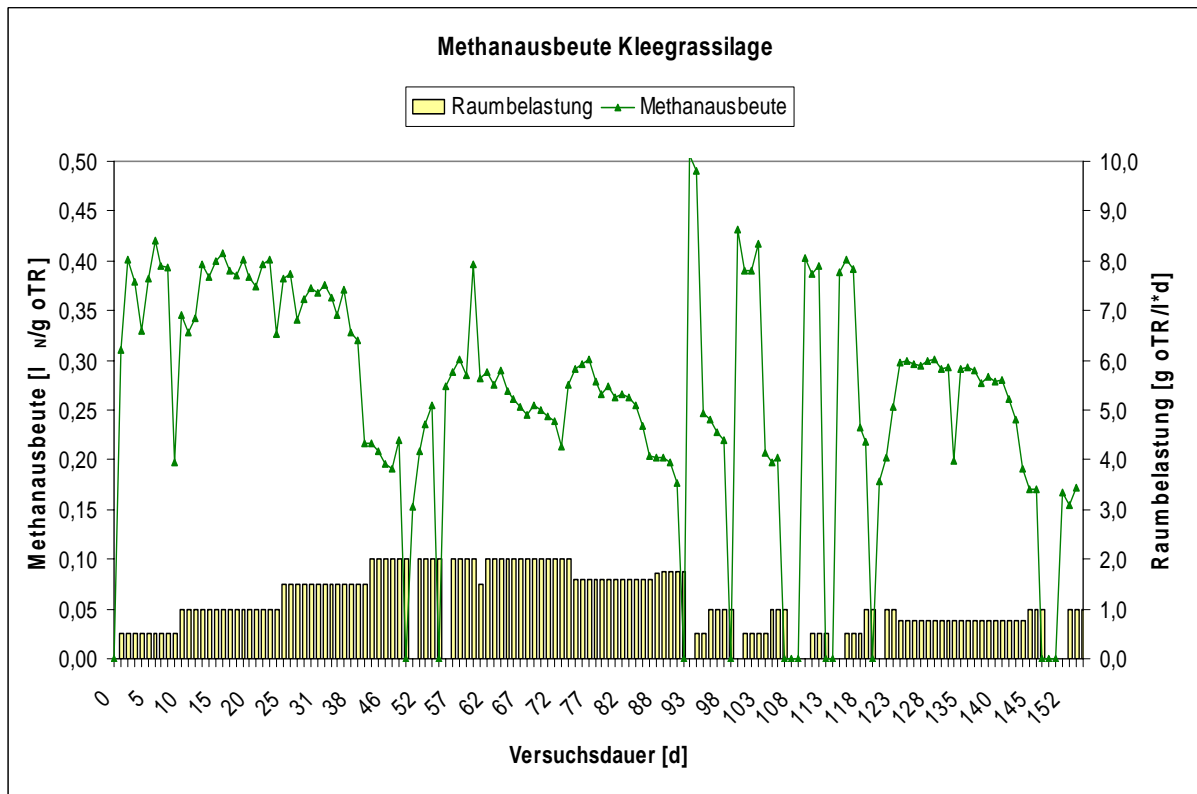


Abbildung 26: Methanausbeute von Kleegrassilage bei thermophiler Betriebsweise

5.3 Nukleinsäure-Extraktion aus Proben aus der Biogasbildung

Die Extraktion von Nukleinsäuren aus Probenmaterial, das aus Biogasreaktoren stammt, ist ein kritischer Schritt für alle sich anschließenden Analysen. Zum einen sollen die Zielorganismen effektiv aufgeschlossen werden, was bei den besonders widerstandsfähigen Zellwänden der Gram-positiven Clostridien nicht trivial ist, zum anderen darf die DNA nicht zu stark beschädigt werden. Zusätzlich sollen die Nukleinsäuren von möglichen Hemmstoffen, die die gewünschten Analysen negativ beeinflussen und verfälschen können, gereinigt werden ohne größere Mengen der Nukleinsäuren zu verlieren.

Um diesen Wünschen gerecht zu werden wurden 11 unterschiedliche Methoden zur Nukleinsäure-extraktion und –Reinigung an Klärschlammproben getestet. Diese Methoden sind im Material und Methoden Teil unter Punkt 4.7.1 genauer beschrieben.

Eine Beurteilung von Menge und Qualität der erhaltenen Nukleinsäuren erfolgte anhand des Erscheinungsbildes der gewonnen Extrakte im Agarosegel (Abbildung 27).

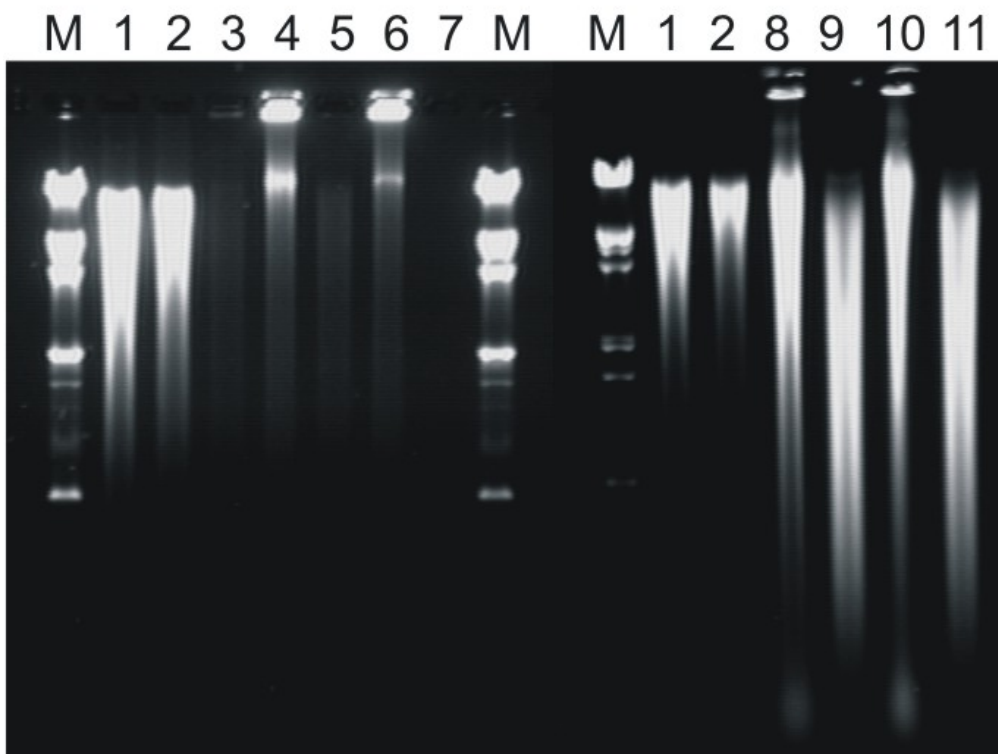


Abbildung 27: Agarosegel zur Beurteilung der unterschiedlichen Methoden der Nukleinsäureextraktion. M: Marker, die DNA-Extrakte wurden entsprechend der angewendeten Methode mit 1-11 gekennzeichnet.

Die Methoden zur Nukleinsäureextraktion unterschieden sich sowohl in der Menge der erhaltenen DNA, als auch in der Qualität. Für eine weitere Beurteilung kamen nur die Methoden 1, 2, 8, 9, 10 und 11 in betracht.

Um die Effizienz des Zellaufschlusses der Clostridien zu bewerten, wurden die DNA-Extrakte in zwei unterschiedliche Amplifikationen eingesetzt. Da das aufgearbeitete Probenmaterial in allen Fällen identisch war, gehen die Unterschiede in der gebildeten Produktmenge alleine auf die Qualität der angewendeten DNA-Extraktionsmethode zurück. Zum einen wurden die 16S rRNA-Gene einer Gruppe von Clostridien vervielfältigt, die nachweislich in Proben fäkalen Ursprungs enthalten sind und somit auch in der hier untersuchten Probe sein sollten. Zum anderen wurde die DNA der Clostridien des Cluster I, die im Focus der weiteren Untersuchungen stehen, amplifiziert.

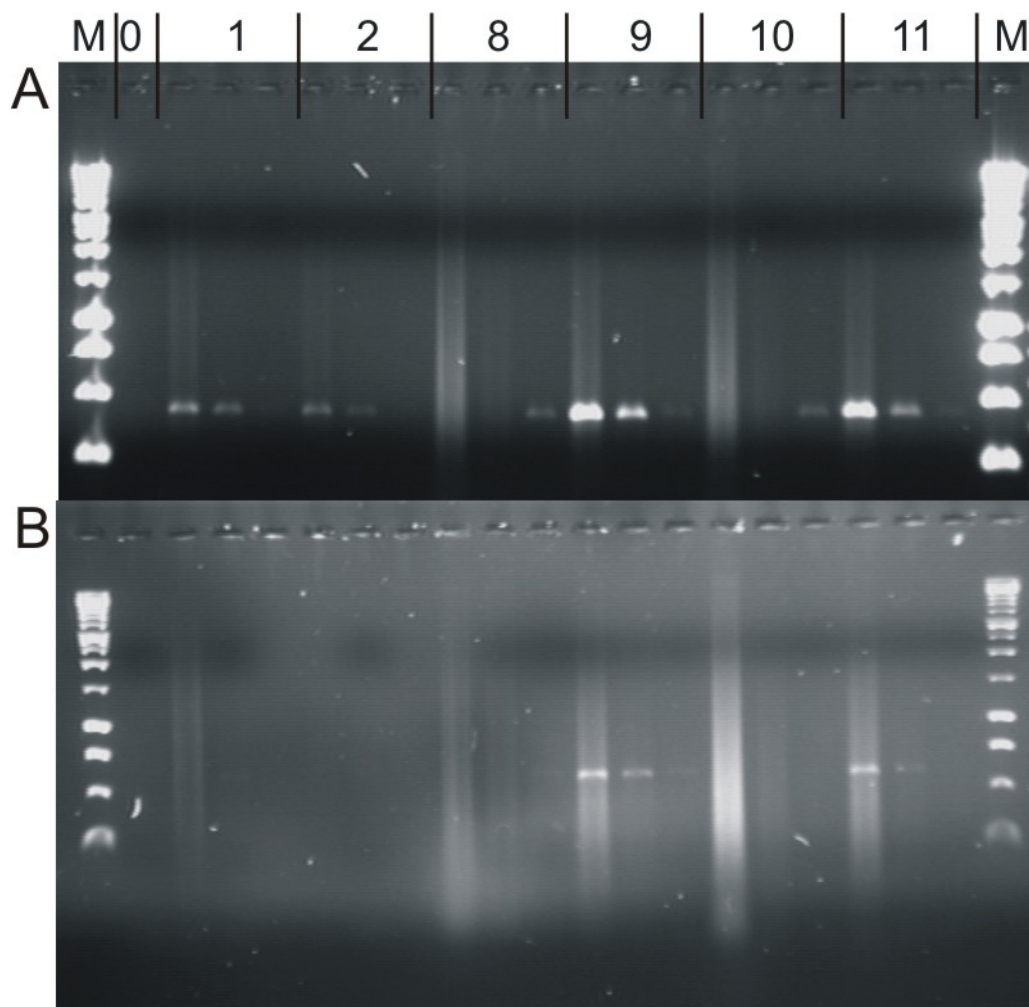


Abbildung 28: PCR-Amplifikation von Clostridien. A: Clostridien, die in Fäkalien gefunden wurden. B: Clostridien des Cluster I. Numerische Bezeichnung der Proben entsprechend der Methode zur DNA-Extraktion, DNA jeweils unverdünnt, 1/10 und 1/100 eingesetzt. 0: Negativkontrolle der PCR, M: Marker

Die Ergebnisse beider PCRs deuten daraufhin das die Extraktionsmethoden 9 und 11 am besten geeignet sind (Abbildung 28). Mit beiden Methoden wurde ein DNA-Extrakt gewonnen, aus dem die gewünschten Bakterien bereits aus der unverdünnten Nukleinsäurelösung amplifiziert werden konnten. Dies ist beim Nachweis von nur schwach repräsentierten Organismen, wie es im Folgenden gewünscht ist, besonders wichtig. Das die aus Methode 9 gewonnene DNA-Lösung in der 1/10-Verdünnung ein etwas stärkeres Produkt liefert als die der Methode 11, deutet auf eine geringfügig höher konzentrierte, oder besser gereinigte DNA-Lösung hin. So wurde im Folgenden, die Methode Nummer 9 zur Gewinnung alle weiteren DNA-Extrakte eingesetzt.

Eine quantitative Beurteilung der mit Methode Nummer 9 gewonnen Nukleinsäureextrakte aus dem mesophilen Verlauf der Biogasbildung aus Rindergülle ergab Lösungen mit einer Konzentration von ~ 1300 ng DNA / μ l. Bei einer Extraktionseffizienz von 60% entspricht dies einem DNA-Gehalt des Gärgutes von $\sim 5,5$ μ g/g (Feuchtgewicht) und bezogen auf das gewaschene und aufgearbeitete Zellpellet einem DNA-Gehalt von ~ 460 μ g/g Pellet (Feuchtgewicht).

5.4 Vielfalt und Veränderlichkeit der dominanten Bakterien

Die Bakterienvielfalt wurde anhand von SSCP-Profilen dargestellt. In diesen Profilen sind die dominanten Vertreter der bakteriellen Gemeinschaft so dargestellt, dass jede Art durch eine Bande in einem vertikalen Profil repräsentiert wird. Vertikale Profile, die die Gemeinschaften zu unterschiedlichen Zeiten zeigen sind nebeneinander angeordnet, so dass eine Betrachtung in Abhängigkeit der Zeit erfolgen kann. Die Gele sind links und rechts von einem internen Marker flankiert.

