



Hochschule Neubrandenburg  
University of Applied Sciences



# Bachelorarbeit

zur Erlangung des Akademischen Grades  
Bachelor of Science (B.Sc.)

**„Verlauf der Isotopensignatur im Biogasprozess bei induzierter Prozessstörung durch Spurenelementmangel und Rückschluss auf den Methanbildungsweg“**

Verfasser: Stephanie Otto  
Studiengang: Bioprodukttechnologie

Erstprüfer: Prof. Dr. Leif-Alexander Garbe, Hochschule Neubrandenburg  
Zweitprüfer: Dipl.-Ing. (FH) Liane Müller, Deutsches Biomasseforschungszentrum  
gemeinnützige GmbH

Leipzig, den 15. April 2016

## Abstract

Three 10-L lab-scale continuous stirred tank reactors were operated under mesophilic conditions using maize silage to investigate the effect of trace element deficiency. Stable isotope fingerprinting of biogas was applied as a process monitoring tool. The methane and carbon dioxide composition of biogas were analysed to estimate the predominant methanogenic pathways. The process of trace element depleted reactor collapsed after four month probably in cause of the inhibition of key enzymes, like CODH and methyl-coenzyme-M-reductase. It resulted in an acidification of the process due to the accumulation of volatile fatty acids. Contrary to expectation there was no considerable shift of the isotope composition of  $\delta^{13}\text{CH}_4$  values but a depletion of  $\delta^{13}\text{CO}_2$  values. For the discussion the results of the analysis by *mcrA* genes were used. The dominant methanogen while acidification was *Methanomassiliicoccales*. It is a recently discovered methanogen which uses the methylotrophic pathway. The degassing of carbonate system depleted the  $\delta^{13}\text{CO}_2$  values probably due to kinetic isotope effect. But it must be tested. The changing of isotope composition of carbon dioxide is for now the only potential indicator for inhibition anaerobic digestion process by trace element deficient.

Keywords: biogas, trace element deficiency, stable isotope fingerprinting

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
Formelverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung.....	1
2 Aufgabenstellung .....	3
3 Stand der Wissenschaft und Technik .....	4
3.1 Grundlagen der anaeroben Fermentation .....	4
3.1.1 Der hydrogenotrophe Methanbildungsweg .....	7
3.1.2 Der acetoklastische Methanbildungsweg .....	7
3.2 Auswirkung von Spurenelementen im Biogasprozess .....	9
3.3 Isotope .....	11
3.3.1 Was sind Isotope?.....	11
3.3.2 Messung der Isotopensignatur mittels GC-IRMS .....	14
3.3.3 Analyse der Isotopensignatur des Biogases .....	15
4 Material und Methoden.....	18
4.1 Versuchsanlage.....	18
4.2 Versuchsdurchführung.....	19
4.3 Analysemethoden .....	22
4.3.1 pH-Wert.....	22
4.3.2 Bestimmung des TS- und oTS-Gehaltes .....	22
4.3.3 Probenvorbereitung .....	23
4.3.4 Bestimmung des FOS-Wertes nach Kapp und FOS/TAC-Wert nach FAL .....	23
4.3.5 Bestimmung des Ammoniumstickstoffgehalts.....	23
4.3.6 Bestimmung der organischen Säuren mittels Head-Space-GC.....	24

4.3.7	Isotopenanalyse .....	24
4.3.8	Spurenelementanalyse .....	25
5	Ergebnisse und Diskussion .....	27
5.1	Auswertung Gärversuch .....	27
5.1.1	Auswertung Versuchsreaktor 2 .....	28
5.1.2	Auswertung Versuchsreaktor 1 .....	34
5.2	Auswertung der Isotopenanalyse .....	36
5.3	Auswertung des Spurenelementmangels .....	43
6	Schlussfolgerung und Ausblick .....	46
7	Zusammenfassung .....	51
	Literaturverzeichnis .....	53
	Quellenverzeichnis .....	59
	Anhang .....	60
	Eidesstattliche Erklärung .....	68

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die vier Phasen des anaeroben Gärprozesses (Anhäuser et al., 1999) .....	6
Abbildung 2	Abbildung 2: Morphologie der acetoklastischen und hydrogenotrophen Methanogen.....	8
Abbildung 3	Isotope des Wasserstoffs (Ballkaschk, 2011) .....	12
Abbildung 4	Schematische Darstellung eines GC-IRMS (Lancashire, 2011).....	15
Abbildung 5	Laborfermenter. Unten: der stehende Rührkessel mit aufgebrachtem Fütterungstrichter. Oben: die Gasuhr .....	19
Abbildung 6	Versäuerung des Reaktors (Rechts der versauerte und Links der stabil laufenden Fermenter).....	29
Abbildung 7	Verlauf der spezifischen Gasproduktion gegenüber dem FOS/TAC der Referenz und des Versuchsreaktors 2 in den ersten drei Verweilzeiten. Am Versuchstag 146 erfolgte der Austausch der Rührer. ....	30
Abbildung 8	Verlauf der Konzentration der flüchtigen Fettsäuren des Referenzreaktors im gesamten betrachteten Zeitraum und dessen Standardabweichung.....	32
Abbildung 9	Verlauf der flüchtigen Fettsäuren des Versuchsreaktors 2 in den ersten drei Verweilzeiten und dessen Standardabweichung .....	33
Abbildung 10	Verlauf der spezifischen Gasproduktion gegenüber dem FOS/TAC der Referenz und des Versuchsreaktors 1 über dem gesamten betrachteten Zeitraum .....	35
Abbildung 11	Verlauf der Konzentration der flüchtigen Fettsäuren in Versuchsreaktor 1 über den gesamten betrachteten Zeitraum .....	36
Abbildung 12	Verlauf der spezifischen Gasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 1 gegenüber dem $\delta^{13}\text{CH}_4$ in den ersten drei Verweilzeiten .....	37
Abbildung 13	Abbildung 13: Verlauf der spezifischen Gasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 2 gegenüber dem $\delta^{13}\text{CH}_4$ in den ersten drei Verweilzeiten .....	38
Abbildung 14	Verlauf der spezifischen Gasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 1 gegenüber dem $\delta^{13}\text{CO}_2$ in den ersten drei Verweilzeiten .....	39
Abbildung 15	Verlauf der spezifischen Gasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 2 gegenüber dem $\delta^{13}\text{CO}_2$ in den ersten drei Verweilzeiten .....	39
Abbildung 16	Verlauf der Isotopenzusammensetzung des Methans vor und 4 h nach der Beschickung des Versuchsreaktors 2.....	42

**Formelverzeichnis**

Formel 1	Hydrogenotrophe Methanogenese (Schieder et al., 2010).....	7
Formel 2	Acetoklastische Methanogenese (Schieder et al., 2010).....	7
Formel 3	Berechnung der Isotopensignatur des Kohlenstoffs (Fischer, 2006) .....	15
Formel 4	Berechnung des Fraktionierungsfaktors $\alpha$ .....	16
Formel 5	Berechnung der Harnstoffmenge .....	21
Formel 6	Berechnung der Kohlenstoff- u. Wasserstoff-Isotopenzusammensetzung ..	25

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Bioelemente und die Häufigkeit ihrer stabilen Isotope (Gimpel, 2011) .....	13
Tabelle 2	Zusammensetzung der Spurenelementlösung (SE-Lösung) .....	20
Tabelle 3	Versuchsdurchführung und tägliche Spurenelementzugabe .....	20
Tabelle 4	Regulärer Analysenplan (Abweichungen vorbehalten) .....	21
Tabelle 5	Durchschnittliche Gasproduktion am Tag in den ersten drei Phase und deren Standardabweichung .....	27
Tabelle 6	Durchschnittlicher CH <sub>4</sub> - und CO <sub>2</sub> - Anteil im Biogas und dessen Standardabweichung in den ersten drei Phasen des Versuchsreaktors 2 .....	31
Tabelle 7	Spurenelementgehalt in der Frischmasse .....	45

## Abkürzungsverzeichnis

### Größensymbole:

<u>Symbol</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Einheit</u>
$\alpha_c$	Fraktionierungsfaktor	
$\Delta G^\circ$	Gibbs Energie	kJ/Mol
$\delta$	Delta-Notation	‰
$B_R$	Raumbelastung	$\text{g}_{\text{TS}}/\text{L} \cdot \text{d}$
$c$	Konzentration	mg/mL
HRT	Hydraulische Verweilzeit	d
$m$	Masse	mg, g, kg
$n$	Frequenz	rpm
$p_v$	Volumenprozent	Vol.-%
$s$	Strecke, Länge	$\mu\text{m}$ , mm, cm, m
$t$	Zeit	min, h, d
$T$	Temperatur	$^\circ\text{C}$ , K
$V$	Volumen	mL, L, $\text{m}^3$

### Elemente und Verbindungen

C	Kohlenstoff	H <sub>2</sub> O	Wasser
CH <sub>4</sub>	Methan	HClO <sub>4</sub>	Perchlorsäure
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	Acetat	HF	Flusssäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
D	Deuterium	N	Stickstoff
Fe	Eisen	NH <sub>4</sub> -N	Ammoniumstickstoff
Fe <sup>3+</sup>	Eisen(III)-Ion	O	Sauerstoff
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion	S	Schwefel
H <sub>2</sub>	Wasserstoff	T	Tritium



**Abkürzungen**

Bez.	Bezeichnung
CODH	Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase
CoA	Coenzym A
CoM	Coenzym M
DBFZ	Deutsches Biomassenforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EA	Elementar Analyzer
EEG	Erneuerbare-Energien-Gesetz
FDH	Formiat-Dehydrogenase
FOS	Flüchtige organische Säuren
FOS/TAC	Verhältnis der FOS zum gesamten organischen Carbonat
GC	Gaschromatograph
GC-IRMS	Gaschromatograph-Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie
HRT	Hydraulische Verweilzeit
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry
IRMS	Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie
ISTD	interner Standard
Molekularbiol. U.	Mikrobiologische Untersuchung
NaWaRo	Nachwachsende Rohstoffe
oTS	Organische Trockensubstanz
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB-Standard	Pee Dee Belemite-Standard
PTFE	Polytetrafluorethylen
RNA/ rRNA	Ribonukleinsäure/ Ribosomale Ribonukleinsäure
SE	Spurenelemente
spp.	Subspezies
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Polymorphism
TS	Trockensubstanz
TC/EA	Terminal Conversion Elementar Analyzer
UFZ	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
V-SMOW	Vienna-Standard-Mean-Ocean-Water

## 1 Einleitung

Als Reaktion der Nuklearkatastrophe in Fukushima 2011 beschloss die Bundesregierung einen Ausstieg aus der Kernenergie bis 2022. Sie leitet somit die Beschleunigung der Energiewende ein. Die fossilen Energieträger sollen wegen ihrer Klimaschädlichkeit und ihrer Endlichkeit durch erneuerbaren Energien ersetzt werden, damit die Versorgungssicherheit langfristig gewährleistet und der Treibhausgasausstoß minimiert wird. Die Bundesregierung hat beschlossen, dass bis 2050 80 % des Strombedarfs aus erneuerbaren Energien gewonnen werden soll (*Bundesregierung*, 2012; *KLU*, 2013). Biogas spielt dabei eine bedeutende Rolle. Dieser regenerative Energieträger besteht aus Methan und Kohlendioxid und entsteht durch die anaerobe Vergärung organischer Stoffe. Im Jahr 2013 wurden 8563 Biogasanlagen in Deutschland gezählt. Bis Ende 2015 sollen ca. 9000 prognostiziert werden (*Statista*, 2016). Der Vorteil von Biogas ist, dass nicht nur Strom und Wärme gewonnen wird, sondern dass das Gas nach einer Aufbereitung und Methananreicherung in das Erdgasnetz eingespeist werden kann. Das aufbereitete Gas findet ebenfalls Anwendung als Kraftstoff für erdgasbetriebene Fahrzeuge. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass das Biogas gespeichert und zwischengelagert werden kann. Durch den Einsatz biogener Rohstoffe können organische Reststoffe sinnvoll genutzt und nicht einfach entsorgt werden. Zudem kann das Gärsubstrat den Mineraldünger auf landwirtschaftlicher Nutzflächen ersetzen (*Weltec Biopower*, 2016). Zu Beginn der energetischen Nutzung aus Biomasse wurden landwirtschaftliche Reststoffe, wie Gülle und biogene Rohstoffe für die Stromerzeugung genutzt. Mit der Novellierung des EEG 2004 wurde ein NaWaRo-Bonus eingeführt. Der Anbau von Energiepflanzen gegenüber der Reststoffverwertung bekam somit einen Vorteil. Schätzungen zufolge kamen 80 % der erzeugten Energie von Biogasanlagen aus NaWaRo. Jeweils 10 % kamen aus Abfällen und Tierexkrementen (*KLU*, 2013).

Die Optimierung und Prozessüberwachung des Biogasprozesses, zur Erzielung höherer Gaseträger sowie eine bessere Ausnutzung des Potenzials des Substrates, ist ein wesentliches Ziel bei der Effizienzsteigerung von Biogasanlagen. Die Investition in eine Biogasanlage ist recht hoch, daher sollte die Anlage optimal ausgelastet sein, um eine optimale Rentabilität zu gewährleisten. Im Mittelpunkt steht dabei der Fermentationsprozess. Dieser ist sehr sensibel und reagiert stark auf Schwankungen der Prozessparameter. Ist in dessen Mikrobiologie bereits ein Problem aufgetreten, kann der Prozess nur sehr schwer wieder stabilisiert werden. Daher sollte eine optimale Überwachung des Biogasprozesses gewährleistet werden, um Produktionsausfälle vorzubeugen

und Ausfälle zu vermeiden. Für die Prozessbiologie gilt, dass dessen Lebens- und Wachstumsbedingungen im Prozess optimal zu gestalten. Es sollten möglichst frühzeitig Informationen über die Tendenz des Verlassens des Optimums- bzw. Toleranzbereich der Schlüsselparameter vorliegen. Daher sind eine regelmäßige Analyse des Gärsubstrates auf dessen Fettsäurespektrum, dem FOS/TAC und dem Ammoniumstickstoffgehalt sowie die Kontrolle der Temperatur und des pH-Wertes notwendig. Viele dieser Messungen können allerdings nur im Labor durchgeführt werden. Mittels einer Online-Überwachung kann die Temperatur, der Füllstand, die Durchflussmessung und die Gasmenge sowie Gasqualität überprüft werden. Letzteres gibt Rückschlüsse auf den Gärprozess. Allerdings nur zeitlich verzögert und kann daher nicht als alleiniger Indikator ausreichen (Götz et al., 2016). In der jüngsten Vergangenheit wurden verschiedene Innovationen im Bereich der Prozessüberwachung entwickelt. Ein Beispiel hierfür ist die Ermittlung der Isotopensignatur des gebildeten Methans und Kohlendioxids. Dieser gibt Aufschluss über den vorherrschenden Methanbildungsweg. Tritt eine Prozessstörung auf kann mittels dieser Analyse eine Veränderung in der Isotopenzusammensetzung des Biogases und somit eine Verschiebung des Methanbildungsweges frühzeitig festgestellt werden. Diese Methode stellt somit ein perspektivisches Konzept als Überwachungsmethode dar, welches zur Prozessoptimierung und Abfallverminderung von Biogasanlagen eingesetzt werden kann.

## 2 Aufgabenstellung

Spurenelemente sind essentiell für die Nährstoffversorgung der fermentativen Bakterien und methanogenen Archaeen. Sie dienen als Cofaktoren zahlreicher Enzyme, die an der Methanbildung beteiligt sind. Durch einen Mangel dieser Mikronährstoffe kann ein optimaler Biogasprozess nicht gewährleistet werden, was dazu führt, dass die Methanausbeute sinkt oder der Prozess zum Erliegen kommt. In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zur Wirkung des Spurenelementmangels auf den Biogasprozess in drei quasi-kontinuierlich, mesophil betriebenen Biogaslaborreaktoren durchgeführt. Als Einsatzmaterial diente Maissilage, aufgrund ihrer geringen Konzentration an enthaltenen Spurenelementen. Zur Beurteilung der Prozessstabilität wurden umfangreiche Analysen des Gärsubstrates und der Gaszusammensetzung durchgeführt. Zusätzlich sollte der Spurenelementgehalt im Gärsubstrat bestimmt werden.

Als zweiten Teil dieser Arbeit im Zusammenhang mit der induzierten Prozessstörung erfolgt eine Analyse der Isotopensignatur des Biogases. Mittels der Bestimmung der Isotopenzusammensetzung des Methans und des Kohlendioxids soll der vorherrschende Methanbildungsweg identifiziert werden, wodurch frühzeitig eine Veränderung der Prozessbiologie erkannt werden kann.

### 3 Stand der Wissenschaft und Technik

#### 3.1 Grundlagen der anaeroben Fermentation

Der anaerobe Abbau der organischen Masse zu Biogas ist in vier Phasen untergliedert (siehe Abbildung 1). Am Prozess sind zwei Domänen beteiligt, welche in Bakterien und methanogenen Archaeen klassifiziert sind. Unterteilt sind diese in vier Hauptstoffwechselgruppen, die hydrolytisch-fermentativen Bakterien, die protonenreduzierenden Säurebakterien (acetogene Bakterien) und die hydrogenotrophen sowie acetoklastischen Methanogene (methanogene Archaeen). Diese Mikroorganismen nutzen die in den Kohlenhydraten, Fette und Eiweißen gespeicherte Energie für den Stoffwechsel (Demirel & Scherer, 2008; Mähnert et al., 2007). Die Leistung des anaeroben Abbaus ist abhängig von der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft im Fermenter und wird beeinflusst von den betrieblichen als auch von den umweltrelevanten Parametern (Demirel und Scherer, 2008). Die Biogasproduktion ist ein natürlicher Prozess und findet in der Natur in Mooren, am Grund von Seen, in Güllegruben und im Pansen von Wiederkäuern statt (Linke et al., 2011).

Das beim anaeroben Abbau entstehende Gasmisch besteht zu 50 – 70 Vol-% aus Methan und zu 25 – 50 Vol-% aus Kohlendioxid sowie geringe Mengen an Spurengasen, wie Wasserstoff, Schwefelwasserstoff und Ammoniak. Die Zusammensetzung des Gases ist abhängig vom eingesetzten Substrat, den technischen Ausführungen und dem Fermentationsverfahren (Linke et al., 2011).

Der Entstehungsprozess des Biogases ist in vier Teilschritte untergliedert. Die erste Phase der Biogasbildung ist die Hydrolyse. Hier werden die makromolekularen Verbindungen des Ausgangsmaterials, wie Kohlenhydrate (z.B. Stärke), Fette und Proteine, in einfache organische Verbindungen (Oligomere, Monomere), wie Aminosäuren, Fettsäuren, Zucker und Basen, gespalten. Die hydrolytischen Bakterien setzen dabei extrazelluläre Enzyme (Lipasen, Proteasen und Amylasen) frei, die die organische Masse auf biochemischen Weg zersetzen (FNR, 2013). Der Abbau der Fette, Proteine und Zuckerverbindungen erfolgt unter anderem durch *Lactobacillus*, *Vibrio*, *Spaphylococcus* und *Escherichia*, während der Abbau des Lignocellulose-Komplexes durch cellulolytische Mikroorganismen stattfindet (Bauer et al., 2009).

Die entstehenden Spaltprodukte der Hydrolyse werden in der Acidogenese („Versäuerungsphase“) unter Beteiligung der fermentativen Bakterien zu reduzierten niedermolekularen Verbindungen wie Fettsäuren (Essig-, Propion- und Buttersäure) sowie Kohlendioxid und Wasser

abgebaut. Dabei kommt es ebenfalls zur Bildung geringer Mengen an Milchsäuren und Alkoholen (FNR, 2013; Linke et al., 2011).

Die Umsetzung der organischen Substanz erfolgt hauptsächlich durch die hydrolytischen und acidogenen Bakterien. Da sie im Stoffwechsel gemeinsam ablaufen, sind diese im Prozess nicht eindeutig voneinander zu trennen. Vertreter der acidogenen Mikroorganismen sind vor allem Gram-positive Bakterien, wie *Clostridien* und *Bacillen* und gehören zum Stamm der *Firmicutes*. Eine weitere wichtige Rolle spielen *Bacteroidetes* und *Actinobacteria*. Die hydrolytischen und acidogenen Bakterien haben eine höhere Wachstumsrate als die syntrophen Bakterien und methanogenen Archaeen. Die Generationszeit liegt bei 20 min – 10 h (Bauer et al., 2009; Mähnert et al., 2007).

Die nächste Phase der Biogasentstehung ist die Acetogenese („Essigsäurebildung“). In dieser Stufe werden die Produkte der Acidogenese mittels der acetogenen bzw. syntrophen Bakterien durch beispielsweise Oxidation oder komplexen Reaktionen zu Essigsäure (Acetat), Wasserstoff und Kohlendioxid abgebaut (FNR, 2013; Schieder et al., 2010). Syntrophe Bakterien sind strikt anaerob und kaum erforscht, da sie schwer kultivierbar sind. Sie können nur vergesellschaftet mit anderen Mikroorganismen wachsen, da sie auf deren StoffwechsellLeistungen angewiesen sind. Die methanogenen Archaeen können nur C1-Verbindungen, wie Acetat und Wasserstoff umsetzen. Die syntrophen Bakterien oxidieren die C2-Verbindungen, wie Succinat, Lactat, Fettsäuren, Alkohole sowie aromatische Verbindungen der vorgelagerten Prozesse und stellen somit die C1-Verbindungen den Methanbildnern zur Verfügung (Bauer et al., 2009).

Der Wasserstoffpartialdruck ist ein wichtiger Parameter, welcher die Prozessstabilität oder die Störung eines Prozesses definiert (Demirel & Scherer, 2008). Ist dieser in der Acetogenese zu hoch können die Zwischenprodukte der Acidogenese thermodynamisch nicht umgesetzt werden. Als Folge dessen kommt es zur Anreicherung der organischen Säuren und daraus einhergehende Hemmung der Methanbildung. Damit der Wasserstoffpartialdruck konstant bleibt, müssen die Wasserstoffbildner (acetogene Bakterien) eng assoziiert in einer Lebensgemeinschaft mit den wasserstoffverbrauchenden methanogenen Archaeen stehen. Dies wird „Inter-Species-Elektronentransfer“ genannt, da die Elektronen in Form von Wasserstoff zwischen den unterschiedlichen Mikroorganismen übertragen werden (Bauer et al., 2009; FNR, 2013).

