



LfL

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Einfluss verpilzter Einsatzstoffe auf den Biogasprozess und die hygienische Beschaffenheit von Gärresten



Schriftenreihe

3
2017
ISSN 1611-4159

Impressum

Herausgeber: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
Vöttinger Straße 38, 85354 Freising-Weihenstephan
Internet: www.LfL.bayern.de

Redaktion: Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen
Lange Point 4, 85354 Freising
E-Mail: AQU@LfL.bayern.de
Telefon: 08161 71-3612

1. Auflage: März 2017 (nur Internet)

© LfL



**„Einfluss verpilzter Einsatzstoffe auf
den Biogasprozess und die hygienische
Beschaffenheit von Gärresten“**

(EW/13/59 – BE/14/29)

**Mathias Hartel, Katrin Harms, Veronika
Dollhofer, Bernhard Munk, Johannes
Ostertag, Karsten Meyer, Fabian Lichti
und Michael Lebuhn**

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Zusammenfassung.....17
2	Summary20
3	Einleitung22
3.1	Vorkommen von Schimmelpilzen in Silagen.....22
3.2	Überblick über die Wirkung von Mykotoxinen25
4	Problemstellung und Zielsetzung des Vorhabens29
5	Arbeitspakete und Institutionen31
5.1	Verbundpartner an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LFL)31
5.1.1	Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT 2a).....31
5.1.2	Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft (ITE 1b).....31
5.1.3	Abteilung für Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, Mikro- und Molekular-Biologie (AQU 1c)31
5.2	Verbundpartner Technische Universität München (TUM), Lehrstuhl für Tierhygiene.....31
6	Material und Methoden33
6.1	Controlling und Beprobung von Praxissilagen33
6.2	Bestimmung der Gasbildung im Mini-Batch-System34
6.3	Semikontinuierliche Durchflussversuche.....38
6.4	Analyse von Prozessparametern.....41
6.4.1	Biogaszusammensetzung41
6.4.2	Physikalische und chemische Parameter.....42
6.5	Mykotoxikologische Untersuchungen.....44
6.5.1	Extraktionsverfahren44
6.5.1.1	Mais/Grassilage44
6.5.1.2	Gärflüssigkeit44
6.5.2	HPLC-MS/MS Analytik.....46
6.6	Herstellung von verschimmelten Versuchssilagen.....46
6.7	Herstellung von Schimmelpilz-Kulturextrakten51
6.8	Molekularbiologische Untersuchungen.....53
6.8.1	DNA-Extraktion54
6.8.2	RNA-Extraktion, DNase Verdau und Reverse Transkription.....54
6.8.3	Polymerase-Kettenreaktion basierte Analysen.....56
6.8.3.1	Konventionelle PCR und Agarose-Gelelektrophorese.....57

6.8.3.2	Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	58
6.8.4	Mikrobiologisch-ökophysiologische Parameter zur Prozessbewertung	59
6.8.4.1	Der Metabolische Quotient	59
6.8.4.2	Das cDNA/DNA Verhältnisse	60
6.8.5	Analyse der mikrobiellen Gesellschaftszusammensetzung durch Klonierung und Sequenzierung	60
7	Ergebnisse und Diskussion	62
7.1	Controlling auf Praxisbetrieben	62
7.2	Einfluss von Mykotoxinen und Schimmelpilzkulturextrakten auf die Gasbildung im Mini-Batch-System.....	62
7.2.1	Lösungsmittelversuche.....	62
7.2.2	Versuch 2014_001.....	64
7.2.3	Versuch 2014_004.....	66
7.2.4	Versuch 2014_005.....	69
7.2.5	Versuch 2014_008.....	71
7.2.6	Versuch 2015_002.....	73
7.2.7	Versuch 2015_003.....	76
7.2.8	Zusammenfassung der Ergebnisse der ATS-Tests mit Mykophenolsäure im Mini-Batch	79
7.3	Einfluss verpilzter Silagen auf die Gasbildung in semikontinuierlichen Durchflussversuchen	79
7.3.1	Versuch 2015_001.....	79
7.3.2	Versuch 2015_005.....	85
7.4	Wiederfindung der untersuchten Mykotoxine im Gärrest.....	92
7.4.1	Gärrest aus Mini-Batch-Versuchen	92
7.4.2	Gärrest aus semikontinuierlichen Durchflussversuchen	98
7.5	Veränderungen der Biozöosen nach Zugabe von Mykotoxinen oder verpilzter Silagen in Biogasprozessen.....	103
7.5.1	Veränderungen in Mini-Batch-Systemen.....	103
7.5.2	Veränderungen in semikontinuierlichen Durchfluss-Systemen.....	105
7.5.2.1	Erster Durchflussversuch mit durch <i>Monascus ruber</i> und <i>Penicillium roquefortii</i> verschimmelter Silage.....	105
7.5.2.2	Zweiter Durchflussversuch mit durch <i>Aspergillus fumigatus</i> verschimmelter Silage	114
8	Schlussfolgerungen und Ausblick	120
9	Veröffentlichungen und Ausbildungen im Rahmen dieses Projektes	121
9.1	Masterarbeiten	121

9.1.1	Masterarbeit Michael Salmen.....	121
9.1.2	Masterarbeit Kerstin Patricia Kiener.....	121
9.2	Veröffentlichungen, Vorträge und Poster	121
10	Anhang	123
10.1	Ergebnisse der Spurenelementanalysen	123
10.2	Veröffentlichungen.....	125
10.2.1	Manuskript zum Vortrag auf dem 129. VDLUFA-Kongress Standortgerechte Landnutzung - umweltverträglich und wirtschaftlich in Freising (M. Hartel <i>et al.</i> 2017).....	125
10.2.2	Manuskript zum Poster und Poster auf dem 11. Rostocker Bioenergieforum, Rostock, Deutschland (M. Hartel <i>et al.</i> 2017)	126
10.2.3	Manuskript zum Vortrag auf der internationalen Konferenz „3rd International Conference on Biogas Microbiology (ICBM-3)“ in Wageningen, Niederlande (V. Dollhofer <i>et al.</i> 2017)	130
10.2.4	Manuskript zum Vortrag auf der internationalen Konferenz „38th Mycotoxin Workshop Berlin 2016“ (K. Harms <i>et al.</i> 2016).....	131
11	Literaturverzeichnis.....	132

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Mögliche Angriffspunkte der durch <i>P. roquefortii</i> , <i>M. ruber</i> und <i>A. fumigatus</i> produzierten Mykotoxine auf die Mikroorganismen im Biogasprozess.....	28
Abb. 2: Besuchte Biogasanlagen, Verteilung in Bayern.....	33
Abb. 3: Mini-Batch-Messsystem im Wasserbad (links) und Aufbau der Batchflasche (rechts) (Zeichnung ILT).....	34
Abb. 4: Randomisierter Positionsplan zur Anordnung der Varianten im Wasserbad. Schwarze Nummerierung: Positionsnummer im Wasserbad, Rot: Messstelle. Hier beispielhaft Versuch 2015_002: Mykophenolsäure zu SB1/BGM.....	36
Abb. 5: Essigsäure und Propionsäurekonzentration vor, während und nach Zugabe von Weizenschrot zu GB-C11.....	37
Abb. 6: Links: 36 Liter Durchflussfermenter; Rechts: Gasflussschema für einstufige Durchflussversuche.....	38
Abb. 7: Inokulum: Abholung und Befüllung der Durchflussversuche.....	40
Abb. 8: Substratmix Anteile in Prozent der gesamten zugeführten Biomasse des Pilotbetriebs 12 für das Jahr 2015.....	41
Abb. 9: Maissilage (Ausgangsmaterial).....	47
Abb. 10: Temperaturprofil eines Maischefasses (Einheit Fahrenheit).....	47
Abb. 11: Maissilage inokuliert mit <i>Penicillium roquefortii</i>	49
Abb. 12: Verschimmelte Silage (<i>Penicillium roquefortii</i>) vor Homogenisierung.....	49
Abb. 13: Homogenisierte verschimmelte Silage (<i>Monascus ruber</i>).....	50
Abb. 14: Schimmelpilzkulturen auf Reis.....	51
Abb. 15 Übersicht über den Analyseablauf und eingesetzte Methoden; a: Quantifizierung; b: Qualitative Analytik der Gesellschaftszusammensetzung (nicht für alle Proben durchgeführt).....	53
Abb. 16: Gemittelter Verlauf der aufsummierter Biogasproduktion des Versuch 2014_007 nach Zugabe von Lösungsmitteln zur stoßbelasteten Biozönose GB-11.....	63
Abb. 17: Gemessene Methangehalte im Versuchsverlauf 2014_007 nach Zugabe von Lösungsmittel zur gestressten Biozönose GB-C11.....	63
Abb. 18: Versuch 2014_007, Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Versuchsstart und -ende.....	64
Abb. 19: Versuch 2014_007, Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Versuchsstart und Versuchsende.....	64
Abb. 20: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe unterschiedlicher Reinsubstanzen zu SB2 im Versuch 2014_001.....	65
Abb. 21: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_001.....	65
Abb. 22: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_001.....	66
Abb. 23: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Reinsubstanzen zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2014_004; Myko: Mykophenolsäure.....	66
Abb. 24: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von kontaminiertem Reis zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2014_004.....	67

Abb. 25: Methangehalte im Versuchsverlauf 2014_004 nach Zugabe von Reinsubstanzen und kontaminiertem Reis zu SB2; Myko: Mykophenolsäure	67
Abb. 26: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_004	68
Abb. 27: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_004	68
Abb. 28: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Mykophenolsäure (Myko) zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2014_005A	69
Abb. 29: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Reinsubstanzen zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2014_005	69
Abb. 30: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_005	70
Abb. 31: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_005	70
Abb. 32: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Reinsubstanzen zu GB-C11 und ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2014_008	71
Abb. 33: Methangehalte nach Zugabe von Reinsubstanzen zu GB-C11 im Versuchsverlauf 2014_008	71
Abb. 34: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_008	72
Abb. 35: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_008	72
Abb. 36: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Mykophenolsäure (Myko) zu SB1 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2015_002	73
Abb. 37: Methangehalte nach Zugabe von Mykophenolsäure (Myko) zu SB1 im Versuchsverlauf 2015_002	73
Abb. 38: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Mykophenolsäure zu BGM und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2015_002	74
Abb. 39: Methangehalte nach Zugabe von Mykophenolsäure zu BGM im Versuchsverlauf 2015_002	74
Abb. 40: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2015_002	75
Abb. 41: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2015_002	75
Abb. 42: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Mykophenolsäure zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2015_003	76
Abb. 43: Methangehalte im Versuchsverlauf 2015_003 nach Zugabe von Mykophenolsäure zu SB2	76
Abb. 44: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Kulturextrakten zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2015_003	77

Abb. 45: Methangehalte nach Zugabe von Kulturextrakten zu SB2 im Versuchsverlauf 2015_003.....	77
Abb. 46: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2015_003.....	78
Abb. 47: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2015_003.....	78
Abb. 48: Eingesetzte Konzentrationen von Mykophenolsäure und Wirkung auf die Biogasproduktion der verwendeten Inokula in den Mini Batch-ATS-Tests.....	79
Abb. 49: Masseverlust durch den artifiziellen Verschimmelungsprozess im Versuch 2015_001.....	80
Abb. 50: Übersicht der zeitlichen Abfolge der Raumbelastungsänderungen im Versuch 2015_001.....	80
Abb. 51: Tatsächlich zugeführte organische Trockensubstanz über die gesamte Versuchszeit im Versuch 2015_001.....	81
Abb. 52: Entwicklung der Methanproduktivität der getesteten Varianten <i>Monascus ruber</i> und <i>Penicillium roquefortii</i> zur unbehandelten Kontrolle im Versuchsverlauf 2015_001.....	81
Abb. 53: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Varianten <i>Monascus ruber</i> MYK1 und MYK2 im Versuch 2015_001.....	82
Abb. 54: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Varianten <i>Penicillium roquefortii</i> MYK3 und MYK4 im Versuch 2015_001.....	82
Abb. 55: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Kontrolle MYK5 im Versuch 2015_001.....	83
Abb. 56: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt über den gesamten Versuchsverlauf 2015_001.....	83
Abb. 57: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Wiederholungen <i>Monascus ruber</i> im Versuch 2015_001.....	84
Abb. 58: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Wiederholungen <i>Penicillium roquefortii</i> im Versuch 2015_001.....	84
Abb. 59: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Kontrolle im Versuch 2015_001.....	85
Abb. 60: Masseverlust durch den artifiziellen Verschimmelungsprozess im Versuch 2015_005.....	86
Abb. 61: Übersicht der zeitlichen Abfolge der Raumbelastungsänderungen im Versuch 2015_005.....	86
Abb. 62: Tatsächlich zugeführte organische Trockensubstanz über die gesamte Versuchszeit im Versuch 2015_005.....	87
Abb. 63: Entwicklung der Methanproduktivität der getesteten Varianten <i>Aspergillus</i> Stamm 1 und <i>Aspergillus</i> Stamm 2 zur unbehandelten Kontrolle im Versuchsverlauf im Versuch 2015_005.....	87
Abb. 64: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Varianten <i>Aspergillus fumigatus</i> Stamm 1 MYK6 und MYK7 im Versuch 2015_005.....	88
Abb. 65: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Varianten <i>Aspergillus fumigatus</i> Stamm 2 MYK8 und MYK9 im Versuch 2015_005.....	88
Abb. 66: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Kontrolle MYK10 im Versuch 2015_005.....	89
Abb. 67: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt über den gesamten Versuchsverlauf 2015_005.....	89
Abb. 68: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Wiederholungen <i>Aspergillus fumigatus</i> Stamm 1 im Versuch 2015_005.....	90

Abb. 69: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Wiederholungen <i>Aspergillus fumigatus</i> Stamm 2 im Versuch 2015_005	91
Abb. 70: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Kontrolle im Versuch 2015_005	91
Abb. 71: Abbaurate über den Versuchszeitraum am Beispiel MYK 1	99
Abb. 72: Kalkulierte Abbauraten pro Zeitintervall	102
Abb. 73 DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA Verhältnis der methanogenen Archaeen (<i>mcrA/mrtA</i>) im Aktivitätstest 2014_004 mit Mykophenolsäure	103
Abb. 74: DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA Verhältnis der methanogenen Archaeen (<i>mcrA/mrtA</i>) im Aktivitätstest 2014_005 mit Mykophenolsäure	103
Abb. 75: DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA Verhältnis der Bacteria (<i>rrs</i>) im Aktivitätstest 2014_004 mit Mykophenolsäure	104
Abb. 76: DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA Verhältnis der Bacteria (<i>rrs</i>) im Aktivitätstest 2014_005 mit Mykophenolsäure	104
Abb. 77: Methanproduktivität (MP) und Metabolischer Quotient (MQ) der Varianten <i>Monascus ruber</i> (Myk1 und Myk2, a) und <i>Penicillium roquefortii</i> (Myk3 und Myk4, b) sowie der Kontrolle (Myk5, c); der horizontale rote Strich bezeichnet die Schwelle von etwa MQ 3 zum Stressmetabolismus	106
Abb. 78: <i>mcrA/mrtA</i> DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA-Verhältnis der Pilzvariante <i>Monascus ruber</i> (Myk1 und Myk2, a), <i>Penicillium roquefortii</i> (Myk3 und Myk4, b) und der Kontrolle (Myk5, c)	107
Abb. 79: <i>mcrA/mrtA</i> basierte methanogene Gesellschaftszusammensetzung der mit verschimmelter Silage gefütterten Fermenter und der Kontrolle im ersten Durchflussversuch zum Versuchsstart, im stabilen Betrieb und im Prozesszusammenbruch.	108
Abb. 80: <i>rrs</i> DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA-Verhältnis der Pilzvariante <i>Monascus ruber</i> (Myk1 und Myk2, a), <i>Penicillium roquefortii</i> (Myk3 und Myk4, b) und der Kontrolle (Myk5, c)	110
Abb. 81: <i>rrs</i> basierte bakterielle Gesellschaftszusammensetzung der mit <i>Monascus ruber</i> verschimmelter Silage gefütterten Fermenter und der Kontrolle im ersten Durchflussversuch im stabilen Betrieb	112
Abb. 82: <i>rrs</i> basierte bakterielle Gesellschaftszusammensetzung der mit <i>Monascus ruber</i> verschimmelter Silage gefütterten Fermenter und der Kontrolle im ersten Durchflussversuch im Prozesszusammenbruch	113
Abb. 83: <i>mcrA/mrtA</i> DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA-Verhältnis der Pilzvariante <i>Aspergillus fumigatus</i> Stamm 1 (Myk6 und Myk7, a), <i>A. fumigatus</i> Stamm 2 (Myk8 und Myk9, b) und der Kontrolle (Myk10, c); RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (RNeasy, Qiagen) extrahiert	115
Abb. 84: <i>mcrA/mrtA</i> DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA-Verhältnis der Pilzvariante <i>Aspergillus fumigatus</i> Stamm 1 (Myk6 und Myk7, a), <i>A. fumigatus</i> Stamm 1 (Myk8 und Myk9, b) und der Kontrolle (Myk10, c); RNA wurde mit dem FastRNA® Pro Soil-Direct Kit RNeasy Mini Kit (MP) extrahiert	116
Abb. 85: Verlauf der Metabolischen Quotienten (MQ) der methanogenen Archaeen (a) und der Methanproduktivität (b) im Durchflussversuch 2 mit den Varianten <i>Aspergillus fumigatus</i> Stamm 1 (Myk6 und Myk7), A.	

fumigatus Stamm 2 (Myk8 und Myk9), und der Kontrolle (Myk10) sowie dem Wert für das Inokulum (SB1).....	117
Abb. 86: rrs DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA-Verhältnis der Pilzvariante <i>Aspergillus fumigatus</i> Stamm 1 (Myk6 und Myk7, a), <i>A. fumigatus</i> Stamm 1 (Myk8 und Myk9, b) und der Kontrolle (Myk10, c); RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (RNeasy, Qiagen) extrahiert	118
Abb. 87: Poster präsentiert auf dem 11. Rostocker Bioenergieforum, Rostock, Deutschland.....	129

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Vorkommen von Mykotoxinen in Silagen/Futtermitteln	24
Tab. 2: Wirkung von Mykotoxinen	25
Tab. 3: Im Mini-Batchsystem hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Biogasproduktionsprozess getestete Substanzen und deren Kontrollen	35
Tab. 4: Biozönosen aus Versuchsbiogasanlagen des ILT (GS: Grassilage, MS: Maissilage, TMR: Totale Mischration, RG: Rindergülle)	37
Tab. 5: Versuchsdesign der Durchflussversuche mit kontaminierten Silagen und deren Kontrollen.....	39
Tab. 6: Kenndaten der Gasanalysesensoren (Herstellerangabe Fa. Awite, 2008).....	41
Tab. 7: Parameter und Methoden der chemischen Laboranalysen	43
Tab. 8: Qualitativ und quantitativ erfasste Toxine	45
Tab. 9: Analytische Kenngrößen des quantitativen Toxinnachweises in Maissilage.....	45
Tab. 10: Analytische Kenngrößen des quantitativen Toxinnachweises im Gärrest	46
Tab. 11: Veränderung des Frisch- und Trockenmassegehalts während der mikroaeroben Lagerung	48
Tab. 12: Mikrobiologischer Befund der Silagen	48
Tab. 13: Mykotoxikologische Untersuchung der Versuchs-Silagen	51
Tab. 14: Toxinkonzentrationen [ng/ml] in den Kulturextrakten	52
Tab. 15: Qualitativer Toxinnachweis in den Kulturextrakten	52
Tab. 16: RNA-Extraktionsprotokolle für die verwendeten Kits.....	55
Tab. 17: Zusammensetzung und Temperaturprotokoll der Reversen Transkription.....	56
Tab. 18: Temperaturprogramme und Reaktionsansätze für die Primerpaare MeA 1046_F_ino / MeA 1435_R_ino und E939-F, R1378_R für die konventionelle PCR.....	57
Tab. 19: qPCR und RT-qPCR Temperaturprogramme und Reaktionsansätze für die Primerpaare MeA 1046_F_ino / MeA 1435_R_ino und E939-F, R1378_R	59
Tab. 20: Versuchsdurchgang 2014_001 (SB2, Reinsubstanzen: Fumonisin, Gliotoxin, Monacolin K _S , Mykophenolsäure, Roquefortin C, vermahlene Weidelgraskörner, <i>Aspergillus fumigatus</i> inokulierte Reiskörner)	93
Tab. 21: Versuchsdurchgang 2014_004 (SB2, Reinsubstanzen, Wiederholung Mykophenolsäure mit abgestuften Konzentrationen, Monacolin K _L , <i>Aspergillus fumigatus</i> inokulierte homogenisierte Reiskörner)	94
Tab. 22: Versuchsdurchgang 2014_005 (SB II, Reinsubstanzen, Wiederholung Mykophenolsäure in zwei Konzentrationsstufen, Citrinin, Ochratoxin A, Aflatoxin B ₁)	96
Tab. 23: Versuchsdurchgang 2014_008 (Gestresste Biozönose, Reinsubstanzen, Mykophenolsäure, Monacolin K _L , Gliotoxin, Aflatoxin B ₁)	96
Tab. 24: Versuchsdurchgang 2015_002 (zwei verschiedene gestresste Biozönosen, Reinsubstanz: Mykophenolsäure in zwei Konzentrationsstufen)	97
Tab. 25: Versuchsdurchgang 2015_003 (SB2, Reinsubstanz Mykophenolsäure, Kulturextrakte)	97
Tab. 26: Toxinkonzentrationen während des Durchflussversuchs 2015_001	98
Tab. 27: Gegenüberstellung theoretische versus gemessener Monacolin (MON)-Konzentration im Fermenter „Monascus 1“	99
Tab. 28: Gegenüberstellung theoretische versus gemessener Roquefortin (RQ C)-Konzentration im Fermenter „Roquefortii 1“	100

Tab. 29: Toxinkonzentrationen während des Durchflussversuchs 2015_005	101
Tab. 30: Abbauraten über den gesamten Zeitverlauf	102
Tab. 31: Ergebnisse der Spurenelementanalysen vor Beginn und nach Beendigung des Durchflussversuchs 2015_001	123
Tab. 32: Ergebnisse der Spurenelementanalysen vor Beginn und nach Beendigung des Durchflussversuchs 2015_005	124

Abkürzungsverzeichnis:

ACN	Acetonitril
AcOH	Aceton
ATS-Test	Aktivitäts-, Toxizitäts- und Supplementierungstests
BGM	Biozönose Biogasmarker
CH ₄	Methan
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
FM	Frischmasse
g	Erdbeschleunigung
GB-C11	Stoßbelastete Biozönose, als Inokulum verwendet
HPLC-MS/MS	High Performance Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry
KBE	Kolonie bildende Einheiten
MeOH	Methanol
min	Minute
n.d.	nicht detektiert
n.u.	nicht untersucht
NDF	Neutrallösliche Faser
oTM	organische Trockenmasse
oTS	organische Trockensubstanz
RP	Reversed Phase
s	Sekunde
SB1	labile Biozönose Technikumsanlage Eggertshof
SB2	Standardbiozönose Technikumsanlage Eggertshof
TM	Trockenmasse
TMR	Totalmischration
TS	Trockensubstanz
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
VT	Versuchstag

1 Zusammenfassung

Verschimmelung von Silagen bewirkt nicht nur einen Masseverlust; Berichten aus Praxis und Wissenschaft zufolge können mit Schimmelpilzen befallene Silagen auch Störungen des Biogasprozesses verursachen. Die Kenntnislage ist allerdings ungenügend und die Berichte sind teilweise widersprüchlich. Im vorliegenden Vorhaben wurde daher untersucht, (i) ob bekannte Mykotoxine und Mykotoxin bildende Pilzkulturen eine Wirkung auf den Biogasprozess in Batchuntersuchungen zeigen und (ii) ob der Einsatz von künstlich mit den häufig vorkommenden Schimmelpilzen *Monascus ruber*, *Penicillium roquefortii* und *Aspergillus fumigatus* infizierten Maissilagen die Biogasproduktion im praxisnahen semikontinuierlichen Durchflussbetrieb beeinträchtigt. Zur Verifizierung von beobachteten Effekten wurden das Verhalten der Toxine in den Prozessen und Auswirkungen auf wichtige Mikroorganismengruppen untersucht.

ATS-Tests im Mini Batch

Die Wirkung von definierten Mykotoxinen auf den Biogasprozess wurde in Aktivitäts-, Toxizitäts- und Supplementierungstests (ATS-Tests) in Mini Batch Systemen überprüft. Hierzu wurden häufig in Silagen vorkommende Mykotoxine ausgewählt und als gelöste Reinsubstanz zu verschiedenen Gärgemischen zugegeben. Die Abweichung der Wiederholungen der einzelnen Varianten war insgesamt gering und lag mit einer Ausnahme (11% Standardabweichung) bei 5%, was für die hohe Präzision der Experimente spricht. Von den Reinsubstanzen hatte nur die Mykophenolsäure in der Konzentration von 50 mg/l wiederholbar einen inhibierenden Effekt auf die Biogasproduktion mit der Standardbiozönose SB2 als Inokulum. Weiterhin zeigte sich, dass der Zustand des Inokulums zu Versuchsbeginn die Gasbildung beeinflussen kann, Effekte zugesetzter Substanzen wie z. B. Mykotoxine können daher unterschiedlich ausfallen. Die Methangehalte unterschieden sich in den einzelnen Varianten nicht von den entsprechenden Kontrollen.

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Analysen dokumentierten plausibel die Aktivitätsveränderung während der Vergärungen, ein Einfluss der Mykophenolsäure auf die wichtigen Mikroorganismengruppen war aber nicht darstellbar. In den Versuchen mit auf Reis angezüchteten Schimmelkulturen (Stämme von *Monascus ruber*, *Penicillium roquefortii* und *Aspergillus fumigatus*) sowie mit deren Kulturextrakten ergab sich weder ein Effekt auf die Biogasproduktion noch auf den Methangehalt.

Jeweils zu Versuchsende wurden die Gärreste mykotoxikologisch analysiert. Aus diesen Ergebnissen wurden „Abbauraten“ kalkuliert (prozentualer Anteil der gemessenen Konzentration im Verhältnis zur zugegebenen Toxinmenge, korrigiert um die analytische Wiederfindungsrate), wobei jedoch nicht zwischen einem enzymatischen/mikrobiellen Abbau und einer physikalischen Adsorption unterschieden werden konnte. Die „Abbauraten“ lag in den Versuchen mit Mykophenolsäure zwischen 93% und 97,4%. Für Fumonisin B1 lag die „Abbauraten“ bei 57,7% und für Roquefortin C bei 74%. Citrinin, Ochratoxin A und Gliotoxin konnten nur noch in geringen Konzentrationen im Gärrest wiedergefunden werden. Monacolin verblieb weitgehend stabil als Säureform im Gärrest, während die Laktinonform nahezu vollständig in die Säureform umgewandelt wurde. Aflatoxin B1 wurde, abhängig von der verwendeten Biozönose, um 49,3% (SB2) bzw. um 4,7% (gestresste Biozönose) „abgebaut“.

Durchflussbetrieb

Im ersten semikontinuierlichen Durchflussversuch wurden künstlich mit *Monascus ruber* und mit *Penicillium roquefortii* verpilzte Maissilagen hinsichtlich Effekten auf die Biogasproduktion in belasteten Prozessen getestet. Bei der Variante mit *M. ruber* kam es bereits nach einer absolut zugeführten organischen Trockensubstanz von 2.500 g zu einem Einbruch der Methanproduktivität. Bei der Variante mit *P. roquefortii* zeigten sich etwa 2 Wochen später bei einer absolut zugeführten Trockensubstanz von 3.800 g Symptome einer Prozessstörung, während die Methanproduktivität in der Kontrolle noch etwas länger auf hohem Niveau blieb. Die Versuche wurden nach Erreichen des Abbruchkriteriums infolge einer Prozessversäuerung wegen des in allen Varianten unterlagerten Kobaltmangels nach den Versuchstagen 155 und 176 beendet. Die molekularbiologischen Analysen indizierten die Prozessversäuerung deutlich früher als die konventionelle Analytik. Dies unterstreicht ihre Eignung zur Prozessdiagnose und als Frühwarnsystem vor Prozessstörungen. Die molekularbiologischen Ergebnisse gaben keinen Anhaltspunkt dafür, dass die Verschimmelung mit *M. ruber* oder *P. roquefortii* die Gesellschaftszusammensetzung der methanogenen Archaeen und der Bacteria oder auch deren Aktivität beeinflusst hätten.

Den mykotoxikologischen Analysen zufolge reicherten sich Monacolin K_S und Roquefortin C in den Prozessen, die mit durch *M. ruber* bzw. *P. roquefortii* verschimmelter Silage betrieben wurden, über den Versuchszeitlauf an. Obwohl die Substanzen nicht oder kaum abgebaut wurden und sich in den Fermentern anreicherten, schienen sie den Prozess zumindest bei den gegebenen Konzentrationen nicht gravierend zu beeinträchtigen. Eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung zur finalen Prozessstörung konnte nicht festgestellt werden, hier wären weiterführende Untersuchungen nötig. Zumindest Roquefortin C scheint keine Hemmung verursacht zu haben, da weder in den Mini-Batchversuchen (siehe oben) noch im zweiten Durchflussversuch (auch hier kam es zu einer Anreicherung von Roquefortin C im Gärgemisch, siehe unten) eine Prozessbeeinträchtigung durch dieses Mykotoxin nachgewiesen werden konnte.

Im zweiten Durchflussversuch wurden zwei mit verschiedenen *A. fumigatus* Stämmen verschimmelte Silagen getestet. Im Versuchsverlauf zeigten sich keine gravierenden Effekte durch die Zugabe, in den *A. fumigatus* Varianten wurde im Vergleich zur Kontrolle lediglich a priori eine etwas geringere Methanproduktivität gemessen. Der Metabolische Quotient (MQ) zeigte in allen Varianten bereits zu Versuchsbeginn und im weiteren Versuchsverlauf noch intensiviert eine Stresssituation für die methanogenen Archaeen an und prognostizierte zu Versuchsende einen Prozesszusammenbruch. Die prozesschemischen Analysen bestätigten in allen Gärgemischen einen im Versuchsverlauf zunehmend gestörten Betrieb, der wahrscheinlich durch Mangel an Kobalt verursacht war. Trotz der unterlagerten Prozessinsuffizienz konnte kein Unterschied zwischen den Varianten mit *A. fumigatus*-Verschimmelung und der Kontrolle festgestellt werden. In Verbindung mit den Ergebnissen der Batch-Untersuchungen mit Einsatz der typischen *A. fumigatus* Toxine als Reinsubstanz liegt daher kein Hinweis vor, dass mit *A. fumigatus* verschimmelte Silage den Biogasprozess beeinträchtigt.

Durch die mykotoxikologischen Analysen konnten im Gärrest typische *Aspergillus*-Toxine wie Gliotoxin, Fumiquinazolin C/D, Fumagillin, Fumitremogen B und Fumigaclavin C nachgewiesen werden. Der Gehalt an Roquefortin C, entstanden wahrscheinlich durch eine Co-Inokulation bei der Beimpfung der Silage, stieg auch im zweiten Durchflussversuch im Versuchszeitraum an. Im Vergleich zum ersten Durchflussversuch lag hier aber kein Hinweis auf eine Beschleunigung der Prozessstörung

durch die Verschimmelung vor, was (wie bereits oben erwähnt) einen schädlichen Einfluss von Roquefortin C auf den Biogasprozess bei den gegebenen Konzentrationen ausschließt.

Die geprüften Toxine oder verschimmelten Silagen lösten keine oder zumindest keine massive Prozessstörung aus. Das bedeutet aber nicht, dass der Einsatz verschimmelter Silagen in Biogasanlagen unbedenklich ist, auch wenn eine energetische Verwertung sinnvoll erscheint. Bevor entsprechende Empfehlungen an Anlagenbetreiber ausgegeben werden können, sollte zum einen geprüft werden, ob andere Sekundärmetaboliten von Schimmelpilzen gravierende Störungen auslösen können, und zum anderen, ob durch die Anreicherung von Toxinen wie z. B. wie Monacolin K_S und Roquefortin C ein hygienisch-toxikologisches Risiko bei der Gärrestausbringung entsteht.

2 Summary

Mold growth in silages is not only causing a decrease in biomass, according to scientific and practical reports mold infested silages can further cause biogas process disturbances. However, the current knowledge is insufficient and reports are partly contradictory. Thus, in the presented study it was examined (i) if known mycotoxins and mycotoxin producing fungal cultures can have an effect on biogas production in batch experiments and (ii) if maize silages artificially infected with the common molds *Monascus ruber*, *Penicillium roquefortii* and *Aspergillus fumigatus*, can impede biogas production in practice relevant semi-continuous flowthrough experiments. For verification of observed effects, mycotoxin concentrations and impacts on important microbial groups were monitored during all experiments.

Activity-, toxicity- and supplementation- mini batch experiments

The effects of pure mycotoxins on biogas production were examined by activity-, toxicity- and supplementation-testing (ATS-test) in a mini-batch set-up. For this approach, mycotoxins known to occur frequently in silages were selected and applied as pure solution to various anaerobic digestion sludges. Variation of replicates was generally minimal with 5% standard deviation (one exception 11%), reflecting the high reproducibility of the experiments. Only in the variants treated with 50 mg / l mycophenolic acid, a repeated inhibition of biogas production of the inoculum SB2 was observed. Further, it turned out that the inoculum condition at experiment start influenced the gas production, thus effects caused by applied substances such as mycotoxins, can diverge. However, the measured methane contents did not differ from the respective controls.

The results of the performed microbiological analyses reasonably documented the observed changes in activity during anaerobic digestion, whereas a definite effect of mycophenolic acid on important microbial groups was not depictable. No effect on biogas production and methane content was detected in experiments with mold infected rice or mold fungal culture extract.

Mycotoxicological analysis of digester sludge was performed at the end of each experiment. Based on the respective results “degradation rates” were calculated (percentage of measured toxin concentration in relation to the added toxin amount, corrected by the analytical recovery rate) whereby no differentiation between enzymatic / microbial degradation and physical adsorption was possible. During experiments with mycophenolic acid “degradation rates” ranged from 93% to 97.4%. For fumonisin B1 and roquefortin C “degradation rates” of 57.7% and 74% were calculated. Citrinin, ochratoxin A and gliotoxin were only detected at very low concentrations in the digestate. Monacolin remained stable in its acid form in the digestate to a great extent, while its lactone form was almost completely transformed into the acid form. Aflatoxin B1 was degraded by 49.3% (SB2) and 4.7% (stressed microbial community), depending on the used microbial inoculum.

Semicontinuous flow-through experiments

In the first semicontinuous flow-through experiment, maize silages infected artificially with *Monascus ruber* or *Penicillium roquefortii* were examined for their potential effect on biogas production in stressed processes. In the *M. ruber* variant, methane productivity severely decreased already after feeding an absolute amount of 2,500 g organic dry matter. In the *P. roquefortii* variant, symptoms of process disturbance occurred two weeks later

after feeding an absolut amount of 3,800 g dry matter, while in the control digester, methane productivity remained on a high level a few weeks longer. The experiment was ended at experimental days 155 and 176, respectively, after the termination criterium was reached due to process acidification caused by cobalt deficit in all variants. Molecular biological analysis indicated process acidification much earlier than conventional analytics, emphasizing their suitability for process diagnosis and as early warning systems of process disturbances. The molecular biological results showed no evidence that the mold infection with *M. ruber* and *P. roquefortii* influenced the composition of the methanogenic archaeal and bacterial community or their activity.

According to the mycotoxicological analyses, monacolin K_S and roquefortin C accumulated over the trial period in the variants operated with *M. ruber* and *P. roquefortii* molded silage. The respective substances did not seem to affect the processes severely in the given concentrations although they were hardly degraded and accumulated in the fermenters. A definite dose-response relationship could not be determined, further studies would be necessary for clarification. At least roquefortin C did not seem to cause inhibition, since no process limitation was caused by this mycotoxin, neither in the mini-batch experiments (see above) nor in the second semicontinuous flow-through experiment (where roquefortin C accumulated in the digestate as well, see below).

In the second semicontinuous flow-through experiment, maize silages infested with two individual *A. fumigatus* strains were tested. Throughout the experiment, no severe effects were caused by their addition, the *A. fumigatus* variants only showed a priori slightly lower methane productivity as compared to the control. The metabolic quotient (MQ) indicated metabolic stress of methanogenic archea already at the start of the experiment and even more intensely with proceeding trial time, and predicted process failure at the end of the experiment. Process chemical analysis confirmed increasing process disturbance in all variants throughout the experiment, most probably caused by cobalt deficit. Despite this underlaid process insufficiency, no difference was observed between the *A. fumigatus* variants and the control. Taken together with the results of the batch experiments with characteristic *A. fumigatus* toxins in pure solution, there was no indication that maize silage infested with *A. fumigatus* affected the biogas process.

Characteristic *Aspergillus* sp. toxins such as gliotoxin, fumiquinazolin C /D, fumagilin, fumitremorgen and fumigaclavin C were detected in the digestate of the variants operated with the molded silages by mycotoxicological analyses. Just like in the first flow-through experiment, the roquefortin C content increased in the experiment, probably due to co-inoculation during artificial infection of maize silage. Since there was no indication for accelerated process disturbance by growth of the mold, a negative effect of roquefortin C on the biogas production process can be excluded, at least at the given concentrations.

The tested toxins or mold infected silages induced no or at least no massive process disturbances. However, this does not mean that the use of of molded silage in biogas plants is harmless in general, even though energetic utilization seems reasonable. Before respective advices can be given to biogas plant owners, it needs first to be examined if other secondary metabolites produced by mold-fungi could cause severe process disturbances, and second if accumulation of particular toxins such as monacolin K_S or roquefortin C can cause hygienic-toxicological risks by digestate application.

3 Einleitung

Silagen für die Biogasproduktion sind nicht selten durch Schimmelpilze befallen. Mit dem Pilzbefall geht dabei nicht nur ein Verlust an Nährstoffen einher, einige der Pilze können auch zusätzlich potente Mykotoxine produzieren. Manche dieser Toxine sind giftig für Mensch und Tier, einige können auch schädlich auf Mikroorganismen wirken.

Im Biogasprozess setzt eine mikrobiologische Gesellschaft vor allem aus Bakterien und methanbildenden Archaeen pflanzliche und tierische Einsatzstoffe zu Biogas um. Die in verschimmelter Silage enthaltenen Mykotoxine könnten für stoffliche Umsetzungen wichtige Mikroorganismen hemmen und so verminderte Biogasausbeuten bis hin zu Prozessstörungen bewirken. Letzteres wurde bereits häufiger von Biogasanlagen-Betreibern berichtet, nachdem sie verschimmelte Silage in ihrer Anlage eingesetzt hatten (Ostertag und Preißler, 2013; Lebuhn et al., 2016). Ziel dieses Verbundvorhabens war es demnach, den Einfluss von ausgewählten, in der Praxis relevanten Mykotoxinen sowie von verschimmelter Mais-Silage auf die Biogasproduktion zu untersuchen.

3.1 Vorkommen von Schimmelpilzen in Silagen

In Mitteleuropa musste seit jeher für mindestens 200 Winterfüttertage Grundfutter für Wiederkäuer zur Verfügung gestellt werden (Amend 1990). In der Vergangenheit wurde zu diesem Zweck vor allem Heu hergestellt (Driehuis und Oude Elferink 2000), heutzutage gibt es mit der Silierung die Möglichkeit, das ganze Jahr über ein konstantes Futterangebot mit konstanter Futtermittelqualität zu gewährleisten. Silierung ist eine Konservierung von pflanzlichem Material jeglicher Art. Damit kann die Qualität und der Ausgangsfutterwert des Pflanzenmaterials weitgehend erhalten werden. Die Konservierung wird unter anaeroben Bedingungen durch eine pH-Wert-Absenkung erreicht. Dabei werden kurzkettige organische Säuren, meist Milchsäure über Milchsäuregärung durch Bakterien produziert. Dies führt zu einer starken Einschränkung der mikrobiellen Aktivität im Futtermittel und auch zur einer Minderung der Aktivität pflanzlicher und mikrobieller Enzyme (Müller und Bauer 2006; Ostertag 2010). Die Silierung ist sehr weit verbreitet. In Deutschland werden über 90% der Futtermittel siliert. Hauptsächlich werden dabei Gras- oder Maissilagen hergestellt (Alonso et al. 2013).

Schimmelpilze sind Eukaryonten und kommen ubiquitär in der Natur vor; daher sind geringe Mengen an Schimmelpilzsporen in Futtermitteln nicht zu vermeiden und als normal anzusehen (LfL-Bericht 2005; Gedek 1980; Gedek et al. 1981). Ein gehäuftes Auftreten von Schimmelpilzen in Silage ist allerdings unerwünscht, da sie als Auslöser für Allergien und schwer behandelbare Infektionen ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier darstellen können.

Je nach Zeitpunkt des Befalls lassen sich die Schimmelpilze in Feldpilze, die Futtermittel bereits auf dem Feld befallen, und Lagerpilze, die erst nach der Ernte aufgrund unsachgemäßer Lagerung bzw. beim Transport auftreten, einteilen (Gedek et al. 1981; Frede 2010). Lagerpilze können sich auch bei Silierung unter nicht optimalen Gärbedingungen (schlechte Verdichtung des Substrats, zu langsamer Abfall des pH-Wertes, usw.), v.a. durch Sauerstoffeintrag bei Silageentnahme ausbreiten (Ostertag 2010). Frisch nach der Ernte wurden in Futtermitteln bis zu 50 verschiedene Schimmelpilzgattungen gefunden (Gedek et al. 1981). Zu den Feldpilzen gehören beispielsweise *Fusarium*-Arten und Vertreter der Gattungen *Acremonium*, *Alternaria* oder *Claviceps* (Gedek et al. 1981; LfL-Bericht 2011). Nach der Silierung bleiben nur wenig anspruchsvolle Schimmelpilzarten übrig. Zu den Lagerpilzen zählen beispielsweise die

Gattungen *Penicillium*, *Mucor*, *Absidia* oder *Aspergillus* (Gedek 1980; LfL-Bericht 2011; Alonso et al. 2013). Zu Vorkommen und Häufigkeit von Schimmelpilzen in Silage gibt es bereits umfangreiche Untersuchungen. Zu den am häufigsten vorkommenden Pilzarten zählen *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium roquefortii* und *Monascus ruber* (Gedek et al. 1981; Auerbach 1996; Schneewis et al. 2000; LfL-Bericht 2009; Ostertag 2010).

Schimmelpilze in Silage haben allerdings noch eine besondere Bedeutung, da sie toxische Sekundärmetabolite (Mykotoxine) bilden können, die ebenfalls die Gesundheit und Leistung der Tiere und auch von Menschen gefährden können (Amend 1990). Nach erfolgreicher Silierung sind Feldpilze nicht mehr im keimfähigen Zustand vorhanden und somit nicht fähig, neue Mykotoxine zu produzieren. Bis dahin bereits gebildete Toxine können allerdings in der Silage oftmals unverändert enthalten bleiben (Gedek et al. 1981). Eine stark mit Schimmelpilzen kontaminierte Silage enthält aber nicht zwangsläufig hohe Mengen an Mykotoxinen oder die ganze Mykotoxinvielfalt, die eine Schimmelpilz-Spezies bilden kann (Betina 1989). Die Toxinproduktion ist von Umweltfaktoren wie pH-Wert, Temperatur, vorhandene Nährstoffe, CO₂-Partialdruck, Wasseraktivität oder Sauerstoffgehalt abhängig (Orth 1981; Auerbach 1996; Bauer und Meyer, 2011).

Tab. 1 gibt einen Überblick über die Konzentrationen der in Silagen/Futtermitteln vorkommenden Mykotoxine.

Tab. 1: Vorkommen von Mykotoxinen in Silagen/Futtermitteln

Mykotoxin	Konz. [µg/kg]	Substrat	Literatur
Aflatoxin B1	13,8	Maisfutter	Amigot et al. 2006
	80	Hirse	Amigot et al. 2006
	29,04	Mais/ Hirsesilage	Sassahara et al. 2005
	160	Maissilage	Gonzales et al. 2011
	155,78	Maissilage	Gonzales et al. 2008
	30	Maissilage	Garon et al. 2006
Citrinin	64,2	Gras/-Maissilage	Schneweis 2000
	38,9	Maissilage	Richard et al. 2007
	25	Maissilage	Garon et al. 2006
	585	fermentierter Maisteig	Kpodo et al. 1995
Fumagillin	722	Grassilage (erwärmt)	Ostertag 2010
	1740	Maissilage (verpilzt)	Ostertag 2010
Fumigaclavin	18792	Maissilage (verpilzt)	Ostertag 2010
Fumonisin B1	172	Maissilage	Uegaki et al. 2012
	1840	vorfermentierte Maissilage	Gonzales et al. 2008
	2490	nachfermentierte Maissilage	Gonzales et al. 2008
	1824	Maissilage	Kim et al. 2004
	2560	Reissilage	Uegaki et al. 2012
	6821	Silage	Grajewski et al. 2012
Fumiquinazolin D	9940	Maissilage (verpilzt)	Ostertag 2010
Fumitremorgen B	2080	Maissilage (verpilzt)	Ostertag 2010
Gliotoxin	513	Gras/-Maissilage	Ostertag 2010
	906	Maissilage	Rasmussen et al. 2010
	936	Maissilage	Richard et al. 2007
Monacolin K _L	15600	Gras/-Maissilage	Schneweis 2000
	54600	Gras/-Maissilage	Ostertag 2010
Monacolin K _S	65400	Gras/-Maissilage	Schneweis 2000
Mykophenolsäure	35200	Gras/-Maissilage	Schneweis 2000
	21400	Gras/-Maissilage	Ostertag 2010
	1646	Maissilage	Rasmussen et al. 2010
	194	Maissilage	Van Pamel et al. 2011
	9311	Silage	Driehuis et al. 2013
Ochratoxin	140	Weizen	Peraica et al. 2010
	100	Mais	Peraica et al. 2010
	29	Silage	Grajewski et al. 2012
Roquefortin C	12900	Gras/-Maissilage	Ostertag 2010
	33662	Maissilage	Rasmussen et al. 2010
	90	Maissilage	Van Pamel et al. 2011
	15000	welke Grassilage	Auerbach et al. 1998
	29000	Maissilage	Auerbach et al. 1998
	25986	Silage	Driehuis et al. 2013
Trypacidin	13200	Grassilage (erwärmt)	Ostertag 2010
Verruculogen	532	Grassilage (verpilzt)	Ostertag 2010

3.2 Überblick über die Wirkung von Mykotoxinen

Die Wirkungen von Mykotoxinen können sehr vielfältig sein. Eine Übersicht darüber gibt Tab. 2. Über den Einfluss auf Biozöosen, wie sie in Biogasprozessen vorkommen, ist bisher nur wenig bekannt.

Tab. 2: Wirkung von Mykotoxinen

Mykotoxine	Produzent	Wirkung	Literatur
Aflatoxin B1	<i>Aspergillus flavus</i> und <i>A. parasiticus</i> selten auch von <i>A. nomius</i>	Hohe akute Toxizität, immunsuppressiv, teratogen, karzinogen, mutagen gegen Mikroorganismen	Cole und Cox 1981, Wiesmüller 2013, Frede 2010, Betina 1989, Nau et al. 2003, Ebermann und Elmadfa 2011
Citrinin	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>Aspergillus</i> -, <i>Penicillium</i> - und <i>Monascus</i> -Arten, unter anderem <i>A. niveus</i> , <i>P. viridicatum</i> oder <i>M. ruber</i>	Nephrotoxisch und hepatotoxisch antibakteriell (eher gram-positive als gram-negative Bakterien), antiprotozoisch, antimykotisch, zytotoxisch; Wirkung auf die Cholesterin- und Triglyceridbiosynthese, beeinträchtigt respiratorische Enzyme, kanzerogen, mutagen und teratogen, inhibiert die DNA-/RNA- und Protein-Synthese	Cole und Cox 1981, Betina 1989, Trucksess und Pohland 2000, Frede 2010, Ebermann und Elmadfa 2011, Driehuis 2013
Fumagillin	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Antibakteriell, fungizid	Eble und Hanson 1951
Fumigaclavine A, B,C, Festuclavin	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium chermesinum</i>	Immunmodulatorisch, antibakteriell	Cole et al. 1977
Fumonisin B1	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. anthophilum</i> , <i>F. globosum</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>F. beomiforme</i> , <i>F. dlamini</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. polyphialidicum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F.</i>	Wirkung auf <i>de novo</i> -Sphingolipidmetabolismus, renal-, hepato- und nephrotoxisch und -karzinogen	Driehuis 2013, WHO 2000, Desjardins 2006, Frede 2010

	<i>thapsinum, Gibberella fujikuroi, Alternaria alternata lycoperisci</i>		
Mykotoxine	Produzent	Wirkung	Literatur
Fumiquinazoline Fumichinazoline	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Zytotoxisch, fungizid	Numata et al. 1992, Belofsky et al. 2000
Fumitremorgen A,B,C	<i>Aspergillus fumigatus, Penicillium verruculosum</i>	Wirkung auf zentrales Nervensystem	Steyn und Vleggaar 1985
Gliotoxin	<i>Aspergillus fumigatus, Penicillium terlikowskii, P. obscuro, P. cinerascens, A. terreus, A. chevalieri, Gliocladium fimbriatum, Trichoderma lignorum, T. hamatum und T. viride</i>	Starke antibiotische, sowie antimykotische, antivirale und immunsuppressive Wirkung, antibiotische Wirksamkeit (abhängig vom Vorhandensein der Disulfidbrücke), apoptotische Wirkung auf Enterozyten, zytotoxisch und neurotoxisch	Cole und Cox 1981, Betina 1989, Driehuis 2013, Gardiner 2005, Spikes et al. 2008, Yamada et al. 2000, Braithwaite et al. 1987, Upperman et al. 2003, Wenehed et al. 2003
Helvolsäure	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Antibakteriell (gram positive Bakterien)	Okuda et al. 1966, Cole and Cox 1981
Monacolin K	<i>Monascus ruber</i> (Hauptproduzent), <i>Aspergillus terreus, Doratomyces nanus, Gymnoascus umbrinus, Verticillium rexianum</i>	Hemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG CoA-Reduktase), (Enzym in der Biosynthese von Cholesterin, Ergosterin und Stigmasterin antimykotische Wirkung z. B. bei <i>Penicillium roquefortii</i> , eine hemmende Wirkung gegenüber Protozoen wie <i>Plasmodium falciparum</i> , antibakterielle Wirkung (Beeinflussung der Membranlipid-Synthese, Hemmung der Archaea in der Methansynthese	Driehuis 2013, Endo et al. 1986a; Wagner et al. 1998, Aravindan et al. 2008, Schneewis 2000, Grellier et al. 1994, Hedl und Rodwell 2004, Miller und Meyer 2001

Mykotoxine	Produzent	Wirkung	Literatur
Mykophenol-säure	<i>P. roquefortii</i> (Hauptproduzent), <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. brunneo-stoloniferum</i> , <i>P. carneo-lutescens</i> , <i>P. griseobrunneum</i> , <i>P. nagemi</i> , <i>P. patris-mei</i> , <i>P. paxilli</i> , <i>P. scabrum</i> , <i>P. stoloniferum</i> , <i>P. szaferei</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>Verticicladelia abientina</i> , <i>Septoria nodorum</i>	Immunsuppressiv (Hemmung der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH), Hemmung gegenüber eukaryontischer IMPDH ist wirksamer als gegenüber prokaryontischer (bakterielle Replikation nur schwach unterbunden, antibakterielle, antifungale und antivirale Eigenschaften, wobei sich die antibiotische Aktivität dabei eher gegen gram-positive als gegen gram-negative Bakterien Wirkung gegen Neoplasmen, antiviral (<i>in vitro</i>))	Cole und Cox 1981, Betina 1989, Sievers et al. 1997, Shipkova et al. 1999, Digits und Hedstrom 1999, Henry et al. 2006, Schneewis et al. 2000
Ochratoxin	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> und <i>P. verrucosum</i> , <i>P. alliaceus</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>A. sclerotiorum</i> oder <i>A. sulphureus</i>	Hepatotoxisch, nephrotoxisch, kanzerogene, teratogene, neurotoxische und genotoxische Eigenschaften	Ebermann und Elmadfa 2011, Betina 1989, Cole et al. 2003; Wiesmüller 2013, Trucksess und Pohland 2000, Frede 2010
Pseudorotin A	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Neuritogene Aktivität, insektizid	Komagata et al. 1996, Hayahi et al. 2007
Roquefortin C	<i>Penicillium roquefortii</i> (Hauptproduzent) <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. concentricum</i> und <i>P. expansum</i>	Neurotoxisch, antibakteriell (gram-positive Bakterien)	Tüller 2005, Cole und Cox 1981, Frede 2010, Driehuis 2013, Kopp und Rehm 1979
Sphinofungine	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fungizid, antibakteriell	VanMiddlesworth et al. 1992
Trypacidin	<i>Aspergillus fumigatus</i>	U.a. antiprotozoisch	Balan et al. 1964
Verrucolugen	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium verruculosum</i>	Wirkung auf zentrales Nervensystem	Steyn und Vleggaar 1985

Zu den drei ausgewählten Schimmelpilzarten *P. roquefortii*, *M. ruber* und *A. fumigatus* gibt es aber Studien zur antibakteriellen Wirksamkeit der von ihnen gebildeten Mykotoxine. Die potentiellen Wirkungspunkte dieser Toxine im Biogasprozess sind in Abbildung 1 dargestellt. Für das durch *P. roquefortii* gebildete Roquefortin C konnte eine Hemmung der Ribonukleinsäure-Synthese und eine daran gekoppelte Wachstumshemmung gram-positiver Bakterien nachgewiesen werden (Kopp und Rehm, 1979). Mykophenolsäure, die ebenfalls durch *P. roquefortii* gebildet wird, zeigte antibiotische und antivirale Wirksamkeit. Auch für die durch *A. fumigatus* gebildeten Toxine Gliotoxin, Fumigaclavin, Fumagillin und Fumiquinazolin ist eine antibiotische/antibakterielle Wirkung belegt (siehe Tabelle 2). Weiterhin ist auch eine antibakterielle Wirkung der von *M. ruber* gebildeten rot-orangen Pigmente bekannt, weshalb diese häufig zur Nahrungsmittelkonservierung eingesetzt werden (Vendruscolo et al., 2013). Aus einer Hemmung für den Biogasprozess wichtiger Bakterien würde ein verschlechterter Substratabbau und damit einhergehend eine verminderte Biogasproduktion resultieren.

Zusätzlich zu einer Wirkung auf die Bakterien im Biogasprozess ist aus Studien zur Methanbildung im Pansen bekannt, dass das durch *M. ruber* produzierte Statin Monacolin die Zellwandsynthese methanogener Archaeen und somit deren Wachstum hemmen kann (Miller and Wolin, 2001; Morgavi et al., 2014). Eine Hemmung dieser Organismengruppe hätte im Biogasprozess die Reduktion der Methanproduktion sowie eine Ansammlung von bakteriell produzierten Säuren (Versauerung) zur Folge.