Zu Beginn der Biogasproduktion waren die bakteriellen Gemeinschaften in allen fünf Reaktoren von den Bakterien dominiert, die mit dem Klärschlamm eingebracht wurden. Im Verlaufe der Fermentation von je einem Substrat bildeten sich in jedem Reaktor substratspezifische bakterielle Gemeinschaften aus, die jedoch nicht zwangsläufig den Gemeinschaften in den jeweiligen Substraten vor der Fermentation entsprachen. In den Reaktoren mit einer stabilen Biogasproduktion blieben diese substratspezifischen Gemeinschaften bis zum Ende der Fermentation stabil (Rindergülle, Schweinegülle und Maissilage). In den Reaktoren, wo sich während der Fermentation Probleme in der Biogasproduktion abzeichneten, konnten sich keine stabilen Gemeinschaften entwickeln (Hühnertrockenkot und Kleegrassilage).

5.4.1 Rindergülle

Während der Biogasbildung aus Rindergülle (Abbildung 29) wurde die bakterielle Gemeinschaft die ersten 28 Tage durch die Bakterien dominiert, die mit dem Klärschlamm eingebracht wurden. Fünf Banden bzw. Gruppen von Banden charakterisieren diese ersten Profile. Ab dem 70.-ten Tag stellte sich dann eine durch das zugefügte Substrat charakterisierte Gemeinschaft ein. Die zuvor dominanten Banden waren nicht mehr vorherrschend und die neue Gemeinschaft wurde durch vier andere Banden dominiert. Diese Gemeinschaft blieb auch bei Erhöhung der Belastungsstufe stabil.

Rindergülle

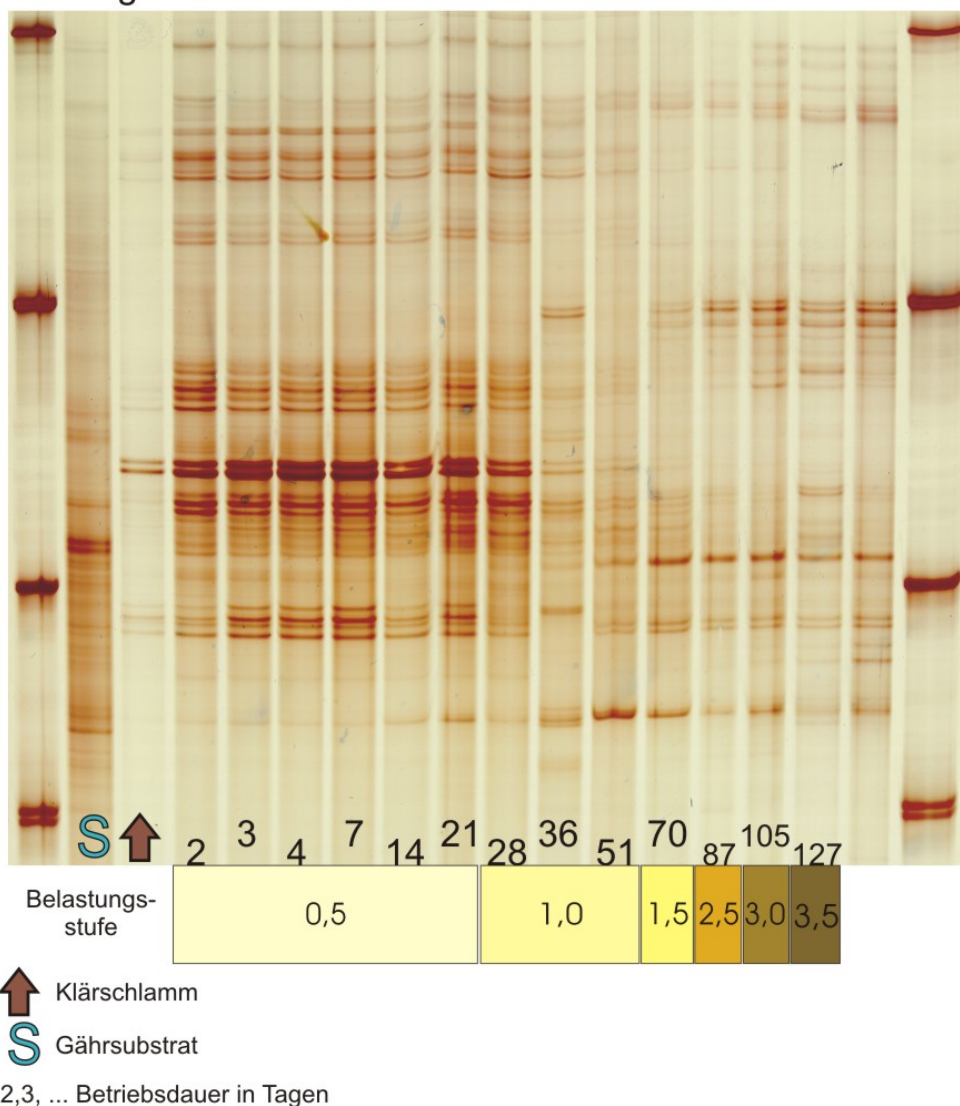


Abbildung 29: SSCP-Profil zur Darstellung der Bakterienvielfalt im Verlauf der Biogasbildung aus Rindergülle.

5.4.2 Schweinegülle

Auch bei der Biogasbildung aus Schweinegülle (Abbildung 30) wurde die bakterielle Gemeinschaft die ersten 28 Tage durch die Bakterien dominiert, die mit dem Klärschlamm eingebracht wurden. Ab dem 51.-ten Tag stellte sich dann eine durch das zugefügte Substrat charakterisierte Gemeinschaft ein. Diese Gemeinschaft wurde durch Organismen dominiert, die zuvor nicht oder nur schwach im Reaktor vertreten waren. Viele dieser Banden waren auch schon in der Schweinegülle vorhanden. Charakteristisch war eine Bande, die mit fortdauernder Gärung und zunehmender Belastungsstufe intensiver wurde und im Substrat nur schwach vorhanden war.

Schweinegülle

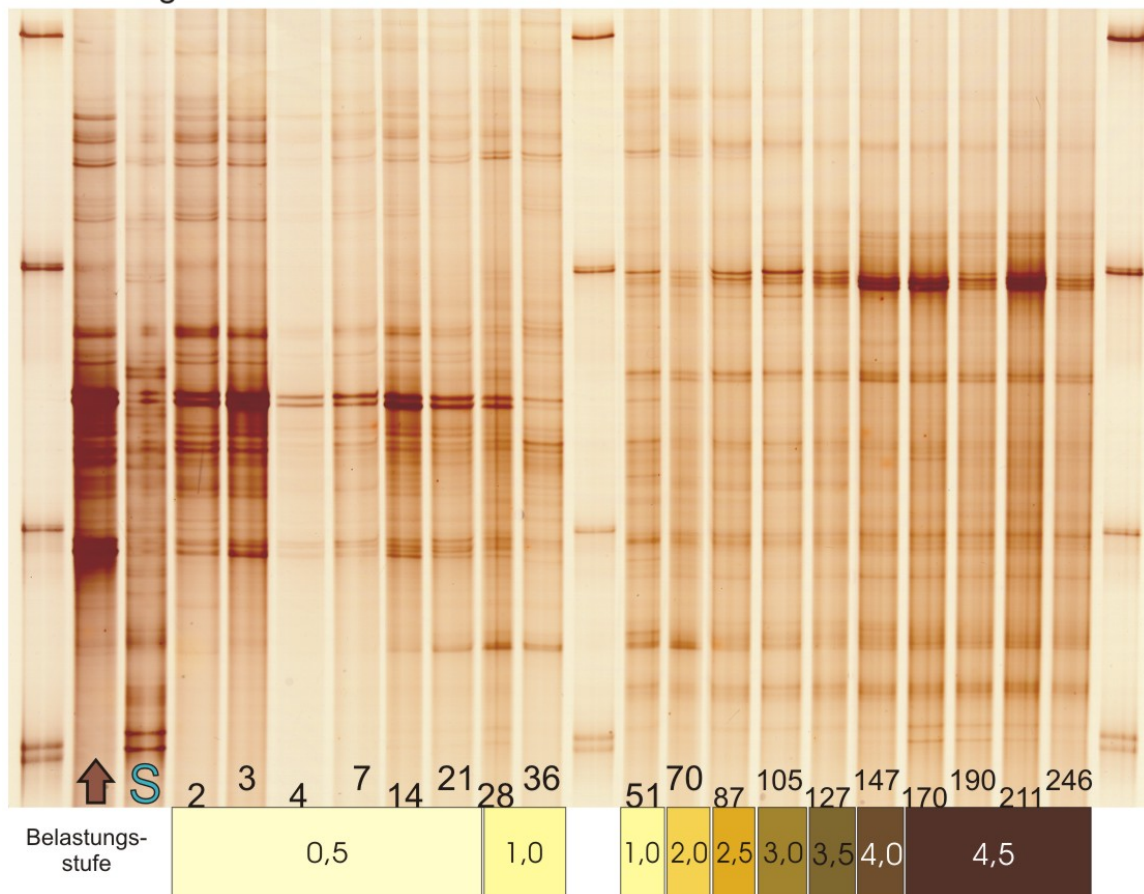


Abbildung 30: Verlauf der Bakterienvielfalt während der Biogasbildung aus Schweinegülle. SSCP-Profile. Legende: siehe Abbildung 29.

5.4.3 Hühnertrockenkot

Die Biogasbildung aus Hühnertrockenkot verlief nicht stetig da es zwischenzeitlich im Fermenter zu einer Anreicherung von Ammonium bis zu toxisch wirkenden Konzentrationen kam, so dass die Substratzugabe variiert und z. T. auch unterbrochen werden musste. Diese unstete Effizienz der Biogasbildung (siehe 5.2.4.3) spiegelte sich auch in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft wieder. Die Gemeinschaft war zunächst durch die Bakterien aus dem Klärschlamm dominiert und veränderte sich nach ca. 30 Tagen (Abbildung 31). Im Vergleich zu den vorherigen Substraten stellte sich jedoch im weiteren Verlauf der Biogasbildung keine stabile Gemeinschaft ein. Erst mit der Wiederaufnahme der Substratzugabe nach einer Periode ohne Substratzufuhr deutete sich eine Konstanz der vorhandenen bakteriellen Gemeinschaft an.

Hühnertrockenkot

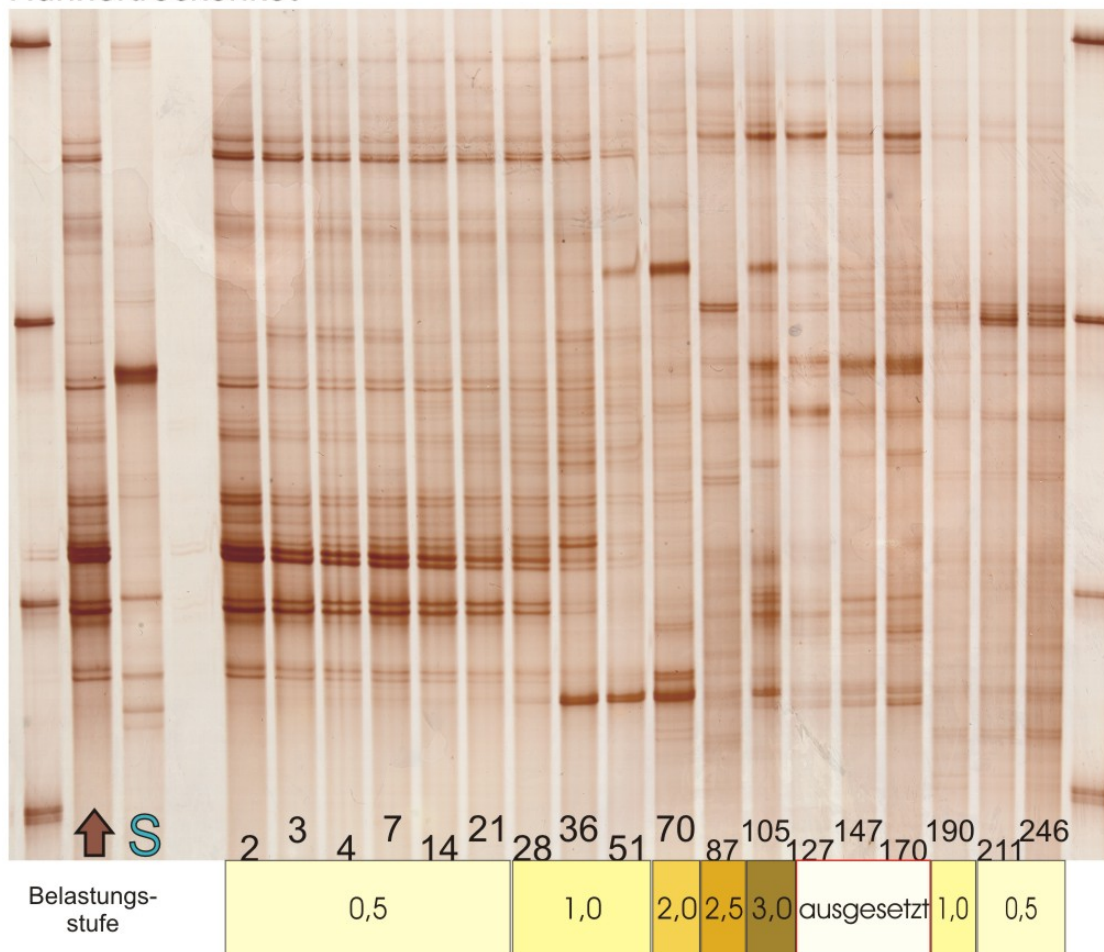


Abbildung 31: Darstellung der Bakterienvielfalt während der Umsetzung von Hühnertrockenkot. Legende: siehe Abbildung 29.