Essigsäure sowie Wasserstoff und Kohlendioxid aus der Acetogenese werden von den methanogenen Archaeen als Substrat genutzt und zu Methan in der letzten Phase, der Methanogenese („Methanbildung“), umgewandelt (FNR, 2013). Zur Bildung von Methan sind nur bestimmte Archaeen fähig. Diese Mikroorganismen gehören dem Phylum Euryarchaeota an

und sind einzigartig in der Natur. Innerhalb der Euryarchaeota sind die Klassen *Methanomicrobia*, *Methanobacteria*, *Methanococci* und *Methanopyri* zu finden. Der Letzt genannte wurde bis jetzt nicht in Biogasanlagen nachgewiesen. Das pH-Optimum der Methanbildner liegt bei 6,8 – 7,5. Im Gegensatz zu den hydrolytischen und den acidogenen Bakterien schaffen die Archaeen ein alkalisches Milieu. Aufgrund der Verwertung der Essigsäure entsteht Kohlendioxid, welches sich teilweise im Fermenter löst und somit einen Carbonat-Puffer schafft. Eine weitere Ursache ist, dass die syntrophen Bakterien beim Säureabbau Wasserstoff produzieren, wodurch der Fermenterinhalt ebenfalls basisch wird (Bauer et al., 2009).

Methan lässt sich durch drei verschiedene Stoffwechselwege bilden, der hydrogenotrophe Bildungsweg (52 Spezies), der acetoklastische Bildungsweg (19 Spezies) und der methylo-trophe Bildungsweg (10 Spezies) (Whiticar, 1999).

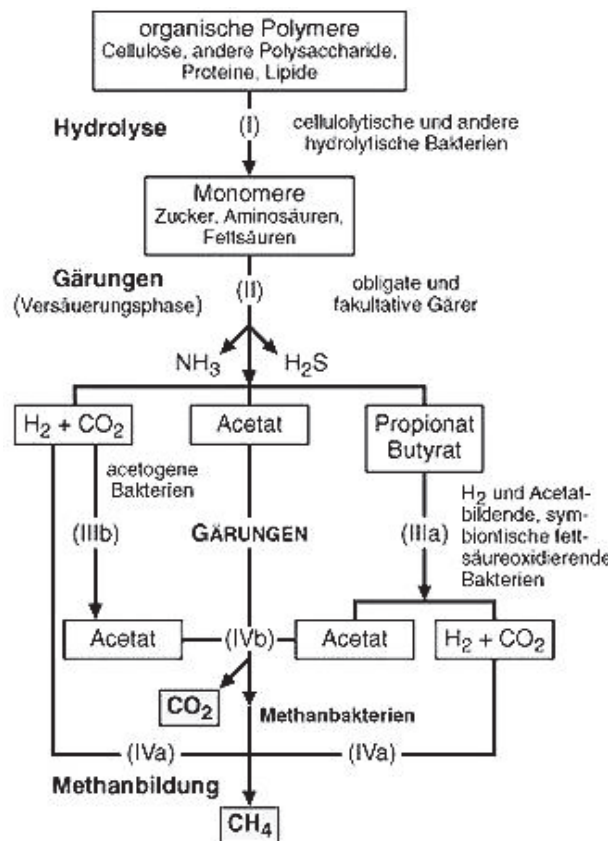


Abbildung 1: Die vier Phasen des anaeroben Gärprozesses (Anhäuser et al., 1999)

### 3.1.1 Der hydrogenotrophe Methanbildungsweg

Während der hydrogenotrophen Methanogenese wird Kohlendioxid mittels Wasserstoff reduziert. Wasserstoff fungiert dabei als Elektronenakzeptor (Nikolauz et al., 2013):



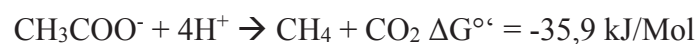
*Formel 1: Hydrogenotrophe Methanogenese (Schieder et al., 2010)*

Vertreter der hydrogenotrophen Archaeen sind *Methanobacteria* mit der Ordnung *Methanobacteriales*; *Methanomicrobia* mit der Ordnung *Methanomicrobiales* und *Methanococci* mit der Ordnung *Methanococcale* (siehe Anhang 1). Diese wachsen stäbchenförmig und sind somit sehr robust gegen Prozessstörungen (siehe Abbildung 2) (Bauer et al., 2009; Demirel & Scherer, 2008).

Die hydrogenotrophe Methanogenese ist vorherrschend bei einer hohen Raumbelastung (ca. 2,5 – 3 kg oTS/m<sup>3</sup>\*d) und niedriger Verweilzeit sowie einer hohen Temperatur. Steigt die Raumbelastung verdrängen die hydrogenotrophen die acetoklastischen Methanbildner. Das gebildete Acetat wird hauptsächlich zu Wasserstoff und Kohlendioxid umgesetzt, als direkt in Kohlendioxid und Methan gespalten zu werden. (Bauer et al., 2009; FNR, 2013; Nikolauz et al., 2013; Schieder et al., 2010). Anhand der Aktivität der hydrogenotrophen Methanbildner lässt sich eine Aussage über eine stabile und effiziente Prozessleistung treffen. Liegt eine niedrige Wasserstoffkonzentration vor wird die Acetatoxidation bevorzugt. Bei einer hohen Temperatur werden die wasserstoffverbrauchenden Bakterien bevorzugt, wobei die Formiat-Verbraucher reduziert werden (Demirel & Scherer, 2008).

### 3.1.2 Der acetoklastische Methanbildungsweg

Bei der acetoklastischen Methanogenese entsteht Methan aus der Abspaltung der Methylgruppe des Acetats. Von einigen wasserstoffverbrauchenden Methanogenen wird Formiat (Ameisensäure) für die Kohlendioxid-Reduzierung zu Methan als Elektronendonator verwendet. Formiat ist ein wichtiges Substrat. In der Umwelt sind seine Konzentrationen niedrig, da es schnell produziert und verbraucht wird (Demirel & Scherer, 2008; Nikolauz et al., 2013).



*Formel 2: Acetoklastische Methanogenese (Schieder et al., 2010)*



Vertreter der acetoklastische Archaeen sind *Methanosarcinales*, zugehörig zu der Gattung *Methanomicrobia*, die sich unterteilen in die Familien *Methanosaetaceae* und *Methanosarcinaceae* (siehe Anhang 1). Der Letzt genannte nutzt sowohl den acetoklastischen, als auch den hydrogenotrophen Bildungsweg (Bauer et al., 2009; Polag et al., 2015). Die acetatverbrauchenden Methanbildner sind dünne Fäden mit einer großen Oberfläche und werden bei einer niedrigen Acetat-Konzentration begünstigt. Durch ihre Struktur sind sie jedoch anfälliger bei Prozessstörungen als die hydrogenotrophen Methanogenen. Sie inhibieren bereits bei einem pH-Wert von 6,2. Die *Methanosarcinaceae* bestehen aus einer Zellakkumulation. Die natürlichen Flocken schützen vor äußeren Einflüssen, wie Chemikalien (siehe Abbildung 2). Bevorzugt werden sie bei einer hohen Acetatkonzentration und die *Methanosaeten* bei einer niedrigen Acetatkonzentration (Bauer et al., 2009; Demirel & Scherer, 2008).

Der acetoklastische Bildungsweg ist vorherrschend bei einer niedrigen Raumbelastung und einer hoher Verweilzeit sowie einem niedrigen Acetatgehalt. Aufgrund einer langen Verweilzeit werden diese Mikroorganismen nicht so schnell ausgedünnt, trotz ihres relativ langsamen Wachstums. Ihre geringe Wachstumsgeschwindigkeit ist begründet durch den geringen Energiegewinn bei der Acetatspaltung (Bauer et al., 2009; FNR, 2013; Schieder et al., 2010). Bevorzugt wird der acetoklastische Bildungsweg bei einer hohen Wasserstoff-Konzentration (Demirel & Scherer, 2008).

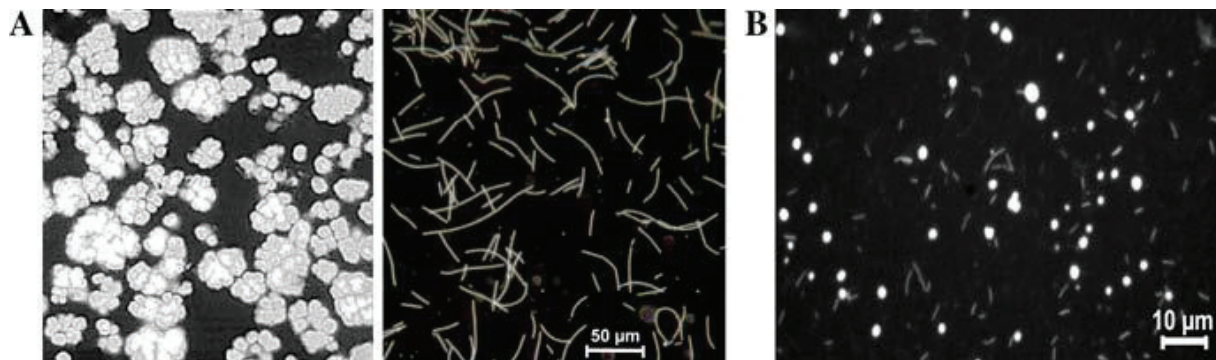


Abbildung 2: Morphologie der acetoklastischen und hydrogenotrophen Methanogenen; (a) Acetoklastische Methanogenen; *Methanosaeta* und *Methanosarcina*; (b) Hydrogenotrophe Methanogenen (Demirel & Scherer, 2008)

Die acetoklastischen Methanogene spielen eine wichtige Rolle für die Stabilität des Vergärungsprozesses. Jedoch wurde in den meisten Biogasanlagen die syntrophe Acetat-Oxidation in Verbindung mit der hydrogenotrophen Methanogenese als dominanter Bildungsweg nachgewiesen (Lv et al., 2014a).

In einem einstufigen Prozess laufen die vier Stufen des anaeroben Abbaus parallel ab. In der Biozönose sind die methanogenen Mikroorganismen das schwächste Glied. Aufgrund ihrer geringen Wachstumsgeschwindigkeit reagieren sie empfindlicher auf Prozessstörungen (FNR, 2013).

Ausgehend von der Studie von Mackie und Bryant (1981) soll im Biogasprozess 70 % des gebildeten Biogases aus Acetat und 30 % aus Wasserstoff und Kohlenstoff gebildet werden. Diese Behauptung ist in einer Studie von Klocke, Nettmann und Bergmann (2009) nicht bestätigt worden. In dieser Untersuchung wurden in Praxisanlagen hauptsächlich hydrogenotrophe Methanogene der Familie *Methanomicrobiales* und *Methanobacteriales* gefunden. Dabei dominierten die Vertreter der Ordnung *Methanomicrobiales*. Während der Studie wurden nur in sechs der zehn untersuchten Anlagen nennenswerte Anteile an acetoklastischen Methanogenen nachgewiesen (Klocke et al., 2009; Mackie and Bryant, 1981).

### **3.2 Auswirkung von Spurenelementen im Biogasprozess**

Zur Effizienzsteigerung der Biogaserträge sowie zur Optimierung der Prozessbiologie werden den Biogasanlagen teilweise Hilfsstoffe zugesetzt. Solche Hilfsmittel können Spurenelemente, Ionenaustauscher oder Enzyme sein. Dadurch sollen die Anlagen laut Hersteller effizienter und wirtschaftlicher arbeiten (Aust et al., 2011). Teilweise kommt es auch vor, dass nach monatelangem Betrieb und optimaler technischer Prozessführung einer Biogasanlage der Biogasertrag plötzlich sinkt. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Bei der anaeroben Vergärung unterscheiden sich stark die säurebildenden Bakterien von dem Methanbildner in Bezug auf die Physiologie, dem Nährstoffbedarf, der Wachstumskinetik und der Empfindlichkeit gegenüber den Umweltbedingungen. Einige Einsatzmaterialien bewirken eine Hemmung des Bakterienwachstums oder eine nachteilige Verschiebung der mikrobiellen Population. Hemmende oder toxische Substanzen sind Ammoniak, Schwefelwasserstoff, Schwermetalle oder organische Substanzen (Chen et al., 2008).

Ein Absinken des Biogasertrages tritt auch häufig bei der Verwendung einförmiger Energiepflanzen, wie beispielsweise Maissilage und Grassilage nach drei bis fünf Jahren auf. In Deutschland hat sich die Verwendung dieser Substrate erhöht, da sie eine hohe Energie- und Biogasausbeute versprechen (Aust et al., 2011; Leuhn et al., 2008). Allerdings enthalten diese Pflanzen nur eine geringe Konzentration an Spurenelementen, die für die Mikroorganismen essentiell sind. Es kommt zu Mangelerscheinungen in den Biogasanlagen und eine daraus resultierende Ansammlung organischer Säuren, die den Biogasprozess hemmen. Die minerali-

sche Zusammensetzung der Energiepflanzen ist dabei abhängig von der Pflanzenart, der Erntezeit, dem Bodentyp und dem Düngemiteleinsatz (Aust et al., 2011; Wall et al., 2014).

Die Hilfsmittel sollen diesen Stressfaktoren entgegenwirken und zu einer optimalen Ausnutzung des Biogaspotenzials des Substrates führen. Dadurch können die Anlagen bei einer höheren Raumbelastung bzw. bei einer kürzeren Verweilzeit gefahren werden (Aust et al., 2011).

Spurenelemente, wie Kobalt, Nickel, Molybdän, und Selen, sind für die Nährstoffversorgung der Mikroorganismen im Fermenter essentiell und dienen als Cofaktoren zahlreicher Enzyme. Enzyme sind an der Zersetzung größerer organischer Verbindungen zu kleineren Molekülen und der Methanbildung beteiligt sind, wie Cellulasen, Pektinasen, Carboxylasen und Dehydrogenasen. Weitere Nährstoffe, wie Cadmium, Mangan, Eisen, Zink und Kupfer spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle für den Biogasprozess. Das mikrobielle Wachstum ist abhängig von der Verfügbarkeit dieser Nährstoffe (Aust et al., 2011; Schattauer et al., 2011; Wall et al., 2014). Eine Unterversorgung der Mikronährstoffe führt zu einer unzureichenden Umwandlung der Biomasse. Die daraus resultierende Akkumulation der organischen Säuren kann eine Prozessinstabilität hervorrufen, wodurch der Biogas- und Methanertrag sinkt (Aust et al., 2011; Pobeheim et al., 2010).

Die Zugabe von Spurenelementen führt zu einer höheren Abbaurate des Acetats und Propinats und beeinflusst die Methanbildung. Im Vergleich mehrerer Studien kann geschlossen werden, dass die Reaktion der verschiedenen Mikronährstoffe zwischen den Prozessen variiert aufgrund der Substratzusammensetzung, dem Abbaumechanismus, den Betriebsparametern und der Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft (Karlsson et al., 2012).

Nickel und Kobalt sind wesentliche Cofaktoren zahlreicher Enzyme. Kobalt dient als Cofaktor für die Methyltransferase und der Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase (CODH), welches ein Schlüsselenzym für die Produktion und den Verbrauch von Acetat darstellt. Vorhanden ist dieses Enzym bei den acetogenen und den methanogenen Mikroorganismen. Eisen, Nickel, Schwefel und Selen sind ebenfalls wesentlich für die CODH sowie für die Aktivität vieler Hydrogenasen. Eisen und Nickel spielen als Bestandteile des Cofaktors  $F_{430}$  eine wichtige Rolle. Das  $F_{430}$  gehört zum Methyl-CoM-Reduktase-Komplexes, welches den letzten Schritt der Methanbildung katalysiert. Wolfram fungiert als Cofaktor in der Fe-S-Benzoyl-CoA-Reduktase, die den Abbau des Benzoyl-CoA katalysiert. Die Methyl-Reduktase benötigt Nickel als Cofaktor. Zur Synthese des Acetyl-CoA wird Eisen, Molybdän und Selen, die sowohl in der Formiat-Dehydrogenase als Cofaktor eingebunden sind, benötigt (Karlsson et al.,

2012; Schattauer et al., 2011). Anhang 2 und Anhang 3 zeigt eine detaillierte Übersicht über die wichtigsten Spurenelemente und deren Funktion.

Die Zugabe von Kobalt und Nickel erhöht die Prozessstabilität sowie die Biogasproduktion und den Methangehalt. Eine Überdosierung von Nickel kann zu einer Hemmung der Methanbildung führen (Demirel & Scherer, 2011). In der Literatur sind verschiedene Angaben zur Dosierung der einzelnen Spurenelemente zu finden. Schattauer et al. (2011) hat mit Hilfe der verschiedenen Literaturangaben die empfohlenen Konzentrationen der einzelnen Spurenelemente aufgelistet. Nach Pobeheim et al. (2010) soll Nickel eine Konzentration von 0,024 – 0,62 mg/L zugegeben werden und nach Weiland (2006) eine Konzentration von 0,005 – 0,5 mg/L. Die restlichen Autoren stimmen weitestgehend mit Weiland überein. Die empfohlenen Konzentration von Kobalt dagegen liegt nach Pobeheim et. al (2010) bei 0,024 – 10 mg/L und nach Weiland (2006) bei 0,003 – 0,06 mg/L. Nach Kloss (1986) soll sogar eine Konzentration von 0,5 – 20 mg/L dem Reaktor zugegeben werden. Die restlichen Autoren stimmen weitestgehend mit dem Werten von Weiland (2006) überein (Schattauer et al., 2011). Die Bioverfügbarkeit der Spurenelemente ist abhängig von ihrer chemischen Form. Der Vergärungsprozess umfasst eine komplexe Matrix von sowohl organischen als auch anorganischen Stoffen, wodurch sich die Bioverfügbarkeit bestimmter Nährstoffe nur schwer zu beurteilen ist. Die Spurenelemente sind im gesamten Medium nur anteilig verfügbar. Die meisten Nährstoffe sind in der festen Fraktion der Substrate vorhanden. Parameter, wie die Verschiebung des pH-Wertes oder die Temperatur, kann zum Ausfällen und/oder Chelation der Mikronährstoffe führen, wodurch die Bioverfügbarkeit reduziert wird (Wall et al., 2014).

### **3.3 Isotope**

#### **3.3.1 Was sind Isotope?**

Isotope sind Atome des gleichen Elements dessen Neutronenanzahl im Atomkern verschieden groß ist, wodurch diese eine unterschiedliche Kernmasse und eine relative Anordnung der Elementarteilchen (Geometrie) im Kern aufweisen. Aufgrund der gleichen Protonen- bzw. Kernladungszahl haben sie in der Hülle die gleiche Elektronenanzahl und gehören somit dem gleichen chemischen Element an (Bammel et al., 2000). In der Natur kommen hauptsächlich leichte Elemente mit einem Gemisch aus stabilen, nicht-radioaktiven Isotopen vor. Die Isotope unterscheiden sich ebenfalls im Kernvolumen, in der Spinquantenzahl und magnetischen Quantenzahl/ Moment und dem elektrischen Quadrupolmoment des Atomkerns (Abram, 2008; Bammel et al., 2000).

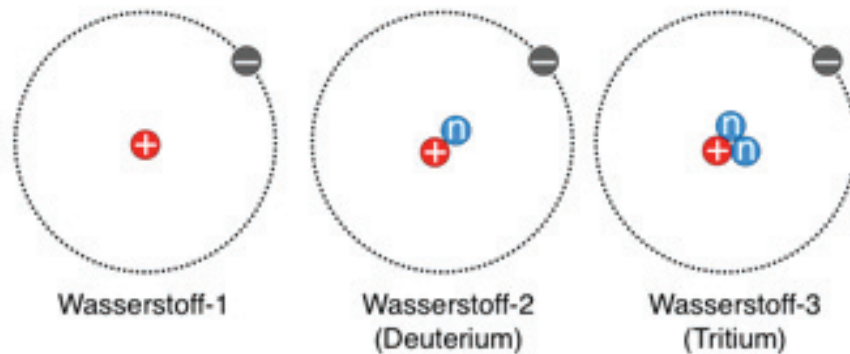


Abbildung 3: Isotope des Wasserstoffs (Ballkaschk, 2011)

Jedes Element besitzt mindestens drei Isotope. Ein Beispiel sind die Isotope des Wasserstoffes ( $H_2$ ) (siehe Abbildung 3).  ${}^1_1H$  besteht aus nur einem Proton, während das  ${}^2_1H$ , das Deuterium ( ${}^2_1D$ ), aus einem Proton und einem Neutron besteht. Das dritte Isotop des Wasserstoffes ist das Tritium ( ${}^3_1T$ ), welches aufgebaut ist aus einem Proton und zwei Neutronen (Bammel et al., 2000).

Isotope lassen sich in stabilen und radioaktiven Isotopen unterscheiden. Radioisotope (instabile Isotope) zerfallen mit der Zeit und geben dabei ionisierte Strahlung ab. Von diesen sind ca. 2700 bekannt. Dazu zählen alle Elemente, dessen Ordnungszahl über 83 ist. Einige Elemente, wie Radium und Uran, kommen in der Natur nur in Form von radioaktiven Nukliden vor (Abram, 2008; Bammel et al., 2000).

Von den stabilen Nukliden sind zurzeit 265 bekannt. Diese Zahl sinkt jedoch, da bei stabil gehaltenen Nukliden ein radioaktiver Zerfall nachgewiesen wurde (Abram, 2008). Die Elemente Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel besitzen natürliche Isotope (siehe Tabelle 1). In der Natur kommt es aufgrund von Isotopeneffekten zu Abweichungen der in der Tabelle gezeigten mittleren Häufigkeiten (Gimpel, 2011).

Tabelle 1: Bioelemente und die Häufigkeit ihrer stabilen Isotope (Gimpel, 2011)

Element	Stabile Isotope	Mittlere relative Häufigkeit [Atom-%]
Wasserstoff	$^1\text{H}$	99,9885
	$^2\text{H}$	0,0115
Kohlenstoff	$^{12}\text{C}$	98,93
	$^{13}\text{C}$	1,07
Stickstoff	$^{14}\text{N}$	99,632
	$^{15}\text{N}$	0,368
Sauerstoff	$^{16}\text{O}$	99,757
	$^{17}\text{O}$	0,038
	$^{18}\text{O}$	0,205
Schwefel	$^{32}\text{S}$	94,93
	$^{33}\text{S}$	0,76
	$^{34}\text{S}$	4,29
	$^{35}\text{S}$	0,02

Aufgrund der unterschiedlichen Bindungsenergie reagieren die isomeren Moleküle mit den schwereren Isotopen langsamer, als die mit den leichteren Isotopen. Dies hat zur Folge, dass sich beim mikrobiellen Abbau die Isotopenverhältnisse des Substrates ändern. Die Mikroorganismen bevorzugen Verbindungen mit leichteren Isotopen und es kommt während der Umsetzung zur Anreicherung schwererer Isotope. Die Änderung der Isotopensignatur und somit die Änderung der relativen Masse der Isotope eines Elements bewirkt eine Isotopenfraktionierung. Je höher der Massenunterschied, desto größer ist die zu erwartende Isotopenfraktionierung (Fischer, 2006; Gimpel, 2011). Durch den Massenunterschied kommt es bei bestimmten physikalisch-chemischen Prozessen zu einer Differenz der Nullpunktenergie der Bindungen, was einen Isotopeneffekt hervorruft. Die Nullpunktenergie ist proportional zur Schwingungsfrequenz (Simon, 1982). Der Isotopeneffekt beruht im geringen Maße auf die Kerneigenschaften, wie der Quadrupolmoment und der kernmagnetische Moment. Je kleiner der prozentuale Massenunterschied zweier Isotope ist, umso geringer ist der Isotopeneffekt (Simon & Palm, 1966). Beim kinetischen Isotopeneffekt reichern sich die Moleküle mit den schwereren Isotopen im nicht umgesetzten Teil der Ausgangsstoffe an, was eine Isotopen-



diskriminierung bei der Entstehung und Umsetzung von Substanzen verursacht. Der relative Massenunterschied des Wasserstoffes und des Deuteriums beträgt 100 %. Vom  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff beträgt der Massenunterschied ca. 8 % (Fischer, 2006; Gimpel, 2011).