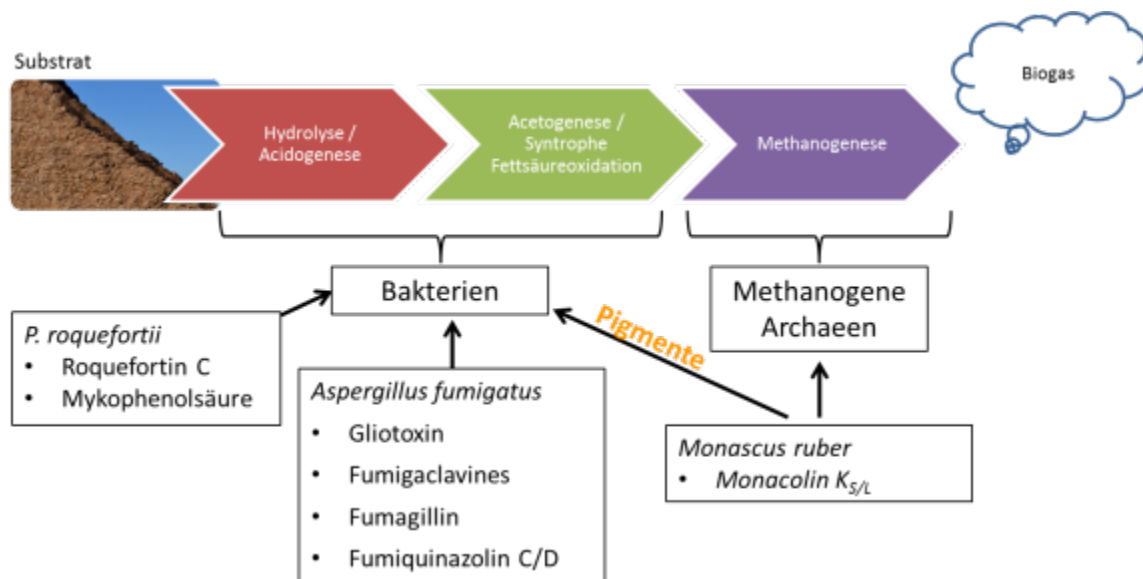


Abb. 1: Mögliche Angriffspunkte der durch *P. roquefortii*, *M. ruber* und *A. fumigatus* produzierten Mykotoxine auf die Mikroorganismen im Biogasprozess

Beides, sowohl die Hemmung wichtiger bakterieller Populationen als auch die Hemmung der methanogenen Archaeen könnten Prozessstörungen auslösen.

4 Problemstellung und Zielsetzung des Vorhabens

Für die Energiewende ist der Ausbau der erneuerbaren Energien und damit auch der Biomassenutzung unabdingbar. Biogasanlagen können hierzu aufgrund der vergleichsweise guten Einpassung ins bayerische Landschaftsbild und der Möglichkeit zur wetterunabhängigen Steuerung der Energielieferung einen wichtigen Beitrag leisten. Auch im Hinblick auf bioökonomische Zielsetzungen gilt es dabei vor allem, den Wirkungsgrad des Gesamtsystems zu optimieren. Dieser ist bereits reduziert, wenn Substratverluste bis zur Einbringung in den Fermenter entstehen. Diese Verluste können beachtliche Ausmaße von deutlich über 15% annehmen, besonders wenn auf eine sachgemäße, luftdichte Abdeckung von Siloanlagen verzichtet wird (Ostertag und Preißler, 2013). Neben dem reinen Masseverlust durch mikrobiellen Abbau können sich auch Schimmelpilze fallweise stark vermehren. Diese sind bekannt dafür, dass sie toxische oder auch antibiotisch wirksame Substanzen wie Penicillin bilden können. Es gibt Hinweise, dass dadurch die Stoffwechsellätigkeit der Biogas-Mikroorganismen und damit die Gesamtbilanz des Biogasprozesses beeinträchtigt werden kann. Dies ist aber nach derzeitigem Kenntnisstand nicht zu quantifizieren. Für eine optimale energetische Nutzung z.B. geringfügig schimmelpilzbefallenen Substrats ist die Kenntnis der Ursachen und Wirkungen und des Ausmaßes von Prozessstörungen dringend erforderlich.

Ein Ziel der Bioökonomie-Strategie ist es, die Nutzung biologischer Ressourcen zu optimieren. Auch aus ökonomischer Sicht ist ein Zusammenbruch des Biogasprozesses unbedingt zu vermeiden. Hierzu ist eine verlässliche Prozessdiagnose mit Einsatz entsprechend geeigneter Analytik erforderlich. Zur Erfassung von Prozessstörungen werden verschiedene prozesschemische und –physikalische Routinen wie die Bestimmung des FOS/TAC-Verhältnisses und des Spektrums kurzkettiger Fettsäuren angewendet, die allerdings erst relativ spät reagieren (Lebuhn et al., 2014b). Neuerdings können auch molekularbiologische Methoden wie der Metabolische Quotient und die Bestimmung von Bioindikatoren für bestimmte Prozesszustände eingesetzt werden, die direkt auf die Akteure des Biogasprozesses abzielen, auf die Mikroorganismen und ihre Aktivität (Lebuhn und Munk, 2015). Sie reagieren schneller als die konventionelle Analytik und eignen sich daher besonders als Frühwarnsysteme vor Prozessstörungen. Im vorliegenden Vorhaben sollte geprüft werden, ob sich diese Methoden auch zur Frühdiagnose von eventuell durch Fütterung mit verschimmelter Silage ausgelösten Prozessstörungen eignen.

Der Einsatz verpilzter Einsatzstoffe in Biogasanlagen ist aber nicht nur aus energetischer Sicht genauer zu betrachten. In Silage wachsende Schimmelpilze können eine Vielzahl von Stoffen produzieren, die für höhere Organismen, auch Säugetiere, toxisch sein können. Der Metabolismus und Verbleib dieser Substanzen im Biogasprozess ist ungeklärt. Hinweise liefern Untersuchungen am Rind, die Ergebnisse sind jedoch nicht ungeprüft auf Biogasprozesse übertragbar. Daher sollten Metabolismus und Verbleib von in der Praxis relevanten Substanzen im Batch- wie auch im Durchflussverfahren geprüft werden. Neben den Stoffwechselprodukten von in Silage wachsenden Schimmelpilzen sollten auch bereits auf dem Feld produzierte toxische Stoffwechselprodukte wie z.B. Aflatoxin B₁ untersucht werden, das angesichts des Klimawandels auch bei uns an Bedeutung gewinnen dürfte. Bei Zukaufsfuttermitteln sind Toxine bereits jetzt von fachlichem und futtermittelrechtlichem Interesse. Beim Rind ist der Metabolismus von einigen Toxinen gut erforscht, die Prüfung im Biogasprozess steht jedoch noch aus.

Im Zusammenschluss der Institute ILT und ITE sowie der Abteilung AQU der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (s. 5.1) mit dem Lehrstuhl für Tierhygiene (TiHy) der Technischen Universität München (s. 5.2) sollten diese komplexen Fragestellungen interdisziplinär und synergistisch bearbeitet werden. Resultate und Erkenntnisse werden der Praxis und der wissenschaftlichen Gemeinschaft vermittelt.

5 Arbeitspakete und Institutionen

Die beteiligten Institutionen ergänzen sich hinsichtlich ihrer fachlichen Kompetenzen und ermöglichten somit einen interdisziplinären Ansatz zur Problemlösung. Um die speziellen Kompetenzen bestmöglich zu nutzen wurden Teilprojekte generiert, die in Abstimmung (Besprechungen im dreimonatigen Rhythmus, bzw. bilateral) mit den Beteiligten bearbeitet wurden (siehe auch:

http://www.lfl.bayern.de/schwerpunkte/regenerative_energien/059474/index.php)

5.1 Verbundpartner an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LFL)

5.1.1 Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT 2a)

Die Wirkung relevanter Mykotoxine auf Gasertrag und Gasqualität wurde zunächst in als Mini-Batch-Systemen ausgeführten Aktivitäts-, Toxizitäts- und Supplementierungstests untersucht. Neben Reinsubstanzen wurden Extrakte relevanter Schimmelpilzkulturen sowie von Praxissilagen getestet. Auf den Erkenntnissen aufbauend wurden gezielte Untersuchungen mittels semikontinuierlichen Durchflussversuchen in Versuchsfermentern bei steigender Raumbelastung durchgeführt. Die Gehalte an Mykotoxinen in den verschimmelten Substraten und in den Gärresten wurden mittels LC-MS/MS-Technik bestimmt (s. Abschnitt 6.5).

5.1.2 Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft (ITE 1b)

Durch gezielte Betriebsbesuche und ein sogenanntes „Controlling am Silo“ sollten die wichtigsten Einflussfaktoren, die durch die Silagenherstellung und Lagerung bedingt sein können, ermittelt.

<http://www.lfl.bayern.de/ite/futterwirtschaft/056865/index.php>

5.1.3 Abteilung für Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, Mikro- und Molekular-Biologie (AQU 1c)

Molekularbiologische Untersuchungen sollten eine Beeinträchtigung spezifischer mikrobieller Prozessindikatoren durch diverse Mykotoxine aufzeigen. Dazu wurde die Quantität und Aktivität von Bakterien und methanogenen Archaeen in den Versuchsfermentern mittels quantitativer Realtime-PCR bestimmt (siehe Material und Methoden, Abschnitt 5.6). Für Proben aus relevanten Prozesszuständen wurden zusätzlich Populationsanalysen durchgeführt und so die vorhandene mikrobielle Gesellschaftszusammensetzung analysiert.

Ziel beider Herangehensweisen war dabei die Früherkennung möglicher, durch Mykotoxine verursachter Prozessinstabilitäten.

http://www.lfl.bayern.de/zentrale_analytik/069593/index.php

5.2 Verbundpartner Technische Universität München (TUM), Lehrstuhl für Tierhygiene

Aufgaben des Lehrstuhls für Tierhygiene waren die Identifikation und Quantifizierung verschiedener Sekundärmetabolite mit hoher Präzision und Richtigkeit in Silagen und Gärresten, um so deren Einfluss und Stabilität im Biogasprozess zu untersuchen. Neben

mykologischen Untersuchungen der Silagen wurden zwei Analysemethoden für die simultane Extraktion von verschiedenen Mykotoxinen (14 qualitativ und 14 quantitativ erfassbare) unterschiedlicher Schimmelpilzgattungen, die häufig in Silagen auftreten, entwickelt. Die Auswahl an zu untersuchenden Toxinen wurde anhand einer Literaturrecherche getroffen (Tab. 1), wobei das Vorkommen der Mykotoxine im Substrat bzw. der Silage und deren toxische Eigenschaften und Wirkungen im Fokus standen (Tab. 2).

6 Material und Methoden

6.1 Controlling und Beprobung von Praxissilagen

Es wurden 14 Betriebsbesuche durchgeführt (Abb. 2). Hierbei wurden die vorhandenen Silagen einem Silocontrolling nach LfL Bericht (2009) unterzogen. Darüber hinaus wurden Daten zum Silomanagement erhoben. Der Rücklauf der übergebenen Fragebögen zur Silierpraxis war sehr verhalten.

Beim Controlling wurden mehrere Einzelproben gewonnen, welche weiterführenden Untersuchungen zugeführt wurden. Im Einzelnen sind dies:

- mykologische Untersuchungen
- mykotoxikologische Untersuchungen (Proben tiefgefroren)
- NIRS-Futteruntersuchungen (aus Gründen des Arbeitsschutzes wurde das Material zuvor autoklaviert)
- Untersuchungen zur Methanausbeute im Batchtest (Proben tiefgefroren)

Es wurden 27 Betriebsbesuche durchgeführt (Abb. 2). Hierbei wurden die vorhandenen Silagen einem Silocontrolling nach LfL Bericht (2009) unterzogen. Darüber hinaus wurden Daten zum Silomanagement erhoben, Dichtemessungen durchgeführt und Probenmaterialien gesammelt.

Beim Controlling wurden mehrere Einzelproben gewonnen, welche weiterführenden Untersuchungen zugeführt wurden.

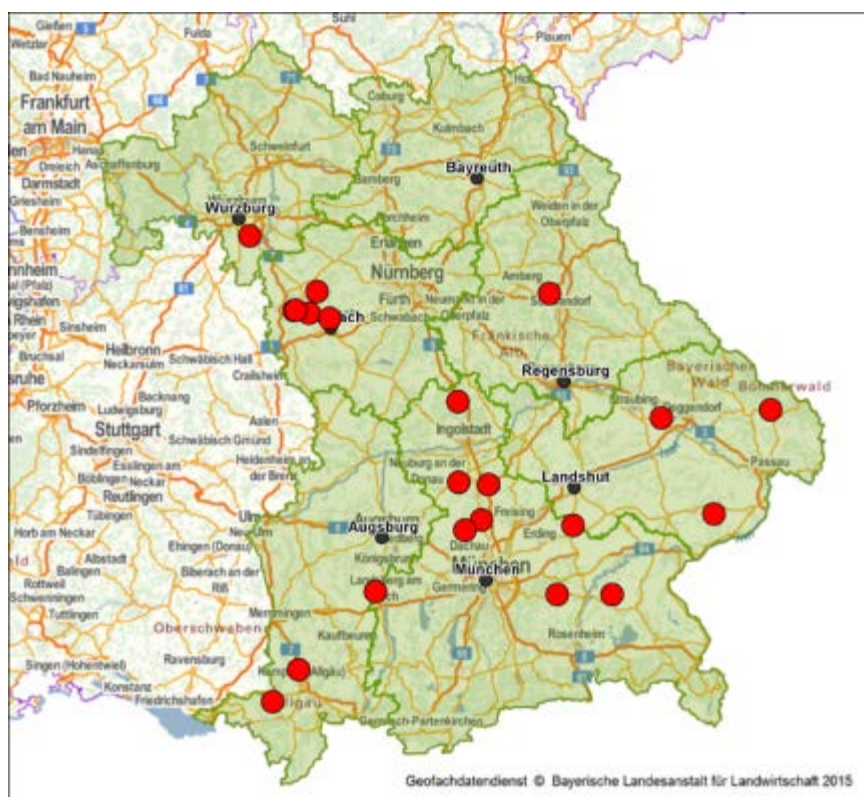


Abb. 2: Besuchte Biogasanlagen, Verteilung in Bayern

6.2 Bestimmung der Gasbildung im Mini-Batch-System

Zur Prüfung der Beeinflussung des Biogasprozesses im Labormaßstab kam das ATS-Verfahren nach Grapenthin et al. (2010) zur Anwendung. Hierbei wurde der Druckanstieg in einem geschlossenen Biogassystem ermittelt und daraus die Gasbildungsaktivität abgeleitet.

Die Testanlage bestand aus einem Wasserbad (Abb. 3, links), in welchem 33 Batchflaschen à 250 ml Platz fanden. Das Wasserbad garantierte eine möglichst exakte Temperaturführung im Bereich zwischen 20°C und 70°C. Die Flaschen wurden in einen Schwenkmechanismus eingespannt, welcher die Einstellung des Schwenkintervalls von fünf Minuten alle sechs Stunden ermöglicht.

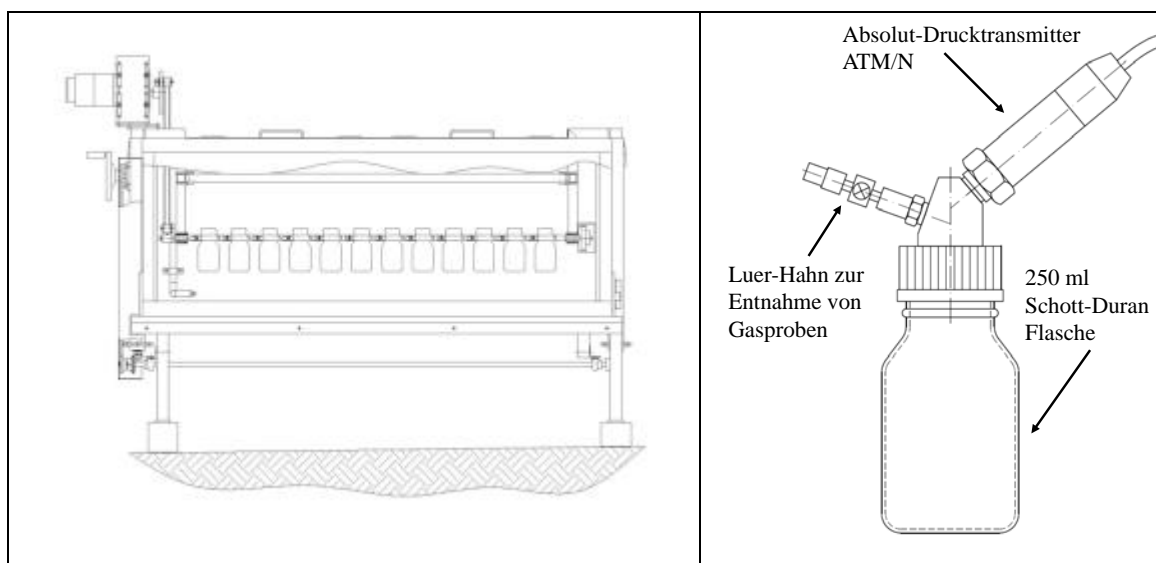


Abb. 3: Mini-Batch-Messsystem im Wasserbad (links) und Aufbau der Batchflasche (rechts) (Zeichnung ILT)

Die Batchflaschen (Abb. 3, rechts) verfügten über einen Absolut-Drucktransmitter (ATM/N, STS), mit dem die Biogasproduktion während der Inkubation über bis zu 25 Tagen kontinuierlich ermittelt wurde. Über den ebenfalls am Kopf der Batchflasche montierten Luer-Hahn konnten in regelmäßigen Intervallen Gasmengen abgelassen werden oder mit Hilfe einer gasdichten Spritze Gasproben in Exetainer[®] entnommen und absatzig am Gaschromatographen (3000 Micro-GC, Agilent) auf die Gehalte an H₂, N₂, O₂, CH₄, CO₂ und H₂S analysiert werden.

Die Toxine wurden in ihrer Reinform als Lösung zugegeben. Um sicher zu gehen, dass die verwendeten Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Biogasproduktion hatten, wurde deren mögliche Wirkung in einem Vorversuch untersucht. Tab. 3 listet die durchgeführten Versuche im Mini-Batchsystem auf, in denen die ausgewählten Mykotoxine und Schimmelpilze hinsichtlich ihrer Einzel- bzw. Gesamtwirkung auf den Gasertrag und die Gasqualität getestet wurden. Jeder Versuch war randomisiert aufgebaut und beinhaltete für jede Variante vier Wiederholungen. Somit konnte die Auswertung der Daten bei möglichem technischem Defekt einer Wiederholung mit drei verbleibenden Wiederholungen gewährleistet werden.

Tab. 3: Im Mini-Batchsystem hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Biogasproduktionsprozess getestete Substanzen und deren Kontrollen

Lösungsmittel bzw. Substrat	Mykotoxin bzw. Schimmelpilz	Inokulum	Konz. [mg L ⁻¹]	Versuch	2014_001	2014_004	2014_005	2014_007	2014_008	2015_002	2015_003
				ATS Versuch	1	2	3	4	5	6	7
H ₂ O		SB2, GB-C11, SB1, BGM			x	x	x	x	x	x	x
Aceton		SB2, GB-C11, SB1, BGM			x	x	x	x	x	x	x
Acetonitril		SB2			x		x	x			
Methanol		SB2,GB-C11			x			x			
1g Reiskorn	Reis	SB2			x						
Aceton	Mykophenolsäure	SB2, GB-C11, SB1, BGM	50		x	x	x		x	x	x
Aceton	Mykophenolsäure	SB2	20				x				
Aceton	Mykophenolsäure	SB2, GB-C11, SB1, BGM	5			x			x	x	
Aceton	Mykophenolsäure	SB2, GB-C11	0,5			x			x		
Aceton	Gliotoxin	SB2, GB-C11	5		x				x		
Aceton	Monacolin K ₁	SB2	50			x					
Aceton	Monacolin K ₁	GB-C11	5						x		
Aceton	Monacolin K _s	SB2	50		x						
Aceton	Fumonisin B1	SB2	3		x						
Acetonitril	Ochratoxin	SB2	5				x				
Aceton	Roquefortin C	SB2	50		x						
Acetonitril, Aceton	Aflatoxin B1	SB2, GB-C11	1				x		x		
Acetonitril	Citrinin	SB2	5				x				
Reisschlempe	Reis	SB2				x					
Reisschlempe	<i>Aspergillus fumigatus</i>	SB2				x					
Kulturextrakte Reis	Reis	SB2						x			x
Kulturextrakte Reis	<i>Monascus ruber</i>	SB2									x
Kulturextrakte Reis	<i>Aspergillus fumigatus</i>	SB2									x
Kulturextrakte Reis	<i>Mucor</i> spp.	SB2									x
Kulturextrakte Reis	<i>Penicillium roquefortii</i>	SB2									x
1g Reiskorn	<i>Aspergillus fumigatus</i>	SB2			x						
Kulturextrakte Reis	<i>Aspergillus fumigatus</i> 1	GB-C11	1					x			
Kulturextrakte Reis	<i>Aspergillus fumigatus</i> 2	GB-C11	1					x			
1g Mutterkorn aus Weidelgras	<i>Claviceps</i> spp.	SB2			x						

Toxine in Reinform

Zu Beginn aller Versuche mit Toxinen in Reinform wurde in jeder Flasche 100 g Fermenterinhalt der Versuchsbiogasanlage (Inokulum) eingewogen. Als Kontrollen wurden Inokulum allein sowie Inokulum mit 500 µl des verwendeten Lösungsmittels Aceton angesetzt. Die Mykotoxine wurden in der gewünschten Konzentration im Lösungsmittel gelöst. Unmittelbar vor Versuchsansatz wurden 500 µl des Mykotoxin-Lösungsmittel-Gemischs dem Inokulum zugegeben. Durch sanftes Schwenken wurde versucht, das Gemisch so gut als möglich unterzumischen. Unmittelbar danach wurde der Deckel der Batchflasche aufgesetzt, der Kopfraum umsichtig mit Stickstoff gespült, um möglichst anaerobe Verhältnisse zu bekommen, und die Flasche wurde so fest als möglich verschlossen. Bei mesophilen Bedingungen von 38°C wurden die Batchflaschen über einen Zeitraum von bis zu 25 Tagen inkubiert. Alle durchgeführten Versuche wurden in randomisierter Form (Abb. 4) mit vierfacher Wiederholung durchgeführt.

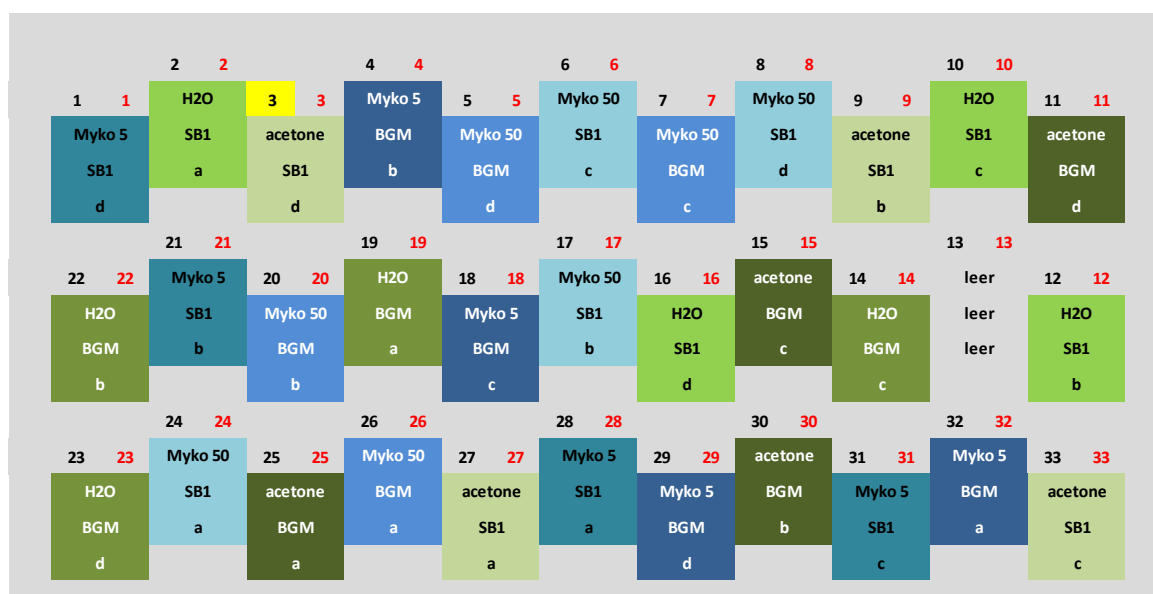


Abb. 4: Randomisierter Positionsplan zur Anordnung der Varianten im Wasserbad. Schwarze Nummerierung: Positionsnummer im Wasserbad, Rot: Messstelle. Hier beispielhaft Versuch 2015_002: Mykophenolsäure zu SB1/BGM

Toxine als Kulturextrakt bzw. Pilzkultur

Die Vorgehensweise bei den Versuchen mit Kulturextrakten und auf Reis angezüchtete Pilzkulturen verhielt sich analog zu denen in Reinform. 1 ml des gelösten Extraktes bzw. 1 g Pilzkultur wurde dem jeweiligen Inokulum zugefügt.

Als Inokulum wurde vorwiegend die am ILT als stabil geltende Standardbiozönose SB2 (näher beschrieben bei Heuwinkel et al., 2009) eingesetzt. Zusätzlich kamen noch Biozönosen mit unterschiedlichen Stressfaktoren zum Einsatz, um ein mögliches Zusammenwirken von Testsubstanz und Inokulum auf den Biogasprozess abbilden zu können. Dabei kamen die am ILT als labil eingestufte Biozönose SB1 sowie die zwei Gärgemische aus Versuchs Fermentern parallel gelaufener Projekte am ILT zum Einsatz.

Die Biozönosen SB1 und SB2 wurden seit mehreren Jahren unter gleichen Bedingungen geführt und für Versuchszwecke vorgehalten. Somit konnten langfristige Einflüsse auf die Biozönosen, beispielsweise durch das Management der Anlage, auf ein Minimum reduziert werden. Tab. 4 beschreibt die Zuordnung der im ATS-System verwendeten Biozönosen mit den festgestellten Stressfaktoren.

Tab. 4: Biozönosen aus Versuchsbiogasanlagen des ILT (GS: Grassilage, MS: Maissilage, TMR: Totale Mischration, RG: Rindergülle)

Fermenterinhalt	Substrat	OLR [kg oTS/m ³ *d]	Stressfaktor
SB2	TMR, RG	2,5	-
SB1	MS	0,5	Spurenelement-Mangel
BGM	GS	1	Ammoniak
GB-C11	RG, MS	2,5	Übersäuerung durch Stoßbelastung mit Weizenschrot (OLR 8 kg oTS/m ³ *d)

Die verwendete Biozönose BGM wies zum Zeitpunkt der Entnahme als Inokulum bereits erhöhte Ammoniumwerte von mehr als >4.000 mg NH₄⁺-N pro Liter FM auf.

Die Biozönose GB-C11 wurde im Zuge der Fragestellung zur biologischen Flexibilisierung des Anlagenbetriebs einer Stoßbelastung mit Weizenschrot ausgesetzt. Die Entnahme als Inokulum erfolgte unmittelbar nach der zweiten Stoßbelastung. Abb. 5 zeigt einen Ausschnitt aus dem zeitlichen Verlauf eines Stoßbelastungsversuches. Die zweimalige Zugabe von Weizenschrot bewirkte zunächst eine Übersäuerung des Fermenterinhalt. Die dabei gebildeten Intermediate wurden anschließend zeitversetzt abgebaut.

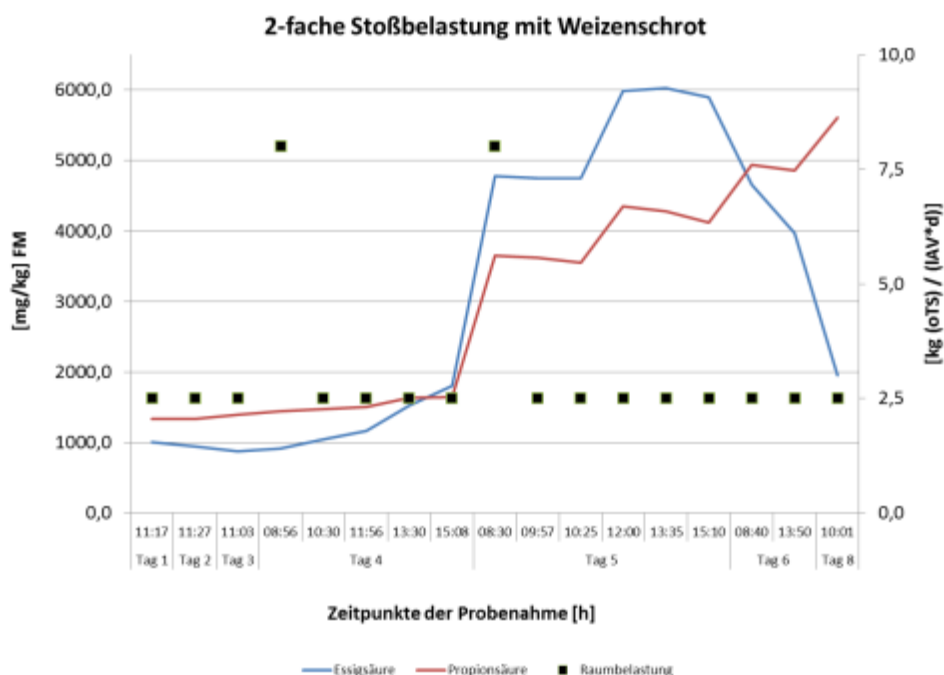


Abb. 5: Essigsäure und Propionsäurekonzentration vor, während und nach Zugabe von Weizenschrot zu GB-C11

6.3 Semikontinuierliche Durchflussversuche

Zur Feststellung der langfristigen Stabilität des Biogasprozesses wurden in Anlehnung an die VDI Richtlinie 4630 (Anonymus, 2016) Durchflussversuche durchgeführt. Die dafür notwendige Überwachung der Gasqualität sowie Untersuchungen der Gärsubstrate hinsichtlich wichtiger Prozessparameter, wie pH-Wert, Fettsäuremuster, Pufferkapazität und Ammoniumgehalt wurden in regelmäßigen Abständen begleitend durchgeführt und dokumentiert. Ebenso wurden für die beteiligten Projektpartner Proben zur Untersuchung bereitgestellt. Das Abbruchkriterium für die Durchflussversuche wurde mit einem Methangehalt von < 45 Vol.% über mehr als 3 Tage festgelegt.

Für die Untersuchung der langfristigen Prozessstabilität während der einstufigen Vergärung von landwirtschaftlichen Substraten wurden am ILT 36 Liter Fermenter eingesetzt (Abb. 6, links). Durch die stetige Biogasproduktion standen die Fermenter leicht im Überdruck von etwa 5 mbar. Zur Erhöhung der Sicherheit waren die Fermenter mit einer Überdrucksicherung ausgestattet, um im Falle von z.B. Verstopfung der Gasleitungen den aufgebauten Überdruck kontrolliert ableiten zu können. Jeder Fermenter verfügte über einen Druckausgleichsbeutel und einen Gassammelsack. Der Druckausgleichsbeutel diente vor allem der Erhaltung der anaeroben Verhältnisse bei der notwendigen, täglichen Betreuung, wie Rezirkulation und Entnahme von Gärsubstrat. Die Gasrate wurde mittels Milligascounter volumetrisch erfasst. Das produzierte Biogas floss anschließend in den Gassammelsack ab. Nach Erreichen von 4 Litern Biogas wurde die Analyse eingeleitet. Nachdem das Rohbiogas auf die Gehalte an CH_4 , CO_2 , H_2S , H_2 und O_2 untersucht wurde, wurde der Sammelsack evakuiert und die Sammlung begann erneut (Abb. 6, rechts).

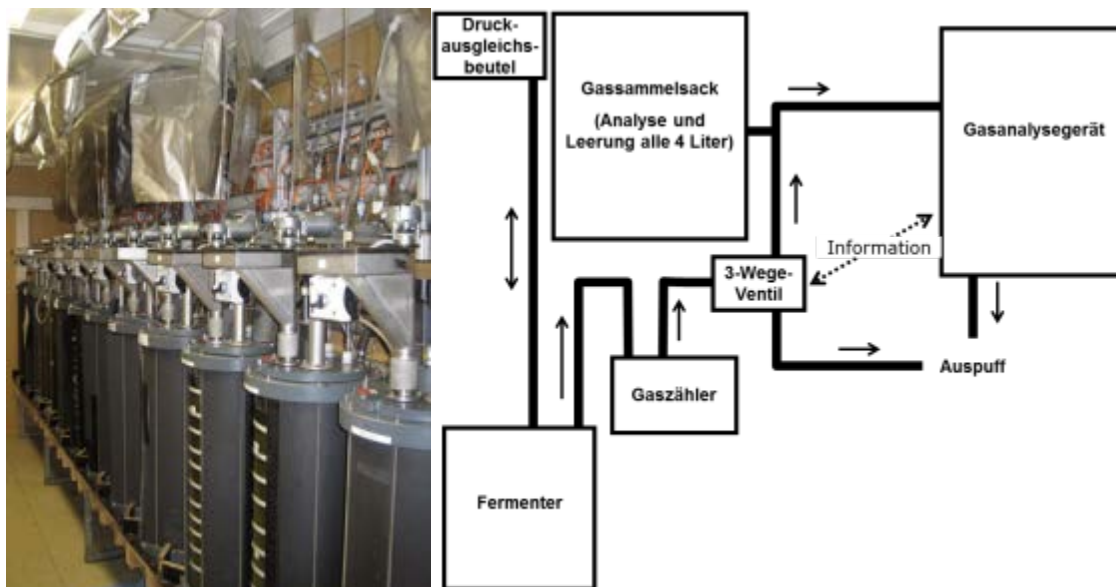


Abb. 6: Links: 36 Liter Durchflussfermenter; Rechts: Gasflussschema für einstufige Durchflussversuche

Die Fermenter wurden im ersten und zweiten Versuchsgang unter mesophilen Bedingungen im einstufig/einphasigen Verfahren bei kontinuierlichem Rühren mit semikontinuierlicher Fütterung betrieben. Das netto Arbeitsvolumen von 28 Litern konnte

während des gesamten Versuchsverlaufes durch regelmäßige Füllstandsmessung überwacht und nach Bedarf korrigiert werden.

Für den ersten Versuchsgang wurden zwei Varianten festgelegt. *Monascus ruber*, welcher vor allem das Mykotoxin Monacolin bilden kann sowie *Penicillium roquefortii* mit der potenziellen Bildung von Roquefortin C und Mykophenolsäure. Im zweiten Versuchsgang wurden zwei *Aspergillus fumigatus* Stämme, Stamm 1 und Stamm 2 (isoliert aus Silagen, potenzielle Mykotoxinbildner), ausgewählt. Tab. 5 liefert eine Übersicht über die Anordnung der Fermenter und die getesteten Varianten in den Durchflussversuchen mit artifiziell verschimmelten Maissilagen.

Tab. 5: Versuchsdesign der Durchflussversuche mit kontaminierten Silagen und deren Kontrollen

Substrat	Schimmelpilz bzw. Variante	Inokulum	Fermenter-bezeichnung	Messstelle	2015_001	2015_005
					Durchfluss 1	Durchfluss 2
Maissilage	<i>Monascus ruber</i> Monovergärung 100%	SB1	Myk 1	MST 1	x	
Maissilage	<i>Monascus ruber</i> Monovergärung 100%	SB1	Myk 2	MST 2	x	
Maissilage	<i>Penicillium roquefortii</i> Monovergärung 100%	SB1	Myk 3	MST 3	x	
Maissilage	<i>Penicillium roquefortii</i> Monovergärung 100%	SB1	Myk 4	MST 4	x	
Maissilage	Kontrolle Monovergärung 100%	SB1	Myk 5	MST 5	x	
Maissilage	<i>Aspergillus</i> Stamm 1 Monovergärung 100%	SB1	Myk 6	MST 5		x
Maissilage	<i>Aspergillus</i> Stamm 1 Monovergärung 100%	SB1	Myk 7	MST 6		x
Maissilage	<i>Aspergillus</i> Stamm 2 Monovergärung 100%	SB1	Myk 8	MST 7		x
Maissilage	<i>Aspergillus</i> Stamm 2 Monovergärung 100%	SB1	Myk 9	MST 8		x
Maissilage	Kontrolle Monovergärung 100%	SB1	Myk 10	MST 9		x

Als Inokulum für die Durchflussversuche wurde die Biozönose SB1 verwendet. Hierzu wurden im Januar 2015 für den ersten Versuchsgang 160 Liter SB1 und für den zweiten Versuchsgang 160 Liter im Oktober am Eggertshof entnommen und in die 36 Liter Versuchsfermenter (Abb. 7) befüllt.



Abb. 7: Inokulum: Abholung und Befüllung der Durchflussversuche

Der festgestellte Kobaltmangel im ersten Versuchsgang ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$ FM; Tab. 31) im Vorfeld der Anfahrtphase wurde auf $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ FM ausgeglichen, um eine Unterversorgung der Mikroorganismen während des Versuchsganges ausschließen zu können. Pro Fermenter wurden somit $890 \mu\text{l}$ Kobaltlösung ($952 \text{ mg CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 250 ml) hinzugegeben. Durch die Verwendung eines labilen Inokulums sollte ein möglicher Effekt auf den Biogasprozess durch die Pilzkulturen leichter erreicht werden.

Im zweiten Versuchsgang wurde der Kobaltmangel von den festgestellten $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ FM während der Anfahrtphase auf $60 \mu\text{g}/\text{kg}$ FM ausgeglichen (Tab. 32). Dies hatte vor allem den Hintergrund, dass es gleich zu Beginn zu verfahrenstechnischen Problemen bei den Kugelhähnen der Versuchsfermenter kam und der entnommene Gärrest vor Fütterung unverdaute Maissilage beinhaltete. Pro Fermenter wurden somit $1186 \mu\text{l}$ Kobaltlösung ($952 \text{ mg CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in 250 ml) zugegeben, um eine mögliche stärkere Unterversorgung der mikroorganismen im Vergleich zur Qualität der SB1 im ersten Versuch entgegen zu wirken.

Nachdem die verfahrenstechnischen und biologischen Probleme nicht behoben werden konnten, musste am VT42 mit Gärrest aus einer überwiegend mit Maissilage betriebenen Praxisanlage angeimpft werden. Die NawaRo Biogasanlage wird im Rahmen des LfL Monitoring Programms seit 2009 begleitet. Die Biogasanlage wurde mit einem hohen Anteil an Maissilage bei gleichzeitig geringem Substratanteil von tierischen Wirtschaftsdüngern gefüttert. Der hohe Anteil an Mais im Substratmix der Praxisanlage sollte im weiteren Verlauf eine möglichst schnelle Adaption des Inokulums an eine 100%ige Fütterung mit Maissilage gewährleisten. Die Entnahme des Inokulums erfolgte am Nachgärer der Praxisanlage, um einen möglichen Effekt frisch zugegebener Biomasse so gering wie möglich zu halten.

Für das Betriebsjahr 2015 setzte sich die gefütterte Einsatzstoffmenge mit einem überwiegenden Anteil an Maissilage und Getreide-GPS zusammen (Abb. 8).

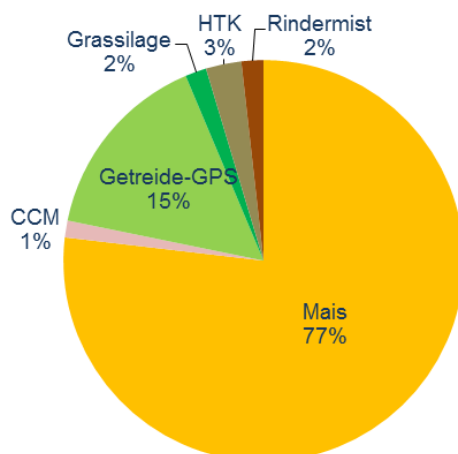


Abb. 8: Substratmix Anteile in Prozent der gesamten zugeführten Biomasse des Pilotbetriebs 12 für das Jahr 2015

Für die Aufrechterhaltung der biologischen Stabilität der Praxisanlage wurden präventiv industrielle Spurenelemente eingesetzt.

Der Versuch mit verpilzter Maissilage konnte dann nach erfolgreicher Adaptionsphase mit unverpilzter Maissilage (VT97 – VT117) am VT118 gestartet werden.

Als Substrat in den beiden Durchflussversuchen wurde Maissilage eingesetzt, welche mit sehr häufig in Silage auftretenden Schimmelpilzgattungen beimpft wurde. Die durch das Institut für Tierernährung (ITE) am Standort Grub bereitgestellten Maissilagen wurden separat zu 3 kg Portionen abgepackt und bis zur Verwendung bei -18°C eingefroren.

6.4 Analyse von Prozessparametern

6.4.1 Biogaszusammensetzung

Tab. 6: Kenndaten der Gasanalysesensoren (Herstellerangabe Fa. Awite, 2008)

Komponente	Messprinzip	Messbereich	Fehlergrenzen
CH ₄	Infrarot	0 – 100 Vol.-%	± 2 % des MBE
CO ₂	Infrarot	0 – 100 Vol.-%	± 2 % des MBE
O ₂	elektrochemisch	0 – 25 Vol.-%	± 2 % des MBE und $\pm 0,1$ % abs. bei 1,0 % O ₂
H ₂	elektrochemisch	0 – 2000 ppm	± 3 % des MBE
H ₂ S	elektrochemisch	0 – 5000 ppm	± 3 % des MBE

(MBE = Messbereichsendwert)

Das produzierte Biogas wurde, wie bereits im Abschnitt 6.3 beschrieben, nach einem automatisierten Verfahren in regelmäßigen Abständen auf seine Zusammensetzung untersucht. Dabei wurde zunächst eine definierte Gasmenge von 4,0 L gesammelt und nach Erreichen des Volumens analysiert. Auf jede Messung folgte unmittelbar die Entleerung des Gassammelsackes, wodurch stets eine neue Abfolge aus Biogassammlung und Messung eingeleitet wurde. In den Batchversuchen fanden Konzentrationsmessungen für die Parameter CH₄, CO₂ und O₂ statt, im Durchfluss wurden zusätzlich H₂ und H₂S gemessen. Tab. 6 zeigt die Kenndaten der dazu eingesetzten Sensortypen.

6.4.2 Physikalische und chemische Parameter

Zur Charakterisierung des prozesstechnischen wie biologischen Verlaufes der Gärversuche bedurfte es einer chemisch-physikalischen Analytik, die sich aus allgemein angewandten Methoden der Abwasseranalytik und aus Methoden der Futtermittelanalytik zusammensetzt. Meist lagen den innerhalb dieses Vorhabens angewandten Untersuchungsmethoden europäische (EN-Norm) oder nationale (DIN-Norm, VDLUFA, etc.) Vorschriften zugrunde, die zusammen mit weiteren Informationen in Tab. 7 zusammengestellt sind. Standardmäßig wurden nahezu alle angefallenen Proben durch die LfL-internen Labore der Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen (AQU) analysiert.

Tab. 7: Parameter und Methoden der chemischen Laboranalysen

Parameter	Methode	Enthalten in	Kurze Beschreibung
TS	DIN 12880 DIN 38414-S2	Handbuch der Bodenuntersuchung; Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung	Wiegen der Probe, Trocknung bei (105±2)°C bis zur Gewichtskonstanz, erneutes Wiegen
oTS	DIN 12879 DIN 38414-S3 (Glührückstand)	Handbuch der Bodenuntersuchung; Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung	Wiegen der Trockensubstanz, Veraschung bei 550°C, erneutes Wiegen TS – Asche (Glührückstand) = oTS (Glühverlust)
pH	DIN 38404-C5 DIN 12176	Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung	Elektrode
TAC	DIN 38409 H7	Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung	Titration
FOS/TAC	Nordmann (1977)		Titration
FFSges	DIN 38414 S19	Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung	Destillation, Titration
FFS-GC	Hausmethode LfL-ILT (verändert nach Hausmethode der Fa. Schmack Biogas AG)		Gaschromatograph
NH ₄ ⁺ – N	verändert nach DIN 38406 E5-2	Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung	Wasserdampfdestillation, anschließende Titration
Rohprotein	VDLUFA MB III 4.1.1	VDLUFA Methodenband III, Untersuchung von Futtermitteln	Kjeldahl-Methode
Rohfett	VDLUFA MB III 5.1.1/2	VDLUFA Methodenband III, Untersuchung von Futtermitteln	
Rohfaser	VDLUFA MB III 6.1.1/2	VDLUFA Methodenband III, Untersuchung von Futtermitteln	Weender Rohfasermethode
NfE	VDLUFA MB III 7	VDLUFA Methodenband III, Untersuchung von Futtermitteln	
NDF	VDLUFA MB III 6.5.1	VDLUFA Methodenband III, Untersuchung von Futtermitteln	
ADF	VDLUFA MB III 6.5.2	VDLUFA Methodenband III, Untersuchung von Futtermitteln	
ADL	VDLUFA MB III 6.5.3	VDLUFA Methodenband III, Untersuchung von Futtermitteln	

6.5 Mykotoxikologische Untersuchungen

6.5.1 Extraktraktionsverfahren

6.5.1.1 Mais/Grassilage

10 g Maissilage wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 30 ml Acetonitril:Wasser-Gemisch (84:16, v/v) versetzt und 30 min geschüttelt (Horizontalschüttler). Im Anschluss wurde die Probe 15 min zentrifugiert (4700 g). Es wurde ein Überstand von 1,5 ml (äquivalent zu 0,25 g Frischmasse) abgenommen, in ein Reagenzglas übergeführt und unter Vakuum verdampft (ca. 2 h, 50°C). Der Rückstand wurde in 0,5 ml Methanol:Wasser (50:50, v/v) aufgenommen und zum besseren Lösen der noch am Reagenzglas anhaftenden Bestandteile im Ultraschallbad (2 min, 20°C) behandelt. Zum Abtrennen von nicht gelösten Bestandteilen wurde die Probe in eine 2 ml Einmalspritze gegeben, über einen aufgesetzten Spitzenfilter (Porenweite = 0,45 µm) in ein HPLC-Fläschchen (Crimp Vial) überführt, verschlossen und bei -20°C gelagert (Ostertag 2010).

6.5.1.2 Gärflüssigkeit

Nachweis von Citrinin, Gliotoxin, Fumonisin B1 und Mykophenolsäure

Die Einwaage von $1 \pm 0,01$ g Gärrest erfolgte in 15 ml Zentrifugenröhrchen. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 9000 g zentrifugiert und der komplette Überstand abgenommen. Davon wurden jeweils 600 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 15 min bei 24000 g in einer Biofuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit einer Einmalspritze über einen aufgesetzten Spritzenfilter (Porenweite = 0,45 µm) in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Von diesem wurden je 400 µl Extrakt in HPLC-Fläschchen abgenommen, und 400 µl Methanol (100%) aufgegeben, um ein Methanol-Wasser-Verhältnis von 1:1 zu erhalten. Zum Schluss wurden die Probenfläschchen unverzüglich verschlossen und bis zur Messung lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

Nachweis von Aspergillus fumigatus-Toxine, Monacolin Ks und K_L, Ochratoxin A und Roquefortin C

Die Einwaage von $1 \pm 0,01$ g Gärrest erfolgte in 15 ml Zentrifugenröhrchen, der anschließend bis zur vollständigen Trockene lyophilisiert wurde. Nach dem Gefriertrocknen wurden die Proben zunächst mit einem Spatel zerrieben bzw. auflockert und dann für die Extraktion 4 ml des Lösungsmittel-Gemisches Acetonitril/Wasser/AcOH im Verhältnis 79:20:1 (v/v/v) zugegeben. Dann wurden die Proben intensiv vermischt (30 s, Vortex), bevor sie 30 min auf dem Horizontalschüttler extrahiert wurden. Anschließend wurden die Proben 10 min lang bei 9000 g zentrifugiert und je 1 ml des Überstandes in ein Reagenzglas aliquotiert. Als erster Aufreinigungsschritt wurde eine Flüssig-Flüssig-Trennung mit Hexan durchgeführt. Dazu wurden zu je 1 ml Extrakt 2 ml Hexan zugeben, diese Emulsion intensiv durchmischt (30 s, Vortex) und dann 5 min bei 4700 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Hexanphase vorsichtig mit Pasteurpipetten abpipettiert und verworfen. Die hydrophile Phase wurde in einer Vakuumzentrifuge (50°C, 90 min) vollständig eingedampft. Das Extrakt wurde daraufhin in 400 µl MeOH (100%) unter intensivem Mischen (30 s, Vortex) resolviert und wieder unter sanftem Stickstoffstrom zur Trockene evaporiert. Anschließend wurde der Rückstand in 200 µl MeOH/Wasser (1:1) resolviert, mit einer Einmalspritze über einen aufgesetzten Spritzenfilter (Porenweite = 0,45 µm) in HPLC-Fläschchen überführt und verschlossen. Bis zur Analyse wurden die Extrakte bei -20°C gelagert.

Tab. 8: Qualitativ und quantitativ erfasste Toxine

Quantitative nachweisbare Toxine	Qualitativ nachweisbare Toxine
Aflatoxin B ₁	Festuclavin
Citrinin	Fumigaclavin A
Fumagillin	Fumiquinazolin A/B
Fumigaclavin C	Fumiquinazolin E
Fumiquinazolin C/D	Fumiquinazolin F/G
Fumitremorgen B, C	Fumitremorgen C
Fumonisin B1	Helvolsäure
Gliotoxin	Pseurotin A
Monacolin K _S , K _L	Pyripyropen
Mykophenolsäure	Sterigmatocystin
Ochratoxin	Synerazol
Roquefortin C	TR-2 Toxin
Trypacidin	Tryprostain A
Verruculogen	Tryptoquvalin F/J

Tab. 9: Analytische Kenngrößen des quantitativen Toxinnachweises in Maissilage

Konzentrationsstufe [ng/g]	Wiederfindungsrate [%] (Standardabweichung)			Nachweisgrenze [ng/g]
	10	100	500	
Toxin				
Fumagillin	78,3 (22,6)	75,0 (27,8)	75,9(2,7)	3,4
Fumigaclavin C	75,3 (41,8)	68,1 (38,6)	76,2 (5,3)	1,2
Fumiquinazolin D	79,2 (10,2)	83,1 (5,8)	81,0 (2,6)	0,9
Fumitremorgen B	72,6 (23,4)	78,6 (18,4)	71,0 (1,6)	1
Fumitremorgen C	71,5 (23,7)	86,7 (10,3)	81,6 (3,5)	0,3
Fumonisin B1	97,1 (11,6)	106,5 (6,1)	104,7 (10,6)	3,4
Gliotoxin	105 (14,8)	101 (5,6)	94,6 (4,4)	0,8
Monacolin K _S	-	53,1 (6,4)	45,9 (4,0)	17,8
Monacolin K _L	59 (14,8)	53,7 (7,0)	49,7 (6,1)	5,2
Mykophenolsäure	-	41,1 (4,3)	39,2 (2,1)	12,1
Roquefortin C	82,3 (21,0)	83,2 (9,9)	75,0 (3,4)	0,4
TR-2 Toxin	73,5 (18,6)	84,4(15,5)	81,4 (4,2)	3,1
Trypacidin	100 (9,2)	100 (8,7)	95,1 (5,1)	0,3
Verruculogen	83,2 (26,9)	85,6 (19,8)	74,4 (5,8)	0,2

Tab. 10: Analytische Kenngrößen des quantitativen Toxinnachweises im Gärrest

Konzentrationsstufe [n/g]	Wiederfindungsrate [%] (Standardabweichung)			Nachweisgrenze* [ng/g]
	10	100	500	
Toxin				
Aflatoxin B1	54,1 (11,9)	54,5 (6,6)	64,4 (1,0)	15,3
Citrinin	57,7 (4,8)	90,5 (1,9)	n.u.	10,3
Fumagillin	n.u.	71,3 (38,3)	77,4 (30,4)	100
Fumigaclavin C	n.u.	-	76,9 (6,7)	125
Fumiquinazolin C/D	-	58,4 (8,9)	74,5 (3,3)	16
Fumonisin B1	175,0 (56,5)	34,7 (14,4)	102 (5,0)	2,8
Gliotoxin	90,3 (18,9)	44,8 (10,2)	26,1 (4,3)	64,4
Monacolin K _S /K _L	94,1 (44,3)	91,7 (8,2)	97,2 (20,5)	11,7/2,5
Mykophenolsäure	125,2 (27,1)	81 (13,3)	93,8 (11,4)	20,6
Ochratoxin A	81,3 (6,2)	92,3 (8,9)	n.u.	2,4
Roquefortin C	120,1 (52,8)	45,7 (5,6)	63,3 (2,4)	0,7
Trypacidin	-	-	13,8 (4,9)	115
Verruculogen	-	72,2 (14,4)	97,2 (12,4)	30

n.u. nicht untersucht, * ermittelt durch das Signal/Noise Verhältnis*3

6.5.2 HPLC-MS/MS Analytik

Die Identifikation und Quantifizierung der Mykotoxine wurde mittels HPLC-MS/MS durchgeführt.

Trennung der Substanzen mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Analyte werden hierbei mit der C8-RP-HPLC-Säule „Luna“ (Phenomenex) bei einer Säulentemperatur von 40°C aufgetrennt. Das Probeauftragsvolumen beträgt 10 µl. Die mobile Phase A besteht aus Reinstwasser + 0,5% Ameisensäure (v/v) und die Phase B aus Methanol + 0,5% Ameisensäure (v/v). Es wurde folgendes Gradientenprogramm mit linearem Anstieg verwendet.

Detektion mittels Tandem-Massenspektrometrie

Die Detektion erfolgt im positiven Elektrospray-Ionisierungs-Modus (ESI+). Pro Analyt wurden je zwei Massenübergänge ermittelt. Zur Identifizierung eines Analyten wurden die zwei substanzspezifischen Übergänge, das Verhältnis deren Signalintensitäten sowie deren Retentionszeit herangezogen.

6.6 Herstellung von verschimmelten Versuchssilagen

Anfang Oktober 2014 wurden Agarplatten (Sabouraud) mit *Penicillium roquefortii* und Platten mit *Monascus ruber* (Stammsammlung LS TiHy) beimpft und bis zur Sporulation kultiviert bei Raumtemperatur. Die Agarplatten wurden mit 0,1% Tween 20 versetzt und die Sporen somit abgespült. Die Flüssigkeit in Zentrifugenröhrchen überführt und die

Sporenkonzentration in einer Zählkammer (Thoma) ermittelt. Die *Penicillium roquefortii*-Suspension enthielt $1,5 \times 10^8$ KBE/ml, sie von *Monascus ruber* $1,0 \times 10^7$ KBE/ml.



Abb. 9: Maissilage (Ausgangsmaterial)

Aus dem Kernbereich eines Fahrersilos Maissilage aus Grub (Erntejahr 2013) wurde Ausgangsmaterial für den Versuch entnommen (Abb. 9). Es war aufgrund der langen Lagerdauer, dem hohen Vorschub im Silo und der Lage im Silo mit geringem Schimmelpilzbesatz zu rechnen (jeweils $< 2 \times 10^2$ KBE/g an *Penicillium roquefortii* und *Monascus ruber*). Die Sporensuspension wurde mit einem Airbrush-System appliziert resultierend in einer theoretischen Sporenkonzentration von $7,5 \times 10^4$ /kg *Penicillium roquefortii* und $5,5 \times 10^3$ *Monascus ruber*. Die inokulierte Silage wurde vermischt und in Maischefässern, welche für einen minimalen Lufteinlass oben und unten mit einer ca. 5 mm großen Bohrung versehen waren, bei 15°C 21 Tage gelagert. Der Temperaturverlauf wurde thermografisch verfolgt (Zahl in der Abb. 10= °F!, nicht °C).