5.4.4 Maissilage

Die ersten 30 Tage nach Start der Biogasbildung aus Maissilage dominierten die im Klärschlamm enthaltenen Bakterien die Gemeinschaft (Abbildung 32). Viele der zu Beginn dominanten Banden blieben auch im weiteren Verlauf der Fermentation in den Profilen erhalten, jedoch in abgeschwächter Intensität. Einzelne Banden wurden sogar intensiver. Mit der Ausnahme wenige Banden, fanden sich dieselben Banden in allen Proben des untersuchten Zeitraumes, wobei sich die Verhältnisse der Bandenintensitäten zueinander änderten. Die im Substrat vorherrschenden Banden dominierten die Profile zu keiner Zeit.

Obwohl die Methanproduktion nicht stetig verlief und die Belastungsstufen zweimal reduziert werden mussten (5.1.4.4), war die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft relativ stabil.

Maissilage

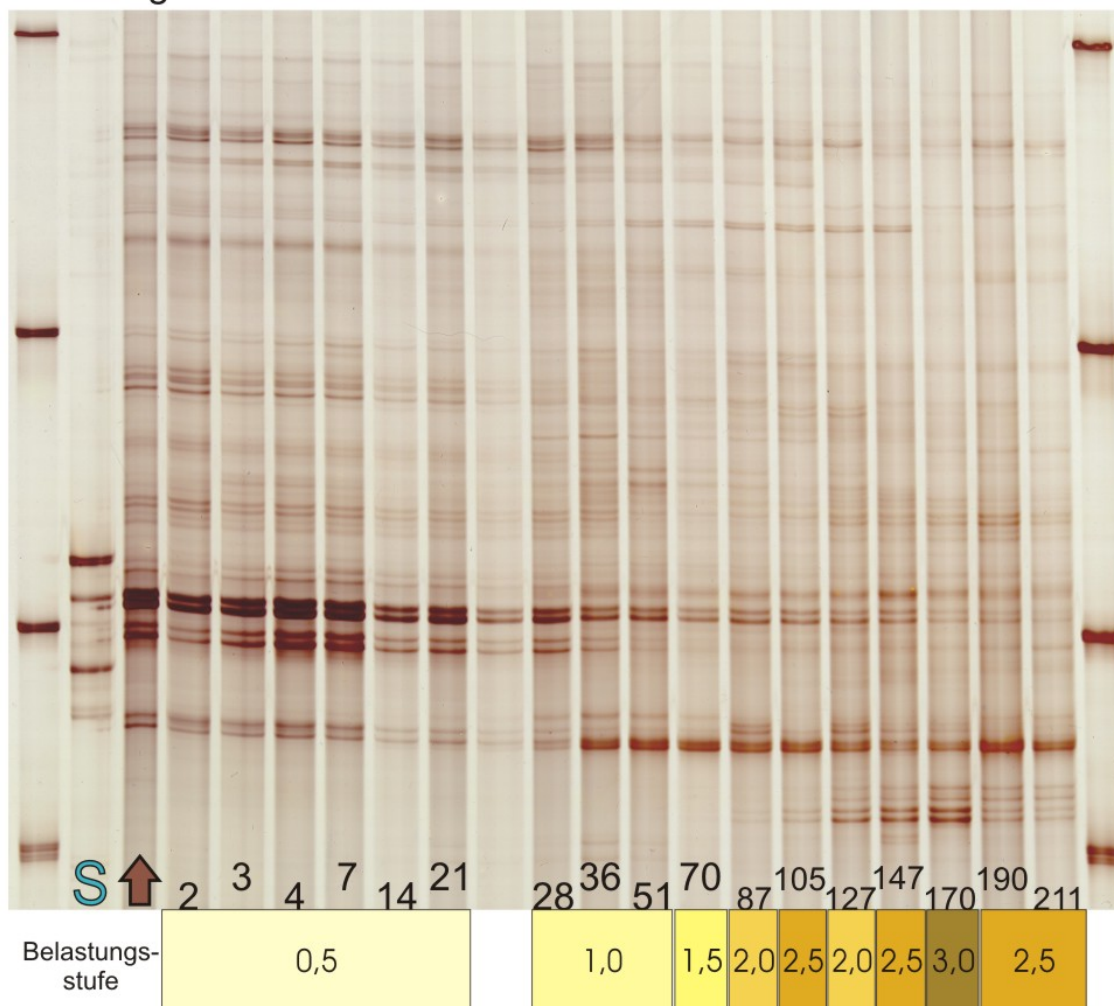


Abbildung 32: SSCP-Profil zur Darstellung der Bakterienvielfalt im Verlauf der Biogasbildung aus Maissilage. Legende: siehe Abbildung 29.

5.4.5 Kleegrassilage

Die ersten 71 Tage war die bakterielle Gemeinschaft durch die des ursprünglich vorhandenen Klärschlammes geprägt. Im weiteren Reaktorverlauf verändert sich ihre Zusammensetzung kontinuierlich, wobei viele der am Anfang dominanten Banden immer schwächer wurden. Viele Banden waren im weiteren Reaktorverlauf konstant vorhanden, doch waren die Verhältnisse der einzelnen Banden in den Profilen zueinander nicht starr. Die das Substrat dominierenden Banden fanden sich in keiner der aus dem Reaktor entnommenen Proben wieder. Die am Ende der Substratzugabe vorhandene Gemeinschaft blieb auch in der Phase der Nachgärung weitere 67 Tage stabil.

Kleegrassilage

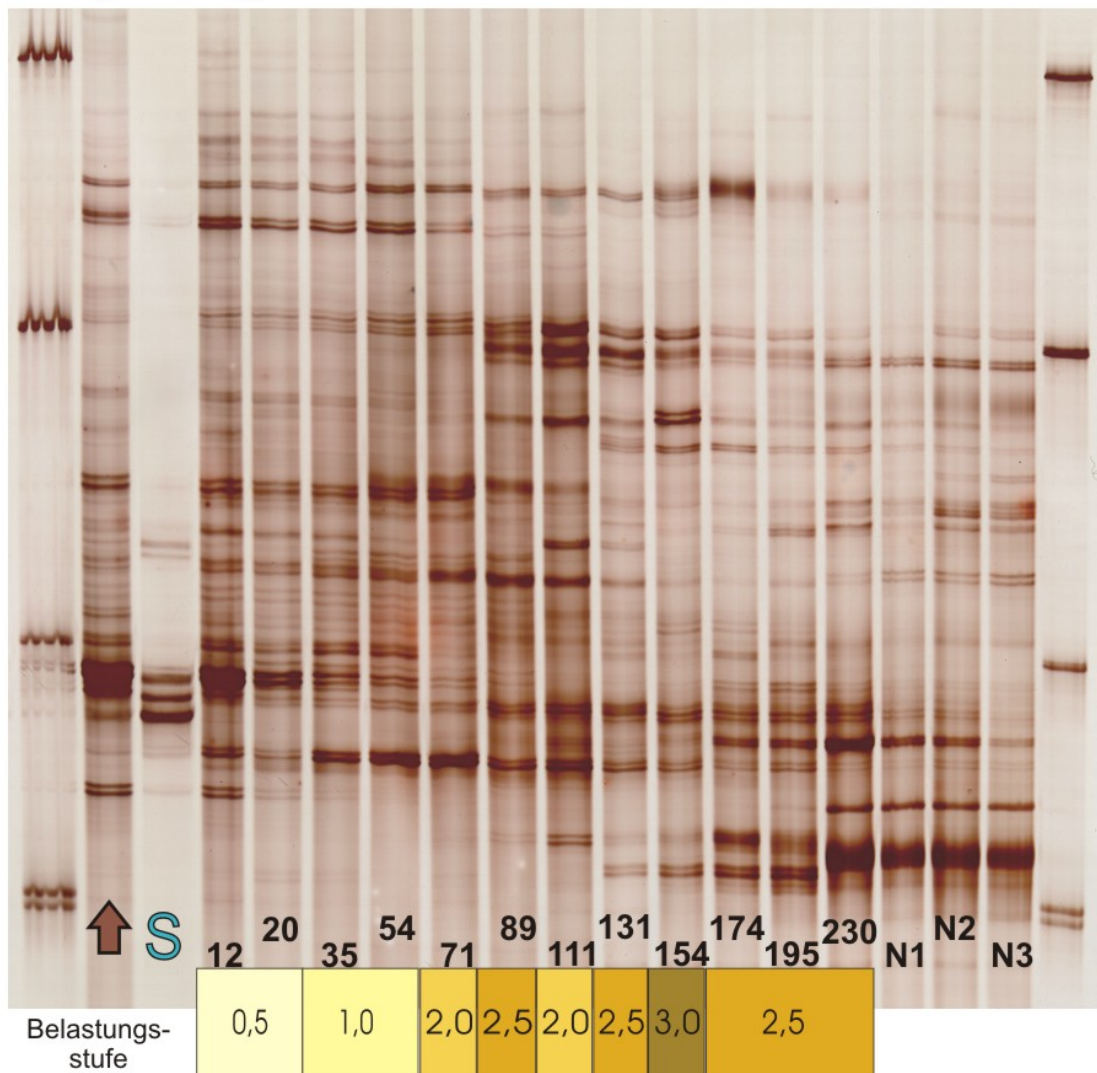


Abbildung 33: Die Vielfalt der Bakterien während der Biogasbildung aus Kleegrassilage. Legende: siehe Abbildung 29. N1, N2 und N3 bezeichnen Proben, die in der Phase der Nachgärung entnommen wurden, respektive 14, 27, und 67 Tage nach der letzten Substratzugabe.

5.5 Die Diversität der Clostridien des Cluster I im mesophilen Verlauf

Von einem anfänglich angewendeten Ansatz zur Darstellung der Clostridien des Cluster I anhand eines ~250 Basen langen Fragmentes wurde im Weiteren abgesehen, da die relativ kurze Sequenzinformation nur eine ungenaue Identifizierung der beteiligten Organismen zulässt.

Zur Darstellung der Diversität der Clostridien des Cluster I wurden die SSCP-Bedingungen so modifiziert, dass Fragmente von ~670 Basen Länge aufgetrennt werden können.

Die Diversität der Clostridien wurde exemplarisch in den mit Rindergülle bzw. Schweinegülle betriebenen Biogasreaktoren untersucht.

Auch die Zusammensetzung der Gemeinschaften der Clostridien war zu Beginn der Biogasproduktion von den Clostridien dominiert, die mit dem Klärschlamm eingebracht wurden. Zum Zeitpunkt an dem sich der Einfluss des Gärsubstrates auf die bakteriellen Gemeinschaften zeigte, ließ sich auch ein Einfluss auf die Gemeinschaft der Clostridien erkennen. Die am Anfang große Vielfalt an Banden reduzierte sich im zeitlichen Verlauf auf wenige dominante Banden.

Bei der Vervielfältigung der clostridialen rRNA Gene war auffällig, dass sich aus den Nukleinsäureextrakten, aus denen sich die Gesamtheit der bakteriellen rRNA Gene problemlos in große Mengen vervielfältigen lässt, nur relativ geringe Mengen des spezifischeren Produktes erzielen ließen.

5.5.1 Schweinegülle

Die Gemeinschaft der Clostridien in dem Schweinegülle umsetzenden Biogasreaktor war die ersten 14 Tage durch drei Banden dominiert, die aus dem Klärschlamm stammten. Zwei dieser Banden traten ab dem 21.-ten Tag nicht mehr auf, wobei die verbleibende Bande den weiteren Reaktorverlauf dominierte. Ab dem 51.-ten Tag kamen dann eine weitere dominante Bande und einige weniger intensive Banden hinzu.

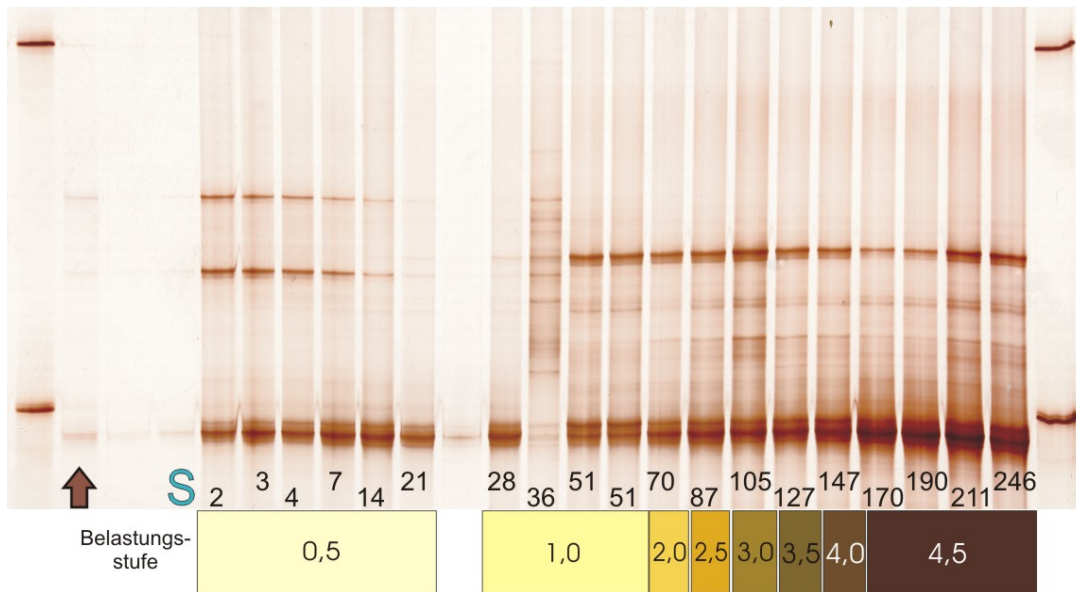


Abbildung 34: Vielfalt der Clostridien im Verlauf der Biogasbildung aus Schweinegülle. Legende: siehe Abbildung 29.