In der Natur ruft der Transfer von Kohlenstoff eine Fraktionierung hervor, was eine Änderung der gleichmäßigen Verteilung der Kohlenstoff-Isotope hervorruft. Beispielsweise kommt es bei der  $\text{CO}_2$ -Fixierung während der Photosynthese zu einem kinetischen Isotopeneffekt. Dies führt zu unterschiedlichen  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen, da das  $^{13}\text{CO}_2$  langsamer als das  $^{12}\text{CO}_2$  reagiert. Es kommt zur Anreicherung des  $^{13}\text{C}$  im organisch gebundenen Kohlenstoff (Gimpel, 2011).

Im Allgemeinen sind durch die Isotopenfraktionierung aufgrund der chemisch-physikalischen Prozesse chemische Verbindungen entstanden, die mittels der Isotopenverhältnisse Auskunft über diese Prozesse geben können. Dadurch können Herkunft und Geschichte dieser chemischen Verbindungen ermittelt werden. In der Isotopensignatur sind zwei Arten von Informationen enthalten. Zum einen geben diese Auskunft über die Reaktionen und dessen Bedingungen und zum anderen gibt die Isotopenverteilung Aufschluss über den Ursprung der Verbindung (Martin et al., 2000; Penning, 2005).

### 3.3.2 Messung der Isotopensignatur mittels GC-IRMS

Die Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie (IRMS) ist das älteste Verfahren in der analytischen Chemie. Mit Hilfe der Entwicklung des Elementar Analyzer (EA) und des Thermal Conversion Elementar Analyzer (TC/EA) ist es möglich, dass die Proben online in das benötigte Messgas überführt werden können. Jedoch ist es mittels der EA-IRMS nicht möglich einzelne Probenbestandteile zu vermessen (Gimpel, 2011). Barrie et al. (1984) koppelte erstmals ein Gaschromatographen (GC) über ein Online-System an den Massenspektrometer (siehe Abbildung 4). Dadurch konnten, je nach Beschaffenheit des Interface, die Isotopenzusammensetzung von Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Wasserstoff einzelner Komponenten bestimmt werden. Mit Hilfe eines Doppelkollektor bzw. Dreifachkollektor, der im IRMS eingebaut ist, können Ionenströme von zwei bis drei Massen parallel erfasst werden (Gimpel, 2011). Mittels der vorgeschalteten GC, der über ein Interface an das IRMS gekoppelt ist, können die Zielverbindungen getrennt werden. Zur Analyse der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) wird dem GC ein Verbrennungsofen nachgeschaltet, der die chromatographisch getrennten Verbindungen zu Kohlendioxid oxidiert. Für die Analyse der Wasserstoff-Isotopenverhältnisse ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) wird die getrennte Substanz durch eine Hochtemperaturpyrolyseeinheit bei ca. 1400 °C zu elementarem Wasserstoff pyrolysiert. Die Messung

der Isotopensignatur erfolgt schließlich mit dem IRMS. Mittels eines Referenzgases ( $\text{CO}_2$  für  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $\text{H}_2$  für  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) mit bekannten Kohlenstoff- bzw. Wasserstoff-Isotopenverhältnissen wird die Signatur der Analyten bestimmt. Relativ zu einem internationalen Standard wird die Isotopensignatur als  $\delta$ -Notation angegeben (Fischer, 2006):

$$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}] = \left( \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Probe}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

Formel 3: Berechnung der Isotopensignatur des Kohlenstoffs (Fischer, 2006)

Als Bezugspunkt für die  $\delta$ -Notation des Kohlenstoffes kommt der Pee Dee Belemnite-Standard (PDB-Standard) zum Einsatz. Dieser ist ein fossiles Calciumcarbonat mit einem festen Isotopenverhältnis von  $[^{13}\text{C}/^{12}\text{C}] = (11237,2 \pm 2,9) \times 10^{-6}$ , was ein  $^{13}\text{C}$ -Gehalt von 1,1112328 Atom-% entspricht (Lv et al., 2014b). Für die  $\delta$ -Notation des Wasserstoffes wird das Vienna-Standard-Mean-Ocean-Water (V-SMOW) verwendet mit einem festen Isotopenverhältnis von  $[^2\text{H}/^1\text{H}] = (15576 \pm 0,05) \times 10^{-6}$  (Fischer, 2006).

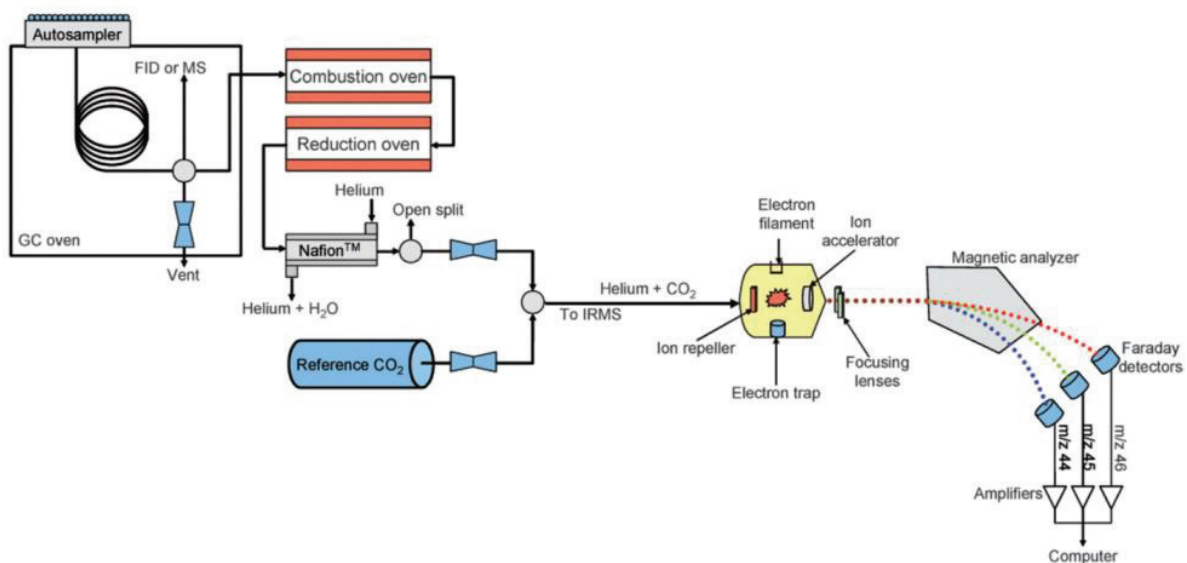


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines GC-IRMS (Lancashire, 2011)

### 3.3.3 Analyse der Isotopensignatur des Biogases

Die heutigen Schwerpunkte im Bereich Biogas liegen nicht mehr im Bau von Biogasanlagen, sondern in der Optimierung und Effizienzsteigerung bestehender Anlagen. Um dies zu realisieren ist eine optimale Prozessüberwachung Voraussetzung. Für die momentane Über-



wachung der Prozesse finden bereits einige Parameter Anwendung, wie beispielsweise die Bestimmung der flüchtigen Fettsäuren und das Verhältnis flüchtiger organischer Säuren zum gesamten anorganischen Carbonat (FOS/TAC) sowie den pH-Wert und die mikrobielle Analyse. Diese Kenngrößen weisen jedoch einige Mängel auf. Beispielsweise geben sie meist erst Auskunft über eine Prozessstörung, wenn diese bereits eingetreten ist. Des Weiteren ist die Verfügbarkeit adäquater Sensoren oder Onlineinstrumente begrenzt und die Messungen sind meist sehr zeitaufwendig. Viele dieser Parameter können erst im Labor analysiert werden. Dadurch ergeben sich erhebliche zeitaufwendige Kriterien, wie die Probenahme, die Analyse, die Auswertung der Ergebnisse und dessen Versand zurück an den jeweiligen Biogasanlagenbetreiber. Aufgrund dessen besteht die primäre Aufgabe darin, einen Weg zu finden, Prozessänderungen vorzeitig zu erkennen, damit Störungen schnell behoben werden können. Dies ermöglicht die Analyse der Isotopensignatur des Biogases zur Rekonstruktion der biochemischen Prozesse. Mit dieser Methode lässt sich, aufgrund der Bestimmung der Methan- und Kohlendioxid-Isotope, eine grobe Bewertung abgeben, welcher Methanbildungsweg vorherrscht (Nikolauz et al., 2013; Polag et al., 2015).

Moleküle mit schwereren Isotopen reagieren in biochemischen Reaktionen langsamer als Moleküle mit leichteren Isotopen. In den beiden primären Methanbildungswegen unterscheiden sich die kinetischen Kohlenstoff- und Wasserstoff-Isotope. Sowohl der acetoklastische als auch der hydrogenotrophe Weg hat ein spezifisches Isotopenmuster des Methans. Die Häufigkeit der Fraktionierung hängt dabei vom spezifischen Bildungsweg ab. Die Änderung des vorherrschenden Methanbildungsweges spiegelt sich in der Änderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte wieder. Dieser Parameter kann letztendlich als Frühwarnindikator für Prozessstörungen genutzt werden (Nikolauz et al., 2013; Polag et al., 2015):

Zur Beurteilung des vorherrschenden Methanbildungsweges wird die Isotopensignatur von Methan und Kohlendioxid gemessen. Die  $\delta^{13}\text{CH}_4$ - und  $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte werden genutzt, um den Fraktionierungsfaktor ( $\alpha_c$ ) berechnen (Nikolauz et al., 2013):

$$\alpha_c = \frac{(\delta^{13}\text{CO}_2 + 1000)}{\delta^{13}\text{CH}_4 + 1000}$$

*Formel 4: Berechnung des Fraktionierungsfaktors  $\alpha_c$*

Ist  $\alpha_c > 1,065$  (Nikolauz et al., 2013) dominiert der hydrogenotrophe Methanbildungsweg und wenn  $\alpha_c < 1,025$  (Lv et al., 2014a) ist die acetoklastische Methanogenese vorherrschend. Liegt

der Wert zwischen 1,065 und 1,025 sind beide Bildungswege vorhanden (Nikolauz et al., 2013).

Es wird vermutet, dass es über den hydrogenotrophen Methanbildungsweg zur Anreicherung des  $^{12}\text{C}$  kommt, was zum Verbrauch von  $\delta^{13}\text{CH}_4$  führt. Die acetoklastischen Methanogene sollen dagegen einen isotopisch schwereren Kohlenstoff besitzen, was zur Anreicherung der Isotopenverhältnisse von Methan führt (Nikolauz et al., 2013; Polag et al., 2015).

Die Messung der Isotopensignatur während des Biogasprozesses ist zur Beurteilung des vorherrschenden Methanbildungsweges eine vielversprechende Methode, jedoch ist eine Kalibrierung mit einer alternativen Methode notwendig, wie die molekularbiologische Analyse. Diese Methode gibt einen Einblick in die Vielfalt und Dynamik der Archaeen-Gemeinschaft, die am anaeroben Vergärungsprozess beteiligt sind. Die Erweiterung der Archaea-16S-rRNA-Gene durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) gefolgt von Klonierung und Sequenzierung gibt eine erste Bewertung über die Vielfalt der methanogenen Gemeinschaft ab. Aus den PCR-Produkten kann anschließend eine molekulare Fingerprinting-Analyse der 16S-rRNA-Gene erfolgen. Diese ermöglichen einen schnellen Vergleich der zahlreichen Proben und somit die Ermittlung der Prozessparameter sowie die zeitliche als auch räumliche Verschiebung der methanogenen Gemeinschaftsstruktur. Anwendung findet dabei die Gelelektrophorese, die Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) oder die Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). Die Analyse der funktionellen Gene ist eine alternative Herangehensweise zur rRNA-basierenden Methode. Diese erlaubt die gezielte Ermittlung der verschiedenen funktionalen Gilden. Das *mcrA*-Gen der alpha-Untereinheit der Methyl-CoM-Reduktase fungiert dabei als Molekularmarker für die Bewertung der Methanbildner. Die molekularbiologischen Methoden sind jedoch sehr langwierig und teuer und damit unpraktisch für die Prozessüberwachung industrieller Biogasanlagen (Nikolauz et al., 2013).

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Versuchsanlage

Der Versuch wurde in drei semi-kontinuierlich geführten Biogasreaktoren im Labormaßstab durchgeführt. Dabei handelte es sich um vollständig durchmischte stehende 15 L – Rührkesselreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 10 L (siehe Abbildung 5). Die Durchmischung des Fermenterinhalt es erfolgte über Rührwerke (RZR 2102 control, Heidolph, Schwabach), die zunächst bei 100 rpm und anschließend bei 150 rpm, mit modifizierten Ankerrührern rührten. Über einen Trommelgaszähler (TG 05, Ritter, Bochum) wurde die produzierte Gasmenge erfasst (siehe Abbildung 5). Die Erfassung der Gaszusammensetzung erfolgte über ein Gasanalysegerät (AWIFLEX Serie 7, Awite Bioenergie GmbH, Langenbach-Niederhummel), bei dem die Komponenten Methan und Kohlendioxid über eine Infrarotgasanalyse und Sauerstoff, Wasserstoff sowie Schwefelwasserstoff über elektrochemische Sensoren erfasst wurden. Die Fermenter arbeiteten unter mesophilen Bedingungen bei ca. 37 °C. Die organische Raumbelastung betrug 5 g<sub>oTS</sub>/L\*d und die hydraulische Verweilzeit 40 Tage.

Als Substrat kam Maissilage zum Einsatz. Zur Lagerung wurde die Silage in Beuteln vakuumiert, eingeschweißt und in einer Kühlzelle bzw. Kühlcontainer bei 10 °C aufbewahrt. Im Laufe des Versuchszeitraumes kamen mehrere Chargen für den Versuch zum Einsatz. Die Beschickung fand täglich statt.

Das Inokulum stammte von einem Laborfermenter (Interne Bezeichnung: R3.2), der ebenfalls mit Maissilage beschickt wurde und als Inokulumbehälter für mehrere Versuchsansätze diente.



Abbildung 5: Laborfermenter. Unten: der stehende Rührkessel mit aufgebrachtem Fütterungstrichter. Oben: die Gasuhr

## 4.2 Versuchsdurchführung

Die Reaktoren wurden am 15.04.2015 in Betrieb genommen. Die drei Fermenter bekamen zu dem Zeitpunkt die gleiche Versorgung mit einer im Labor hergestellten Spurenelementlösung (siehe Tabelle 2). Nachdem alle Reaktoren einen parallelen Biogasprozess aufwiesen, begann am Versuchstag 47 (01.06.2015) die induzierte Instabilität (siehe Tabelle 3)

Tabelle 2: Zusammensetzung der Spurenelementlösung (SE-Lösung)

<b>Chemische Verbindung</b>	<b>Massenkonzentration [g/L]</b>
CaSe	0,04
Co(II)Cl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	0,382
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> H <sub>2</sub> W <sub>12</sub> O <sub>40</sub> · xH <sub>2</sub> O	0,042
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,508
Ni(II)Cl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	3,403
ZnCl <sub>2</sub>	22,252
Mn(II)Cl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O	53,757
Fe(III)Cl <sub>3</sub> x6H <sub>2</sub> O	610,074

Tabelle 3: Versuchsdurchführung und tägliche Spurenelementzugabe

<b>Versuchstag [d]</b>	<b>Referenz: 100%</b> <b>(Interne Bez.: R8.10)</b>	<b>Versuchsreaktor 1: 50%</b> <b>(Interne Bez.: R8.11)</b>	<b>Versuchsreaktor 2: 0%</b> <b>(Interne Bez.: R8.12)</b>
0 (15.04.15)	Inbetriebnahme	Inbetriebnahme	Inbetriebnahme
	100 % SE-Lösung 1,15 mL/d	100 % SE-Lösung 1,15 mL/d	100 % SE-Lösung 1,15 mL/d
47 (01.06.15)	100 % SE-Lösung 1,15 mL/d	50 % SE-Lösung 0,575 mL/d	Keine SE-Lösung
200 (02.11.15)	100 % SE-Lösung 1,15 mL/d	25 % SE-Lösung 0,287 mL/d	Außer Betrieb

Mehrmals pro Woche wurden prozessbiologische Analysen durchgeführt (siehe Tabelle 4). Dies sind zum einen die Bestimmung des TS/oTS-Gehaltes, der pH-Wert, die FOS- und FOS/TAC-Analyse, die Bestimmung des Ammoniumstickstoffgehaltes sowie die Analyse der organischen Fettsäuren (Durchführung siehe Analysemethoden). Zusätzliche Untersuchungen ergaben sich in der Messung der Isotopensignatur, die molekularbiologische Analysen sowie die Bestimmung des Spurenelementgehaltes (SE) im Gärsubstrat.

Tabelle 4: Regulärer Analysenplan (Abweichungen vorbehalten)

	<b>Referenz</b>	<b>50 %</b>	<b>0 %</b>
<b>pH-Wert</b>	3x pro Woche	3x pro Woche	3x pro Woche
<b>TS/oTS</b>	Alle 2 Wochen	Alle 2 Wochen	Alle 2 Wochen
<b>FOS, FOS/TAC</b>	1x pro Woche	2x pro Woche	3x pro Woche
<b>NH<sub>4</sub>-N</b>	1x pro Woche	2x pro Woche	3x pro Woche
<b>GC-Säuren</b>	1x pro Woche	2x pro Woche	3x pro Woche
<b>Isotopen</b>	1x pro Woche	2x pro Woche	3x pro Woche
<b>SE-Analyse</b>	1x pro Woche	2x pro Woche	3x pro Woche
<b>Molekularbiol. U.</b>	1x pro Woche	2x pro Woche	3x pro Woche

Für die Isotopenanalyse, der Spurenanalyse und der molekularbiologischen Untersuchung wurden nur die Proben genommen. Die Vermessung erfolgte extern.

Von der Maissilage erfolgten alle zwei Wochen eine TS/oTS-Bestimmung sowie eine Analyse der organischen Säuren durchgeführt.

Der Ammoniumstickstoffgehalt wurde in allen drei Fermenter konstant bei ca. 2 g/L eingestellt. Die Berechnung der Menge an Harnstoff erfolgte nach Folgender Formel:

$$m_H \text{ [g]} = (2 \text{ g/L} - y) \times 10 \text{ L} : 0,47$$

$m_H$  = Menge an Harnstoff [g]

$y$  = Analysierter Ammoniumstickstoffgehalt im Fermenter [g/L]

47 % = prozentuale Anteil an Stickstoff im Harnstoff

*Formel 5: Berechnung der Harnstoffmenge*

Die Auswertung der molekularbiologische Untersuchung war nicht Aufgabe dieser Arbeit. Sie war Bestandteil weiterer Untersuchungen am DBFZ. Für die Diskussion werden die Ergebnisse mit angeführt.

### 4.3 Analysemethoden

#### 4.3.1 pH-Wert

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte mittels eines pH-Meters (Typ pH 3310, WTW GmbH, Weilheim). Für die Messung wurde die pH-Elektrode in die zu untersuchende Probe gehängt und der pH-Wert abgelesen.

#### 4.3.2 Bestimmung des TS- und oTS-Gehaltes

##### ***Bestimmung von Flüssigen Substanzen:***

Die Bestimmung der Trockensubstanz und der organischen Trockensubstanz erfolgte in Anlehnung an die DIN 12880 bzw. DIN 2879 (*Messmethodensammlung Biogas*, 2013). Zur Untersuchung des TS-Gehaltes wurde zunächst ein geglähter, getrockneter Tiegel mittels einer Feinwaage (sartorius, Göttingen) leer gewogen. Anschließend erfolgte die Einwaage von 5 g des Gärsubstrates und das Eintragen der Daten ins Protokoll. Die Probe kam über Nacht in den Trockenschrank (Binder, Tuttlingen) bei 105 °C. Nach 24 h konnte von einer Gewichtskonstanz ausgegangen werden (hausinterne Untersuchungen DBFZ). Das Gewicht des Tiegels mit der getrockneten Probe wurde anschließend vermerkt. Zur Bestimmung des oTS-Gehaltes erfolgte das Glühen der Tiegel mit der getrockneten Probe im Muffelofen für 3,5 h. Der Durchgang lief 2 h bei 550 °C. In der restlichen Zeit erfolgte das Hoch- und Runterheizen des Ofens. Anschließend wurden die Tiegel zum Auskühlen in den Exsikkator gestellt und nochmal gewogen.

Die Formeln zur Berechnung des TS- und oTS-Gehalts siehe Anhang 4 und Anhang 5.

##### ***Bestimmung von inhomogenen Substanzen (z.B. Maissilage)***

Für die TS/oTS-Bestimmung von Maissilage wurden größere Mengen von 200 – 250 g in flache Schalen eingewogen. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben. Die Probe wurde getrocknet und die Masse festgehalten. Zur Ermittlung des oTS-Gehaltes erfolgte das Mahlen der getrockneten Probe auf ca.  $\leq 1$  mm mit einer Messermühle (Retsch GM 300, Retsch GmbH, Haan). Anschließend wurde eine repräsentative Probe genommen und die TS/oTS-Bestimmung wie beschrieben durchgeführt.



### 4.3.3 Probenvorbereitung

Aufgrund des hohen Feststoffgehaltes im Gärsubstrat mussten die Proben vor der Analytik vorbehandelt werden. Dazu wurde die zu untersuchende Probe in 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und für 10 min bei 10000 g und 10 °C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Anschließend überführte man das Zentrifugat durch ein Sieb mit einer Maschenweite von ca. 1 mm in Probenbecher.

### 4.3.4 Bestimmung des FOS-Wertes nach Kapp und FOS/TAC-Wert nach FAL

Zur Bestimmung der flüchtigen organischen Säuren (FOS) wurde die Methode nach Kapp angewandt. Die Ermittlung des FOS/TAC-Wertes erfolgte nach FAL. Beide Verfahren wurden in einem Arbeitsdurchgang durchgeführt. Voraussetzung ist ein pH-Wert > 5. Anwendbar sind diese Methoden für Gärsubstrate und flüssige Substanzen, bei denen durch zentrifugieren die Flüssigphase vom Feststoff abgetrennt wurde. Zur Analyse erfolgte die Überführung von 10 g der Klarphase in einen Probenbecher für den Titrator (Mettler Toledo Typ Rondo 60/T90, Mettler-Toledo GmbH, Gießen). Anschließend wurde, zur Bestimmung des FOS-Wertes 0,2 N Schwefelsäure in Stufen bis zu einem pH-Wert von 5,0; 4,3 und 4,0 titriert. Zur Ermittlung des FOS/TAC-Wertes erfolgte zusätzlich die Titration bis pH 4,4. Anhand der verbrauchten Schwefelsäuremenge ließ sich der FOS- der FOS/TAC-Wert berechnen (siehe Anhang 6 und Anhang 7).

