



**LfL**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

# Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009

**Band 2**



16

2009

**Schriftenreihe**

**ISSN 1611-4159**

## **Impressum**

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

Redaktion: Institut für Landtechnik und Tierhaltung  
Vöttinger Straße 36, 85354 Freising-Weihenstephan  
Prof.-Dürrwaechter-Platz 2, 85586 Poing  
E-Mail: [TierundTechnik@LfL.bayern.de](mailto:TierundTechnik@LfL.bayern.de)  
Tel.: 08161/71-3450

1. Auflage: Dezember 2009

Druck: ES-Druck, 85356 Freising

Schutzgebühr: 15,- €

© LfL

Die Beiträge in dieser Schriftenreihe geben die Meinung der Autoren wieder.



# **Internationale Wissenschaftstagung**

## **Biogas Science 2009**

**02. – 04. Dezember 2009**

**in Erding**

**Band 2 – Vorträge**

Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft



# Inhaltsverzeichnis

## Session 4: Mikro- und Molekularbiologie

**Design and application of a functional oligonucleotide microarray for the identification of cellulose genes and their expression in (different) biogas fermenters..... 253**  
*M. Engel, X. Dong and M. Schlöter*

**Evaluierung des Hygienisierungspotentials des Biogasprozesses im Hinblick auf phytopathogene Schaderreger ..... 255**  
*R. Friedrich, D. Kaemmerer, P. Büttner und L. Seigner*

**Prevalence and role of hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic biogas reactors ..... 267**  
*V.V. Zverlov, W. Hiegl, D.E. Köck, J. Kellermann und W.H. Schwarz*

**Systemanalyse von Biogasanlagen mit Hilfe mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden: Vergleich Hyperthermophil (60°C) zu Thermophil (55°C) ..... 283**  
*P. Scherer, N. Krakat, A. Westphal, K. Satke und L. Neumann*

**Methanogene Archaea in landwirtschaftlichen Biogasanlagen ..... 303**  
*E. Nettmann, I. Bergmann und M. Klocke*

**Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage – a causal analysis..... 319**  
*M. Leubhn, C. Bauer, B. Munk and A. Gronauer*

## Session 5: Analytik, MSR-Technik und Prozessmodellierung

**Advanced Interpretation of Anaerobic Batch Tests – Conclusions for the Practical Operation ..... 335**  
*S. Meier, S. Yüceer, L. Hinken, D. Weichgrebe and K.-H. Rosenwinkel*

**Entwicklung einer NIRS Kalibration zur Bestimmung der Biogausausbeute von Mais ..... 345**  
*B. Darnhofer, J. Eder, H. Oechsner und M. Mukengele*

**Hydrogen and Methane: Enhanced Methane as well as Hydrogen Production and Increased Process Stability by Sensorik Control ..... 355**  
*N. Weran*

**Stabile Kohlenstoffisotope: Eine neue Lasermethode zur Prozessanalyse und Identifikation mikrobiologischer Reaktionen im Biogasprozess..... 369**  
*S. Laukenmann, H. Heuwinkel, A. Gronauer und F. Keppler*

**Biogas from grass silage – Measurements and modelling ..... 377**  
*K. Koch, M. Lübken, T. Gehring and M. Wichern*

<b>Mathematische Modellierung der mesophilen und thermophilen anaeroben Vergärung von Maissilage .....</b>	<b>389</b>
<i>M. Lübken, K. Koch und M. Wichern</i>	

## **Session 6: Ökonomie, Ökologie und Bilanzierungen**

<b>The basket of benefit methodology as a tool for the comparison of electricity, heat, and fuel production from energy crops, exemplified by different utilization pathways for .....</b>	<b>395</b>
<i>M. Bystricky, T. Knödlseher, G. Weber-Blaschke und M. Faulstich</i>	

<b>Treibhausgasbilanz von Biomethan – welche Substrate sind geeignet? Greenhouse gas balance of bio-methane – which substrates are suitable? .....</b>	<b>405</b>
<i>K. Arnold</i>	

<b>Klimagasemissionen und Ressourcenverbrauch von Praxis-Biogasanlagen .....</b>	<b>417</b>
<i>H. Bachmeier, M. Effenberger und A. Gronauer</i>	

<b>Untersuchungen zu Treibhausgasemissionen bei der Biogaserzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen .....</b>	<b>429</b>
<i>J. Clemens, C. Cuhls, C. Hafermann, J. Friehe, P. Weiland, J. Liebetrau u. J. Daniel</i>	

<b>Potenziale der Biogasproduktion in der serbischen Provinz Wojwodina und Grundlagen der Wirtschaftlichen Begründheit .....</b>	<b>437</b>
<i>M. Tesic, D. Djatkov, M. Effenberger und M. Martinov</i>	

<b>Energie- und Ökobilanzierung verschiedener Konversionspfade von Energiepflanzen zu Biogas bzw. Bioethanol .....</b>	<b>447</b>
<i>B. Schumacher, H. Oechsner, T. Senn und T. Jungbluth</i>	

## **Session 4**

# **Mikro- und Molekularbiologie**

**Chairman: Prof. Gübitz**





## **Design and application of a functional oligonucleotide microarray for the identification of cellulase genes and their expression in (different) biogas fermenters**

M. Engel<sup>1</sup>, X. Dong<sup>2</sup> and M. Schlöter<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department for Terrestrial Ecogenetics, Helmholtz Zentrum München, Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Germany

<sup>2</sup> Chair of Soil Ecology, Technical University Munich, Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg, Germany

The efficiency of biogas fermenters operated solely with energy crops like maize silage strongly depends on the hydrolysis of cellulose, one of the major organic components of plants. Cellulolytic microorganisms, contributing to cellulose degradation, can be found in a broad range of genera of bacterial and fungal origin. Former studies to detect cellulolytic organisms were predominantly based on isolation or on 16S rDNA targeting methods like FISH or PCR. Latter have the disadvantage that only organisms at species level and above can be detected. However it is known that microorganisms even within the same species varied from metabolic features, thus cautions must be given when identifying their functional properties.

As our study addresses the question of how different operation procedures and substrate feedings influence hydrolysis of cellulose, we focused on the detection of functional genes encoding for cellulases. Cellulases comprise a very heterogeneous group of enzymes, assigned to different families of glycoside hydrolases (GH), thus showing large sequence diversity although performing similar catabolic processes. Therefore the development of a microarray, targeting cellulose genes and transcripts, was the most appropriate method to enable the simultaneous, specific detection of numerous, different genes in samples taken from biogas plants operated under different conditions. The oligonucleotide microarray prototype presented here detects cellulolytic genes of anaerobic and facultative anaerobic bacteria and fungi of GH family 5, 6, 9 and 48. Oligos were designed using OligoArray 2.1 and up to three oligonucleotides were constructed per gene. It contains 756 unique up to 70-mer oligos with <85% similarity to their non-target sequences. As sequences used for construction of the microarray were retrieved from a public database and were mainly based on data from cultivable organisms the question arose, whether cellulases from until now not cultivated organisms present in biogas fermenters can be detected by the highly specific microarray approach. Therefore among the 756 oligos, 62 were amplified gene fragments from a PCR detection assay for GH family 48. Besides, three type of control oligos (positive, negative and stringency controls) were also included.

Specificity tests of this type of microarray was carried out with representative pure cultures as well as data from samples from different biogas fermenters will be presented in the frame of this presentation.



## Evaluierung des Hygienisierungspotentials des Biogasprozesses im Hinblick auf phytopathogene Schaderreger

R. Friedrich, D. Kaemmerer, P. Büttner und L. Seigner

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz,  
Lange Point 10, 85354 Freising, Deutschland

### Zusammenfassung

Die Biogastechnologie hat sowohl in ökologischer Hinsicht durch die Nutzung erneuerbarer Energieträger als auch in ökonomischer Hinsicht durch die Verwertung biologischer Reststoffe und Abfälle aus Landwirtschaft, Gartenbau und Industrie große Bedeutung. Zudem könnten hochgradig mit Phytopathogenen infizierte und damit nicht mehr vermarktungsfähige Befallspartien nutzbringend in Biogasanlagen entsorgt werden, wenn eine Verschleppung der Erreger über Gärrückstände ausgeschlossen werden kann. Daher wird im Rahmen dieses Projektes das Hygienisierungspotenzial des Biogasprozesses evaluiert, um das Risiko durch Ausbringen von Gärresten und die damit verbundene Aufschaukelung bestimmter Erreger abschätzen zu können. Zu diesem Zweck werden effiziente Methoden für den Nachweis und die Feststellung der Lebensfähigkeit der Pathogene entwickelt. Die Untersuchung erfolgt zum einen an Quarantänekrankheiten der Kartoffel wie der Bakteriellen Ringfäule (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Cms), Schleimkrankheit (*Ralstonia solanacearum*), dem Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum*) und den Zystennematoden (*Globodera pallida*, *G. rostochiensis*). Zum anderen werden aufgrund der gehäuften Anfragen aus der Praxis weitere Nicht-Quarantäneschadorganismen bearbeitet. Diese umfassen u. a. die Welkepilze *Verticillium dahliae* und *V. albo-atrum*, das Rizomaniavirus der Zuckerrübe, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, den mykotoxinbildenden Pilz *Fusarium graminearum* und den Erreger der Bakteriellen Gräserwelke *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. Zusätzlich wurde von Juli 2007 bis September 2008 ein Monitoring dreier unterschiedlicher, bayerischer Biogaspilotbetriebe zur Untersuchung von Substraten, Fermenterinhalt und Gärresten auf phytopathogene Pilze durchgeführt.

Die Untersuchungen ergaben, dass neben der Temperatur und der Verweilzeit des Substrats im Biogasfermenter erwartungsgemäß das umgebende Milieu die Überlebensfähigkeit der Schadorganismen beeinflusst. Erreger in Pflanzenmaterial scheinen länger zu überleben als isolierte Erreger. Die Überlebensdauer der Pathogene lag zumeist unter den für das jeweilige Substrat angegebenen theoretischen Verweilzeiten in der Biogasanlage. Die meisten bisher untersuchten Erreger starben innerhalb weniger Stunden bzw. Tage in Gärsubstrat bzw. im Fermenter ab. Lediglich für Cms wurde eine längere Überlebensdauer von mindestens 100 Tagen ermittelt; dieses Ergebnis muss in weiteren Analysen überprüft werden. Die zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass der Großteil der untersuchten Erreger bei praxisüblicher Verweilzeit des Substrats im Biogasfermenter selbst bei mesothermer Vergärung aus Sicht der Phytohygiene als unbedenklich einzustufen ist, sofern eine ausreichend lange Verweilzeit des Materials gewährleistet ist. Da auch eine fachgerecht durchgeführte Silierung zu einer Hygienisierung beiträgt, kann durch die Verwendung von optimal siliertem Erntegut als Substrat für die Biogasanlage das Risiko der Verschleppung von Krankheitserregern beim Ausbringen des Gärrests weiter reduziert werden. Die bisherigen Ergebnisse müssen in weiteren Versu-

chen bestätigt und die Überlebensfähigkeit verschiedener Erreger zudem in der Pflanze ("in planta") untersucht werden.

Im Monitoring der Biogaspilotbetriebe konnten bislang weder in Substraten (Silagen, Getreide), noch in Fermentern oder Gärresten phytopathogene Pilze in nennenswertem Umfang nachgewiesen werden.

## Stichwörter:

Biogasanlage, Hygienisierung, Schaderreger, Lebensfähigkeit

## Summary

The biogas technology is of great ecological and economical importance by using renewable resources for energy production and by offering the chance for recycling biological residues and waste from agriculture, horticulture and industry. The possible disposal of highly infected, non marketable field crops and plant material provides an additional advantage, if the spread of pathogens with the fermentation residue is excluded. Therefore the hygienisation potential of the biogas process is evaluated within this project to assess the risk resulting from the deployment of fermentation residues and the possible enrichment of pathogens on production sites. For this purpose efficient methods to detect the relevant pathogens and especially to prove their viability are to be developed. Quarantine diseases of potato, like bacterial ring rot (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Cms), bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*), potato wart disease (*Synchytrium endobioticum*) and potato cyst nematodes (*Globodera pallida*, *G. rostochiensis*) are analysed on the one hand. On the other hand non-quarantine pathogens were included in our project because of increased requests from practice. These cover e. g. *Verticillium* wilt (*V. dahliae*, *V. albo-atrum*), rhizomania virus of sugar beet, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, the mycotoxin producing fungus *Fusarium graminearum* and the bacterial wilt in forage grasses caused by *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. Additionally a monitoring of three different Bavarian biogas plants was conducted from July 2007 to September 2008 to analyse substrates, contents of fermenters and fermentation residues for phytopathogenic fungi.

Our results demonstrate that besides temperature and retention time of the input material the surrounding milieu represents a major impact factor for the survival of the pathogens in the biogas plant. Pathogens situated in plant material tend to show a longer persistence compared to pathogens isolated from their surrounding host tissue. So far all our analyses show that in most cases the survival time of the investigated pathogens in the biogas fermenter is shorter than the theoretical retention time for the particular substrate. Most of the pathogens examined died within a few hours or days in fermentation substrate or in the fermenter. For Cms a longer survival time was found; this result has to be proved in further examinations. The present results indicate that in most cases the temperatures in mesothermal biogas plants are high enough to obtain fermentation residues which are phytohygienically harmless, provided that the substrate retention time is sufficiently long. As ensilaging also contributes to hygienisation, the fermentation of crops ensiled under optimal conditions further reduces the risk for spreading viable pathogens with fermentation residues. Nevertheless the present results have to be proved in further experiments. In addition the viability of several pathogens has to be examined "in planta".

Within the monitoring of biogas plants phytopathogenic fungi could not be observed in considerable amount, neither in substrates (silage, crop) nor in fermenter contents or fermentation residues.

## Key words:

biogas plant, hygienisation, pathogen, viability

## 1 Einleitung

Die Biogastechnologie ist unter dem Aspekt der Nutzung erneuerbarer Energieträger (NawaRo-Kulturen) und des Klimaschutzes eine zukunftsweisende Technologie. Das Ausbringen der Gärrückstände auf landwirtschaftlich genutzte Flächen leistet zudem einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung natürlicher Kreislaufprozesse. Aus ökonomischer Sicht ist die Möglichkeit, biologische Abfälle und Reststoffe aus Landwirtschaft, Gartenbau und Industrie für die Energieproduktion zu nutzen, bedeutsam. Zudem könnten nicht vermarktungsfähige Befallspartien in Biogasanlagen gewinnbringend entsorgt werden. Dies wäre insbesondere im Hinblick auf die Verwertung von mit Quarantäneschadorganismen (QSO) infizierten Partien, für die zumeist keine sinnvolle Verwendungsmöglichkeit besteht, von großem Vorteil. Allerdings besteht grundsätzlich die Gefahr, dass Pathogene, die den Fermentationsprozess möglicherweise überleben, mit dem Gärrest großflächig auf Kulturflächen verteilt werden; im Hinblick auf QSO ist dies ein bislang nicht kalkulierbares Risiko. Es könnte zu einem raschen und verstärkten, wiederholten Befall der Pflanzen und damit zu einer Aufschaukelung bestimmter Erreger kommen. Die betriebene Kreislaufwirtschaft, enge Fruchtfolgen bevorzugter und mit reduziertem Pflanzenschutzmitteleinsatz angebaute NawaRo-Kulturen sowie die gezielte Entsorgung von Befallspartien erhöhen hierbei das Gefährdungspotenzial. Speziell bei mesotherm betriebenen Biogasanlagen, die in einem Temperaturbereich von 35 bis 45 °C laufen, könnten die Temperaturen für eine Inaktivierung der Keime nicht ausreichen, so dass von diesen Anlagen eine erhöhte Gefahr ausgehen könnte. Dementsprechend müssen gemäß der Bioabfallverordnung bei Vergärung im mesothermen Bereich eine Vor- oder Nachpasteurisierung bei 70 °C oder eine Nachkompostierung durchgeführt werden (PHILIPP und PIETSCH, 2008). Immerhin werden nach einer Studie des Instituts für Ländliche Strukturentwicklung, Betriebswirtschaft und Agrarinformatik (ILB) der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) ca. 75 % der bayerischen Anlagen mesotherm geführt.

Zur Abklärung bestehender Risiken wird an der LfL im Rahmen eines bisher über 3 Jahre laufenden, vom Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten geförderten Projekts das Hygienisierungspotenzial von Biogasanlagen untersucht (*Abb. 1*).

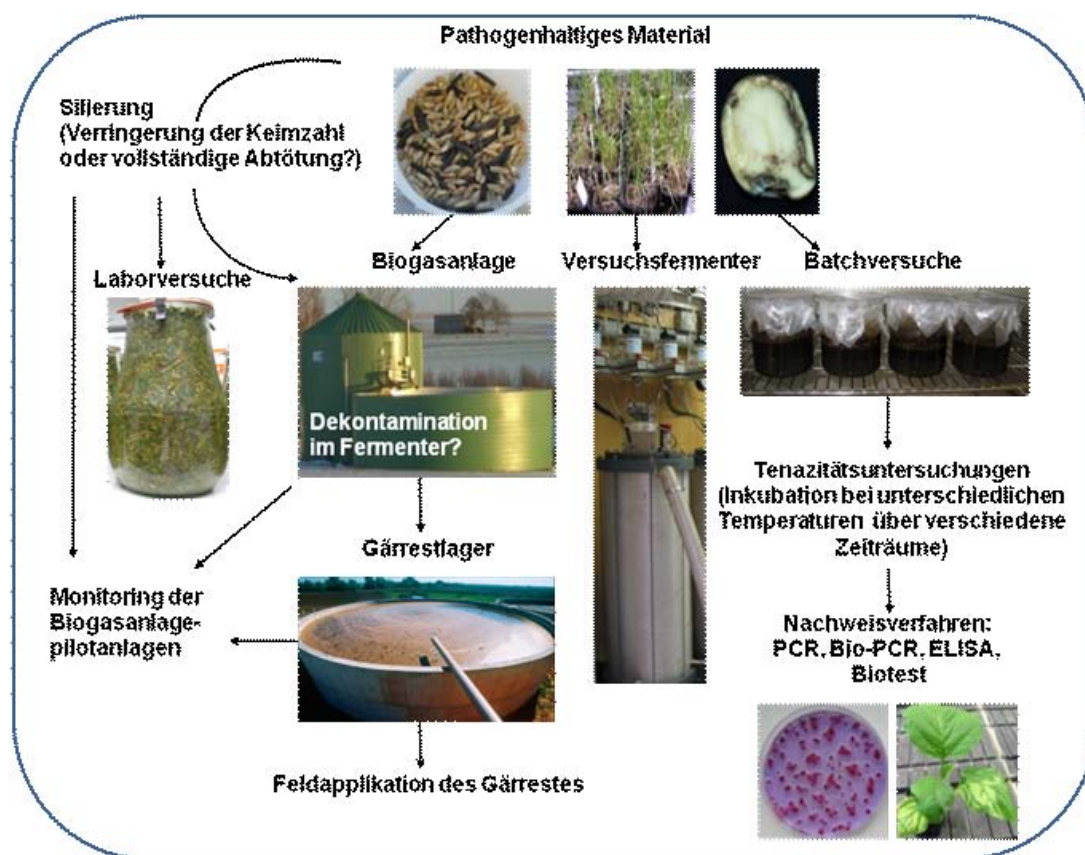


Abb. 1: Grafische Darstellung der Projektarbeiten (Bildquelle: Richter, ITE; ILT, AGENDA)

Die Untersuchung erfolgt zum einen an Quarantänekrankheiten der Kartoffel wie der Bakteriellen Ringfäule (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Cms), Schleimkrankheit (*Ralstonia solanacearum*, Rs), dem Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum*, Se) und den Zystennematoden (*Globodera pallida*, Gp; *G. rostochiensis*, Gr). Zum anderen werden aufgrund gehäufter Anfragen aus der Praxis weitere Nicht-Quarantäneschadorganismen bearbeitet. Diese umfassen u. a. *Verticillium dahliae* (Vd) und *V. albo-atrum* (Vaa), die Erreger von Welke bei einer Reihe bedeutsamer Kulturen, das Rizomaniavirus, das die Wurzelbärtigkeit der Zuckerrübe (BNYVV) bedingt, *Rhizoctonia solani*, den Verursacher der Späten Rübenfäule bei Zuckerrübe und der Wurzeltöterkrankheit bei Kartoffel, *Sclerotinia sclerotiorum*, Auslöser von Fäulnis und Krebs z. B. bei Raps, Leguminosen, Sonnenblume, *Fusarium graminearum*, einen Pilz, der zur Weißfäule und Mykotoxinbildung bei Weizen führt, sowie den Verursacher der Bakteriellen Gräserwelke *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* (Xtg) (Zusammenfassung aller untersuchten Erreger siehe Tab. 1). Zusätzlich wurde von Juli 2007 bis September 2008 ein Monitoring in drei unterschiedlichen, bayerischen Biogaspilotbetrieben (2 mesophil, 1 thermophil betrieben) zur Untersuchung von Substraten, Fermenterinhalt und Gärresten auf phytopathogene Pilze durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Fermenterversuche

Zur Untersuchung der Überdauerungsfähigkeit verschiedener Schadorganismen im Biogasprozess wird pathogenhaltiges Material im Biogasversuchsfermenter unter möglichst

praxisnahen Bedingungen fermentiert. Hierfür werden 36 l-Durchfluss-Versuchsfermenter am Institut für Landtechnik und Tierhaltung (ILT) der LfL genutzt, die im mesophilen (38 °C) bzw. thermophilen (55 °C) Bereich betrieben werden. Als Substrat dienen vorwiegend Gras- und Maissilage in verschiedenen Anteilen. In die Durchflussfermenter (Abb. 2 A-B) werden jeweils zwei Keimträger mit einem Fassungsvermögen von ca. 10 ml (Abb. 2 C) mit dem zu untersuchenden, pathogenhaltigen Material eingeschleust. Die Pathogene werden dabei entweder in isolierter Form, d. h. beispielsweise bei Pilzen als Myzel auf Nährmedium, als Sporen oder Sklerotien, im Falle von Nematoden als Zysten, oder umgeben von ihrer Wirtspflanze, also im Pflanzengewebe („in planta“), eingebracht. Die Keimträger werden unterschiedlich lange im Durchflussfermenter belassen und danach für die Analyse lebensfähiger Schaderreger entnommen.

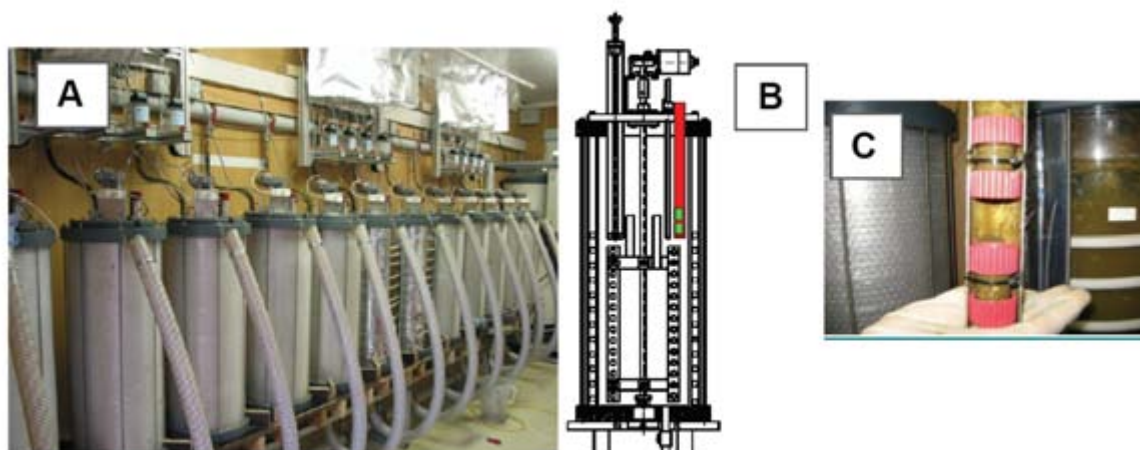


Abb. 2: A: Anlage mit Durchflussbiogasfermentern am ILT. B: Durchflussfermenter (schematisch) mit Vorrichtung zum Einsetzen der Keimträger (rot), Keimträger in Grün. C: Zwei in einer Führungsschiene übereinander installierte Keimträger

## 2.2 Laborversuche im Batchverfahren

Laborversuche, die als diskontinuierliche Batchversuche unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden, dienen zur gezielten Untersuchung der Überdauerungsfähigkeit der Schadorganismen in Abhängigkeit von Temperatur und Milieu. Batchversuche kommen hauptsächlich für die Quarantäneschadorganismen (QSO) *Ralstonia solanacearum* und *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* zur Anwendung. Damit ist sicher gestellt, dass diese QSO nicht über die bei den Versuchsfermentern anfallenden Gärreste ausgebracht und in die Umgebung entweichen können. Zudem erlaubt das Batchverfahren die Untersuchung größerer Pflanzenteile (z. B. Kartoffelknollen). Für die Batchversuche werden infiziertes Pflanzenmaterial oder isolierte Erreger in Laborbechergläsern (Abb. 1) in Gärsubstrat oder Puffer bei definierten Temperaturen im Brutschrank inkubiert und danach zu verschiedenen Zeitpunkten Probenmaterial für die Bestimmung der Überlebensfähigkeit der Pathogene entnommen.

## 2.3 Silierversuche

Um den Einfluss der Silierung auf das Überleben von Pilzen vor der Biogasfermentation zu ermitteln, werden Silierversuche, u. a. am Institut für Tierernährung (ITE) der LfL, in Weckgläsern durchgeführt. Das pathogenhaltige Material wird in Filtertüten eingeschlossen und diese dann in die Weckglas-Silos eingebracht (Abb. 3). Nach unterschiedlich langer Silierdauer wird das silierte Material auf Nährmedien ausgelegt und auf überlebende

Pathogene untersucht. Z.T. werden Proben aus dem silierten Material zusätzlich im Versuchsfermenter bzw. Batchversuch inkubiert, um die kombinierte Wirkung von Silierung und Fermentation im Biogasreaktor zu erfassen



Abb. 3: Weckglas-Silos mit gehäckseltem Pflanzenmaterial

## 2.4 Nachweisverfahren

Zum Nachweis der Pathogene finden verschiedene Methoden Anwendung (*Tab. 1*): mikroskopische, kulturtechnische, biologische, serologische und molekularbiologische Verfahren. Für den Nachweis der Erregervitalität, die nicht allein durch serologische oder molekularbiologische Verfahren zu bestimmen ist, werden stets das Erregerwachstum auf Nährmedien und/oder die Fähigkeit, Wirtspflanzen zu infizieren, miteinbezogen. Im Einzelnen wurden folgende Techniken eingesetzt:

- konventionelle Kulturverfahren auf Semiselektiv- und Selektiv-Medien für Pilze und Bakterien,
- mikroskopische Auswertung nach Wachstum der Erreger, besonders Pilze, auf Nährmedium und Bestimmung aufgrund morphologischer Kriterien,
- Immunfluoreszenz (IF)-Test für den Nachweis bestimmter Bakterienarten (Rs: ANONYMOUS, 2004a; Cms: ANONYMOUS, 2006; Xtg: POSCHENRIEDER, pers. Mitt),
- klassische, qualitative PCR für den Nachweis bestimmter Bakterien-, Pilz- und Nematodenarten (Rs: ANONYMOUS, 2004a; Cms: ANONYMOUS, 2006; V. d.: ASPROMOUGKOS, 2002; V.a.a.: ANONYMOUS, 2007; Xtg: MAES et al., 1996; Gp, Gr: ANONYMOUS, 2004b, KAEMMERER, unveröffentlicht; Se: NIEPOLD und STACHEWICZ, 2004; VAN DEN BOOGERT et al., 2005),
- Realtime PCR für Rs und Cms (SEIGNER, 2007),
- Bio-PCR für lebensfähige Cms (KAEMMERER, 2009), Rs (SEIGNER, unveröffentlicht),
- DAS-ELISA (CLARK und ADAMS, 1977) und Fangpflanzentest (SEIGNER, unveröffentlicht) für den Nachweis virulenter Rizomaniaviren,



- Biotest für den Nachweis vitaler bzw. pathogener Erreger: Schleim- (ANONYMOUS, 2004a) und Ringfäulebakterien (ANONYMOUS, 2006), Kartoffelkrebserreger (ANONYMOUS, 2004c), Xtg (FRIEDRICH, unveröffentlicht), *Globodera* spp. (ARNDT, 2007),
- Schlupftest für den Nachweis lebensfähiger *Globodera* spp. (ARNDT, 2007).

## 2.5 Monitoring der Biogaspilotanlagen

Von Juli 2007 bis September 2008 wurde ein Monitoring in 3 bayerischen Biogaspilotanlagen durchgeführt. 2 dieser Praxisanlagen werden mesophil, 1 thermophil betrieben. Monatlich wurden Proben aus den eingebrachten Substraten (Silagen, Getreide), den einzelnen Fermentern und dem Gärrestlager gezogen. Die einzelnen Proben wurden mit konventionellen Verfahren auf phytopathogene Pilze untersucht und dabei auf antibiotikahaltige Nährböden ausgelegt bzw. ausplattiert. Nach ca. 2 Wochen wurde das Wachstum der Pilze mikroskopisch ausgewertet und eine Identifizierung aufgrund morphologischer Parameter vorgenommen.

## 3 Ergebnisse

Die Untersuchungen an einer Reihe von Erregern (Cms, Rs, Gp, Gr, Fg, Um) ergaben, dass erwartungsgemäß neben der Verweildauer die Temperatur ein kritischer Faktor bei der Überdauerung der Erreger im Biogasfermenter ist. Zudem zeigte sich deutlich, dass die Temperatursensitivität vom umgebenden Milieu beeinflusst wird. Die Erreger sterben in Gärsubstrat bei geringeren Temperaturen und teilweise wesentlich schneller ab, als in Puffer oder Wasser. Dort wirkt sich eine Inkubation erst bei 40-45 °C negativ auf die Lebensfähigkeit aus, in Gärsubstrat bereits ab 35-40 °C. Ab der kritischen Temperatur reduziert – bei jeweils 10-minütiger Inkubation – eine Erhöhung um 4-8 °C in Wasser oder Puffer die Keimzahl um 90 %, in Gärsubstrat reichen dafür 2-6 °C.

### 3.1 Lebensfähigkeit der Pathogene im Durchflussfermenter und Batchverfahren

In den bisherigen Untersuchungen lagen die Überlebenszeiten der Pathogene zumeist unter den für das jeweilige Substrat angegebenen theoretischen Verweilzeiten in der Biogasanlage. Die meisten Erreger starben innerhalb weniger Stunden bzw. Tage in Gärsubstrat bzw. im Fermenter ab (*Tab. 1*).

#### 3.1.1 Bakterielle Ringfäule (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*)

Für Cms wurde eine Bio-PCR entwickelt, mit der die Untersuchung der Temperaturempfindlichkeit der Bakterien und die Feststellung ihrer Lebensfähigkeit in Gärproben ermöglicht wurde (KAEMMERER, 2009). Die Lebensfähigkeit von Cms wurde in Batchversuchen untersucht. In Vorversuchen führte eine 2-tägige Inkubation der Bakterien bei 39 °C in Puffer bereits zur Abtötung (KAEMMERER, unveröffentlicht). Wurden hingegen ganze Knollen in Puffer bei 38 °C inkubiert, so überlebten die Bakterien mindestens 7 Tage lang. Dies unterstreicht eindeutig die Schutzwirkung der umgebenden Knolle auf die Bakterien. In Kartoffelstücken, in Gärsubstrat inkubiert, war Cms ebenfalls noch am Versuchsende nach 7 Tagen vital. Unsere jüngsten Versuche über einen verlängerten Zeitraum mit ganzen Knollen in Gärsubstrat zeigen, dass die Bakterien in Knollen selbst nach einer Inkubation von 100 Tagen (Versuchsende) im Batchversuch noch vital sind. Unter Berücksichtigung der in der Praxis üblichen Retentionszeiten könnte das bedeuten, dass unter Praxisbedingungen hinsichtlich Cms eine vollständige Hygienisierung im Biogasfermenter nicht

mit Sicherheit zu erwarten ist. Die vorliegenden Ergebnisse müssen für eine endgültige Risikoabschätzung jedoch noch weiter überprüft werden.

Tab. 1: Zusammenfassung der bearbeiteten Phytopathogene und bisherige Ergebnisse

Erreger	Krankheit	Kultur	Nachweismethode / Vitalitätsnachweis	untersuchtes Gewebe	Lebensfähigkeit in Gärsubstrat bzw. Silage
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (Cms)	Bakterielle Ringfäule	Kartoffel, Tomate	PCR, Realtime-PCR / Wachstum auf NCP-88-Medium + Bio-PCR	Knolle	mindestens 100 Tage bei 38 °C (Batchverfahren)
<i>Ralstonia solanacearum</i> (Rs)	Schleimkrankheit	Kartoffel, Tomate	PCR, Realtime-PCR / Wachstum auf SMSA-Medium + Bio-PCR	Knolle	mindestens 30 Tage bei 38 °C (Batchverfahren)
<i>Synchytrium endobioticum</i> (Se)	Kartoffelkrebs	Kartoffel	Mikroskop, DNA-basierte PCR / Biotest	Krebswucherungen	noch keine Ergebnisse
<i>Globodera pallida</i> , <i>Globodera rostochiensis</i> (Gp, Gr)	Kartoffel-Zystennematode	Kartoffel	PCR, Mikroskopie / Schlupfstest, Fangpflanzentest, GPDH-mRNA-Nachweis	Zysten	4 Tage bei 38 °C (Durchflussfermenter)
<i>Microdochium nivale</i>	Schneeschnitzpilz	Gräser, Getreide	Mikroskopie / Wachstum auf Antibiotika-Medium	überwachsene Weizenkörner	8 h bei 38 °C (Durchflussfermenter)
<i>Fusarium graminearum</i> (Fg)	Ährenfusariose, Taubährigkeit (Mykotoxinbildung)	Getreide, Gräser, Mais	Mikroskopie, PCR, Realtime-PCR / Wachstum auf Antibiotika-Medium	überwachsene Weizenkörner	1 Tag bei 38 °C (Durchflussfermenter) ; Silierversuch bei 25 °C: kein Überleben
Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)	Wurzelbärtigkeit der Zuckerrübe	Zuckerrübe	ELISA, Mikroskopie / ELISA nach Fangpflanzentest	Wurzeln	4 Tage bei 38 °C, 4 Tage bei 55 °C: kein Überleben (Durchflussfermenter)
<i>Verticillium dahliae</i> (Vd), <i>Verticillium albo-atrum</i> (Vaa)	Verticilliumwelke	Dikotyledonen, u. a. Solanaceen, Hopfen	Mikroskopie / Wachstum auf Biomalz-Agar, PCR	Myzel auf Agar, Hopfenreben	Myzel: 2 Tage (Vd), 13 Tage (Vaa) bei 38 °C (Durchflussfermenter) ; bei 55 °C: kein Überleben
<i>Ustilago maydis</i> (Um)	Maisbeulenbrand	Mais	Mikroskopie / Wachstum auf Antibiotika-Wasseragar	Sporen	1 Tag bei 38°C (Durchflussfermenter)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Ss)	Fäule, Krebs	Raps, Leguminosen, Sonnenblume etc.	Mikroskopie / Wachstum auf Antibiotika-Biomalz-Medium	Sklerotien (Dauerkörper)	8 Std. bei 38 °C (Durchflussfermenter) ; Silierversuch bei 25 °C: 2 Tage
<i>Rhizoctonia solani</i> (Rhs)	Späte Rübenfäule, Wurzeltöterkrankheit	Zuckerrübe, Kartoffel, Mais	Mikroskopie / Wachstum auf Antibiotika-Medium	Sklerotien (Dauerkörper)	8 Std. bei 38 °C (Durchflussfermenter) ; Silierversuch 25 °C: kein Überleben
<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>graminis</i> (Xtg)	Bakterielle Gräserwelke	Gräser	Wachstum auf XTS-Medium, PCR, Biotest	Weidelgras, isolierte Keime	Weidelgras: bis 26 Tage vital, 6 Tage infektiös bei 38 °C (Durchflussfermenter)
<i>Claviceps purpurea</i> (Cp)	Bildung von Mutterkorn	Getreide	Mikroskopie / Sporulation auf Mantel-Medium	Mutterkörner	noch kein Ergebnis

### 3.1.2 Schleimkrankheit (*Ralstonia solanacearum*)

Auch das Überleben von Rs wurde in Batchversuchen untersucht. In Vorversuchen, in denen ganze Knollen in Wasser inkubiert worden waren, konnten nach 4-tägiger Inkubati-

on bei 39 °C nur noch einzelne lebende Zellen isoliert werden. Ebenso konnte Rs in Kartoffelstückchen 4 Tage in Gärsubstrat überstehen, hingegen war nach 7 Tagen, anders als bei Cms, kein Wachstum mehr feststellbar. Nach Inkubation ganzer Knollen in Gärsubstrat war Rs nach 30 Tagen Wachstum noch vital. Ob ein längeres Überdauern möglich ist, muss noch abgeklärt werden. Im Gegensatz zu Cms scheint Rs jedoch empfindlicher gegenüber den Bedingungen im Gärsubstrat zu reagieren. Die praxisüblichen Retentionszeiten könnten hier für eine Hygienisierung ausreichen.

### 3.1.3 Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum*)

In Batchversuchen mit Knollenwucherungen, verursacht durch Se, wurde in Gärsubstrat schon nach 1-stündiger Inkubation keine Infektiosität des Erregers im Biotest mehr festgestellt. In Fermenterversuchen bei 39 °C mit Knollenwucherungen, eingeschweißt in Gazebriefchen und so in Keimträger eingebracht, erwies sich Se bei der ersten Probenahme nach 4 Tagen als nicht mehr vital. Diese Ergebnisse gelten jedoch nur mit äußerstem Vorbehalt, da auch in der Positivkontrolle nur eine geringe Erregerpathogenität nachzuweisen war. Das bedeutet, dass der zur Feststellung der Vitalität angewandte Biotest (ANONYMOUS, 2004c) keine verlässlichen Aussagen ermöglichte. Zur Überwindung dieser methodischen Schwierigkeiten kamen als Alternative zum Biotest DNA-basierte PCR-Verfahren zum Einsatz. Die Se-DNA konnte nach Inkubation im Fermenter bei 38 °C nach 21 Tagen noch nachgewiesen werden, was allerdings nur auf die Präsenz des Erregers, nicht aber auf seine Vitalität schließen lässt. Eine Abklärung der Befunde ist notwendig. Eine Abschätzung der Überdauerungsfähigkeit von Se ist bisher nicht möglich.

### 3.1.4 Kartoffel-Zystennematoden (*Globodera pallida*, *G. rostochiensis*)

Für Gp und Gr wurde ein GPDH-mRNA-basiertes Verfahren als hochsensitive Methode zum Nachweis vitaler Nematodeneier, -larven und -zysten entwickelt, basierend auf innerhalb eines DEFRA Projekts (ANONYMOUS) erarbeiteten Primern. Dieses Verfahren kam in Ergänzung zum Schlupftest zur Anwendung. Nach 5-tägiger Inkubation von Zysten bei 39 °C in Puffer verlief der Schlupftest sowohl bei Gp als auch bei Gr negativ. In einem 14-tägigen Fermenterversuch bei 39 °C erbrachte der Schlupftest bei Gr bereits nach 4 Tagen negative Resultate. Bei Gr war nach 3 Tagen keine mRNA, und bei Gp weniger mRNA nachweisbar, was auf einen schnellen Rückgang der Vitalität schließen lässt. Es ist davon auszugehen, dass Kartoffelzystennematoden durch den Biogasprozess abgetötet werden, so dass diesbezüglich kein phytosanitäres Risiko besteht.

### 3.1.5 *Fusarium graminearum*

Fg-Sporen zeigten bei 10-minütiger Inkubation in Puffer zwischen 45 °C und 55 °C eine lineare Abnahme ihrer Lebensfähigkeit. In Gärsubstrat wurden im Batchversuch bei 40 °C nach 10 Minuten erste Sporen abgetötet; die Abnahme der Zahl lebender Sporen erhöhte sich bis 55 °C um das 6-fache im Vergleich zur Puffer-Inkubation. Fg zeigte nach Inkubation überwachsener Weizenkörner schon nach 1 Tag im Biogasfermenter bei 38 °C kein Wachstum mehr auf Nährmedium.

### 3.1.6 Wurzelbärtigkeit der Zuckerrübe (*Beet necrotic yellow vein virus*)

Die Untersuchung zur Persistenz von BNYVV erfolgte nach Inkubation infizierter Zuckerrübenwurzeln im Fermenter bei 38 °C und 55 °C mit ELISA. Die Überprüfung der Virulenz wurde im Biotest mit Zuckerrübenpflänzchen und anschließendem ELISA untersucht. Dabei zeigte sich, dass BNYVV bis zum Versuchsende nach 22 Tagen nachweisbar, aber

nur nach 4-tägiger Inkubation bei 38 °C noch infektiös war, ab 8 Tagen nicht mehr. Nach Inkubation bei 55 °C war keine Virulenz des BNYVV mehr festzustellen.

### 3.1.7 Verticilliumwelke (*Verticillium dahliae*, *V. albo-atrum*)

Vd und Vaa wurden als Myzel auf Agar im Fermenter bei 38 °C inkubiert. Vd war bis zu 8 Tagen lebensfähig, Vaa bis zu 13 Tagen. Bei einer 7-tägigen Inkubation bei 55 °C konnten bei keiner Probenahme überlebende Erreger (Vd und Vaa) nachgewiesen werden. Versuche mit *Verticillium*-infiziertem Pflanzenmaterial werden zurzeit durchgeführt.

### 3.1.8 Bakterielle Gräserwelke (*Xanthomonas translucens* pv. *graminis*)

In Vorversuchen zeigte Xtg bereits nach 3-tägiger Inkubation bei 38 °C in Gärsubstrat (Batchversuch) kein Wachstum mehr auf Medium. Nach Inkubation von infiziertem Weidelgras im Fermenter bei 38 °C war Xtg bis 26 Tage lebensfähig. Allerdings erwies sich der Erreger nur bis zum 6. Tag im Fermenter als infektiös im Biotest auf Weidelgras.

## 3.2 Silierversuche mit *Fusarium graminearum*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Rhizoctonia solani*

Um den Einfluss der Silierung auf das Überleben verschiedener Pathogene zu untersuchen, wurde ein 90-tägiger Silierversuch bei 25 °C angelegt, in dem mit Fusarien überwachsene Weizenkörner und Sklerotien von Ss und Rhs mit Mais in Weckgläsern siliert wurden. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch nach Wachstum auf Nährmedium. Dabei konnte nur bei Ss nach 2 Tagen geringes Wachstum festgestellt werden, bei Fg und Rhs war kein Wachstum mehr nachweisbar. Allerdings ist für die hygienisierende Wirkung der Silierung der Ausschluss von Sauerstoff ein kritischer Faktor.

## 3.3 Monitoring der Biogaspilotanlagen

In dem von Juli 2007 bis September 2008 durchgeführten Monitoring in 3 bayerischen Biogaspilotanlagen (2 mesophil, 1 thermophil) wurden keine phytopathogenen Pilze in nennenswertem Umfang nachgewiesen, weder in Proben aus Substraten (Silagen, Getreide), noch aus Fermentern und Gärrestlagern. In erster Linie traten als reine Saprophyten einzustufende Organismen auf. In den Fermenterproben war insgesamt deutlich geringeres Pilzwachstum festzustellen. Dies gilt vor allem für die aus dem Nachgärer bzw. Endlager gezogenen Proben, in denen z. T. kein Pilzwachstum mehr beobachtet wurde. Unterschiede zwischen meso- und thermophiler Fermenterführung wurden nicht beobachtet.

## 4 Diskussion

Eine abschließende Beurteilung des Hygienisierungspotenzials des Biogasprozesses ist aufgrund der vorliegenden Projektergebnisse noch nicht möglich. Ob die in Biogasfermentern herrschenden Bedingungen ausreichen, um Pathogene abzutöten, kann noch nicht für alle bearbeiteten Pathogene endgültig beurteilt werden. Weitere Untersuchungen sind hierfür notwendig. Eindeutig belegt wurde, dass erwartungsgemäß nicht nur die Temperatur und die Verweildauer des Substrats im Fermenter, sondern auch das umgebende Milieu die Überdauerung von Schaderregern beeinflussen. Diese drei Parameter sind, neben der Persistenz des Erregers selbst, als kritische Größen für eine Hygienisierung in der Biogasanlage zu betrachten. Eine vorgeschaltete Silierung unter optimalen Bedingungen trägt zu einer wesentlichen Reduktion der Keimbelastung des

Inputmaterials bei und unterstützt dadurch die weitere Hygienisierung im Biogasfermenter.

Unsere Ergebnisse zeigen ferner, dass die Überdauerungsfähigkeit der Pathogene in Biogasanlagen differenziert zu beurteilen ist. Für den Großteil der bearbeiteten Pathogene wurden bei 38 °C Überdauerungszeiten zwischen 8 Stunden und 7 Tagen ermittelt. Somit liegen selbst unter mesothermen Versuchsbedingungen die Überlebenszeiten unter den meist für Substrate angegebenen, durchschnittlichen theoretischen Verweilzeiten in Biogasanlagen von 2 bis 4 Monaten. Die Temperaturen in mesothermen Anlagen scheinen also auszureichen, um phytohygienisch unbedenkliche Gärreste zu erhalten, sofern eine ausreichend lange Verweilzeit des Inputmaterials im Fermenter gewährleistet ist. Obwohl diese Ergebnisse größtenteils noch keine endgültige Bewertung zulassen, bestätigen sie die wenigen, für anaerobe Fermentation in der Literatur vorliegenden kurzen Überdauerungszeiten. Z. B. erbrachten Untersuchungen der Universität Hohenheim (FRAUZ et al., 2006) ähnliche Erkenntnisse: *Fusarium culmorum*, ein Pilz an Getreide, wird im Biogasfermenter sowohl bei 37 °C als auch bei 53 °C schon nach 12 Stunden inaktiviert. Für diese, innerhalb weniger Stunden oder Tage abgetöteten Erreger kann die Biogasfermentation durchaus als Hygienisierungsmaßnahme angesehen werden. Andere Schadorganismen hingegen sind in der Lage, den anaeroben Fermentationsprozess über einen längeren Zeitraum zu überdauern, so z. B. der Erreger der Bakteriellen Ringfäule der Kartoffel (Quarantänekrankheit), der mindestens 100 Tage im Gärsubstrat überleben kann. Betrachtet man die in der Praxis üblichen Verweildauern von Gärsubstraten im Fermenter, so besteht beim Ausbringen des Gärrests auf Produktionsflächen für diese, über längere Zeit persistierenden Pathogene ein Risiko der Verschleppung. Da das Risiko für eine Aufschaukelung von Krankheiten auf den entsprechenden Produktionsflächen jedoch nicht allein vom Ausbringen belasteter Gärreste abhängt, sondern auch von der Fruchtfolge, der Persistenz eines Erregers im Boden und vor allen Dingen auch davon, ob ein Erreger tatsächlich über den Boden Infektionen auslösen kann, kann eine endgültige Risikoabschätzung nur pathogenbezogen unter Berücksichtigung aller genannten Einflussgrößen erfolgen.

Einen alternativen Ansatz zur Abschätzung des Risikos bieten Monitoring-Programme. Im Rahmen des von uns durchgeführten Monitorings wurden aus einer Reihe von Pilotbetrieben im Rahmen des "Aktionsprogramms Biogas in Bayern" drei Biogaspilotanlagen ausgewählt. Da weder in den Inputmaterialien noch in den Gärresten dieser Pilotanlagen unabhängig davon in welchem Temperaturbereich sie betrieben wurden – phytopathogene Pilze in nennenswertem Umfang gefunden wurden, scheint zumindest im Hinblick auf die Verbreitung von Pilzkrankheiten in der Praxis derzeit keine Gefahr zu bestehen. Für eine umfassendere Risikobeurteilung ist eine Ausdehnung des Monitorings auf weitere Anlagen und Anlagentypen, evtl. auch die Einbeziehung von Betrieben, die Substrat aus biologischer Landwirtschaft zuführen, über einen verlängerten Zeitraum anzustreben.

## Literatur

ANONYMOUS: Development of a robust assay to estimate the viability of potato cyst nematodes *Globodera* spp. URL: [http://randd.defra.gov.uk/Document.aspx?Document=HH3110SPO\\_1940\\_FRP.doc](http://randd.defra.gov.uk/Document.aspx?Document=HH3110SPO_1940_FRP.doc) [Stand: 10.09.09]

ANONYMOUS (2004a): *Ralstonia solanacearum*. EPPO Bulletin 34, 173–178

ANONYMOUS (2004b): *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. EPPO Bulletin 34, 155–157

- ANONYMOUS (2004c): *Synchytrium endobioticum*. EPPO Bulletin 34, 213-218
- ANONYMOUS (2006): *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. EPPO Bulletin 36, 99-109
- ANONYMOUS (2007): *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop. EPPO Bulletin 37, 528-535
- ARNDT, M. (2007): Vergleich von Nachweismethoden für Kartoffelzystennematoden (*Globodera* spp.) im Hinblick auf eine Qualitätssicherung von Diagnosen geregelter Schadorganismen. Gesunde Pflanzen 59(2), 67-70
- ASPROMOUGKOS I. (2002): Quantifizierung der DNA von *Verticillium dahliae* in planta mittels kompetitiver PCR und HPLC. Diss., Giessen
- CLARK, M.F., ADAMS, A.N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34, 475-483
- FRAUZ, B. (2006): Untersuchung zur Inaktivierung von Fusariensporen und zur Reduzierung von Deoxynivalenol in Weizen bei dessen Vergärung in landwirtschaftlichen Flüssig- und Trockenfermentierungsanlagen. Abschlussbericht zum Projekt mit Förderkennzeichen 22015903
- KAEMMERER, D. (2009): Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in digester material after heat treatment by TaqMan® BIO-PCR. J. Plant Dis. Prot. 116, 10-16
- MAES M., GARBEVA P., KAMOEN O. (1996): Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leaf streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. Techniques 86(1), 63-69
- NIEPOLD F., STACHEWICZ H. (2004): PCR-detection of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.. Zeitschr. für Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz 111(4), 313-321
- PHILIPP W., PIETSCH, M. (2008): Phyto- und Seuchenhygiene bei der Biogaseerzeugung. Mais 3(35), 95-97
- SEIGNER, L. (2007): Realtime-PCR zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* und *Ralstonia solanacearum* - Grundlagen, Methode und praktische Hinweise. Gesunde Pflanzen 59, 101-106
- VAN DEN BOOGERT P.H.J.F., VAN GENT-PELZER M.P.E., BONANTS P.J.M., DE BOER S.H., WANDER J.G.N., LEVESQUE C.A., VAN LÉEUWEN G.C.M., BAAYEN R.P. (2005): Development of PCR-based detection methods for the quarantine phytopathogen *Synchytrium endobioticum*, causal agent of potato wart disease. Europ. Journal of Plant Pathol. 113, 47-57

## Dank

Unser Dank gilt Herrn Dr. Poschenrieder und seiner Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei den bakteriologischen Analysen sowie allen beteiligten Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppen Mykologie und Virologie, den Kolleginnen und Kollegen des ILT, die uns die Benutzung der Versuchsfermenter ermöglichten, und dem Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten für die finanzielle Förderung des Projekts.

## Prevalence and role of hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic biogas reactors

V.V. Zverlov<sup>1</sup>, W. Hiegl<sup>1</sup>, D.E. Köck<sup>1</sup>, J. Kellermann<sup>2</sup> and W.H. Schwarz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Technische Universität München, Emil-Ramann-Str. 4, 85350 Freising-Weihenstephan, Germany

<sup>2</sup> Max Planck Institute for Biochemistry, Am Klopferspitz 18a, 82152 Martinsried, Germany

### Zusammenfassung

Die Hydrolyse der Biomasse ist in Biogasanlagen der erste Schritt für den Abbau zu Biogas und deshalb entscheidend für die Effizienz des Gesamtprozesses. Nebenprodukte des Stoffwechsels der hydrolytischen Bakterien sind kurzkettige Fettsäuren und Alkohole, sowie Hydrolysegas (CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>), die zusammen mit dem Hydrolysegas durch Archaeobakterien zu Methan umgewandelt werden. Über die Gemeinschaft der hydrolytischen Bakterien und die besten Bedingungen für ihre Aktivität ist bisher wenig bekannt.

Auf Silage aus Ganzpflanzen-Mais und Gras aus Dauergrünlandanbau wurden bei 37 und 55 °C Bakterien-Mischkulturen angereichert und auf optimales Wachstum und gute Hydrolyse gescreent. Es wurden die Bedingungen ausgetestet, die für eine Hydrolyse am besten geeignet sind. Bei 55 °C wurden durchwegs bessere Ergebnisse erzielt als bei 37 °C. Der pH-Bereich über 6,5 ist für die Hydrolyse von Cellulose geeignet. Für die Analyse der Abbaueffizienz wurden Batch-Kulturen angesetzt. Das Retentat wurde nach Abtrennung und Waschen mit einem feinen Nylonsieb getrocknet und gewogen.

Die Zusammensetzung eines optimal hydrolysierenden Bakterien-Konsortiums wurde mit molekularbiologischen Methoden bestimmt. Die Zahl der Klone wurde durch einen Vergleich der Restriktionsmuster (RFLP) eingeschränkt und durch Sequenzierung taxonomischer Einheiten (OTUs) zugeordnet. Um cellulolytische Vertreter in der Bakteriengemeinschaft zu identifizieren, wurden Reinkulturen auf Cellulose-Hydrolyse gescreent. 70 % der cellulolytischen Isolate waren verwandt zu *Clostridium thermocellum*. Um die Beschränkung auf kultivierbare Bakterien zu umgehen, wurden Cellulose-bindende Proteine isoliert und durch MALDI-TOF-TOF und Peptid-Sequenzierung *C. thermocellum* und *Clostridium stercorearium* zugeordnet. Damit wurden diese beiden Bakterien als die hauptverantwortlichen Bakterien für die Hydrolyse in thermophilen Biogasanlagen identifiziert.

## Summary

Hydrolysis of plant biomass is the first step in the degradation chain for the production of biogas and is of the greatest importance for the efficiency and yield of the entire process. This first reaction step is in plant-biomass fed biogas fermenters entirely performed by a consortium of hydrolytic bacteria. They produce mono- and oligosaccharides, short chain fatty acids, alcohols and “hydrolysis gas” which are necessary for the microbial downstream processes towards biogas production. The nature of the hydrolytic bacterial community in biogas plants fed with pure plant material and the optimal conditions for hydrolysis are almost uncharted territory.

Maize (whole plant) or grass silage were used to enrich mixed bacterial cultures from various natural environments. The cultures were screened for optimal growth at 37 and 55 °C, production of hydrolysis gas and efficiency of fibre degradation. With selected cultures the conditions best suited for hydrolysis were determined. At 55 °C a better hydrolysing culture could be isolated than at 37 °C. The best selected hydrolytic cultures (one each mesophilic and thermophilic), were tested with different starting pH, different dilutions of substrate and at various temperatures. The residual fibre after filtration through a fine nylon cloth was taken as an indicator for hydrolytic activity.

The composition of the thermophilic bacterial consortium was determined by sequencing clones from a metagenomic 16S rDNA gene library. A pre-screening method for grouping of the clones was developed on the basis of RFLP. To identify the cellulolytic bacteria anaerobic cultures were purified. 70 % of the pure isolates were strongly related to *C. thermocellum*. As a culture independent approach a method for isolating cellulose binding proteins (= true cellulases) were developed. MALDI-TOF-TOF analysis and end-sequencing of peptides from prominent protein bands revealed mainly cellulases from the cellulosome of *C. thermocellum* and from a major cellulase of *C. stercorarium*. Cultures of *C. thermocellum* and *C. stercorarium*, alone and in mixture, were shown to be good degraders of maize silage.



## 1 Introduction

Hydrolysis of plant biomass is the first step in the degradation of substrates and the metabolic conversion to biogas in a chain of interacting bacteria. Degradation of the polysaccharides in the biomass has to be as complete as possible to enable an economically and energetically efficient overall process. Hydrolysis with high reaction speed and effective substrate degradation depth is therefore of the greatest importance for the efficiency and yield of the entire process. This first reaction step in plant biomass fed biogas fermenters is entirely performed by a consortium of still widely unknown hydrolytic bacteria. They produce the mono- and oligosaccharides, the short chain fatty acids and alcohols necessary for the microbial downstream processes towards biogas production, which is performed by the syntrophic bacteria and the acetoclastic and hydrogenotrophic archaea (Nettmann et al., 2008; Bauer et al. 2008).

A number of mesophilic and thermophilic, mainly anaerobic but also aerobic biomass degrading bacteria has been isolated. Most are able to hydrolyze the relatively easily accessible polysaccharides such as starch, pectin,  $\beta$ -1,3- or mixed-linkage glucans, hemicellulose or gums. They are usually not very active on natural cellulose although some of them have been called “cellulolytic” due to their activity on carboxymethyl cellulose (CMC) (Schwarz, 2001, 2002). However, many environmental bacteria (especially soil dwellers) produce endo-glucanases active on CMC but not on crystalline (natural) cellulose. On the other hand, “true” cellulose degraders such as *C. thermocellum* are specialized on and very efficient in the degradation of cellulose. Although *C. thermocellum* produces enzymes for the degradation of hemicellulose, it does not use the sugars released (xylose) as carbon source. The role of the hemicellulases seems to be the peeling of the cellulose microfibril from the hemicellulose embedding it – only to get access to its substrate, the cellulose.

The nature of the community of hydrolytic bacteria in purely plant-fed biogas plants (NaWaRo) and the optimal conditions for hydrolysis are almost uncharted territory. In this study we try to present further insights into the underlying processes and the methods to investigate them. Mesophilic and thermophilic processes are regarded.

For this purpose we set up a synthetic mixture of two bacteria commonly involved in the natural degradation of lignocellulosic material and compare its efficiency in mesophilic and thermophilic enrichments of optimally hydrolytic bacterial cultures on the same substrate. The bacteria in these mixed cultures were investigated on a molecular basis for their phylogenetic heterogeneity to identify the composition of the consortium. Potentially hydrolytic bacterial groups are identified by homology of 16S rDNA sequence determination, by isolation and identification of culturable cellulolytic bacteria, and by identification of proteins attaching to cellulose.

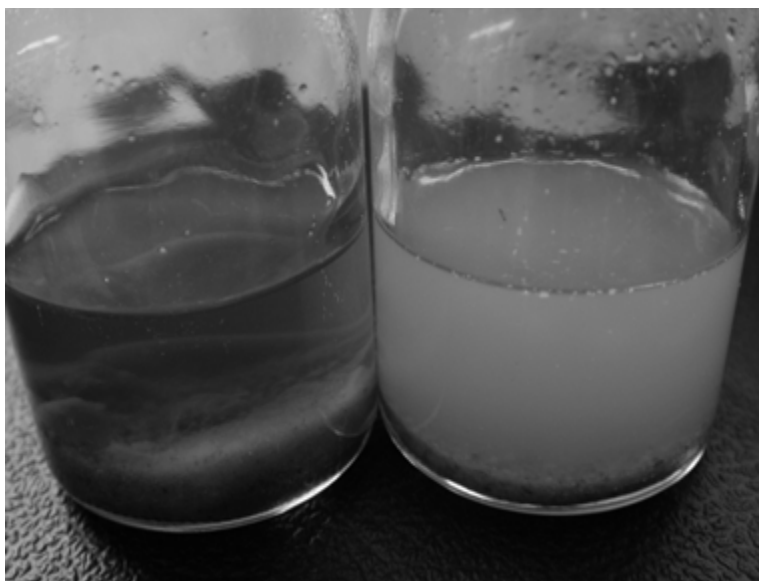
## 2 Results

### 2.1 Growth of hydrolytic reference cultures on silage

From earlier investigations it was known that *Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium* are ubiquitous occurring bacterial species commonly involved in cellulose and hemicellulose degradation during the natural decay of plant biomass (Schwarz, 2002). Hence it was investigated how efficiently a combination of these two thermophilic anaerobic species can degrade the polysaccharides in maize silage alone and in co-culture. Whereas *C. thermocellum* is able to degrade and utilize cellulose with high efficiency, it

degrades hemicellulose as a side activity of its enzyme complex (cellulosome). However, it can not utilize the sugars produced from hemicellulose. In contrast, *C. stercorarium* is less efficient in cellulose hydrolysis and possesses only two genes for cellulases. On the other hand it has a great number of genes for the hydrolysis of hemicellulose, hydrolyzes hemicellulose efficiently, and utilizes the degradation products (Adelsberger et al., 2004).

Both bacteria produce the typical end products of clostridial fermentation: ethanol, lactate, acetate, butyrate and other short chain products in addition to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> gas (Zverlov & Schwarz, 2008). These products fit well into the scheme of typical substrates for the syntrophic and acetogenic bacteria, as well as for the acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenic archaea in the biogas process. These bacteria will conclude the disproportionization process from the biomass polysaccharides to the reduced and oxidized final products, methane and CO<sub>2</sub> respectively.



*Fig. 1: Growth of hydrolytic cultures on ground maize silage. Left bottle: substrate in medium without inoculation. Right bottle: after inoculation with *C. thermocellum* and *C. stercorarium* and 3 days incubation at 60 °C the decrease in substrate volume indicates its degradation, turbidity of the medium and gas formation growth of microorganisms*

Both bacterial strains, *C. thermocellum* and *C. stercorarium*, are growing well on maize silage (Fig. 1). Dense growth with about 10<sup>9</sup> cells ml<sup>-1</sup> was obtained within 50 hrs under vigorous formation of hydrolysis gas, a mixture of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>, and of fermentation products, mainly acetate and ethanol. Further end products in negligible quantities are also formed. *C. stercorarium* was growing (at least initially) faster on the substrate, but did not degrade as much of it at the end (65 vs. 78 %). In contrast, *C. thermocellum* did initially not grow as quickly, but could after long incubation (more than 4 days) degrade as much of the substrate as the synthetic mix (Fig. 3). The mixed culture of both strains was able to degrade the substrate within 2 days by 68 %; after 5 days ca. 76 % of the substrate (dry weight) were degraded almost to the maximum of possible degradation.

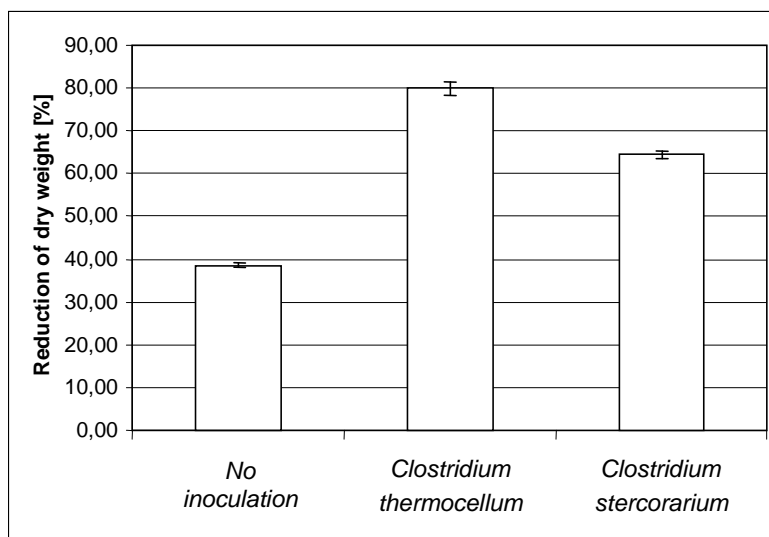


Fig. 2: Reduction of dry weight of ground maize silage after incubation with no bacteria, *C. thermocellum* and *C. stercorarium* at 60°C. Values are % dry weight after washing in comparison to material input

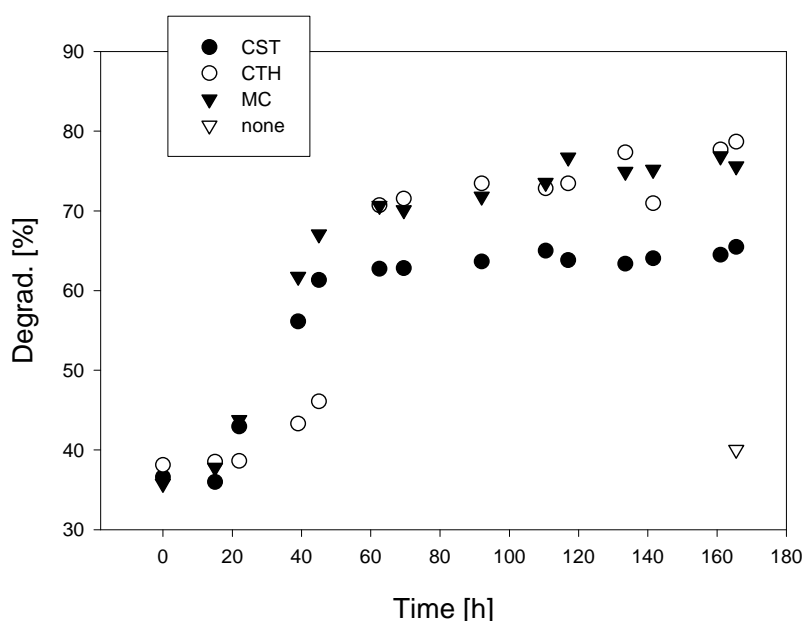


Fig. 3: Time course for degradation of maize silage by *Clostridium stercorarium* (CST), *Clostridium thermocellum* (CTH), and a mixture of both (MC), resp., measured as decrease of dry substance in substrate after washing ( $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

The degradation determined with the method of sieving and washing is a combination of hydrolysis and reduction of the particles to a size which is not hold back by the fine nylon mesh used. Consequently the contribution of hydrolysis to the solubilisation (i.e. release of sugars) may be overestimated. However, the particle size minimization is also effected by the hydrolytic action on the plant cell wall composite which is degraded to microscopic fibre particles by degrading for example the polysaccharides gluing together the single molecular fibres of cellulose.

A synergistic effect of the two bacterial species in the speed of substrate degradation is obvious. This may be a result of the combined action on hemicellulose and cellulose, to which both bacteria contribute to a different degree. However, the overall degradation seems to be limited by a decrease in pH value (down to pH 5.5) as well as by accumulation of fermentative products, mainly acetate and ethanol, in the culture supernatant.

## 2.2 Enrichment of hydrolytic bacterial cultures

The synthetic bacterial mixture was to be compared to an optimally hydrolyzing mixed culture from natural sources. Such a culture could be expected to be a mixture of various bacteria hydrolyzing the plant cell walls and other bacteria fermenting the resultant sugars, short chain fatty acids, alcohols to mainly acetate, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. These fermentation products would be the optimal substrates for acetotrophic and hydrogenotrophic methanogenic archaea.

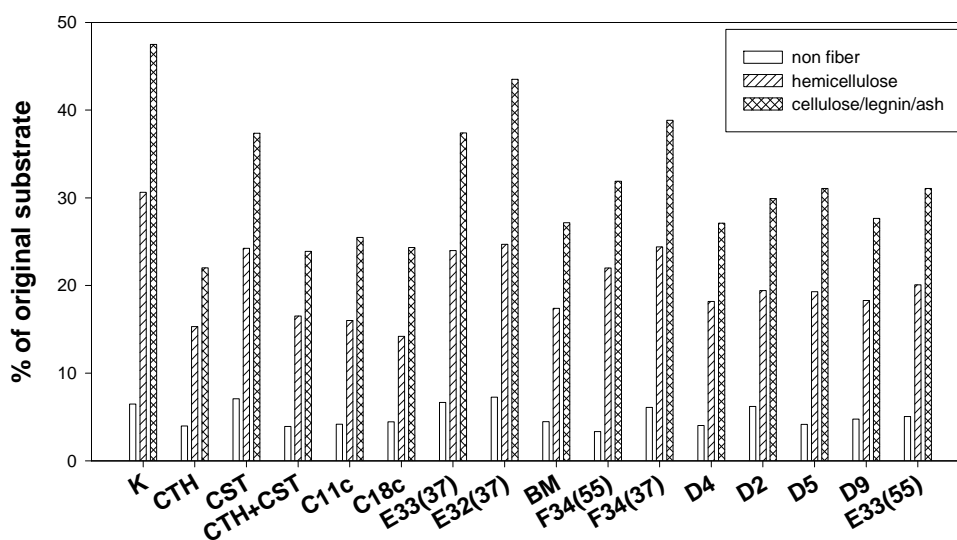


Fig. 4: Degradation of maize silage by different bacterial cultures. Incubation at 60 °C (except where indicated at 37 or 55 °C) for 7 days; remaining biomass was fractionated using van Soest analysis. K, uninoculated control; CTH, *C. thermocellum*; CST, *C. stercorarium*

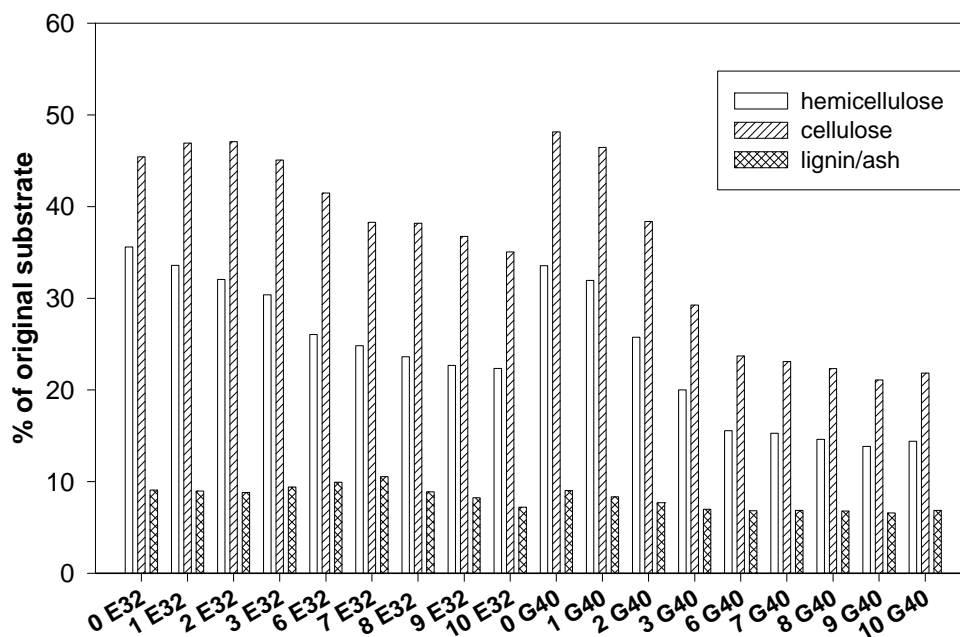


Fig. 5: Degradation of maize silage by the best hydrolytic cultures selected at 37 °C (E32) and 55 °C (G40) respectively in 1 to 10 days (0 is inoculated control). The results of van Soest analysis are presented: non fibre, hemicellulose, cellulose and lignin+ash fractions in percentage of the input material before inoculation

To enrich for such a culture, bacteria were grown from samples collected in the area of Freising and Muenchen (Bavaria, Germany) from different sources where plant material degradation takes place: compost heaps, a commercial compost fermenter, rotting cattle manure, garden soil et cetera.

Samples from biogas plants (thermophilic and mesophilic) with optimal performance were included. The samples were inoculated in phosphate buffered GS medium [a] containing 2 % (w/v) of grass silage from permanent grassland in pre-reduced, rubber stoppered 50 ml bottles. These bottles were heated to 80 °C for 15 min to inactivate vegetative cells (pasteurization) and to select for spore formers which include the hydrolyzing bacteria. The flasks were incubated at 37, 55 and 60 °C respectively. They were not constantly shaken, but degassed and shaken manually once a day.

The content of the flasks was filtered after 7 days of incubation through a nylon fabric (FOSS Fibercap 2023), dried and subjected to van Soest analysis to determine neutral solubles, neutral detergent fibre, acid detergent fibre and insoluble residues. The content of cellulose, hemicellulose and lignin+ash fractions was calculated from the dry weight before and after each step. In comparison to an uninoculated control (K) some enrichment cultures degraded half of the available biomass, although degradation stopped approximately at day 4 due to decrease in pH value and accumulation of metabolic products (data not shown). Examples for selected cultures are shown in Fig. 3. The best results were obtained with the two cultures C11c and C18c at 60 °C. It is interesting to note that a pure *C. thermocellum* culture and a mixed culture of *C. thermocellum* and *C. stercorarium* are similarly well performing in the test (see above). However, the overall performance such as reduction of hemicellulose and rate of degradation was better for the enriched cultures. It should be noted that in all cultures (incl. *C. thermocellum* and *C. stercorarium* pure cultures) hemicellulose as well as cellulose was degraded simultaneously and that the reduction of these two polysaccharide classes was about proportional. This is an indication that

cellulose degradation is naturally coupled to hemicellulose degradation and that hydrolysis of these two polysaccharides cannot be efficiently performed separate from each other. This can be explained by the tight molecular connection between hemicellulose and the embedded cellulose in the plant cell wall.

The best culture for the mesophilic (E32) and the thermophilic conditions (G40) on maize silage was selected and investigated further.

### 2.3 Influence of pH on cellulolytic cultures

Besides the aforementioned enrichment procedure, samples from decaying plant material were used to enrich a cellulose degrading culture at 60 °C at varying initial pH under buffered conditions. It can be assumed that a natural and open habitat of rotting plant cell walls contains a wide variety of bacteria in manifold micro-environments, sometimes even in symbiosis with plant feeding amoebae, ciliates, insects, nematodes, mammals etc. The strict selection procedure was thought to enable for the selection of a hydrolysing bacterial community even under extreme conditions.

Cultures were enriched on maize silage in buffered medium adjusted to a range of initial pH values from pH 5.2 to 8.0, conditions which can occur in a biogas plant. The degradation of cellulose in the test flasks was indicated by a strip of Whatman filter paper additionally added to the maize silage: degradation of the filter paper strip was easily detected as an indicator of cellulolysis. No cellulose-hydrolytic culture could be enriched below an initial pH of 6.3. This does not indicate that cellulolysis did not take place at a pH below 6.3, because in a mixed culture the easily degradable polysaccharides like pectin, starch or hemicellulose are metabolized first and lower the pH of the culture fluid. This would preclude the degradation of the resilient cellulose at the then lower pH.

This observation is corroborated by the finding that *C. thermocellum* degrades cellulose down to a pH of 6.0. However the hydrolysis is slowed down at least by a factor of 2 compared to the situation in a buffered medium of pH 7.0 (Fig. 6).

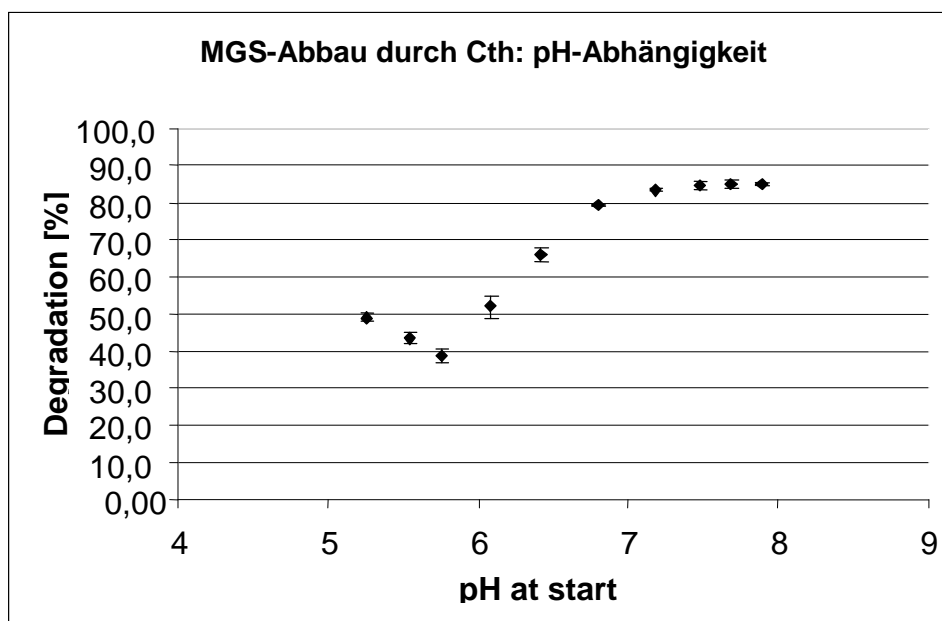


Fig. 6: Degradation of maize silage by *C. thermocellum* in cultures with different start pH at 60 °C. Standard deviation of three parallel probes is indicated

## 2.4 Phylogenetic analysis of hydrolytic culture

The culture optimally hydrolyzing maize silage at 60 °C (G40) was investigated by molecular methods for its composition. For this purpose the bacterial 16S rRNA genes were PCR-amplified from the metagenomic DNA with bacteria-specific oligonucleotide primers. The amplificate was cloned in *E. coli*. DNA from single clones was subjected to RFLP analysis to avoid sequencing of multiple copies of identical DNA (Fig. 7). At least two clones from each RFLP group were sequenced (if possible) and aligned with the ARB software program. The result is shown in Tab. 1. Operational taxonomic units (OTUs) for each sequenced clone DNA were determined by 16S rDNA sequence similarity to known bacteria in the ARB database. Clones with identical RFLP pattern were added to the numbers shown in table 1. All bacteria were members of the phylum Firmicutes which is not surprising given the initial pasteurization step which excluded non-spore forming bacteria.

The only bacterial species described as cellulolytic and related to the sequences obtained are *C. cellulosi* and *C. thermocellum*. Both species are described as thermophilic anaerobic degraders of cellulose (He et al., 1991; Zverlov & Schwarz, 2008). It is not sure if the two OTU's belonging to the Clostridiaceae are cellulolytic or not. However they have been isolated from compost and thus from a natural analogue of a biogas plant (Kim et al., 2008). The other sequences belong to surely not cellulolytic bacterial groups.