5.5.2 Rindergülle

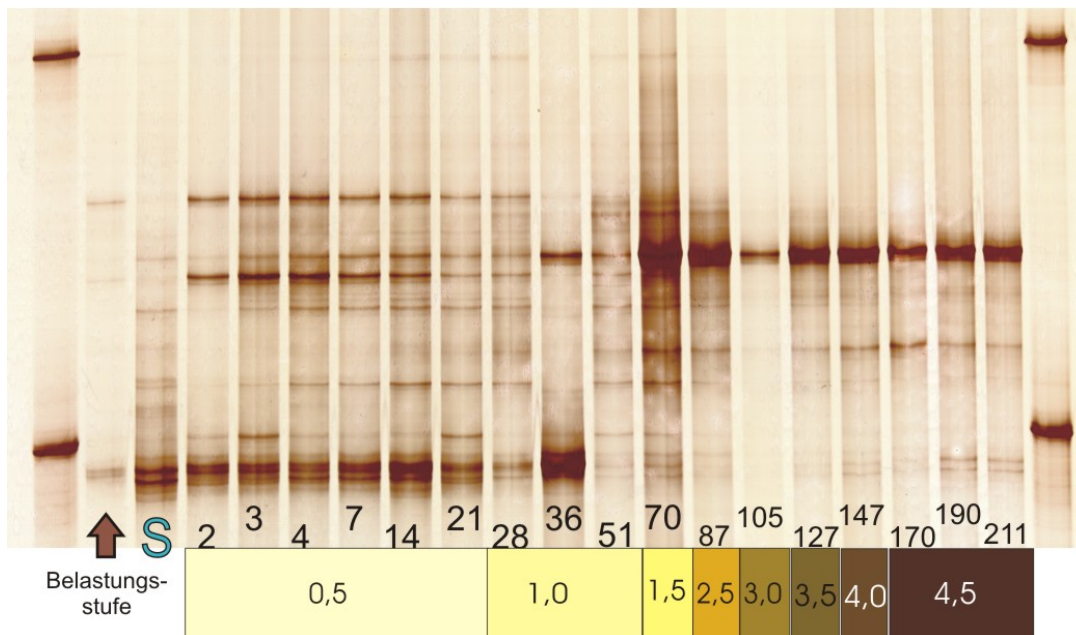


Abbildung 35: Die Gemeinschaft der Clostridien im Verlauf der Biogasbildung aus Rindergülle. Legende: siehe Abbildung 29.

Um die Vergleichbarkeit innerhalb der Proben einer Zeitreihe zu verbessern wurde in jeder Spur dieselbe DNA-Menge aufgetrennt.

Die ersten 14 Tage dominierten 3 intensive Banden die Profile, die von ca. 8 schwächeren Banden begleitet wurden. Im weiteren Verlauf blieb die stärkste aller Ausgangsbanden bis

zum Ende erhalten, ab dem 51.-sten Tag jedoch nur noch als relativ schwache Bande. Von da an dominierte eine der ursprünglich schwächeren Banden die Profile. Eine dritte, anfänglich nicht vorhandene Bande etablierte sich ab dem 28.-ten Tag in den Profilen.

5.6 Charakterisierung der Clostridien der mesophilen Biogasbildung

Der Vergleich der beiden SSCP-Gele, die die Diversität der Clostridien darstellen, deutet an, dass beide Reaktoren am Anfang von denselben, später durch unterschiedliche Organismen dominiert wurden. Zur Überprüfung der Spezifität des angewendeten PCR-Systems zur selektiven Vervielfältigung von Cluster I Clostridien-DNA und zur Identifizierung der an der Biogasbildung beteiligten Clostridien wurden einzelne Banden ausgewählt (Abbildung 36) und sequenziert.

5.6.1 Rinder- und Schweinegülle

Die in Abbildung 36 benannten Banden wurden zur Sequenzierung ausgewählt, da sie charakteristisch für die einzelnen Phasen der Biogasbildung waren.

Die Auswertung von 36 clonierten DNA-Sequenzen zeigte, dass alle Sequenzen hohe Ähnlichkeiten zu Clostridien aufwiesen, und der Klasse *Clostridia* zugeordnet wurden. Drei der Sequenzen gehören offenbar nicht dem Cluster I an, wenngleich sie hohe Ähnlichkeiten zu anderen Gattungen innerhalb der Klasse *Clostridia* aufwiesen (Abbildung 45, Seite 101).

Eine Betrachtung des Verwandtschaftsgrades der erhaltenen Sequenzen gegenüber den 16S rDNA Sequenzen der unterschiedlichen *C. botulinum* Gruppen schloss eine Zuordnung der untersuchten Sequenzen zu diesen Gruppen aus (Abbildung 37). Zudem wies keine der betrachteten Sequenzen Ähnlichkeiten zu den pathogenen Arten *Clostridium tetani* und *Clostridium perfringens* auf.

Die Sequenzierung hat bestätigt, dass Banden, die sowohl in der Rindergülle, als auch in der Schweinegülle vorkamen auf dieselben Organismen zurückgehen (Tabelle 28). Die Banden 3 und 10 sowie 1 und 11 ließen sich auf jeweils dieselbe Sequenz zurückführen. Zusätzlich waren diese beiden Sequenzen sehr ähnlich zueinander, sodass sie wahrscheinlich von zwei sehr nah verwandten Arten herrührten, oder von zwei Operonen einer Art. Die nächst ähnlichsten Sequenzen wurden in einem Schlamm gefunden, der mesophilen und anaeroben Bedingungen unterlag. Bei der Biogasbildung aus Rinder- und aus Schweinegülle

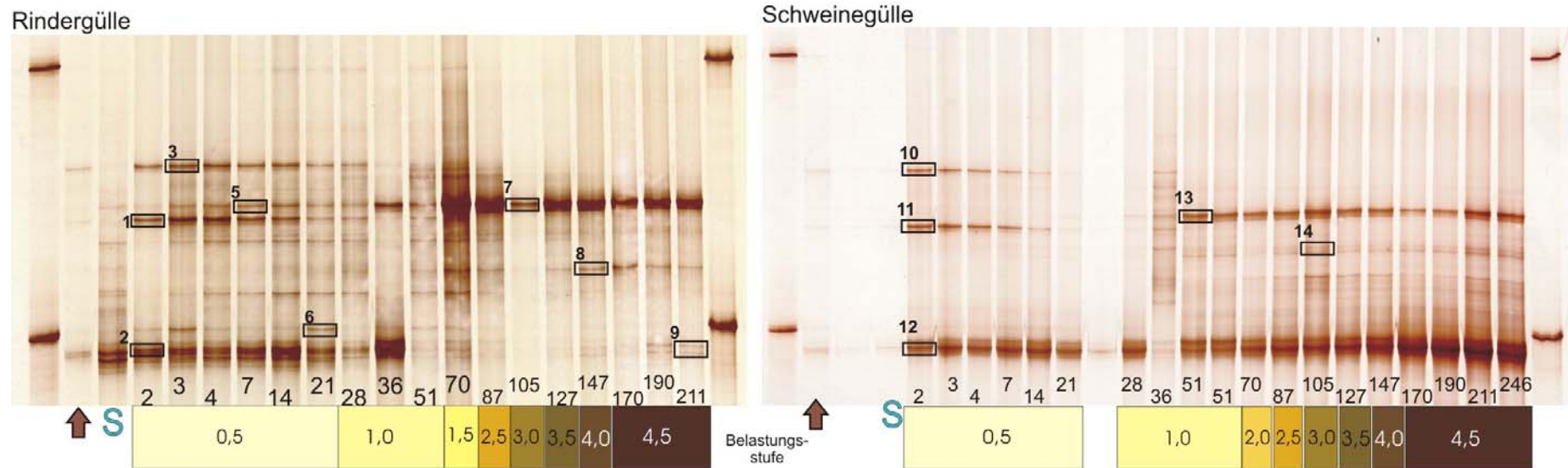


Abbildung 36: Markierung der SSCP-Banden, die zur Identifizierung ausgewählt wurden

Tabelle 28: Zuordnung der untersuchten Sequenzen

Bande	Clon	Ähnlichkeit (Anzahl identischer Nukleotide an Gesamtnukleotiden)	Nächste verwandte Sequenz,	Sequenznummer	Ursprung der Sequenz
3 und 10	10c	98% (615/626)	Unkultiviertes Bakterium,	AB267031	Mesophiler anaerober Schlamm
1 und 11	01a	98% (617/626)	Unkultiviertes Bakterium,	AB267031	Mesophiler anaerober Schlamm
5, 7 und 13	07c	100% (628/628)	Unkultiviertes Bakterium,	AJ853594	Abfluss einer Deponie
2 und 9	09b	97% (611/624)	Unkultiviertes Bakterium,	DQ327513	Menschlicher Stuhl
6	06a	98% (614/624)	<i>Clostridium paraputrificum</i> ,	AY442815	Känguru Magen
8	08c	99% (625/628)	Unkultiviertes Bakterium,	AJ853594	Abfluss einer Deponie
12	12a	99% (619/623)	Unkultiviertes Bakterium,	EF532779	Bioaerosole aus einem Schweinestall
14	14c	97% (606/624)	Unkultiviertes Bakterium,	DQ800364	Menschlicher Stuhl

war diese Sequenz in der Anfangsphase der Biogasbildung dominierend jedoch spätestens ab dem 38.-ten Tag war sie in beiden Gelen nicht mehr detektierbar.

Auch die Banden 5, 7 und 13 gingen auf dieselbe Sequenz zurück, die die beiden Biogasreaktoren in der stabilen Phase dominierten. Ferner wurde die Bande 8 auch derselben Sequenz zugeordnet, deren nächst ähnlichste Sequenz aus dem Abfluss einer Deponie gewonnen wurde. Aus den Banden 2 und 9 konnte jeweils dieselbe Sequenz gewonnen werden, die 97% Ähnlichkeit zu einer Sequenz aus menschlichem Stuhl aufweist. Im Verlauf der Biogasbildung aus Rindergülle war diese Sequenz in den SSCP-Profilen der Anfangsphase dominant repräsentiert, in der Endphase jedoch deutlich abgeschwächt.

Der die stabile Phase der Biogasbildung aus Schweinegülle dominierenden Bande 12 wurde einer Sequenz zugeordnet, die eine Ähnlichkeit von 99% zu einer Sequenz aufwies, die in Aerosolen eines Schweinestalles gefunden wurde.

Die beiden verbleibenden Banden 6 und 14 wiesen auch Sequenzen mit hohen Ähnlichkeiten zu Sequenzen auf, die aus menschlichen Stuhlproben gewonnen wurden: die der Bande 6, die nur in einzelnen Proben aus der Anfangsphase der Biogasbildung aus Rindergülle detektiert wurde, entsprach zu 98% der von *C. paraputrificum*. Und die aus Bande 14, einer Bande, die sich in der stabilen Phase der Biogasbildung aus Schweinegülle mit schwacher bis mittlerer Intensität etablierte, einem bis lang unkultivierten Bakterium.

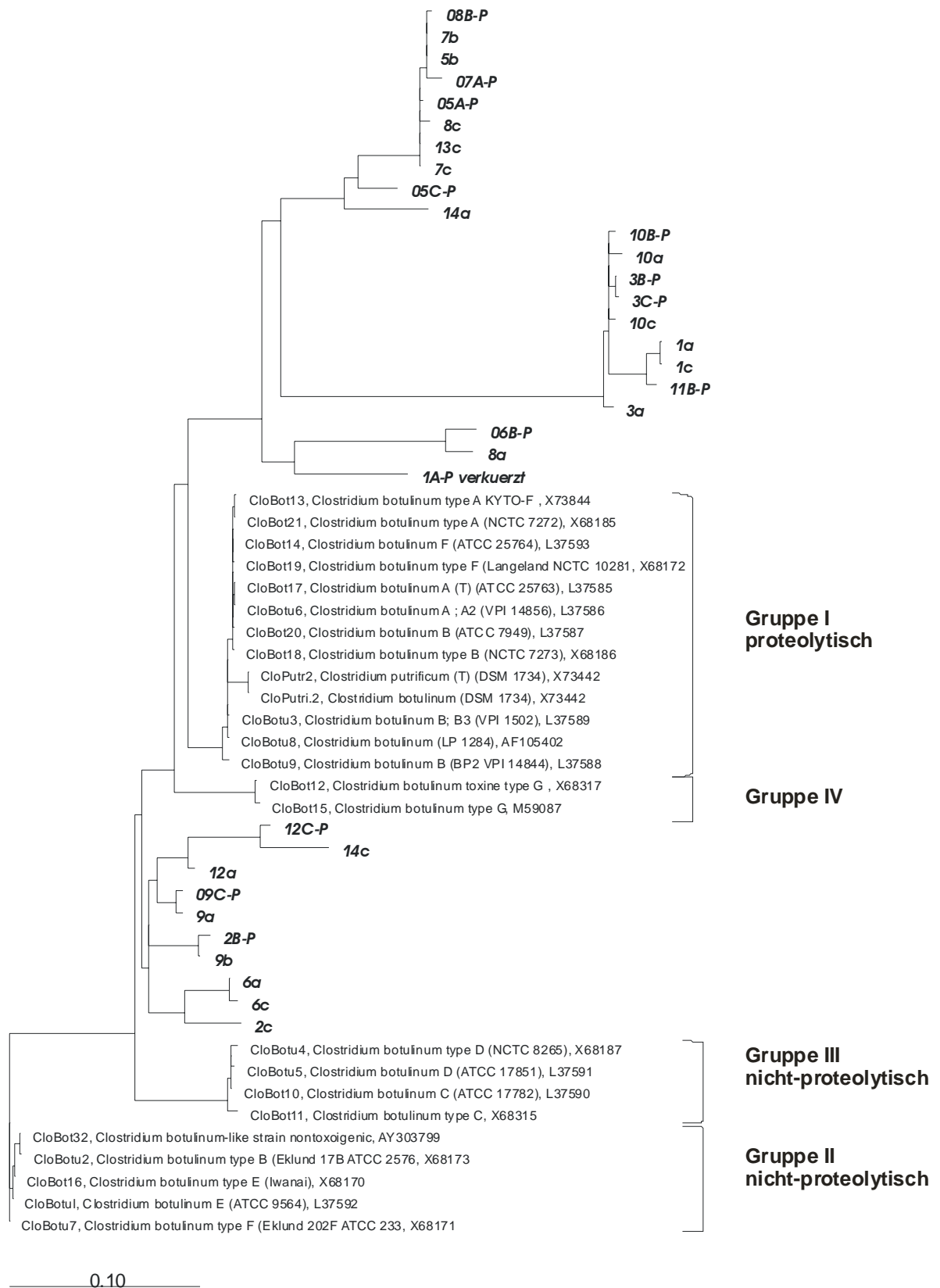


Abbildung 37: Phylogenetische Einordnung der in den Proben ermittelten 16S rRNA Genesequenzen, basierender Maximum Likelihood Baum zur Darstellung der Verwandtschaft gegenüber *C. botulinum*