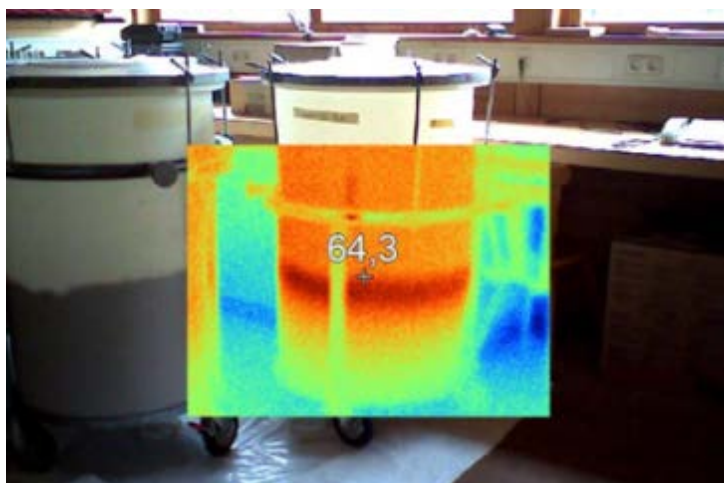


Abb. 10: Temperaturprofil eines Maischefasses (Einheit Fahrenheit)

Tab. 11: Veränderung des Frisch- und Trockenmassegehalts während der mikroaeroben Lagerung

Inokulation	<i>Monascus ruber</i>		<i>Penicillium roquefortii</i>	
	1	2	3	4
Fass Nr.				
Leergewicht inkl. Deckel (kg)	53.2	55.6	56	53.2
Gesamtgewicht (kg)	103.2	105.6	106	103
TM Gehalt der Silage	31.1	31.1	31.1	31.1
TM im Fass	15.6	15.6	15.6	15.5
FM im Fass (kg)	50	50	50	49.8
Rückwaage				
Gesamtgewicht (kg)	102.2	105.6	105.8	103.6
TM Gehalt der Silage (%)	31	31.2	32.2	30.8
TM im Fass (kg)	15.2	15.6	16.0	15.5
FM im Fass (kg)	49.0	50.0	49.8	50.4
TM Verlust (%):	2.32	-0.32	-3.12	-0.23
absoluter FM-Verlust (kg):	1.0	0.0	0.2	-0.6
relativer FM-Verlust (%)	1.0	0.0	0.2	-0.6

FM = Frischmasse; TM = Trockenmasse

Während der Lagerung kam es zu keinem drastischem Masseverlust (Tab. 11). Die Temperatur der Maissilage stieg, zumindest in den oberen Schichten der Silage, deutlich an (Abb. 10), was auf intensive metabolische mikrobielle Aktivität schließen lässt.

Der Keimgehalt an *Monascus ruber* lag in beiden *Monascus*-Fässern (MYK 1 und MYK2) bei 10^7 KBE/g Fässern, bei den *Penicillium*-Ansätzen (MYK 3 und MYK 4) ebenso bei 10^7 KBE/g *Penicillium roquefortii* (Tab. 12).

Tab. 12: Mikrobiologischer Befund der Silagen

	Ausgangsmaterial	MYK1	MYK2	MYK3	MYK4
Inokulum	-	<i>Monascus ruber</i>	<i>Monascus ruber</i>	<i>Penicillium roquefortii</i>	<i>Penicillium roquefortii</i>
KBE (log/g) <i>M. ruber</i>	$< 2 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$	-	-
KBE (log/g) <i>P. roquefortii</i>	$< 2 \cdot 10^2$	$3,1 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^7$	$9,0 \cdot 10^7$

Nach 21 Tagen wurden die Deckel der Fässer geöffnet und die verschimmelte Silage wurde auf fabrikneuen Folien ausgebreitet und das Material homogenisiert (Abb. 11, Abb. 12, Abb. 13). Aliquote (2 kg) wurden in Plastikbeuteln bis zur Verwendung in den Durchflussversuchen bei -20°C tiefgefroren.



*Abb. 11: Maissilage inokuliert mit *Penicillium roquefortii**



*Abb. 12: Verschimmelte Silage (*Penicillium roquefortii*) vor Homogenisierung*



Abb. 13: Homogenisierte verschimmelte Silage (*Monascus ruber*)

Analog hierzu wurden die Silagen mit zwei *Aspergillus fumigatus* Stämmen (A19 und 297) inokuliert und gelagert.

Die Versuchs-Silagen wurden des Weiteren mykotoxikologisch untersucht Die „*Monascus ruber*- Silage“ enthielt überwiegend Monacolin, Die „*Penicillium roquefortii*-Silage“ vor allem Roquefortin C und die beiden „*Aspergillus fumigatus*- Silagen“ zeigten ein typisches Spektrum an Fumigaclavinen und Tremorgenen (Tab. 13).

Tab. 13: Mykotoxikologische Untersuchung der Versuchs-Silagen

Silage mit dominantem Schimmelpilz	Kontroll-Silage	<i>M. ruber</i> Silage	<i>P. roquefortii</i> Silage	<i>A. fumigatus</i> Silage (Stamm A 19)	<i>A. fumigatus</i> Silage (Stamm 297)
Toxinkonzentration	[µg/kg]				
Monacolin K _s	n.n.	400	n.n.	12,6	8,9
Monacolin K _L	n.n.	189	n.n.		
Mykophenolsäure	n.n.	n.n.	n.n.	2,2	7,0
Fumonisin B ₁	2,1	12,4	9,9	2,0	2,2
Roquefortin C	16,4	n.n.	265	207,6	239,0
Gliotoxin	3,5	30,7	n.n.	110,4	83,7
Fumiquinazolin C/D	n.n.	+	n.n.	3406	3210
Fumagillin	n.n.	14,2	n.n.	10452	8374,0
Trypacidin	n.n.	26,0	n.n.	15140	14160
Verruculogen	n.n.	n.n.	n.n.	157,2	160,4
Fumitremorgen B	n.n.	n.n.	n.n.	32,3	28,4
Fumigaclavin C	n.n.	96,3	n.n.	9638	7640

6.7 Herstellung von Schimmelpilz-Kulturextrakten

Für die Überprüfung von möglichen Kombinationseffekten wurden Kulturextrakte von vier Schimmelpilz-Kulturen (*Monascus ruber*, *Aspergillus fumigatus* Stamm A19, *Penicillium roquefortii* und *Mucor spp.*) hergestellt (Abb. 14). Die Pilze wurden auf autoklaviertem Reis angezchtet (25 Tage bei Raumtemperatur, im Dunklen) und anschließend wurden Aliquote (10 g) der Kultur mit Ethylacetat (40 ml) extrahiert und zentrifugiert (4700 g, 10 min). Der so gewonnene Extrakt (entsprechend 5 Grammäquivalent) wurde zur Trockne eingengt, in Aceton resolviert und über einen Spritzenfilter (0,45 µm) aufgereinigt. Des Weiteren wurden typische *Aspergillus*-Toxine qualitativ bestimmt (Tab. 15).



Abb. 14: Schimmelpilzkulturen auf Reis

Tab. 14: Toxinkonzentrationen [ng/ml] in den Kulturextrakten

Extrakte der Schimmelpilzkultur	<i>Monascus ruber</i>	<i>Mucor sp.</i>	<i>Penicillium roquefortii</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Toxinkonzentration	[ng/ml]			
Fumagillin	734,5	n.d.	n.d.	48.200
Fumitremorgen A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fumitremorgen B	103,1	n.d.	n.d.	12.500
Gliotoxin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Monacolin K _S	20.300	n.d.	n.d.	n.d.
Monacolin K _L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mykophenolsäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Roquefortin C	n.d.	n.d.	14.650	n.d.
Sphingofungin D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sterigmatocystein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Trypacidin	3,6	n.d.	n.d.	12,8
Tryptoquivalin E/H	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tryptoquivalin G/L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tryptoquivalin N	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Verruculogen	68,7	n.d.	n.d.	22.500

n.d.: nicht detektierbar

Tab. 15: Qualitativer Toxinnachweis in den Kulturextrakten

Extrakte der Schimmelpilzkultur	<i>Monascus ruber</i>	<i>Mucor sp.</i>	<i>Penicillium roquefortii</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Toxinkonzentration	[ng/ml]			
Fumigaclavin C	+	-	-	+
Fumiquinazolin C/D	+	-	-	+
Fumiquinazolin F/G	+	-	-	+
Fumiquinazolin A/B	+	-	-	+
Fumiquinazolin E	-	-	-	+
TR-2	+	-	-	+
Tryptoquivalin F/J	+	-	-	+
Cyclotrypiostatin	+	-	-	+
Demethoxy-Fumitremorgen C	+	-	-	+
Festuclavin	+	-	+	+
Fumigaclavin A/Iso	+	-	+	+
Helvolsäure	+	-	-	+
Pseurotin A	+	-	-	+
Pyripyropen	+	-	-	+
Sphingofungin A		-	-	+
Synerazol	+	-	-	+
Tryptostatin A	+	-	-	+

6.8 Molekularbiologische Untersuchungen

Um die mikrobielle Gemeinschaft während der Versuche mit Mykotoxin-Extrakten oder verschimmelten Silagen zu analysieren, wurden Proben molekularbiologisch untersucht. Ein Überblick über die angewandten Methoden und den Analyseablauf ist in Abb. 15 dargestellt.

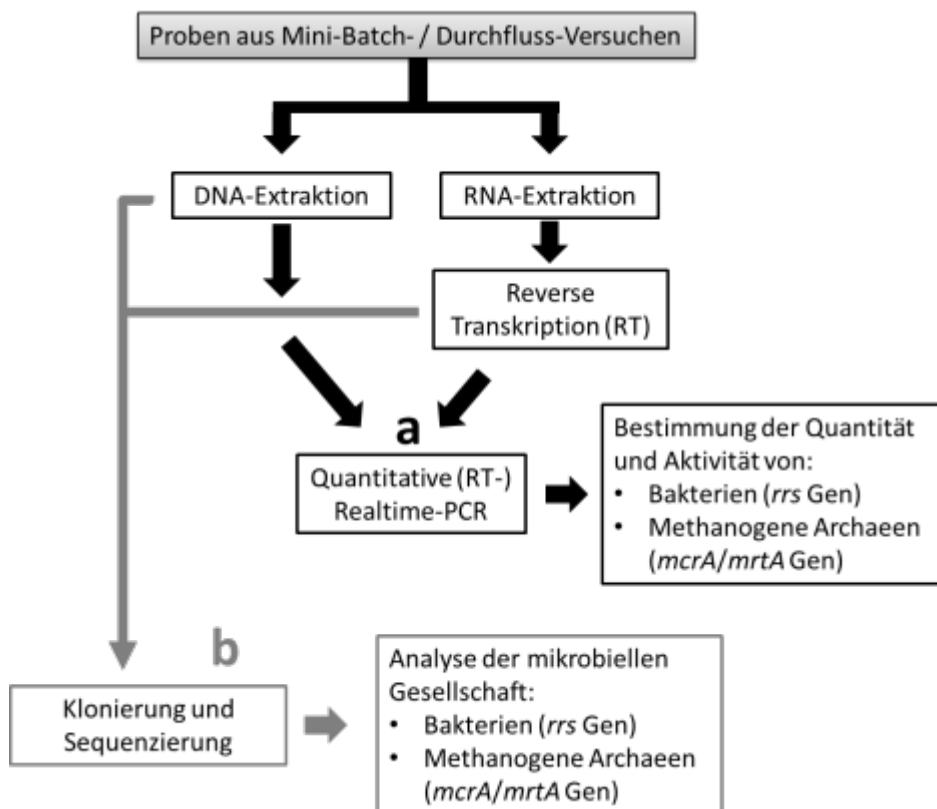


Abb. 15 Übersicht über den Analyseablauf und eingesetzte Methoden; a: Quantifizierung; b: Qualitative Analytik der Gesellschaftszusammensetzung (nicht für alle Proben durchgeführt)

Für die methanogenen Archaeen zielten die molekularbiologischen Untersuchungen auf das Gen (DNA-Ebene) des Schlüsselenzyms der Methanogenese (Methyl-Coenzym M-Reduktase, Fragment *mcrA* bzw. Isogen *mrtA*; *mcrA/mrtA*), bzw. auf die vom Gen in messenger-RNA (mRNA) umgeschriebenen Transkripte (RNA-Ebene) ab. Letztere werden über Reverse Transkription (RT) umgeschrieben und als cDNA nachgewiesen. Die Analysen der Bakterien zielten spezifisch auf das bakterielle Gen der kleinen ribosomalen Untereinheit (*rrs*) ab. Ribosomen katalysieren die Proteinbiosynthese und sind in allen lebensfähigen Zellen vorhanden. Ebenso wie für das *mcrA/mrtA* Gen erfolgten die *rrs*-Analysen auf DNA- und mit vorgeschalteter RT auf cDNA-Ebene. Für die qualitative Analytik wurde dabei konventionelle (RT-) PCR und für die Quantifizierung Quantitative (RT-) Realtime-PCR eingesetzt (Abb. 15; s. Abschnitt 6.8.3).

6.8.1 DNA-Extraktion

Die für Fermenterproben optimierten Methoden der DNA-Extraktion und der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) sind in Munk et al. (2010) beschrieben.

Die wichtigsten Schritte sind im Folgenden in Kürze dargestellt: Es wurden 500 µl Gärgemisch (Fermenterinhalt) zweimal mit je 1 ml 0,85% steriler KCl-Lösung gewaschen. 40 µl gewaschene Probe wurde in die Extraktion mit dem Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) eingesetzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch „Bead-Beating“ im FastPrep®-24 Classic Instrument (MP Biomedicals) für 40 s bei „Speed“ 6.0 Die Aufreinigung erfolgte bis auf einen zusätzlichen Waschschrift mit SEWS-M Puffer nach Anweisung des Herstellers.

Die in Spiking-Experimenten bestimmten Wiederfindungsraten der DNA-Extraktion lagen für verschiedene Organismen bei angepasstem Zellaufschluss durch „bead-beating“ zwischen 90 und 100%. Es wurde daher kein Korrekturfaktor für die Quantifizierung eingeführt.

6.8.2 RNA-Extraktion, DNase Verdau und Reverse Transkription

Um nur aktive Mikroorganismen in den Fermenterproben nachzuweisen, wurden spezifisch *mcrA/mrtA*-mRNA-Transkripte von methanogenen Archaeen bzw. *rrs*-RNA-Transkripte von Bakterien analysiert. Die RNA wird im Gegensatz zur DNA in biologisch aktiven Systemen sehr schnell abgebaut. Dieser Umstand erlaubt es, den aktuellen Zustand der Mikroorganismen zu bestimmen. Die für Fermenterproben optimierte Methode der RNA-Extraktion mit dem FastRNA® Pro Soil-Direct Kit (MP Biomedicals) und der qPCR mit vorgeschalteter Reverser Transkription (RT; RT-qPCR) ist in Munk et al. (2012) beschrieben.

Zusätzlich zu den publizierten Methoden wurde die RNA-Extraktion während des zweiten Durchflussversuchs mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Ein Methodenvergleich sollte zeigen, welcher der beiden Extraktionskits die besseren Ausbeuten liefert. Die Extraktionsprotokolle für die beiden Methoden sind in Tab. 16 beschrieben.

Tab. 16: RNA-Extraktionsprotokolle für die verwendeten Kits

FastRNA [®] Pro Soil-Direct Kit (MP Biomedicals)	RNeasy Mini Kit (Qiagen)	Funktion
40 µl gewaschene Fermentprobe in einem Lysing Matrix E Reaktionsgefäß mit 1 ml RNApro[™] Soil 300 µl gewaschener Fermentprobe in einem Lysing Matrix E Reaktionsgefäß mit 300 µl Lysis Solution mischen	300 µl gewaschener Fermentprobe in einem Lysing Matrix E Reaktionsgefäß mit 300 µl saurem Phenol mischen	Zellaufschluss
Mehrmals invertieren um „Lysing Matrix“ zu resuspendieren	Mehrmals invertieren um „Lysing Matrix“ zu resuspendieren	
Zellaufschluss im FastPrep[®]-Instrument (40 s „bead-beating“, speed setting 6.0)	Zellaufschluss im FastPrep[®]-Instrument (2 mal 20 s „bead-beating“, speed setting 5.0)	
Zentrifugieren, 5 min, 14.000 g, Raumtemperatur (RT)	Inkubation für 1 h auf Eis	
Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführen	Zentrifugieren 5 min, 5.500 g, 4 °C	Zellaufschluss
750 µl Phenol:Chloroform (1:1) zugeben	80-100 µl der wässrigen Phase in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführen 350 µl, mit β-Mercaptoethanol (10 µl/l ml RLT) versetzte, RL-T-Lösung und 237,5 µl 99 % Ethanol zugeben	
5 min Inkubation, RT durch invertieren mischen	Auftragen von 700 µl Probe auf eine RNeasy-Säule	
Zentrifugieren, 5 min, 14.000 g, RT	Zentrifugieren, 30 s, 13.000 g, RT und den Durchfluss verwerten	
200 µl Inhibitor Removal Solution in ein 2 ml Reaktionsgefäß vorlegen, wässrige Phase aus Schritt 8 in ngg. Schritt 8+9 wiederholen bis Probe aufgebraucht dieses überführen		RNA-Aufreinigung
Mischen durch invertieren, 10 mal		
Zentrifugieren, 5 min, 14.000 g, RT		
Überstand über dem Pellet in neues 2 ml Reaktionsgefäß überführen		
Fällung mit 650 µl kaltem 100 % Isopropanol 10 mal invertieren, mind. 60 min (oder über Nacht) auf -20°C		
Zentrifugieren, 15 min, 14.000 g, 4°C		
Überstand abpipettieren und Pellet mit 500 µl kaltem 70 % Ethanol waschen		
Zentrifugieren, 5 min, 14.000 g, 4°C		
Ethanol entfernen und Pellet lufttrocknen		
RNA in 200 µl DEPC-Wasser lösen und mit 600 µl RNA-MATRIX[®] Binding Solution und 10 µl RNA-MATRIX[®] Slurry vermischen		
5 min bei Raumtemperatur inkubieren, dabei häufig invertieren, zentrifugieren, ca. 10 s und Überstand abpipettieren		Waschen
600 µl RNA-MATRIX[®] Wash Solution zugeben, durch Finger schnippen resuspendieren, dann zentrifugieren, ca. 10 s und Überstand verworfen	Waschen m. 700 µl RW1-Lösung , zentrifugieren 30 s 13.000 g, RT+Durchfluss verwerten	
lufttrocknen für 5 min bei Raumtemperatur	Waschen m. 500 µl RPE-Lösung zentrifugieren, 30 s 13.000 g, RT + Durchlauf verwerten	RNA-Elution
50µl DEPC-Wasser zugeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren, währenddessen durch Finger schnippen resuspendieren	Schritt 12 wiederholen, RNeasy-Säule in ein neues Reaktionsgefäß einsetzen	
Zentrifugieren, ca. 30 s und die eluierte RNA (Überstand) in eine neues Reaktionsgefäß überführen	Eluieren der RNA in 30 µl DEPC-Wasser durch Inkubation für 2-3 min	
Schritte 22-23 wiederholen, Eluate zusammenführen	Schritt 15+16 wiederholen, Eluate zusammenführen	
100 µl RNA-Extrakt bei -80 °C lagern	80 µl RNA-Extrakt bei -80 °C lagern	

Um eventuell mitgeschleifte genomische DNA aus dem (m)RNA-Extrakt zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau mit dem TURBO DNA-free™ Kit (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Erfolg des DNA-Verdaus wurde für alle DNase-Reaktionen überprüft (s. 6.8.3).

Die RNA wurde je nach Zielsetzung mit spezifischem Reverse-Primer (*mcrA/mrtA* oder *rrs*) mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Tab. 17). Die Reverse Transkriptase (RT, AffinityScript, Agilent Technologies) ergänzt dabei den vorliegenden RNA-Strang zu einem RNA-cDNA-Hybrid-Strang (bei Enzymen mit RNase H Aktivität werden die RNA-Bestandteile in einer nachfolgenden Reaktion verdaut). Einzelsträngige cDNA wird wie doppelsträngige genomische DNA (gDNA) in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, s. 6.8.3) vervielfältigt, allerdings dient der erste Zyklus für cDNA der Herstellung eines Doppelstrangs.

Tab. 17: Zusammensetzung und Temperaturprotokoll der Reversen Transkription

Reagens	1 Ansatz [µl]
Reverse-Primer (20 µM)	0,6
RNase freies Wasser	7,4
DNase verdaute RNA	5
5 min bei 65°C denaturieren	
RT-Puffer	2
DTT	2
dNTP Mix (10 mM)	2
AffinityScript	1
60 min bei 45°C inkubieren	
15 min bei 70°C denaturieren	

6.8.3 Polymerase-Kettenreaktion basierte Analysen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein in-vitro Verfahren zur Vervielfältigung von DNA. Die PCR läuft typischerweise über 20 bis 40 Zyklen, wobei jeder Zyklus in drei Phasen unterteilt werden kann: Denaturierung, Annealing (Primerbindung) und Elongation. Die einzelnen Phasen werden über die einwirkende Temperatur gesteuert. Die PCR findet daher in einem Heizblock (Thermocycler) statt, der gezielte Temperaturprogramme abrufen kann.

Initial wurde für 3 min bei 95 °C denaturiert, um die eingesetzte gDNA in ihre Einzelstränge aufzuschmelzen und auch andere unerwünschte Basenpaarungen aufzulösen (z.B. „Primerdimere“, aneinander gebundene Primer). Die Erhitzung auf 95 °C dient auch zur Aktivierung der hitzestabilen DNA-Polymerase. Zu Beginn eines jedes Zyklus wurde dann erneut 30 s denaturiert. Während des Annealings lagern sich die Primer (kurze, für das Zielgen spezifische Oligomere), an ihre spezifischen Bindestellen an der gDNA an. Die optimale Temperatur für diesen Schritt ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer-gDNA-Hybride und muss für die einzelnen Systeme stringent eingestellt werden. In der dritten Phase, der Elongation, synthetisiert die DNA-Polymerase die zur Vorlage komplementären DNA-Einzelstränge mit den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs, Basen der DNA) ausgehend von den 3'-Enden der Primer. In jedem Zyklus wird so der

Zielbereich der gDNA verdoppelt, die Menge an Ziel-DNA nimmt somit bei optimaler Reaktionseffizienz exponentiell (2^n ; n = Anzahl der Zyklen) zu.

6.8.3.1 Konventionelle PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Die konventionelle PCR läuft wie unter 6.8.3 beschrieben ab und dient zur Vervielfältigung von gDNA aus Probenmaterial. Diese Technik wurde im beschriebenen Verbundvorhaben eingesetzt, um ausreichend Ausgangsmaterial für die Klonierung und die Sequenzierung der vereinzelt Ziel-DNA-Moleküle bereitzustellen. Die Temperaturprogramme und Reaktionsansätze für die verschiedenen Primerpaare sind Tab. 18 zu entnehmen. Die Primersequenzen für *mcrA/mrtA* (MeA 1046_F_ino / MeA 1435_R_ino) wurden in Bauer et al. (2008) und die für die V6-V8 Region der bakteriellen *rrs* (E939-F, R1378_R) in Lebuhn et al. (2014a) veröffentlicht.

Tab. 18 Temperaturprogramme und Reaktionsansätze für die Primerpaare MeA 1046_F_ino / MeA 1435_R_ino und E939-F, R1378_R für die konventionelle PCR

		MeA 1046_F_ino / MeA 1435_R_ino			
		Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
		Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
		Denaturierung	95 °C	20 sec	12
		Annealing	60,5 °C	45 sec	
		Elongation	72 °C	40 sec	
		Denaturierung	95 °C	20 sec	5
		Annealing	60 °C	45 sec	
		Elongation	72 °C	40 sec	
		Denaturierung	95 °C	20 sec	5
		Annealing	59,5 °C	45 sec	
		Elongation	72 °C	40 sec	
		Denaturierung	95 °C	20 sec	13
		Annealing	59 °C	45 sec	
		Elongation	72 °C	40 sec	
		Finale Elongation	72 °C	10 min	1
		MeA 1046_F_ino / MeA 1435_R_ino			
		1 Ansatz (µl)			
Puffer (10x, cont. no MgCl ₂)	5				
MgCl ₂ (50 mM)	6				
dNTPs (10 mM each)	1				
AF 18S 1F (10 µM)	1.5				
AF 18S R improved (10 µM)	1.5				
(Platinum)-Taq-Pol. (5 u / µl)	0.3				
H ₂ O	32.7				
Vorlegen	48				
Probe	2				
Ges.-Vol.	50				

		E939-F, R1378_R			
		Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
		Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
		Denaturierung	95 °C	20 sec	30
		Annealing	70 °C	70 sec	
		Finale Elongation	72 °C	10 min	1
		E939-F, R1378_R			
		1 Ansatz (µl)			
Puffer (10x, cont. no MgCl ₂)	5				
MgCl ₂ (50 mM)	6				
dNTPs (10 mM each)	1				
forw.-Primer (10 µM)	1				
rev.-Primer (10 µM)	1				
(Platinum)-Taq-Pol. (5 u / µl)	0.3				
H ₂ O	33.7				
Vorlegen	48				
Probe	2				
Ges.-Vol.	50				

Die erhaltene amplifizierte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese auf die richtige Fragmentgröße und auf Verunreinigungen geprüft. Bei diesem Verfahren werden DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern durch das an das Gel angelegte elektrische Feld zum Pluspol. Dabei wandern

kleine Moleküle schneller durch das Gel als große. Es wurden 1,2 prozentige Gele verwendet. Dazu wurde der benötigte Agaroseanteil abgewogen und in 1 x TAE Puffer erhitzt, bis die Lösung völlig klar war. Pro 100 ml Gellösung wurden 2 µl SERVA Green zu Färbung der Nukleinsäuremoleküle zugesetzt. Nach kurzem Abkühlen wurde das Gel in die Gelapparatur gegossen. Die Proben wurden mit 6 x Ladepuffer versetzt auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Größenstandard aufgebracht, um die Länge der vervielfältigten Nukleinsäure-Fragmente (PCR-Amplikons) zu überprüfen. Nach dem Gellauf wurden die Banden im UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert.

Bei der Untersuchung von RNA wurde die Freiheit der RNA-Extrakte von gDNA durch parallel mitgeführte –RT Kontrollen verifiziert. Da in dieser Kontrolle keine gDNA enthalten und keine cDNA gebildet sein darf, darf auch keine DNA-Bande im Gel erscheinen.

6.8.3.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die quantitative PCR (qPCR) erlaubt es, die Zunahme der DNA-Zielmoleküle während der PCR in Echtzeit mitzuverfolgen und die in der Probe enthaltene DNA-Menge zu quantifizieren. Neben den konventionellen Reagenzien werden für die qPCR Fluoreszenzfarbstoffe oder mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Oligonukleotid-Sonden benötigt. Nicht-gekoppelte Farbstoffe, wie SYBR-Green oder EVA-Green, binden nur in doppelsträngige DNA und setzen im gebundenen Zustand Fluoreszenz frei. Das Fluoreszenzsignal wird in jedem Zyklus der qPCR nach der Annealing-Phase gemessen. Mit der Zunahme doppelsträngiger DNA steigt auch das Fluoreszenzsignal mit dem gleichen Faktor an.

Um die Bildung der Ziel-DNA bzw. die originär in der Probe enthaltene DNA- (oder RNA-) Konzentration absolut zu quantifizieren, benötigt man einen der Ziel-DNA entsprechenden Standard. Für die absolute Quantifizierung von methanogenen Archaeen wurde ein *mcrA/mrtA*-Standard angefertigt (Munk et al., 2010), für die absolute Quantifizierung von Bakterien ein *rrs*-Standard. Beide Standards wurden nach dem gleichen Prinzip hergestellt: Das Zielgen wurde über Klonierung in *Escherichia coli* Zellen integriert. Die Klone wurden mittels M13-PCR und Agarose-Gelelektrophorese (s. 6.8.3.1) auf Spezifität geprüft. Ein geeigneter Klon wurde in flüssigem LB-Medium über Nacht angezüchtet. Am nächsten Tag wurden 5 µl der Kultur auf frisches Medium überimpft und für weitere 6 h bei 37 °C inkubiert. Bei ausreichender Trübung wurde die Kultur aufgeteilt. Es wurden 1 ml zur Herstellung einer Verdünnungsreihe (unverdünnt bis 10^{-8}) für die Kultivierung verwendet und 4 ml zur Herstellung einer Verdünnungsreihe zur qPCR (unverdünnt bis 10^{-8}). Mit ersterer wurde durch Ausplattieren und Auszählen die pro µl in der Kultur enthaltene Zellzahl bestimmt. Diese wurde in die qPCR eingesetzt und vermessen. Die Genkopien-Anzahl in den einzelnen Verdünnungsstufen wurde über die Most-Probable-Number (MPN)-Methode ermittelt. Hieraus lässt sich die Ziel-DNA-Kopienkonzentration pro µl Kultur sowie pro *E. coli* Zelle berechnen.

Der seriell verdünnte Standard wurde aliquotiert und eingefroren. Bei jedem qPCR-Lauf wurde eine der aliquotierten Standard-Verdünnungsreihen mitgeführt. Über die bekannte Standardkonzentration wurde die Konzentration der Genkopien in der Probe bestimmt. Die Reaktionsansätze und Temperaturprogramme sind Tab. 18 und Tab. 19 zu entnehmen.

Von allen Proben wurden die methanogenen Archaeen sowie die Bakterien mittels qPCR (*mcrA/mrtA*-Gen und *rrs*-Gen) quantifiziert. Dabei wurden alle Proben (Ziel-DNA) in einer Verdünnungsreihe eingesetzt, um eine (partielle) PCR-Inhibierung durch eventuell

mitextrahierte Hemmstoffe aufzuzeigen bzw. auszuschließen. Eine korrekte und effiziente Amplifikation gehorcht der Bedingung, dass das Fluoreszenzsignal der 1:10 Verdünnung den Signal-Schwellenwert („Threshold“) 3,33 Zyklen später erreicht.

Bei der Untersuchung von RNA wurde die Freiheit der RNA-Extrakte von gDNA durch parallel mitgeführte –RT Kontrollen verifiziert. Da in dieser Kontrolle keine gDNA enthalten und keine cDNA gebildet sein darf, darf auch kein Fluoreszenzsignal empfangen werden.

Tab. 19 qPCR und RT-qPCR Temperaturprogramme und Reaktionsansätze für die Primerpaare MeA 1046_F_ino / MeA 1435_R_ino und E939-F, R1378_R

MeA 1046_F_ino / MeA 1435_R_ino		MeA 1046_F_ino / MeA 1435_R_ino			
	1 Ansatz (µl)	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Puffer (10x, cont. no MgCl ₂)	2.5	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
MgCl ₂ (50 mM)	3	Denaturierung	95 °C	15 sec	45
dNTPs (10 mM each)	0.5	Annealing	60 °C	1 min	
forw.-Primer (10 µM)	0.75	Entfernen unspez. Produkte	82 °C	10 sec	
rev.-Primer (10 µM)	0.75	Schmelzkurve	95 °C	1 min	1
(Platinum)-Taq-Pol. (5 u / µl)	0.15		55 °C	30 sec	
Eva-Green (50x)	1		95 °C	30 sec	
H ₂ O	15.35				
Vorlegen	24				
Probe	1				
Ges.-Vol.	25				

E939-F, R1378_R		E939-F, R1378_R			
	1 Ansatz (µl)	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Puffer (10x, cont. no MgCl ₂)	2.5	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
MgCl ₂ (50 mM)	3	Denaturierung	95 °C	15 sec	45
dNTPs (10 mM each)	0.5	Annealing	70 °C	1 min	
forw.-Primer (10 µM)	0.5	Entfernen unspez. Produkte	84 °C	10 sec	
rev.-Primer (10 µM)	0.5	Schmelzkurve	95 °C	1 min	1
(Platinum)-Taq-Pol. (5 u / µl)	0.15		55 °C	30 sec	
Eva-Green (50x)	1		95 °C	30 sec	
H ₂ O	15.85				
Vorlegen	24				
Probe	1				
Ges.-Vol.	25				

6.8.4 Mikrobiologisch-ökophysiologische Parameter zur Prozessbewertung

6.8.4.1 Der Metabolische Quotient

Aus den Ergebnissen der qPCR (s. 6.8.3.2) und der aktuellen Methanproduktivität wurde der Metabolische Quotient (MQ) berechnet. Der MQ ist abhängig von der Methanproduktivität und der Konzentration methanogener Archaeen. Eine Standardfunktion wurde für einen stabilen Mono-Mais vergärenden Betrieb entwickelt (Munk et al., 2012). Damit wird über die aktuelle Methanproduktivität (MP_{akt}) eine erwartete Konzentration an methanogenen Archaeen (mA_{erw}) berechnet oder über die

aktuelle Konzentration methanogener Archaeen (mA_{akt}) eine erwartete Methanproduktivität (MPR_{erw}).

Aus diesen Faktoren ist der MQ abgeleitet: $MQ = MPR_{akt} / MPR_{erw} = mA_{erw} / mA_{akt}$.

Ist die aktuell gemessene methanogene Population kleiner als die für die gemessene Methanproduktivität erwartete Standardgröße, leistete jede einzelne Zelle mehr als bei der entsprechenden Standard-Methanproduktivität. Bei einem Anstieg des MQ über einen Wert von ca. 3 ist Stressmetabolismus für die methanogenen Archaeen indiziert. Bei Werten unter 1 sind mehr Methanogene vorhanden als über die Standardfunktion erwartet. Werte $MQ < 0,1$ zeigen an, dass die Zellen (teilweise) inaktiv und/oder unterfordert sind. Derart niedrige Werte treten beispielsweise in Versäuerungsphasen mit inhibierter methanogener Aktivität auf. Dabei zeigt sich typischerweise etwa 2 – 3 Wochen vor dem Rückgang des MQ-Werts der oben beschriebene Stressmetabolismus (Munk and Lebuhn, 2014). Der Verlauf des MQ dient damit der Prozessdiagnose, wobei der Stressmetabolismus Frühindikator einer Prozessstörung ist (Lebuhn et al., 2014b).

6.8.4.2 Das cDNA/DNA Verhältnisse

Aus den Ergebnissen der verschiedenen Untersuchungen mit qPCR bzw. RT-qPCR wurde der Aktivitätsparameter cDNA/DNA-Verhältnis (bzw. Transkript/Gen-Verhältnis) berechnet, um die spezifische *mcrA/mrtA*- bzw. *rrs*-Transkriptionsaktivität pro methanogene bzw. bakterielle Zelle zu bestimmen.

Der Verlauf der cDNA/DNA-Verhältnisse wird ebenfalls zur Verfolgung der Aktivität der betrachteten Gilde und für die Prozessdiagnose genutzt (Munk et al., 2012; Lebuhn et al., 2014b).

6.8.5 Analyse der mikrobiellen Gesellschaftszusammensetzung durch Klonierung und Sequenzierung

Um die mikrobielle Gesellschaftszusammensetzung in den Fermenterproben zu bestimmen, wurden phylogenetische Sequenzanalysen durchgeführt. Diese zielten gruppenspezifisch auf konservierte Genbereiche ab, zur Analyse der methanogenen Gesellschaftszusammensetzung auf das Gen (DNA-Ebene: Nachweis der Präsenz) der Untereinheit A der Methyl-CoM-Reduktase (*mcrA/mrtA*; *mcrA*-Gen bzw. Isogen *mrtA*) und zur Analyse der bakteriellen Gesellschaftszusammensetzung auf das Gen der kleinen ribosomalen Untereinheit (*rrs*-Gen; 16S rRNA Gen) bzw. zur Beurteilung der Aktivität auf die entsprechende mRNA oder rRNA (Messung als cDNA; s. 6.8.2).

Bevor ein PCR-Produkt aus einer gemischten mikrobiellen Gesellschaft (z.B. Gärgemisch) sinnbringend sequenziert werden kann, müssen die Amplikons (PCR-Produkte) zunächst vereinzelt werden, es muss eine Klonbibliothek erstellt werden. Dazu wurden DNA und cDNA Extrakte in einer konventionellen PCR amplifiziert (6.8.3.1). Die gereinigten PCR-Produkte (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen;) wurden mit dem TOPO-TA cloning Kit (Invitrogen), der den pCR 4-TOPO Vektor enthält, in OneShot TOP10 chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen kloniert. Positive Klone wurden durch ihr Aufwachsen auf Ampicillin-LB-Agarplatten identifiziert. Über eine Kolonie-PCR (mit dem Primerpaar M13) und anschließende Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 6.8.3.1) wurde kontrolliert, ob die Klone eine DNA-Insertion in der richtigen Größe trugen. Positive Klone wurden zur Sequenzierung an das Unternehmen Eurofins MWG Operon versandt.

Nach Erhalt der Sequenzen wurden diese zunächst zugeschnitten und so von der noch anhängenden Plasmidsequenz befreit. Die Sequenzen wurden nun über das Programm

Mothur (<https://www.mothur.org/>) und den darin enthaltenen Programmbaustein Uchime (Edgar, 2011) auf Chimären geprüft. Chimären sind Sequenzen, die während der PCR aus zwei individuellen DNA-Fragmenten verschiedener Herkunft zusammengesetzt wurden. Dies kann zum Beispiel passieren, wenn für einen DNA-Strang die Synthese durch die DNA-Polymerase zu früh abgebrochen wurde und im nächsten PCR-Zyklus ein fremdes DNA-Fragment an den unfertigen DNA-Strang bindet und diesen so fehlerhaft vervollständigt. Verbleiben solche Sequenzen im Datensatz, stören sie die phylogenetische Zuordnung und führen so zu einer falsch bestimmten mikrobiellen Gesellschaftszusammensetzung typischerweise mit überschätzter mikrobieller Diversität. Identifizierte Chimären wurden daher aus dem Datensatz entfernt.

Über bioinformatische Routinen (BLAST, RDP Classifier, Seqmatch) wurden die Sequenzen im Abgleich mit selbsterstellten qualitätsgeprüften Referenzdatensätzen und online verfügbaren Datenbanken (NCBI Genbank, SILVA Datenbank, Greengenes Datenbank) ausgewertet. Phylogenetische Bäume wurden mit der Software MEGA (Versionen 5.0 – 7.0) angefertigt. Zusätzlich wurden die bakteriellen Sequenzen mit dem Programm CD-Hit EST nach ihrer Ähnlichkeit in operational taxonomic units (OTUs) gruppiert, wobei bei > 99% Sequenzidentität der *rrs*-V6-V8-Region Zugehörigkeit zu einer Species oder Genospecies definiert ist (Lebuhn et al., 2014a).

Anhand der phylogenetischen Zuordnung aus der Stammbaum- und der OTU-Analyse wurden die prozentualen Anteile der identifizierten Taxa in einer Probe auf DNA- sowie auf cDNA-Ebene errechnet. Dieser Ansatz ermöglicht eine vergleichende Analyse der mikrobiellen Gesellschaftszusammensetzung z.B. zu unterschiedlichen Prozesszuständen oder zwischen verschieden behandelten Fermenterproben. Im vorliegenden Verbundvorhaben waren die Analysen darauf fokussiert, ob ein Unterschied in der mikrobiellen Gesellschaft zwischen Fermenterproben aus den Ansätzen mit den verschimmelten Silagen und der Kontrolle bestand.

7 Ergebnisse und Diskussion

7.1 Controlling auf Praxisbetrieben

Es wurden 27 Silocontrollings durchgeführt. Dabei fiel auf, dass die vorherrschende Silierpraxis auf den LfL-Pilotanlagen von hoher Güte ist. Im Mittel wurden die Zielwerte einer guten Silage erreicht (96 DLG-Punkte bei Maissilage, 91 DLG-Punkte bei Grassilage). Erwärmte oder verschimmelte Bereiche umfassten nur sehr geringe Anteile (1-3 %) des gelagerten Substrats. Das kann auf hohe Dichtewerte der Silagen sowie hohem Vorschub bei guter Abdekarbeit zurückgeführt werden. Für diese Anlagen dürften Schimmelpilze und deren sekundäre Stoffwechselmetaboliten aus den eigenen Substratlagerungen weniger ein Problem darstellen, als zugekaufte Substrate mit fraglicher hygienischer Qualität.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass es auch bei der Substratlagerung möglich ist, hohe Qualitäten sowohl hinsichtlich der inhaltstofflichen Zusammensetzung als auch der Hygiene zu erreichen.

7.2 Einfluss von Mykotoxinen und Schimmelpilzkulturextrakten auf die Gasbildung im Mini-Batch-System

Für die Darstellung der Druckverläufe der getesteten Varianten sind die Mittelwerte der vier Wiederholungen pro Variante verwendet worden. Die relative Standardabweichung zwischen den einzelnen Wiederholungen in den Batchversuchen lag bei maximal 5%. Lediglich im Versuch 2015_002 mit den Biozönosen SB1 und BGM lagen die Abweichungen innerhalb der Wiederholungen bei bis zu 11%.

7.2.1 Lösungsmittelversuche

Um mögliche Auswirkungen der potenziellen Lösungsmittel auf den Biogasprozess auszuschließen, wurden in einem Vorversuch der SB2 mit jeweils 1 ml die doppelte notwendige Menge der Lösungsmittel Wasser, Methanol, Aceton und Acetonitril (ACN) zugegeben. Die Zugabe von Methanol bewirkte eine signifikante Zunahme der Biogasproduktion und wurde im weiteren Verlauf für die Mykotoxinversuche als Lösungsmittel nicht verwendet. Aceton und Acetonitril hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Biogasproduktion und wurden als neutral und somit verwendbar beurteilt.

In einem zweiten Lösungsmittelversuch 2014_007 mit der stoßbelasteten Biozönose GB-C11 konnte die signifikante Verstoffwechslung des Methanol bestätigt werden, allerdings hatten die Lösungsmittel Aceton und Acetonitril gegenüber der Kontrolle einen leicht mindernden Effekt (Abb. 16). Hinsichtlich der Methangehalte konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 17).

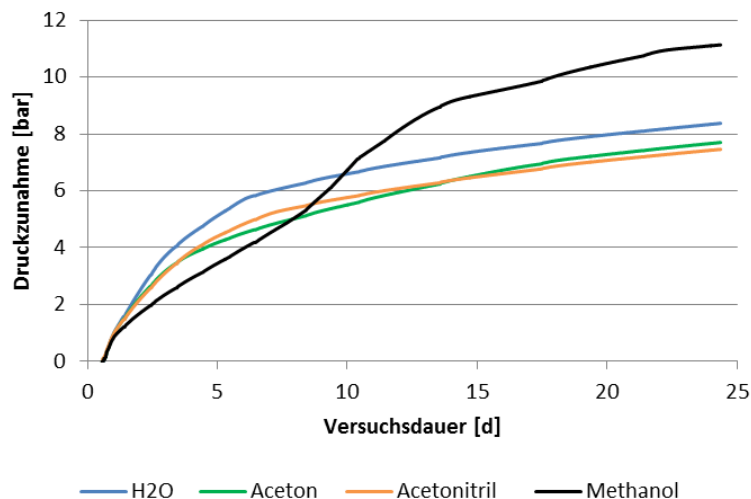


Abb. 16: Gemittelter Verlauf der aufsummierter Biogasproduktion des Versuch 2014_007 nach Zugabe von Lösungsmitteln zur stoßbelasteten Biozönose GB-11

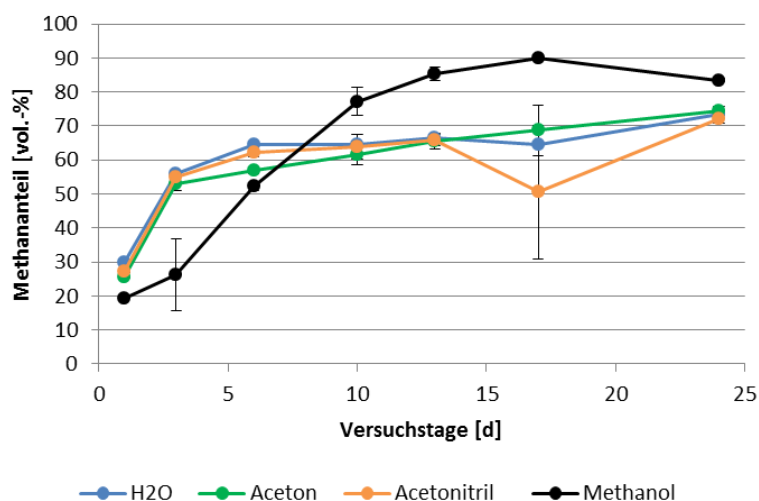


Abb. 17: Gemessene Methangehalte im Versuchsverlauf 2014_007 nach Zugabe von Lösungsmitteln zur gestressten Biozönose GB-C11

Das eingesetzte Inokulum wurde zu Versuchsbeginn zunächst vor der Belastung und erneut nach 4 Stunden direkt vor Versuchsstart und abschließend alle getestete Varianten nach Versuchsende als Mischprobe aus den Wiederholungen nasschemisch untersucht (Abb. 18 und Abb. 19). Bis auf eine leichte Versauerung innerhalb der 4 Stunden vor Versuchsstart (Abb. 18) durch die Zugabe von Weizenschrot zeigten die Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede.

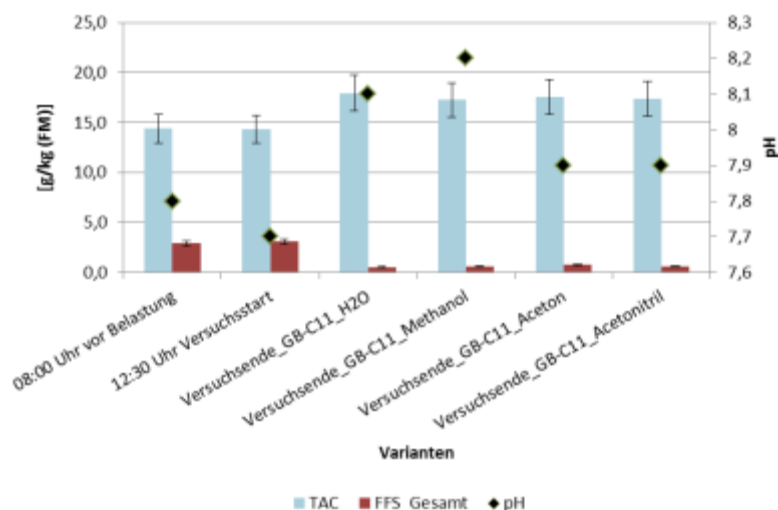


Abb. 18: Versuch 2014_007, Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Versuchsstart und -ende

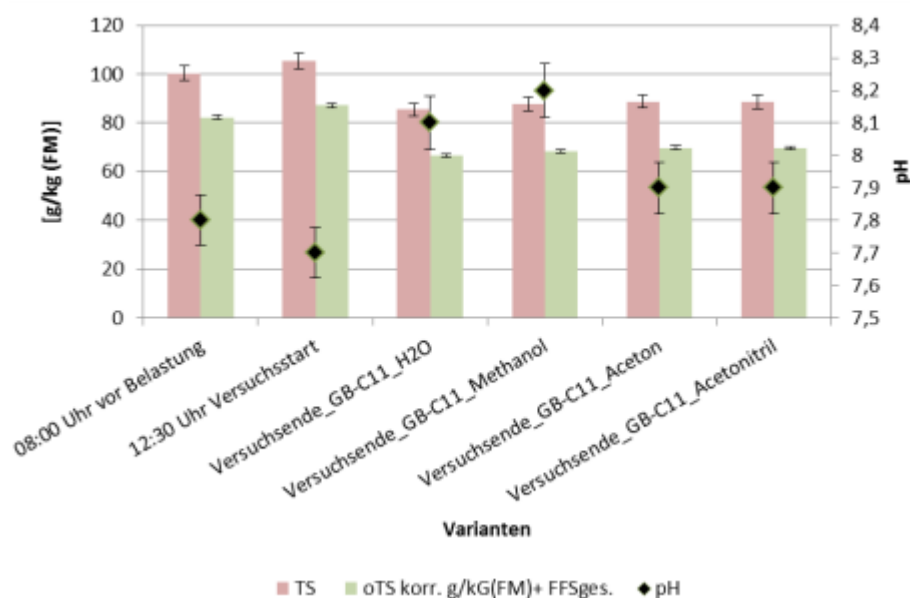


Abb. 19: Versuch 2014_007, Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Versuchsstart und Versuchsende

7.2.2 Versuch 2014_001

Bereits im ersten Versuch mit Reinsubstanzen zu SB2 zeigte die Zugabe von in Aceton gelöster Mykophenolsäure, welche von einem der häufigsten Silagepilze *Penicillium spp.* gebildet werden kann, in einer Konzentration von 50 mg/l einen signifikanten Einfluss auf die Biogasproduktion (Abb. 20). Sowohl die in Aceton gelöste Reinsubstanz Roquefortin, als auch die in Acetonitril gelösten Reinsubstanzen Monacolin, Fumonisin und Gliotoxin zeigten keinen Effekt hinsichtlich des Druckverlaufs.

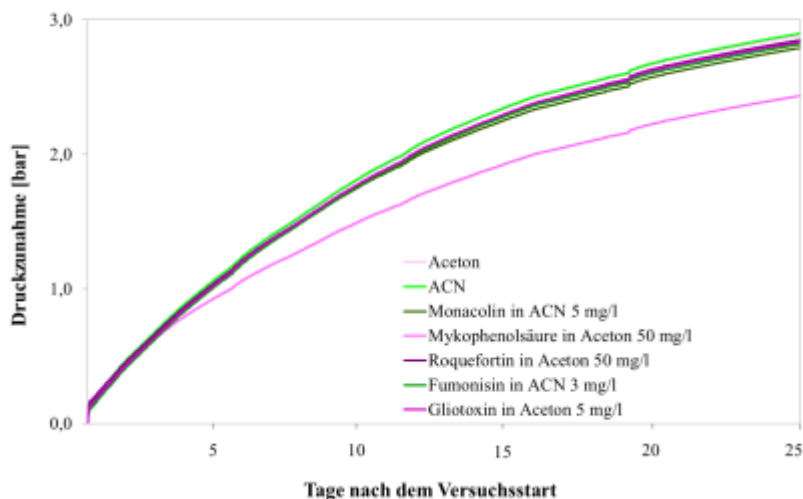


Abb. 20: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe unterschiedlicher Reinsubstanzen zu SB2 im Versuch 2014_001

In Bezug auf die nasschemischen Analysen, dargestellt in Abb. 21 und Abb. 22, konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

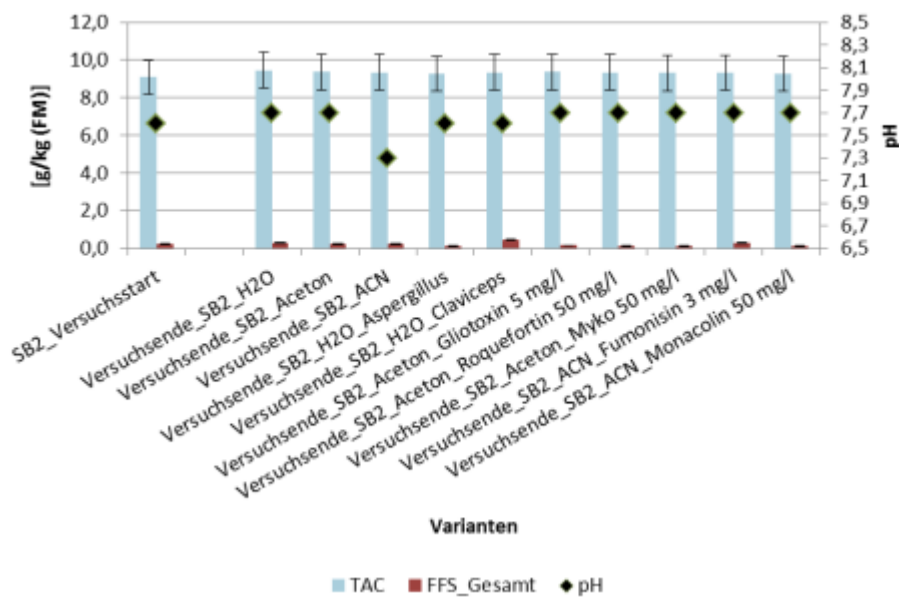


Abb. 21: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_001

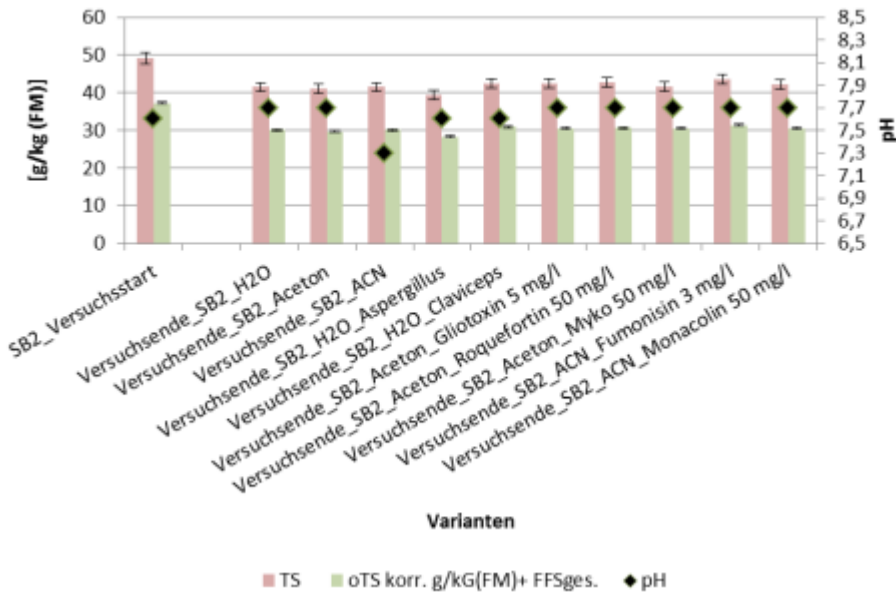


Abb. 22: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_001

7.2.3 Versuch 2014_004

Im zweiten Versuch wurden zum einen erneut Reinsubstanzen zu SB2 zugegeben, wobei die Zugabe von Mykophenolsäure in den Konzentrationen 0,5 und 50 mg/l in Aceton gelöst zugegeben wurde. Des Weiteren wurden Reiskörner mit *Aspergillus fumigatus* kontaminiert, anschließend homogenisiert und als Schlempe zugegeben.

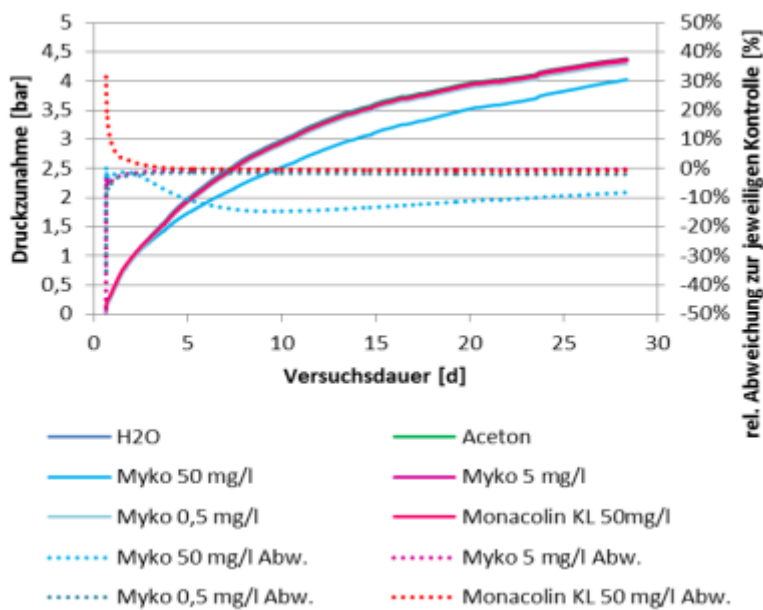


Abb. 23: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Reinsubstanzen zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2014_004; Myko: Mykophenolsäure

Unter den in Reinform zugegebenen Mykotoxinen zeigte nur die Mykophenolsäure in der höchsten Konzentration von 50 mg L⁻¹ einen signifikant reduzierenden Effekt (Abb. 23). Niedrigere Konzentrationen von 0,5 mg L⁻¹ und 5 mg L⁻¹ an Mykophenolsäure zeigten keine Wirkung auf die Biogasproduktion.