*C. thermopalmarium* and *C. thermobutyricum* are closely related thermophilic, anaerobic species which ferment sugars to mainly butyrate (Soh et al., 1991; Rainey et al., 1993). The two OTU's belonging to the *Bacillus* group are probably saccharolytic, but non-cellulolytic bacteria. It is possible that they contribute to the overall hydrolysis of starch, pectin, gums and various hemicelluloses. *Tepidimicrobium* is a thermophilic, peptolytic and strictly non-saccharolytic bacterium related to the clostridia (Slobodkin et al., 2006). Although spore formation for members of the genus *Tepidimicrobium* has not been observed so far, this is probable since the closest relatives are clostridia. *Tepidanaerobacter* is an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic, primary alcohol- and lactate-degrading bacterium which grows well in co-culture with the hydrogenotrophic methanogen *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Without an externally added electron acceptor it utilizes ethanol, glycerol and lactate syntrophically only (Sekiguchi et al., 2006). *Symbiobacterium thermophilum* is also a thermophilic, syntrophic bacterium (Ueda et al., 2004).

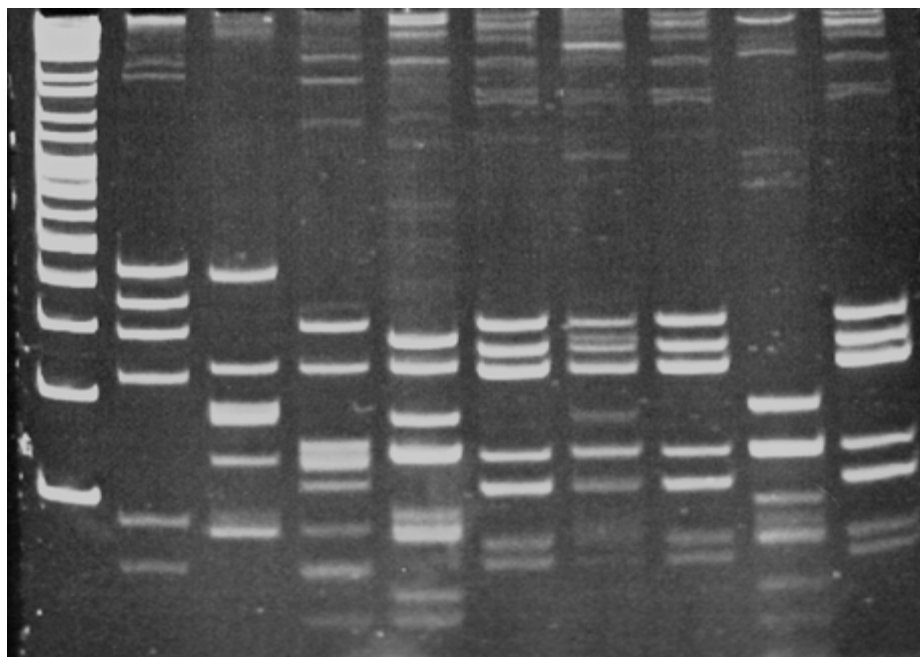


Fig. 7: RFLP analysis of 16S rDNA clones from a metagenomic library of thermophilic culture G40. The left lane is a molecular mass marker. Each lane represents DNA from one clone

Tab. 1: Operational taxonomic units by 16S rDNA sequence similarity to known bacteria in the ARB database. The sequence identity (in %) and the number of clones falling into this group are indicated. Last lane: portion in population (in %)

Next related bacterium	% identity	clones	% population
<i>Clostridium cellulosi</i>	91-92	1	1.1
<i>Clostridium thermocellum</i>	99	4	4.6
<i>Clostridium thermopalmarium</i> / <i>thermobutyricum</i>	97-99	13	14.9
<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>	96-99	5	5.7
Clostridiaceae bacterium Aso3-CS349	99	26	29.9
Clostridiaceae bacterium Aso3-CS342	95	1	1.1
<i>Tepidimicrobium</i> sp. (Firmicutes)	98/99	2	2.3
<i>Tepidanaerobacter</i> sp. (Firmicutes)	95-96	10	11.5
<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	97-99	6	6.9
Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone 96	98/99	2	2.3
Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone 54	95-98	17	19.5
Total		87	100

## 2.5 Isolation of new cellulolytic bacteria

From well hydrolysing mixed cultures bacteria were streaked to single colonies on GS-agar plates with an 5ml-overlay of GS-agar containing 2 % (w/v) of crystalline cellulose MN301. Bacteria producing cellulolytic exo-enzymes form colonies surrounded by a halo. After a second and a third single-colony purification, DNA was isolated from liquid cultures and 16S rDNA was amplified by bacteria-specific oligonucleotide primers. The double-stranded DNA-amplificate was sequenced and compared to a database of bacterial 16S



rRNA sequences (ARB database). 10 % of the isolates were unknown bacteria, 10 % were  $\alpha$ -proteobacteria, 70 % were closer than 98 % sequence identity to *C. thermocellum*, and 10 % were *Clostridium* sp.. An example for hydrolysis formation on a cellulose layer on agar plates by a new isolate of *C. thermocellum* is shown in Fig. 8.

Most probably the  $\alpha$ -proteobacteria were contaminating sequences occluding a cellulolytic bacterium and may result from not completely pure cultures. It is a general problem with the purification of thermophilic anaerobic bacteria (esp. of *C. thermocellum*), that they are not easily separated from each other by single colony streaking (J. Wiegel, pers. commun.). However, it is possible that cellulolytic bacteria are among the clostridia and the “unknown” bacteria. These strains will be investigated in a later study.

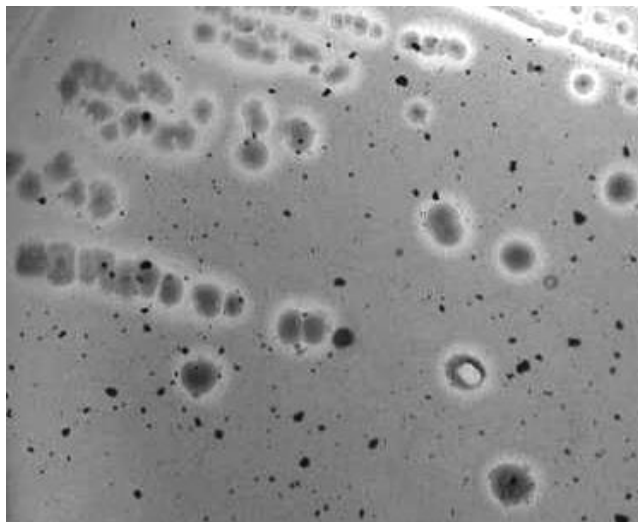


Fig 8: Colonies of isolated bacteria (large dark-grey spots) on a cellulose overlay (turbid with sharp irregular black spots) on anaerobic agar plates (60°C) – hydrolysis of crystalline cellulose is indicated by a clear halo around the colonies

## 2.6 Isolation of proteins binding to cellulose

As an additional and innovative method for determining the major hydrolyzing agents in fermentation sludge, proteomics methods were applied to identify cellulose hydrolyzing proteins and their most probable producing hosts. The intrinsic cellulose adsorption of cellulose hydrolyzing enzymes (so called “true cellulases”) was exploited to extract these proteins from the multitude of proteins present in the cleared supernatant, i.e. from the bacterial cells and the residual substrate. To avoid the loss of binding cellulases with the centrifugation pellet, the last step of growth of the mixed culture was performed in a synthetic medium which had been shown to grow all bacteria in the blend. After adsorption to a homogeneous cellulose matrix the bound enzymes could be washed from the non-adsorbed proteins.

The SDS-PAGE of the concentrated proteins (Fig. 9) shows discrete bands of a limited number of polypeptides. Most unusual is a band at ~230 kDa which reminds the scaffoldin band (CipA) of clostridial cellulosomes. After MALDI-TOF-TOF and peptide sequencing this band resembles undoubtedly the CipA protein of *C. thermocellum*, the cellulosome integrating factor “scaffoldin” (Schwarz, 2001). The CipA reading frame of the *C. thermocellum* type strain ATCC 27405 gave multiple hits with peptide sequences from the M1 band of the mixed culture, indicating that this protein was one of the major proteins in the preparation. Proteins with only one hit were not taken into account in this analysis.

Similarly proteins from the bands M2 to M4 could be carefully assigned to proteins of the *C. thermocellum* cellulosome (see table 2). These proteins have been shown earlier to be among the major proteins of the cellulosome (Zverlov et al., 2005). No other bacterial protein sequences showed up except one cellulase from *C. stercorarium*, CelY. This processive cellulase is one of the two cellulases of the two-enzyme cellulase system of *C. stercorarium* (Bronnenmeier et al., 1997).

Tab. 2: Results from MALDI-TOF-TOF and peptide sequencing of cellulose binding proteins. Only proteins which resulted in more than one peptide of the proteins indicated are shown. Proteins are assigned to protein from bands M1 to M4

M1	<i>C. thermocellum</i>	CipA (cellulosome integrating protein)
M2	<i>C. thermocellum</i>	Pectate lyase (cellulosomal)
	<i>C. thermocellum</i>	CbhA (endoglucanase GH9)
M3	<i>C. thermocellum</i>	CelK (processive Cellulase GH9)
M4	<i>C. thermocellum</i>	CelS (processive Cellulase GH48)
	<i>C. thermocellum</i>	CelQ (endoglucanase GH9)
	<i>C. stercorarium</i>	CelY (processive Cellulase GH48)

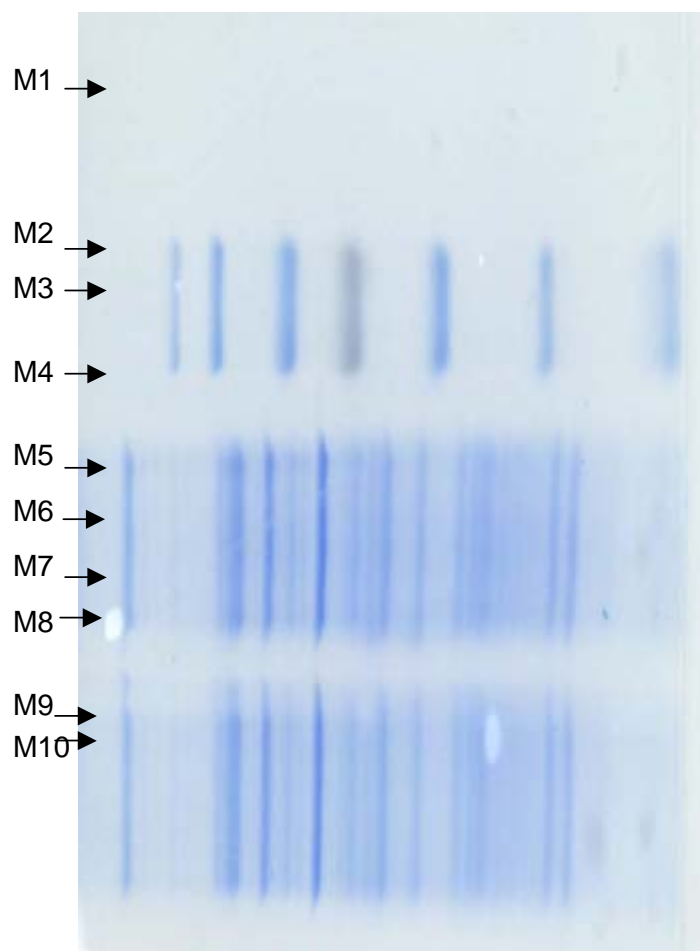


Fig. 9: SDS-PAGE of concentrated samples of cellulose binding proteins from the thermophilic hydrolytic bacterial mixture. Marker proteins with defined molecular mass are on the right lane. Bands extruded for MALDI-TOF-TOF analysis are marked M1 to M10

## 2.7 Preparation of spores for inoculation

Various media described for the preparation of spores were tested and all resulted in more or less efficient spore formation. GS2 medium with filter paper as sole carbon source was chosen as optimal for the thermophilic culture. The spores were reactivated and tested on maize silage to prove that the degradation of plant fibres was still as effective as in the original culture and the hydrolytic quality of the culture was not diminished (*table 3*).

With this method described in material and methods the enriched hydrolytic culture can now be stored for long time and reactivated. A concentrated addition of spores to a fermenter is now possible, without adding much volume to a vessel and disturbing the calculation of degradation efficiency.

*Tab. 3: Addition of spore suspension or fresh culture (without sporulation) to maize silage in GS2 medium. Incubation at 55 °C for 5 days and determination of residual fibre material after filtration and washing*

	Degradation [%] mean value	Standard deviation
0.1 ml spores	67,7	1,0
0.5 ml spores	68,4	1,0
1.0 ml fresh culture	63,8	0,1

## 3 Discussion

To determine the degradation efficiency of bacterial cultures, a filtration and washing technique was chosen which measures in addition to pure hydrolysis of polysaccharides in plant fibre (solubilisation) also the reduction of particle size which allows fibres of a certain minimum size to slip through the mesh of the filter applied. However, this is one of the effects of hydrolytic attack of the enzymes produced by the bacteria. Moreover, hydrolysis was determined in batch without removing the fermentation products except the hydrolysis gas produced (CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>). The accumulation of alcohols and acids results in unfavourable conditions for the further growth of the hydrolytic bacteria and thus in a stop of enzyme production. Cultures which produce less toxic products or which are more resistant to the harmful effects will produce longer; cultures producing more acid resistant hydrolytic enzymes will also be more active. These effects are of importance for the effective hydrolysis in the microenvironment of sludge particles in a biogas fermenter.

With the method described an optimally hydrolyzing culture was obtained from dozens of natural samples. Various conditions have been studied with this culture. The optimal hydrolytic culture was most efficient at a temperature of 60 °C. A culture with a similarly high degradation velocity could not be obtained at 37 °C. However, the total degradation value (albeit after a considerably elongated incubation time) was about the same.

The optimally degrading culture showed comparable but slightly better degradation (as well in end degradation value as in velocity of reaction) as a synthetic two-component mixture of purified hydrolytic bacteria, *C. thermocellum* and *C. stercorarium*. This was unexpected as in usual mixed cultures the hydrolytic bacteria, although invariably contain-

ing both these bacterial species, the hydrolytic bacteria were a minority in the population, outnumbered by the saccharolytic/acidogenic and syntrophic bacteria.

The major hydrolytic bacteria in biogas fermentation could be identified as *C. thermocellum* and/or closely related bacteria. Both species have been regarded before as superior biomass fibre degraders (Schwarz, 1995, 2002). The experiments here show that they can be present in relatively high numbers in natural mixed cultures. Unpublished results show that at least *C. thermocellum* is present in a wide range of natural habitats where plant biomass is degraded, almost independent of the average temperature of the environment.

*C. thermocellum* could be detected in the mixed culture by two methods, strain isolation and protein analysis. Strain isolation from natural samples is hampered by the culturability of the bacteria. More than 90 % of soil bacteria cannot be cultivated in pure culture either because they depend on a co-cultivated bacterium or on hitherto unknown growth factors. The protein isolation and analysis approach used here is biased by the pre-selection of cellulose binding proteins. However, all cellulases of great importance for the hydrolysis of natural (i.e. crystalline) cellulose contain a cellulose binding module, either being covalently attached to each single enzyme (as in *Caldicellulosiruptor* sp. or in *C. stercorarium*) or through the complex-integrating protein (as is the case in many cellulosomal enzymes of *C. thermocellum*). This proteomic based method primarily picks up sequences of proteins from bacteria with sequenced genomes; at least from cellulases for which sequences are in the data bases. Completely new and hitherto unknown sequences will not be recognized properly. However, the redundancy of cellulase sequences in the data bases is overwhelming and completely new cellulase sequences are probably not to be expected. It can thus be assumed that all major cellulases present in the protein preparation have been identified and (due to the high confidence of the partial sequences) assigned to the two species *C. thermocellum* and *C. stercorarium* respectively.

The optimal cellulolytic pH of the cellulase system of *C. thermocellum* has been determined to be above pH 6.5. This has consequences for biogas plants in that, although good growth of cellulolytic bacteria can be observed below pH 6.5, effective cellulose hydrolysis cannot be expected. Such low pH values would limit the substrate for growth (and hence the hydrolysis) to easier accessible polysaccharides in the plant material such as starch, pectin or some types of hemicellulose (Lebuhn et al. 2008). The overall hydrolysis efficiency of a biogas fermenter would thus be predicted to be far below optimum if the pH is too low.

The results give insights into the hydrolysis in biogas plants and open ways for monitoring the “healthy” hydrolysis state of a reactor. Optimal conditions for hydrolysis have not been found to be in stark contrast to conditions for optimum methanogenesis. However, certain differences could be made out which could enable a lower pH and a higher temperature in a hydrolysis reactor.

## 4 Acknowledgment

The authors were supported by grant No 22011705 from the German Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection through Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR). The technical assistance by Sabine Dummert is gratefully acknowledged.

## References

- ADELSBERGER, H., HERTEL, C., GLAWISCHNIG, E., ZVERLOV, V.V., & SCHWARZ, W.H. (2004). Enzyme system of *Clostridium stercorarium* for hydrolysis of arabinoxylan: reconstitution of the in vivo system from recombinant enzymes. *Microbiol.* **150**, 2257-2266.
- BAUER C., M. KORTHALS, A. GRONAUER AND M. LEBUHN (2008). Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Science & Technology* 58:1645-1651.
- BRONNENMEIER, K., K. KUNDT, K. RIEDEL, W. H. SCHWARZ, AND W. L. STAUDENBAUER (1997). Structure of the *Clostridium stercorarium* gene *celY* encoding the exo-1,4- $\beta$ -glucanase Avicelase II. *Microbiology* **143**: 891-898.
- DESROSIER J. P., AND CANO L. J. (1981). Isolation and Properties of Phli from Spores of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 145: 613 – 619.
- HE Y., DING Y. AND LONG Y. (1991). Two Cellulolytic *Clostridium* Species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 306-309.
- KIM J-J., KIM H.N., MASUI R., KURAMITSU, S, SEO J-H., KIM K., & SUNG M-H. (2008). Isolation of uncultivable anaerobic thermophiles of the family *Clostridiaceae* requiring growth -supporting factors. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 611-615.
- LAWSON A., SOH A., RALAMBOTIANA H., OLLIVIER B., PRENSIER G., TINE E., AND GARCIA J-L. (1991). *Clostridium thermopalmarium* sp. nov., a moderately thermophilic butyrate-producing bacterium isolated from palm wine in Senegal. *System. Appl. Microbiol.* 14, 135-139.
- LEBUHN M., F. LIU, H. HEUWINKEL AND A. GRONAUER (2008). Biogas production from mono-digestion of maize silage–long-term process stability and requirements. *Water Science & Technology* 58:1645-1651.
- NETTMANN E, BERGMANN I, MUNDT K, LINKE B, KLOCKE M. (2008). Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *J. Appl. Microbiol.*105:1835-50.
- RAINEY FA, WARD NL, MORGAN HW, TOALSTER R, STACKEBRANDT E. (1993). Phylogenetic analysis of anaerobic thermophilic bacteria: aid for their reclassification. *J Bacteriol.* 175:4772-4779.
- SCHWARZ, W. H., K. BRONNENMEIER, B. LANDMANN, G. WANNER, W. L. STAUDENBAUER, N. KUROSE, AND T. TAKAYAMA (1995). Molecular characterization of four strains of the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **9**: 1661-1665
- SCHWARZ, W.H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**:634-649.
- SCHWARZ, W.H. (2002) *Clostridium stercorarium* - a versatile polysaccharide hydrolyzing thermophile. Comparison with *Clostridium thermocellum*. Presentation on the “Clostridium VII”, Rostock, Germany.

- SEKIGUCHI Y., IMACHI H., SUSILORUKMI A., MURAMATSU M., OHASHI A., HARADA H., HANADA S., AND KAMAGATA Y. (2006). *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.***56** (2006), 1621-1629.
- SLOBODKIN A. I., TOUROVA T. P., KOSTRIKINA N. A., LYSENKO A. M., GERMAN K. E., BONCH-OSMOLOVSKAYA E. A. AND N.-K. BIRKELAND (2006) *Tepidimicrobium ferriphilum* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, Fe(III)-reducing bacterium of the order Clostridiales. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 369-372.
- SOH, A. L. L., RALAMBOTIANA, H., OLLIVIER, B., PRENSIER, G., TINE, E. & GARCIA, J.-L. (1991). *Clostridium thermopalmarium* sp. nov., a moderately thermophilic butyrate-producing bacterium isolated from palm wine in Senegal. *Syst Appl Microbiol* 14: 135-139.
- UEDA K., YAMASHITA A., ISHIKAWA J., SHIMADA M., WATSUJI T., MORIMURA K., IKEDA H., HATTORI M., AND BEPPU T. (2004). Genome sequence of *Symbiobacterium thermophilum*, an uncultivable bacterium that depends on microbial commensalism. *Nucleic Acids Research* 32:4937-4944.
- ZVERLOV, V. V., KELLERMANN, J., & SCHWARZ, W. H. (2005). Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: Identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes. *Proteomics*, **5**: 3646-3653.
- ZVERLOV, V. V., & SCHWARZ, W. H. (2008). Bacterial hydrolysis in anaerobic environmental subsystems – *Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fibre degraders. In: Wiegel J. (ed.), *Incredible Anaerobes*. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 1125: 298-307.

## Systematic analysis of biogas plants by microbiological and genetic methods: Comparison hyper-thermophilic (60°C) with thermophilic (55°C)

P. Scherer, N. Krakat, A. Westphal, K. Satke and L. Neumann

Hamburg University of Appl. Sciences (HAW), Research and Transfer Centre for Regenerative Energy and Process Efficiency, Lohbruegger Kirchstraße 65, 21033 Hamburg-Bergedorf, Germany

### Zusammenfassung

Es wurden zwei kontinuierliche, vollautomatisierte, intermittierend gerührte Reaktoren mit Futter- und Zuckerrübensilage als Monosubstrat ohne Güllezufuhr über einen Zeitraum von 1150 Tagen untersucht. Dazu wurden fünf thermophile und sechs mesophile Reaktortage im Gleichgewichtszustand (nach dem Dreifachen der hydraulischen Verweilzeit HRT) beprobt. Der direkte Einfluss von Gülle konnte ausgeschlossen werden. Sowohl die PCR-basierende ARDRA Technik zur Bestimmung des Genotyps (operational taxonomic unit, OTU) als auch die Fluoreszenzmikroskopie mit digitaler Bildanalyse zur Bestimmung des Morphotyps kamen zur Anwendung. Diese Studie stellt das erste Langzeitexperiment über die mikrobielle Diversität in einem Biogasreaktor dar, der unter definierten und geregelten Prozessbedingungen mit Energiepflanzen thermophil und mesophil betrieben wurde.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei der Vergärung organikreicher NawaRo, wie z.B. Rübensilage, bei allen OLRs wasserstoffverwertende, methanbildende *Archaea* (*Methanobacteriales* und *Methanomicrobiales*) dominierten, während acetotrophe Methanbildner (*Methanosarcinales*) auf unter 10% oder nicht nachweisbar zurückgedrängt werden konnten. Erstaunlicherweise läuft die Methanbildung, insbesondere die thermophile, offenbar zuerst über eine nahezu komplette Vergasung der Biomasse zu  $H_2/CO_2$  ab, erst dann wird dieses Gasgemisch (und nicht Essigsäure) durch hydrogenotrophe Methanbildner zu  $CH_4/CO_2$  konvertiert. Dies steht im Gegensatz zu dem gängigen Anaerobmodell ADM 1 (BATSTONE et al. 2006). Die methanbildenden *Archaea* lagen bei allen Beprobungstagen zwischen 15-25% der Gesamtpopulationen (manchmal sogar darüber), während großtechnische Biogasanlagen i.d.R. Zahlen zwischen 5-15% aufwiesen, Anlagen mit niedrigen Umsätzen sogar unter 5%. Damit eröffnet sich über eine quantitative Bildanalyse eine schnelle Klassifizierung von Biogasanlagen und Impfschlämmen.

Es konnten ferner nahezu alle maßgeblichen Gruppen der Domäne *Bacteria* des gängigen Lehrbuchschemas der anaeroben Nahrungskette zur Hydrolyse von Biomasse bestätigt werden. Daneben wurden sehr viele untypische und neue Vertreter gefunden. Trotz gleichen oder zumindest sehr ähnlichen Substrats bestand im Gegensatz zu den auf Methanbildung spezialisierten *Archaea* eine sehr große Dynamik der Bakterienpopulation, was durch die Ersetzbarkeit der einzelnen hydrolytischen Bakteriengruppen durch andere erklärt werden könnte.

Versuche zum Temperatureinfluss bei 50° oder 60°C („moderat hyper-thermophil“) zeigten, dass bei 60°C sich eine ganz andere *Archaea*-Population durchsetzte. 60°C verdrängt

danach die gegenüber Acetat und  $\text{NH}_3$  empfindlichen, fädigen Methanosaeten. Die Biodiversität war erstaunlicherweise thermophil ( $60^\circ\text{C}$ ) insgesamt eher sogar geringfügig größer. Daraus und dadurch, dass der  $60^\circ\text{C}$ -Fermenter bereits über 8 Jahre stabil ist, leitet sich die Erkenntnis ab, dass für einen Hochdurchsatz die  $60^\circ\text{C}$ - der  $55^\circ\text{C}$ -Gärung vorzuziehen ist. Die moderat „hyper-thermophile“ Vergärung sollte von Anfang an durch geeignete Impfmateriale mit hoher Impfkraft etabliert werden, was hier der Fall war.

## Schlüsselwörter:

ARDRA, 16s rDNA, Biogas, Nachwachsende Rohstoffe, Rübensilage.

## Summary

Two continuously and fully automated operated biogas fermenters were driven for a period of 1755 days with fodder beet and sugar beet silage as mono-substrate, both without manure addition. They were intermittently stirred at mesophilic and thermophilic conditions under the process direction of a Fuzzy-logic based feedback-control system. To obtain the aimed microbial insight, six defined mesophilic and five defined thermophilic fermenter days were investigated in a balanced fermenter state, i.e. after the threefold of the hydraulic retention time HRT. The PCR-based ARDRA-technique (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) for the determination of a genotype, i.e. the operational taxonomic unit (OTU), as well as the digital quantitative imaging was simultaneously applied to find out the concurrent morphotypes. This long term experiment represents the first study about the microbial diversity in a fermenter for anaerobic digestion of energy crops under defined and controlled conditions, simultaneously under mesophilic and thermophilic conditions.

Nearly all relevant *Bacteria* of the common textbook scheme for the anaerobic food chain to hydrolyse biomass could be confirmed, some additional could be detected. Apparently most of the *Bacteria* were not well known as typical members; some represented even a new phylum. Acetotrophic methanogens (*Methanosarcinales*) represented mostly a minority down to a proportion of only 10% or not detectable. Hydrogenotrophic methanogens with  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  as substrate (*Methanobacteriales* and *Methanomicrobiales*) clearly dominated. Therefore, the methanogenesis of energy crops includes presumably first a “cold” gasification to  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  and after this a second biogasification to  $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ . This is in contrast to the common anaerobic digestion model ADM 1 (BATSTONE et al. 2006) and other literature (LECLERC et al. 2004, LIU and WHITMAN, SCHNUEERER and NORDBERG 2008). Surprisingly, the archaeal flora at  $60^\circ\text{C}$  (“moderate hyper-thermophilic”) was quite different to the archaeal flora at  $55^\circ\text{C}$ . *Methanosaeta* seemed to be absent at  $60^\circ\text{C}$  operation temperature. That opens the strategy to prefer in industrial scale the temperature of  $60^\circ\text{C}$  over  $55^\circ\text{C}$  to exclude *Methanosaeta*, which is known to be sensitive for acetate, ammonia and  $\text{H}_2\text{S}$ . The biodiversity was nearly equal or even slightly higher under thermophilic than under mesophilic conditions.

## Keywords:

Anaerobic Digestion, ARDRA, 16S rDNA, Biogas, Biomass, Energy Crops, Sugar Beet.



## 1 Introduction

Biogasification is the only fuel producing process with a closed nutrient cycle, and it has the potential to reduce greenhouse gas emissions (TILCHE and GALATOLA 2008). Biogas engineering uses even more efficiently energy crops than livestock farming. Both fodder and sugar beets resp. are ideal energy and biogas crops as they offer like maize very high hectare yields (140-160 Mg/ha, incl. top and leaves). The dry weight of sugar beets ranges at present between 20-25%, but it trends to go to 30%. In contrast to other energy crops, sugar beets have the lowest water requirement (calculated for the case of biofuel production, GERBENS-LEENES et al. 2009), and they lack the non digestible lignin. They can be regarded as a model substrate for other energy crops with high carbohydrate content. In Europe and in Germany too, the availability of arable soil is not the problem. The problem is to hold this fertile ground economically in function. 12 million hectares of arable land is available, but many parts lie fallow. Only 0.7 million of 12 million hectares are used in Germany for the production of biogas or ethanol, but much more area is needed to produce the same energy crops for live-stock farming.

On the other hand, the rate to cultivate sugar beets in Europe was decreased in 2006. Many sugar refineries in Germany were closed. On the other side the prize for grain fell dramatically and the price for sugar beets, too. Therefore, many farmers in Germany are looking for sugar beets as an alternative use. The production of biogas with electricity and heat from energy crops is such a promising option. The working group of Scherer at the HAW decided many years before (since 2001) to optimise the anaerobic digestion of silaged beet (SCHERER et al. 2003, 2005, 2009, DEMIREL and SCHERER 2008a/b, 2009, DEMIREL et al. 2008, 2009). It was a founder member of the research group “biogas-crops network” (BCN, [www.biogas-network.de](http://www.biogas-network.de)), we were the only research group working on beets.

An alternative in Germany, but not favoured by the electricity feed-in-law of the German government, is the agricultural anaerobic digestion without the use of manure. It is assumed that 15 % of the present 4000 biogas plants are operated without addition of manure, as the logistics to combine meat or milk production with biogas production is difficult. Germany is an extreme example of a country with large-scale livestock farming. It “produces” 160 million m<sup>3</sup> manure, but it generates only 30 million tons of municipal solid waste by about 80 million inhabitants. However, in many other countries large-scale livestock farming is not so common. Consequently manure was used in the presented experiments only one time as a source to seed microorganisms to start the biogas process. Energy crops are at present monocotyledonous plants, like maize, triticale, rye, wheat or grass, whereas beets are dicotyledonous plants of the northern hemisphere.

Aim of this study was to obtain a better understanding about the composition of the microbial community participating in the degradation process of beet silage and how a variation of the hydraulic retention time HRT, the organic loading rate OLR and the temperature can influence the existing methanogenic population in the biogas reactor.

A long term experiment has been started 8 years ago and the same biogas fermenters are still running stable since that time without addition of manure or sewage sludge and without any stop (SCHERER et al. 2003, 2009). It took nearly 600 days to wash out surplus ammonium deriving from the inoculum. The stable fermentation state was indicated by a constant ammonium level of 250-350 ppm as propagated by (COBB and HILL 1990). Therefore this long pre-phase offered the unique chance to get defined fermenter conditions being not directly influenced by the inoculum. During the conversion of biomass into

methane four different microbial reactions can be distinguished: Hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis.

In the last step the known hydrogenotrophic methanogens reduce CO<sub>2</sub> to methane by using H<sub>2</sub>. They belong to the orders *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* and *Methanococcales*. Acetotrophic methanogens converting acetate to methane and CO<sub>2</sub> were found so far only among the *Methanosarcinales* (WHITMAN et al. 2001, LIU and WHITMAN 2008). We used the word acetotrophic instead of acetoclastic as the hydrogenotrophic methanogenic *Bacteria* are generally cultivated with small amounts of acetate in the growth medium for anabolic purposes. A true acetotrophic state can only be proved by experiments with isotopes. Nevertheless, about 65-70% of the methane produced by *Archaea* is assumed to originate from acetate (BATSTONE et al. 2006, LIU and WHITMAN 2008) and these acetotrophs are also the dominating methanogens in many biogas reactors for anaerobic waste water treatment and sewage sludge digestion (LECLERC et al. 2004, KARAKASHEV et al. 2005).

We used a well established PCR based fingerprint technique to obtain the whole, possible information about bacterial diversity (HOFMAN-BANG et al. 2003, SPIEGELMAN et al. 2005) and we aimed to correlate the obtained methanogenic diversity with the unique microscopically observed pictures of only rod-like morphotypes under high throughput fermenter conditions (SCHERER et al., 2005). Rod-like methanogens are known to be hydrogenotrophic ones, but they can use formate as substrate, too (WHITMAN et al. 2001). It represents the first long term study about the archaeal and bacterial diversity in a biogas fermenter under defined and controlled process conditions with energy crops.

## 2 Methods

There are several papers of the working group are published which delineate the substrate and the fermentation procedures (SCHERER et al. 2003, 2009b, DEMIREL et al. 2008, 2009, DEMIREL and SCHERER 2008a, [www.milligascounter.de](http://www.milligascounter.de)). For calculation of degradation rates, the equation was used that 1 g carbon produces at 100% conversion 1.8 litres biogas (CH<sub>4</sub> + CO<sub>2</sub>) under standard temperature and pressure (SCHERER 2007).

The first fermenter sample was taken under controlled conditions after 609 fermenter days without any addition of manure. Therefore, the manure was completely washed out revealing an residual ammonium content of the fermenter of 200-300 ppm ammonium. It was taken care that the fermenter samples were in a well balanced state, i.e. after waiting the threefold of the hydraulic retention time HRT (HRT = 5.5 – 40 days)

The used molecular methods are already described by RHEIMS and STACKEBRANDT (1999) resp. KRAKAT and SCHERER (2007) or please contact the authors.

It should be valid the simplified assumption that the percentage distribution of OTUs (operational taxonomic unit, synonymous for an organism or a terminal node in phylogenetic analysis) reflects in the same way the species diversity in the investigated fermenters. 1 OTU has a similarity of less 97% compared to another OTU to distinguish it from each other as a separate species.

## 2.1 Automated fermenter process with closed loop control

The objective of this study was to investigate the application of an automatic closed loop fuzzy logics control (FLC) strategy for long-term, continuous anaerobic digestion of beet silages (sugar and fodder beets), which had an extreme low pH (3.3-3.4) and a low buffer capacity (SCHERER et al. 2003). A neutral pH in the digester should be obtained only by FLC controlled feeding of the substrate. The results of this study can contribute to the improvement and/or implementation of ICA (instrumentation and control applications) for agricultural biogas plants operating with mono-substrates.

The FLC with a feeding cycle of 3 times per day allowed a high throughput mode up to a maximum organic loading rate OLR of 2.4 - 14.3 kg VS m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup> and a short hydraulic retention time (HRT) of 5.5 – 30 days, along with a neutral operation pH and a level of volatile fatty acids below 500 ppm. The developed FLC system did not need any complicated detector (e.g. for propionate) or self-learning network or a special mathematical model. The aim was to achieve and maintain a safe process without stability problems, particularly in terms of pH monitoring and control. The FLC strategy proved to be a useful and reliable tool to serve this purpose. Three standard measuring parameters (pH, methane content-CH<sub>4</sub> and the spec. GPR) can cover most of all applications, including a gentle recovery strategy after a severe fermenter fall and a temperature shock (SCHERER et al. 2009a). No chemicals or manure were added to the biogas reactor.

The spec. GPR alone did not guarantee sufficiently a stable biogas process. The simple volumetric GPR increases further on, even if the volatile acids reach a dangerous level (SCHERER et al. 2008). Therefore, the specific GPR was introduced as a novel process parameter (patented) being related to the amount of feeding substrate on one day. As the measured gas production rate could not differentiate between biogas producing yeasts and methanogens, a methane sensor was used in addition to a volumetric gas meter.

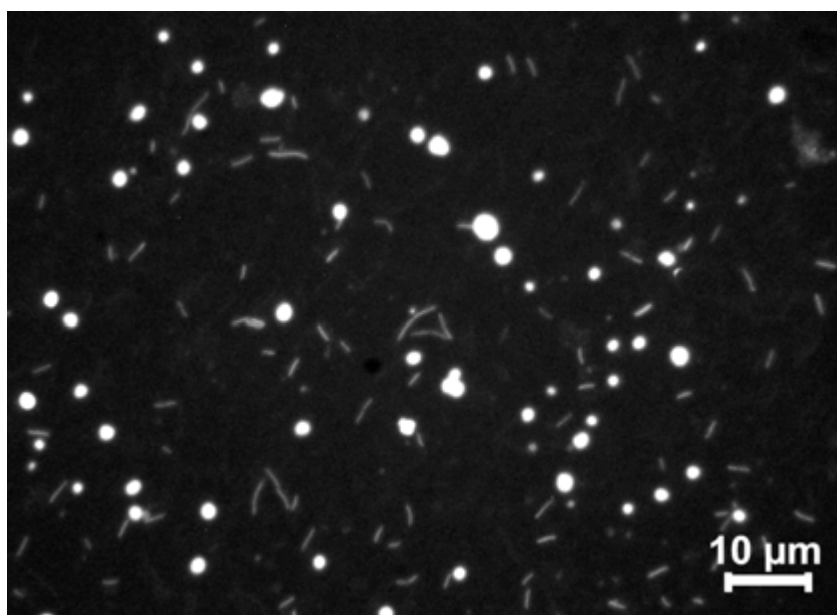
In the case of the beet silage with a low pH, the combination of pH, CH<sub>4</sub> and the specific GPR was found to be optimal, to control an anaerobic digestion process, even with biomass of a low alkalinity (pH 3-3.5 and 6.3-7.3) in the fermenter. This test period lasted more than 5 years, up to now (SCHERER et al. 2003, 2008, 2009a, DEMIREL et al. 2009).

The FLC is not restricted to anaerobic digestion processes with a low buffer capacity as it was with beet silage the case. Originally the FLC was developed for the anaerobic digestion of food leftovers from restaurants under thermophilic conditions with one stage or two stages, being also an extreme environment. Cat food consisting mainly of protein and fat was used as a “standardized kitchen waste”. In a period of 1 ½ years this extremely problematic substrate was successfully digested under stable conditions. The ammonium content reached values of 6000 ppm resp. of 1500 ppm ammonia at 55°C and an alkaline pH value of 7.2-8.2. An OLR of 4 kg VS/m<sup>3</sup>/d with a HRT of 20 days could be obtained with this extreme substrate under balanced conditions (SCHERER and LEHMANN 2004). The process with two thermophilic stages (65/60°C) was originally developed and patented for the organic fraction of municipal grey waste (“Hypertherm Process”) (SCHERER et al. 2000).

### 3 Results

The aim was to explore the complete microcosm spectrum of an anaerobic digestion process for an energy crop for the first time. At present and in future that will be only possible by molecular methods, i.e. without cultivation of *Bacteria* or *Archaea*. Beets were chosen as model plants for a dicotyledoneous biogas plant of the northern hemisphere being rich of carbohydrates. For such purposes the so called 16S ribosomal RNA resp. DNA has to be extracted, to be in order to be amplified and sequenced (RFLP-technique). Simultaneous microscopical techniques were used to find a quicker and cheaper way to judge the microbial condition of a biogas fermenter by digital image analysis (SCHERER et al. 2005). Not only is the presence of hydrolytic bacteria limiting for the anaerobic food chain. The presence of the slowly growing methanogens is also extremely important for the functionality of the anaerobic food chain, as they are required to neutralize the acidic pH caused by the generation of fatty acids. If the methanogenic *Archaea* drop down below a limiting value of the total bacterial population of an anaerobic biogas digester (Microbial Quality Index below 5%, for a stirred fermenter), the whole process stagnates. The volatile fatty acids accumulate and the biogas production will be on a poor level.

In *Fig. 1a* only the green fluorescent archaeal methanogens of the thermophilic fermenter at 55°C are visualized (fermenter day 798d), whereas in *Fig. 1B* the archaeal methanogens of the hyper-thermophilic fermenter at 60°C are shown (fermenter day 609d).



*Fig. 1A: The green fluorescent archaeal methanogens of the thermophilic fermenter (55°C) are visualized (fermenter day 798d). The bacteria can be visualized by phase contrast, they are in the background here*

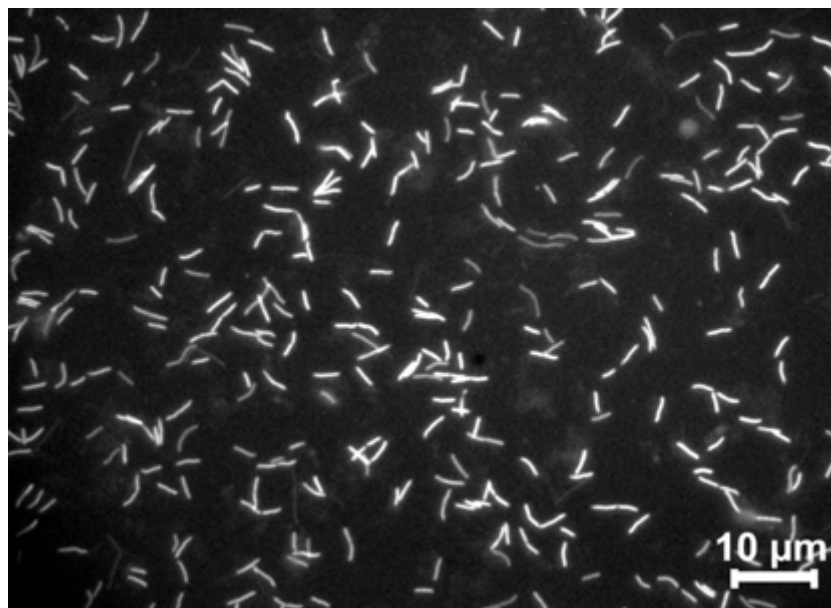


Fig. 1B: The archaeal methanogens of the hyper-thermophilic fermenter (60°C) are shown to demonstrate the uniformly looking archaeal population at this temperature fermenter day 609d. It was a temperature dependent reversible process. Later on it could be demonstrated that all archaeal members on this day belonged to the same order of *Methanobacteriales*

The methanogenic flora apparently changed to this uniformly looking rod-like methanogens. From the literature they are known to be mainly hydrogenotrophic (WHITMAN et al. 2001). On the other hand it is well-established that with temperature the partial hydrogen pressure will increase in a closed fermenter. According to the equation of free energy (Equation 1)

$$(1) \Delta G_f = \Delta H_f - T\Delta S$$

and the temperature dependency of the entropy term  $-T\Delta S$ , the  $\Delta G_f$  will be more negative and therefore the whole process is much more exergonic at thermophilic conditions ( $\Delta H_f$  is the free enthalpy or heat of formation,  $\Delta S$  is the entropy value, and  $T$  is the temperature in Kelvins (LEE and ZINDER 1988)). This again will favour hydrogen consuming microbes like hydrogenotrophic methanogens, Fig. 5. The change of the microbial population depends on the change in temperature and was completely reversible, Fig. 2 and 5. Therefore, the typical shape of clump or coccoid cells forming methanogens disappeared at 60 °C. The fluorescent microbes at 55 °C could belong to the *Methanosarcinales* being mostly acetotrophic or to the *Methanomicrobiales* being coccoid or rod-like (all were predominantly hydrogenotrophic).

On the other side the order of *Methanosarcinales* is generally acetotrophic, with the exception of *Methanosarcina* (WHITMAN et al. 2001). *Methanosarcina* generates generally thick cell clumps which can be both, acetotrophic or hydrogenotrophic, not seen here. To the *Methanosarcinales* also belongs the family *Methanosaetaceae*, forming long, thin filaments. They appeared in our fermenters only if the fermenter was in a disturbed condition followed by elevated acetate concentrations (> 5000 ppm). As the fermenters had a Fuzzy feedback control this was a rare occasion (technical problems like over-dosage etc.). On such fermenter days the *Methanosaetaceae* could be seen by microscope and by ARDRA-technique.

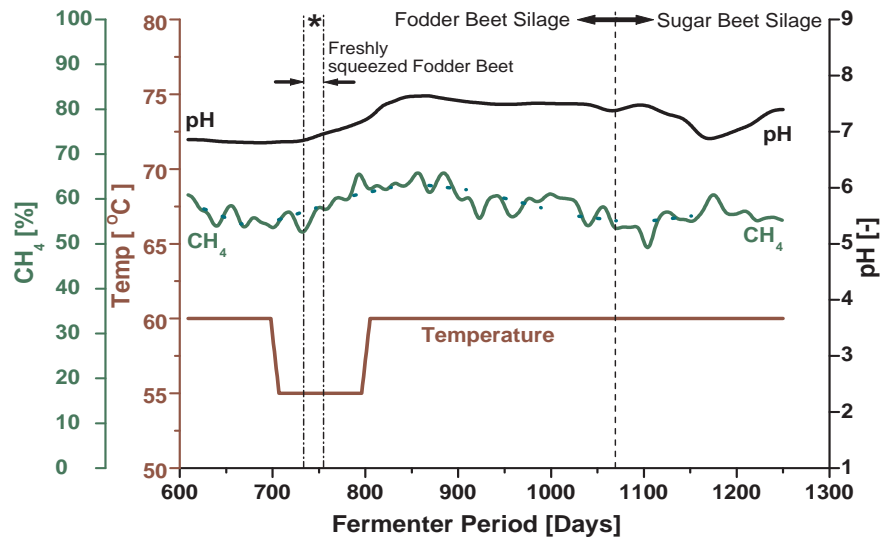


Fig. 2: Investigated thermophilic fermentor: diagram. The focus was laid on the reversible change of temperature. The fermenter was started with 65°C and has been changed after 80 days to 60°C as the propionate level increased dramatically (SCHERER et al. 2003). After this, the temperature was switched from 60°C to 55°C and vice versa (702d-796d). The HRT was in average in the range of 27 days

As the detection limit of the microscope and the RFLP-technique were under our fermenter conditions in the same range, the absence of special microbes did not reflect a complete absence. The here determined detection limit by addition of pure cultures lay in our investigation around  $10^5$  resp. 0.00001% of a bacterial population with  $10^{10}$  total cells per ml. That means that *Bacteria* and *Archaea* being not detected could be hidden in the background.

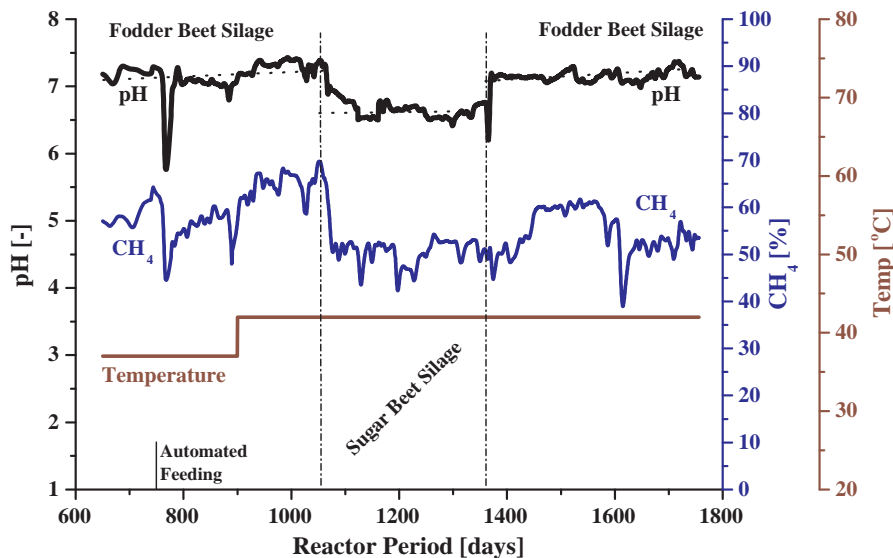


Fig. 3: The investigated mesophilic fermentation period: The HRT was prefixed between 5.5 and 30 days. Around day 870, the fermenter went into a disturbed state. An accident occurred. The barrel with the acidic beet silage was nearly empty and contained yeasts. Additionally, the automatic substrate feeding did not function and an over-dosage occurred. This led to a yeast invasion. For that reason the temperature was increased from 37°C to 41°C, the yeasts disappeared after 1 week. There exists literature that anaerobic digestion of maize is more favourable at 41°C than at 37°C (LINDORFER et al. 2006). Therefore, the temperature was not altered again

During thermophilic and slight hyper-thermophilic fermentation, the dominance of methanogenic *Archaea* being hydrogenotrophic was even more pronounced than under mesophilic temperatures. The percentage of hydrogenotrophic methanogens increased up to 100% *Methanobacteriales*, e.g., on fermenter day 609d and 924d. They mainly consisted of *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. On the fermenter days 745 and 1249, the *Methanosarcinales* consisted only of *Methanosarcina thermophila*, with 1.8-3.5% of the 120 investigated clones. On fermenter day 727, the highest number of *Methanosarcinales* was found with 9.15%, Fig. 5. Fermenter day 727d had a temperature of only 55°C (Fig. 2) and some coccoid methanogens could be seen microscopically (Fig. 1a).

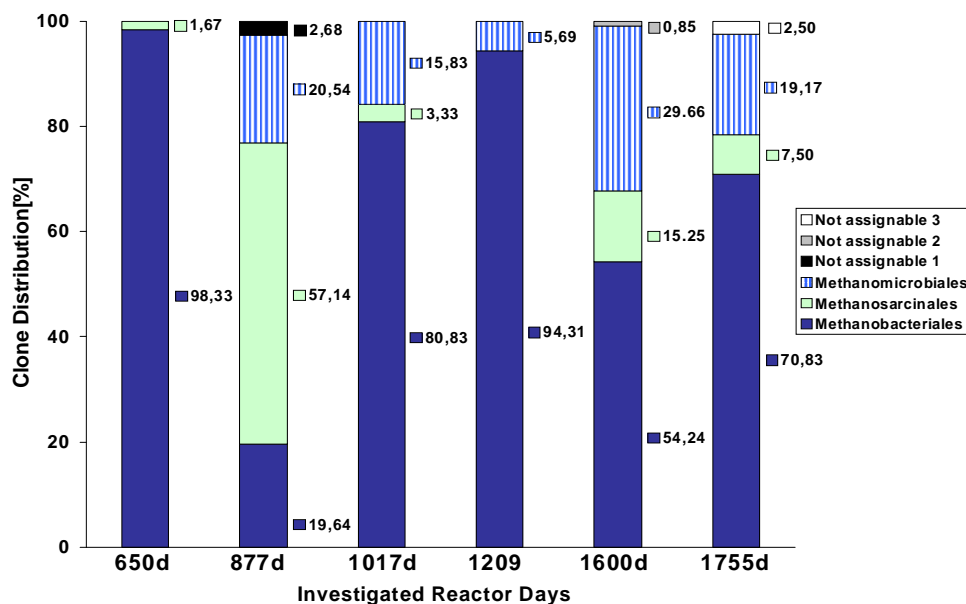


Fig. 4: The distribution of the mesophilic methanogenic *Archaea* in the investigated fermentation period of 1755 days is shown. Two imbalances occurred on day 877d (yeast invasion, technical problems, over-dosage) and on around day 1600. The volatile fatty acids increased 10fold up to 5000 ppm (otherwise below 500 ppm). It can be seen, that the dominance of hydrogenotrophic *Methanobacteriales* and *Methanobacteriales* was somewhat diminished. Therefore, the *Methanosarcinales* (mostly *Methanosaeta*) increased temporarily from 2-7.5% to 21-58%

Such a coccoid, hydrogenotrophic representative of *Methanomicrobiales* could be *Methanoculleus*, and indeed they were detected here by the used genetic methods. It was unusual to detect thermophilic *Methanomicrobiales*, as they were shown to occur or even dominate in anaerobic digesters fed with energy crops only under mesophilic conditions (optimum 45°C) (KLOCKE et al. 2007, 2008, BAUER et al. 2008, KRAUSE et al. 2008).

However, these studies were no long term fermenter studies without manure addition over years, as done here. Therefore, the direct influence of the seed sludge could not be excluded. For example, it is known that foreign methanogens coming from cow manure could be detected even after years of application in arable soils by molecular methods (GATTINGER et al. 2007).

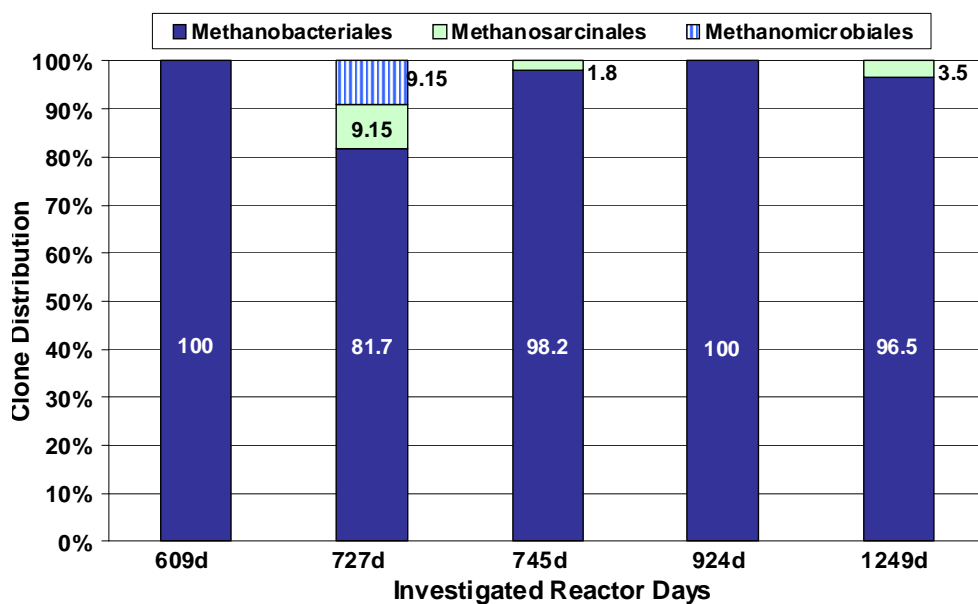


Fig. 5: The distribution of the thermophilic and hyper-thermophilic methanogenic Archaea in the investigated fermentation period of 1249 days. The fermentation diagram with the corresponding temperature variations is shown in Fig. 2

Hydrogenotrophic methanogens were also found to be dominant in the rumen of cows and sheeps (JANSSEN and KIRS 2008, LIU and WHITMAN 2008). In contrast to manure the ammonium concentration in the rumen itself is very low, similar to the investigation here, ranging between 100-200 ppm (we found 250-350ppm ammonium in our fermenters with beet silage including the top). On the other hand it was found that the sensitive *Methanosaeta* filaments could be outcompeted by the robust, clump forming *Methanosarcina* cells by elevated ammonium concentrations (KARAKASHEV et al. 2005). In addition SCHNUEERER and NORDBERG (2008) found by fermenter experiments at 37°C that ammonium concentrations above 2000-3000 ppm could force acetate oxidizers (e.g. *Clostridium ultunense*) and thereby hydrogenotrophic methanogens to be dominant over acetotrophic methanogens. PETERSEN and AHRING (1991) found by experiments with a laboratory sewage sludge digester (60°C) that at 1.4 mM acetate the acetotrophic methanogens dominated. But when the concentrations were below 1 mM (< 60 ppm), the acetate oxidizers succeeded together with hydrogenotrophic methanogens. Also LECLERC found that in 44 different anaerobic digesters either *Methanosarcina* or *Methanosaeta* dominated each digester, but not rod-like hydrogenotrophic methanogens (LECLERC et al. 2004).

Our scenario seemed to be quite different, and therefore it is thought that simply the concentration of organic matter was so high in the fermenter that this enabled the dominance of hydrogenotrophic methanogens under thermophilic and even under mesophilic temperatures (including syntrophic acetate, ethanol, propionate or butyrate oxidizers). Astonishing was the finding that apparently the hydrogenotrophic methanogens and the syntrophic fatty acid and alcohol oxidizers were not disturbed by the intermittent feeding every 8 hours for 5 min at 250 rotations per minute.



### 3.1 The biodiversity of *Bacteria* in mesophilic and thermophilic anaerobic fermenters fed with energy crops

There exist only a few publications about this subject, and no long term fermenter study (CIRNE et al. 2007, KLOCKE et al. 2007, MOUSIDI et al. 2007, WANG et al. 2008).

The known hydrolytic, acidogenic and acetogenic *Bacteria* of microbiological textbooks (MADIGAN et al. 2006) could be confirmed. The hydrolytic active phyla of *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) were found in nearly all fermenter samples. In our long term fermentation study a high dynamic could be observed. This can be explained by the fact that most of the *Bacteria* were carbohydrate consumers and this property is not very unique. Therefore, this explains the high dynamic and even large phyla containing many families could be nearly substituted during the investigated fermentation period, Fig. 6 and 7. From all bacterial phyla known at present, the following representatives could not be detected here:  $\delta$ - and  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Deferribacteres*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermomicrobia*, *Chrysiogenetes*, *Cyanobacteria* (phototrophic), *Chlamydiae* (parasites), *Dictyoglomi*, *Nitrospirae* (nitrificant), *Fusobacteria*, *Aquificae* and *Tenericutes* (www.catalogueoflife.org).

By analyzing the beet silage it could be excluded that the detected bacterial groups and *Archaea* derived perhaps from the substrate beet silage, as seen by Fig. 6.

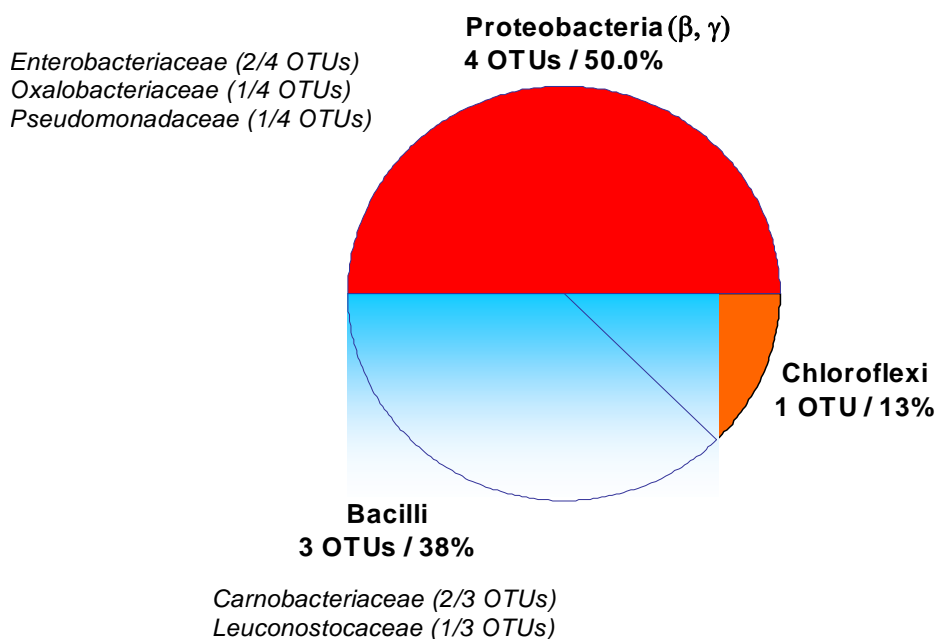


Fig. 6: Biodiversity of the acidic beet silage (pH 3.3-3.4) used as mono-input for the continuous fermentation. It underwent lactic acid fermentation because the characteristic fermentation products of lactic acid, acetic acid and ethanol were estimated as the major products

Additionally, most of the found bacterial representatives could not contribute to the common known *Bacteria* species or genera from catalogued culture collections. That was somewhat astonishing, but was also observed by CHOUARI et al. (2005) and KLOCKE (personal communication).

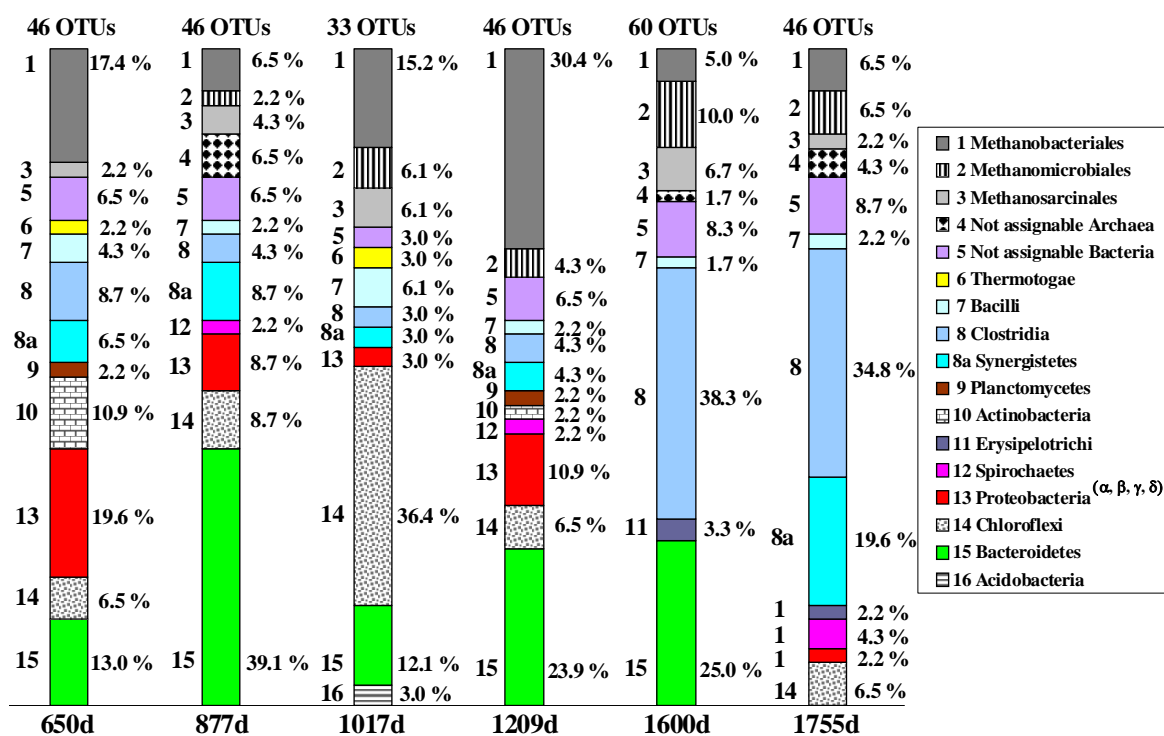


Fig. 7: Biodiversity of an automated mesophilic fermenter with beet silage as mono-input. The anaerobic digester was continuously driven and intermittently stirred over a period of 1755 days. The samples were drawn on 6 selected fermenter days as indicated. The number of found operational taxonomic units (OTUs) of methanogenic Archaea ranged between 19-25%. That equals the same range of the whole microbial population as estimated by quantified fluorescence microscopy

Even new phyla could be detected in the fermentation samples with lower than 80% congruence of the 16S ribosomal DNA with any cultivated and catalogued microbe. That means that the percentage difference to genomic DNA should have been much higher (Yarza et al. 2008).

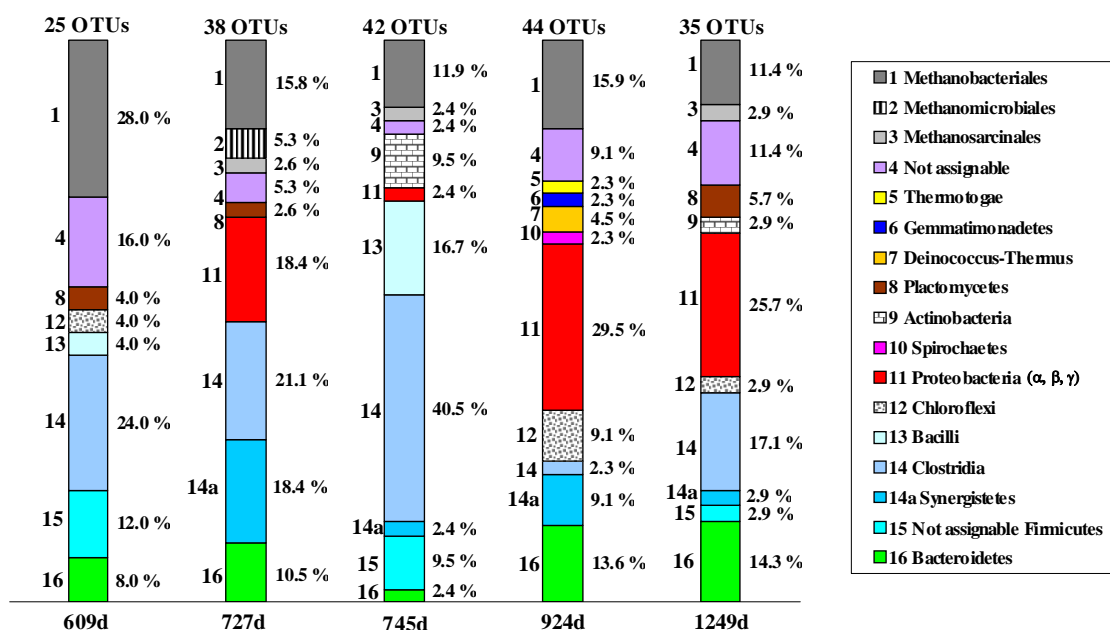


Fig. 8: Biodiversity of an automated thermophilic fermenter (55/60°C) with beet silage as mono-input. The anaerobic digester was continuously driven and intermittently stirred over a period of 1249 days (still in operation now for more than 50000 hours). The samples were drawn on 5 selected fermenter days as indicated. The number of found operational taxonomic units (OTUs) of methanogenic Archaea ranged between 14-28%. This shares the same range of the whole microbial population as estimated by quantified fluorescence microscopy

The old question remained if the biodiversity was higher under mesophilic or thermophilic conditions. There exist several indices to quantify the found biodiversity (MAGURRAN 2004) e.g. the Simpson-Index of Diversity (SIMPSON 1949) and the Shannon Index (SHANNON 1948). The Chao I estimation predicts the theoretical possible number of OTUs (CHAO 1984). These indices were determined here. The diversity varied with the fermenter day, but on average the bacterial biodiversity of the mesophilic and the slight hyper-thermophilic fermenter was similar. The bar diagrams of Fig. 7 and 8 do not show this directly. The diversity of the mesophilic methanogenic *Archaea* and *Bacteria* was somewhat higher than the thermophilic representatives. This can be seen from Fig. 4 and Table 1 as the hydrogenotrophic *Methanomicrobiales* played only a significant role under mesophilic conditions and enlarged thereby the diversity. It is known that some *Methanomicrobiales* had a high affinity resp. a low threshold concentration for hydrogen (ca. 0.1  $\mu\text{M}$  resp. 15 Pa, LEE and ZINDER 1988) and perhaps this was of advantage over some *Methanobacteriales*. As the hydrogen concentration in a closed fermenter is increased five to tenfold under thermophilic conditions by thermodynamic reasons (ZINDER 1990), the preference of *Methanomicrobiales* by low hydrogen concentration could have been lost and they were outcompeted by the *Methanobacteriales*.

Tab. 1: Overview of the used statistical parameters to compare the mesophilic (877 – 1209d) with the thermophilic biogas fermenter (924 – 1249d). The arithmetic mean of both temperature models had been formed from chosen stable fermenter days. The Chao I number predicts the theoretical possible number of OTUs

	Mesophilic	Thermophilic
	<b>Bacteria</b>	
<b>Simpsons</b>	<b>0.913</b>	<b>0.94</b>
<b>Shannon</b>	<b>2.9</b>	<b>3.06</b>
<b>OTU</b>	<b>30.33</b>	<b>33.5</b>
<b>Chao 1-Corr.</b>	<b>40.66</b>	<b>48.15</b>
	<b>Archaea</b>	
<b>Simpsons</b>	<b>0.6</b>	<b>0.7</b>
<b>Shannon</b>	<b>1.33</b>	<b>1.41</b>
<b>OTU</b>	<b>11.33</b>	<b>6</b>
<b>Chao 1-Corr.</b>	<b>13.28</b>	<b>12</b>

In the thermophilic fermenter a somewhat higher diversity could be observed for both, *Archaea* and *Bacteria*. But actually no mentionable divergence had resulted from the calculation of diversity indices (CHAO 1984, SHANNON 1948, SIMPSON 1949). Based on this it cannot be made a final decision if the thermophilic fermenter was more balanced or had a more stable population than the mesophilic fermenter. That means on the other side that mesophilic temperatures did not favour the biodiversity. We got a kick on the biodiversity under thermophilic conditions by changing somewhat the substrate from fodder beet silage to fresh, squeezed fodder beet juice. This increase remained constant until the end of the investigation period of the thermophilic fermenter, Fig. 2.

## 4 Conclusions

As the experiments started first after a pre-run of 600 days, any direct influence of manure could be excluded. This long term experiment represents the first study about the microbial diversity in a fermenter for the anaerobic digestion of energy crops under defined and controlled conditions, simultaneously under mesophilic and thermophilic conditions.

Nearly all relevant *Bacteria* of the common textbook scheme for the anaerobic food chain to hydrolyse biomass could be confirmed, some additional could be detected. Apparently most of the *Bacteria* were not well known as typical members, some represented even a new phylum.

The findings clearly demonstrated that during anaerobic digestion of renewable biomass the hydrogenotrophic methanogens with  $H_2 + CO_2$  as substrate (*Methanobacteriales* and *Methanomicrobiales*) dominated. Acetotrophic methanogens (*Methanosarcinales*) represented mostly a minority down to a proportion of only 10% or not detectable. Therefore, the methanogenesis of energy crops includes presumably first a gasification to  $H_2 + CO_2$  and after this a second biogasification to  $CH_4 + CO_2$ . This is in contrast to the common anaerobic digestion model ADM 1 (BATSTONE et al. 2006) and the findings for other an-

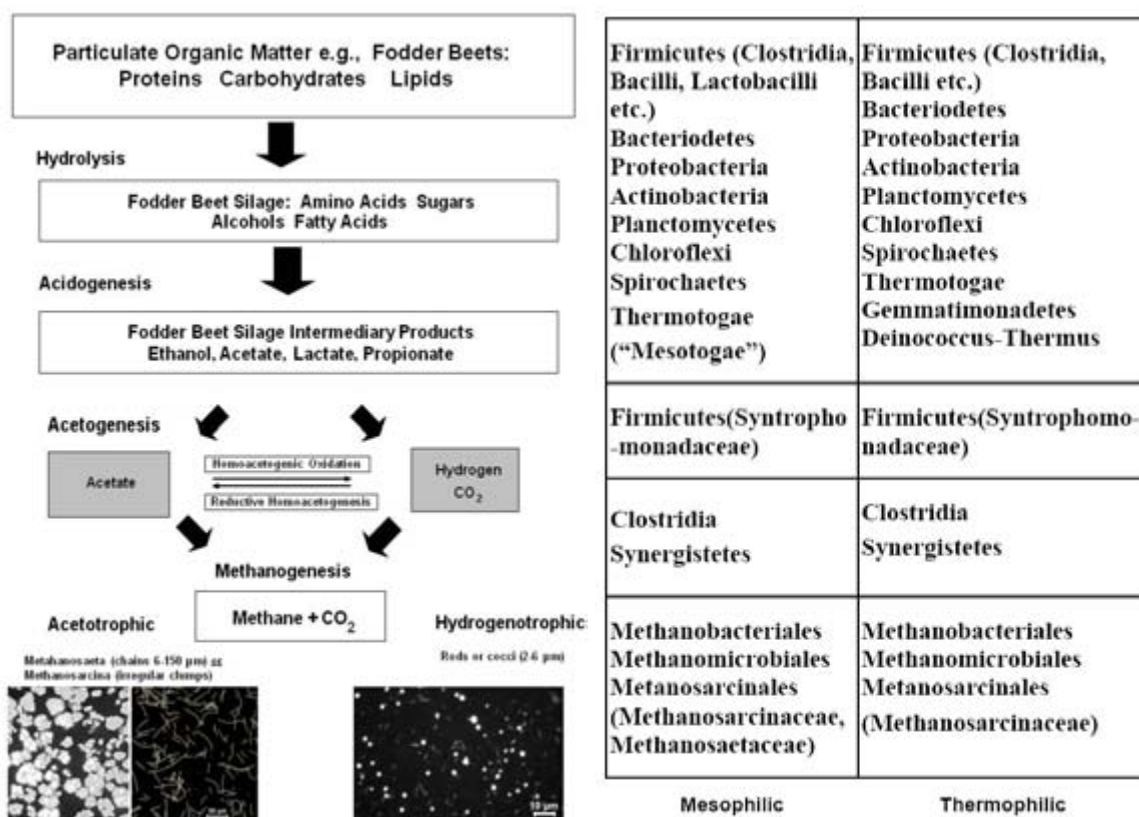
aerobic digesters (PETERSEN and AHRING 1991, LECLERC et al. 2004, SCHNUEERER and NORDBERG 2008, LIU and WHITMAN 2008).

Surprisingly, the archaeal flora at 60°C (slightly hyper-thermophilic) was quite different to the archaeal flora at 55°C. *Methanosaeta* seemed to be absent at 60°C operation temperature. That opens the strategy to prefer in industrial scale 60°C over 55°C to exclude by this way the disadvantageous genus *Methanosaeta*, which is known to be sensitive for acetate, ammonia and H<sub>2</sub>S. This should be enabled by an inoculum with high inoculating power. That was apparently here the case.

Figure 9 outlines the anaerobic food chain modified from microbiological textbooks (MADIGAN et al. 2006).

Fig. 9: Scheme of the anaerobic microbial food chain (SCHERER, unpublished results.) and

Tab. 2: Summary of the detected main archaeal and bacterial groups during continuous fermentation of beet silage under mesophilic and thermophilic fermenter conditions. The groups are positioned according to their possible action in the food chain (left)



## References

- BATSTONE D. J.; KELLER J., STEYER J. P. (2006): A review of ADM1 extensions, applications, and analysis, *Wat. Sci. Tech.* 54, 1-10.
- BAUER C., KORTHALS M., GRONAUER A., LEBUHN M. (2008): Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach, *Wat. Sci. Tech.* 58, 1433-1439.
- CHAO A. (1984): Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Statist* 11, 265-270.
- CHOUARI, R., D. LE PASLIER, P. DAEGELEN, GINESTET P, WEISSENBACH J. AND A. SGHIR. (2005): Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environ. Microbiol.* 7, 1104-1115.
- CIRNE D. G., LEHTOMÄKI A., BJÖRNSSON L., BLACKALL L. L. (2007): Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *J. Appl. Microbiol.* 103, 516-527.
- DEMIREL B., SCHERER P. (2008a): Production of methane from sugar beet silage without manure addition by a single-stage anaerobic digestion process *J. Biomass & Bioenergy*, 32, 203-209.
- DEMIREL B., SCHERER P. (2008b): The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. *Rev Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 173-190.
- DEMIREL B., NEUMANN L., SCHERER P. (2008): Microbial community dynamics of a continuous mesophilic anaerobic biogas digester fed with sugar beet silage, *Eng. Life Sci.* 8, 390-398.
- DEMIREL B., SCHERER P. (2009): Bio-methanization of energy crops through monodigestion for continuous production of renewable biogas. *Renew. Energy.* 4, 2940-2945.
- DEMIREL B., ERGUN S., NEUMANN L., SCHERER P. (2009): Performance and behaviour of the microbial community of an anaerobic biogas digester using Sugar Beet Silage as mono-substrate, *Biosyst. Engin.* 102, 442-452.
- GARRITY G.M., HOLT J.G. (2001): *Chloroflexi* phy.nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (D.R. Boone, R.W. Castenholz, eds.), Springer Publishers, 427-446.
- GARRITY G.M, HOLT JG, RAINEY F.A, DA COSTA M.S, (2001): Phylum „*Deinococcus – Thermus*“. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (D.R. Boone, R.W. Castenholz, eds.), Springer Publishers, 395-420.
- GATTINGER A., HÖFLE M. G., SCHLOTTER M., EMBACHER A., BÖHME F., MUNCH J. C., LABRENZ M. (2007): Traditional cattle manure application determines abundance, diversity and activity of methanogenic *Archaea* in arable European soil, *Environ. Microbiol.* 9, 612-624.
- GERBENS-LEENES W., A. Y., HOEKSTRA T. H., VAN DER MEER. (2009): The water footprint of bioenergy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10219-10223.
- HOFMAN-BANG J., ZHENG D., WESTERMANN P., AHRING B.K., RASKIN L. (2003): Molecular ecology of anaerobic reactor systems, *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 81, 151-203.

- JANSSEN P. H., KIRS M. (2008): Structure of the archaeal community of the rumen., Appl. Environ. Microbiol. 74, 3619-3625.
- JUMAS-BILAK, E, ROUDIÈRE L, MARCHANDIN H (2009): Description of 'Synergistetes' phyl. nov. and emended description of the phylum 'Deferribacteres' and of the family Syntrophomonadaceae, phylum. Firmicutes' Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 1028-1035.
- KARAKASHEV D., BATSTONE D. J., ANGELIDAKI I. (2005): Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. Appl. Environ. Microbiol. 71, 331-338.
- KLOCKE M., MÄHNERT P, MUNDT P., SOUIDIA K., LINKE B. (2007): Microbial community analysis of a biogas producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate, Syst. Appl. Microbiol. 30, 139-151.
- KLOCKE M., NETTMANN E., BERGMANN I., MUNDT K., SOUIDI K., MUMME J., LINKE B. (2008): Characterization of the methanogen *Archaea* within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass, Syst. Appl. Microbiol. 31, 190-205.
- KRAKAT N., SCHERER P. (2007): The methanogenic and bacterial diversity in a high throughput fuzzy controlled digester for renewable biomass. 11th World Congress on Anaerobic Digestion, Bioenergy for our future, Brisbane, Australia, 23-27
- KRAUSE L., DIAZ N. N., EDWARDS R. A., GARTEMANN K.-H., KRÖMEKE H., NEUWEGER H., PÜHLER A., RUNTE K. J., SCHLÜTER A., STOYE J., SZCZEPANOWSKI R., TAUCH A., GOESMANN A. (2008): Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor, J. Biotechnol. 136, 91-101.
- LECLERC, M., DELGENES, J.-P., GODON, J.J. (2004): Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing, Environ. Microbiol. 6, 809-819.
- LEE M.J., ZINDER S.H. (1988): Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture, Appl. Env. Microbiol. 54, 1457-1461.
- LIU, Y., WHITMAN (2008), W.B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic *Archaea* Ann. N.Y. Acad. Sci. 1125, 171–189
- LINDORFER H, BRAUN R, KIRCHMAYR R. (2006): Self-heating of anaerobic digestion using energy corps. Wat. Sci. Tech. 53, 159-166.
- MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO, T. D. BROCK, and THOMM M. (2006): Brock Mikrobiologie, 11. Edition., ed. by Pearson Studium-Publisher, Munich
- MAGURRAN, A. E., (2004): Measuring Biological Diversity. Blackwell Publishing.
- NESBØ C. L., DLUTEK M.; ZHAXYBAYEVA O., DOOLITTLE W. F. (2006): Evidence for existence of "mesotogas," members of the order Thermotogales adapted to low-temperature environments, Appl. Environ. Microbiol. 72, 5061-5068.
- PETERSEN, S.P., AHRING, B.A. (1991): Acetate oxidation in a thermophilic anaerobic sewage-sludge digester: the importance of non-aceticlastic methanogenesis from acetate, FEMS Microbiol. Ecol. 86, 149-158.
- REISENBACH A-L. (2001): Thermotogae phyl.nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (D.R. Boone, R.W. Castenholz, eds.), Springer Publishers, 369-393.