5.7 Die Bakterienvielfalt in den thermophilen Biogasreaktoren

Wie im mesophil betriebenen Prozess der Biogasbildung waren auch die Bakteriengemeinschaften im thermophil betriebenen Prozess anfangs durch die Bakteriengemeinschaften dominiert die mit dem Klärschlamm in die Reaktoren eingebracht wurden. Die Gemeinschaft der Bakterien im Klärschlamm der zur Animpfung des thermophilen Prozesses genutzt wurde unterschied sich jedoch von der des zur Animpfung des mesophilen Prozesses genutzten Klärschlammes. Auch die sich im Verlauf der Fermentation ausbildenden substratspezifische Gemeinschaften unterschieden sich von denen der mesophilen Prozessführung. Die Profile wurden von Banden dominiert, die größtenteils aus dem Klärschlamm stammten. Dabei konnten die die Substrate dominierenden Banden in den Profilen der Gemeinschaften aus dem Fermentationsprozess nicht wieder gefunden werden. Die Zusammensetzung dieser Gemeinschaften stabilisierte sich weitestgehend im Prozessverlauf da die dominanten Banden über den gesamten Versuchszeitraum stabil blieben jedoch Schwankungen in der Intensität schwächerer Banden vorkamen. Diese geringe Variabilität der Bakteriengemeinschaften ging einher mit einer Biogasproduktion, die immer wieder eine gute Effizienz von mindestens 50 % Methan in der Gasphase nicht aufweisen konnte (5.2.1).

5.7.1 Rindergülle

Die ersten 28 Tage der Biogasbildung aus Rindergülle war die Bakteriengemeinschaft durch die Bakterien geprägt die mit dem Klärschlamm in den Reaktor eingebracht wurden (Abbildung 38). Die entsprechenden Profile der Gemeinschaften waren von vier Banden dominiert, von denen im weiteren zeitlichen Verlauf nur eine Bande erhalten blieb und an Intensität zunahm. Ab dem 63.-sten Tag waren die Profile von zwei Banden dominiert: der zuvor beschriebenen und einer weiteren Bande, die auch schon in geringerer Intensität im frühen Verlauf der Biogasproduktion (Tag 7) vorhanden war, im zeitlichen Verlauf jedoch deutlich an Intensität dazugewann. Diese dominanten Banden wurden von zahlreichen schwächeren Banden begleitet, deren Intensitäten jedoch im zeitlichen Verlauf nicht beständig waren. Diese Variabilität in der Gemeinschaft ging einher mit einer gewissen Empfindlichkeit gegenüber einer Erhöhung der zugefügten Substratmenge über einen Wert von 2,0 g oTR/l*d. Wurde die Substratzugabe über diese Menge gesteigert, so sank die Methankonzentration in der Gasphase bei einem gleichzeitigen Anstieg der H₂S-Konzentration bis über Werte hinaus die toxisch für die Methanbakterien waren und so eine endgültige Stabilisierung der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft verhinderten.

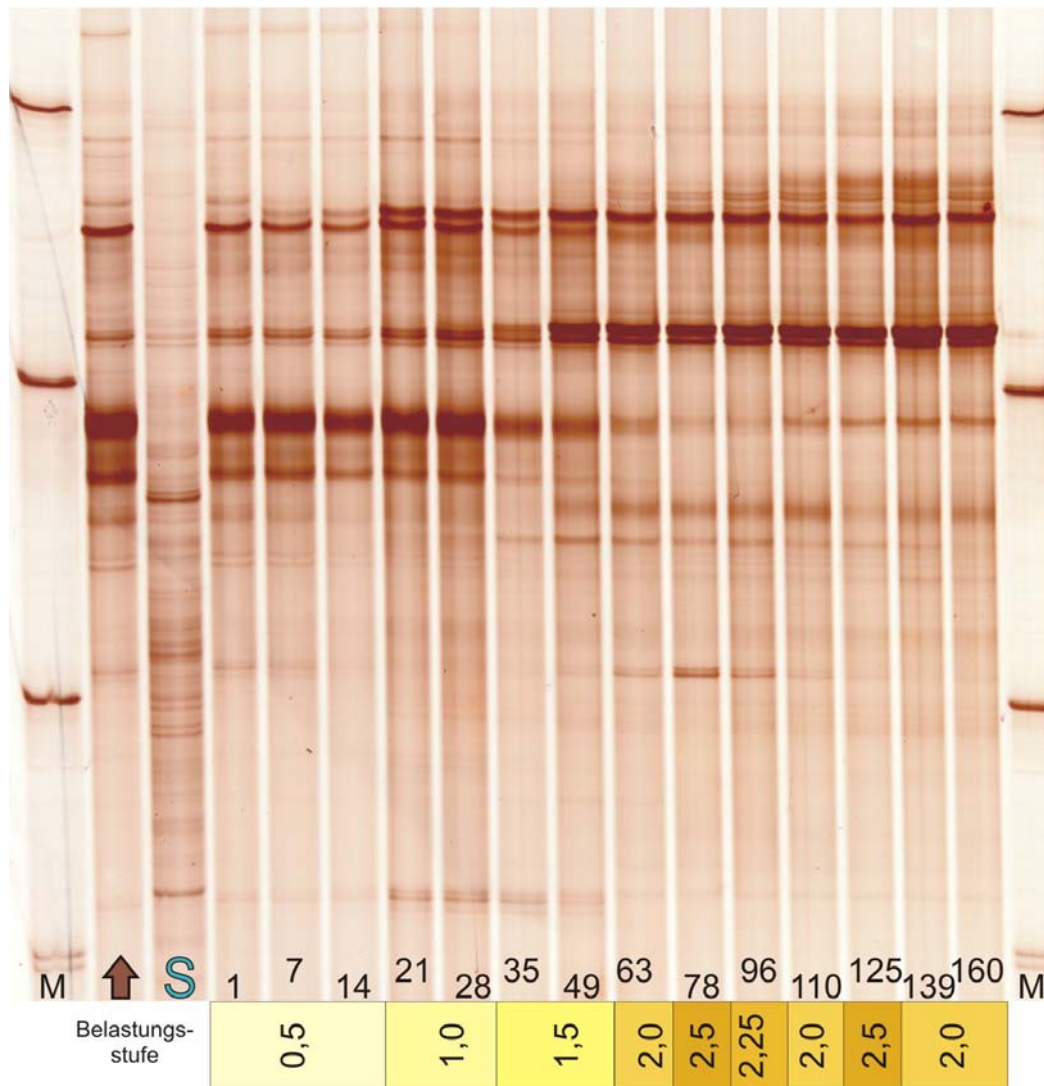


Abbildung 38: Die Vielfalt der Bakterien während der Biogasbildung aus Rindergülle durch einen thermophilen Prozess. Legende: siehe Abbildung 29.

5.7.2 Schweinegülle

Auch die Bakteriengemeinschaften während der Biogasbildung aus Schweinegülle waren die ersten 28 Tage durch die Bakterien dominiert, die mit dem Klärschlamm in den Prozess eingebracht wurden (Abbildung 39). Von den dominanten Banden konnte sich eine im weiteren Verlauf der Biogasbildung in den Profilen etablieren, während die anderen ursprünglich dominanten Banden nur noch schwach vertreten waren. Ab dem 35.-ten Tag trat eine weitere Bande in den Profilen auf die zuvor weder im Klärschlamm, noch in der Schweinegülle detektiert wurde. Diese Bande gewann im weiteren Verlauf an Intensität und dominierte die Profile ab dem 78.-ten Tag.

Wie schon bei der Biogasbildung aus Rindergülle konnte auch bei der Biogasbildung aus

Schweinegülle die zugefügte Substratmenge nicht ohne Einbußen in der erhaltenen Methanmenge über einen Wert von 2,0 g oTR/l*d gesteigert werden. So musste zwischenzeitlich die zugegebene Substratmenge reduziert werden oder die Substratzugabe unterbrochen werden. Die Ursache hierfür blieb unklar. In den Profilen der Bakteriengemeinschaften zeigte sich jedoch, dass sich die Zusammensetzung der Gemeinschaft weiter leicht veränderte.

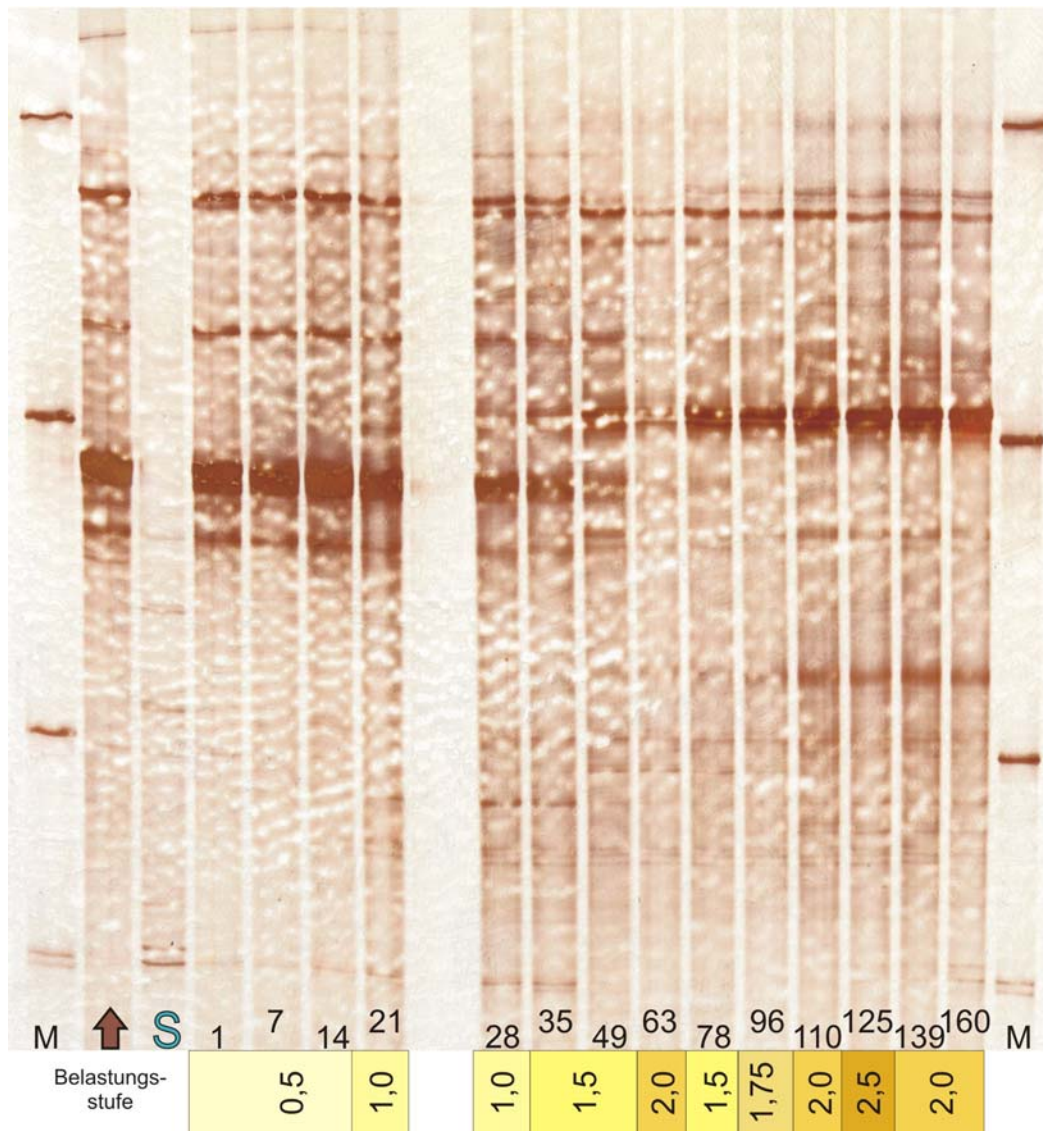


Abbildung 39: Die Vielfalt der Bakterien während der Biogasbildung aus Schweinegülle durch einen thermophilen Prozess. Legende: siehe Abbildung 29.