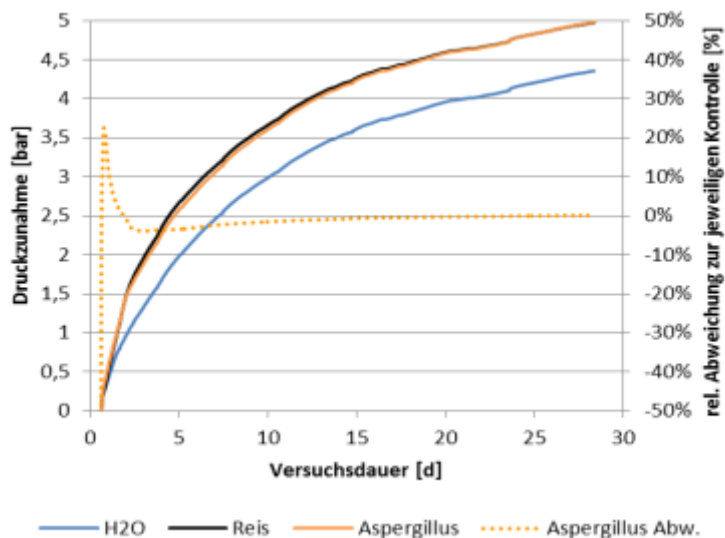


Abb. 24: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von kontaminiertem Reis zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2014_004

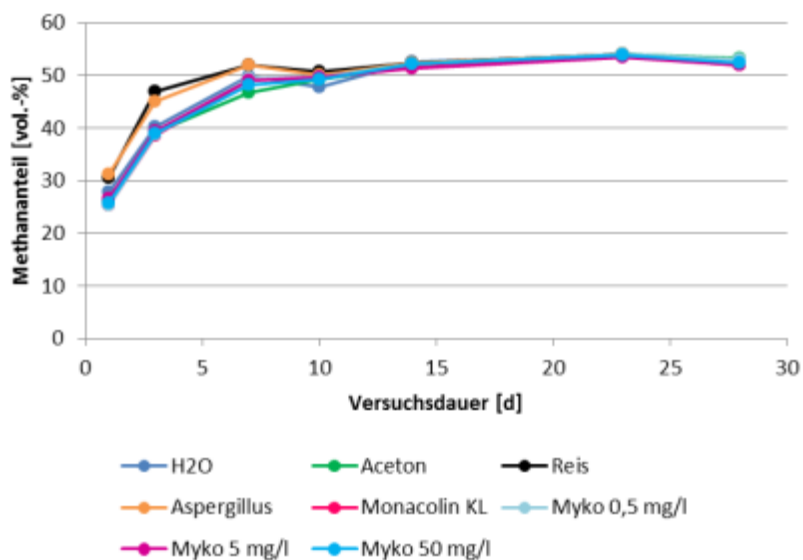


Abb. 25: Methangehalte im Versuchsverlauf 2014_004 nach Zugabe von Reinsubstanzen und kontaminiertem Reis zu SB2; Myko: Mykophenolsäure

Abb. 24 zeigt eine deutliche Zunahme der Biogasproduktion nach der Zugabe von Reis. Der Fütterungseffekt durch die Zugabe von Reis erhöhte die Biogasproduktion sowohl in der Reiskontrolle als auch bei der kontaminierten Variante. Der Schimmelpilz selbst zeigte somit keinen Effekt.

In Bezug auf den Verlauf des Methangehalts über den Versuchszeitraum zeigten die Reinsubstanzen keinen Unterschied zur Kontrolle. Lediglich der zugegebene Reis beeinflusste zu Beginn des Versuches mit leicht höheren Methangehalten gegenüber der Kontrolle ohne Zugabe von Reis (Abb. 25).

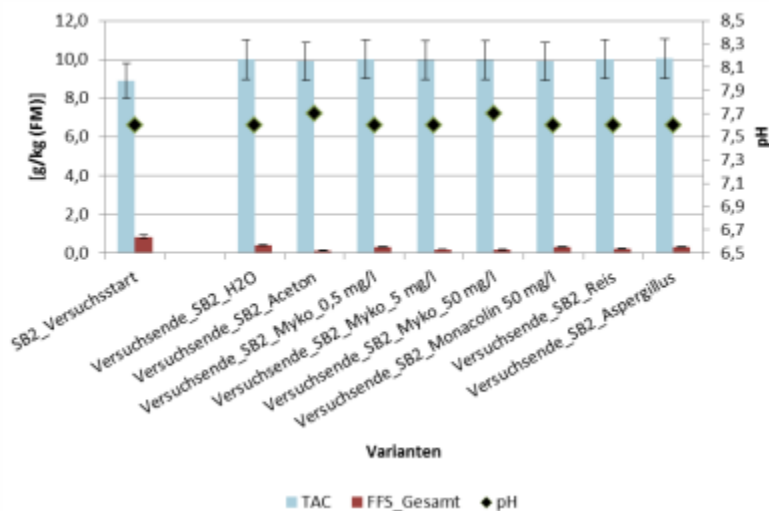


Abb. 26: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_004

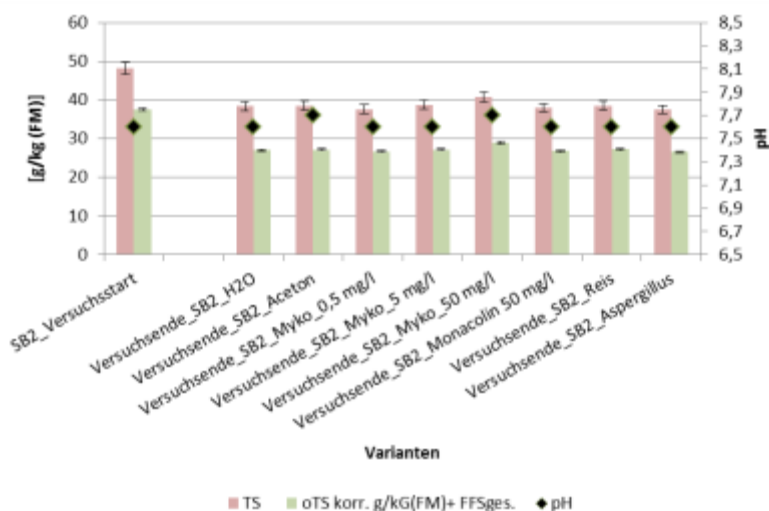


Abb. 27: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_004

Wie bereits im vorangegangenen Versuch mit SB2 lieferten die nasschemischen Analysen (Abb. 26 und Abb. 27) keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchsstart und Versuchende.

7.2.4 Versuch 2014_005

Im dritten Versuch mit SB2 als Inokulum hatte die Mykophenolsäure in der Konzentration von 20 mg L⁻¹ nicht den reduzierenden Effekt, der auch in diesem Versuch bei einer Konzentration von 50 mg L⁻¹ g beobachtet werden konnte (Abb. 28).

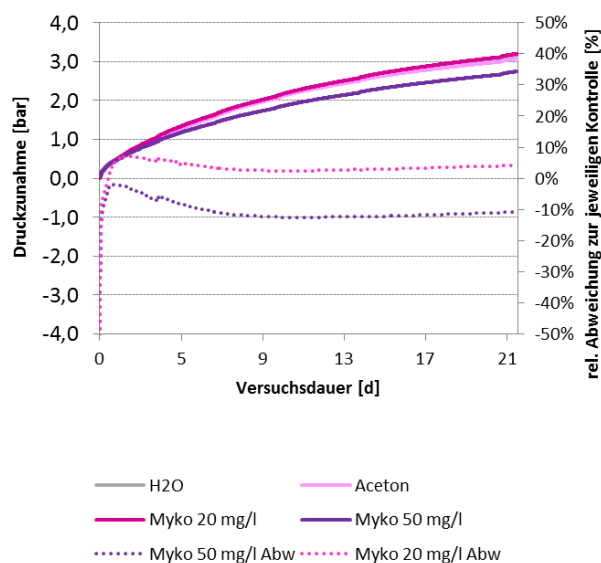


Abb. 28: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Mykophenolsäure (Myko) zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2014_005A

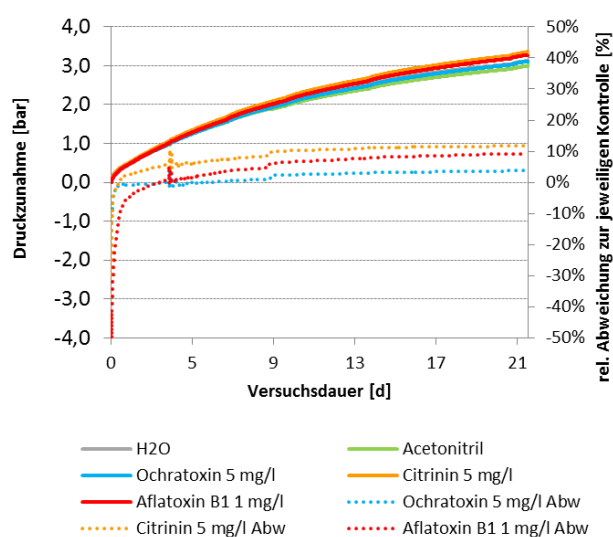


Abb. 29: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Reinsubstanzen zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2014_005

Die Mykotoxine Ochratoxin A, Citrinin und Aflatoxin B₁ (Abb. 29) zeigten ähnlich wie die in vorhergehenden Versuchen in ihrer Reinform getesteten Toxine keine Wirkung auf die Biogasproduktion bzw. den Druckanstieg im Versuchssystem.

Auch in diesem Versuch konnten bei den Ergebnissen der nasschemischen Analysen (Abb. 30 und Abb. 31) keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchsstart und Versuchsende festgestellt werden.

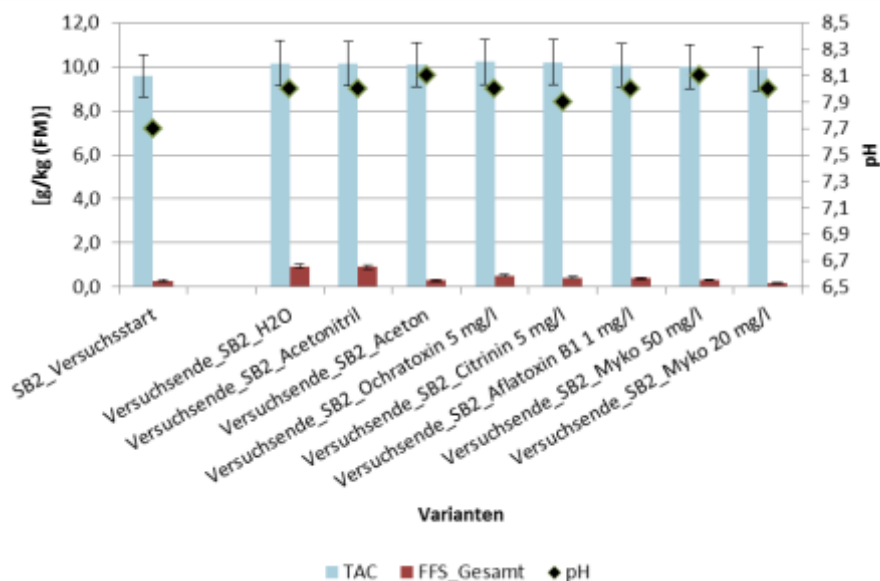


Abb. 30: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_005

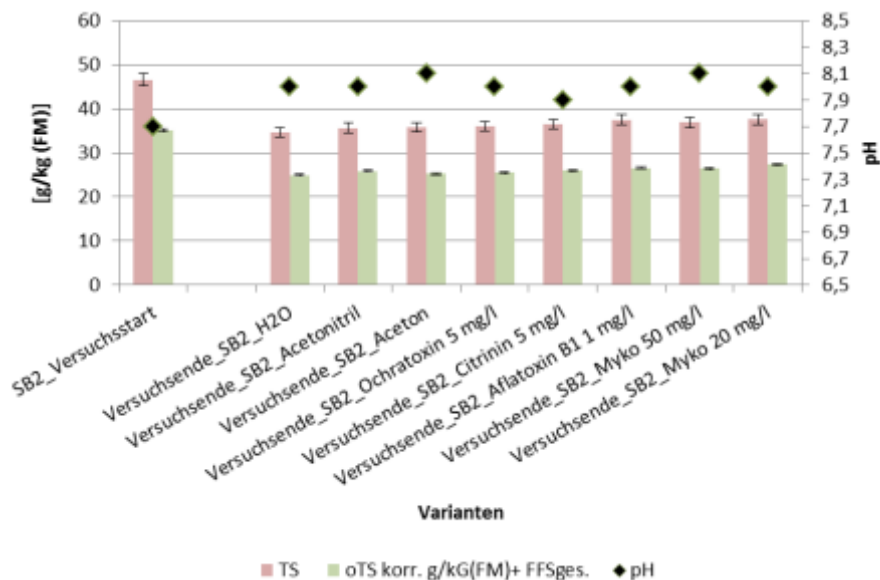


Abb. 31: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_005

7.2.5 Versuch 2014_008

In diesem Versuch kam die überfütterte Biozönose GB-C11 zum Einsatz. Der Zusatz der Reinsubstanzen erfolgte in denselben Konzentrationen wie in den vorangegangenen Tests mit SB2. Abb. 32 zeigt den Druckverlauf der getesteten Varianten.

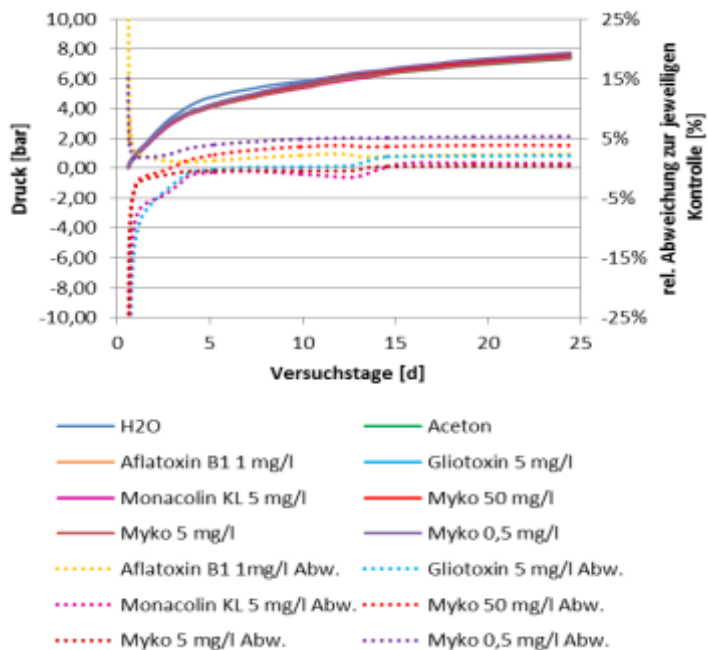


Abb. 32: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Reinsubstanzen zu GB-C11 und ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2014_008

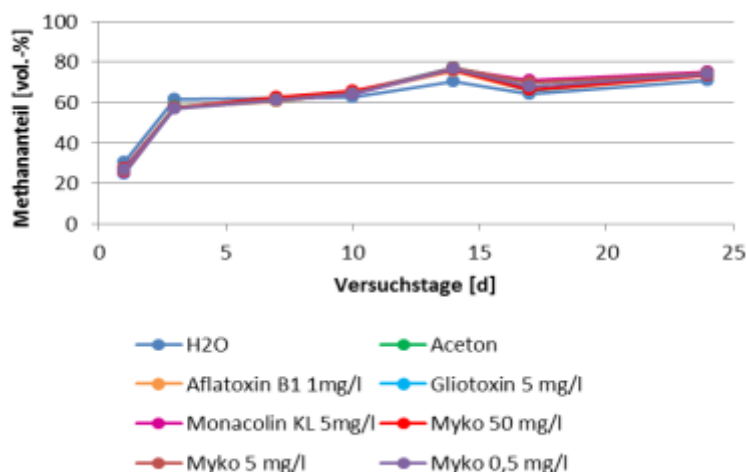


Abb. 33: Methangehalte nach Zugabe von Reinsubstanzen zu GB-C11 im Versuchsverlauf 2014_008

Der Verlauf zeigte weder bei der Biogasproduktion, noch in den gemessenen Methangehalten (Abb. 33) im Versuchszeitraum eine signifikante Wirkung auf den Biogasprozess. Auch die Zugabe von Mykophenolsäure in einer Konzentration von 50 mg L⁻¹, die bei vorangegangenen Versuchen einen mindernden Einfluss auf die Biogasproduktion ausübte, zeigte in diesem Versuch keinen Effekt.

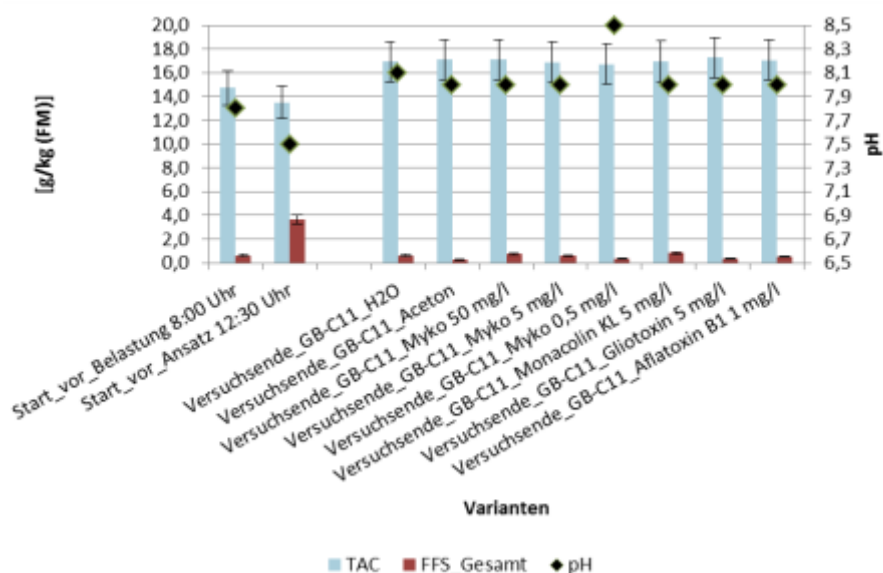


Abb. 34: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_008

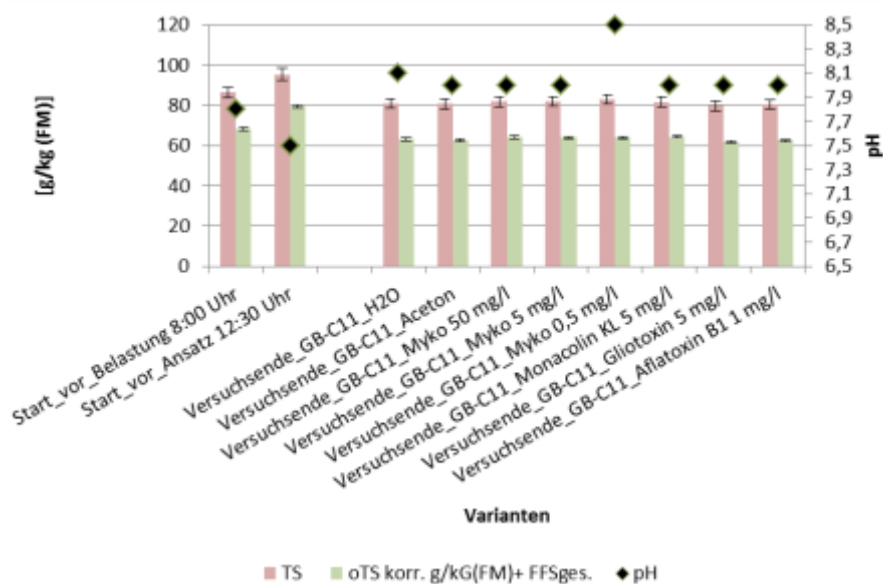


Abb. 35: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2014_008

Bei den nasschemischen Analysen zeigte sich, ähnlich wie im zweiten Lösungsmittelversuch 2014_007 eine leichte Versäuerung vor Versuchsbeginn zwischen der Stoßbelastung mit Weizenschrot und dem Versuchsstart, die sich aber bis zu Versuchsende als nicht signifikant auswirkt (Abb. 34). Für die Ergebnisse bezüglich der Trockensubstanzgehalte sind wie in den vorangegangenen Versuchen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abb. 35).

7.2.6 Versuch 2015_002

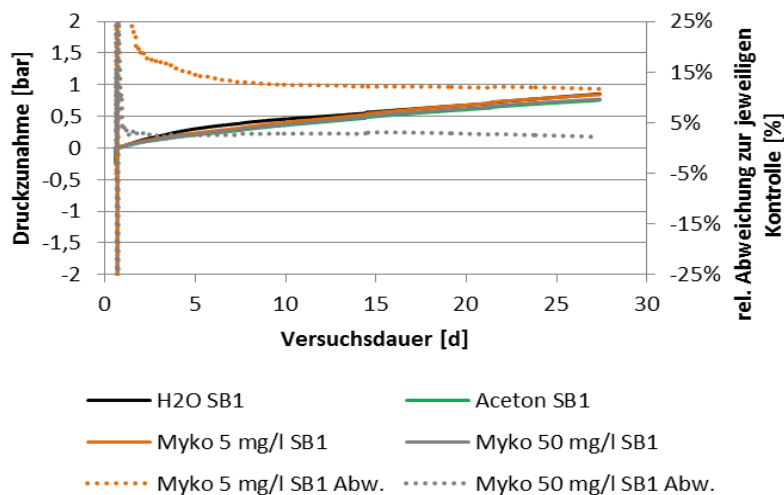


Abb. 36: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Mykophenolsäure (Myko) zu SB1 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2015_002

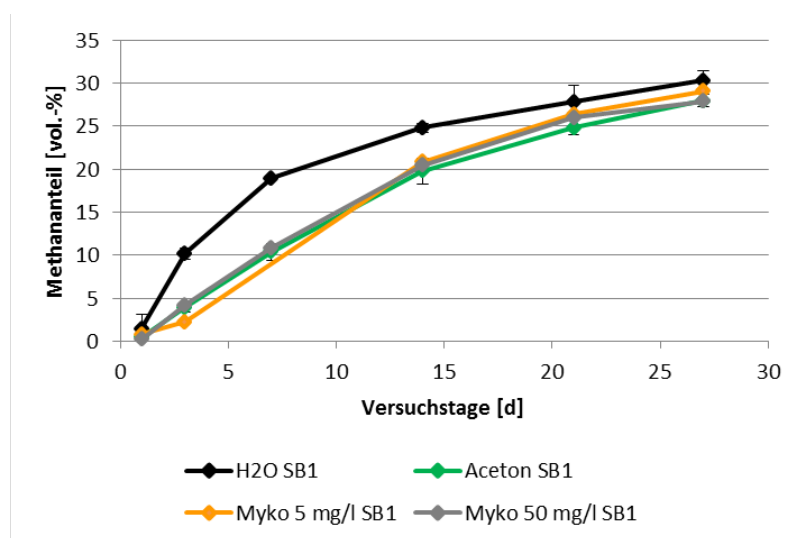


Abb. 37: Methangehalte nach Zugabe von Mykophenolsäure (Myko) zu SB1 im Versuchsverlauf 2015_002

In diesem Versuch wurde Mykophenolsäure in den bereits getesteten Konzentrationen 5 und 50 mg L⁻¹ als Zugabe zu den Biozönosen SB1 und BGM getestet. Abb. 36 stellt den Druckverlauf mit SB1 dar. Hier zeigte die Konzentration von 5 mg L⁻¹ Mykophenolsäure einen größeren Einfluss als die Zugabe in der Konzentration von 50 mg L⁻¹. Bei den Methangehalten zeigte die Kontrolle im Versuchsverlauf höhere Gehalte (Abb. 37).

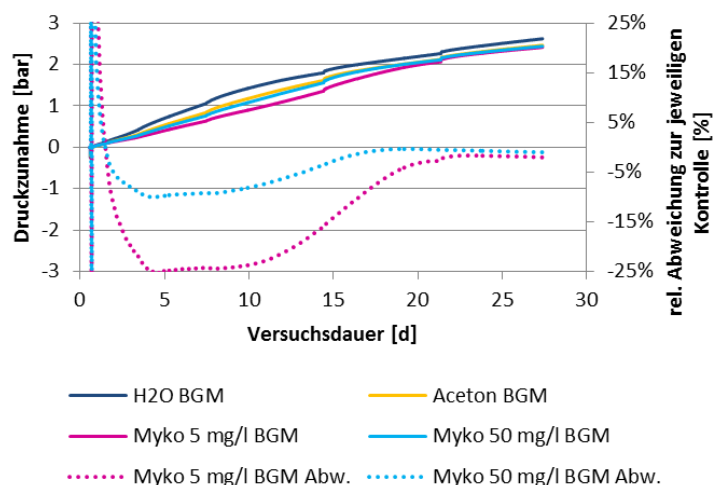


Abb. 38: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Mykophenolsäure zu BGM und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2015_002

Einen deutlichen Einfluss der Mykophenolsäure in der Konzentration von 5 mg L⁻¹ gegenüber der höheren Konzentration von 50 mg L⁻¹ zeigte sich bei der Zugabe zur Biozönose BGM (Abb. 38). Beide Konzentrationszugaben beeinflussten die Druckentwicklung zu Beginn des Versuches, die gemessenen Methangehalte (Abb. 39) zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Varianten.

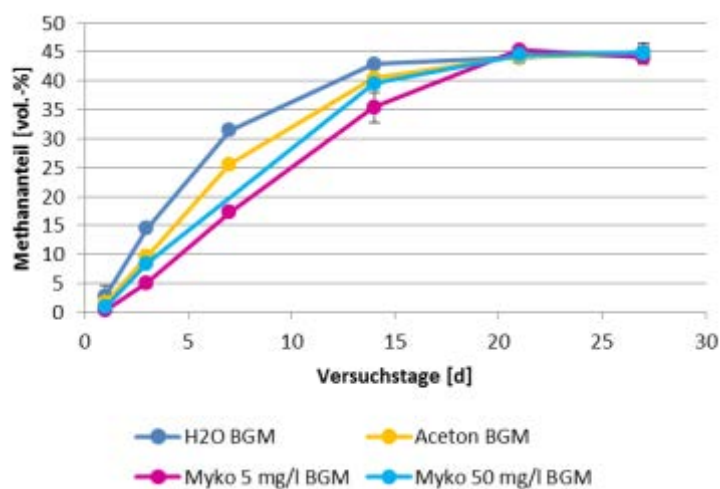


Abb. 39: Methangehalte nach Zugabe von Mykophenolsäure zu BGM im Versuchsverlauf 2015_002

Die nasschemischen Analysen zu Versuchsstart und Versuchsende lieferten für beide eingesetzte Inokula SB1 und BGM (Abb. 40 und Abb. 41) keine signifikanten Unterschiede. Lediglich bei den Analysen der Fettsäuren in SB1 (Abb. 40) ist zu erkennen, dass die vor Versuchsstart gemessenen Werte auch nach Versuchsende sowohl bei den getesteten Varianten auch in der Kontrolle festgestellt wurden.

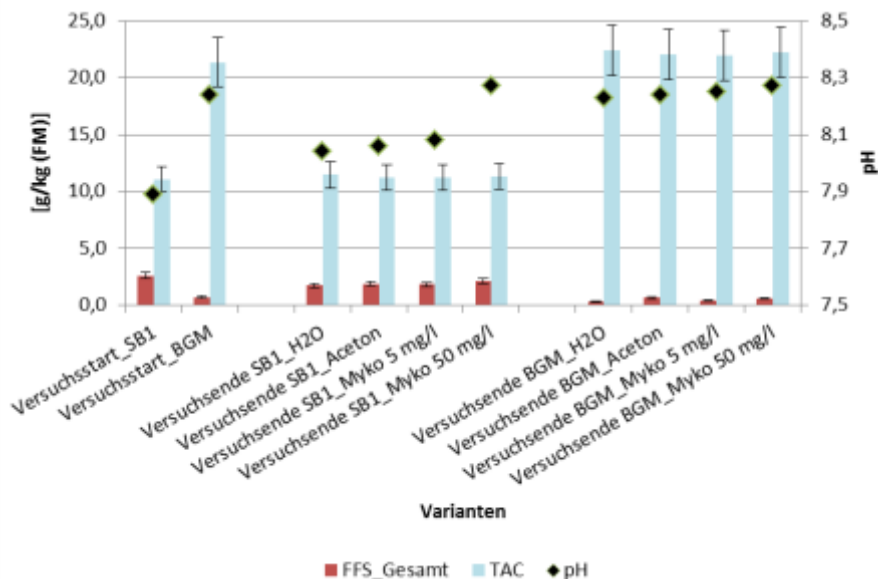


Abb. 40: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2015_002

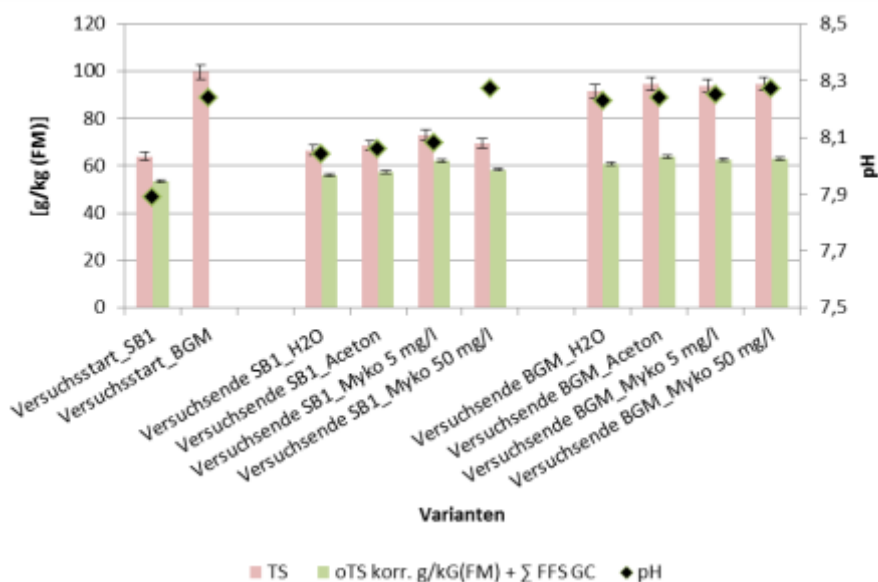


Abb. 41: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2015_002

7.2.7 Versuch 2015_003

Neben der wiederholten Zugabe von Mykophenolsäure als Reinsubstanz wurden für diesen Versuch die Schimmelpkulturen als Kulturextrakt aus Reis zur Biozönose SB2 zugegeben. Hierdurch sollte der in vorangegangenen Versuchen beobachtete Fütterungseffekt durch das Reiskorn vermieden werden.

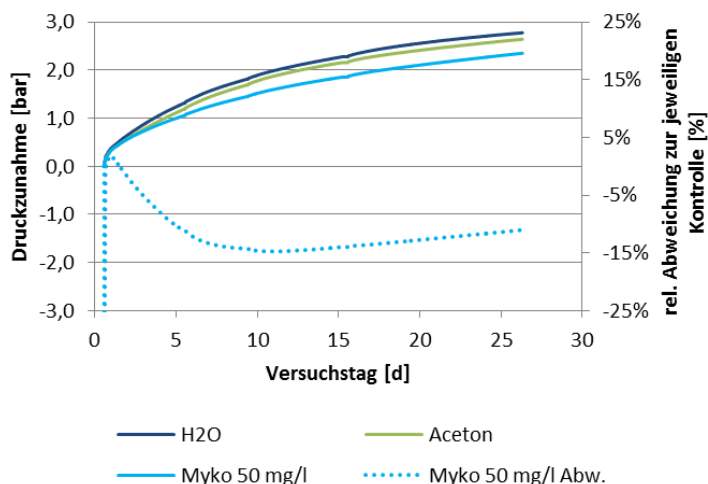


Abb. 42: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Mykophenolsäure zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2015_003

Das Ergebnis der Druckverläufe zeigt wiederholt eine Wirkung von Mykophenolsäure in der Konzentration von 50 mg L^{-1} auf die Biogasproduktion (Abb. 42). Bei den gemessenen Methangehalten zeigte sich wiederholt kein signifikanter Unterschied zwischen der Variante und den Kontrollen (Abb. 43).

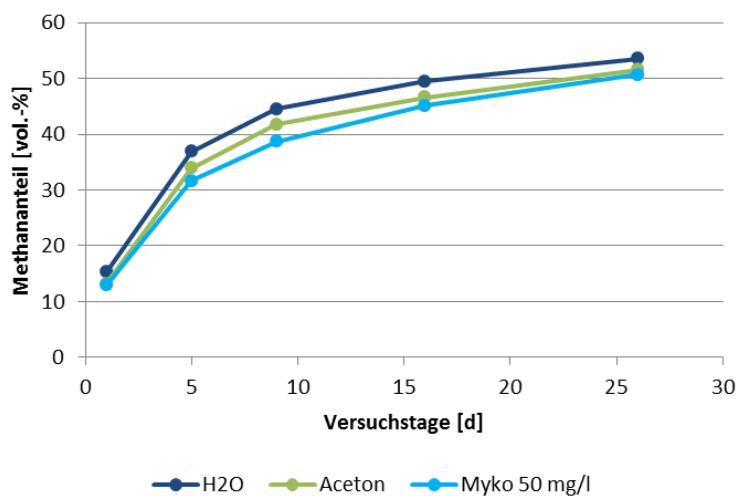


Abb. 43: Methangehalte im Versuchsverlauf 2015_003 nach Zugabe von Mykophenolsäure zu SB2

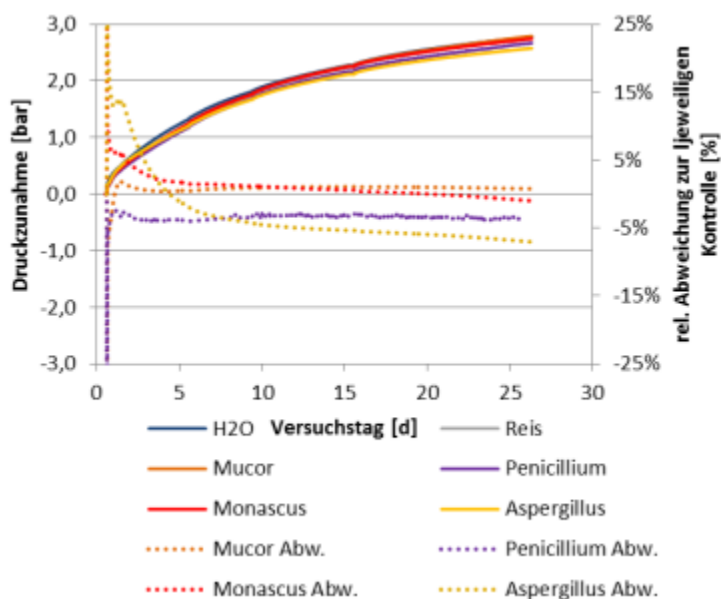


Abb. 44: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Kulturextrakten zu SB2 und Verlauf ihrer Abweichung zur Kontrolle im Versuch 2015_003

Die Zugabe der Kulturextrakte aus *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* und *Monascus* zeigten weder bei der Druckentwicklung (Abb. 44) noch bei den gemessenen Methangehalten (Abb. 45) einen signifikanten Einfluss auf den Biogasprozess.

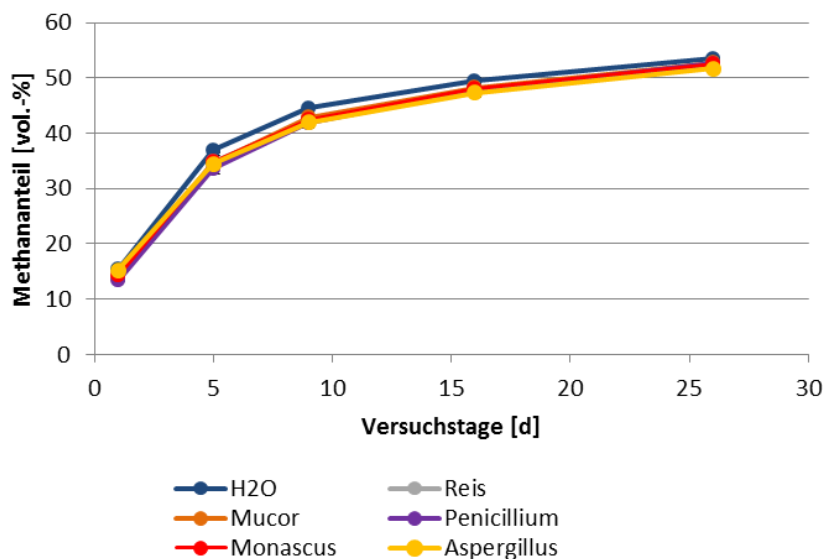


Abb. 45: Methangehalte nach Zugabe von Kulturextrakten zu SB2 im Versuchsverlauf 2015_003

Auch im letzten Versuch ergaben die nasschemischen Analysen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 46 und Abb. 47). Die Werte der Pufferkapazität zu Versuchsende wurden nicht gemessen.

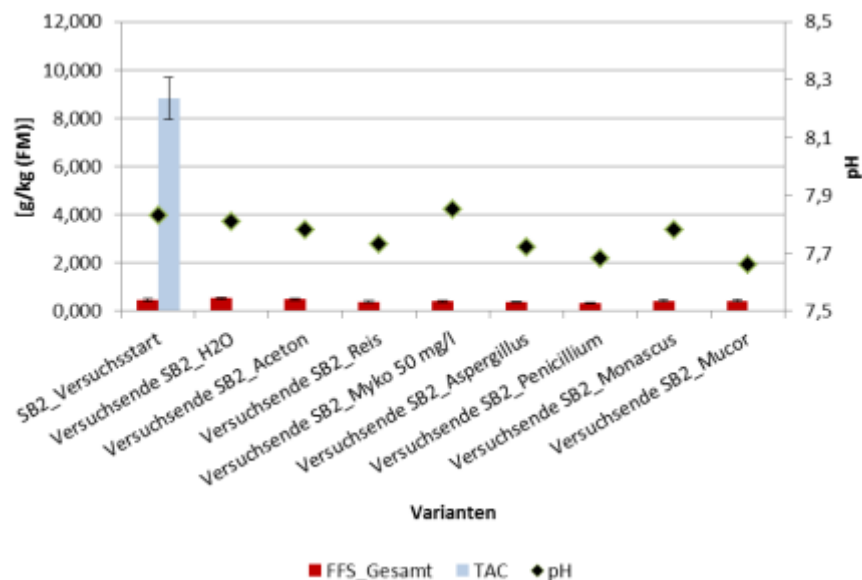


Abb. 46: Pufferkapazität und Fettsäuren gesamt zu Beginn und Ende im Versuch 2015_003

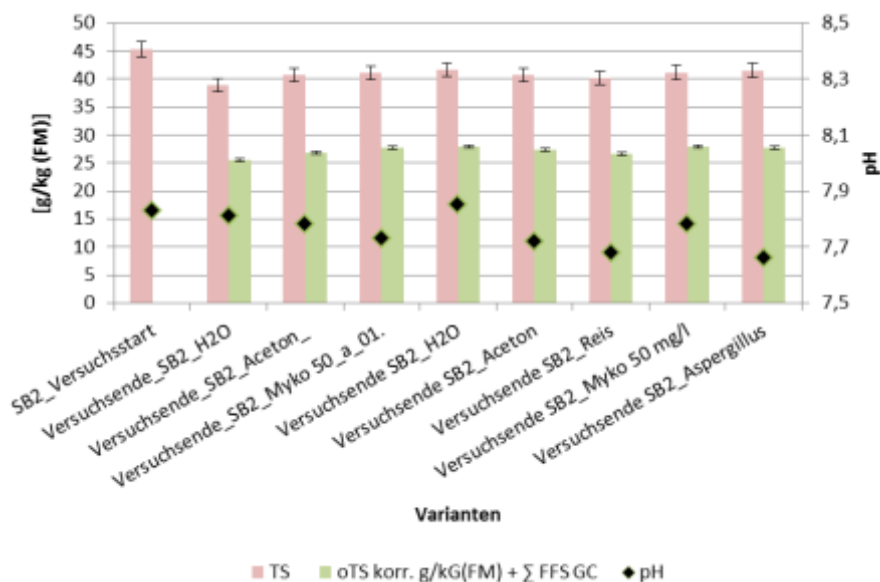


Abb. 47: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt zu Beginn und Ende im Versuch 2015_003

7.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der ATS-Tests mit Mykophenolsäure im Mini-Batch

Die Übersicht in Abb. 48 zeigt die unterschiedliche Druckbildung der eingesetzten Inokula, zusammengestellt nach der getesteten Konzentrationen der Mykophenolsäure. In der Konzentration von 50 mg L^{-1} konnte wiederholt ein inhibierender Effekt auf die Biogasproduktion des Inokulums SB2 gezeigt werden. Die dabei gemessenen Methangehalte in den einzelnen Versuchen zeigten keine Unterschiede zu den Kontrollen.

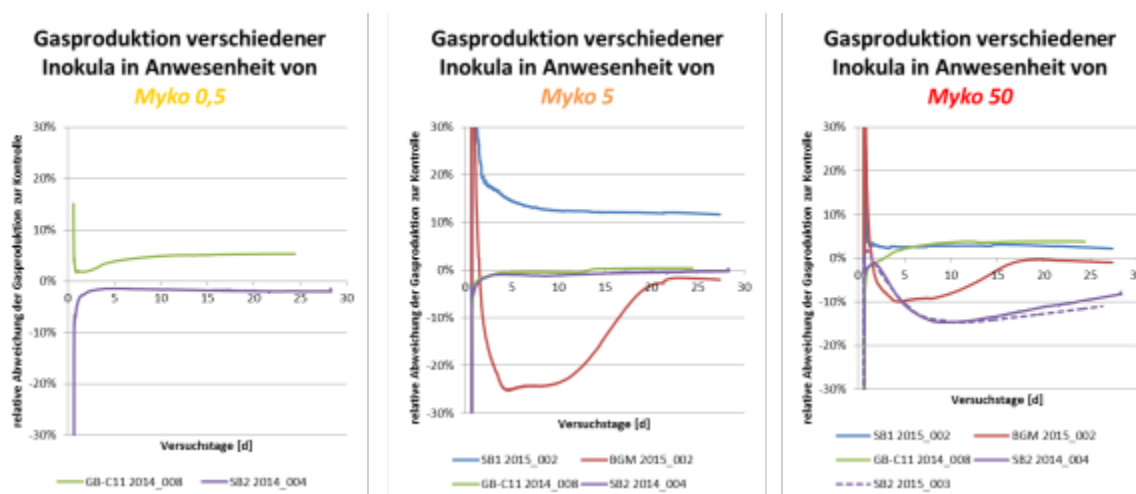


Abb. 48: Eingesetzte Konzentrationen von Mykophenolsäure und Wirkung auf die Biogasproduktion der verwendeten Inokula in den Mini Batch-ATS-Tests

7.3 Einfluss verpilzter Silagen auf die Gasbildung in semikontinuierlichen Durchflussversuchen

7.3.1 Versuch 2015_001

Zur Feststellung langfristiger Effekte auf den Biogasprozess konnte der erste Versuchsgang innerhalb von 176 Versuchstagen durchgeführt werden. Davon wurden während der Anfahrphase ab VT42 alle Fermenter über 21 Versuchstage mit unbelasteter Maissilage und einer Raumbelastung von $0,5 \text{ kg(oTS)}_m^3 \cdot \text{d}$ gefüttert, bevor die Fütterung mit verpilztem Substrat bei gleicher Raumbelastung begonnen wurde. Ab VT64 konnte dann mit den Belastungstests begonnen werden. Die dabei berechnete Raumbelastung wich durch die im Nachgang festgestellten Masseverluste durch die artifizielle Verschimmelung ab, so dass die tatsächliche Raumbelastung in den Varianten von der Kontrolle verschieden war. In Abb. 49 sind die festgestellten Masseverluste von ca. 10% durch den Verschimmelungsprozess ersichtlich.

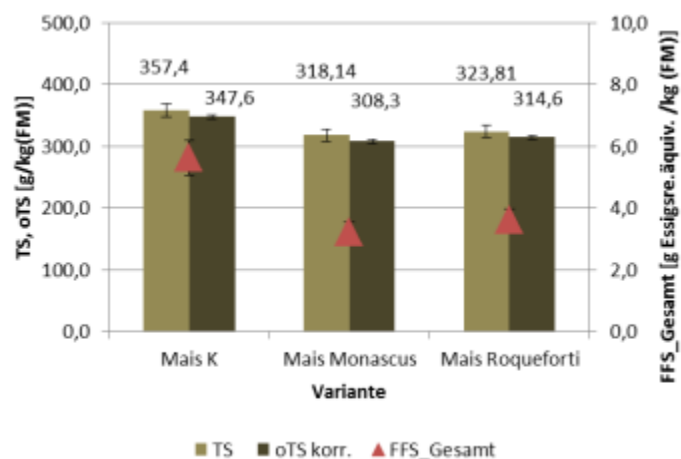


Abb. 49: Masseverlust durch den artifiziellen Verschimmelungsprozess im Versuch 2015_001

Die schematische Darstellung des Versuchsganges in Abb. 50 zeigt die einzelnen Zeitpunkte der Raumbelastungsänderungen bis zu Versuchsende. Die in Klammer gesetzten Werte im Verlauf sind die tatsächlich gefütterten Raumbelastungen in beiden Varianten. Abb. 51 zeigt die unterschiedlichen zugeführten Mengen im zeitlichen Ablauf.

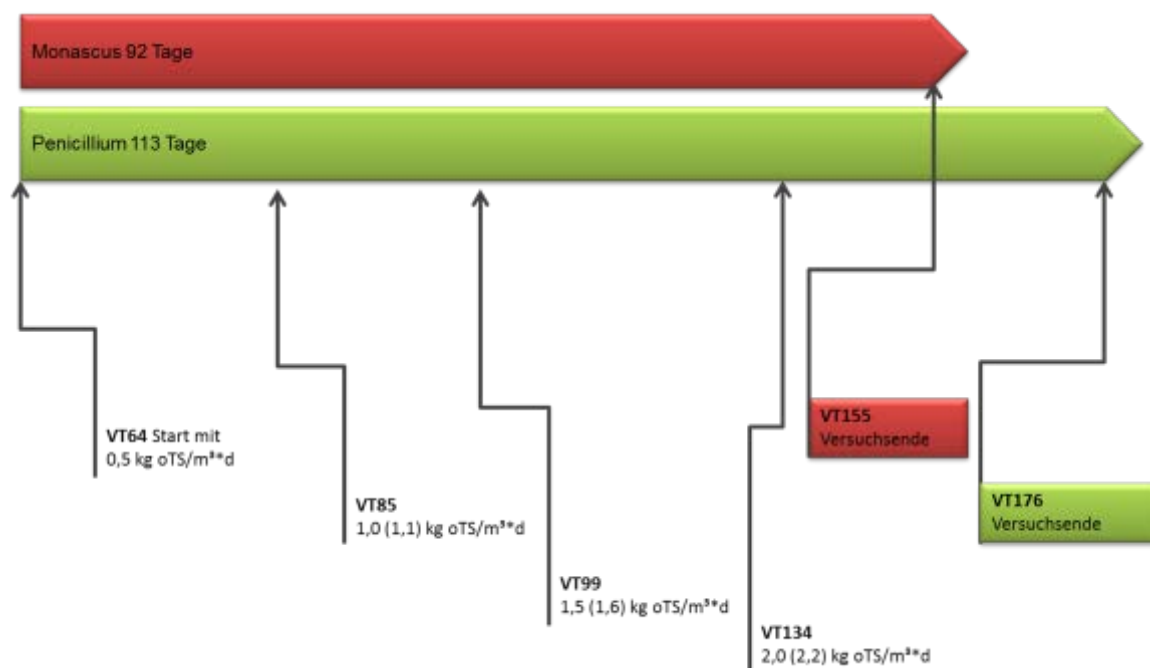


Abb. 50: Übersicht der zeitlichen Abfolge der Raumbelastungsänderungen im Versuch 2015_001

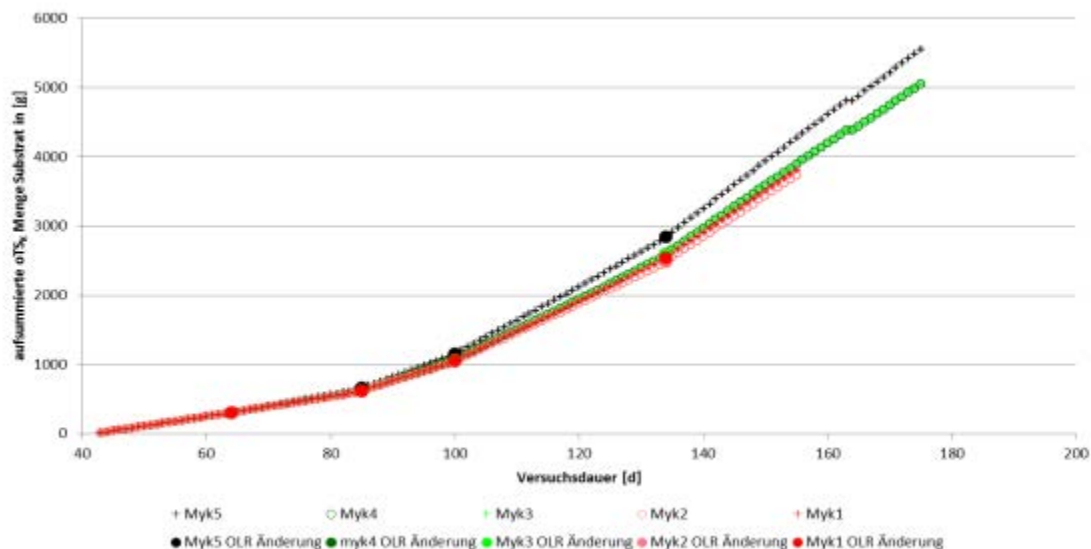


Abb. 51: Tatsächlich zugeführte organische Trockensubstanz über die gesamte Versuchszeit im Versuch 2015_001

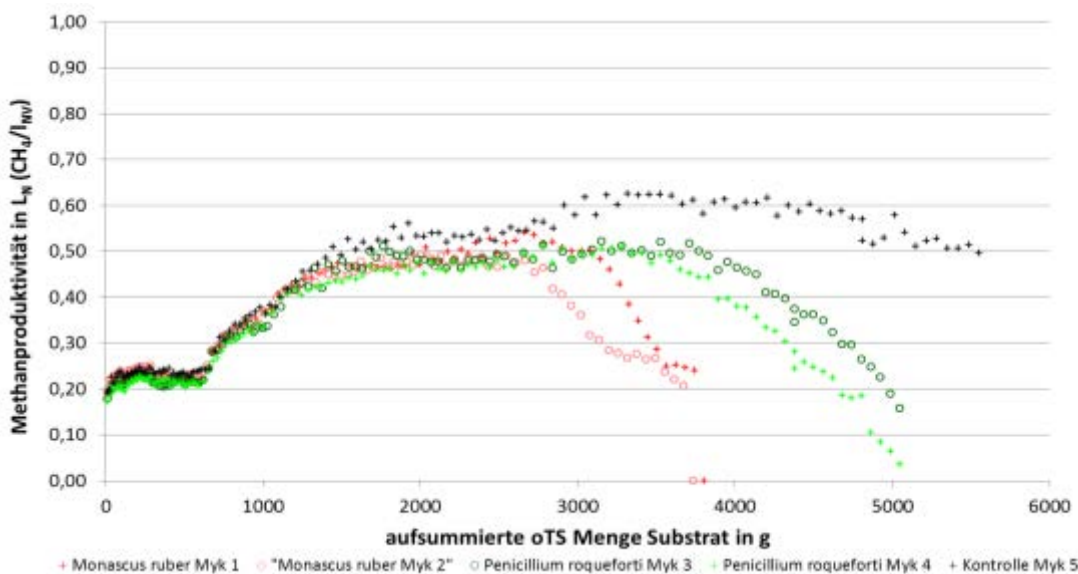


Abb. 52: Entwicklung der Methanproduktivität der getesteten Varianten *Monascus ruber* und *Penicillium roquefortii* zur unbehandelten Kontrolle im Versuchsverlauf 2015_001

Wegen der Korrektur der (tatsächlich) gefütterten organischen Trockenmasse erfolgte der Vergleich des Versuchsverlaufs anhand der Methanproduktivität in Abhängigkeit der über die Zeit zugeführten organischen Trockensubstanz (Abb. 52). Es ist deutlich zu erkennen, dass bei der Variante mit *Monascus ruber* kontaminiertes Silage ab VT134 und einer zugeführten organischen Trockensubstanz von 2.500 g die Methanproduktivität zu sinken beginnt. Im weiteren Verlauf sank der Methangehalt ab VT143 unter 45 Vol. % in beiden Wiederholungen (Abb. 53). Der Versuch wurde nach ca. 2 Wochen am VT155 und einer absolut zugeführten organischen Trockensubstanz von 3.300 g beendet.

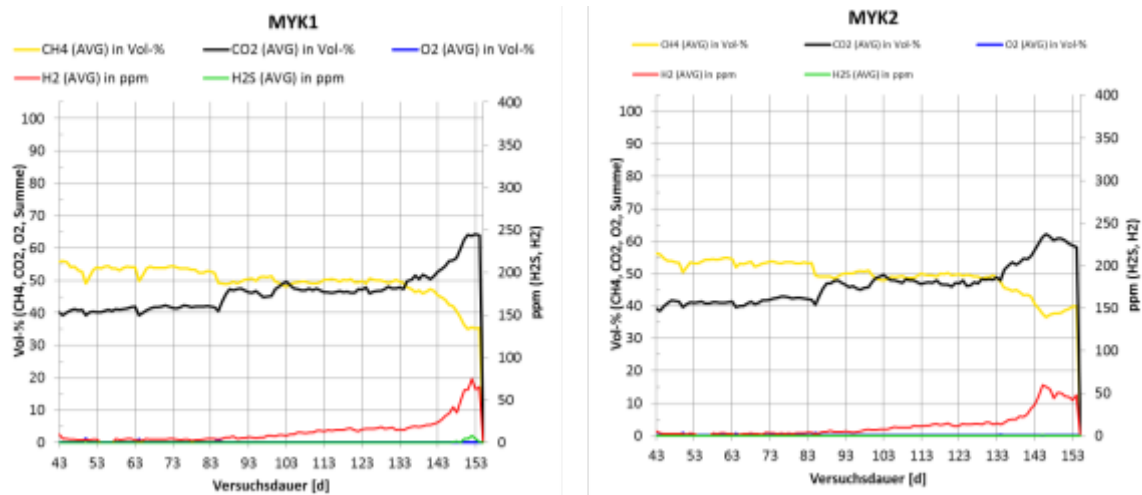


Abb. 53: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Varianten *Monascus ruber* MYK1 und MYK2 im Versuch 2015_001

Bei der Variante mit *Penicillium roquefortii* kontaminierter Silage konnte ein stabiler Betrieb bis etwa 3.800 g zugeführter Trockensubstanz aufrechterhalten werden. Ab diesem Zeitpunkt bei VT154 begann die Methanproduktivität zu sinken. Ab VT168 lag der Methangehalt < 45 Vol. % (Abb. 54) und der Versuch wurde nach einer absolut zugeführten organischen Trockenmasse von 5.000 g am VT176 beendet.