- RHEIMS H., STACKEBRANDT E. (1999): Application of nested polymerase chain reaction for the detection of as yet uncultured organisms of the class Actinobacteria in environmental samples. *Environ. Microbiol.* 1, 137-143.
- SCHERER P.A., VOLLMER G.-R., FAKHOURI T., MARTENSEN S. (2000): Development of a methanogenic process to degrade exhaustively municipal „grey waste“ under thermophilic and hyperthermophilic conditions, *Wat. Sci. Tech.* 4, 83-91.
- SCHERER P., DOBLER S., ROHARDT S., LOOCK R., BÜTTNER B., NÖLDEKE P. and BRETTSCHUH A. (2003): Continuous biogas production from fodder beet silage as sole substrate, *Wat. Sci. Tech.* 48, 229-233
- SCHERER P., LEHMANN K. (2004): Mehrjährige Versuche zur Vergärung von Energiepflanzen mittels Fuzzy-geregelter Intervallbeladung. In: „Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt“, Band 12 (ISBN 3-00-015042-0), IBA e.V., Heiligenstadt, 295-315.
- SCHERER P.A., KLOCKE M., KRAKAT N., UNBEHAUEN M. (2005): Anaerobic digestion of beet silage by non-aceticlastic methanogenesis. In: Ahring B.K., Hartmann H. (eds.), *Proceedings of the 4th International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste*, Technical University of Denmark, Copenhagen, 106 - 111.
- SCHERER, P., ERGUN S.O., SCHMIDT O., LÖFFELHOLZ J., HENNING-JACOB, VOLLMER, G.-R. (2008): Entwicklung einer Fuzzy-Logik-Regelung für eine Hochdurchsatzbiogasanlage: „Telefermentation“ zwischen Hamburg und Nordhausen In: *Gülzower Fachgespräche*, Druck FNR e.V, Gülzow, 146-171.
- SCHERER P., LEHMANN K., SCHMIDT O., DEMIREL B. (2009a): Application of a Fuzzy logic control system for continuous anaerobic digestion of low buffered, acidic energy crops as mono-substrate, *Biotechnol. Bioengin.* 102, 136-142.
- SCHERER, P., NEUMANN, L., DEMIREL, B., SCHMIDT, O., UNBEHAUEN, M. (2009b): Long term fermentation studies about the nutritional requirements for biogasification of fodder beet silage as mono-substrate, *J. Biomass & Bioenergy* 33, 873-881.
- SCHNUERER A., NORDBERG A. (2008): Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Wat. Sci. Tech.* 57, 735-740.
- SHANNON C. E. (1948): A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J* 27, 379-423.
- SIMPSON E. H. (1949): Measurement of diversity. *Nature* 163, 688
- SOUIDI K., MUMME J., MUNDT K., NETTMANN E., BERGMANN I., LINKE B., KLOCKE M. (2007): Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure, *Agric. Eng. Res. Agrartech.* 13, 197-206.
- SPIEGELMAN D., WHISELL G., GREER C.W. (2005): A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities, *Can. J. Microbiol.* 51, 355-386.
- TILCHE A., GALATOLA M. (2008): The potential of bio-methane as bio-fuel/bio-energy for reducing greenhouse gas emissions: a qualitative assessment for Europe in a life cycle perspective, *Wat. Sci. Tech.* 57, 1683-1692.
- VDI 4630 (2006): *Vergärung organischer Stoffe/Digestion of Organic Matter* (German & English, dual text), C. Beuth Verlag, Berlin oder VDI-Verlag, Düsseldorf.



- WANG H., LEHTOMÄKI A., TOLVANEN K., PUHAKKA J., RINTALA J. (2009): Impact of crop species on bacterial community structure during anaerobic co-digestion of crops and cow manure. *Bioresour. Technol.* 100, 2311-2315
- WHITMAN W.B., BOONE, D.R., KOGA Y., KESWANI J. (2001): Taxonomy of methanogenic *Archaea*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (D.R. Boone, R.W. Castenholz, eds.), Springer Publishers, 211-294.
- YARZA, P.; RICHTER, M.; PEPLIES, J.; EUZEBY, J.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.-H.; LUDWIG, W.; GLÖCKNER, F. O. & ROSSELLÓ-MÓRA, R. (2008): 'The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 241-250.
- ZHANG H., SEKIGUCHI Y., HANADA S., HUGENHOLTZ P., KIM H., KAMAGATA Y., NAKAMURA K. (2003): *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating microorganism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1155-1163.
- ZINDER, S.H. (1990): Conversion of acetic acid to methane by thermophiles. *FEMS Microbiol. Rev.* 75, 125-138.

## Acknowledgements

We wish to thank the German ministry for education and research for granting the project 03SF0317 I and we wish to thank Karsten Lehmann, Nils Scharfenberg, Christian Rösner and Monika Unbehauen for their excellent support regarding fermentation technique and fermentation analytics.



## Methanogene Archaea in landwirtschaftlichen Biogasanlagen

E. Nettmann<sup>1,2</sup>, I. Bergmann<sup>1,2</sup> und M Klocke<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB), Abteilung Bioverfahrenstechnik, Max-Eyth-Allee 100, 14469 Potsdam, Deutschland

<sup>2</sup> Technische Universität Berlin, Institut für Technischen Umweltschutz, Fachgebiet Umweltmikrobiologie, Franklinstraße 29, 10587 Berlin, Deutschland

### Zusammenfassung

Die Produktion von Biogas aus landwirtschaftlichen Primärprodukten oder Reststoffen stellt einen wesentlichen Beitrag zur Reduktion des CO<sub>2</sub>-Ausstoßes sowie zur Entwicklung einer nachhaltigen Landbewirtschaftung dar. Gegenwärtig stehen im Fokus der Forschung die Entwicklung von verbesserten Biogasreaktoren, die Etablierung von effizienteren Betriebsweisen sowie die Optimierung der Substratbereitstellung. Dahingegen ist die Struktur und Zusammensetzung der in landwirtschaftlichen Biogasanlagen an der Biogasbildung beteiligten mikrobiellen Lebensgemeinschaften jedoch weitgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Zusammensetzung der methanogenen Mikroflora in ausgewählten landwirtschaftlichen Biogasanlagen, welche auf Basis von Nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) betrieben werden, mittels eines polyphasischen Ansatzes verschiedener kulturunabhängiger, molekularer Verfahren untersucht. Vorrangig wurde hierzu eine Analyse der Nukleotidsequenz des 16S rDNA Gens durchgeführt. Nach der Konstruktion entsprechender Klonbibliotheken wurden die isolierten DNA-Sequenzen mittels PCR-RFLP Analyse in einzelne taxonomische Einheiten (OTU) gruppiert. Durch die Bestimmung der jeweils einer OTU zugrunde liegenden Nukleotidsequenz sowie deren phylogenetischer Einordnung wurde dann der jeweilige Ursprungsorganismus ermittelt. Die relativen Anteile der ermittelten mikrobiellen Gruppen wurden mittels quantitativer *real-time* PCR (Q-PCR) und, zellbasiert, mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) bestimmt.

Die Ergebnisse der Analysen zeigten, dass in neun der zehn untersuchten Biogasanlagen die hydrogenotrophen Methanogene, repräsentiert durch Vertreter der Ordnungen Methanomicrobiales, vorherrschend waren. Innerhalb dieser Ordnung wurden vorrangig Vertreter der Gattung *Methanoculleus* detektiert. Nennenswerte Anteile an acetiklastischen Methanbildnern, insbesondere der Gattung *Methanosaeta*, konnten für sechs der untersuchten zehn Anlagen nachgewiesen werden. Jedoch wurde nur in einer Biogasanlage diese Gattung als die dominierende Gruppe von Methanbildnern gefunden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der Mehrheit der untersuchten Biogasanlagen die hydrogenotrophe Methanogenese auf Basis von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> der vorrangige Stoffwechselweg für die Methanproduktion ist.

Relevant für die Ausprägung einer bestimmten Archaea-Gemeinschaft scheint vorrangig die Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) Konzentration und/oder der Anteil an freiem Ammoniak (NH<sub>3</sub>) zu sein, welcher sich besonders auf acetiklastische Gattung *Methanosaeta* negativ auswirkt. Ein Zusammenhang zwischen den jeweils zur Biogasgewinnung eingesetzten Substraten und der Struktur der Archaea-Biozönose konnte jedoch nicht beobachtet werden. Ebenso wenig scheinen unterschiedliche Verweilzeiten der Substrate sowie die Raumbelastung der Reaktoren einen Einfluss auf die methanogenen Archaea zu haben.

## Summary

The production of biogas from agricultural primary products or residues provides an important contribution to the reduction of CO<sub>2</sub> emissions and to the development of sustainable land use strategies. Today the optimization of reactor constructions and operation protocols as well as the establishment of efficient procedure for substrate supply are main goals of research. Nevertheless, up to now the knowledge about the structure of the methane forming microbial communities present in agricultural biogas plants is still limited.

In this study the methanogenic Archaea community structure present within agricultural biogas plants utilizing primarily renewable raw material was characterized applying a polyphasic strategy consisting of four different culture-independent approaches. Firstly, an analysis of the 16S rDNA nucleotide sequence was conducted to determine the diversity within the domain Archaea. Therefore, from amplified DNA sequences clone libraries were constructed. Using PCR-RFLP analysis, cloned 16S rDNA sequences were grouped in operational taxonomic units (OTUs). After determination of nucleotide sequences representative for each single OTU a phylogenetic analysis was performed allowing the taxonomic classification of detected OTUs and hence of their microbial origins. Relative amounts of major groups of methanogenic Archaea were determined by quantitative *real-time* PCR (Q-PCR) and, additionally, by fluorescence in situ hybridisation (FISH) with group-specific DNA probes and microscopically determination of respective cell densities.

In nine of ten analyzed biogas plants hydrogenotrophic methanogens represented by members of the order Methanomicrobiales were predominant. Within this order, predominantly members of the genus *Methanoculleus* were detected. Visible amounts of aceticlastic methanogens mainly of genus *Methanosaeta* were found in six of nine biogas plants, but only in one of them this genus was predominant. These findings point to the hydrogenotrophic methanogenesis based on CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> conversion as favoured pathway for methane synthesis in the majority of analyzed biogas plants.

The development of a certain archaeal community seems to be mainly influenced by the apparent ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) concentration or the fraction of free ammonia (NH<sub>3</sub>). The latter is a known inhibitor of aceticlastic *Methanosaeta*. In contrast, a direct link between the substrates used for bioconversion and archaeal community structure was not obvious. Accordingly, the organic loading rate or the retention times of substrates seems to be irrelevant for the structure of the methanogenic community

## Schlüsselwörter:

Methanogene Archaea, Biogasanlagen, Mikrobielle Diversität, 16S rDNA Gen

## 1 Einleitung

Im letzten Jahrzehnt gewann die Produktion von Biogas aus nachwachsenden Rohstoffen und landwirtschaftlichen Reststoffen zunehmend an Bedeutung. Die Produktion von Biogas ist einerseits integraler Bestandteil einer nachhaltigen Landwirtschaft, trägt andererseits wesentlich zur CO<sub>2</sub>-neutralen Energieproduktion bei. Biogas ist das Endprodukt einer komplexen Kette verschiedener anaerober mikrobieller Stoffwandlungsprozesse. Von besonderer Bedeutung ist Methan (CH<sub>4</sub>) als die energetische Komponente im Biogas. Methan ist Endprodukt des Energiestoffwechsels einiger weniger, hoch spezialisierter Mikroorganismen der Domäne Archaea. Im Unterschied zu der Verfahrenstechnik der Biogasfermentation ist die Mikrobiologie dieses Prozesses, insbesondere der Methanproduktion in Biogasanlagen auf Basis nachwachsender Rohstoffe, bislang kaum Gegenstand der Forschung. Dieses erstaunt umso mehr, da die Effizienz einer Biogasanlage nicht zuletzt von der Aktivität der vorliegenden mikrobiellen Gemeinschaft und ihrer Kapazität zum Substratabbau und Methansynthese abhängt.

Abhängig von der Art des Substrates zur Methanogenese lassen sich zwei größere Gruppen methanogener Archaea unterscheiden: Acetiklastische Methanogene metabolisieren Acetat, hydrogenotrophe Methanbildner nutzen molekularen Wasserstoff (H<sub>2</sub>) als Elektronendonator und Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) als Kohlenstoffquelle zur Synthese von Methan. Neben diesen sind verschiedene andere Methanogene auch in der Lage methylierte Verbindungen und Methanol zu Methan zu konvertieren (GARRITY und HOLT, 2001:211; LOVLEY und KLUG, 1983:1310).

Gegenstand mikrobiologischer Studien waren bislang vorrangig die mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasreaktoren zur Abwasserreinigung oder zur Behandlung von Gülle (KARAKASHEV et al., 2005: 331; LECLERK et al., 2004:809; MCHUGH et al., 2003:297). In der Mehrheit dieser Biogasanlagen wurde als vorherrschender Weg zur Methanbildung die acetiklastische Methanogenese nachgewiesen. Dieses ist in Übereinstimmung mit Studien zum Kohlenstoffumsatz in anaeroben Habitaten, welche zeigten, dass das gebildete Methan zu etwa 70% aus der Acetat-Umwandlung und zu 30% aus der Reduktion von CO<sub>2</sub> stammt (AHRING, 2003:1; MACKIE und BRYANT, 1981:1363). Andererseits konnte für bestimmte anaerobe Umwelten gezeigt werden, dass der Beitrag der hydrogenotrophen Methanogenese auch wesentlich größer ausfallen kann (CHAN et al., 2005:1139; KARAKASHEV et al., 2006:1139; KRAUSE et al., 2006:5138). Welche Kohlenstoffflüsse bzw. methanogenen Archaea jedoch in landwirtschaftlichen Biogasanlagen vorliegen, welche überwiegend mit nachwachsenden Rohstoffen betrieben werden, wurde bislang nur vereinzelt untersucht (KLOCKE et al., 2008:190; KRAUSE et al., 2008:91; NETTMANN et al. 2008:1835). Insbesondere fehlen umfassendere Studien zur Struktur und Variabilität der methanogenen Archaea-Gemeinschaften.

Diese Studie fasst die Ergebnisse einer Analyse von zehn verschiedenen Biogasanlagen zusammen, welche auf Basis von verschiedenen Energiepflanzen in Kombination mit verschiedenen Gülle-Arten betrieben werden. Die Zusammensetzung der in diesen Biogasanlagen vorkommenden methanogenen Archaea-Biozönose wurde mittels eines polyphasischen Ansatzes ermittelt. Die archaelle Diversität wurde mit Hilfe der Klonierung und Sequenzierung der archaellen 16S rDNA Nukleotidsequenz erfasst. Eine Quantifizierung der archaellen 16S rDNA Gene erfolgte auf Grundlage gruppenspezifischer quantitativer *real-time* PCR (Q-PCR). Die Zellkonzentrationen für bestimmte Gruppen von methanogenen Archaea wurden mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

von Oligonukleotid-Sonden und mikroskopischer Auszählung der markierten Zellen ermittelt.

## 2 Material und Methoden

### *Probennahme*

Eine Übersicht der beprobten Biogasanlagen wird in *Tab. 1* gegeben. Alle zehn Biogasanlagen wurden seit mindestens einem Jahr unter mesophilen Bedingungen betrieben. Die Probennahme erfolgte im März 2006 bis Juli 2007. Hierbei wurden von dem durchmischten Reaktorinhalt im Abstand von 15 Minuten vier Proben mit einem Volumen von je fünf Litern genommen. Aliquots (500 ml) von jeder Teilprobe wurden zu einer Mischprobe vereinigt.

### *Mikroskopische Analysen*

Die Quantifizierung verschiedener Gruppen von Mikroorganismen erfolgte mikroskopisch nach Markierung der Zellen mit fluoreszent markierter Oligonukleotidsonden (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung). Die FISH wurden exemplarisch mit Proben von vier Biogasanlagen (BA2, BA7, BA9 und BA10) durchgeführt. Hierzu wurden 25 ml der Mischprobe mit 1 Vol. Ethanol (96%) gemischt und bei -20°C über Nacht gelagert. Die Fixierung mit 3,7%igem Formaldehyd (1:3) und weitere Aufarbeitung von 500 µl Probe erfolgte nach (DAIMS et al., 2005:213). Zur Auflösung der Biofilme bzw. der mikrobiellen *extracellular polymeric substances* (EPS) wurde ein modifiziertes Protokoll nach BÖCKELMANN et al. (2003:201) angewandt.

Die mikroskopische Analyse erfolgte mittels Nikon Optiphot-2 ausgerüstet mit Filterblock DAPI AMCA und HQ: Cy3 und Kamera Nikon Digital Sight DS-2Mv. Grundsätzlich wurde zu jeder Reaktorprobe eine Verdünnungsreihe (1:100, 1:500, 1:1000) angelegt. Eine Einfärbung aller Zellen zur Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte mit dem Farbstoff 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (10 µl Probe + 70 ng DAPI).

Zur Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wurden folgende Oligonucleotid-Sonden verwendet: Archaea gesamt: ARC915 (STAHL und AMANN, 1991:205), Bacteria gesamt: EUB223 (AMANN et al., 1990:1919), Methanomicrobiales: MG1200 (RASKIN et al., 1994:1232), Methanobacteriales: MB310+MB1174 (RASKIN et al., 1994:1232), Methanosarcinaceae: MS821 (RASKIN et al., 1994:1232), Methanosaetaceae: MX825 (YU et al., 2006:424; RASKIN et al., 1994:1232). Alle Sonden waren mit dem Farbstoff Cy3 markiert. Die Funktion jeder Sonde wurde mit entsprechenden Kontrollen überprüft. Die Hybridisierung erfolgte nach DAIMS et al. (2005:213). Die Zählung erfolgte auf Basis von 1000 DAPI-markierten Zellen unabhängiger und zufällig ausgewählter Felder bei 630x Vergrößerung. Die Zellzahlen von Aggregaten wurden auf Basis der sichtbaren Fläche geschätzt.

Tab. 1: Beprobte Biogasanlagen

Biogasanlagen	Inbetriebnahme	Fermentergröße (m <sup>3</sup> )	Verfahren	Substrate (Gewichtsprozent, > 2%)	Biogasausbeute (Nm <sup>3</sup> BG t <sub>oTS</sub> <sup>-1</sup> )	CH <sub>4</sub> -Ausbeute (Nm <sup>3</sup> BC t <sub>oTS</sub> <sup>-1</sup> )	CH <sub>4</sub> (Vol.%)
BA 1 Brandenburg	12.2004	1000	Nassvergärung	Schweinegülle (74%), Lieschkolbensilage (11%), Maissilage (9%), Roggenkörner (6%)	655 (572)*	351 (299)*	54 (52)*
BA 2 Brandenburg	12.2005	3600	Nassvergärung	Rindermist (40%), Maissilage (39%), Rinderjauche (18%), Wasser (2,5%)	756	389	53.0
BA 3 Mecklenburg-Vorpommern	10.2004	1000	Nassvergärung	Schweinegülle (54%), Maissilage (46%)	634	335	53
BA 4 Mecklenburg-Vorpommern	12.2004	2326	Nassvergärung	Rindergülle (72%), Maissilage (28%)	284	145	51
BA 5 Mecklenburg-Vorpommern	10.2005	1300	Nassvergärung	Schweinegülle (50%), Maissilage (38%), Putendung (10%)	511	267	52
BA 6 Sachsen-Anhalt	12.2002	2700	Nassvergärung	Schweinegülle (56%), Maissilage (40%)	683	363	53
BA 7 Brandenburg	05.2003	1000	Nassvergärung	Maissilage (82%), Gerstenkörner (12%), Wasser (6%)	772	402	52
BA 8 Sachsen	10.2004	150 (AF) 4x 120 (FR)	Trockenvergärung	Triticale (100%)	343**	213**	62**
BA 9 Mecklenburg-Vorpommern	12.2005	2640	Nassvergärung	Rindergülle (54%), Maissilage (37%), Schweinegülle (6%), Puttermist (2%)	n. b.	n. b.	56
BA 10 Sachsen-Anhalt	12.2005	1950	Nassvergärung	Rindergülle (76%), Maissilage, (14%), Rindermist (4%), Grassilage (4%), Getreidekörner (2%)	635	334	53

BG = Biogas, oTS = organische Trockensubstanz, N = Daten wurden normalisiert für 273,15 K und 1013,25 hPa, BA = Biogasanlage, AF = Anaerobifilter, FR = Feststoffreaktor, n. b. = nicht bestimmt, \* Werte für zweite, zeitlich versetzte Beprobung (= BA1a), \*\* Summe aller Fermenter.

### *Molekulargenetische Analysen*

Aus der Mischprobe wurden vier Aliquots zu je 40 ml entnommen. Hieraus wurde die gesamte mikrobielle DNA unter Verwendung eines Protokolls von NETTMANN et al. (2008:1835) isoliert. Die Kontrolle auf vollständige Zelllyse erfolgte mikroskopisch (lichtmikroskopisch und F420-Autofluoreszenz). Im Falle von DNA-Präparationen mit ungenügender Reinheit wurde eine zusätzliche gelbasierte Reinigung nach MOREIRA (1998:3309) durchgeführt.

Die Quantifizierung der in der mikrobiellen DNA enthaltenen Kopien an 16S rDNA erfolgte mittels quantitativer PCR (Q-PCR) im 5'-Nuclease-Assay (TaqMan Assay) in einem ABI 7300 System. Es wurden spezifische Primer und TaqMan-Sonden für folgende Gruppen verwendet: Archaea gesamt: ARC, Bacteria gesamt: BAC, Methanomicrobiales: MMB, Methanobacteriales: MBT, Methanosarcinaceae: Msc, Methanosaetaceae: Mst (YU et al., 2006:424; YU et al., 2005:670). Die PCR-Bedingungen sowie die Anwendung von Standards und die Berechnung der Kopienzahlen erfolgte wie in NETTMANN et al. publiziert (2008:1835).

Die Erfassung der mikrobiellen Diversität erfolgte auf Basis der Klonierung und Sequenzierung der archaeellen 16S rDNA Sequenz. Zur Amplifikation der archaeellen 16S rDNA wurden die Primer Arch16S-Forw2 und Univ16S-Rev5 verwendet (KLOCKE et al., 2008:190). Eine detaillierte Darstellung der Protokolle erfolgte in NETTMANN et al. (2008:1835). Als taxonomische Einheit (*operational taxonomic unit*, OTU) wurden solche DNA-Sequenzen gewertet, welche ein identisches Fragmentmuster im enzymatischen Verdau mit *BsuRI*+*Hin6I* aufwiesen. Je OTU wurde ein zufällig ausgewählter Klon sequenziert. Alle DNA-Sequenzen wurden mittels Chimera Check (COLE et al., 2003:442) überprüft. Die Zuordnung zu Referenz-Sequenzen aus der NCBI GenBank erfolgte mittels phylogenetischer Analyse in Mega 4.0 (Tamura et al., 2007:1596) wie in NETTMANN et al. (2008:1835) beschrieben.

### *Vergleich der ermittelten Populationsstrukturen*

Der paarweise Vergleich der ermittelten Strukturen der Archaea-Lebensgemeinschaften erfolgte mittels *similarity index* nach Chao-Jaccard (CJ) (CHAO et al., 2005:148). Hierzu wurden die in der Analyse der 16S rDNA Sequenzen ermittelten OTUs in höheren taxonomischen Einheiten entsprechend der Q-PCR und FISH Analysen zusammengefasst. Die Berechnung der CJ Werte erfolgte mittels EstimateS v8.0.0 (COLWELL, <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>). Die Umrechnung der paarweisen Relationen zur grafischen Darstellung erfolgte mittels multidimensionaler Skalierung unter Verwendung von Permap (HEADY und LUCAS, <http://www.ucs.louisiana.edu/~rbh8900/>).

## **3 Ergebnisse und Diskussion**

Die Diversität innerhalb der methanogenen Archaea in den zehn beprobten Biogasreaktoren wurde mittels PCR-RFLP-Analyse untersucht. Die quantitative Erfassung verschiedener taxonomischer Gruppen erfolgte auf drei Wegen: (1) Auswertung der Anteile von 16S rDNA Gensequenzen in den Klonbibliotheken ermittelt durch die Häufigkeit der entsprechenden PCR-RFLP-Muster, (2) Q-PCR-Analysen auf Basis gruppenspezifischer 16S rDNA Primer sowie (3) mikroskopische Quantifizierung nach Hybridisierung mit fluoreszent markierten Oligonukleotidsonden (FISH).



Die drei unterschiedlichen Methoden zur Erfassung der methanogenen Lebensgemeinschaft zeigten annähernd übereinstimmende Resultate (Abb. 1). In neun der zehn untersuchten Biogasanlagen wurden hydrogenotrophe Methanomicrobiales als vorherrschende Methanbildner nachgewiesen. In den 16S rDNA Klonbibliotheken wurden Vertreter der Methanomicrobiales mit Anteilen zwischen 75 - 100% nachgewiesen. Ähnliche Verteilungen wurden mittels Q-PCR für die Kopienzahl der 16S rDNA in der isolierten mikrobiellen DNA ermittelt (61 - 99% aller Kopien des archaeellen 16S rDNA Gens). Eine zellbasierte Quantifizierung mittels FISH-Mikroskopie ergab zwar geringere Anteile von 58 - 67% der archaeellen Zellzahl, bestätigte aber dennoch die Dominanz dieser Organsimengruppe. Mittels Sequenzanalyse des 16S rDNA Gens wurde gezeigt, dass aus der Ordnung Methanomicrobiales Vertreter der Gattung *Methanoculleus* am häufigsten in den Biogasanlagen vertreten waren. Darüber hinaus wurden in geringer Anzahl die ebenfalls zur Ordnung Methanomicrobiales zählenden Gattungen *Methanospirillum*, *Methanogenium* und *Methanofollis* nachgewiesen.

Neben Methanomicrobiales wurden in sieben der zehn untersuchten Anlagen auch Anhörige der ebenfalls hydrogenotrophen Methanobacterales, vertreten durch die Gattungen *Methanobacterium* und *Methanobrevibacter*, detektiert (Abb. 1).

Vertreter der Acetat verwertenden Gattung *Methanosaeta* (Ordnung Methanosarcinales) wurden ebenfalls nur in sieben von zehn Anlagen nachgewiesen. Nur in einer Anlage (BA10) waren solche acetiklastischen Methanbildner dominierend (Abb. 1). In dem Probenmaterial aus dieser Biogasanlage konnten mittels FISH-Mikroskopie 64% der archaeellen Zellen als *Methanosaeta* sp. identifiziert werden, die Q-PCR basierte Bestimmung der Kopienzahl für das 16S rDNA Gen ergab für *Methanosaeta* sp. einen Anteil von 74% aller archaeellen 16S rDNA Kopien in dieser Probe.

Die Gattung *Methanosarcina* (Ordnung Methanosarcinales), welche ausnahmslos mixotrophe Archaea umfasst, wurde nur vereinzelt, und zwar in den Biogasanlagen BA1, BA8 (AF und FR) und BA9 nachgewiesen (Abb. 1).

In 90% der untersuchten Biogasanlagen stellten hydrogenotrophe Methanbildner die Mehrheit unter den methanogenen Archaea. Dieses legt die Vermutung nahe, dass somit auch die hydrogenotrophe Methanogenese der vorherrschende Stoffwechselweg zur Methansynthese ist. Die direkte Umwandlung von Acetat zu Methan scheint in den untersuchten Anlagen aufgrund der Abwesenheit acetiklastischer Methanbildner bzw. ihrer im Vergleich mit hydrogenotrophen Methanbildnern geringeren Zelldichte eine untergeordnete Rolle zu spielen. Damit stehen die ermittelten Resultate im Gegensatz zu der häufig in der Literatur zu findenden Ansicht, dass 70% des in Biogasanlagen gebildeten Methans aus der Umsetzung von Acetat hervorgehen und nur 30% hydrogenotrophen Ursprungs sind (AHRING, 2003:1; MACKIE und BRYANT, 1981:1363).

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Frage, welche Mikroorganismen das gebildete Acetat in diesen Biogasreaktoren abbauen. Eine mögliche Erklärung ist der Acetat-Abbau durch syntrophe, Acetat oxidierende Bacteria. Die Acetat-Oxidation ist jedoch eine endotherme Reaktion ( $\Delta G^0 = +104,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), also thermodynamisch extrem ungünstig. Dieser Prozess kann daher nur ablaufen, wenn der Wasserstoffpartialdruck durch Wasserstoff verbrauchende Partner-Organismen, zum Beispiel die hydrogenotrophen Archaea, ständig niedrig gehalten wird. Die Gesamtreaktion aus syntropher Acetat-Oxidation und hydrogenotropher Methanogenese wird somit exergon mit derselben Stöchiometrie und Energiebilanz ( $\Delta G^0 = -31,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) wie die acetiklastische Methanogenese.

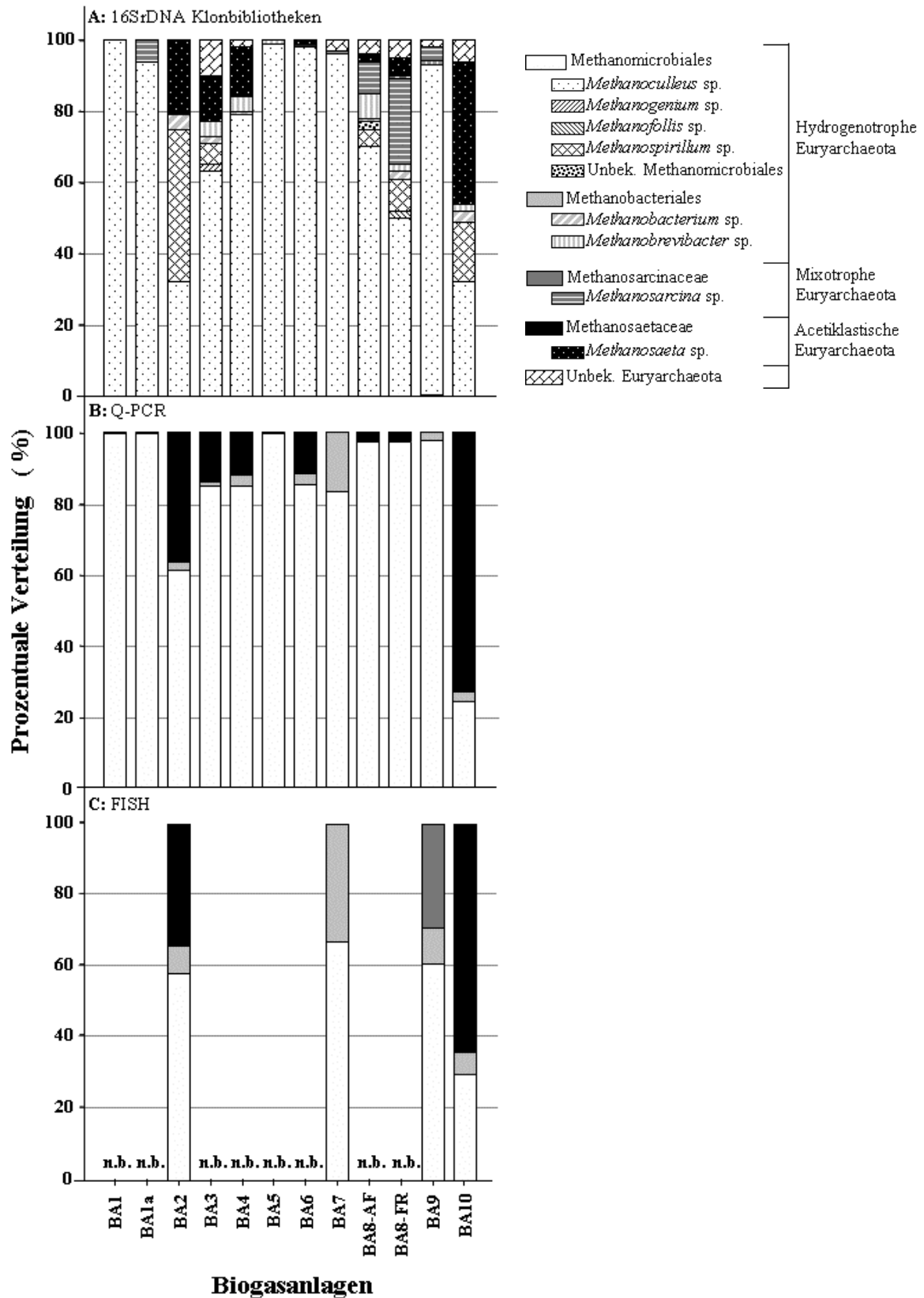


Abb. 1: Struktur der methanogenen Archaea-Gemeinschaft in zehn ausgewählten landwirtschaftlichen Biogasanlagen

(Fortsetzung Abb. 1)

- (A) Sequenzanalyse der 16S rDNA. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der detektierten taxonomischen Einheiten (OTUs) innerhalb der Klonbibliothek.
- (B) Nachweis verschiedener Gruppen methanogener Archaea mittels 16S rDNA basierter quantitativer PCR (Q-PCR). Dargestellt ist die relative Kopienzahl.
- (C) Nachweis verschiedener Gruppen methanogener Archaea mittels Markierung der Zellen mit fluoreszenten Oligonukleotidsonden und mikroskopischer Ermittlung der Zellzahl (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, FISH). Dargestellt sind die relativen Zelldichten.

Die Biogasanlage 1 wurde im Abstand von 12 Wochen wiederholt beprobt (BA1 und BA1a). Von der zweistufigen zweiphasigen Biogasanlage 8 wurde der Anaerobfilter (AF) und ein Feststoffreaktor (FR) beprobt. n.b. = nicht bestimmt.

In einer Studie konnte mittels Radioisotopen-Versuche gezeigt werden, dass bei Abwesenheit von acetiklastischen Methanogenen wie *Methanosaeta* spp. die nicht-methanogene Acetatoxidation anstieg (KARAKASHEV et al., 2006:5138). Laut SCHNÜRER et al. (1999:249) stellt die syntrophe Acetatoxidation den Hauptmechanismus für den Acetatabbau in Anwesenheit von Inhibitoren wie Ammonium bzw. Ammoniak und VFA dar.

In Biogasreaktoren, in denen eine syntrophe Acetat-Oxidation ermittelt wurde, konnte die hydrogenotrophe Gattung *Methanoculleus* als dominierende Archaea-Gruppe nachgewiesen werden (SCHNÜRER et al. 1999:249). Diese Gattung wurde bereits in verschiedenen Labor- und Praxis-Biogasanlagen als vorherrschende methanogene Gruppe detektiert (SOUIDI et al., 2007:197; KRAUSE et al., 2008:91). Interessanterweise war auch in dieser Studie *Methanoculleus* spp. die dominierende methanogene Gattung in acht von zehn Anlagen (Abb. 1).

Um Rückschlüsse auf etwaige Einflussgrößen, wie z.B. die verwendeten Substrate, auf die Zusammensetzung der methanogenen Biozönosen zu gewinnen, wurde die ermittelte Archaea-Diversität der zehn Biogasanlagen statistisch verglichen und in Bezug zu den jeweils eingesetzten Substraten gesetzt. Für diesen paarweisen Diversitätsvergleich wurde der Chao-Jaccard-Ähnlichkeitsindex (CJ-Index) berechnet. Die Ergebnisse der Chao-Jaccard-Kalkulation wurden mittels multidimensionaler Skalierung (MDS) visualisiert (Abb. 2). Die Kalkulation des CJ-Indexes wird allerdings stark durch den verwendeten Datensatz, in diesem Fall durch das Niveau der taxonomischen Hierarchie, beeinflusst. Der Chao-Jaccard-Index reagiert umso sensibler, desto mehr Taxa in die Berechnung eingehen. Daher zeigt der Diversitätsvergleich auf Grundlage der Häufigkeit der 16S rDNA OTUs (Gattungsniveau) höhere MDS Distanzen (Abb. 2A) als auf Grundlage der Häufigkeit der höheren taxonomischen Ordnungen bzw. Familien Methanomicrobiales, Methanobacteriales, Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae (Abb. 2B-D).

Aus dem Vergleich der CJ-Indices ergibt sich keine Abhängigkeit der Struktur der methanogenen Lebensgemeinschaft vom eingesetzten Substrat auf Gattungsniveau (Abb. 2A). Darüber hinaus scheinen unterschiedliche Verweilzeiten der Substrate (28 - 108 d) sowie die Raumbelastung der Reaktoren ( $2,1 - 5,8 \text{ Nm}_{\text{CH}_4}^3 \text{ m}_{\text{AV}}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) ebenfalls keinen Einfluss auf die Struktur der methanogenen Archaea-Biozönose zu haben (Tab. 2). So zeigten Biogasanlagen mit ähnlicher Substratkombination im paarweisen Vergleich auf Gattungsebene (Abb. 2A) zwar ähnliche Strukturen (BA2 und BA10), andere Anlagen dagegen aber Unterschiede in der methanogenen Biozönose (BA2 und BA4). Entsprechendes wurde auch für Anlagen mit unterschiedlicher Substratbeschickung gefunden. Der Vergleich auf einer höheren taxonomischen Ebene (Familien, Ordnungen) zeigte dagegen hohe Übereinstimmungen in der methanogenen Diversität zwischen den zehn Biogasanla-

gen (Abb. 2B-D). Hiermit wird bestätigt, dass bestimmte Gruppen von Archaea in allen Biogasanlagen vertreten sind (Abb. 1A-C), die konkrete Artenzusammensetzung jedoch variiert.

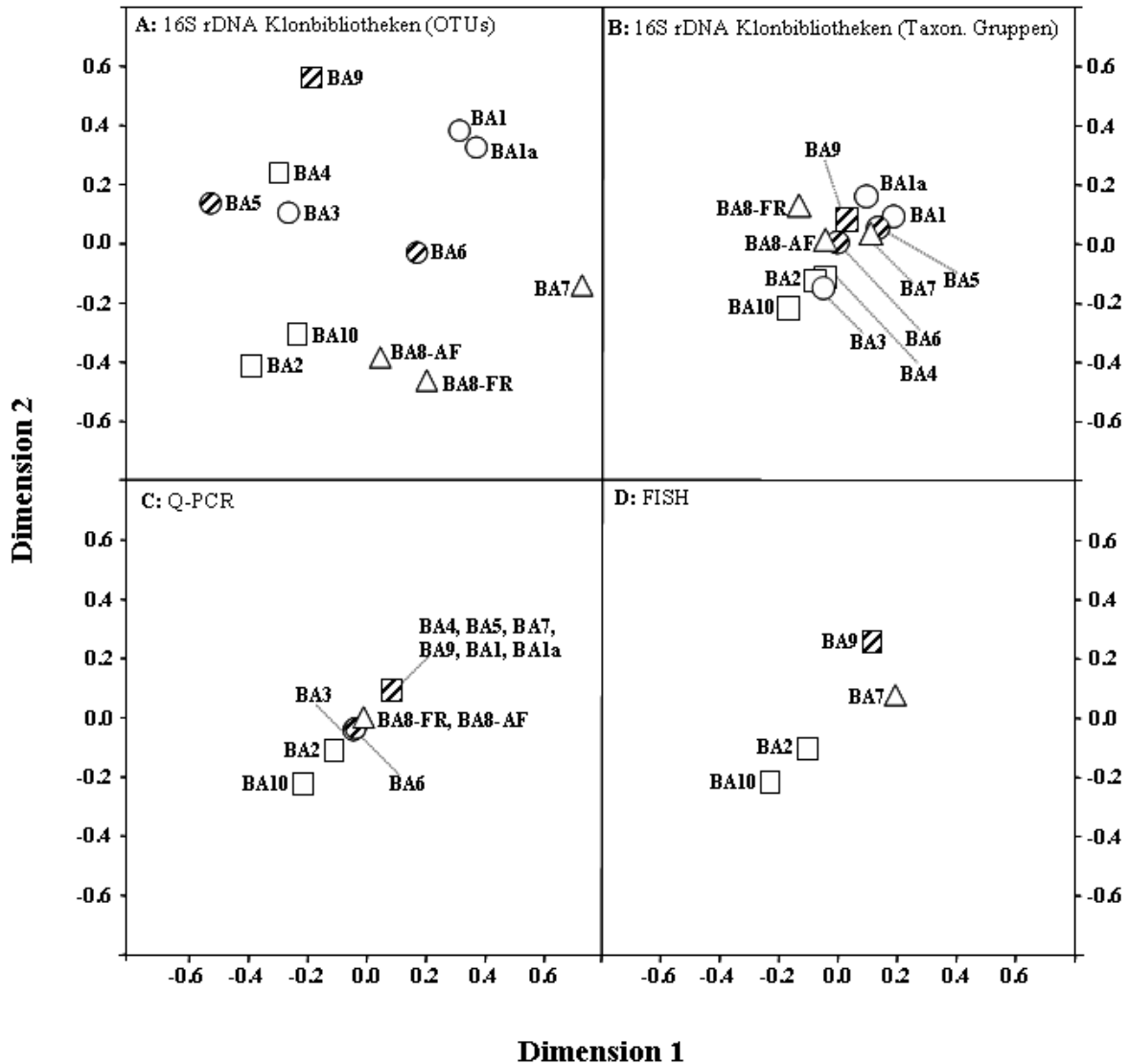


Abb. 2: Multidimensionale Skalierung der Chao-Jaccard-Indices für die paarweise Ähnlichkeit der archaeellen Biozönosen in den untersuchten zehn Biogasanlagen

Die Berechnung erfolgte auf Basis (A) der Anteile individueller OTUs in den 16S rDNA Klonbibliotheken, (B) die Häufigkeit des Nachweises der taxonomischen Übergruppen Methanomicrobiales, Methanobacteriales, Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae basierend auf dem Anteil entsprechender 16S rDNA Sequenzen in den Klonbibliotheken, (C) der durch Q-PCR ermittelten 16S rDNA Kopienzahl in der aus den Biogasanlagen isolierten mikrobiellen DNA für diese vier taxonomischen Gruppen und (D) der mittels FISH-Mikroskopie detektierten Zelldichten für diese vier taxonomischen Gruppen. Aus technischen Gründen konnten mittels FISH nur vier Biogasanlagen untersucht werden.

Die Hauptsubstrate der einzelnen Biogasanlagen werden durch folgende Symbole im Diagramm dargestellt: □ Rindergülle; ▨ Rindergülle, Schweinegülle und Geflügelkot; ○ Schweinegülle, ⊗ Schweinegülle und Geflügelkot; △ nur NawaRo. Eine hohe Übereinstimmung in den gefundenen Diversitäten ist als Funktion der Distanz zwischen zwei Biogasanlagen dargestellt, d.h. Biogasanlagen mit ähnlicher Zusammensetzung der methanogenen Lebensgemeinschaft liegen nahe beieinander.

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer Studie von KARAKASHEV et al. (2005:331), in welcher die methanogene Biozönose von verschiedenen Biogasanlagen (reine Gülle- oder Abwasserschlammreaktoren) mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung untersucht wurde. Hier konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Substratbeschickung, der Raumbelastung oder der Substratverweilzeit und der ermittelten methanogenen Lebensgemeinschaft nachgewiesen werden.

Einen größeren Einfluss auf die Zusammensetzung der methanogenen Biozönose haben vielmehr verschiedene abiotische Faktoren, wie z.B. Temperatur, pH-Wert, Gesamtkonzentration an Ammonium (als Summe von  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{NH}_3$  Konzentration), freier Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) und leichtflüchtige Fettsäuren (*volatile fatty acids* = VFA). Bei der Betrachtung des Gesamtprozesses der Biogasproduktion wird der Gesamt-Ammoniumgehalt als hauptsächlicher Inhibitor der Methanogenese angesehen (GAVALA et al., 2003:57).

Auch in den untersuchten Biogasanlagen scheint die Gesamt-Konzentration an Ammonium ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ) wesentlich für die Struktur der archaellen Gemeinschaft verantwortlich zu sein. Bei einer Konzentration oberhalb  $2,3 \text{ kg t}^{-1}$  konnten keine strikt acetiklastischen Methanogenen nachgewiesen werden (Abb. 3A). Dieser Wert entspricht in etwa bereits veröffentlichten Grenzwerten für das Wachstum von acetiklastischen Methanogenen von  $2,5 \text{ g kg}^{-1}$  (gemessen in einem Praxis-Biogasreaktor beschickt mit Hausmüll) bis ca.  $4,0 \text{ g kg}^{-1}$  (gemessen in einem Laborfermenter mit Rindergülle) (ANGELIDAKI und AHRING 1993:560; POGGI-VARALDO et al. 1997:284). In allen Anlagen, deren Ammoniumkonzentrationen unterhalb dieses Grenzwertes lagen, wurden Organismen der Familie Methanosetaceae nachgewiesen, mit Ausnahme von BA5. In BA10 waren sie zudem die dominierende methanogene Gruppe (Abb. 1).

- Hydrogenotrophe Methanogene herrschten in dem Biogasreaktor vor.
- Acetiklastische Methanogene waren vorherrschend.
- Sowohl hydrogenotrophe wie auch acetiklastische Methanogene wurden nachgewiesen.

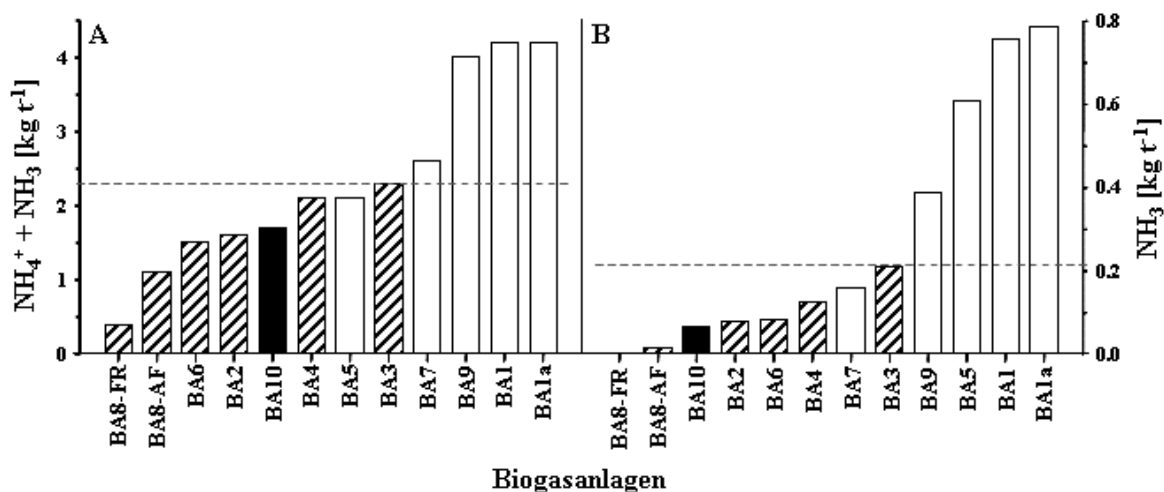


Abb. 3: Korrelation zwischen der Gesamt-Ammoniumkonzentration ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ ) (A) bzw. des berechneten freien Ammoniaks ( $\text{NH}_3$ ) (B) und der An- bzw. Abwesenheit von acetiklastischen Methanogenen in den zehn untersuchten Biogasanlagen

Tab. 2: Chemische und physikalische Kenngrößen der beprobten Biogasanlagen

Biogasanlagen	Reaktortemperatur (C°)	pH-Wert	Raumbelastung (kg <sub>oTS</sub> m <sup>-3</sup> AV d <sup>-1</sup> )	Verweilzeit (d)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N + NH <sub>3</sub> -N (kg t <sup>-1</sup> )	NH <sub>3</sub> -N (kg t <sup>-1</sup> )*	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (kg t <sup>-1</sup> )	VFA (kg <sub>ESSäq</sub> t <sup>-1</sup> )
BA 1	37,9	8,2	3,9	61	4,2	0,75	3,45	n.b.
BA1a	42,2	8,1	4,5	46	4,2	0,78	3,42	n.b.
BA 2	36,8	7,6	3,8	41	1,6	0,08	1,52	1,4
BA 3	40,0	7,8	5,8	28	2,3	0,21	2,09	0,8
BA 4	39,5	7,6	2,8	56	2,1	0,12	1,98	1,5
BA 5	44,0	8,3	5,4	35	2,1	0,10	1,49	7,6
BA 6	38,7	7,6	3,9	48	1,5	0,08	1,42	2,8
BA 7	44,7	7,5	3,4	108	2,5	0,60	2,34	2,1
BA 8 (AF)	38,5	6,8	2,1	n.b.	1,1	0,01	1,09	6,3
BA 8 (FR)	39,0	6,2	2,1	32	0,4	0,00	0,40	10,0
BA 9	41,0	7,8	4,0	34	4,0	0,38	3,62	2,4
BA10	39,3	7,4	3,8	26	1,7	0,06	1,64	1,5

oTS = organische Trockensubstanz, ESäq. = Essigsäureäquivalent, AF = Anaerobfilter, FR = Feststoffreaktor, n.b. = nicht bestimmt,  
 \* = berechnet nach GALLERT et al. (1997:405):  $\text{NH}_3\text{-N} = \text{NH}_4^+\text{-N} \times 10^{\text{pH}} / \text{kb} \cdot \text{kw} + 10^{\text{pH}}$  (kb/kw =  $e^{(63,44/273+T)}$ )

- Hydrogenotrophe Methanogene herrschten in dem Biogasreaktor vor.  
 ■ Acetiklastische Methanogene waren vorherrschend.  
 ▨ Sowohl hydrogenotrophe wie auch acetiklastische Methanogene wurden nachgewiesen.
- ESÄq. = Essigsäureäquivalent, n.b. = nicht bestimmt.

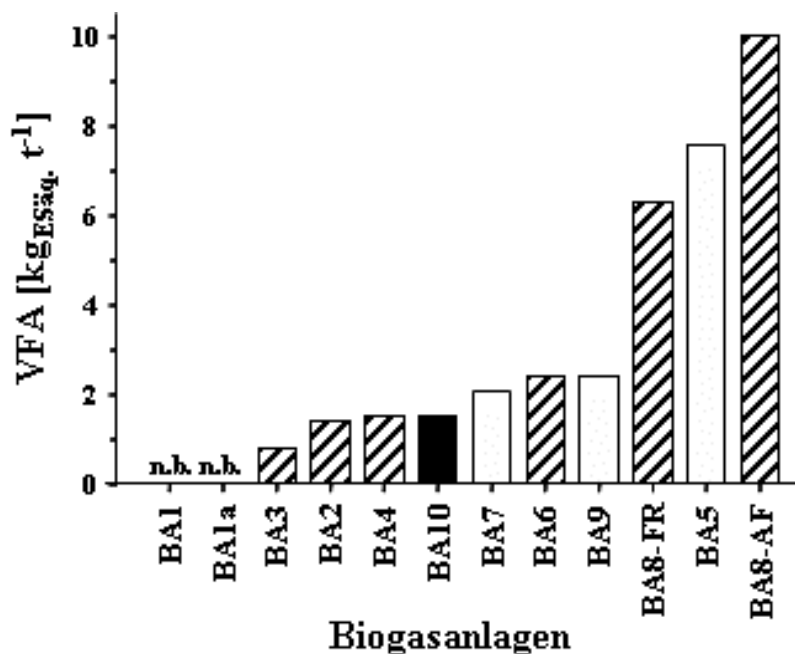


Abb. 4: Korrelation zwischen der Konzentration an leichtflüchtigen Fettsäuren (volatile fatty acids = VFA) und der An- bzw. Abwesenheit von acetiklastischen Methanogenen in den zehn untersuchten Biogasanlagen.

Neben dem Gesamtgehalt an Ammonium scheint insbesondere auch die Konzentration des Anteils an freiem Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) entscheidend für die Ansiedelung von *Methanosaeta* spp. zu sein. Dies wird am Beispiel der BA5 deutlich. In dieser Anlage wurden keine Methanosaetaceae nachgewiesen, obwohl die Gesamt-Ammoniumkonzentration in dieser Anlage unterhalb des in dieser Studie ermittelten Grenzwertes von  $2,3 \text{ kg t}^{-1}$  lag.

Jedoch wies BA5 im Vergleich zu den restlichen Anlagen einen hohen pH-Wert (8,3) und eine hohe Temperatur ( $44^\circ\text{C}$ ) auf, was sich auf das Dissoziationsgleichgewicht von Ammonium und Ammoniak auswirkt (SPROTT und PATEL, 1986:358). So wurde für BA5 die dritthöchste Konzentration an freiem Ammoniak für die zehn untersuchten Biogasanlagen ermittelt (Abb. 3b) (NETTMANN et al., unpubl.).

Die molekularen Grundlagen der inhibitorischen Wirkung von Ammonium bzw. Ammoniak sind bislang noch ungeklärt. In der Literatur werden verschiedene Toxizitätsmechanismen, aber auch die Möglichkeit zur Adaption der Mikroorganismen an hohe Gesamt-Ammoniumkonzentrationen diskutiert (ANGELIDAKI und AHRING, 1993:560; GALLERT und WINTER, 1997:405; KADAM und BOONE, 1996:4486; KOSTER, 1986:445). Ebenfalls unklar ist, warum acetiklastische Methanogene wesentlich sensitiver auf hohe Gesamt-Ammoniumkonzentrationen reagieren als hydrogenotrophe. Die Beantwortung dieser Fragen kann nur im Rahmen weiterer Arbeiten erfolgen.

Auch leichtflüchtige Fettsäuren (volatile fatty acids = VFA) können einen starken Einfluss auf die methanogene Biozönose in Biogasanlagen ausüben (KARAKASHEV et al. 2005:331). In den in dieser Studie untersuchten Biogasanlagen konnte jedoch kein eindeu-

tiger Effekt der VFA-Konzentration auf die Methanogenen, insbesondere auf die aktiklastischen Methanbildner, beobachtet werden (Abb. 4). Acetat verwertende Methanbildner wurden sowohl in Anlagen mit niedrigem VFA-Gehalt (BA3) aber auch in Anlagen mit hohem VFA-Gehalt (BA8) nachgewiesen. Jedoch wurden im letzteren Beispiel nur geringe Mengen an *Methanosaeta* spp. detektiert, was auf ungünstige Umweltbedingungen für diese Methanogenen hindeutet.

Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass in neun von zehn untersuchten landwirtschaftlichen Biogasanlagen, welche mit nachwachsenden Rohstoffen betrieben werden, hydrogenotrophe Methanbildner insbesondere aus der Ordnung Methanomicrobiales vorherrschend sind. Acetat verwertende Methanbildner wurden nur vereinzelt mit größeren Zelldichten nachgewiesen. Somit scheint die Methanogenese auf Basis der direkten Verwertung von Acetat in diesen Anlagen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dahingegen können Wasserstoff und CO<sub>2</sub> verwertende Methanbildner durch ihre enge Verbindung zu syntrophen Bacteria letztendlich eine höhere Relevanz im anaeroben Abbau von nachwachsenden Rohstoffen haben als bislang angenommen. Eine Verifizierung dieser Hypothese kann jedoch nur im Rahmen weiterer Arbeiten zur Aufklärung der Stoffflüsse in Biogasreaktoren erfolgen.

## Literatur

- AHRING, B.K. (2003): Perspectives for anaerobic digestion. In: Ahring, B.K. (Ed.): Biomechanation I. Springer, New York, 1-30
- ANGELIDAKI, I. and B.K. AHRING (1993): Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 560-564
- AMANN, R.I., B.J. BINDER, R.J. OLSON, S.W. CHRISHOLM, R. DEVEREUX and D.A. STAHL (1990): Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919-1925
- BÖCKELMANN, U., U. SZEWZYK and E. GROHMANN (2003): A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 55, 201-211
- CHAN, O.C., P. CLAUS, P. CASPER, A. ULRICH, T. LUEDERS and R. CONRAD (2005): Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ. Microbiol.* 7, 1139-1149
- CHAO, A., R.L. CHAZDON, R.K. COLWELL and T. SHEN (2005): A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecol. Lett.* 8, 148-159
- COLE, J.R., B. CHAI, T. L. MARSH, R. J. FARRIS, Q. WANG, S. A. KULAM, S. CHANDRA, D. M. MCGARRELL, T. M. SCHMIDT, G. M. GARRITY and J. M. TIEDJE (2003): The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucl. Acids Res.* 31, 442-443
- COLWELL, R.K. (2006): EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples, v. 8.0.0. In: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>.
- DAIMS, H., K. STOECKER and M. WAGNER (2005): Fluorescence *in situ* hybridisation for the detection of prokaryotes. In: Osborn, A.M. and C.J. Smith (Eds.): *Advanced Methods in Molecular Microbial Ecology*. BIOS Scientific Publishers, Abingdon, 213-239.



- GALLERT, C. and J. WINTER (1997): Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 405-410
- GARRITY, G.M. and J.G. HOLT (2001): Phylum AII. Euryarchaeota. In: Boone, D.R., R.W. Castenholz and G.M. Garrity (Eds.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Springer, New York, 211-345.
- GAVALA, H.N., I. ANGELIDAKI and B.K. AHRING (2003): Kinetics and modeling of anaerobic digestion process. In: Ahring, B.K. (Ed.): *Biomethanation I*, Springer, Berlin, 57-93.
- HEADY, R.B. and J.L. LUCAS (2007): PERMAP (Perceptual Mapping Software), v. 11.6. In: <http://www.ucs.louisiana.edu/~rbh8900/>.
- KADAM, P.C. and D.R. BOONE (1996): Influence of pH on ammonia accumulation and toxicity in halophilic, methylotrophic methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4486-4492
- KARAKASHEV, D., D.J. BATSTONE and I. ANGELIDAKI (2005): Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 331-338
- KARAKASHEV, D., D.J. BATSTONE, E. TRABLY and I. ANGELIDAKI (2006): Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosetaeaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5138-5141
- KLOCKE, M., E. NETTMANN, I. BERGMANN, K. MANDT, K. SOUIDI, J. MUMME and B. LINKE (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 190-205
- KOSTER, I.W. (1986): Characteristics of the pH-influenced adaptation of methanogenic sludge to ammonium toxicity. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 36, 445-455
- KRAUSE, L., N. N. DIAZ, R. A. EDWARDS, K.-H. GARTEMANN, H. KRÖMEKE, H. NEUWEGER, A. PÜHLER, K.J. RUNTE, A. SCHLÜTER, J. STOYE, R. SZCZEPANOWSKI, A. TAUCH and A. GOESMANN (2008): Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J. Biotechnol.* 136, 91-101
- LECLERC, M., J.-P. DELGENES and J.-J. GODON (2004): Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environ. Microbiol.* 6, 809-819
- LOVLEY, D.R. and M.J. KLUG (1983): Methanogenesis from methanol and methylamines and acetogenesis from hydrogen and carbon dioxide in the sediments of a eutrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1310-1315
- MACKIE, R.I. and M.P. BRYANT (1981): Metabolic activity of fatty acid-oxidizing Bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate, and CO<sub>2</sub> to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1363-1373
- MCHUGH, S., M. CARTON, T. MAHONY and V. O'FLAHERTY (2003): Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 297-304
- MOREIRA, D. (1998): Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res.* 26, 3309-3310

- NETTMANN, E., I. BERGMANN, K. MANDT, B. LINKE and M. KLOCKE (2008): Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1835-1850
- NETTMANN, E., I. BERGMANN, S. PRAMSCHÜFER, V. PLOGSTIES, C. HERRMANN, K. MANDT and M. KLOCKE (unpubl.): Polyphasic analyses of methanogenic population in agricultural biogas plants. Eingereicht zum Review.
- POGGI-VARALDO, H.M., R. RODRIGUEZ-VÁZQUEZ, G. FERNÁNDEZ-VILLAGÓMEZ and F. ESPARZA-GRACIA (1997): Inhibition of mesophilic solid-substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 284-291
- RASKIN, L., J.M. STROMLEY, B.E. RITTMANN and D. STAHL (1994): Group-specific 16S ribosomal-RNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1232-1240
- SCHNÜRER, A., G. ZELLNER and B.H. SVENSSON (1999): Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 249-261
- SOUIDI, K., J. MUMME, K. MANDT, E. NETTMANN, I. BERGMANN, B. LINKE and M. KLOCKE (2007): Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure. *Agrartechn. Forsch.* 13, 197-205
- SPROTT, G.D. and G.B. PATEL (1986): Ammonia toxicity in pure cultures of methanogenic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 7, 358-363
- STAHL, D.A. and R. AMANN (1991): Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt, E. and M. Goodfellow (Eds.): *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley, Chichester, 205-248.
- TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI and S. KUMAR (2007): MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (Mega) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599
- YU, Y., C. LEE, J. KIM and S. HWANG (2005): Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 670-679
- YU., Y., J. KIM and S. HWANG (2006): Use of real-time PCR for group-specific quantification of aceticlastic methanogens in anaerobic processes: population dynamics and community structures. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 424-433

## Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage – a causal analysis

M. Lebuhn, C. Bauer, B. Munk and A. Gronauer

Bavarian State Research Center of Agriculture, Institute for Agricultural Engineering and Animal Husbandary, Vöttinger Straße 36, 85354 Freising, Germany

### Zusammenfassung

Die Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) hat jüngst stark zugenommen und soll künftig einen deutlich höheren Beitrag zur Vermeidung klimarelevanter Emissionen leisten. Methanogene Archaeen spielen in der Biogasproduktion eine entscheidende Rolle, da nur sie Methan produzieren können.

Besonders wenn keine Gülle zugesetzt wird können sich bei der Biogasproduktion aus NawaRo in Durchflusssystemen Limitationen bei der Versorgung der methanogenen Archaeen mit essentiellen Spurenelementen (SpE) ergeben. Solche Mangelsituationen haben eine Prozessversäuerung zur Folge, da die gebildete Essigsäure bzw.  $H_2/CO_2$  nicht mehr als Biogas „entsorgt“ werden kann. Durch Endproduktthemmung ergibt sich ein Säure-Rückstau entgegen der Abbaurichtung. Bei der mesophilen mono-Vergärung von Mais-silage scheinen, wenn kein entsprechender Zusatz erfolgt, insbesondere Kobalt und Natrium mit Schwellenwerten von ca. 0,03 bzw. ca.  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  limitierend zu werden. Für das Symptom Versäuerung scheinen neben Co- und  $Na^+$ -Mangel auch Faktoren wie ein zu hoher Trockensubstanzgehalt verantwortlich sein zu können. Werden die Mängel spezifisch ausgeglichen, verläuft der Prozess mit einem Umsatz des Kohlenstoffs aus der organischen in die Gasphase von annähernd 80 % höchst effizient und lässt eine hohe organische Raumbelastung zu, wenn nicht andere Faktoren wie z.B.  $NH_3$  und  $H_2S$  den Abbau limitieren.

Mit molekularbiologischen Methoden (PCR-SSCP, qPCR) wurden mikrobielle Populationsveränderungen während der Versäuerung der mono-Vergärung von Maissilage qualitativ und quantitativ erfasst. Dabei wurde das Gen des Schlüsselenzyms der Methanogenese (*mcrA/mrtA*) untersucht. *Methanopyri*, *Methanococci* und anaerobe Methanoxidierer wurden in keiner Probe gefunden, jedoch konnten Vertreter von 2 bisher noch nicht beschriebenen Klassen methanogener *Archaea* nachgewiesen werden. Vertreter der obligat acetoklastischen *Methanosaetaceae* traten nur bei sehr geringen Acetat-Konzentrationen auf. Bei höherer Raumbelastung der mono-Mais Vergärung ohne Prozessinhibierung dominierten Vertreter der obligat hydrogenotrophen (oh) *Methanobacteriales* und versatilen *Methanosarcinaceae*. Dabei wurden etwa  $5 \cdot 10^8$  Methanogene pro mL Fermenterinhalt gemessen. Im versäuerten Prozess wurden dagegen ca. 3 log-Stufen weniger Methanogene festgestellt, hier überwogen *Methanomicrobiales* (oh), genauer *Methanospirillum hungatei* und eine *Methanoculleus*-Art. Die Diversität der Methanogenen war bei Prozessversäuerung und bei hoher Raumbelastung am kleinsten.

Unseren Ergebnissen zufolge sind in der Vergärung von Silagen entgegen der Lehrbuchmeinung nicht hydrolysierende Bakterien das primär limitierende Glied der Abbaukette sondern methanogene Archaeen. Hier überwiegen nicht Essigsäure-spaltende sondern  $H_2/CO_2$  verwertende Methanogene; die Essigsäure wird offenbar vorwiegend über die

syntrophe Acetat-Oxidation von den hydrogenotrophen Methanogenen verwertet. Bei dieser Art der Biogasentstehung ist ein ständig sehr geringer Abstand zwischen den syntrophen Bakterien und den methanogenen Archaeen sehr wichtig, um die syntrophe Elektronenübergabe effizient zu gestalten. Für die Praxis bedeutet das, dass Rührwerke möglichst konstant viele neue Oberflächen schaffen und den Fermenterinhalt langsam, gleichmäßig und vollständig durchmischen müssen.

## Summary

Biogas production from renewable resources (RR) has enormously increased recently and will contribute to mitigation of greenhouse gas emissions from fossil fuel to a much higher degree worldwide. Methanogenic archaea play a key role in the biogas process because exclusively these organisms are able to produce methane.

Particularly when no manure is added, limitations in the supply of essential trace elements (TE) for methanogenic archaea can arise in RR methanation in flow-through systems. TE deficiencies can cause process acidification because the produced acetic and/or H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> cannot be disposed of as biogas anymore, and by feedback inhibition an 'acid jam' against the degradation pathway can be formed. Data suggested that without compensating supplementation, particularly cobalt and sodium can become limiting in flow-through mono digestion of maize silage at threshold values of ca. 0.03 and 10 mg \* L<sup>-1</sup>, respectively, and these deficiencies probably triggered the observed process acidification. For the symptom acidification other factors such as a too high dry matter content can apparently be responsible, too. If deficiencies are eliminated, the process can run very efficiently with a carbon turnover rate from the liquid to the gas phase of ca. 80 %, and allows for a high organic loading rate (OLR).

Using molecular biological methods (PCR-SSCP, qPCR), microbial population dynamics were monitored qualitatively and quantitatively at distinct stages during the experiments, investigating *mcrA/mrtA*, the gene of the key enzyme of methanogenesis. *Methanopyri*, *Methanococci* and anaerobic methane oxidizers were found in none of the samples, but we recovered sequences affiliating with 2 hitherto undescribed classes of methanogenic *Archaea*. Members of obligately acetoclastic *Methanosaetaceae* were found only at low acetate concentrations. At higher OLR without acidification symptoms, obligately hydrogenotrophic (oh) *Methanobacteriales* and versatile *Methanosarcinaceae* were dominating, and an abundance of ca. 5 \* 10<sup>8</sup> methanogens per mL fermenter content was determined. In the acidified process, however, ca. 3 orders of magnitude less methanogens were detected, and *Methanomicrobiales* (oh), more specifically *Methanospirillum hungatei* or a *Methanoculleus* species were dominating. Species diversity, was lowest at the DNA level during acidification and at high OLR.

According to our results and against established doctrines, bacterial hydrolyzers are not the primary limiting link in the RR degradation chain, methanogenic archaea are weakest. Moreover, hydrogenotrophic but not acetoclastic methanogens are dominating in RR digestion; acetic acid is obviously converted via syntrophic acetate oxidation to H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> serving hydrogenotrophic methanogens as substrate. In this pathway of biogas generation, a very small distance between syntrophic bacteria and methanogenic archaea must be maintained to render efficiently the syntrophic electron transfer. This means for the practice that stirrers must generate many new surfaces constantly and mix the fermenter content slowly, completely and evenly over the whole digester volume.

## 1 Introduction

Biogas production is one of the most promising technologies to produce sustainable energy from organic material and mitigate greenhouse gas emissions from combustion of fossil energy carriers. The number of and research on biogas plants has enormously increased in the last years, in particular on the agricultural sector. The majority of the currently ca. 4,000 biogas plants in Germany is operated with renewable resources (RR) because of the higher energy yield. Some of them are run without animal manure. However, several recent cases of process failure and even havary underline that microbiology of biogas production from RR, particularly in mono-digestion, is not sufficiently understood.

One of the reasons is that the concept of the anaerobic digestion (AD) with the quantitative contribution of distinct reaction pathways has mainly been adopted from the areas of waste and wastewater treatment without further proof. It has recently been shown (LEBUHN et al., 2008) that acidification and process breakdown in fermenters mono-digesting maize silage could only be overridden by the supply of a specifically composed trace element (TE) mixture. It was added because the symptoms suggested that the activity of methanogenic archaea was affected. Since lack of heavy metal trace elements typically is no issue in anaerobic digestion of waste and wastewater treatment, the importance of trace elements for distinct sub-processes in biogas production from RR has previously been disregarded.

Methanogenesis is a unique trait of certain lineages of *Euryarchaeota* and not found in the domains *Bacteria* or *Eukaryota*. Due to their difficult cultivation, methanogens are best studied and determined using molecular biology tools. Methyl coenzyme-M reductase (Mcr, isoenzyme Mrt), the key enzyme of methanogenesis, catalyses the reduction of a methyl group bound to coenzyme-M and the release of methane, is only present in methanogenic *Archaea* (THAUER, 1998). The gene coding for subunit A (*mcrA/mrtA*, E.C. 2.8.4.1) can be used for phylogenetic analyses because topologies in *rrs* and *mcrA/mrtA* trees are identical and resolution of species very similar (e.g. LUTON et al., 2002). It is therefore highly suitable for the specific detection and identification of methanogenic *Archaea* and central to our PCR (polymerase chain reaction) based studies on population dynamics of methanogens.

The extraction of high quality PCR amplifiable nucleic acids is a crucial step for reliable results. Co-extracted humic acids present in environmental samples such as fermenter content can inhibit PCR analysis (TEBBE, 1994; LEBUHN et al., 2004). Therefore we employ recently developed DNA and RNA extraction protocols optimized to obtain PCR amplifiable extracts with a DNA recovery rate of > 90 % for reliable qualitative and quantitative molecular biological analyses (LEBUHN et al., 2003; GARCES et al., 2005, 2009).

Recently we reported on the development of a PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) method and of specific *mcrA/mrtA* primers targeting all methanogens to reveal population shifts of methanogens e.g. in biogas fermenters (BAUER et al., 2008). This method was further refined and employed in the current study to investigate the presence and dynamics of distinct sub-populations of methanogens during biogas process acidification. Beside PCR-SSCP analysis, we developed a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) technique (LEBUHN et al., 2003; WILHELM and PINGOUD, 2003) using the same *mcrA/mrtA* primers for the quantification of methanogenic *Archaea* in the samples.

The aim of this study was to analyse the mechanisms of process acidification when maize silage is digested as the sole substrate to biogas, with hints as background that primarily methanogens may be affected. Along with the chemical process status data, results of the molecular biological analyses in time series should inform (i) on the composition of the methanogenic biocenosis, concomitantly enlarging respective basic knowledge, (ii) on the dominant pathways of methane formation (acetoclastic versus hydrogenotrophic) at characteristic process stages, and (iii) on their dynamics during process changes.

We saw that hydrogenotrophic, not acetoclastic methanogens were dominating, suggesting that acetic acid is converted via syntrophic acetate oxidation in high performance RR methanation. This result challenges the current concept of pathways in anaerobic production from RR. Several reasons, among these lack of cobalt and sodium, seem to trigger acidification by inhibiting the activity of methanogens. For the practice, respective TE deficiencies must be compensated, and stirring must not disturb the particular association of syntrophic bacteria (SCHINK, 1997) with methanogens. Indicator organisms were identified, allowing to monitor and evaluate the microbiological fermenter status by rapid qPCR analysis.

## 2 Material and methods

### 2.1 Fermenters and fermenter management

Six mesophilic (38°C) semi-continuously stirred and daily fed biogas reactors (28 L working volume, reactors B1–B3, C1–C3) mono-digesting maize silage were started up in July 2006. Gas production and composition were measured continuously. Samples for chemical (standard procedures) and molecular biological analyses were taken irregularly at significant process stages. Between February and April 2007, the reactors acidified at a relatively low organic loading rate (OLR) of 2.0–2.5 g VS \* L<sup>-1</sup> \* d<sup>-1</sup>. After feeding stop, degradation of accumulated fatty acids and addition of trace elements (TE), reactor feeding with maize silage was re-started in July/August 2007 (*Figures 1, 2*). Reactors B2 and B3 initially served as controls and received no additional TE supply until 2008. Reactors B1 and C1 were supplied with 1 x concentrated TE cocktail, and C2 (*Figures 1, 2*) and C3 (*Figure 3*) with 10 x TE cocktail. More details on reactor management and performance and chemical/physical analyses can be found in LEBUHN et al. (2008). In addition to trace element analyses from aqua regia extracts by ICP-OES, ICP-MS analyses from high-pressure HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracts were performed.

### 2.2 DNA extraction

DNA was extracted from fermenter samples essentially as described previously (LEBUHN et al., 2003; GARCÉS et al., 2005). In brief, 100 mL fermenter sample was homogenized for 1 min using a sterilized Ultraturrax. In order to remove dissolved humic compounds and released nucleic acids, 40 µL homogenate (not more) was washed twice with 1 mL PBS and once with 1 mL 0.85% KCl. The sediment was filled up with KCl to approximately 40 µL. DNA was isolated with the Fast-DNA<sup>®</sup> Spin Kit for soil (Bio 101) following the manufacturers protocol with a FastPrep-24<sup>®</sup> system (Bio101, 30 s bead beating, BB, at speed 5.5), except for adding a second washing step of the binding matrix with SEWS-M buffer and for elution with 100 µL DES-water. This DNA extraction method was found optimally suited for fermenter samples containing humic compounds and provided over 90% DNA recovery even from recalcitrant cells with specifically adjusted bead beating (GARCÉS et al., 2005).

Concentration and purity of extracted DNA were assessed with an IMPLLEN NanoPhotometer™. For the determination of purity, absorbance ratios A260/280 (for contamination with proteins) and A260/230 (for contamination with phenolic compounds), and A320 (for contamination with humic acids) were measured.

### 2.3 PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)

For profiling methanogenic archaeal communities in different biogas reactor samples by PCR single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), a touchdown PCR protocol was applied. PCR was performed in an Primus 25 Advanced thermocycler (Peqlab) in a total volume of 50 µL with 1.5 U Platinum®-Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 6.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.08 µM primers (MeA 1046f: 5'-TAYATGWSNGGHGGNGTNGGNTTYAC-3', MeA 1435r: 5'-P-TGRTCYTGNARRTCRWANCCRWAGAANCC-3') and 1 µL DNA extract. For design of the primers that were specific for methanogens (BAUER et al. 2008), GenBank entries for *mcrA* and *mrtA* genes (currently ca. 4,000) were initially aligned using MEGA4.0 (TAMURA et al., 2007) and cured for obvious sequencing or editing errors. Highly conserved regions were chosen as 3' primer target regions by programmed searching for maximum locally weighted free hybridization energy with all alignment entries.

The temperature profile consisted of an initial 3 min 95°C activation step and the following thermal cycles: 12 x (95°C 20 s; 60.5°C 45 s; 72°C 40 s), 5 x (95°C 20 s; 60°C 45 s; 72°C 40 s), 5 x (95°C 20 s; 59.5°C 45 s; 72°C 40 s), 13 x (95°C 20 s; 59°C 45 s; 72°C 40 s), 15 min 72°C, and 4°C forever. Amplicons of correct length (evaluation of aliquots on agarose gel) were purified with a MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) and eluted with 10 µL DES-water. Double-stranded PCR products were digested with 5 U lambda exonuclease (Fermentas) for 30 min at 37°C. Digestion was stopped by heating the reaction mix (80°C for 15 min). 5 µL SSCP loading buffer was added to 10 µL digested DNA, denatured for 3 min at 95°C and immediately cooled on ice. 15 µL ss-DNA was loaded on a native, vertical polyacrylamide gel for SSCP electrophoresis (0.7 x MDE, Lonza) in an INGENY phorU-system with 1 mm spacers and combs, and run with 0.6 x TBE buffer for 19.5 h at 400 V. Gels were casted silver stained according to BASSAM et al. (1991), except for a higher concentration of formaldehyde (0.15%) in staining and developer solutions and for a lower sodium thiosulfate concentration (1 mg \* L<sup>-1</sup>) in the staining solution, and dried at room temperature. After gel documentation in a biostep Dark Hood DH-40/50 with software Argus X1, intensity of bands and band pattern diversity of the were analysed using GelCompar II 5.0.

Interesting bands or all bands from whole band profiles were excised, and DNA was eluted in 100 µL Tris-EDTA buffer for 3 h at 37°C. DNA of 80 µL supernatant was precipitated with 160 µL ethanol and 80 ng glycogen, and the washed precipitate dissolved in 10 µL MilliQ water. 2 µL purified DNA was amplified using primers MeA-i 1046f and MeA-i 1435r (see 2.4).

### 2.4 Direct PCR and SSCP band cloning, sequencing of clones

In parallel, extracted DNA from the mesophilic fermenters and DNA from SSCP bands was amplified using 0.4 mM inosynylated primers MeA-i 1046f (5'-TAYATGWSIGGGHGGIGTIGGITYAC-3') and MeA-i 1435r (5'-TGRTCYTGIARRTCRWAICCRWAGAAICC-3'), 0.75 U Platinum® Taq polymerase (Invitrogen), 200 µM dNTPs and 6 mM MgCl<sub>2</sub> with the thermal profile used for PCR-SSCP-analysis (see 2.3). For ligation and cloning of the amplicons, the TOPO-TA® clon-

ing kit (Invitrogen) with the pCR<sup>®</sup>2.1 vector and OneShot<sup>®</sup> TOP10 chemically competent cells was used. Positive clones were selected on Luria-Bertani agar containing 50 mg \* L<sup>-1</sup> Ampicillin at 37°C for 20 h. Aliquots of randomly selected colonies were transferred to 25 µL PCR mastermix containing 140 nM M13 primers, 0.75 U Platinum<sup>®</sup> Taq Polymerase (Invitrogen), 200 µM dNTPs and 3 mM MgCl<sub>2</sub>, and PCR-amplified (10 min 95°C, 32 x (95°C 20 s; 52.5°C 45 s; 72°C 60 s), 72°C 10 min, 4°C forever). Amplicons were checked on agarose gels, and clones with correct inserts were incubated in LB medium containing 50 mg \* L<sup>-1</sup> Ampicillin at 37°C for 16 h. Plasmids were purified (Qiagen QIAprep Spin Kit) and sequenced (AGOWA, Germany) using primer M13-R.

Sequences obtained from direct PCR and PCR-SSCP band cloning were added to the alignment (see 2.3) including neighbours identified in BLAST searches. Neighbour joining and minimum evolution trees were constructed, and the phylogenetic position of the new sequences was determined. Relative abundances of obtained sequences were calculated. Operational “phylogenetic species” were defined if consistent clades were formed and the speciation level amounted to ca. 2.5% sequence dissimilarity.

## 2.5 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

DNA extracts were diluted with MilliQ water in the range of 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-6</sup>. The dilution series were used to create a standard curve for DNA extracts from reactor B2 and C3. With 1 µL of each dilution, qPCR was carried out in triplicates in a 25 µL reaction volume with 0.6 µM inosylated Primers MeA-i 1046f and MeA-i 1435r, 0.75 U Platinum<sup>®</sup> Taq polymerase (Invitrogen), 200 µM dNTPs, 6 mM MgCl<sub>2</sub> and 2 x concentrated EvaGreen fluorescence DNA stain (Jena Bioscience). The temperature profile was 3 min 95°C, 45 x (95°C 15 s, 60°C 60 s, 81°C 10 s, fluorescence measurement) followed by a dissociation curve program (ramp from 55°C to 95°C in 0.01°C \* s<sup>-1</sup> steps). The denaturation step before fluorescence measurement was necessary to exclude signals of primer multimers (formed obviously due to high primer degeneration) in the amplification plot. At a temperature of 81°C, unspecific products were dissociated, and at 84-92°C, only specific products were detected. All qPCR experiments were run with a Stratagene MX3005P system and analysed with software MXPro 4.1. The cycle range was set individually before the quantification cycle (C<sub>q</sub>) of the no template control in order to exclude unspecific signals and to obtain reliable standard curves. The slope of the curves ranged between -3.8 and -3.0 (PCR-efficiency of 85-115%). Signals were scored positive when they matched the given criteria. Amplification plots, dissociation and standard dilution curves were used to calculate copy numbers of the target gene per mL fermenter content.

In a first approach, most probable numbers (MPN) of the initial target gene copy number were calculated for 1 mL fermenter content in order to avoid any bias eventually introduced by comparison with curves generated for dissimilarly composed standard extracts (LEBUHN et al., 2004).

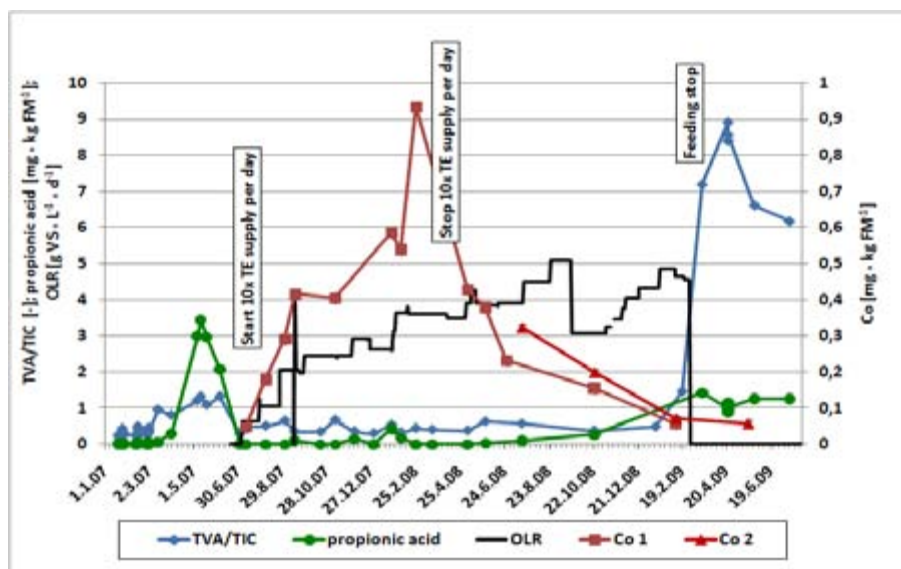
## 3 Results

### 3.1 Trace elements

Trace element (TE) concentrations were analysed to evaluate their importance for fermenter stability. Fermenters mono-digesting maize silage without addition of TE supply acidified first in May 2007. Variants B1, C1-C3 (with trace element supplement) recovered and showed stable performance (e.g. C2, *Figure 1*), whereas control fermenters B2 and B3

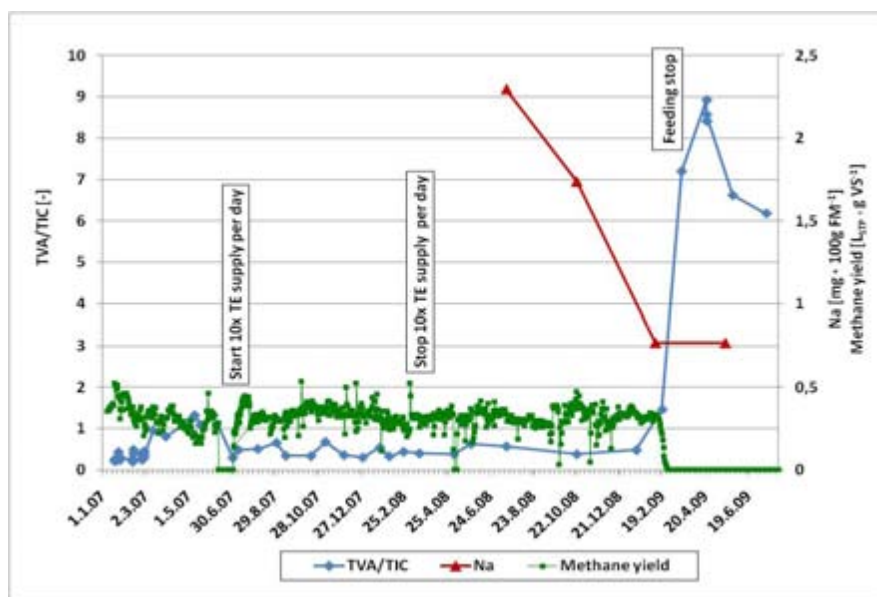


(LEBUHN et al., 2008) soon re-acidified. When TE addition was stopped, particularly Cobalt (Co) and sodium (Na) concentrations decreased (*Figures 1, 2*). At a Co concentration of ca. 0.03 mg \* kg<sup>-1</sup> fresh matter (FM), the TVA/TIC (total volatile acids / total inorganic or alkaline carbonate) value, a measure of process stability (LEBUHN et al., 2008), and propionic acid (PA) concentrations strongly increased (*Fig. 1*). Similarly, acidification was observed in fermenter C2 when Na concentrations fell below ca. 10 mg \* kg<sup>-1</sup> FM (*Fig. 1*: Cobalt (Co) concentration and conditions in fermenter C2) as well as in fermenter B1 (not shown). There was no indication that elements other than Co or Na may have become limiting.



Co 1: ICP-OES determination of Co from aqua regia extracts; Co 2: ICP-MS determination of Co from HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> high pressure extracts. Error bars: Mean absolute deviation (MAD)

*Fig. 1: Cobalt (Co) concentration and conditions in fermenter C2*



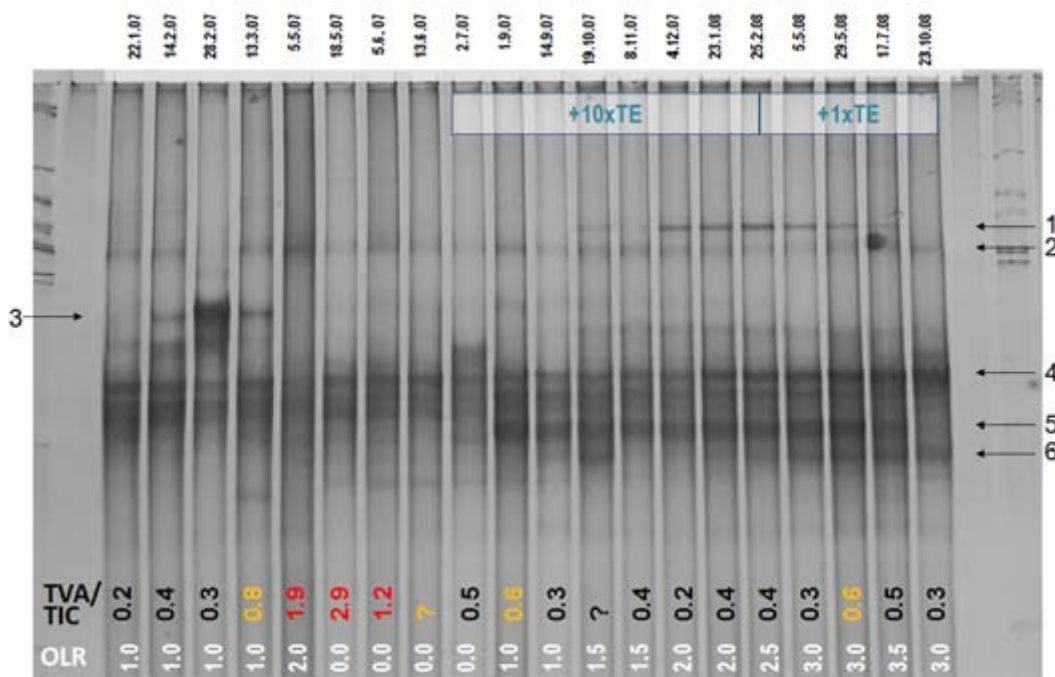
Error bars: Mean absolute deviation (MAD). STP: Standard temperature, pressure

*Fig. 2: Methane yield, sodium concentration and TVA/TIC value in fermenter C2*

However, low Co and Na concentrations are not the only trigger of acidification: at high total solids (TS) content of ca. 14% in fermenter B1 (not shown), TVA/TIC and PA strongly increased although Co and Na contents were high. Diluting the acidified fermenter to 11% TS resulted in sudden process recovery.

### 3.2 Diversity of methanogens and population dynamics

In order to reveal population shifts of methanogenic *Archaea*, PCR-SSCP analysis of characteristic samples from three fermenters B1, C2, C3 (C3 as example in *Figure 3*) was performed and SSCP profiles compiled as a time series.



TVA/TIC: Total volatile acids / Total inorganic carbonate [-]. OLR: organic loading rate [ $\text{kg VS} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ ]. 10x (1x) TE: period of 10x (1x) trace element cocktail supply. Arrows 1-6: characteristic bands (see text).

*Fig. 3: PCR-SSCP time series of fermenter C3*

In spite of haziness of bands, most probably due to the high primer degeneration, and although sequence analysis of amplicons cut out from single SSCP gel bands showed that most bands did not consist of a single species, a stable core banding pattern was reproducibly obtained for samples taken at similar fermenter conditions (*Figure 3*). E.g., bands 2 and 4 were stable over the whole time period. In contrast, bands 1, 5 and 6 appeared only after TE addition and at efficient reactor performance, and were most intense between OLR 1.5 and 3.0  $\text{kg VS} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ . Band 3 was dominant only at one sampling date, before the fermenter acidified. Formation of an artefact can not be excluded. Altogether, results indicated that the PCR-SSCP approach can be used to monitor the composition of the methanogenic biocenosis and to detect population shifts.

Visible bands were excised, and cloned DNA was sequenced and phylogenetically analysed. In parallel, random-cloning of *mcrA/mrtA* PCR products was carried out from fermenter DNA extracts. Results are shown in *Tab. 1*. *Methanopyri*, *Methanococci* and anaerobic methane oxidizers could not be detected. However, we could detect sequences affiliating with 2 hitherto undescribed clades. To both clades, class status was assigned due to

their deep branching within the *Euryarchaeota* (unknown classes I and II in *Tab. 1*). Unknown class II sequences were exclusively found in band 1 (*Figure 3*).

*Tab. 1: Population dynamics of methanogenic Archaea for different fermenter conditions*

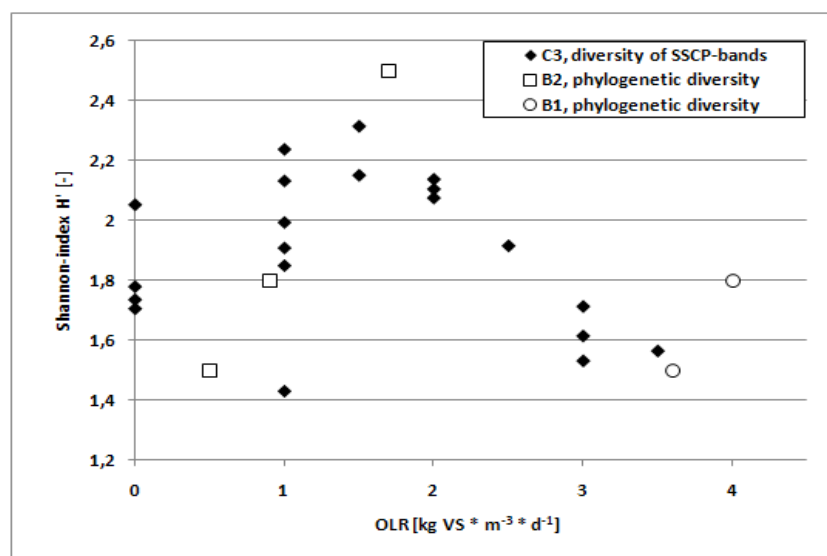
Date (fermenter)	25.02.08 (B1)*	17.07.08 (B1)*	26.01.07 (B2)#	13.06.07 (B2)*	13.06.07 (B2)#	17.07.08 (B2)*	17.7.08 (B2)#	18.05.07 (C3)*	23.10.08 (C3)*
pH [-]	7.7	7.9	8.0	7.7		7.5		6.3	7.6
TVA/TIC [-]	0.48	0.45	0.2	<b>0.9</b>		0.5		<b>2.8</b>	0.3
OLR [gVS · L <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup> ]	3.6	4.5	0.9	0		1.1		1.2	2.6
Acetate [mg · L <sup>-1</sup> ]	n.d.	1010	207	<b>2900</b>		601		<b>2621</b>	1087
<i>M.bacteriales</i> [%]	35	15	22	13	38	<u>56</u>	30	0	<u>68</u>
<i>M.microbiales</i> [%]	18	9	7	<b>87</b>	<b>46</b>	11	16	<b>69</b>	8
<i>M.sarcinales</i> [%]	<u>47</u>	<u>67</u>	<u>70</u>	0	15	33	<u>45</u>	31	24
( <i>M.saetaceae</i> ) [%]	(18)	(0)	(0)		(0)	(0)	(2)	(0)	(0)
Unknown class I [%]	0	9	0	0	0.2	0	0	0	0
Unknown class II [%]	0	0	0	0	0	0	9	0	0
Clones analysed	23	26	20	13	28	14	49	13	21

\*: Direct PCR cloning. #: PCR-SSCP cloning; percentages are calculated with consideration of relative band intensities.

N.d.: not detected.

Bold numbers: prevalent in acidified fermenters; underlined numbers: prevalent in stably running fermenters.

Depending on the fermenter condition, methanogenic biocenoses were differently composed. *Methanosaetaceae* were only detected at low acetate content. Obligately hydrogenotrophic *Methanobacteriales* and versatile *Methanosarcinaceae* prevailed when fermenters were not acidified, but no correlation with the OLR was seen (*Tab. 1*). At acidic conditions (TVA/TIC >0.9, acetate >2.6 g · L<sup>-1</sup>), *Methanomicrobiales* were dominant. More specifically, on May 18, 2007, sequences of two undescribed *Methanoculleus* species (15%, 31%) and of *Methanogenium organophilum* ssp. 2 (23%) prevailed in fermenter C3. On June 13, 2007, a sequence cluster designated as *Methanospirillum hungatei* ssp. 2 was dominant in the SSCP profile (61%) as well as in the clones derived directly from the extract (24%) of fermenter B2.



At OLR=0, fermenters were not fed due to acidification.

*Fig. 4: Shannon indexes calculated from SSCP profiles and phylogenetic sequence comparison at different organic loading rates for fermenters C3, B2 and B1*

As expected, very similar biocenosis compositions were determined from direct PCR and from SSCP cloning of a fermenter at a given day (*Tab. 1*), indicating that SSCP did not introduce bias into downstream evaluations.

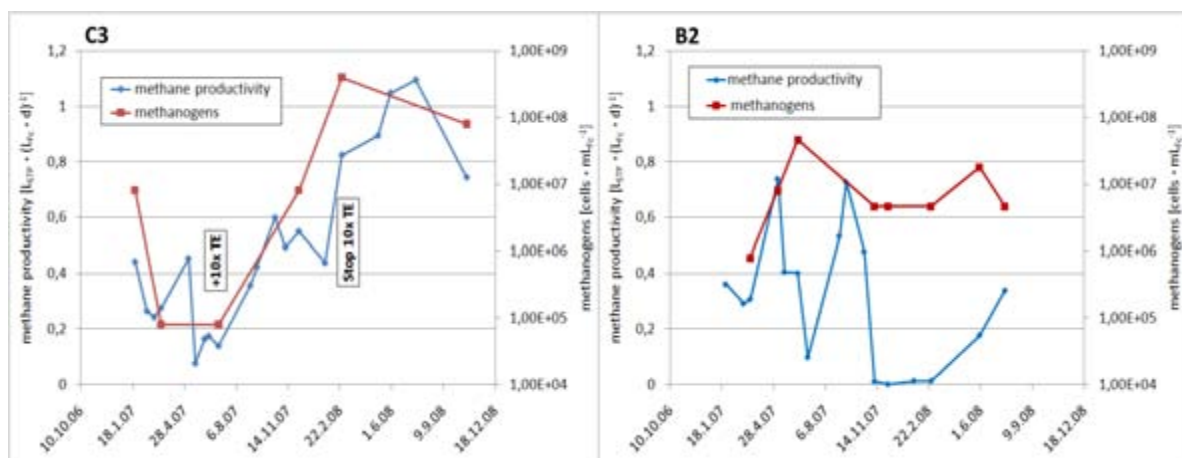
To compare the diversity of methanogenic populations at defined time points, the Shannon-index ( $H'$ ) was calculated from number and intensities of SSCP bands and from phylogenetic sequence analysis. Variation of results was considerable but by trend, diversity (*Figure 4*) and species richness (not shown) were highest between OLR 1.0 and 2.0 kg VS \* m<sup>-3</sup> \* d<sup>-1</sup>.

### 3.3 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

For reliable quantification, DNA extracts must be optimally amplifiable. Spectrophotometry of the extracted DNA indicated no or only slight contamination with proteins (A260/280 >1.4), contamination with phenolics (A260/230 <0.03; probably guanidine salts from the DNA extraction kit) and most importantly (NING et al. 2009), almost no contamination with humic compounds (A320 <0.05). Accordingly, all 10<sup>-1</sup> diluted extracts were PCR-amplifiable without symptoms of PCR inhibition, and only a single undiluted sample (A260/280 of 1.4, A320 of 0.05) amplified suboptimally.

*Fig. 5* shows the development of methanogen DNA in relation to methane productivity for fermenters C3 and B2. Methane productivity was chosen as the reference because the alternative, methane yield, should rather be a measure of specific microbial activity. Accordingly, methane yield ranged constantly between 0.3 and 0.4 L CH<sub>4</sub> \* g VS<sup>-1</sup> when fermenter showed stable performance (*Fig. 2*). This high methanation corresponded to a conversion rate of fed carbon to the gas phase of ca. 70-80% (LEBUHN et al., 2008).

Whereas methane productivity and methanogen DNA were visually correlated for fermenter C3, this was not convincingly the case for fermenter B2 (*Fig. 5*). A possible reason is too low resolution of datapoints in time. The relatively high concentration of methanogen DNA between November 2007 and March 2008 is probably due to released DNA and/or resting or dead cells residing in the fermenter. Turnover activity was negligible within this period due to extreme acidification (pH value below 5, TVA/TIC over 6) which could only be overcome by adding considerable amounts of slaked lime and finally inoculation by ca 0.1 vol. of another maize-fed fermenter.



STP: standard temperature, pressure. Fc: fermenter content

*Fig. 5: Quantity of methanogens and methane productivity in reactors C3 (left) and B2 (right)*

When fermenters were acidified, DNA of methanogens was lowest, corresponding to  $10^5 - 8 * 10^5$  to cells  $* mL^{-1}$ , whereas up to  $5 * 10^8$  methanogens  $* mL^{-1}$  were present at stable, high performance operation (*Fig. 5*).

## 4 Discussion

### 4.1 Trace elements

JARVIS et al. (1997) reported that acidification of clover-grass fed fermenters was predominantly due to lack of cobalt, with a threshold value of ca.  $0.02 \text{ mg} * \text{kg}^{-1}$  fresh matter (FM). Results of the present study suggest a very similar threshold ( $0.02\text{-}0.03 \text{ mg} * \text{kg}^{-1}$  FM) for mono-maize fed flow-through fermenters. This suggests that this threshold for Co may be generally valid for methanation of renewable resources. Our results suggest that beside Co, sodium can become limiting in mono-digestion of maize silage at a concentration of ca.  $10 \text{ mg} * \text{kg}^{-1}$  due to its relatively low  $\text{Na}^+$  content. Co is essential for many cellular processes of methanogens, and  $\text{Na}^+$  plays an important role in energy conservation of methanogens (BLAUT, 1994; DEPPENMEIER et al., 1999). A TS content of about 14% seems also to be critical and induce process acidification that apparently can be relieved by dilution. Mechanisms are not clear, we speculate that  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  transfer from syntrophs to methanogens may be impeded due to high viscosity of the fermenter sludge.

Recommendation for the practice is hence that the TE and TS fermenter status should be checked regularly, and that in case of deficiencies, these are specifically compensated. It should be noticed, that there are specific optimum ranges of TE concentrations, and that above these, toxic effects can be caused also for man and environment, and legal prescriptions trespassed. Adding much is not necessarily helpful, it can easily become too much. Adequately tuned TE concentrations in biogas plants are a key issue for their economically meaningful and ecologically sustainable operation.

### 4.2 Diversity of methanogens and population dynamics

The finding that Co and Na can become limiting factors in mono-digestion of maize silage prompted us to study in more detail the obviously primarily affected methanogenic *Archaea* and their population dynamics. For this purpose, a PCR-SSCP and a qPCR approach was developed and applied along with direct PCR phylogenetic profiling to fermenter samples taken at different fermenter conditions. These techniques detect DNA. This must be kept in mind for the following discussion of population dynamics of distinct methanogenic groups. Although we can assume that in equilibrated systems with high metabolic turnover detection of DNA pertains to active microorganisms, this is not necessarily the case in severely stressed systems where significant amounts of dead and/or inactivated microbes may be found (LEBUHN et al., 2005). This can explain some of the inconsistency between methane productivity and unexpectedly high methanogen concentration determined in fermenter B2 in the period November 2007 – March 2008 (*Fig. 5*, right).

Particularly in the direct PCR cloning approach, the number of analysed clones was relatively low (*Tab. 1*). This can explain some of the numerical differences between the phylogenetic results obtained for direct PCR and PCR-SSCP clone libraries. Results have to be verified with more clones. However, the abundance of different groups of methanogens was similar for both approaches, suggesting that our glimpse into the methanogenic fermenter biocenoses and their dynamics is realistic.

*Methanopyri*, *Methanococci* and anaerobic methane oxidizers could not be detected in any of the samples. When fermenters were performing well without symptoms of process inhibition, and diversity of methanogens was highest (Fig. 4), the percentage of *Methanomicrobiales* (obligately hydrogenotrophic, oh) was low, methanogens of a hitherto undescribed class (unknown class II) appeared, *Methanosaetaceae* (obligately acetoclastic, oa) could be detected, and versatile *Methanosarcinaceae* (v) as well as *Methanobacteriales* (oh) were dominant (Tab. 1, B2 (26.1.07, 17.7.08)). In accordance with previous reports that *Methanosaetaceae* are outcompeted at higher acetate concentration (JETTEN et al. 1992; KARAKASHEV et al., 2006), these acetoclasts were only detected when acetate was low (Tab. 1, B1 (25.2.08), B2 (17.7.08)). At OLR higher than ca.  $2 \text{ kg VS} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ , diversity of methanogens decreased (Fig. 4) but methane productivity and the number of methanogens increased in the fermenter (Fig. 5). When additionally acetate concentrations passed ca.  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , no *Methanosaetaceae* (oa) were found anymore, methanogens of hitherto undescribed class II appeared, and versatile *Methanosarcinaceae* (v) as well as *Methanobacteriales* (oh) were still dominant (Tab. 1, B1 (17.7.08), C3, (23.10.08)). High reactor performance was obviously accompanied by diminished diversity of certain numerous methanogens (up to  $5 \cdot 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ , Fig. 5). This is in agreement with the established view that high microbial diversity provides a profound basis for ecosystem stability and resilience after stress (FINLAY et al., 1997), whereas superior physiological performance is achieved by a more stress-susceptible biocenosis of few specialist species (low species richness) whose members are high in abundance.

When fermenters were acidic (Tab. 1, B2 (13.6.07), C3, (18.5.07)), striking dominance of *Methanomicrobiales* with prevalence of *Methanospirillum hungatei* ssp. 2, *Methanoculleus* spp. and *Methanogenium organophilum* ssp. 2 was obtained. Dominance of *Methanomicrobiales* (*Methanoculleus* sp., *Methanospirillum* sp., oh) has also been reported for RR fed stressed/acidified biogas plants using different methods (KLOCKE et al., 2008; SCHLÜTER et al., 2008)). The different techniques apparently produce comparable results. The mentioned *Methanomicrobiales* may be useful as bioindicators of process disturbance.

The quantity of methanogens determined for the different samples from reactor C3 visually correlated with the methane productivity (Fig. 5). This indicates that the total amount of methanogen DNA can be used as an indicator of process performance if the metabolic turnover rate is high (see above for the exception of fermenter B2 and severe acidification). Up to  $5 \cdot 10^8$  methanogens  $\cdot \text{mL}^{-1}$  were determined at high performance and over 3 orders of magnitude less at acidic conditions. Targeting *rrs* (16S rDNA), YU et al. (2005) analysed a well operating full-scale digester fed with activated sludge. They found a concentration of  $1 \cdot 10^9$  *Euryarchaeota* per mL fermenter content, accounting for ca. 10% of the total microbial digester community. Considering that not all *Euryarchaeota* are methanogens and that methanogens can have more *rrs* copies, the reported number resembles our results. Taken together, our assay appears to produce a realistic view of the quantity of methanogens present in a metabolically active ecosystem.

For the next steps, we intend to quantify exclusively active, methane producing methanogens targeting *mcrA/mrtA* mRNA concomitantly investigating reaction pathways using stable isotopes (LAUKENMANN et al., 2009). Design and application of Real-Time qPCR assays targeting specific groups of methanogens such as the above mentioned biomarkers will give a quick and improved insight into the abundance of process-relevant methanogens. Such systems can be useful to provide a rapid diagnosis of the fermenter status e.g. if acidification of the biogas process is suspected.

## Acknowledgements

This study was realised by financial support of the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection (BMELV) via the Agency for Renewable Resources (FNR), FKZ 22011505 and 22011905b.

We thank Mrs. Susanne Thieman and Mrs. Helga Gaenge for excellent technical assistance, and Diana Andrade for excellent fermenter management.

## References

- BASSAM, B.J., G. CAETANO-ANOLLÉS, and P.M. GRESSHOFF (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196(1), 80–83
- BAUER, C., M. KORTHALS, A. GRONAUER and M. LEBUHN (2008): Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Sci. Tech.* 58(7), 1433–1439
- BLAUT, M. (1994): Metabolism of methanogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66(1–3), 187–208
- DEPPENMEIER, U., T. LIENARD and G. GOTTSCHALK (1999): Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Lett.* 457(3), 291–297
- FINLAY B.J., MABERLY, S.C. and COOPER, J.I. (1997): Microbial diversity and ecosystem function. *Oikos* 80, 209–213
- GARCÉS, G., M. EFFENBERGER, M. NAJDROWSKI, A. GRONAUER, P.A. WILDERER, and M. LEBUHN (2005): Quantitative real-time PCR for detecting *Cryptosporidium parvum* in cattle manure and anaerobic digester samples - Methodological advances in DNA extraction. Proc. 8<sup>th</sup> Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion, Oct. 2-5, Punta del Este, Uruguay, ISBN 9974-7699-3-0, pp. 68-73
- GARCÉS, G., P.A. WILDERER, J.C. MUNCH, H. HORN and M. LEBUHN (2009): Evaluation of two methods for quantification of hsp70 mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples. *Water Res.* 43, 2669–2678
- JARVIS, Å., Å. NORDBERG, T. JARLSVIK, B. MATHISEN, and B.H. SVENSSON (1997): Improvement of a grass-clover silage-fed biogas process by the addition of cobalt. *Biomass Bioen.* 12(6), 453–460
- JETTEN, M.S.M., A.J.M. STAMS and A.J.B. ZEHNDER (1992): Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol. Rev.* 88, 181–198
- KARAKASHEV, D., G.J. BATSTONE, E. TRABLY and I. ANGELIDAKI (2006): Acetate oxidation is the dominant pathway from acetate in the absence of *Methanosaetaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5138–5141
- KLOCKE, M., E. NETTMANN, I. BERGMANN, K. MUNDT, K. SOUIDI, J. MUMME, B. LINKE (2008): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 190–205

- LAUKENMANN, S., H. HEUWINKEL, A. GRONAUER und F. KEPPLER (2009): Stabile Kohlenstoffisotope: Eine neue Lasermethode zur Pro-zessanalyse und Identifikation mikrobiologischer Reaktionen im Biogasprozess. Proceedings of the Congress Biogas Science 2009, Erding, December 02-04, in press.
- LEBUHN, M., M. EFFENBERGER, A. GRONAUER, P.A. WILDERER and S. WUERTZ (2003): Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. *Water Sci. Tech.* 48(4), 97-103
- LEBUHN, M., M. EFFENBERGER, G. GARCÉS, A. GRONAUER and P.A. WILDERER (2004): Evaluating real-time PCR for the quantification of distinct pathogens and indicator organisms in environmental samples. *Water Sci. Technol.* 50(1), 263–270
- LEBUHN, M., M. EFFENBERGER, G. GARCÉS, A. GRONAUER and P.A. WILDERER (2005): Hygienization by anaerobic digestion: comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR. *Water Sci. Tech.* 52/1-2, 93-99
- LEBUHN, M., F. LIU, H. HEUWINKEL and A. GRONAUER (2008): Biogas production from mono-digestion of maize silage – long-term process stability and requirements. *Water Sci. Tech.* 58(8), 1645-1651
- LUTON, P.E., J.M. WAYNE, R.J. SHARP and P.W. RILEY (2002): The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiol.* 148(11), 3521–3530
- NING, J., J. LIEBICH, M. KÄSTNER, J. ZHOU, A. SCHÄFFER and P. BURAUER (2009): Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR-based DGGE and functional gene microarray in soil microbial community study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 983-993
- SCHINK, B. (1997): Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(2), 262-280
- SCHLÜTER, A., T. BEKEL, N.N. DIAZ, M. DONDRUP, R. EICHENLAUB, K.H. GARTEMANN, I. KRAHN, L. KRAUSE, H. KRÖMEKE, O. KRUSE, J.H. MUSSGNUG, H. NEUWEGER, K. NIEHAUS, A. PÜHLER, K.J. RUNTE, R. SZCZEPANOWSKI, A. TAUCH, A. TILKER, P. VIEHÖVER and A. GOESMANN (2008): The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *J. Biotechnol.* 136, 77-90
- TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI and S. KUMAR (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599
- TEBBE, C. and W. VAHJEN (1994): Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 92, 2657-2665
- THAUER, R.K. (1998): Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lect. *Microbiol.* 144, 2377-2406
- WILHELM, J. and A. PINGOUD (2003): Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem* 4, 1120-1128
- YU, Y., C. LEE and S. HWANG (2005): Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Sci. Tech.* 52(1-2), 85-91



## **Session 5**

# **Analytik, MSR-Technik und Prozessmodellierung**

**Chairman: Prof. Wichern**



## **Advanced interpretation of anaerobic batch tests – conclusions for the practical operation**

S. Meier, S. Yüceer, L. Hinken, D. Weichgrebe and K.-H. Rosenwinkel

Institute for Water Quality and Waste Management (ISAH), Leibniz University Hannover,  
Welfengarten 1, 30167 Hannover, Germany

### **Zusammenfassung**

Im Zuge der Planung von landwirtschaftlichen und industriellen Vergärungsanlagen hat sich mit Einführung der VDI 4630 der Biogasertragstest etabliert. Dieses Verfahren ist anwendbar auf alle organischen Feststoffe bzw. Flüssigkeiten, die als repräsentative Testsubstanz eingesetzt werden können.

Durch geringfügige Modifikation der Testmethode sowie durch weitergehende Interpretation der Kurvenverläufe lassen sich belastbare Aussagen sowie Optimierungsvorschläge für den Biogasanlagenbetreiber erarbeiten. Die Ermittlung der spezifischen Methanaktivität (SMA) ist mit Hilfe der modifizierten Methode einfach und in relativ kurzer Zeit möglich. Hinsichtlich des Substratabbaus werden aus den Biogasertragskurven Aussagen über die einzelnen Prozesse Hydrolyse, Versäuerung und Methanisierung vorgestellt und diskutiert. Ferner werden Ergebnisse zur Adaption an erhöhte Ammoniumkonzentrationen präsentiert und Aussagen für den Anlagenbetrieb abgeleitet. Die Untersuchungen werden mit zwei verschiedenen Faulschlammproben aus kommunalen Kläranlagen sowie einem Pellettschlamm aus der Ethanolproduktion durchgeführt.

## Summary

Anaerobic Biogas Batch-Test (ABT) according to VDI 4630 has been established as one reliable basis for the dimensioning of agricultural or industrial fermentation plants. ABT was developed as an aid to gain knowledge and data regarding degradability of different substrates, and therefore to increase the efficiency of biogas production. The procedure can be applied to particulate organic matter as well as organic loaded fluids which could be used as representative test substances. By means of ABT according to guideline VDI 4630 verifiable results could be determined for

- the specific methane activity (SMA),
- the progress of the degradation phases – hydrolysis, acidification, methanisation,
- the adaptability of biomass to inhibitors (for example  $\text{NH}_4/\text{NH}_3$ ).

Therefore ABT were applied for different substrates marginal modified according to VDI 4630 with the main emphasis of an advanced interpretation of the received data. This interpretation will be presented exemplified on results of different inoculi from two different municipal sewage treatment plants and from granular sludge from the ethanol production.

## Keywords:

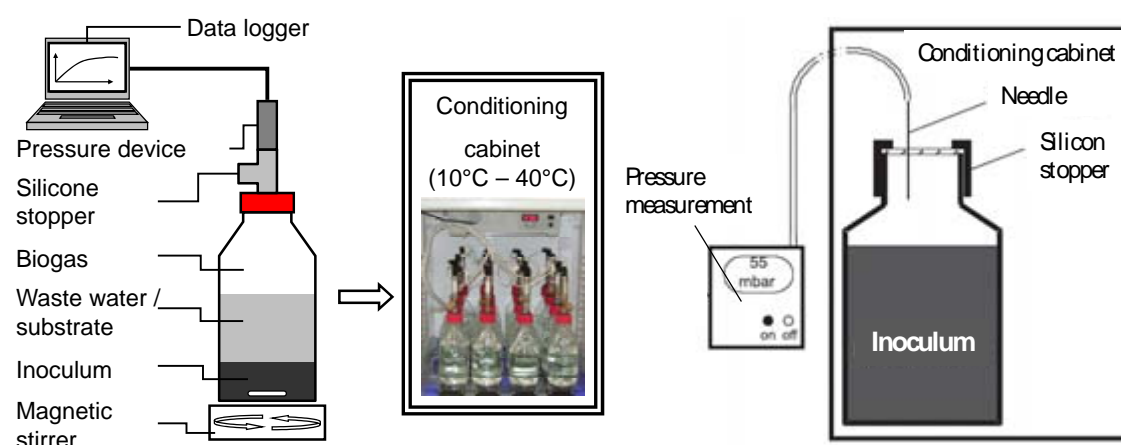
VDI 4630, biogas yield test, methane activity, ammonium inhibition

## 1 Introduction

As reaction to the worldwide demand for energy the number of anaerobic plants in particular for renewable resources has strongly increased internationally. As high capacities of the plants as possible, continuous gas production and stable gas composition are the preconditions for the optimal operation, and thus also prerequisites of their economic efficiency. Due to the complexity of the anaerobic degradation, there is still massive research demand in regard to efficiency increases and process control. The previous determination of the biogas potential of single agricultural or industrial substrates is of considerable importance for the dimensioning of the plant. Globally, there exist standards and regulations, a survey of which is provided by (ANGELIDAKI et al., 2009) and (MÜLLER et al., 2004). In Germany, VDI Guideline 4630 has been established as tool for the determination and evaluation of the digestibility of organic substances. Within this paper, the guideline is used as the basis for the analysis. Through slight modifications, an advanced interpretation of the gained data shall be achieved. Moreover, more advanced reliable statements on the Specific Methane Activity (SMA), the development of the degradation stages acidification, hydrolysis and methanation, and the adaptability of the biomass to inhibitor (ammonia) shall be concluded for the practical operation. The analyses used as inoculum two different kinds of digested sludge from two municipals wastewater treatment plants and one granular sludge from alcohol production. These kinds of sludge were then compared to each other regarding to their productive efficiency. Based on the extensive experiences of the Institute for Water Quality and Waste Management (ISAH), the constant volume reactors described in the VDI Guideline have become established as the most suitable method for the anaerobic batch tests (WEICHHREBE et al, 2004).

## 2 Methods

As test equipment for the running of the fermentation test according to VDI 4630, the gas volume measurement with gas pressure gauges or probes according to DIN EN ISO 11734 was used (cf. *Figure 1*) (URBAN et al., 2007). With the constant volume reactor, the produced biogas is collected in the fermentation bottle.



*Fig. 1: Experimental apparatus in accordance with DIN EN ISO 11 734 (right) and gas volume measurement by a semi-technical test facility with pressure transmitters directly attached to the bottleneck but without a hose line (left) (edited version, Urban et al., 2007)*

In order to record the pressures increase as exactly as possible, the pressure is measured regularly and continuously and gas samples are taken. Via the pressure increase and the gas analysis (for instance with gas chromatography – GC), the biogas and methane developments are determined. The test procedure is run in accordance with VDI 4630 and is described in detail in (ABDEL-HALIM, 2005) and (URBAN, 2009).

According to VDI 4630, the inoculum chosen for the analysis should be etiolated for several days. In the present analysis, however, the inoculum was not etiolated in a second test phase designed to determine the Specific Methane Activity (SMA). If granular sludge is used as inoculum, it should be fed into the fermentation bottles as homogeneously as possible, or it should be screened.

The batches were all subjected to multiple determination and were run with an one-time dosage of a reference substrate. Depending on the test target, the reference substrate can be sodium acetate, glucose or microcrystalline cellulose. For the determination of the SMA, sodium acetate is used. The single stages hydrolysis, acidification and methanation can be read off the development of the biogas or methane cumulative curves of the reference substrates glucose and cellulose and then be interpreted.

The fermentation tests were also run with different sludge-substrate ratios (SLR – Sludge Loading Rate). In order to determine the maximum sludge conversion rates, the ISAH batch tests deviate from VDI 4630 in that they set higher sludge-substrate ratios for the batch tests. Additionally, the batches are buffered by the dosage of  $K_2HPO_4$  and  $KH_2PO_4$ .

For the determination of the adaptability or inhibition of the digested sludge, and to determine the maximum concentrations, biomasses which already have adapted to high ammonia concentrations are in the batch test charged with additional ammonium concentrations.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Specific methane activity

The Specific Methane Activity (SMA) was determined for municipal sewage sludge of the wastewater treatment plant in Hannover-Herrenhausen (DS HH) and for granular sludge (GS) from an alcohol production plant.

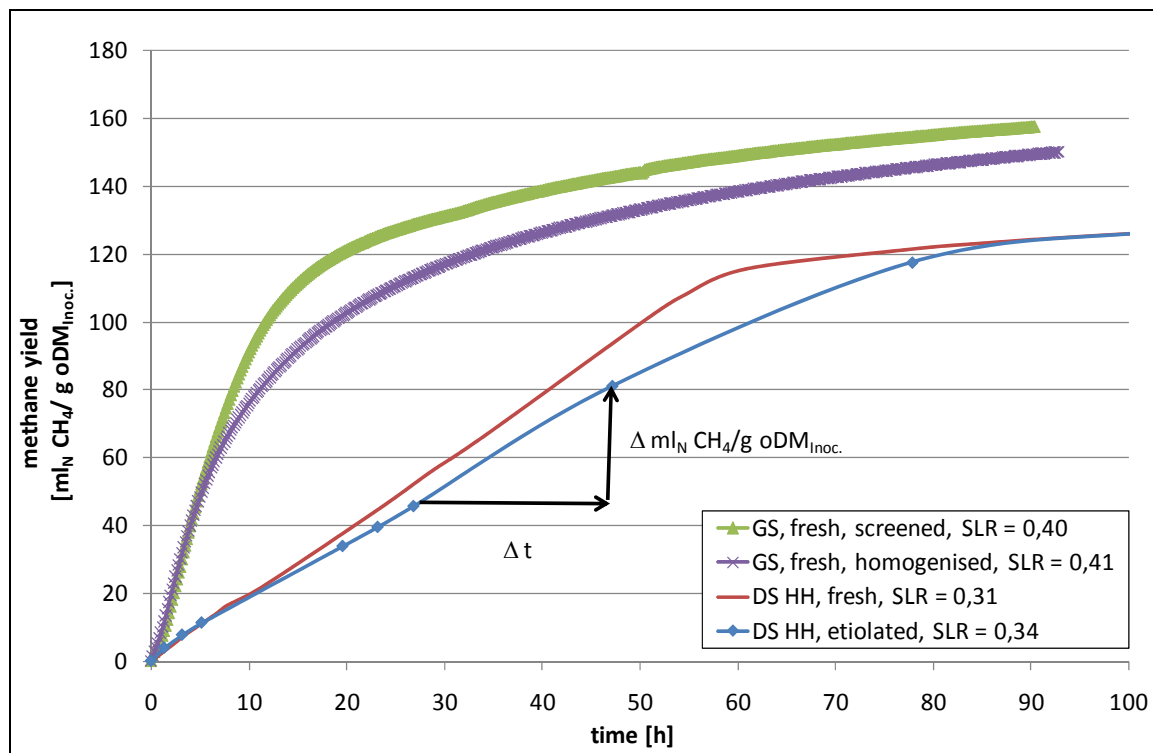
The SMA is the amount of substrate per gram of biomass which is converted into methane per day. The specific methane activity [ $g\ COD_{removed} / (g\ oDM_{Inoc} \cdot d)$ ] can immediately be determined from the almost linear increase of the measured cumulative biogas curve of the reference substrate acetate including the inoculum. According to VDI 4630, the SMA is calculated with Equation (1)

$$(1) \quad SMA = \frac{V(t_2) - V(t_1)}{x_{CH_4} * (t_2 - t_1) * m_{oDM, Inoc}} \left[ \frac{gCOD_{removed}}{goDM_{Inoc} * d} \right]$$

with

- SMA - Specific Methane Activity [ $g\ COD_{removed} / (g\ oDM_{Inoc} \cdot d)$ ]
- $V(t_1), V(t_2)$  - Methane amount incl. basic metabolism at  $t_1$  and  $t_2$ , respectively [ $ml_N\ CH_4$ ]
- $x_{CH_4}$  - Theoretical gas yield ( $320\ ml_N\ CH_4 / g\ CSB_{removed}$ )
- $t_1, t_2$  - Time 1 [d] and Time 2 [d], respectively
- $m_{oDR, Inoc}$  - Mass of organic dry matter of the used inoculum [ $g\ oDM$ ]

In *Figure 2* the cumulative methane curves compare the contrast between of digested and granular sludge. For the determination of the SMA, it is important to choose the correct linear curve section. On the basis of the time difference  $\Delta t$  and the increasing gas volume  $\Delta V$  in  $\text{ml}_N \text{CH}_4/\text{g oDM}_{\text{Inoc.}}$ , the SMA can be determined as ascending gradient of the quotient of these two values.



*Fig. 2: Methane yield of acetate with municipal digested sludge (DS HH) and granular sludge (GS) in  $\text{ml}_N \text{CH}_4 / \text{g oDM}_{\text{Inoc}}$*

*Table 1* illustrates the calculation path to determine the specific methane activity for a theoretic gas yield of  $320 \text{ ml}_N \text{CH}_4 / \text{g COD}_{\text{removed}}$

*Tab. 1: Calculation of the specific methane activity for a theoretic gas yield*  
 $x_{\text{CH}_4} = 320 \text{ ml}_N \text{CH}_4 / \text{g COD}_{\text{removed}}$

	DS HH, etiolated	DS HH, fresh	GS, screened	GS, homogenised
<b>Etiolation</b> [d]	7	1	1	1
<b>SLR</b> [g $\text{COD}_{\text{removed}} / \text{g oDM}_{\text{Inoc.}}$ ]	0.34	0.31	0.40	0.41
<b><math>\Delta V / \Delta t</math></b> [ $\text{ml}_N \text{CH}_4 / \text{h}$ ]	10.8	14.2	24.8	42.7
<b><math>m_{\text{oDM}}</math> of the inoculum</b> [g $\text{oDM}_{\text{Inoc.}}$ ]	6.20	6.70	2.08	3.75
<b>SMA</b> [g $\text{COD}_{\text{removed}} / (\text{g oDM}_{\text{Inoc.}} \cdot \text{d})$ ]	0.13	0.16	0.89	0.85

The degradation velocity is determined according to the respective inoculum and thus to the active biomass. For the reference substrate sodium acetate, comparative analyses of municipal digested sludge and granular sludge show that the specific methane activity of the pellet sludge is 5.6 times higher, this corresponds to the examination results of (ABDEL-HALIM, 2005). The analyses show also that according to VDI and after etiolation of 7 days of the municipal digested sludge a slightly lower SMA is reached than with "fresh" sludge. It can be assumed that a partial stabilisation of the inoculum has already occurred, so that the ratio of active biomass decreases and that thus the biomass activity is reduced.

Analyses with granular sludge have shown that the preliminary treatment (screening or homogenisation including the liquid phase) has an impact on the SMA. The same applies for examinations with higher sludge-substrate ratios, with screened granular sludge showing a slightly higher activity.

### 3.2 Development of the degradation stages hydrolysis, acidification, and methanation

Depending on the substrate used, will occur different degradation behaviour and degradation velocities of the entire anaerobic process, which is due to the different substrate properties. *Figure 3* presents exemplary cumulative biogas curves produced in fermentation tests of acetate, glucose, and cellulose. In these fermentation tests, digested sludge from the wastewater treatment plant in Hannover-Herrenhausen was used, with similarly high COD equivalents of carbohydrates of ca. 2 g COD per fermentation bottle being dosed. In the first hours after filling, the system adapts, that is the temperature of bottle and contents adjusts to the temperature in the conditioning cabinet and there develops an equilibrium of the gas in the water and gas phases. Then occurs the lag phase of the anaerobic microbiology, before the degradation reaches a stable level.

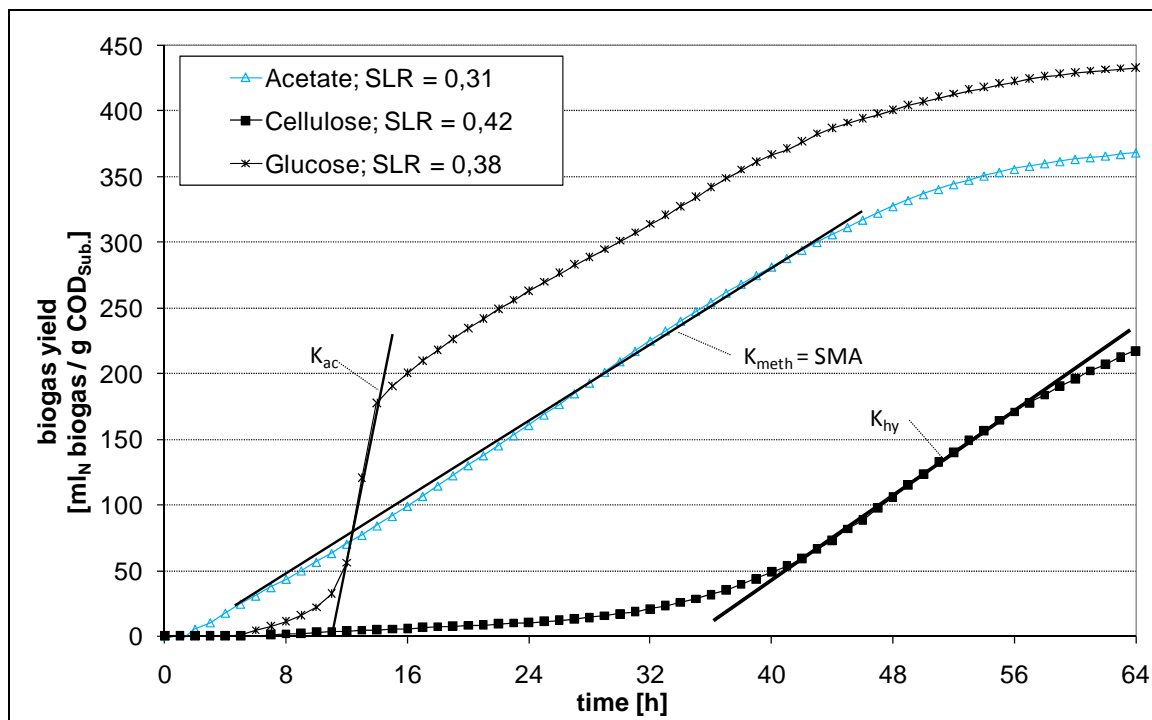


Fig. 3: Progress of the cumulative biogas curves for acetate, glucose and cellulose



**Acetate** can be converted directly into methane, so that this substrate can be used to determine the degradation velocity of the 3rd and 4th stages of the anaerobic degradation and thus the activity of the biomass of the methanogenesis (SMA) must be determined.

**Glucose** is a monosaccharide and must first be hydrolysed. *Figure 3* shows that hydrolysis and acidification will here occur through a leap in the cumulative biogas curves after ca. 11 to 14 hours. It can be assumed, that in these stages among to acids and alcohol mainly hydrogen and carbon dioxide are produced. However, the slope in this range represents the acidification rate  $K_{ac}$  and can be determined quantitatively. The S-shaped progress of the cumulative curves is typical of glucose. After 14 hours, the methanogenesis will commence, which can be read off the linear development of the cumulative biogas curve— almost parallel to that of the acetate. The maximum conversion rate and thus the SMA can be determined from the inclination.

Like glucose, **micro-crystalline cellulose** is a carbohydrate, albeit a polysaccharide. Because of the complex structure of the cellulose, it will pass through all four degradation stages. *Figure 3* also shows that the hydrolysis of the substrate goes considerably at first more slowly, so that the degradation is strongly delayed. The inclination (between 42 to 56 h) is equivalent to the hydrolysis rate. There the hydrolysis of the enzymes produce monomer hydrocarbons (mainly monosaccharide, like glucose). This effects the conversion of particulate COD into dissolved COD as acetate, which is then available for the methanogenic bacteria.

With sufficiently long duration of the fermentation test, the cumulative curves of the used substrates will converge to maximum specific biogas yield.

### 3.3 Adaptability of the biomass to inhibitors (ammonium inhibition)

Wastewater with high ammonium concentration caused by production processes can make for considerable toxicity hazards during anaerobic treatment, with the undissociated ratio (ammoniac) being the reason of the inhibition.

In contrast to the acids, the undissociated ratio of the ammonium increases with rising pH-values, so that the inhibitory effect of ammonium in the alkaline range will start already at low concentration. Yet, the anaerobic biocoenosis is capable of adapting to higher ammonium concentrations (KOSTER & LETTINGA, 1988).

For the analysis, a kind of digested sludge was chosen which already has this adaptability. The original concentration measured in the used inoculum already amounted to 3.314 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$  (at pH-value 7.9); these concentrations considerably exceed those recommended for anaerobic processes (URBAN, 2009), (KROISS, 1986) and (KOSTER & LETTINGA, 1988).

*Figure 4* exemplarily shows the cumulative biogas curve of the municipal digested sludge with dosage of the reference substrate and with different ammonium concentrations. From the inclination of the linear development at the beginning after the lag phase, the activity and thus the adaptability of the biomass can be determined with one-time addition of acetate and different concentrations of ammonium.

On the basis of the cumulative biogas curves with one-time addition of acetate without increase of the ammonium concentrations, it can be assumed that the used inoculum was not inhibited through the addition of acetate.

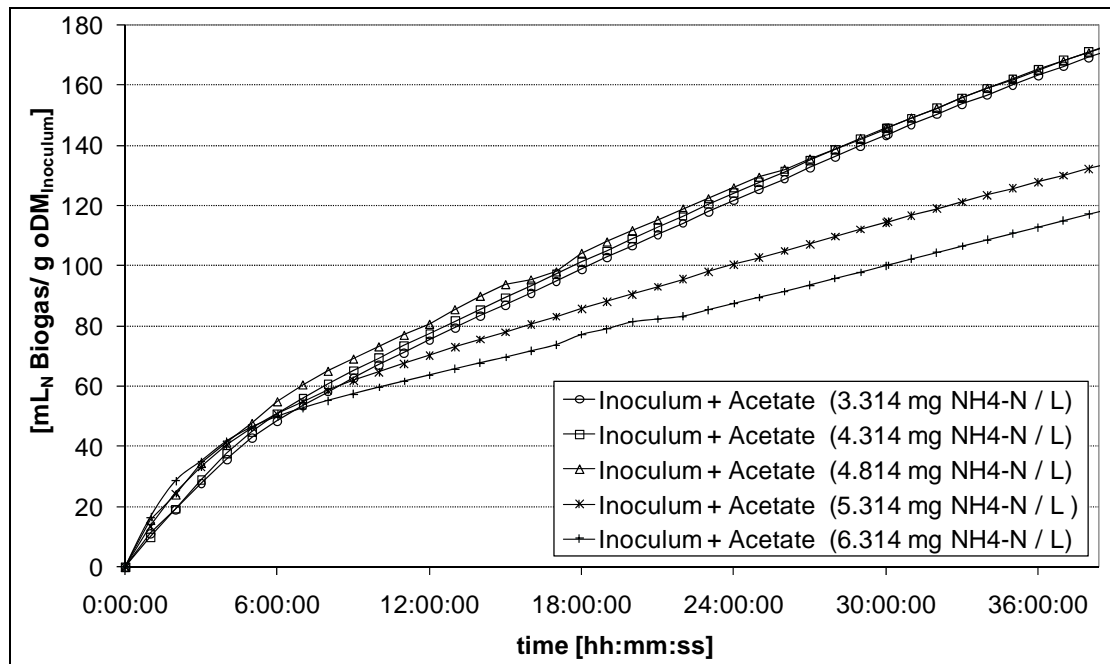


Fig. 4: Biogas yield of acetate with digested sludge at different ammonium concentrations in  $mL_N$  Biogas/ g  $oDM_{Inoculum}$

The gradient for the calculation of the activity was here used from after the lag phase (after ca. five hours) until the end of the test. The calculated methane activity rates are presented in Figure 5. Through the fermentation tests, it could be ascertained that a one-time addition of up to 1.500 mg NH<sub>4</sub>-N/L will have no significant changes in the activity rates, which stayed almost constantly between 0,21 and 0,23 g COD<sub>removed</sub>/ (g  $oDM_{Inoc}$  · d).

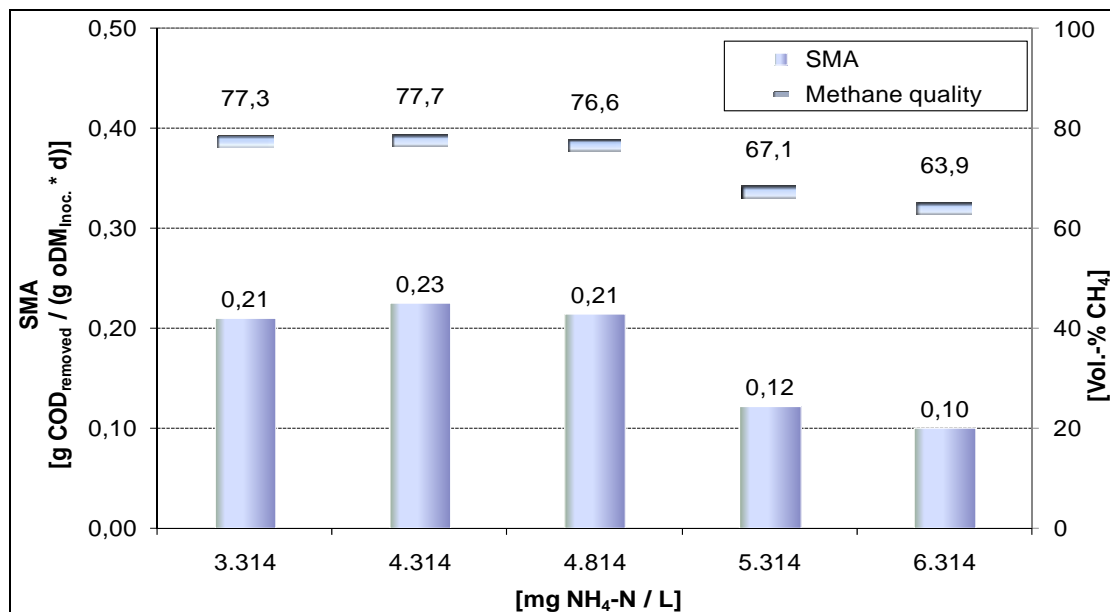


Fig. 5: Methanogenic activity of acetate with digested sludge at different ammonium concentrations in g COD<sub>removed</sub> / (g  $oDM_{Inoc}$  · d)

An additional dosage of 2.000 mg NH<sub>4</sub>-N/ L, however, led to inhibition, which can be seen also from the decreasing gas quality by more than 10 Vol.-% CH<sub>4</sub>.

In regard to the transferability of the results to practical operation one has to keep in mind that the adaptability of the digested sludge determined with batch tests and a single dosage of NH<sub>4</sub>-N will only allow for general statement about NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ NH<sub>3</sub>. For the determination of the adaptability of biomass to increasing NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/ NH<sub>3</sub> concentrations in continuous operation, operation parameters like wastewater composition, acidification rate, temperature, pH-value, sludge age, etc. must be considered.

## 4 Conclusions

The batch tests run on the basis of the VDI Guideline 4630 allow for statements on the gas yield and the degradability of substrates. Through slight modification of the test methods and advanced interpretation of the collected data and curves developments, it is possible to gain further insights in regard to potential inhibitions of the inoculum, the activity of the biomass (SMA), and single stages of the anaerobic degradation (hydrolysis, acidogenesis/acetogenesis, methanogenesis), on the basis of which optimization suggestions for the running of biogas plants can then be worked out.

Through determining the specific methane activity (SMA), the achievement potential of the biomass can be determined and compared to others. Moreover, this form of evaluating the cumulative biogas curves also provides the opportunity to show inhibitions, for instance due to overloads, nutrient shortage, or toxicity of substances. One particular advantage of the method described and the advanced interpretation is that statement can be made in a relatively short time (within 48 hours).

For the comparability with other analyses, particular attention should be paid to the processing of the substrates (comminution, screening) and the dosing of the inoculum (especially with granular sludge – screened, homogenised), as these factors have a crucial impact on the results. The analysis show that for the determination of the maximum SMA, non-etiolated biomass is recommendable, as it can be assumed that by etiolating a partial stabilization of the inoculum occurs, that the ratio of active biomass will decrease, and thus the biomass activity will be reduced.

Depending on which substrate is used, there will occur different degradation behaviours and degradation velocities of the entire anaerobic process. From the cumulative biogas curves determined in the batch tests according to VDI 4630, statements on the single processes (hydrolysis, acidification, and methane rates) can be gleaned. With acetate, the maximum methane conversion rate can be determined directly. Glucose and cellulose, however, must first be hydrolysed and acidified, so that with parallel degradation tests of these three substrates also the hydrolysis and acidification rate must be determined.

Furthermore, results of the adaptation to increased ammonium concentrations were presented, with conclusions on the practical operation of biogas plants. It became apparent that the proceeding is suitable for determining inhibitions.

The analyses presented above substantiate that – on the basis of the VDI 4630 – more information than just the biogas yield can be read off the development of the cumulative curves.

## References

- ANGELIDAKI, I., ALVES, M., BOLZONELLA, D., BORZACCONI, L., GUWY, A.J., KALYUZHNYI, S., JENICEK, P., CAMPOS, L., VAN LIER, J.B. (2009): Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes: a proposed protocol for batch assays. In: IWA Publishing, Water Science & Technology – WST, 59.5
- ABDEL-HALIM, W. (2005): Anaerobic Municipal Wastewater Treatment. Dissertation, Heft 133, Hannover
- DIN EN ISO 11734 (1998): Bestimmung der "vollständigen" anaeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen im Faulschlamm, Verfahren durch Messung der Biogasproduktion. Berlin
- KOSTER & LETTINGA (1988): Anaerobic Digestion at Extreme Ammonia Concentrations. In: Biological Wastes 25
- KROISS, H. (1986): Anaerobe Abwasserreinigung. Wiener Mitteilungen, Wasser-Abwasser-Gewässer, Bd. 62, Wien
- MÜLLER, FROMMERT, JURG (2004): Standardized methods for anaerobic biodegradability testing Re/Views. In: Environmental Science & Bio/technology, 3
- URBAN, I., ROSENWINKEL, K.-H., WEICHGREBE, D. (2007): Bestimmung von Biomasseaktivitäten und Biogaspotentialen mit anaeroben Batch-Tests. Vortrag Wasserwirtschaftliches Kolloquium, Hannover
- URBAN, I. (2009): Anaerobe Kommunalabwasserbehandlung Einsatz und Bemessung von UASB-Reaktoren. Dissertation, Heft 143, Hannover
- VDI –RICHTLINIE 4630 (2006): Vergärung organischer Stoffe, Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche. Düsseldorf
- WEICHGREBE, D., ABDEL-HALIM, W., ROSENWINKEL, K.-H. (2004): Determination of anaerobic biodegradability of domestic wastewater- comparison between inoculation with digested and granular sludge, Second National Conference "The Chartered Institution of Water and Environmental Management CIWEM", 13-15th Sept. 2004, Wakefield, UK

## Entwicklung einer NIRS Kalibration zur Bestimmung der Biogasausbeute von Mais

B. Darnhofer<sup>1</sup>, J. Eder<sup>1</sup>, H. Oechsner<sup>2</sup> und M. Mukengele<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Am Gereuth 8, 85354 Freising, Deutschland

<sup>2</sup> Landesanstalt für Landwirtschaftliche Agrartechnik und Bioenergie, Universität Hohenheim, 70599 Stuttgart, Deutschland

### Zusammenfassung

In einem von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) geförderten Projekt wurde in den Jahren 2002 bis 2007 Mais zur Biogasproduktion an verschiedenen Standorten in Deutschland angebaut. Es wurde Material unterschiedlicher Herkünfte geprüft und ein weiter Reifebereich mit einer breiten Inhaltsstoffzusammensetzung abgedeckt. Der Mais wurde gehäckselt, getrocknet, vermahlen und die Spektren mithilfe der Nahinfrarot-Reflexions-Spektroskopie (NIRS) aufgenommen. Anschließend wurden über 400 Proben ausgewählt, die mit dem Hohenheimer Biogasertragstest (HBT) auf ihre Methanausbeute untersucht wurden. Der gesamte Probensatz wurde zur Erstellung einer Kalibrationsgleichung für das Merkmal Methanausbeute in einen Kalibrations- und einen Validationsdatensatz aufgeteilt.

Es wurden verschiedene Methoden zur Kalibrationsentwicklung geprüft. Die beste Kalibration führte lediglich zu einer Korrelation von 0,7 zwischen den Labordaten des Validationsdatensatzes und den mit der Kalibrationsgleichung berechneten Werten dieses Datensatzes. Es wurde deutlich, dass keine ausreichend genaue Vorhersage der im HBT ermittelten Methanausbeute von Mais mittels der angewandten NIRS-Verfahren möglich war. Obwohl verschiedene Inhaltsstoffe in einem weiten Bereich variierten, schwankte die Methanausbeute vor allem um den Wert von  $330 \text{ NI (kg OTM)}^{-1}$ , extreme Werte waren selten. Möglicherweise wurden Unterschiede in der Zusammensetzung der Maispflanze insbesondere der Kohlenhydratfraktion durch die lange Zeit im Fermenter nivelliert. Die Spektren spiegelten die breite Variation in der pflanzlichen Zusammensetzung vor dem Prozessbeginn wider und nicht die geringe in der Methanausbeute. So war auch die Korrelation zwischen den Qualitätsmerkmalen wie z.B. Verdaulichkeit, die sich gut mit NIRS bestimmen lässt, und der Methanausbeute gering. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Methanausbeute von Mais ein Merkmal mit einer geringen Variation ist, dass auf Basis der genutzten Referenzmethode nicht so exakt mit NIRS bestimmt werden kann, dass eine Schnellbestimmung mit NIRS zum Einsatz in der Züchtung und Sortenbewertung möglich ist.

## Summary

In a project funded by the Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) maize was cultivated for fermentation gas production at different locations in Germany 2002 to 2007. Plant material of different origins with a far ripe range and a broad ingredient composition was checked. The maize was chopped, dried, ground, and the spectra were taken with near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). Subsequently, over 400 samples were selected, which were examined with the Hohenheimer fermentation gas test (HBT) for their methane yield. For the development of a calibration equation for the trait methane the entire sample set was divided into a calibration and a validation data set.

Different statistical methods were checked for calibration development. The best calibration led only to a correlation of 0,7 between the laboratory data of the validation data set and the values computed with the calibration equation. By means of the NIRS procedures there was no sufficiently exact prediction of the methane yield of maize determined in the HBT. Although different ingredients and quality traits lay within a wide range, the methane yield varied particularly around the value of 330 NI (kg OTM)<sup>-1</sup>, extreme values were rare. Possibly differences in the composition of the maize plant in particular the carbohydrates were levelled by the long time in the fermenter, and this was not reflected by the spectra. So, the correlation between the quality criteria like digestibility, which can be determined well with NIRS, and methane yield was small. Consequentially, it seems reasonable to suppose that the methane yield of maize is a trait that cannot be determined so accurately with NIRS that a rapid determination with this method is possible to the use in breeding and variety testing.

## Schlüsselwörter:

Biogasausbeute, Methan, Mais, NIRS

# 1 Einleitung

Die Produktion von Biogas bildet heute einen wichtigen Betriebszweig vieler landwirtschaftlicher Unternehmen in Deutschland. In einem Großteil der landwirtschaftlichen Biogasanlagen stellt Mais das wichtigste Substrat für die Gasgewinnung dar. Aufgrund seiner hoher Ertragsleistung pro Hektar und der guten Konservierbarkeit eignet er sich hierzu besonders gut.

Die wichtigsten Kriterien für die Wahl einer Silomaisssorte zur Biogasproduktion sind neben den allgemeinen pflanzenbaulichen Aspekten wie Standfestigkeit, Krankheitsanfälligkeit u.a. der Trockenmasseertrag pro Hektar und die Höhe der Methanausbeute bezogen auf die organische Trockenmasse. Sind beide im Optimum, so ist auch die Zielgröße der Substratproduktion „Methanertrag pro ha“ optimiert.

Es ist von großem Interesse, die potentielle Biogasausbeute von Silomais bereits möglichst früh nach der Ernte festzustellen falls davon ausgegangen werden kann, dass verschiedene Sorten sich hinsichtlich ihrer Gasausbeute unterscheiden. Dieses kann einerseits für die Züchtung und Sortenbewertung von Relevanz sein, aber auch für den Besitzer einer Anlage. Vielfach wird Mais zur Befüllung der Anlage zugekauft. Wäre die mögliche Gasausbeute bereits bei der Anlieferung vorhersagbar, so könnte die Bezahlung der Ware nicht nur nach Menge, sondern auch nach Qualität erfolgen.

Die Vergärung und die dadurch gewinnbare Methanmenge ist von der chemischen Zusammensetzung der Pflanze abhängig. Zur Bestimmung der Methanmenge lag zu Projektbeginn kein Messverfahren vor, das es ermöglicht hätte, große Probenmengen, wie sie in jedem Züchtungsprogramm oder der Sortenbewertung innerhalb kurzer Zeit anfallen, mit einem hohen Durchsatz zu analysieren. Ein wichtiges Ziel war es daher, eine Kalibrationsgleichung für NIRS zur Vorhersage der Methan- und Biogasausbeute von Energiemais zu entwickeln. Die Bestimmung der Gasausbeute ist im Labor zeit- und kostenintensiv und daher für den täglichen Einsatz in der Sortenentwicklung und -bewertung nicht geeignet. Für die Inhaltsstoff- und Qualitätsbestimmung von Silomais hat sich NIRS als Routinemethode durchgesetzt. Es lag daher nahe zu untersuchen, ob diese Methode auch zur Bewertung der Methanausbeute von Mais anwendbar ist.

Bei der Entwicklung einer NIRS-Kalibration zur Inhaltsstoffbestimmung werden Labordaten und Reflexionsspektren aus den Nahinfrarot-Bereich zusammengestellt und aus diesen eine Regressionsgleichung erstellt. Das Ziel ist eine enge Korrelation zwischen den Labordaten und den mithilfe der Kalibration errechneten Werten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 NIRS

Zur Erstellung der Kalibrationsgleichung wurde die MPLS- (*Modified Partial Least Square*) Regression genutzt. Es wurde eine so genannte globale Kalibration erstellt, bei der der gesamte Datensatz in die Modellentwicklung einfließt. Es soll so durch die Nutzung aller möglichen Informationen und Inhaltsstoffkonzentrationen die Erstellung einer robusten Kalibration erreicht werden (DILLER 2002).

Bei der Erstellung des Modells ist die Festlegung der optimalen Anzahl an Faktoren ein wichtiger Gesichtspunkt. Um die beste Anzahl an Faktoren zu bestimmen, wird vom Programm eine Kreuzvalidierung durchgeführt. Es wird dabei jeweils ein Teil des gesamten

Datensatzes zur Modellentwicklung herangezogen, der andere Teil wird ausgeschlossen und dient der Prüfung des Modells. Dieses Verfahren wird durchgeführt, bis alle Teile einmal zur Modellbildung und -überprüfung beigetragen haben. Im vorliegenden Projekt wurden vier Kreuzvalidierungsdurchläufe durchgeführt.

Um die Qualität der Kalibration zu bestimmen, dienten unabhängige Proben zur Kontrolle. Diese wurden bei der Modellentwicklung nicht berücksichtigt und spiegelten das Probenpektrum wider, das später mit der Kalibration bewertet werden sollte. Im Projekt wurde der gesamte Datensatz in einen Kalibrations- und einen Validationsdatensatz aufgeteilt, wobei der Validationsdatensatz kleiner war und zur externen Überprüfung diente.

Bevor die eigentliche Modellerstellung beginnen kann, ist eine Vorbehandlung der spektralen Daten erforderlich. Die Datenvorbehandlung erfolgte einerseits durch die Bildung von Ableitungen. Bei der Datentransformation kann die Dimension der Ableitung (erste Ziffer), der Abstand zwischen den Datenpunkten zur Bildung der Ableitung (zweite Ziffer) oder die Anzahl an Datenpunkten zur Glättung mittels gleitender Mittelwerte (dritte Ziffer) variiert werden. So bedeutet beispielsweise (1, 4,4), dass die erste Ableitung gebildet wurde, der Abstand zwischen den Datenpunkten vier war und dass vier Datenpunkte zur Glättung mittels gleitender Mittelwerte genutzt wurden. Zudem ist eine Streulichtkorrektur durchgeführt worden. Im Projekt wurden die Verfahren *Standard Normal Variate* und *Detrend* kombiniert (SNVD), *Multiplicative Scatter Correction* (MSC), *Weighted MSC* (WMSC) sowie *Inverse MSC* (IMSC) angewendet und geprüft.

Vor der Kalibrationsentwicklung wurde zudem eine Ausreißerkontrolle durchgeführt. Die Ausreißer wurden zum einen an den Referenzdaten und zum anderen an den Spektren bestimmt. Die Ausreißerkontrolle der Spektren erfolgte mit einem Programm im Rahmen der genutzten WIN ISI III V 1.50 Software der Fa. Infrasoft International Inc. (Port Matilda, PA, USA). Die Ausreißer wurden nach TILLMANN (1996) bestimmt. Es wurden folgende Grenzwerte genutzt:  $T = 2,5$ ,  $GH = 10,0$ ,  $X = 10,0$ .

Zur Beschreibung des Datensatzes anhand der spektralen Daten wurde außerdem eine Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis, PCA*) durchgeführt. Es war keine Gruppenbildung nachweisbar. Es konnten keine Versuchsjahre, Standorte oder Proben einzelner Versuchsdurchgänge als eigenständige Gruppe innerhalb des gesamten Datensatzes nachgewiesen werden.

## 2.2 Probenmaterial

Die Spektren wurden von frischem, getrocknetem und vermahlenem (1 mm Siebdurchmesser) Mais an der LfL in Freising aufgenommen. Jede Probe wurde in zwei Wiederholungen gemessen. Nach Überprüfung der Daten wurde der Mittelwert gebildet und anschließend dieser zur Kalibrationsentwicklung genutzt. Zur Aufzeichnung der spektroskopischen Daten wurde ein Gerät der Fa. Foss Instruments, Hamburg, Modell NIR Systems 5000 eingesetzt. Die Messung der Reflexion erfolgte in 2 nm-Abständen in einem Wellenlängenbereich von 1108-2492,8 nm.

Sobald alle Proben eines Erntejahres spektroskopisch untersucht worden waren, erfolgte die Auswahl für die Referenzanalyse mit dem HBT (HELLFRICH & OECHSNER 2003). Die Referenzanalytik erfolgte an der Universität Hohenheim, Landesanstalt für Agrartechnik und Bioenergie. In diesem Verfahren werden frische, getrocknete und vermahlene Proben untersucht, so wie sie auch für die NIRS-Messung benötigt werden. Dieser Test wurde ausgewählt, da er zu Projektbeginn die einzige Methode zur Biogasbestimmung war, mit der ein so hoher Probendurchsatz ermöglicht werden konnte, wie er für die Entwicklung



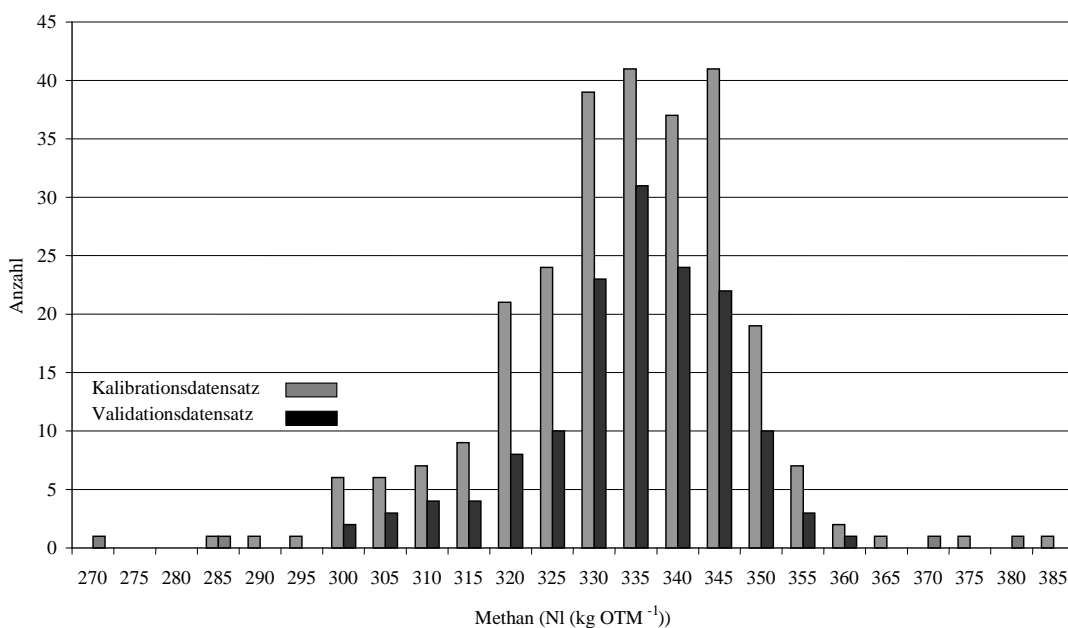
einer NIRS-Kalibration erforderlich ist. Die Auswahl der Proben erfolgte einerseits nach den spektroskopischen Daten und andererseits nach dem Trockensubstanz- (TS-) Gehalt der Maispflanze. Es sollte ein möglichst breiter Bereich an Spektren wie auch an TS-Gehalten bzw. Inhaltsstoffen in die Kalibration einfließen, damit mit einer Kalibration die gesamte Variation an Maisgenotypen mit verschiedenster Zusammensetzung bewertet werden könnte.