### 4.3.5 Bestimmung des Ammoniumstickstoffgehalts

Die Bestimmung des Ammoniumstickstoffgehaltes erfolgte nach dem Prinzip von Neßler. Zum Einsatz kam die Neßler-Reagenz (HACH LANGE GmbH), welche Kaliumhydroxid und Kaliumtetraiodomercurat (II) ( $K_2[HgI_4]$ ) enthielt. Mit Ammoniak bildet Neßler einen rot-braunen Farbkomplex ( $Hg_2N$ ), das Iodid des Kations der Millonschen Base. Mit Hilfe dieses Komplexes konnte der Ammoniumstickstoffgehalt im Photometer (Hach Lange DR 300, HACH LANGE GmbH, Düsseldorf) bestimmt werden.

Zur Analyse wurden 0,5 g der Probe eingewogen und mit 4,5 mL destilliertem Wasser vorverdünnt (1:100). Für die zweite Verdünnung gab man 0,25 mL der Vorverdünnung in ein 25 mL-Maßkolben und füllte diesen mit destilliertem Wasser auf. 25 mL der verdünnten Probe wurden in eine Küvette gefüllt und 3 Tropfen Mineralstabilisierer (HACH LANGE GmbH, Loveland, CO, USA) sowie 3 Tropfen Polyvenylalkohol (HACH LANGE GmbH, Loveland, CO, USA) zugegeben. Es erfolgte das Homogenisieren der in der Küvette enthaltenen Flüssigkeit. Zunächst wurde die Eigenfärbung angeglichen. Anschließend erfolgte die Zugabe von



1 mL Neßler-Reagenz, welche durch sanftes Schwenken durchmischt wurde. Nach einer Reaktionszeit von 2 min konnte die Probe vermessen werden.

#### 4.3.6 Bestimmung der organischen Säuren mittels Head-Space-GC

Bei der Analyse der organischen Säuren wurden folgende Säuren bestimmt:

Essigsäure, Propionsäure, ISO-Buttersäure, n-Buttersäure, ISO-Valeriansäure, n-Valeriansäure und Hexansäure.

Verwendet wurde ein Head-Space-GC (GC: Aglient 7980A, Aglient Technologies, Santa Clara, CA, USA; Head-Space Probengeber: PerkinElmer Turbo Matrix 110, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) welches sich gut für die Bestimmung des Gehaltes flüchtiger Substanzen in Proben mit komplexen Matrizen eignet. Um den Einfluss verschiedener Matrizes gerecht zu werden erfolgte die Zugabe von 2-Ethylbuttersäure als interner Standard (ISTD). Durch die Zugabe von Phosphorsäure wurden die Säuren in ihre undissoziierte Form überführt und in einen leicht flüchtigen Zustand versetzt.

Die Analyse erfolgte in dreifach-Bestimmung. Es wurden 5 g der Probe in jeweils drei Head-space-Vials pipettiert und 1 mL ISTD sowie 1 mL Schwefelsäure zugegeben. Es erfolgte das Verschließend der Vials mit Caps mittels einer elektrischen Crimpzange (Aglient Technologies, Santa Clara, CA, USA).

In Anhang 8 ist die verwendete Kalibrierung für den GC dargestellt. Anhang 9 und Anhang 10 beschreiben die Parameter des Gaschromatographen bzw. des Head-Space-Probengebers.

#### 4.3.7 Isotopenanalyse

Die Gasproben wurden in Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig analysiert. Die Durchführung der Untersuchung erfolgte durch das Department Bioenergie (UFZ). Die Probenahme der Gasprobe erfolgte vor und ca. 4 h nach der Beschickung mittels einer 20 mL-Spritze aus dem Kopfraum des Biogasreaktors. Das entnommene Gas wurde in 20 mL evakuierte Vials injiziert. Die Analyse der Isotopensignatur erfolgte mittels eines Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (Finnigan MAT 253, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gekoppelt mit einem Gaschromatographen (HP 6800 Series, Aglient Technologies, USA) über eine Verbrennungseinrichtung für die Kohlenstoffanalyse bzw. über eine Pyrolyseeinheit für die Wasserstoffanalyse. Für die Isotopenmessung wurden 25 – 50 µL der Probe in den IRMS injiziert. Als Trägergas diente Helium welches man auf 1:40 bzw. 1:50 für die Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffanalyse anpasst. Die Kohlenstoff- und Wasserstoff-Isotopenzusammensetzung wurde als  $\delta$ -Notation ( $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^{12}\text{H}$ -Wert) in ‰ relativ

zum V-PDR bzw. V-SMOW wiedergegeben. Jede Probe wurde mindestens zweimal vermessen. Die Kohlenstoff- und Wasserstoff-Isotopenzusammensetzung wird ausgedrückt als  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta\text{D}$ -Wert:

$$\delta_x = \left[ \frac{(R_a)_{Probe}}{(R_a)_{Probe}} - 1 \right] \times 10^3 \text{ [‰]}$$

*Formel 6: Berechnung der Kohlenstoff- und Wasserstoff-Isotopenzusammensetzung*

$R_a$  beschreibt das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - oder D/H-Verhältnis.

Berechnung des Fraktionierungsfaktors [ $\alpha_c$ ] siehe *Formel 4*

#### 4.3.8 Spurenelementanalyse

Die Analyse der Spurenelemente erfolgte in Kooperation mit der Universität Göttingen. Die Probenahme fand mehrmals die Woche statt und wurde bis zur Untersuchung bei  $-20\text{ °C}$  im Tiefkühlschrank zwischengelagert.

Zunächst erfolgte die Ermittlung des TS-Gehaltes der Probe. Anschließend kam die getrocknete Probe in eine Planetenkugelmühle mit Mahlbechern und –kugeln aus reinem Achat (pulverisette Typ 05.102, Fritsch, Idar-Oberstein) und wurde für 10 min auf eine Korngröße von ca. 0,125 mm gemahlen. Zur Bestimmung des Elementgesamtgehaltes durch die Multi-elementaranalyse wurden etwa 400 mg des gemahlenen, homogenen Probenpulvers in einem Säuretotalaufschlussverfahren unter Einsatz eines Gemisches aus jeweils hochreiner 65 %iger Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ ), 40 %iger Flußsäure (HF) und 70 %iger Perchlorsäure ( $\text{HClO}_4$ ) unter Druck und Temperatur vollständig in Lösung gebracht. Anschließend erfolgte der Aufschluss zusammen mit einer Blind- und einer international zertifizierten Referenzprobe in PTFE-Gefäßen über verschiedene Phasen (Vorreaktion-, Druck-, Abrauch- und Auflösephase). Der komplette Säuretotalaufschluss von Fermenterproben dauerte ca. acht Tage.

Im nächsten Schritt erfolgte die Multianalyse ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry). Hierbei wurde mit einem optischen Emissionsspektrometer (Agilent 5100 VDV, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), induktiv gekoppelt mit einem Argon-Plasma als Quelle, durchgeführt. Das Plasma hatte eine Temperatur von 5000 bis 10000 K wodurch es zur Ionisation vieler Elemente kam. Für die Berechnung der Konzentrationen wurden die Intensitäten der Spektrallinien der angeregten Proben gemessen und mit Intensitäten von verschiedenen Kalibrationslösungen verglichen. Der Gerätedrift konnte

durch die mehrfache Mitmessung einer Kalibrationslösung (Quality Control) bestimmt und die Messwerte demnach driftkorrigiert werden.

Bei der Multielementanalyse ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry), analog zur Multielementanalyse ICP-OES, wurde mit einem Standardmassenspektrometer (Elan DRC II, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die Elemente einer Probe führte man als Aerosol in den Argonstrom einer Fackel, in der das Aerosol durch induktiv gekoppelte, hochfrequente Energie im heißen Plasma (bis 10000 K) vollständig ionisiert wird. Nach der Fokussierung im Quadrupolfeld wurden die Ionen anschließend nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt und durch mehrfach Mitmessung einer QC-Lösung bzw. der mitgemessenen internen Standartelemente (Be, Rh, In und Re) korrigiert.

Die jeweiligen Element-Nachweisgrenzen konnten über die dreifache Standardabweichung der mitgemessenen Blindwerte berechnet und die Richtigkeit der Analyse über die mitgemessenen international zertifizierten Referenzproben geprüft werden. Die Elementgesamtgehalte wurden dann nach Blindwertabzug, der Umrechnung auf die Festphase und unter Berücksichtigung der jeweiligen Nachweisgrenzen dargestellt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Auswertung Gärversuch

Zur Untersuchung und Beurteilung des Spurenelementmangels auf den Biogasprozess wurde ein Gärversuch in drei baugleiche quasikontinuierliche Biogaslaborreaktoren unter mesophilen Bedingungen durchgeführt. Die Raumbelastung betrug  $5 \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L} \cdot \text{d}$  und die Verweilzeit 40 Tage.

Der Referenzreaktor bekam die optimale Spurenelementversorgung (100 %), da dessen Analyseergebnisse als Bezugswerte dienten, um die Wirkung des Mikronährstoffmangels zu beurteilen. Versuchsreaktor 1 wurden 50 % der Spurenelementlösung zugesetzt und bei Versuchsreaktor 2 blieb die Zugabe des Additivs aus (0 %). Der Versuch des spurenelementreduzierten Fermenters wurde noch nicht beendet, da dieser noch keine prozessbiologische Instabilität aufzeigte (Stand 23.03.2016). Die Betrachtung und Auswertung des Versuches erfolgte bis zum 327. Versuchstag (08.03.2016).

Die Anlaufphase betrug 46 Tage, in denen alle drei Reaktoren gleich behandelt wurden. Nachdem die Fermenter auf gleichem Niveau waren, konnte die induzierte Instabilität der Versuchsreaktoren eingeleitet werden. Die Reaktoren liefen in den ersten drei Verweilzeiten sowohl stabil als auch parallel und waren den gleichen Schwankungen unterlegen. In Tabelle 5 ist die durchschnittliche Biogasproduktion am Tag in den ersten drei Phasen aufgeführt. Das produzierte Volumen blieb in allen Reaktoren ähnlich.

Tabelle 5: Durchschnittliche Gasproduktion am Tag in den ersten drei Phase und deren Standardabweichung

Verweilzeiten	Referenz	Versuchsreaktor 1	Versuchsreaktor 2
1. HRT (47 – 85 d)	35 L/d $\pm$ 2	35 L/d $\pm$ 3	36 L/d $\pm$ 2
2. HRT (86 – 125 d)	34 L/d $\pm$ 2	34 L/d $\pm$ 2	35 L/d $\pm$ 2
3. HRT (126 – 166 d)	33 L/d $\pm$ 2	33 L/d $\pm$ 2	34 L/d $\pm$ 2

Am Versuchstag 125 kam es zum Ausfall eines Thermostates, wodurch die Reaktoren für eine gewisse Zeit nicht beheizt wurden. Dies hatte jedoch keine negativen Auswirkungen auf den Prozess. Das Problem wurde noch am selben Tag behoben.

In den Punkten 5.1.1 und 5.1.2 erfolgt die Betrachtung der einzelnen Versuchsreaktoren im Vergleich zur Referenz. Im Folgenden wurden die Parameter und Analyseergebnisse ab der Indizierung betrachtet.

### **5.1.1 Auswertung Versuchsreaktor 2**

Der Verlauf der spezifischen Biogasproduktion der Referenz sowie des Versuchsreaktors 2 gegenüber dem FOS/TAC ist in Abbildung 7 dargestellt. Wie oben beschrieben liefen die Reaktoren in den ersten drei Verweilzeiten noch parallel und stabil. Aufgrund des Ausbleibens der erwarteten Prozessinstabilität, erfolgte eine Ursachensuche. Es kam der Verdacht auf, dass durch das Leitungswasser geringen Mengen an Spurenelementen eingetragen wurden. Daher erfolgte am 139. Versuchstag die Zufuhr an destilliertem Wasser, anstatt dem normalem Leitungswasser. Das Wasser wurde auf den Gehalt an Chrom, Cobalt, Eisen, Nickel u.a. untersucht. Die Spurenelemente waren nur in sehr geringer Konzentration vorhanden oder nicht nachweisbar. Damit konnte dieser Verdacht nicht bestätigt werden.

Am 146. Versuchstag, fand ein Austausch der Rührer statt. Die neuen Rührer wurden mit Acrylamid beschichtet. Der Grund hierfür war ebenfalls der Verdacht, dass durch die Rührer geringe Konzentrationen an Spurenelementen in den Reaktorprozess gelangten. Die Analyse des Spurenelementgehaltes im Gärsubstrat erfolgte durch die Universität Göttingen. Für diesen Zeitpunkt lagen noch keine konkreten Ergebnisse vor, die diesen Verdacht bestätigten konnten.

Der Austausch der Rührer konnte positiv bewertet werden, da es ab dem 166. Versuchstag zu einer Instabilität des Prozesses kam. Dies äußerte sich im exponentiellen Anstieg des FOS/TAC-Wertes, während die spezifische Gasproduktion abnahm (siehe Abbildung 7). Der Zeitraum des Zusammenbruchs betrug ca. 25 Tage. Die Versäuerung des Reaktorinhaltes äußerte sich sowohl optisch als auch olfaktorisch. Das Gärsubstrat nahm eine hellbraune bis giftgrüne Farbe an (siehe Abbildung 6) und der Geruch war beißend, stechend. Des Weiteren kam es zur Schaumbildung und die Viskosität nahm zu.

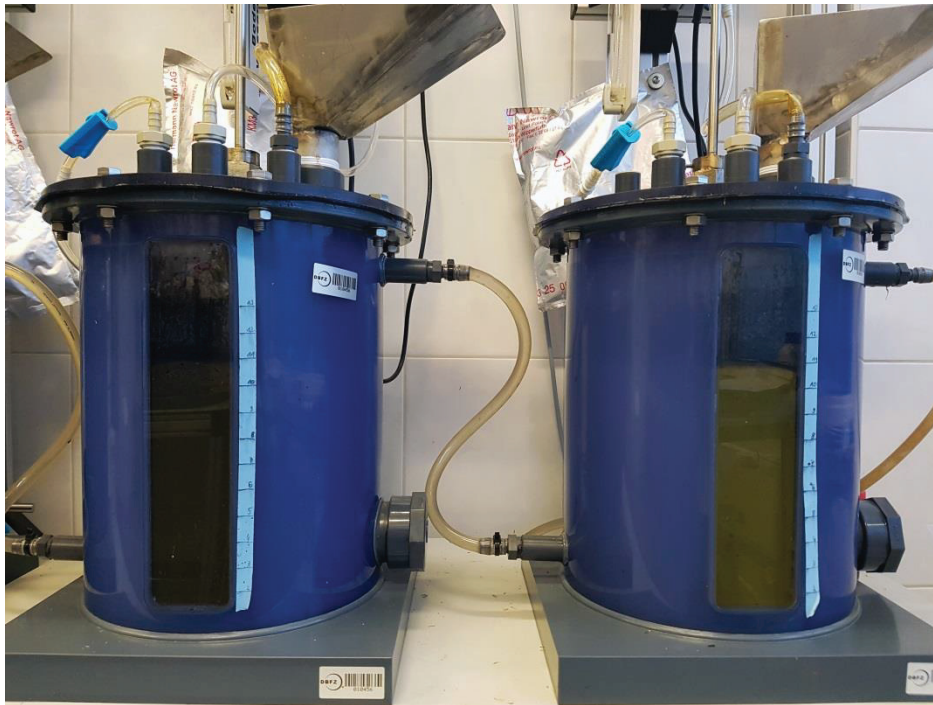


Abbildung 6: Versäuerung des Reaktors (Rechts der versauerte und Links der stabil laufenden Fermenter)

Der FOS/TAC-Wert der Referenz lag im Durchschnitt bei 0,22 und der des Versuchsreaktors 2, vor der Instabilität, bei 0,24. In der Literatur gibt es verschiedene Grenzwerte bzw. Optimalwerte bezüglich des FOS/TAC-Wertes. Nach Kaiser et al. (2008) sollte der Wert 0,8 nicht übersteigen, da ab dem Punkt der Prozess gehemmt werden kann. Nach Lindorfer (2014) befindet der Reaktor sich im kritischen Zustand bei einem  $\text{FOS/TAC} \geq 1$ . Diese Parameter können jedoch nicht als Faust-Werte betrachtet werden, aufgrund der Adaptionfähigkeit der Mikroorganismen und die Zusammensetzung des Substrates. Nach Linke et al. (2011) deutet ein FOS/TAC von 0,3 – 0,4 in der Regel auf eine gut belastete Biogasanlage hin. Bei der Abschlussanalyse (191. Versuchstag) konnte ein FOS/TAC von 8,37 im spurenelementverarmten Fermenter ermittelt werden.

Die Konzentration der flüchtigen organischen Säuren lag im Referenzreaktor durchschnittlich bei 1,56 g/L. Im Zeitraum, als der Versuchsreaktor 2 noch stabil war, lag der FOS durchschnittlich bei 1,86 g/L. Dieser Parameter beschreibt die Gesamtkonzentration der flüchtigen organischen Säuren. Der FOS-Gehalt erreichte im spurenelementverarmten Fermenter einen Höchstwert von 19,05 g/L, was auf eine hohe Akkumulation der Säuren hindeutet. Für sich alleine ist er FOS jedoch kein Maß für eine Hemmung. Der FOS/TAC dagegen kann als Maß für die Versäuerung betrachtet werden, da es das Verhältnis der Gesamtkonzentration an





Wert des Referenzreaktors lag bei 7,25 und der des Versuchsreaktors 2, vor der Instabilität, bei 7,38. Nach Einsetzen der Versäuerung bleibt der pH-Wert zunächst noch stabil. Dies kam daher, dass das Puffersystem bei vermehrter Säurebildung das Absinken des pH-Wertes vermindert, indem die Wasserstoffionen ( $H^+$ ) neutralisiert wurden. Da die Fettsäuren akkumulierten wurde der Puffer stark belastet und dessen Konzentration nahm ab, wodurch der pH-Wert sank (Hecht et al., 2007). Als der pH-Wert anfang zu sinke lag der FOS/TAC bereits bei 0,77 und der FOS bei 5,23 g/L. Bei der Abschlussanalyse lag der pH bei 4,73. Die methanogenen Archaeen reagieren sehr empfindlich auf Milieuänderungen. Durch die Absenkung des pH-Wertes verringerten sie ihre Stoffwechselrate oder wurden inaktiviert, wodurch die Biogasproduktion zurückging (Hecht et al., 2007).

Im Laufe der Prozessinhibierung des spurenelementverarmten Fermenters stieg der Anteil an Kohlendioxid im Gas an, während der Anteil an Methan zurückging. Durch das Absinken des pH-Wertes wurde Kohlendioxid freigesetzt aufgrund der Entgasung des Carbonat-Puffersystems. Bei der Abschlussanalyse bestand das Biogas aus knapp 91 %  $CO_2$ , während der Methananteil nur noch ca. 6 % betrug. In Tabelle 6 sind zum Vergleich der durchschnittliche Methan- und Kohlendioxidanteil im Biogas in den ersten drei Verweilzeiten vor der Prozesshemmung des spurenelementverarmten Fermenters aufgeführt.

Tabelle 6: Durchschnittlicher  $CH_4$ - und  $CO_2$ - Anteil im Biogas und dessen Standardabweichung in den ersten drei Phasen des Versuchsreaktors 2

<b>Verweilzeiten</b>	<b>Methananteil [%]</b>	<b>Kohlendioxidanteil [%]</b>
1. HRT (47 – 85 d)	$54 \pm 1,27$	$46 \pm 1,27$
2. HRT (86 – 125 d)	$55 \pm 0,89$	$45 \pm 0,89$
3. HRT (126 – 166 d)	$55 \pm 1,62$	$45 \pm 1,61$

In Abbildung 8 und Abbildung 9 sind der Verlauf der Konzentrationen der flüchtigen Fettsäuren der Referenz bzw. des Versuchsreaktors 2 dargestellt. Im Referenzreaktor lag die durchschnittliche Essigsäurekonzentration bei 79 mg/L und die der Propionsäure bei 22 mg/L. Die Konzentration der Iso-Buttersäure betrug 0,3 mg/L und die der Iso-Valeriansäure 0,4 mg/L. Die Gesamtkonzentration an flüchtigen Fettsäuren, einschließlich n-Buttersäure, n-Valeriansäure und Hexansäure, lag im Gärsubstrat durchschnittlich bei 102 mg/L. Diese Werte befanden sich weit unter den Grenzwerten (siehe unten). Im stabilen Gärprozess stehen die



Produktion und die Metabolisierung der Fettsäuren im Gleichgewicht. In der Praxis gilt ein Essigsäure/ Propionsäure-Verhältnis 3:1 als Anzeichen eines stabilen Systems, was auch in diesen Reaktoren der Fall war (Hecht et al., 2007).