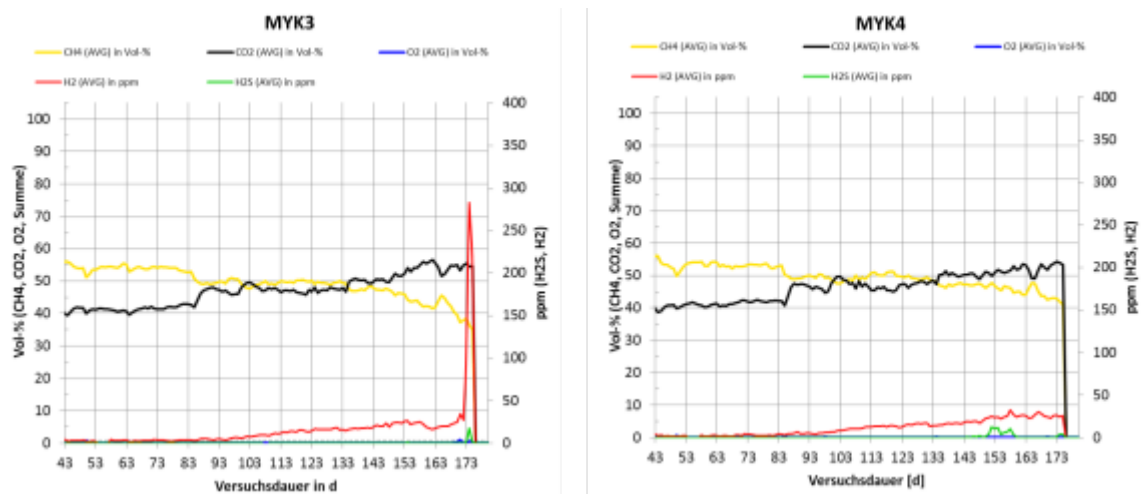


Abb. 54: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Varianten *Penicillium roquefortii* MYK3 und MYK4 im Versuch 2015_001

Die Kontrolle MYK 5 mit unbehandelter Maissilage konnte bis zu Versuchsende am VT176 stabil betrieben werden trotz höherer absolut eingebrachter organischer Trockensubstanz von 5.600 g. Auch der Methangehalt (Abb. 55) blieb bis zu Versuchsende oberhalb von 45 Vol. %. Die ersichtliche Schwankung bei VT163 wurde durch eine personell bedingte Aussetzung der Fütterung verursacht.

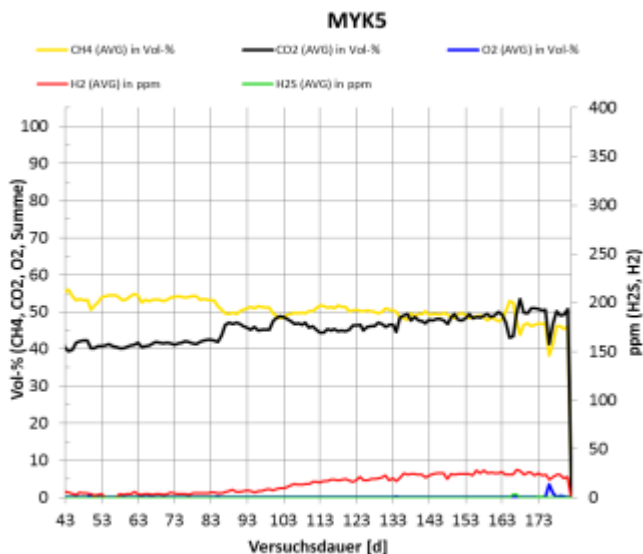


Abb. 55: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Kontrolle MYK5 im Versuch 2015_001

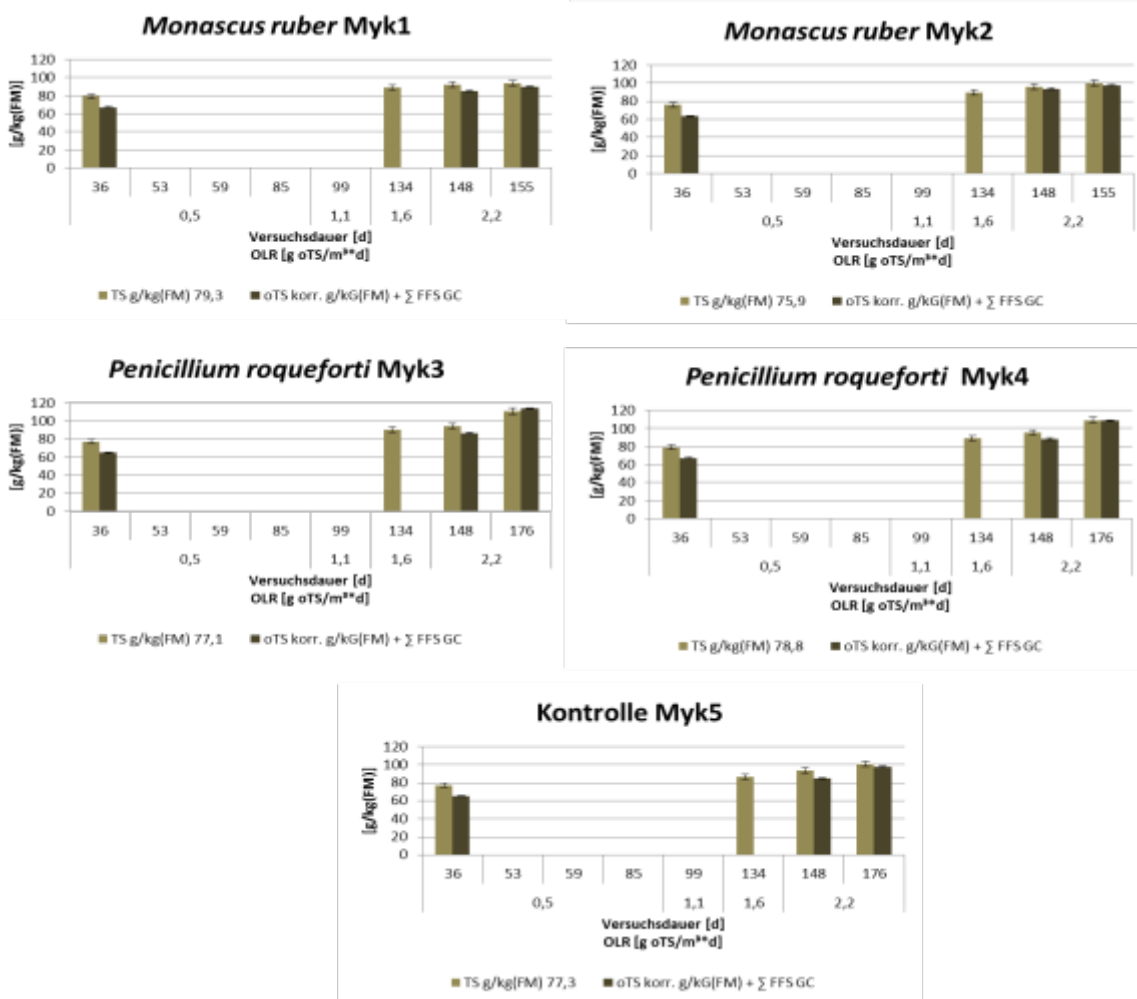


Abb. 56: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt über den gesamten Versuchsverlauf 2015_001

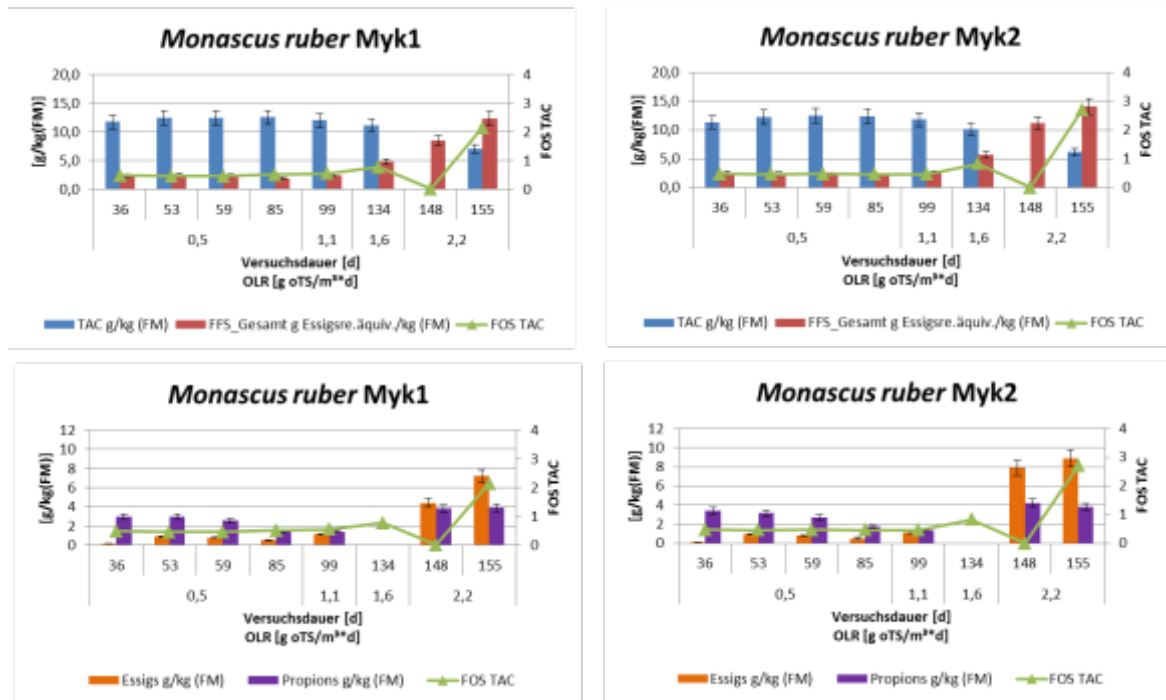


Abb. 57: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Wiederholungen *Monascus ruber* im Versuch 2015_001

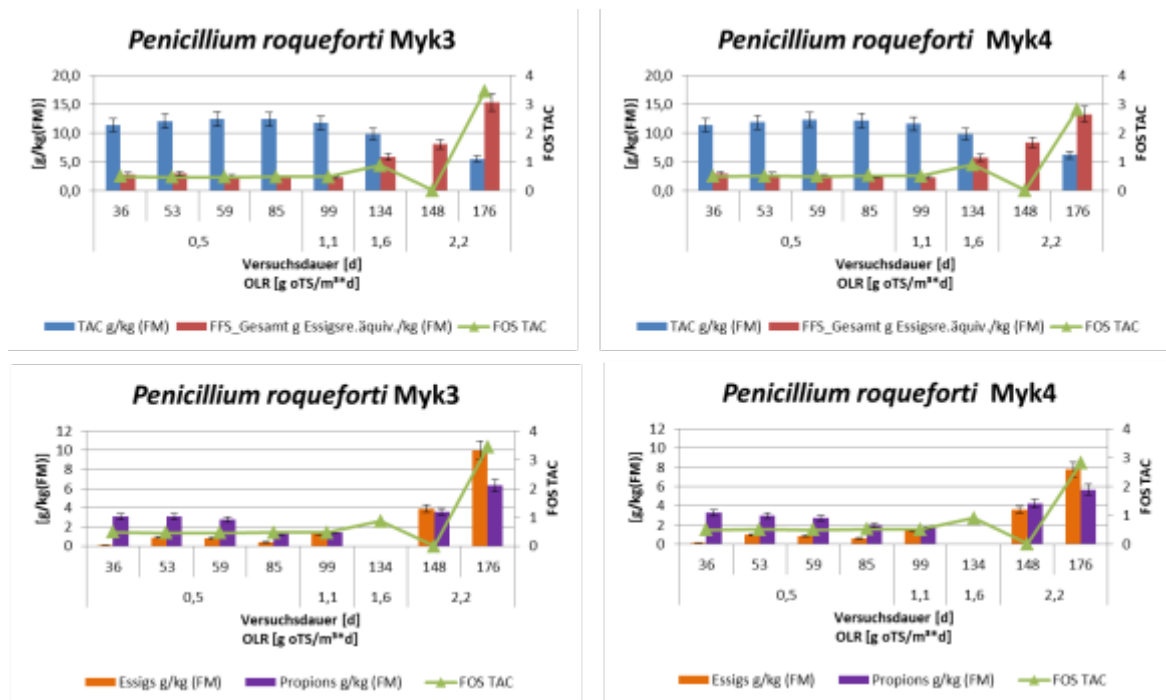


Abb. 58: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Wiederholungen *Penicillium roquefortii* im Versuch 2015_001

Die klassischen laborchemischen Analyseparameter, dargestellt in den Abb. 56, Abb. 57, Abb. 58 und Abb. 59 zeigen im Vergleich zur Kontrolle keine Auffälligkeiten. Lediglich zu Versuchsende zeigt sich eine massive Steigerung der Essigsäuregehalte auf 6 g/kg (FM) bei Myk 1 und Myk 2 und 8 g/kg (FM) bei Myk 3 und Myk 4, sowie Propionsäuregehalte zwischen 4 g/kg FM bei Myk 1 und Myk 2 und 6 g/kg (FM) bei Myk 3 und Myk 4. Die Kontrolle lag mit 4 g/kg (FM) für Essigsäure und Propionsäure leicht darunter. Auf Grund der sehr geringen Frischmassezugabe, vor allem zu Beginn der Versuche, musste verfahrenstechnisch bedingt an den einzelnen Probenahmezeitpunkte weniger Material herausgenommen werden, so dass für diese Zeitpunkte die Menge für eine Analyse der TS und oTS Gehalte nicht ausreichte.

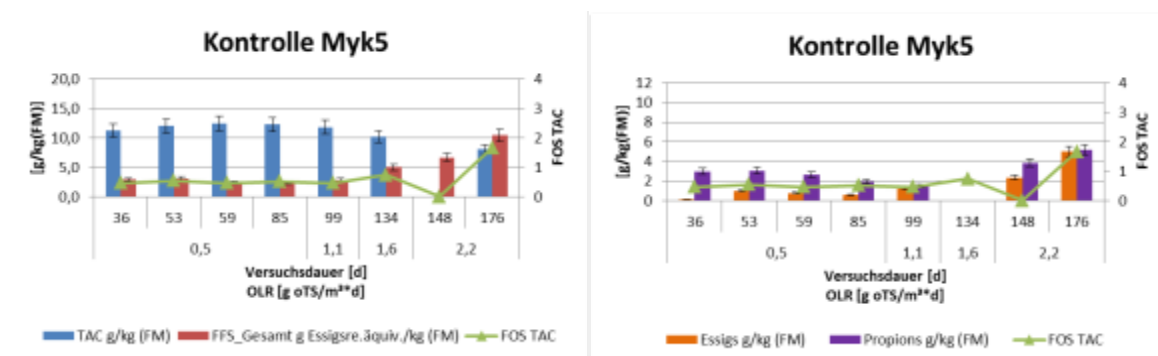


Abb. 59: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Kontrolle im Versuch 2015_001

Die Ergebnisse der Spurenelementanalysen sind in tabellarischer Form im Anhang in Tab. 31 einsehbar. Hieraus wird deutlich, dass ein Mangel insbesondere an Kobalt die in allen Fermentern unterlagerte Prozessversauerung induzierte. Für die etwas verschiedene Entwicklung der Varianten mit Schimmelpilzen und der Kontrolle lieferten die Ergebnisse der Spurenelementanalysen keine Erklärung.

7.3.2 Versuch 2015_005

Der zweite Durchflussversuch konnte innerhalb von 236 Versuchstagen durchgeführt werden. Durch die technischen und biologischen Schwierigkeiten (6.3) konnten erst ab VT96 alle Fermenter über 21 Versuchstage mit unbelasteter Maissilage und einer Raumbelastung von 1,0 kg oTS/m³*d gefüttert werden, bevor die Fütterung mit verpilztem Substrat bei gleicher Raumbelastung begonnen wurde. Ab VT118 konnte dann mit den Belastungstests begonnen werden.

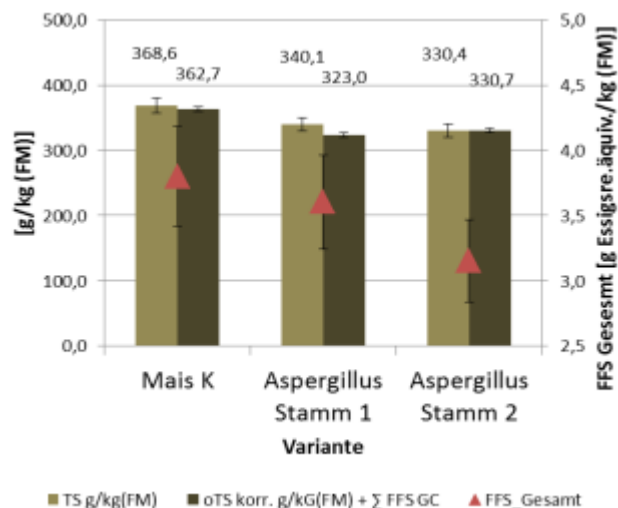


Abb. 60: Masseverlust durch den artifiziellen Verschimmelungsprozess im Versuch 2015_005

Ebenso wie in den ersten Durchflussversuchen wich die berechnete Raumbelastung, bedingt durch den Masseverlust während der artifiziellen Verschimmelung, von der tatsächlichen ab. In Abb. 60 sind die festgestellten Masseverluste von ca. 10% durch den Verschimmelungsprozess ersichtlich.

Dementsprechend wich die tatsächliche Raumbelastung gegenüber der berechneten ab. Abb. 61 zeigt schematisch die Zeitpunkte der Raumbelastungsänderung und die tatsächliche Raumbelastungsstufe der Varianten und ihrer Kontrolle.

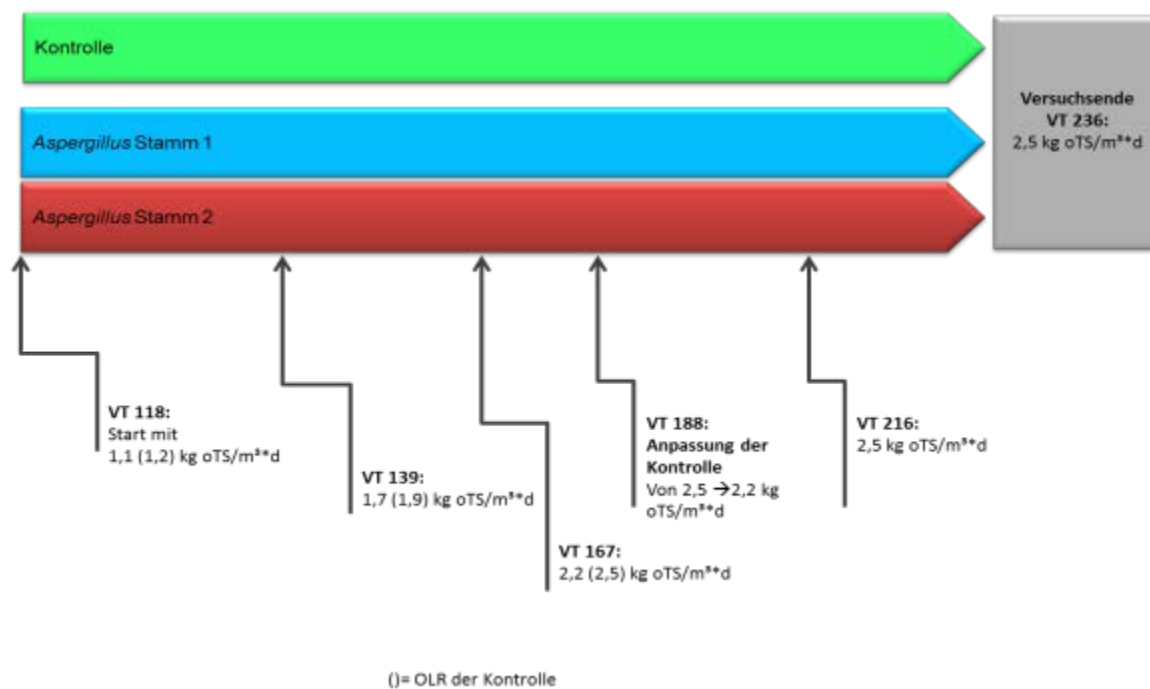


Abb. 61: Übersicht der zeitlichen Abfolge der Raumbelastungsänderungen im Versuch 2015_005

Schließlich wich die Kontrolle mit fast 0,5 kg oTS/m³·d von den Varianten ab, so dass entschieden wurde am VT188 die Raumbelastung der Kontrolle an die Raumbelastungsstufe der Varianten anzupassen. Abb. 62 verdeutlicht noch einmal die unterschiedlich zugeführte organische Trockensubstanz im zeitlichen Verlauf.

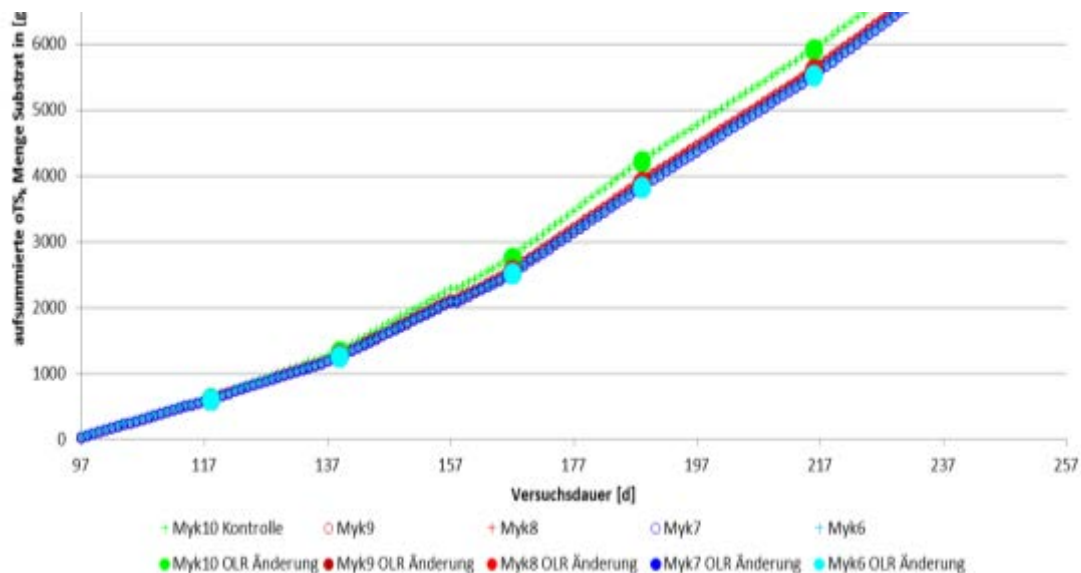


Abb. 62: Tatsächlich zugeführte organische Trockensubstanz über die gesamte Versuchszeit im Versuch 2015_005

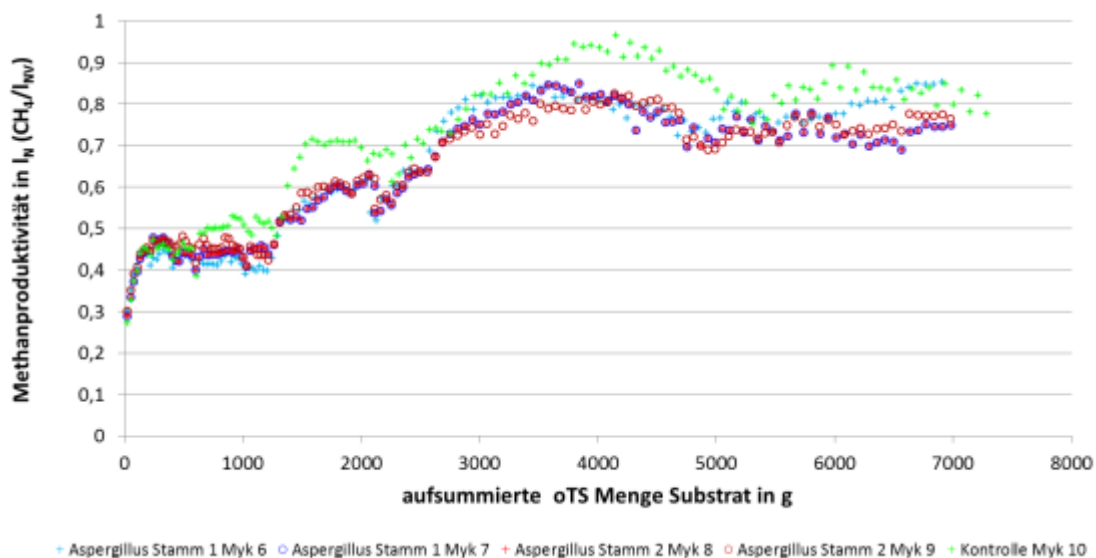


Abb. 63: Entwicklung der Methanproduktivität der getesteten Varianten Aspergillus Stamm 1 und Aspergillus Stamm 2 zur unbehandelten Kontrolle im Versuchsverlauf im Versuch 2015_005

Der Vergleich des Versuchsverlaufs der getesteten Varianten erfolgte auch bei den zweiten Durchflussversuchen anhand der Methanproduktivität in Abhängigkeit der über die Zeit zugeführten organischen Trockensubstanz (Abb. 63). Es ist zu erkennen, dass die Varianten mit *Aspergillus fumigatus* Stamm 1 und *Aspergillus fumigatus* Stamm 2 kontaminierten Silagen, Myk 6 und Myk 7, bereits ab einer zugeführten organischen Trockensubstanz von 600 g bei VT117 gegenüber der Kontrolle Myk 10 niedrigere Methanproduktivitäten aufweisen. Ab VT182 und einer zugeführten organischen Trockensubstanz von 3.500 g stagniert die Methanproduktivität bei 0,8 l_N CH₄ /l_{NV} bei beiden Varianten. Die Variante Myk 7 und beide Wiederholungen von *Aspergillus fumigatus* Stamm 2, Myk 8 und Myk 9 stabilisieren sich bis zu Versuchsende bei einer Methanproduktivität von 0,7 l_N CH₄ /l_{NV}. Bei Myk 6 steigt die Methanproduktivität wieder ab einer zugeführten organischen Trockensubstanz von 6.000 g bei VT223 bis zu Versuchsende. Die Kontrolle zeigte ab VT188 und einer zugeführten organischen Trockensubstanz von 4.200 g ebenfalls eine rückläufige Methanproduktivität auf, welche vor allem der Anpassung der Raumbelastungsstufe an die Varianten zu zuordnen ist.

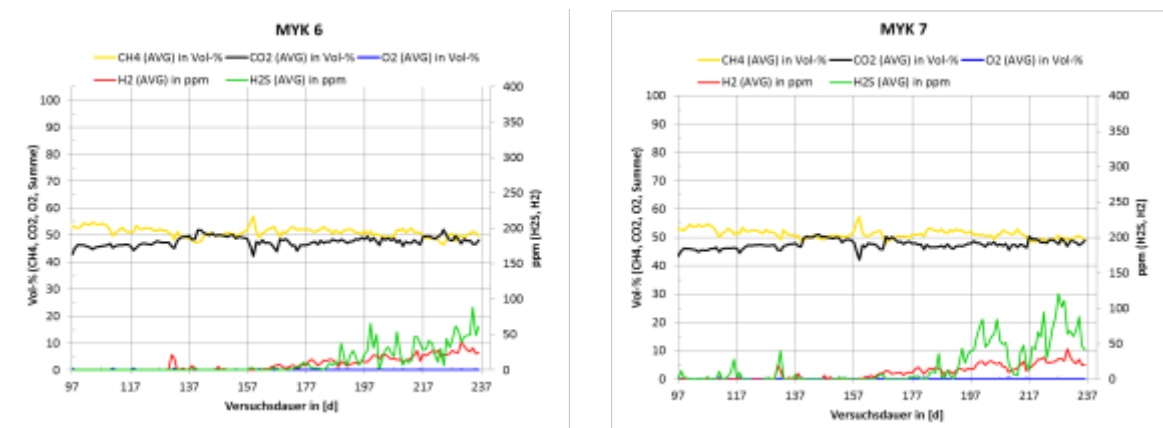


Abb. 64: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Varianten *Aspergillus fumigatus* Stamm 1 MYK6 und MYK7 im Versuch 2015_005

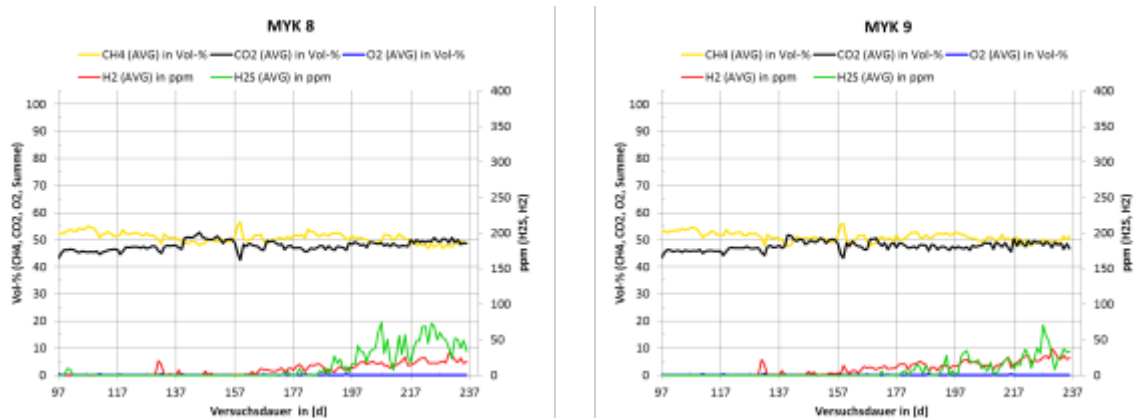


Abb. 65: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Varianten *Aspergillus fumigatus* Stamm 2 MYK8 und MYK9 im Versuch 2015_005

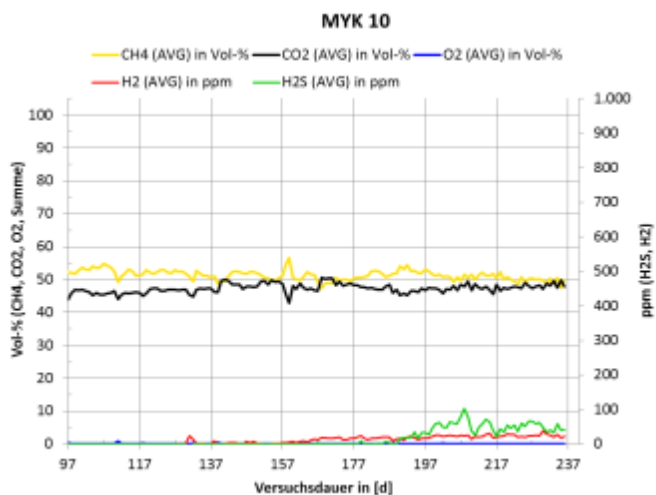


Abb. 66: Entwicklung der Gaszusammensetzung im Versuchsverlauf der Kontrolle MYK10 im Versuch 2015_005

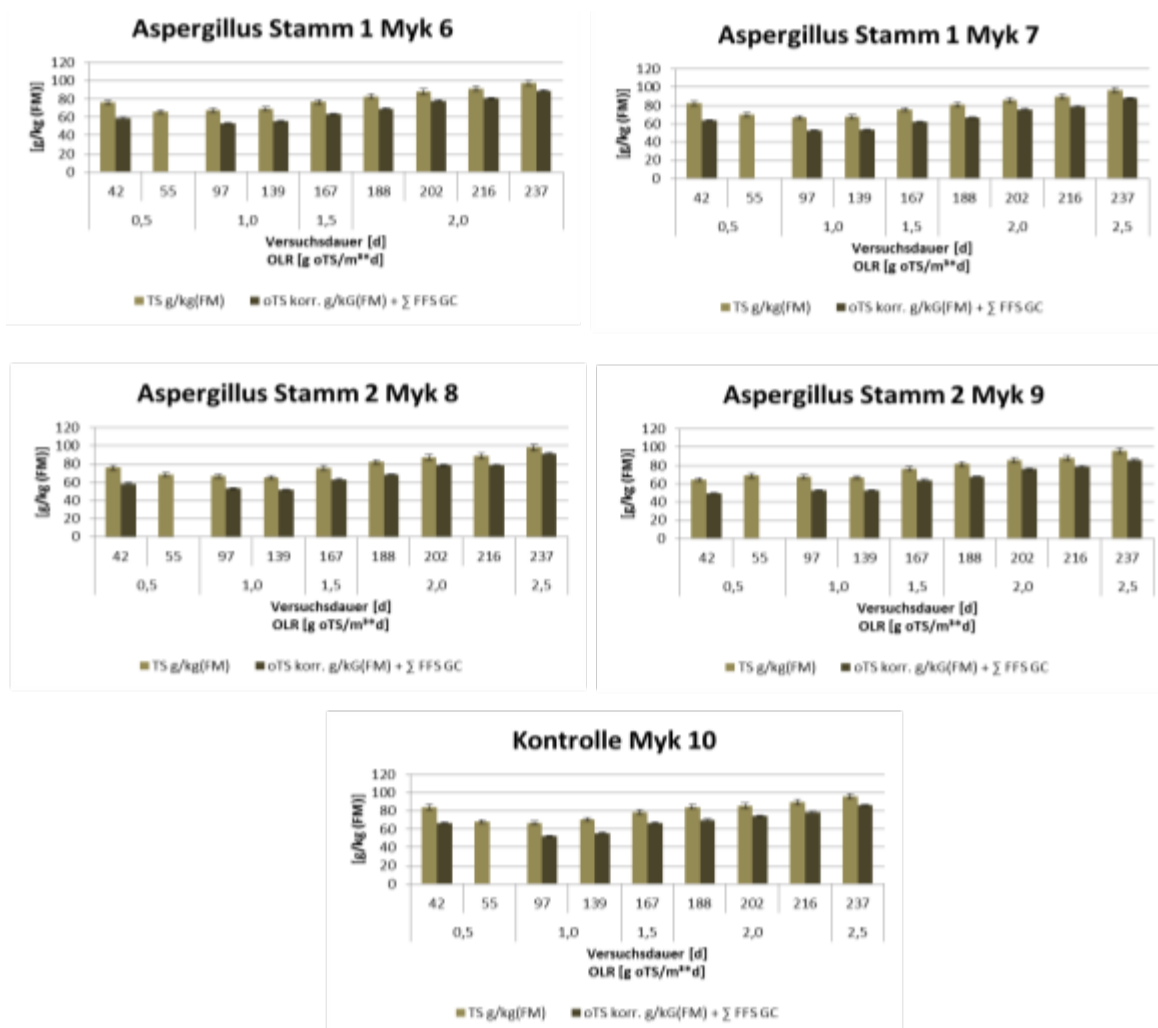


Abb. 67: Trockensubstanzgehalt und organischer Trockensubstanzgehalt über den gesamten Versuchsverlauf 2015_005

Hinsichtlich der Gaszusammensetzung sind vor allem bei den getesteten Varianten in Abb. 64 und Abb. 65 bei den Zeitpunkten der Raumbelastungsänderungen Schwankungen im Methangehalt ersichtlich. Nach VT139 kam es bei Myk 6 und Myk 8 zu einer kurzzeitigen Umkehr des CH₄ zu CO₂ Verhältnisses über mehrere Tage, eine eindeutige Prozessstörung konnte allerdings nicht beobachtet werden. Ab VT218 kehrte sich das CH₄ zu CO₂ Verhältnis bis zu Versuchsende bei Myk 8 ebenfalls ohne eindeutige Prozessstörung um.

Die Kontrolle Myk 10 (Abb. 66) zeigte eine tendenziell ähnliche Gaszusammensetzung wie die Varianten auf, allerdings kehrte sich das CH₄ zu CO₂ Verhältnis im gesamten Versuchsverlauf nicht massiv um. Zusätzlich führte die Rückstufung der organischen Belastung ab VT188 zunächst zu höheren Methangehalten.

Der Versuch musste schließlich bei VT236 ohne Erreichen des Abbruchkriteriums beendet werden, da für einen weiteren Versuchsfortgang keine kontaminierten Silagen mehr zur Verfügung standen.

Die laborchemischen Analysen belegten in allen Fermentern eine zunehmende Prozessversauerung als Ursache für die Verminderung der Methanproduktivität über den Versuchsverlauf. Durch die höhere Raumbelastungsstufe von 1,0 kg oTS/m³*d konnte ohne verfahrenstechnische Probleme eine fast lückenlose Analyse der TS und oTS Gehalte durchgeführt werden. Abb. 67 zeigt wie an VT97 mit zunehmender Belastung der Trockensubstanzanteil gleichermaßen in allen Fermentern anstieg. Ebenfalls ab VT97 war eine leichte aber stetige Abnahme der Pufferkapazität bei gleichzeitigem Anstieg der Fettsäuregehalte in allen Fermentern zu beobachten (Abb. 68, Abb. 69 und Abb. 70). Zu Versuchende wurden in den Varianten bis zu 3 g/kg (FM) Essigsäuregehalte und 2 g/kg (FM) Propionsäuregehalte gemessen. Die Gehalte der Kontrolle lagen für Essigsäure bei 3 g/kg (FM) und für Propionsäure bei 1-2 g/kg (FM). Der FOS/TAC-Wert erreichte in allen Fermentern Werte um etwa 1.

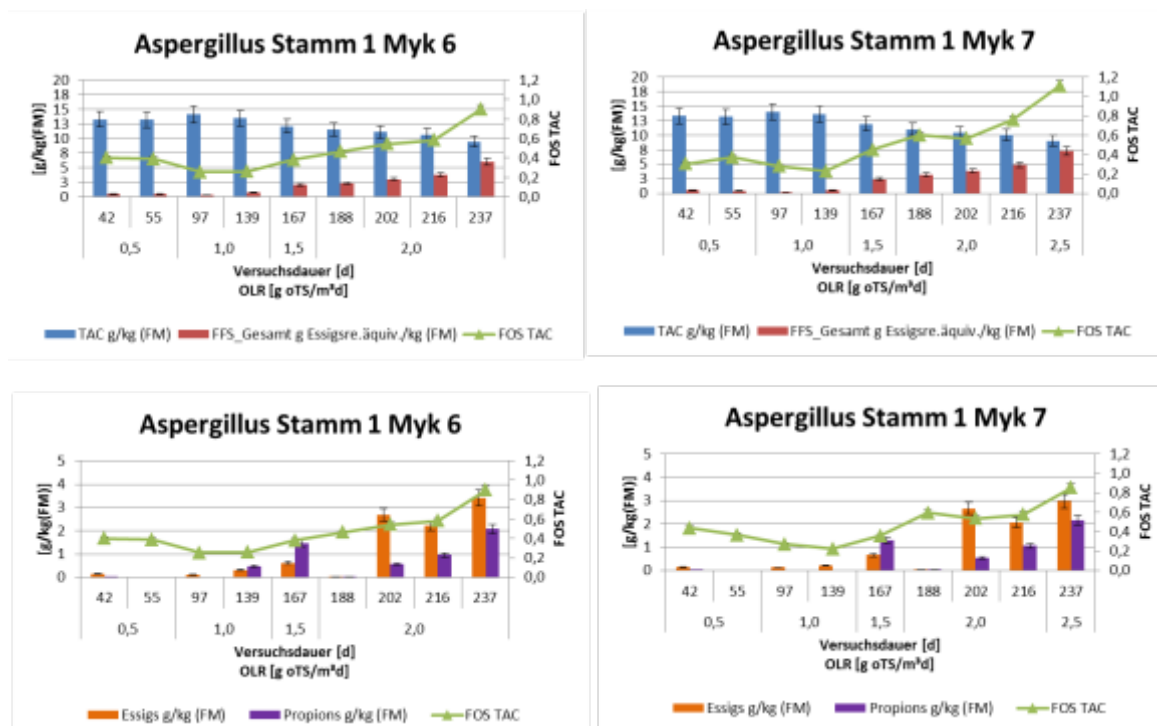


Abb. 68: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Wiederholungen *Aspergillus fumigatus* Stamm 1 im Versuch 2015_005

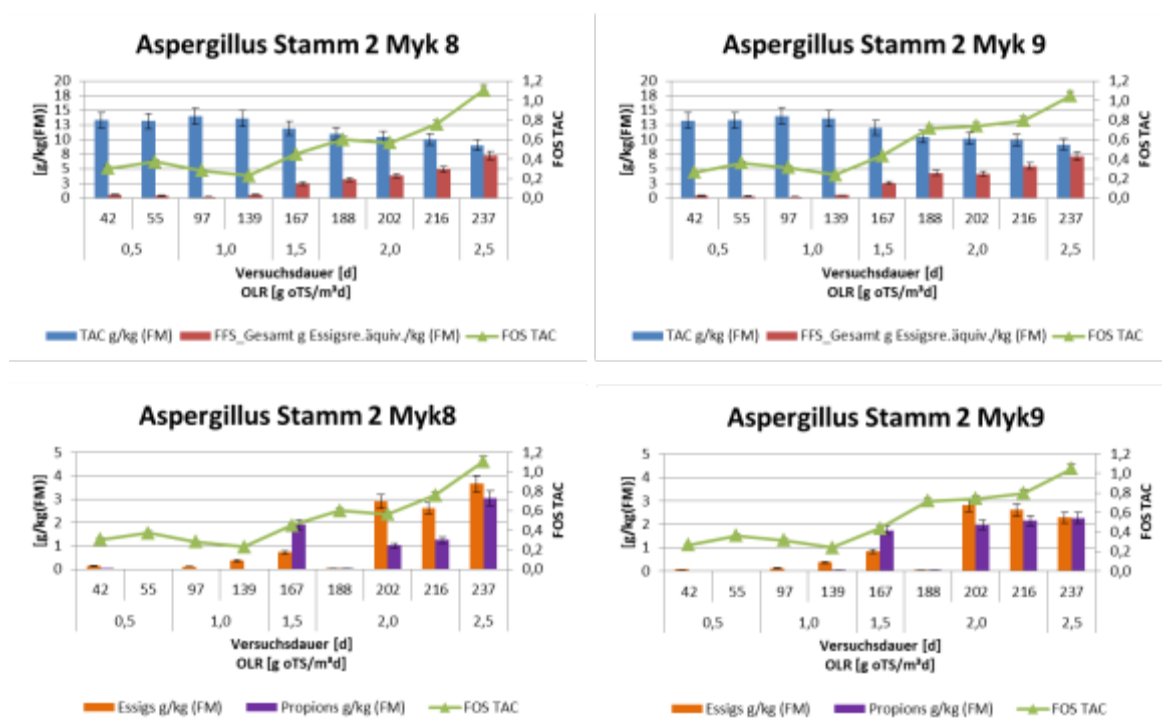


Abb. 69: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Wiederholungen *Aspergillus fumigatus* Stamm 2 im Versuch 2015_005

Die Ergebnisse der Spurenelementanalysen sind in tabellarischer Form im Anhang in Tab. 32 einsehbar. Sie zeigen, dass ein Mangel insbesondere an Kobalt die in allen Fermentern unterlagerte Prozessversauerung induzierte. Für die etwas verschiedene Entwicklung der Varianten mit den *A. fumigatus* Stämmen und der Kontrolle lieferten die Ergebnisse der Spurenelementanalysen keine Erklärung.

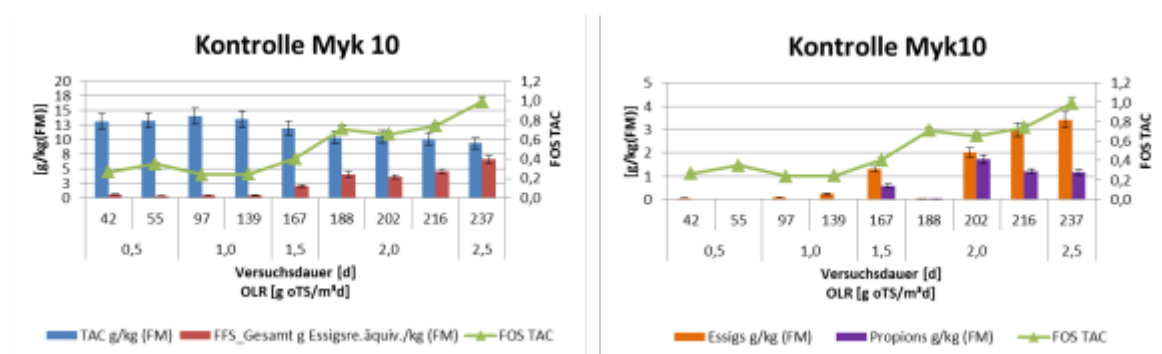


Abb. 70: Pufferkapazität und Fettsäuremuster der Kontrolle im Versuch 2015_005

7.4 Wiederfindung der untersuchten Mykotoxine im Gärrest

7.4.1 Gärrest aus Mini-Batch-Versuchen

Die Toxine wurden in Reinform dem System zugegeben. Nach Versuchsende wurden Proben des „Gärrestes“ gezogen und auf das Vorkommen des Mykotoxins überprüft. Der Begriff „Abbaurate“ bezieht sich lediglich auf den prozentualen Anteil, der von der zugegebenen Menge nicht wiedergefunden wurde. Hierbei kann jedoch nicht darauf geschlossen werden, ob es sich um eine physikalische Adsorption oder um einen (enzymatischen/mikrobiellen) Abbau handelt. Da es über die Art der Abbauprodukte in Gärresten keine oder nur wenige Kenntnisse gibt, oder diese Verbindungen analytisch schwer zu erfassen sind, kann hierzu keine Aussage getroffen werden.

Im Versuchsdurchgang 2014_001 wurden Reinsubstanzen (Fumonisin, Gliotoxin, Monacolin K_S, Mykophenolsäure, Roquefortin C) und SB2 als Biozönose gewählt (Tab. 20)

Fumonisin B1 war mit 42,3% (korrigiert um die analytische Wiederfindungsrate) der eingesetzten Menge im Gärrest zu finden was an der guten Wasserlöslichkeit und Stabilität des Toxins in wässrigem Milieu liegen kann (WHO 2000). Fumonisin B1 ist zwar nicht so thermostabil wie andere Mykotoxine, allerdings treten erst ab Temperaturen von 125°C Verluste von 25-30% auf (Bullerman und Bianchini 2007), die bei den Untersuchungen in den Minibatch-Systemen bei weitem nicht erreicht wurden. Auch Bothast et al. (1992) konnten feststellen, dass beim Einsatz von natürlich mit Fumonisin B1 kontaminiertem Getreide bei der Herstellung von Ethanol während der Fermentation nur ein geringer Abbau stattfand. Trotzdem wurden 57,7% des Toxins im ATS-System abgebaut, wofür Biodegradation ein Grund sein könnte. Niderkorn et al. (2007) fanden heraus, dass einige fermentative Bakterien unter Maissilage-ähnlichen Bedingungen die Eigenschaft besitzen, Fusarium-Toxine, auch Fumonisin B1, zu binden und die toxischen Effekte zu minimieren. Um festzustellen, ob Fumonisin B1 in gebundener Form entweder nur nicht mehr extrahierbar ist oder kein toxisches Potential mehr aufweist, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Gliotoxin wurde in der Konzentration 5000 ng/g zugegeben, von der noch $18,3 \pm 6,0$ ng/g im Gärrest nach dem Biogasprozess zu finden waren. Somit hat sich Gliotoxin weitgehend „abgebaut“. Dieser Abbau ist von Bedeutung, da Gliotoxin eine starke antibiotische Wirkung aufgrund seiner Disulfidbrücken hat (Cole und Cox 1981; Gardiner 2005). Der starke Abbau von Gliotoxin während des Biogasprozesses lässt sich mit dessen Verhalten während der Pansenfermentation vergleichen. Wie Morgavi et al. (2004) bei der Pansenfermentation beobachten konnten, gibt es einen Ab- oder Umbau von Gliotoxin durch biotische bzw. abiotische Effekte. Nach sechs Stunden konnten nur noch 10% der zugegebenen Mykotoxinmenge im Pansensaft gefunden werden. Insgesamt hatte Gliotoxin keine Wirkung auf die Biogasbildung. Vergleichend konnten Morgavi et al. (2004) feststellen, dass Gliotoxin in Reinform nur eine sehr gering hemmende Wirkung auf die Fermentation besitzt. Erst ab einer Konzentration von 80 µg/ml führte Gliotoxin zu Veränderungen des Trockenmasseabbaus, der Gasproduktion und der Produktion kurzkettiger Fettsäuren.

Monacolin K_S wurde im Biogasprozess nicht messbar verändert und konnte in Höhe der Ausgangskonzentration (50.000 ng/g) wiedergefunden werden. Insgesamt konnte das vermutete Potential von Monacolin K, aufgrund seiner antibakteriellen Wirkung einen Effekt auf den Biogasprozess zu zeigen, nicht bestätigt werden. Diese Vermutung war

durch die Eigenschaft begründet, dass hauptsächlich bei Bakterien die Membranlipid-Synthese durch Monacolin K beeinflusst werden kann (Hedl und Rodwell 2004) und vor allem Archaea in der Methansynthese gehemmt werden (Miller und Meyer 2001). Dies konnte in diesem ATS-System jedoch nicht festgestellt werden.

Die kalkulierte „Abbaurrate“ lag für **Roquefortin C** bei 74,0%. Roquefortin zeigte keine Auswirkung auf den Biogasprozess, wenn auch von Kopp und Rehm (1979) in Bakterienkulturen eine Wachstumshemmung gram-positiver Bakterien, die hauptsächlich im Gärsubstrat eines Bioreaktors zu finden sind, gegenüber Roquefortin festgestellt werden konnte.

Mykophenolsäure zeigte bei einer zugegebenen Toxinmenge von 50.000 ng/g einen Effekt auf den Biogasprozess. Wie oft in der Literatur berichtet wird, ist Mykophenolsäure häufig in Mais- oder Grassilagen (Schneewis et al. 2000; Rasmussen et al. 2010; Driehuis 2013) oder auch in Getreide (Kokkonen et al. 2005; Sulyok et al. 2010) zu finden, in „hot spots“ von Schimmelnestern auch in vergleichbar hoher Konzentrationen. Ein Grund für die negative Wirkung von Mykophenolsäure auf den Biogasprozess könnten seine antibakteriellen Eigenschaften sein. Dabei richtet sich die antibiotische Aktivität eher gegen gram-positive als gegen gram-negative Bakterien (Cole und Cox 1981). Gram-positive Bakterien wie hydrolytisch/acidogene Bakterien, zum Beispiel die Gattung *Firmicutes* wie *Bacilli* (*B. subtilis*), *Staphylococcus* (*S. aureus* / *S. pyogenes*), sind hauptsächlich als fermentierende Bakterien in Biogasanlagen zu finden (LfL-Schriftenreihe 2009) und könnten demnach von Mykophenolsäure gehemmt werden. Die Eigenschaft von Mykophenolsäure, die Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase zu hemmen, ist gegenüber eukaryontischer IMPDH allerdings wirksamer als gegenüber prokaryontischer, somit wird die bakterielle Replikation nur schwach unterbunden (Digits und Hedstrom 1999), was aber trotzdem zu einer Wachstumshemmung führen könnte. In den entsprechenden mikrobiologischen Untersuchungen der Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungswesen der LfL (Abb. 73) hatte der Ansatz mit Mykophenolsäure (50 µg/g) keinen Einfluss auf die methanogenen Archaeen und ihre Aktivität. Eine massive Hemmung der *Bacteria* war daher wenig wahrscheinlich (allerdings nicht ausgeschlossen; vgl. 7.5.1) und wurde nicht untersucht.

Tab. 20: Versuchsdurchgang 2014_001 (SB2, Reinsubstanzen: Fumonisin, Gliotoxin, Monacolin K_S, Mykophenolsäure, Roquefortin C, vermahlene Weidelgraskörner, *Aspergillus fumigatus* inokulierte Reiskörner)

	Zugabe zum ATS-System	Gemessene Konzentrationen nach der Vergärung (x ± s)	„Abbaurrate“
Toxin	[ng/g]	[ng/g]	[%] ¹
Fumonisin B ₁	5.000	2.626,7 ± 430,2	57,7
Gliotoxin	5.000	18,3 ± 6,0	98,4
Monacolin K _S	50.000	48.900,0 ± 5109,8	-2,9
Monacolin K _L	0	1.820,0 ± 469,4	-
Mykophenolsäure	50.000	3.043,3 ± 193,3	93,0
Roquefortin C	50.000	8.803,3 ± 719,9	74,0

¹ Korrektur um die analytische Wiederfindungsrate

Im Gärrest wurde ein „Abbau“ der Mykophenolsäure von 93% festgestellt. Grund für die geringe Wiederfindung im Gärrest hierfür könnte eine mikrobielle Transformation von Mykophenolsäure durch Mikroorganismen sein. Wie Jekkel et al. (2001) untersuchten, sind Mikroorganismen, hauptsächlich der Gattung *Streptomyces* in der Lage, Mykophenolsäure durch Amidierung der Carboxylgruppe, durch Hydroxylierung der C4-Methylgruppe und durch Bildung von Glycosidderivaten aus der Hydroxylgruppe, die sich an C7 befindet, umzuwandeln.

Des Weiteren wurde die Wirkung einer Pilzkultur (Anzucht von *Aspergillus fumigatus* Stamm 77 auf Reis, Einsatz von inokulierten Reiskörnern (0,03-0,07 g) überprüft. Nach der Methode von Ostertag (2010) konnten im Gärrest folgende Mykotoxine detektiert werden: Fumagillin, TR-2 Toxin, Fumitremorgen B, Fumitremorgen C, Pyripyropen A, Festuclavin, Fumigaclavin A/Isfumigaclavin A, Fumigaclavin C, Fumiquinazolin C/D, Fumiquinazolin F/G, Sphingofungin A, Helvolsäure und Demethoxy- Fumitremorgen C.

Bei der Variante mit vermahlenden Weidelgraskörnern lag der Fokus auf der Überprüfung einer Prozessstörung, welche aber nicht beobachtet werden konnte. Toxikologische Rückstandsuntersuchungen wurden hierzu nicht durchgeführt.

Im Versuchsdurchgang_2014_004 (Tab. 21) wurden drei abgestufte Konzentrationen an Mykophenolsäure, Monacolin K_L sowie homogenisiertes Reis-Pilzmyzel (inokuliert mit *Aspergillus fumigatus*) überprüft.

Der Konzentrationsrückgang bei Mykophenolsäure variierte je nach ursprünglicher Konzentrationszugabe. Die höchste eingesetzte Konzentration von 50.000 ng/g wurde fast vollständig bis zu 3,0% abgebaut; bei Zugabe von 5000 ng/g Mykophenolsäure lag dieser Wert bei 4,6%, während bei einer eingesetzten Konzentration von 500 ng/g noch 9,2% zu finden waren. Zum Zeitpunkt, an dem Mykophenolsäure, zugebenen in der höchsten Konzentrationsstufe, eine Auswirkung auf den Biogasprozess zeigte, war es noch mit 19,2% der Ausgangskonzentration im System nachweisbar.