Insgesamt basierte der Datensatz zur Kalibrationserstellung auf 426 Proben aus den Jahren Erntejahren 2002 bis 2007. Das gesamte Material spiegelte die Variationsbreite von heimischen und exotischen Sorten zur Biogasnutzung wider. Der TS-Gehalt lag zwischen 14,6 bis 51,8 %. Die Zusammensetzung der Pflanze variierte in einem weiten Bereich. So lag in der Trockenmasse beispielsweise der Gehalt an Stärke zwischen 0 und 47,9 % und an enzymlöslicher organischer Substanz (ELOS) zwischen 49,3 und 79,0 %.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Der Datensatz wurde auf unerklärliche Ausreißer der Spektren und Referenzwerte untersucht. Insgesamt wurden 13 Proben entfernt. Für die Erstellung des Kalibrationsdatensatzes wurden die übrigen 413 Proben nach ihrer Methanausbeute sortiert und jede zweite Probe ausgewählt. Aus dem verbliebenen Proben wurden über den gesamten Wertebereich verteilt weitere Proben gewählt sowie die Proben mit den höchsten und niedrigsten Werten. Auf diese Weise wurde ein Kalibrationsdatensatz mit 275 Proben und ein Validationsdatensatz mit 138 Proben erstellt. Einen Überblick über die Werteverteilung im Kalibrations- und Validationsdatensatz gibt *Abb. 1*. Der Mittelwert für Methan betrug im Kalibrationsdatensatz  $331 \text{ NI (kg OTM)}^{-1}$  und im Validationsdatensatz  $333 \text{ NI (kg OTM)}^{-1}$ . Die jeweiligen Standardabweichungen waren  $15,7$  und  $11,1 \text{ NI (kg OTM)}^{-1}$ .

Es zeigt sich, dass die Werte normal verteilt waren. Hohe oder niedrige Werte wurden nur selten bestimmt und der Anteil an Proben mit durchschnittlichen Methanausbeuten war sehr hoch.



*Abb. 1:* Werteverteilung im Kalibrations- und Validationsdatensatz

Zur Berechnung einer geeigneten Kalibration zur Bewertung der Methanausbeute von Mais wurden verschiedene Verfahren und Kombinationen zur Ableitung und Streulichtkorrektur geprüft. Dieses waren unter anderem (1,4,4), (2,10,10), (3,20,20) und (2,20,20) mit den Streulichtkorrekturen SNVD, SMSC, WMSC und IMSC. Als Regressionsverfahren wurde MPLS genutzt. Während der Kalibrationsentwicklung sind einige Proben von der Software als Ausreißer definiert worden. Diese sind im endgültigen Datensatz, auf denen die jeweiligen Kalibrationen basieren, nicht mehr enthalten. Aus diesem Grund ist die Anzahl der Proben sowie Minimum-, Maximum- und Mittelwert und Standardabweichung vom Ausgangsdatsatz verschieden. Im folgenden (*Tab. 1*) werden nur die Ergebnisse der Kombination dargestellt, die die besten statistischen Parameter der Kalibrationsentwicklung aufwies. Einige andere Kombinationen wiesen ähnliche statistische Werte auf. Es gab keine Methode, die sich von den anderen in ihrer Güte abhob. Die beste Kalibration führte zu einem RSQ von 0,58. Das Bestimmtheitsmaß für die interne Kreuzvalidierung (1-VR) lag bei 0,54. Dieser Wert ist sehr niedrig.

*Tab. 1: Ergebnis der besten Methode (MPLS, IMSC (2,20,20)) zur Kalibrationsberechnung und internen Kreuzvalidierung für Methan (NI (kg OTM-1))*

N*	Min	Max	MW	SD	SEC
259	292	357	332	12,6	8,1
RSQ	F	SECV	1-VR	SEP	Bias
0,58	8,8	8,6	0,54	7,9	-0,01

\*: N: Probenanzahl, Min: Minimumwert, Max: Maximumwert, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, SEC: Standardfehler der Kalibrierung, RSQ: Bestimmtheitsmaß der Kalibrierung, F: F-Wert der Kalibrierung, SECV: Standardfehler der internen Kreuzvalidierung, 1-VR: Bestimmtheitsmaß der internen Kreuzvalidierung, SEP: Standardfehler der Vorhersage, Bias: mittlerer systematischer Fehler, um den alle Proben durchschnittlich über- bzw. unterschätzt werden

Das Bestimmtheitsmaß nach externer Validierung war etwas kleiner als nach interner Kreuzvalidierung und betrug 0,50. Der Mittelwert der Referenzwerte des Validationsdatensatzes sowie der Mittelwert der mithilfe der Kalibration berechneten Werte war 333 NI (kg OTM)<sup>-1</sup>, die Standardabweichung lag bei 11,1 und 8,8 NI (kg OTM)<sup>-1</sup>. In *Abb. 2* ist die Beziehung zwischen den Laborwerten und den berechneten Werten für die Kalibration mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß (MPLS, IMSC, 2,20,20) dargestellt.

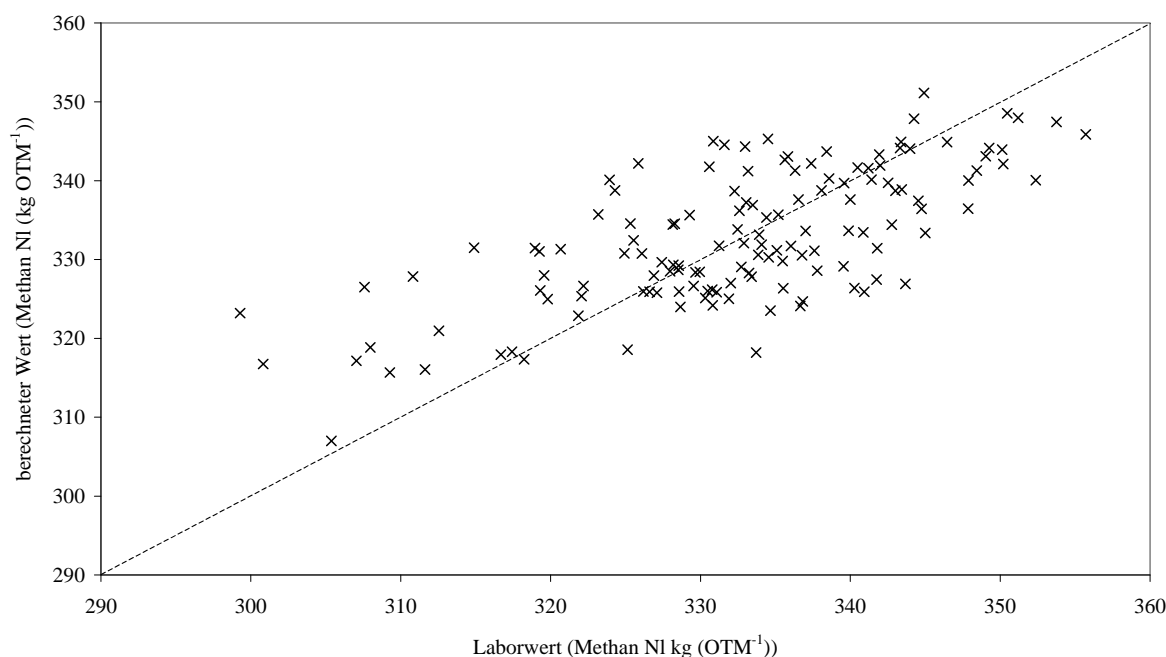


Abb. 2: Korrelation zwischen den Laborwerten und den berechneten Werten im Validationsdatensatz für das Merkmal Methanausbeute

Es wird deutlich, dass die niedrigen Laborwerte durch die Kalibration höher geschätzt werden und die Werte oberhalb des Mittelwertes unterschätzt werden. Dies zeigt sich auch in einem *Slope* von 0,89. Je näher dieser Wert bei 1 liegt, desto besser ist die Schätzung. Eine Korrelation von 0,7 zwischen den berechneten Werten und Laborwerten im Validationsdatensatz reicht für eine Bewertung von Maisgenotypen nicht aus.

Im Folgenden sollen einige Faktoren, die die Güte einer Kalibration beeinflussen, diskutiert werden. Diese können Eigenschaften der Probe (z.B. Vermahlungsgrad und -art, Feuchtigkeit, Verschmutzung, Zusammensetzung oder Schüttdichte) oder der Probenherkunft sein. Die Probenherkunft war verschieden, spiegelte aber die Variation wider, die auch durch eine Kalibration später erfasst werden sollte. Es war kein Gruppeneinfluss feststellbar. Die Probenaufbereitung (Ernte, Trocknung, Lagerung, Vermahlung) war bei allen Proben vergleichbar, so dass große Effekte durch die Probe ausgeschlossen werden können.

Einen weiteren Grund kann die Referenzanalytik darstellen. Den HBT zeichnen drei wesentliche Aspekte aus: die geringe Probenmenge, die Verwendung von frischem, getrocknetem und nicht von siliertem Material, die Vermahlung auf 1 mm. Durch die geringe Einwaage besteht ein Risiko des Einwaagefehlers. Der Durchführung ist daher eine große Genauigkeit abzuverlangen, weit mehr als in vergleichbaren Methoden, die mit größeren Probenmengen arbeiten. Auch ist der Probenbereitstellung, der Homogenität der Probe bei geringeren Mengen größeres Augenmerk zu schenken. Eine ungenaue Probennahme oder Entmischungen haben einen stärkeren Einfluss auf das Ergebnis bei kleiner Probenmenge als bei großer. Durch die Verwendung von frisch getrocknetem Material können vor allem Effekte durch die Silagebereitung vermieden werden. Sortenunterschiede, die auf die Zu-

sammensetzung der Pflanze zurückzuführen sind, werden bei frisch getrocknetem Material nicht durch den Siliereinfluss überlagert.

Im Vergleich mit anderen Methoden zeigt der HBT einen niedrigen Variationskoeffizienten von unter 10 %. HELFFRICH & OECHSNER (2003) gaben für ihre Untersuchungen mit dem HBT einen Variationskoeffizienten von 7,1 % an und bezeichnetem solche Schwankungen in biologischen Prozessen als normal. Bei LINKE & MÄHNERT (2005), NEUREITER et al. (2005) und KAISER (2007) wurden größere Streuungen der Werte festgestellt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Daten eine gute Qualität aufwiesen.

Nach Analysen von HELFFRICH & OECHSNER (2003) hat die Probenaufbereitung keinen Einfluss auf die Höhe der Gasausbeute. Die Zerkleinerung des Materials auf 1 mm geht nicht mit einer Zerstörung der Zellwände und Zellen einher, da die Siebgröße dafür zu groß ist. Daher kommt es nicht zu einem Aufschluss der Zellen und nicht zu einer möglichen Erhöhung der Gasausbeute.

Eine weitere Fehlerquelle kann das Gerät zur Spektrenaufnahme darstellen. Es wurden alle Spektren mit demselben Gerät aufgenommen, das in einem klimatisierten Raum stand. Die Spektrenaufnahme wurde regelmäßig anhand eines Standards kontrolliert und mögliche Verschiebungen korrigiert.

Die Qualität des Modells wird zudem von der Auswahl und Anzahl der Proben beeinflusst. Im Allgemeinen gilt, dass die Anzahl der Proben, die für eine funktionierende Kalibration benötigt wird, mit der Komplexität des Merkmals ansteigt. In diesem Projekt wurden über 400 Proben analysiert von denen über 200 zur Kalibrationserstellung genutzt wurden. Eine Anzahl, die als ausreichend anzusehen ist. Ein Nachteil kann darin gesehen werden, dass die Proben normal verteilt waren. Die äußeren Wertebereiche waren nur mit einer geringen Probenanzahl abgedeckt. Eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten Wertebereich wäre besser gewesen. Allerdings war dieses nicht möglich, da der größte Teil der Werte relativ eng um den Mittelwert schwankte. Dieses lag jedoch nicht an einer unzureichenden Probenauswahl, sondern spiegelte die Werteverteilung in allen Versuchen wider. Außerdem sind die Ausreißer- und Datenvorbehandlung und das Regressionsverfahren Einflussfaktoren. Es wurden verschiedene Verfahren und Regressionsmodelle getestet, die sich in der Güte nicht signifikant unterschieden.

Möglicherweise ist die geringe Korrelation zwischen den Spektren und der Methanausbeute nicht auf die Kalibrationsentwicklung zurückzuführen, sondern die Methanausbeute von Mais basierend auf dem HBT, ist ein Merkmal, dass sich nicht exakt mit NIRS an frischen, getrockneten und vermahlenden Proben schätzen lässt. Es wird vermutet, dass sich die Unterschiede in der pflanzlichen Zusammensetzung vor der Befüllung des Fermenters nicht in der Biogasausbeute im gleichen Maße widerspiegeln. So waren die Korrelationen zwischen den Inhaltsstoffen und Qualitätsmerkmalen, die sehr gut mit NIRS bestimmbar sind, und der Methanausbeute gering. Über den gesamten Datensatz gerechnet betrug die Korrelation zwischen dem Stärkegehalt und der Methanausbeute beispielsweise 0,39 und zwischen ELOS und der Methanausbeute 0,45. Es würde aber die Annahme nahe liegen, dass Pflanzen mit höheren ELOS Werten auch eine höhere Gasausbeute zeigen würden. Die Zeit im Fermenter ist jedoch sehr viel länger als im Verdauungstrakt eines Wiederkäuers, so dass auch schwerer abbaubare Stoffe im Lauf der Zeit abgebaut werden können. So können Pflanzen, die sie sich in den Inhaltsstoffen und Verdaulichkeitsmerkmalen deutlich unterschieden haben, eine ähnliche Methanausbeute erreichen, da sich die Unterschiede während der Zeit im Fermenter nivelliert haben. Vermutlich variiert die Methan-

ausbeute daher wesentlich weniger als die Inhaltsstoffe. Die geringe Variation in der Methanausbeute zeigt sich daher auch nicht in den Spektren, die die Verschiedenheit der Inhaltsstoffe vor der Bestimmung der Biogasausbeute widerspiegeln.

## 4 Schlussfolgerung

Das Projektziel, eine NIRS-Kalibration zur genauen Vorhersage der Methanausbeute von frischem Mais auf Grundlage des HBT zu erstellen, konnte nicht erreicht werden. Die Korrelation zwischen den Laborwerten und den berechneten Werten lag nur bei 0,7, ein Wert, der deutlich zu niedrig ist, um die Kalibration zur Bewertung von Maisgenotypen einsetzen zu können. Obwohl eine große Anzahl Proben, die eine weite Spanne in den Inhaltsstoffen zeigte, in die Kalibrationsentwicklung eingeflossen ist, war die Variation des Merkmals Methan relativ gering. Es wird angenommen, dass die Unterschiede in der Zusammensetzung des frischen Materials nach der relativ langen Zeit im Fermenter zu einem beträchtlichen Teil ausgeglichen worden sind. Aus diesem Grund können die Biogaswerte auch nicht durch die Spektren, durch die sich das frische Material sehr gut differenzieren lässt, dargestellt werden. Weitere Arbeiten an der Kalibration, z.B. durch den Einbau zusätzlicher Proben mit niedrigen und hohen Gaswerten, könnten die Korrelation möglicherweise etwas verbessern, eine Eignung zur Sortenbewertung würde aber vermutlich nicht erreicht werden. Dieses ist vor allem auf die geringe Variation in der Methanausbeute bei Mais zurückzuführen. So sind die Unterschiede zwischen den Genotypen zumeist nur von geringer Relevanz für den Methanertrag pro Hektar, die Zielgröße beim Anbau von Mais zur Biogaserzeugung, so dass einer NIRS-Kalibration zur Bewertung der Methanausbeute von Mais zur Zeit nicht die große Bedeutung zugemessen wird, von der zu Beginn des Projekt ausgegangen wurde.

## Literaturverzeichnis

- DILLER, M. (2002): Untersuchungen zur NIRS-Methodenentwicklung für Kartoffeln aus dem Organischen Landbau unter Berücksichtigung von Jahrgangs- und Sorteneinflüssen. Diss. Univ. Bonn.
- HELFFRICH, D. and H. OECHSNER (2003): Hohenheimer Biogasertragstest. Agrartechnische Forschung 3, 27-30
- KAISER, F. (2007): Einfluss der stofflichen Zusammensetzung auf die Verdaulichkeit nachwachsender Rohstoffe beim anaeroben Abbau in Biogasreaktoren. Dissertation. Technische Universität München
- LINKE, B. and P. MÄHNERT (2005): Einfluss der Raumbelastung auf die Gasausbeute von Gülle und Nachwachsenden Rohstoffen. In : Biogas - Nachwachsende Rohstoffe. Tagungsband zur 14. Jahrestagung des Fachverband Biogas e.V.; Nürnberg. 33-46.
- NEUREITER, M., J. TEIXEIRA PEREIRA DOS SANTOS, C. PEREZ LOPEZ, H. PICHLER, R. KIRCHMAYR and R. BRAUN (2005): Effect of silage preparation on methane yields from whole crop maize silages. In Ahring, B.K. & Hartmann, H. (eds), Proc. 4th Int. Symposium Anaerobic Digestion of Solid Waste, Copenhagen, Vol.1: 119-115
- TILLMANN, P. (1996): Kalibrationsentwicklung für NIRS-Geräte. Eine Einführung. Göttingen, Culliver.

Das diesem Artikel zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft unter dem Förderkennzeichen 22 000 303 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

## **Hydrogen and methane: Enhanced methane as well as hydrogen production and increased process stability by sensorik control**

N. Weran

Bioenergie + Umwelttechnik GmbH, Puntigamerstraße 125-127, 8055 Graz, Austria

### **Zusammenfassung**

Die einstufige Prozessführung zur Biogasproduktion in Kofermentation von nachwachsenden Rohstoffen oder organischen Reststoffen ist verfahrenstechnisch als schwierig anzusehen, da es aufgrund der Bildung von Schwimm- und Sinkschichten nur mit großem Rühraufwand möglich wird die Suspension im Fermenter zu homogenisieren.

Eine Steuerung bzw. Regelung des Prozesses mittels Sensoren ist praktisch nicht möglich. Dies wird durch die die Trennung der 4 Phasen der Biogasfermentation in 2 Stufen erheblich verbessert. Durch eine optimierte Steuerungs- und Regeltechnik wird die Prozessstabilität, die Methanausbeute und somit die Wirtschaftlichkeit von Biogasanlagen deutlich erhöht. Weiters erlaubt diese Art der Fermentation die biologische Produktion zweier Energieträger, Wasserstoff und Methan, in einer biologischen Anlage zu realisieren.

### **Summary**

The single-step processing for biogas production by co fermentation of energy plants or organic residual substances is very difficult regarding to process engineering. Due the formation of swimming and sinking layers a high mixing effort has to be done to homogenise the suspension in the fermenter.

A controlling and/or a regulation of the process by the use of sensors practically are not possible. This is substantially improved by the separation of the 4 phases of the biogas fermentation in 2 stages. By the usage of an optimised control system the process stability, methane yield and thus the economy of the whole biogas plant will be increased. Further the production of two energy sources, hydrogen and methane, in one biological energy plant will be possible.

### **Key Words:**

Sensor Technique – Process Stability – Hydrogen – Methane

# 1 Introduction

## 1.1 Problem of the state of the art

In a traditional or state-of the art biogas plant the four phases of anaerobic digestion known as hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis take place in parallel in one fermenter. This single-step building method had its authorization for the pure fermentation of liquid manure or other liquid substrates, because this building method is relatively favourable and simple.

With the beginning of the co fermentation of renewable raw materials like maize silage and liquid manure the problems in view to the homogeneity of the substrate started. The mixture of silage and manure shows a distinct tendency to segregate and separate into sinking and swimming layers. To prevent this strong mixers are necessary to bring the separated phases of substrates to one homogenous pulp appropriate for the microbes. The other way of homogenisation is the substrate preparation by cutting and crushing the raw material which is also very energy intense. (AUTORENKOLLEKTIV, 2004)

The process approach followed by the two-step fermentation is to optimise the biological procedure that happens in the fermenter during the anaerobic degradation of the raw material (CROWTHER, 1975). Therefore the four phases of digestion are divided in two steps, the hydrolysis which combines the hydrolysis, the acidogenesis and a part of the acetogenesis and the methanogenesis where the process of the methane production takes place. Those two steps occur in two separate reactors working in one process flow.

## 1.2 The idea of the two-step biogas plant

By the dividing of the four phases of anaerobic digestion into the two steps, named by the main biochemical process first step or hydrolysis reactor and second step methanogenesis reactor a better disintegration of the substrate should occur. The better digestion should lead directly to a higher biogas yield.

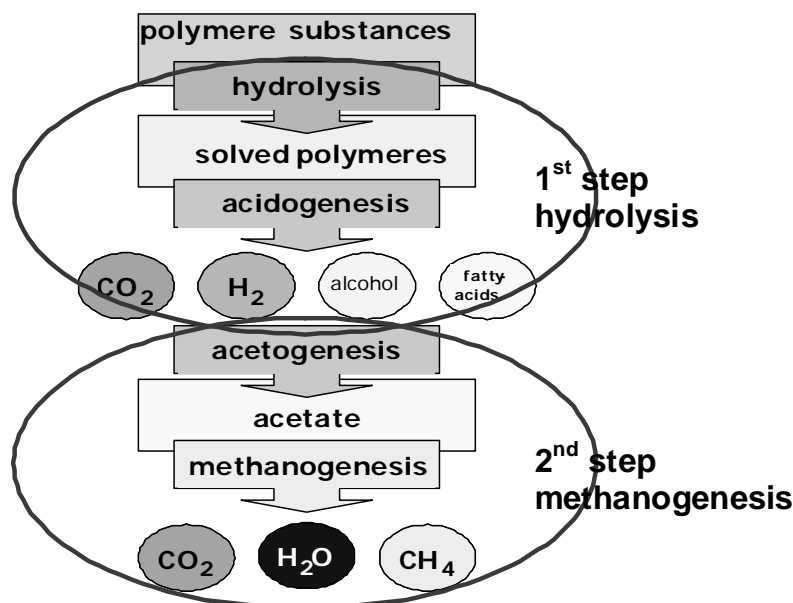


Fig. 1: Schema of the division of the four phases of anaerobic digestion in the two-step fermentation (own drawing acc. THOMÉ-KOZMIENSKY, 1989)



The schema in *figure 1* should explain the definition of the two steps. Having a closer look to the doubling times and the pH-optima of the micro-organisms, as shown in, shows that the separation of the digestion into two steps makes sense.

*Tab. 1: The four phases of anaerobic digestion, their species including the pH-optima and the doubling times (LAMED, 1987; THOMÉ-KOZMIENSKY, 1989; WEILAND, 2003)*

Phase	Species	pH-Optima	Doubling Time
hydrolysis	<i>Clostridium</i> <i>Bacteroides</i> <i>Ruminococcus</i> <i>Acetovibrio</i>	pH 5.2 - pH 6.3 degradation of cellulose is faster at 6.7	24 – 36 h
acidogenesis	<i>Clostridium</i> <i>Micrococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Bacteroides</i>	pH 5.2 - pH 6.3	24 – 36 h 30 min
acetogenesis	<i>Acetobacterium</i> <i>Acetobacter</i> <i>Syntrophobacter</i> <i>Desulfovibrio</i>	pH 7	1.5 – 4 d
methanogenesis	<i>Methanoscarcina</i> <i>Methanotrix</i> <i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacter</i> <i>Methanococcus</i> <i>Methanomicrobium</i> <i>Methanospirillum</i>	pH 7 – 7,5	5 – 15 d

Especially the doubling times and the pH-optima of the bacteria of the hydrolysis and the acidogenesis are almost the same. From this point of view it makes sense to put them in one reactor with their optimised conditions. Regarding the pH-optima and the doubling times of the acetogenic and the methanogenic bacteria and thinking of the fact that they prefer to share one habitat for the interspecies hydrogen transfer it also makes sense to separate them from the others. The optimised pH-value for the hydrolytic and the acidogenic micro-organisms is between 5.2 up to 6.3, for the acetogenic and the methanogenic it is at pH 7 to 7.5. In the particular pH-range the biochemical reactions occur at their best. (WEILAND, 2003)

In this case it is possible that the hydrolysis vessel is much smaller than the methanogenic.

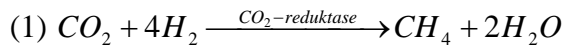
In traditional or state of the art biogas plants the process management orientates on the pH-value of the methanogenic bacteria the pH-value turns into 7 to 8 because of the complex buffer system in the fermenter. (LINKE, 2005; WEILAND, 2003)

By the separation of the microbic groups by their biochemical demands it is also possible to increase the organic loading in the first step, because the hydrolytic and the acidogenic bacteria do not react on a high nutrient loading that sensitive as the acidogenic and the methanogenic microbes.

## 2 Hydrogen and methane production

The production of hydrogen is an inevitable process happening by the anaerobic digestion of organic substances. This happens especially during the acidogenic phase of degradation (cp. *figure 1*). In the biogas generation process the hydrogen is passed to the micro-organisms of the third, the acetogenic phase in which the in parallel produced carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) is reduced to methane enzymatically catalysed by the CO<sub>2</sub>-reductase (cp. 1).

The CO<sub>2</sub>-reductase was found in every examined methanogenic micro-organism. (SCHLEGEL 1992)



The concentration of dissolved and gaseous H<sub>2</sub> is in direct combination with the organic loading of the fermenter (volumetric loading). At a low volumetric loading (up to 3 kg oDS/m<sup>3</sup>\*d) the gaseous part of H<sub>2</sub> is lower than 1% in the total biogas. (LIU, 2006; SCHÖFTNER 2007)

With higher organic loading the gaseous part of the H<sub>2</sub> concentration is increasing also. (ANGELIDAKI, 1993) Due this the concentration of gaseous H<sub>2</sub> can also be taken as a measurement parameter for overloading of the fermenter in conventional single step biogas plants. The sensors and the measurement even of low concentrations (lower than 1% of hydrogen in the total biogas) works excellent but the only problem is the reaction time in the feeding. When the sensoric data shows that the fermenter is going to be overloaded the substrate is already brought in the reactor and has to be digested more or less.

The balance between the micro-organisms is quite instable. On the one hand the H<sub>2</sub> produced by the acidogenic organisms is essential for the electron transfer of the acetogenic bacteria but too high concentrations of H<sub>2</sub> are inhibiting the enzymatic complex. By this the methane production breaks down. (ANGELIDAKI, 1993; KALLE, 1984)

Together with H<sub>2</sub> also CO<sub>2</sub> and hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) is produced during anaerobic digestion. For an energetic usage of the produced hydrogen the H<sub>2</sub>S must be removed.

By a constructional separation of the hydrolytic and the methanogenic fermenter with separated gas lines it is possible to produce two energy carrier, hydrogen and methane, on one renewable energy plant.

### 2.1 Batch-fermentation tests

To get an idea of the possible biogas yields and the quality of the produced gas the model substrates maize silage and kitchen waste, both taken from real biogas plants, were digested in batch-fermentation-tests in 1 litre bottles at 37°C.

To simulate the two-step anaerobic fermentation the batch-tests also were performed in two steps. Therefore several hydrolysis tests with increasing organic loading, starting at 2% dry substance (DS) up to 9% dry substance in the mixture were carried out. The increasing organic loading was necessary to find out the optimum regarding the maximum of H<sub>2</sub> yield and the maximum of acetate.

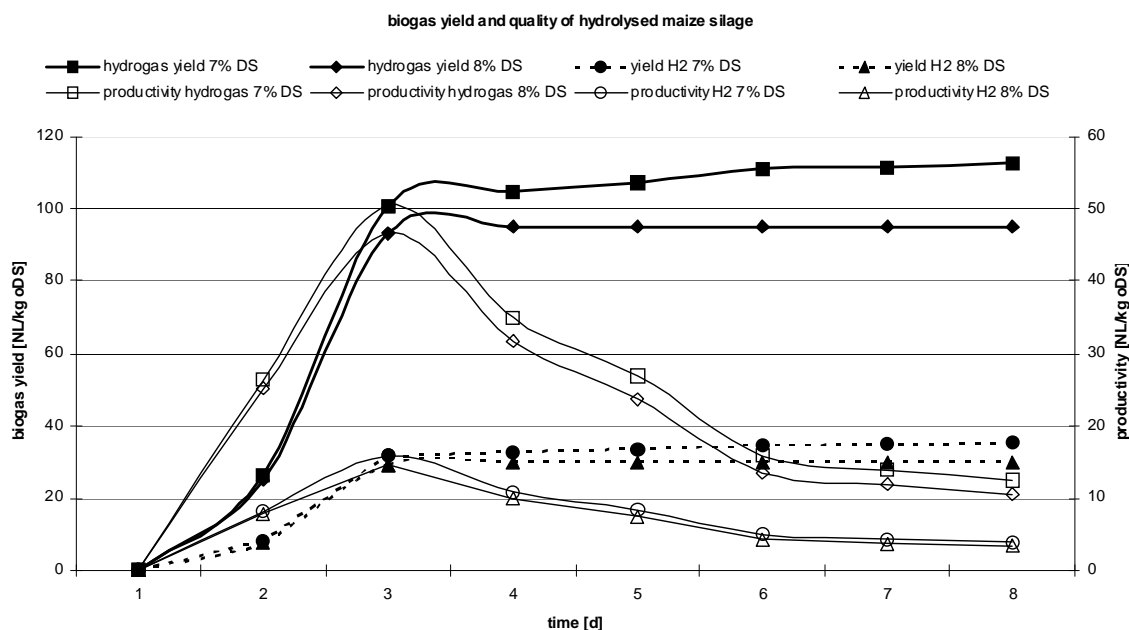
For the methanogenic batch-tests a several amount of hydrolysed substrate was fermented again to measure the biogas amount and the gas quality.

For the hydrolytic tests heat inactivated sludge was used to inactivate the methanogenic organisms, for the methanogenic tests the native sludge was used.

The batch-tests were carried out following the DIN 38414-S8. The gas quality was analysed daily by gas chromatography.

### 2.1.1 Fermentation of maize silage

The best results regarding the biogas yield and the gas quality of the maize silage hydrolysis showed the tests with 7% and 8% dry mass in the mixture as shown in *figure 2*. The optimised hydraulic retention time for the hydrolysis of maize silage is between three and four days. The best yield of 115 NL/kg oDS was reached with the organic loading of 8% DS and 18 NL/kg oDS H<sub>2</sub> or 15.6%.



*Fig. 2: Hydrolysis of maize silage with 7% and 8% dry mass in the mixture (WERAN, 2008)*

The hydrolysate was fermented in the methanogenic batch-tests to see if the best hydrolytic tests are also the best in the methanogenic fermentation as shown in *figure 3*. It showed that there is a direct connection between the highest hydrogen yield and the highest methane yield, 750 NL/kg oDS in total and 390 NL/kg oDS methane or 52.0%.

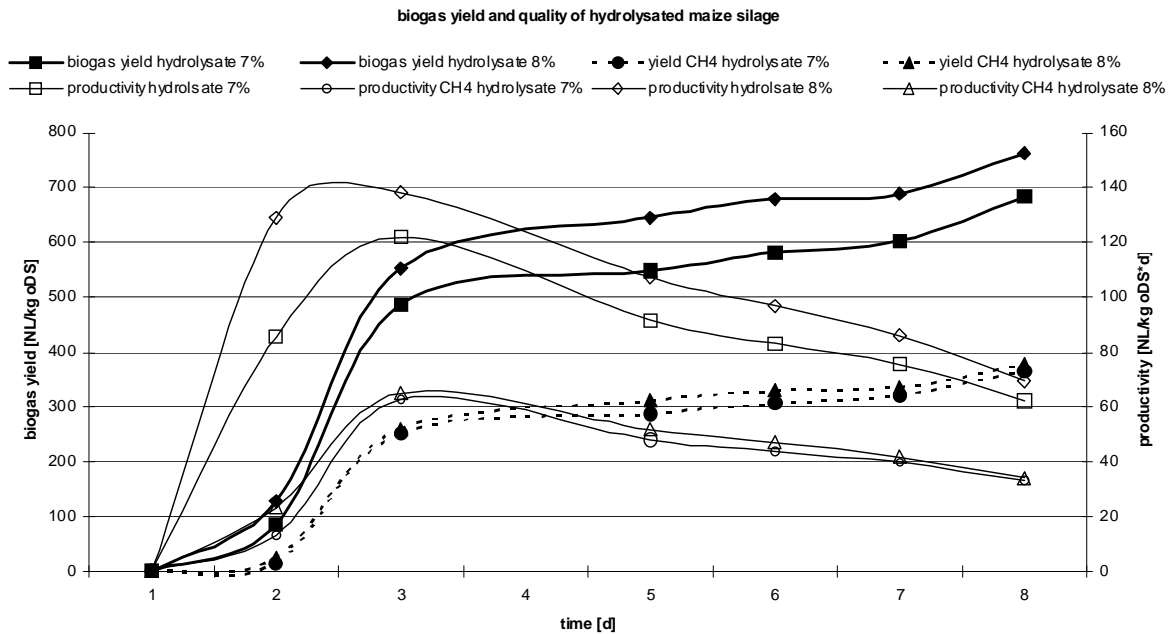


Fig. 3: Fermentation of the hydrolysate of 7% and 8% dry mass of maize silage (WERAN, 2008)

### 2.1.2 Fermentation of kitchen waste

The best results regarding the biogas yield and the gas quality of the kitchen waste hydrolysis showed the tests with 5% and 6% dry mass in the mixture as shown in *figure 4*. The optimised hydraulic retention time for the hydrolysis of maize silage is between two and three days. The best yield of 90 NL/kg oDS was reached with the organic loading of 6% DS and 22 NL/kg oDS H<sub>2</sub> or 24.4%.

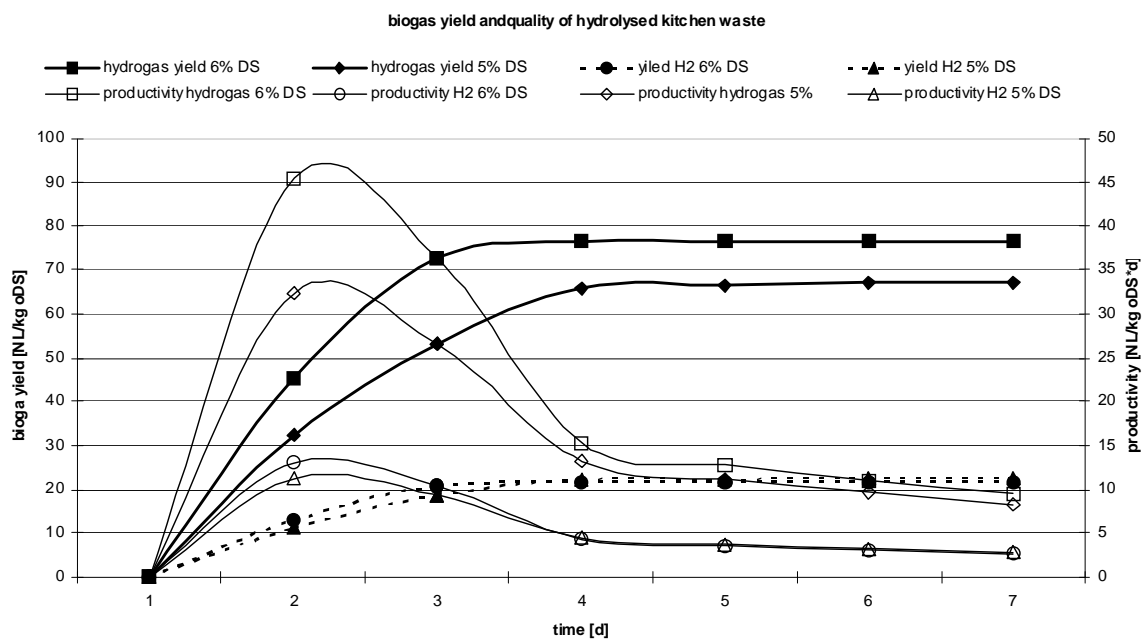


Fig. 4: Hydrolysis of kitchen waste with 5% and 6% dry mass in the mixture (WERAN, 2008)

The hydrolysate was fermented in the methanogenic batch-tests to see if the best hydrolytic tests are also the best in the methanogenic fermentation as shown in *figure 5*. It showed that there is a direct connection between the highest hydrogen yield and the highest methane yield, 750 NL/kg oDS in total and 390 NL/ kg oDS methane or 52.0%.

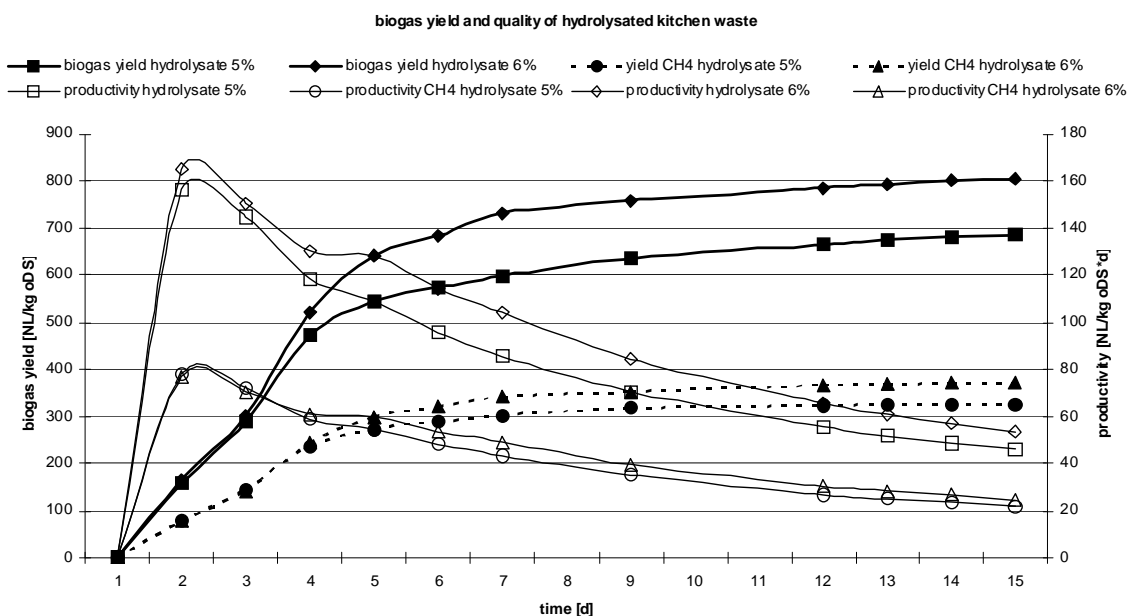
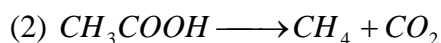


Fig. 5: Fermentation of the hydrolysate of 5% and 6% dry mass of kitchen waste (WERAN, 2008)

If the hydrolysis works well the micro-organisms of the first step, the hydrolytic and the acidogenic bacteria degrade the long-chained substrate into the short-chained fatty acids. The most important acid is the acetate because it is directly enzymatically degraded by the methanogenic micro-organisms to  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  (cp.(2)).



Even though all methanogenic bacteria have the  $\text{CO}_2$ -reductase enzyme about 70% of the whole methane production is done by the cleavage of acetate. Therefore the acetate concentration in the fermenter regarding the single step fermentation is very important to measure and to control. In case of the two-step fermentation the acetate concentration is an important value for the quality of the hydrolysate.

The propionate and the butyrate concentrations are also very important. The propionate is produced by the degradation of odd-numbered fatty acids. This parameter is so important because too high propionate concentrations (more than 500 mg/L) are inhibiting the process.

The formation of butyrate is a way of storage strategy of the micro-organisms. In case the kinetics of acetate degradation is low the formation of butyrate is increasing. As soon as the acetate degradation kinetics is increasing the butyrate is degraded to acetate also. (ANGELIDAKI, 1993)

Tab. 2: Comparison of the hydrolysis of maize silage and kitchen waste with regard to the short chained fatty acids and the hydrogen and methane yield (OCHS, 2008)

	maize silage hydrolysate			kitchen waste hydrolysate		
	6	7	8	5	6	7
organic loading hydrolysis [% DS]	6	7	8	5	6	7
max. H <sub>2</sub> -yield [NL/kg oDS]	15	18	9	20	22	10
acetate [mg/L]	3.550	3.800	4.450	2.700	3.600	4.800
propionate [mg/L]	550	320	385	1.000	1.200	780
butyrate [mg/L]	310	9.200	9.600	8.100	8.700	5.800
acetate equivalent [mg/L]	4.825	17.718	19.151	16.022	18.967	14.357
max. CH <sub>4</sub> -yield [NL/kg oDS]	330	380	390	320	390	270

The direct comparison of the hydrolysis of maize silage and of kitchen waste with the concentration of the short-chained fatty acids, the hydrogen and the methane yield in *table 2* shows a correlation between the maximum hydrogen yield and the highest acetate equivalent concentration which leads to a high methane yield.

The higher concentration of propionate by the hydrolysis of kitchen waste is because of the higher concentration of odd-numbered long-chained fatty acids. For the further fermentation in the methanogenic reactor this is because of the ratio acetate to propionate no problem. (SCHÖFTNER, 2007)

Regarding the productivity of the hydrolysis of maize silage and of kitchen waste it is shown, that the fermentation of maize silage takes longer than the fermentation of kitchen waste because of the higher concentration of celluloses and hemi-celluloses in the maize plant.

### 3 Sensoric controlling

The target of the installation of innovative sensory technique is the increase of the process stability of the biogas plant. Therefore the advantages of the two-step fermentation concept and the constructive division of the hydrolytic and the methanogenic step are used.

In the first step the degradation of the substrate up to the short-chained fatty acids, mainly acetate, propionate and butyrate, occurs. Those short-chained fatty acids will be transferred into the second step where they get converted by the acetogenic and the methanogenic micro-organisms to CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>.

The biochemical degradation of the fatty acids has a direct effect on the pH-value. The degradation of the short-chained fatty acids causes inevitably an increasing of the pH-value. On the contrary the introduction of acetous hydrolysate occurs a decreasing of the pH-value. These effects make it possible to control the pH value of the methanogenic reactor directly by the feeding process of the biogas plant from the first to the second step. The automation will be carried out by a pH-controlled substrate pump.

This makes, a working sensory control postulated, an overloading of the fermenter by too much substrate almost impossible.

### 3.1 Technical appliances for the continuous tests

The continuous fermentations were carried out at 37°C in two 25 litre stainless steel vessels with integrated sensors for the controlling of the process. The level for the overflow was on 20 litres, the headspace for the produced biogas was 5 litres.

The two vessels were connected by a pH-value controlled substrate pump to simulate the continuous mode of operation.

The signals of the sensors were calculated and displayed by a math-lab supported PC programme. The lower and the upper value of the pH-control were able to fix by the programme. The controlling system strategy was pulsed-paused with an adjustable hysteresis.

### 3.2 Continuous fermentation of maize silage

The maize silage for the testing was taken from a biogas plant close to the lab. The feeding of the first step occurred almost every day, except weekend. The organic loading in the fermenter was, as the batch-tests showed the optimum, between 8% and 9% DS.

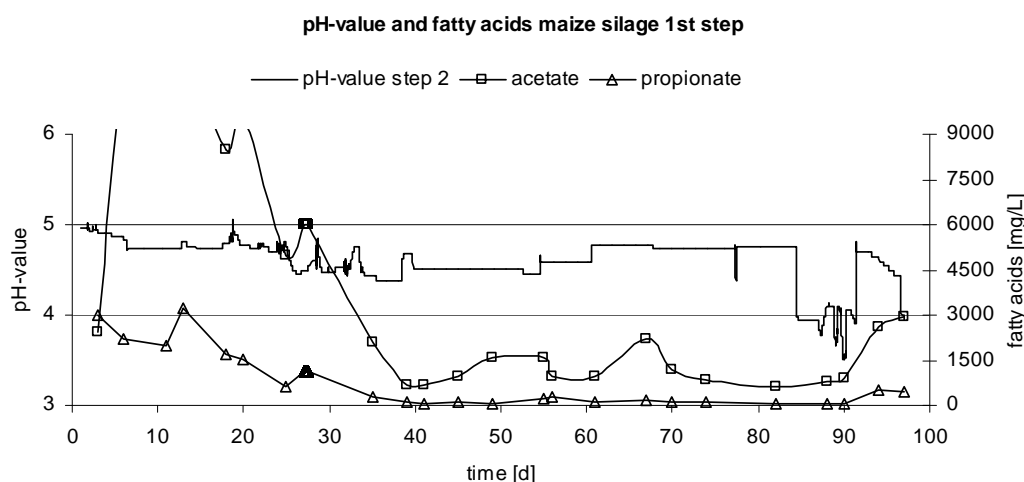


Fig. 6: Fermentation of maize silage 1st step pH-value and fatty acids (OCHS, 2008)

The pH-value of the hydrolysed maize silage pulp as shown in *figure 6* was stable between 5 and 4.5. The micro-organisms took their time to set up a stable hydrolysis. After day 20 the value for the acetate and the propionate went down to values below 3000 mg/L for the acetate and lower than 400 mg/L for the propionate. The monitoring of the short-chained fatty acids is important to prevent inhibitions in the second step.

The hydrolysate of the first step was pumped into the second vessel, the methanogenic reactor, controlled by the pH-value. The control value for the substrate pump was set between 6.9 and 7.5. In case the pH-value is higher than 7.5 the substrate pump provides the methanogenic vessel with acetous hydrolysate to lower the pH-value until it reached the lower set point of 6.9. That is why the graph in *figure 7* shows this saw tooth characteristic. Between the day 80 and 90 there was a problem with the automatic control because of a broken pH electrode. The microbes were able to handle the overloading with substrate easily and after the 10 days the concentration of acetate went lower than 600 mg/L.

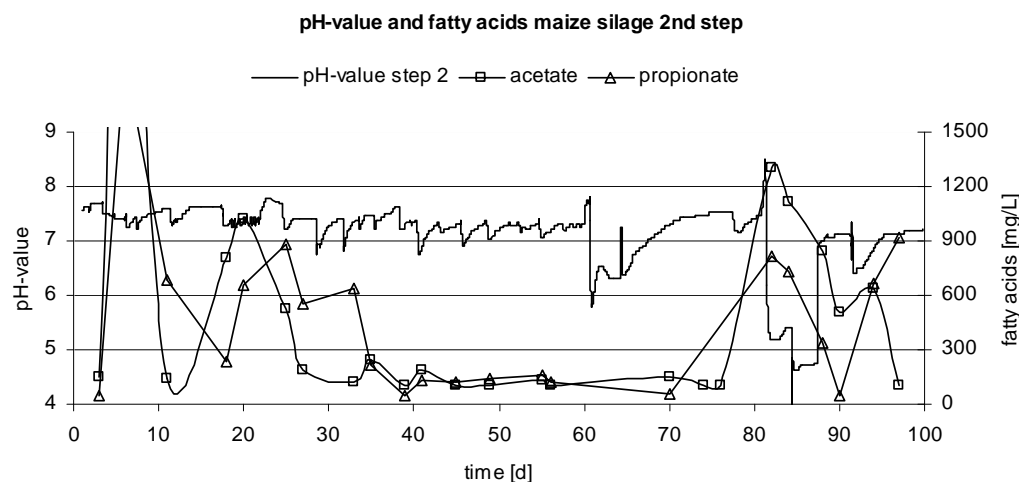


Fig. 7: Fermentation of maize silage 2<sup>nd</sup> step pH-value and fatty acids (OCHS, 2008)

### 3.3 Continuous fermentation of kitchen waste

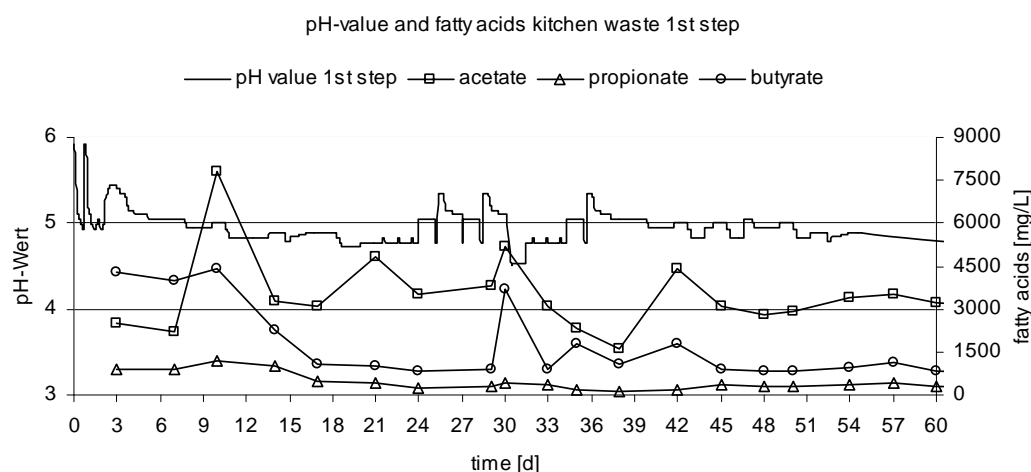


Fig. 8: Fermentation of kitchen waste 1st step pH-value and fatty acids (OCHS, 2008)

The kitchen waste for the testing was taken from a biogas plant that works with those substrates. The kitchen waste was milled and hygienised at the plant.

The feeding of the first step occurred almost every day, except weekend. The organic loading in the fermenter was, as the batch-tests showed the optimum, between 5% and 6% DS.

The pH-value of the hydrolysed kitchen waste pulp as shown in *figure 8* was stable between 5.5 and 4.5. The acetate concentration varied between 3.000 mg/L and 4600 mg/L. The Propionate concentration was stable under a value of 500 mg/L. In this experiment, as *figure 8* shows the butyrate concentration was also measured. It is interesting to see how the concentration of the butyrate follows the acetate. In a stable system the butyrate production is a way to store material of a higher energy yield for the bacteria. In single-step fermentation the value of the butyrate concentration is also used as a parameter for the



substrate inhibition by organic overloading the fermenter. In two-step fermentation those high concentrations of butyrate are no problem, because it is not inhibiting the microbes.

The hydrolysate of the first step was pumped into the second vessel, the methanogenic reactor, controlled by the pH-value. The control value for the substrate pump was set between 6.8 and 7.4. The graph in *figure 9* shows also the typical saw tooth characteristic. This figure also shows the fact, that when there is enough material in the fermenter the substrate loading by the pump stops. Because of the very good buffer in the biogas manure the pH-value does not direct interact with the concentration of the short chained fatty acids. (SCHERER, 2001) This means that the concentration of the acids might be higher than the pH-value might show. Nevertheless the automatisisation controlled by the pH-value works quite well.

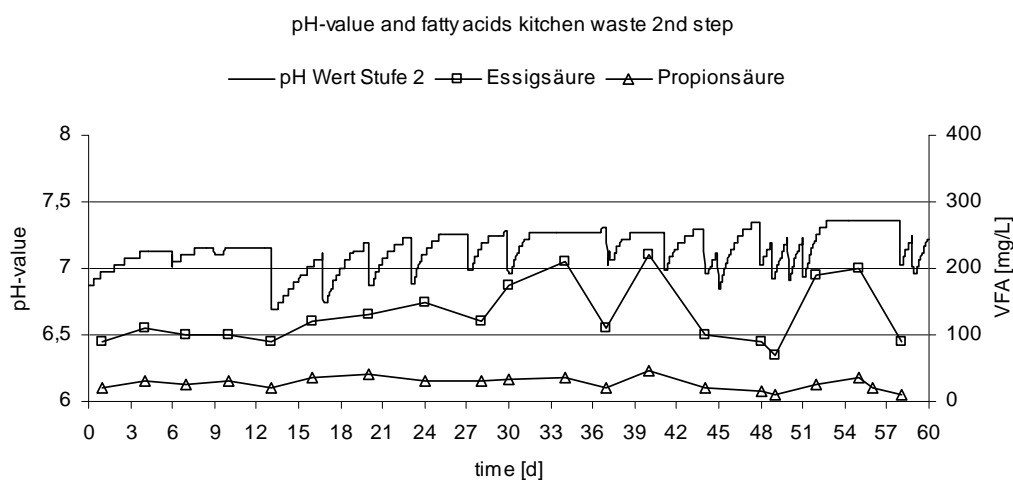


Fig. 9: Fermentation of kitchen waste 2<sup>nd</sup> step pH-value and fatty acids (OCHS, 2008)

The concentration of short chained fatty acids and of the organic loading of the hydrolysis is found in the methanogenic reactor also, as *figure 7* shows. When the concentration of volatile fatty acids like acetate and propionate are high in the hydrolysis vessel, they are also high in the methanogenic reactor. This is because a several amount of substrate is delivered by the pump in time. Due the controlling of the pH-value in the second step the concentration of the fatty acids never got to a dangerous level which would affect an inhibition of the process - higher than 1.000 mg/L acetate and 500 mg/L propionate.

In case of accidents as the breaking of the pH-sensor that affects a short time increasing of the organic loading in the fermenter the micro-organisms are able to cope with temporarily stress.

So the dividing of the four phases of anaerobic digestion in the two steps leads to high process stability. Due the ability of the microbes to cope with stress a high loading of the methanogenic fermenter for a short time is no problem and does not lead that fast to an inhibition as in the single-step process. (SCHÖFTNER, 2007)

## 4 Conclusion

### 4.1 Advantages of the two-step fermentation

- The production of two renewable energy carriers in one plant is possible in principle. The usage of hydrogen for energy production in industrial scale is not state-of-the-art yet. The co-burning of the hydrogen in the gas engine increases the temperature in the combustion chamber and reduces the NO<sub>x</sub> concentration of the exhaust.
- The two-step process combined with sensory supported controlling increases the process stability and prevents the biogas plant of problems by to high organic loading. The micro-organisms are cultivated at their optimised pH-value. Inhibition of the acetogenic organisms are minimised by the separation in the two steps and the stripping of the hydrogen in the first step.
- The additional fermenter for the hydrolysis step offers an additional substrate storage room. By this seasonal variations in the supply of the substrates can be buffered. Due the hydrolysis energy rich substrate, the short chained fatty acids, will be stored and offered to the micro-organisms of the second step. This advantage is more important for biogas plants that use biological waste than for biogas plants that use agricultural goods that will be harvested once a year.
- Nevertheless most of the variations in the quality of the substrates can be buffered.
- The gas quality in the second step is increased if there are different gas lines. The most of the CO<sub>2</sub> is produced in the first step which does not dilute the CH<sub>4</sub> produced in the second step.
- The division of the process in two steps offers the possibility of automatisisation of the whole process without the problems of overloading as in the single step process.

### 4.2 Disadvantages of the two-step fermentation

- Because of the additional fermenter for the hydrolytic step the investment costs for the second-step fermentation are higher than for the single-step fermentation. The costs have to be refunded by the higher process stability and by a higher rate of degradation of the substrate leading to a higher biogas yield from the same amount of substrate.
- The separation of the gas lines for a better gas quality from the second stage lead also to higher investment costs. Because of the H<sub>2</sub>S content of the hydrolytic biogas it should be cleaned by a filter (e.g. bio filter with *Thiobacilli*) which means also additional costs. In case this investment will not be done and the gas from the hydrolysis and the methanogenesis are collected in the same vessel the gas quality is the same as in the single step process.
- The power consumption of the engines of the mixer is higher than in the single step main fermenter due the high organic and volumetric loading. This increases the operational costs.
- The fact, that the hydrogen that is produced in the first step and stripped is missing for the methane generation process by the microbes of the third phase of anaerobic digestion (acetogenic bacteria; cp. (1) is discussed controversial at several symposia. In the

moment there is not found any evidence that there is a lack of hydrogen in the second step fermenter for the methane production.

- There is no market for biological produced hydrogen in the moment.

## References

- ANGELIDAKI, I., ELLEGAARD, L. and AHRING, B.K. (1993): A mathematical model for dynamic simulation of anaerobic digestion of complex substrates: focusing on ammonia inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 159-166.
- AUTORENKOLLEKTIV; HRSG. FACHAGENTUR NACHWACHSENE ROHSTOFFE E. V. (2004): Handreichung – Biogasgewinnung und –nutzung.
- CROWTHER, R. F. & HARKNESS, N. (1975): Anaerobic Bacteria in Ecological Aspects of Used-water Treatment, pp. 65-91. Edited by C. R. Curds & H. A. Hawkes. London, New York, San Francisco: Academic Press.
- LAMED, R., NAIMARK, J., MORGENSTERN, E. & BAYER, E. A. (1987): Specialized Cell Surface Structures in Cellulolytic Bacteria. *Journal of Bacteriology* 169, 3792-3800.
- LINKE, B. und P. MÄHNERT (2005): Einfluss der Raumbelastung auf die Gasausbeute von Gülle und nachwachsenden Rohstoffen in Tagungsband der 14. Jahrestagung des Fachverbands Biogas e. V., S. 33-43
- LIU, DAW.; LIU, DAP.; ZENG, R.J.; ANGELIDAKI, I. (2006): Hydrogen and methane production from household solid in the two-stage fermentation process. Institute of Environment and Resources DTU, Technical University of Denmark
- KALLE, G. P.; MENON, K. K. (1984): Inhibition of methanogenesis and its reversal during biogas formation from cattle manure. *Journal of Biosciences* 6, p. 315 -324
- OCHS, D. und WERAN N., HRSG. BMVIT (2008): Endbericht - HyMeth: erhöhte Methan- sowie Wasserstoffbildung und Prozesssteuerung durch Sensorsteuerung.
- SCHERER P.A., HRSG.: KÄMPFER P. (2001): Mikrobiologie von festen Abfallstoffen in Biologische Behandlung organischer Abfälle. Springer Berlin, Heidelberg, New York.
- SCHLEGEL, H. G. und C. ZABOROSCH (1992): Allgemeine Mikrobiologie; 7. überarb. Aufl.
- SCHÖFTNER, R., SCHNITZHOFFER W. WERAN N.; HRSG. BMVIT (2007): Endbericht - Best Biogas Practise - Monitoring und Benchmarks zur Etablierung eines Qualitätsstandards für die Verbesserung des Betriebs von Biogasanlagen und Aufbau eines österreichweiten Biogasnetzwerks.
- THOMÉ-KOZMIENSKY, K. J. (1989): Biogas Anaerobtechnik in der Abfallwirtschaft. EF-Verlag für Energie- u. Umwelttechnik, Berlin.
- WEILAND, P. (2003): ZNR Biogastagung, Bad Sassendorf-Ostinghausen
- WERAN, N., OCHS, D. und SCHNITZHOFFER W. (2008): erhöhte Methan- sowie Wasserstoffbildung und Prozesssteuerung durch Sensorsteuerung. Poster Biomassetagung Graz März/2008



## **Stabile Kohlenstoffisotope: Eine neue Lasermethode zur Prozessanalyse und Identifikation mikrobiologischer Reaktionen im Biogasprozess**

S. Laukenmann<sup>1</sup>, H. Heuwinkel<sup>2</sup>, A. Gronauer<sup>2</sup> und F. Keppler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Max-Planck-Institut für Chemie, Joh.-J.-Becher-Weg 27, Universitätscampus, 55128 Mainz, Deutschland

<sup>2</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Vöttinger Straße 36, 85354 Freising, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Anhand verschiedener Gärversuche (Batchansatz) wurde erstmalig mittels Laserabsorptionsspektroskopie die Messung stabiler Kohlenstoffisotope am gebildeten Biogas zur Analyse mikrobiologischer Reaktionen eingesetzt. Die Analysen erfolgten mit einem neu entwickelten Laserabsorptionsspektrometer, das im Vergleich zur Massenspektrometrie günstiger, mobil einsetzbar und einfach zu bedienen ist. Zum Vergleich wurden die Proben ebenso mit einer etablierten Messmethode (GC-IRMS) gemessen.

Die Daten erlauben einen Einblick in die Abbaukinetik verschiedener Substrate (Mais, Gras, Zellulose, pures Inokulum) und auch wie sich die Substrate in Gemischen verhalten, bzw. abgebaut werden. Des Weiteren deuteten im Batchansatz die stabilen Kohlenstoffisotopenwerte im Gegensatz zur Gasbildungsrate schon frühzeitig auf eine Erschöpfung des Futterreservoirs hin. In einem kontinuierlichen Gärprozess könnte somit die Isotopensignatur des Methans frühzeitig Aufschlüsse über den Zustand des Gärprozesses liefern. In weiteren Versuchen konnten mithilfe isotopisch markierter Substanzen die Reaktionswege und Abbaukinetik des Acetats (Essigsäure) näher analysiert und identifiziert werden. Die Daten zeigen dabei überraschende Ergebnisse: Zum einen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass in dem verwendeten Inokulum die Methanbildung aus Acetat über eine syntrophe Acetatoxidation als Zwischenschritt verläuft. Zum anderen läuft die Methanbildung insgesamt nur zu einem geringen Anteil über Acetat ab, der wesentliche Anteil der Methanbildung findet schon weit vorher in der Abbaukette des organischen Materials statt.

## Summary

In a series of anaerobic batch experiments we measured the stable carbon isotope signature of the produced biogas using laser absorption spectroscopy to distinguish between microbiologic reaction pathways. The analyzes were performed using a new available laser spectrometer. This technique is suggested to be considerably cheaper, easier in operation and transportable compared to common mass spectrometry. By comparison we measured the same biogas samples with an established method (isotope ratio mass spectrometry).

The data provides a more detailed insight into the degradation kinetics of different substrates (maize, grass, cellulose, inoculum, etc.) and also might help to constrain the degradation of mixed substrates. In the batch experiments the stable carbon signatures clearly indicate the early depletion of the organic resources. We presume that in a continuous digestion process the isotopic signature could act as an indicator of the state of the process.

In several isotope tracer experiments we could analyze the pathway and kinetics of the degradation of acetate and surprisingly, for the applied inoculum we could demonstrate that syntrophic acetate oxidation is the first step of methane generation. The data further suggests that a substantial fraction of methane is produced in an earlier degradation step of the organic material and only a minor part of the formed methane is provided by the acetate pathway.

## Keywords:

anaerobic fermentation, stable carbon isotopes, reaction kinetics

# 1 Einleitung

In den Geo- und Umweltwissenschaften ist die Messung stabiler Kohlenstoffisotope ( $\delta^{13}\text{C}$ -Werte) schon lange als wirkungsvolles Instrument für Untersuchungen verschiedenster physikalischer und chemischer Prozesse bekannt. Die spezifische Isotopensignatur eines Systems fungiert dabei quasi als „Fingerabdruck“ für den bestehenden Zustand und es können damit auch Quellen und Senken entlang von Reaktionspfaden identifiziert werden (Abb. 1). Aus der Veränderung des isotopischen „Fingerabdrucks“ lassen sich so Rückschlüsse auf die an den Reaktionen beteiligten Substanzen und Reaktionsmechanismen schließen. Eine Anreicherung (Fraktionierung) des  $^{13}\text{C}$  in den Reaktionsprodukten zeigt sich in negativen Isotopenwerten, während die Reaktionsedukte (Quellen) isotopisch „schwerer“ werden (positive Werte).

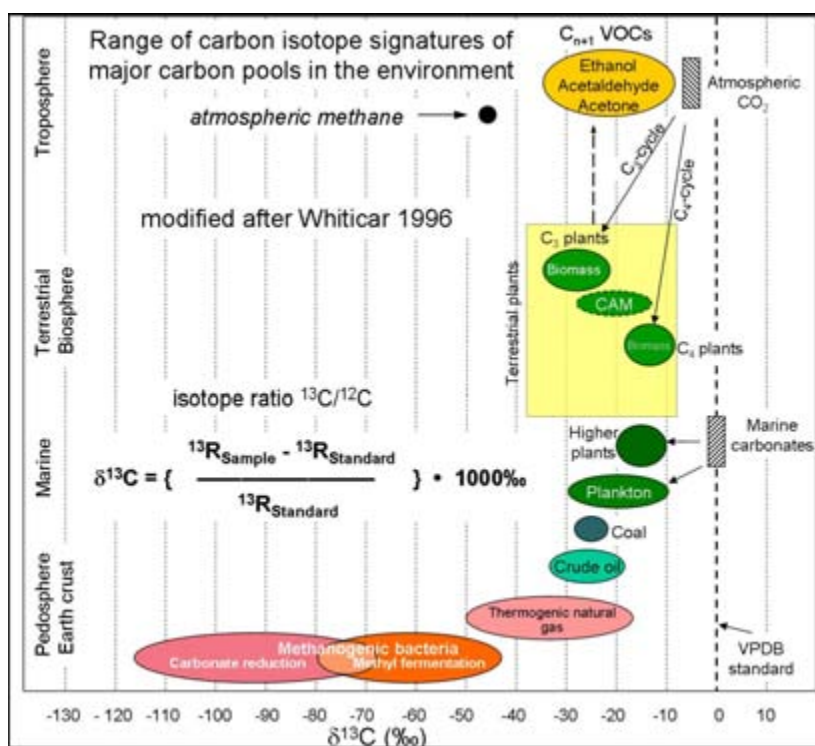


Abb. 1: Isotopensignaturen verschiedener Kohlenstoffquellen in der Natur

Bei Methan war bis vor kurzem die Messung stabiler Kohlenstoff- und Wasserstoffisotope aber nur unter großem apparativem Aufwand und mit Spezialwissen möglich. Seit kurzem gibt es jedoch neuartige Lasermethoden, mit denen relativ einfach und komfortabel das Verhältnis der stabilen Kohlenstoffisotope von  $\text{CH}_4$  und  $\text{CO}_2$  online und mobil direkt im Biogasreaktor erfasst werden können. Bereits durchgeführte erste Anwendungen des Laserspektrometers in einfachen Laborversuchen (Batch-Ansatz) deuten auf viel versprechende Einsatzmöglichkeiten hin.

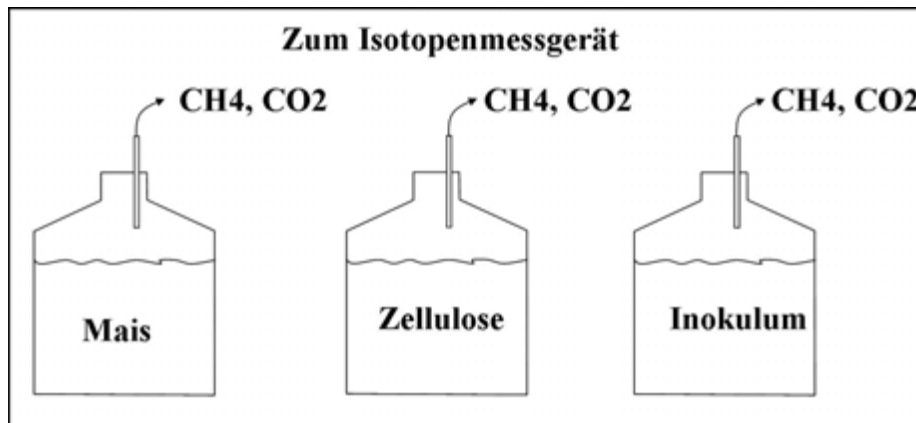
## 2 Versuchsanordnung

Für die Gärversuche wurden 2l Glasfermenter im Batchansatz verwendet. Für die Versuche wurden die Fermenter mit den entsprechenden Substraten bzw. Inokula gefüllt und 30 Tage in einem Wärmeschrank bei 38°C gehalten (Heuwinkel et al. 2009). Die Gaserträge, sowie die Gaszusammensetzung wurden kontinuierlich online erfasst. Gasproben wurden ebenfalls kontinuierlich einmal täglich genommen (20ml in vorher evakuierte 12ml vials).

Es wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt:

- a) Prozessverlauf und Abbaudynamik verschiedener Substrate beobachten:

Je drei Fermenter (*Abb. 2*) wurden mit einem Gemisch aus Wasser und Standardinokulum (600:600 ml) als Basis befüllt und je 20g Mais oder Zellulose als Hauptgärsubstrat hinzu gegeben. Weitere drei Fermenter wurden mit 1200ml Inokulum und 300ml Wasser befüllt und ohne extra Substratzugabe vergoren. Jeden Tag wurden 5-20ml Gas zur Messung der Kohlenstoffisotopie an Methan und CO<sub>2</sub> entnommen



*Abb. 2: 2l Batchfermenter mit verschiedenen Gärsubstraten*

- b) Konkreten Abbau von Essigsäure untersuchen und identifizieren:

Je drei Fermenter wurden mit einem Gemisch aus Wasser und Standardinokulum (1200:300 ml) als Basis befüllt und mit 0,7mmol isotopisch markiertem Na-Acetat (aufgelöst in 5ml H<sub>2</sub>O) versetzt (*Abb. 3*). Bei dem eingesetzten Acetat war dabei jeweils entweder in der Methy- oder der Carboxylgruppe das <sup>12</sup>C komplett durch <sup>13</sup>C ersetzt („isotopisch markiert“) worden. Die eingesetzte Menge an markiertem Acetat entsprach ca. 5% des Gesamtacetats in der Lösung. Jeden Tag wurden 5-20ml Gas zur Messung der Kohlenstoffisotopie an Methan und CO<sub>2</sub> entnommen



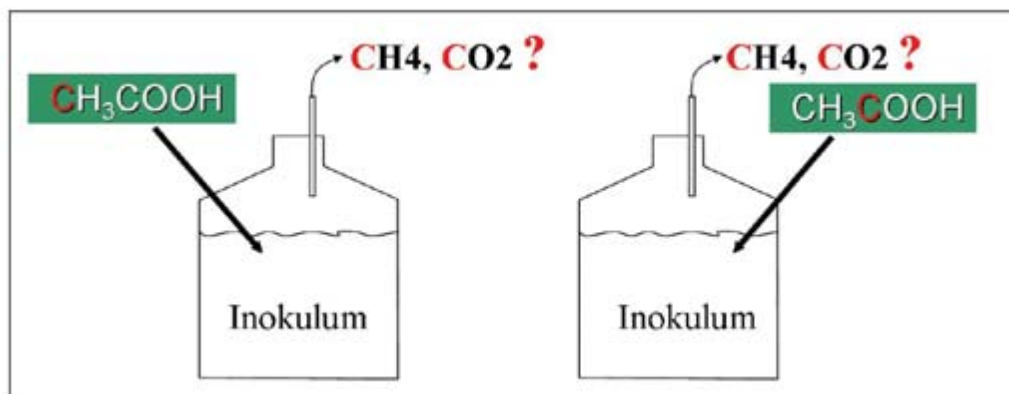


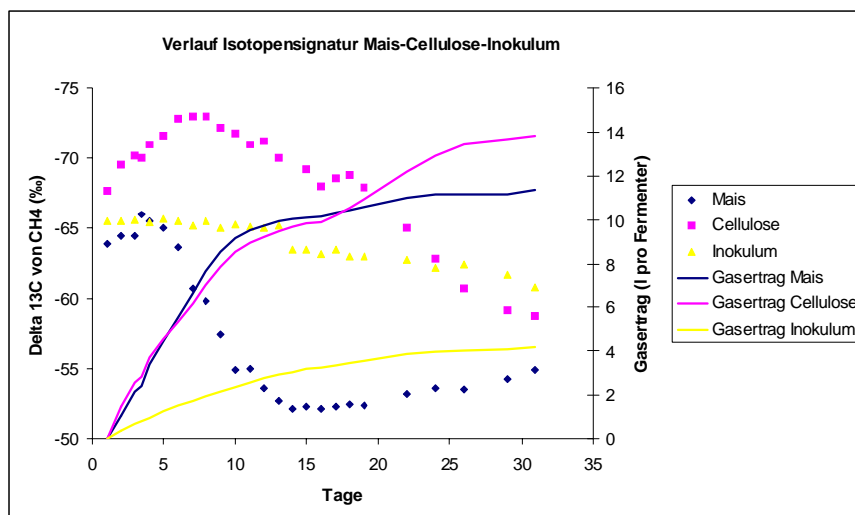
Abb. 3: Tracerversuch mit markierter Essigsäure; Ansatz 1: Methylmarkierung; Ansatz 2: Carboxylmarkierung

### 3 Ergebnisse/Interpretation

Versuch a): Eine erste Frage war, wie sich die Isotopensignatur von  $\text{CH}_4$  und  $\text{CO}_2$  im Biogas während eines Batchversuchs verändert. *Abb. 4a* zeigt die  $\text{CH}_4$ -Kohlenstoffisotopenwerte der Mais-, Zellulose- und Inokulumvergärung zusammen mit der jeweiligen Gasbildungsrate. Die signifikanten Unterschiede zwischen Mais/Zellulose und Inokulum sind deutlich erkennbar. Während die geringe Änderung der Isotopie und die niedrige Gasbildungsrate darauf hinweist, dass das Inokulum weitestgehend ausgegoren ist, zeigen die Isotopenwerte der aktiven Gärtschlämme eine hohe Dynamik. Bei beiden Substraten spiegeln die Isotopenwerte die Dynamik des Abbaus des organischen Materials wieder die zwischen Mais und Zellulose jedoch deutlich Unterschiede aufweist. Die sich schnell verändernden Kohlenstoffisotopenwerte haben mehrere Ursachen: zunächst werden die schnell und leicht verdaulichen Fraktionen abgebaut (negativere Isotopenwerte). Dann folgt besonders bei Mais nach wenigen Tagen der steile Trend nach positiveren Isotopenwerten, der entweder auf den Abbau einer weiteren schwerere abbaubaren Fraktion (mit anderer Isotopensignatur) hindeutet oder aber schon das Signal für die Erschöpfung des Reservoirs darstellt. Durch die dauerhafte Bildung von „leichtem“ Methan reichert sich der schwerere Kohlenstoff in der Quelle an und da diese endlich ist wird das dann gebildete  $\text{CH}_4$  auch immer „schwerer“ (positivere Werte). Beim Verlauf des  $^{13}\text{C}$  im  $\text{CO}_2$  des gebildeten Biogas bei Mais ist diese Dynamik noch deutlicher und schneller (*Abb. 4b*), obwohl das Signal des  $\text{CO}_2$  noch durch den relativ großen vorhandenen Carbonatpuffer abgepuffert wird.

Bemerkenswert ist vor allem auch, dass das Isotopensignal schon wesentlich früher auf die Veränderung im Prozess hindeutet als die Gasbildung. Im Zuge weiterer Untersuchungen soll analysiert werden, wie dieser Parameter zur Früherkennung von Prozessstörungen eingesetzt werden kann.

a)



b)

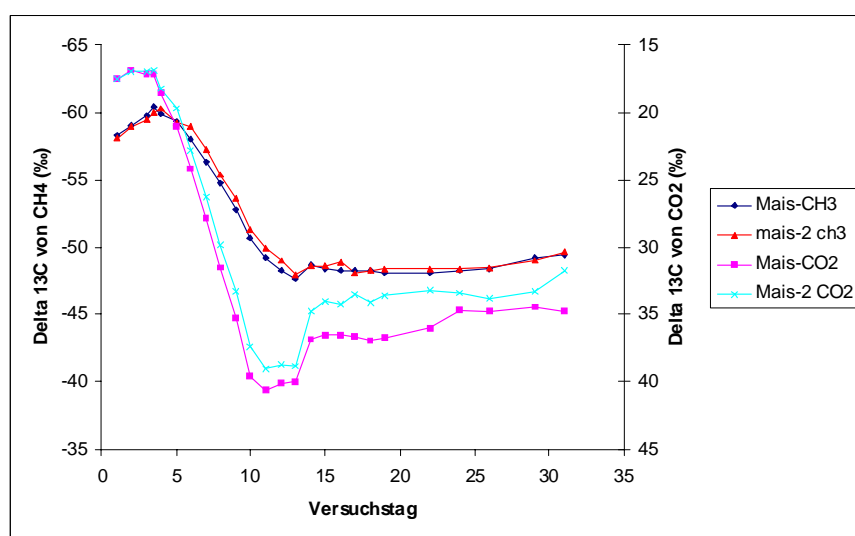
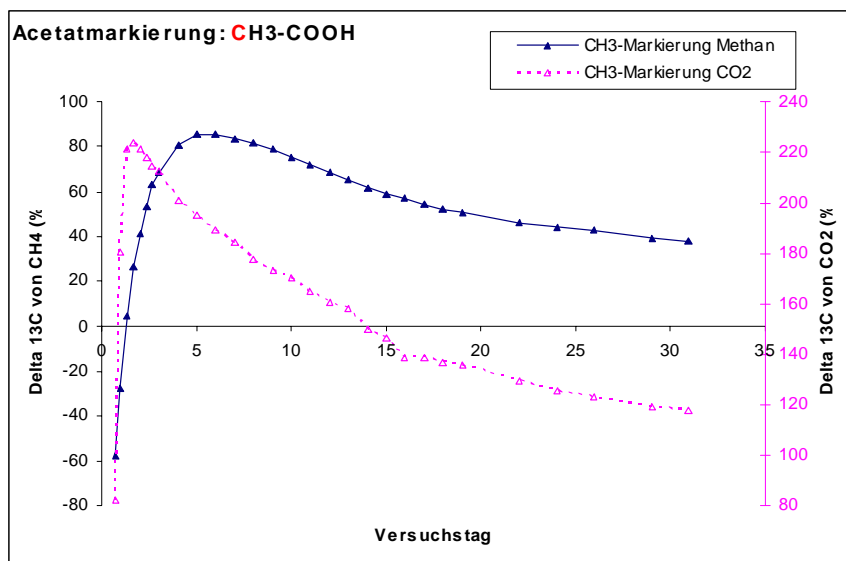


Abb. 4: Messung der Kohlenstoffisotopie an Methan und CO<sub>2</sub> in verschiedenen Gärversuchen. (a)  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von CH<sub>4</sub> von Mais, Zellulose, Inokulum. (b)  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von CH<sub>4</sub> im Vergleich zu  $^{13}\text{C}$  von CO<sub>2</sub> von Mais

Versuch b): Die Frage des Abbauwegs von Acetat und die zugehörige Reaktionskinetik konnte mit Hilfe eines einfachen Tracer-Versuchs untersucht werden. *Abbildung 5a* zeigt den Verlauf der Isotopensignaturen von Methan und CO<sub>2</sub> beim Carboxyl-markierten Acetat als Tracer. Die Menge der Markierung entsprach etwa 5% des Gesamtacetats und sollte bei Umsetzung innerhalb 24-48h ein Isotopensignal weit über 1000 ‰ erreichen. Tatsächlich werden nur Werte bis 100 ‰ erreicht, was eindeutig auf einen geringen Beitrag des Acetatabbaus an der Gasbildung hinweist. Die deutlich schnellere Kinetik bzw. Freisetzung von CO<sub>2</sub> gegenüber Methan ist zunächst plausibel, da die Markierung der Carboxylgruppe erst nach der Acetatspaltung in einem zweiten Schritt über die Reduktion des CO<sub>2</sub> ins CH<sub>4</sub> gelangt. Der Vergleich mit den CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub> Isotopenwerten bei der Methylmarkierung (*Abb. 5b*) ergibt jedoch ein völlig unerwartetes Bild: es besteht quasi kein Unterschied zwischen den Reaktionspfaden der beiden Markierungen. Beim Versuch mit der Methylmarkierung würde man erwarten, dass sich die Markierung ausschließlich im Methan wieder findet. Aber auch hier findet zunächst eine schnelle Freisetzung der

Markierung über gebildetes CO<sub>2</sub> statt, gefolgt von einer langsameren späteren Freisetzung von Methan. Und auch hier ist der Umsatz vielfach niedriger als erwartet.

a)



b)

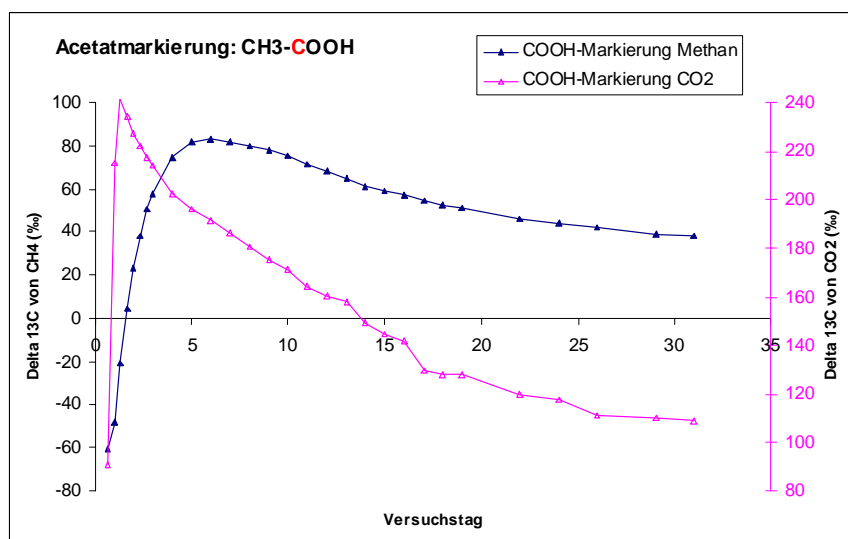


Abb. 5: Messung der Kohlenstoffisotopie an Methan und CO<sub>2</sub> in verschiedenen Gärversuchen bei Einsatz von markiertem Acetat. (a)  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub> bei methyl-markiertem Acetat. (b)  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub> bei carboxyl-markiertem Acetat

Die Ergebnisse lassen nur eine Erklärung zu: beide Reaktionsprodukte (bzw. deren C-Atome) des Abbaus von Acetat, CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub>, stammen aus derselben Quelle. Dazu muss das Acetat trotz anaerober und extrem reduzierender Bedingungen zuerst komplett zu CO<sub>2</sub> oxidiert werden, das dann z.T. gasförmig entweicht und z.T. zu CH<sub>4</sub> reduziert wird. Durch die komplette Oxidation verliert sich die unterschiedliche Quellensignatur der Markierung, da es danach nur noch einen Gesamtpool gibt, was von den Messdaten widerspiegelt wird.