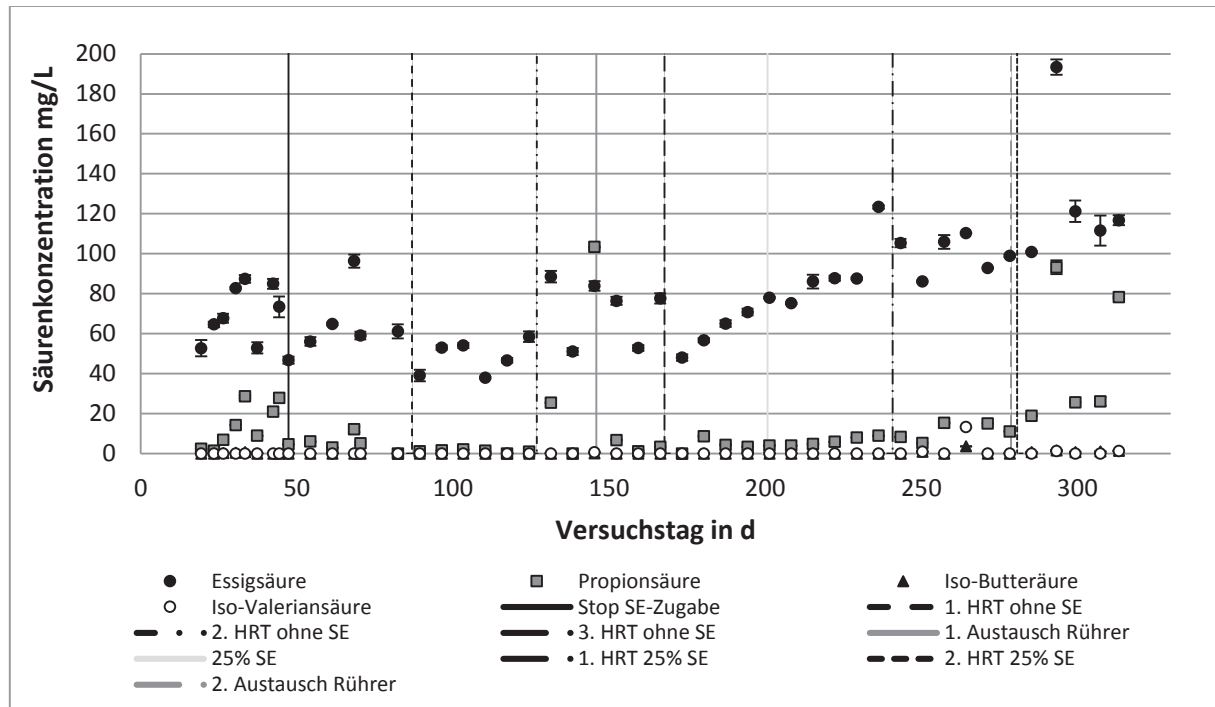


Abbildung 8: Verlauf der Konzentration der flüchtigen Fettsäuren des Referenzreaktors im gesamten betrachteten Zeitraum und dessen Standardabweichung

Laut Literatur gilt eine Essigsäurekonzentration unter 1500 mg/L als optimal (Agravis, 2013). Steigt die Konzentration über 3000 mg/L befindet sich der Reaktor im kritischen Zustand (Kaiser et al., 2008; Lindorfer, 2014). Der optimale Wert der Propionsäurekonzentration liegt unter 150 mg/L, was maximal 10 % der Essigsäurekonzentration ausmachen soll (Agravis, 2013). Der Fermenter befindet sich im kritischen Zustand, wenn die Konzentration der Propionsäure über 1000 mg/L steigt (Kaiser et al., 2008; Lindorfer, 2014). Die Konzentration der Iso-Buttersäure sollte nicht höher als 150 mg/L sein, damit ein stabiler Prozess gewährleistet ist (Agravis, 2013).

In Abbildung 9 ist der Verlauf der Säurekonzentration des Versuchsreaktors 2 dargestellt. Anhand der GC-Daten konnte ein leichter Anstieg der Säurekonzentration bereits ab dem 147. Versuchstag festgestellt werden. Es kam zunächst zum Anstieg der Essigsäure- und der Propionsäurekonzentration. Die Werte blieben noch weit unter dem Grenzwert. Bis vor dem Anstieg lag die Essigsäurekonzentration durchschnittlich bei 66 mg/L und die der Propion-

säure bei 4 mg/L. Am Versuchstag 173 lag die Essigsäurekonzentration auf über 1000 mg/L. Sowohl die Konzentration der Iso-Buttersäure und Iso-Valeriansäure fingen ebenfalls an zu steigen. Am 177. Versuchstag erreichte die Konzentration der Essigsäure den literarischen Grenzwert bei knapp 3000 mg/L und stieg bis zum Versuchsende auf 11144 mg/L. Die Propionsäurekonzentration erreichte am 180. Versuchstag den formulierten Grenzwert bei knapp 1000 mg/L und stieg bis auf 2422 mg/L. Die Iso-Buttersäure erreichte eine Höchstkonzentration von 333 mg/L und die Iso-Valeriansäure erreichte eine Konzentration von 636 mg/L. Die Gesamtkonzentration der flüchtigen Fettsäuren betrug bei der Abschlussanalyse 18644 mg/L. Im stabilen Betrieb sollte die Gesamtkonzentration unter 4000 mg/L liegen (Kaiser et al., 2008).

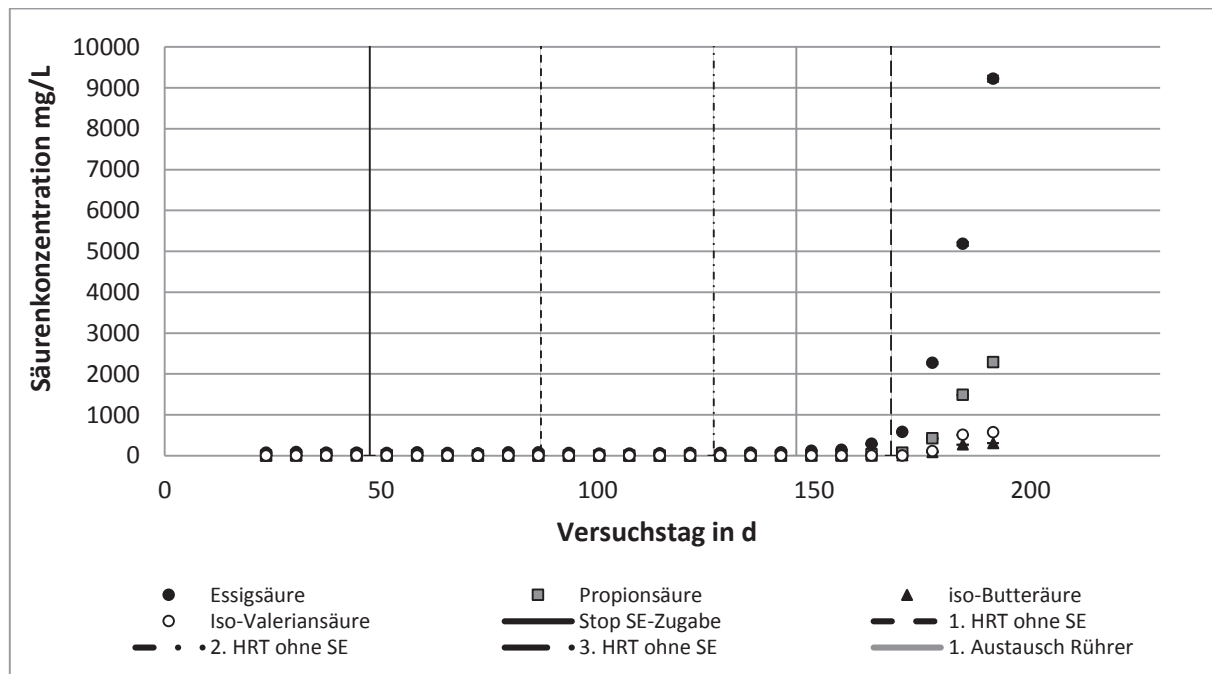


Abbildung 9: Verlauf der flüchtigen Fettsäuren des Versuchsreaktors 2 in den ersten drei Verweilzeiten und dessen Standardabweichung

Eine hohe Konzentration der Essigsäure führt zur Hemmung der Methanbildung und eine zu hohe Konzentration der Propion- und Buttersäure führt zur Hemmung der Acetogenese (Agravis, 2013). Eine detaillierte Auswertung über den Hemmprozess ist in Punkt 5.3 dargestellt. Der Ammoniumstickstoffgehalt aller Reaktoren wurde auf einen möglichst konstanten Wert von 2 g/L eingestellt. Durch das Zusetzen von Futterharnstoff konnte Stickstoff in das System eingetragen werden. Neben Kohlenstoff ist Stickstoff ein wichtiger Nährstoff für die Mikroorganismen. Er wird für die Bildung von Enzymen und zum Mikroorganismenwachstum

gebraucht. Dabei ist das Verhältnis zwischen Kohlenstoff und Stickstoff wichtig. Ist beispielsweise zu viel C und zu wenig N im System kann durch den unzureichenden Stoffwechsel der vorhandene Kohlenstoff nicht vollständig umgesetzt werden. Das C/N-Verhältnis sollte im Bereich zwischen 10 – 30 liegen. Der durchschnittliche Ammoniumstickstoff-Gehalt des Referenzreaktors lag bei 1,93 g/L und der des Versuchsreaktors 2 bei 2,01 g/L.

Ist die Pufferkapazität des Systems erschöpft steigt die Hemmwirkung des Schwefelwasserstoffes und der Propionsäure (Linke et al., 2011). Schwefelwasserstoff ist in undissoziierter gelöster Form ein Zellgift für die Mikroorganismen, welches eine hemmende Wirkung hervorrufen kann. Mit sinkendem pH-Wert stieg auch der Anteil an freiem Schwefelwasserstoff. Eine Konzentration von 50 mg/L wirkt hemmend auf den Prozess (FNR, 2013). Spurenelemente, wie Nickel, Kobalt, Molybdän und Eisen fällen den Schwefelwasserstoff als schwerlösliche Metallsulfide aus, wodurch es für den methanogenen Stoffwechsel nicht mehr zur Verfügung steht (Linke et al., 2011). Ab dem 156. Versuchstag traten vereinzelt Spuren von Schwefelwasserstoff auf, diese lagen jedoch unter dem Grenzwert und waren nicht bedenklich. Am Versuchstag 183 stieg die Konzentration rasch an und erreichte eine Konzentration von 4982 mg/L.

Die Gasproduktion des Versuchsreaktors 2 sank zum Versuchsende auf ein Minimum von 1 L/d und die spezifische Biogasproduktion auf 15,33 mL/g<sub>oTS</sub>\*d. Am Versuchstag 191 wurde der Versuch abgebrochen.

### 5.1.2 Auswertung Versuchsreaktor 1

Der Verlauf der spezifischen Biogasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 1 gegenüber dem FOS/TAC ist in Abbildung 10 dargestellt. So wie Versuchsreaktor 2 lief auch dieser in den ersten drei Verweilzeiten sehr stabil. Trotz Austausch des Rührers am Versuchstag 146 fand keine Veränderung im Fermentationsprozess statt. Am 200. Versuchstag wurde die Menge an Spurenelementen auf 25 % reduziert, wodurch die Instabilität schneller hervorgerufen werden sollte.

Vom 252. – 262. Versuchstag erstreckten sich die Feiertage Weihnachten und Neujahr. Hier wurde zweimal über einen längeren Zeitraum kein Ablauf genommen, wodurch der Füllstand in den Reaktoren auf über 10 L anstieg. Der FOS/TAC des Referenzreaktors stieg bis auf 0,32 und der des Versuchsreaktors auf 0,29 (siehe Abbildung 10). Diese Werte befanden sich noch unter den literarischen Grenzwerten. Die spezifische Biogasproduktion sank ebenfalls kurz ab. Ab Versuchstag 263 wurde der Betrieb wieder normal aufgenommen. Der

FOS/TAC-Wert des Versuchsreaktors 1 lag im Durchschnitt bei 0,23 und war damit im optimalen Bereich. Der durchschnittliche FOS-Wert ergab 1,71 g/L und der pH-Wert 7,36, was ebenfalls auf einen stabilen Prozess hindeutete. Die durchschnittliche Ammoniumstickstoffkonzentration lag bei 1,97 g/L.

Am 278. Versuchstag wurden nochmals die Rührer ausgetauscht. Beim Abbau des Versuchsreaktors 2 konnte festgestellt werden, dass sich die Acrylamidbeschichtung wieder ablöste. Aus diesem Grund kam dieses Mal eine Beschichtung aus Metalllack zum Einsatz. Jedoch blieb eine Veränderung des Biogasprozesses aus.

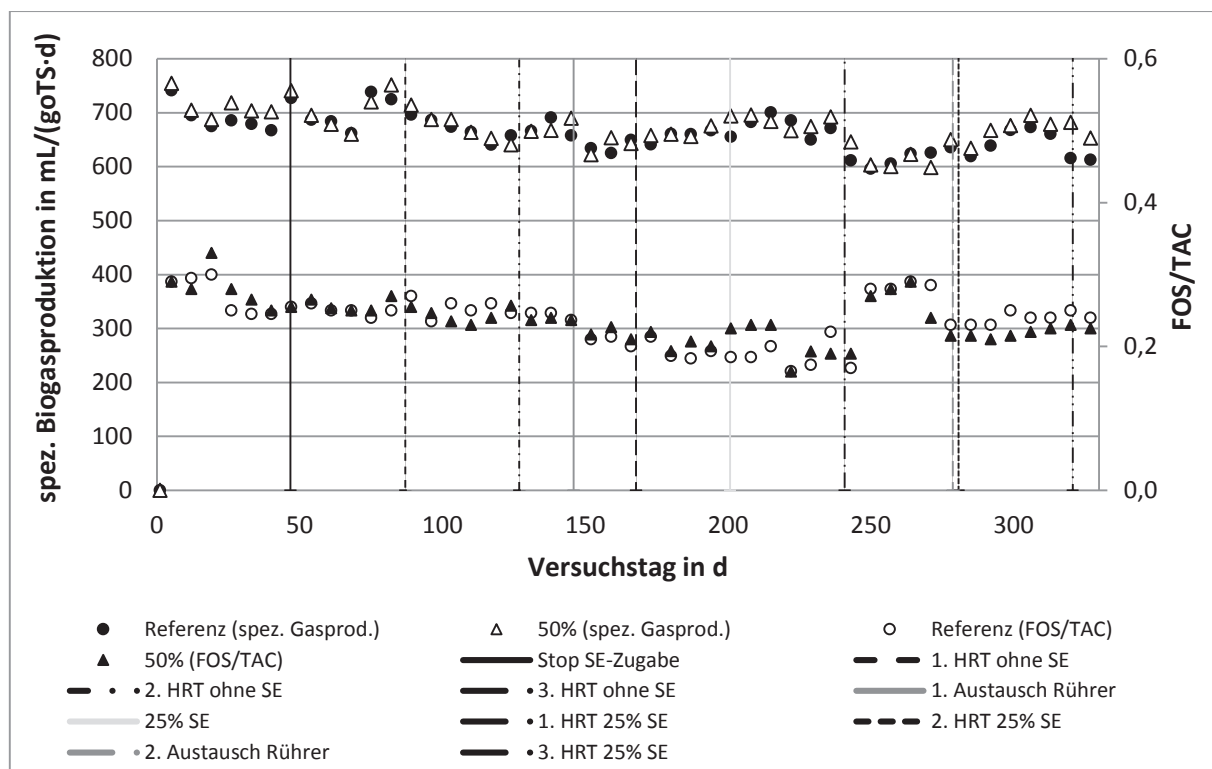


Abbildung 10: Verlauf der spezifischen Gasproduktion gegenüber dem FOS/TAC der Referenz und des Versuchsreaktors 1 über dem gesamten betrachteten Zeitraum

In und Abbildung 11 ist der Verlauf der flüchtigen Fettsäuren des Versuchsreaktors 1 dargestellt. Bei der Referenz (siehe Abbildung 8) konnte eine deutlichere Streuung der Essigsäurekonzentration als beim Versuchsreaktor 1 erkannt werden. Die Tendenz bei beiden Fermenter war dahingehend, dass im Laufe des Versuches die Konzentration der Essigsäure und der Propionsäure leicht zunahm. Die durchschnittliche Essigsäurekonzentration des spurenelementreduzierten Fermenters lag bei 67 mg/L und die der Propionsäure bei 5 mg/L. Die Konzentration der anderen organischen Säuren war bei beiden Reaktoren so gering, dass diese nicht extra benannt werden müssen. Die Gesamtkonzentration der Säuren lag im Versuch-

sreaktor 1 bei 74 mg/L und damit 28 mg/L niedriger als beim Referenzreaktors. All diese Werte liegen im optimalen Bereich und weisen auf keine Störung des Prozesses hin.

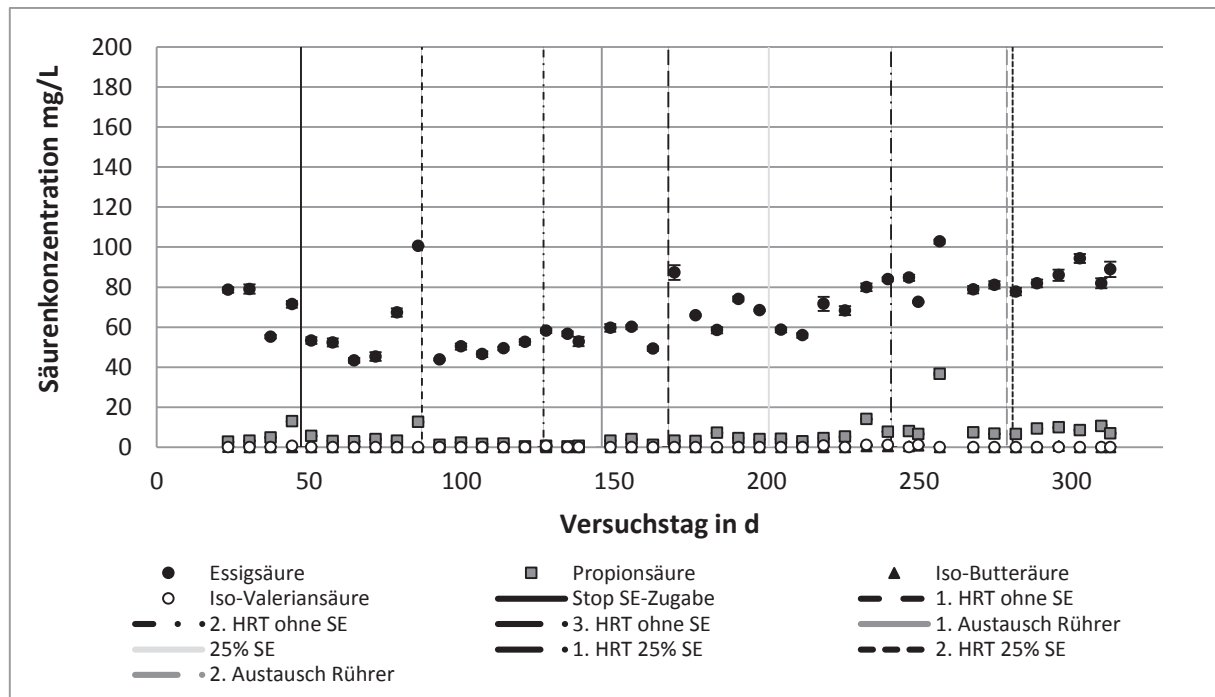


Abbildung 11: Verlauf der Konzentration der flüchtigen Fettsäuren in Versuchsreaktor 1 über den gesamten betrachteten Zeitraum und dessen Standardabweichung

## 5.2 Auswertung der Isotopenanalyse

Um eine eventuelle Verschiebung des vorherrschenden Methanbildungsweges bei einer Prozessstörung zu ermitteln, wurde der Verlauf der Isotopensignatur des gebildeten Methans und des Kohlendioxids bestimmt. Die Durchführung der Isotopenanalyse erfolgte über das UFZ, daher stand für diese Arbeit nur eine Auswahl der Ergebnisse zur Verfügung. In Abbildung 12 und Abbildung 13 ist der Verlauf der spezifischen Biogasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 1 bzw. Versuchsreaktor 2 gegenüber der Isotopenzusammensetzung des Methans dargestellt. Im Kontrollreaktor lag der  $\delta^{13}\text{CH}_4$  zwischen -35,7 ‰ und -34,3 ‰ und in Versuchsreaktor 1 zwischen -37,4 ‰ und -31,4 ‰. In beiden Fermentern blieben die Werte gradlinig ohne größere Schwankungen. In Versuchsreaktor 1 gab es am 151. Tag eine leichte Erhöhung des  $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Wertes auf -31,4 ‰. Am Tag zuvor erfolgte ein Austausch der Rührer, bei dem die Reaktoren geöffnet wurden. Die Erhöhung des Wertes könnte folglich damit zusammenhängen. Die Isotopenzusammensetzung in Versuchsreaktor 2 lag zwischen -42,8 ‰

und -29,9 ‰. Am zeitlichen Verlauf ist zu erkennen, dass es hier zu einer größeren Streuung der Werte kam, im Vergleich zu den anderen beiden Reaktoren. Nach dem Austausch der Rührer stiegen auch hier die Werte minimal an und fielen ab dem 165. Versuchstag bis auf -42,8 ‰. Kurz nach dem Absinken der Isotopenwerte kam es auch zum Absinken der Biogasproduktion. Jedoch stieg der Wert am 191. Versuchstag wieder auf -35,4 ‰ an.

In einer Studie von Nikolauz et al. (2013) sollte mit Hilfe der Isotopenanalyse der vorherrschenden Methanbildungsweg beurteilt werden. Dazu wurden Reaktoren im Labormaßstab mit verschiedenen Substraten, unter anderem Maissilage, beschickt. Der  $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Wert im Maissilagefermenter lag zwischen -38,7 ‰ und -31,3 ‰. In einer anderen Studie von Lv et al. (2014b) lag der  $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Wert für einen Reaktor, der mit Maissilage beschickt wurde, zwischen -33,1 ‰ und -40,2 ‰. Die ermittelten Werte dieser Arbeit entsprechen den Werten aus den Studien. Beim spurenelementverarmten Fermenter wurde eine deutliche Verschiebung in der Isotopenzusammensetzung des Methans vor der Prozessstörung erwartet. Die Werte der drei Reaktoren blieben jedoch im Rahmen der literarischen Ergebnisse.

