

MT Energy Service GmbH | Ludwig-Elsbett-Str. 1 | 27404 Zeven

BIB landwirtschaftliche Beratung

Thomas Klein

Am Mühlenbach 2

17168 Sukow-Levitzow



MT Energy Service GmbH

Ludwig-Elsbett-Straße 1 | 27404 Zeven

Tel. +49 (0) 42 81 - 9845-0

Fax +49 (0) 42 81 - 9845-100

www.mte-service.de | info@mte-service.de

Ihre Mail: t.klein@blb-beratung.de

Ihr Tel: 0152/53199638

Ihr Fax:

Bearbeitung: Niclas Krakat

Durchwahl: 04281 9845 - 626

Zeven,
30.4.2021

**Prozessbiologische Betreuung
Durchführung eines kontinuierlichen Versuches mit der Zugabe von Huminstoffen**

Sehr geehrter Herr Klein,

als Anlage zu diesem Schreiben möchten wir Ihnen die Zusammenfassung der im Rahmen eines kontinuierlichen Fermentationsbetriebes durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Analysen zukommen lassen. Parallel geht Ihnen ein zweiter Bericht zur Erfassung der Gaserträge inkl. prozesschemischer Parameter zu.

Bei weiteren Fragen stehen wir Ihnen gerne zu Verfügung.

ppa. Dr. Niclas Krakat

i.A. Martin Pydde

1. Untersuchungshintergrund und Versuchs-Setup

Zur Erfassung des Einflusses von Huminsäuren auf den Biogasprozess wurde zur Simulation einer Biogasanlage ein kontinuierlich geführter Gärversuch plus je einem Referenzversuch (ohne Additiv) in einer jeweiligen Doppelbestimmungen durchgeführt.

4 Labor-Fermenter wurden mit aktivem Gärsubstrat aus einer BGA befüllt. Es erfolgte eine Fütterung je Fermenter mit 200g mit einem Substratmix (50% Mais, 21% Zuckerrübe, 18% HTK, 11% GPS). Zwei der Fermenter (Huminstoffansatz A und B) erhielten zu Beginn der 3. Woche für 5 Tage eine Huminstoff- Zugabe von 200 µl pro Tag. Anschließend erfolgte eine Huminstoff- Zugabe von 21 µl/ pro Tag an 5 Tagen pro Woche (entsprechend 15 µl im 7 Tages-Schnitt) bis Woche 8. In der Überlastungsphase wurden entsprechend 21 µl/ pro 200g zugefüttertem Substrat Input-Mix zudosiert.

Am Ende erfolgte eine stoßweise Substratüberlastung (VP2-Überlastungsphase), um Aussagen über Einfluss von Huminstoffen auf die Populationsdynamik bei Stresssituationen ableiten zu können. Während des Versuchsablaufes wurden zu 5 Zeitpunkten mikroskopische Analysen zur qualitativen und quantitativen Bestimmung methanogener Euryarchaeota (Archaea) und Bacteria in Doppelbestimmungen durchgeführt (=17 Mikroskopische Untersuchungen).

Die mit dieser Versuchsreihe gekoppelten Ergebnisse der Gasertragsbestimmung inkl. chemisch relevanter Parameter (Tab. 1) werden Ihnen in einem gesonderten zweiten Bericht zugesandt.

Tab. 1: Übersicht des Versuchsablaufs. Der Ablauf umfasste 3 Versuchsabschnitte bzw. einen Zeitraum von 12 Wochen mit 5 Untersuchungspunkten.