## 4 Zusammenfassung

Die ersten Versuche zur Untersuchung der stabilen Kohlenstoffisotope an Methan und CO<sub>2</sub> im Biogas verdeutlichen die vielfältigen Möglichkeiten dieser Methode für die Prozessanalyse in Biogasreaktoren. Der Einsatz erstreckt sich dabei von der Analyse verschiedener Reaktionspfade und -mechanismen über verschiedene Fragestellungen zur Kinetik des Abbaus bis hin zum eventuellen Einsatz der Methode als Prozessüberwachung und Früherkennung von Prozessstörungen. Das Verfahren ermöglicht dabei Einblicke, wie sie mit herkömmlichen Untersuchungsmethoden nur mit sehr großem Aufwand erreichbar sind. Außerdem sind die Messungen an der Gasphase in Zusammenhang mit der neuen Laserspektroskopie einfach und schnell durchführbar und die Messergebnisse unmittelbar interpretierbar.

Die Versuche zeigten die deutlichen Veränderungen der Isotopenwerte im Verlauf eines Gärtests, die die Dynamik des Abbauprozesses widerspiegeln. Beispielhaft ist die schnelle Abbaudynamik von Mais, wobei die Isotopensignatur im Gegensatz zur Gasbildungsrate schon frühzeitig die Erschöpfung des Substrats anzeigte.

In mehreren Tracerversuchen konnten mithilfe isotopisch markierten Acetats die Reaktionswege und Abbaukinetik des Acetats (Essigsäure) näher analysiert und identifiziert werden. Die Ergebnisse widerlegen zum Teil die gängige Lehrbuchmeinung: Zum einen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass in dem verwendeten Inokulum die Methanbildung aus Acetat über eine syntrophe Acetatoxidation als Zwischenschritt verläuft. Das aus Acetat gebildete CH<sub>4</sub> stammt zu annähernd gleichen Teilen aus der Methyl- und Carboxylgruppe. Zum Anderen läuft die Methanbildung insgesamt nur zu einem geringen Anteil über Acetat ab, der wesentliche Anteil der Methanbildung findet vermutlich schon früher in der Abbaukette des organischen Materials statt.

## Literatur

- AHRING, B. K.: Methanogenesis in thermophilic biogas reactors; Antonie van Leeuwenhoek; 1995
- CONRAD, R., KLOSE, M., CLAUS, P.: Pathway of CH<sub>4</sub> formation in anoxic rice field soil and roots determined by <sup>13</sup>C-stable isotope fractionation; CHEMOSPHERE 2001
- GUJER, W., ZEHNDER, A.J.B.: Conversion process in anaerobic digestion; Water Sci. Technol. 15, 1983
- HEUWINKEL, H., A. ASCHMANN, R. GERLACH und A. GRONAUER (2009): Die Genauigkeit der Messung des Gasertragspotentials von Substraten mit der Batchmethode. Int. Wissenschaftstagung Biogas Science der Bayer. Landesanstalt für Landwirtschaft, Kongressband Erding 2009.
- KARAKASHEV, D., BATSTONE, D. J., TRABLY, E., ANGELIDAKI, I.: Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from Acetate in the absence of Methanosarcinaceae; Applied and Environmental Microbiology; 2006
- NÜSSLEIN B., ECKERT, W., CONRAD, R.: Stable Isotope biogeochemistry of methane formation in profundal sediments of Lake Kinneret (Israel); Limnol. Oceanogr. 2003
- SCHNÜRER, A., ZELLER, A., SVENSON, B. H.: Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors; FEMS Microbiol. Ecol. 1999

## Biogas from grass silage – measurements and modelling

K. Koch<sup>1</sup>, M. Lübken<sup>2</sup>, T. Gehring<sup>2</sup> and M. Wichern<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Water Quality Control, Technische Universität München,  
Am Coulombwall, 85748 Garching, Germany

<sup>2</sup>Institute of Environmental Engineering, Ruhr-Universität Bochum,  
Universitätsstraße 150, 44780 Bochum, Germany

### Keywords:

anaerobic digestions, grass silage, modelling, ADM 1

## 1 Introduction

Since ratification of the German Renewable Energy Sources Act (EEG) in 2000, biogas production from agricultural material has been heavily pushed. Especially high-capacity plants using energy crops as single substrate enforce the exigency of detailed research into the drawbacks and opportunities of monofermentation. Considering the actual debate on concurrence of energy crops and food production, biogas technology should mainly focus on residues from agriculture and other sources. Especially in landscape conservation (parks, nature reserves, fallow land, etc.) grass is often a waste product and composted by emitting the stored energy as heat. Such treatment strategies are not conforming to the closed loop recycling management and additionally, valuable energy is needlessly wasted (Koch et al., 2009).

A sufficient conservation (e.g. ensilage or haylage) provided, grass has a high potential as energy crop for biogas production and is available during the whole year. Grass silage is mostly used as co-substrate in biogas plants based on manure. Experiences with monofermentation of grass silage are very rare, particularly because of its high protein content of about 14 % of TS (Rodriguez et al., 2005) and hence of the expectedly problems caused by high ammonia concentrations. Anyway, monofermentation of grass silage is possible as has been shown by several authors (Amon et al., 2005; Koch et al., 2009; Kusch, 2007; Lehtomäki et al., 2008; Nousiainen et al., 2003; Speckmaier et al., 2005; Yan and Agnew, 2004; Yu et al., 2002; Zielonka et al., 2007). In order to meet the 2010 biofuels target the use of grass with short growth periods, especially in northern countries, is the best alternative. Anyway, grass is a crop that the farmers are familiar with and for instance over 90 % of Irish agricultural land is under grass (Murphy and Power, 2009; Seppälä et al., 2009). Furthermore, grassland provide a variety of essential environmental benefits such as carbon storage, habitat function, preservation of ground and surface water quality (Prochnow et al., 2009).

In terms of economics, the system ought to unify both short retention times (thus, high organic loading rates) and high yields of biogas. As anaerobic digestion is a complex biological process with many involved microorganisms and the energy surplus for them is marginal compared to aerobic ones, optimum conditions are requested to guarantee stable and efficient treatment. In order to cope with these claims, mathematical models were helpful to the processes understanding. After a successful calibration of such a model, it is able to predict the reactors behaviour under varying conditions (e.g. inflow composition).

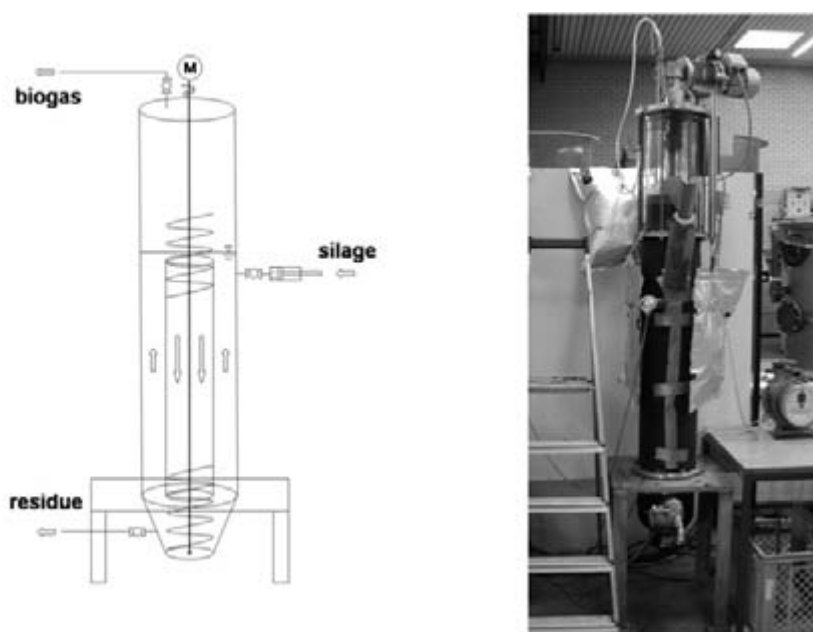
The ADM 1 (Batstone et al., 2002) has been used for mathematical simulation of the fermentation of different substrates, prevalent activated and primary sludge. Nevertheless, an increasing number of experiences are available for the mathematical simulation of agricultural substrates like cattle manure (Angelidaki et al., 1999; Myint et al., 2007; Schoen et al., 2009), cattle manure and maize (Amon et al., 2007), cattle manure and co-substrates (Lübken et al., 2007), even for aquatic plants (Zhao et al., 2009) and grass silage (Wichern et al., 2009).

Contributing knowledge on mono fermentation of grass silage as well as on mathematical modelling with ADM 1 is the aim of the present paper.

## 2 Material and methods

### 2.1 Reactor set-up and operation

Two loop reactors were run as duplicates, called reactor L and reactor R. A schematic view and a photo can be seen in *Figure 6*. The reactors consist of an outer cylinder and an inner cylinder, a motor driven screw and a headspace made of glass to visualise the process and potential scum layers. Produced biogas is first detected in a gas meter (Ritter drum chamber gas meter, Bochum) and then collected in a several gas bag for daily analyses of the concentration of CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S and H<sub>2</sub> in a gas analyser (Awite Bioenergy, Langenbach).



*Fig. 6: Simplified drawing and photo of loop reactor*

The loop reactors with a total operating volume of 50 litres were daily fed with grass silage, mixed permanently with 60 rpm and run as mesophilic fermenters at 38°C. Depending on the organic loading rate (OLR) of 1.0 to 3.5 kgVS/(m<sup>3</sup>·d), the retention time of the substrate in the fully mixed reactor was 140 to 440 days. Afterwards, the retention time was fixed to 50 days by adding water to a constant feeding amount of one kg per day, due high TS content problems that occurred (Koch et al., 2009).

## 2.2 Origin of materials

Grass silage was obtained from a farm in the north of Munich (Biogasanlage Eggertshofen, Freising) and was prepared at the farm from grass harvested at late summer, chopped after few days of pre-wilting and ensiled in a bunker silo without any additive. Sometimes it is also called haylage because of the low water content. The fouled substrate used to inoculate the loop reactor was from a mesophilic biogas plant in the west of Munich (Biogasanlage Miller, Schmiechen) fed with grass silages (Table 2) at an organic loading rate of 3.0 kgVS/(m<sup>3</sup>·d).

Tab. 2: Characteristics of grass silage and inoculum

Parameter	Unit	Grass silage*	Inoculum
TS	%	50.0	14.6
VS	% TS	90.4	77.4
pH	-	4.1	7.9
∑ VFA	g/kg	4.4	7.4
TVFA/Alkalinity	-	n.d.	0.6
TKN	g/kg	4.1	7.7
NH <sub>4</sub> -N	g/kg	1.0	4.0
COD	g/kg	605	149
TC	% TS	45.9	41.9
TOC	% TS	45.5	38.3

\* average of several analyses

n.d. not determined

As the reactor is only lab scale and the distance between inner and outer cylinder is just five cm, preliminary tests with original grass silage have shown a tendency to clog the whole system within few days because of fibered properties. Attempts to cut down the original grass silage failed. Hence, it was gently dried at 60 °C and chopped (Retsch cutting mill SM1, Haan) to maximum fiber length of 6 mm. Before feeding, the original water content was restored to the original value. Besides water, volatile fatty acids are vaporised as well during drying. Certainly, their influence on biogas production is marginal compared to that of the solids and as the buffer capacity from the high ammonium concentrations is very high, the effect on overall process stability can be neglected (Weißbach and Strubelt, 2008).

## 2.3 Chemical analyses and calculations

Every two weeks a sample was taken for analysis of total solids (TS), volatile solids (VS), pH-value, sum and spectrum of volatile fatty acids (VFA), total Kjeldahl nitrogen (TKN), ammonium nitrogen (NH<sub>4</sub>-N), chemical oxygen demand (COD), total carbon (TC), total organic carbon (TOC) and the stability criterion TVFA/alkalinity (so called FOS/TAC). This ratio describes the stability of the process by dividing the content of volatile fatty

acids (TVFA) by the buffer capacity measured as total inorganic carbon (Alkalinity). TVFA/alkalinity was determined by titration (FNR, 2005).

Volatile fatty acids (acetic acid, propionic acid, i-butyric acid, n-butyric acid, i-valeric acid, n-valeric acid and hexanoic acid) were quantified by means of a GC/FID (CE Instruments, HRGC 5300) according to the German standard methods for the examination of water, waste water and sludge (DEV, 1993).

Additionally, every charge of grass silage is analyzed on the same parameters to enable balances of the process, e.g. degradation levels. All analytical methods were based on German Standard Methods for the examination of water, wastewater and sludge (DEV, 1993). All mentioned gas volumes are standardized to 0°C and 101,325 kPa. The methane and biogas yields were expressed as m<sup>3</sup><sub>N</sub> per kg VS added, taking the VS removal during reactor operation into account. Associated organic loading rates (OLR) were calculated by dividing the daily load (kg VS per day) by the reactors operation volume resulting in kg VS per m<sup>3</sup> of reactor and day.

## 2.4 Mathematical model

The 1997 formed IWA Task Group on Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes published the Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM 1) in 2002 (Batstone et al., 2002). This highly complex model is characterized by 19 biochemical conversion processes and 24 dynamic state variables. Simulation results were executed with SIMBA 4.2 based on Matlab/Simulink (Version 7.0.4).

## 3 Results and discussion

### 3.1 Characterisation of influent

The prediction of the model is only as good as the influent characterisation. Fed Grass silage is fractioned on the basis of extended Weender analyses (Naumann and Bassler, 1993; Van Soest and Wine, 1967) into crude protein, crude fat, crude fiber and n-free extracts (NfE) as well as into neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin (ADL). Carbohydrates were further divided into hemicellulose (NDF-ADF), cellulose (ADF-ADL) and lignin (ADL), because of their different degradability. *Table 3* shows the average influent characteristics based on several analyses (Kaiser, 2007).

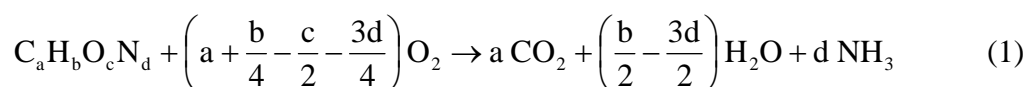


Tab. 3: Characteristics of grass silage fractions

Parameter	Unit	Grass silage
Total solids TS	%	100 <sup>a</sup>
Volatile Solids VS	% TS	91.1
Raw protein RP	% TS	17.1
Raw fiber RF	% TS	26.4
Raw lipid RL	% TS	3.0
NfE <sup>b</sup>	% TS	44.7
NDF	% TS	54.0
ADF	% TS	32.3
ADL	% TS	5.3

<sup>a</sup> dried<sup>b</sup> calculated value

As ADM 1 is COD-based, COD of the aforementioned fraction were calculated using by the following reaction:



By means of a relation between calculated and measured COD, it became clear that nitrogen is not nitrificated but converted to ammonia (Gerike, 1984). The theoretical oxygen demand (ThOD) at known elemental composition can be calculated by the following equation. The COD of the different fraction is shown in *Table 4* (Angelidaki and Sanders, 2004).

$$ThOD = \frac{16 \cdot (2a + 0,5(b - 3d) - c)}{12a + b + 16c + 14d} = \left[ \frac{g_{O_2}}{g_{C_a H_b O_c N_d}} \right] \quad (2)$$

Tab. 4: Chemical Oxygen Demand (COD) of different fraction

Fraction	Elemental formula	Molar mass [g/mol]	ThOD [g/g]
Cellulose, hemicellulose	$(C_6H_{10}O_5)_n$	162n	1.19
lignin, starch			
Protein	$C_5H_7O_2N$	113	1.42
Lipid	$C_{57}H_{104}O_6$	884	2.90

Because the grass silage was fed in dried form, influent is only divided into particular model fractions. Independent if degradable or not, cellulose, hemicellulose, lignin and starch are firstly united in one fraction for the COD calculation. Afterwards, the splitting in degradable carbohydrates and inert materials is done by f-factors (see below).

$$X_{Pr} = Q \cdot TS \cdot RP \cdot ThOD_{Pr} = [\text{kg}_{\text{COD}}/\text{d}] \quad (3)$$

$$X_{Li} = Q \cdot TS \cdot RL \cdot ThOD_{Li} = [\text{kg}_{\text{COD}}/\text{d}] \quad (4)$$

$$X_{CHLS} = Q \cdot TS \cdot (RF + NfE) \cdot ThOD_{CHLS} = [\text{kg}_{\text{COD}}/\text{d}] \quad (5)$$

The sum of all three fraction is the composite material  $X_C$ , representing the grass silage in influent. Fed silage is first of all disintegrated ( $k_{dis}$ ) into the different fraction  $X_{Pr}$ ,  $X_{Li}$ ,  $X_{Ch}$ , and  $X_I$  by means of the following f-factors:

$$f_{Pr_{Xc}} = RP = [-] \text{ and } f_{Li_{Xc}} = RL = [-] \quad (6)$$

$$f_{Ch_{Xc}} = 1 - (ADL + RP + RL) - d_{\text{Cellulose}} = [-] \quad (7)$$

$$f_{Xi_{Xc}} = ADL + d_{\text{Cellulose}} = [-] \quad (8)$$

whereas  $d_{\text{Cellulose}}$  is percentage of non degradable cellulose that is calibrated with the gas curve. The sum of all four f-factors is 1, guaranteeing that the composite material is completely split to the several fraction. Within the next step, the material is hydrolyzed ( $k_{hyd}$ ) and consequently available for the microorganisms. Detailed information on disintegration, substrate fractioning and hydrolysis can be found in *Table 5*.

*Tab. 5: Disintegration, influent COD fractioning and hydrolysis*

Parameter	Unit	Description	Grass silage
$f_{Pr_{Xc}}$	-	Proteins from $X_c$	0.171 <sup>a</sup>
$f_{Li_{Xc}}$	-	Lipids from $X_c$	0.030 <sup>a</sup>
$f_{Ch_{Xc}}$	-	Carbohydrates from $X_c$	0.346 <sup>a</sup>
$f_{Xi_{Xc}}$	-	Inerts from $X_c$	0.453 <sup>a</sup>
$d_{\text{Cellulose}}$	-	non degradable part	0.4 <sup>b</sup>
$k_{dis}$	$\text{d}^{-1}$	Disintegration	0.6 <sup>c</sup>
$k_{hyd_{Pr}}$	$\text{d}^{-1}$	Hydrolysis Proteins	0.1 <sup>b</sup>
$k_{hyd_{Li}}$	$\text{d}^{-1}$	Hydrolysis Lipids	10 <sup>b</sup>
$k_{hyd_{Ch}}$	$\text{d}^{-1}$	Hydrolysis Carbohydrates	1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> from extended Weender analyses

<sup>b</sup> manually calibrated value

<sup>c</sup> from (Koch et al., 2009)

### 3.2 Nitrogen incorporation and release

High ammonia concentration might be the driving force for instabilities in monofermentation of grass silage. Therefore, biological nitrogen incorporation and release has been integrated in ADM 1 as in (Wett et al., 2006). Thus a fraction of the decayed biomass,  $f_p$ , is converted to the biomass decayed product,  $X_p$  (implemented as a new model variable), and in this way is possible to include the nutrient mineralization in the model. Assuming that the nitrogen content in the reactor in the beginning and in the end of the considered period

is equal, the nitrogen mass balance has been fulfilled by calibrating the nitrogen content of involved material as presented in *Table 6*.

*Table 6: Nitrogen content of involved fractions*

Parameter	Unit	Description	Grass silage
$N_{Pr}$	$\text{kmol}_N/\text{kg}_{\text{COD}}$	N content proteins	0.007 <sup>a</sup>
$N_{Xc}$	$\text{kmol}_N/\text{kg}_{\text{COD}}$	N content composite material	0.0011935 <sup>b</sup>
$f_p$	-	stoichiometric factor	0.15 <sup>c</sup>
$N_{Xb}$	$\text{kmol}_N/\text{kg}_{\text{COD}}$	N content biomass	0.00625 <sup>b</sup>
$N_{Xp}$	$\text{kmol}_N/\text{kg}_{\text{COD}}$	N content biomass decay product	0.043 <sup>b</sup>
$N_I$	$\text{kmol}_N/\text{kg}_{\text{COD}}$	N content particular inerts	0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> ADM 1 value

<sup>b</sup> manually calibrated value

<sup>c</sup> adsorbed from ASM 1

### 3.3 Calibration of kinetic parameters

Applied methodology to adapt ADM 1 to grass silage followed a two-step procedure. Firstly, all kinetic parameters as default ADM 1 values were set to calibrated values for grass silage (Wichern et al., 2008). Secondly, simulations were run varying all kinetic parameter of one biomass group ( $k_m$ ,  $K_S$  and  $K_I$ ), whereas the goodness of the simulation compared to measurements has been evaluated as least square method for the measurements and simulations of the correspondent substrate by:

$$\text{Goodness of fit} = \sum_{i=1}^n (X_{\text{measured}} - Y_{\text{simulated}})^2 \quad (9)$$

In principle an as less as possible number of parameters should be varied in order to fit the measured data. Furthermore, the variation should regularly not exceed an interval of 50 % to 200 % of parameter. By means of the calibrated parameter set of Wichern et al. (2008), it was possible to fit the data by changing only three parameters, namely the decay rates of acetate, propionate and valerate and butyrate degrading bacteria, respectively (*Table 7*).

Table 7: Significant changes of parameters compared to the ADM 1 for mesophilic condition for grass silage

Parameter	Unit	Description	ADM1 value	Grass silage
$k_{m\_Ac}$	$d^{-1}$	Max. uptake rate acetate	8	$6.8^a$
$K_{I\_NH3}$	$kmol_N/m^3$	free ammonia inhibition constant for acetate uptake	0.0018	$0.005^a$
$K_{I\_H2\_Pro}$	$kg_{COD}/m^3$	Hydrogen inhibition constant for propionate uptake	$3.5 \cdot 10^{-6}$	$0.87 \cdot 10^{-7}^a$
$K_{I\_H2\_C4}$	$kg_{COD}/m^3$	Hydrogen inhibition constant for valerate and butyrate uptake	$1 \cdot 10^{-5}$	$0.75 \cdot 10^{-7}^a$
$K_{S\_H2}$	$kg_{COD}/m^3$	Half saturation coefficient of hydrogen	$7 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-5}^a$
$pH_{UL, acid}$	-	Upper pH limit for acidogens	5.5	$8.0^a$
$pH_{LL, acid}$	-	Lower pH limit for acidogens	4.0	$6.0^a$
$K_{dec\_XAc}$	$d^{-1}$	Decay rate of acetate degraders	0.02	$0.11^b$
$K_{dec\_XPro}$	$d^{-1}$	Decay rate of propionate degraders	0.02	$0.032^b$
$K_{dec\_XC4}$	$d^{-1}$	Decay rate of valerate and butyrate degraders	0.02	$0.039^b$

<sup>a</sup> analog to Wichern et al. (2008)

<sup>b</sup> manually calibrated value

### 3.4 Modelling of reactor performance

Figure 2 presents measured data of both reactor L and reactor R (run as duplicate) in comparison to simulation results for the gas flow and the main biogas compounds methane, carbon dioxide and hydrogen. A good agreement between simulation results and measurements was achieved, whereas satisfying prediction of biogas composition is an indicator for realistic influent characterization. For some days no data were available. Since start of operation the grass silage was added in original water content of about 50 % (dried and chopped grass silage and water one half each), which caused an increase of the TS content in the reactor up to 16 %. The increase of reactor total solids content with higher organic loading rates subsequently lowered the substrate flowability, whereas biogas production dropped in both reactors (day 145). In order to reduce the TS, on day 176 a part of the reactor content was withdrawn and was substituted by water. As a consequence the flowability became visibly better and the biogas production increased noticeable after several days of adaption. Since day 234 the total feed volume was fixed to one kg per day, e.g. 205 g of dried grass silage and 795 g of water. The model is not able to predict troubles caused by outside influences (e.g. increasing viscosity). Thus, the simulation does not indicate the sloping gas production from day 145 to 176 as well as the adaption phase (up to day 230) and the consequently increased gas production caused by accumulated substrate within the previous phase.

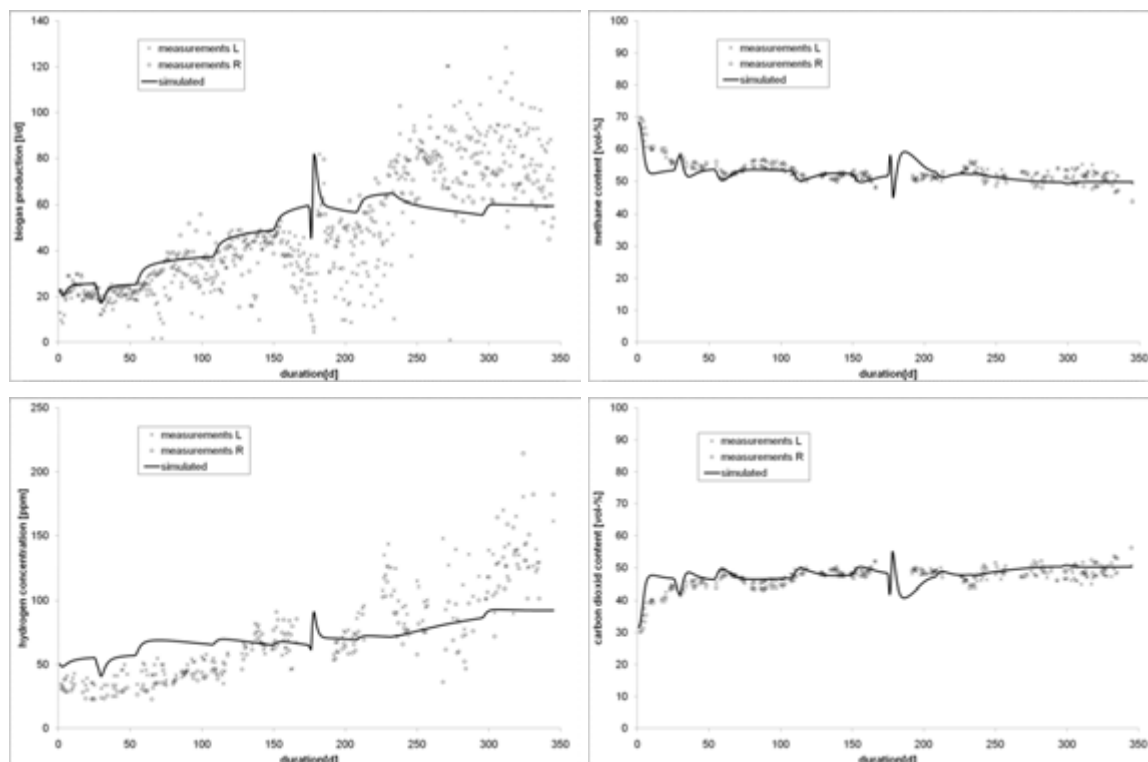


Figure 2: Simulation results and measured data for biogas flow and composition

## 4 Conclusions

- Monofermentation of grass silage was performed in loop reactors over a period of 345 days under mesophilic conditions. An averaged specific biogas production of  $0.50 \text{ m}^3$  per kg volatile solids (VS) with a methane concentration of 52 % at an organic loading rate (OLR) of up to  $3.5 \text{ kg}_{\text{VS}}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$  was obtained. A stable process is considered to be possible at an OLR of  $3.0 \text{ kg}_{\text{VS}}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$ .
- Fractioning of substrate was based on established fodder analyses. Transfer to COD-based model input is smoothly possible. The approach for influent characterisation as performed in this study facilitates model application for lignocellulosic substrate.
- Kinetic parameters from ADM 1 were calibrated by minimizing the differences between measured data and model results. Variable influence of the parameters on the goodness of fit have been shown, whereas it became clear that only few need to be modified. By using the modified parameters for grass silage of Wichern et al. (2008), only changes of decay rates were necessary in order to fit the measurements. Anyway, adapted ADM 1 showed a good agreement with measurements.

## 5 Acknowledgements

Funding for this study was provided by German Agency for Renewable Resources (FNR) - FKZ: 22011905.

## References

- AMON, T., AMON, B., KRYVORUCHKO, V., ZOLLITSCH, W., MAYER, K., GRUBER, L., 2007. Biogas production from maize and dairy cattle manure-Influence of biomass composition on the methane yield. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 118, 173-182.
- AMON, T., KRYVORUCHKO, V., AMON, B., BODIROZA, V., ZOLLITSCH, W., BOXBERGER, J., 2005. Biogaserzeugung aus Grünlandbiomasse im Alpenraum. *Landtechnik*, 60, 336-337.
- ANGELIDAKI, I., ELLEGAARD, E., AHRING, B.K., 1999. A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 363-372.
- ANGELIDAKI, I., SANDERS, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3, 117-129.
- BATSTONE, D.J., KELLER, J., ANGELIDAKI, I., KALYUZHNYI, S.V., PAVLOSTATHIS, S.G., ROZZI, A., SANDERS, W.T.M., SIEGRIST, H., VAVILIN, V.A., 2002. *Anaerobic Digestion Model No. 1*. International Water Association, London.
- DEV, 1993. *Deutsche Einheitsverfahren zu Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (German standard methods for examination of water, wastewater and sludge)*. Wiley-VCH, Weinheim.
- FNR, 2005. *Ergebnisse des Biogasmessprogramms*. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow.
- GERIKE, P., 1984. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. *Chemosphere*, 13, 169-190.
- KAISER, F., 2007. *Einfluss der stofflichen Zusammensetzung auf die Verdaulichkeit nachwachsender Rohstoffe beim anaeroben Abbau in Biogasreaktoren*. Dissertation, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Technische Universität München, Freising.
- KOCH, K., WICHERN, M., LÜBKEN, M., HORN, H., 2009. Mono fermentation of grass silage by means of loop reactors. *Bioresource Technology*, 100, 5934-5940.
- KUSCH, S., 2007. Vergärung von Grassilage in berieselten Feststoffschüttungen. *Wasser und Abfall*, 9, 40-44.
- LEHTOMÄKI, A., HUTTUNEN, S., LEHTINEN, T.M., RINTALA, J.A., 2008. Anaerobic digestion of grass silage in batch leach bed processes for methane production. *Bioresource Technology*, 99, 3267-3278.
- LÜBKEN, M., WICHERN, M., SCHLATTMANN, M., GRONAUER, A., HORN, H., 2007. Modelling the energy balance of an anaerobic digester fed with cattle manure and renewable energy crops. *Water Research*, 41, 4085-4096.
- MURPHY, J.D., POWER, N.M., 2009. An argument for using biomethane generated from grass as a biofuel in Ireland. *Biomass and Bioenergy*, 33, 504-512.
- MYINT, M., NIRMALAKHANDAN, N., SPEECE, R.E., 2007. Anaerobic fermentation of cattle manure: Modeling of hydrolysis and acidogenesis. *Water Research*, 41, 323-332.
- NAUMANN, C., BASSLER, R., 1993. *Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt.

- NOUSIAINEN, J., RINNE, M., HELLAMAKI, M., HUHTANEN, P., 2003. Prediction of the digestibility of primary growth and regrowth grass silages from chemical composition, pepsin-cellulase solubility and indigestible cell wall content. *Animal Feed Science and Technology*, 110, 61-74.
- PROCHNOW, A., HEIERMANN, M., PLÖCHL, M., LINKE, B., IDLER, C., AMON, T., HOBBS, P.J., 2009. Bioenergy from permanent grassland - A review: 1. Biogas. *Bioresource Technology*, 100, 4931-4944.
- RODRIGUEZ, G.A., MANDALUNIZ, N., FLORES, G., OREGUI, L.M., 2005. A gas production technique as a tool to predict organic matter digestibility of grass and maize silage. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 267-276.
- SCHOEN, M., SPERL, D., GADERMAIER, M., GOBERNA, M., FRANKE-WHITTLE, I., INSAM, H., ABLINGER, J., WETT, B., 2009. Population dynamics at digester overload conditions. *Bioresource Technology*, 100, 5648-5655.
- SEPPÄLÄ, M., PAAVOLA, T., LEHTOMÄKI, A., RINTALA, J.A., 2009. Biogas production from boreal her-baceous grasses - Specific methane yield and methane yield per hectare. *Bioresource Technology*, 100, 2952-2958.
- SPECKMAIER, M., SCHLATTMANN, M., METZNER, T., GRONAUER, A., 2005. Bestimmung des Biogasertrages aus Co-Substraten im diskontinuierlichen Durchflussverfahren. *Landtechnik*, 60, 340-341.
- VAN SOEST, P.J., WINE, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 50, 50-59.
- WEIBACH, F., STRUBELT, C., 2008. Die Korrektur des Trockensubstanzgehaltes von Grassilagen als Substrat für Biogasanlagen. *Landtechnik*, 63, 210-211.
- WETT, B., ELADAWY, A., OGUREK, M., 2006. Description of nitrogen incorporation and release in ADM1. *Water Science and Technology*, 54, 67-76.
- WICHERN, M., GEHRING, T., FISCHER, K., ANDRADE, D., LÜBKEN, M., KOCH, K., GRONAUER, A., HORN, H., 2009. Monofermentation of grass silage under mesophilic conditions: Measurements and mathematical modeling with ADM 1. *Bioresource Technology*, 100, 1675-1681.
- WICHERN, M., LÜBKEN, M., KOCH, K., GEHRING, T., HORN, H., FISCHER, K., SCHLATTMANN, M., GRONAUER, A., 2008. Eignung des Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM 1) zur Prozesssteuerung landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR), Gülzow.
- YAN, T., AGNEW, R.E., 2004. Prediction of metabolisable energy concentrations from nutrient digestibility and chemical composition in grass silages offered to sheep at maintenance. *Animal Feed Science and Technology*, 117, 197-213.
- YU, H.W., SAMANI, Z., HANSON, A., SMITH, G., 2002. Energy recovery from grass using two-phase anaerobic digestion. *Waste Management*, 22, 1-5.
- ZHAO, B.-H., YUE, Z.-B., NI, B.-J., MU, Y., YU, H.-Q., HARADA, H., 2009. Modeling anaerobic digestion of aquatic plants by rumen cultures: Cattail as an example. *Water Research*, 43, 2047-2055.
- ZIELONKA, S., LEMMER, A., OECHSNER, H., JUNGBLUTH, T., 2007. Zweiphasige Vergärung nachwachsender Rohstoffe. *Landtechnik*, 63, 338-339.





# Mathematische Modellierung der mesophilen und thermophilen anaeroben Vergärung von Maissilage

M. Lübken<sup>1</sup>, K. Koch<sup>2</sup> und M. Wichern<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft und Umwelttechnik, Ruhr-Universität Bochum, Universitätsstraße 150, 44780 Bochum, Deutschland

<sup>2</sup> Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, Technische Universität München, Am Coulombwall, 85748 Garching, Deutschland

## Keywords:

Biogas, Energiepflanzen, Maissilage, Modellierung, ADM1

## 1 Einleitung

Zur Vereinheitlichung der mathematischen Beschreibung des Anaerobprozesses wurde im Jahre 1997 die IWA-Task-Group on Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes gegründet, aus deren Arbeit das Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM 1) hervorging. Das ADM 1 ist ein hoch komplexes Modell, das durch 19 biochemische Stoffumwandlungsprozesse und 24 Stoffparameter charakterisiert wird. Zusätzlich zu den genannten Prozessen und Parametern sind 6 Prozesse berücksichtigt, die die Dissoziationsgleichgewichte der organischen Säuren, des Ammoniumstickstoffs und des Bikarbonats beschreiben. Drei weitere Prozesse beschreiben die Strippung von Methan, Kohlendioxid und Wasserstoff, aus denen der Gasfluss errechnet wird. Mit Hilfe einer Ladungsbilanz kann letztendlich der pH-Wert in der flüssigen Phase bestimmt werden.

Das ADM 1 zeichnet sich durch einen hohen Detailgrad besonders bei der Beschreibung der Umsatzprozesse organischer Säuren (Essig-, Propion-, Butter- und Valeriansäure) aus und kann, sofern Messdaten u.a. zu den organischen Säuren vorliegen, erfolgreich im Bereich einer Prozesssteuerung von Anlagen eingesetzt werden. Neben der CSB- und Stickstoffbilanz wird auch eine Kohlenstoffbilanz berücksichtigt, die u.a. maßgebend für die Berechnung der ausgestrippten Menge von CO<sub>2</sub> ist.

In der vorliegenden Arbeit wird die mathematische Modellierung der anaeroben Vergärung von Maissilage beschrieben. Es werden detaillierte Hinweise zusammengestellt, wie die Zulauffraktionierung des CSBs anhand von Messdaten erfolgen sollte, mit welchen Parametern der Stoffabbau kalibriert werden kann und wie sich letztendlich eine erfolgreiche Modellierung des Gasflusses, der Gaszusammensetzung und der Abbildung der organischen Säuren Essig-, Propion- und Buttersäure erreichen lässt. Weitere Hinweise wurden zur Sensitivität und Identifizierbarkeit biochemischer Größen zusammengestellt.

## 2 Material und Methoden

Das Abbauverhalten von Maissilage in Monofermentation unter mesophilen Prozessbedingungen wurde in einer halbtechnischen Versuchsanlage unter variierender organischer Raumbelastung untersucht. Das Verfahrensschema bestand aus einem liegenden Pflropfenstromfermenter mit einem Volumen von 240 Litern und einem stehenden Nachgärer mit einem Nutzvolumen von 600 Litern. Die Gasproduktion und die Zusammensetzung des produzierten Biogases wurden kontinuierlich bestimmt und aufgezeichnet. Für den liegenden Fermenter bestand zudem die Möglichkeit, sowohl die Gasproduktion als auch die Gaszusammensetzung an 4 verschiedenen Stellen in Längsrichtung zu messen. Hierzu wurde der Fermenter mit vier einzelnen Gasdomen ausgestattet. Der liegende Fermenter wurde einmal täglich mit einer Maische aus Maissilage und Fermenterinhalt aus dem Nachgärer (Gärrestrückführung) gefüttert. Die verwendete Maissilage hatte einen durchschnittlichen Trockensubstanzgehalt von 35% (bezogen auf die Frischmasse) und einen durchschnittlichen organischen Trockensubstanzgehalt von 95% (bezogen auf die Trockenmasse).

## 3 Ergebnisse und Diskussion

Für die Simulation wurde der liegende Fermenter in vier einzelne Kompartimente entsprechend der Messanordnung unterteilt. *Abbildung 1* zeigt den Vergleich zwischen gemessener und simulierter Trockengasproduktion sowie des FOS/TAC Verhältnisses.

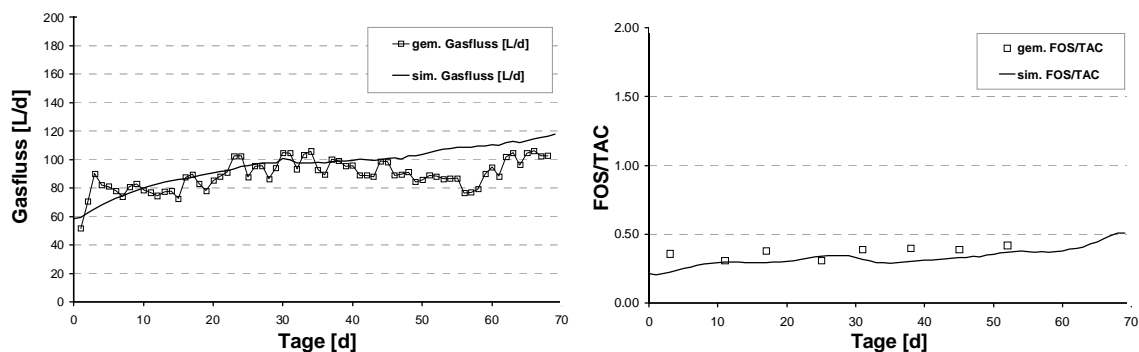


Abb. 1: Messdaten und Simulationsergebnisse für den Trockengasfluss und das FOS/TAC-Verhältnis bei anaerober Behandlung von Maissilage

Abbildung 1 zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen Messdaten und Simulationsergebnissen. Abweichungen ergeben sich ab dem 45. Versuchstag. Die Ursache lag in der Verwendung einer neuen Charge Maissilage. Hier musste offensichtlich erst eine Adaption der Biomasse an das neue Substrat erfolgen, um wieder einen stabilen Gasertrag zu erreichen. Ab dem 63. Versuchstag lagen die Messwerte wieder im Bereich der Simulationsergebnisse.

Die Stabilität einer landwirtschaftlichen Biogasanlage wird in der Praxis häufig über den FOS/TAC-Wert, das Verhältnis flüchtiger organischer Säuren (FOS) zum anorganischen Kohlenstoff (TAC- stellvertretend für die Pufferkapazität) beurteilt. *Abbildung 1* zeigt den Vergleich zwischen simuliertem und gemessenem FOS/TAC. Hier zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Simulation und Messung. Die grundsätzliche Eignung des ADM1 zur Prozesssteuerung über den Parameter FOS/TAC ist demnach gegeben.

Das detaillierte Vorgehen zur Modellkalibrierung, die Darstellung weiterer Simulationsergebnisse sowie die komplette Liste aller kalibrierten Parameter werden in der Langfassung des Manuskripts dargestellt. Auf die Unterschiede der Kalibrierung für den mesophilen und thermophilen Betrieb wird gesondert eingegangen.



## **Session 6**

# **Ökonomie, Ökologie und Bilanzierungen**

**Chairman:  
Dr. Reinhard / Dr. Gronauer**



## **The basket of benefit methodology as a tool for the comparison of electricity, heat, and fuel production from energy crops, exemplified by different utilization pathways for biogas**

M. Bystricky<sup>1</sup>, T. Knödlseher<sup>1</sup>, G. Weber-Blaschke<sup>1</sup> and M. Faulstich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Technische Universität München, Institute of Resource and Energy Technology, Weihenstephaner Steig 22, 85350 Freising, Germany

<sup>2</sup>Technische Universität München, Institute of Resource and Energy Technology, Petersgasse 18, 94315 Straubing, Germany

### **Zusammenfassung**

Angesichts begrenzter Flächenpotenziale für den Energiepflanzenanbau in Bayern sollten die verfügbaren Ackerflächen nachhaltig genutzt werden. Eine endgültige ökologische Bewertung verschiedener Bioenergie-Nutzungspfade von Ackerflächen kann nur stattfinden, wenn dafür ein geeignetes Werkzeug vorhanden ist. In dieser Studie wird mit der „Nutzenkorbmethode“ ein Ökobilanz-Ansatz weiterentwickelt, der es ermöglicht, die absoluten Emissionen verschiedener Bioenergiepfade bezogen auf einen Hektar Anbaufläche realitätsnah darzustellen und miteinander zu vergleichen, trotz des unterschiedlichen „Endnutzens“ (Strom, Wärme, Kraftstoffe).

Die Umweltwirkungen verschiedener Verwertungswege von Biogas aus Energiepflanzen werden hier nach der Nutzenkorbmethode ermittelt. Eine lokale, dezentrale Nutzung im Blockheizkraftwerk zur Strom- und Wärmeerzeugung wird dabei mit der Einspeisung ins Erdgasnetz und zentraler Strom- und Wärmeerzeugung sowie mit der Kraftstoffnutzung verglichen. Ebenso wird ein Vergleich zwischen der Biogasnutzung und der Erzeugung von Biodiesel aus Raps und Bioethanol aus Zuckerrüben gezogen. Dabei wurden bayerische Flächenerträge und Anbaubedingungen angenommen.

Exemplarisch werden hier die Ergebnisse für die beiden Wirkungskategorien „Treibhauspotenzial“ und „Eutrophierungspotenzial“ herausgegriffen. Bei den Treibhausgasemissionen sind die Ergebnisse heterogen: Biogas kann dann besser bewertet werden als Bioethanol und Biodiesel, wenn ein möglichst großer Anteil der im BHKW entstehenden Wärme genutzt wird. Die Nutzung als Kraftstoff in Erdgasautos schneidet ähnlich ab wie die Nutzung anderer Biokraftstoffe. Beim Eutrophierungspotenzial weist Biogas wegen des Einsatzes von Gärresten im Vergleich zu den anderen Bioenergielinien die höchsten Emissionen auf. Momentan werden weitere Bioenergielinien sowie zusätzliche Wirkungskategorien in die Berechnungen einbezogen.

## Summary

As the potentially available agricultural land for energy crop cultivation is limited, the available area should be used in a sustainable and efficient way. A conclusive assessment of environmental impacts of different bioenergy utilization pathways is only possible when a suitable instrument is available. In this project, the “basket of benefit” methodology, a special life cycle assessment approach, is used to calculate absolute emissions of different bioenergy pathways, related to one hectare of agricultural land, in a way close to reality. The method enables this comparison in spite of the different “end use” (electricity, heat, fuels).

In this paper, environmental impacts of different utilization pathways of biogas from energy crops are determined according to the basket of benefit methodology. A local, decentralized usage in a cogeneration plant for the production of electricity and heat is compared to feeding purified biomethane into the gas grid for centralized electricity and heat production, and to the usage as transportation fuel. Likewise, a comparison is drawn between biogas utilization and the production of biodiesel from rapeseed and bioethanol from sugar beet. Hectare yields and cultivation systems according to Bavarian conditions are forming the calculation basis.

Results for the impact categories “greenhouse gas potential” and “eutrophication potential” are presented. Regarding the greenhouse gas emissions, the results are heterogeneous: Biogas shows fewer emissions than biodiesel and bioethanol only if a big proportion of the generated heat is actually consumed. The use as fuel in natural gas passenger cars can be rated similar to the use of the other biofuels. Due to the application of digestates as fertilizer, biogas exhibits a higher eutrophication potential than the other bioenergy carriers. At the moment, more bioenergy pathways, as well as additional impact categories, are being included into the calculations.

## Schlüsselwörter:

Ökobilanz, Nutzenkorbmethode, Biogasverwertung, Biokraftstoffe

Life cycle assessment, basket of benefit methodology, biogas utilization, biofuels



## 1 Introduction

Due to an increasing demand for renewable energies, the significance of biomass utilization is continually growing in Bavaria. In 2008, the biggest part of the Bavarian energy crop land was used for the production of maize and cereals for biogas, while a smaller part was cultivated with rapeseed and cereals for biofuels production (STMELF 2008). Especially when combined heat and power generation is applied, land use for biogas is supposed to be more efficient than other energetic utilization possibilities of the agricultural area. However, the cultivation of other energy crops, such as short rotation coppice for heat production, is also promising a high energy yield and a high greenhouse gas reduction potential. Biofuels for transportation also still play an important role in the political debate. As the potentially available agricultural area for energy crop cultivation is limited, the available area should be used in a sustainable and efficient way.

One of the aims of this project is to compare different energy crop species using the basket of benefit methodology as a special approach to life cycle assessment. With electricity, heat, and transportation fuels all three energy types are implied in the analysis. For this comparison, along with calculating emission reduction potentials compared to fossil fuels (which is done in many studies, e.g. ZAH *et al.* 2007, HEINZER *et al.* 2000), the basket of benefit methodology is an appropriate tool. With this tool, absolute emissions of different bioenergy pathways can be assessed close to reality, and can be compared to each other despite their different “end use” (electricity, heat, fuel) and without making assumptions of alternative land use scenarios necessary. Such assumptions have to be made in the “emission reduction potential” approach, and are influencing the results greatly.

In this paper, environmental effects of different biogas utilization pathways are compared to each other. Combined heat and power generation in a local cogeneration plant of 350 kW is compared to feeding purified biomethane into the natural gas grid with central heat and power generation in a 2 MW cogeneration plant and with utilization as transportation fuel. Representative for other bioenergy pathways, bioethanol from sugar beet and rapeseed methyl ester are also implied in the comparison.

## 2 Methodology

### 2.1 Basket of benefit approach

The starting point for an evaluation with the basket of benefit approach is a certain area of land upon which one bioenergy type – e.g. heat – is produced (see *Fig. 1*, “basket of benefit 2”). To the environmental impacts of this amount of energy, those of both remaining energy types – in this case electricity and fuels, produced mainly from fossil resources – have to be added. The procedure for the two other energy types produced from energy crops on the same area of land is analogous. Finally, for every energy crop utilization pathway, one “basket of benefit” is constructed. Each of those “baskets of benefit” contains the same amount of electricity, heat, and fuel (= same total “benefit”), with varying shares of their contents being provided by bioenergy and other energy carriers (*Fig. 1*). The environmental impacts of these “baskets of benefit”, determined according to the ISO standards for the conduction of life cycle assessment studies (CEN 2006), are now comparable to each other. Thus, the basket of benefit approach provides a close-to-reality view of all possible bioenergy utilization pathways of a certain area of land.

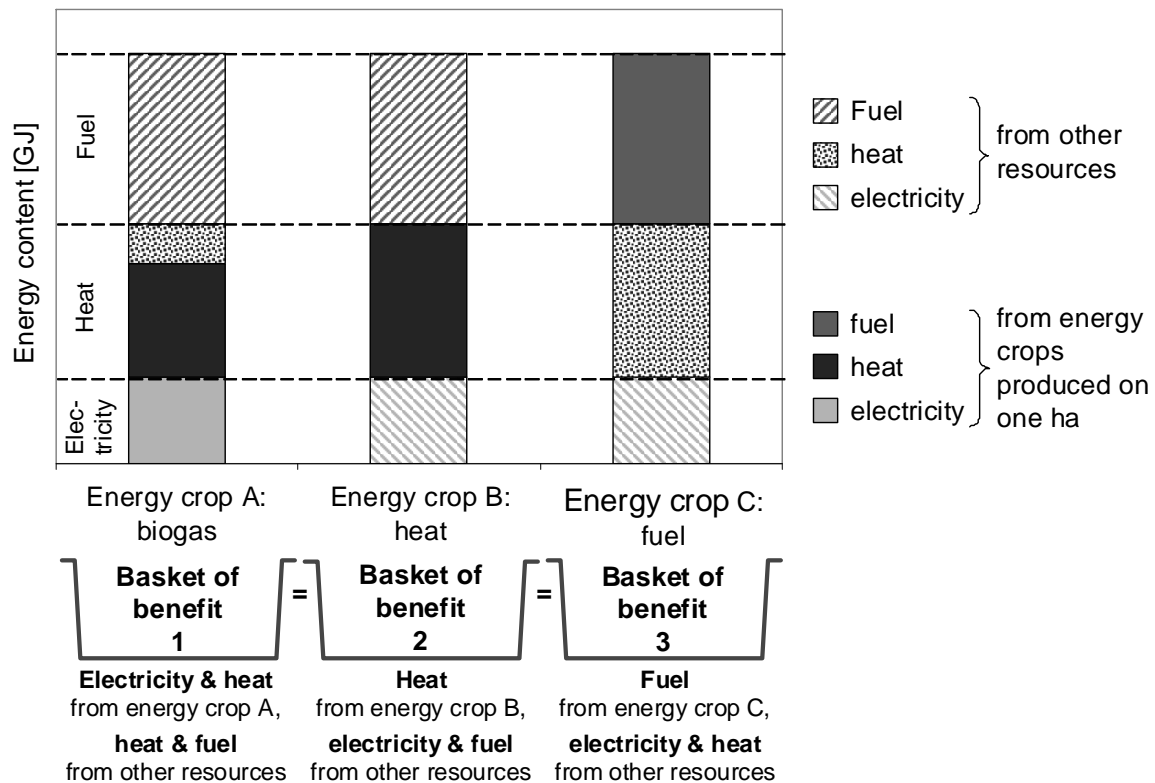


Fig. 1: Scheme of a possible basket benefit methodology composition (the proportion of bioenergy is derived from the energy yield of the respective crop per hectare; the maximum electricity, heat, and fuel content of the baskets of benefit result from the overall maximum energy yields per hectare of all considered crops)

## 2.2 Bioenergy variants and calculation basis

The system boundaries of the bioenergy life cycles comprise all steps of agricultural production and the conversion of biomass to energy. The production of machines and other inputs such as pesticides and fertilizers were included into the system boundaries.

Agricultural production and biogas utilization were adapted to Bavarian conditions. For the cultivation system, “good agricultural practise” was assumed. Data regarding machine and fuel usage were taken from KTBL (2006). Average crop yield data of the years 2005-2007 were taken for the region “Regensburg-Straubinger Gäu”, a region located in the eastern part of Bavaria with high yields per hectare. Fertilizer use was calculated according to WENDLAND *et al.* (2007a).

Six bioenergy variants are taken into consideration, four of them representing different biogas utilization possibilities (the same order is always used in the following chapters):

- (1) One smaller biogas plant, with a 350 kW cogeneration unit was modelled assuming a substrate mix of 30 mass-% liquid cattle manure and 70 mass-% maize silage. Of the generated heat, 15 % were assumed to be consumed. This variant represents an average agricultural Bavarian biogas plant (EFFENBERGER 2009 and EFFENBERGER *et al.* 2007).
- (2) For the same biogas and cogeneration plant, an 80 % use of the heat was assumed.
- (3) A biogas plant using only silage maize as substrate with processing of the biogas to natural gas quality was modelled according to KLICHE (2009). The biomethane

was then supposed to be transported via pipeline over 20 km and used in a 2 MW cogeneration unit for the production of electricity and heat, 80 % of the generated heat being consumed. A 350 kW cogeneration unit, located near the biogas plant, was assumed to produce heat for the plant's own requirements, the generated electricity being fed into the grid.

- (4) Using the same biogas plant, biomethane was assumed to be fed into the gas grid, transported over 20 km, and consumed as biofuel in natural gas driven cars. Here, too, a 350 kW cogeneration unit was necessary to produce heat for the biogas plant's own requirements. This means that even with the primary utilization of biomethane as transportation fuel, a small amount of electricity and heat is generated as well.
- (5) Biodiesel production from rapeseed in an oil mill and esterification plant with a daily output of 63 t methyl ester was modelled according to ECOINVENT (2007). The by-products rape meal and glycerine were taken into account via allocation after the energy content, according to EU (2009).

Bioethanol production from sugar beet in a fermentation plant with an annual capacity of 90,000 t ethanol was modelled according to ECOINVENT (2007). The by-products beet chips and vinasse were taken into account via allocation after the energy content, according to EU (2009).

The environmental burdens of biofuel production could also be allocated between main and by-product after their mass yield. As nearly half of the biomass harvested from one hectare can be used as animal fodder (rape meal or beet chips), the same share of the environmental impacts would have to be allocated to those by-products, thus influencing the evaluation of different energy crop utilization pathways in favour of the biofuels. Such a calculation will be conducted in the future. The results will be compared to those of an allocation after the energy content.

With regard to the use of liquid manure in the bioenergy variants (1) and (2), the impacts of manure use were excluded in this paper. The environmental impacts of biogas production and use were allocated between the substrates manure and silage maize according to their contribution to the total biogas yield. Another possibility would be to include the impacts of manure use. In that case, in bioenergy variants (3)-(6), an alternative use for the manure would have to be assumed: It could either be stored and spread conventionally, releasing CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, and NH<sub>4</sub> emissions into the air, thus enhancing greenhouse and eutrophication potential, or it could be used for energy production in another biogas plant.

The life cycles of bioenergy pathways were modelled using the "GaBi4 professional" life cycle assessment software (PE INTERNATIONAL 2007). As calculation basis for agricultural production and the energetic processing of the harvested products as well as for fossil energy production, the "ecoinvent v2.0" (2007) data base was used (ECOINVENT 2007; data base documentation with calculation steps: JUNGBLUTH et al. 2007, NEMECEK & KÄGI 2007).

### 2.3 Functional unit

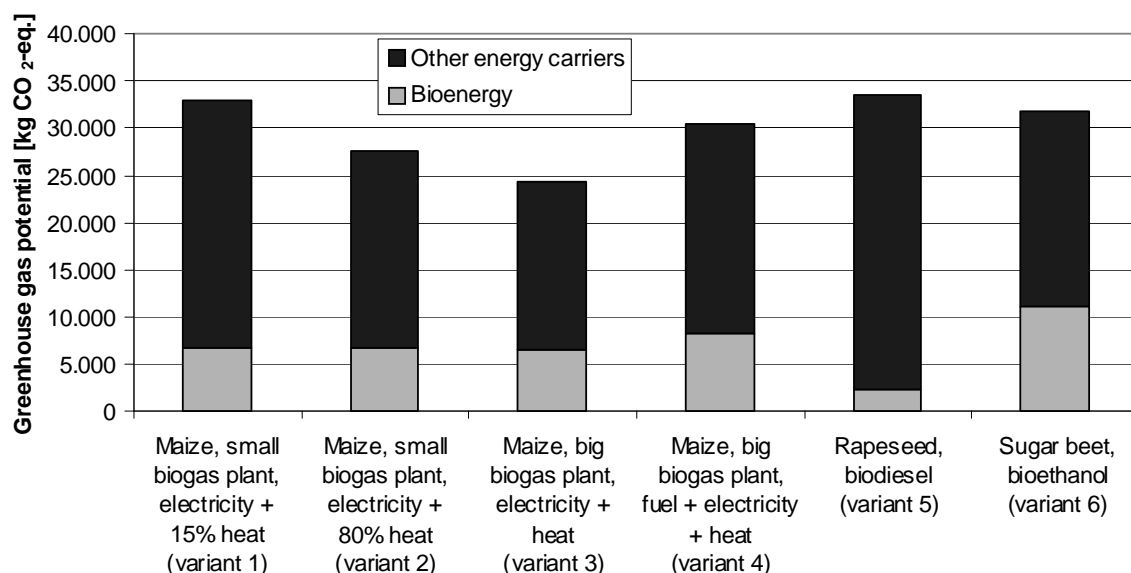
The functional unit is formed by the total content of electricity, heat, and fuel of the "baskets of benefit". Tab. shows the composition of the "baskets of benefit" regarded in this paper.

Tab. 1: Energy contents of the baskets of benefit for 6 bioenergy variants as base data for a life cycle assessment according to the basket of benefit methodology; CHP: combined heat and power; pkm: person-kilometre

Energy crop variant	yield (dt FM / ha)	Energy type	Composition of the baskets of benefit				
			Energy from energy crops, produced on 1 ha		Energy from other resources		Total energy content
Maize, variant (1)	541,6	Electricity (MJ)	Biogas in 350 kW CHP plant	74.248	Electricity grid mix	5.892	84.047
		Heat (MJ)	Biogas in 350 kW CHP plant	13.921	Light heating oil	72.742	87.396
		Fuel (pkm)	--	--	Diesel	101.485	101.485
Maize, variant (2)	541,6	Electricity (MJ)	Biogas in 350 kW CHP plant	74.248	Electricity grid mix	5.892	84.047
		Heat (MJ)	Biogas in 350 kW CHP plant	74.248	Light heating oil	9.240	87.396
		Fuel (pkm)	--	--	Diesel	101.485	101.485
Maize, variant (3)	541,6	Electricity (MJ)	Biogas in 2 MW CHP plant	84.047	--	--	84.047
		Heat (MJ)	Biogas in 2 MW CHP plant	87.396	--	--	87.396
		Fuel (pkm)	--	--	Diesel	101.485	101.485
Maize, variant (4)	541,6	Electricity (MJ)	Biogas in 350 kW CHP plant	13.724	Electricity grid mix	70.324	84.047
		Heat (MJ)	Biogas in 350 kW CHP plant	13.724	Light heating oil	73.672	87.396
		Fuel (pkm)	Biomethane	83.320	Diesel	18.165	101.485
Rapeseed, variant (5)	49,9	Electricity (MJ)	--	--	Electricity grid mix	84.047	84.047
		Heat (MJ)	--	--	Light heating oil	87.396	87.396
		Fuel (pkm)	Biodiesel	42.953	Diesel	58.532	101.485
Sugar beet, variant (6)	747,2	Electricity (MJ)	--	--	Electricity grid mix	84.047	84.047
		Heat (MJ)	--	--	Light heating oil	87.396	87.396
		Fuel (pkm)	Bioethanol	101.485	--	--	101.485

### 3 Results

In order to illustrate the results of the basket of benefit methodology, the two impact categories “greenhouse gas potential” (*Fig. 2*) and “eutrophication potential” (*Fig. 3*) are shown below. Each bar represents the overall emissions of the respective basket of benefit, composed of different energy carriers (see *Tab. 1*). The light parts of the bars show the contribution of the bioenergy to the total basket of benefit emissions, while the dark parts show the share of the other, mostly fossil energy carriers.



*Fig. 2:* Greenhouse gas potential according to the basket of benefit methodology for six bioenergy pathways for the production of the respective amount of bioenergy on 1 ha; for a description of the variants see Chapter 2.2; for the total energy carrier content in the baskets of benefit see *Tab. 1*

The results for the greenhouse gas potential are heterogeneous. Producing biogas from silage maize on one hectare results in high greenhouse gas emissions when it is burned in a 350 kW cogeneration plant with only 15 % of the generated heat being used. The use of biogas as biofuel also results in high greenhouse gas emissions. An improvement in the greenhouse gas potential can be achieved when a larger proportion of the generated heat is used, either directly at the site of the biogas plant or after being fed into the gas grid, electricity and heat then being produced anywhere near the heat consumer. Only this latter possibility shows a real advantage over the cultivation and use of other energy crops for biofuel production on the same piece of land.

*Fig. 3* shows the eutrophication potential for the same bioenergy pathways calculated after the basket of benefit methodology. Here the results are more homogeneous. All biogas utilization pathways show similar results. Their eutrophication potential is twice as high as that of rapeseed methyl ester and bioethanol from sugar beet. This is due to ammonia emissions resulting from the application of biogas digestate as fertilizer and could change if a more emission reducing method for the spreading of the digestate would be implied. According to WENDLAND *et al.* (2007b), storage and application losses of 18.6 % of the nitrogen in the digestate were assumed.

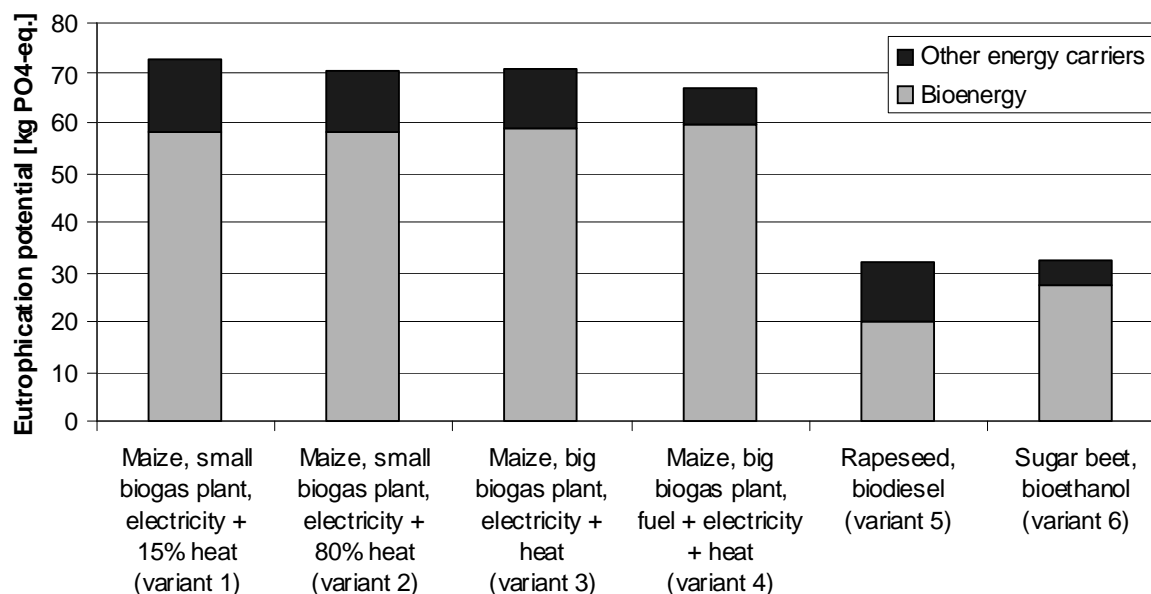


Fig. 3: Eutrophication potential according to the basket of benefit methodology for six bioenergy pathways for the production of the respective amount of bioenergy on 1 ha; for a description of the variants see Chapter 2.2; for the total energy carrier content in the baskets of benefit see Tab. 1

## 4 Conclusions and future research issues

The ranking of different utilization pathways for biogas and other biogenic energy carriers depends on the considered impact category. With regard to the greenhouse gas potential, it can be concluded that a use of biogas for electricity and heat generation results in lower emissions than a use as transportation fuel or the cultivation and use of other energy crops, as long as a big proportion of the generated heat is actually consumed. The average Bavarian agricultural biogas plant, however, does not yet achieve a high percentage of heat use as there usually are not enough heat consumers in the vicinity (EFFENBERGER *et al.* 2007, RÖHLING & KEYMER 2007). The predicted trend towards bigger biogas plants processing energy crops with biogas purification and feeding into the gas grid on the one hand, and smaller biogas plants processing animal manure without energy crops on the other hand (EFFENBERGER 2009), seems to result in more climate friendly bioenergy production.

The basket of benefit approach is suitable for a comparative illustration of the environmental effects of different energy crop utilization pathways. In contrast to the calculation of emission reduction potentials, the emissions actually caused by bioenergy production and use are named closer to reality. This is particularly relevant for impact categories such as eutrophication and acidification potential, where bioenergy does not bring about a reduction, but an additional pressure compared to fossil energies, and where the absolute emissions of different bioenergy pathways are more interesting for environmental protection than a comparison to their fossil reference systems.

Further steps in the project include the modelling of other bioenergy pathways, such as production of ethanol from wheat and of heat from short rotation coppice. For biogas, a variant with a rye-maize crop rotation will be calculated. Results for other impact categories will be presented as well. Furthermore, legal, technical, and economical aspects will

be integrated into the comparison of different energy crop utilization pathways in order to develop a strategy for a sustainable and efficient use of Bavarian crop land for energy crop cultivation.

## 5 Acknowledgements

The authors would like to the Bavarian State Ministry of Agriculture and Forestry and the Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) for their financial support of this project.

## Literature

- CEN (European Committee for Standardization) (2006): Environmental management - life cycle assessment - principles and framework (ISO 14040:2006). CEN, Brussels, B.
- ECOINVENT (2007): ecoinvent v2.0 (2007). Data base (CD-ROM). Swiss Centre for Life Cycle Inventories, Zurich, CH. Internet: [www.ecoinvent.org](http://www.ecoinvent.org)
- EFFENBERGER, M. (2009): Oral communication, June 2009. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising.
- EFFENBERGER, M., E. KRAENSEL, A. LEHNER, A. GRONAUER, J. SIMON (2007): Biogas-Pilotanlagen auf landwirtschaftlichen Betrieben in Bayern. LfL-Information. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising.
- EU (2009): Directive 2009/28/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC. Official Journal of the European Union 52, L 140/16-L140/62
- HEINZER, L., G. GAILLARD, D. DUX and C. STETTER (2000): Ökologische und ökonomische Bewertung von Bioenergieträgern. Schriftenreihe der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Agrarwirtschaft und Landtechnik, vol. 52.
- JUNGBLUTH, N., M. CHUDACOFF, A. DAURIAT, F. DINKEL, G. DOKA, M. FAIST EMMENEGGER, E. GNANSOUNOU, N. KLJUN, K. SCHLEISS, M. SPIELMANN, C. STETTLER and J. SUTTER (2007): Life Cycle Inventories of Bioenergy. ecoinvent report No. 17, Swiss Centre for Life Cycle Inventories, Dübendorf, CH.
- KLICHE, R. (2009): Oral communication, June 2009. Aufwind Neue Energien GmbH, Regensburg
- KTBL (Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V.) (2006): Energiepflanzen - Daten für die Planung des Energiepflanzenanbaus. KTBL-Datensammlung. KTBL, Darmstadt.
- NEMECEK, T. and T. KÄGI (2007): Life Cycle Inventories of Swiss and European Agricultural Production Systems. Final report ecoinvent v2.0 No. 15a. Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, Swiss Centre for Life Cycle Inventories, Zurich/Dübendorf, CH.
- PE INTERNATIONAL (2007): GaBi 4 professional academy (Computer software). PE International, Stuttgart. Internet: [www.gabi-software.com](http://www.gabi-software.com)

- RÖHLING, I. and U. KEYMER (2007): Biogasanlagen in Bayern 2006. Ergebnisse einer Umfrage. LfL-Information. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising.
- STMELF (Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten) (2008): Bayerischer Agrarbericht 2008. StMELF, Munich.
- WENDLAND, M., M. DIEPOLDER and P. CAPRIEL (2007a): Leitfaden für die Düngung von Acker- und Grünland. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising.
- WENDLAND, M., T. DITTMANN and H. GEIGER (2007b): Einsatz als Dünger und Inverkehrbringen der Biogastrückstände. In: Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU) (Ed.): Biogashandbuch Bayern – Materialband. LfU, Augsburg.
- ZAH, R., H. BÖNI, M. GAUCH, R. HISCHIER, M. LEHMANN and P. WÄGER (2007): Ökobilanz von Energieprodukten – Ökologische Bewertung von Biotreibstoffen. Studie des EMPA im Auftrag der Bundesämter für Umwelt, Landwirtschaft und Energie der Schweiz. EMPA Materials Science & Technology, Zurich/St. Gallen/Dübendorf, CH.



## **Greenhouse gas balance of bio-methane – which substrates are suitable?**

K. Arnold

Wuppertal Institut für Klima, Umwelt, Energie,  
Döppersberg 19, PO BOX 100480, 42004 Wuppertal, Deutschland

### **Zusammenfassung**

Biogas oder Biomethan auf Basis von Energiepflanzen ist ein regenerativer Energieträger mit dem Potenzial, einen Beitrag zum Klimaschutz zu leisten. Über den gesamten Lebenszyklus gesehen, entstehen aber dennoch erhebliche Emissionen an Treibhausgasen. Diese resultieren hauptsächlich aus den Aufwendungen der landwirtschaftlichen Prozesse, also für Anbau, Pflege und Ernte der Substrate durch den Einsatz von Dünge- und Pflanzenschutzmitteln.

Im vorliegenden Artikel wird ein integriertes Life Cycle Assessment (Lebenszyklusbewertung, LCA) von Biogas (bzw. Biomethan nach erfolgter Aufbereitung auf Erdgasqualität) vorgelegt, das den heutigen Stand der Technik sowie das Optimierungspotenzial der Fermentations- und Aufbereitungstechniken einschließt. Damit werden sowohl Biogas-Einspeiseanlagen nach heutigem Stand, als auch neue, industriell betriebene Großanlagen adressiert.

Es werden nicht nur technische Fragestellungen betrachtet, sondern ebenso viel Wert auf die Auswahl der Substrate gelegt, die eine wichtige Rolle bei der gesamten ökologischen Bewertung des Energieträgers spielen. Die hier vorgestellten Substrate umfassen neben Mais auch Futterroggen und -hirse, Ganzpflanzensilage aus Triticale und Gerste, sowie die recht neuen und innovativen Optionen eines Ackergrases (*Landsberger Gemenge*) und eine Mischkultur aus Mais und Sonnenblumen.

Die jeweilig untersuchten Substrat-Kombinationen aus regional angepassten Fruchtfolge-systemen sind in Hinsicht auf die resultierende Treibhausgas-Emissionsfaktoren des produzierten Biomethans bilanziert worden.

## Summary

Biogas or bio-methane based on energy crops is a renewable energy carrier and therefore offers the potential to contribute to climate protection. However, significant greenhouse gas emissions have to be considered over the whole life cycle, mainly resulting from agricultural production processes, as fertilizer use, pesticide etc.

The author provides an integrated life cycle assessment (LCA) of biogas (respectively bio-methane after upgrading to the quality of natural gas), taking into account the state of the art and optimization potential for the technologies of fermentation and upgrading, thus examining the current state of the art as well as new, large-scale plants, operated by industrial players.

Not only technical and engineering aspects are taken into account here, but also the choice of feedstock which plays an important role as to the overall ecological evaluation of bio-methane.

The substrates evaluated in this paper – aside from maize – are rye, sorghum, whole-crop-silage from triticale and barley, and the innovative options of agricultural grass (*Landsberger Gemenge*) and a combination of maize and sunflower.

The combination of these crops to regional adjusted crop rotation systems were balanced according to the respective resulting GHG emission factor of the bio-methane produced.

## 1 Introduction

Biogas is produced through fermentation of wet biomass. Unlike most other European-countries, in Germany mostly energy crops from dedicated farming are used as input to the process, rather than residues or sewage gas.

Since the end of 2006 there are several projects for injection of upgrade biogas into the natural gas grid, using the existing infrastructure to distribute the bio-methane to a broader number of probable end users. Bio-methane – as raw biogas after upgrading is called – as a perfect substitute for natural gas can thus be available for CHP application as well as for provision of domestic heat or as an alternative fuel for the transport sector.

Considering the process of upgrading, injection and distribution for different end users, the biogas industry has moved forward from the local, small-scale provision of energy “on-site” at the farm to new markets and possibilities. This step is linked to a professionalization, but also industrialization, which leaves the question, which role bio-methane still can play as a regional, agricultural energy carrier with low climate impact.

The author provides an integrated life cycle assessment (LCA) of biogas (respectively bio-methane after upgrading and injection into the natural gas grid), taking into account the state of the art and optimization potential for the technologies of fermentation, upgrading and injection to the grid, thus examining the current state of the art as well as new, large-scale plants, operated by industrial players. The focus is on large biogas plants ( $\geq 1.000 \text{ Nm}^3/\text{h}$ ) which include the upgrading and injection unit; the given results do not, therefore, hold in any case for small-scale, agricultural biogas plants.

Not only technical and engineering aspects are taken into account here, but also the choice of feedstock which plays an important role as to the overall ecological evaluation of bio-methane. In this paper, regional adjusted crop rotation systems are evaluated according to the respective resulting GHG balance of the bio-methane produced.

## 2 Technological process chain of bio-methane

The technological process chain of bio-methane is pictured in the following scheme. Simplified, the process chain can be divided into four steps: (1) provision of substrates, (2) fermentation to biogas through anaerobic digestion, (3) upgrading of the raw gas to the same quality as natural gas, (4) handling of digestates. The provision of the energy needed for the operation of the reactor and the upgrading unit can be seen as a fifth step. In all process steps, GHG emissions can evolve: directly through leakage of methane, or indirectly through the use of fossil energy or agricultural processes.

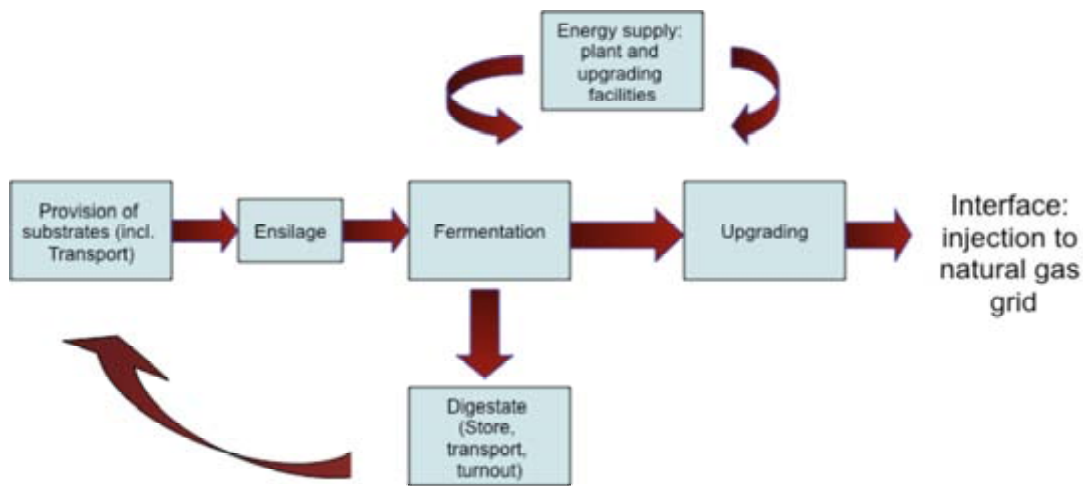


Fig. 1: Scheme of technological process chain of bio methane

The four process steps will be briefly described in the next paragraphs.

### (1) Provision of substrates:

This step includes the cultivation and harvest of the energy crops, as well as the ensilage. Exemplary, maize will be taken as a reference crop, while the full life cycle assessment (LCA) has been made for eight different crops in different crop rotation systems. Most relevant are the data on N-P-K-fertilizers, lime, pesticide, and diesel used in machinery. This data has been provided by [VETTER et.al, 2009] and represent the actual situation on five different locations in Germany.

Furthermore, emissions of nitrous oxide from organic processes in the soil have been taken into account, to the amount of 1 % of the deployed nitrogen fertiliser [IPCC, 2007]. During ensilage of substrates, material losses between 5 and 15 % occur, according to [KTBL, 2007], giving the bandwidth for the two plant configuration types.

### (2) Fermentation:

In the reactor itself there can be leakage of methane due to not properly sealed elements, diffusion from gas-bearing parts or process disturbances. The exact amount of leakage is not exactly scientifically assessed yet, so there is the need for further examination. According to previous studies as [LFL, 2007] and [IFEU, 2008] a number of 1 % of the methane production has been applied, which will be halved to present an optimum case.

Another important parameter is the yield of crude biogas that can be achieved during the digestion. It depends a lot of the constitution and quality of substrate, but also on the construction of the reactor itself. So far, for maize as reference crop, it has been calculated with 200 m<sup>3</sup>/ tFM [FNR, 2006], but operating experience from plant operators show, that even today 10 – 18 % more can be achieved.

### (3) Handling of digestates:

As mentioned before, the LCA is done for large-scale professional operated plants, so it is assumed, that the store of digestate is fully covered and no methane leakage will occur at this point. Nevertheless, in the sensitivity analysis, the effects of a not completely covered store will be explored, to give a perspective of the importance of a closed store.

The digestate will be returned to the cultivator of the crops and deployed as fertilizer. Compared to mineral fertilizer, its value is between 50 – 70 % regarding nitrogen [GUTSER, 2008]. The other nutrients, phosphate and potassium, are not decomposed during the digestion and can be fully regained.

#### (4) Upgrading:

Exemplary, the Pressure Swing Adsorption (PSA) is chosen to be depicted for this article. Highly relevant is the slip rate of methane. Most PSA procedures contain a slip of 2 % [URBAN, 2008]. As there is a regulation of methane slip since the beginning of 2009 in Germany [TSCHIEDEL, 2008], currently it is the common method to put a burner after the PSA to convert the methane catalytically or thermal to carbon dioxide. Again, for both plant configuration types, a methane slip after the after treatment of 0,01% is assumed.

#### (5) Energy supply:

For the operation of the biogas plant and the upgrading facilities, energy is need in form of heat for the reactor and electricity for the stirring unit and pumps. The PSA needs electrical and thermal energy, as well. The data is taken from [URBAN, 2008] and from the plan operators.

The input data to the LCA for both plant configuration types is listed in *Table 1*.

*Tab. 1: Input data for the LCA for the plant configuration types: state of the art and optimized technology*

			State of the art	optimized Technology
provision of substrates*	diesel	l/ha	82,9	82,9
	N-fertilizer	kg/ha	141,75	141,75
	material loss ensilage	% mass	15	5
	N <sub>2</sub> O emissions (soil)	%**	1	1
fermentation	CH <sub>4</sub> leakage reactor	Vol %	1	0,5
	yield of raw gas	m <sup>3</sup> / t FM	200	220
handling of digestate	CH <sub>4</sub> leakage store	%	0	0
	substitution of von N-fertilizer (mineral)	%	70	70
	substitution of von P,K-fertilizer (mineral)	%	100	100
up-grading	CH <sub>4</sub> slip	%	2	2
	remaining CH <sub>4</sub>	%	0,01	0,01
energy supply	electricity (reactor)	kWh el/ t FM	36	36
	heat (reactor)	kWh th/ t FM	83	83
	electricity (PSA)	kWh el/m <sup>3</sup> BG	0,3	0,3
	heat (PSA)	kWh th/m <sup>3</sup> BG	0	0

\*exemplary for maize, without accounting of digestate  
 \*\* calculated in % of nitrogen fertilizer deployed

### 3 GHG emission factors of bio-methane

Two different types of biogas plants have been in the focus of the study: the current state of the art as well as a new, large-scale plant, operated by industrial players (optimized technology). The input parameter for both vary regarding the material loss in ensilage, the yield of raw gas achieved and the methane leakage from the reactor, as can be taken from

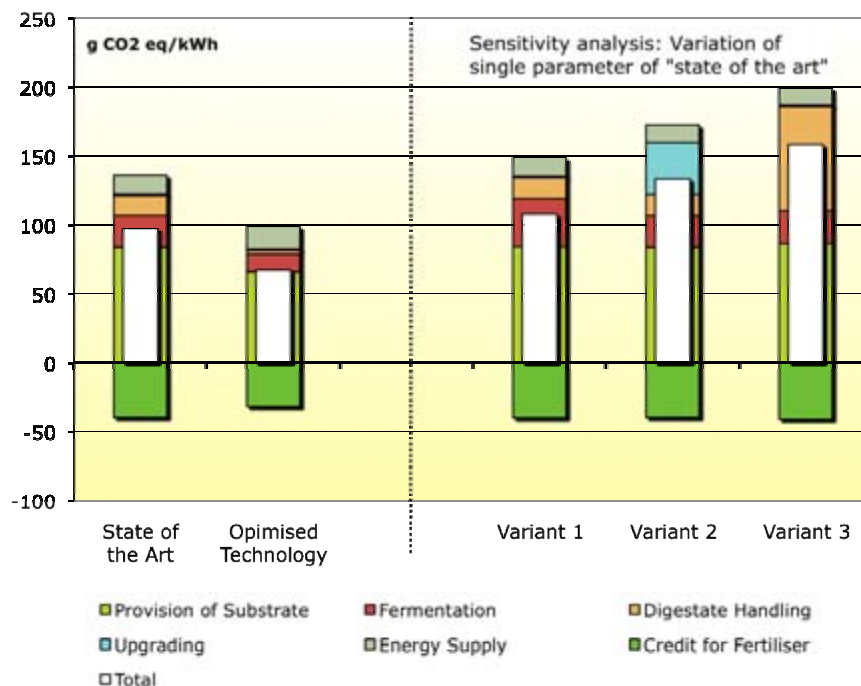
*Table 1.* In the following chapter, first the emission factors of this two plant configurations will be shown, before evaluating single aspects in a sensitivity analysis.

### 3.1 Comparison of plan configurations

*Figure 2* shows the results of the LCA for the GHG emission factors of both plants and the sensitivity analysis. Both plants are operated in a professional way, nevertheless the difference between both types is clearly visible (columns on the left hand side). Compared to the state of the art plant, GHG emissions can be decreased by about 30%, from 97 g CO<sub>2</sub>eq/kWh to 67 g CO<sub>2</sub>eq/kWh, if the currently available most optimized technology is applied.

The difference between the two configurations is mostly due to a combination of lower loss during ensilage and a better yield of raw gas for the optimized technology. Furthermore, a minor leakage of methane from the reactor and a better handling of nitrogen during digestate deployment are visible.

When the technical aspects are optimized as far as possible with today's technology, it is obvious, that the provision of substrates is the main factor for GHG emissions. For the optimized technology plant, its share is about 52 % of the overall balance, having taken the credit for digestate already into account. Research as to the further reduction of GHG from the process chain of bio-methane should therefore focus not only on technology, but a feedstock supply, as well.



Variant 1: increased methane leakage in reactor (1,5% instead of 1%); Variant 2: increased methane slip in PSA (no after treatment, slip of 2% instead of 0,01%); Variant 3: digestate store not completely covered – moderate emissions of 2,5% of gas stored

*Fig. 2: GHG factors of the process chain bio-methane: relation of two plant configurations considered and sensitivity analysis*

### 3.2 Sensitivity analysis: Technical aspects

Direct emissions of methane have the highest single influence to the overall GHG balance, as methane has a higher global warming potential (GWP) as carbon dioxide. Therefore, the process steps where leakage of methane occurs, need to be looked at especially carefully when optimising the production of bio-methane. The following sensitivity analysis is done for three of those steps for the plant according to the current state of the art:

- Variant 1: leakage of methane from the reactor itself is raised from 1 % to 1,5 % due to the mentioned insecurity regarding the quality of data;
- Variant 2: no after treatment of methane leakage from the upgrading unit, the methane slip is still considered to be 2 % instead of 0,01 %;
- Variant 3: it is assumed, that the digestate store is not completely covered. Here, rather moderate emissions of only 2,5 % are depicted, while practical experiences show [FNR, 2005], that up to 15 % and more can be occur. Some of the older and smaller agricultural biogas plants even have open digestate stores. Such plants are, however, not in the focus of this article. The number of 2,5 % has been chosen to give an impression of the high relevance of methane leakage from the digestate store.

This sensitivity analysis is done in full knowledge, that it is mandatory to cover the digestate store and put an after treatment to the upgrading unit, in order to get the full subsidy for bio-methane production and use (innovation bonus in the renewable-energy-law EEG). Admittedly, there is a maximum in plant size of 700 Nm<sup>3</sup>/h for this innovation bonus anyway [LOIBL, 2009], so it cannot be in any case assumed, that the guidelines and specifications will be met from all biogas plants. Therefore, it does make sense to clarify the impacts of non-compliance with the regulation to climate change.

The three variants are shown in the right columns of *Figure 2*.

### 3.3 Sensitivity analysis: Nitrous oxide emissions

Nitrous oxide emissions are not the most important factor in the overall GHG balances, but they still play a role. The current controversy discussed matter of nitrous oxide emissions from organic processes can be of highly importance to the overall GHG balance of bio-methane.

In the above described examinations and results, a value of 1 % of deployed nitrogen fertilizer was assumed to be emitted as nitrous oxide, following the current IPCC reports [IPCC, 2007]. A lot of recent international research indicates, however, that this data might be much too low. [CRUTZEN et.al, 2008] indicated, that this factor of 1 % should be multiplied by 3 or even 5 to take the indirect emissions of nitrous oxide into account, while on the other hand preliminary test with nitrification inhibitors show, that at least for some German locations the (direct) N<sub>2</sub>O emissions could be halved to 0,5 %.

Therefore, in a sensitivity analysis, values from 0,5% to 5% were calculated. The calculation shows, that the overall GHG balance rises for the state of the art technology from 97 g CO<sub>2</sub>eq/kWh if 1 % is applied to 115,8 g CO<sub>2</sub>eq/kWh (2 %) and even 171 g CO<sub>2</sub>eq/kWh for 5 % nitrous oxide emissions of nitrogen fertilizer deployed.

In this assumed “worst case”, there is not much margin of error for the plant technology: if the current state of the art technology is deployed, for example even minor leakage of methane from the digestate store can diminish the GHG difference of bio-methane to natu-

ral gas to nearly zero, thus annihilating the climate protection potential of the renewable energy carrier.

#### 4 Provision of substrates – GHG balance of regional adjusted crop rotation systems

In cooperation with agricultural experts from TLL, Jena, for five different locations throughout Germany regionally adjusted crop rotation systems for the provision of biogas substrates were composed. They all contain maize as the most advantageous energy crop due to the high yield of raw gas as well as the high agricultural yield per acreage, but they all contain different crops as well, as they are typical and well known in the specific regions.

The crop rotation systems are built in a way, that they are adjusted for the production of biogas substrates. Nevertheless, the supply of biogas plants shall not take a part bigger as 30 – 40 % of the overall crop rotation system, to guarantee the farmer flexibility and security of income for his farm. Also, the production of biogas substrates shall be integrated in the conventional agricultural business as unproblematic as possible. Regional characteristics and specifications therefore have been taken into account while composing the crop rotation systems.

The approach was not so much to not use maize, but to use not only maize, in order to contribute to a more diversified agriculture. So, at all locations, maize is deployed, followed by rye and sorghum at four respectively three locations. By choosing silage from the whole crop from triticale and barley as well as cultivated grass (*Landsberger Gemenge*) and a combination of maize and sunflower, at each of the locations a new option is tested, that is not state of the art today.

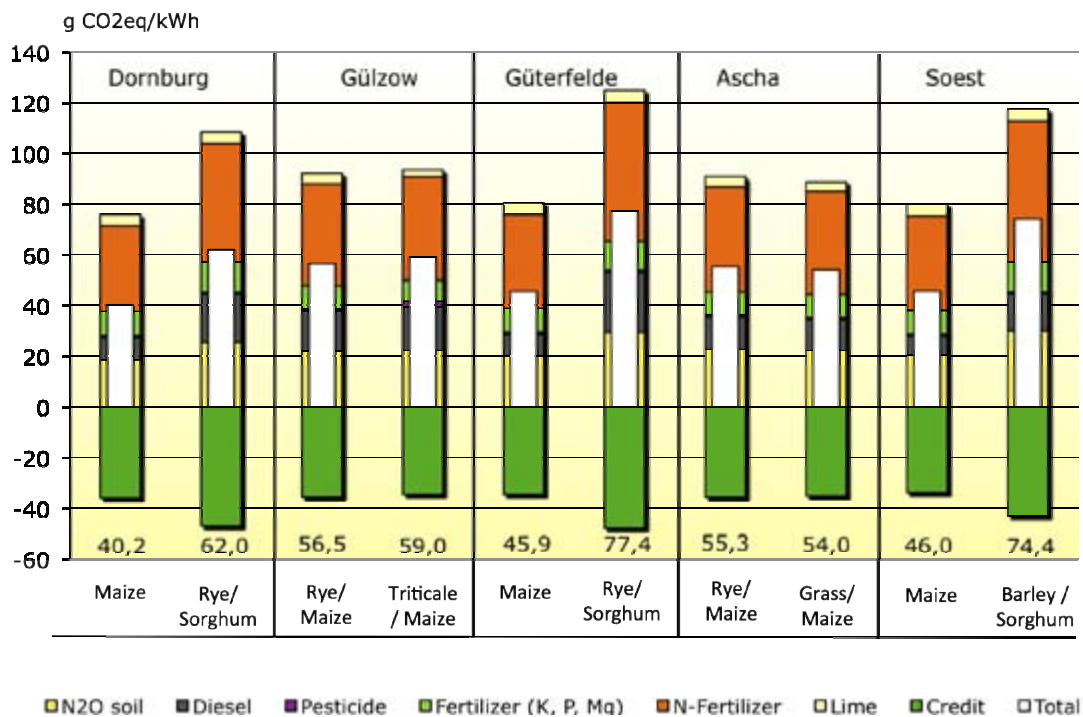


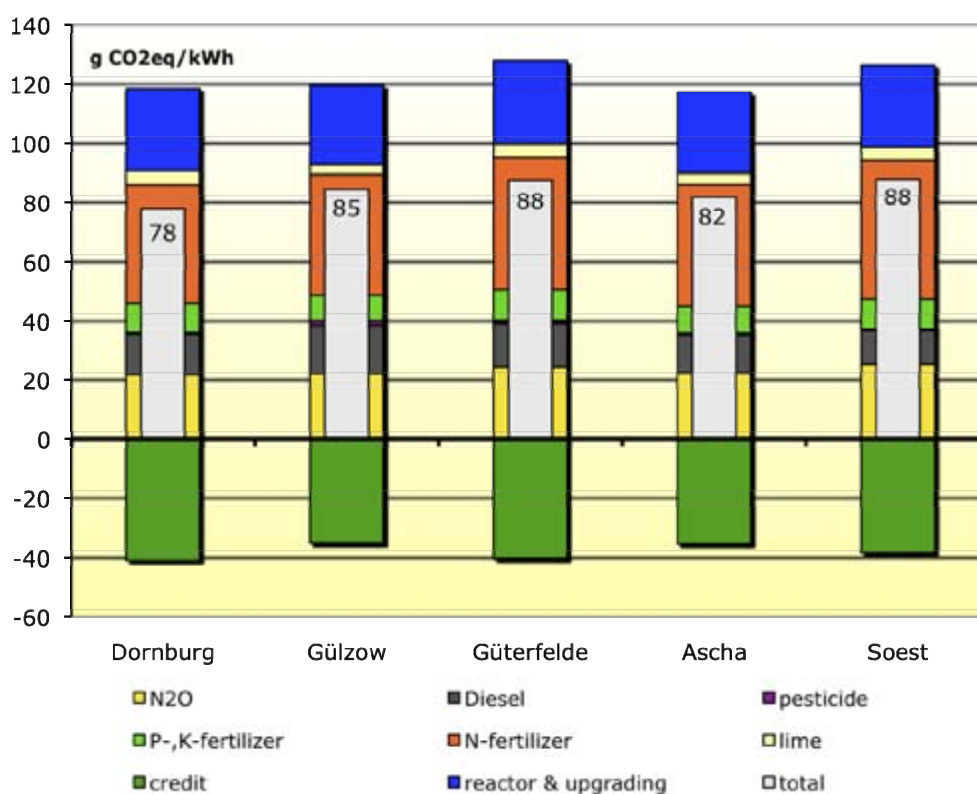
Fig. 3: Resulting GHG balance from the crop rotation system at the five locations



In a first step, the substrates that are combined on the same acreage in one year are depicted in *Figure 3*, where there are two columns for each location. In Dornburg, Güterfelde and Soest maize is the main crop and not combined with another crop in the same year. The system is complemented by rye and sorghum or whole-crop-silage from barley, respectively. At Gülzow maize is combined on one field with rye or whole-crop-silage from triticale, in Ascha maize is combined with rye and grass (*Landsberger Gemenge*). In the graph are only the emissions from the provision of the substrates depicted, without the conversion to bio-methane.

The results are standardised to kilowatt hour of methane. Therefore the yield of biomass from the field and the yield of raw gas per ton of biomass have a huge influence on the diagram. For example, the amount of nitrogen fertilizer per hectare is higher for the cultivation of maize than for rye or sorghum. But as the yield both of biomass as of raw gas is considerably higher for maize as for rye and sorghum, the bar indicating nitrogen fertilizer in *Figure 3* is lower for maize and higher for the other crops, that are less advantageous regarding biogas production.

In the next step, the respective substrates are combined for the each location. The crop rotation systems are perennial: after about five years, the rotation starts again. In order to supply the biogas plant with always the same combination of substrates, the same system is applied at different farms, but shifted. This is according to established experiences in the large-scale biogas plants today.



*Fig. 4: Resulting GHG balance at the locations*

At each location, the combination of substrates contains a minimum of maize. Therefore, in comparison of the resulting respective feedstock supply, the difference between the locations is not as considerable as shown before. This is visible from *Figure 4*.

As can be seen, the difference between the five locations vary only between 78 g CO<sub>2</sub>eq/kWh (Dornburg) and 88 g CO<sub>2</sub>eq/kWh (Güterfelde), if the credit for use of digestate instead of mineral fertilizer is taken into account. This is in line with the current state of the art, as both plant operator as crop cultivator benefit from it.

The main goal of the examination was to prove that there are other choices than just maize as substrate, that can still result in acceptable GHG balances which are not much higher than the ones achieved with maize only.

So even from an climate protection point of view, there is no need to plant maize in large-scale monocropping farms, which is strongly not recommended from an biodiversity, ecological and even agricultural point of view, as monocropping may allow pest and rodents to spread and is not in line with good agricultural praxis.

## 5 Conclusions

Two different types of biogas plant configurations have been closely examined and analyzed: a state of the art plant and one deploying the currently most optimized technology. The results of the LCA hold not in any case for small-scale plants that might not be equally professional operated.

Once the technology is optimized to the point of only marginal methane leakage from the reactor, a considerable yield of raw gas from the substrates, and, most importantly, a closed store for digestate, the cultivation of substrates contributes to the biggest amount to greenhouse gas emissions of the whole process chain.

Bio-methane can be produced from energy crops from dedicated farming without harming or negatively effecting the environment more than from conventional agricultural farming for food and feed production, if regionally adjusted crop rotation systems are deployed. The substrates evaluated in this paper – aside from maize – are rye, sorghum, whole-crop-silage from triticale and barley, and the innovative options of agricultural grass (*Landsberger Gemenge*) and a combination of maize and sunflower.

Regarding the resulting GHG emission factor of bio-methane, a slight increase can be noticed when applying regional adjusted crop rotation systems. On the other hand side, monocropping has its own disadvantages, as an increased risk of pest and rodents and an insecurity of income for the farm in years, when maize is not growing in an optimal way.

The farmer as well as the plant operator should therefore plan with a combination of at least three or four different substrates for the biogas plant. These can vary considerably for different locations, but a broad choice of crops is available, that allows for a satisfying GHG balance, as well.

## Acknowledgements

I would like to thank Armin Vetter, Sven Grebe and others from TLL Jena, Ole Soukup from the Wuppertal Institute, Alexander Vogel and his colleagues from E.ON Ruhrgas and the experts who have attended the workshop “LCA of bio-methane” in January 2009 in Wuppertal for most valuable input and discussions.

## References

- BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT LFL (2007): Klimabilanz für Biogasstrom. Klimabilanz der energetischen Nutzung von Biogas aus Wirtschaftsdüngern und nachwachsenden Rohstoffen. Freising.
- ROBERT EDWARDS, Joint Research Centre, European Commission, Institute for Energy - Renewable Energies Unit: persönliche Mitteilung. Oktober 2008
- FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V. (2005): Ergebnisse des Biogas-Messprogramms.
- BUNDESFORSCHUNGSANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE UND BIOSYSTEMTECHNIK. GÜLZOW.
- P.J. CRUTZEN, A.R. MOSIER, K.A. SMITH, W. WINIWARDER (2008): N<sub>2</sub>O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. Atmos. Chem. Phys., 8, 389–395, 2008
- FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V. (2006): Handreichung Biogasgewinnung und -nutzung. Gülzow.
- FACHAGENTUR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE E.V. (2008): Biogasbasisdaten Deutschland. Gülzow
- FACHVERBAND BIOGAS E.V. (2007): Biogas im Jahr 2020: Wo werden wir stehen? Vortrag bei der 16. Jahrestagung des Fachverbandes Biogas. Leipzig.
- FRAUNHOFER UMSICHT (2008): Technologien und Kosten der Biogasaufbereitung und Einspeisung in das Erdgasnetz. Ergebnisse der Markterhebung 2007-2008. Oberhausen.
- GUTSER, R. (2008): Nährstoff- und Humuswirkungen bestimmen die Vorzüglichkeit organischer Dünger. Vortrag bei 5. Pflanzenbautagung vom 25.01.2008, TU München.
- INSTITUT FÜR ENERGIE- UND UMWELTFORSCHUNG (2008): Basisdaten zu THG Bilanzen für Biogas-Prozessketten und Erstellung neuer THG-Bilanzen. Im Auftrag der E.ON Ruhrgas AG. Heidelberg.
- IPCC (2007): IPCC Fourth Assessment Report: „Climate Change 2007“. Cambridge University Press, UK
- JOINT RESEARCH CENTER (2007): Well-to-wheels analysis of future automotive fuels and powertrains in the european context; <http://ies.jrc.cec.eu.int/Download/eh>
- KURATORIUM FÜR TECHNIK UND BAUWESEN IN DER LANDWIRTSCHAFT E.V. (2007): Faustzahlen Biogas. Darmstadt.
- LANDESUMWELTAMT BRANDENBURG (2008): Überwachung von Biogasanlagen. Vortrag bei Fachtagung Biogas. Brandenburg.
- HELMUT LOIBL (2009): Rechtsfragen bei der Raumplanung und der Genehmigung von Biogasanlagen. Vortrag beim Workshop Rechtsfragen der Einspeisung von Biogas in die Erdgasnetze. Oberhausen, Juni 2009
- SOUKUP, OLE (2008): Erstellung von Produktökobilanzen auf Basis von Stoffstromnetzen für die Bereitstellung von Biogas zur Einspeisung in das Erdgasnetz. Diplomarbeit. Wuppertal.

A. VETTER, S.GREBE, J. BECK, M. SCHEFTELOWITZ: Eignung und Verfügbarkeit verschiedener Anbausysteme für die Produktion von Biogassubstraten auf Modellstandorten in Deutschland. Thüringische Landesanstalt für Landwirtschaft, Jena

WUPPERTAL INSTITUT, INSTITUT FÜR ENERGETIK UND UMWELT LEIPZIG, Fraunhofer UMSICHT, Gas-Wärme-Institut Essen (2006): Analyse und Bewertung der Nutzungsmöglichkeiten von Biomasse. Im Auftrag des BGW/ DVGW. Wuppertal, Leipzig, Oberhausen, Essen.

## Klimagasemissionen und Ressourcenverbrauch von Praxis-Biogasanlagen

H. Bachmaier, M. Effenberger und A. Gronauer

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung,  
Vöttinger Straße 36, 85354 Freising, Deutschland

### Zusammenfassung

Für 10 unterschiedlich konzipierte landwirtschaftliche Biogasanlagen wurde eine detaillierte Berechnung der Treibhausgasemissionen und des kumulierten Energieaufwands erstellt. Im Vergleich zum fossilen Referenzsystem spart die Stromproduktion in allen zehn analysierten Anlagen erhebliche Mengen an klimaschädlichen Emissionen ein. Die Einsparungen betragen zwischen 573 und 910 g CO<sub>2</sub>Äq\*kWh<sub>el</sub><sup>-1</sup>. Ohne Berücksichtigung der fossilen Referenz für die Strombereitstellung reichen die Ergebnisse von einer Emissionsgutschrift in Höhe von 85 g CO<sub>2</sub>Äq\*kWh<sub>el</sub><sup>-1</sup> bis zu Emissionen in Höhe von 251 g CO<sub>2</sub>Äq/kWh<sub>el</sub>. Ebenso liegt der kumulierte Energieaufwand bei den betrachteten Biogasanlagen erheblich niedriger als bei der fossilen Referenz. Die Einsparungen betragen zwischen 2,31 und 3,16 kWh<sub>fossil</sub>\*kWh<sub>el</sub><sup>-1</sup>. Die Erntefaktoren bezogen auf die eingespeiste elektrische Energie liegen zwischen 11 und 72. Entscheidenden Einfluss auf diese Kennzahl hat die Nutzungsphase der Biogasanlage. Anlagen mit geringem Bezug fossiler Energien im Betrieb schneiden hier besser ab. Den höchsten Erntefaktor erreicht eine Anlage mit Gasmotor-BHKW (also ohne Verbrauch von Zündöl) und Anlagenbetrieb mit Strom aus dem BHKW (also ohne Bezug von Netzstrom).

### Summary

For ten agricultural biogas plants a detailed balance of greenhouse gas emissions (GHG) and cumulated energy demand (CED) was calculated. Compared to the reference system based on fossil resources, electricity production from biogas avoids GHG emissions from 573 to 910 g CO<sub>2</sub>eq\*kWh<sub>el</sub><sup>-1</sup>. Without accounting for the substitution of electricity from the reference system, GHG emissions range from -85 g CO<sub>2</sub>eq\*kWh<sub>el</sub><sup>-1</sup> to 251 g CO<sub>2</sub>Äq\*kWh<sub>el</sub><sup>-1</sup>. With savings of 2.31 to 3.16 kWh<sub>fossil</sub>\*kWh<sub>el</sub><sup>-1</sup>, the CED of the biogas plants was also much lower than that of the fossil reference system. Energy yield ratios with respect to electricity fed into the grid ranged from 11 to 72. Dominant factors for the energy yield ratio were the life-expectancy and the demand for fossil energy of the biogas plant. The highest energy yield ratio was calculated for a plant that was equipped with a gas engine (no fuel oil required) and covered its electricity demand from own production.

# 1 Einleitung

Energie aus Biogas wird in erster Linie erzeugt, um die Treibhausgasemissionen der Energieproduktion aus fossilen Energieträgern zu reduzieren und um fossile Ressourcen einzusparen. Im Folgenden wird die Methode und die Ergebnisse der Berechnung der Treibhausgasemissionen und des kumulierten Energieaufwands für 10 unterschiedlich konzipierte Praxis-Biogasanlagen vorgestellt.

## 2 Methode

Für die Bewertung der Umweltwirkungen wurde die Ökobilanzmethode gewählt (DIN, Deutsches Institut für Normung e.V., 2006a; b). In einer Ökobilanz werden die Umweltwirkungen eines Produkts oder eines Verfahrens über den gesamten Lebensweg von der Rohstoffgewinnung, über die Produktion bis zur Entsorgung untersucht. Bei dieser ganzheitlichen Betrachtung kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass ein eventuell bestehendes Umweltproblem aus dem betrachteten Bilanzrahmen in einen angrenzenden Bilanzrahmen, der nicht Teil der Bewertung ist, verschoben wird. Für die Wirkungsabschätzung wurde die Methode nach Umweltbundesamt (1999) verwendet.

### 2.1 Ziel und Untersuchungsrahmen

Im ersten Schritt einer Ökobilanz wird das Ziel formuliert, die untersuchte Verfahrenskette beschrieben und das betrachtete System abgegrenzt.

#### 2.1.1 Zieldefinition

Die Ökobilanz soll die Treibhausgasemissionen und den Verbrauch fossiler Ressourcen bei der Bereitstellung von Strom und Wärme auf zehn realen Biogasanlagen ermitteln. Ein Vergleich der Anlagen soll Hinweise zur Spannweite bestimmter Größen und zur Verminderung der Treibhausgasemissionen und des Ressourcenverbrauchs liefern.

#### 2.1.2 Funktionelle Einheit

Die funktionelle Einheit stellt ein Maß für den Nutzen des betrachteten Prozesses dar und dient als Bezugsgröße für ein- und ausgehende Stoffströme. Das Hauptprodukt der betrachteten Biogasanlagen ist elektrischer Strom. Als funktionelle Einheit wurde daher eine Kilowattstunde elektrischer Strom gewählt, der ins Stromnetz eingespeist wird. Alle Stoff- und Energieströme werden auf diese Einheit bezogen.

#### 2.1.3 Untersuchungsrahmen und Untersuchungszeitraum

Der Untersuchungsrahmen umfasst alle zur Energieproduktion notwendigen Prozesse und die sie verbindenden Material- und Energieflüsse. Die Verfahrenskette Biogas wurde dazu in folgende Abschnitte aufgeteilt:

- Erzeugung, Transport und Konservierung der pflanzlichen Rohstoffe sowie Transport der Wirtschaftsdünger,
- Betrieb der Biogasanlage,
- Gärrestbehandlung und
- Errichtung der Biogasanlage.

Eventuell vorhandene weitere landwirtschaftliche Betriebszweige auf den Praxis-Biogasanlagen waren nicht Teil der Betrachtung. Als Untersuchungszeitraum wurde das Kalenderjahr 2007 gewählt. Die Stoffströme für die Anlagenerrichtung wurden entsprechend der technischen Lebensdauer der Bauteile nur mit dem jeweiligen Zeitwert berücksichtigt.

## 2.2 Sachbilanz

Die Sachbilanz enthält die Basisdaten zur Ermittlung der Ökobilanz. Hier werden die jeweiligen ein- und ausgehenden Stoffströme der einzelnen Prozesse angegeben. Anschließend können diese Daten zur Gesamtbilanz addiert und auf die funktionelle Einheit bezogen werden.

### 2.2.1 Modellierung Biogasanlagen

Das detaillierte Modell der Stoffströme der Praxis-Biogasanlagen wurde mit der Software Umberto erstellt. Auf eine genauere Beschreibung der unterschiedlichen Anlagen wird an dieser Stelle verzichtet. Technische Eckdaten der Biogasanlagen finden sich im Tagungsbeitrag von Djatkov et al., ausführlich sind die Anlagen bei Effenberger et. al (2009) beschrieben.

### 2.2.2 Datensammlung

Hauptsächlich wurden die Material- und Energieströme aus während des Untersuchungszeitraums erhobenen Daten oder auf Basis von Einzelmessungen ermittelt. Ein Teil der benötigten Daten wurde der Literatur entnommen oder abgeschätzt.

**Anbau der nachwachsenden Rohstoffe (NAWARO):** Die Ernteketten für den Anbau der jeweiligen nachwachsenden Rohstoffe wurden auf Basis von KTBL (2006; 2008) mit mittleren Hektarerträgen modelliert. Für den Anbau aller Feldfrüchte wurde „Wendende Bodenbearbeitung“ unterstellt.

Die gasförmigen Ammoniakverluste bei der Gärrestausrückführung hängen wesentlich von den Temperaturen zum Zeitpunkt der Ausbringung und vom Zeitpunkt der Einarbeitung des Gärrests in den Boden ab. Tabelle 1 zeigt die angenommenen Anteile der Emissionsniveaus für Ackerland und Grünland. Die Werte gelten für eine Ausbringung des Gärrests mit einem emissionsintensiven Breitverteiler. Zusätzlich wurde festgelegt, dass 25 % des Gärrests mit Breitverteiler und 75 % mit Schleppschlauchtechnik ausgebraucht werden. Nach KTBL (2005) lassen sich mit letzterer Technik im Vergleich zur Ausbringung mit Breitverteiler im Schnitt 40 % der Emissionen vermeiden (KTBL, 2008, S. 268: mittlerer Wert für Gülle). Die Emissionen bei der Ausbringung von Gärrest auf Grünland wurden im Vergleich zur Ausbringung auf Acker etwas ungünstiger angenommen, da keine Möglichkeit der Einarbeitung des Gärrests in den Boden besteht.

Tab.1: Berechnungsgrundlage für Ammoniakemissionen auf Ackerland und Grünland

	Ammoniakemissionsstufen - Anteile bezogen auf die gesamte Ammoniakfracht im Gärrest bei Ausbringung mit Breitverteiler				
	10%	20%	30%	40%	50%
Anteil der Emissionsstufen auf Ackerland [%]	20	30	25	15	10
Anteil der Emissionsstufen auf Grünland [%]	10	20	30	25	15
<b>Eingesetzte Ausbringtechnik</b>					
Breitverteiler	25%				
Schleppschlauch		75%			
<b>Verminderung der Emissionen mit Schleppschlauchtechnik</b>			40%		
bezogen auf Emissionen des Breitvertailers					

Der Düngbedarf wurde als Summe des Stickstoffentzugs der pflanzlichen NAWARO und der unvermeidbaren Stickstoffverluste ermittelt. Die unvermeidbaren Auswaschungsverluste von Stickstoff, die Düngewirksamkeit von organischem Stickstoff sowie die N-Lieferung von Leguminosen wurde basierend auf den Angaben in Wendland (2007: Seite 21, 48 und 60) ermittelt. Der organische Stickstoff wurde zu 80 % in der Düngebilanz berücksichtigt. Es wurde weiterhin angenommen, dass die Differenz aus dem düngewirksamen Stickstoff im ausgebrachten Gärrest und dem Düngbedarf durch mineralische Dünger ersetzt wird (außer bei der ökologisch wirtschaftenden Biogasanlage B). Da bei der Vergärung die Nährstoffe Kaliumoxid und Phosphat nach Wendland (2008) in voller Höhe erhalten bleiben, wurde kein zusätzlicher Einsatz von mineralischem Kali- und Phosphatdünger unterstellt.

Basierend auf den Annahmen im Nationalen Inventarbericht zum deutschen Treibhausgasinventar (Umweltbundesamt, 2009: Seite 365) wurde zugrundegelegt, dass 1,0 % des ausgebrachten Stickstoffs (in Mineraldünger und Gärrest) in Lachgas umgewandelt wird. Die Entfernung zwischen Feld und Silo wurde für alle Anlagen einheitlich auf drei Kilometer festgelegt. Die Masseverluste der NAWARO bei der Lagerung wurde nach KTBL (2008) für Maissilagen mit 13 %, für Getreide-Ganzpflanzsilagen mit 12 %, für Körnersilagen mit 9 % und für Rübensilagen mit 20 % angesetzt.

**Betrieb der Biogasanlage:** Die Substratzugabe und der Eigenenergieverbrauch, die Biogasproduktion und die Stromproduktion der Anlagen wurden tagesgenau erhoben. Es wurde jeweils berücksichtigt, woher die elektrische Energie für die Biogasanlage bezogen wird (aus eigener Stromproduktion, aus dem Stromnetz oder von einem eigenen Kleinwasserkraftwerk). Die direkten Emissionen der Biogasanlage wurden in Höhe von 1 % der Biogasproduktion angenommen. Für die Anlagen mit Gasfackel (C und F) wurden reduzierte Emissionen in Höhe von 0,25 % der Biogasproduktion zugrundegelegt. Die Emissionen der Blockheizkraftwerke (BHKW) wurden in Einzelmessungen meist baugleicher Biogas-BHKW ermittelt. Die Leitungsverluste bis zum öffentlichen Stromnetz und die Transformationsverluste auf Mittelspannung wurden zusammen mit 1 % des produzierten Stroms festgesetzt.

**Errichtung der Biogasanlage:** Da bei der Errichtung einer Biogasanlage die Materialien Beton, Asphalt, Stahl und Ziegel bei weitem dominieren, wurde die Stoffstrombilanz für die Errichtung der Biogasanlage auf diese Materialien beschränkt. Fernwärmeleitungen wurden nicht berücksichtigt.

**Gärrestbehandlung:** Fünf der zehn Biogasanlagen verfügten im Untersuchungszeitraum über ein offenes Gärrestlager (Anlagen B, F, H, I, J). Die Methanemissionen aus dem Gärrestlager wurden basierend auf dem in Gärversuchen ermittelten Restgaspotential abgeschätzt. Für die Gärversuche wurde Substrat aus dem Nachgärer in Laborfermentern ohne Zusatz von Inokulum bei 22°C ca. 60 Tage vergoren. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass die durchschnittliche Temperatur in einem Gärrestlager jedoch niedriger liegt, und zwar zwischen 14 und 15 °C. Da bei niedrigeren Temperaturen mikrobiologische Umsetzungsvorgänge verlangsamt werden und der Gärrest vor allem im kalten Winterhalbjahr über längere Zeiträume lagert, wurden die Emissionen aus offenen Gärrestlagern mit 70 % des ermittelten Gasertrags bei 22°C festgesetzt. Bei Anlage F findet zwischen Nachgärer und Gärrestlager eine Fest-Flüssig-Trennung statt. Die feste und die flüssige Phase wird offen gelagert. Für die Berechnungen wurden nur Methanemissionen aus der flüssigen Phase berücksichtigt.



### 2.2.3 Allokationsverfahren

Bei der Biogasproduktion entstehen neben dem Hauptprodukt elektrischer Strom getrennt verwertbare Nebenprodukte (Wärme und Dünger). Diese Nebenprodukte wurden über Gutschriften in der Sachbilanz berücksichtigt. Es wurde angenommen, dass die genutzte BHKW-Abwärme die Wärmebereitstellung eines Ölheizkessels ersetzt. Für Gärrest, der aus dem Untersuchungsrahmen exportiert wurde, wurde eine Gutschrift in Höhe von 80 % der äquivalenten Mineralstickstoffmenge gewährt. Neben der Gutschrift für den abgegebenen Stickstoff erfolgte bei Anlage E auch eine Gutschrift für im Gärrest enthaltenes Phosphat und Kali (jeweils 100 % des mineralischen Äquivalents).

## 2.3 Wirkungsabschätzung

Die Wirkungsabschätzung verdeutlicht die möglichen Umweltfolgen, die aus der Sachbilanz resultieren. Die Stoff- und Energieströme wurden den Umweltkategorien Treibhauseffekt und Kumulierter Energieaufwand (KEA) zugeordnet. Dabei wurden alle klimawirksamen Emissionen der Sachbilanz auf kg Kohlendioxidäquivalente umgerechnet und aggregiert (Umrechnungsfaktoren für Methan 21 und für Lachgas 310 kg CO<sub>2</sub>-Äquivalente\*kg<sup>-1</sup>).

Für den kumulierten fossilen Energieaufwand wurden alle nichtregenerativen fossilen Primärenergien für Bau und Betrieb der Anlage aufsummiert. Die Rückbau der Anlage und das Materialrecycling wurden nicht berücksichtigt. Fossile Energie wird vor allem verbraucht durch den Dieseleinsatz der Landmaschinen, den Bezug von elektrischer Energie aus dem öffentlichen Stromnetz für den Anlagenbetrieb und die Herstellung mineralischer Düngemittel. Bei Biogasanlagen korreliert der KEA nicht zwingend mit der Treibhausgasbilanz, da geringe Mengen an stark klimaschädlichen Methan- bzw. Lachgasemissionen die Energiebilanz nicht beeinflussen.

Der Erntefaktor gibt an, um wie viele Male die Erzeugung einer Energieanlage während ihrer Lebensdauer die für die Herstellung, den Betrieb und die Entsorgung der Anlage benötigte Energiemenge übertrifft (nach FfE, 1996). Bei der Berechnung wurde eine Laufzeit der Anlage von 20 Jahren angenommen. Die Entsorgung der Anlage wurde nicht berücksichtigt. Pro Anlage wurden zwei Erntefaktoren berechnet: zum einen der Erntefaktor bezogen auf die eingespeiste elektrische Energie und zum anderen der Erntefaktor bezogen auf die gesamte zur Nutzung abgegebene Energie (Strom und Wärme).

## 2.4 Referenzen

Die Referenzen berücksichtigen alternative Lebenswege für In- und Outputs der Biogasanlagen. Elektrische Energie aus Biogas ersetzt Energie aus fossilen Quellen. Nach Bundesministerium für Umwelt (2007) ersetzt Biogasstrom zu 30 % Strom aus Gas-Kraftwerken und zu 70 % aus Steinkohlekraftwerken. In diesem Kraftwerksmix wird Strom mit Emissionen in Höhe von 825 g CO<sub>2</sub>-Äquivalenten und einem Kumulierten fossilen Energieaufwand in Höhe von 2,55 kWh pro kWh<sub>el</sub> erzeugt. Die Ergebnisse werden sowohl mit als auch ohne fossile Referenz dargestellt.

Mit der Vergärung von Wirtschaftsdüngern tierischer Herkunft in Biogasanlagen lassen sich die Methanemissionen der ansonsten notwendigen Wirtschaftsdüngerlagerung vermeiden. Die Emissionen aus der Lagerung von Wirtschaftsdüngern wurden für Rindergülle mit 13,5 %, für Schweinegülle mit 16,3 %, für Schweine- und Rinderfestmist mit 2 % und für Hühnermist mit 2,25 % des jeweiligen Methanertragspotentials festgesetzt. (Annahmen übernommen aus: Umweltbundesamt, 2009: Tabelle 91ff). Diese durch die Ver-

gärung vermiedenen Emissionen wurden in der Treibhausgasbilanz als Gutschrift berücksichtigt.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Übersicht der Ergebnisse

Im Vergleich zum fossilen Referenzsystem sparen alle Biogasanlagen erhebliche Mengen an klimaschädlichen Emissionen ein (Tabelle 2). Die Einsparungen betragen zwischen 573 (Anlage H) und 910 Gramm CO<sub>2</sub>-Äquivalente pro eingespeiste kWh<sub>el</sub> (Anlage E). Gegen Null bilanziert, also ohne Berücksichtigung der fossilen Referenz für die Strombereitstellung, reichen die Emissionen von einer Emissionsgutschrift in Höhe von 85 g CO<sub>2</sub>-Äq/kWh<sub>el</sub> (Anlage E) bis zu Emissionen in Höhe von 251 g CO<sub>2</sub>-Äq/kWh<sub>el</sub> (Anlage H) (Abbildung 4).

Ebenso liegt der kumulierte Energieaufwand bei den betrachteten Biogasanlagen erheblich niedriger als bei der fossilen Referenz. Die Einsparungen betragen zwischen 2,31 (Anlage G und B) und 3,16 kWh<sub>fossil</sub>/kWh<sub>el</sub> (Anlage E) (Tabelle 2).

Die Erntefaktoren bezogen auf die eingespeiste elektrische Energie liegen zwischen 11 (Anlage H) und 72 (Anlage C). Entscheidenden Einfluss auf diese Kennzahl hat die Nutzungsphase der Biogasanlage. Anlagen mit geringem Bezug fossiler Energien im Betrieb schneiden hier besser ab. Den höchsten Erntefaktor erreicht eine Anlage mit Gasmotor-BHKW (also ohne Verbrauch von Zündöl) und Anlagenbetrieb mit Strom aus dem BHKW (also ohne Bezug von Netzstrom) (Tabelle 3).

### 3.2 Die Ergebnisse im Einzelnen

Um die Unterschiede der Treibhausgasbilanz und des KEA zwischen den Anlagen zu verdeutlichen, erfolgt die Diskussion auf Basis der gegen 0 bilanzierten Daten (Abbildung 4 und Abbildung 5). Für die Anlagen C, E und G wurden Sankey-Diagramme erstellt (Abbildungen 1 - 3). Das Klimasaldo in den Sankey-Diagrammen ist geringfügig positiver als in Abbildung 4, da bei den Sankey-Diagrammen die Aufwendungen für die Errichtung der Anlagen nicht berücksichtigt wurden.

**Anlage A:** Die Anlage emittiert vergleichsweise wenig Methan, andererseits entstehen aber nur sehr geringe Gutschriften für eingesetzten Wirtschaftsdünger und die Abwärme aus dem Blockheizkraftwerk wird nur zu einem kleinen Teil genutzt.

**Anlage B:** Diese Anlage ist durch hohe Emissionen aus dem Betrieb der Anlage gekennzeichnet (hoher Strombedarf und hohe Emissionen aus dem offenen Gärrestlager). Der Anbau der NAWARO erfolgt ohne zusätzliche mineralische Dünger. Durch den Einsatz großer Mengen Kleegrassilage wird Stickstoff im System angereichert und Gärrest kann an andere ökologisch wirtschaftende Marktfruchtbetriebe abgegeben werden. Dafür wird eine Gutschrift berechnet. Wirtschaftsdünger werden nur in geringem Maß eingesetzt, die anfallende Abwärme des BHKW kann nicht genutzt werden.

**Anlage C:** Die Anlage bezieht keine Energie aus dem Stromnetz, der Anlagenbetrieb erfolgt vollständig mit Strom aus dem BHKW (Überschusseinspeisung). Es fallen daher keine Emissionen aus der Vorkette der Strombereitstellung an (Abbildung 1). Die direkten Methanemissionen sind aufgrund eines emissionsarmen BHKW und einer Gasfackel für überschüssiges Biogas auf sehr niedrigem Niveau. Die hohe Gutschrift für die genutzte Abwärme kompensiert die entstehenden Emissionen fast komplett. Gasmotor-BHKW und

Eigenstromversorgung haben die höchsten Erntefaktoren im Vergleich der zehn Anlagen zur Folge.

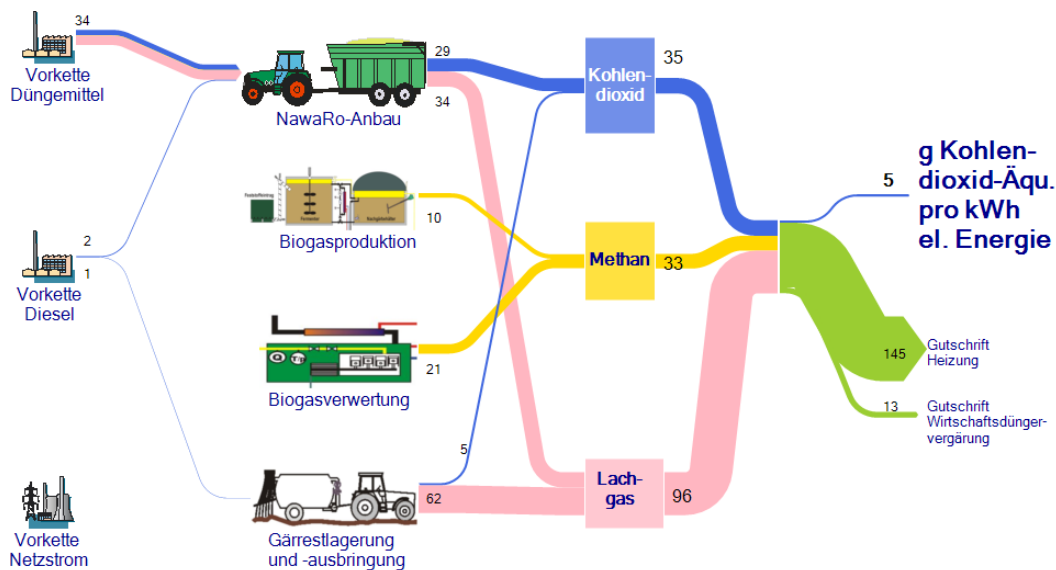


Abb. 1: Sankey-Diagramm der Klimagasemissionen von Anlage C. Bei dieser Darstellung werden die klimarelevanten Stoffflüsse von links nach rechts aufsummiert. Die Dicke der Pfeile ist proportional zur Menge der Treibhausgase. Kohlendioxid, Methan und Lachgas wurden in Kohlendioxidäquivalenten dargestellt.

**Anlage D:** Es wird kein Wirtschaftsdünger eingesetzt, die Abwärme kann zum Teil genutzt werden. Die hohen Emissionen für den Anbau der NAWARO sind auf die vergleichsweise schlechte Silagequalität und biologische Probleme bei der Vergärung im Beobachtungsjahr zurückzuführen.

**Anlage E:** Diese Anlage weist mit einer Netto-Vermeidung von  $85 \text{ g CO}_2\text{-Äq} \cdot \text{kWh}_{\text{el}}^{-1}$  die günstigste Treibhausgasbilanz auf. Durch den Einsatz eines hohen Anteils an Hähnchenmist können in dieser Anlage pflanzliche NAWARO eingespart werden. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich wird, ist zum Anbau der nachwachsenden Rohstoffe rechnerisch kein zusätzlicher mineralischer Dünger nötig. Ein Teil des Gärrests kann daher abgegeben werden (Dünergutschrift). Die Abwärme kann zu einem hohen Anteil genutzt werden.

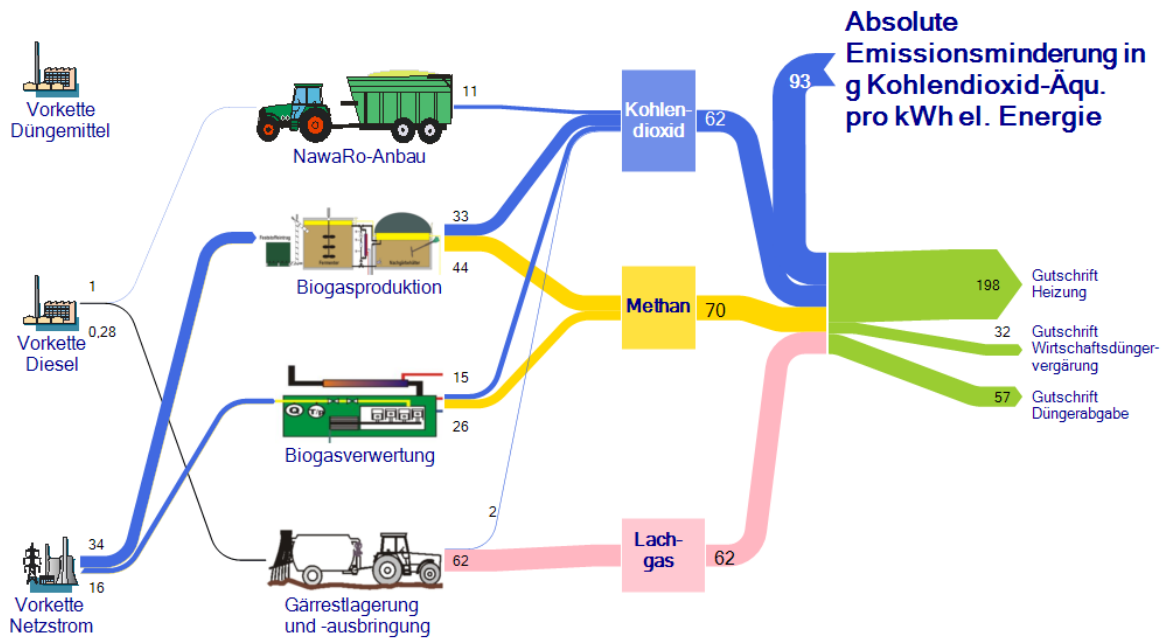


Abb. 2: Sankey-Diagramm der Klimagasemissionen von Anlage E

**Anlage F:** Wie bei Anlage E werden auch auf dieser Anlage größere Mengen an Hähnchenmist eingesetzt. Dadurch verringert sich der Bedarf an pflanzlichen NAWARO. Darüber hinaus ist kein Zukauf von mineralischem N-Dünger notwendig. Die Abwärme kann sehr gut genutzt werden. Die Anlage verfügt über eine Gasfackel, so können die Methanemissionen aus der Biogasproduktion niedrig gehalten werden. Das BHKW emittiert jedoch bauartbedingt große Mengen an unverbranntem Methan (Methanschluß). Der Gärrest wird separiert und die feste und flüssige Phase werden offen gelagert. Die Emissionen der flüssigen Phase wurden berücksichtigt.

**Anlage G:** Wirtschaftsdünger steht als Substrat zur Verfügung, die BHKW-Wärme konnte zu einem Teil genutzt werden. Bauartbedingt ist der Methanschluß im BHKW-Abgas hoch. Der Verbrauch fossiler Ressourcen während des Anlagenbetriebs ist hoch (Strombezug aus Netz, Zündstrahl-BHKW), die Erntefaktoren betragen daher 19 bezogen auf die eingespeiste elektrische Energie bzw. 22 bezogen auf in Nutznetze eingespeiste Strom und Wärme.

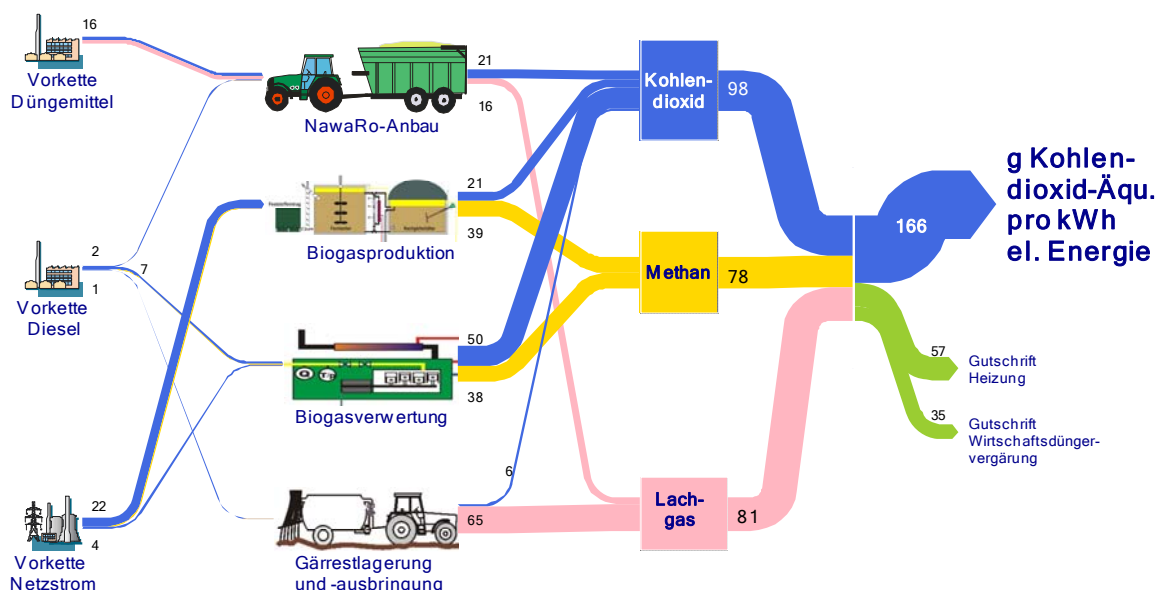


Abb.3: Sankey-Diagramm der Klimagasemissionen von Anlage G

**Anlage H:** Diese Anlage ist einerseits durch eine gute Wärmenutzung, andererseits durch hohe Methanemissionen mit dem BHKW-Abgas gekennzeichnet. Ein Teil des Betriebsstroms wird von einer hofeigenen kleinen Wasserkraftanlage bezogen. Im Beobachtungszeitraum verfügte die Anlage nur über ein offenes Gärrestlager. Das BHKW weist einen hohen Zündölverbrauch auf. Die Biogas-Verstromung erfolgt in einem Zündstrahl-BHKW, ein Teil der elektrischen Energie für den Anlagenbetrieb stammt aus dem Stromnetz.

**Anlage I:** Die Abwärme des BHKW kann zum Teil genutzt werden. Darüber hinaus wird eine kleinere Menge Wirtschaftsdünger eingesetzt. Der Betrieb der Anlage mit einem hohen Anteil an Getreide- und Mais Kornbrei macht sich in der Klimabilanz auf den ersten Blick nicht bemerkbar. Die Emissionen aus dem Gärrestlager verschlechtern die Klimabilanz um  $65 \text{ g CO}_2\text{-Äq} \cdot \text{kWh}_{\text{el}}^{-1}$ .

**Anlage J:** Die Gutschrift für eingesetzte Wirtschaftsdünger und genutzte Abwärme beträgt  $99 \text{ g CO}_2\text{-Äq} \cdot \text{kWh}_{\text{el}}^{-1}$ . Im Beobachtungszeitraum verfügte die Anlage nur über ein offenes Gärrestlager.

Tab. 2: Treibhausgasbilanz und Kumulierter fossiler Energieaufwand (KEA) der Praxisanlagen inkl. Gutschrift für Stromeinspeisung

Anlage	G	C	F	H	A	I	B	D	E	J
Treibhausgasbilanz der 10 Praxis-Biogasanlagen inkl. Gutschrift für Stromeinspeisung [g CO <sub>2</sub> -Äquivalente / kWh <sub>el</sub> ]	-648	-808	-795	-601	-573	-608	-617	-662	-910	-661
KEA der 10 Praxis-Biogasanlagen inkl. Gutschrift für Stromeinspeisung [kWh <sub>KEA</sub> /kWh <sub>el</sub> ]	-2,3	-2,9	-3,1	-2,3	-2,3	-2,8	-2,3	-2,7	-3,2	-2,5

Tab.3: Erntefaktoren der Praxis-Biogasanlagen

Anlage	G	C	F	H	A	I	B	D	E	J
Erntefaktor bezogen auf eingespeiste elektrische Energie	19	72	35	11	32	37	22	35	38	32
Erntefaktor bezogen auf eingespeiste elektrische und thermische Energie	22	99	55	16	34	49	22	44	57	37

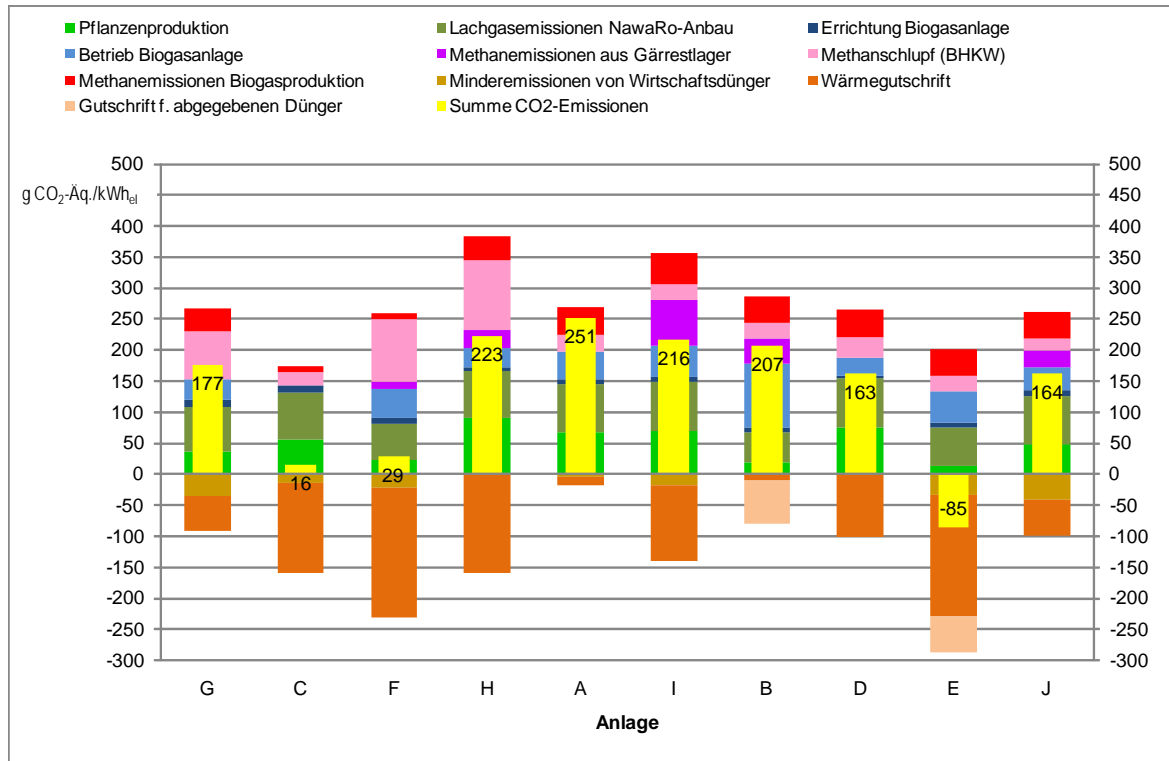


Abb. 4: Treibhausgasbilanz der 10 Praxis-Biogasanlagen ohne Gutschrift für Stromerzeugung („Null-Szenario“)

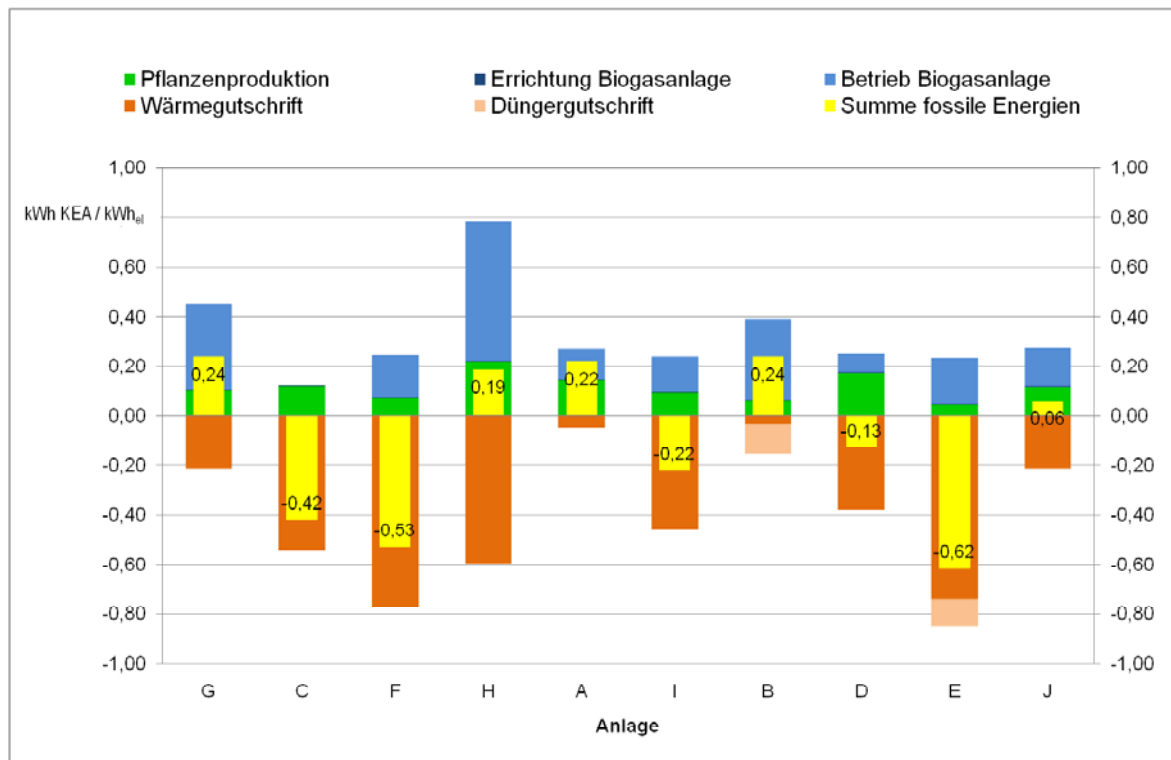


Abb. 5: Kumulierter fossiler Energieaufwand der 10 Praxis-Biogasanlagen ohne Gutschrift für Stromerzeugung („Null-Szenario“)

## Literaturverzeichnis

- BACHMAIER, H., M. EFFENBERGER, A. LEHNER, A. GRONAUER (2008): Klimabilanz von Praxis-Biogasanlagen. In: Wulf, Sebastian (Hrsg.): Ökologische und ökonomische Bewertung nachwachsender Energieträger. Darmstadt: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (KTBL-Schrift 463), S. 194–200
- BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT (2007): Umweltpolitik Erneuerbare Energien in Zahlen - nationale und internationale Entwicklung. Berlin.
- DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. (2006a): Umweltmanagement- Ökobilanz- Grundsätze und Rahmenbedingungen (ISO 14040:2006); Deutsche und Englische Fassung EN ISO 14040:2006. Berlin.
- DIN, Deutsches Institut für Normung e.V. (2006b): Umweltmanagement- Ökobilanz- Anforderungen und Anleitungen (ISO 14044:2006); Deutsche und Englische Fassung EN ISO 14044:2006. Berlin.
- EFFENBERGER, M., H. BACHMAIER, E. KRÄNSEL, A. LEHNER, A. GRONAUER (2009): Wissenschaftliche Begleitung der Pilotbetriebe zur Biogasproduktion in Bayern. Abschlussbericht an das Bayerische Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising, August/2009
- FfE (1996): Ganzheitliche energetische Bilanzierung der Energiebereitstellung (GaBiE). Teil 1 - Allgemeiner Teil. Forschungsstelle für Energiewirtschaft (FfE), München.
- KTBL (2005): Faustzahlen für die Landwirtschaft. 13. Aufl. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V., Münster.
- KTBL (2006): Energiepflanzen. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V., Darmstadt.
- KTBL (2008): Betriebsplanung Landwirtschaft 2008/09. Daten für die Betriebsplanung in der Landwirtschaft - mit Internetangebot. 21., Aufl. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V., Darmstadt.
- UMWELTBUNDESAMT (1999): Bewertung in Ökobilanzen. Methode des Umweltbundesamtes zur Normierung von Wirkungsindikatoren, Ordnung (Rangbildung) von Wirkungskategorien und zur Auswertung nach ISO 14042 und 14043 (Version '99), Umweltbundesamt, Berlin.
- UMWELTBUNDESAMT (2009): Berichterstattung unter der Klimarahmenkonvention der Vereinten Nationen 2009. Nationaler Inventarbericht zum deutschen Treibhausgasinventar (1990-2007), Umweltbundesamt, Dessau.
- WENDLAND, M. (2008): Düngung mit Gärrückständen, Nährstoffbilanzierung für Biogasbetriebe Rechtsvorschriften aus dem Düngebereich. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Agrarökologie.
- WENDLAND, M.; DIEPOLDER, M.; CAPRIEL, P. (2007): Leitfaden für die Düngung von Acker- und Grünland. Gelbes Heft. 8, überarbeitete Auflage, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising.





## Untersuchungen zu Treibhausgasemissionen bei der Biogaserzeugung aus nachwachsenden Rohstoffen

C. Hafermann<sup>1</sup>, J. Clemens<sup>1</sup>, C. Cuhls<sup>1,2</sup>, J. Friehe<sup>3</sup>, P. Weiland<sup>3</sup>,  
J. Liebetrau<sup>1</sup> und J. Daniel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Deutsches BiomasseForschungsZentrum gGmbH, Torgauer Straße 116, 04347 Leipzig, Deutschland

<sup>2</sup> gewitra mbH, Karlrobert-Kreiten-Straße 13, 53115 Bonn, Deutschland

<sup>3</sup> VTI Johann Heinrich von Thünen Institut, Institut für Agrartechnologie und Biosystemtechnik, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, Deutschland

### Zusammenfassung

Für eine umfassende Inventarisierung der Emissionen, die beim Biogasbildungsprozess entstehen, werden derzeit 10 landwirtschaftliche Biogasanlagen auf die entstehenden Emissionen untersucht. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind in einen größeren Vorhaben eingebunden, in welchem neben der Emissionsanalyse der Einfluss von Prozessparametern auf das Emissionsverhalten und das Emissionspotential von Gärresten untersucht wird, sowie eine ökobilanzielle Bewertung der Biogaserzeugung durchgeführt wird. Ziel des Vorhabens ist eine Inventarisierung der Emissionen, sowie die Entwicklung eines Maßnahmenkatalogs zur Minimierung der Emissionen.

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass bei der Biogaserzeugung Methanemissionen zwischen 1,3 und 12 g CH<sub>4</sub>/kWh entstehen, dies entspricht 33 – 300 g CO<sub>2</sub>-Äquivalenten/kWh. Die meisten Anlagen wiesen jedoch Emissionen von unter 100 g CO<sub>2</sub>-Äquivalenten/kWh auf. Die größten Emissionen entstehen dabei im nicht abgedeckten Gärrestlager und bei der Gasverwertung im BHKW. Nennenswerte Emissionen wurden jedoch auch bei einzelnen unsachgemäßen Ausführungen von Konstruktionselementen festgestellt.

### Summary

For a comprehensive inventory of greenhouse gas emissions, which might occur within the biogas production process, the apparent emissions of 10 agricultural biogas plants are monitored. These measurements are integrated in a project investigating additionally the influence of parameters of the biogas process, the emission potential of the digestate and last but not least a life circle assessment of the biogas production process is carried out. Beside the inventory of the emissions, sufficient measures for a substantial reduction of emissions will be developed.

The so far done measurements revealed occurring greenhouse gas emissions between 1.3 and 12 CH<sub>4</sub>/kWh this equals 33 – 300 g CO<sub>2</sub> equivalents/kWh. The greatest emission sources within the process chain are the digestate storage tanks (if designed unsealed) and the co-generation units. In some cases substantial emissions have been caused by improper realisation of elements of construction (e.g. manhole or connection of rubber sealing to concrete wall).

## 1 Einleitung

Eine umfassende ökologische Bewertung der landwirtschaftlichen Biogasgewinnung und -nutzung sowie die Inventarisierung der Emissionen scheiterten bisher an fehlenden Daten zu den tatsächlich auftretenden Emissionen. Die hier vorgestellten Untersuchungen sind Teil eines Vorhabens, welches eine detaillierte Bewertung der Treibhausgasemissionen bei der Biogaserzeugung ermöglichen wird. Die vorgestellten Messergebnisse wurden im Rahmen eines größeren Vorhabens erhoben, in welchem neben der Erfassung der Emissionen folgende Schwerpunkte bearbeitet werden:

- Erhebung emissionsrelevanter Daten zu Biogasanlagen
- Begleitende Laborversuche zum Einfluss von Prozessparametern auf das Emissionsverhalten
- Ausbringungsversuche zum Emissionspotential von Gärresten
- Ökobilanzielle Bewertung der Biogaserzeugung
- Inventarisierung der Emissionen
- Entwicklung eines Maßnahmenkatalogs zur Minimierung der Emissionen.

Auf der Basis einer umfassenden Datenerhebung zu den Anlagen in Deutschland können emissionspezifische Anlagencharakteristika identifiziert und als Bewertungsgrundlage für den gesamten Anlagenbestand herangezogen werden.

In diesem Beitrag werden erste Ergebnisse der Messung von Emissionen auf den Anlagen vorgestellt.

## 2 Methodik

Grundlage für die Bewertung wird die Messkampagne sein, die derzeit an 10 ausgewählten, repräsentativen Anlagen durchgeführt wird. Die Messungen werden in zwei Zeiträumen (jeweils im Sommer und Winter) von je einer Woche durchgeführt. Dabei wird die gesamte Anlage im Regelbetrieb von der Anlieferung bis zur Ausbringung der Gärreste untersucht. Als mögliche Emissionsquellen werden dabei Substratlager, Beschickungseinrichtungen, Gasspeicher und Fermenterabdeckungen, Gasverwertungsanlagen (BHKW und Gasaufbereitungsanlagen), Gärrestlagerung und -ausbringung untersucht. Darüber hinaus spielen natürlich alle gasführenden Anlagenteile eine besondere Rolle. Hier kann Methan aus Leckagen emittiert werden, u.a. an Folienabschlüssen, undichten Verschlüssen und Rohrverbindungen. Bisher wurden 14 der 20 Messungen durchgeführt. Die hier vorgestellten Ergebnisse stellen daher den aktuellen Zustand dar, die abschließende Auswertung aller Daten steht noch aus. Von den untersuchten 10 Anlagen sind sieben Nassvergärungsanlagen, 9 werden im mesophilen Temperaturbereich betrieben, die installierten Leistungen liegen zwischen 320 kW und 1 MW. Die Substrate sind meist NAWARO/Gülle Mischungen, außer bei einer Anlage, hier werden ausschließlich NAWARO eingesetzt und bei einer wird vorwiegend Gülle eingesetzt.

Es werden die für die Biogasproduktion typischen Gase, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>S untersucht, in dieser Veröffentlichung wird sich zum überwiegenden Teil auf die Darstellung der Methanemissionen beschränkt.

Bei den Messungen erfolgt in einem ersten Schritt ein qualitatives Abscannen der Anlage, durch das mögliche Leckagen lokalisiert werden. Die identifizierten Leckagen werden dann in Anschluss mit einer Windtunnelmethode detailliert untersucht, um so Emissionsmassenströme ermitteln zu können. Hierfür werden die Windtunnel definiert belüftet und die Konzentration der zu messenden Gase im Abstrom in Anlehnung an VDI 3790 bestimmt.



Abb. 1: Praktische Umsetzung einer belüfteten Haube an einem Sichtfenster eines Fermenters

Die gemessenen Emissionen werden aufsummiert und als Vergleichsgröße auf die Menge an produziertem elektrischen Strom bezogen. (als g CH<sub>4</sub>/kWh) Diese Emissionen werden zu CO<sub>2</sub>-Äquivalenten umgerechnet. (1 g CH<sub>4</sub> = 25 g CO<sub>2</sub> (IPCC 2007))

Bei offenen Gärrestlagern werden die Emissionen von freien Flächen und denen, die mit einer Schwimmschicht bedeckt waren, gesondert erfaßt. Die Emissionen werden dann anteilig auf die jeweilige Fläche bezogen berechnet.

Es wurden folgende Messgeräte für die Messungen eingesetzt:

Zielgas	Zweck	Methode	Bestimmungsgrenze	
CH <sub>4</sub>	Leckageerkennung	Tunable diode laser absorption spectroscopy (TDLAS) & IR-Gerät	10 ppm, entfernungsabhängig, bis 400 ppm	Begehung der Anlage "screening"
CH <sub>4</sub> & NMVOC = Ges.-C	Emissionsbestimmung	Flammenionisationsdetektor (FID)	1 ppm	belüfteter Tunnel/ Haube, BHKW
N <sub>2</sub> O & CH <sub>4</sub>	Emissionsbestimmung	GC-ECD/FID, im Labor, VDI 2469 Blatt 1	N <sub>2</sub> O: 0,1 ppm CH <sub>4</sub> : 0,3 ppm	belüfteter Tunnel/ Haube und geschlossene Haube, BHKW

Eine weitere Methode ist die CH<sub>4</sub>-Messung durch Gasprobennahme mittels vakuumierter Glasfläschchen (Vial) und anschließender Analyse am GC – FID (nach VDI 2469).

Zum Vergleich wurden die Emissionen nach der DIN EN 1544:2008-04 (Fugitive und diffuse Emissionen von allgemeinem Interesse für Industriebereiche – Messung fugitiver Emissionen von Gasen und Dämpfen aus Lecks von Betriebseinrichtungen und Rohrleitungen) bestimmt. In dieser Norm werden die Emissionen durch Konzentrationsmessungen und Emissionsfaktoren zurückgeschlossen werden. Die Emissionsberechnung einer Leckage erfolgt in der DIN über folgende Gleichung:

$E = A * (C_{CH_4})^B$	E	Emission (kg/h)
	C <sub>CH<sub>4</sub></sub>	Konzentration des untersuchten Gases (ppm)
	A, B	Empirische Faktoren, variieren je nach Gas, Art der Verbindung (für diese Berechnungen: A= 1,36 x 10 <sup>-5</sup> ; B = 0,589)

Für Biogasanlagen gibt es keine spezifische Vorschrift.

### 3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Messungen werden im Folgenden entsprechend der Anlagenkomponenten vorgestellt, an denen sie gemessen wurden.

#### Silagelager

Die hier vorgestellten Analysen wurden im Winter 2008/2009 erhoben. Dabei wurden ausschließlich Untersuchungen berücksichtigt, die auf Anlagen erhoben wurden, die eine Silierung entsprechend guter fachlicher Praxis durchführen. Generell kann festgestellt werden, dass nur sehr geringe CH<sub>4</sub>-Emissionen festgestellt wurden. Sie betragen zwischen 0 und 60 mg CH<sub>4</sub>/kWh. Diese niedrigen Werte waren zu erwarten, da die Silagen sehr niedrige pH-Werte aufweisen und so eine signifikante Methanbildung unterdrückt wird. Messtechnisch war hier die Herausforderung, belüftete Tunnel an einer senkrechten Wand zu betreiben.