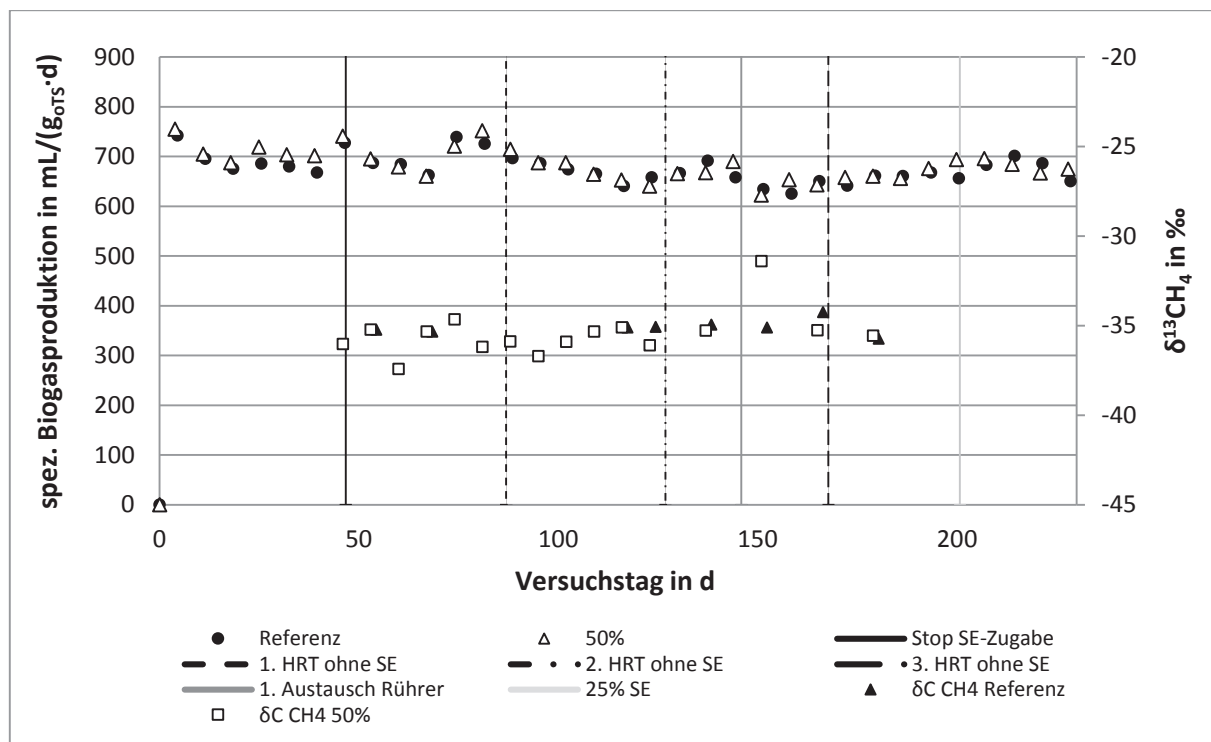


Abbildung 12: Verlauf der spezifischen Gasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 1 gegenüber dem  $\delta^{13}\text{CH}_4$  in den ersten drei Verweilzeiten

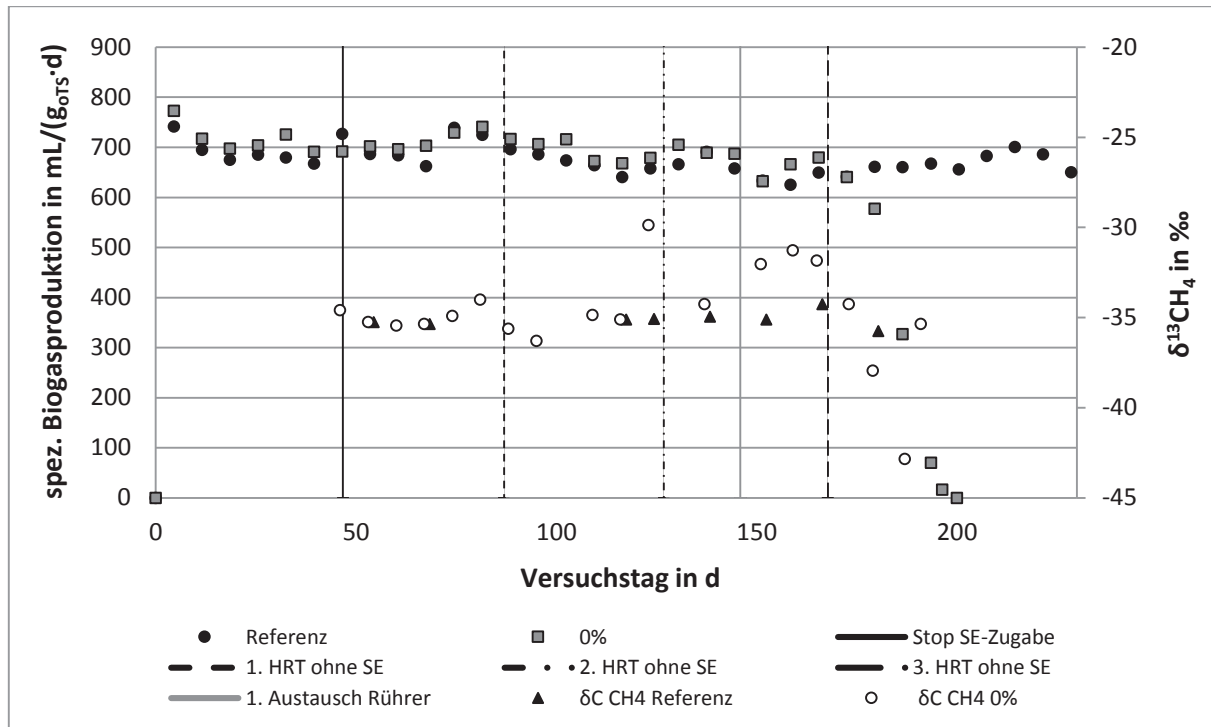


Abbildung 13: Verlauf der spezifischen Gasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 2 gegenüber dem  $\delta^{13}\text{CH}_4$  in den ersten drei Verweilzeiten

In Abbildung 14 und Abbildung 15 sind der Verlauf der spezifischen Gasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 1 bzw. Versuchsreaktor 2 gegenüber der Isotopenzusammensetzung des Kohlendioxids dargestellt. Der  $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Wert des Referenzreaktors lag zwischen 10,4 ‰ und 11,6 ‰ und der des Versuchsreaktors 1 zwischen 9,7 ‰ und 12,9 ‰. Vor dem Zusammenbruch des Versuchsreaktors 2 konnten ähnliche Werte ermittelt werden. Sie lagen zwischen 9,9 ‰ und 14,2 ‰. Im Vergleich zur Studie von Nikolauz et al. (2013) lag der Wert für den Maissilagereaktor zwischen 11,6 ‰ und 12,2 ‰, was den Werten dieser Arbeit entspricht. In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass es zum Verbrauch des  $\delta^{13}\text{CO}_2$  während der Prozesshemmung kam. Der  $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Wert sank auf -6,3 ‰. Der Carbonat-Puffer sorgt für das Aufrechterhalten des pH-Wertes und verhindert somit eine Versäuerung des Systems (siehe oben). Durch das Absinken des pH-Wertes kam es zur Freisetzung des Kohlendioxids. Die Hydrogenen und Fermentativen produzieren beim Abbau das  $\text{CO}_2$ . Durch die höhere Produktion konnten die methanogenen Archaeen das Gas nicht mehr verbrauchen. Es kam vermutlich zu einem kinetischen Isotopeneffekt des  $\delta^{13}\text{CO}_2$ , bei dem sich das schwerere  $^{13}\text{C}$  in dem nicht umgesetzten Teil des Ausgangsstoffes anreicherte und das leichtere  $^{12}\text{C}$  aus dem System entwich.

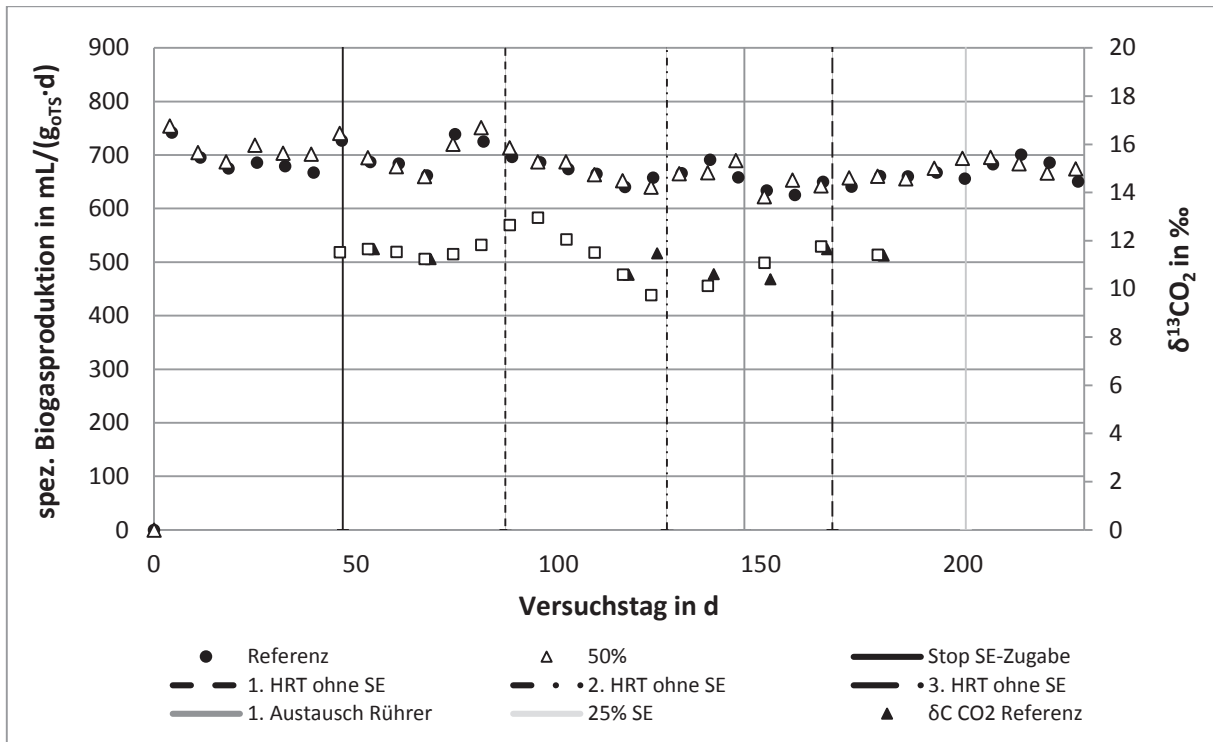


Abbildung 14: Verlauf der spezifischen Gasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 1 gegenüber dem  $\delta^{13}\text{CO}_2$  in den ersten drei Verweilzeiten

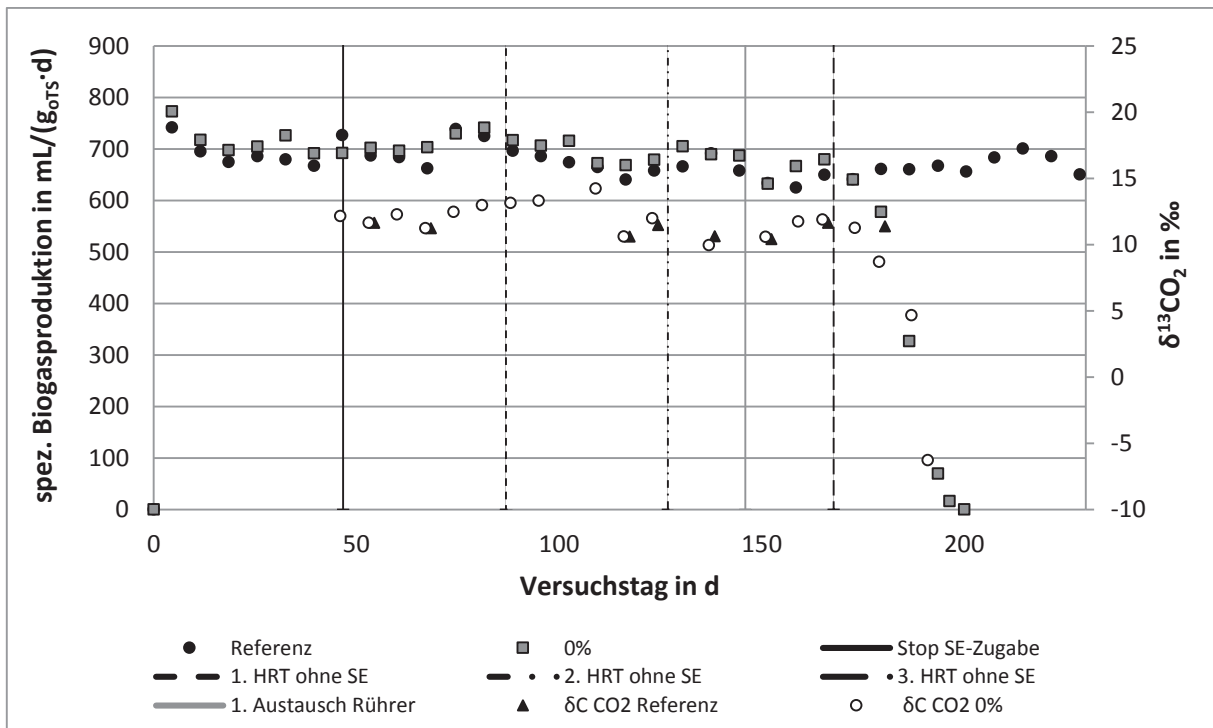


Abbildung 15: Verlauf der spezifischen Gasproduktion der Referenz und des Versuchsreaktors 2 gegenüber dem  $\delta^{13}\text{CO}_2$  in den ersten drei Verweilzeiten



Bei der Isotopenmessung wurde auch die Isotopenzusammensetzung des Wasserstoffes aufgenommen. Im Referenzreaktor lag dieser zwischen -233,6 ‰ und -310,0 ‰. In Versuchsreaktor 1 und 2 waren die Werte ähnlich und lagen zwischen -290,0 ‰ und -262,0 ‰ bzw. -311,7 ‰ und -259,2 ‰. Im Vergleich zur Studie von Nikolauz et al. (2013) betrug der  $\delta D$ -Wert -280,9 ‰ und -291,4 ‰ und in der Studie von Lv et al. (2014b) -279 ‰ und -261,6 ‰. Diese Ergebnisse entsprechen den Werten dieser Arbeit. Der  $\delta D$ -Wert des Methans wird vorwiegend durch die Isotopenzusammensetzung des im Substrat enthaltenen Wassers, als durch den Methanbildungsweg, beeinflusst (Nikolauz et al., 2013).

Das UFZ führte eine mikrobiologische Untersuchung des Gärsubstrates durch, dessen Ergebnisse für diese Arbeit vorlagen. Die Kultivierung der Methanogenen ist schwierig, daher wird für die Analyse der Methanbildner das *mcrA*-Gen des Schlüsselenzyms Methyl-CoM-Reduktase genutzt, da es in allen methanogenen Archaeen erhalten ist. Dieses Gen dient als Marker für die Organismen. Das *mcrA*-Gen wurde mittels der PCR-basierten T-RFLP-Fingerprinting-Methode bestimmt. Die Analyse erfolgte mittels zwei Restriktionsenzymen, dem *Bst*NI und dem *Mwo*I. Als Datenbank diente eine noch nicht veröffentlichte Schrift von Bühligen et al. (2016). Anhand der DNA-Analyse konnte gezeigt werden welche Mikroorganismen sich im Gärsubstrat befinden. Jedoch sagte diese Methode nicht aus, ob diese auch aktiv sind (Nikolauz et al., 2013).

Es wurde die zeitliche Dynamik der methanogenen Gemeinschaftszusammensetzung aufgenommen. *Methanosarcina*, der Ordnung *Methanosarcinales*, war der vorherrschende Methanbildner in allen drei Reaktoren mit einer relativen Häufigkeit zwischen 60 % und 90 %. Diese Methanogene nutzen sowohl den acetoklastischen als auch den hydrogenotrophen Methanbildungsweg. Die zweithäufigste Methanogene war *Methanomassiliicoccales*, mit einer relativen Häufigkeit zwischen 5 und 20 %. Am dritthäufigsten konnten Mitglieder der Ordnung *Methanomicrobiales*, wie *Methanomicrobium*, identifiziert werden. Diese sind strikt hydrogenotroph. Während der Hemmperiode vom 180. – 191. Versuchstag erhöhte sich die relative Häufigkeit der Mitglieder von *Methanomassiliicoccales* auf fast 40 % und verdrängten somit einen großen Anteil der *Methanosarcina*. Ihre relative Häufigkeit lag nur noch bei ca. 40 %. Die *Methanomassiliicoccales* stellen eine neu entdeckte Ordnung dar (Entdeckung: 2012). Sie nutzen den wasserstoffabhängigen methylotrophen Methanbildungsweg bei dem Methan aus methylierten Verbindungen, wie Methanol, Methylamine und Methylsulfide gebildet wird (Companaro et al., 2016). Über diesen Mikroorganismus ist noch nicht viel bekannt, daher gab es noch keine Informationen über dessen Isotopenfraktionierung. Aus diesem Grund trug

der Anstieg der Häufigkeit von *Methanomassiliicoccales* nicht zum Isotopeneffekt bei, was die ausbleibende Verschiebung der Isotopenzusammensetzung des Methans begründen würde. Die gemessenen  $\delta^{13}\text{CH}_4$ - und  $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Werte wurden für die Berechnung des Fraktionierungsfaktors [ $\alpha_c$ ] genutzt. Der  $\alpha_c$ -Wert der Referenz lag zwischen 1,047 und 1,049; der des Versuchsreaktors 1 zwischen 1,044 und 1,052 und der des spurenelementverarmten Fermenters zwischen 1,030 und 1,052. Die Werte waren sehr ähnlich und es war keine Verschiebung der methanogenen Archaeen in Versuchsreaktor 2 zu erkennen, trotz des Absinkens des  $\delta^{13}\text{CO}_2$ . Ein Fraktionierungsfaktor zwischen 1,025 und 1,065 zeigt, dass die Methanproduktion über den acetoklastischen und hydrogenotrophen Weg vonstattengeht. In allen drei Reaktoren lagen die Werte in diesem Bereich. Dies wurde über die mikrobiologische Auswertung bestätigt, da *Methanosarcina* der dominante Methanogen bei allen Fermentern war. Der Fraktionierungsfaktor zeigt entweder den hydrogenotrophen, den acetoklastischen oder beide Methanbildungswege an, daher konnte durch die Auswertung des  $\alpha_c$ -Wertes der methylotrophe Weg nicht angezeigt werden.

Die Probenahme des Biogases erfolgte vor und vier Stunden nach der Beschickung der Reaktoren. In Abbildung 16 sind der zeitliche Verlauf der Isotopenzusammensetzung des Methans des spurenelementverarmten Fermenters vor bzw. vier Stunden nach der Beschickung dargestellt. Anhand des Verlaufes konnte eine leichte Verschiebung der  $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte nach der Substratzufuhr festgestellt werden. Von Versuchstag 46 bis 74 kam es zur Anreicherung des  $\delta^{13}\text{CH}_4$ . Vom 81. bis zum 95. Tag kam es zu einer Abreicherung der  $\delta$ -Werte nach der Beschickung. Ab Versuchstag 123 war ein deutlicher Unterschied zwischen den  $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte vor und nach der Substratzufuhr zu erkennen. Nach der Beschickung kam es zum höheren Verbrauch des  $^{13}\text{C}$ . Dieser Verlauf stand im Zusammenhang mit der zugeführten Menge an Frischmasse. Die Reaktoren wurden vom 84. bis 97. Versuchstag bei einer erhöhten Raumbelastung von 5,22  $\text{g}_{\text{OTS}}/\text{L} \cdot \text{d}$  gefahren, wodurch es zu einem höheren Substrateintrag kam. Im Verlauf kam es zum Verbrauch der  $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte. Am 98. Versuchstag wurde die Raumbelastung wieder auf 5  $\text{g}_{\text{OTS}}/\text{L} \cdot \text{d}$  angepasst, wodurch es zur Anreicherung der  $\delta$ -Werte kam. Dem Prozess wurde wieder weniger Substrat zugeführt. Der große Unterschied zwischen dem  $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Wert ab Versuchstag 123 vor und nach der Beschickung ist damit zu begründen, dass ein Substratchargenwechsel folgte. Die Qualität der Maissilage nahm, im Gegensatz zu den Chargen davor, ab. Der TS-Gehalt war sehr niedrig, wodurch größere Mengen an Frischmasse dem Prozess zugeführt werden mussten. Eine ähnliche Entwicklung konnte für  $\delta^{13}\text{CO}_2$  beobachtet werden, jedoch waren dessen Änderungen kleiner.

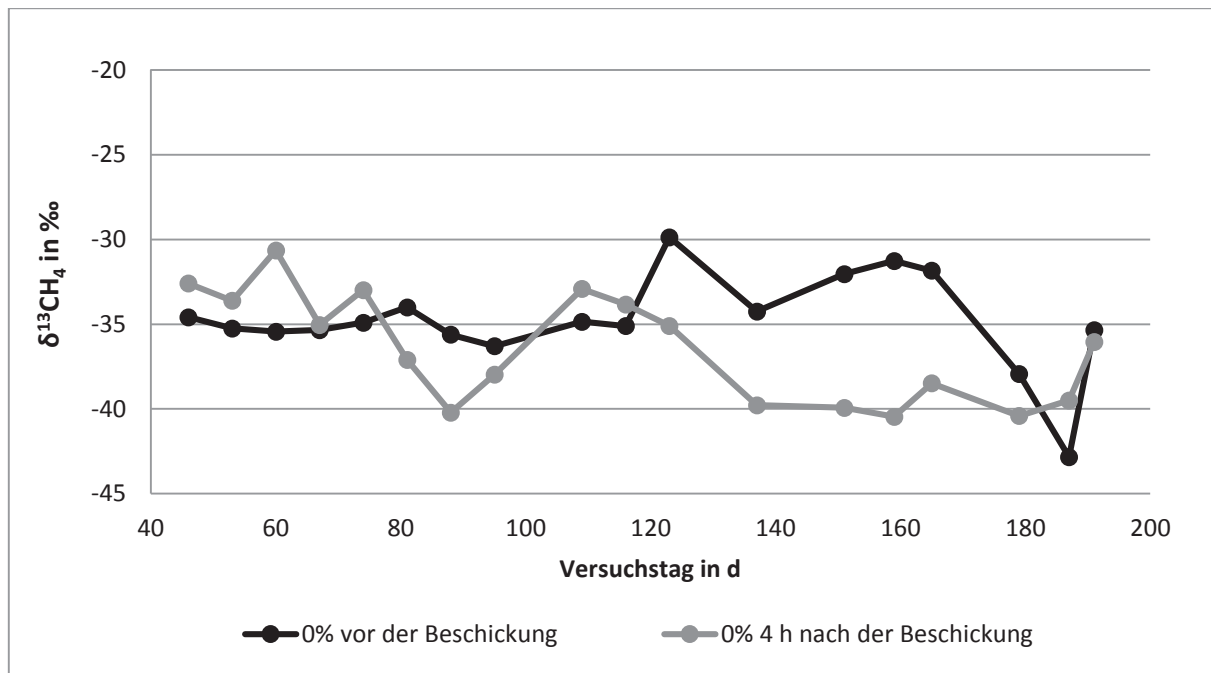


Abbildung 16: Verlauf der Isotopenzusammensetzung des Methans vor und 4 h nach der Beschickung des Versuchsreaktors 2

Die tägliche Beschickung nahm Einfluss auf die physiologische Aktivität der Methanogene. Maissilage enthält leicht zu metabolisierende organische Säuren in großen Mengen, wie Milchsäure und Essigsäure. Diese lassen sich leicht in Acetat umsetzen, dessen Konzentration im Fermenter entweder die acetoklastischen oder die hydrogenotrophen Methanbildner begünstigt. An den Versuchstagen, bei dem es zum Verbrauch an  $\delta^{13}\text{CH}_4$  kam, wurden eine größere Menge der Frischmasse zugeführt. Dies führte dazu, dass die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren anstieg. Die hydrogenotrophen Methanbildner werden bei einer höheren Acetatkonzentration begünstigt. Es gilt, je mehr  $\delta$ -Werte nach der Fütterung absinken, desto mehr verschiebt sich diese in Richtung hydrogenotrophen Methanogenese. Durch die impulsartige Substratzufuhr, und damit einen impulsartigen Eintrag der organischen Säuren, können die acetoklastischen Methanogene vorübergehend hemmen. An den Versuchstagen bei die  $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werter anstiegen gab es eine Umstellung auf eine geringere Substratzufuhr und damit eine geringere Konzentration an organischen Säuren. Die acetoklastischen Methanogenen werden bei einer geringeren Acetatkonzentration begünstigt. Es kam jedoch zu keiner eindeutigen Verschiebung der Methanbildungswege. Die Ergebnisse zeigten nur eine Tendenz welcher Bildungsweg dominierte. Die  $\alpha_c$ -Werte lagen auch hier zwischen 1,025 und 1,065, was sowohl auf den acetoklastischen als auch hydrogenotrophen Weg hindeutet. Bei den anderen beiden Reaktoren kam es zu einem ähnlichen Verlauf.