5.7.3 Maissilage

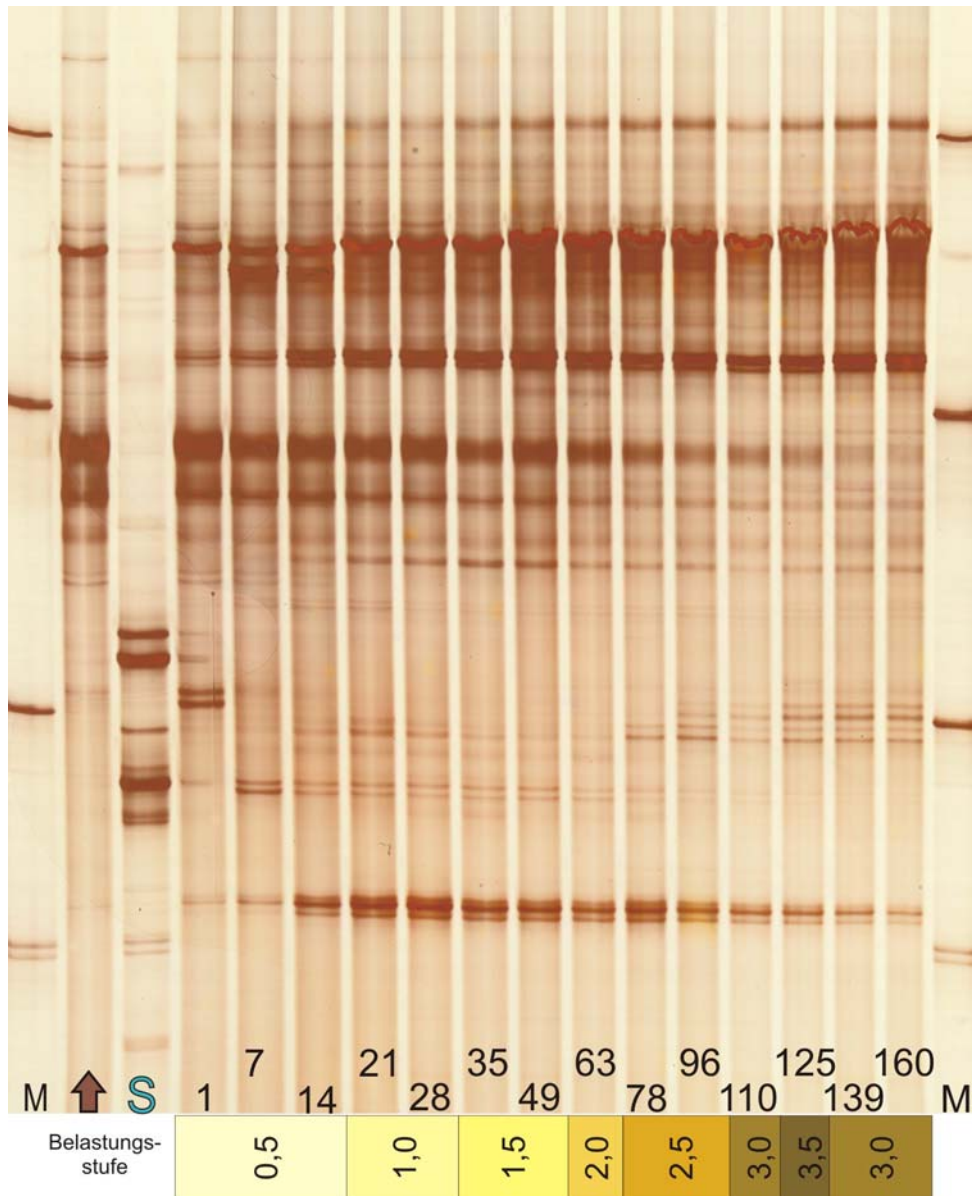


Abbildung 40: Die Vielfalt der Bakterien während der Biogasbildung aus Maissilage durch einen thermophilen Prozess. Legende: siehe Abbildung 29.

Im Gegensatz zu den beiden zuvor beschriebenen Prozessen wandelte sich die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft im gesamten Verlauf des Fermentationsprozess von Maissilage kontinuierlich (Abbildung 40). Bereits nach sieben Tagen deuteten sich erste Unterschiede gegenüber der ursprünglich vorhandenen Gemeinschaft des Klärschlammes an. Zwar waren die vier dominanten Banden aus dem Klärschlamm vorhanden, doch traten zusätzliche vorher nicht vorhandene Banden in den Profilen auf. Von den vier schon im Klärschlamm dominanten Banden dominierten zwei Banden auch noch die Gemeinschaft zum Versuchsende. Zahlreiche Banden blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum in den

Profilen vorhanden, veränderten jedoch die Intensität im Versuchsverlauf. Dies deutet auf eine kontinuierliche Veränderung der Proportionen der beteiligten Bakterien zueinander wie sie auch schon im mesophil betriebenen Prozess der Biogasbildung aus Maissilage beobachtet wurde. Diese Veränderlichkeit in der Bakteriengemeinschaft geht einher mit Problemen bei der Methanproduktion und der Umsetzung der zugefügten Substratmenge.

Die zugeführte Substratmenge konnte, wie schon bei den beiden zuvor beschrieben thermophilen Fermentationen, nicht über 3,0 g oTR/l*d gesteigert werden. Wurde darüber hinaus Substrat zugeführt, so kam es zu einem Anstieg von flüchtigen organischen Säuren im Fermenter, insbesondere Essigsäure und Propionat, der mit einem Abfall des Carbonatpuffers einherging (5.2.2.4). Dies führte zu einer Verminderung der produzierten Methanmenge.

5.8 Die Diversität der Clostridien des Cluster I im thermophilen Verlauf

Die Diversität der Clostridien in dem Klärschlamm, der als Impfgut für den Prozess der thermophilen Biogasbildung diente unterschied sich von der des Klärschlammes der für den mesophilen Prozess genutzt wurde. Während der Fermentation stellten sich je nach umgesetztem Substrat unterschiedliche Clostridiengemeinschaften ein wobei die Herausbildung der charakteristischen Gemeinschaften der Clostridien deutlich schneller erfolgte, als es bei den Gemeinschaften der Bakterien der Fall war. Die Diversität der dominanten Clostridien war im Fall der Fermentation von Rindergülle mit fünf dominanten Banden relativ hoch. Im Vergleich dazu wurden die Prozesse der Umsetzung von Schweinegülle und Maissilage nur von einer bzw. respektive zwei Banden dominiert.

5.8.1 Rindergülle

Bereits nach einer Woche der Fermentation von Rindergülle begann sich die Zusammensetzung der Gemeinschaft der Clostridien von der des Klärschlammes zu unterscheiden (Abbildung 41). Schon nach 21 Tage stellte sich eine Gemeinschaft ein, die durch fünf dominante Banden geprägt war, von denen eine aus der Rindergülle stammte. Mehrere Banden schwächerer Intensität umrahmten diese dominanten Banden. Die Banden blieben den gesamten Beobachtungszeitraum über erhalten jedoch veränderten sich ihre relativen Intensitäten zueinander wobei viele der schwächeren Banden zusätzlich an Intensität verloren. Dies deutet darauf hin, dass die Clostridiengemeinschaft während des Prozess von denselben Arten dominiert wurde, deren Anteile an der Clostridienpopulation sich jedoch stetig leicht verändern.

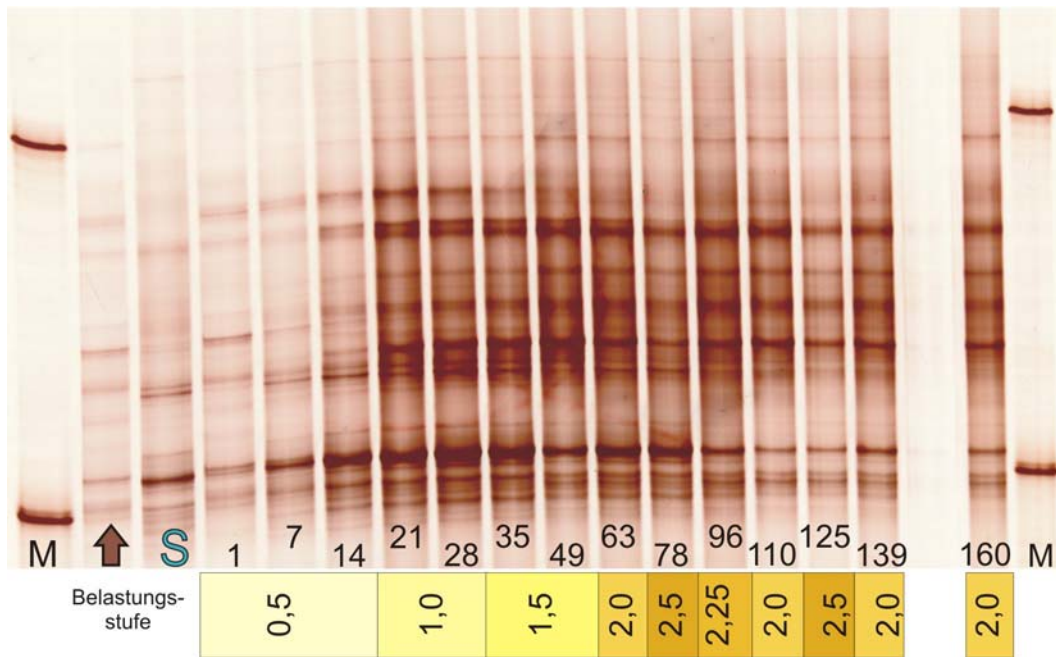


Abbildung 41: Die Vielfalt der Clostridien im Gärgut während der thermophilen Biogasbildung aus Rindergülle. Legende: siehe Abbildung 29.

5.8.2 Schweinegülle

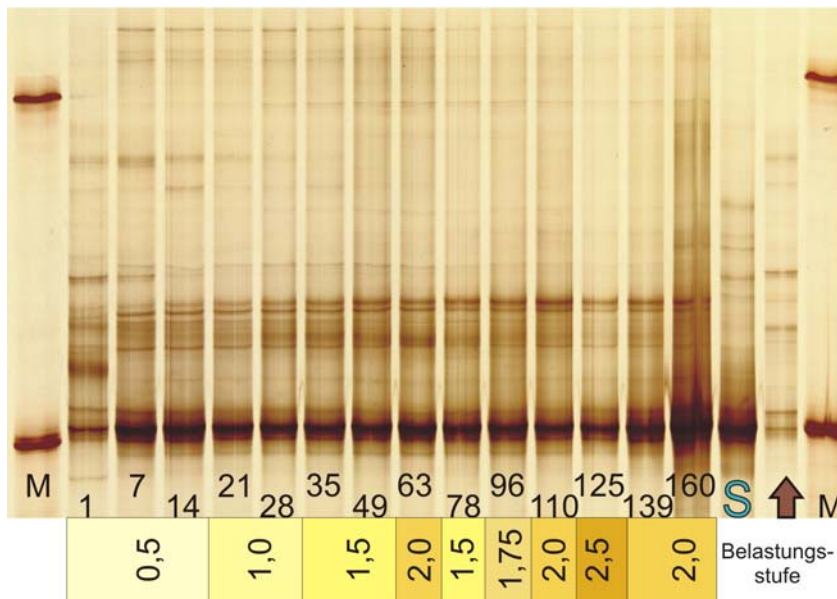


Abbildung 42: Die Vielfalt der Clostridien im Gärgut während der thermophilen Biogasbildung aus Schweinegülle. Legende: siehe Abbildung 29.

Nur zu Beginn der Biogasbildung aus Schweinegülle waren die Clostridien im Fermenter detektierbar, die aus dem Klärschlamm stammen (Abbildung 42). Bereits nach sieben Tagen war der Einfluss des Klärschlammes vermindert und die Clostridiengemeinschaft wurde von einer Bande dominiert, die auch das Profil der Schweinegülle dominierte. Diese Bande blieb

den gesamten Beobachtungszeitraum in den Profilen dominant und wurde nur von Banden deutlich geringerer Intensität begleitet. Auch die Intensitätsverhältnisse der Banden zueinander blieben über den weiteren Beobachtungszeitraum stabil.

5.8.3 Maissilage

Die Gemeinschaft der Clostridien im Verlauf der Biogasbildung aus Maissilage ähnelte zu keinem Zeitpunkt weder der des Klärschlammes, noch der der Maissilage (Abbildung 43). Bereits nach 24 Stunden Fermentation wurde das Profil von einer einzigen Bande dominiert, die jedoch im weiteren Verlauf nicht weiter vorkam. Dafür trat ab dem siebten Tag eine andere Bande als dominant auf, die auch im weiteren Verlauf die Profile dominierte und offenbar schon in der Maissilage vorhanden war – jedoch in vergleichsweise geringerer Intensität. Diese Bande wurde von ca. fünf weiteren Banden begleitet, deren Präsenz in den Profilen und deren Intensitäten sich im Verlauf der Fermentation immer wieder veränderten und somit zeigten, dass die Zusammensetzung der Gemeinschaft der Clostridien über den gesamten Beobachtungszeitraum Veränderungen unterlag.

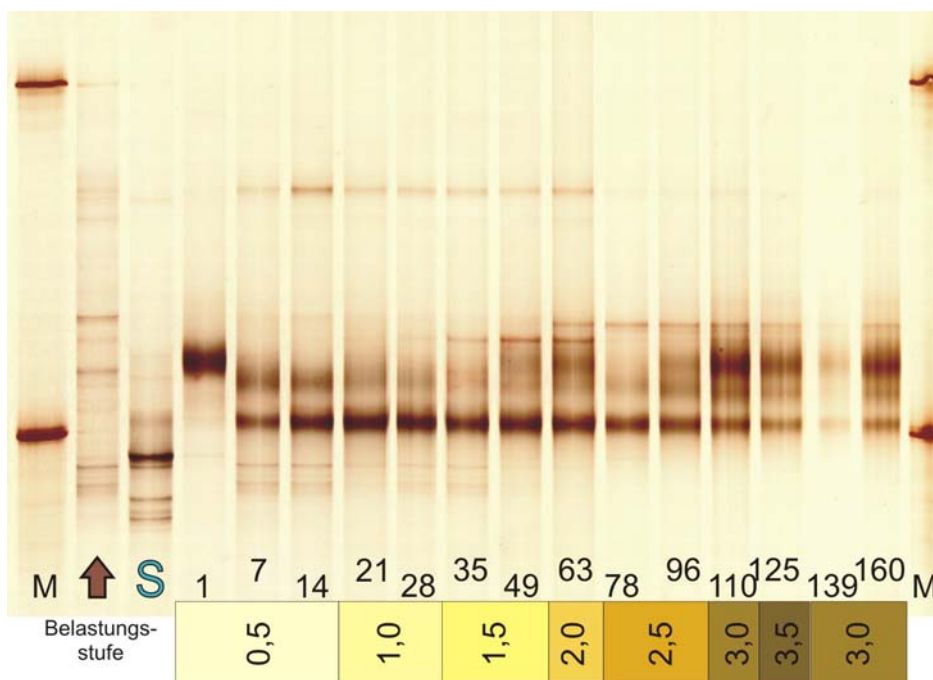


Abbildung 43: Die Vielfalt der Clostridien im Gärgut während der thermophilen Biogasbildung aus Maissilage. Legende: siehe Abbildung 29.