#### Beschickung

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen verschiedene Problembereiche auf. Nennenswerte Emissionen können bereits bei der Beschickung auftreten, wenn das Inputmaterial in offenen Gruben mit Gärrest vermischt wird, um es dann in den Fermenter zu pumpen. Bei einer Feststoffdosierung mittels Schnecke, also ohne die Vermischung mit Gärrest (Rezirkulat), sind die Emissionen von Treibhausgasen dagegen vernachlässigbar. *Abbildung 2* zeigt ein Beispiel für den Verlauf der gemessenen Emissionen, wenn in einer offenen Grube mit Gärrest angemischt wird. Die Peaks entstehen bei der Zugabe von Gülle zum Behälter und dem Anschalten des Rührwerkes.

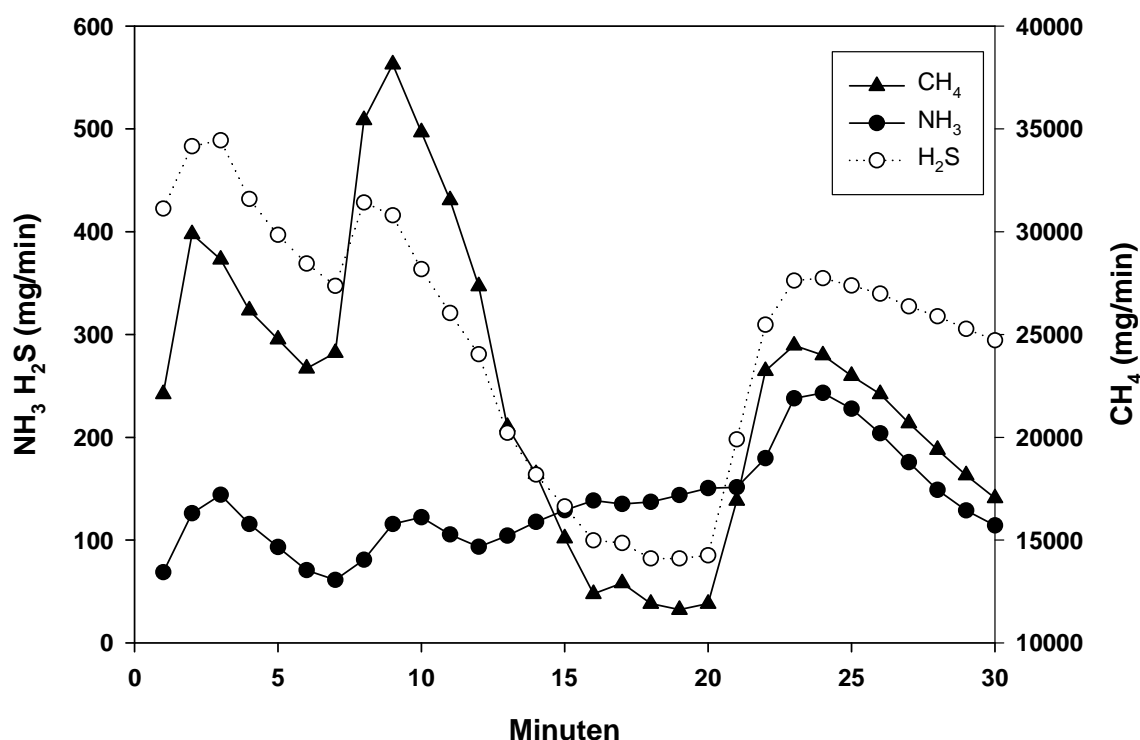


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der Emissionen eines Anmischbehälters

Wie zu erwarten war, werden die größten Mengen in Form von Methan freigesetzt. Hier konnten im Mittel 22,3 g/min gemessen werden, während Ammoniak mit 0,1 g/min und Schwefelwasserstoff mit 0,3 g/min detektiert wurden.

Werden diese Emissionen auf die produzierten Strommengen umgerechnet, ergeben sich Werte zwischen 0 -375 mg CH<sub>4</sub>/kWh für Anlagen, die ohne offene Gruben und Gärrest zum Anmischen arbeiten, wurden dagegen Feststoffe mit Material aus dem Nachgärer oder Fermenter angemischt, traten höhere Emissionen auf (15 – 1700 mg CH<sub>4</sub>/ kWh).

### Foliendächer

Die Foliendächer dienen als Gasfassung und auch als Gasspeicher, so dass gerade hier schon aus wirtschaftlichen Gründen auf die Vermeidung von Emissionen geachtet werden sollte. Interessanterweise konnten bei einigen Anlagen an den Verbindungsstellen zwischen Gashaube und Fermenter nicht unerhebliche Emissionswerte (siehe *Abbildung 3*) nachgewiesen werden. So wurde für einen Fermenter mit einer Einfachfolie mit 15 m Durchmesser ein Wert von 16 gCH<sub>4</sub>/min ermittelt. Dies entspricht einem Volumenstrom von ca. 1,3 m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/h. Bei zwei Anlagen, die mit einem belüfteten Tragluftdach ausgestattet sind, konnten Emissionen in der Abluft des Daches gemessen werden. Diese lagen zwischen 52 und 101 mg CH<sub>4</sub>/min.

Am Beton von Fermentern mit Betondeckel und am Folienmaterial selber konnten keine Emissionen festgestellt werden.

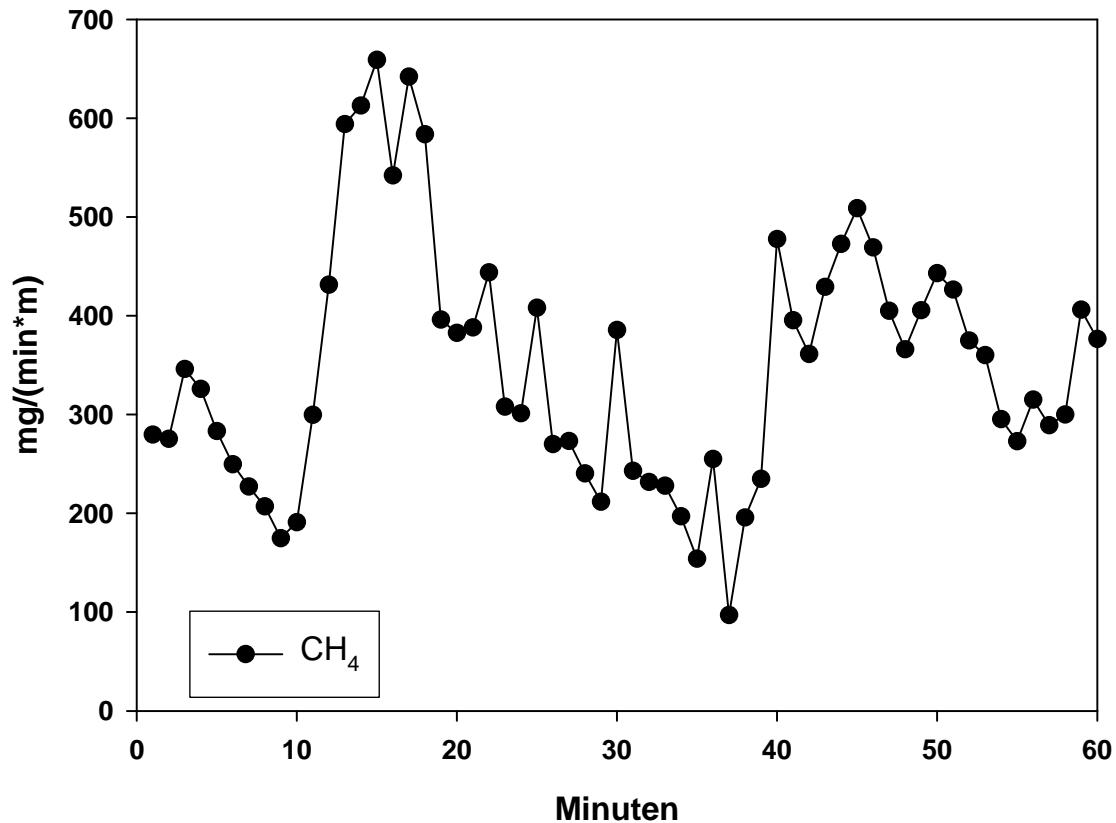


Abb. 3: Gemessene Emissionen des Übergangs von Foliendach zu Fermenterwand

Bei belüfteten Foliendächern (Stützbelüftung) wurde in der „Stützluft“ Methan gefunden, welches zu Emissionen zwischen 9 – 35 mg CH<sub>4</sub>/ kWh führte. Darüber hinaus gab es einige Fermenter, an denen die Befestigung der Folie an der Betonwand mehrere Leckagen aufwies (bis zu 20 Leckagen an einem Fermenter). Soweit möglich, wurden die Leckagen mittels Windtunneln erfasst. Hier traten Emissionen zwischen 0 und 66 mg CH<sub>4</sub>/kWh auf.

Auf einigen Anlagen, die mit Betondächern ausgestattet waren, wurden Emissionen an Serviceeinbauten festgestellt. Sie betragen zwischen 0-310 mg CH<sub>4</sub>/kWh. In einem Fall konnten die Emissionen von 610 mg CH<sub>4</sub>/kWh durch eine Wartung des Betreibers halbiert werden. Als ein extremes Negativbeispiel ist eine grob fahrlässige Abdeckung eines Mannlochs mittels einer nicht abgedichteten Furnierplatte zu nennen. In einem anderen Fall konnten an einer Serviceöffnung, die unzureichend abgedichtet war 9,7 g CH<sub>4</sub>/kWh gemessen werden.

### Offene Gärrestlager

Wie zu erwarten war, sind offene Gärrestlager eine bedeutende Emissionsquelle. Die gemessenen Emissionen erreichten Werte zwischen 730 – 3700 mg CH<sub>4</sub>/kWh. Beim Aufrühren konnten Spitzen von bis zu 6,4 g CH<sub>4</sub>/kWh festgestellt werden. In einem Teilprojekt wird untersucht, in welchem Zusammenhang diese Emissionen mit der Prozessführung (Aufenthaltszeit, Temperaturbereich etc.) stehen.

### Separator

An den untersuchten Fest-Flüssig Separatoren, die in den untersuchten Fällen intervallweise betrieben wurden, traten CH<sub>4</sub>-Emissionen in Höhe von 23 – 230 mg CH<sub>4</sub>/kWh auf.

Der separierte Feststoff wurde nur kurze Zeit unter dem Separator gelagert. Hier betragen die CH<sub>4</sub>-Emissionen sehr geringe 0 – 1 mg CH<sub>4</sub>/kWh.

### **Weitere Emissionsquellen**

Weitere untersuchte Quellen stellten Sichtfenster (0 – 2 mg CH<sub>4</sub>/kWh), Förderschnecken (0–12mgCH<sub>4</sub>/kWh) und Seildurchführungen zu den Rührwerken dar. Letztere konnten nicht mit der Windtunnelmethode vermessen werden, da sie nicht sinnvoll abgedeckt werden konnten.

Bei der Begehung der Anlagen zur Leckagedetektierung konnten als Schwachstellen vor allem nicht regelmäßig gewartete Seildurchführungen für die Tauchmotor-Propellerrührwerke identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnten an Rührwerken, bei denen der Motor außerhalb des Fermenters sitzt, wie Längsachs- oder Axialrührwerke, keine Emissionen detektiert werden.

### **Gasverwertung BHKW:**

Eine nicht zu unterschätzende Emissionsquelle stellt das BHKW dar. Die gemessenen Methankonzentrationen im Abgas erreichten Maximalwerte von bis zu 2500 ppm. Durch die hohen Volumenströme entstehen Emissionen zwischen 0,6 und 4,8 g CH<sub>4</sub>/kWh. Damit stellt das BHKW nach bisherigem Erkenntnisstand die größte Emissions-Einzelquelle dar.

Im weiteren Verlauf des Projektes werden außerdem Anlagen zur Biogasaufbereitung zur Einspeisung ins Gasnetz untersucht, hier liegen derzeit noch keine Ergebnisse vor.

### **Gesamtemissionen**

Die gesamten CH<sub>4</sub>-Emissionen der untersuchten Anlagen betragen zwischen 1,3 – 12 g CH<sub>4</sub>/kWh oder 33 – 300 g CO<sub>2</sub>-Äquivalente/kWh. Die meisten Anlagen wiesen jedoch Emissionen von unter 100 g CO<sub>2</sub> Äquivalenten/kWh auf.

Bei diesen Untersuchungen sind noch nicht die Emissionen aus Überdrucksicherungen am Fermenter berücksichtigt. Diese sind messtechnisch schwer zu fassen und eine Auswertung der Ergebnisse steht noch aus. Für eine abschließende ökologische Bewertung müssen zudem die N<sub>2</sub>O Emissionen berücksichtigt und die Daten mittels einer umfassenden Ökobilanz ausgewertet werden. Trotzdem sei zur Einordnung die für den deutschen Strommix gültige CO<sub>2</sub>-Äquivalente von 624 g angegeben (UBA 2009).

### **Vergleich eigene Messungen - DIN EN 1544:2008-04**

Für die Messungen laut DIN EN 1544:2008-04 erfolgt die Abschätzung der Emissionen mittels Konzentrationsmessungen. Die in den hier dargestellten Untersuchungen zum Einsatz kommende Messtechnik liefert nur Ergebnisse bis zu einer Konzentration von 44000 ppm, da dies die untere Explosionsgrenze darstellt und das Gerät aus Sicherheitsgründen bei dieser Konzentration abschaltet. Diese Konzentration wurde jedoch oft an den identifizierten Lecks überschritten. Eine Konzentration von 44000 ppm entspricht einer Emission von etwa 7,4 g CH<sub>4</sub>/h bzw. für eine 500 kW Anlage entspricht dies 15 mg/kWh. Werden die gemessenen Konzentrationen für die gefundenen Lecks in Emissionen umgerechnet, so ergeben sich Werte zwischen 2 – 600 mg/kWh für die untersuchten Anlagen. Diese Werte sind deutlich geringer als die mit der Windtunnelmethode ermittelten, allerdings sind diese mit der Einschränkung der hier limitierten Konzentrationsmessung zu betrachten. Grundsätzlich ist in Frage zu stellen, wie genau eine Emissionsmessung sein kann, die Emissionen anhand von Konzentrationen bestimmt, wobei Faktoren z.B. das Wetter und die Verteilungsgeschwindigkeit des Gases in der Umgebung nicht berücksichtigt werden können.

## 4 Diskussion und Ausblick

Die Ergebnisse zeigen, dass in konstruktions- und betriebsbedingte Emissionen unterschieden werden kann.

Den konstruktionsbedingten Emissionen sind Emissionen zuzuordnen, die z.B. durch offene Gärrestlager oder Vorruben verursacht werden, d.h. ohne bauliche Veränderungen können diese Emissionen nicht vermieden werden.

Als betriebsbedingte Emissionen können zum Einen Emissionen betrachtet werden, welche durch die Art der Betriebsführung der Anlage entstehen. Ein Beispiel dafür ist das Entweichen von Biogas über die Überdrucksicherungen am Fermenter, welches vorrangig zu erwarten ist, wenn die Anlage an der Grenze der Kapazität gefahren wird. Zum Anderen sind alle Leckagen, die durch unsachgemäße Ausführung von Konstruktionsdetails oder mangelhafte Wartung entstehen ebenso den betriebsbedingten Störungen zuzuordnen.

Eine Vermischung von konstruktions- und betriebsbedingten Emissionen stellen die bereits genannten Seildurchführungen für die Tauchrührwerke dar. Die Emissionen an Seildurchführungen können durch regelmäßige Abschmierung der Öffnungen vermieden werden.

Im Hinblick auf die Vermeidung sind die betriebsbedingten Emissionen durch eine Umstellung im Betriebsregime relativ einfach zu vermeiden, während die Vermeidung konstruktionsbedingter Emissionen hauptsächlich in der Planungsphase der Anlagen realisiert werden kann, spätere Änderungen sind mit zusätzlichen Aufwendungen verbunden.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass durch sachgemäße Betriebsführung die entstehenden Emissionen stark eingeschränkt werden können. Nach dem derzeitigen Stand der Untersuchungen bieten die Gärrestlager und die Gasnutzung im BHKW das größte Potential für eine signifikante Reduktion der entstehenden Emissionen. Speziell am BHKW ist noch zu klären, in welchem Umfang die Emissionen durch die Betriebsführung minimiert werden können.

## Danksagung

Das beschriebene Vorhaben wird durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz finanziert, vertreten durch die Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (FNR). Das Projekt hat den Titel „Emissionsanalyse und Quantifizierung von Stoffflüssen durch Biogasanlagen im Hinblick auf die ökologische Bewertung der landwirtschaftlichen Biogasgewinnung und Inventarisierung der deutschen Landwirtschaft“. Das Förderkennzeichen ist 22023606.

## Quellen

DIN EN 1544:2008-04 (2008): Fugitive und diffuse Emissionen von allgemeinem Interesse für Industriebereiche – Messung fugitiver Emissionen von Gasen und Dämpfen aus Lecks von Betriebseinrichtungen und Rohrleitungen

IPCC (2007): Climate Change 2007. Fourth Assessment Report (AR4) der WG1

UBA (2009): <http://www.umweltbundesamt.de/energie/archiv/co2-strommix.pdf>



## **Potenziale der Biogasproduktion in der serbischen Provinz Wojwodina und Grundlagen der Wirtschaftlichen Begründheit**

M. Tesic<sup>1</sup>, D. Djatkov<sup>1</sup>, M. Effenberger<sup>2</sup> und M. Martinov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fakultät der Technischen Wissenschaften, Trg Dositeja Obradovica 6, 21000 Novi Sad, Serbien

<sup>2</sup> Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung, Vöttinger Str. 36, 85354 Freising, Deutschland

### **Zusammenfassung**

In der Wojwodina existiert augenblicklich keine einzige Biogasanlage, wobei die wichtigsten Gründe dafür in den fehlenden gesetzlichen Vorschriften sowie in dem Preis für die von den bevorzugt behandelten Stromproduzenten erzeugte elektrische Energie, d. h. in dem Einspeisetarif zu suchen sind. Die Vorbereitung dieser Vorschriften ist jedoch im Gange und es ist vorgesehen, dass sie bis Ende 2009 in Kraft treten sollen.

Das Potenzial für die Gewinnung von elektrischem Strom aus Biomasse, die aus der Landwirtschaft stammt, liegt in der Wojwodina bei 78 GWh<sub>el</sub>/a, während sich die insgesamt installierte elektrische Kapazität auf etwa 9,3 MW<sub>el</sub> belaufen würde. damit könnte 1 % des augenblicklichen Stromverbrauchs in der Wojwodina gedeckt werden.

Den Einschätzungen zufolge könnte die Biogastechnologie in den kommenden fünf Jahren auf etwa fünf Farmen mit einer insgesamt installierten Kapazität von ca. 2 MW<sub>el</sub> umgesetzt werden.

### **Schlüsselwörter:**

Biogasproduktion; Potentiale; Wirtschaftlichkeit; Wojwodina.

## Summary

Currently, not a single biogas plant exists in the Serbian Province of Vojvodina. The main reason for this is the lack of a legislative framework for decentralized electricity production and the low prices for grid electricity. The respective regulations are in the pipeline and are supposed to become effective at the end of 2009.

In Vojvodina, the potential electricity production from agricultural biomass is an estimated 78 GWh<sub>el</sub> per year with a corresponding installed electrical capacity of about 9.3 MW<sub>el</sub>. This potential would amount to about 1 % of the current electricity consumption in the province. It is estimated that about 2 MW electrical capacity from biogas could be installed on five farms.

## Keywords:

Biogas production; potentials; economics; Vojvodina

## 1 Einleitung

Serbien und somit auch die Wojwodina, sowie andere Balkanstaaten haben ein Dokument namens *Memorandum of understanding* (EUROPEAN COMMISSION, 2002) unterzeichnet und sich dadurch verpflichtet, sich an die Energiepolitik der EU zu halten. Die Zielsetzungen und Verpflichtungen sind im *White Paper* (EUROPEAN COMMISSION, 1997), in der Richtlinie zur Stromgewinnung aus erneuerbaren Quellen sowie in der Richtlinie zur Kraft-Wärme-Kopplung definiert. Für Serbien ist es überaus wichtig, ein ausbalanciertes Verhältnis zwischen den zugänglichen Potenzialen erneuerbarer Energiequellen und den Kosten für deren Nutzung zu finden. Die Erfahrungen anderer Staaten belegen deutlich, dass die Stromerzeugung aus erneuerbaren Energiequellen nur unter besonderen Umständen billiger ist als die aus fossilen Brennstoffen (ILIC, 2003; MARTINOV & DJATKOV, 2008).

Die Autonome Provinz Wojwodina ist eine im Norden Serbiens gelegene landwirtschaftliche Region. Ihre Gesamtfläche beträgt 21.500 km<sup>2</sup>, von denen 1,5 Mill. Hektar landwirtschaftlich nutzbar sind. Die Provinz hat etwa 2,1 Mill. Einwohner und kann als der am weitesten entwickelte und fortschrittlichste Teil der gesamten Republik Serbien gelten.

Mitte der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts befanden sich insgesamt sieben Biogasanlagen in der Wojwodina entweder in Planung oder im Bau. Bei einigen von ihnen wurden die Bauarbeiten nie vollendet, während sich andere wiederum langfristig als wirtschaftlich unrentabel erwiesen. Durch den Bau von Biogasanlagen wollte man damals das Problem der Beseitigung von Stallmist in den Viehbetrieben und dadurch auch zahlreiche Umweltprobleme lösen. Der Bau wurde größtenteils mit Mitteln des Provinzsekretariats für Energiewirtschaft und Mineralrohstoffe finanziert. Die wirtschaftliche Begründetheit dieser Anlagen war jedoch ungewiss, während das gewonnene Biogas lediglich für die Erzeugung von Wärmeenergie, aber nicht auch für die Stromerzeugung genutzt wurde.

Heute sind die wichtigsten Gründe dafür, dass es in Serbien und somit auch in der Wojwodina keine Biogasanlagen gibt, in fehlenden gesetzlichen Vorschriften und in dem Preis für die von den bevorzugt behandelten Stromproduzenten gewonnene elektrische Energie, d. h. in dem Einspeisetarif zu suchen. Die serbische Regierung und die für die Arbeit mit erneuerbaren Energiequellen zuständigen Organisationen sind jedoch bemüht, entsprechende Dokumente vorzubereiten, mit deren Hilfe eine wirtschaftliche Stromerzeugung aus erneuerbaren Energiequellen möglich wäre, wobei diese bis Ende 2009 in Kraft treten sollen.

Die Zielsetzungen dieser Arbeit lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen: Bewertung und Darstellung der landwirtschaftlichen Potenziale für die Biogaserzeugung in der Wojwodina; Identifizierung der Hindernisse für die Biogaserzeugung sowie dessen Nutzung bei der Kraft-Wärme-Kopplung; Identifizierung und Darstellung der für die Wirtschaftlichkeit bedeutendsten Faktoren anhand von Beispielen potenzieller Biogasanlagen.

## 2 Potenziale für eine Biogasproduktion in der Wojwodina

### 2.1 Viehbetriebe

Das Potenzial für eine Produktion von Biogas aus Gülle in den Viehbetrieben ist in der *Tabelle 1* dargestellt, wobei das Gesamtpotenzial bei ca. 9,5 Mill. Nm<sup>3</sup>/a liegt. Für die

Berechnung der potenziellen Biogaserzeugung wurden Angaben aus BMELV (2008a) und BMELV (2008b) herangezogen.

Dabei wurden nur große Viehbetriebe mit mehr als 600 Großvieheinheiten berücksichtigt, bei denen man Anlagen mit einer ausreichenden Kapazität errichten würde (MARTINOV & DJATKOV, 2008). Das Potenzial für die Gewinnung von elektrischer Energie auf einem solchen Betrieb beträgt ca. 23,5 GWh<sub>el</sub>/a, während die benötigte installierte Leistung des Blockheizkraftwerks (BHKW) bei ca. 2,5 MW<sub>el</sub> liegt.

Tab. 1: *Potenzielle jährliche Biogasproduktion in Schweine- und Rinderbetrieben in der Wojwodina*

Größe des Betriebs, Anzahl der GV in Schweinebetrieben	Anzahl der Betriebe	Mögliche Biogasproduktion, 10 <sup>3</sup> Nm <sup>3</sup> /a	Größe des Betriebs, Anzahl der GV in Rinderbetrieben	Anzahl der Betriebe	Mögliche Biogasproduktion, 10 <sup>3</sup> Nm <sup>3</sup> /a
600	13	2.665	700	3	555
1.000	3	1.130	1.000	2	475
2.600	2	1.765	2.000	5	2.910
INSGESAMT	18	5.560	INSGESAMT	10	3.940

GV: Großvieheinheit

## 2.2 Getreidesilage

Die bedeutendsten Ackerbausorten, die in der Wojwodina für die Herstellung von Silage für eine anaerobe Fermentation genutzt werden können, sind Mais und Halmgetreide (Weizen, Gerste und Roggen). Mais wird auf einer Fläche von 627.000 ha und Halmgetreide auf einer Fläche von 397.000 ha angebaut. Die Anbaudichte bei Mais und Halmgetreide in den Gemeinden der Wojwodina ist *Abbildung 1* zu entnehmen, wobei sie im Bezug auf die Gemeindefläche spezifiziert ist. Die an dieser Stelle präsentierten Angaben über Flächen und Erträge wurden vom Statistikamt der Republik Serbien - Sektor für Statistik der AP Wojwodina in Novi Sad übernommen.

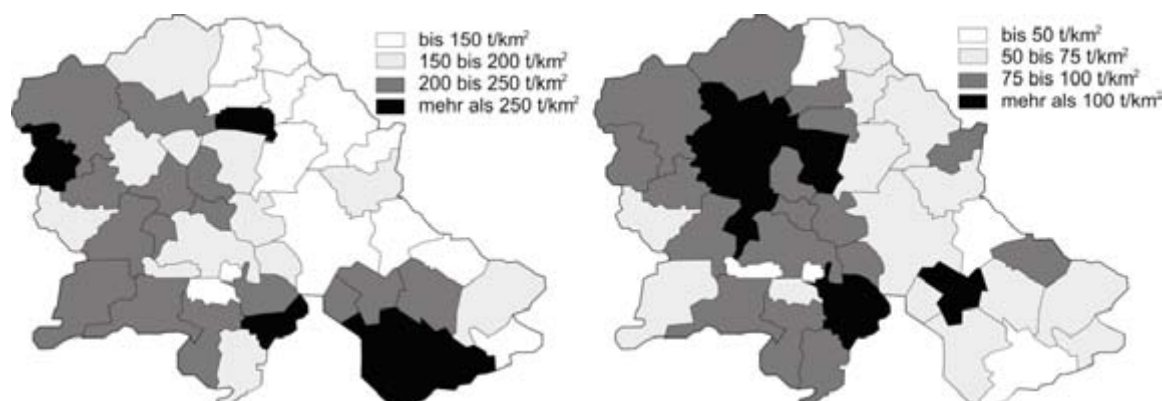


Abb. 1: *Dichte des Mais- (links) und Getreideanbaus (rechts) in den Gemeinden der Wojwodina*

Um ein reelles Bild der zur Verfügung stehenden Potenziale der Energiepflanzen für die Biogaserzeugung zu erhalten, wurde zuerst eine Einteilung in große, kleine und mittlere (im weiteren Textverlauf K/M) landwirtschaftliche Betriebe vorgenommen. Kleine land-

wirtschaftliche Betriebe verfügen über bis zu 50 ha, die mittleren zwischen 50 und 200 ha, während die großen Betriebe mehr als 200 ha Land besitzen, wobei lediglich jene Flächen berücksichtigt werden, welche die Landwirte oder die landwirtschaftlichen Betriebe auch bestellen. Diese Unterteilung wurde deswegen vorgenommen, weil K/M Betriebe vor allem ihre eigenen Ackerflächen dazu nutzen, um Lebensmittel und Viehfutter zu erzeugen. Über genügend landwirtschaftlich bebaubare Bodenflächen verfügen nur die großen Betriebe, auf denen in den meisten Fällen auch Viehzucht betrieben wird. Im Falle einer Biogasproduktion und des Bedürfnisses nach einer Steigerung der Kapazitäten könnte auch die Silage der Ackerfrüchte verwendet werden. In *Tabelle 2* sind die Mais- und Halmgetreideerträge in der Wojwodina dargestellt, und zwar separat für große und K/M landwirtschaftliche Betriebe. Wegen der möglichen Nutzung der genannten Ackerfrüchte in Form von Silage sind die Gesamterträge entsprechend den bei MARTINOV & DJATKOV (2008) definierten Verhältnissen separat berechnet und ausgewiesen worden.

Tab. 2: Mais- und Halmgetreideerträge in der Wojwodina

Kultur	T*	Fläche, 1.000 ha	Großbetriebe, 1.000 ha	K/M Betriebe, 1.000 ha	Kornerträge, 1.000 t		Mögl. Erträge ganzer Pflanzen, 1.000 t	
					Großbetriebe	K/M Betriebe	Großbetriebe	K/M Betriebe
Weizen	↓	336	142	194	561	665	1.234	1.463
Roggen	—	1,15	0,42	0,73	0,52	1,23	1,14	2,71
Gerste	—	60	29	31	94	98	207	216
Mais	↑	627	114	513	655	2.770	1.441	6.095
INSGESAMT					ca. 1.311	ca. 3.534	ca. 2.883	ca. 7.777
					4.845		10.660	

\* Veränderungstrend der jeweiligen Anbauflächen

Die Erträge der Feldfrüchte belaufen sich bei den großen landwirtschaftlichen Betrieben in der Wojwodina auf ca. 2,9 Mill. t/a. Unter der Voraussetzung, dass man 5 % der zur Verfügung stehenden Mengen für die Biogasproduktion verwenden könnte, sowie ausgehend von den potenziellen Biogasmengen (BMELV, 2008a; BMELV, 2008b), würde die potenzielle Biogasproduktion 26,3 Mill. Nm<sup>3</sup>/a betragen. Den durchschnittlichen Anteil von Methan im Biogas sowie die elektrische Effizienz von Blockheizkraftwerken gemäß FAL (2008) mit einbezogen, beträgt das Potenzial für die Produktion der elektrischen Energie ca. 54,5 GWh<sub>el</sub>/a, während die benötigte installierte elektrische Leistung an den Biogasanlagen ca. 6,8 MW<sub>el</sub> betragen würde.

### 3 Hindernisse

Das erste und größte Hindernis für eine erfolgreiche Biogasproduktion und dessen Verwendung für die Gewinnung von elektrischer und Wärmeenergie ist der nicht vorhandene Einspeisetarif für den "grünen" Strom. Es fehlen aber auch gesetzliche Vorschriften, die die Einspeisung des auf diese Weise erzeugten Stroms in das öffentliche Stromnetz regeln sollen.

Zudem bestehen auch Schwierigkeiten bei der Suche nach einer genügenden Anzahl von Verbrauchern für die erzeugte Wärmeenergie. Biogasanlagen und insbesondere landwirtschaftliche Biogasanlagen befinden sich zumeist in Gegenden, die weit entfernt sind von Wohnsiedlungen, so dass aus diesem Grunde nicht die Möglichkeit gegeben ist, die überschüssige Wärmeenergie größtenteils zu nutzen, was sich wiederum in großem Maße auf die Wirtschaftlichkeit des Betriebs der Anlagen auswirkt.

## 4 Förderprogramme

An dieser Stelle seien einige der wichtigeren Gesetze angeführt, bei denen Änderungen vorbereitet werden, aber auch die Verabschiedung von konkreten finanziellen und nicht-finanziellen Maßnahmen, mit denen ein günstiges Umfeld für die Erzeugung von elektrischer und Wärmeenergie aus erneuerbaren Energiequellen und somit auch aus Biogas geschaffen werden soll (TESIC et al., 2007):

- Energiegesetz;
- Garantiefondsgesetz;
- Verordnung über bevorzugt zu behandelnde Produzenten von elektrischer und Wärmeenergie aus Biobrennstoffen;
- Tarifsystemordnung beim Anschluss der bevorzugt zu behandelnden Stromproduzenten an das öffentliche System für den Stromtransport und die Stromdistribution;
- Sicherstellung von Subventionen für die Erforschung und Entwicklung von Technologien und konkreten Produkten sowie für Schulungen im Bereich der erneuerbaren Energiequellen;
- Gewährleistung von Zollvergünstigungen für den Import von Ausrüstungsgegenständen und Rohstoffen für Objekte, die Energie aus erneuerbaren Energiequellen verwenden;
- Festlegung von langfristig garantierten Herstellerpreisen für aus erneuerbaren Energiequellen gewonnene Energie;
- Schulung von Fachleuten für das Projektmanagement im Bereich der erneuerbaren Energiequellen;
- Umsetzung von Investitionsprojekten im Bereich der Nutzung von erneuerbaren Energiequellen.

Durch die Verabschiedung und das Inkrafttreten dieser Dokumente könnten folgende Effekte erzielt werden: Definition des Tarifsystems und des garantierten Übernahmeprices für die elektrische und Wärmeenergie, die aus erneuerbaren Energiequellen gewonnen wird; Gründung eines staatlichen Fonds für die Subventionierung der Nutzung erneuerbarer Energiequellen. Zudem würde man auf diese Weise auch die technischen und sonstigen Bedingungen für den Anschluss von Objekten, die erneuerbare Energiequellen für die Gewinnung von elektrischer und Wärmeenergie verwenden, an die öffentlichen Systeme für die Distribution der elektrischen und Wärmeenergie festlegen. Anlagen, die nicht im Land gefertigt werden, dafür aber unmittelbar einer Steigerung der energetischen Effizienz und/oder der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen dienen und dadurch einen Beitrag zum Umweltschutz leisten, wären von der Steuerzahlung befreit. Im Rahmen des Bildungswesens sind eine Förderung von entsprechenden Studiengängen an den Hochschulen und von wissenschaftlichen Entwicklungsprojekten im Bereich der energetischen Effizienz und der erneuerbaren Energiequellen vorgesehen, um dadurch Experten in der Sphäre der Nutzung nachwachsender Rohstoffe heranzubilden.

Der wichtigste Schritt in Richtung einer wirtschaftlichen Produktion und Nutzung von Biogas ist sicherlich die Definition eines Tarifsystems für aus erneuerbaren Energiequellen erzeugten Strom (Einspeisetarif). Die Regierung der Republik Serbien hat den Entwurf einer entsprechenden Verordnung vorgelegt, die den Erwartungen zufolge bis Ende 2009 in Kraft treten soll. Es wird davon ausgegangen, dass die Obergrenze des Präferenzpreises für aus Biogas erzeugten und in das öffentliche Netz eingespeisten Strom bei 16,444 c€/kWh<sub>el</sub> liegen wird. Berücksichtigt wird dabei Biogas, das aus landwirtschaftli-

chen Abfällen (Gülle, Biomassereste) und Abwasser aus der Lebensmittelindustrie mit Biomasseresten gewonnen wird, jedoch unter der Voraussetzung, dass diese keine Gefahrenstoffe und Teile bzw. Überreste von Tieren enthalten (REGIERUNG der REPUBLIK SERBIEN, 2008).

Tab. 3: *Empfohlene Präferenzpreise für aus Biogas erzeugten Strom (REGIERUNG der REPUBLIK SERBIEN, 2008)*

Elektrische Leistung (P), $MW_{el}$	Einspeisetarif, c€/kWh <sub>el</sub>
< 0,2	16,0
$\geq 0,2$	16,444 – 2,222*P
> 2	12,0

## 5 Bewertung der Wirtschaftlichkeit potenzieller Biogasanlagen

Anhand des Beispiels von 3 Viehbetrieben, die für potenzielle Investitionen in Biogasanlagen (BGA I, BGA II und BGA III) ausgewählt wurden, wurde die Bewertung der Wirtschaftlichkeit ihres Betriebs (Tabelle 4) dargestellt, wobei auch das grundlegende Konzept für jeden einzelnen Viehbetrieb beschrieben wurde. Die Wirtschaftlichkeit des Betriebs der potenziellen Biogasanlagen wurde auf der Grundlage des aktuellen Strompreises errechnet, der in Serbien mit 5,3 c€/kWh<sub>el</sub> in der gesamten Region mit Abstand der niedrigste ist. Die Nutzung der überschüssigen Wärmeenergie wurde als Einsparung bei der Nutzung von Erdgas oder elektrischer Energie zum Heizen berücksichtigt.

### **BGA I.**

Die erste potenzielle Biogasanlage (BGA I) würde man in einer Fabrik für die Gemüseverarbeitung und -trocknung errichten. Als Rohstoff für die Biogaserzeugung können nur in geringem Umfang Abfälle aus der Gemüseproduktion, dafür aber vor allem Maissilage und Schweinegülle zum Einsatz kommen, wodurch ein stabiler Prozess gewährleistet sein sollte. Die Kosten für die Beschaffung von Silagemais wurden mit 27 €/t veranschlagt, während die Kosten für den Gülletransport von der nahe gelegenen Farm 3 €/t betragen würden. Die überschüssige Wärmeenergie könnte vollständig genutzt werden, jedoch nur in jenen Monaten, in denen Gemüse getrocknet wird, d.h. im Zeitraum von August bis Dezember.

### **BGA II**

Die Biogasanlage II ist ein Schweinezuchtbetrieb mit ca. 3.000 Großvieheinheiten, deren Gülle einen kostenlosen Rohstoff für die Biogasproduktion darstellt. Im Betrieb könnten 70 % der überschüssigen Wärmeenergie zum Beheizen der Ferkel- und Aufzuchtställe während der verlängerten Heizsaison genutzt werden. Dieser Betrieb verfügt über Pumpsysteme und Systeme für eine automatische Ausmistung der Ställe, da in diesem Betrieb bereits in den 80-er Jahren des letzten Jahrhunderts die Errichtung einer Biogasanlage geplant war.

**BGA III**

Für die Biogasanlage III würde man Schweine- und Rindergülle von ca. 1.600 bzw. 2.000 Großvieheinheiten verwenden. Auch diese Gülle würde als Rohstoff kostenlos zur Verfügung stehen, während die Nutzung der Wärmeenergie weitaus niedriger ausfallen würde als bei der Biogasanlage II. Dieser landwirtschaftliche Betrieb verfügt über kein automatisches System für die Stallausmistung, die durch Spülung erfolgt.

Tab. 4: Beurteilung der Wirtschaftlichkeit potenzieller Biogasanlagen in der Wojwodina

Angaben zur Wirtschaftlichkeit	BGA I. (540 kW <sub>el</sub> )	BGA II. (440 kW <sub>el</sub> )	BGA III. (530 kW <sub>el</sub> )
Investitionen in Mill. €	1,4	1,5	1,6
Jährliche Gesamtkosten, 10 <sup>3</sup> €/a	467	382	386
Gesamteinnahmen, 10 <sup>3</sup> €/a	278	241	228
– Strom (5,3 c€/kWh <sub>el</sub> )	224	175	206
– Wärmeenergie (3,5 c€/kWh <sub>el</sub> )	54	66	22
Gewinn/Verlust, 10 <sup>3</sup> €/a	-189	-141	-158
Strompreis bei einer Null-Rentabilität, c€/kWh <sub>el</sub>	18,6	10,5	10,2

## 6 Fazit

Schon bald sollen in Serbien und somit auch in der Wojwodina ausreichende Voraussetzungen für eine wirtschaftlich profitable Biogasproduktion und -nutzung geschaffen werden. Das Potenzial für die Stromgewinnung aus Biogas beträgt in der landwirtschaftlichen Produktion 78 GWh<sub>el</sub>/a: 23,5 GWh<sub>el</sub> aus der Viehhaltung und 54,5 GWh<sub>el</sub> aus Silage im Rahmen des Ackerbaus. Die insgesamt installierte Kapazität würde sich auf ca. 9,3 MW<sub>el</sub> belaufen. Durch die Produktion von elektrischer Energie aus Biogas könnte etwa 1 % des augenblicklichen Stromverbrauchs in der Wojwodina gedeckt werden (Sekretariat für Energiewirtschaft und Mineralrohstoffe der Provinz Wojwodina, 2008). Daraus geht hervor, dass die gewonnene elektrische Energie nicht das Problem der Stromversorgung lösen würde, dass man aber durch den Bau von Biogasanlagen in landwirtschaftlichen Betrieben in der Wojwodina sehr wohl einen großen Beitrag zum Umweltschutz leisten würde.

Für den Fall, dass der Absatz und die Einspeisung von Strom in das öffentliche Netz zu den aktuell in Serbien geltenden Preisen (5,3 €/kWh) erfolgen würde, könnte für keine der drei als Beispiel genannten potenziellen Biogasanlagen ein wirtschaftlicher Betrieb sichergestellt werden. Unter der Voraussetzung, dass die Preise für diese Art von Strom subventioniert werden, könnte man die BGA I wegen der hohen Kosten der Substratbeschaffung und des ungenügenden Absatzes von Wärmeenergie nicht wirtschaftlich rentabel betreiben. Die anderen beiden potenziellen Anlagen (BGA II und BGA III) könnten im Falle einer Subventionierung der Strompreise große Profite erwirtschaften. Es wurde der Schluss gezogen, dass die Biogastechnologie in der Wojwodina in erster Linie in Viehbetrieben eingesetzt werden könnte, und zwar wegen der guten Zugänglichkeit kostenloser Rohstoffe (Gülle). Zudem sollten wegen der Möglichkeit für eine ausreichende Verwendung der Wärmeenergie die ersten Investitionen in Biogasanlagen in Schweinebetriebe getätigt werden.

Den Einschätzungen zufolge könnten in den kommenden fünf Jahren 5-7 Biogasanlagen mit einer insgesamt installierten Kapazität von ca. 2 MW<sub>el</sub> errichtet werden.



## Literaturverzeichnis

- BUNDESFORSCHUNGSANSTALT für LANDWIRTSCHAFT (FAL) (2005): Ergebnisse des Biogas-Messprogramms. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V, Gülzow.
- BUNDESMINISTERIUM für ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT und VERBRAUCHERSCHUTZ (BMELV) (2008a): Biogas Basisdaten Deutschland. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V, Gülzow.
- BUNDESMINISTERIUM für ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT und VERBRAUCHERSCHUTZ (BMELV) (2008b): Biogas – eine Einführung. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V, Gülzow.
- EUROPEAN COMMISSION (1997): Energy for the future: renewable sources of energy – White Paper for a Community Strategy and Action Plan. Brüssel.
- In: [http://europa.eu/documents/comm/white\\_papers/pdf/com97\\_599\\_en.pdf](http://europa.eu/documents/comm/white_papers/pdf/com97_599_en.pdf).
- EUROPEAN COMMISSION (2002): Memorandum of Understanding on the Regional Energy Market in South East Europe and its Integration into the European Union Internal Electricity Market. Brüssel. In: [www.stabilitypact.org/energy](http://www.stabilitypact.org/energy).
- ILIC M. (2003): Energetski potencijal i karakteristike ostataka biomase i tehnologije za njenu pripremu i energetsko iskorišćenje u Srbiji (*Energetisches Potenzial und Charakteristiken der Biomassenreste und Technologien für ihre Aufbereitung und energetische Nutzung in Serbien*); Endbericht im Auftrag des serbischen Ministeriums für Wissenschaft und Umweltschutz, Belgrad, April/2003
- MARTINOV M. und Dj. DJATKOV (2008): Studija mogućnosti kombinovane proizvodnje električne i toplotne energije iz biomase (*Studie der Möglichkeiten für eine Kraft-Wärme-Kopplung aus Biomasse*); Fakultät der technischen Wissenschaften; Novi Sad, April/2008.
- SEKRETARIAT für ENERGIEWIRTSCHAFT und MINERALROHSTOFFE der PROVINZ WOJWODINA. Energetski bilans AP Vojvodine – Plan za 2009. god. (*Energiebilanz der Autonomen Provinz Wojwodina - Plan für 2009*). Novi Sad. November/2008.
- TESIC, M., BABIC, M. und M. MARTINOV (2007): Predstojeći podsticaji za korišćenje biomase kao energenta (*Geplante Fördermaßnahmen für die Nutzung von Biomasse als Energieträger*). Savremena poljoprivredna tehnika, 33(1-2), 53-59
- REGIERUNG der REPUBLIK SERBIEN (2008): Entwurf der Verordnung über Maßnahmen zur Förderung der bevorzugt zu behandelnden Stromproduzenten. Belgrad. November/2008.



## **Energie- und Ökobilanzierung verschiedener Konversionspfade von Energiepflanzen zu Biogas bzw. Bioethanol**

B. Schumacher<sup>1</sup>, H. Oechsner<sup>2</sup>, T. Senn<sup>3</sup> und T. Jungbluth<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH (DBFZ),  
Torgauer Straße 116, 04347 Leipzig, Deutschland

<sup>2</sup> Landesanstalt für Agrartechnik und Bioenergie, vormals "Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen und Bauwesen", Universität Hohenheim, 70593 Stuttgart, Deutschland

<sup>3</sup> Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Gärungstechnologie, Universität Hohenheim, 70593 Stuttgart, Deutschland

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden im Auftrag der Landesstiftung Baden-Württemberg an der Universität Hohenheim im Rahmen des Forschungsprojekts „Optimierung der Bereitstellung von Biomasse für innovative energetische Nutzungsformen“ unter Beteiligung der Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen (jetzt Landesanstalt für Agrartechnik und Bioenergie), des Instituts für Pflanzenbau und Grünland, Fachgebiet Allgemeiner Pflanzenbau sowie des Instituts für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Fachgebiet Gärungstechnologie durchgeführt.

### **Zusammenfassung**

Sowohl Biogas als auch Bioethanol, letzteres bei optimaler Kombination mit Biogas, sind nach den hier untersuchten Szenarien unter den erläuterten Rahmenbedingungen dazu geeignet, den Einsatz nicht regenerativer Energieträger und damit Klimagasemissionen zu senken. Eine Aufgabe für die Zukunft wird es sein, differenzierte standortgerechte Nutzungskonzepte auf der Basis einer Entscheidung zu entwickeln, in welchem Maß eine (Flüssig-) Kraftstoffherzeugung oder eine stationäre Bereitstellung thermischer und elektrischer Energie aus Biomasse zu bevorzugen sind. Ziel muss es sein, durch eine sinnvolle Kombination aus Biomasse, Nutzungspfad und Konversionstechnik in Abhängigkeit von den lokalen und regionalen natürlichen Gegebenheiten sowie den anthropogenen Anforderungen, die land- und forstwirtschaftliche Fläche (als dem limitierten Faktor) höchst effizient zur Bioenergieträgerbereitstellung zu nutzen.

### **Schlüsselwörter:**

Biogas, Ethanol, LCA, TDH

## **Summary**

Biogas as well as bioethanol (combined with biogas) is able to reduce the consumption of non-renewable energy carrier and its GHG-emission under the investigated scenarios and the scope set. A future task will be the development of differentiated and well-adapted concepts on the basis of a decision between (liquid) fuels or stationary supply of thermal and electrical energy of biomass. The aim is an efficient use of the limited areas of arable land and forests for the supply with bioenergy carriers by a useful combination of biomass, paths of utilization and conversion technique depending on natural local and regional conditions as well as the anthropogenic needs.

## **Key words:**

biogas, ethanol, LCA, TPH

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Um die Biomasseaufbereitung und die Biomassekonversionspfade (zur Biogas- und Ethanolgewinnung) hinsichtlich ihres Energiegewinns sowie ausgewählter Umweltwirkungen miteinander vergleichen zu können bzw. die Verwendung von Silomais und reifer Triticale gegenüberzustellen, wurde ein Modell bzw. 8 Szenarien entwickelt und mit der Software GaBi 4 der PE Europe GmbH bilanziert. Als Bezugsgröße oder funktionelle Einheit wurde der Ertrag pro Hektar und Jahr gewählt. Variablen der Szenarien waren die Kulturpflanzen Mais/Triticale, die Düngung mineralisch/Gärrest, die Biomassevorbehandlung und die Konversion in Biogas bzw. Bioethanol (vgl. *Tabelle 1*).

## 2 Material und Methode

In Anlehnung an die Ökobilanznormen ISO 14040 (2006) bis ISO 14044 (2006) wurde die Bilanzierung entsprechend den vier Schritten durchgeführt: Festlegung des Ziels und Untersuchungsrahmens, Sachbilanz, Wirkungsabschätzung und Auswertung.

Grundlage der Bilanzierung war ein arrondierter landwirtschaftlicher Modellbetrieb mit 1000 ha landwirtschaftlicher Nutzfläche. Auf dieser Fläche wurde nur Mais oder nur Triticale bzw. auf zwei Dritteln Triticale und auf einem Drittel Silomais konventionell nach guter fachlicher Praxis angebaut. Dabei wurden Erträge für Mais von 20.000 kg TM/ha, für Triticalekorn von 8.200 kg TM/ha und Triticalestroh von 7.000 kg TM/ha unterstellt. Details zum Pflanzenbau sind der Literatur zu entnehmen (SCHUMACHER, 2008).

Auf dem Modellbetrieb befanden sich eine Biogasanlage und eine landwirtschaftliche Brennerei sowie die für den Anbau, die Ernte, den Transport und die Aufbereitung der Biomasse benötigten Maschinen und Geräte. Als Verfahren zur Biomasseaufbereitung wurde die Steam-Explosion als effektiver mechanisch-thermischer Aufschluss gewählt mit einer Temperatur von 155 °C bei einem Druck von ca. 6 bar und einer explosionsartigen Entspannung.

Die Brennereiprozesse für die Konversion von Triticalekorn und Maisganzpflanze wurden von FLEISCHER UND SENN (2007) übernommen und in das Modell eingebunden. Das Hauptprodukt Ethanol wurde vermarktet, aber keiner konkreten Nutzung zugeschrieben. Das Kuppelprodukt Brennereischlempe wurde wie Mais oder Triticale zur Biogaserzeugung eingesetzt. Die spezifischen Methanerträge für Mais, Triticalekorn und -stroh (mit/ohne Steam-Explosion-Aufbereitung) sowie für die Schlemphen von Maisganzpflanzen und Triticalestroh aus den Ethanolvergärungsversuchen wurden in Untersuchungen im Biogaslabor ermittelt.

Die Gärreste der Biogasanlage wurden in sechs von acht Szenarien als 100%iges Substitut der mineralischen Phosphor- und Kalidüngung sowie als 60%iges Substitut der mineralischen Stickstoffdüngung, basierend auf den Angaben von Schneider (2007) angerechnet. In den Szenarien 1 und 6 werden die Gärreste nicht als Düngemittel eingesetzt. In jedem Fall handelte es sich aber um ein abgedecktes Gärrestlager.

In *Tab. 1* sind die Szenarien der Bilanzierung zusammengefasst. Die Fließschemata der acht Szenarien sind auf den folgenden Seiten dargestellt. In den Szenarien 1 bis 3 und 5 wird ausschließlich Mais als Ausgangssubstrat verwendet. Die Szenarien 6 bis 8 behandeln ausschließlich die Konversion reifer Triticale. Szenario 4 verbindet die Stoffströme Mais und Triticale in dem Verhältnis der Nutzung der landwirtschaftlichen Fläche von zwei Dritteln Triticale und einem Drittel Silomais bezogen auf einen Hektar.

Tab. 1: Szenarien der Bilanzierung

Szenario	Anbau	Biogaserzeugung	Bioethanol- erzeugung
1	Mais – Mineraldünger	Mais	-
2	Mais – Mineraldünger/Gärrest	Mais	-
3	Mais – Mineraldünger/Gärrest	Mais/Steam Ex	-
4	Mais/Getreide – Mineraldün- ger/Gärrest	Mais/Getreidestroh/ Schlempe	Getreidekorn
5	Mais – Mineraldünger/Gärrest	Schlempe	Maissilage
6	Getreide – Mineraldünger	Korn + Stroh	-
7	Getreide – Mineraldünger/Gärrest	Korn + Stroh	-
8	Getreide – Mineraldünger/Gärrest	Korn + Stroh/Steam Ex	-

Steam-Ex = Steam-Explosions-Verfahren

Abbildung 1 zeigt das Fließschema für die Szenarien 1 bis 3 und 6 bis 8 mit den Optionen: Biomasse-Input Mais/Triticale, Steam Explosion ja/nein und Gärrestrückführung ja/nein.

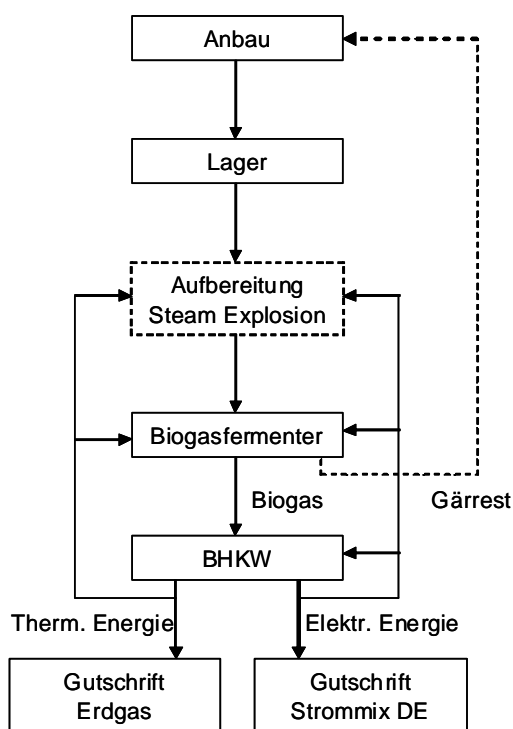


Abb. 1: Szenarien 1-3 und 6-8, optional: Mais/Triticale, Steam Explosion ja/nein, Gärrestrückführung ja/nein

Die folgende Abbildung 2 veranschaulicht anhand eines Fließschemas das komplexe Szenario 4, bei dem Getreidekorn in der Brennerei sowie Mais, Getreidestroh und Schlempe in der Biogasanlage verwendet und die Gärreste zurück in den Anbau geführt werden.

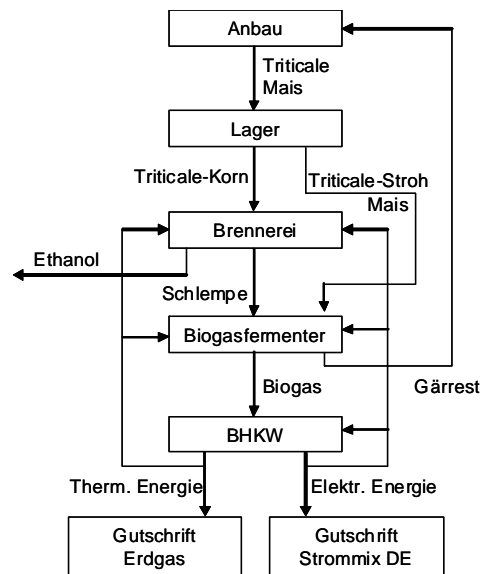


Abb. 2: Szenario 4: Getreidekorn in Bioethanol und Mais/Getreidestroh/Schlempe in Biogas mit Gärrestverwertung

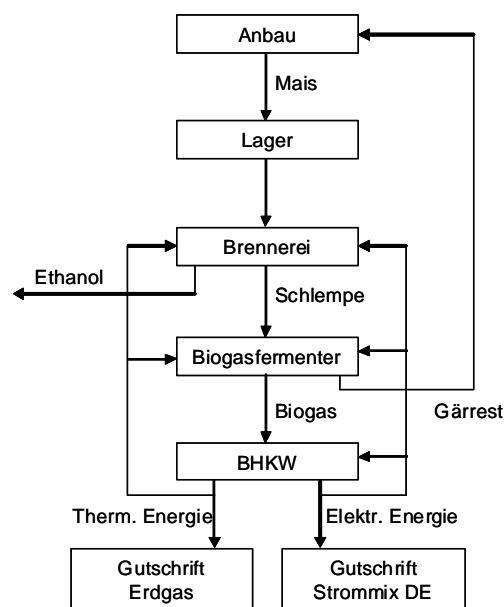


Abb. 3: Szenario 5: Maisganzpflanze in Bioethanol und Maisschlempe in Biogas mit Gärrestverwertung

In der *Abbildung 3* ist Szenario 5 dargestellt, bei dem Maisganzpflanzensilage als Input für die Brennerei und die Maisschlempe als Input für die Biogasanlage dienen. Auch hier werden die Gärreste zurückgeführt.

Das gewonnene Biogas wurde mittels Blockheizkraftwerk verstromt bzw. in thermische Energie gewandelt. Der elektrische Wirkungsgrad des BHKWs wurde mit 38 % (aufgerundet nach FNR, 2005) und der thermische mit 48 % (zwischen 22,8 und 55 % nach FNR, 2005) angesetzt, das entspricht einem Gesamtwirkungsgrad von 86 %. Sowohl die elektrische als auch die thermische Energie wurde für die Versorgung des Modellbetriebs eingesetzt, und die überschüssige Energie konnte vermarktet werden und wurde als Gutschrift behandelt.

Der Eigenverbrauch des BHKWs an elektrischer Energie wurde mit 2 % und der des Fermenters mit 6 % der produzierten elektrischen Energie angesetzt. Von DACHS UND REHM (2006) wird ein aktueller Eigenstromverbrauch von Biogasanlagen von insgesamt 8,1 % angegeben. In anderen Quellen wird der Anteil des BHKWs am Eigenstrombedarf mit einer Spanne von 10 bis 40 % ausgewiesen (FNR, 2005). Der Bedarf an thermischer Energie für den Biogasfermenter bei einer Fermentationstemperatur von 38 °C wurde anhand der Substratmenge, der spezifischen Wärmekapazität und der Annahme einer durchschnittlichen Temperaturerhöhung des Substrats um 30 K errechnet.

In allen acht Szenarien, ausgenommen Nr. 5, war der Modellbetrieb im Bereich thermischer und elektrischer Energie autark. Somit wurden nur für die bei Anbau und Transport der Biomasse benötigten Kraftstoffe sowie für die vorgelagerten Prozesse z.B. der Düngemittelherstellung fossile Energieträger eingesetzt. Die Kraftstoffverbräuche für den Transport zwischen Silo und Fermenter wurden nach FRISCH ET AL. (2004) kalkuliert. Der Energiebedarf zur Vorzerkleinerung des Getreides für den Biogasprozess wurde anhand von Daten der FNR (o.J.) berechnet.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Energiebilanz der acht Szenarien in den *Tabellen 2 und 3* dargestellt.

Tab. 2: Energiebilanz der Szenarien 1 bis 4

Szenario	1	2	3	4
<b>Biomasse</b>	<b>Mais</b>	<b>Mais</b>	<b>Mais</b>	<b>1/3 Mais</b>
<b>Biomasse</b>				<b>2/3 Triticale</b>
<b>Rückführung</b>		<b>Gärrest</b>	<b>Gärrest</b>	<b>Gärrest</b>
<b>Aufbereitung der Biomasse</b>			<b>Steam Ex</b>	
<b>Erzeugung von</b>	<b>Biogas</b>	<b>Biogas</b>	<b>Biogas</b>	<b>Biogas</b>
<b>Erzeugung von</b>				<b>Ethanol</b>
<b>Input (GJ/ha a)</b>				
Anbau Triticale				4,57
Anbau Mais	8,95	6,18	6,18	2,06
Biogas-/Ethanolanlage	25,29	25,29	134,82	36,88
<b>Summe Energie-Input</b>	<b>34,23</b>	<b>31,47</b>	<b>141,00</b>	<b>43,51</b>
<b>Output (GJ/ha a)</b>				
Ethanol				57,46
Elektr. Energie	93,82	93,82	99,56	53,07
Therm. Energie	111,69	111,69	125,76	64,76
<b>Summe Energie-Output</b>	<b>205,51</b>	<b>205,51</b>	<b>225,32</b>	<b>175,29</b>
<b>Energiegewinn (GJ/ha a)</b>	<b>171,28</b>	<b>174,05</b>	<b>84,32</b>	<b>131,78</b>
(Energie-Output - Energie-Input)				
<b>Energiegewinn : Energie-Input</b>	<b>5,00</b>	<b>5,53</b>	<b>0,60</b>	<b>3,03</b>
<b>Energie-Output : Energie-Input</b>	<b>6,00</b>	<b>6,53</b>	<b>1,60</b>	<b>4,03</b>



Anhand der *Abbildungen 4 bis 6* werden die Resultate der Berechnungen näher erläutert. Die Grenze hinsichtlich des Energiebedarfs zwischen Biomasseanbau und -konversion in Biogas bzw. Ethanol wurde am Lager bzw. Silo am Hof gesetzt, d.h. der Energiebedarf der Prozesse wurde entsprechend bis zum Biomasselager dem Anbau und alle folgenden Prozesse den Konversionsanlagen zugeschlagen.

Tab. 3: *Energiebilanz der Szenarien 5 bis 8*

Szenario	5	6	7	8
<b>Biomasse</b>	<b>Mais</b>			
<b>Biomasse</b>		<b>Triticale</b>	<b>Triticale</b>	<b>Triticale</b>
<b>Rückführung</b>	<b>Gärrest</b>		<b>Gärrest</b>	<b>Gärrest</b>
<b>Aufbereitung der Biomasse</b>				<b>Steam Ex</b>
<b>Erzeugung von</b>	<b>Biogas</b>	<b>Biogas</b>	<b>Biogas</b>	<b>Biogas</b>
<b>Erzeugung von</b>	<b>Ethanol</b>			
<b>Input (GJ/ha a)</b>				
Anbau Triticale		9,21	6,86	6,86
Anbau Mais	6,18			
Biogas-/Ethanolanlage	148,08	29,15	29,15	106,49
<b>Summe Energie-Input</b>	<b>154,26</b>	<b>38,36</b>	<b>36,00</b>	<b>113,35</b>
<b>Output (GJ/ha a)</b>				
Ethanol	91,50			
Elektr. Energie	58,60	63,89	63,89	67,75
Therm. Energie	74,03	80,71	80,71	85,58
<b>Summe Energie-Output</b>	<b>224,13</b>	<b>144,60</b>	<b>144,60</b>	<b>153,34</b>
<b>Energiegewinn (GJ/ha a)</b>	<b>69,87</b>	<b>106,25</b>	<b>108,60</b>	<b>39,99</b>
(Energie-Output - Energie-Input)				
<b>Energiegewinn : Energie-Input</b>	<b>0,45</b>	<b>2,77</b>	<b>3,02</b>	<b>0,35</b>
<b>Energie-Output : Energie-Input</b>	<b>1,45</b>	<b>3,77</b>	<b>4,02</b>	<b>1,35</b>

Die *Abbildungen 4 und 5* zeigen den Energie-Input bzw. -Output in GJ pro Hektar und Jahr unter Variation der Biomasseart, der Biomassevorbehandlung, der Konversionsart (Biogas bzw. Ethanol) und der Gärrestrückführung als Düngemittelsubstitut. Da das gesamte Biogas in das BHKW eingespeist wird, ist die daraus resultierende thermische und elektrische Energie als Output angegeben.

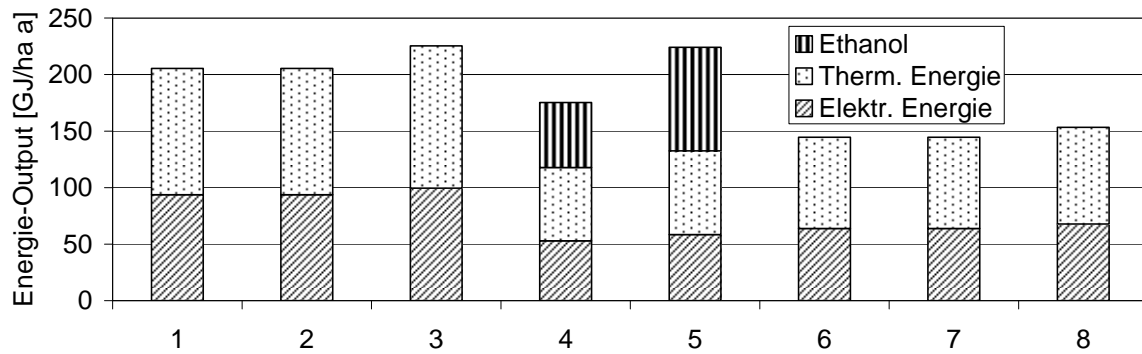


Abb. 4: Energie-Input ( $GJ\ ha^{-1}\ a^{-1}$ ) der acht Szenarien

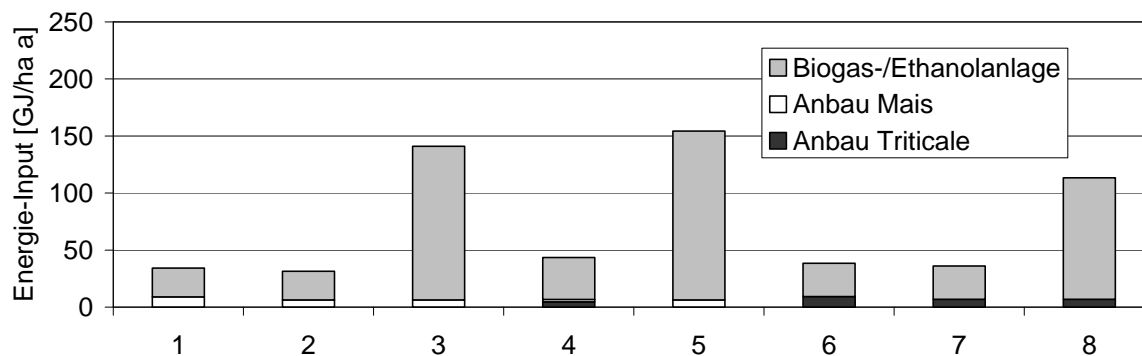


Abb. 5: Energie-Output ( $GJ\ ha^{-1}\ a^{-1}$ ) der acht Szenarien

Der hohe Energiebedarf für die Konversion in Biogas- bzw. Ethanol in den Szenarien 3, 5 und 8 erklärt sich aus den energieintensiven Aufbereitungsverfahren der Steam Explosion bzw. bei Szenario 5 aus dem nass mechanischen Aufschluss mittels Rotor-Stator-Maschine in der Brennerei.

Der Energie-Output von Szenario 4 teilt sich in etwa zu je einem Drittel in Ethanol mit 57, elektrische mit 53 und thermische Energie mit rund 65  $GJ/ha\ a$  auf. In Szenario 5 übersteigt der Energie-Output über Biogas aus der Schlempe mit ca. 59 elektrischer und 74 thermischer Energie den aus dem Ethanol mit 91, 5  $GJ/ha\ a$ .

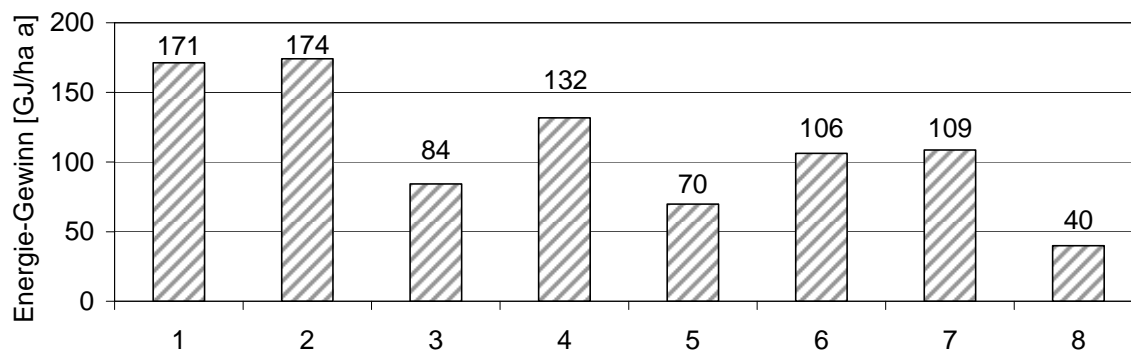


Abb. 6: Energie-Gewinn der acht Szenarien

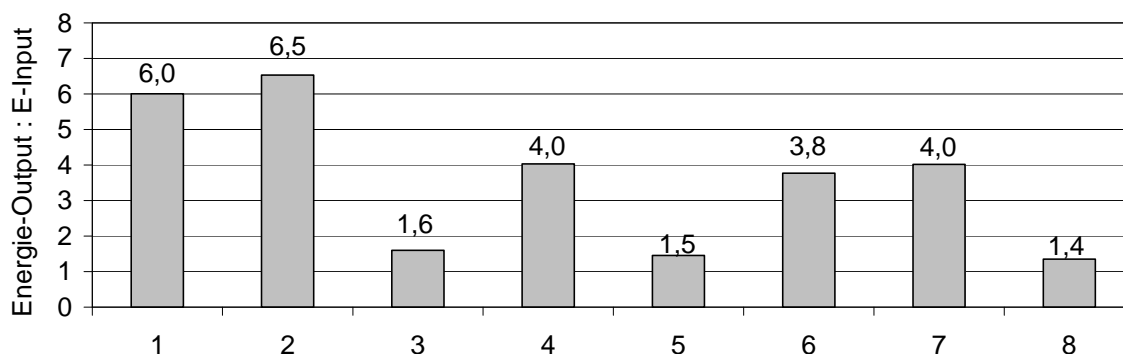


Abb. 7: Verhältnis Energie-Output zu Energie-Input der acht Szenarien

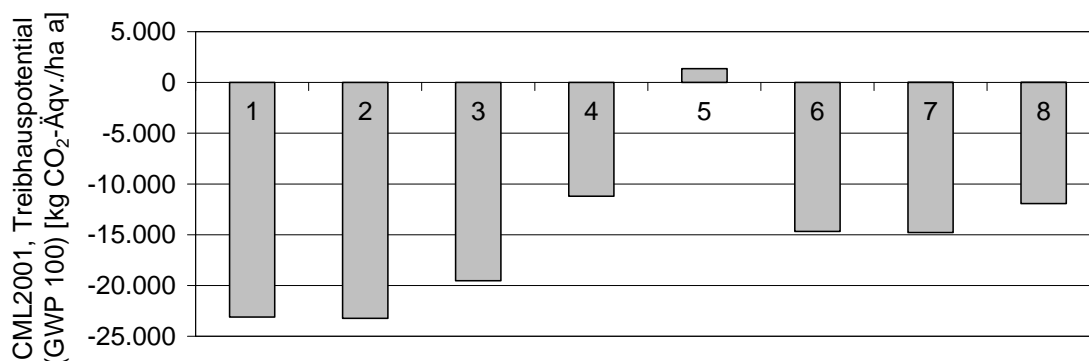
Die Abbildung 6 stellt den Energiegewinn der Szenarien gegenüber. In Abbildung 7 ist das Verhältnis von Energie-Output zu Energie-Input für jedes der acht Szenarien dargestellt. Den höchsten Wert mit 6,5 erreicht Szenario zwei, in dem Mais zu Biogas umgewandelt wurde und die Gärreste auf die landwirtschaftlichen Flächen zurückgeführt wurden. Der zweithöchste Wert wird mit 6,0 bei Szenario eins erzielt, das sich nur durch die Nichtverwendung der Gärreste von Szenario zwei unterscheidet. Szenario vier, sechs und sieben liegen mit 4,0, 3,8 und 4,0 auf dem gleichen Niveau.

Im Folgenden sollen die acht Szenarien kurz hinsichtlich ausgewählter Umweltwirkungen (ausgedrückt in den entsprechenden Äquivalenten) betrachtet werden. In Tabelle 4 sind das Treibhauspotenzial (GWP 100 Jahre) in kg CO<sub>2</sub>-Äqv., das Versauerungspotenzial (AP) in kg SO<sub>2</sub>-Äqv. und das Eutrophierungspotenzial (EP) in kg Phosphat-Äqv. nach CML 2001, bezogen auf einen Hektar und ein Jahr, der acht Szenarien aufgeführt. Mit Ausnahme von Szenario 5, bei dem keine autarke Versorgung mit thermischer und elektrischer Energie gegeben war und deshalb keine thermische oder elektrische Energie gutgeschrieben werden konnte, werden in allen anderen Szenarien die Emissionen gemindert. Durch die thermische Energie und die elektrische Energie aus dem Biogas-BHKW abzüglich des Eigenbedarfs wurde „Thermische Energie aus Erdgas“ und „Strommix Deutschland“ substituiert. Diese mit Emissionsdaten hinterlegten Standardprozesse werden durch die Software GaBi zur Verfügung gestellt.

Tab. 4: CML2001, Treibhauspotenzial (GWP 100 Jahre) [kg CO<sub>2</sub>-Äqv.], CML2001, Versauerungspotenzial (AP) [kg SO<sub>2</sub>-Äqv.], CML2001, Eutrophierungspotenzial (EP) [kg Phosphat-Äqv.] der acht Szenarien bezogen auf ha und a

1	2	3	4	5	6	7	8
CML2001, Treibhauspotenzial (GWP 100 Jahre) [kg CO <sub>2</sub> -Äqv./ha a]							
-23105,2	-23227,1	-19521,2	-11209,9	1361,4	-14673,8	-14771,5	-11926,8
CML2001, Versauerungspotenzial (AP) [kg SO <sub>2</sub> -Äqv./ha a]							
-39,7	-40,5	-36,1	-19,3	8,7	-26,6	-27,2	-23,8
CML2001, Eutrophierungspotenzial (EP) [kg Phosphat-Äqv./ha a]							
-2,7	-2,9	-2,4	-1,2	1,5	-2,0	-2,1	-1,7

Die *Abbildung 8* veranschaulicht die Daten aus *Tabelle 4* und zeigt das Treibhauspotenzial (GWP 100 Jahre) nach CML2001 der acht Szenarien.



*Abb. 8: CML2001, Treibhauspotenzial (GWP 100 Jahre) [kg CO<sub>2</sub>-Äqv.] der acht Szenarien*

Die Szenarien 4 und 5 verfügen noch über weitere Potenziale der Emissionsminderung, da das hier gewonnene Ethanol keinem bestimmten Verwendungszweck zugeordnet wurde und damit keine Gutschriften für beispielsweise substituiertes Benzin erfolgten.

## 4 Fazit

Das höchste Output-Input-Verhältnis der hier betrachteten Szenarien bezogen auf die Energie pro Hektar wurde von Szenario zwei erzielt, bei dem Mais zu Biogas umgewandelt und die Gärreste als Substitut für mineralische Düngemittel eingesetzt wurden. In diesem Szenario wird kein Ethanol gewonnen.

Die Produktion des hochwertigen flüssigen Kraftstoffs Ethanol, der sehr einfach Otto-Kraftstoffen beigemischt werden kann, verlangt einen höheren Energieeinsatz als die Biogasherstellung. Zu beachten ist, dass zurzeit die Ethanolgewinnung aus Maisganzpflanzen einen wesentlich höheren Energieeinsatz kostet als die Verwendung von stärkereichem Triticalekorn.

Die Aufbereitung der Biomasse mittels Steam Explosion erhöht zwar den Biogasertrag, aufgrund des hohen Energieeinsatzes fällt aber der Energiegewinn deutlich niedriger aus als bei den Vergleichsszenarien. Auf der anderen Seite wird für diese Art der Aufbereitung hauptsächlich thermische Energie benötigt, die zurzeit bei der Biogasverbrennung im BHKW entsteht, oft aber nicht anderweitig sinnvoll genutzt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass aufgrund der geringeren Trockenmasse- und damit Energieerträge pro Hektar der Triticale auch die Emissionsminderungspotenziale verglichen mit dem Mais geringer sind.

## Quellenverzeichnis

- DACHS, G. UND W. REHM, 2006: Der Eigenstromverbrauch von Biogasanlagen und Potenziale zu dessen Reduzierung. Solarenergieförderverein Bayern e. V. [Hrsg.], SeV-Studien 01, 11/2006, <http://www.sev-bayern.de>
- FLEISCHER, S. UND T. SENN, 2007: Verbesserung der Energie-, Stoff- und Emissionsbilanzen bei der Bioethanolproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen. Abschlussbericht August 2003 - Juni 2007, Entwurf Oktober 2007
- FNR, 2005: Ergebnisse des Biogasmessprogramms. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. [Hrsg.], Bundesforschungsanstalt (FAL), Gülzow, [www.tb.fal.de](http://www.tb.fal.de)
- FNR, o.J.: Leitfaden Bioenergie. Planung, Betrieb und Wirtschaftlichkeit von Bioenergieanlagen. Aktualisierung der Fassung von 2000, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. [Hrsg.], Gülzow, ISBN 3-00-015389-6
- FRISCH, J., ET AL., 2004: Betriebsplanung Landwirtschaft 2004/2005, Daten für die Betriebsplanung in der Landwirtschaft, KTBL-Datensammlung, Landwirtschaftsverlag GmbH, Münster, ISBN 3-7843-2178-X
- ISO 14040, 2006: Umweltmanagement - Ökobilanz - Grundsätze und Rahmenbedingungen, Deutsche und Englische Fassung, DIN EN ISO 14040:2006, 10/2006
- ISO 14044, 2006: Umweltmanagement - Ökobilanz - Anforderungen und Anleitungen, Deutsche und Englische Fassung, DIN EN ISO 14044: 2006, 10/2006
- N.N., 2003: GaBi 4 - Get ready for tomorrow! Handbuch GaBi 4, IKP, Universität Stuttgart, Institut für Kunststoffprüfung und Kunststoffkunde, Abteilung GaBi, PE Europe GmbH, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland
- N.N., o.J.: Grundlagen der Ganzheitlichen Bilanzierung, Unterlagen Softwareschulung 1, PE Europe GmbH, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland
- SCHNEIDER, N., 2007: Gärreste aus Biogasanlagen - Nähr- und Schadstoffe, Einsatzmöglichkeiten im Ackerbau. Internationale Konferenz - Progress in Biogas, Stuttgart-Hohenheim. ISBN 978-3-940706-00-3
- SCHUMACHER, B., 2008: Untersuchungen zur Aufbereitung und Umwandlung von Energiepflanzen in Biogas und Bioethanol. Dissertation, Universität Hohenheim, ISBN 978-3-86664-492-2