Start – Up Phase			Versuchsphase 1 (VP1)					VP 2 (Überlastung)			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MB		MB			MB		MB				MB
pH		pH			pH		pH				pH
F/T		F/T			F/T		F/T				F/T
TS/oTS		TS			TS		TS				TS
NH4-N		NH4-N			NH4-N		NH4-N				NH4-N
Visko		Visko			Visko		Visko				GC
GC											

MB= Mikroskopie (dieser Bericht). F/T= FOS/TAC-Quotient, TS= Trockensubstanz, oTS= org. TS (Gasertragstest, gesondertes Protokoll)

2. Prozentuale prokaryotische Verteilung (Bacteria, Archaea)

Zur Erfassung der prokaryotischen Zusammensetzung innerhalb durchgeführter Prozessphasen wurden 5 Versuchstage (epi-fluoreszenz) mikroskopisch untersucht. Nach einer Start-up Phase (3.2. – 21.2) ohne Zugabe von Huminsäure (HS), erfolgte am 22.2.21 erstmalig eine HS-Zugabe (200 µL pro Tag für eine Woche) und anschließend durchschnittlich 15 µL pro Tag. Am 2. Untersuchungstag (nach 24 Tagen) war ein Rückgang der Zellzahl auf 4,1 % bzw. 4,5% feststellbar (**Abb. 1, Abb. 2**). Diese Abnahme konnte bei beiden Versuchsansätzen (Referenz, + HS) festgestellt werden.

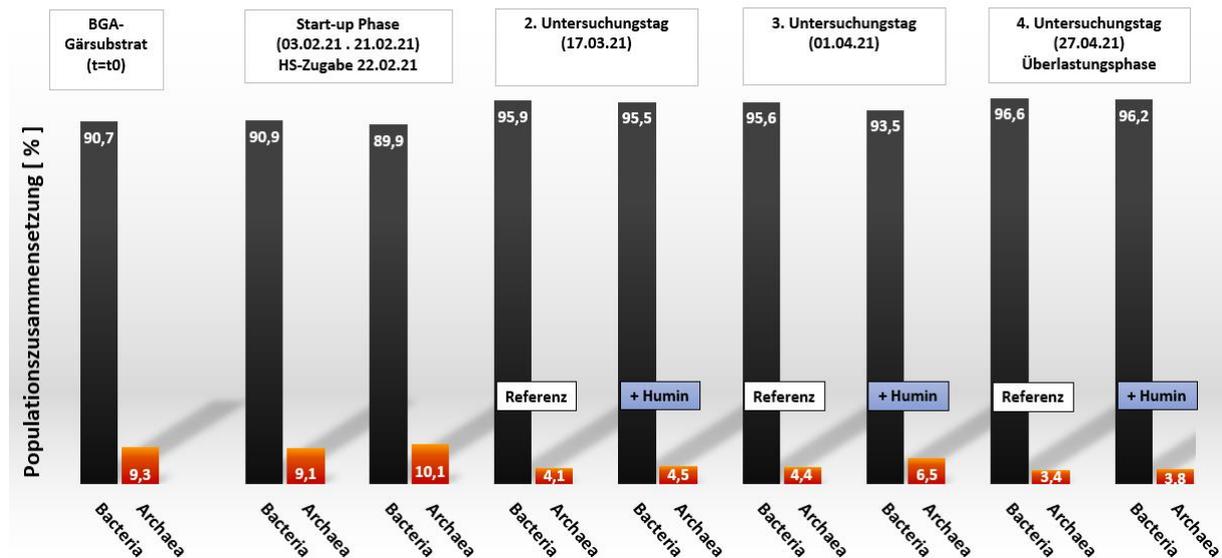


Abb. 1: Einfluss von Huminsäuren auf die prokaryotische Zusammensetzung im kontinuierlich betriebenen Fermentationsansatz in der Start-up Phase, Untersuchungsphase mit HS sowie während der Überlastungsphase mit HS.

Im darauffolgenden 6. bis 8. Versuchswoche konnte im Vergleich zum Referenzwert bei der Fermentation mit HS eine Erhöhung der methanogenen Archaea um ca. 47,7 % erzielt werden (**Abb. 2**). Die sich hieran anschließende Überlastungsphase führte zwar zu einer Abnahme methanogener Archaea bei beiden Ansätzen (Referenz, + HS), aber auch hier stellten sich bei dem Ansatz mit HS tendenziell höhere Zellzahlen der Archaea ein (**Abb. 1, Abb. 2**).

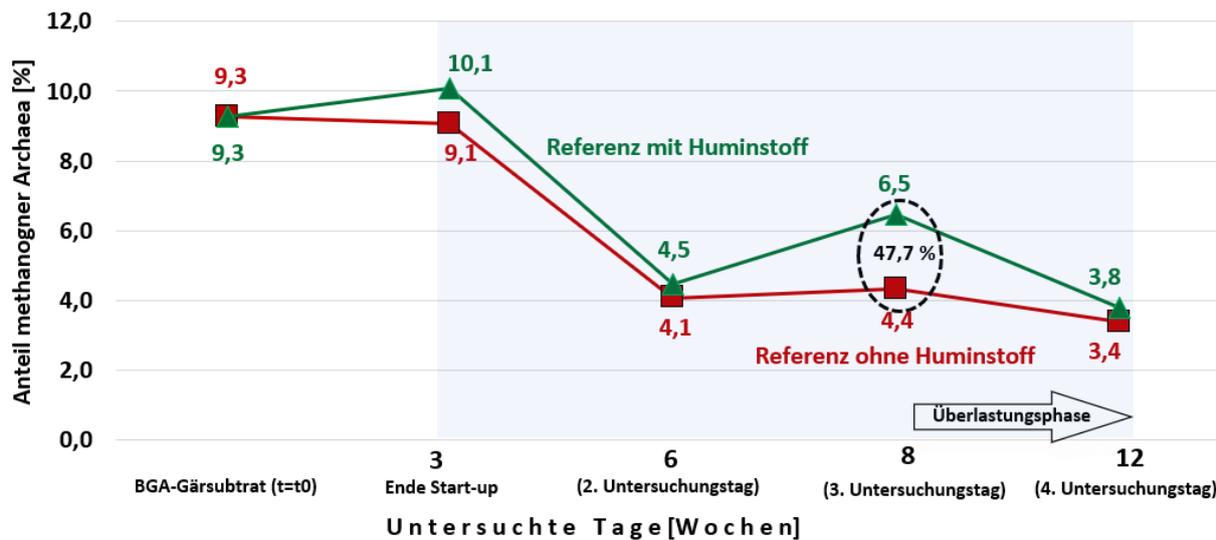
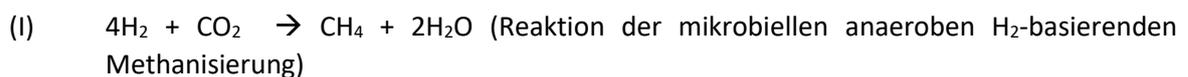


Abb. 2: Einfluss von Huminsäuren auf die prokaryotische Zusammensetzung im kontinuierlich betriebenen Fermentationsansatz in allen Untersuchungsphasen. Der Einsatz von HS wirkte führte zu höheren Zellzahlen methanogener Archaea im gesamten Untersuchungszeitraum

Der Einsatz von HS führte auch zur Veränderung des morphologischen Erscheinungsbildes der am anaeroben Abbau beteiligten Mikroorganismen (**Abb. 3, Abb. 4**). Die Zusammensetzung des BGA-Gärsubstrates am Startpunkt der Versuchsreihe (**Abb. 4**, 14,3% stäbchenförmige Archaea) verschob sich in ein morphologisches Bild mit überwiegend stäbchenförmigen Archaea (ca. 65% stäbchenförmige Archaea). Nach 38 Tagen (22.2 – 1.4.) stieg der Anteil stäbchenförmiger Archaea von 64,2 % auf 68,3% (=6,5%) an. In Relation zum Referenzwert betrug die Differenz 9,9% (**Abb. 3**). Insb. stäbchenförmige hydrogenotrophe Euryarchaeota, die Wasserstoff (H₂) mit CO₂ zu Methan umwandeln (CO₂-Reduktion)



gelten als die „robusten“ Vertreter im anaeroben Abbauprozess und weisen oftmals auf stabile Prozesse hin.

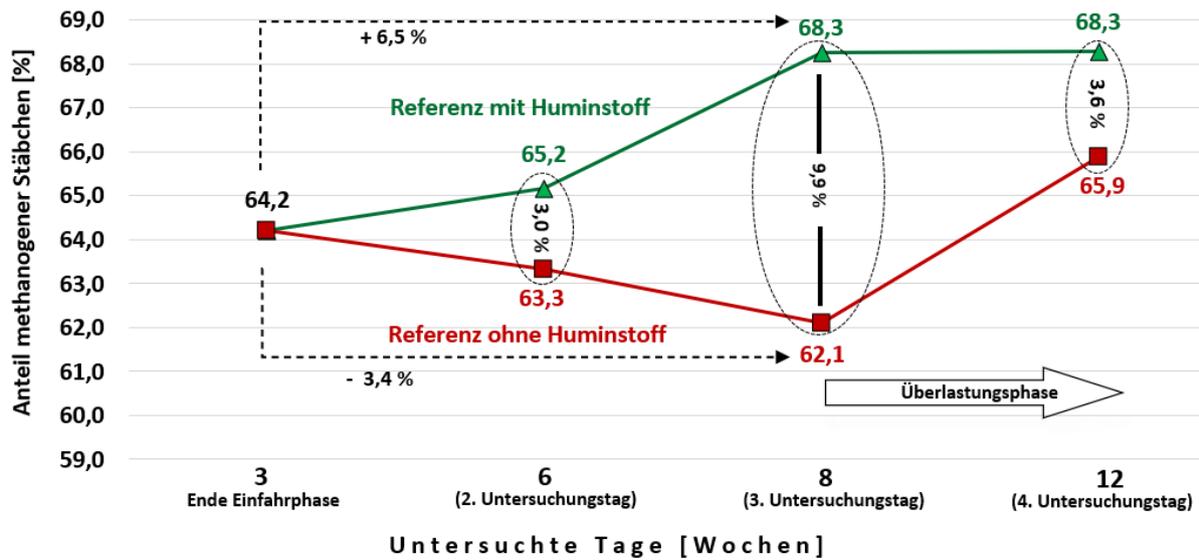


Abb. 3: Einfluss von Huminsäuren auf die prokaryotische Zusammensetzung im kontinuierlich betriebenen Fermentationsansatz in alle Untersuchungsphasen. Der Einsatz von HS begünstigte das Wachstum hydrogenotropher methanogener Archaea.

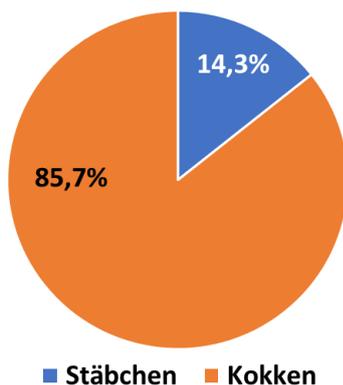


Abb. 4: Morphologische Verteilung BGA- Gärsubstrates (t=t₀). Stäbchenförmige methanogene Archaea waren lediglich zu 14,3% nachweisbar. Im Laufe der Fermentation drehte sich das Verhältnis.

Die anschließend durchgeführte Überlastungsphase (s. parallelen Bericht zur Gasertragstest) hatte keinen Einfluss auf die Morphologie (+ HS), währenddessen beim Referenzversuch eine Zellzahlzunahme methanogener Archaea von 62,1% auf 65,9% zu verzeichnen war.

Dennoch blieb der prozentuale Anteil wasserstoffverwertender Archaea während der gesamten Untersuchungsphase bei dem Versuchsansatz mit HS höher als bei der Referenzfermentation (ohne HS). Der Einsatz von HS führte offensichtlich zu einer Dominanz stäbchenförmiger Euryarchaeota.

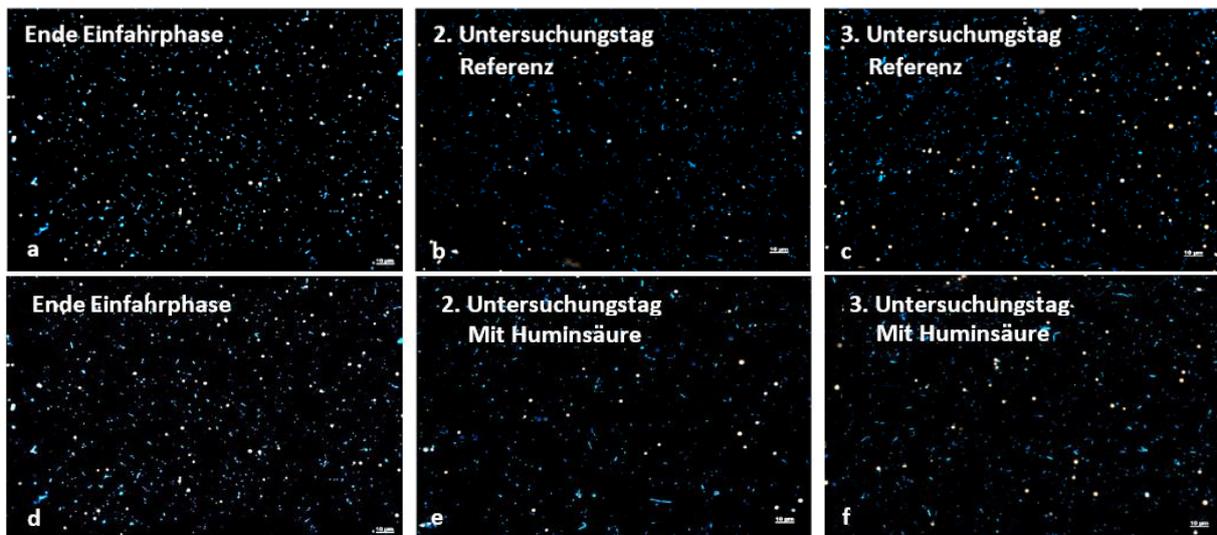


Abb. 5: Die (fluoreszenz)mikroskopischen Aufnahmen stellen die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Probematerials bei 1000-facher Vergrößerung dar. Die Probe wurde stark verdünnt und mit Lichtwellen bei 420 nm angeregt. Durch die Fluoreszenzanfärbung erscheinen die zelluloseabbauenden und säurebildenden Organismen (Gärbakterien) blau. Die methanogenen Archaea können durch ihren fluoreszierenden Cofaktor F420 identifiziert werden (hier weiß angefärbt). **Oben:** Mikroskopische Erfassung der Archaea und Bacteria der Referenzprobe nach der Start-up Phase und vor der Belastungsphase. **Unten:** Analoge mikroskopische Aufnahmen zum Versuch mit Huminsäuren.

3. Fazit

Der Einsatz von Huminsäuren scheint im durchgeführten Kontroversuch den H₂-basierenden methanogenen Metabolismus zu begünstigen. Die archaische Gemeinschaft wurde in Gegenwart von HS im Vergleich zum Referenzversuch in allen Untersuchungsphasen von H₂-verwertenden Archaea dominiert (ca. 10% höherer Anteil stäbchenförmiger methanogener Archaea).

Wasserstoffverwertende Euryarchaeota sind im Vergleich zu acetoklastische Archaea bekanntermaßen befähigt, sich schneller an neue untypische Lebensräume (z.B. mit Sauerstoff, Austrocknung) sowie an Temperaturschwankungen anzupassen, als die Klasse der kokkoiden Archaea. Methanostäbchen gelten als die „robusten“ Vertreter im anaeroben Abbauprozess und weisen oftmals auf stabile Prozesse hin.

Ferner konnte durch den Einsatz von Huminstoffen, im Vergleich zu den durchgeführten Versuchen ohne Zugabe, die Archaea-Zellzahlen um ca. 50% erhöht werden.