5.9 Identifizierung von Clostridien im thermophilen Reaktorverlauf

Zur Identifizierung der Clostridien, die an der thermophilen Umsetzung von Rinder- und Schweinegülle beteiligten waren, wurden 17 Banden aus den Profilen ausgewählt (Abbildung 44). Es konnten jedoch nur fünf dieser Banden eindeutig DNA-Sequenzen zugeordnet werden. Alle Sequenzen wiesen Ähnlichkeiten zu Sequenzen auf, die aus entsprechenden Habitaten, wie anaeroben Prozessen oder Fäkalien stammten (Tabelle 29).

Die DNA-Sequenzen der Banden 2 und 4 die den Prozess der Biogasbildung aus Rindergülle dominierten wiesen hohe Ähnlichkeiten zu DNA-Sequenzen von bislang unkultivierten Bakterien auf, die an der anaeroben Abfallumsetzung beteiligt waren bzw. respektive in einem anaeroben Klärschlamm nachgewiesen wurden. Die Sequenz aus Bande 3, einer Bande die in den Profilen der Tage 14 bis 78 detektiert wurde, diese Profile jedoch nicht dominierte, wies eine Ähnlichkeit von 99% zu *Clostridium tertium* auf. *C. tertium* wird allgemein als nichtpathogener Organismus betrachtet, da er keine Exotoxine produziert. *C. tertium* wurde jedoch in Verbindung mit anderen pathogenen Clostridien von Patienten isoliert, die Blutvergiftungen hatten oder an Gasbrand erkrankt waren, sodass eine abschließende Aussage bezüglich der Pathogenität von *C. tertium* nicht möglich ist.

Aus den Profilen der Fermentation von Schweinegülle konnte nur eine DNA-Sequenz eindeutig einer Bande in den Profilen zugeordnet werden: Diese Sequenz stammte aus der Bande 5, die den gesamten Prozess dominant vorhanden war und hohe Ähnlichkeiten zu der DNA-Sequenzen eines Bakteriums aufwies, das an der Biogasbildung aus Glucose beteiligt war.

Eine phylogenetische Analyse aller erhaltenen DNA-Sequenzen, die sowohl aus dem mesophilen, als auch aus dem thermophilen Prozess stammten zeigte dass alle DNA-Sequenzen der Klasse *Clostridia* zugeordnet werden konnten (Abbildung 45). Von 79 untersuchten Sequenzen fielen 64 (81%) in das Cluster I der Clostridien (*Clostridium sensu stricto*), den für diese Untersuchungen gewählten Zielorganismen. Weitere 15 Sequenzen wurden anderen Gattungen innerhalb der Klasse *Clostridia* zugeordnet. Die Spezifität der ausgewählten Primer zur Amplifikation der Clostridien ist somit sehr hoch und gut geeignet einen Grossteil der an der Biogasbildung beteiligten anderen Organismen auszuschließen und die Population der Clostridien selektiv zu betrachten.

Diese Untersuchung ergab auch, dass keine der 16S rDNA-Sequenzen als nahe verwand zu pathogenen Clostridien wie *C. botulinum*, *Clostridium perfringens* oder *Clostridium tetani* eingestuft wurde (Abbildung 45).

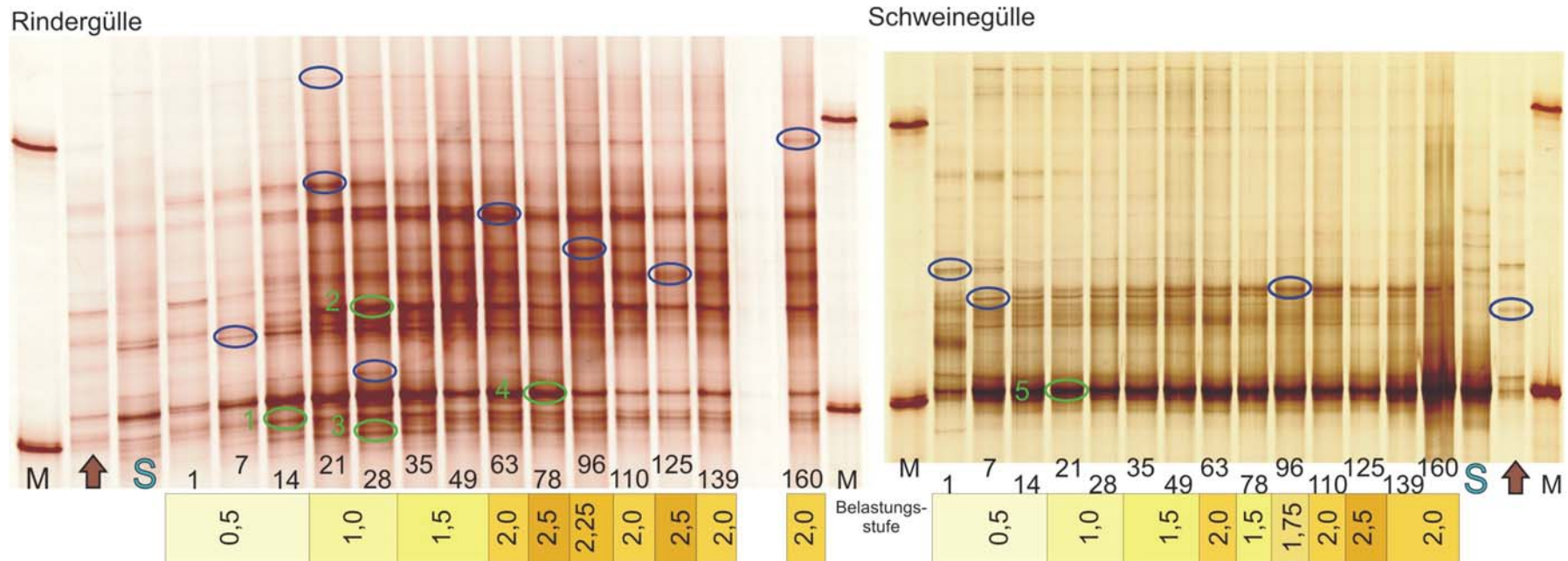
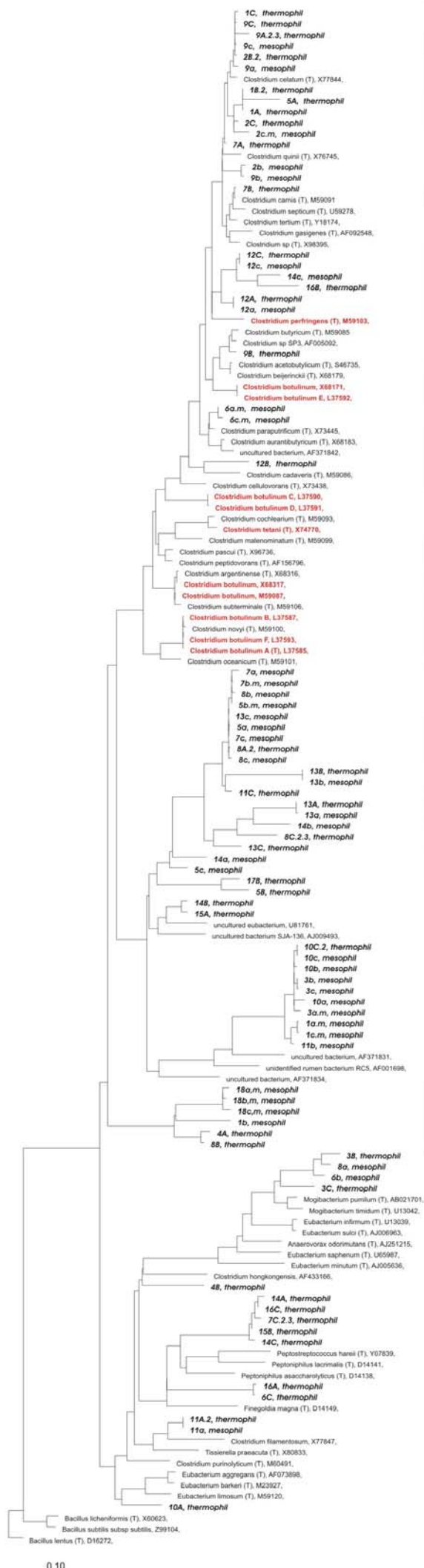


Abbildung 44: Markierung der SSCP-Banden, die zur Identifizierung ausgewählt wurden.

Tabelle 29: Zuordnung der untersuchten Sequenzen aus den thermophilen Prozessen

Bande	Clon	Ähnlichkeit	Nächste verwandte Sequenz,	Sequenznummer	Ursprung der Sequenz
1	2B	99%	Unkultiviertes Bakterium,	DQ809531	Menschlicher Stuhl
2	5B	96%	Unkultiviertes Bakterium	AB274492	Anaerobe Umsetzung von Abfall
3	7B	99%	<i>Clostridium tertium</i>	Y18174	
4	9B	98%	<i>Clostridium butyricum</i>	AY540110	Anaerober Klärschlamm
5	15A	96%	Unkultiviertes Bakterium,	AF275916	Biogasbildung aus Glucose



Cluster I

Abbildung 45: Auf 16S rDNA-Sequenzen basierender Maximum-Likelihood Baum zur Darstellung des Verwandtschaftsgrades der erhaltenen Clostridiensequenzen gegenüber ausgewählten pathogenen Clostridien. Die in dieser Arbeit erhaltenen Sequenzen sind in **schwarzer fetter** Schrift dargestellt und die Fermentationsbedingungen durch den Zusatz mesophil bzw. thermophil angegeben. Ausgewählte pathogene Clostridien sind in **roter** Schrift dargestellt (*Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* und *Clostridium tetani*). Der Balken gibt einen Unterschied von 10% an.

5.10 Quantifizierung der Cluster I Clostridien

Zur Erfassung der Populationsgröße der Clostridien im Biogasreaktor wurde eine quantitative PCR eingesetzt bei der die Menge an ursprünglich in einer Probe vorhandenen Genkopien der 16S rRNA bestimmt wird. Dabei kommt es zum einen darauf an, dass ein spezifisches Produkt gebildet wird, zum anderen muss die Produktbildung einer bestimmten Kinetik entsprechen.

Für eine optimale Produktbildung wurde zunächst die Reaktionschemie der PCR optimiert. Dazu wurden drei unterschiedlich modifizierte Ansätze und ein Standardansatz hinsichtlich der gebildeten Produktmenge aus Klärschlamm-DNA beurteilt.

Ein spezifisches Produkt wurde nur in dem mit zusätzlichem $MgCl_2$ erweiterten Standardansatz erhalten (Abbildung 46). Diese Ansatzchemie wurde im Folgenden für die real-time PCR eingesetzt.

Insgesamt 16 Proben aus dem Verlauf der Biogasbildung aus der Rindergülle wurden zur Quantifizierung ausgewählt und die erhaltenen Kopienzahlen in relative Verhältnisse zueinander gesetzt, da zum jetzigen Zeitpunkt die Angabe einer absoluten Kopienzahl nicht möglich ist.

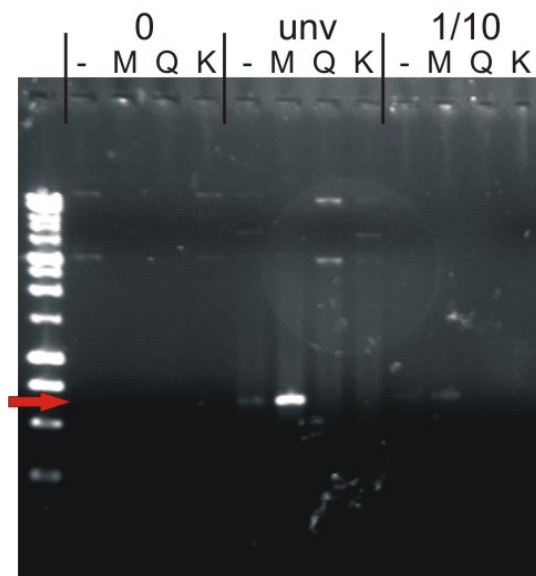


Abbildung 46: Test unterschiedlicher PCR-Bedingungen zur optimalen Ausbeute von PCR-Produkten. Unverdünnte (unv) und 1/10-verdünnte Nukleinsäureextrakte aus Klärschlamm wurden unter 4 Bedingungen amplifiziert. -: Standardansatz, M: Standardansatz + $MgCl_2$, Q: Standardansatz + Q-Solution, K: Standardansatz + KCl. 0: die jeweiligen Negativkontrollen. Der rote Pfeil markiert die Position des erwarteten Produktes.

Da unterschiedlich vorbehandelte Proben zur Vermessung eingesetzt wurden, konnten letztendlich drei Proben hinsichtlich ihres Gehaltes an Clostridien untersucht werden: Zum einen die als Substrat zugeführte Rindergülle und zum anderen zwei aus dem Verlauf der Biogasbildung mit Rindergülle entnommene Proben aus der stabilen Phase der Biogasbildung. In dem Gärsubstrat Rindergülle ließen sich deutlich mehr clostridiale Genkopien nachweisen, als in den Proben, die nach 87 bzw. 105 Tagen aus der Fermentation entnommen wurden (Abbildung 47). Je nachdem, ob die Kopienzahlen auf das Feucht- oder das Trockengewicht das Probenmaterials bezogen wurden, waren im Reaktor zum Tag 87 nur ~13% respektive 20 % der Clostridien vorhanden, die in der Rindergülle enthalten waren. Auch wenn am Tag 105 doppelt so viele Kopien wie am Tag 87 nachgewiesen wurden, war die Anzahl der Clostridien gegenüber dem Gärsubstrat deutlich reduziert und eine massenhafte Vermehrung der Clostridien unwahrscheinlich, da Variabilitäten um den Faktor 2 durchaus in den Bereich der Messungenauigkeit fallen.

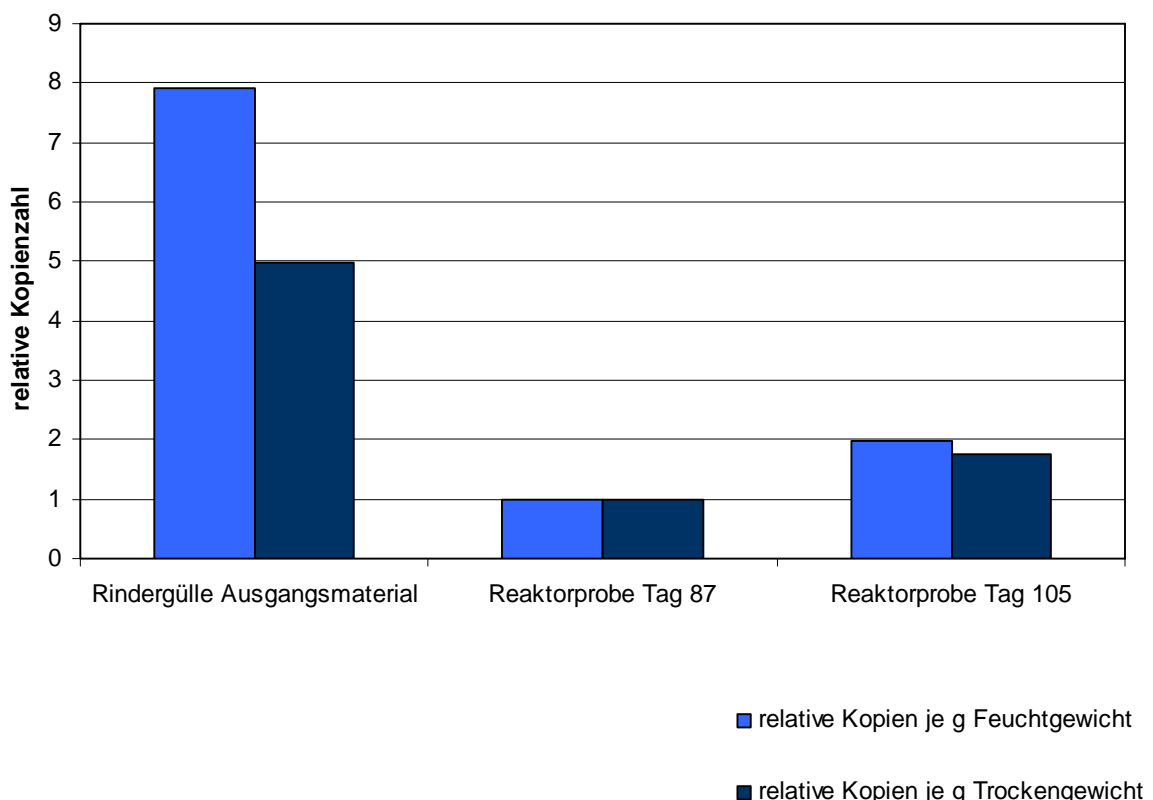


Abbildung 47: Verhältnis der in Rindergülle und in Proben aus dem mit Rindergülle betriebenen Biogasreaktor nachgewiesenen Kopienzahlen der Clostridien. Die geringste, am Tag 87 erhaltene Kopienzahl wurde auf den relativen Wert „1“ gesetzt.

5.11 Nachweis von BoNT – Genen

Der Nachweis der für *C. botulinum* charakteristischen Neurotoxin-Gene erfolgte in zwei nacheinander geschalteten PCRs. Für diese Nachweisreaktionen wurden exemplarisch 7 Proben ausgewählt (Tabelle 30), aus denen sich die bakteriellen rRNA Gene problemlos amplifizieren ließen. Mit Ausnahme einer Probe (Substrat Maissilage) führten auch die PCRs zur Darstellung der Clostridien des Cluster I, sowie die PCRs zur Quantifizierung der Clostridien zur Ausbildung spezifischer Produkte.

Tabelle 30: Probenauswahl zur Detektion von BoNT A, B, E und F incl. Probenbezeichnung

Spur im Gel	DNA aus
1	Ohne DNA-Zugabe – Nullkontrolle der Reaktion
2	Klärschlamm (1/10)
3	Substrat: Hühnertrockenkot (1/10)
4	Substrat: Maissilage (1/10)
5	Substrat: Rindergülle, zusätzlich gereinigt (1/50)
6	Substrat: Schweinegülle (1/10)
7	Tag 2 Reaktor Rindergülle (1/10)
8	Tag 127 Reaktor Rindergülle feste Partikel, zusätzlich gereinigt (1/10)

5.11.1 Unspezifisch BoNT A, B, E oder F

Die gleichzeitige Amplifikation der Gene für BoNT A, B E und F führte in keiner der untersuchten Proben zu einem Produkt (Abbildung 48). Auch nach einer über das gebräuchliche Maß hinausgehenden Belichtung des Geles waren keine Banden im Gel sichtbar. Ein unspezifisches Signal in den Proben 2 und 7 deutet auf eine möglicherweise gestörte Effizienz der Reaktion, die unbedingt durch die Zugabe einer internen Kontroll-DNA abgeklärt werden muss.

So eine Positivkontrolle ist zurzeit für dieses System nicht vorhanden, da *C. botulinum* aufgrund seiner Pathogenität nicht zugänglich ist und uns ein als PCR-Kontrolle dienendes molekulares DNA-Konstrukt durch den Autor des angewendeten PCR-basierenden Nachweissystems nicht zugänglich gemacht wurde. Für weitere Arbeiten ist die Konstruktion solch einer Positivkontrolle unabdingbar.

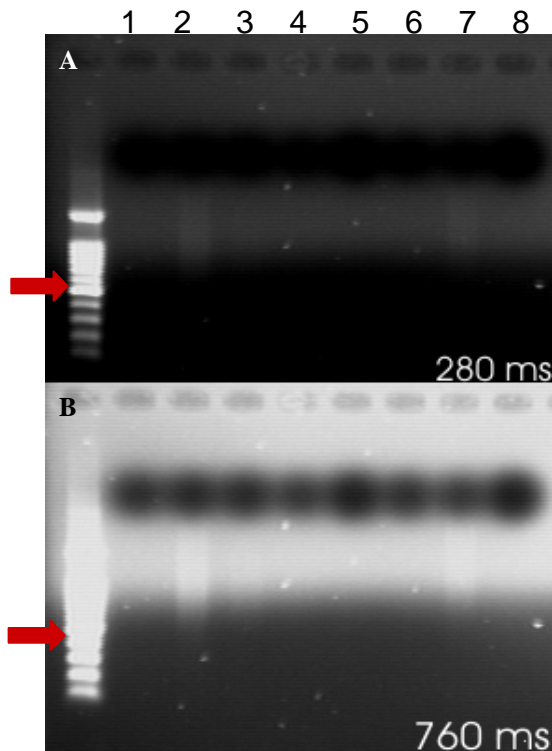


Abbildung 48: Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel zur Darstellung der PCR-Produkten nach der Amplifikation von BoNT A, B, E und F. Spurenbezeichnung entsprechend der Proben in Tabelle 30. Der rote Pfeil markiert die Position des zu erwartenden Produktes. Normal belichtetes Gel bei 280 ms (A) und überbelichtetes Gel bei 760 ms (B).

5.11.2 Spezifisch BoNT A

Zur Steigerung der Sensitivität des Nachweises und zur eindeutigen Charakterisierung der vorhandenen BoNT-Gene wurden die unter Punkt 5.11.1 erzielten Produkte in eine weitere Amplifikation eingesetzt. Es ist durchaus möglich, dass in der ersten PCR bereits eine geringe Menge an spezifischem Produkt gebildet wurde, dieses aber unter dem Detektionslimit eines Nachweises im Agarosegel liegt. Diese geringe Produktmenge kann aber nach einer weiteren Vervielfältigung durchaus im Agarosegel detektiert werden.

Die spezifische Amplifikation von BoNT A verlief in allen Proben negativ (Abbildung 49).

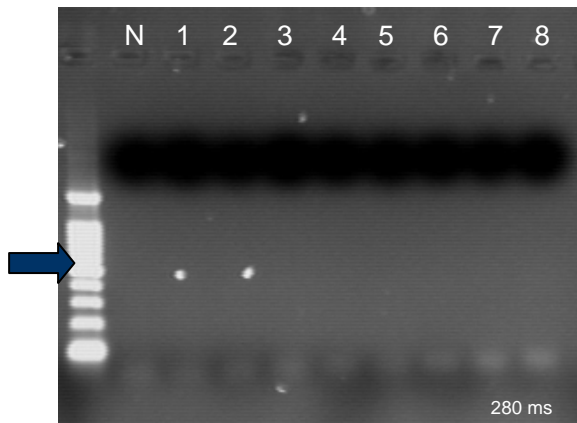


Abbildung 49: Agarosegel zur Darstellung von Produkten nach der spezifischen Amplifikation von BoNT A. N: Negativkontrolle der PCR, alle anderen Bezeichnungen siehe Tabelle 30. Der blaue Pfeil markiert die Position eines zu erwartenden Produktes.

5.11.3 Spezifisch BoNT B

Die spezifische Amplifikation von BoNT B führte in keiner der Proben zu der Ausbildung eines Produktes (Abbildung 50).

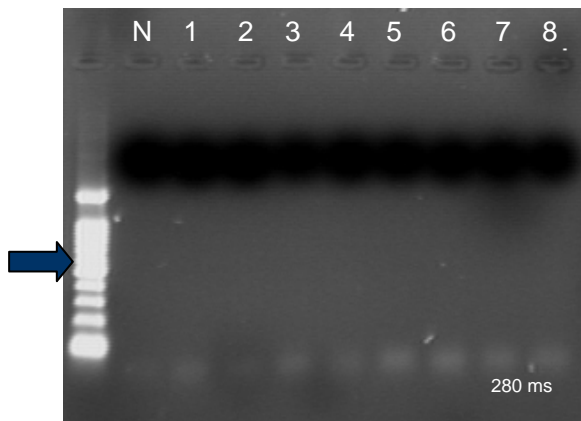


Abbildung 50: Agarosegel zur Darstellung von Produkten nach der spezifischen Amplifikation von BoNT B. Bezeichnungen siehe Abbildung 49.

5.11.4 Spezifisch BoNT E

Die Amplifikation von BoNT E verlief in allen Proben negativ (Abbildung 51).

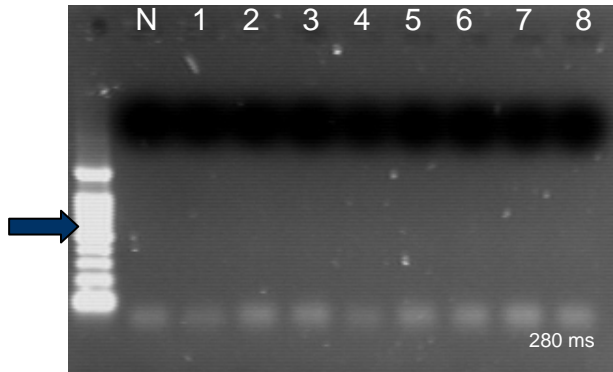


Abbildung 51: Agarosegel zur Darstellung von Produkten nach der spezifischen Amplifikation von BoNT E. Bezeichnungen siehe Abbildung 49.

5.11.5 Spezifisch BoNT F

Die Amplifikation von BoNT F führte in keiner der Proben zur Ausbildung eines spezifischen Produktes (Abbildung 52).

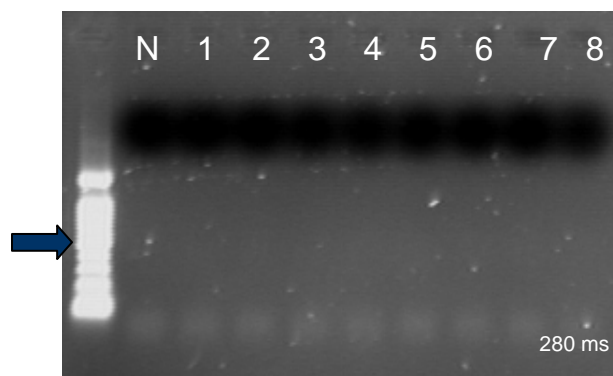


Abbildung 52: Agarosegel zur Darstellung von Produkten nach der spezifischen Amplifikation von BoNT F. Bezeichnungen siehe Abbildung 49.

6 Literaturverzeichnis

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

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.

Dohrmann, A.B. and Tebbe, C.C. (2004) Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kuwalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D., and van Elsas, J.D. (eds). Printed in the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 809-838.

Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Dargaignaratz, C., Botella, L. et al. (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**: 5870-5876.

Galey, F.D. (2001) Botulism in the horse. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* **17**: 579-+.

Harvey, S.M., Sturgeon, J., and Dassey, D.E. (2002) Botulism due to *Clostridium baratii* type F toxin. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 2260-2262.

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.

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.

- 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.
- Lueders, T., Manefield, M., and Friedrich, M.W. (2004) Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology* **6**: 73-78.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T., and Tanaka, R. (2004) Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7220-7228.
- Paisley, J.W., Lauer, B.A., and Arnon, S.S. (1995) A 2Nd Case of Infant Botulism Type-F Caused by *Clostridium baratii*. *Pediatric Infectious Disease Journal* **14**: 912-914.
- Rinttila, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogius, L., and 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.
- Schwieger, F. and Tebbe, C.C. (1998) A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4870-4876.
- 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.