### 5.3 Auswertung des Spurenelementmangels

Die Untersuchung des Spurenelementgehaltes im Gärsubstrat erfolgte an der Universität Göttingen. Vor Ort gab es technische Probleme wodurch noch keine Ergebnisse über den Spurenelementgehalt in Versuchsreaktor 2 vorlagen. Die Spurenelementlösung wurde aus Salzen, die die Mikronährstoffe enthielten, hergestellt (siehe Tabelle 2). Die Berechnung der Spurenelementkonzentration erfolgte nach dem Patent von Oechsner (2008).

Anhand des spurenelementverarmten Versuchsreaktors konnte die Auswirkung des Spurenelementmangels auf den Biogasprozess beobachtet werden. Wie in 5.1.1 beschrieben kam es zum Zusammenbruch des Prozesses nach ca. drei Verweilzeiten. Für den Biogasprozess essentielle Spurenelemente waren Kobalt, Nickel, Molybdän und Selen. Während des Prozesses kam es zum langsamen Auswaschen der Spurenelemente aus dem System, was letztlich zu Mangelercheinungen und dem Zusammenbruch führte. Die Verfügbarkeit dieser Mikronährstoffe beeinflusst die Prozessstabilität und die Biogasproduktion. Sie bilden essentielle Bestandteile verschiedener Enzyme die die verschiedenen Schritte der Methanbildung katalysieren (Demirel & Scherer, 2011). Kobalt ist ein essentieller Bestandteil der Methyltransferase, die an verschiedenen methanbildenden Reaktionen beteiligt sind. Des Weiteren stellt dieser Mikronährstoff ein zentrales Ion für die Corrinoiden dar, die in allen Methanogenen vorhanden sind und wichtig für den Elektronentransfer. Zu den Corrinoiden gehört Vitamin B<sub>12</sub> (Munk & Lebuhn, 2014). Das Enzym CODH benötigt als Cofaktor Nickel und Kobalt. Es stellt ein Schlüsselenzym bei der Produktion und Verbrauch von Acetat dar. Diese Enzyme werden vor allem für die syntrophe Acetatoxidation benötigt, bei der das Acetat zu Wasserstoff und Kohlendioxid umgesetzt wird. Durch das Fehlen dieser Mikronährstoffe kam es wahrscheinlich zur Inhibierung der Enzyme, wodurch das Acetat nicht mehr richtig umgesetzt werden konnte und sich somit im Fermenter anreicherte.

Die Umsetzung der Propionsäure könnte ebenfalls durch die Spurenelemente beeinflusst worden sein. Die syntrophe Propionsäureoxidation erfolgt vermutlich durch den Methylmalonyl-CoA-Weg (Propionsäuregärung), an dem zwei Enzyme beteiligt sind. Dies sind zum einen Propionyl-CoA-Oxaloacetate-Transcarboxylase und die Vitamin B<sub>12</sub>-abhängige Methylmalonyl-CoA-Mutase. Beide Enzyme benötigen als Cofaktor Kobalt, welches nun aus dem Prozess ausgewaschen wurde und wahrscheinlich für die Enzyme und somit den Mikroorganismen nicht mehr zu Verfügung stand. Daher könnte es zum Anstieg der Propionsäurekonzentration und der allmählichen Versauerung des Reaktors gekommen sein. Auch das En-

zym Formiat-Dehydrogenase ist am Propionsäureabbau beteiligt, welches vermutlich durch das nicht Vorhandensein an Molybdän und Selen gehemmt wurde (Karlsson et al., 2012).

Der Abbau der Iso-Buttersäure und Iso-Valeriansäure kam, wie in Abbildung 9 dargestellt, wahrscheinlich aufgrund des fehlenden Stoffwechsels von Acetat und Wasserstoff zum Erliegen. Der Abbau der Iso-Buttersäure beinhaltet die Isomerisierung der Buttersäure, welche über die B<sub>12</sub>-abhängigen Coenzyme Butyryl-CoA und Isobutyryl-CoA-Mutase katalysiert wird. Diese Enzyme benötigen als Cofaktor Kobalt. Daher verschlechterte sich vermutlich die Rate des Iso-Buttersäureabbaus aufgrund des Rückganges des Isomerisierungsprozesses (Karlsson et al., 2012).

Eisen und Nickel stellen einen essentiellen Bestandteil des Cofaktors F<sub>430</sub> dar. Dieser aktiviert den Methyl-CoM-Reduktase-Komplex, welches den letzten Schritt der Methanbildung katalysiert. Durch die Hemmung der Enzyme, aufgrund des Spurenelementmangels, konnten vermutlich viele essentielle Abbauschritte nicht mehr katalysiert werden und kamen zum Erliegen. Daraus folgte die schrittweise Versäuerung des Gärsubstrates und folglich eine Inaktivierung der Methanogenen aufgrund des Sinkens des pH-Wertes.

Es gab bereits mehrere Studien in der die Monofermentation von Energiepflanzen, wie Mais-silage, untersucht wurde. Die Betrachtung lag auf die Wirkung von Spurenelementen und dessen Mangel auf den Biogasprozess. In der Untersuchung von Leuhn et al. (2008) wurde Maissilage in semi-kontinuierlichen, mesophil geführten Laborbiogasanlagen vergärt. Die Raumbelastung betrug 2,0 – 2,4 g<sub>oTS</sub>/L\*d. Hier inhibierte der Prozess nach ca. acht Monaten aufgrund eines Spurenelementmangels. Versuchsreaktor 2 wurde bei einer Raumbelastung von 5 g<sub>oTS</sub>/L\*d gefahren und inhibierte nach ca. vier Monaten. Diese Ergebnisse entsprachen in etwa den Ergebnissen dieser Arbeit.

In Versuchsreaktor 1 konnte noch keine Veränderung des Biogasprozesses festgestellt werden. In Tabelle 7 sind die bisherigen Ergebnisse der Spurenelementanalyse des Referenzreaktors und des Versuchsreaktors 1 vom 194. bis 215. Versuchstag dargestellt. Die Betrachtung lag dabei auf den Anfangs- und Endwerten.

Tabelle 7: Spurenelementgehalt in der Frischmasse

<b>Spurenelement [mg/kg FM]</b>	<b>Referenz (t = 194 d)</b>	<b>Referenz (t = 215 d)</b>	<b>50 % (t = 194 d)</b>	<b>50 % (t = 215 d)</b>
Kobalt	0,61	0,54	0,35	0,27
Nickel	7,9	6,5	7,5	5,8
Chrom	4,4	3,1	9,5	7,6

Der Spurenelementgehalt bezog sich auf die Frischmasse. Der Anteil an Kobalt in Versuchsreaktor 1 ist im Gegensatz zur Referenz etwas geringer. Jedoch war es noch ausreichend einen stabilen Prozess aufrecht zu erhalten. Der Gehalt an Nickel war in beiden Reaktoren ähnlich. Die Konzentration an Chrom dagegen war in Versuchsreaktor 1 dieser deutlich höher als bei der Referenz. Chrom ist für den Glucosestoffwechsel von Bedeutung und daher nicht ausschlaggebend für einen Prozesszusammenbruch. Es wird vermutet, dass aufgrund einer Zersetzung der Rührer geringe Mengen an Spurenelementen in den Prozess gelangten. Die Rührer bestehen aus Edelstahl, eine Legierung aus Nickel und Chrom. Dies könnte den höheren Gehalt an Chrom begründen, jedoch müsste dies auch für den Referenzreaktor gelten. Vermutlich hat sich die Beschichtung am Referenzreaktor nicht so stark abgelöst wie beim Versuchsreaktor 1. Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass bis zum 215. Versuchstag in Versuchsreaktor 1 noch kein Spurenelementmangel aufgetreten ist.

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Nachwachsenden Rohstoffen kam seit der Novellierung des EEG im Jahr 2004 eine besondere Bedeutung zu. Insbesondere Mais findet in landwirtschaftlichen Biogasanlagen am häufigsten Anwendung, da die Pflanze eine hohe Energie- und Biogasausbeute verspricht. Aus diesem Grund kommt es häufig zur Mono-Vergärung von Maissilage, da diese energieeffizienter ist als eine Co-Vergärung mit beispielsweise Rindergülle. Mais enthält leicht zu metabolisierende Säuren, wie Milchsäure und Essigsäure. Jedoch enthält sie nur eine geringe Konzentration an essentiellen Mikronährstoffen. Daher führt die langfristige Mono-Vergärung von Maissilage oftmals zum Rückgang der Biogasproduktion aufgrund eines Spurenelementmangels, wodurch die Leistungsfähigkeit und die Populationsdichte der im Fermenter enthaltenen Biologie beeinträchtigt werden. Im spurenelementverarmten Versuchsreaktor kam es vermutlich zu einer Reihe an Hemmprozessen wichtiger Enzyme, die essentiell für die Umsetzung der verschiedenen flüchtigen Fettsäuren sind. Der Reaktorinhalt versauerte aufgrund der Akkumulation der organischen Säuren. Ausschlaggebend für den Zusammenbruch war vermutlich die Hemmung der Methyl-CoM-Reduktase, da dieser den letzten Schritt der Methanbildung katalysiert. Durch die Inhibierung des Enzyms konnte kein Methan mehr gebildet werden, wodurch die Produktion zum Erliegen kam. Der Abbau der Kohlenstoffquellen erfolgte in der Acidogenese und Acetogenese, bei dem Essigsäure u. a. organischen Säuren gebildet werden, welche durch das CODH umgesetzt werden. Die Hemmung dieses Enzyms spielte vermutlich ebenfalls eine wichtige Rolle für die Versäuerung des Reaktorinhaltes. Durch die fortschreitende Akkumulation der flüchtigen organischen Säuren konnte das Puffersystem nicht mehr aufrecht gehalten werden, wodurch es zum Absinken des pH-Wertes kam. Die methanogenen Archaeen inhibieren bereits bei einem pH unter 6,5, wodurch die Methanproduktion gänzlich zum Erliegen kam.

Anhand der Ergebnisse der Isotopenanalyse und die mikrobiologischen Untersuchung konnte nicht eindeutig bestimmt werden, welcher Methanbildungsweg im prozessstabilen Zustand vorherrschte. Der berechnete Fraktionierungsfaktor lag in allen Reaktoren zwischen 1,025 und 1,065 was auf eine Methanbildung durch die acetoklastische und hydrogenotrophe Methanogenen schließen ließ. Als dominanter Methanbildner wurden *Methanosarcina* klassifiziert, welcher die beiden eben genannten Methanbildungswege nutzt. Hauptsächlich ist dieser bei einer hohen Raumbelastung anzutreffen. Aufgrund des höheren Acetatgehaltes hat dieser schnell wachsende Methanogen einen Vorteil gegenüber den anderen *Archeae*-



Gattungen. Dieser Methanbildner dient als Indikator für eine hohe Prozessleistung, da er entweder direkt am Acetat-Abbau beteiligt ist oder indirekt durch den Verbrauch an Wasserstoff. Es ist sehr robust und kann daher bei verschiedenen Prozesssituationen Höchstleistung bringen (Munk & Leubhn, 2014). Die Anwesenheit von Nickel und Eisen stellt eine entscheidende Bedingung für das Vorherrschen von *Methanosarcina* dar. Die Spurenelemente verbessern die Leistung des Methanogens, wodurch Acetat und Propionsäure effizienter abgebaut werden. In verschiedenen Studien wurde berichtet, dass durch die Zugabe von Spurenelementen die syntrophe Acetatoxidation in Verbindung mit der hydrogenotrophen Methanogenese dominierte. Im Gegensatz zur Essigsäurespaltung ist die hydrogenotrophe Methanbildung energiebringender.

Die Enzyme der acetoklastischen Methanogenen benötigen eine größere Menge an Spurenelementen für den Stoffwechsel als die hydrogenotrophen und methylotrophen Methanbildner. Aufgrund dessen wurde eine Hemmung des acetoklastischen Methanbildungsweges durch den Mangel an essentiellen Mikronährstoffen erwartet. In der Isotopenzusammensetzung des Methans konnte keine bedeutsame Verschiebung erkannt werden. Es kam zwar zum leichten Verbrauch der  $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Werte während der Prozesshemmung, stieg jedoch bei der letzten Messung wieder an. Die Werte blieben im Rahmen der literarischen Ergebnisse. Durch die Auswertung des Fraktionierungsfaktors konnte ebenfalls keine Veränderung des Methanbildungsweges festgestellt werden. Der Verbrauch an  $\delta^{13}\text{CH}_4$  würde eine Verschiebung in Richtung der hydrogenotrophen Methanogenese implizieren.

Anhand der mikrobiologischen Untersuchung konnte während der Prozessinstabilität eine verstärkte Anwesenheit von *Methanomassiliicoccales* festgestellt werden. Dieser Methanogen ist ein neuartiges *Methanobacteriaceae*-Genus (Genus IV), das den wasserstoffabhängigen methylotrophen Methanbildungsweg nutzt. *Methanomassiliicoccales* verdrängte während der Versäuerung einen Teil der *Methanosarcina*. Da es noch keine Informationen über dessen Isotopenfraktionierung vorliegen, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, wie dieser das System beeinflusst. In einer jüngeren Studie von Munk und Leubhn (2014) wurde die Auswirkung eines Spurenelementmangels auf den Biogasprozess untersucht. Als Substrat kam Maissilage zum Einsatz. Der Fermenterinhalt versauerte durch den Mangel und auch hier wurde die *Archeae*-Gattung *Methanomassiliicoccales* klassifiziert.

Während der Prozessinstabilität kam es vermehrt zur Bildung von Schwefelwasserstoff. In der Studie von Lv et al. (2016) wurden Kultivierungsversuche mit Methanogenen auf verschiedenen Substraten durchgeführt. Bei einem Versuch wurde dem Substrat zusätzlich Sulfat zugesetzt. Dabei konnte *Methanomassiliicoccales* als dominanter Methanogen klassifiziert wer-



den. Es schien, dass das Vorhandensein von Sulfat das Wachstum des Methanbildners anregte. Die Anreicherung an Schwefelwasserstoff und somit Sulfat konnte erst während des Versäuerungsprozesses festgestellt werden. Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang. Dies müsste allerdings durch weitere Versuche überprüft werden.

Im Gegensatz zum  $\delta^{13}\text{CH}_4$ -Wert konnte eine deutliche Verschiebung in der Isotopenzusammensetzung des Kohlendioxids während der Prozesshemmung festgestellt werden. Durch den Anstieg der flüchtigen organischen Säuren und dem Absinken des pH-Wertes wurde vermehrt Kohlendioxid freigesetzt. Es kam zum Verbrauch an  $\delta^{13}\text{CO}_2$ , was darauf hindeutet, dass die  $\text{CO}_2$ -Nutzung der Methanogenen weniger Effektiv war als die  $\text{CO}_2$ -Produktion. Es wird vermutet, dass es hier zu einem Isotopeneffekt kam, bei dem sich das schwerere  $^{13}\text{C}$  im nicht umgesetzten Teil des Ausgangsstoffes anreicherte. In vergangenen Studien mit Schwerpunkt auf die Isotopenanalyse kam es noch zu keinem vergleichbaren Ergebnis. Aufgrund dessen bedarf es einer weiteren Überprüfung. Dazu könnten Gärversuche in Mini-Biogasanlagen (z.B. Flaschen) durchgeführt werden, bei dem das Gärsubstrat mit Acetat angesäuert wird. In Anbindung erfolgt die Isotopenanalyse des Kohlendioxids, um den Fraktionierungseffekt des Carbonat-Systems zu bewerten.

Im spurenelementreduzierten Versuchsreaktor konnten im betrachteten Zeitraum keine Veränderung des Biogasprozesses festgestellt werden. Alle Parameter und Analysedaten wiesen auf einen stabilen und gleichbleibenden Prozess hin. Dies könnte mit der Adaptionsfähigkeit der Mikroorganismen zusammenhängen. Die methanogenen Archaeen bilden das schwächste Glied der Biozönose. Diese brauchen ca. 5 – 15 Tage für die Regeneration (Weiland, 2003). Die Mikroorganismen erhielten weiterhin essentielle Spurenelemente, jedoch nicht in der optimalen Dosis. Die mikrobielle Populationsstruktur kann sich bei leichten Veränderungen gut an die gegebenen Bedingungen anpassen. Die Archaeen hatten genug Zeit sich auf die Veränderungen einzustellen. Dabei werden die nicht angepassten Gemeinschaftsmitglieder inaktiviert oder abgetötet (Lebuhn et al., 2014). Dadurch konnte ein optimaler Prozess gewährleistet werden.

Nach der Beschickung der Reaktoren kam es zu einer kurzzeitigen Veränderung in der Isotopenzusammensetzung des Methans. Die tägliche Substratzugabe beeinflusst den anaeroben Vergärungsprozess in Bezug auf die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren, wodurch es zu einer Änderung in der physiologischen Aktivität der Methanogene kommen kann. Folglich trugen die Substratverfügbarkeit und damit die Stoffwechselaktivitätsänderung der Mikroorganismen zu den Schwankungen in der Isotopenzusammensetzung des produzierten Methans bei. Des Weiteren hat die Substratzugabe Einfluss auf die Wasserstoffproduktion der

syntrophen acetatoxidierenden Bakterien und anderen fermentativen Mikroorganismen. Die Wasserstoffverfügbarkeit ist nach der Beschickung höher, was vermutlich die Isotopenfraktionierung und die Aktivität der Methanogene ebenfalls beeinflusst. Um diesen Schwankungen entgegenzuwirken könnte auf eine Dauersubstratzufuhr umgestellt werden, bei dem kleinere Portionen des Substrates über den Tag verteilt dem Biogasprozess zugeführt werden.

Die Methanogenen benötigen bestimmte Spurenelemente in optimalen Konzentrationsbereichen, damit eine optimale Prozessleitung gewährleistet ist. Kobalt, Nickel, Molybdän und Selen sind zentrale Bestandteile der Stoffwechselwege. Sie sind notwendig bei der Elektronentransportkette, ATP-Gewinnung, Methanbildung, H<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Aufnahme, Acetat-spaltung, und der Methylgruppen-Verwertung (Lebuhn & Gronauer, 2009). Die Mono-Vergärung von Maissilage ist zwar Verbunden mit einer hohen Energieausbeute, jedoch müssen dem System teure Additive zugesetzt werden, damit ein stabiler Biogasprozess gewährleistet ist. Zudem ist es ebenfalls notwendig darauf zu achten, in welcher Dosierung die Spurenelemente zugesetzt werden. Eine Überdosierung könnte den Gärprozess hemmen. Des Weiteren kann der Gärrückstand nicht mehr als Wirtschaftsdünger verwendet werden, da die Grenzwerte für die landwirtschaftliche Verwertung nicht mehr eingehalten werden können (FNR, 2013). Daher sollte auf Vergärung zusammen mit anderen Substraten gesetzt werden. Beispielsweise kann die Co-Vergärung von Tierexkrementen, wie Rindergülle, dem Spurenelementmangel entgegenwirken. Eine vielversprechende Pflanzenart stellt Amarant. Diese C<sub>4</sub>-Pflanze ist reichhaltig an Spurenelementen, welche den Gärprozess im Fermenter positiv beeinflussen und Mangelerscheinungen vorbeugen kann. Dadurch könnte auf Zusatz von Spurenelementpräparaten im Biogasprozess verzichtet werden (Eberl & Fritz, 2014).

Die Analyse der Isotopenzusammensetzung des Biogases hat das Potenzial als Anlagenüberwachungstechnologie, speziell für die Veränderung des methanogenen Prozesses, eingesetzt zu werden. In dieser Arbeit konnte keine bedeutsame Veränderung in der Isotopenzusammensetzung des Methans festgestellt werden. Grund dafür war vermutlich die Dominanz der *Methanomassiliicoccales*. Da noch keine Kenntnis über dessen Isotopenfraktionierung bestehen sollten mit diesen Methanogen Kultivierungsversuche durchgeführt werden, um dessen Einfluss auf den Biogasprozess und Isotopenzusammensetzung aufzuklären.

Die Verschiebung des  $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Wertes kann als potenzieller Indikator für die Prozessinstabilität gesehen werden. Jedoch kam es erst zu einer Veränderung als die Inhibierung des Prozesses bereits vorgeschritten war. Ab dem 173. Versuchstag konnte eine relevante Veränderung des FOS-Wertes und der Essigsäurekonzentration festgestellt werden. Erst am 179. Versuchstag sank der  $\delta^{13}\text{CO}_2$ -Wert. Da kaum vergleichbare Studien mit Schwerpunkt auf die

Überwachung der Isotopensignatur des Biogases bei einer Prozessstörung durch einen Spurenelementmangel vorlagen, bedarf es weitere Versuchsreihen, um dieses Konzept zu etablieren. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann gesagt werden, dass die Analyse der Isotopenzusammensetzung bei einer Prozessstörung durch einen Spurenelementmangel als Überwachungstechnologie nur bedingt anwendbar ist.

Für das weitere Verfahren dieses Versuchs blieb es abzuwarten, ob der Fermentationsprozess des Versuchsreaktors 1 durch die Spurenelementreduzierung ebenfalls gehemmt wird. Am 351. Versuchstag kam es zu einer Prozessinstabilität im Referenzreaktor, während der spurenelementreduzierte Fermenter weiterhin stabil lief. Es konnte noch keine Ursache für die Instabilität festgestellt werden. Die Ergebnisse können aufgrund der ausstehenden Analysen nicht berücksichtigt werden.

## 7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mangel an Spurenelementen auf einen quasi-kontinuierlichen, mesophil betriebenen Biogasprozess untersucht. Im spurenelementverarmten Laborfermenter konnte nach ca. vier Monaten des Betriebes eine Instabilität des Prozesses festgestellt werden. Es erfolgte eine Akkumulation der organischen Säuren, die zur Inhibierung der methanogenen Archaeen führte. Grund dafür war vermutlich die Hemmung essentieller Enzyme wie Methyl-CoM-Reduktase, welches ein Schlüsselenzym für die Methanbildung darstellt. Des Weiteren führte wahrscheinlich die Hemmung der Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase zu einer unzureichenden Umwandlung des Acetats, woraufhin dieses sich im Gärsubstrat anreicherte.