Monacolin K_L konnte im Gärrest nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden; hier erfolgte eine nahezu vollständige Umwandlung zu Monacolin K_S.

Tab. 21: Versuchsdurchgang 2014_004 (SB2, Reinsubstanzen, Wiederholung Mykophenolsäure mit abgestuften Konzentrationen, Monacolin K_L, *Aspergillus fumigatus* inokulierte homogenisierte Reiskörner)

	Zugabe zum ATS-System	Gemessene Konzentration nach der Vergärung (x ± s)	„Abbaurat e“
Toxin	[ng/g]	[ng/g]	[%] ¹
Mykophenolsäure	50.000	1.323,3 ± 162,9	97,0
Mykophenolsäure 07.04.14	50.000	8410	80,8
Mykophenolsäure	5.000	261,0 ± 26,7	95,4
Mykophenolsäure	500	40,2 ± 2,7	90,8
Monacolin K _L	50.000	1.865,0 ± 324,6	96,2
Monacolin K _S	0	45.725,0 ± 1821,0	-

¹ Korrektur um die analytische Wiederfindungsrate

Bei dem Versuchsansatz mit homogenisiertem Reis-Pilzmyzel wurde das gleiche Toxinspektrum wie im vorangegangenen Versuch im Gärrest nachgewiesen.

Beim Versuchsdurchgang 2014_005 wurde Mykophenolsäure in zwei Konzentrationsstufen, Citrinin, Ochratoxin A und Aflatoxin B₁ dem Batchsystem zugegeben (Tab. 22).

Auch hier konnte ein negativer Effekt der **Mykophenolsäure** bei der höchsten Konzentrationsstufe festgestellt werden. Bei Zugabe von 50.000 ng/g wurde Mykophenolsäure fast vollständig „abgebaut“; auch bei einer Zugabe von 20.000 ng/g, was keinen messbaren Einfluss auf den Prozess hatte, konnte Mykophenolsäure ebenfalls nur noch zu 2,7% detektiert werden. Zum Zeitpunkt, zu dem bereits Auswirkungen auf den Fermentationsprozess festzustellen waren, konnte 75,9% der Ausgangsmenge im Minibatch-System nachgewiesen werden.

Citrinin wurde im Biogasprozess fast vollständig „abgebaut“. Allgemein gilt Citrinin im Gegensatz zu anderen Toxinen als instabil; so ist es relativ hitzeempfindlich und wird schon bei Temperaturen von 60-70°C abgebaut (Scott 1984). Solche hohen Temperaturen liegen zwar im Minibatch-System nicht vor, allerdings werden die Fermenter über einen langen Zeitraum beständig mit 38°C erwärmt. Zudem konnten Shu und Lin (2002) in Untersuchungen feststellen, dass Citrinin vor allem in wässrigen Lösungen instabil und thermolabil ist. In Bezug auf Feldfrüchte gilt, je höher der Wassergehalt, desto schneller erfolgt der Abbau von Citrinin (Harwig et al. 1977). Da das zugegebene SB2-Gärs substrat bei Versuchsstart nur einen TS von 4,66% hatte, der sogar während der Gärung weiter bis 3,48% abnahm, könnte der hohe Wasseranteil somit auch zum Abbau von Citrinin beigetragen haben. Die zugegebene Menge an Citrinin hatte keinen Einfluss auf die Biogasproduktion, obwohl es antibiotisch, vor allem gegen gram-positive Bakterien, die die hauptsächlich vorhandenen Genera in Gärs substraten sind, wirkt (Betina 1989). Da Citrinin oft mit Ochratoxin A gleichzeitig auftritt (Trucksess und Pohland 2000) und sie gemeinsam synergistische Wirkung haben können (Ebermann und Elmadfa 2011), wäre es interessant diese Toxine auch im Kombinationsversuch einzusetzen.

Ochratoxin A wies einen starken „Abbau“ von 99,9% auf. Ochratoxin A konnte in Spuren auch in den Kontrollproben ohne Toxinzugabe detektiert werden. Da Ochratoxin A vorwiegend in Getreide und Futtermitteln in gemäßigten Klimazonen auftritt (Mücke und Lemmen 1999), könnte das SB2-Gärs substrat darüber vor Versuchsbeginn geringfügig kontaminiert gewesen sein. Ein Grund für den starken Abbau von Ochratoxin A könnte seine Umwandlung in das weniger toxische Ochratoxin α sein, welches nicht analytisch erfasst wurde. Diese Umwandlung geschieht z.B. durch enzymatische Hydrolyse durch die Mikroflora im Pansen von Wiederkäuern (Boudra und Morgavi 2005). Teilweise scheinen auch Protozoen für die Umwandlung in den weniger toxischen Metaboliten verantwortlich zu sein (Pattono et al. 2011), die eventuell mit der Rindergülle des SB2-Substrats in den Prozess eingetragen wurden. Dieser starke Abbau bzw. diese Hydrolyse könnte ebenfalls der Grund dafür sein, dass Ochratoxin A in diesem Versuchsansatz keinen Effekt auf den Biogasprozess zeigte.

Aflatoxin B₁ wies eine „Abbaurrate“ von 49,3% auf, wobei keine messbare Auswirkung auf die Biogasproduktion festgestellt werden konnte. Die Reduktion des Aflatoxin B₁-Gehalts könnte durch die in Silage produzierte Milchsäure mitverursacht worden sein, deren Fähigkeit zur chemischen Umwandlung von Aflatoxin B₁ in das weniger toxische Aflatoxin B_{2a} von Hafez und Megalla (1982) nachgewiesen werden konnten. Da auch im SB2-Gärs substrat in der Totalen-Misch-Ration ein Silageanteil von 20% eingesetzt wurde,

könnte teilweise während des Biogasprozesses diese Umwandlung in Aflatoxin B_{2a} stattgefunden haben.

Tab. 22: Versuchsdurchgang 2014_005 (SB II, Reinsubstanzen, Wiederholung Mykophenolsäure in zwei Konzentrationsstufen, Citrinin, Ochratoxin A, Aflatoxin B₁)

	Zugabe zum ATS-System	Gemessene Konzentrationen (x ± s) nach der Vergärung	„Abbaurat e“
Toxin	[ng/g]	[ng/g]	[%]¹
Mykophenolsäure	50.000	1.136,7 ± 86,2	97,4
Mykophenolsäure 16.05.14	50.000	33.200,0	24,1
Mykophenolsäure	20.000	467,8 ± 41,8	97,3
Ochratoxin A	5.000	4,5 ± 0,5	99,9
Citrinin	5.000	77,2 ± 5,3	98,1
Aflatoxin B ₁	1.000	306,0 ± 36,4	49,3

¹ Korrektur um die analytische Wiederfindungsrate

Im Versuchsdurchgang 2014_008 (Tab. 23) wurde der Effekt von Mykophenolsäure, Monacolin K_L, Gliotoxin und Aflatoxin B₁ auf eine gestresste Biozönose überprüft. Im Gärrest konnten am Versuchsende nur bei der höchsten Konzentration (50.000 ng/g) noch geringe Mengen an Mykophenolsäure nachgewiesen werden. Monacolin K_L wurde auch in dieser Biozönose zu Monacolin K_S umgewandelt, allerdings in einem geringeren Umfang als beim vorangegangenen Versuch. Eine „Abbaurrate“ von Monacolin K_L von 92,8% wurde für den Gärrest berechnet. Gliotoxin wurde bei diesem Versuch zu 93,1% „abgebaut“, was vergleichbar zu Versuch 2014_001 war (98,4%). Die zugegebene Menge an Aflatoxin B₁ wurde bei dieser gestressten Biozönose nur um 4,7% reduziert.

Tab. 23: Versuchsdurchgang 2014_008 (Gestresste Biozönose, Reinsubstanzen, Mykophenolsäure, Monacolin K_L, Gliotoxin, Aflatoxin B₁)

	Zugabe zum ATS-System	Gemessene Konzentrationen (x ± s) nach der Vergärung	„Abbaurrate“
Toxin	[ng/g]	[ng/g]	[%]¹
Mykophenolsäure	50.000	167,0 ± 17,5	99,6
Mykophenolsäure	5.000	-	100
Mykophenolsäure	500	-	100
Monacolin K _L	50.000	3.542,5 ± 181,4	92,8
Monacolin K _S	-	8.217,5 ± 1596,8	-
Gliotoxin	5.000	80,6 ± 20,3	93,1
Aflatoxin B ₁	1.000	574,5 ± 111,0	4,7

¹ Korrektur um die analytische Wiederfindungsrate

Tab. 24: Versuchsdurchgang 2015_002 (zwei verschiedene gestresste Biozönosen, Reinsubstanz: Mykophenolsäure in zwei Konzentrationsstufen)

	Zugabe zum ATS-System	Gemessene Konzentrationen ($\bar{x} \pm s$) nach der Vergärung	„Abbaurrate“
„gestresste“ Biozönose Grassilage BGM			
Toxin	[ng/g]	[ng/g]	[%] ¹
Mykophenolsäure	50.000	7.575 ± 742,0	82,7
Mykophenolsäure	5.000	803,5 ± 42,7	81,6
„gestresste“ Biozönose Spurenelementmangel (SB1)			
Mykophenolsäure	50.000	5.780 ± 428,6	86,8
Mykophenolsäure	5.000	702 ± 40,2	84,0

¹ Korrektur um die analytische Wiederfindungsrate

Die Wirkung der Mykophenolsäure wurde in einem weiteren Versuchsansatz 2015_002 an zwei weiteren gestressten Biozönosen überprüft. Die „Abbaurrate“ lag bei beiden Varianten etwas höher als in den vorangegangenen Versuchen bei ca. 82% (Grassilage BMG) und ca. 85% (Biozönose SB1) (Tab. 24).

Beim Versuchsansatz mit Kulturextrakten (Versuchsdurchgang 2015_003) wurden im Gärrest nur geringe Konzentration an Monacolin K_S und Roquefortin C gemessen. Fumagillin, Verruculogen, Fumitremorgen C und Trypacidin, welche im Kulturextrakt nachweisbar waren, konnten im Gärrest nicht wiedergefunden werden. Mykophenolsäure, als gelöste Reinsubstanz zugegeben, wurde nahezu vollständig „abgebaut“ (Tab. 25).

Tab. 25: Versuchsdurchgang 2015_003 (SB2, Reinsubstanz Mykophenolsäure, Kulturextrakte)

	Zugabe zum ATS-System	Gemessene Konzentrationen ($\bar{x} \pm s$) nach der Vergärung	„Abbaurrate“
Toxin	[ng/g]	[ng/g]	[%] ¹
Mykophenolsäure	50.000	2.395 ± 805**	99,9
Kulturextrakt „Monascus“:			
Monacolin K _S	20.300	1.485 ± 663	92,3
Fumagillin	734,5	n.n.	100
Fumitremorgen C	456	n.n.	100
Verruculogen	68,7	n.n.	100
Kulturextrakt „Penicillium“			
Roquefortin C	14.650	391 ± 65	99,9
Kulturextrakt „Aspergillus“			
Fumagillin	48.200	n.n.	100
Verruculogen	22.500	n.n.	100
Fumitremorgen C	13.700	n.n.	100
Trypacidin	12,8	n.n.	100
Kulturextrakte „Mucor“	-	-	-

** Mittelwert von 3 Wiederholungen, 1 Ausreißer 16350; ¹ Korrektur um die analytische Wiederfindungsrate

7.4.2 Gärrest aus semikontinuierlichen Durchflussversuchen

Beim Durchflussversuch 2015_1 wurden die mit *Monascus ruber* und *Penicillium roquefortii* verschimmelten Silagen eingesetzt. Im Gärrest wurden an verschiedenen Probenahmezeitpunkten v.a. Monacolin (K_S und K_L), Roquefortin C sowie Fumonisin B1 detektiert. Während die Konzentration an Fumonisin konstant blieb und auch in der Kontrollvariante detektiert werden konnte, stiegen die Konzentrationen an Monacolin K (MYK 1 und 2) und Roquefortin C (MYK 3 und 4) über den Versuchszeitlauf an (Tab. 26).

Tab. 26: Toxinkonzentrationen während des Durchflussversuchs 2015_001

Fermenter	Probenahmezeitpunkt	Toxinkonzentration im Gärrest [ng/g]							
		FES	FCC	FCA	FQ A/B	FUM	MON K _S	MON K _L	RQ C
Myk1,,Monascus1“	13.04.15	+	111	n.n.	n.n.	17,8	21,6	0,71	5,2
	27.04.15	+	n.n.	n.n.	n.n.	15,5	47,5	0,75	n.n.
	01.06.15	+	n.n.	+	+	13,1	202	n.n.	3,73
	15.06.15	+	n.n.	+	+	9,07	224	8,89	6,35
	22.06.15	+	n.n.	+	+	14,9	283	16,9	8,91
Myk2,,Monascus2“	13.04.15	+	n.n.	+	n.n.	19,7	23,0	0,98	n.n.
	27.04.15	+	n.n.	n.n.	n.n.	19,9	43,8	3,15	n.n.
	01.06.15	+	n.n.	+	+	11,8	202	4,85	5,73
	15.06.15	+	n.n.	+	+	9,33	213	8,38	8,84
	22.06.15	+	n.n.	+	+	x	309	21,2	7,9
Myk3,,Roquefortii1“	13.04.15	+	n.n.	n.n.	n.n.	21,9	n.n.	n.n.	4,63
	27.04.15	+	n.n.	n.n.	n.n.	17,2	n.n.	n.n.	12,5
	01.06.15	+	n.n.	+	n.n.	18,9	n.n.	n.n.	37,5
	15.06.15	+	n.n.	+	+	14,9	n.n.	n.n.	58,5
	13.07.15	+	n.n.	+	(n.n.)	15,1	n.n.	n.n.	109
Myk4,,Roquefortii2	13.04.15	+	n.n.	n.n.	n.n.	17,6	n.n.	n.n.	4,48
	27.04.15	+	n.n.	+	n.n.	14,9	n.n.	n.n.	11,6
	01.06.15	+	n.n.	n.n.	n.n.	14,8	n.n.	n.n.	41,0
	15.06.15	+	n.n.	+	+	n.n.	n.n.	n.n.	53,5
	13.07.15	+	n.n.	+	(n.n.)	14,8	n.n.	n.n.	88,4
Myk5 Kontrolle	13.04.15	+	n.n.	n.n.	n.n.	18	n.n.	n.n.	n.n.
	27.04.15	+	n.n.	n.n.	n.n.	12,9	n.n.	n.n.	n.n.
	01.06.15	+	n.n.	n.n.	n.n.	14,9	n.n.	n.n.	n.n.
	15.06.15	+	n.n.	n.n.	n.n.	15,9	n.n.	n.n.	n.n.
	13.07.15	+	n.n.	(+)	(n.n.)	13,4	n.n.	(n.n.)	n.n.

FES=Festuclavin, FCC= Fumigaclavin C, FCA= Fumigaclavin A/Isofumigaclavin, FQ A/B= Fumiquinazolin A/B, FUM=Fumonisin B1, MON K_S/K_L= Monacolin K (Säure bzw. Laktonform), RQ C=Roquefortin C, n.n.=nicht nachweisbar, +=qualitativer Nachweis, x=kein Messwert

Bei den Probenansätzen Myk 1 und 2 wurden mit *Monascus ruber*-inokulierte Silage verwendet (Tab. 13), welche eine Monacolin-Konzentration (Summe von K_S und K_L) von 589 µg/kg enthielt. Die folgende Tabelle (Tab. 27) zeigt eine Kalkulation, in der die wiedergefundene Toxinmenge im Gärrest der theoretisch zugegebenen Menge gegenüber gestellt wird. Über den Zeitverlauf ist eine Anreicherung zu beobachten.

Tab. 27: Gegenüberstellung theoretische versus gemessener Monacolin (MON)-Konzentration im Fermenter „Monascus 1“

Fermenter „Monascus 1“ /Myk1	Futtermenge [g]	Futtermenge aufsummiert [g]	theoretisch zugeführte Menge an MON [ng]	theoretische Konzentration im Fermenter (28 l) [ng/g]	gemessene Konzentration im Gärrest [ng/g]	„WDF“ [%]*
13.04.2015	967	967	56.9563	20,3	22,3	109,7
28.04.2015	1.365	2.332	1.373.548	49,1	48,3	96,8
01.06.2015	4.728	7.060	4.158.340	148,5	202,0	136,0
15.06.2015	2.698	9.758	5.747.462	205,3	232,9	109,1
23.06.2015	1.528	11.286	6.647.454	237,4	299,9	126,3

*gemessene/theoretische Konzentration, ohne Korrektur um analytische Kenngrößen oder Volumenverluste

In Abb. 71 ist der Verlauf der Abbauraten an Monacolin K über den Versuchszeitraum dargestellt; hierbei ist die Umwandlung der Lakton- in die Säureform ersichtlic.

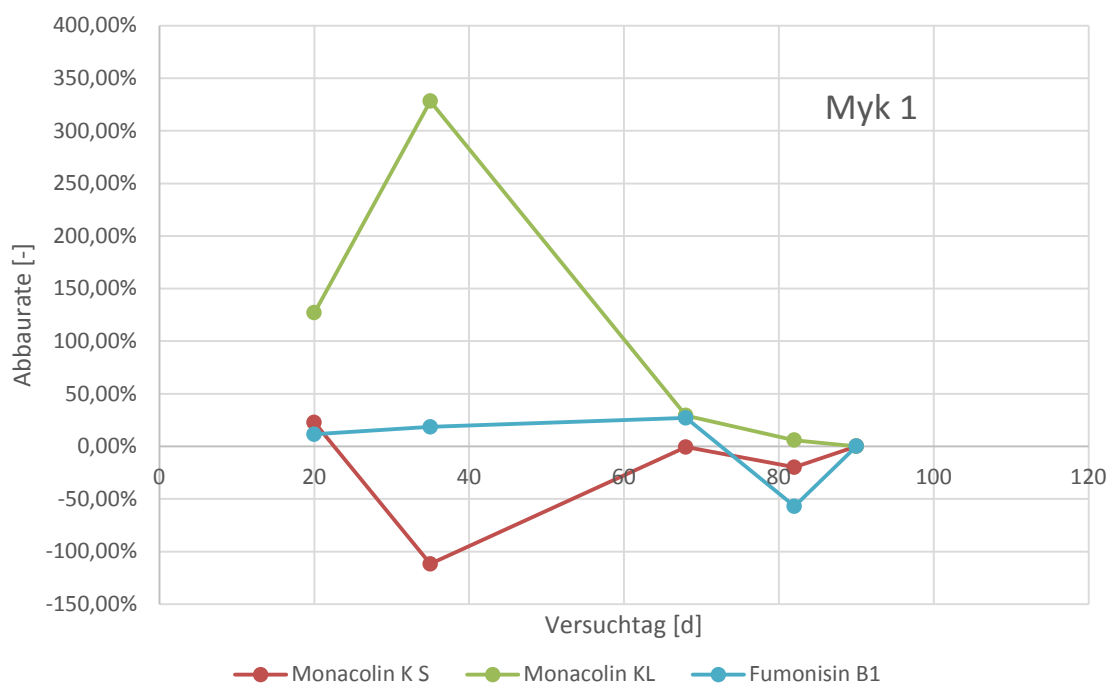


Abb. 71: Abbauraten über den Versuchszeitraum am Beispiel MYK 1

Bei den Fermentern Myk 3 und 4 wurde mit *Penicillium roquefortii*-inokulierte Silage verfütterte (Roquefortin C-Konzentration 265 µg/kg). In beiden Fermentern kam es zu einem Konzentrationsanstieg über den Versuchsverlauf (Tab. 28).

Tab. 28: Gegenüberstellung theoretische versus gemessener Roquefortin (RQ C)-Konzentration im Fermenter „Roquefortii 1“

Fermenter „Roquefortii 1“ /Myk3	Futtermenge [g]	Futtermenge aufsummiert [g]	theoretisch zugeführte Menge an RQ C [ng]	theoretische Konzentration im Fermenter (28 l) [ng/g]	gemessene Konzentration im Gärrest [ng/g]	„WDF“ [%]*
13.04.2015	967	967	256.255	9,1	4,63	50,6
28.04.2015	1.365	2.332	617.980	22,1	12,5	56,6
01.06.2015	4.728	7.060	1.870.900	66,2	37,5	56,1
15.06.2015	2.748	9.808	2.599.120	92,8	58,5	63,0
23.06.2015	5.157	14.965	3.965.725	141,6	110	77,7

*gemessene/theoretische Konzentration, ohne Korrektur um analytische Kenngrößen oder Volumenverluste

Im zweiten Durchflussversuch wurden mit *Aspergillus fumigatus* (Stamm 297 und A19) artifiziiell kontaminierte Silagen verwendet. Im Gärrest konnten typische Aspergillus-Toxine wie Gliotoxin, Fumiquinazolin C/D, Fumagillin, Fumitremogen B und Fumigaclavin C nachgewiesen werden. Der Gehalt an Roquefortin C lässt sich durch eine Co-Inokulation bei der Beimpfung der Silage erklären. Auch in diesen Untersuchungen konnte in beiden Versuchsansätzen MYK 9 und 10 als auch im Kontrollfermenter Fumonisin B1 nachgewiesen werden (Tab. 29).

Tab. 29: Toxinkonzentrationen während des Durchflussversuchs 2015_005

Fermenter	VT	Toxinkonzentration im Gärrest [ng/g]								
		MON _{Ks}	MP	GLIO	RQ C	FUM	FQ C/D	FG	FT B	FCC
Kontrolle (Myk10)	1	n.n.	n.n.	21,7	3,0	11,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	21	n.n.	n.n.	18,8	7,0	14,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	50	n.n.	n.n.	21,9	n.n.	11,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	71	n.n.	n.n.	5,1	n.n.	9,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	85	n.n.	n.n.	16,4	8,4	8,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	99	n.n.	n.n.	26,1	n.n.	9,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	120	n.n.	n.n.	24,7	12,1	9,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„Aspergillus 297-1“ (Myk 9)	1	n.n.	n.n.	5,6	1,6	20,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	21	n.n.	n.n.	17,2	23,3	16,2	9,2	n.n.	n.n.	90,1
	50	n.n.	n.n.	27,6	62,8	13,2	21,4	n.n.	6,4	263,8
	71	n.n.	n.n.	40,5	84,4	10,5	18,9	59,4	n.n.	47,6
	85	n.n.	n.n.	32,4	130,0	9,4	18,8	20,6	6,9	94,8
	99	n.n.	n.n.	53,7	136,8	9,5	30,3	27,9	n.n.	21,2
	120	n.n.	n.n.	63,4	202,4	9,6	32,2	59,2	13,6	87,4
„Aspergillus 297-2 „ (Myk 8)	1	n.n.	n.n.	10,2	n.n.	17,8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	21	n.n.	n.n.	15,0	24,5	14,5	9,1	n.n.	n.n.	191,2
	50	n.n.	n.n.	30,7	78,0	12,4	20,6	n.n.	5,6	164,2
	71	n.n.	n.n.	18,9	87,2	10,0	19,0	47,7	n.n.	92,5
	85	n.n.	n.n.	35,8	128,2	9,6	20,3	41,7	5,7	n.n.
	99	n.n.	n.n.	44,6	146,2	8,0	24,7	38,1	n.n.	47,1
	120	n.n.	n.n.	43,0	228,0	7,9	32,8	74,5	12,1	46,5
„Aspergillus A19-1“ (Myk 7)	1	n.n.	n.n.	14,2	n.n.	15,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	21	n.n.	n.n.	23,3	22,5	15,0	8,1	n.n.	n.n.	275,6
	50	n.n.	n.n.	25,7	53,3	13,4	14,2	n.n.	3,4	184,6
	71	n.n.	n.n.	35,1	58,3	8,5	19,7	18,6	n.n.	52,6
	85	n.n.	n.n.	25,1	94,4	8,6	16,7	24,9	6,2	29,8
	99	n.n.	n.n.	38,5	93,7	6,9	24,0	18,9	n.n.	88,4
	120	n.n.	n.n.	52,1	153,8	6,7	21,3	53,0	9,3	141,0
„Aspergillus A19-2“ (Myk 6)	1	n.n.	n.n.	16,5	n.n.	15,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	21	n.n.	n.n.	12,1	22,0	14,5	7,8	n.n.	n.n.	184,0
	50	n.n.	n.n.	28,8	47,6	10,9	16,0	n.n.	4,3	247,4
	71	n.n.	n.n.	34,5	56,8	7,5	16,2	n.n.	n.n.	66,8
	85	n.n.	n.n.	35,9	91,6	6,8	17,2	22,1	4,8	89,5
	99	n.n.	n.n.	48,5	100,2	7,4	19,0	28,7	n.n.	79,4
	120	n.n.	n.n.	61,9	129,6	6,3	29,0	31,2	7,2	59,8

VT= Versuchstag, FCC=Fumigaclavin C, FG=Fumagillin, FQ C/D=Fumiquinazolin C/D, FUM=Fumonisin B1, FT B=Fumitremorgen B, GLIO=Gliotoxin, MON KS=Monacolin K (Säureform), MP Mykophenolsäure, RQ C=Roquefortin C, n.n.=nicht nachweisbar

Bezieht man die in der Gärflüssigkeit abgebaute Toxinmasse auf die Summe der eingebrachten und der bereits vorhanden Toxinmengen, erhält man die prozentuale Abbaurate. Diese wurde für jedes Toxin für alle sechs Zeitintervalle zwischen den Probeentnahmen berechnet (Abb. 72).

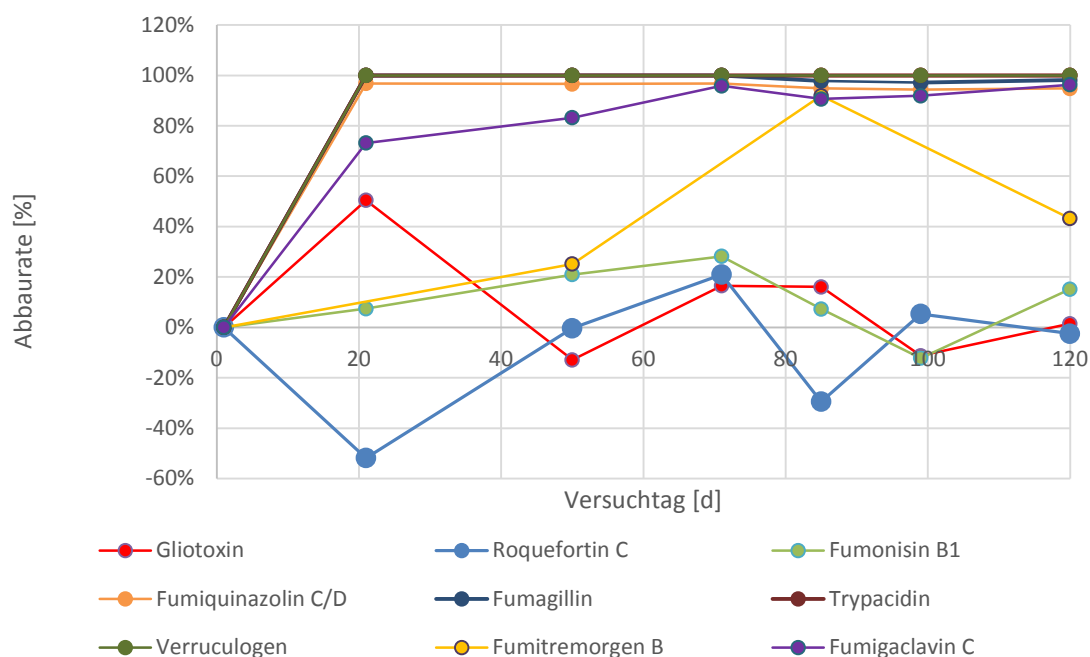


Abb. 72: Kalkulierte Abbauraten pro Zeitintervall

Trypacidin und Verruculogen besitzen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg eine Abbauraten von 100%. Fumagillin, Fumiquinazolin C/D und Fumigaclavin C weisen eine Abbauraten zwischen 98-99% auf. Die Abbauraten von Fumitremorgen B schwanken zwischen 25-85% und zeigt eine $Abbauraten_{Gesamt}$ von 65,7%. Die $Abbauraten_{Gesamt}$ von Fumonisin B₁ liegt mit 55,7% nahe den Ergebnissen der Batch-Versuche. Die Abbauraten von Roquefortin C und Gliotoxin schwanken über die Versuchslaufzeit und nehmen teilweise negative Werte an (Tab. 30).

Tab. 30: Abbauraten über den gesamten Zeitverlauf

Toxin	$Abbauraten_{Gesamt}$ [%]
Roquefortin C	-9,0
Fumonisin B ₁	55,7
Gliotoxin	23,0
Fumiquinazolin C/D	98,8
Fumagillin	99,6
Trypacidin	100,0
Verruculogen	100,0
Fumitremorgen B	65,7
Fumigaclavin C	99,1

7.5 Veränderungen der Biozösen nach Zugabe von Mykotoxinen oder verpilzter Silagen in Biogasprozessen

7.5.1 Veränderungen in Mini-Batch-Systemen

Bei den ATS-Tests zwei und drei wurden Proben für die molekularbiologische Untersuchung der Zusammensetzung und Aktivität der mikrobiellen Populationen in den Varianten Kontrolle, Lösungsmittelzusatz (Aceton) und Mykophenolsäure (MPS, 50 mg/l Gärs substrat, gelöst in Aceton) gewonnen. Dabei war kein Effekt des MPS-Zusatzes auf die Konzentration der Archaeen- (Abb. 73 und Abb. 74) und der Bakterien- (Abb. 75 und Abb. 76) in den Gärgemischen feststellbar.

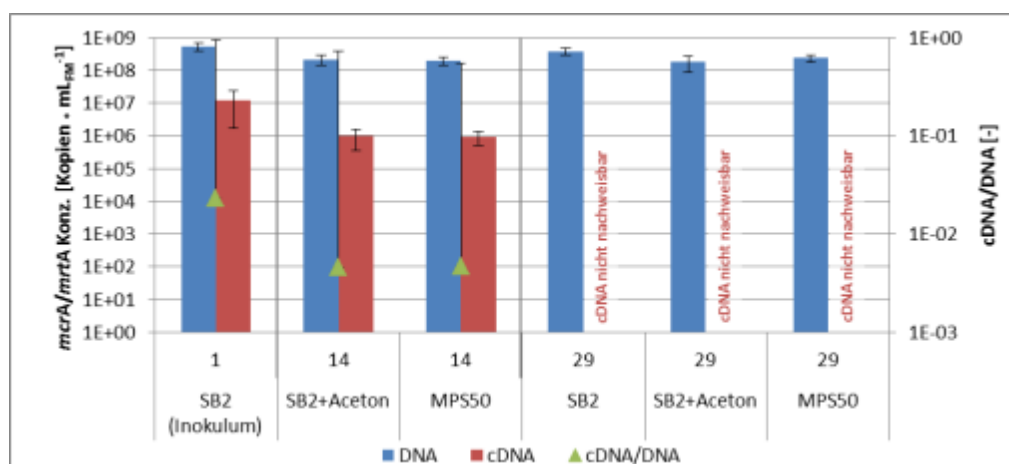


Abb. 73 DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA Verhältnis der methanogenen Archaeen (*mcrA/mrtA*) im Aktivitätstest 2014_004 mit Mykophenolsäure

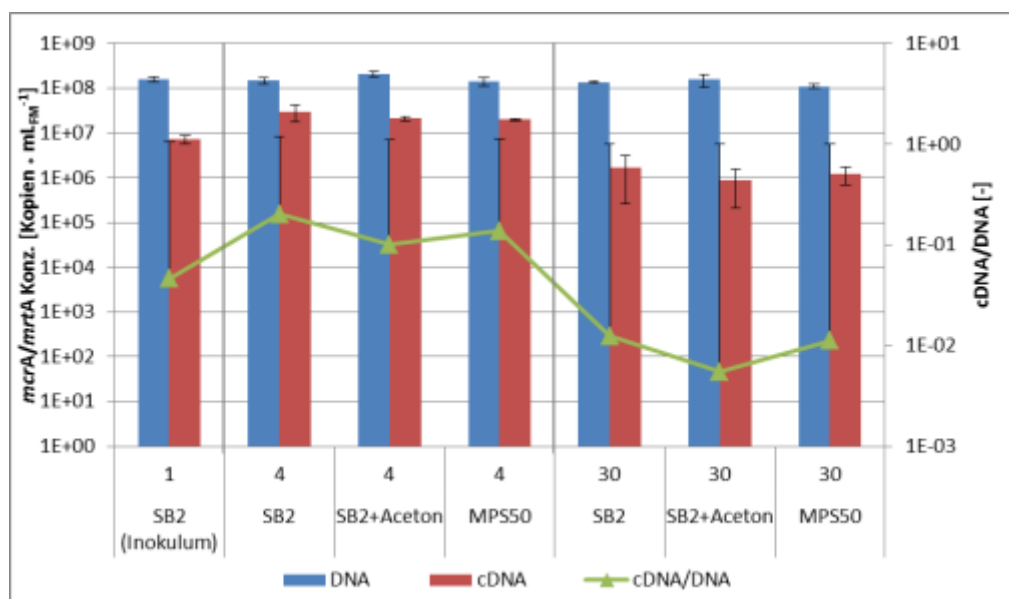


Abb. 74: DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA Verhältnis der methanogenen Archaeen (*mcrA/mrtA*) im Aktivitätstest 2014_005 mit Mykophenolsäure

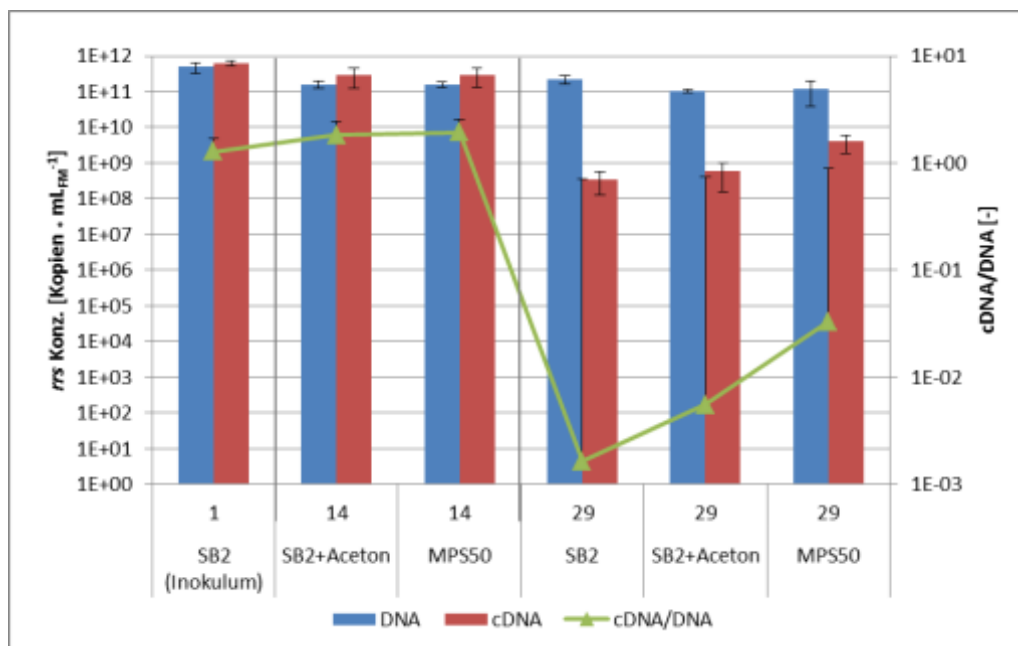


Abb. 75: DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA Verhältnis der Bacteria (*rrs*) im Aktivitätstest 2014_004 mit Mykophenolsäure

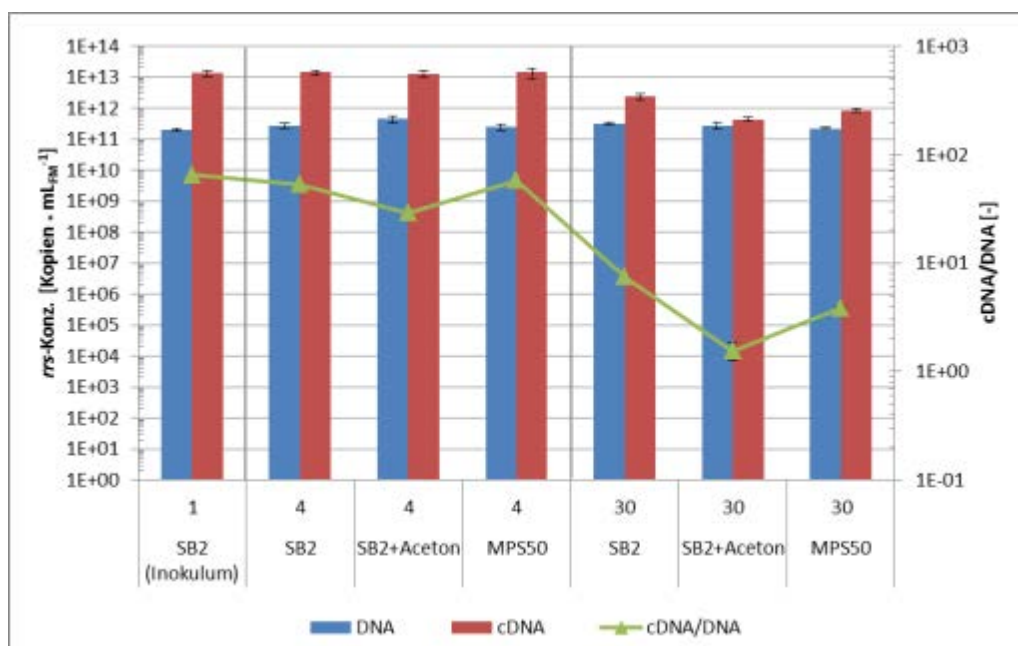


Abb. 76: DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA Verhältnis der Bacteria (*rrs*) im Aktivitätstest 2014_005 mit Mykophenolsäure

Die reproduziert in Variante MPS50 (Mykophenolsäure-Konzentration 50 mg/l) etwas geringere Gasproduktion (Abb. 20, Abb. 23) ließ sich nicht durch die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen erklären, ein Einfluss war weder hinsichtlich der Präsenz (DNA-Ebene) noch auf Ebene der Transkription (cDNA/DNA-Verhältnis) der Biogas-Biozönosen feststellbar. Hier wäre eine Arbeitshypothese, dass die beobachtete Hemmung auf Ebene der Translation oder der Enzymaktivität stattfindet. Alternativ

könnte die Säureproduktion bestimmter *Bacteria*-Populationen gehemmt worden sein (vgl. 7.4.1). Anlass zu dieser Vermutung gaben die im Vergleich zur Kontrolle niedrigeren Fettsäurekonzentrationen in den Ansätzen mit MPS50. Im zweiten Aktivitätstest lagen der Wert für die Kontrolle bei 410 mg/kg und der Wert für die Ansätze mit MPS50 bei 192 mg/kg. Im dritten Aktivitätstest lagen die Werte generell mit 928 mg/kg in den Kontrollansätzen und 320 mg/kg in den MPS50 Ansätzen höher. Eine Verringerung der Fettsäure-Bildung durch Mykophenolsäure wurde auch in einer Studie zum Einfluss von *P. roquefortii*-Toxinen auf die Gasbildung diskutiert. Mit steigender Konzentration an Mykophenolsäure nahmen die Bildung flüchtiger Fettsäuren und die Gasproduktion stetig ab (Gallo *et al.*, 2014). In der gleichen Studie führte die Zugabe von Roquefortin C zu einem ähnlichen Verlauf. In den hier beschriebenen Versuchen konnte ein solcher Effekt aber nicht beobachtet werden.

7.5.2 Veränderungen in semikontinuierlichen Durchfluss-Systemen

7.5.2.1 Erster Durchflussversuch mit durch *Monascus ruber* und *Penicillium roquefortii* verschimmelter Silage

Proben für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden vom Inokulum und jeweils im äquilibrierten Betrieb vor einer Raumbelastungssteigerung genommen.

Mit steigender Raumbelastung stieg auch die Methanproduktivität an, wobei die Biozönosen in den Varianten mit den verschimmelten Silagen allenfalls marginal weniger Methan produzierten als die Kontrolle. Durch die unterschiedlichen oTS-Gehalte der Silagen (Abb. 49) waren die Raumbelastungen der verschiedenen Varianten leicht abweichend. In der höchsten organischen Raumbelastungsstufe (OLR, $2,1 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ für die Pilzvarianten; OLR, $2,35 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ für die Kontrolle) lag sie in den Pilzvarianten bei $0,4\text{-}0,5 \text{ NL CH}_4 \cdot \text{L}_{\text{FM}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ und in der Kontrolle bei $0,6 \text{ NL CH}_4 \cdot \text{L}_{\text{FM}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Abb. 77).

Für das Inokulum betrug der MQ ca. $1 \cdot 10^{-1}$ (Abb. 77). Der niedrige MQ ist auf die diskontinuierliche Fütterung von SB1 und eine deswegen geringe Belastung und Aktivität der methanogenen Archaeen zurückzuführen: SB1 wurde zuvor 2 Tage lang nicht gefüttert. Bei einer OLR von $1,0 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ lag der MQ für alle Varianten bei $3 \cdot 10^{-1} - 6,5 \cdot 10^{-1}$. Mit steigender OLR stieg auch der MQ weiter an und überstieg bei einer OLR von ca. $1,5 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ in allen Varianten einen Wert von 3. Hier deutete sich also für alle Gärgemische eine Belastungs- bzw. Stresssituation an.

Nach OLR-Steigerung auf $2,1 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, brach die Biogasproduktion in der Variante mit *M. ruber* für Myk1 ca. 2 Wochen und für Myk2 ca. 1 Woche später ein. Mit dem Einbruch der Biogasproduktion sank auch der MQ deutlich auf ca. $1,7 \cdot 10^{-1} - 3 \cdot 10^{-1}$. Die Variante mit *P. roquefortii* lief bei einer OLR von $2,1 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ etwas länger stabil als die Variante mit *M. ruber*. Auch in dieser Variante stieg der MQ bei einer OLR von $1,7 \text{ kg}_{\text{oTS}} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (Versuchstag (VT)134) über 3 an. Bei Myk3 brach ca. 2 Wochen (VT151) später die Biogasproduktion ein. An VT148 sank der MQ bereits auf $1,5$ und dann weiter auf $9,5 \cdot 10^{-4}$ (VT176). Myk4 lief etwas länger stabil als Myk3. In Myk4 stieg der MQ am VT148 auf ca. 6 an, bevor ca. 2 Wochen später die Biogasproduktion einbrach. Am Ende lag der MQ bei ca. $5 \cdot 10^{-2}$.

Die Kontrolle lief am längsten stabil. Hier stieg der MQ bis zum VT148 kontinuierlich auf ca. 6 an, bevor es zu einer Verringerung der Biogasproduktion kam. Aufgrund der etwas geringeren Methanproduktivität am Ende des Versuches (VT176) sank auch der MQ auf ca. 1. Der deutlich höhere MQ als in den Fermentern mit verschimmelter Silage, lässt auch

angesichts der seit VT148 leicht gesunkenen Methanproduktivität (Abb. 77) schließen, dass die Kontrolle deutlich länger stabil lief als beide Schimmelvarianten.

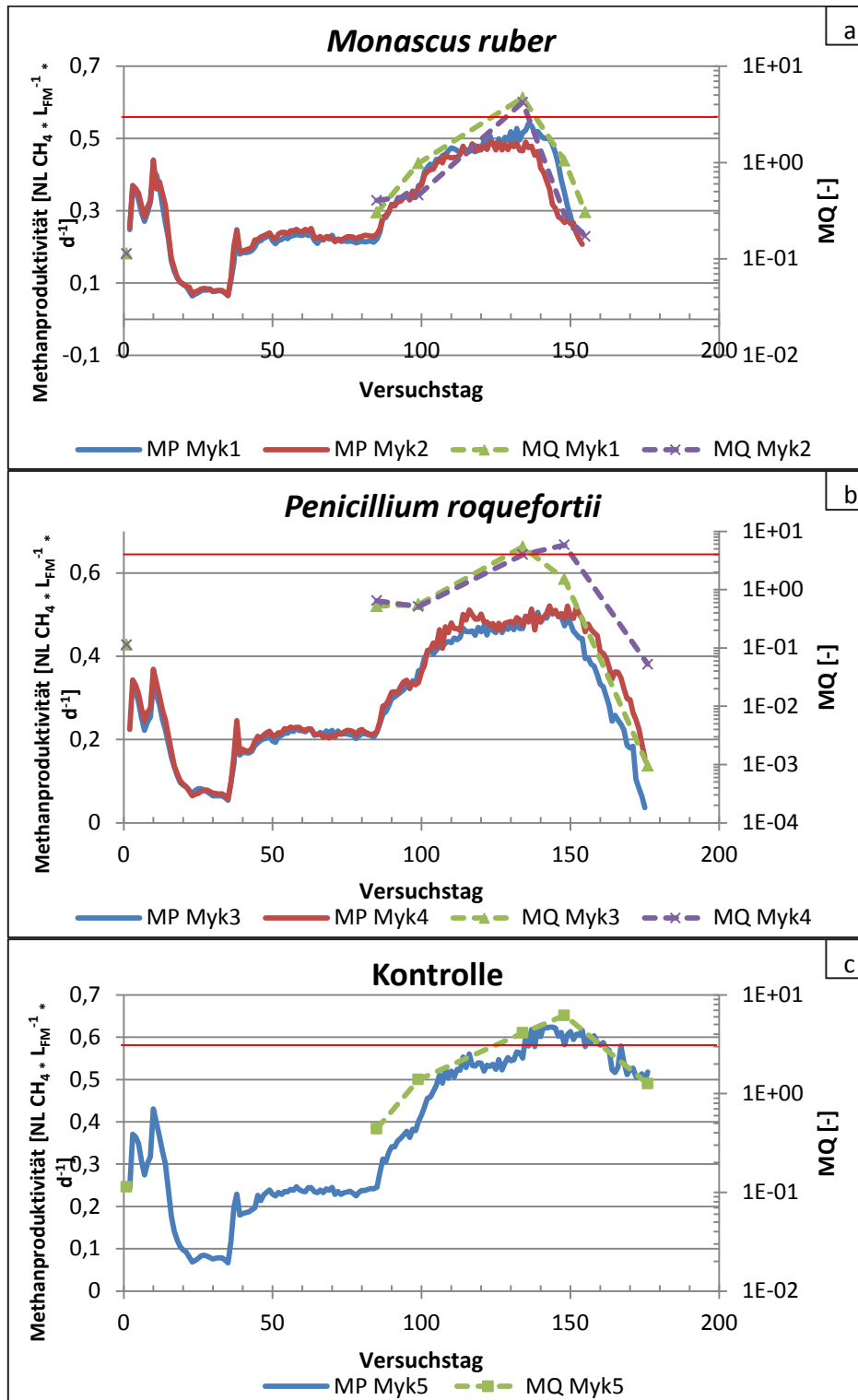


Abb. 77: Methanproduktivität (MP) und Metabolischer Quotient (MQ) der Varianten *Monascus ruber* (Myk1 und Myk2, a) und *Penicillium roquefortii* (Myk3 und Myk4, b) sowie der Kontrolle (Myk5, c); der horizontale rote Strich bezeichnet die Schwelle von etwa MQ 3 zum Stressmetabolismus

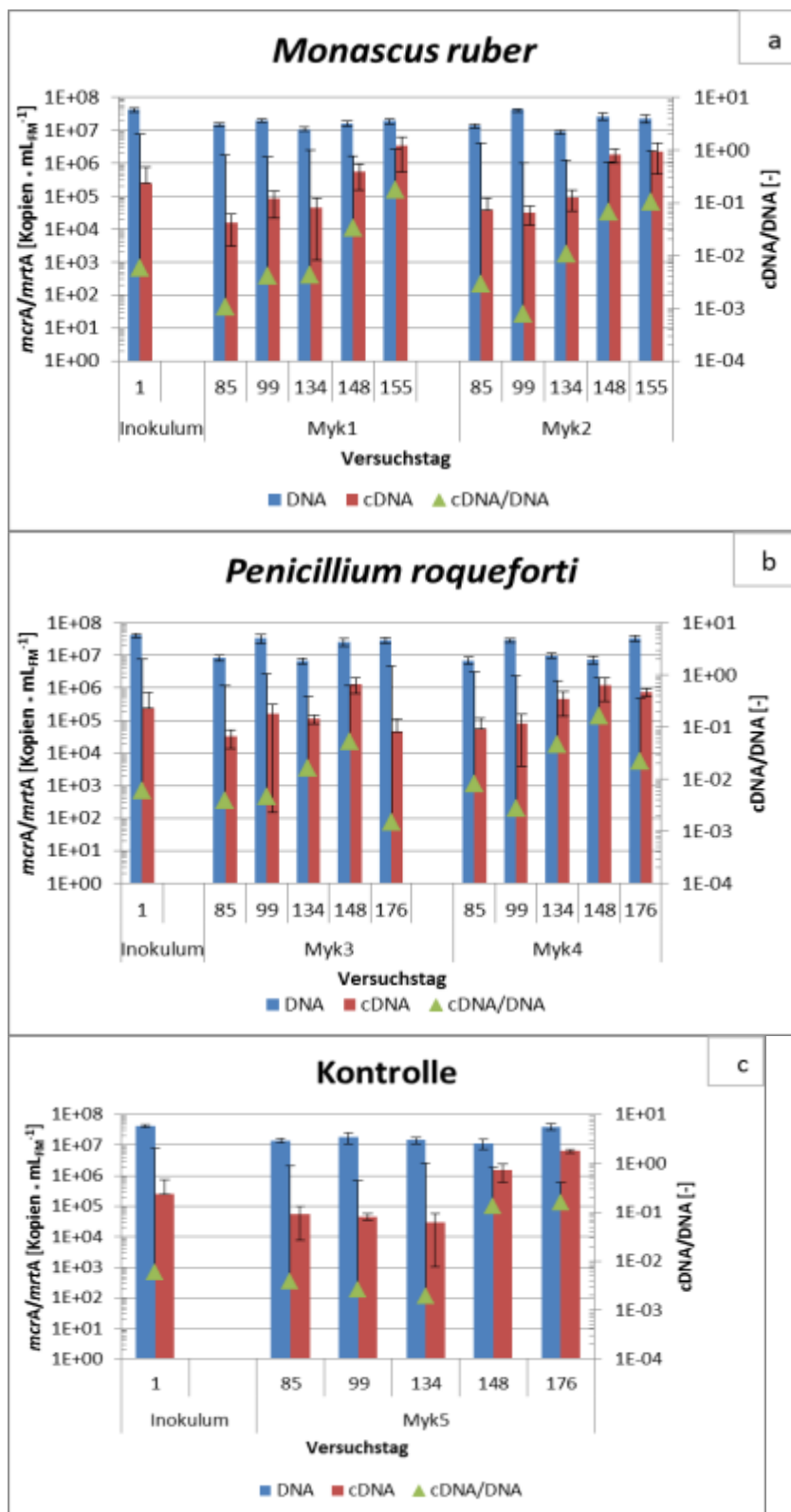


Abb. 78: *mcrA/mrtA* DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA-Verhältnis der Pilzvariante *Monascus ruber* (Myk1 und Myk2, a), *Penicillium roquefortii* (Myk3 und Myk4, b) und der Kontrolle (Myk5, c)

Auch der Aktivitätsparameter cDNA/DNA für methanogene Archaeen stieg mit steigender Raumbelastung zunächst kontinuierlich an (Abb. 78). Für das Inokulum wurde eine *mcrA/mrtA*-DNA-Konzentration von $4,2 \cdot 10^7$ Kopien \cdot mL_{FM}⁻¹ und eine cDNA-Konzentration von $2,5 \cdot 10^5$ Kopien \cdot mL_{FM}⁻¹ gemessen. Dies entspricht einem (sehr niedrigen) cDNA/DNA Verhältnis von $5,9 \cdot 10^{-3}$ und bestätigt die anhand des MQ getroffenen Aussagen (s. oben).

In allen Varianten blieb die *mcrA/mrtA*-DNA-Konzentration während des ganzen Versuchs annähernd konstant, während sich die cDNA-Konzentration mit steigender OLR zunächst erhöhte. Dadurch stieg auch das cDNA/DNA Verhältnis und dokumentiert eine intensiviertere (Transkriptions)-Aktivität. In der Stressphase (MQ \geq 3) wurde bei OLR > 2,0 kg_{oTS} \cdot m⁻³ \cdot d⁻¹ (VT148) kein Unterschied im cDNA/DNA Verhältnis zwischen den verschiedenen Varianten festgestellt. In der Variante mit *P. roquefortii* sank das cDNA/DNA Verhältnis nach Einbruch der Biogasproduktion (VT176) deutlich. Bei Myk3 war der Rückgang des Verhältnisses stärker als bei Myk4 ($1,5 \cdot 10^{-3}$ bzw. $2,2 \cdot 10^{-2}$). Dies stimmt mit dem stärkeren Einbruch der Biogasproduktion in Myk3 als in Myk4 überein.

Der Prozess in den Fermentern Myk1 und Myk2 war schon vor VT176 zusammengebrochen. Die Untersuchung dieser Variante wurde beendet und Myk1 und Myk2 wurden entleert. Deswegen liegt hier kein Vergleichswert mehr vor. In der Kontrolle (Myk5) blieb die transkriptionelle Aktivität auch am VT176 hoch (Abb. 78). Dies unterstützt den anhand des Verlaufs des MQ geführten Befund (s. oben), dass der mikrobielle Biogasprozess in der Kontrolle länger stabil blieb als in den Schimmelsubstrat Fermentern.

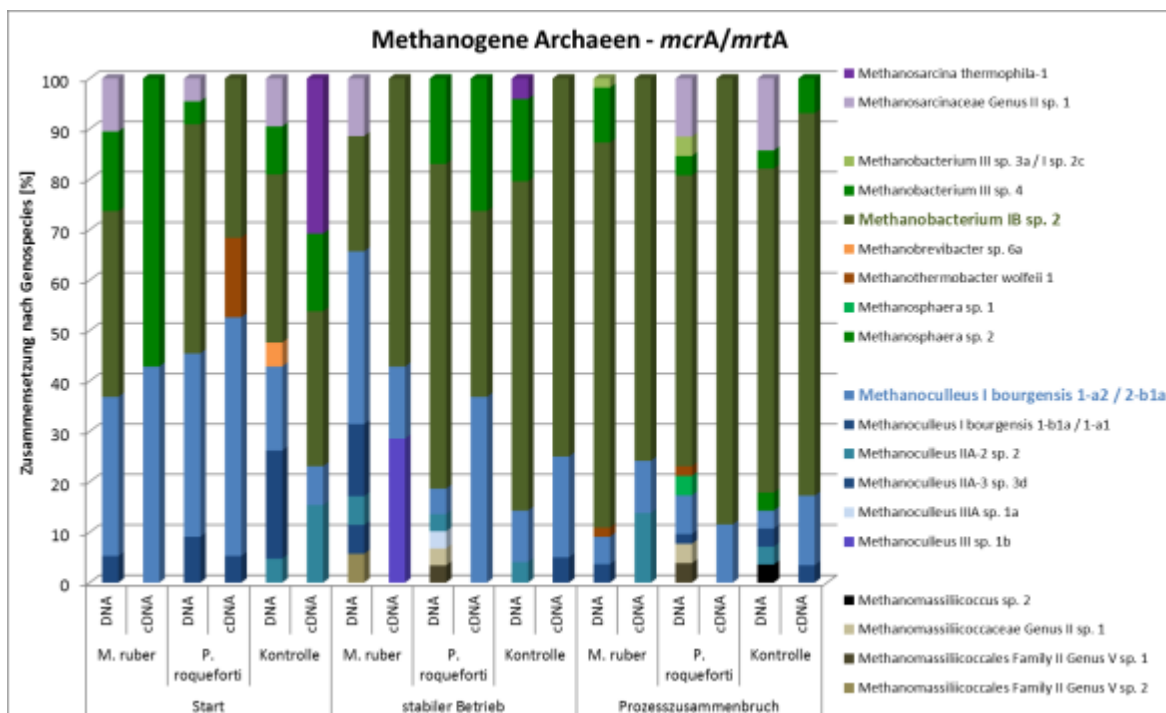


Abb. 79: *mcrA/mrtA* basierte methanogene Gesellschaftszusammensetzung der mit verschimmelter Silage gefütterten Fermenter und der Kontrolle im ersten Durchflussversuch zum Versuchsstart, im stabilen Betrieb und im Prozesszusammenbruch.

Mittels Klonierung und Sequenzierung von Amplikons und Transkripten (*mcrA/mrtA* DNA und cDNA) wurde untersucht, ob sich die Zusammensetzung der Gilde methanogener Archaeen in den verschieden behandelten Fermentern im Versuchsverlauf geändert hatte. Hierzu wurden Proben vom Versuchsstart, aus dem stabilen Betrieb und zum Zeitpunkt des Prozesszusammenbruchs analysiert (Abb. 79).

Die Zusammensetzung der Gilde methanogener Archaeen veränderte sich zwar im Versuchsverlauf, jedoch entwickelten sich alle Fermenter ähnlich. Besonders auffällig war eine Verschiebung der methanogenen Population in Richtung *Methanobacterium* IB sp. 2 in allen Fermentern mit zunehmender Versuchsdauer. Dieser Organismus war schließlich sowohl auf DNA als auch auf cDNA-Ebene dominierend. Die Verschiebung hin zu hydrogenotrophen methanogenen Archaeen wie *Methanobacterium* IB sp. 2 ist für belastete und gestresste Zustände von Biogasprozessen typisch. Weitere Vertreter hydrogenotropher methanogener Archaeen, *Methanoculleus* I *bourgensis* 1-a2 / 2-b1a und *Methanobacterium* III sp. 4, waren zu Versuchsbeginn auf DNA- und cDNA-Ebene in allen Fermentern vorhanden, sie nahmen aber im Versuchsverlauf auf beiden Ebenen stetig ab. Acetoklastische methanogene Archaeen, hier *Methanosarcina thermophila*-1, waren zu Versuchsbeginn noch aktiv (cDNA-Nachweis). Im stabilen Betrieb waren sie aber nur noch auf DNA-Ebene und im Prozesszusammenbruch nicht mehr nachweisbar. Dem ähnlich konnten mit zunehmender Versuchsdauer Vertreter der Familie *Methanomassiliicoccaceae* und der Gattung *Methanobrevibacter*, wahrscheinlich residual aus dem SB2-Inokulum verbliebene Bioindikatoren (Lebuhn et al., 2015) für den Einfluss tierischer Ausscheidungen, nicht mehr in der aktiven Fraktion (cDNA) nachgewiesen werden.

Die Verschiebung in Richtung der Klade *Methanobacterium* IB sp. 2 in allen Fermentern weist auf generell zunehmenden Stress hin, der in Form von Prozessversäuerung mit stark gestiegenen Gehalten kurzkettiger Fettsäuren (v.a. Propionat) und FOS/TAC-Werten in allen Fermentern bestätigt (Abb. 57, Abb. 58, Abb. 59) und auch frühzeitig durch den angestiegenen MQ (Abb. 77) prognostiziert wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen bestätigen die Befunde von Lebuhn und Munk (2015), in denen Genospecies wie *Methanobacterium* III sp. 3a und *Methanobacterium* IB sp. 2 wegen ihrer zunehmenden Präsenz und Aktivität (DNA- und cDNA-Ebene) bei widrigen Prozessbedingungen als Bioindikatoren von Stresszuständen bezeichnet wurden.

Ein Unterschied zwischen den Pilzvarianten und der Kontrolle und demnach ein differentieller Einfluss der mit *M. ruber* oder *P. roquefortii* verschimmelten Silage auf die methanogene Population war nicht erkennbar. Dies erhärtet die Vermutung, dass den diskutierten Effekten der Verschimmelung in allen Gärgemischen eine Prozessversäuerung unterlag, die vor allem durch Kobaltmangel (Tab. 31) induziert wurde.

Bakterien stehen im Biogasprozess am Anfang der Stoffwechselkette, sie hydrolysieren pflanzliche Zucker (z.B. Cellulose, Hemicellulose) und produzieren über verschiedene Abbauwege vor allem eine Vielzahl von kurzkettigen Fettsäuren, die durch syntrophe Bakterien über Fettsäure-Oxidation in Kohlendioxid und Wasserstoff umgewandelt werden können. Die Reaktionen der Fettsäure-Oxidation sind energiezehrend und können nur stattfinden, wenn insbesondere der freiwerdende Wasserstoff durch die Methanogenen verwertet wird. Sollten die Pilztoxine die Bakterien im Prozess gehemmt haben, könnte dies zu einer Unterversorgung der Methanogenen geführt haben. Ein leichtes Absinken der *mcrA/mrtA*-Transkriptionsaktivität war in der Variante mit *P. roquefortii* am VT176 zu erkennen (Abb. 78b).

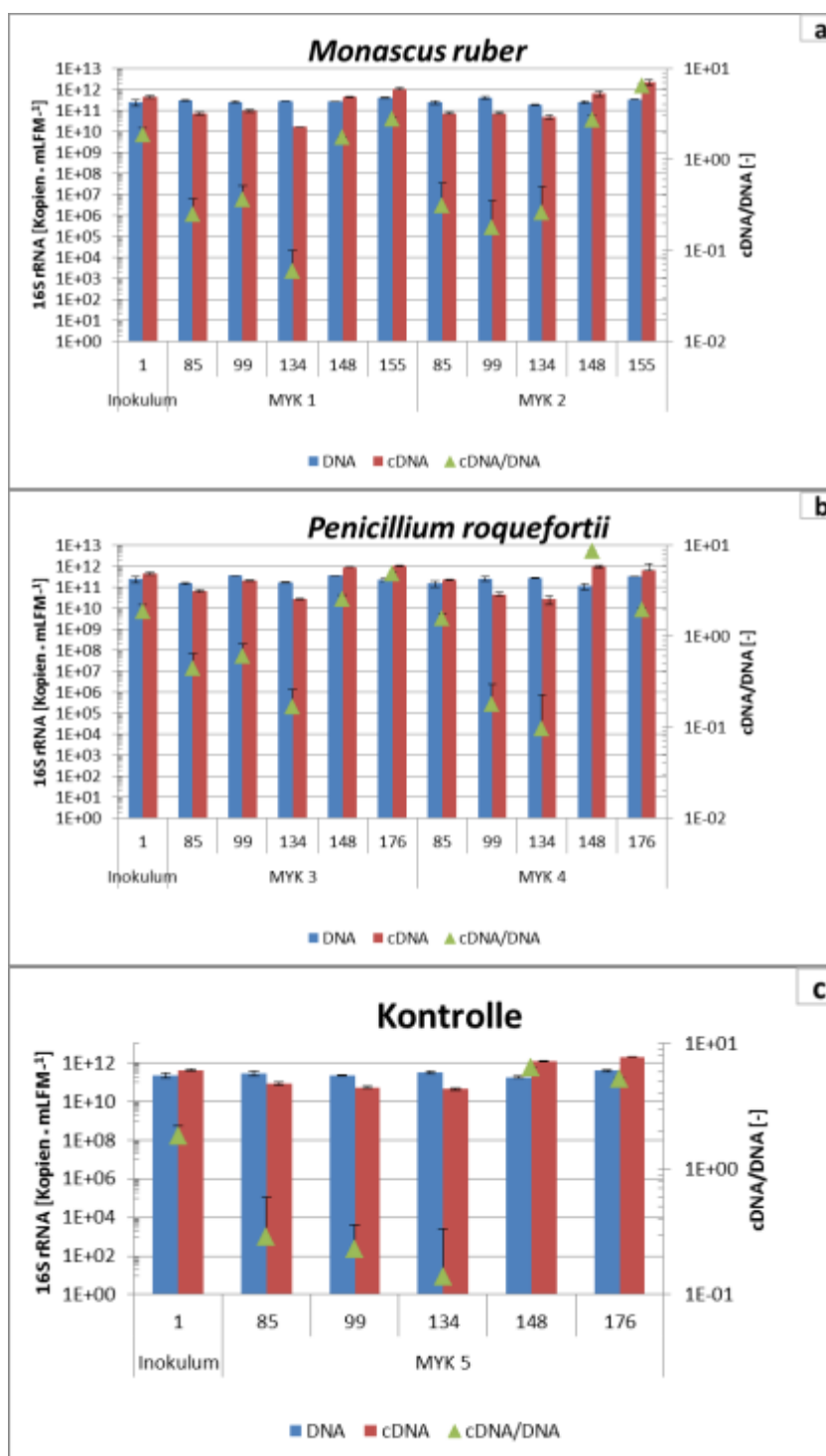


Abb. 80: *rrs* DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA-Verhältnis der Pilzvariante *Monascus ruber* (Myk1 und Myk2, a), *Penicillium roquefortii* (Myk3 und Myk4, b) und der Kontrolle (Myk5, c)

Um zu prüfen, ob die beiden Pilzvarianten einen Einfluss auf die Bakterien im Biogasprozess hatten, wurden Analysen des 16S rRNA (*rrs*) Gens sowie dessen Transkripte (cDNA) durchgeführt (DNA und RNA Ebene; vgl. Abschnitt 6.8; Abb. 80). Die *rrs* Kopienzahl lag im Inokulum, wie auch in allen Fermentern über den gesamten Durchflussversuch im Bereich von 10^{11} bis 10^{12} pro ml Gärgemisch. Auch zeigten sich in

allen Fermentern unabhängig von den Pilzvarianten ähnliche Verläufe für die *rrs*-Transkriptionsaktivität (Abb. 80a-c). Die *rrs*-cDNA-Konzentrationen lagen zu Versuchsbeginn für die Fermenter MYK1 und MYK2 bei $7,15 * 10^{10}$ und $7,28 * 10^{10}$ Transkripte $* \text{mL}_{\text{FM}}^{-1}$, für die Fermenter MYK3 und MYK4 bei $6,46 * 10^{10}$ und $2,28 * 10^{11}$ Transkripte $* \text{mL}_{\text{FM}}^{-1}$ und im Kontrollfermenter MYK5 bei $8,89 * 10^{10}$ Transkripte $* \text{mL}_{\text{FM}}^{-1}$. Zum Versuchstag 134 hin sank die *rrs* cDNA Konzentration in allen Fermentern etwa um den Faktor 10. Da dies auch die Kontrolle betraf, sollte nicht die Verschimmelung sondern eher eine Prozessäquilibrierung die Ursache gewesen sein. Mit steigender OLR erhöhte sich dann die bakterielle Aktivität bis zum Prozesszusammenbruch hin in allen Varianten. In den Fermentern MYK1 und MYK2 betrug die *rrs* cDNA Konzentration $1,08 * 10^{12}$ und $2,19 * 10^{12}$ Transkripte $* \text{mL}_{\text{FM}}^{-1}$, in den Fermentern MYK3 und MYK4 $1,04 * 10^{12}$ und $6,12 * 10^{11}$ Transkripte $* \text{mL}_{\text{FM}}^{-1}$ und in der Kontrolle MYK5 auf $2,24 * 10^{12}$ Transkripte $* \text{mL}_{\text{FM}}^{-1}$. Ein Einfluss der verschimmelten Silage auf die bakterielle Aktivität war demnach nicht nachweisbar, lediglich für die Variante mit *P. roquefortii* fiel die Transkriptionsaktivität im Prozesszusammenbruch (VT176) ab (Abb. 80b).

Um zu prüfen ob eine Veränderung der bakteriellen Gesellschaftszusammensetzung Ursache der verfrühten Prozessverschlechterung in den mit *M. ruber* gefütterten Fermentern war, wurde die bakterielle Zusammensetzung der gesamten (DNA-Ebene) Population der *Bacteria* und der aktiven Fraktion (rRNA- bzw. cDNA-Ebene) im stabilen Betrieb (Abb. 81) und im Prozesszusammenbruch (Abb. 82) untersucht. Hierfür dienten Mischproben aus MYK1 und MYK2 im Vergleich zum Kontrollfermenter MYK5. In den Abb. 81 und Abb. 82 sind die *Bacteria* nach „operational taxonomic units“ (OTUs) kategorisiert. Bei $> 1\%$ Sequenzdivergenz der V6-V8-Region der 16S rRNA bzw. 16 S rDNA (s. 6.8.3.1) sind die *Bacteria* verschiedenen OTUs bzw. verschiedenen Genospecies zugeordnet, die auf Basis phylogenetischer Untersuchung häufig auch unterschiedliche Species darstellen (Lebuhn et al., 2014a).

Besonders auffällig war der sehr hohe Anteil an *Actinomycetaceae* OTU17-, *Sedimentibacter* OTU 64- und *Clostridia*-MBA03 OTU-24-cDNA im stabilen Betrieb in der Kontrolle, während in der entsprechenden *M.-ruber*-Fraktion *Pseudomonas*-OTU23-cDNA und *Clostridiales-inc.-sed.-XI*-OTU59-cDNA dominierten (Abb. 81). Demgegenüber waren beide Profile, sowohl das auf DNA-Ebene als auch das der cDNA-Fraktion, im Prozesszusammenbruch (Abb. 82) stark verändert: Neben dem auch im stabilen Betrieb dominierenden unklassifizierte *Clostridia*-MBA03 OTU-24, dominierten daneben verschiedene *Clostridia*-OTUs und *Porphyromonadaceae*-OTU-4 und OTU-2, während in den Gärgemischen mit *M. ruber* in der aktiven Fraktion *Sedimentibacter* OTU 63, neben *Actinomycetaceae* OTU17, weitaus am stärksten vertreten waren.

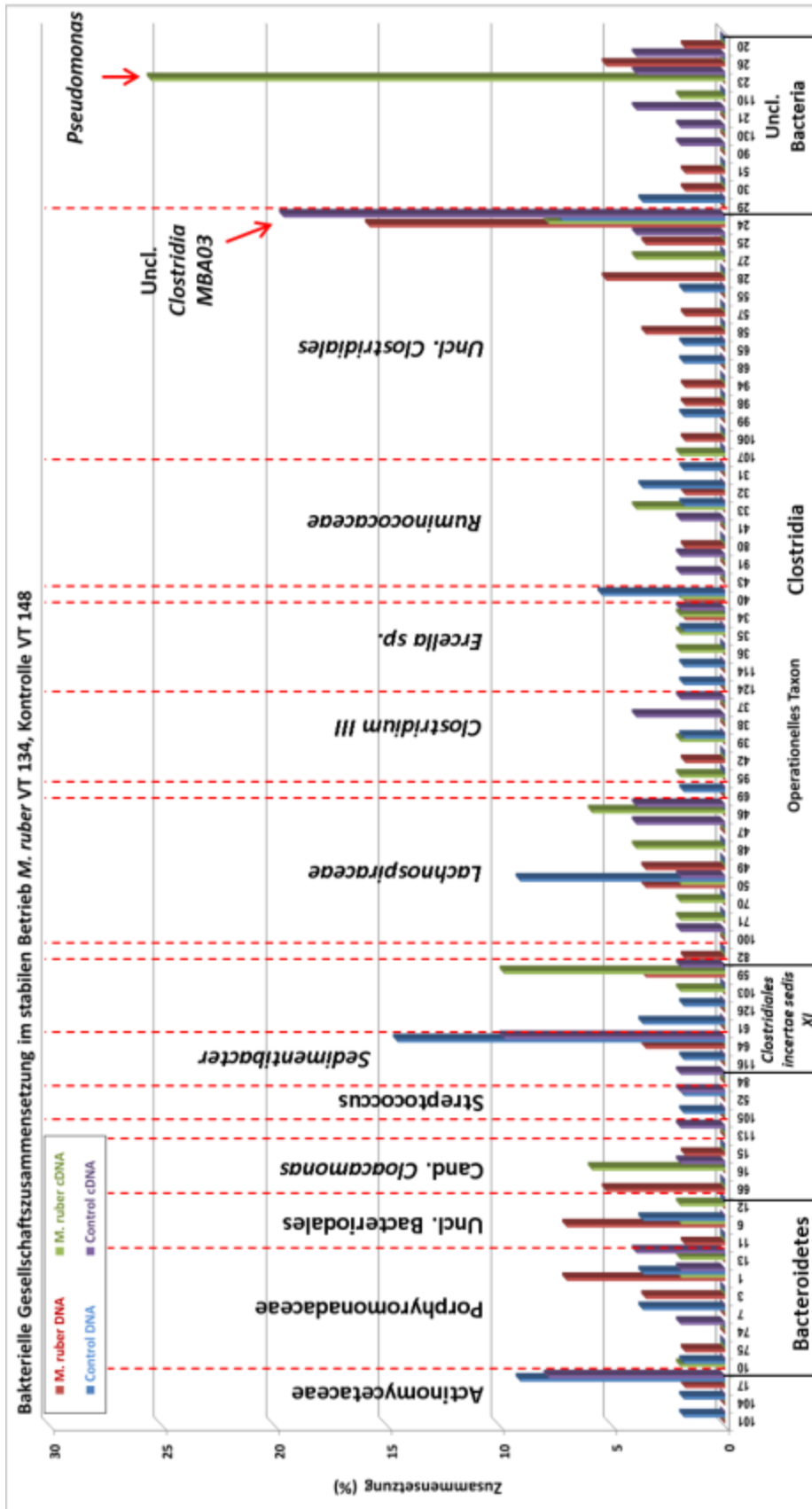


Abb. 81: *rrs* basierte bakterielle Gesellschaftszusammensetzung der mit *Monascus ruber* verschimmelter Silage gefütterten Fermenter und der Kontrolle im ersten Durchflussversuch im stabilen Betrieb

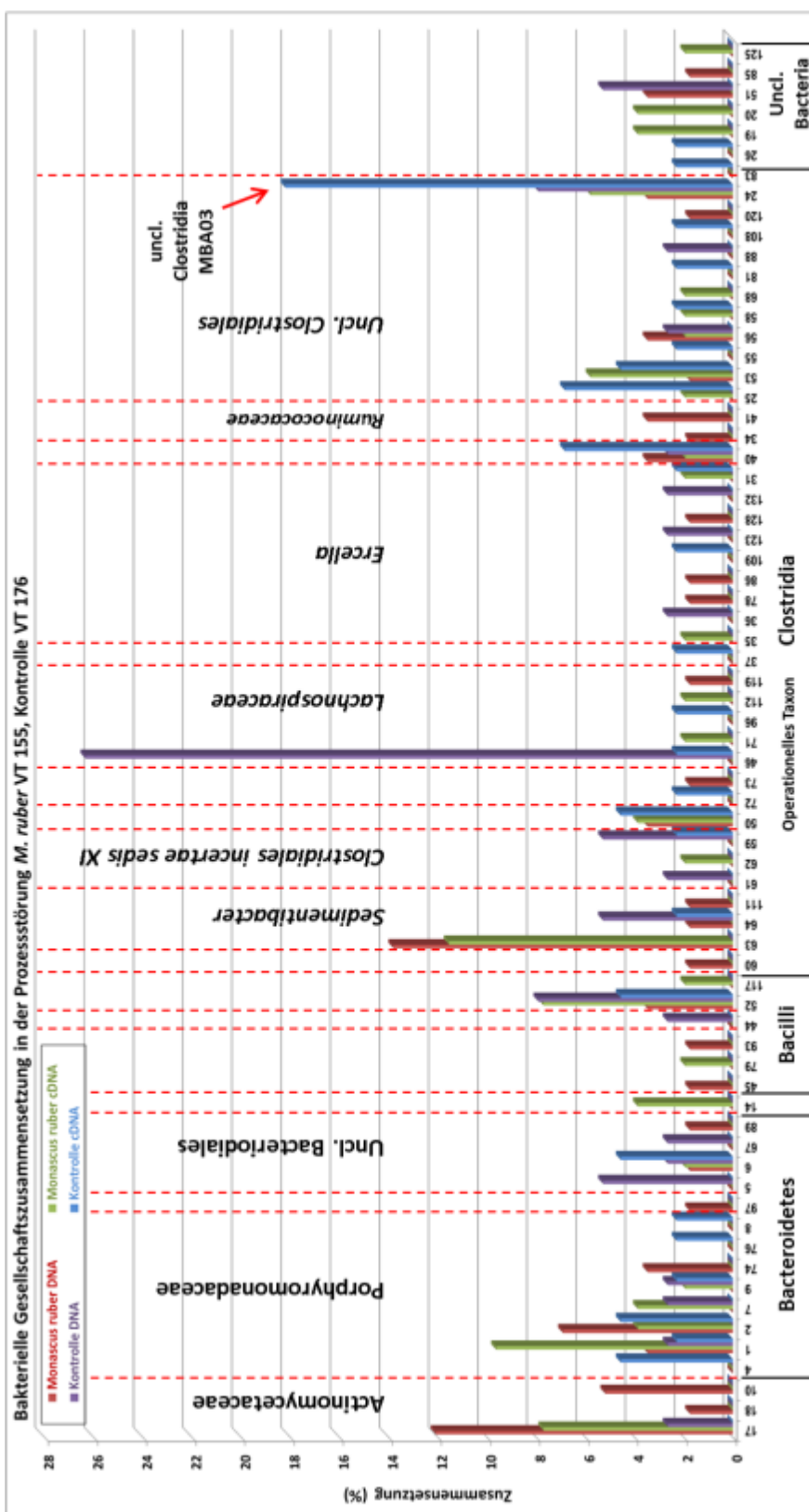


Abb. 82: *rrs* basierte bakterielle Gesellschaftszusammensetzung der mit *Monascus ruber* verschimmelter Silage gefütterten Fermenter und der Kontrolle im ersten Durchflussversuch im Prozesszusammenbruch

Weil sich die Profile in parallel betriebenen Fermentern mit der angewendeten Methodik typischerweise sehr ähneln (Lebuhn und Munk, 2015), wird in der vorliegenden Untersuchung von einer verschiedenen Entwicklung der Gesellschaftszusammensetzung aktiver *Bacteria* in den unterschiedlichen Varianten ausgegangen. Die Verschimmelung mit *M. ruber* hatte demnach die Gesellschaftszusammensetzung aktiver *Bacteria* verändert. Die Frage, ob damit auch funktionelle Änderungen eingetreten waren, lässt sich beim gegebenen Kenntnisstand nicht beantworten, da praktisch kein OTU einer beschriebenen Species der *Bacteria* mit bekannter Funktion zugeordnet werden konnte.

Hinsichtlich der beobachteten Anreicherung von Monacolin K (MYK 1 und 2) und Roquefortin C (MYK 3 und 4) (Tab. 26) bleibt noch zu bemerken, dass diese Substanzen in den Batchversuchen keine hemmende Wirkung zeigten (vgl. Abschnitt 7.2), und für Roquefortin C ergab sich trotz Anreicherung im zweiten Durchflussversuch auch kein Anhalt, dass die Substanz eine Prozessstörung auslöste (s. Abschnitte 7.3.2, 7.5.2.2).

7.5.2.2 Zweiter Durchflussversuch mit durch *Aspergillus fumigatus* verschimmelter Silage

Im zweiten Durchflussversuch wurden die Fermenter Myk6 und Myk7 mit durch *Aspergillus fumigatus* Stamm 1 verschimmelter Silage betrieben und die Fermenter Myk8 und Myk9 mit durch *A. fumigatus* Stamm 2 verschimmelter Silage. Fermenter Myk10 war die Kontrolle. Dabei wurde mit qPCR sowie mit RT-qPCR die Konzentration methanogener Archaeen (DNA-Ebene) bzw. deren mRNA-Transkripte (Assay „*mcrA/mrtA*“, Tab. 19) sowie die Konzentration von *Bacteria* (DNA-Ebene) bzw. deren rRNA-Transkripte (Assay „*rrs*“, Tab. 19) bestimmt. Hieraus ergaben sich die Metabolischen Quotienten (MQ) sowie die entsprechenden cDNA/DNA-Verhältnisse zur Beschreibung der spezifischen Transkriptionsaktivität der methanogenen Archaeen und der *Bacteria* (s. Kapitel 6.8). Die Ergebnisse für die methanogenen Archaeen finden sich in Abb. 83, Abb. 84 und Abb. 85 und die Ergebnisse für *Bacteria* in Abb. 86.

Weiterhin wurden zwei verschiedene RNA-Extraktionsroutinen („RNeasy“, „MP“, Tab. 16) mit dem Assay *mcrA/mrtA* in einem Methodenvergleich getestet. Für den Vergleich sind in Abb. 83 und Abb. 84 die nötigen Informationen dargestellt. Die Variante „RNeasy“ zeigte sich gegenüber der Variante „MP“ für die gegebene Probenmatrix überlegen: für „RNeasy“ wurden höhere cDNA-Konzentrationen gemessen (10^6 – $5 \cdot 10^7$ /ml gegenüber 0 – 10^6 /ml). Aus diesem Grund werden für die folgende Betrachtung eines Einflusses der Stämme 1 und 2 von *A. fumigatus* lediglich die Ergebnisse der Variante „RNeasy“ (Abb. 83, Abb. 85) herangezogen:

Zwischen den Varianten *A. fumigatus* Stamm 1 und 2 sowie der Kontrolle (Abb. 83a-c) ließ sich hinsichtlich der Konzentration methanogener Archaeen (DNA-Ebene) kein Unterschied feststellen, die Werte lagen durchwegs zwischen knapp 10^6 und 10^7 Kopien/ml. Solche Werte sind für einen effizienten Betrieb bei der gegebenen Raumbelastung eher gering (Munk et al., 2012; Lebuhn et al., 2014b). Dementsprechend hoch lag der Metabolische Quotient (MQ, Abb. 85a, Werte > 3,5) bereits zu Versuchsbeginn im Inokulum und wies bereits hier wohl primär infolge der geringen Co-Gehalte (Tab. 32, 40 – 50 µg/g(FM)) eine Stresssituation für die methanogenen Archaeen aus. Diese war auch erwünscht, um toxische Effekte der Verschimmelung besser darzustellen (vgl. Kapitel 6.3). Der sehr geringe Gehalt an Co, möglicherweise aber auch an anderen Mikro-/Makronährstoffen, hatte offenbar bewirkt, dass sich weder die methanogenen Archaeen noch die Bakterien der biogasproduzierenden Biozönosen bei der gegebenen Ausschwemmungsrate im Durchfluss vermehren konnten. Ihre Konzentration

schiene sie aber, wenn auch unter weiter steigendem metabolischem Stress, halten zu können.

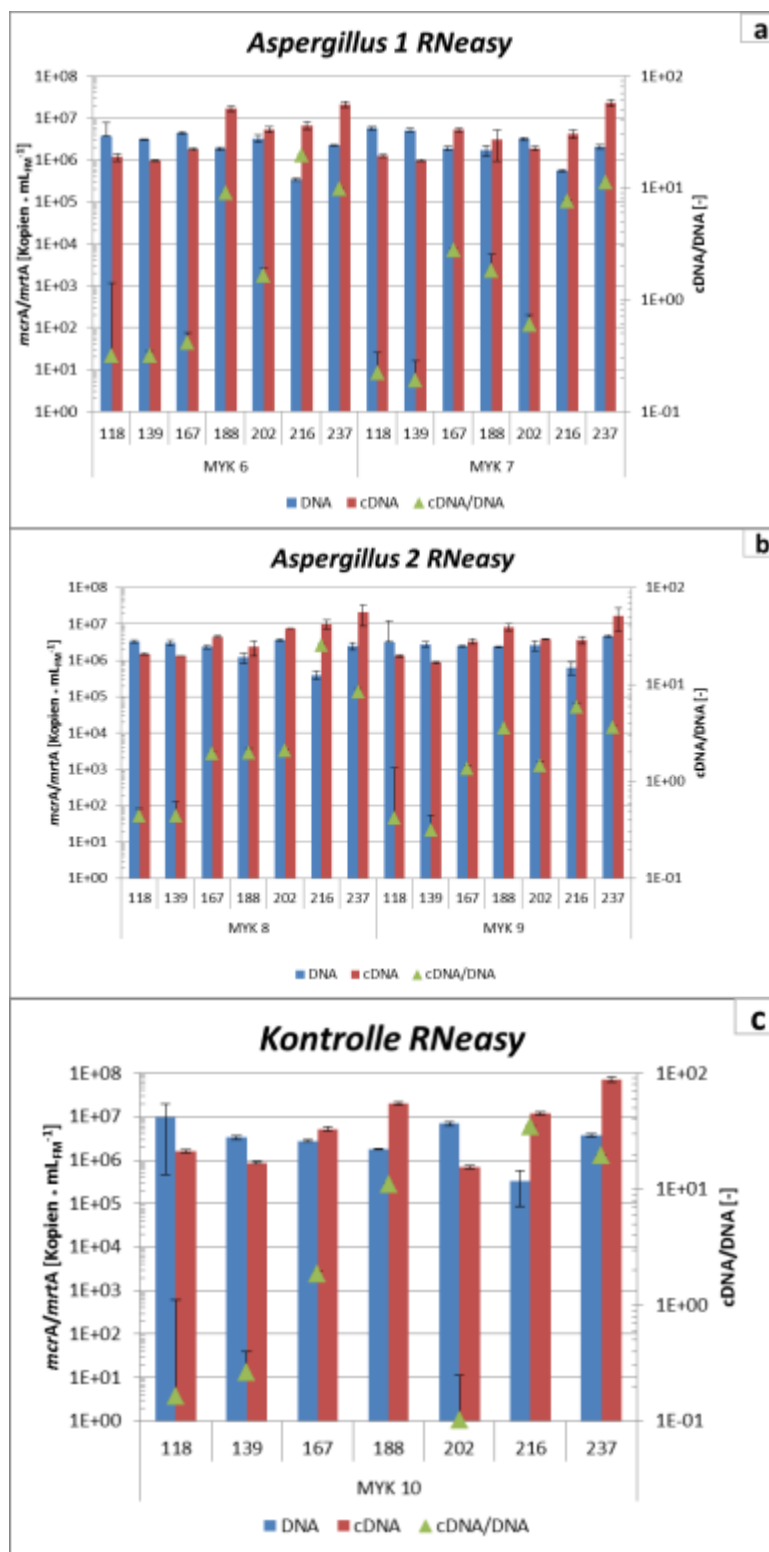


Abb. 83: *mcrA/mrtA* DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA-Verhältnis der Pilzvariante *Aspergillus fumigatus* Stamm 1 (Myk6 und Myk7, a), *A. fumigatus* Stamm 2 (Myk8 und Myk9, b) und der Kontrolle (Myk10, c); RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (RNeasy, Qiagen) extrahiert

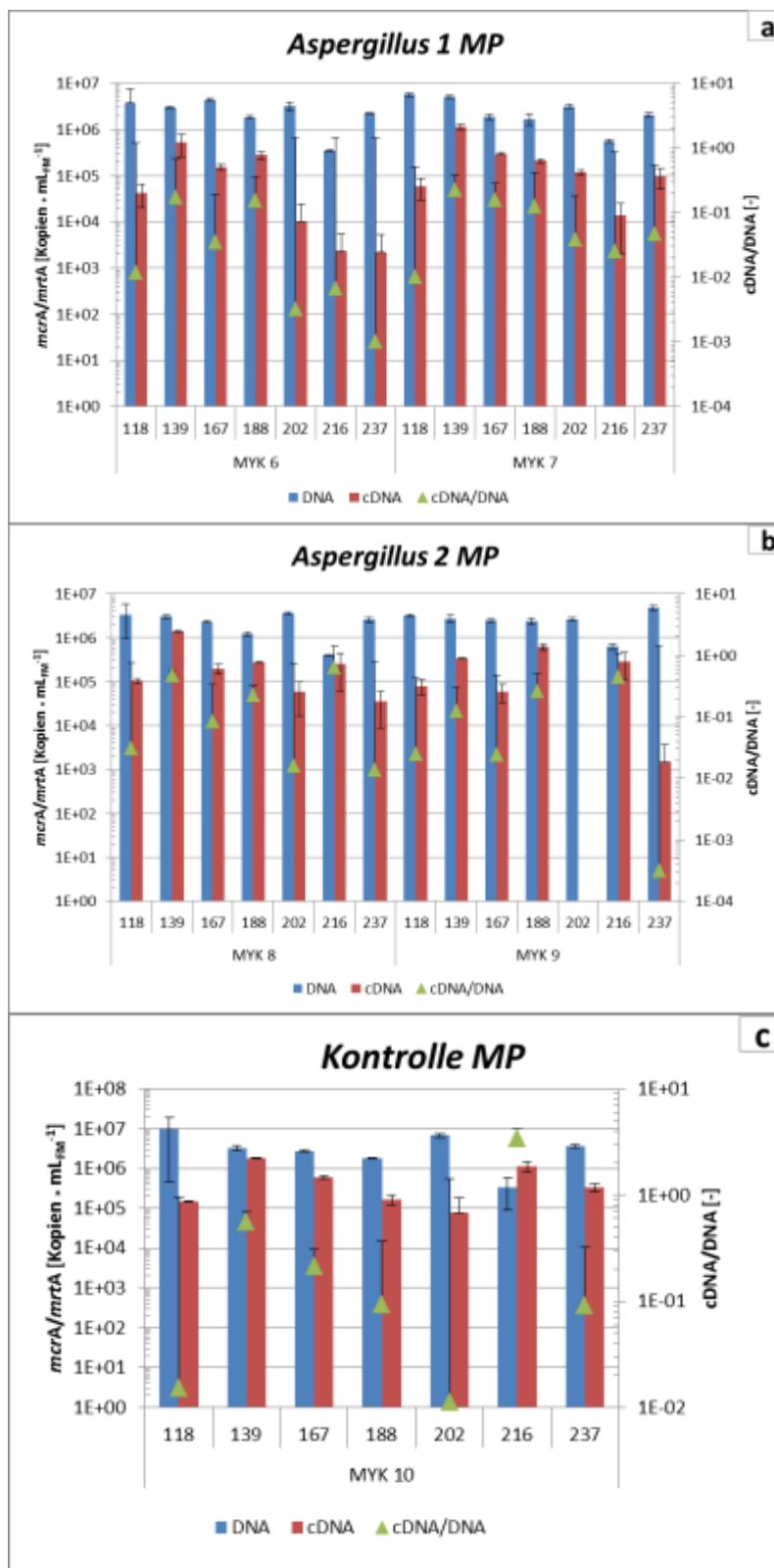


Abb. 84: *mcrA/mrtA* DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA-Verhältnis der Pilzvariante *Aspergillus fumigatus* Stamm 1 (Myk6 und Myk7, a), *A. fumigatus* Stamm 1 (Myk8 und Myk9, b) und der Kontrolle (Myk10, c); RNA wurde mit dem FastRNA® Pro Soil-Direct Kit RNeasy Mini Kit (MP) extrahiert

Mit der erhöhten organischen Raumbelastung stieg in der Folge die Methanproduktivität (Abb. 85b) in allen Fermentern in gleicher Weise an, und der MQ erreichte ebenfalls in allen Fermentern abnorm hohe Werte (220 – 610, Abb. 85a). Zwischen VT188 und VT202 ging der MQ vorübergehend in allen Fermentern leicht zurück (vgl. Diskussion unten für cDNA), und nach dem VT216 wies die starke Abnahme des MQ in allen Fermentern auf einen anstehenden Prozesszusammenbruch hin. Die ebenfalls in allen Fermentern in etwa gleicher Weise deutlich angestiegenen FOS/TAC-Werte und Propionsäuregehalte (Abb. 68, Abb. 69, Abb. 70) stützen diese Interpretation.

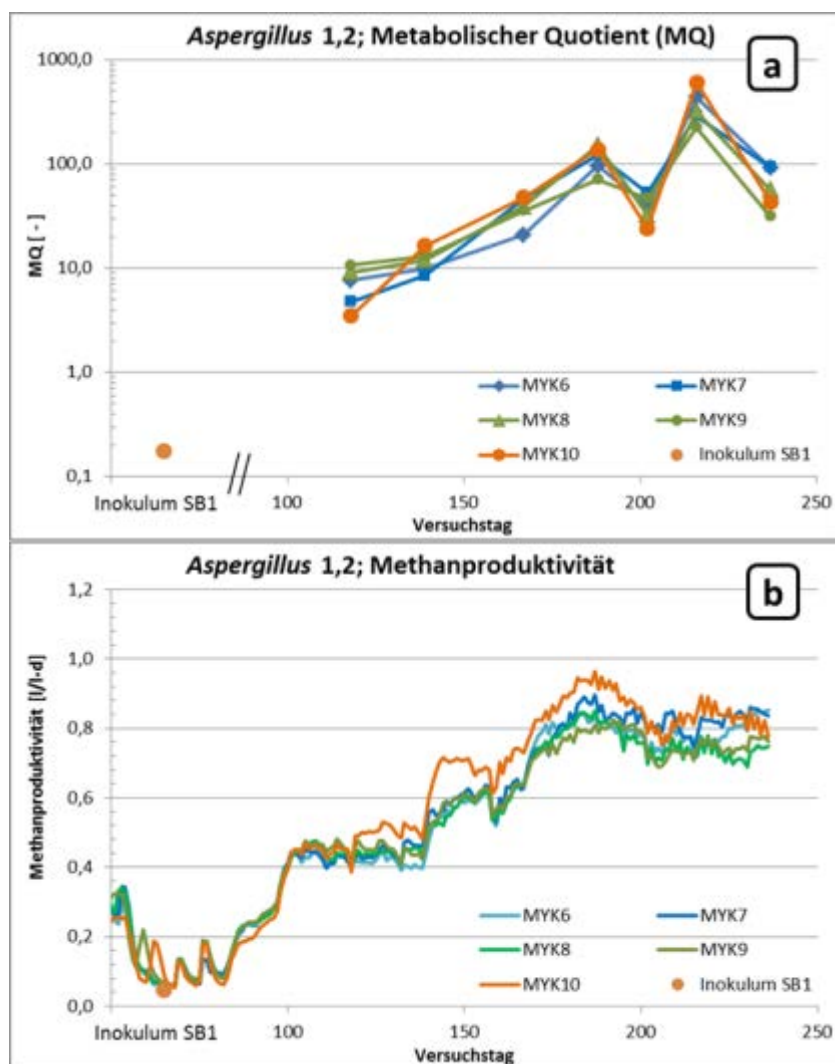


Abb. 85: Verlauf der Metabolischen Quotienten (MQ) der methanogenen Archaeen (a) und der Methanproduktivität (b) im Durchflussversuch 2 mit den Varianten *Aspergillus fumigatus* Stamm 1 (Myk6 und Myk7), *A. fumigatus* Stamm 2 (Myk8 und Myk9), und der Kontrolle (Myk10) sowie dem Wert für das Inokulum (SB1)

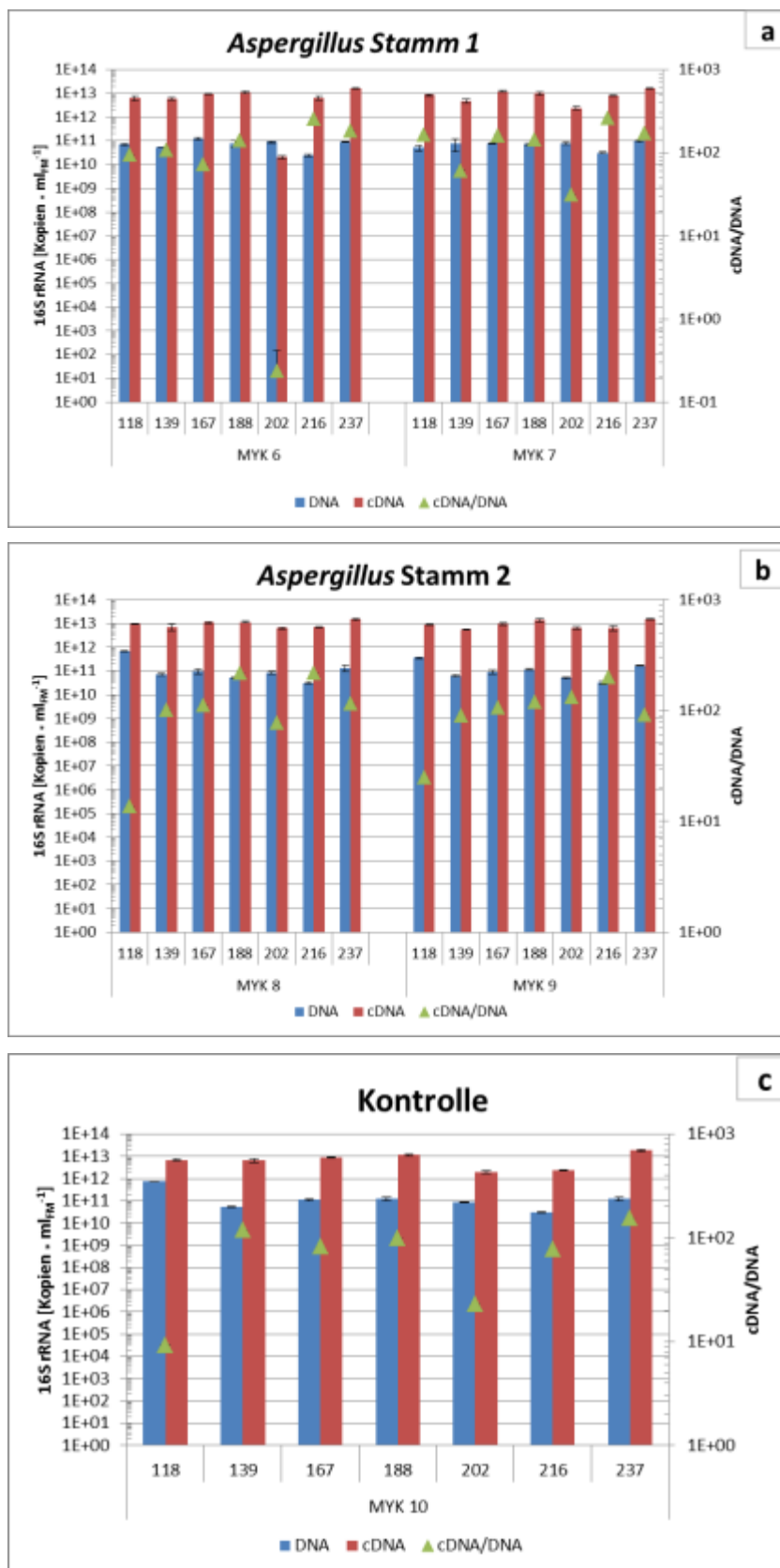


Abb. 86: *rrs* DNA- und cDNA-Konzentration sowie cDNA/DNA-Verhältnis der Pilzvariante *Aspergillus fumigatus* Stamm 1 (Myk6 und Myk7, a), *A. fumigatus* Stamm 1 (Myk8 und Myk9, b) und der Kontrolle (Myk10, c); RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (RNeasy, Qiagen) extrahiert

Auch die Konzentration der *mcrA/mrtA*-Transkripte (cDNA) stieg in allen Varianten zum Versuchsende hin etwa um den Faktor 10 an, und dementsprechend entwickelten sich wegen der praktisch konstanten DNA-Konzentrationen auch die cDNA/DNA-Verhältnisse (Abb. 83). Eine Ausnahme bildeten die Ergebnisse vom VT202 mit praktisch durchwegs niedrigen cDNA-Werten. Da dieses Phänomen in ähnlicher Weise auch in den „MP“-Extrakten zu finden war (Abb. 84), ist nicht von einer ungenügenden RNA-Extraktion an diesem Tag auszugehen. Gleichzeitig gingen auch die MQ-Werte und die Methanproduktivität (Abb. 85) sowie auch die *rrs*-cDNA/DNA-Verhältnisse der *Bacteria* (Abb. 86) vorübergehend zurück. In diesem Zusammenhang weist der starke Anstieg der Essig- und Propionsäuregehalte am VT202 in allen Varianten auf eine Störung im Metabolismus der kurzkettigen Fettsäuren hin. Wir vermuten, dass vor allem bestimmte syntrophe Propionat-Oxidierer der *Bacteria* gehemmt wurden, und dass die Methanogenen daher vorübergehend weniger mit H₂ und CO₂ für den Energie- und Zellstoffwechsel versorgt wurden. Dies kann den vorübergehenden Rückgang des MQ und der *mcrA/mrtA*-cDNA/DNA-Verhältnisse am VT202 erklären.

Untersuchungen auf die Zusammensetzung der methanogenen Archaeen und der *Bacteria* wurden nicht durchgeführt, weil die Ergebnisse keinen Anhalt boten, dass sich die Varianten mit *A. fumigatus* und die Kontrolle unterschieden.

Hinsichtlich eventueller Effekte einer Verschimmelung von Maissilage mit *A. fumigatus* auf die Biogasproduktion lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Ergebnisse keinen Anhalt für eine Prozesshemmung lieferten, da der Prozess in den verschimmelten Varianten und in der Kontrolle annähernd gleichförmig verlief. Es ist von daher zwar unwahrscheinlich, dass der Einsatz von mit *A. fumigatus* verschimmelter Maissilage in der Praxis die Biogasproduktion beeinträchtigt, allerdings sollten noch weitere *A. fumigatus*-Stämme mit potenterer Aflatoxinproduktion untersucht werden.

8 Schlussfolgerungen und Ausblick

In den hier vorgestellten Untersuchungen wurden zum einen relevante Mykotoxine als Reinsubstanzen in Batchassays hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Biogasprozess getestet. Dabei zeigte sich lediglich für Mykophenolsäure (50 mg/l) reproduzierbar eine leichte Hemmung. Zum anderen wurde die Wirkung von mit *Monascus ruber*, *Penicillium roquefortii* und *Aspergillus fumigatus* infizierten Maissilagen im Durchflussbetrieb untersucht, um der Situation in der Praxis möglichst nahezukommen. Dabei wurden die Prozesse mit einem Spurenelementmangel belastet, um hemmende Effekte durch Substanzen in den verschimmelten Silagen oder deren Abbauprodukte früher und sensitiver zu erkennen. Die Varianten mit *M. ruber* und *P. roquefortii* zeigten etwas früher als die Kontrolle Prozessstörungssymptome, die Effekte waren aber weitaus weniger massiv als nach manchen Praxisberichten und einzelnen Beobachtungen erwartet. Bemerkenswerterweise reicherten sich Monacolin K_S und Roquefortin C in den Gärgemischen an. Die molekularbiologische Analytik, insbesondere der Metabolische Quotient, war zur Früherkennung der Prozessstörungen dienlich und gestattete im Zusammenspiel mit der chemisch/physikalischen Analytik eine präzise Prozessdiagnose.

Weder die untersuchten Toxine als Reinsubstanzen noch die artifiziell verschimmelten Silagen induzierten also eine schwerwiegende Prozessstörung. Allerdings kann hieraus nicht geschlossen werden, dass jede verschimmelte Silage problemlos in einer Biogasanlage energetisch genutzt werden kann. Für eine derartige Aussage bedarf es noch weiterer Untersuchungen:

Es sollte zum einen geprüft werden, ob andere Sekundärmetaboliten ggf. von anderen Schimmelpilzen schwerwiegende Störungen auslösen können. Hier wäre z.B. von Interesse, ob Mykophenolsäure, die im Batchansatz wiederholt hemmend wirkte, auch im Durchflussbetrieb eine Prozessstörung auslöst. Weiterhin sollte getestet werden, ob eine Verschimmelung mit *Neurospora crassa*, die weit verbreitet auftritt aber nicht für Mykotoxinproduktion bekannt ist, inhibierend auf den Biogasprozess wirkt. Es erscheint auch eminent wichtig, den Einfluss verschimmelter Grassilage zu untersuchen. Hier ergab sich bei einer Voruntersuchung eine drastische Prozesshemmung (Lebuhn et al., 2016). Der Hemmstoff zeigte sich hitzelabil, eine tiefergehende Analytik war aber nicht möglich. In Fällen einer schwerwiegenden Prozessstörung sollte daher versucht werden, den verantwortlichen Störstoff (ggf. mehrere) zu identifizieren und die Ursachenkette zu klären.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob durch die Anreicherung bestimmter Toxine oder Störstoffe während des Gärprozesses ein hygienisch-toxikologisches Risiko bei der Gärrestausrückung entsteht. Wenn gezeigt ist, dass eine in bestimmter Weise verschimmelte Silage keine Prozessstörung verursacht und die Silage nicht dem Abfallrecht unterliegt, kann diese gewinnbringend für die Biogasproduktion eingesetzt werden. Wenn sie dem Abfallrecht unterliegt wäre eine energetische Nutzung im Biogasprozess zumindest denkbar, wenn der Gärrest mit den Gefahrstoffen sachgerecht entsorgt wird.

9 Veröffentlichungen und Ausbildungen im Rahmen dieses Projektes

9.1 Masterarbeiten

9.1.1 Masterarbeit Michael Salmen

Michael Salmen (2016): Einfluss verpilzter Substrate auf den Biogasprozess und die hygienische Beschaffenheit der Gärflüssigkeit in einem semikontinuierlichen Durchflussversuch

Masterarbeit an der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Tierhygiene. Betreuung: Dr. Karsten Meyer (TUM), Mathias Hartel (LFL-ILT)

9.1.2 Masterarbeit Kerstin Patricia Kiener

Kerstin Patricia Kiener (2014): Methodenentwicklung zum Nachweis von Mykotoxinen im Gärrest und deren Verhalten in Minibatch-Systemen

Masterarbeit an der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Tierhygiene. Betreuung: Dr. Karsten Meyer (TUM)

9.2 Veröffentlichungen, Vorträge und Poster

V. Dollhofer, B. Munk, M. Hartel, M. Salmen, K. Harms, J. Ostertag, F. Lichti, K. Meyer, M. Lebuhn (in Vorbereitung): Effects of *Monascus ruber* and *Penicillium roquefortii* infected maize silage on biogas production

M. Hartel (2017): Einfluss verpilzter Einsatzstoffe auf den Biogasprozess und die hygienischen Eigenschaften von Gärresten. Abstract und Vortrag. In: 129. VDLUFA-Kongress - Standortgerechte Landnutzung - umweltverträglich und wirtschaftlich, 12. - 15. September 2017, Freising, Deutschland. (siehe Anhang 10.2.1)

M. Hartel, F. Lichti, M. Lebuhn, B. Munk, V. Dollhofer, K. Harms, K. Meyer, J. Ostertag, M. Schneider (2017): Einfluss von verschimmelter Silage auf den Biogasprozess. Abstract und Poster. In: 11. Rostocker Bioenergieforum am 22. und 23. Juni 2017, Rostock, Deutschland (siehe Anhang

V. Dollhofer, B. Munk, M. Hartel, M. Salmen, K. Harms, J. Ostertag, F. Lichti, K. Meyer, M. Lebuhn (2017): Effects of mycotoxins and molded maize silage on biogas production. Abstract und Vortrag. In: 3rd International Conference on Biogas Microbiology, ICBM-3 Abstract Book, May 1-3 2017, Wageningen, The Netherlands. (siehe Anhang 10.2.2)

M. Hartel, F. Lichti, M. Lebuhn, B. Munk, V. Dollhofer, K. Harms, K. Meyer, J. Ostertag and M. Schneider (2017): Studies on the influence of moulded feedstocks on the biogas process and the mycotoxicological status of digestates. In: Proceedings of the III. Conference on Monitoring & Process Control of Anaerobic Digestion Plants, March 29 - 30, 2017, Leipzig, Germany, p. 53, https://www.energetische-biomassenutzung.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Ver%C3%B6ffentlichungen/CMP_2017_web.pdf

V. Dollhofer, B. Munk, M. Hartel, M. Salmen, K. Harms, D. Schneider, M. Schneider, J. Ostertag, F. Lichti, K. Meyer, M. Lebuhn (2016): Einfluss verpilzter Einsatzstoffe auf den Biogasprozess und die hygienische Beschaffenheit von Gärresten („Schimmelsubstrat“). Vortrag beim Biogs Jour Fixe 2016, StMELF, München, Deutschland

K. Harms, J. Ostertag, M. Lebuhn, B. Munk, M. Hartel, F. Lichti, K. Meyer (2016): Investigations on the influence of mycotoxins on biogas production. Abstract und Vortrag. In: 38th Mycotoxin Workshop, May 02 – 04 2016, Berlin, Deutschland

M. Lebuhn, B. Munk, V. Dollhofer und E. Madge-Pimentel (2016): Einfluss verpilzter Einsatzstoffe auf den Biogasprozess und die hygienische Beschaffenheit von Gärresten. In: AQU-Jahresbericht 2015, 70-74,
http://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/zentrale_analytik/dateien/lfl_aqu-jahresbericht-2015.pdf

J. Ostertag (2015): Schimmelsubstrat, Vortrag beim Biogs Jour Fixe 2015, StMELF, München, Deutschland

J. Ostertag (2015): Einfluss verpilzter Einsatzstoffe im Biogasprozess - Projektvorstellung, LFL, Freising, Deutschland

10 Anhang

10.1 Ergebnisse der Spurenelementanalysen

Tab. 31: Ergebnisse der Spurenelementanalysen vor Beginn und nach Beendigung des Durchflussversuchs 2015_001

Versuch 2015_001		Versuchsstart		Versuchsende				
				Monascus		Penicillium	Kontrolle	
Probenahmedatum		19.01.2015		22.06.2015		13.07.2015		
		Inokulum	Silage	MYK1	MYK2	MYK3	MYK4	MYK5
Calcium (Ca)	mg/kg (FM)	1000,00	812,00	933,00	924,00	787,00	877,00	866,00
Phosphor (P)	mg/kg (FM)	751,00	838,00	809,00	795,00	690,00	797,00	771,00
Natrium (Na)	mg/kg (FM)	33,00	65,00	36,60	35,90	42,90	41,90	39,80
Magnesium (Mg)	mg/kg (FM)	505,00	655,00	566,00	560,00	492,00	552,00	535,00
Kalium (K)	mg/kg (FM)	4570,00	4110,00	5260,00	5420,00	4660,00	4730,00	4820,00
Schwefel (S)	mg/kg (FM)	342,00	440,00	343,00	350,00	323,00	355,00	338,00
Aluminium (Al)	mg/kg (FM)	24,60	19,10	19,50	21,10	19,50	20,10	28,10
Nickel (Ni)	mg/kg (FM)	0,31	0,08	1,07	1,05	2,10	0,71	1,16
Kobalt (Co)	mg/kg (FM)	0,02	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04
Molybdän (Mo)	mg/kg (FM)	0,34	0,18	0,35	0,35	0,28	0,32	0,31
Selen (Se)	mg/kg (FM)	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Eisen (Fe)	mg/kg (FM)	44,40	36,00	40,50	39,80	32,60	36,90	51,00
Mangan (Mn)	mg/kg (FM)	5,84	7,93	6,20	6,02	5,57	5,91	6,10
Kupfer (Cu)	mg/kg (FM)	1,96	1,63	11,20	11,60	4,69	11,90	7,16
Zink (Zn)	mg/kg (FM)	11,60	7,54	18,50	18,50	11,20	19,00	13,90
Bor (B)	mg/kg (FM)	1,82	2,00	1,75	1,79	1,54	1,75	1,69
Vanadium (V)	mg/kg (FM)	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,08

Tab. 32: Ergebnisse der Spurenelementanalysen vor Beginn und nach Beendigung des Durchflussversuchs 2015_005

Versuch 2015_005		Inokulum	Versuchsstart	Versuchsende				
				Aspergillus 1		Aspergillus 2		Kontrolle
Probenahmedatum		20.10.15	15.02.16	13.06.16		13.06.16		13.06.16
Fermenter		SB1	MYK A_B	MYK6	MYK7	MYK8	MYK9	MYK10
Calcium (Ca)	mg/kg (FM)	886,00		915,00	983,00	960,00	955,00	927,00
Phosphor (P)	mg/kg (FM)	567,00	0,21	783,00	818,00	815,00	809,00	799,00
Natrium (Na)	mg/kg (FM)	24,10	0,22	25,30	26,60	26,40	24,50	25,80
Magnesium (Mg)	mg/kg (FM)	369,00	0,21	560,00	589,00	583,00	571,00	574,00
Kalium (K)	mg/kg (FM)	4230,00	0,21	4950,00	5010,00	5080,00	4860,00	4990,00
Schwefel (S)	mg/kg (FM)	305,00		373,00	408,00	370,00	384,00	363,00
Aluminium (Al)	mg/kg (FM)	18,10		17,90	19,90	18,80	18,30	18,40
Nickel (Ni)	mg/kg (FM)	0,30		1,25	2,29	1,16	1,15	3,23
Kobalt (Co)	mg/kg (FM)	0,02		0,04	0,05	0,04	0,04	0,05
Molybdän (Mo)	mg/kg (FM)	0,40		0,32	0,34	0,30	0,32	0,34
Selen (Se)	mg/kg (FM)	0,01		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Eisen (Fe)	mg/kg (FM)	35,40		38,40	41,40	40,70	39,20	35,80
Mangan (Mn)	mg/kg (FM)	4,52		8,59	8,95	8,96	8,81	8,72
Kupfer (Cu)	mg/kg (FM)	1,91		8,38	10,40	7,16	6,59	11,00
Zink (Zn)	mg/kg (FM)	11,10		14,70	15,70	14,40	13,80	15,40
Bor (B)	mg/kg (FM)	1,63		1,75	1,88	1,86	1,77	1,82
Vanadium (V)	mg/kg (FM)	0,05		0,04	0,05	0,04	0,04	0,05

10.2 Veröffentlichungen

10.2.1 Manuskript zum Vortrag auf dem 129. VDLUFA-Kongress Standortgerechte Landnutzung - umweltverträglich und wirtschaftlich in Freising (M. Hartel *et al.* 2017)

Einfluss verpilzter Einsatzstoffe auf den Biogasprozess und die hygienischen Eigenschaften von Gärresten

Hartel, M.

Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft Freising

Die Kombination aus Tierhaltung und Biogasproduktion, sowie die aktuelle Forderung verstärkt Reststoffe als Einsatzstoff zu nutzen bietet nicht nur aus umweltrelevanter Sicht verschiedene Vorteile. So ermöglicht beispielsweise die Biogastechnologie eine weiterhin gesicherte Verwendung von für die Fütterung ungeeigneten Materials. Hinweise aus der Praxis deuten jedoch darauf hin, dass verpilzte Silagen den Biogasprozess beeinträchtigen können. Die dabei gebildeten Sekundärmetabolite können sowohl toxische als auch antibiotisch wirksame Substanzen enthalten. Der Metabolismus im komplexen Biogasprozess und Verbleib im Gärrest ist jedoch weitgehend unbekannt.

Die durchgeführte Untersuchung der Reinsubstanzen im Minibatch-System verdeutlichen, dass die Effekte einer Zugabe von Toxinen vom Zustand des Fermenter Inhaltes abhängen können und die Konzentration des zugegebenen Stoffes von Bedeutung ist. Dabei zeigte nur die Mykophenolsäure im Bereich der ausgewählten Konzentrationen einen inhibierenden Effekt auf die Biogasproduktion. In den Belastungstests zeigte die Variante *Monascus ruber* als erste eine Prozessstörung auf, gefolgt von *Penicillium roqueforti*. In den verwendeten Silagen konnte vor allem die Bildung der Mykotoxine Monakolin KS+KL und Roquefortin C festgestellt werden. Die begleitende Untersuchung der Gärreste ergab sowohl für Monakolin KS+KL, als auch für Roquefortin C eine Zunahme der Konzentration über den gesamten Versuchsverlauf. *Aspergillus fumigatus* konnte ohne Prozessstörung betrieben werden. Die weiteren Ergebnisse zur Gaszusammensetzung, nasschemischen Analyseparameter und den mikrobiologischen Analysen zeigten keine Unterschiede zwischen den getesteten Varianten und den Kontrollen, können somit keine Erklärung für den Einbruch der Methanproduktivität liefern.

Das Projekt wird vom Bayerischen Staatsministerium für Wirtschaft und Medien, Energie und Technologie gefördert

10.2.2 Manuskript zum Poster und Poster auf dem 11. Rostocker Bioenergieforum, Rostock, Deutschland (M. Hartel *et al.* 2017)

Einfluss von verschimmelter Silage auf den Biogasprozess

Mathias Hartel, Fabian Lichti, Michael Lebuhn, Bernhard Munk, Veronika Dollhofer, Katrin Harms, Karsten Meyer, Johannes Ostertag, Mariana Schneider

Zusammenfassung: Die Gesamteffizienz einer Biogasanlage kann bereits reduziert sein, wenn Substratverluste bis zur Einbringung in den Fermenter entstehen. Durch fehlerhafte Silierung können diese Verluste beträchtliche Ausmaße erreichen. Zusätzlich zum reinen Masseverlust bilden sich oftmals auch Schimmelpilze. Die dabei gebildeten Stoffwechselprodukte können toxisch oder antibiotisch wirksame Substanzen enthalten, die im Verdacht stehen einzelne Schritte im Biogasprozess zu beeinflussen. Die Forderung nach einer stärkeren Ausschöpfung der Nutzungsmöglichkeiten durch den Einsatz anfallender Reststoffe verschärft die Möglichkeit hierdurch vermehrt belastetes Material einzusetzen. Hierdurch könnten zusätzliche Stoffströme dafür sorgen, den Biogasprozess nachhaltig zu beeinflussen. Die Untersuchungen mit ausgewählten Mykotoxinen erfolgten im Minibatchverfahren und mit artifiziell verschimmelten Silagen in Durchflussfermentern.

Summary: High-quality substrates are the basis of optimal biomass utilization in biogas plants and contribute significantly to the efficiency of the overall system. There are indications that silage spoiled by mycotoxin producing fungi can affect the biogas process. In addition to mass loss by microbial degradation, the secondary metabolites formed by moulds may affect the activity of the microorganisms in biogas plants. In order to test this, activity tests were conducted with selected mycotoxins and continuous process fed with differently moulded silages were analysed. Analyses comprised of Biogas production, effects on the methanogenic biocenosis at the molecular level and the fate of mycotoxins in digestate.

Einleitung: Bei Silagen kann es durch fehlerhafte Silierung neben dem reinen Masseverlust durch mikrobiellen Abbau auch zur Bildung von Sekundärmetaboliten durch das Wachstum von Schimmelpilzen kommen. Diese Substanzen können sowohl toxische als auch antibiotische Wirkungen zeigen (Mitchell *et al.*). Die gebildeten Mykotoxine stehen im Verdacht, die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen in Biogasanlagen beeinträchtigen zu können und somit möglicherweise die Effizienz einer Anlage zu beeinflussen (Richter *et al.*, Morgavi *et al.*). Zudem ist der Einsatz verschimmelten Materials nicht nur aus energetischer Hinsicht kritisch zu betrachten. Neben Stoffwechselprodukten wie Aflatoxin B1, die in zugekauften Futtermitteln enthalten sein können, sind viele Pilzgifte von Lagerschimmelpilzen für höhere Organismen toxisch. Deren Metabolismus im komplexen Biogasprozess und der Verbleib im Gärrest sind jedoch weitgehend unbekannt.

Material und Methoden: Für die Prüfung des Einflusses von Mykotoxinen auf die Stabilität des Biogasprozesses wurden zunächst im Minibatchsystem verschiedene Mykotoxine in Reinform getestet und die Auswirkung auf die Aktivität verschiedener Gärgemische abgebildet. Hierzu wurden im Wasserbad 100 g Inokulum unter Zugabe der Toxine in unterschiedlichen Konzentrationen bei 38 °C über 25 Tage inkubiert. Die Biogasproduktivität als ein Parameter des Biogasprozesses wurde dabei kontinuierlich mit Hilfe von automatischen Drucktransmittern (ATM/N, STS) und die Gaszusammensetzung regelmäßig am Gaschromatographen analysiert.

Für die Belastungstests im Durchflussverfahren sind im Vorfeld Maissilagen mit den Toxinbildenden Schimmelpilzen *Monascus ruber*, sowie *Penicillium roqueforti* artifiziiell verschimmelt worden. In Anlehnung an die VDI 4630 (Anonymus) sind anschließend 36 Liter fassende Durchflussfermenter mit verschimmelter Silage kontinuierlich gefüttert worden. Die dabei produzierte Biogasmenge wurde nach einem automatisierten Verfahren erfasst und in regelmäßigen Abständen auf die Zusammensetzung untersucht.

Die getesteten Varianten wurden versuchsbegleitend molekularbiologisch untersucht und hinsichtlich einer möglichen Beeinträchtigung durch die Mykotoxine auf mikrobiologische Prozessindikatoren untersucht. Um Aussagen über die Stabilität der Substanzen in den durchgeführten Versuchen treffen zu können, wurden die Gärreste mittels LC-MS auf den Gehalt an Mykotoxinen untersucht.

Ergebnisse: Die Ergebnisse zu den Untersuchungen der Reinsubstanzen im Minibatchsystem deuten an, dass Effekte vom Zustand des Fermenterinhaltens abhängen können und die Konzentration des zugegebenen Stoffes von Bedeutung ist. Von den untersuchten Mykotoxinen in Reinform zeigte bisher lediglich die Mykophenolsäure eine signifikante, konzentrationsabhängige Hemmung auf die Biogasproduktion (Abb.1.).

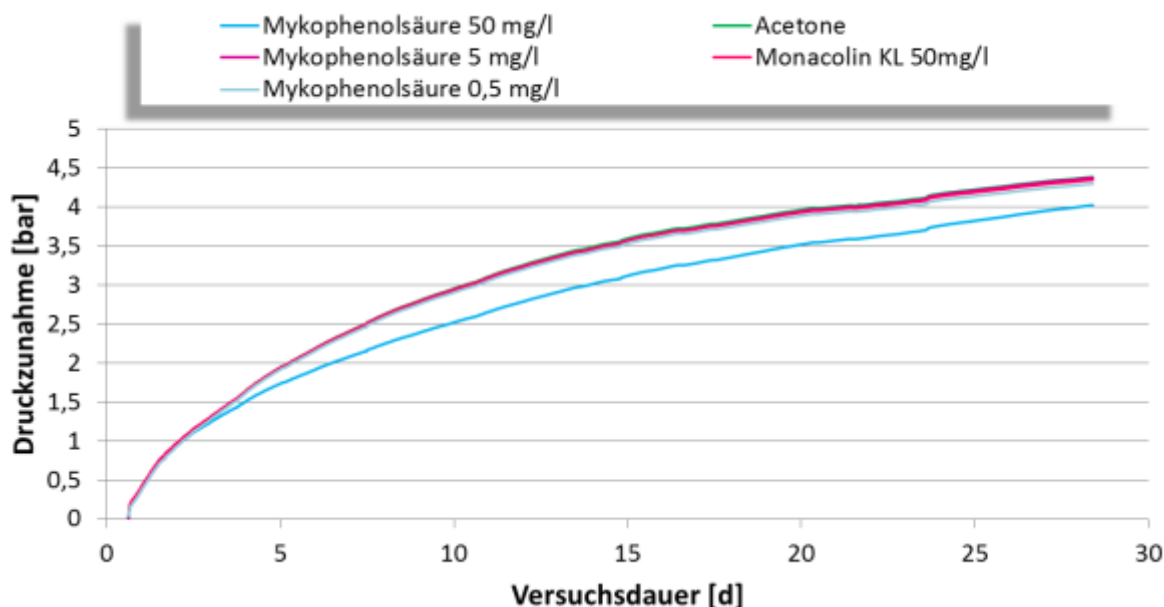


Abb.1.: Verlauf der aufsummierten Biogasmengen nach Zugabe von Mykophenolsäure in unterschiedlichen Konzentrationen

Die molekularbiologischen Untersuchungen lieferten allerdings bisher auch auf der Ebene der Transkription keine Erklärung für die reduzierte Gasproduktion.

In den Belastungstests zeigte die Variante *Monascus ruber* als erste eine Prozessstörung auf, gefolgt von *Penicillium roqueforti*. In den verwendeten Silagen konnte vor allem die Bildung der Mykotoxine Monakolin KS+KL und Roquefortin C festgestellt werden (Abb.2.). Die begleitende Untersuchung der Gärreste ergab sowohl für Monakolin KS+KL, als auch für Roquefortin C eine Zunahme der Konzentration über den gesamten Versuchsverlauf. Die weiteren Ergebnisse zur Gaszusammensetzung, zu nasschemischen Analyseparametern und den mikrobiologischen Analysen zeigten keine Unterschiede zwischen den getesteten Varianten und den Kontrollen, können somit keine Erklärung für den Einbruch der Methanproduktivität liefern.

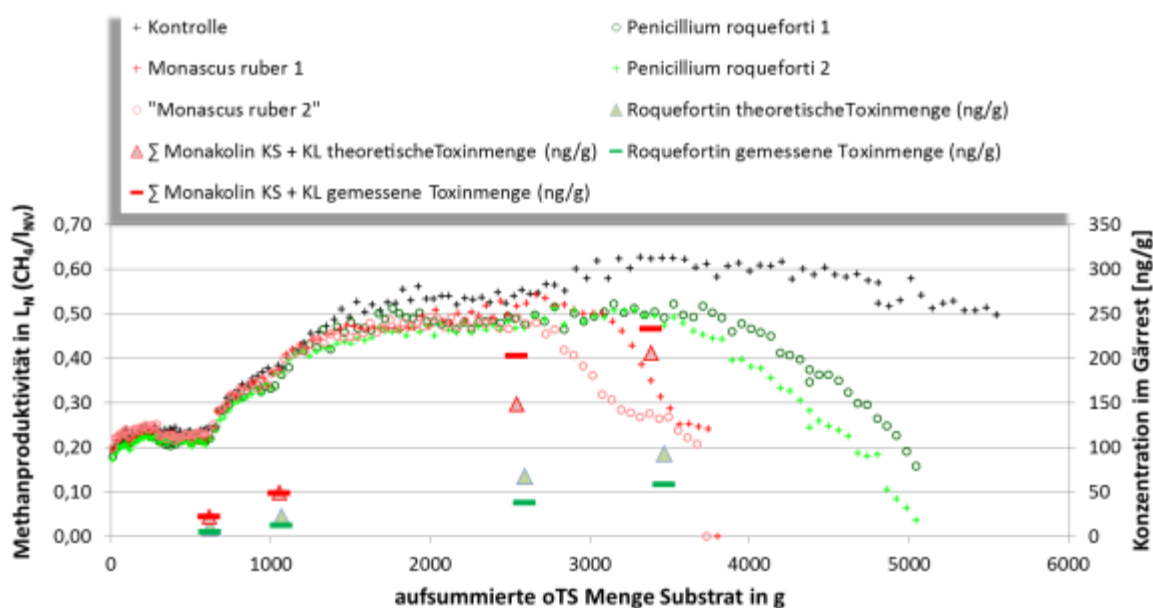


Abb.2: Darstellung der Entwicklung der Methanproduktivität der getesteten Varianten *Monascus ruber* und *Penicillium roqueforti* zur unbehandelten Kontrolle und die theoretisch zugeführten Toxinmengen im Vergleich zu den gemessenen Werten in den Gärresten im Versuchsverlauf

Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der chemischen und molekularbiologischen Analysen lieferten auch Durchflussversuche mit *Aspergillus fumigatus* kontaminierten Maissilagen. Allerdings konnten hier die getesteten Varianten im Versuchszeitraum ohne Prozessstörung betrieben werden.

Das Vorhaben wird vom Bayerischen Staatsministerium für Wirtschaft und Medien, Energie und Technologie gefördert.

Literatur:

Anonymus (2016): Vergärung organischer Stoffe - Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche. VDI Richtlinie 4630, Verein deutscher Ingenieure.

Mitchell Shannon M., Ullman Jeffrey L., Teel Amy L., Watts Richard J., Frear Craig (2013): The effects of the antibiotics ampicillin, florfenicol, sulfamethazine and tylosin on biogas production and their degradation efficiency during anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 149. 244-252.

Morgavi D.P., Martin C, Boudra H, (2013): Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. Reduce rumen methane orpduction in vitro and in vivo. *Journal Of Animal Science* 2013.91:848-860

Richter W., Zimmermann N., Abriel M., Schuster M., Kölln-Höllrigl K., Ostertag J., Meyer K., Bauer J., Spiekers H., (2009): Hygiene bayerischer Silagen – Controlling am Silo. Schriftenreihe, Nr. 9, Hrsg: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Einfluss von verschimmelter Silage auf den Biogasprozess
 Mathias Hartel¹, Fabian Lichti¹, Michael Leuhn², Bernhard Munk², Veronika Dollhofer², Katrin Harms³,
 Karsten Meyer³, Johannes Ostertag⁴, Mariana Schneider⁵

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
¹Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT), Vöttinger Straße 36, D-85354 Freising
²Abteilung Qualitätssicherung und Untersuchungenwesen (AQU), Lange Point 6, D-85354 Freising
³Institut für Tierernährung und Futtermittelkunde (ITE), Prof.-Dürnwächter-Platz 3, D-85586 Grub
Technische Universität München
³Lehrstuhl für Tierhygiene, Weihenstephaner Berg 3, D-85354 Freising
Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenbergring
⁴Referat Futtermittel, Nebelstraße 25, D-76227 Karlsruhe

<p>Motivation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Qualitativ hochwertige Silagen liefern einen wichtigen Beitrag zur Gesamteffizienz einer Biogasanlage • Mögliche Verwendung von für die Tierernährung ungeeignete Futtermittel als kosteneffizienter Einsatzstoff 	<p>Abb. 1: Silostock mit Schimmelnestern</p>	<p>Hypothese</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fehlerhafte Silierung führt zu Mykotoxinbildenden Schimmelpilzen • Entstehende Sekundärmetabolite der Schimmelpilze können die Aktivität der Mikroorganismen beeinflussen • Mykotoxine werden im Biogasprozess nicht umgewandelt bzw. abgebaut
---	--	--

Experimenteller Aufbau

<p>Abb. 2: <i>Monascus ruber</i> 1000-fache Vergrößerung, Chemische Struktur von Monacolin K5 und dem auf Reis gezüchteten Kulturextrakt von <i>Monascus ruber</i></p>	<p>Abb. 3: <i>Penicillium roqueforti</i> 1000-fache Vergrößerung, Chemische Struktur von Roquefortine C und dem auf Reis gezüchteten Kulturextrakt von <i>Penicillium roqueforti</i></p>	<p>Abb. 5: Mit <i>Monascus ruber</i> artifiziiell verschimmelte Maissilage</p>	<p>Abb. 6: Mit <i>Penicillium roqueforti</i> artifiziiell verschimmelte Maissilage</p>
--	--	--	--

<p>Minibatch-Tests</p> <ul style="list-style-type: none"> • Toxine in Reinform in verschiedenen Konzentrationen • Toxine als Extrakt von Schimmelpilzkulturen <p>→ Gasproduktion, Gasqualität</p>	<p>Abb. 4: Minibatch-System: (1) Wasserbad mit eingespannten Batchflaschen und Schwermechanismus; (2) Schematische Darstellung der Batchflaschen mit Drucktransmitter; (3) Gasprobenahme aus Kopfraum über Luer Hahn</p>	<p>Belastungstest</p> <p>Steigerung der organischen Raumbelastung mit verschimmelter Silage</p> <ul style="list-style-type: none"> → Biogasqualität → Methanproduktivität → Mikrobiologische Aktivität → Verbleib der Mykotoxine im Gärrest 	<p>Abb. 7: 36 Liter Durchflussfermenter</p>
--	--	--	---

Ergebnisse

<p>Zusammenfassung</p> <p>Minibatch</p> <ul style="list-style-type: none"> - Von den getesteten Mykotoxinen zeigte nur die Mykophenolsäure einen Einfluss auf die Biogasproduktion <p>Belastungstest</p> <ul style="list-style-type: none"> - Herkömmliche laborchemische und mikrobiologische Analysen lieferten keine Erklärung für die Prozessstörung - Die Konzentration der untersuchten Toxine nahm zu 	<p>Abb. 8: Gemittelter Verlauf der aufsummierten Biogasproduktion nach Zugabe von Mykophenolsäure im Minibatch-Test</p>	<p>Abb. 9: Entwicklung der Methanproduktivität der getesteten Varianten im Belastungstest</p>
--	---	---



Abb. 87: Poster präsentiert auf dem 11. Rostocker Bioenergieforum, Rostock, Deutschland

10.2.3 Manuskript zum Vortrag auf der internationalen Konferenz „3rd International Conference on Biogas Microbiology (ICBM-3)“ in Wageningen, Niederlande (V. Dollhofer *et al.* 2017)

Effects of mycotoxins and molded maize silage on biogas production

V. Dollhofer¹, B. Munk¹, M. Hartel¹, M. Salmen², K. Harms², J. Ostertag¹, F. Lichti¹, K. Meyer², M. Lebuhn¹

¹Bavarian State Research Center for Agriculture, Micro- and Molecular-Biology, Freising, Germany,

²Technical University of Munich, Freising, Germany

Spoiling of silages for biogas production with molds can frequently be observed. Respiration of carbohydrates leads to reduced energy yields, and some fungi in silage can produce potent mycotoxins potentially harming microorganisms which are relevant in the biogas process. Serious process failures have occasionally been reported by biogas plant operators after feeding molded silage. Thus, the aim of this interdisciplinary study was to analyze the effects of selected mycotoxins and mold infected maize silage on biogas production. During all experiments, gas quality, gas yield, quantity of mycotoxins and microbial population dynamics were analyzed.

Our experiments were focused on the most abundant mycotoxin producing fungi known from silage and their mycotoxins produced in this habitat: (i) *Penicillium roquefortii* forming roquefortin C and mycophenolic acid, (ii) *Monascus ruber* forming monacolin K and (iii) *Aspergillus fumigatus* forming gliotoxin [1]. In batch-experiments, the mycotoxins were tested in concentrations between 500 and 50.000 µg / kgFM. Only in the variants treated with mycophenolic acid, slight inhibition of biogas production was observed.

In order to mimic anaerobic digestion of molded silages in practice, maize silage was contaminated artificially and used as substrate for biogas production in continuously operated fermenters. Uninfected maize silage served as control. Process breakdown was observed with the *M. ruber* and *P. roquefortii* infected silages, and decreased methane productivity with the *A. fumigatus* silage. No effects on the methanogenic populations and their transcriptional activity were seen. Results for the bacterial community will be presented at the conference. Inhibition of the methane production could not be linked to concentrations of the analyzed mycotoxins. Alternative compounds obviously have been decisive.

Reference

1. Schneweis, I., Meyer, K., Hörmansdorfer, S., Bauer, J. 2001. Metabolites of *Monascus ruber* in silages. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85(1-2), 38-44.

10.2.4 Manuskript zum Vortrag auf der internationalen Konferenz „38th Mycotoxin Workshop Berlin 2016“ (K. Harms *et al.* 2016)

Investigations on the influence of mycotoxins on biogas production

Katrin Harms¹, Johannes Ostertag², Michael Lebuhn², Bernhard Munk², Matthias Hartel², Fabian Lichti², Karsten Meyer¹

¹ *Lehrstuhl für Tierhygiene, Technische Universität München*

² *Bavarian State Research Center for Agriculture (LfL)*

Maize and grass silages are often used as substrate in agricultural biogas production. A contamination of silages with toxinogenic moulds such as *Penicillium*, *Monascus* or *Aspergillus* species is a common problem. In addition to the loss of energy of the substrate caused by respiration, the occurrence of mycotoxins may influence biogas production.

Preliminary investigations on adverse effects and the stability of single mycotoxins in the biogas fermentation process have been conducted in batch trials. The fermentation substrate was donated with solutions of common feed contaminants like *Fusarium* toxins and aflatoxin B1, but also typical silage toxins like mycophenolic acid, roquefortine C or monacolin K. The biogas yield was measured continuously. After 25 days the digestates were screened for mycotoxin residues with LC-MS/MS. In these batch trials, only the addition of mycophenolic acid (50 µg/g) resulted in reduced gas yields. However, a remarkable reduction of the measurable amounts of the toxins in the digestates (up to 100%) was observed.

For further investigations with larger scaled continuous flow digesters artificially moulded silages were used. These silages were inoculated with either *Monascus ruber* or *Penicillium roqueforti* strains as dominant fungal species. Toxin analysis of the silages contaminated with *Monascus ruber* revealed the presence of large amounts of monacolin K, but also fumigaclavin C, gliotoxin, trypacidin, fumagillin and fumonisin were detected. The silage inoculated with *Penicillium roqueforti* contained predominantly roquefortine C.

Both biogas processes with substrates moulded by *Monascus ruber* broke down after 70 days, the *Penicillium*-contaminated digesters were disturbed a few days later, while the gas yield of the control fermenter fed with silage of good quality remained stable. The reduced methane quota obtained in all experiments using mouldy silages may be caused by increased respiration during storage or inhibitory activities of mycotoxins. The digestates showed a remarkable accumulation of monacolin K and roquefortine C, respectively.

The study is performed in cooperation with the Bavarian State Research Center for Agriculture (LfL), Department for Quality Assurance and Analytics, the Institute for Animal Nutrition and Feed Management and the Institute for Agricultural Engineering and Animal Husbandry and supported by the grant of the Bavarian Ministry of Economic Affairs and Media, Energy and Technology.

11 Literaturverzeichnis

- Alberts, A.W.; Chen, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; Huff, J.; Hoffman, C. (1980): Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77 (7), 3957–3961.
- Alonso, V.A.; Pereyra, C.M.; Keller, L.A.M.; Dalcero, A.M.; Rosa, C.A.R.; Cavaglieri, L.R. (2013): Fungi and mycotoxins in silage: an overview. In: *Journal of Applied Microbiology*, 115, 637-643.
- Amend, R. (1990): Anhäufung der Mykotoxine Patulin, Penicillinsäure, PR-Toxin und Mykophenolsäure durch Penicillien auf Maissilage und auf halbsynthetischem Medium. Dissertation. Universität Hohenheim, Hohenheim. Allgemeine und angewandte Naturwissenschaften.
- Amigot, S.L.; Fulgueira, C.L.; Bottai, H.; Basilico, J.C. (2006): New parameters to evaluate forage quality. *Postharvest Biol Tec*, 41, 215-224.
- Anonymus (2016): Vergärung organischer Stoffe - Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche. VDI Richtlinie 4630, Verein Deutscher Ingenieure.
- Aravindan, R.; Viruthagiri, T.; Seenivasan, A.; Subhagar, S. (2008): Microbial production and biomedical applications of lovastatin. In: *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70 (6), 701.
- Auerbach, H. (1996): Verfahrensgrundlagen zur Senkung des Risikos eines Befalls von Silagen mit *Penicillium roqueforti* und einer Kontamination mit Mykotoxinen dieses Schimmelpilzes. Dissertation. Universität Hohenheim, Hohenheim. Institut für Tierernährung.
- Auerbach, H.; Oldenburg, E.; Weissbach, F. (1998): Incidence of *Penicillium roqueforti* and Roquefortine C in Silages. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (4), 565-572.
- Balan, K.; Ebringer, M.; Nemeč, O. (1964): Trypacidin a new antiprotozoal antibiotic. *Naturwissenschaften*, 51(9), 227.
- Bauer, C.; Korthals, M.; Gronauer, A.; Lebuhn, M. (2008): Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Sci. Tech.*, 58(7), 1433-1439.
- Bauer J.; Meyer K. (2011): Mykotoxine in Silagen. Hg. v. TUM Jahresbericht. Hans-Eisenmann-Zentrum.
- Belofsky, G.N., Selldorf, P., Jensen, P.R., Fenical, W., Kock, M. (2000): Oxepinamides A-C and fumiquinazolines H-I: bioactive metabolites from a marine isolate of a fungus of the genus *Acremonium*. *Chemistry*, 6(8), 1355-1360.
- Berthiller, F.; Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R. (2007): Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. In: *International Journal of Food Microbiology* 119 (1-2), 33-37.
- Betina, V. (1984): Mycotoxins. Production, isolation, separation, and purification. Amsterdam, New York, New York, N.Y: Elsevier; Distributors for the United States and Canada, Elsevier Science Pub. Co., *Developments in food science*, 8.

- Betina, V. (1989): Mycotoxins. Chemical, biological, and environmental aspects. Amsterdam, Netherlands, New York: Elsevier (v. 9).
- Bothast, R.J.; Bennet, G.A.; Vancauwenberge, J.E.; Richard, J.L. (1992): Fate of Fumosin B1 in Naturally Contaminated Corn during Ethanol Fermentation. In: Applied and Environmental Microbiology, 58 (1), 233-236.
- Boudra, H.; Morgavi, D.P. (2005): Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. In: Animal Feed Science and Technology 120, (1-2), 113-123.
- Braithwaite, A. W.; Eichner, R. D.; Waring, P.; Müllbacher, A. (1987): The immunomodulating agent gliotoxin causes genomic DNA fragmentation. In: Molecular Immunology 24 (1), 47-55.
- Bruchhausen, F. von; Dannhardt, G.; Ebel, S.; Frahm, A. W.; Hackenthal, E., Holzgrabe, U. (1993): Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. 5., vollst. neubearb. Aufl. Berlin, Heidelberg, Springer.
- Bullerman, L.B.; Bianchini, A. (2007): Stability of mycotoxins during food processing. In: Mycotoxins from the Field to the Table, 119 (1-2), 140-146.
- Cole, R.J.; Cox, R.H. (1981): Handbook of Toxic Fungal Metabolites. New York: Academic Press.
- Cole, R.J.; Jarvis, B.B.; Schweikert, M.A. (2003): Handbook of Secondary Fungal Metabolites. 3 Bände. Amsterdam [u.a.]: Elsevier Science; Academic Press (3).
- Cole, R. J., Kirksey, J.W., Dorner, J.W., Johnson, J.C., Johnson, A.N., Bedell, D.M., Springer, J.P., Chexal, K.K., Clardy, J.C., Cox, R.H. (1977): Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. J Agric Food Chem, 25 (4), 826-830.
- Daković, A.; Tomašević-Čanović, M.; Dondur, V.; Rottinghaus, G. E.; Medaković, V.; Zarić, S. (2005): Adsorption of mycotoxins by organozeolites. In: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 46 (1), 20-25.
- DeClercq, E.; Billiau, A.; Ottenheijm, H.C.J.; Herscheid, J.D.M. (1978): Antireverse Transcriptase activity of Gliotoxin analogs. In: Biochemical Pharmacology, (27), 635-639.
- Deshpande, S. S. (2002): Handbook of food toxicology. New York: Marcel Dekker (Food science and technology, 119).
- Desjardins, A. E. (2006): Fusarium mycotoxins. Chemistry, genetics and biology. St. Paul, Minn: APS Press.
- Digits, J. A.; Hedstrom, L. (1999): Species-Specific Inhibition of Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase by Mycophenolic Acid. In: Biochemistry, 38 (46), 15388-15397.
- Driehuis, F. (2013): Silage and the safety and quality of dairy foods: a review. In: Agricultural and Food Science, (22), 16-34.
- Driehuis, F. und Oude Elferink, S.J.W.H. (2000): The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. In: Veterinary Quarterly, 22 (4), 212-216.
- Ebermann, R. und Elmadfa, I. (2011): Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung. 2. Aufl. Wien, New York: Springer-Verlag.

- Eble, T. und Hanson, F. (1951): Fumagillin, an antibiotic from *Aspergillus fumigatus* H-3. *Antibiotic Chemother*, 1, 54-58.
- Edgar, R., Haas, B., Clemente, J., Quince, C.; Knight, R. (2011): UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194-2200.
- Endo, A.; Hasumi, K.; Negishi, S. (1985): Monacolin J and L, new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber*. In: *The Journal of Antibiotics*, 3 (38), 420-422.
- Endo, A.; Hasumi, K.; Yamada, A.; Shimoda, R.; Takeshima, H. (1986a): The synthesis of compactin (ML-236B) and monacolin K in fungi. In: *The Journal of Antibiotics*, 39 (11), 1609-1610.
- Endo, A.; Komagata, D.; Shimada, H. (1986b): Monacolin M, a new inhibitor of cholesterol biosynthesis. In: *The Journal of Antibiotics*, (29), 1670-1673.
- FNR (Hg.) (2013): Broschüre Biogas. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. 9. Aufl.
- FNR-Handreichung (Hg.) (2004): Biogasgewinnung und -nutzung. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. Leipzig.
- FNR-Leitfaden Biogas (Hg.) (2013): Von der Gewinnung zur Nutzung. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. 6., vollst. überarb. Aufl. Gülzow-Prüzen: [s.n.].
- FNR-Studie (Hg.) (2006): Einspeisung von Biogas in das Erdgasnetz. Unter Mitarbeit von S. Klinski. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. Gülzow: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe.
- Frank, H. K. (1981): Einführung in das Mykotoxinproblem. In: J. Reiß (Hg.): *Mykotoxine in Lebensmitteln*. Stuttgart, New York: Fischer.
- Frede, W. (2010): *Handbuch für Lebensmittelchemiker. Lebensmittel-Bedarfsgegenstände-Kosmetika-Futtermittel*. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York, NY: Springer-Verlag; Springer.
- Gallo, A.; Giuberti, G.; Bertuzzi, T.; Moschini, M.; Masoero, F. (2014): Study of the effects of PR toxin, mycophenolic acid and roquefortine C on *in vitro* gas production parameters and their stability in the rumen environment. *The Journal of Agricultural Science*, 153(1), 163-176.
- Gardiner, D.M. (2005): The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. In: *Microbiology*, 151 (4), 1021-1032.
- Garon, D.; Richard, E.; Sage, L.; Bouchart, V.; Pottier, D.; Lebailly, P. (2006): Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (9), 3479-3484.
- Gedek, B. (1980): *Kompodium der medizinischen Mykologie*. Berlin: Parey (25).
- Gedek, B.; Bauer, J.; Schreiber, H. (1981): Zur Mykotoxinbildung Silage-verderbender Schimmelpilze. In: *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 68 (8/9), 299-301.
- González Pereyra, M.L.; Alonso, V.A.; Sager, R.; Morlaco, M.B.; Magnoli, C.E.; Astoreca, A.L. (2008): Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. In: *Journal of Applied Microbiology*, 104 (4), 1034-1041.

- González Pereyra, M. L.; Chiacchiera, S. M.; Rosa, C. A. R.; Sager, R.; Dalcero, A. M.; Cavaglieri, L. (2011): Comparative analysis of the mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. In: Journal of the Science of Food and Agriculture, 91 (8), 1474-1481.
- Grajewski, J.; Blajet-Kosicka, A.; Twaruszek, M.; Kosicki, R. (2012): Occurrence of Mycotoxins in Polish Animal Feed in Years 2006-2009. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 96 (5), 870-877.
- Grapenthin, H.; Lebuhn, M.; Gronauer, A. (2010): Spezifische Aktivitäts-, Toxizitäts- und Supplementierungstests zur Optimierung des Anlagenbetriebs. In: Kongressband des 1. C.A.R.M.E.N.-Forschungs-Kolloquiums "Nachwachsende Rohstoffe", Straubing 04./05.11.10, 8 Seiten.
- Grellier, P.; Valentin, A.; Millerioux, V.; Schrevel, J.; Rigomier, D. (1994): 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors lovastatin and simvastatin inhibit *in vitro* development of Plasmodium falciparum and Babesia divergens in human erythrocytes. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38 (5), 1144-1148.
- Hafez, A. H.; Megalla, S. E. (1982): The potential value of silage in detoxifying aflatoxin B1. In: Mycopathologia, 79 (1), 31-34.
- Hägglom, P. (1990): Isolation of Roquefortine C from Feed Grain. In: Applied and Environmental Microbiology, 56 (9), 2924-2926.
- Harwig, J.; Blanchfield, B. J.; Jarvis, G. (1977): Effect of water activity on disappearance of patulin and citrinin from grains. In: J Food Science, 42 (5), 1225-1228. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1977.tb14466.x.
- Hayashi, A.; Fujioka, S.; Nukina, M.; Kawano, T.; Shimada, A.; Kimura, Y. (2007): Fumiquinones A und B, nematocidal quinones produced by *Aspergillus fumigatus*. Biosci. Biotechnol Biochem, 71(7), 1697-1702.
- Hedl, M.; Rodwell, V. W. (2004): Inhibition of the Class II HMG-CoA reductase of *Pseudomonas mevalonii*. In: Protein Science, 13 (6), 1693-1697.
- Henry, S. D.; Metselaar, H. J.; Lonsdale, R. C.B.; Kok, A.; Haagmans, B. L.; Tilanus, H. W.; Laan, L. J.W. van der (2006): Mycophenolic Acid Inhibits Hepatitis C Virus Replication and Acts in Synergy With Cyclosporin A and Interferon- α . In: Gastroenterology, 131 (5), 1452-1462.
- Herebian, D.; Zühlke, S.; Lamshöft, M.; Spitteller, M. (2009): Multi-mycotoxin analysis in complex biological matrices using LC-ESI/MS: Experimental study using triple stage quadrupole and LTQ-Orbitrap. In: Journal of Separation Science, 32 (7), 939-948.
- Heuwinkel, H.; Aschmann, A.; Gerlach, R.; Gronauer, A. (2009): Die Genauigkeit der Messung des Gasertragspotentials von Substraten mit der Batchmethode. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009, 02-04 Dezember 2009, Erding, Band 1, 95-103, ISSN 1611-4159.
- ILT-, LfL-, WGA-Forschungsbericht (2005): Konzeptionierung, Erstellung und Betrieb einer Versuchsfermentieranlage zur Bearbeitung von Fragestellungen in Bereich Inputmaterialien und Mikrobiologie bei landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Schlussbericht. Insitut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik (ILT); Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL); Lehrstuhl für Wassergüte und Abfallwirtschaft (WGA) der TU-München.

- Jekkel, A.; Barta, I.; Kónya, A.; Sütő, J.; Boros, S.; Horváth, G.; Ambrus, G. (2001): Microbiological transformation of mycophenolic acid. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11 (4-6), 423-426.
- Kim, E.; Aragos, C.; Kendera, D. (2004): Liquid Chromatographic Determination of Fumonisin B1, B2 and B3 in Corn Silage. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 196-200.
- Kokkonen, M.; Jestoi, M.; Rizzo, A. (2005): The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. In: *International Journal of Food Microbiology*, 99 (2), 207–214.
- Komagata, D.; Fujita, S.; Yamashita, N.; Saito, S.; Morino, T. (1996): Novel neurotoxic activities of pseudorotin A and penicilic acid. *J. Antibiot (Tokyo)*, 49 (9), 858-959.
- Kopp, B.; Rehm, H. J. (1979): Antimicrobial action of roquefortine. In: *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6 (4), 397-401.
- Köppen, R.; Koch, M.; Siegel, D.; Merkel, S.; Maul, R.; Nehls, I. (2010): Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (6), 1595-1612.
- Kpodo K., Sorensen A. K., Jakobsen M. (1996): The occurrence of mycotoxins in fermented maize products. *Food Chem.*, 56, 147-153.
- Latgé, J.-P. (1999): *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. In: *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (2), 310-350.
- Lattanzio, V.M.T.; Della Gatta, S.; Suman, M.; Visconti, A. (2011): Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal-based foods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25 (13), 1869-1880.
- Lebuhn, M.; Hanreich, A.; Klocke, M.; Schlüter, A.; Bauer, C.; Marín Pérez C. (2014a): Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe*, 29, 10-21, DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.04.006.
- Lebuhn, M.; Munk, B.; Effenberger, M. (2014b): Agricultural biogas production in Germany - from practice to microbiology basics. *Energy Sustainability and Society*, 4 (1)/10, DOI:10.1186/2192-0567-4-10.
- Lebuhn, M.; Munk, B. (2015): Mikrobiologische Prozessoptimierung in der Biogastechnologie – Diagnostik der mikrobiellen Populationen und Identifizierung von Schlüsselorganismen in Biogas-Fermentern. Abschlussbericht an das StMELF und StMUV, pp. 185
- Lebuhn, M.; Munk, B.; Madge-Pimentel, E. (2016): Mikrobielle Gemeinschaften in einphasigen Systemen; Teilprojekt 2 im Verbundvorhaben: „Entwicklung von molekularen Markern und Nachweisverfahren auf Basis der quantitativen (realtime) PCR zum Monitoring von prozessrelevanten Mikroorganismen als Frühwarnsysteme für Prozessstörungen“ (Biogas-Marker, FKZ 03SF0440B). Abschlussbericht an das BMBF, pp. 79
- LfL-Bericht (2005): Schimmelpilze und Mykotoxine in Futtermitteln (Futtergetreide, Grünfutter, Silage, Heu, Stroh). Vorkommen, Bewerten, Vermeiden. Länderübergreifende Zusammenarbeit der Landesanstalten für Landwirtschaft.

- LfL-Bericht (Hg.) (2009): Hygiene bayerischer Silagen - Controlling am Silo. Endbericht. Unter Mitarbeit von Richter W, Zimmermann N., Abriel M., Schuster M., Kölln-Höllrigl K., Ostertag J. ; Hg. v. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft. 1. Auflage.
- LfL-Bericht (2011): Mikrobielle Beurteilung von Grobfuttermitteln. Orientierungswertschema des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA). Hg. v. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft.
- LfL-Information (Hg.) (2013): Biogasgärreste. Einsatz von Gärresten aus der Biogasproduktion als Düngemittel. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft. 4. Auflage.
- LfL-Schriftenreihe (Hg.) (2009): Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Unter Mitarbeit von C. Bauer, M. Lebuhn und A. Gronauer. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft. 1. Auflage. (12).
- LfU-Kompodium (Hg.) (2007): Biogashandbuch Bayern - Materialienband. Bayerisches Landesamt für Umwelt.
- Miller, T. L.; Meyer, J. W. (2001): Inhibition of Growth of Methane-Producing Bacteria of the Ruminant Forestomach by Hydroxymethylglutaryl~SCoA Reductase Inhibitors. In: Journal of Dairy Science, 84 (6), 1445–1448.
- Monbaliu, S.; van Poucke, C.; Detavernier, C.; Dumoulin, F.; Velde, M. van de; Schoeters, E. (2010): Occurrence of Mycotoxins in Feed as Analyzed by a Multi-Mycotoxin LC-MS/MS Method. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (1), 66-71.
- Morgavi, D. P.; Boudra, H.; Jouany, J. P.; Michalet-Doreau, B. (2004): Effect and stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on in vitro rumen fermentation. In: Food Additives and Contaminants, 21 (9), 871-878.
- Morgavi, D.P.; Martin, C.; Boudra, H. (2014): Fungal secondary metabolites from *Monascus* spp. reduce rumen methane production *in vitro* and *in vivo*. Journal of Animal Science, 91(2), 848-860.
- Mücke, W.; Lemmen, C. (1999): Schimmelpilze. Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmassnahmen. 2. Aufl. Landsberg: Ecomed.
- Müller, J.; Bauer, R. (2006): Futtermittelkonservierung. In: Pflanzliche Erzeugung. 12., völlig neu bearb. und erw. Aufl. München: BLV-Buchverl (Lehrbuch für Landwirtschaftsschulen ; [1]).
- Munk, B.; Bauer, C.; Gronauer, A.; Lebuhn, M. (2010): Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. Eng. Life Sci., 10(6), 496-508, DOI: 10.1002/elsc.201000056
- Munk, B.; Bauer, C.; Gronauer, A.; Lebuhn, M. (2012): A Metabolic Quotient for methanogenic Archaea. Water Sci. Tech., 66(11), 2311-2317, doi: 10.2166/wst.2012.436
- Munk, B.; Lebuhn, M. (2014): Process diagnosis using methanogenic Archaea in maize-fed, trace element depleted fermenters. Anaerobe, 29, 22-28, DOI:10.1016/j.anaerobe.2014.04.002
- Nau, H.; Steinberg, P.; Kietzmann, M. (2003): Lebensmitteltoxikologie. Rückstände und Kontaminanten: Risiken und Verbraucherschutz; mit 43 Tabellen. Unter Mitarbeit von Gerd Hamscher. Berlin [u.a.]: Parey.

- Nelson, P. E.; Desjardins, A. E.; Plattner, R. D. (1993): Fumonisin, Mycotoxins Produced by *Fusarium* Species: Biology, Chemistry, and Significance. In: Annual Review of Phytopathology, 31, 233-252.
- Niderkorn, V.; Morgavi, D. P.; Pujos, E.; Tissandier, A.; Boudra, H. (2007): Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. In: Food Additives and Contaminants, 24 (4), 406–415.
- Nordmann, W. (1977): Die Überwachung der Schlammfäulung. KA-Informationen für das Betriebspersonal, Beilage zur Korrespondenz Abwasser, 3/77.
- Numatea, A.; Takahashi, C.; Matushita, T.; Miyamoto, T.; Kawai, K.; Yoshihide, U.; Matsomura, E.; Inoue, M.; Ohishi, H.; Shingu, T. (1992): Fumiquinazolines, novel metabolites of a fungus isolated from saltfish. Tetrahedron Letters, 33(12), 1621-1624.
- Ohmomo, S.; Utagawa, T.; Abe, M. (1977): Identification of Roquefortine C Produced by *Penicillium roqueforti*. In: Agricultural and Biological Chemistry, 10 (41), 2097-2098.
- Okuda, S.; Nakayama, Y.; Tsuda, K. (1966): Studies on microbial products. I. Helvolic acid and related compounds. I.-desacetoxylhelvolic acid and helvolinic acid. Chem Pharm Bull (Tokyo), 14(4), 1168-1169.
- Orth, R. (1981): Einfluss physikalischer Faktoren auf die Bildung von Mykotoxinen. In: J. Reiß (Hg.): Mykotoxine in Lebensmitteln. Stuttgart, New York: Fischer.
- Ostertag, J. (2010): Nachweis und Vorkommen von *Aspergillus fumigatus*-Toxinen in Gras- und Maissilagen. Dissertation. Technische Universität München, Freising. Lehrstuhl für Tierhygiene.
- Ostertag, J.; Preißler, D. (2013): Handlungsempfehlung zum Einsatz von verpilzten Einsatzstoffen als Biogassubstrat. Hg. v. ALB Bayern e.V. Biogas Forum Bayern (III).
- Pattono, D.; Gallo, P. F.; Civera, T. (2011): Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. In: Food Chemistry, 127 (1), 374-377.
- Peraica, M.; Domijan, A.-M.; Ivić, D.; Cvjetković, B. (2010): Ochratoxin A Contamination of Food from Croatia. In: Toxins, 2 (8), 2098–2105.
- Poupko, R.; Luz, Z.; Destro, R. (1997): Carbon-13 NMR of Citrinin in the Solid State and in Solutions. In: The Journal of Physical Chemistry A, 101 (28), 5097-5102.
- Rasmussen, R. R.; Storm, I. M.; Rasmussen, P. H.; Smedsgaard, J.; Nielsen, K. F. (2010): Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. In: Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397 (2), 765-776.
- Reiß, J. (Hg.) (1981): Mykotoxine in Lebensmitteln. Stuttgart, New York: Fischer.
- Richard, E.; Heutte, N.; Sage, L.; Pottier, D.; Bouchart, V.; Lebailly, P.; Garon, D. (2007): Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. In: Food and Chemical Toxicology, 45 (12), 242-2425.
- Roigé, M. B.; Aranguren, S. M.; Riccio, M. B.; Pereyra, S.; Soraci, A. L.; Tapia, M. O. (2009): Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. In: Revista iberoamericana de micología 26 (4), 233-237.

Sassahara M.; Pontes Netto, D.; Yanaka, E.K. (2005): Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the North of Paraná state. *Food Chem Toxicol*, 43(6), 981-984.

Schneider, C. B. (2007): Vorkommen und Nachweis von Citrinin in Nahrungsmitteln pflanzlicher Herkunft. Dissertation. Technische Universität München, Freising. Lehrstuhl für Tierhygiene.

Schneweis, I. (2000): Futtermittelhygienische Untersuchungen von Silagen: Nachweis und Vorkommen von Monacolinen, Citrinin und Mycophenolsäure. Dissertation. Technische Universität München, Freising. Lehrstuhl für Tierhygiene.

Schneweis, I.; Meyer, K.; Hörmansdorfer, S.; Bauer, J. (2000): Mycophenolic acid in silage. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (8), 3639-3641.

Scott, P. M. (1984): Effects of food-processing on mycotoxins. In: *Journal of Food Protection*, 47 (6), 489-499.

Scudamore, K. A. (2008): Mycotoxins. In: J. Gilbert und H. Z. Senyuva (Hg.): *Bioactive compounds in foods*. Oxford: Blackwell Pub.

Serajuddin, A.T.M.; Ranadive, S. A.; Mahoney, E. M. (1991): Relative lipophilicities, solubilities, and structure-pharmacological considerations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a (HMG-COA) reductase inhibitors pravastatin, lovastatin, mevastatin, and simvastatin. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80 (9), 830-834.

Shipkova, M.; Armstrong, V. W.; Wieland, E.; Niedmann, P. D.; Schütz, E.; Brenner-Weiß, G. et al. (1999): Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. In: *British Journal of Pharmacology*, 126 (5), 1075-1082.

Shu, P.; Lin, C. (2002): Simple and Sensitive Determination of Citrinin in *Monascus* by GC-Selected Ion Monitoring Mass Spectrometry. In: *Analytical Sciences*, 18 (3), 283-287.

Sievers, T. M.; Rossi, S. J.; Ghobrial, R. M.; Arriola, E.; Nishimura, P.; Kawano, M.; Holt, C. D. (1997): Mycophenolate Mofetil. In: *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 17 (6), 1178-1197. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/j.1875-9114.1997.tb03082.x>.

Spikes, S.; Xu, R.; Nguyen, C. K.; Chamilos, G.; Kontoyiannis, D. P.; Jacobson, R. H. et al. (2008): Gliotoxin Production in *Aspergillus fumigatus* Contributes to Host Differences in Virulence. In: *The Journal of Infectious Diseases*, 197 (3), 479-486.

-Specific

Stanzani, M.; Orciuolo, E.; Lewis, R.; Kontoyiannis, D. P.; Martins, S. L. R.; St. John, L. S.; Komanduri, K. V. (2004): *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. In: *Blood*, 105 (6), 2258-2265.

Steinegger, E. (2007): *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Mit 191 Tabellen. 8., überarb. und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).

Steyn, P.S. und Vleggaar, R. (1985): Tremoenic mycotoxins. *Fortschr Chem Org Naturst*, 48, 1-80.

Sulyok, M.; Krska, R.; Schuhmacher, R. (2010): Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. In: *Food Chemistry*, 119 (1), 408-416.

- Teuscher, E. (1987): Biogene Gifte. Biologie, Chemie, Pharmakologie. Stuttgart, New York: Fischer.
- Tobert, J. A. (1987): New developments in lipid-lowering therapy: the role of inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase. In: *Circulation*, 76 (3), 534-538.
- Trucksess, M. W. und Pohland, A. E. (2000): *Mycotoxin protocols*. Totowa, N.J: Humana Press (157).
- Tüller, G. (2005): Einfluss von Roquefortin C auf Tiergesundheit und Lebensmittelqualität bei Wiederkäuern. Dissertation. Technische Universität München, Freising.
- Uegaki, R.; Kobayahi H.; Inoue, H.; Tonoho, M.; Tsukiboshi, T. (2013): Changes of fumonisin production in rice grain during ensiling. *Journal of animal science*, 84(1), 48-53.
- Upperman, J. S.; Potoka, D. A.; Zhang, X.-R.; Wong, K.; Zamora, R.; Ford, H. R. (2003): Mechanism of Intestinal-Derived fungal sepsis by gliotoxin, a fungal metabolite. In: *Journal of Pediatric Surgery*, 38 (6), 966-970.
- van Asselt, E. D.; Azambuja, W.; Moretti, A.; Kastelein, P.; De Rijk, T. C.; Stratakou, I.; Van Der Fels-Klerx, H. J. (2012): A Dutch field survey on fungal infection and mycotoxin concentrations in maize. In: *Food Additives and Contaminants: Part A*, 29 (10), 1556-1565.
- VanMiddelsworth, F.; Giacobbe, R.; Lopez, M.; Garrity G.; Bland, J.; Bartizal, K.; Fromtling, R. ; Polishook, J.; Zweerink, M.; Edison, A. (1992): Sphingofungins A, B, C und D; a new family of antifungal agents. I. Fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot (Tokyo)*, 45 (6), 861-867.
- van Pamel, E.; Verbeken, A.; Vlaemynck, G.; Boever, J. de; Daeseleire, E. (2011): Ultrahigh-Performance Liquid Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric Multimycotoxin Method for Quantitating 26 Mycotoxins in Maize Silage. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (18), 9747-9755.
- Vendruscolo, F., Tosin, I., Giachini, A.J., Schmidell, W., Ninow, J.L. (2013): Antimicrobial activity of *Monascus* pigments produced in submerged fermentation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38 (4), 1860-1865.
- Vishwanath, V.; Sulyok, M.; Labuda, R.; Bicker, W.; Krska, R. (2009): Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (5), 1355-1372.
- Wagner, C.; Sterner, O.; Anke, H. (1998): *Verticillium rexiianum* (SACC) SACC, a new producer of Monacolin K. In: *Zeitschrift für Naturforschung*, 53c, 289-290.
- Wang, Y.; Xiao, C.; Guo, J.; Yuan, Y.; Wang, J.; Liu, L.; Yue, T. (2013): Development and Application of a Method for the Analysis of 9 Mycotoxins in Maize by HPLC-MS/MS. In: *Journal of Food Science*, 78 (11), S. M1752.
- Wang-Iverson, D.; Ivashkiv, E.; Jemal, M.; Cohen, A. I. (1989): Determination of lovastatin acid in serum by gas chromatography/mass spectrometry. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3 (5), 132-134.

- Weber, A.; Schraml, M.; Walter, F. (2013): Spezifische Aktivitäts-, Toxizität- und Supplementierungstests für die Optimierung des Anlagenbetriebs. 1. Zwischenbericht. Hg. v. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft. Institut für Landtechnik und Tierhaltung.
- Wenehed, V.; Solyakov, A.; Thylin, I.; Häggblom, P.; Forsby, A. (2003): Cytotoxic response of *Aspergillus fumigatus*-produced mycotoxins on growth medium, maize and commercial animal feed substrates. In: Food and Chemical Toxicology, 41 (3), 395-403.
- WHO (2000): Fumonisin B. Environmental health criteria, 219. Geneva.
- Wiesmüller, G. A. (2013): Gesundheitsrisiko Schimmelpilze im Innenraum. Heidelberg, München, Landsberg [u.a.]: Ecomed-Medizin ([Hygiene in Krankenhaus und Praxis]).
- Wink, M. (1999): Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Sheffield, England, Boca Raton, FL: Sheffield Academic Press; CRC Press (Annual plant reviews, v. 3).
- Xu, B.J.; Jia, X.Q.; Gu, L.J.; Sung, C.K. (2006): Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. In: Food Control, 17 (4), 271-285.
- Yamada, A.; Kataoka, T.; Nagai, K. (2000): The fungal metabolite gliotoxin: immunosuppressive activity on CTL-mediated cytotoxicity. In: Immunology Letters, 71 (1), 27-32.