Die Isotopenanalyse zeigte, dass in allen drei Reaktoren sowohl der acetoklastische als auch der hydrogenotrophe Methanbildungsweg vorherrschte. Entgegen der Erwartung kam es zu keiner bedeutsamen Verschiebung der Isotopensignatur des Methans während der Prozessinstabilität im spurenelementverarmten Laborfermenter. Eine Verschiebung in der Signatur würde auf eine Veränderung der Prozessbiologie hinweisen. Allerdings kam es zu einer Verschiebung in der Isotopensignatur des Kohlendioxids. Durch die Versäuerung des Fermenterinhalt und das Absinken des pH-Wertes wurde CO<sub>2</sub> freigesetzt, woraufhin es zum Verbrauch an  $\delta^{13}\text{CO}_2$  kam. Vermutlich könnte ein kinetischer Isotopeneffekt dafür verantwortlich sein, bei dem sich das schwerere Kohlenstoffisotop im nicht umgesetzten Teil des Ausgangsstoffes anreichert und das leichtere  $^{12}\text{C}$  aus dem System entwich.

Zur Diskussion der Ergebnisse der Isotopenanalyse wurden die Resultate der mikrobiologischen Untersuchung hinzugezogen. Beim Versäuerungsprozess nahm die relative Häufigkeit eines kürzlich entdeckten *Methanobacteriaceae*-Genus (Genus IV) zu. Dieser Methanogen nutzt den wasserstoffabhängigen methylotrophen Methanbildungsweg. Da noch keine Informationen über dessen Isotopenfraktionierung bekannt waren, konnten noch keine Aussagen über dessen Einfluss auf das Systems getroffen werden.

Die tägliche Substratzugabe nahm Einfluss auf den anaeroben Vergärungsprozess in Bezug auf die Änderung der Konzentration der flüchtigen Fettsäuren und die physiologische Aktivität der Methanogenen. Die Bioverfügbarkeit des Substrates und damit die Stoffwechselaktivitätsänderung der Mikroorganismen im Biogasprozess trugen zu den Schwankungen der Isotopenzusammensetzung des produzierten Methans bei.

Um die Isotopenuntersuchung bei einer Prozessinstabilität durch einen Spurenelementmangel zu etablieren müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden. Auch der Verlauf der Isotopensignatur des Kohlendioxids sollte durch weitere Versuche gegengeprüft werden, ob dies ein einmaliges Auftreten oder auch bei anderen spurenelementverarmten Versuchen vorkommt. Für diesen Beleg kann die Isotopenverschiebung des Kohlendioxids als potenzieller Indikator gesehen werden, jedoch trat erst eine Veränderung der Signatur auf als die Prozessinhibierung schon fortgeschritten war.

**Literaturverzeichnis**

Abram, U.: Isotope. Stuttgart: Römpf Thieme, 2008.

Agravis AG: Was sagen die Analysedaten aus? AGRAVIS Reifeisen AG, Münster 2013.

Aust, J.-H. et al.: Einsatzstoffe für Biogasanlagen (S. 29-46). Leitfaden Biogas. Gültzow: Fachagentur Nachwachsender Rohstoffe e. V., 2011.

Bammel, K.; Baumann, S.; Beikert, G.: Zitieren von Quelle im Internet. 2000.  
<http://www.spektrum.de/lexikon/physik/isotope/7584>. 30.07.2015.

Bauer, C. et al.: Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Schriftreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Nr. 7, Freising-Weihnstephan, 2009.

Bundesregierung: Zitieren von Quelle im Internet. 04.06.2012.  
<https://www.bundesregierung.de/Content/DE/Infodienst/2012/06/Energiewende/energiwende.html>. 04.11.2016.

Chen, Y. et al.: Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99 (2008), Nr. 10, S. 4044–4064.

Companaro, S.; Treu, L.; Kougias, P.G.: Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing as a novel binning strategy. *Biotechnology and Biofuels* (2016), S. 1-17

Conrad, R.: Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signature: a review and a proposal. *Organic Geochemistry* 5 (2005), Nr. 36, S. 739–752.

Demirel, B.; Scherer, P.: The role of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogenes during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 7 (2008), Nr. 2, S. 173-190.

- Demirel, B.; Scherer, P.: Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass Bioenergy* 35 (2011), Nr. 3, S. 992–998.
- Eberl, V.; Fritz, M.: 2014. Amaranth als Biogassubstrat. *Biogas Forum Bayern* 5 (2014), 3. Aufl., Nr. 1
- Feisthauer, S.; Siegert, M.; Seidel, M.: Isotopic fingerprinting of methane and CO<sub>2</sub> formation from aliphatic and aromatic hydrocarbons. *Organic Geochemistry* 5 (2010), Nr. 41, S. 482–490.
- Fischer, A.: Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus in kontaminierten Grundwasserleitern mit Hilfe stabiler Isotopen. Christian-Albrechts-Universität, Kiel 2006.
- FNR: Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung. 6. Aufl. Gültzow: Fachagentur Nachwachsender Rohstoffe e. V., 2013.
- Gimpel, M.: GC/C-IRMS in komplexer biologischer Matrix: Untersuchung zu den Einflussfaktoren auf die Genauigkeit der gemessenen Isotopenverhältnisse am Beispiel der Steroid-Analytik. Technische Universität Berlin, Berlin, 2011.
- Götz, J. et al.: Motivation, Voraussetzung und Methoden für die Prozessüberwachung. *Prozessbiologie, -bewertung und Analytik* Nr. 3, *Biogas Forum Bayern*, 2016.
- Hecht, M.; Clemens, J.; Wulf, S.: 2007. Entwicklung eines einfachen und für den Landwirt durchführbaren Verfahrens zur Überwachung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. *Institut für Naturpflanzenwissenschaft und Ressourcenschutz* (2007), Nr. 151.
- Kaiser, F. et al.: Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. 2. Aufl. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising-Weihnstefhan, 2008.

- Karlsson, A. et al.: Impact of trace element addition on degradation efficiency of volatile fatty acids, oleic acid and phenyl acetate and on microbial population in a biogas digester. *J Biosci Bioeng* 114 (2012), Nr. 4, S. 446–452.
- Klocke, M.; Nettmann, E.; Bergmann, I.: Monitoring der methanbildenden Mikroflora in Praxis-Biogasanlagen im ländlichen Raum: Analyse des Ist-Zustandes und Entwicklung eines quantitativen Nachweissystems. *Bornimer Agrartechnische Berichte* (2009), Nr. 67.
- KLU: Biogaserzeugung und -nutzung: Ökologische Leitplanken für die Zukunft. Vorschläge der Kommission Landwirtschaft beim Umweltbundesamt (KLU), Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau, 2013.
- Lebuhn, M.; Gronauer, A.: Mikroorganismen im Biogasprozess - die unbekanntesten Wesen. *Landtechnik* 64 (2009), Nr. 2, S. 127–130.
- Lebuhn, M. et al.: Biogas production from mono-digestion of maize silage-long-term process stability and requirements. *Water Science & Technology* 58 (2008), Nr. 8, S. 1645–1651.
- Lebuhn, M.; Munk, B.; Effenberger, M.: Agricultural biogas production in Germany - from practice to microbiology basics. *Energy, Sustainability & Society* (2014), S. 1-21
- Linke, B. et al.: Grundlagen und Verfahren der Biogasgewinnung (S. 12-28). Leitfaden Gültezow: Biogas. Fachagentur Nachwachsender Rohstoffe e. V., 2011
- Lindorfer, H.: Mikrobiologische Prozesse in einer Biogasanlage und deren Störungen. Schaumann BioEnergy GmbH, Pinneberg, 2014.
- Lv, Z.; Hu, M.; Harms, H.: Stable isotope composition of biogas allows early warning of complete process failure as a result of ammonia inhibition in anaerobic digester. *Bioresource Technology* 167 (2014a), S. 251–259.



- Lv, Z.; Leite, A. F.; Harms, H.: Influences of the substrate feeding regime on methanogenic activity in biogas reactors approached by molecular and stable isotope methods. *Anaerobe* 29 (2014b), S. 91–99.
- Lv, Z.; Zhou, L.; Lui, J.-F.; Gu, J.-D.: Selective inhibition of methanogenesis by sulfate in enrichment culture with production water from low-temperature oil reservoir. *International Biodeterioration & Biodegradation* 3 (2016), Nr. 108, S. 133–141.
- Mackie, B.; Bryant, M.: Metabolic Activity of Fatty Acid-Oxidizing Bacteria and the Contribution of Acetate, Propionate, Butyrate, and CO<sub>2</sub> to Methanogenesis in Cattle Waste at 40 and 60°C. *Appl Environ Microbiol.* 41 (1981), Nr. 6, S. 1363–1373.
- Mähnert, P.; Marksches, C.; Kaufmann, O.: Kinetik der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen und Gülle. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, 2007.
- Martin, C.; Bischof, N.: Zitieren von Quelle im Internet. 2000. <http://www.spektrum.de/lexikon/geowissenschaften/isotopenfraktionierung/7829>. 31.08.2015.
- May, T.: Mikrobielle Prozesskontrolle in Biogasanlagen durch Monitoring der Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse im Gasbereich. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, 2015.
- Messmethodensammlung Biogas: Methoden zur Bestimmung von analytischen und prozessbeschreibenden Parametern im Biogasbereich. 2. Aufl. Schriftreihe des BMU-Förderprogramms Energetische Biomassennutzung, Leipzig, 2013.
- Munk, B.; Lebuhn, M.: Process diagnosis using methanogenic Archaea in maize-fed, trace element depleted fermenters. *Anaerobe* (2014), Nr. 29, S. 22–28.
- Nikolauz, M.; Walter, R. F. H.; Sträuber, H.: Evaluation of stable isotope fingerprinting techniques for the assessment of the predominant methanogenic pathways in anaerobic digester. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (2013), Nr. 5, S. 2251–2262.

Oechsner, H.: Verfahren zur Herstellung von Biogas bei kontrollierter Konzentration von Spurenelementen. Patent WO2008145362 A1, 2008.

Pasold, T.: Arbeitsvorschrift Spurenelementanalyse. E-Mail, 2016.

Penning, H.: Fraktionierung stabiler Isotope durch anaerobe Bodenmikroorganismen. Philipps-Universität Marbug/Lahn, Marburg/Lahn, 2005.

Pobeheim, H. et al.: Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage. *Bioresource Technology* 101 (2010), Nr. 2, S. 836–839.

Pobeheim, H. et al.: Impact of nickel and cobalt on biogas production and process stability during semi-continuous anaerobic fermentation of a model substrate for maize silage. *Water Res.* (2011), Nr. 45, S. 781–787.

Polag, D.; May, T.; Müller, L.: Online monitoring of stable carbon isotopes of methane in anaerobic digestion as a new tool for early warnig of process instability. *Bioresource Technology* 197 (2015), S. 161–170.

Schattauer, A.; Abdoun, E.; Weiland, P.: Abundance of trace element in demonstration biogas plants. *Biosystem Engineering* 108 (2011), Nr. 1, S. 57–65.

Schieder, D. et al: Prozessmodell Biogas. (No. 3), Bayern Biogas Forum, Nr. 3, 2010.

Simon, H.: Biophysik. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1982.

Simon, H.; Palm, D.: Isotopeneffekt in der organischen Chemie und Biochemie. *Angewandte Chemie* 78 (1966), Nr. 22, S. 993–1007.

Statista: Zitiren von Quelle im Internet. 2016.  
<http://de.statista.com/statistik/daten/studie/167671/umfrage/anzahl-der-biogasanlagen-in-deutschland-seit-1992/>. 09.04.2016

- Sugimoto, A.; Wada, E., Hydrogen isotopic composition of bacterial methane: CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> reduction and acetat fermentation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59 (1995), Nr. 7, S. 1329–1337.
- Wall, D.; Allen, E.; Straccialini, B.: The effect of trace element addition to mono-digestion of grass silage at high organic loading rates. *Bioresource Technology* 172 (2014), S. 349–355.
- Weiland, P.: *Biologie der Biogaserzeugung*. ZNR Biogastagung, Bad Sassendorf-Ostinghausen, 2003
- Weltec Biopower: Zitieren von Quelle im Internet. 2016. <http://www.weltec-biopower.de/Warum-Biogas.1036.0.html>. 09.04.2016
- Whiticar, M. J.: Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geol.* 161 (1999), Nr. 1-3, S. 291–314.
- Zhang, L.; Ouyang, W.; Li, A.: Essential role of trace elements in continuous anaerobic digestion of food waste. *Procedia Environmental Sciences* (2012), Nr. 16, S. 102–111.

**Quellenverzeichnis**

Anhäuser, M. et al.: Zitieren von Quelle im Internet. 1999.  
<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/anaerobe-nahrungskette/3226>. 14.04.2016.

Ballkaschk, M.: Zitieren von Quelle im Internet. 2011. <http://www.scilogs.de/detritus/wie-man-isotopenmarkierte-peptide-in-bakterien-herstellt/>. 25.02.2016

Lancashire, R.: Zitieren von Quelle im Internet. 2011.  
[http://wwwchem.uwimona.edu.jm/courses/CHEM2402/Crime/GC\\_IRMS.html](http://wwwchem.uwimona.edu.jm/courses/CHEM2402/Crime/GC_IRMS.html).  
23.02.2016.

**Anhang****Anhang 1:** Klassifikation der methanogenen Bakterien (Auswahl) (Demirel & Scherer, 2008)

Klasse I	Methanobacteria	Hydrogenotropher Bildungsweg
Ordnung I	Methanobacteriales	
Familie I	Methanobacteriaceae	
Gattung I	Methanobacterium	
Klasse II	Methanococci	Hydrogenotropher Bildungsweg
Ordnung I	Methanococcales	
Familie I	Methanococcaceae	
Gattung I	Methanococcus	
Klasse III	Methanomicrobia	Hydrogenotropher Bildungsweg
Ordnung I	Methanomicrobiales	
Familie I	Methanomicrobiaceae	
Gattung I	Methanomicrobium	
Ordnung II	Methanosacrinales	Acetoklastischer und hydroge- notropher Bildungsweg
Familie I	Methansacinaceae	
Gattung I	Methanosarcina	
Familie II	Methanosaetaceae	Acetoklastischer Bildungsweg
Gattung II	Methanosaeta	

**Anhang 2:** Spurenelemente und deren Funktion in Anlehnung an Schattauer et al. (2011) I

<b>Element</b>	<b>Allgemeine Funktion (MO)</b>	<b>Rolle für die Methanogenese</b>
Chrom	- Glukosestoffwechsel	
Kobalt	- Vorhanden in Corrinoiden - Aktivierung metallischer Enzyme - Aktiviert Carboxylpeptidase - erforderlich für Synthese von Vitamin B <sub>12</sub> - CODH - kann den Stoffwechsel inhibieren	- Methyltransferase
Kupfer	- Aktivierung metallischer Enzyme - kann den Stoffwechsel inhibieren - Chelation anderer Substanzen und reduziert deren Toxizität	
Eisen	- Elektronenakzeptor im Cytochrom (Fe <sup>3+</sup> ) - Synthese von Katalase, Peroxidase und Aconitase - essentiell bei der Ferredoxin-Hydrogenase, CODH und FDH (Formiat-Dehydrogenase) - Redox-Eigenschaften	- Formylmethanofuran-Dehydrogenase - CODH - Hydrogenasen
Mangan	- Aktivierung Iso-Citronensäure-Dehydrogenase und metallischer Enzyme der Bakterien - Stabilisierung Methyltransferase bei den methanbildenden Bakterien - Redoxreaktion - Cofaktor verschiedener Enzyme	

**Anhang 3:** Spurenelemente und deren Funktion in Anlehnung an Schattauer et al. (2011) II

<b>Element</b>	<b>Allgemeine Funktion (MO)</b>	<b>Rolle für die Methanogenese</b>
Molybdän	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vorhanden im FDH</li> <li>- Inhibierung Sulfat-reduzierender Bakterien</li> <li>- Cofaktor verschiedener Enzyme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formiat-Dehydrogenase</li> <li>- Formylmethanofuran-Dehydrogenase</li> </ul>
Nickel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CODH</li> <li>- Synthese von Coenzym A, Faktor F<sub>430</sub>, Methyl-CoM-Reduktase</li> <li>- Stabilisierung der DNA, RNA</li> <li>- Cofaktor der Urease</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CODH</li> <li>- Methylreduktase</li> <li>- Hydrogenasen</li> </ul>
Selen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hydrogenase, FDH in den methanbildenden Bakterien und Clostridien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Formiat-Dehydrogenase</li> <li>- Formylmethanofuran-Dehydrogenase</li> <li>- CODH</li> </ul>
Schwefel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cofaktor und Komponenten vieler Proteine und somit eine Stoffwechselkomponente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CODH</li> <li>- Hydrogenasen</li> </ul>

**Anhang 4:** Berechnung des TS-Gehalts (*Messmethodensammlung Biogas*, 2013):

$$\text{TS [\%]} = 100 \times \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}$$

**Anhang 5:** Berechnung des oTS-Gehalts (*Messmethodensammlung Biogas*, 2013):

$$\text{oTS [\%]} = 100 \times \frac{m_3 - m_4}{m_3 - m_1}$$

TS =	Trockensubstanz [%]
oTS =	organische Trockensubstanz [%]
m <sub>1</sub> =	Masse des leeren Tiegels [g]
m <sub>2</sub> =	Masse des Tiegels nach Probenzugabe [g]
m <sub>3</sub> =	Masse des Tiegels nach der Trocknung [g]
m <sub>4</sub> =	Masse des Tiegels nach dem Glühen [g]



**Anhang 6:** Berechnung des FOS-Gehaltes (*Messmethodensammlung Biogas*, 2013):

$$\text{FOS [mg/L]} = 313340 \times (V_{\text{pH}4,00} - V_{\text{pH}5,00}) \times \frac{N_{\text{H}_2\text{SO}_4}}{V_{\text{Probe}}} - 3,08 \times V_{\text{pH}4,30} \times \frac{N_{\text{H}_2\text{SO}_4}}{V_{\text{Probe}}} \times 1000 - 10,9$$

**Anhang 7:** Berechnung des FOS/TAC-Wertes (*Messmethodensammlung Biogas*, 2013):

$$\text{FOS/TAC [g}_{\text{FOS}}/\text{g}_{\text{CaCO}_3}] = \frac{\left( (V_{\text{pH}4,4} - V_{\text{pH}5,0}) \times \frac{20}{V_{\text{Probe}}} \times \frac{N_{\text{Säuren}}}{0,1} \times 1,66 - 0,15 \right) \times 500 \times V_{\text{Probe}}}{0,5 \times N_{\text{Säuren}} \times V_{\text{pH}5,0} \times M_{\text{CaCO}_3} \times 1000}$$

- FOS = Konzentration der flüchtigen organischen Säuren nach Kapp [mg/L]
- FOS/TAC = Verhältnis der flüchtigen organischen Säuren und dem Reaktionspuffervermögen bezogen auf Calciumcarbonat [g<sub>FOS</sub>/g<sub>CaCO<sub>3</sub></sub>]
- V<sub>pH4,00</sub> = Volumen zutitrierter Säuren bis zu pH = 4,00 [mL]
- V<sub>pH4,30</sub> = Volumen zutitrierter Säuren bis zu pH = 4,30 [mL]
- V<sub>pH4,4</sub> = Volumen zutitrierter Säuren bis zu pH = 4,40 [mL]
- V<sub>pH5,00</sub> = Volumen zutitrierter Säure bis zu pH = 5,00 [mL]
- V<sub>Probe</sub> = Volumen vorgelegter, zentrifugierter Probe [mL]
- N<sub>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></sub> = Normalität der Säuren (molare Konzentration der Hydroniumionen der Säuren) [mol/L]
- N<sub>Säuren</sub> = Normalität der Säuren (molare Konzentration der Hydroniumionen der Säuren) [mol/L]
- M<sub>CaCO<sub>3</sub></sub> = Molare Masse Calciumcarbonat [100 g/mol]

**Anhang 8:** Verwendete Kalibrierung für den Gaschromatographen. Durch die Herstellung verschiedener Kalibrierlösungen wurde das Gerät in folgenden Konzentrationsbereichen kalibriert (*Messmethodensammlung Biogas*, 2013):

<b>Analyt</b>	<b>Kalibrierbereich [mg/L]</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>	<b>NG [mg/L]</b>	<b>BG [mg/L]</b>
Essigsäure	5,223-15669,000	6,0	2,819	8,405
Propionsäure	1,980-5940,000	7,2	1,07	3,189
Iso-Buttersäure	0,948-2844,000	7,7	0,372	1,176
n-Buttersäure	1,920-5760,000	9,0	0,845	2,489
Iso-Valeriansäure	0,930-2790,000	10,1	0,389	1,218
n-Valeriansäure	0,940-2820,000	12,6	0,626	2,018
Hexansäure	0,465-1395,000	15,5	0,205	0,62
2-Ethylbuttersäure (ISTD)	-	13,5		

**Anhang 9:** Beschreibung des Gaschromatographen (Agilent 7980A) (*Messmethodensammlung Biogas*, 2013)

Injektor	-	Split/Splitless		
Detektor	-	FID		
Trägergas	-	Stickstoff		
Säulenbezeichnung	-	ZB-FFAP (Phenomenex) oder äquivalent		
Säulenlänge	m	30		
Säulendurchmesser	mm	0,32		
Filmdicke	µm	0,25		
Fluss constant flow	mL/min	Total flow: 8,5 Septum Purge flow: 3 Split flow: 0,5		
Säulentemperatur- Programm		Rate	Zieltemperatur	Verweildauer
		[°C/min]	[°C]	[min]
		Start	40	0
		10	100	8
		30	150	1
		120	240	2
Laufzeit	min	19,417		
Split Ratio	-	0,1:1		
Injektor Temperatur	°C	220 °C		
Detektoreinstellung	Heizung	260 °C		
	H <sub>2</sub> flow	45 mL/min		
	Air flow	400 mL/min		
	Make up flow	25 mL/min		
	Signal	10 Hz/0,02 min		

**Anhang 10:** Beschreibung des Head-Space-Probengeber (PerkinElmer Turbo Matrix 110)  
(*Messmethodensammlung Biogas*, 2013)

Temperatur [°C]	Nadel	95
	Transfer Line	110
	Ofen	85
Drücke [psi]	Trägergasstrom	32,0
	Vial	32,0
Zeit [min]	Druckaufbau	4,0
	Injektion	0,10
	Verweilzeit	0,5
	Thermostat	32,0
	Zyklus	22,0
	PII	24,0
Weitere Einstellungen	Hochdruckinjektion	Ein
	Vial vent	Ein
	Rüttler	Ein
	Injektionsmethode	Zeit
	Bedienungsmethode	konstant
	Injektionen	1
Transfer Line	-	Deaktiviert ID: 0,32 mm

Zur Berechnung der tatsächlichen Konzentrationen der untersuchten Analyten wurde der interne Standard hinzugezogen und über die Kalibriergerade ausgewertet.

Eidesstattliche Erklärung

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe nur mit den angegebenen Hilfen angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift