



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

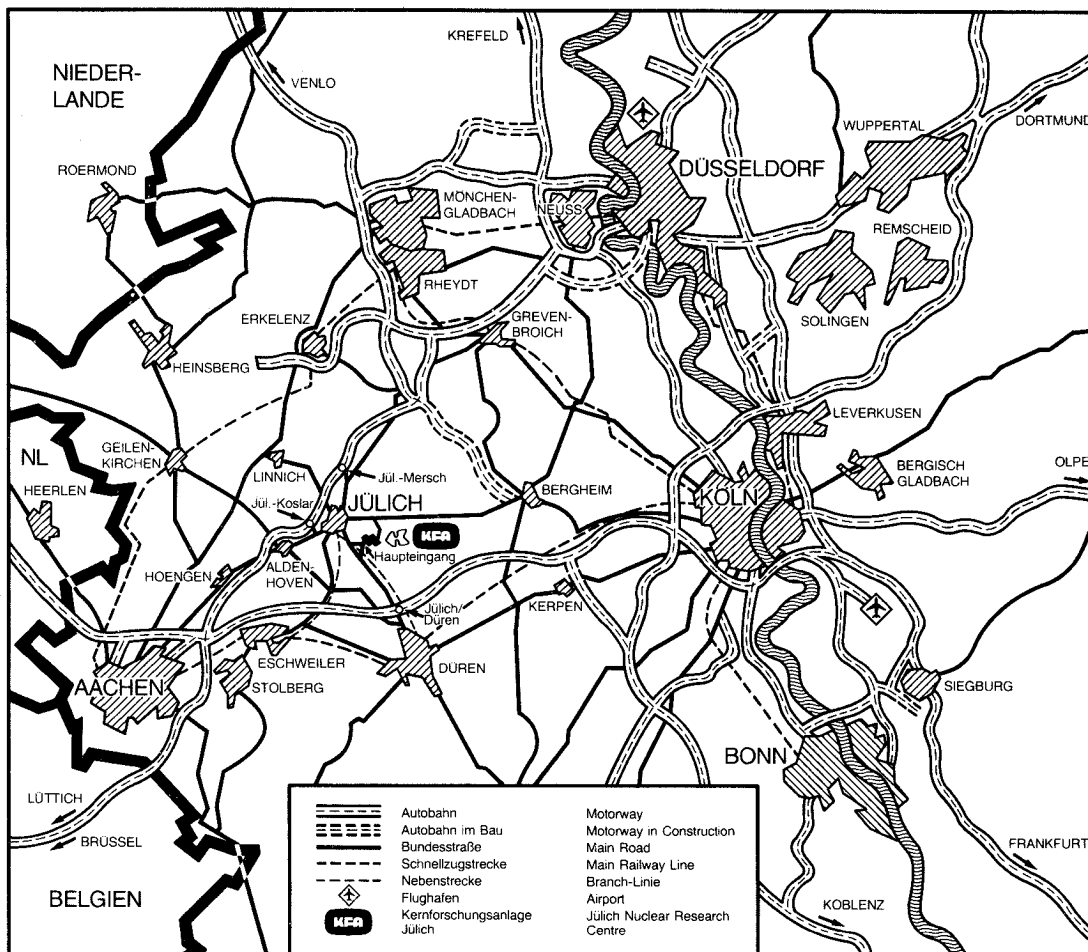
Institut für Biotechnologie

**Untersuchungen zur mikrobiellen
anaeroben Reinigung eines Abwassers
aus der Citronensäure-Produktion**

von

Hans-Jürgen Koepp-Bank

Jül - 2082
September 1986
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2082

Institut für Biotechnologie Jül - 2082

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 024 61/610 · Telex: 833 556-0 kf d

Untersuchungen zur mikrobiellen anaeroben Reinigung eines Abwassers aus der Citronensäure-Produktion

von

Hans-Jürgen Koepp-Bank

D 10 (Diss. Uni. Düsseldorf)

Anaerobic Treatment of Waste Water from Citric Acid Production

In recent years the anaerobic digestion of industrial waste water has gained increasing interest. This study presents results of the anaerobic treatment of waste water from citric acid production.

1. The waste water used originates from molasses based production of citric acid by Aspergillus niger. The main constituents of the effluent are lower alcohols and organic acids. With a COD of 20.000 to 50.000 mg $O_2 \text{xl}^{-1}$ this waste water belongs to the highly polluted industrial effluents.
2. The limiting steps of the anaerobic treatment of this waste water are the conversions of propionic acid to acetic acid and of acetic acid to methane. Further degradation of propionic acid depends on the concentration of acetic acid.
3. Sulfate, contained in this waste water in a concentration of 9 to 27 mmol xl^{-1} , influenced the conversion of the organic waste water constituents to methane. Sulfate concentrations higher than 9 mmol xl^{-1} lowered the production of methane. Elimination of the sulfate, already contained in the waste water, stimulated production of methane.
- 4.1. In stirred tank reactors a maximum COD-degradation rate of 3.9 g $O_2 \text{xl}^{-1} \text{xd}^{-1}$ was obtained at a hydraulic retention time of 3.3 days. A COD-reduction of more than 70% was possible only at hydraulic retention times longer than 10 days.
- 4.2. A maximum COD-degradation rate of 17 g $O_2 \text{xl}^{-1} \text{xd}^{-1}$ was achieved at a hydraulic retention time of 24h with a fixed bed loop reactor filled with porous sinter glass (SCHOTT) as carrier material. However precipitation of calciumcarbonate led to clogging of the fixed bed within 6 months.
- 4.3. The highest degradation rates were achieved with an expanded bed reactor and powdered activated carbon as carrier material. The maximum COD-degradation rate was 31 g $O_2 \text{xl}^{-1} \text{xd}^{-1}$ at a hydraulic retention time of 16.5h.

GLIEDERUNG

1.	Einleitung	1
1.1	Mikrobiologie des anaeroben Abbaues	1
1.2	Ökologie des anaeroben Abbaues	13
1.3	Reaktorsysteme zur anaeroben Abwasserreinigung	14
2.	Material und Methoden	22
2.1	Abwasser	22
2.2	Versuchs-Aufbau und -Durchführung	23
2.2.1	Batch-Kulturen	24
2.2.2	Kontinuierliche Kulturen	25
2.3	Analytik	30
2.3.1	Summenparameter	30
2.3.2	Elementaranalysen	33
2.3.3	Gasanalyse	36
2.3.4	Chemische Analysen	40
2.3.5	Biomasse-Bestimmung	42
2.4	Mikroskopische Untersuchungen	44
2.5	Reinkulturen	45
3.	Ergebnisse	48
3.1	Zusammensetzung des Abwassers	48
3.2	Anaerober Abbau des Abwassers aus der Citronensäure-Produktion	54
3.2.1	Anreicherungskultur	54
3.2.2	Batch-Versuche	56
3.2.3	Kontinuierlicher Abbau des Abwassers	87
3.3	Mikroorganismen	117
4.	Diskussion	124
5.	Zusammenfassung	136
6.	Literaturverzeichnis	138

1. EINLEITUNG

1.1 Mikrobiologie des anaeroben Abbaues

Alle biologischen Verbindungen können unter aeroben Bedingungen von Mikroorganismen abgebaut werden (Schlegel, 1985). Während dieser oxidative Abbau zu den anorganischen Endprodukten CO_2 und H_2O oftmals durch einen einzigen Mikroorganismus durchgeführt wird, sind am anaeroben Abbau organischer Substanzen zahlreiche Organismengruppen beteiligt (Mudrak u. Kunst, 1985). Unter strikt anaeroben Bedingungen bilden häufig methanogene Bakterien die letzte Gruppe der am Abbau beteiligten Organismenkette, so daß dann CO_2 und Methan als Endprodukte entstehen.

Um die Jahrhundertwende ging man noch von einem einstufigen Modell der Methanbildung aus: Omelianski (1906) führte die Bildung von Methan aus Zellulose allein auf die Tätigkeit eines *Bacillus methagenis* zurück (Tab. 1). Zur gleichen Zeit erkannte Söhngen (1906) bereits in CO_2 und H_2 Substrate für die methanogenen Bakterien (Braun, 1982). Barker (1940, 1956) erweiterte das einstufige zu einem zweistufigen Modell der Methangärung: eine erste Bakteriengruppe spaltet hochmolekulare organische Verbindungen in niedermolekulare Fettsäuren und Alkohole. Die obligat anaeroben Methanbakterien bilden aus diesen Zwischenprodukten (neben Essigsäure und CO_2) v.a. Methan. Am Beispiel des *Methanobacterium omelianskii* zeigte Barker (1940) die Bildung von Methan und Essigsäure aus Äthanol.

Ausgehend von der Erkenntnis, daß Methanbakterien ein sehr negatives Redoxpotential benötigen, entwickelte Hungate (1950) eine Technik zur Kultivierung strikt anaerober Mikroorganismen. Mit Hilfe dieser "Hungate-Technik" konnten Bryant u.a. (1967) zeigen, daß es sich bei *Methanobacterium omelianskii*

1887	Essigsäure durch Klärschlamm zu Methan und CO ₂ abgebaut	Hoppe-Seyler (1887)	1
1868	Anaerober Abbau von Zucker durch "lebendes Ferment"	Bechamp (1868)	2
1906	Bacillus methagenis vergärt Zellulose zu Methan	Omelyanski (1906)	1
1906	Bildung von Methan aus CO ₂ und H ₂	Söhngen (1906)	
1940	Methanobacterium omelyanskii vergärt Alkohol und CO ₂ zu Essigsäure und Methan	Barker (1940)	
ab 1950	Entwicklung einer Technik zur Kultivierung strikt anaerober Mikroorganismen	Hungate (1950, 1969)	
1956	Zweistufiges Modell der Methanbildung	Barker (1956)	
1967	Methanobacillus omelyanskii stellt eine syntrophe Mischkultur eines acetogenen und eines methanogenen Bakteriums dar. Bioenergetische Symbiose über "interspecies hydrogen transfer" möglich	Bryant (1967) Bryant (1967)	
1979	Dreistufiges Modell der Methanbildung	Bryant (1979)	
1979	Methanbakterien benötigen Nickel zum Wachstum	Thauer (1979)	

Tab. 1: Historische Daten zur Mikrobiologie des anaeroben Abbaues

um eine syntrophe Mischkultur handelte: Der "S-Organismus" bildet aus Äthanol Essigsäure und Wasserstoff, der von Methanobacterium MoH (= M. bryantii) mit CO_2 zu Methan und Wasser oxidiert wird. Gleichzeitig wurde hiermit erstmals die Bedeutung des "interspecies hydrogen transfers" für die Erniedrigung des Wasserstoff-Partialdruckes erkannt (Bryant et al., 1967). Damit wurde das zweistufige Modell abgelöst von einem dreistufigen Modell der Methanbildung: die in der ersten Stufe anfallenden niedermolekularen Fettsäuren und Alkohole werden in der zweiten Stufe zu Essigsäure, H_2 und CO_2 abgebaut. Diese Produkte dienen den Methanbakterien der dritten Stufe als Substrate für die Bildung von Methan (Bryant et al., 1967). Heute geht man davon aus, daß der anaerobe Abbau von Biopolymeren über vier Reaktionsschritte erfolgt, für die mindestens drei Organismengruppen verantwortlich sind. Gujer und Zehnder (1983) gelangten durch weitere Unterteilung einzelner Schritte zu einem sechsstufigen Schema des anaeroben Abbaues (Abb. 1).

1. Hydrolyse

Der erste Schritt des anaeroben Abbaues von Biopolymeren stellt die Hydrolyse von Polymeren zu den entsprechenden Monomeren dar. Diese Spaltung erfolgt durch Exoenzyme, die von saccharolytischen und peptolytischen Clostridien, Streptococcen und weiteren aerotoleranten bis strikt anaeroben Bakterien ausgeschieden werden (Hobson, 1981). Bei höheren Konzentrationen von Lipiden im Abwasser stellt die Hydrolyse den limitierenden Schritt im anaeroben Abbau dar (Kennedy und van den Berg, 1982). In einem separaten säurebildenden Reaktor bildet die Hydrolyse immer den limitierenden Schritt (Eastman und Ferguson, 1981). Dies gilt besonders, wenn die Biopolymere hauptsächlich ungelöst vorliegen (Kaspar u. Wuhrmann, 1978).

Als Ergebnis dieser Hydrolyse der Polymere (Proteine, Fette, Kohlenhydrate) entstehen die entsprechenden Monomere (Aminosäuren, Fettsäuren, Zucker), die von den fermentativen Bakte-

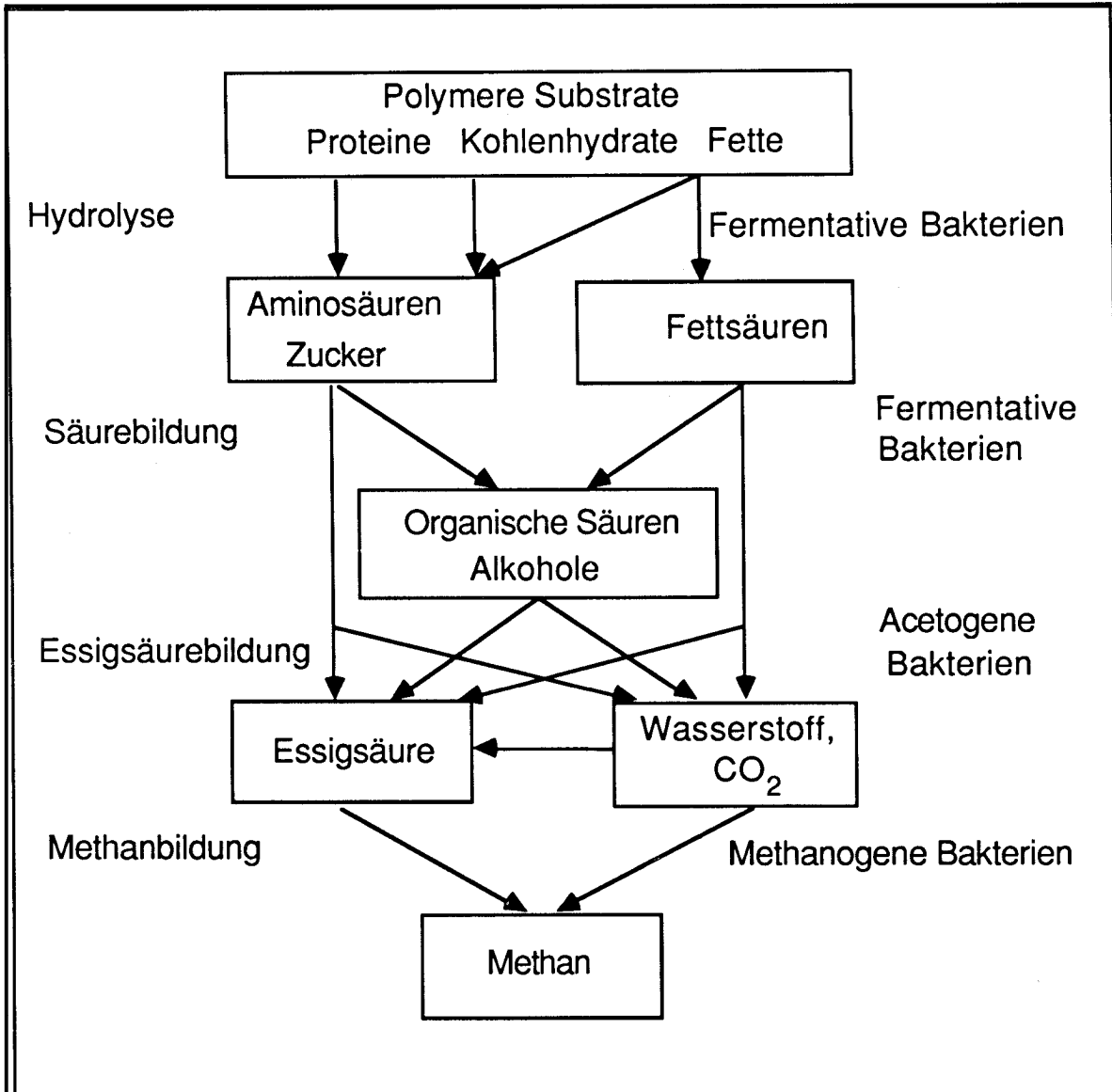


Abb. 1: Vierstufiges Schema des anaeroben Abbaues

rien aufgenommen werden können. Hobson (1981) betont die Bedeutung der "Passenger"-Bakterien genannten, fakultativ anaeroben und aeroben Arten, die den mit dem Zulauf in den Fermenter gelangten Sauerstoff entfernen und so zur Erniedrigung des Redoxpotentials im Fermenter beitragen. Ihre Zahl kann bis zu 10 % der Gesamtzahl an Bakterien in einem Fermenter betragen (Toerien et al., 1967).

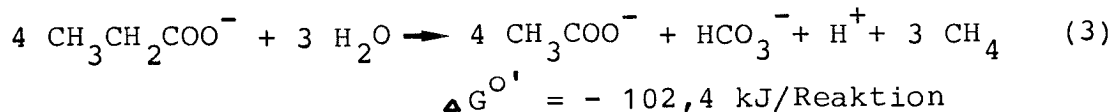
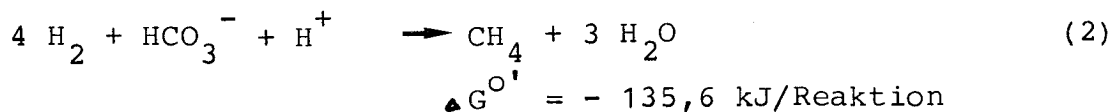
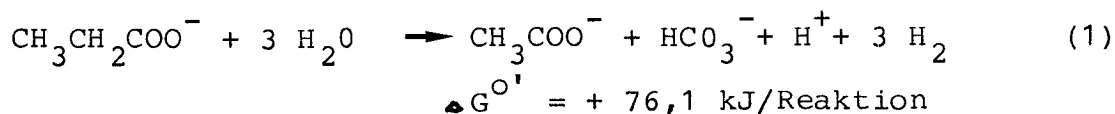
2. Säurebildung

Die Produkte der Hydrolyse werden von hydrolytischen und nicht hydrolytischen fermentativen Bakterien aufgenommen und zu reduzierten Gärungsprodukten (Alkohole, Fettsäuren, Dikarbonsäuren, Kohlendioxid, Wasserstoff, Schwefelwasserstoff, Ammoniak) abgebaut (Zehnder et al., 1981; Braun, 1982). Die Gesamtzahl der säurebildenden Bakterien wurde vielfach bestimmt (Hobson u. Shaw, 1971; Toerien et al., 1967). Sie liegt bei 2×10^9 /ml bis 1×10^{10} /ml, schwankt allerdings beträchtlich je nach verwendeter Substratzusammensetzung. Andererseits scheint die sich nach einiger Zeit etablierende Biozönose in einem Fermenter aufgrund der natürlichen Selektion sehr konstant in ihrer Artenzusammensetzung zu sein (Hobson, 1981).

Die Zusammensetzung der bei der Fermentation anfallenden Produkte wird u.a. vom pH-Wert und dem Wasserstoff-Partialdruck bestimmt (Thauer, 1976). Bei hohem Wasserstoff-Partialdruck werden bevorzugt reduzierte Endprodukte wie Äthanol, Propionsäure, Buttersäure, Milchsäure und Bernsteinsäure gebildet, mit deren Bildung zugleich überschüssige Elektronen abgeführt werden (Large, 1984). In höheren Konzentrationen hemmen diese Produkte jedoch den weiteren anaeroben Abbau (Zehnder, 1976). Bei niedrigem Wasserstoff-Partialdruck wird dagegen hauptsächlich Essigsäure gebildet.

3. Essigsäurebildung

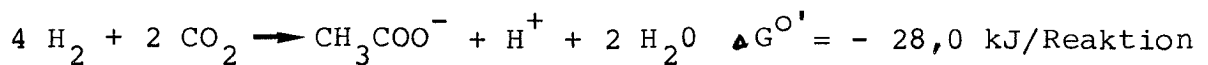
Nun erfolgt eine Aufteilung der weiteren Abbauewege zu Methan: während Essigsäure, H_2 und CO_2 sowie einige andere Produkte (Ameisensäure, Methanol, Methylamine) den methanogenen Bakterien direkt als Substrate dienen können, müssen alle anderen Gärungsprodukte in einer acetogenen Zwischenstufe zu Essigsäure, Wasserstoff und CO_2 abgebaut werden (Schoberth, 1981). Diese Reaktionen verlaufen jedoch unter Standardbedingungen endergon, wie für den Abbau von Propionsäure angegeben (Boone u. Bryant, 1980):



Die β -Oxidation von Propionsäure (1) wird erst dann exergon, wenn der Wasserstoff-Partialdruck, z.B. von methanogenen Bakterien, erniedrigt wird (2). Nur in syntropher Assoziation mit einem H_2 -verbrauchenden Bakterium vermag Syntrophobacter wolinii Propionsäure abzubauen (3) (Boone u. Bryant, 1980). Da für diesen "interspecies hydrogen transfer" ein enger räumlicher Kontakt zwischen beiden beteiligten Organismen erforderlich ist, kommt es bei Störungen der anaeroben Fermentation häufig zur Akkumulation von Propionsäure. Andererseits ist der Energiegewinn bei der Bildung von Methan aus Propionsäure nur gering, so daß die Generationszeiten sehr lang sind: Boone u. Bryant (1980) bestimmten für eine Propionsäure-abbauende Mischkultur aus drei

Organismen aus der Zunahme der optischen Dichte eine Verdoppelungszeit von 161 h.

Mit der Bildung von Essigsäure, Wasserstoff und CO₂ aus Alkoholen und längerkettigen Fettsäuren vereinigen sich wieder beide Abbauwege zu Methan. Das Verhältnis der methanogenen Substrate: Essigsäure und H₂/CO₂ kann allerdings noch durch die Tätigkeit der homoacetogenen Bakterien verändert werden. Diese, wie z.B. Butyribacterium methylotrophicum, Acetobacterium woodi und Clostridium aceticum bilden aus Wasserstoff und CO₂ Essigsäure (Zeikus et al., 1985):

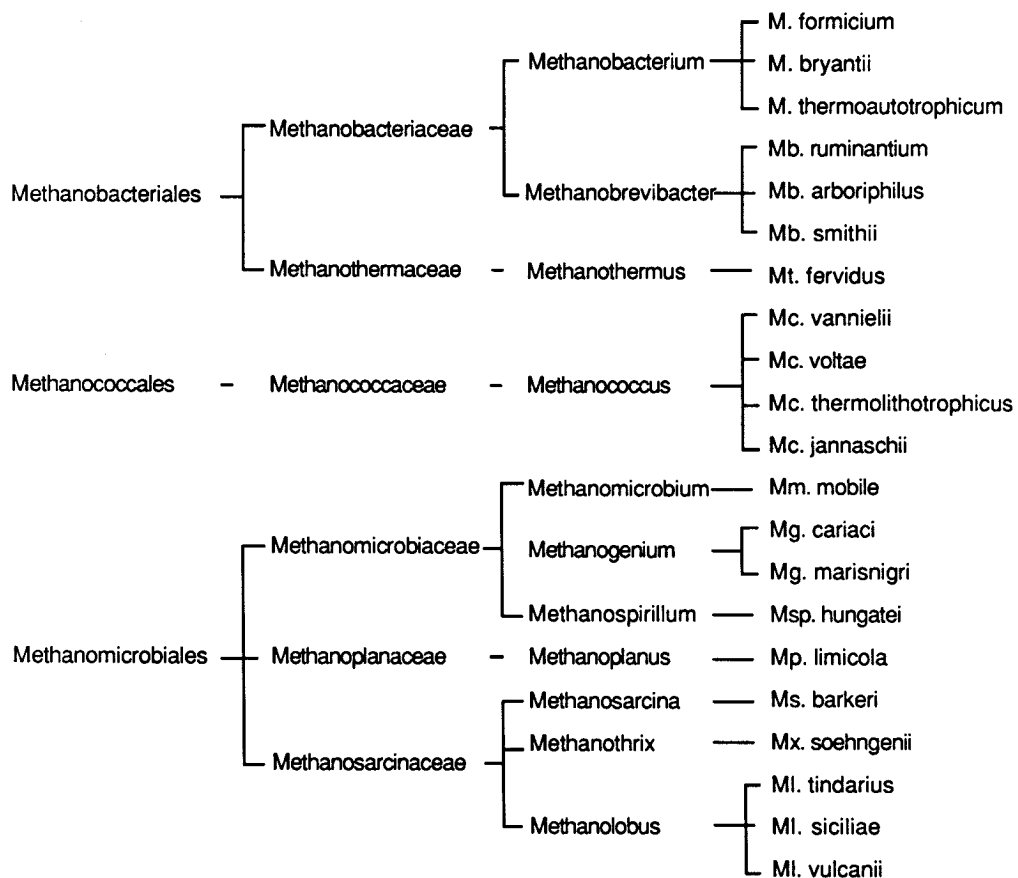


Sie sind eventuell für das "Sauerwerden" von Fermentern verantwortlich (Schoberth, 1978).

4. Methanbildung

Die gebildeten Produkte: Essigsäure und H₂/CO₂ sind die Substrate für die letzte Gruppe der anaeroben Nahrungskette, den Methanbakterien. Diese strikt anaerobe Gruppe benötigt ein Redoxpotential von -300 mV zum Wachstum (Paynter u. Hungate, 1968) und kommt in der Natur in marinen und Süßwassersedimenten, in überfluteten Reisfeldern, im Darm von Wiederkäuern und in Insekten vor (Klass, 1984). Zusammen mit den extrem halophilen Halobacteriales, den acidophilen Thermoplasmatales und den extrem thermophilen Sulfolobales und Thermoproteales bilden die Gruppe der Methanbakterien das Reich der Archaeobakterien (Daniels, 1984; Stetter, 1985). Unterschiede zu der alle übrigen Bakterien, Cyanobakterien und Mycoplasmen enthaltenden Gruppe der Eubakterien bestehen hinsichtlich der Zellwandstruktur, den Membranen, den Lipiden, der ribosomalen 16S-RNA-Sequenz und der RNA-Polymerase (Woese et al., 1977; Fox et al., 1980; Matheson et al., 1982; Schmid et al., 1982; Zillig, 1982).

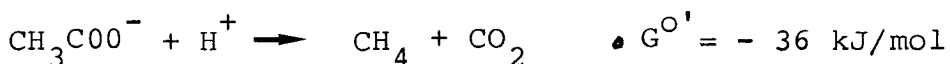
Untersuchungen zur Basensequenz der 16S-RNS der Ribosomen, einem konservativen Molekül im Verlaufe der Evolution, erlaubten eine systematische Einordnung der Methanbakterien in drei Ordnungen: Methanobacteriales, Methanococcales und Methanomicrobiales, die insgesamt 6 Familien mit 11 Gattungen umfassen (Stetter, 1985), (Tab. 2).



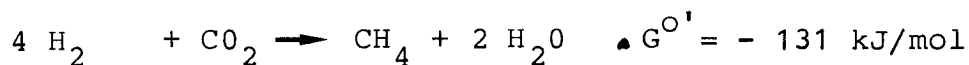
Tab. 2: Systematik der Methanbakterien (nach Stetter, 1985)

Dazu gehören Organismen mit unterschiedlicher Gram-Reaktion, unterschiedlichen Zellwandbestandteilen und verschiedenen Substratansprüchen (Balch et al., 1979; Kandler, 1982). Weitere Möglichkeiten der phylogenetischen Einordnung der Methanbakterien bieten die elektrophoretische Untersuchung des ribosomalen Proteinmusters (Douglas et al., 1980), der Guanin- + Cytosin-Gehalt (G+C) der DNA (Sowers et al., 1984) und die Untersuchung mit monoklonalen Antikörpern (Conway de Macario et al., 1982).

Das Substratspektrum der Methanbakterien umfaßt Essigsäure, H_2/CO_2 , Ameisensäure, Methanol, Methylamine und CO (Klass, 1984; Daniels et al., 1984). Essigsäure bildet in den meisten anaeroben Biotopen mit etwa 70 % das Hauptsubstrat der methanogenen Bakterien (Smith u. Mah, 1966; Patel, 1984). Diese Reaktion wird durchgeführt von Arten der Gattungen Methanosarcina und Methanothrix (Smith et al., 1980; Zehnder et al., 1980). (Methanococcus mazei erwies sich ebenfalls als zur Gattung Methanosarcina gehörend (Mah u. Kuhn, 1984)). Die Energieausbeute bei dieser Reaktion ist gering, da bei der Bildung von Methan aus Essigsäure nur maximal 1/2 mol ATP gebildet werden kann (Thauer, 1985):



Demgegenüber ist die Bildung von Methan aus Wasserstoff und CO_2 energetisch günstiger, da hierbei etwas mehr als 1 mol ATP gebildet werden könnte (Thauer, 1985):



Mit Ausnahme von Methanosarcina Stamm TM1 (Zinder u. Mah, 1979), Methanothrix soehngenii (Huser et al., 1982), Methanolobus tindarius (König u. Stetter, 1982) und Methanosphaera stadtmaniae (Miller und Wolin, 1985) können alle Methanbakterien auf Wasserstoff und CO_2 wachsen.

Im Pansen von Wiederkäuern werden die gebildeten Fettsäuren von der Darmwand resorbiert, weshalb hier die Bildung von Methan aus der Carbonat-Reduktion überwiegt (Hungate, 1967). Nur etwa 8 - 10 % des Substrates werden im Pansen über H_2 und CO_2 sowie Ameisensäure zu Methan abgebaut (Zehnder et al., 1981).

Einen Überblick über die Biochemie der Methanbildung geben Zeikus et al., (1985) und Thauer (1985) (Abb. 2).

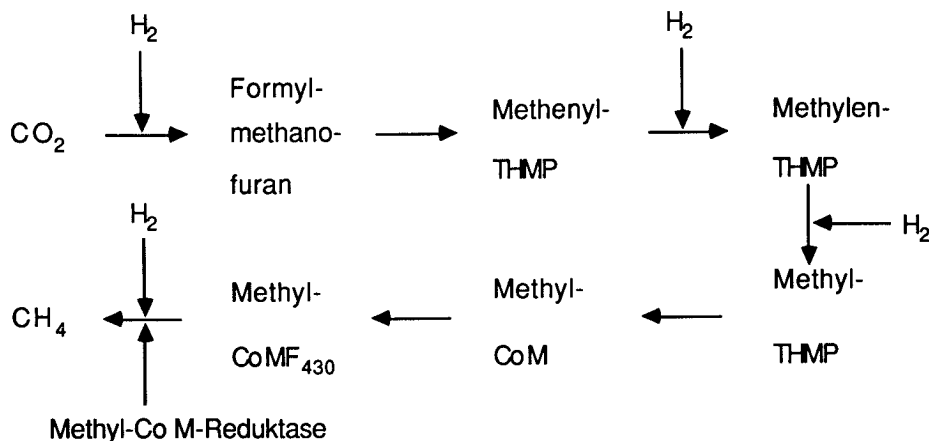


Abb. 2: Methanbildung aus H_2 und CO_2 (n. Thauer, 1985; Vogels et al., 1984)

Danach erfolgt die Bildung von Methan aus Wasserstoff und CO_2 nicht über freie Ameisensäure, freies Formaldehyd oder freies Methanol. Nach Barker (1956) sollten die C_1 -Einheiten der verschiedenen Reduktionsschritte an einen oder mehrere mit "X" bezeichnete Komponenten gebunden sein. Heute geht man davon aus, daß CO_2 über mindestens vier Schritte zu Methan reduziert wird: CO_2 wird zunächst mit Hilfe des CO_2 -Reduktionsfaktors (CDR-Faktor), einem Methanofuran, aktiviert (Leigh u. Wolfe, 1983). Nach der Reduktion wird die C_1 -Einheit übertragen auf Methenyltetrahydromethanopterin (Methenyl-THMP), weiter auf Methylenetetrahydromethanopterin (Methylen-THMP) und Methyltetrahydromethanopterin (Methyl-THMP) (Vogels et al., 1984). Von Methyl-THMP wird die Methyl-Gruppe auf Coenzym M übertragen, einem in allen Methan-

bakterien nachgewiesenen Cofaktor (β -Mercaptoethansulfonsäure) (Balch u. Wolfe, 1979). Die anschließende Reduktion von Methyl-Coenzym-M zu Methan wird katalysiert von einem Methyl-Coenzym M-Reduktase-System, das aufgrund seiner zentralen Stellung im Stoffwechsel von methanogenen Bakterien mit der Cytochrom c-Oxidase aerober Organismen zu vergleichen ist (Thauer, 1985). Dieses Methyl-Coenzym M-Reduktase-System besitzt als prosthetische Gruppe einen Nickel enthaltenden Faktor F_{430} und kann bei Methanobacterium thermoautotrophicum bis zu 12 % der löslichen Proteine ausmachen (Ellefson u. Wolfe, 1981). Bereits 1977 fanden Gunsalus und Wolfe eine drastische Erhöhung der CO_2 -Reduktion zu Methan nach Zugabe von $CH_3-S-CoM$ zu zellfreien Extrakten von Methanobacterium thermoautotrophicum. Die Reduktion von $CH_3-S-CoM$ zu Methan ist die eigentliche energieliefernde Reaktion (Daniels et al., 1984). Die Reduktionsäquivalente für die Reduktion von CO_2 zu Methan werden von zwei Hydrogenasen geliefert, von denen eine Coenzym F_{420} , ein 5-Deazaflavin, als Elektronenakzeptor besitzt (Thauer, 1985). Dieses Coenzym F_{420} überträgt Elektronen nicht nur von Wasserstoff, sondern auch von Ameisensäure, Kohlenmonoxid und wahrscheinlich Methanol und Essigsäure auf NADP (Daniels et al., 1984). Es findet sich in allen Methanbakterien sowie in niedrigerer Konzentration in Streptomyces-Arten (Eker et al., 1980). Aufgrund seiner Fluoreszenz dient es zur Unterscheidung von methanogenen und nicht-methanogenen Bakterien (Cheeseman et al., 1972).

Obwohl viele Methanbakterien autotroph leben können, fixieren sie CO_2 nicht über den Calvin-Zyklus, sondern über den anaeroben Acetyl-CoA-Weg über Acetyl-CoA und Pyruvat (Stupperich u. Fuchs, 1984; Fuchs u. Stupperich, 1984). Dabei wird Acetyl-CoA aus zwei CO_2 synthetisiert: während ein Molekül CO_2 wahrscheinlich zu Methyl-Corrinoid reduziert wird, wird ein zweites Molekül CO_2 mit Hilfe einer Kohlenmonoxid-

mensetzung des Mediums und dem Vorhandensein von Reduktionsmitteln beeinflußt.

Die optimalen Temperatur- und Wachstumsbedingungen der Methanbakterien sind unterschiedlich und artspezifisch (Balch et al., 1979). Der optimale pH-Bereich liegt im neutralen, jedoch konnte man eine Methanbildung auch bei pH 5,5 und pH 9,7 beobachten (Oremland et al., 1982; Daniels et al., 1984). Die Generationszeiten variieren zwischen zwei Wochen bei Methanothrix soehngenii (Huser et al., 1982) und 30 Minuten bei Methanococcus jannaschii (Jones et al., 1983).

1.2 Ökologie des anaeroben Abbaues

Eine oben beschriebene Trennung des anaeroben Abbaues in vier oder sechs Stufen ist in der Praxis nicht oder nur unvollständig möglich (Winter, 1984). Dies gilt um so mehr, wenn man die am anaeroben Abbau beteiligten Organismen nicht als Teile voneinander unabhängiger Nahrungsketten, sondern als Biozönose eines komplexen Nahrungsnetzes versteht. Der Begriff der Biozönose eines Ökosystems besagt, daß zwischen Umwelt und Organismen ein kompliziertes System von Wechselbeziehungen besteht und daß beide eine mehr oder weniger geschlossene Funktionseinheit darstellen.

Zwischen den Organismen, die am anaeroben Abbau beteiligt sind, gibt es Wechselbeziehungen unterschiedlichster Art: unter diesen Wechselbeziehungen ist der Wettbewerb um ein Substrat oder bestimmte andere Faktoren sicherlich die wichtigste Beziehung (Kuenen u. Harder, 1982). So treten beim anaeroben Abbau sulfatreicher Abwässer sulfatreduzierende Bakterien in Konkurrenz zu methanbildenden Bakterien um die Substrate Essigsäure und H_2/CO_2 (Archer, 1984). Bei genügend hoher Wasserstoff-Konzentration können methanogene und sulfatreduzierende Bakterien koexistieren (Kristjansson et al., 1982). Bei limitierter Wasserstoff-Konzentration verdrängen dagegen die Sulfatreduzierer die Methanbakterien

aufgrund ihrer höheren H_2 -Affinität und der höheren Umsatzrate für Wasserstoff (Robinson u. Tiedje, 1984). Die Hemmung oder Inhibition des Wachstums methanogener Bakterien durch homoacetogene Bakterien, die durch ihre Tätigkeit den pH-Wert erniedrigen, ist ein Beispiel für einen nicht-spezifischen Amensalismus (Archer, 1984). Ein weiteres Beispiel für diese Wechselbeziehung stellt die Bildung von H_2S durch sulfatreduzierende Bakterien dar, die durch ihr Produkt methanogene Bakterien hemmen (Cappenberg, 1974).

1.3 Reaktorsysteme zur anaeroben Abwasserreinigung

Die anaerobe Reinigung industrieller Abwässer hat in den vergangenen zwei Jahrzehnten aufgrund ihrer Vorteile gegenüber aeroben Verfahren ständig an Bedeutung gewonnen (Sahm, 1984):

- nur 3 - 5 % des organischen Kohlenstoffs im Abwasser finden sich anschließend im Überschußschlamm
- als energiereiches Produkt wird Methan gebildet
- die Kosten für eine Belüftung entfallen

Noch bis zur Jahrhundertwende beschränkten sich der Einsatz der anaeroben Verfahren auf die Verwendung offener Teiche bzw. Tanks. Aber bereits 1859 wurde das in einer Gärgrube einer Lepra-Kolonie in Bombay gebildete Biogas zur Energieerzeugung eingesetzt (Fry, 1973). Die erste anaerobe Anlage zur Klärschlammstabilisierung wurde ab 1890 in Exeter (England) gebaut (Liebmann, 1956). Auch in den folgenden Jahrzehnten diente die anaerobe Stufe hauptsächlich der Stabilisierung des in der aeroben Stufe anfallenden Klärschlammes. Die "übliche Faulzeit" in diesen mesophilen Anlagen lag bei 28 Tagen.

Erst nachdem Verfahren zur Biomasse-Rückhaltung und -Rückführung entwickelt worden waren, wurden verstärkt anaerobe Verfahren auch zur Abwasserreinigung eingesetzt. Im folgenden werden die verschiedenen anaeroben Reaktorsysteme dargestellt.

Abb. 3 gibt einen Überblick über die wichtigsten Systeme der anaeroben Abwasserreinigung. Eine exakte Zuordnung der verschiedenen Reaktortypen ist nicht immer möglich: einerseits findet man in der Literatur keine einheitlichen Bezeichnungen (so wird der Rohr-Reaktor sowohl als eigenständige Entwicklung angesehen (Braun, 1982), als auch als Sonderfall des Rührkessel-Fermenters (Stadlbauer, 1982)). Andererseits sind die Übergänge fließend, wie zwischen dem Wirbelschicht- und dem Schwebebett-Reaktor.

Den klassischen und zugleich häufigsten Reaktortyp stellt der bei der Klärschlammstabilisierung eingesetzte Rührkessel-Fermenter dar. Da es sich hierbei im Idealfall um einen vollständig durchmischten Reaktor handelt, ist die kürzest mögliche hydraulische Verweilzeit von der Generationszeit der limitierenden Organismengruppen abhängig. Hieraus ergeben sich Verweilzeiten von 10 - 25 Tagen und eine CSB-Abbaurrate von 0,8 bis 1,7 kg CSB/m³.d (Nyns et al., 1980). Ähnlich lange hydraulische Verweilzeiten erfordern die Plug-Flow-Reaktoren. Hierbei wird das Substrat als Pfropfen durch einen liegenden Rohr-Reaktor transportiert. Eine der ersten Anlagen wurde 1950 von Reinhold und Noak entwickelt und zur Vergärung von Abfällen aus der Massentierhaltung eingesetzt (Braun, 1982).

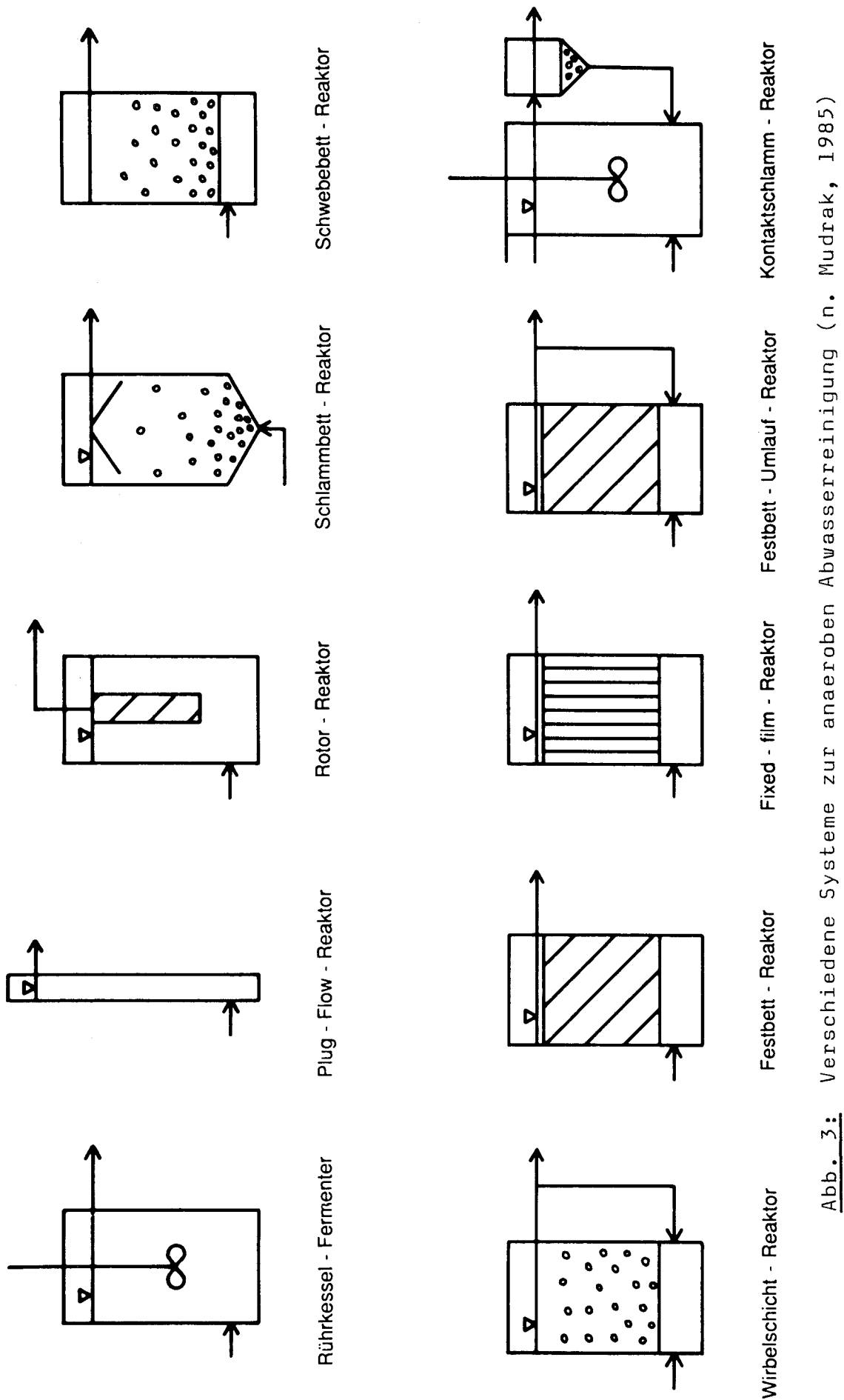


Abb. 3: Verschiedene Systeme zur anaeroben Abwasserreinigung (n. Mudrak, 1985)

Ein technisch aufwendiges Verfahren stellt der Membran- oder Rotor-Fermenter dar. Dabei wird die Biomasse bereits im Fermenter durch Filtration zurückgehalten. Probleme bereitet noch die Wahl der richtigen Filtermembran, die einerseits nicht verstopfen, andererseits die Biomasse möglichst effektiv zurückhalten soll (Bastin, 1983).

Eine ebenfalls interne Rückhaltung der Biomasse erfolgt im Schlammbett-Reaktor, bei dem sich aufgrund fehlender Rührung ein Feststoff-Gradient ausbildet. Unter teilweise noch ungeklärten Bedingungen kommt es zur Bildung von Pellets, die sich günstig auf das Sedimentationsverhalten des Schlammes auswirken. Mit dem UASB-Reaktor (upflow anaerobic sludge blanket), der noch über interne Abscheider verfügt, lassen sich bei hohen CSB-Raumbelastungen von 4 - 60 kg CSB/m³.d Verweilzeiten von 1 bis 24 h erzielen (Lettinga et al., 1980; Brune, 1982). Die Pelletbildung wird u.a. beeinflusst von den Start-Bedingungen, dem pelletisierten Impfschlamm, der Abwasserzusammensetzung und dem Gehalt an Ca²⁺- und NH₄⁺-Ionen (Hulshoff Pol et al., 1983). Auch scheint die Zugabe von künstlichem Trägermaterial die Pelletbildung zu verbessern (Binot et al., 1981).

Der Schwebebett- oder Expanded bed-Reaktor stellt ebenfalls einen Schlammbett-Reaktor mit künstlichem Aufwuchs-Trägermaterial dar. Während sich das Schlammbett beim Expanded-Bed-Reaktor mit zunehmender Aktivität um das etwa 1,5-fache ausdehnt, wird beim Wirbelschicht- oder Fluidized-Bed-Reaktor der Träger (z.B. Sandkörner) durch die hohe Umwälzströmung in der Schwebelage gehalten und teilweise ausgeschwemmt (Fließbett-Reaktor). Im letzten Fall ist der Einbau eines Sedimenters zur externen Biomasse-Rückführung notwendig. Die inerten Trägerpartikel dienen den Mikroorganismen als zusätzliche Aufwuchsfläche (Switzenbaum, 1983). Ebenfalls künstliche Aufwuchsflächen werden beim Festbett- oder Fixed-Bed-Reaktor verwendet. Dabei wird das Reaktolvolumen ganz oder teilweise mit einem stationären porösen

Trägermaterial gefüllt (Young & McCarty, 1969). Handelt es sich hierbei um Keramik- oder Glasröhrchen, so spricht man vom Röhren- oder Fixed-Film-Reaktor (van den Berg et al., 1979). Die Mikroorganismen bewachsen als Biofilm die Oberfläche des Trägers und liegen in den Hohlräumen des Trägers als suspendierte Aggregationen vor. Das Abwasser durchströmt die anaeroben Filter in Aufwärts- oder Abwärtsströmung und führt die durch Scherkräfte abgelöste Biomasse mit fort. Eine hohe Lineargeschwindigkeit von 10 - 30 m/h und damit eine Verringerung der Verstopfungsgefahr des Filters durch Feststoffakkumulation läßt sich mit dem Festbett-Umlauf-Reaktor erzielen (Aivasidis u. Wandrey, 1983). Bei erhöhter Umlaufrate nimmt der Festbett-Umlauf-Reaktor jedoch zunehmend Rührkesselcharakteristik an und das Trägermaterial hat nur noch Filterfunktion (Braun, 1982).

Zu den ältesten Verfahren der Biomasse-Erhöhung im Reaktor gehört der Kontakt-Prozeß (Jung, 1949). Hierbei wird die Biomasse extern vom Ablaufstrom getrennt und in den Rührkessel-Fermenter zurückgeführt. Die Abtrennung erfolgt beim klassischen Kontakt-Prozeß durch Flockulation (Schlegel, 1981), kann aber auch durch Zentrifugation, Flotation oder durch Lamellenabscheider erfolgen (Aivasidis et al., 1985).

Allen hier beschriebenen Reaktorsystemen, mit Ausnahme der Rührkessel- und der Plug-Flow-Reaktoren, ist gemeinsam, daß die Verweilzeit der Mikroorganismen im Reaktor, d.h. die Schlammrückhaltezeit, von der hydraulischen Verweilzeit abgekoppelt wird. Hierdurch lassen sich eine im Vergleich zum Rührkessel-Fermenter höhere Biomasse-Konzentration im Reaktor und höhere Abbauraten erzielen (Kolot, 1981). Die Mechanismen der Anheftung von Mikroorganismen auf einem Träger, wie Oberflächenbeschaffenheit, Porosität, Adsorption und Adhäsion sind zwar im einzelnen bekannt, nicht jedoch, in welchem Maße sie für die Immobilisierung verantwortlich sind (Murray, et al., 1981; Heijnen, 1983).

Durch eine Immobilisierung der Mikroorganismen wird eine höhere Stabilität des Systems erreicht: so scheint die Wiederbesiedlung eines Reaktors nach starken Milieuschwankungen von den immobilisierten, als mikrobiologische Reservoirs dienenden "Microenvironments", auszugehen (Fletcher, 1979).

Durch Verwendung spezieller Trägersubstanzen ist es heute möglich, mit anaeroben Verfahren Abwässer mit einer Belastung von fast 50 kg/m^3 CSB unverdünnt abzubauen (Aivasis u. Wandrey, 1985). Entscheidend für die Effektivität des anaeroben Abbaues ist jedoch neben dem Reaktorsystem und der organischen Belastung auch die Zusammensetzung des Abwassers (Sixt, 1981). Ein Problem stellt oft das unausgewogene C-N-P-Verhältnis industrieller Abwässer dar (Frostell, 1981). Verschärft wird dieses Problem noch dadurch, daß industrielle Abwasserströme häufig in Zusammensetzung und Menge schwanken und dadurch der Aufbau einer stabilen Biozönose behindert wird (Mudrak u. Kunst, 1985). Skogman (1979) gibt Grenzen für die Temperatur und den pH-Wert sowie maximale Konzentrationen wichtiger Ionen für den anaeroben Abbau an:

pH	6,5 - 8,0
Temperatur	25 - 37°C; 55 - 65°C
K ⁺	2500 - 4500 mg/l
Na ⁺	3500 - 5500 mg/l
Ca ²⁺	2500 - 4500 mg/l
Mg ²⁺	1000 - 1500 mg/l
HS ⁻	100 - 200 mg/l
NH ₄ ⁺	1500 - 3000 mg/l

Störungen des anaeroben Abbaues können sich durch schwer abbaubare, z.T. in höherer Konzentration toxisch wirkende Substanzen wie chlorierte Kohlenwasserstoffe oder Lösungsmittel ergeben (Mudrak u. Kunst, 1985). Dies wirkt sich häufig

in einer Akkumulation von organischen Säuren und einer pH-Wert-Erniedrigung aus (Braun, 1982). In den letzten Jahren wird versucht, mit speziellen Starterkulturen auch schwer abbaubare Verbindungen, wie Furfurol, zu methanisieren (Schoberth et al., 1985).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Abwasser auf seine anaerobe Abbaubarkeit hin untersucht, das bei der Produktion von Citronensäure mit *Aspergillus niger* auf Melassebasis anfällt. Die Melasse enthält neben etwa 2000 verschiedenen organischen Verbindungen, die bisher charakterisiert wurden, noch ca. 50 % Zucker in der Trockensubstanz (Schulz, 1985). Sie wird außerdem als Substrat für verschiedene Gärungen (Milchsäure, Buttersäure, Propionsäure) und unvollständige Oxidationen (Essigsäure, Gluconsäure, Oxalsäure) sowie zur Gewinnung von Betain und Pottasche verwendet (Schneider, 1968).

Als Rohstoff für die technische Fermentation der Citronensäure werden u.a. Rüben- und Rohrzucker-Melassen eingesetzt, die noch mit Nährsalzen und Zusätzen versehen und hitzesterilisiert werden. Die Fermentation erfolgt sowohl nach dem Oberflächen- als auch nach dem Submers-Verfahren (Abb. 4). Die produzierte Citronensäure wird als Calciumcitrat gefällt, umkristallisiert und mit Schwefelsäure gefällt. Pro Tonne Citronensäure entstehen etwa 18 - 25 Tonnen Abfallstoffe, die neben Feststoffen (Gips, Pilzmycel) u.a. die Ablauge und Waschwässer enthalten. Das Pilzmycel kann als Futtermittelzusatz und der gereinigte Gips als Baurohstoff genutzt werden. Der Nutzung der Ablauge als Futtermittelzusatz stehen die hohen Kosten für die erforderliche Eindampfung entgegen (Schulz u. Rauch, 1975). Deshalb bleibt hier nur eine aerobe oder anaerobe Behandlung der Ablauge übrig. Neben den erwähnten Nachteilen der aeroben Abwasserreinigung steht der aeroben Reinigung u.a. der hohe CSB-Gehalt von 30 - 50 g/l entgegen.

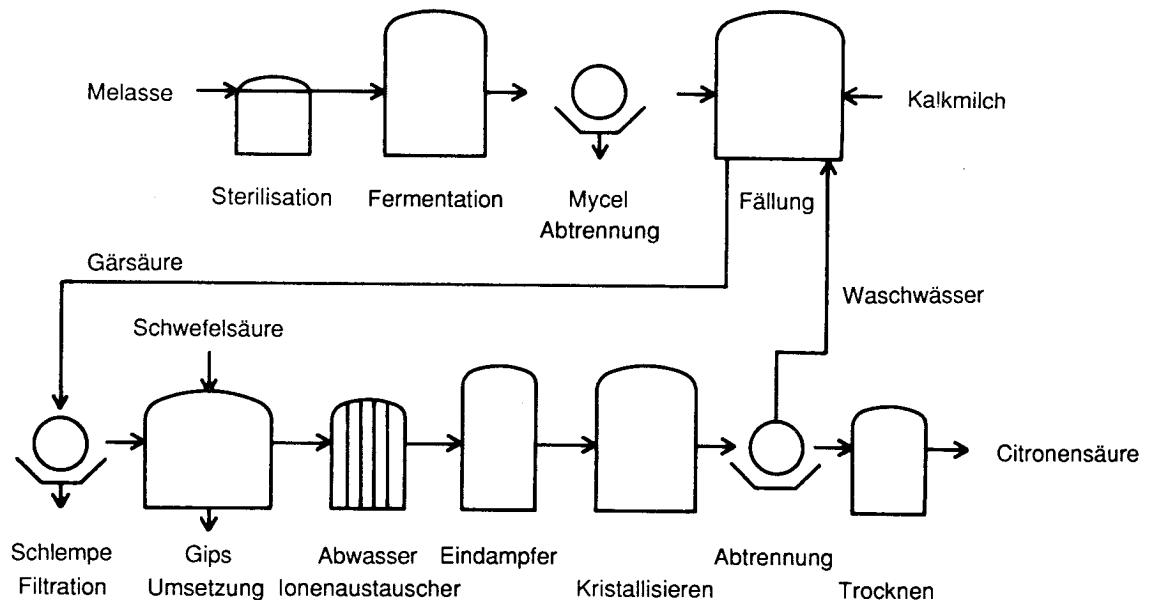


Abb. 4: Schema der techn. Fermentation von Citronensäure

In der vorliegenden Arbeit sollte der anaerobe Abbau eines Abwassers aus der Citronensäure-Produktion untersucht und verbessert werden. Dazu sollten die Hauptinhaltsstoffe des Abwassers analysiert und ihr anaerober Abbau sowie mögliche Zwischenprodukte untersucht werden. Weiterhin sollte der Einfluß einzelner Abwasserinhaltsstoffe, wie Sulfat und Calciumcarbonat, auf den anaeroben Abbau untersucht und hemmend wirkende Konzentrationen bestimmt werden. Durch Einsatz verschiedener Reaktorsysteme und unterschiedlicher Trägersubstanzen sollte die optimale Prozeßführung ermittelt und der anaerobe Abbau verbessert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Abwasser

Das in dieser Arbeit untersuchte Abwasser stammte von der Fa. J.A. Benckiser, Ladenburg. Es fällt an bei der Fermentation von Citronensäure mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* aus Melasse und setzt sich zusammen aus der bei der Ca-Citrat-Fällung anfallenden Ablauge und Waschwässern. Für diese Untersuchungen wurden beide Abwasserströme zu gleichen Teilen gemischt.

Während des Untersuchungszeitraumes traten erhebliche Schwankungen hinsichtlich der Zusammensetzung und der Gesamtbelastung des Abwassers auf. Diese Schwankungen beruhten auf unterschiedlichen Melasse-Qualitäten, die für die Citronensäure-Fermentation eingesetzt wurden, wechselnden Prozeßbedingungen, bei denen unterschiedliche Mengen an Nährsalzen und Komplexbildnern (wie Kaliumhexacyanoferrat) zugesetzt wurden und unterschiedlich langen Lagerzeiten der Abwasserproben.

Tabelle 3 gibt die Schwankungsbreite der Zusammensetzung des Abwassers aus der Citronensäure-Fermentation (= Dünnlauge, d.h. Mischung zu gleichen Teilen aus Ablauge und Waschwasser) wieder:

CSB (mg O ₂ /l)	:	20.000 - 50.000
BSB ₅ (mg O ₂ /l)	:	10.000 - 25.000
pH-Wert	:	4,5 - 5,5
Ethanol (mMol/l)	:	6,8 - 31,5
Essigsäure (mMol/l)	:	9,1 - 38,0
Propionsäure (mMol/l)	:	0,3 - 18,9
Buttersäure (mMol/l)	:	0,6 - 26,8
Valeriansäure (mMol/l)	:	0,0 - 2,1
Citronensäure (mMol/l)	:	2,6 - 5,0
Milchsäure (mMol/l)	:	9,7 - 39,8
Glucose (mMol/l)	:	0,6 - 7,1
Fructose (mMol/l)	:	0,8 - 3,2
Arabinose, Galactose,		
Xylose (mMol/l)	:	2,1 - 2,5
Sulfat (mMol/l)	:	9,7 - 26,8

Tab. 3: Zusammensetzung des Abwassers aus der Citronensäure-Produktion

2.2 Versuchs-Aufbau und -Durchführung

Anaerobes Arbeiten

Alle Experimente wurden anaerob, d.h. unter Begasung mit O₂-freien Gasen, durchgeführt. Grundlagen bildeten die von Hungate (1969), Wolfe (1971) und Latham u. Wolin (1977) beschriebenen Techniken zur Isolierung und Kultivierung strikt anaerober Mikroorganismen. Die Begasung erfolgte mit Argon, N₂/CO₂ (80 %/20 %), oder H₂/CO₂ (80 %/20 %), die zuvor durch eine erhitzte (225°C) Säule mit einem Kupfer-Katalysator (Actimet 13, Doduco-Chemie, Sinsheim/Elsenz) geleitet wurden. Zusätzlich wurden bei Untersuchungen von Reinkulturen Reduktionsmittel (Titan(III)-citrat, Cystein, Natriumsulfid) in den jeweils angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Bei Versuchen mit Anreicherungskulturen wurde unter Beibehaltung der anaeroben Technik aufgrund der immer vorhandenen fakultativ anaeroben Bakterien auf spezielle Reduktionsmittel verzichtet.

2.2.1 Batch-Kulturen

Für sämtliche Untersuchungen der Anreicherungskultur wurden Proben aus einem anaeroben Rührkessel-Fermenter (10,75 l) entnommen, der das unverdünnte Abwasser mit einer hydraulischen Verweilzeit von 13 Tagen abbaute. Jeweils 500 - 1000 ml des Fermenterinhaltess wurden unter Argon-Begasung in eine 1 l-Flasche abgefüllt. Hieraus wurde anschließend unter N_2/CO_2 -Begasung (80 %/20 %) und Rühren die entsprechende Menge der Anreicherungskultur in zuvor anaerobisierte Versuchsgefäße gefüllt.

Für die Experimente wurden verschiedene Kulturgefäße benutzt: 25 ml-Röhrchen (Bellco-Glass Nr. 2, USA), 117 ml- und 500 ml-Serumflaschen sowie 1 l- und 2 l- Glaskolben (Glasbläserei, KFA Jülich). Alle Gefäße wurden vor dem Beimpfen mit N_2/CO_2 (80 %/20 %) anaerobisiert und die entsprechende Menge der Kulturflüssigkeit bzw. der Anreicherungskultur mit einer Vollpipette unter ständigem Begasen zugegeben. Nach dem Befüllen wurden Butylgummi-Stopfen (Bellco-Glass, USA) leicht aufgesetzt und das Begasen noch für einige Minuten fortgesetzt. Korrekturen des pH-Wertes wurden vor dem endgültigen Verschließen der Gefäße mit anaerobisierter Salzsäure (1 N, 2 N) oder Natronlauge (2 N, 5 N) vorgenommen. Zur Herstellung fester Nährböden wurden dem Abwasser 2 % Agar zugesetzt. Jeweils 10 ml wurden in 117 ml-Serumflaschen gefüllt und diese nach dem Autoklavieren (20 min. bei 120°C) liegend abgekühlt. Anschließend wurden 0,1 ml der Anreicherungskultur auf der Agaroberfläche unter Begasung mit N_2/CO_2 (80 %/20 %) bzw. H_2/CO_2 (80 %/20 %) ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C konnten nach etwa drei Wochen erste Kolonien beobachtet werden.

2.2.2 Kontinuierliche Kulturen

Rührkessel-Fermenter

Der kontinuierliche anaerobe Abbau des Abwassers aus der Citronensäure-Produktion wurde in zwei 12 l-Fermentern (Biostat S) der Fa. B. Braun-Melsungen untersucht. In der Standardausführung waren die Fermenter mit einem Rührwerk (3 Blattrührer mit je 6 Blättern), einem internen Heizkreislauf sowie einer Meß- und Regeleinheit ausgerüstet (Abb. 5).

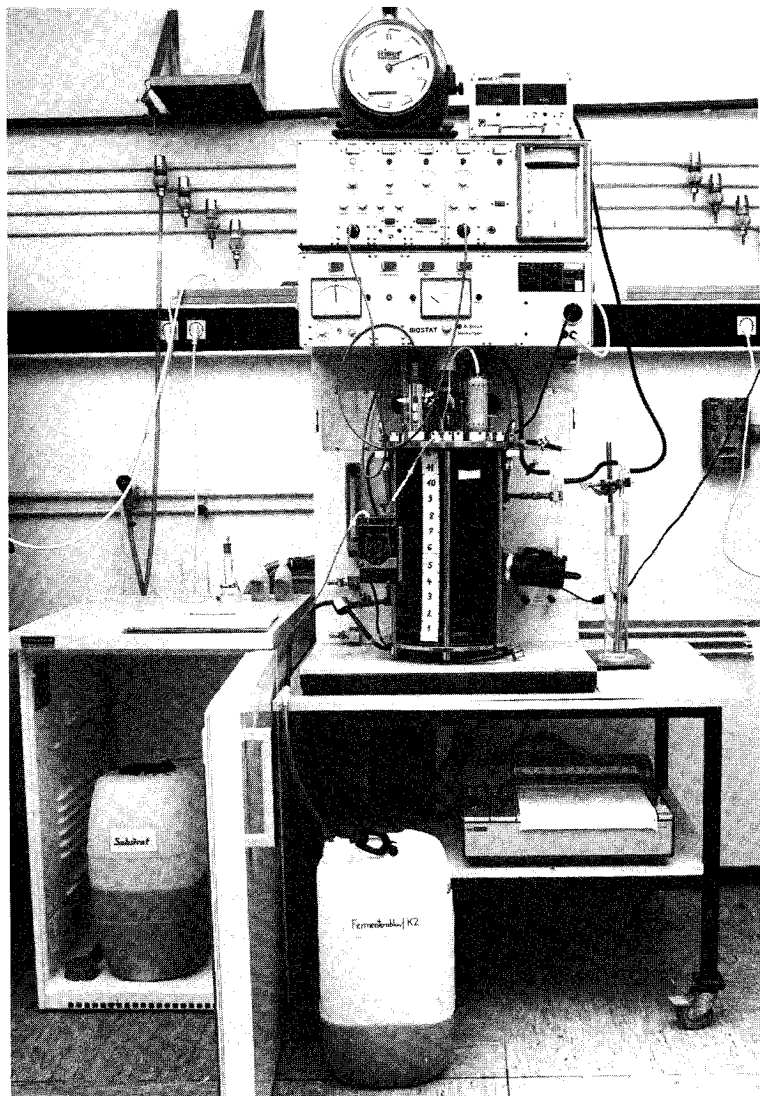


Abb. 5: Gesamtansicht des Rührkessel-Fermenters

Zu Beginn wurden die beiden Fermenter mit einer Anreicherungskultur (15 g/l TS) aus einer Pilotanlage der Firma J.A. Benckiser, Ladenburg, angeimpft. In dieser Pilotanlage (8 m^3) wurde das Abwasser aus der Citronensäure-Fermentation bei einer hydraulischen Verweilzeit von 5 - 10 Tagen und einer Raumbelastung von $3 - 6 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{d}$ CSB abgebaut. Die Temperatur wurde durch einen externen Heizkreislauf auf 37°C gehalten, der pH-Wert stellte sich selbsttätig auf pH 7,5 - 8,2 ein.

In den Laborfermentern mit einem Gesamtvolumen von 12 l wurde das Arbeitsvolumen mittels eines Überlaufrohres auf 10,75 l eingestellt. Das Abwasser wurde in 20 l-Kanistern in einem Kühlschrank aufbewahrt und von dort in die Rührkessel-Fermenter gepumpt. Die Abwasserzufuhr erfolgte zunächst über eine taktgesteuerte Schlauchpumpe (Typ SP-G, Jungkeit), später über eine langsam laufende Schlauchpumpe mit variabler Geschwindigkeit (Typ VRE, Verder). Über ein Überlaufrohr mit nachgeschaltetem Siphon wurde das Arbeitsvolumen im Fermenter konstant gehalten. Die Rührerdrehzahl wurde auf 50 - 100 rpm eingestellt, die Temperatur auf $37^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$. Eine Registrierung des Redox- und pH-Wertes erfolgte über entsprechende Elektroden (Ingold) und den standardmäßig eingebauten pH- und Redox-Meßgeräten. In der Start-Phase wurde der pH-Wert mit 2 N Natronlauge auf 7,2 eingestellt. Nach Erreichung eines stationären Zustandes war keine weitere Regelung notwendig, da sich selbsttätig ein pH-Wert von 7,2 - 7,4 und ein Redox-Potential von ca. -300 mV einstellte.

Das gebildete Biogas wurde in einem Experimentiergasmesser (nasse Bauart, 0,5 bzw. 1,0 l, Ritter, Bochum) gemessen. Zur Bestimmung des Methangehaltes wurden anfangs über ein T-Stück Gasproben entnommen und in einem Gaschromatographen analysiert. Nachdem eine ausreichend hohe Gasproduktionsrate erreicht worden war, wurde in die Gasleitung

ein Infrarotanalysator (Binos, Leybold-Heraeus) installiert. Um bei einer Verstopfung des Fermenterablaufes eine Beschädigung des Infrarotanalysators zu verhindern, wurde in die Gasleitung zusätzlich ein Siphon eingebaut. Der Zulauf des unverdünnten Abwassers in die Rührkessel-Fermenter erfolgte, wie jeweils angegeben, entweder vom Boden des Fermenters (upflow) oder über eine Thermofalle (B. Braun, Melsungen) von oben (downflow). Da die Schlauchpumpen eine Schwachstelle in der Substratzufuhrleitung (Leck-Gefahr) darstellten, wurden die Substratpumpen im ersten Fall in Höhe des Fermenterniveaus befestigt.

Festbett-Reaktor

Ein Festbett-Reaktor (Abb. 6) wurde aus einem Plexiglasrohr (50 cm Höhe; 6 cm Durchmesser) mit einem Gesamtvolumen von 1,19 l und einem Arbeitsvolumen von 1,05 l gefertigt (Werkstatt des IBT). Die Substratzufuhr erfolgte am Boden der Säule über einen trichterförmig gestalteten und mit einem Sieb versehenen Sockel. Hierdurch wurde eine gute Verteilung des Zulaufs am Boden der Säule erreicht. Zur Vermeidung von Kanalbildungen an der Innenwand wurden in 12 cm Abstand ringförmige Verengungen eingebaut. Neben den Öffnungen für Zu- und Ablauf wurden in regelmäßigem Abstand 6 Probeentnahmestellen in der Säulenwand angebracht. Die Säule wurde oben mit einem Schraubdeckel (PVC) versehen, der drei Öffnungen für Meßsonden und die Gasableitung enthielt. Die Meßsonden wurden mit offenen Schraubdeckeln und entsprechenden Dichtungen gasdicht befestigt. Die Temperierung auf $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ erfolgte über einen die Säule umgebenden Schlauchmantel und einen externen Umwälzthermostaten (B. Braun, Melsungen). Als Trägermaterial für die Festbett-Reaktoren wurde ein poröses Sinterglas der Fa. Schott (Mainz) in Form von Raschig-Ringen (2 x 7 mm) verwendet. Dieses nach einem speziellen Sinterprozeß hergestellte Trägermaterial besitzt eine Porosität von 60 % und einen Porendurchmesser

von 60 - 100 μm (Aivasidis u. Wandrey, 1985). Die Festbett-Reaktoren wurden mit diesem Sinterglas-Träger bis etwa 2 cm unterhalb des Ablaufes gefüllt. Das freie Volumen der Säulen betrug nach der Füllung mit dem Träger 765 ml oder 73 % des Arbeitsvolumens.

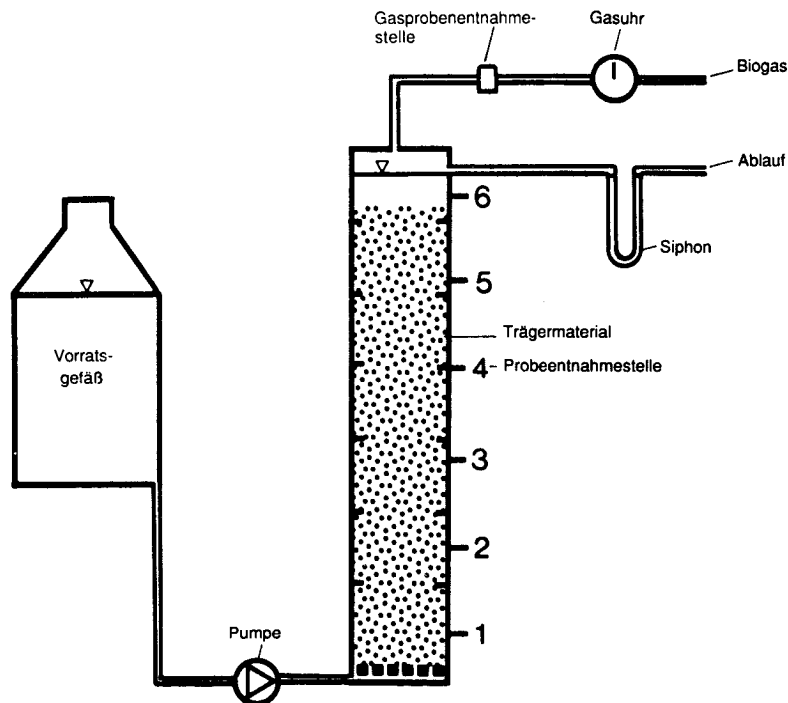


Abb. 6: Schema des Festbett-Reaktors mit porösem Sinterglas als Trägermaterial

Die Festbett-Reaktoren wurden für 20 Min. mit Argon begast und mit 765 ml einer Anreicherungskultur (Trockengewicht: 0,92 g/l) angeimpft. Das unverdünnte Abwasser wurde mit einer kontinuierlich laufenden Schlauchpumpe (Abimed) dem Reaktor zugeführt. Über eine Niveauregelung (Eigenbau KFA) wurde das Arbeitsvolumen auf 1,05 l ($\pm$ 10 ml) konstant gehalten und der Ablauf über eine weitere Schlauchpumpe (Abimed) abgepumpt.

Das gebildete Biogas wurde zunächst über einen Siphon geleitet und die Gasmenge mit einem Experimentiergasmesser (Ritter, Bochum, 0,5 l, nasse Bauart) bestimmt. Aus einem mit einem Septum versehenen T-Stück der Gasleitung wurden anfangs Gasproben mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton, 50 µl) entnommen und der Methangehalt gaschromatographisch bestimmt. Bei höherer Gasbildung wurde der Methangehalt kontinuierlich über ein in die Gasleitung geschaltetes Infrarot-Analysengerät (Binos, Leybold-Heraeus) bestimmt.

Festbett-Umlauf-Reaktor

Ein großer Nachteil des Festbett-Reaktors ist die Verstopfungsgefahr bei Akkumulation von Feststoffen innerhalb des Trägermaterials (van den Berg, 1984). Dieser Nachteil wird weitgehend vermindert beim Festbett-Umlauf-Reaktor (Aivasidis u. Wandrey, 1983). Hierbei treten aufgrund des Umlaufstromes höhere Scherkräfte im Festbett auf.

Der Aufbau des hier benutzten Festbett-Umlauf-Reaktors glich dem oben beschriebenen Festbett-Reaktor mit porösem Sinterglas als Trägermaterial. Zusätzlich wurde dem Substratzulaufstrom ein externer Rezirkulationsstrom überlagert. Hierdurch wurde im Reaktor eine Lineargeschwindigkeit von 1,4 - 3,1 m/h erreicht, die allerdings noch nicht zu einer Fluidisierung des Trägers führte (Aivasidis u. Wandrey, 1984).

Schwebebett-Reaktor (Expanded-bed)

Bei diesem Reaktortyp wird als Trägermaterial nicht ein Hohlkörper eingesetzt, der das Reaktorvolumen weitgehend ausfüllt, sondern ein relativ feinkörniges und leichtes Trägermaterial. Je nach Aufwärtsgeschwindigkeit der Strömung expandiert das Trägerbett im Reaktor und wird dann als Wirbelbett bezeichnet. Bei dem hier benutzten Schwebebett-Reaktor bewegen sich dagegen die einzelnen Träger-

körperchen nicht und ähneln so einem Schlammbett im Reaktor (Mudrak u. Kunst, 1985). Der Schwebebett-Reaktor wurde ebenfalls aus einer Plexiglas-Säule (50 cm Höhe, 6 cm Durchmesser) gebaut (Werkstatt des IBT). Die Ausführung des Sockels, des Deckels und der Probenentnahmestellen war die gleiche wie beim Festbett-Reaktor. Als Trägermaterial wurde eine modifizierte, pulverisierte Aktivkohle verwendet. Die Säulen wurden zu etwa 30 % mit der modifizierten Aktivkohle gefüllt und durch leichten Unterdruck entgast. Anschließend wurden sie mit Argon begast und mit der Anreicherungskultur aus einem Rührkessel-Fermenter gefüllt (ca. 800 ml; 1,2 g/l TS). Nach Erreichen eines stabilen Betriebszustandes hatte sich das Trägerbett aufgrund intensiver Gasbildung um den Faktor 1,5 - 2 ausgedehnt. Um zu verhindern, daß das Trägermaterial bei stärkerer Fluidisierung ausgespült wurde, wurde in den Ablauf ein unten konisch zulaufender Sedimenter (Glasbläserei KFA Jülich) installiert. Von dort konnte in der Start-Phase ausgeschwemmtes Trägermaterial in den Reaktor zurückgepumpt werden.

2.3 Analytik

2.3.1 Summenparameter

Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)

Der chemische Sauerstoffverbrauch (CSB) wird neben dem gesamten organischen Kohlenstoff (TOC) und dem biologischen Sauerstoffverbrauch (BSB) zur Kennzeichnung des Gehaltes eines Wassers an organischen Stoffen verwendet (Wagner, 1976). Er gibt den Sauerstoffverbrauch bei vollständiger Oxidation der im Wasser enthaltenen Stoffe an.

Die Bestimmung erfolgte mit einer handelsüblichen CSB-Test-Kombination (Dr. Lange, Küvetten-Test LCK 114 und Nanocolor CSB 1500, Machery & Nagel, Düren). Beide Tests beruhen auf dem CSB-Kurzzeittest DIN 38409 (H4) der Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung.

Dabei werden die im Wasser enthaltenen Substanzen mit schwefelsaurer Kaliumdichromat-Lösung und Silbersulfat als Katalysator oxidiert. Störende Chloride werden mit Quecksilbersulfat maskiert. Nach zweistündiger Oxidation bei $148^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ wird die Cr^{3+} -Konzentration photometrisch bei 620 nm bestimmt. Zur Kontrolle wurde eine Eichkurve mit Essigsäure im Bereich von 54 mg/l O_2 bis 1084 mg/l O_2 aufgenommen.

Biologischer Sauerstoffbedarf (BSB)

Der biologische Sauerstoffbedarf (BSB) umfaßt die in einer Wasserprobe vorhandenen, beim BSB_5 in 5 Tagen biologisch abbaubaren organischen Verbindungen. Ist die in der Wasserprobe enthaltene Mikroorganismenmenge nicht ausreichend, so muß mit einer möglichst "polyvalenten", d. h. vielseitig zusammengesetzten Bakterienpopulation angeimpft werden (Wagner, 1976).

Die Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfes erfolgte in einem SAPROMAT (Voith), in dem bei einer konstanten Temperatur von 20°C der Sauerstoffverbrauch kontinuierlich registriert wurde. Die Proben wurden im jeweils angegebenen Bereich mit Ablaufwasser der biologischen Kläranlage der KFA verdünnt, wobei die endogene Zehrung abgezogen wurde. Jeweils 250 ml Probe wurden mit 1 ml Belebtschlamm der Kläranlage beimpft. Die Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfes erfolgte durch Herrn Schlenter (Überwachungslabor der Kläranlage, KFA Jülich).

Die biologische Abbaubarkeit einer Probe wurde über den Wirkungsgrad angegeben:

$$\frac{\text{BSB}_5}{\text{CSB}} \times 100 = \text{prozentualer biologischer Abbau in 5 Tagen (Wagner, 1976)}.$$

Organisch gebundener Kohlenstoff (TOC)

Der in einer Wasserprobe enthaltene Kohlenstoff wird als Gesamtkohlenstoff (TC) bezeichnet und setzt sich aus dem organisch gebundenen Kohlenstoff (TOC) und dem anorganischen Kohlenstoff (TIC) zusammen:

$$TC = TOC + TIC$$

Der organisch gebundene Kohlenstoff (TOC) setzt sich aus dem gelösten organischen Kohlenstoff (DOC) und dem partikulären organischen Kohlenstoff (POC) zusammen:

$$TOC = DOC + POC$$

Die Kohlenstoff-Bestimmungen erfolgten in einem Beckman 915-Analysator. Zur Bestimmung des Gesamtkohlenstoffes (TC) wurde die verdünnte Probe (50 µl) in ein Verbrennungsrohr eingespritzt und in einem kontinuierlichen Trägergasstrom (Luft) bei 950°C verdampft. Anschließend wurde der CO₂-Gehalt im Luftstrom in einem Infrarot-Gasanalysator (Beckman Modell IR 215 A) gemessen.

Eine weitere Probe (50 µl) wurde zur Bestimmung des anorganischen Kohlenstoffes (TIC), d. h. gelöstes CO₂ und Carbonate, in ein weiteres Zersetzungsrohr eingespritzt, mit 85 %iger Phosphorsäure angesäuert und auf 150°C erhitzt. Dabei werden die in einer Probe enthaltenen Carbonate zersetzt, das gelöste CO₂ ausgetrieben und der CO₂-Gehalt im Luftstrom gemessen. Der organisch gebundene Kohlenstoff (TOC) ergab sich dann aus der Differenz von Gesamtkohlenstoff (TC) und dem anorganischen Kohlenstoff (TIC):

$$TOC = TC - TIC$$

Zur Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffes (DOC) wurden die Wasserproben zunächst durch ein 0,45 µm Filter filtriert und anschließend der Kohlenstoffgehalt der Probe

bestimmt. Aus der Differenz des gesamten organisch gebundenen Kohlenstoffes (TOC) und des gelösten organischen Kohlenstoffes (DOC) ergab sich der partikuläre organische Kohlenstoff (POC):

$$\text{POC} = \text{TOC} - \text{DOC}$$

Täglich wurde mit einer $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Eichlösung eine Eichkurve im Bereich von 0 - 40 mg/l Kohlenstoff aufgestellt.

2.3.2 Elementaranalysen

Multiementanalysen

Neben einem ausgewogenen C:N:P-Verhältnis ist eine ausreichend hohe Konzentration weiterer Elemente, wie Ca, Mg, Na, S, Ni, für das Wachstum von Mikroorganismen und damit den Abbau von organischen Schmutzstoffen im Abwasser, notwendig. Bei industriellen Abwässern treten häufig Probleme hinsichtlich des C:N:P-Verhältnisses auf (Braun, 1982).

Deshalb wurden verschiedene Chargen des Abwassers aus der Citronensäure-Produktion mit Hilfe der Atom-Emissions-Spektrometrie (ICP-AES) auf die Elementzusammensetzung untersucht.

Zur Bestimmung wurden die Proben zunächst mit Schwefelsäure angesäuert und eingedampft, anschließend die organischen Substanzen mit Hilfe von H_2O_2 oxidiert und mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Zur quantitativen Bestimmung diente ein Vielkanalgerät der Fa. Bausch & Lomb, Typ 3400 ARL (Appl. Res. Lab., Lausanne), mit dem mittels optischer Emissionsspektralanalyse mit induktiv gekoppeltem Argonplasma alle Elemente in einer Probe gleichzeitig analysiert werden konnten (Scherer et al., 1982). Die Analysen wurden von Herrn Dr. Wolff (Zentralinstitut für Chemische Analysen der KFA Jülich) durchgeführt.

EDAX-Mikroanalysen

Die Verteilung einzelner Elemente auf der Oberfläche von Aktivkohle, die als Trägersubstanz im Schwebebett-Reaktor eingesetzt wurde, wurde mit Hilfe der EDAX (Energy-dispersive X-ray)-Mikroanalyse untersucht. Diese Methode ermöglicht die qualitative Bestimmung einzelner Elemente in einem nur 50 nm Durchmesser breiten Objektbereich eines Dünnschnittes.

Proben des unbewachsenen und bewachsenen Trägermaterials wurden mit 2,5 % (Vol/Vol) Glutaraldehyd fixiert und in Epoxyharz eingebettet. Mit Hilfe eines LKB Ultratom III wurden 60 nm dicke Dünnschnitte hergestellt und diese auf einem Kupfer-Objektträger befestigt. Zur elektronenmikroskopischen Betrachtung diente ein Philips EM 400-Elektronenmikroskop, das mit einem EDAX-Detektor (EDAX-PV 9100/60, Witten) ausgerüstet war. Ein Elektronenstrahl wurde auf die Objektstelle fokussiert, die emittierten Röntgenstrahlen von einem Detektor aufgefangen und in einem Vielkanalröntgenspektrometer registriert. In einem Diagramm wurden die registrierten Quanten gegen die Energie aufgetragen (Energiebereich: 0 - 20 KeV) und den Elementen zugeordnet. Die EDAX-Mikroanalysen der elektronenmikroskopischen Dünnschnitte wurden von Herrn Bochem (Institut für Biotechnologie der KFA Jülich) durchgeführt.

Darüber hinaus wurden EDAX-Mikroanalysen von rasterelektronenmikroskopischen Präparaten von Herrn Linke (Institut für Grenzflächenforschung und Vakuumphysik der KFA Jülich) gemacht. Dazu wurden die Proben ebenfalls mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Proben auf einem Probenteller aufgeklebt, mit Gold gesputtert und ebenfalls EDAX-Mikroanalysen gemacht.

Schwefel

Der Gesamt-Schwefel-Gehalt wurde ebenfalls mit Hilfe der optischen Emissionsspektralanalyse mit induktiv gekoppel-

tem Argon-Plasma (ICP-AES) bestimmt. Zur Probenvorbereitung wurden 10 ml der Probe mit 10 ml destilliertem Wasser, 1,5 ml 30 %iger Natronlauge und 1 ml Brom versetzt, einige Minuten lang gekocht und nach dem Abkühlen mit 3 ml einer 30 %igen Salzsäure versetzt. Anschließend wurde die Probe bis zum Verschwinden der Bromdämpfe gekocht und nach dem Abkühlen mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die quantitative Bestimmung der Elementkonzentration erfolgte anschließend mit Hilfe der Atom-Emissions-Spektrometrie (ICP-AES).

Zur Bestimmung des Sulfat-Schwefel-Gehaltes wurden 100 ml der Probe mit 5 ml Salzsäure (1:1) angesäuert. Das in der Probe enthaltene Sulfat wurde anschließend mit Bariumchlorid als Bariumsulfat gefällt und gravimetrisch bestimmt. Bei einigen Abwasserproben war aufgrund der hohen Eigentrübung zunächst eine Klärung mittels Aktivkohle und Membranfilter erforderlich.

Die Sulfid-Schwefel-Bestimmung erfolgte photometrisch nach der Methylenblau-Methode. Dimethyl-p-phenylendiamin bildet mit Schwefelwasserstoff eine Intermediärverbindung, die in Leucomethylenblau übergeht. Das Leucomethylenblau wird durch Eisen(III)-Ionen zu Methylenblau oxidiert (Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Bestimmung des Sulfidschwefels (D7), 1975). Die Schwefel-Bestimmungen wurden von Herrn Dr. Heckner (Zentralinstitut für Chemische Analysen der KFA Jülich) durchgeführt.

Stickstoff

Die Bestimmung des Gesamt-Stickstoff-Gehaltes erfolgte nach Aufschluß der Proben nach Kjeldahl. Die Proben wurden mit Schwefelsäure versetzt und in Gegenwart eines Katalysators erhitzt. Dabei fällt der Stickstoff als $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ an und wird nach Zusatz von Natronlauge abdestilliert (Braun, 1982).

Zur Bestimmung des anorganischen Stickstoffes wurden die Proben nach Reduzierung mit Devardas-Legierung ebenfalls destilliert und der Stickstoff-Gehalt nach Rücktitration mit Salzsäure bestimmt. Die Stickstoff-Bestimmungen wurden von Herrn Dr. Wolff (Zentralinstitut für Chemische Analysen der KFA Jülich) durchgeführt.

2.3.3 Gasanalyse

Volumenbestimmung

Die in Batch-Versuchen gebildete Gasmenge wurde nach der bei Latham u. Wolin (1978) beschriebenen Methode mit Glas-spritzen (Fortuna, W.G. Co., 10 - 50 ml) bestimmt. Die Spritzen wurden vor Benutzung sterilisiert und der Kolben mit sterilem Wasser gangbar gemacht. Vor dem Einstechen wurden die Spritzen mehrmals mit N_2/CO_2 (80 %/20 %) gespült. Je nach Versuch wurden die Spritzen auch mit H_2/CO_2 (80 %/20 %) gespült und der Kolben nicht wieder vollständig heruntergedrückt. Dadurch wurde bei Unterdruck in den Kulturgefäßen H_2/CO_2 eingesogen.

Die Messung der Gasbildung in den Bioreaktoren erfolgte über Experimentier-Gasuhren (0,5 l und 1 l, nasse Bauart, Ritter, Bochum). In der Start-Phase, d.h. bei geringer Gasproduktion, wurde das gebildete Biogas in einer mit einer Sperrflüssigkeit gefüllten Bürette aufgefangen und gemessen. Die Sperrflüssigkeit setzte sich zusammen aus: 800 ml Wasser, 40 ml konz. Schwefelsäure und 200 g Natriumsulfat (D'Ans u. Lax, 1967).

Die Gasbildungsrate kleiner Kulturvolumina wurde in einer Warburg-Apparatur (B. Braun, Melsungen) bestimmt. Die Schüttelfrequenz betrug 120/min., die Amplitude 4 cm. Das Wasserbad wurde auf $37^\circ C \pm 0,1^\circ C$ temperiert. Die Reaktionsgefäße besaßen je nach Ausführung einen Zentralzylinder und ein bis zwei Seitenarme. Das Gesamtvolumen betrug 12 - 16 ml.

Über eine zusätzliche Begasungseinrichtung konnten alle 14 Gefäße gleichzeitig begast werden (Abb. 7). Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Gefäße zu Versuchsbeginn 10 Min. mit N_2/CO_2 (80 %/20 %) begast. 0,5 - 10 ml der Anreicherungskultur wurden in den Hauptraum pipettiert, das Substrat in die Seitenarme.

Zur Bestimmung des CO_2 -Anteils im gebildeten Biogas wurde KOH zur CO_2 -Absorption in das Zentralgefäß gefüllt (Kleinzeller, 1965). Die folgende Erniedrigung des CO_2 -Partialdruckes führte jedoch zu einem Anstieg des pH-Wertes in der Kulturflüssigkeit, da das gelöste CO_2 in einem Gleichgewicht mit dem CO_2 der Gasphase steht (Henry'sches Gesetz):

$$S = \alpha \times P_{CO_2}$$

mit:

S = Sättigungskonzentration des Gases

α = Absorptionskoeffizient des Gases in der Flüssigkeit

P_{CO_2} = Partialdruck des Gases CO_2

Zur Bestimmung des Methananteils im Biogas unter physiologischen Bedingungen wurden deshalb nach Vorlage von Herrn Dr. Schoberth (Institut für Biotechnologie der KFA Jülich) spezielle, mit einem Septum versehene Warburg-Gefäße angefertigt (B. Braun, Melsungen) (Abb. 8). Hieraus konnten auch während des Versuches mit Hilfe einer Mikroliterspritze (50 μ l, Hamilton) Gasproben entnommen und in einem Gaschromatographen analysiert werden.

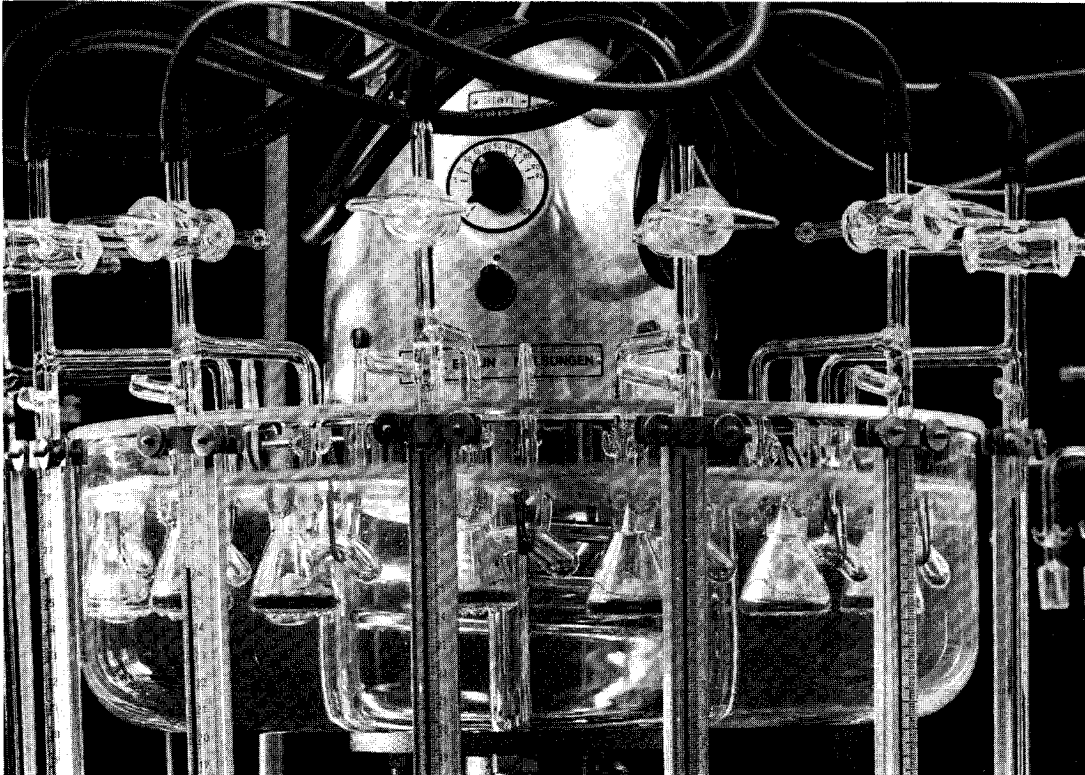


Abb. 7: Warburg-Apparatur mit Vorrichtung zum anaeroben Begasen der Versuchsgefäße

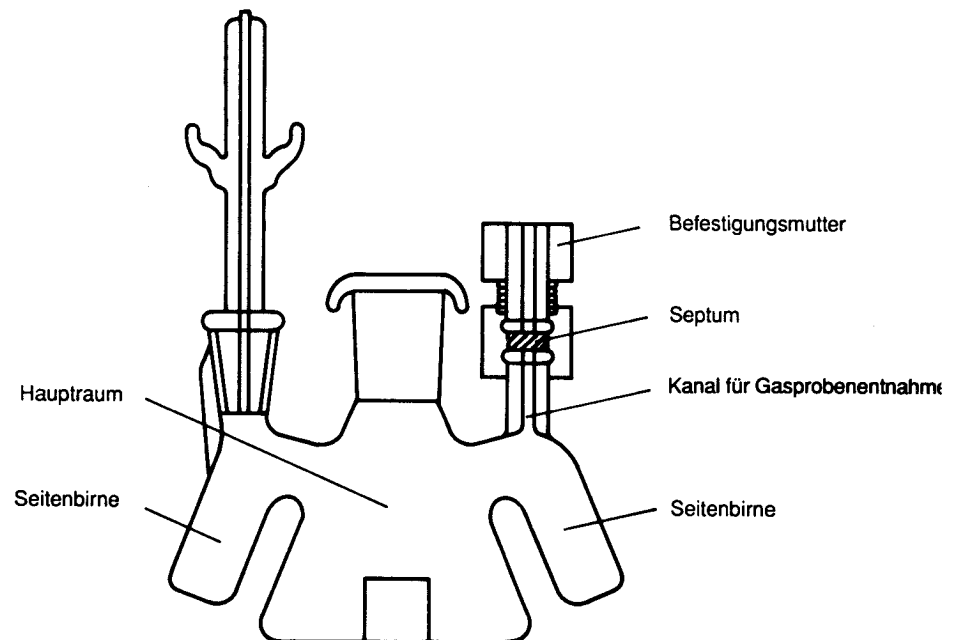


Abb. 8: Schema eines Warburg-Gefäßes mit Septum zur Entnahme von Gasproben

Gaszusammensetzung

Der Methananteil im Biogas wurde gaschromatographisch bestimmt:

Gaschromatograph	:	Packard 428/603
Säule	:	Porapak QS, 80 - 100 mesh, 1 m x 2 mm (Ø) (Werner Günther Analystechnik, Düsseldorf)
Säulentemperatur	:	120°C
Injektortemperatur	:	300°C
Detektortemperatur	:	250°C (FID)
Probevolumen	:	20 µl
Retentionszeit	:	ca. 12 Sek.
Verstärkung	:	64/128

Bei kontinuierlichen Fermentationen wurde die Gaszusammensetzung über ein Infrarot-Analysengerät (Binos, Leybold-Heraeus, Hanau) bestimmt. Die Geräte wurden monatlich mit CO₂ und CH₄ geeicht.

Der Gehalt an Wasserstoff im Biogas wurde ebenfalls gaschromatographisch bestimmt:

Gerät	:	Hewlett Packard 5840
Säule	:	Edelstahl; 2,4 m Länge; 1/8 Zoll; Aktivkohle
Trärgas	:	Argon; 30 ml/Min.
Detektor	:	WLD; 230°C
Ofentemperatur	:	Start: 70°C; Rate: 20°C/Min. bis 180°C
Injektorblock	:	150°C
Eingabe über Schleife; Probevol.:	:	0,5 ml

Die gaschromatographische Bestimmung von Wasserstoff wurde von Herrn Menzer (Institut für Reaktorbauelemente der KFA Jülich durchgeführt.

Der Gehalt an Schwefelwasserstoff im Biogas wurde mit einer Dräger-Gasspürpumpe (Dräger-Werk, Lübeck;) Modell 21/31) und Dräger-Röhrchen: Schwefelwasserstoff 0,2 %/A (CH 28101)

bestimmt. Hierbei kommt es bei Anwesenheit von Schwefelwasserstoff zur Bildung von schwarz gefärbtem Kupfersulfid. Der Meßbereich betrug 0,2 - 7 Vol.-%.

2.3.4 Chemische Analysen

Niedere Fettsäuren und Alkohole

Die Bestimmung der niederen Fettsäuren und Alkohole erfolgte gaschromatographisch. Dazu wurden die Proben zunächst in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Jeweils 500 µl Probe wurden dann mit der gleichen Menge eines internen Standards (9,5 mMol/l Methanol in 0,2 N HCl) versetzt:

Gaschromatograph	:	Hewlett Packard 5840 A mit automatischem Probengeber 7672 A, USA sowie Hewlett Packard 5790 A mit automatischem Probengeber 7671 A
Säule	:	Porapak QS, 80 - 100 mesh (2 m x 2 mm (Ø) (Werner Günther Analysentechnik, Düsseldorf)
Säulentemperatur	:	150°C
Injektortemperatur	:	230°C
Detektortemperatur	:	230°C
Probenvolumen	:	1 µl
Trärgas	:	N ₂
Retentionszeit	:	ca. 18 Min. bis zur n-Buttersäure

Routinemäßig wurden in folgender Reihenfolge bestimmt:

Ethanol, Essigsäure, Propionsäure, n-Buttersäure.

Bei Bedarf wurde unter gleichen Bedingungen n-Valeriansäure bestimmt. Methanol (9,5 mMol/l) wurde als interner Standard eingesetzt.

Organische Säuren

Milchsäure wurde mit Hilfe der Isotachophorese bestimmt.

Hierbei werden Ionen in einem elektrischen Feld innerhalb einer Kapillare je nach ihrer Beweglichkeit verschieden

schnell zur Elektrode transportiert. Die dabei entstehenden Zonen werden mittels Leitfähigkeit bzw. Lichtabsorption (254 nm) nachgewiesen. Eine qualitative Bestimmung der Ionen ergibt sich aus der Lage der Leitfähigkeitszone auf dem Tachophorogramm, eine quantitative Aussage ist über die Länge der Zone möglich. Die Lactat-Bestimmung wurde von F. Schölgens (Abt. Dr. Kneifel, Institut für Biotechnologie der KFA Jülich) durchgeführt.

Darüber hinaus wurden Lactat und Citrat mit Enzym-Test-Kombinationen (Boehringer, Mannheim) bestimmt:

L-Milchsäure wird durch NAD in Gegenwart von L-Lactat-Dehydrogenase zu Pyruvat oxidiert. Da das Gleichgewicht dieser Reaktion weitgehend auf der Seite von Lactat liegt, wird Pyruvat mit Hilfe des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase in Gegenwart von Glutamat unter Bildung von L-Alanin und α -Ketoglutarat abgefangen. Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der Milchsäure-Menge äquivalent und wird bei 340 nm gemessen.

Citronensäure wird durch das Enzym Citrat-Lyase zunächst in Oxalacetat und Acetat gespalten. In Gegenwart der Enzyme Malat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase werden Oxalacetat und dessen Decarboxylierungsprodukt Pyruvat durch NADH zu Malat und Lactat reduziert. Die während der Reaktionen verbrauchten NADH-Mengen sind der Citrat-Menge äquivalent und werden bei 340 nm gemessen.

Kohlenhydrate

Saccharide bilden beim Erwärmen mit Schwefelsäure Furfural-derivate, die mit Anthron zu farbigen Kondensationsprodukten reagieren (Lange, Photometrische Analysen, 1980). In einem Reagenzglas wurden 2 ml einer 2 %igen Anthronlösung in konzentrierter Schwefelsäure unter Eiskühlung mit 1 ml Probelösung überschichtet und kräftig umgeschüttelt. Anschließend wurde die Lösung 16 Min. im siedenden Wasserbad erwärmt, unter fließendem Wasser abgekühlt und die Farblösung sofort bei 620 nm photometriert. Als Kontrolle dien-

te eine Probe, bei der das Reagenz mit 1 ml Wasser überschichtet wurde. Eine Eichkurve wurde mit Glucose erstellt.

Die Bestimmung des Gehaltes an Pentosen und Hexosen erfolgte mit Hilfe eines Zuckeranalysators (ZA 5100, Biotronik). Aufgrund der hohen Eigenfärbung wurden die Proben zunächst 1 : 10 mit bidest. Wasser verdünnt und dann über ein Ionenaustauscherharz (DA-X4-20), Säulenlänge 30 cm, Durchmesser 6 mm, bei einer Säulentemperatur von 60°C geleitet. Die Bestimmung wurde von Herrn Irrgang (Institut für Biotechnologie der KFA Jülich) durchgeführt. Der Gehalt an Glucose und Fructose wurde mit Enzym-Test-Kombinationen (Boehringer, Mannheim) bestimmt: Glucose und Fructose werden durch das Enzym Hexokinase und ATP zu Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat phosphoryliert. In Gegenwart des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wird Glucose-6-Phosphat von NADP zu Gluconat-6-Phosphat oxidiert. Dabei entsteht NADPH, das der Glucose-Menge äquivalent ist und bei 340 nm bestimmt wird. Nach Ablauf dieser Reaktion wird Fructose-6-Phosphat durch Phosphoglucose-6-Isomerase in Glucose-6-Phosphat überführt. Glucose-6-Phosphat reagiert wiederum mit NADP unter Bildung von Gluconat-6-Phosphat und NADPH. Die gebildete NADPH-Menge ist der Fructose-Menge äquivalent und wird bei 340 nm photometrisch bestimmt.

2.3.5 Biomasse-Bestimmung

Trockengewichtsbestimmung

Die Bestimmung der organischen Trockensubstanz erfolgte über eine Bestimmung der Gesamt-Trockensubstanz bei 105°C (Deutsche Einheits-Verfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, 1975) und anschließender Bestimmung des Glührückstandes bei 550°C (Braun, 1982).

Zur Bestimmung der Gesamt-Trockensubstanz wurden jeweils 10 ml Probenmenge 15 Min. bei 5000 U/Min. abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen mit den Pellets für 24 Stunden bei 105°C ($\pm$ 5°C) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Zur Bestimmung der organischen Trockensubstanz wurde aschefreies Filterpapier (100 mm Ø, Weißband, Machery & Nagel, Düren) gewaschen, zweimal 3 Min. im Mikrowellenherd (650 W) getrocknet und gewogen. Anschließend wurden 5 - 200 ml Probenmenge abfiltriert, zweimal 3 Min. im Mikrowellenherd (650 W) getrocknet und nach dem Abkühlen im Exsikkator gewogen. Zur Bestimmung des Glühverlustes wurden die Proben 3 Stunden in Porzellantiegeln bei 550°C geglüht und erneut gewogen. Die Gewichts Differenz gab den Anteil an organischer Trockensubstanz an (der Glühverlust wurde von Herrn Schlenter, KFA Jülich, bestimmt).

Proteinbestimmung

Zahlreiche Methoden, die für die Proteinbestimmung existieren, sind für die Bestimmung des Proteingehaltes in Schlammproben ungeeignet (Hattingh et al., 1967). Probleme treten insbesondere durch die häufig intensive Eigenverfärbung (z. B. durch Maillard-Produkte) der Proben auf. Bei der Bestimmung des Proteingehaltes in Schlammproben mit der Biuret-Reaktion wurde deshalb ein Blindwert von den gemessenen Extinktionswerten abgezogen. 0,2 - 0,3 ml Schlammprobe wurden zweimal mit 4 ml Wasser gewaschen und anschließend mit 4 ml Wasser und 0,4 ml 16 %iger Natronlauge 15 Min. bei 100°C gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 1,6 ml Biuret-Reagenz ($0,25 \text{ g CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O} + 1,25 \text{ g K-Na-Tartrat} \times 4 \text{ H}_2\text{O} + 1 \text{ g NaOH} + 6,25 \text{ g KJ}$ auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt) zugegeben. Anschließend wurden die Proben 30 Min. bei 37°C inkubiert, abzentrifugiert und die Extinktion bei 546 nm gemessen. Vom Meßwert wurden neben dem Reagenzienleerwert noch ein Blindwert abgezogen, bei dem anstelle des Biuret-Reagenzes Wasser zugegeben wurde.

Eine Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin erstellt. Eine weitere Proteinbestimmung ganzer Zellen nach Bradford (1976) erfolgte durch Frau Lennartz (Institut für Biotechnologie der KFA Jülich). 1 ml Probe wurden in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert, in 0,5 ml Natronlauge resuspendiert und nach 10 - 15 Min. für 30 Sek. fest verschlossen im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen im Eisbad wurden 25 - 100 µl zur Proteinbestimmung verwendet. In Reagenzgläsern wurden 5 ml Bradford-Reagenz (50 ml Ethanol + 40 mg Serva Blau G, gelöst + 100 ml 85 %ige Phosphorsäure, ad 1 l) zugemischt und nach 1 Min. die Extinktion bei 578 nm gemessen. Ein Blindwert wurde auch hier gemessen, indem anstelle des Biuret-Reagenzes Wasser zugegeben wurde. Dieser Blindwert wurde von den Extinktionswerten abgezogen. Mit Rinderserumalbumin wurde eine Eichkurve erstellt.

2.4 Mikroskopische Untersuchungen

Lichtmikroskop

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung der Mikroorganismen diente ein Photomikroskop III (Zeiss, Oberkochen), das mit einer Phasenkontrasteinrichtung und einem Fluoreszenz-Auflichtkondensator III RS (Zeiss, Oberkochen) ausgerüstet war. Die Anregungswellenlänge lag bei 390 - 440 nm. Die Fluoreszenz-SW-Aufnahmen wurden mit einem HP 5 (27 DIN)-SW-Film gemacht. Die Belichtungszeit lag je nach Fluoreszenzstärke bei 1 - 60 Sek. Zur Verringerung des Abstandes zwischen Deckglas und Objektträger wurde das Deckglas angepreßt und mit Nagellack umrandet.

Elektronenmikroskop

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Phillips EM 400 Elektronenmikroskop durchgeführt. Dazu wurden die Proben in 2,5 % (Vol/Vol) Glutaraldehyd

fixiert, mit Wasser gewaschen, mit Osmiumtetroxid nachfixiert und mit Uranylacetat kontrastiert. Von den in Epoxydharz eingebetteten Proben wurden mit einem Ultratom III (LKB) Dünnschnitte hergestellt, die mit Blei-Citrat nachkontrastiert wurden. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Aufnahmen wurden von Herrn Bochem (Institut für Biotechnologie der KFA Jülich) durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskop

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Leitz-AMR 1600T Raster-Elektronenmikroskop von Herrn Elz (Institut für Reaktorwerkstoffe der KFA Jülich) angefertigt. Die Proben wurden zuvor in 2,5 % (Vol/Vol) Glutaraldehyd fixiert, über Aceton in Amylacetat überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -90°C gefriergetrocknet (Kritisch-Punkt, 10^{-3} Pa). Anschließend wurden die Proben auf einen Probenteller aufgeklebt und mit Gold besputtert. Die Probenvorbereitung erfolgte durch Herrn Bochem (Institut für Biotechnologie der KFA Jülich).

2.5 Reinkulturen

Versuchsstamm

Im Rahmen der Untersuchungen wurde der Anreicherungskultur zur Verbesserung des Essigsäure-Abbaues eine Reinkultur von *Methanosarcina barkeri* zugesetzt. Dieser Stamm (DSM 804) wurde über mehrere Jahre auf einem Acetat-Medium angezogen (Schug u. Sahm, 1983) und freundlicherweise von Frau Schug (Institut für Biotechnologie der KFA Jülich) zur Verfügung gestellt.

Kulturmedium

Zur Anzucht von *Methanosarcina barkeri* diene das von Scherer u. Sahm (1981) optimierte Medium:

Imidazol-HCl	40	mMol/l
NaH_2PO_4	0,5	mMol/l
Na_2HPO_4	0,5	mMol/l
CaCl_2	1,7	mMol/l
MgCl_2	2,0	mMol/l
KCl	5,4	mMol/l
NaCl	34	mMol/l
NH_4Cl	9,4	mMol/l
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1	mMol/l
Titan-(III)-Citrat	0,15	mMol/l
L-Cystein-HCl	0,85	mMol/l
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	2,5	mMol/l
Resazurin	4,4	$\mu\text{Mol/l}$
Na-Acetat	50	mMol/l

als Spurenelemente:

H_3BO_3	1,45	$\mu\text{Mol/l}$
CoCl_2	0,25	$\mu\text{Mol/l}$
Na_2SeO_3	0,1	$\mu\text{Mol/l}$
ZnCl_2	0,1	$\mu\text{Mol/l}$
MnCl_2	0,045	$\mu\text{Mol/l}$
NaMoO_4	0,037	$\mu\text{Mol/l}$
NiCl_2	0,025	$\mu\text{Mol/l}$
CuCl_2	0,017	$\mu\text{Mol/l}$

sowie Wolfe's Vitamin-Lösung: 10 ml/l (nach Balch et al., 1979)

Wolfe's Vitamine:

Biotin	2	mg/l
Folsäure	2	mg/l
Pyridoxal-HCl	10	mg/l
Thiamin-HCl	5	mg/l
Riboflavin	5	mg/l
Nikotinsäure	5	mg/l
B 12	2	mg/l
p-Aminobenzoessäure	5	mg/l
Liponsäure	1	mg/l
Ca-Panthotenat	5	mg/l

3. ERGEBNISSE

3.1 Zusammensetzung des Abwassers

Zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen lagen nur wenige, ältere Analysen über die Zusammensetzung des Abwassers aus der Citronensäure-Produktion vor (Ahrens, 1982). Deshalb war es notwendig, zunächst genauere Analysen über die Art und die Schwankungen der im Abwasser enthaltenen Inhaltsstoffe durchzuführen. Tab. 4 zeigt die wichtigsten Summenparameter zur Bestimmung der organischen Belastung im Abwasser:

CSB (mg O ₂ /l):	20.000 - 50.000
BSB ₅ (mg O ₂ /l):	10.000 - 25.000
BSB ₂₈ /CSB :	0,75
DOC (mg C/l) :	11.900 - 13.800
TOC (mg C/l) :	12.500 - 20.800
TS (g/l):	0,125
organ. TS (g/l):	0,095
pH-Wert:	4,5 - 5,5

Tab. 4: Analysenwerte des Abwassers aus der Citronensäure-Produktion

Mit einem CSB von bis zu 50 kg/m³ zählt dieses Abwasser zu den hochbelasteten industriellen Abwässern (Sixt, 1979). Die hohen Schwankungen in der Belastung des Abwassers könnten zur Anhäufung von Zwischenprodukten und damit zu Problemen bei der Methangärung führen. Der Anteil des ungelösten, partikulären CSB macht nur ca. 2 - 3 % des Gesamt-CSB des Abwassers aus. Das BSB₅/CSB-Verhältnis von etwa 0,5 sowie das BSB₂₈/CSB-Verhältnis von 0,75 deuten darauf hin, daß etwa 25 % der Inhaltsstoffe mikrobiologisch nur langsam oder überhaupt nicht abbaubar sind. Die Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfs über 28 Tage ergab eine deutliche Abhängigkeit des aeroben Abwasserabbaues von der Abwasserkonzentration (Abb. 9).

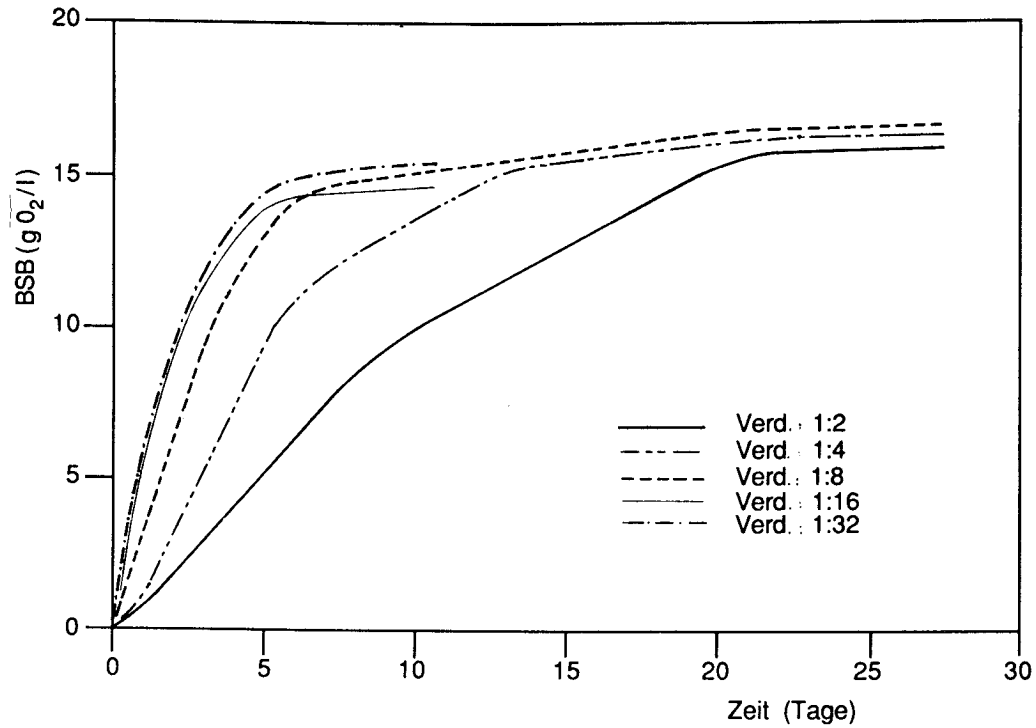


Abb. 9: Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfs (BSB) eines Abwassers aus der Citronensäure-Produktion (CSB: 23.000 mg/l) in verschiedenen Verdünnungen (1 : 2 bis 1 : 32)

Erst ab einer Verdünnung des Abwassers von 1 : 8 wurde eine maximale Abbaugeschwindigkeit (gemessen als Sauerstoffverbrauch) erreicht. Je nach Verdünnungsgrad war die Oxidation nach 3 - 4 Wochen abgeschlossen. Bei der in Abb. 9 untersuchten Abwasserprobe erreichte der aerobe Abbau mit 17.000 mg O₂/l BSB₂₈ etwa 74 % des CSB in Höhe von 23.000 mg O₂/l. Der verbleibende Rest-CSB von 6.000 mg O₂/l führte noch zu einer dunkelbraunen Färbung des Abwassers, die auf Produkte der Maillard-Reaktion (Angrick u. Rewicki, 1980) hinwies. Diese stammten aus der Melasse und entstehen während der Aufarbeitung des Citronensäure-Kulturfiltrates.

Abb. 10 zeigt eine Titrationskurve des Abwassers mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl. Wie der Verlauf der Kurve zeigt, ist die Pufferkapazität des Abwassers gerade im neutralen Bereich von pH 6,0 bis pH 8,0 nur sehr schwach. Da die Methangärung im neutralen pH-Bereich stattfindet, könnte dies zu Problemen hinsichtlich der pH-Stabilität bei Anreicherung von Zwischenprodukten (Fettsäuren) führen.

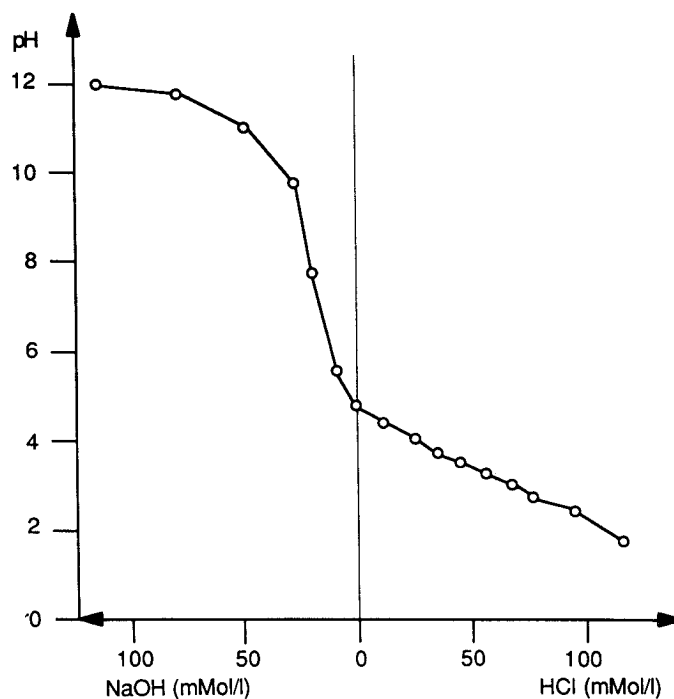


Abb. 10: Titrationskurve des Abwassers mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl

Wie aus Tab. 3 zu ersehen ist, bilden organische Säuren die Hauptbestandteile des Abwassers, worauf auch der niedrige pH-Wert des Abwassers von 4,5 - 5,5 zurückzuführen ist.

Der chemische Sauerstoffbedarf der bestimmten Abwasserinhaltsstoffe entspricht etwa 70 % des Gesamt-CSB. Den restlichen CSB bildeten u. a. dunkelbraun gefärbte Mailard-Produkte. In der Melasse, dem Ausgangssubstrat für die Citronensäure-Fermentation, wurden mehr als 2000 Substanzen identifiziert (Schulz, 1985).

Tab. 5 gibt die mit Hilfe der Atom-Emissions-Spektrometrie gemessenen Konzentrationen der häufigsten Elemente im Abwasser (mit Ausnahme von C, N, H) an:

Kalium	3325	-	4080
Calcium	930	-	1210
Schwefel	650	-	890
Natrium	380	-	630
Magnesium	240	-	315
Antimon	60		
Silizium	45	-	56
Zinn	45	-	60
Phosphor	23	-	28
Aluminium	13		
Eisen	4,5	-	9,0
Strontium	1,5	-	1,9
Selen	0,5	-	2,8
Bor	0,49	-	0,7
Titan	0,45	-	0,52
Tellur	0,19		
Barium	0,13	-	0,16
Chrom	0,1	-	0,17
Lithium	0,08	-	0,5
Vanadium	0,05	-	0,079
Molybdän	0,05	-	0,075
Nickel	0,036	-	0,1
Mangan	0,02	-	0,2
Kobalt	0,019		
Zink	0,016	-	0,1
Cadmium	0,007		
Blei	0,005		
Wolfram	0,005		
Kupfer	0,004		

Tab. 5: Multielementbestimmungen verschiedener Chargen eines Abwassers aus der Citronensäure-Produktion (mg/l)

Zusätzlich bestimmt wurden (mg/l):

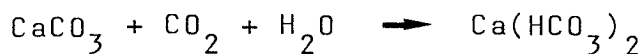
Gesamt-Stickstoff	736 - 740
anorg. Stickstoff	104
Phosphat	86
Sulfat	931 - 2580
Chlor	710 - 1450
Sulfid	0,5

Die Hauptelemente bildeten: Kalium, Calcium, Schwefel, Natrium und Magnesium. Die hohe Kalium-Konzentration von 3,3 - 4,1 g/l ist auf den hohen Kalium-Gehalt der Melasse, dem Ausgangssubstrat für die Citronensäure-Fermentation, zurückzuführen. Eine Kalium-Konzentration von 2,5 - 4,5 g/l kann bereits inhibierend auf den anaeroben Abbau wirken (Skogman, 1979; McCarty, 1964).

Das Spurenelement Nickel, das in mindestens 4 verschiedenen Proteinen methanogener Bakterien enthalten ist (Thauer, 1985), lag mit 0,6 - 1,7 µMol/l nur in geringer Konzentration vor. Auf die Fällung der Citronensäure als CaCitrat mit Kalkmilch ist die hohe Calcium-Konzentration von 0,9 - 1,2 g/l zurückzuführen. Hier besteht die Gefahr der Bildung von unlöslichem Calciumcarbonat, gemäß folgender Gleichung:



Calciumcarbonat steht im Gleichgewicht mit seinem Hydrogensalz:



Die Gleichgewichtseinstellung ist u.a. abhängig vom pH-Wert, der Temperatur und der Kohlensäure-Konzentration.

In den hier untersuchten Abwasserchargen wurden keine Aminosäuren gefunden, wie Analysen mit Hilfe eines Aminosäure-Analysators ergaben (die Aminosäure-Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Herscheid, Institut für Biotechnologie, durchgeführt).

Das hier untersuchte Abwasser aus der Citronensäure-Fermentation, die sog. "Dünnlauge", setzte sich zu gleichen Teilen aus der Ablauge (aus der Submers-Fermentation) und Waschwasser zusammen. Da auch die Abbaubarkeit dieser beiden Teilabwasserströme untersucht werden sollte, war eine getrennte Analyse beider Teilströme erforderlich. Tab. 6 zeigt die Zusammensetzung der S-Ablauge und des Waschwassers:

	S-Ablauge:	Waschwasser:
CSB (mg O ₂ /l):	41.000	19.300
DOC (mg C/l):	19.950	9.200
pH-Wert	4,3	4,8
Ethanol (mMol/l):	11,9	6,8
Essigsäure (mMol/l):	9,1	29,9
Propionsäure (mMol/l):	0,4	0,4
Buttersäure (mMol/l):	0,0	0,9
Sulfat (mg/l):	2690	1230
Gesamt-Stickstoff (mg/l):	900	570
Kalium (mg/l):	4280	2370
Calcium (mg/l):	1470	860
Natrium (mg/l):	658	573
Magnesium (mg/l):	354	168
Phosphor (mg/l):	36	14

Tab. 6: Zusammensetzung der S-Ablauge und des Waschwassers

Für eine vollständige anaerobe Reinigung eines Abwassers ist ein ausgewogenes C:N:P-Verhältnis erforderlich. Die C:N:P-Verhältnisse für die beiden Teilabwasserströme sowie für die Dünnlauge betrugen (mg):

	C:	N:	P:
S-Ablauge:	554	: 25	: 1
Waschwasser:	657	: 40	: 1
Dünnlauge:	568	: 29	: 1

Nach Scherer et al. (1982) ergaben chemische Analysen verschiedener methanbildender Bakterien ein C:N:P-Verhältnis von 100:26:4. Frostell (1981) gibt für die anaerobe Abwasser-Behandlung ein optimales C:N:P-Verhältnis von 700:5:1 an. Nach Inden (1977) wird eine maximale Gasausbeute bei einem C:N-Verhältnis von 10:1 bis 16:1 erreicht. Hiernach wäre das C:N-Verhältnis beim Waschwasser mit 16:1 für die anaerobe Reinigung am günstigsten.

3.2. Anaerober Abbau des Abwassers aus der Citronensäure-Produktion

3.2.1 Anreicherungskultur

Für die Untersuchungen des anaeroben Abbaues des Abwassers aus der Citronensäure-Produktion stand eine Anreicherungskultur aus einer anaeroben Pilotanlage der Fa. J.A. Benckiser (Ladenburg) zur Verfügung. In dieser Anlage wurde das unverdünnte Abwasser bei 37°C in einem 8 m³-Rührkessel-Fermenter mit nachgeschaltetem Sedimenter fermentiert.

Zwei 12 l-Rührkessel-Fermenter (Biostat S, B. Braun, Melsungen) wurden unter Argon-Begasung mit der Anreicherungskultur (15 g/l TS) gefüllt und ebenfalls auf 37°C temperiert. Das unverdünnte Abwasser wurde, entsprechend den Bedingungen in der Pilotanlage, ohne Zusatz von Mineralsal-

zen und Reduktionsmitteln, zunächst diskontinuierlich mit einer durchschnittlichen hydraulischen Verweilzeit von 21 Tagen zudosiert. Abb. 11 zeigt die Zunahme der Gasproduktion mit steigender Aktivität der Mikroorganismen in der Start-Phase eines Rührkessel-Fermenters.

Nach 15 Tagen wurde das unverdünnte Abwasser kontinuierlich mit einer hydraulischen Verweilzeit von 13,5 Tagen zudosiert. Die Gasproduktion stieg weiter an und erreichte nach 30 Tagen eine konstante Rate. Bei einer CSB-Belastung von $1,7 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{d}$ wurden ca. 9,9 l Biogas pro Tag gebildet, mit einem durchschnittlichen Methangehalt von 50 %. Der gemessene CSB-Abbaugrad lag bei 73 %. Der pH-Wert stellte sich bei kontinuierlicher Substratzugabe auf pH 7,2 - 7,4 ein. Aus diesem Rührkessel-Fermenter wurden Proben für die folgenden Abbau-Versuche entnommen.

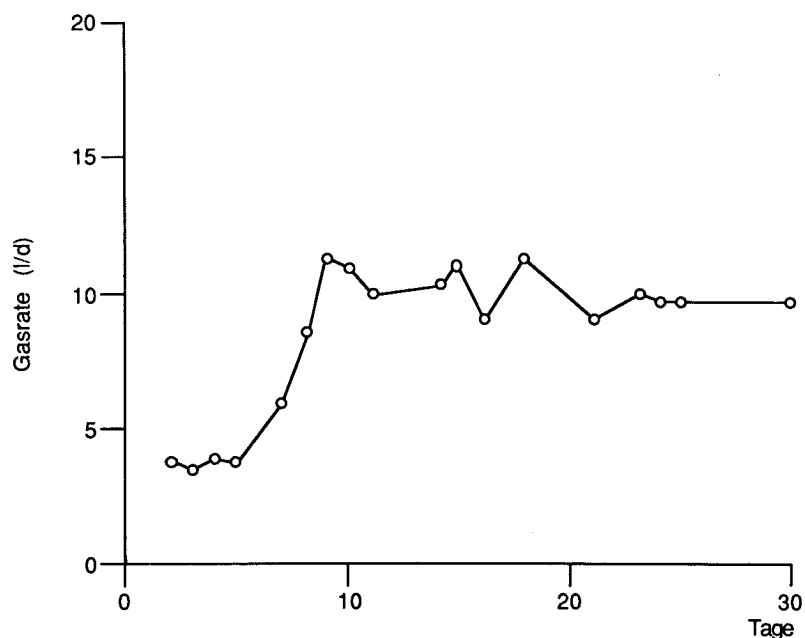


Abb. 11: Zunahme der Gasproduktion in der Start-Phase bei kontinuierlichem Abbau des Abwassers in einem Rührkessel-Fermenter (HRT: 13,5 d)

3.2.2 Batch-Versuche

Abbau des Abwassers in unterschiedlicher Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Abwasser-Konzentration bei Abbau-Versuchen wurden jeweils 50 ml der Anreicherungskultur mit 0 - 25 ml des Abwassers bei 37°C in Serumflaschen (117 ml) inkubiert. Die Methanbildung in den ersten 10 Std. nahm mit steigender Abwasser-Zugabe zu (Abb. 12).

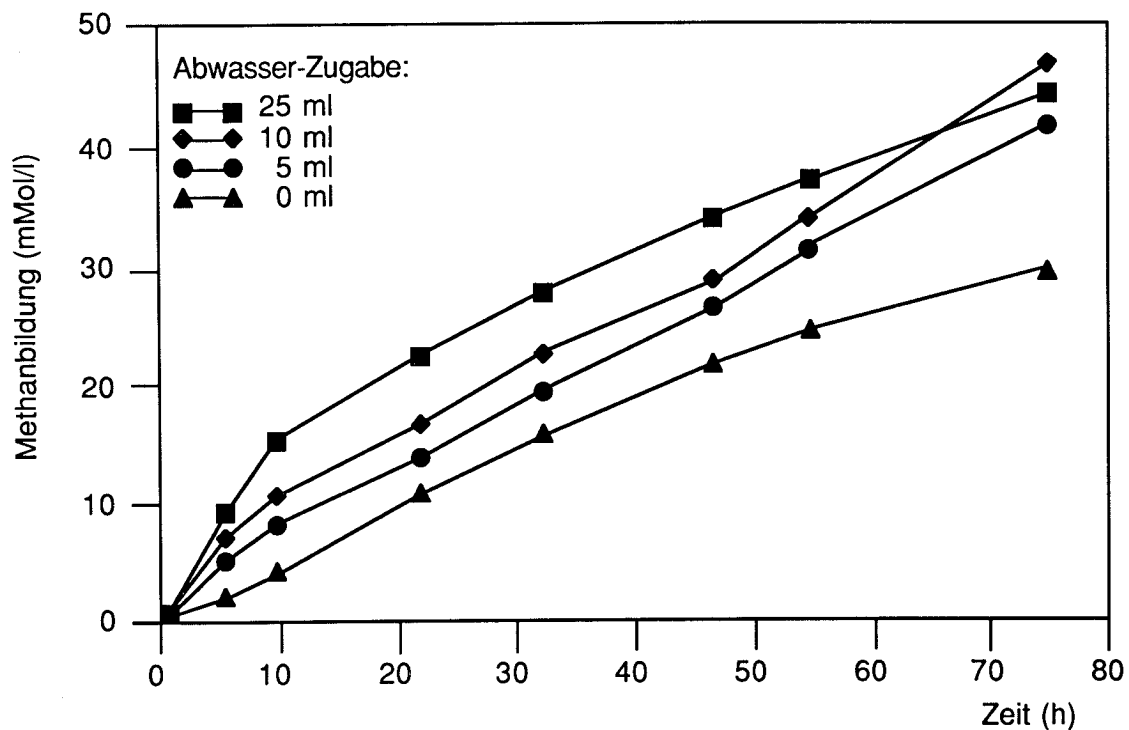


Abb. 12: Methanbildung durch eine Anreicherungskultur (50 ml) bei unterschiedlicher Zugabe des Abwassers (0-25 ml)

Trägt man die Methanbildungsrate gegen die zugesetzte Abwasser-Menge (0 - 25 ml) auf, so ließ sich daraus eine maximale Methanbildungsrate von 34,6 ml/l.h Methan berechnen (Abb. 13) (Lineweaver-Burk-Darstellung; Van den Heuvel u. Zoetemeyer, 1982).

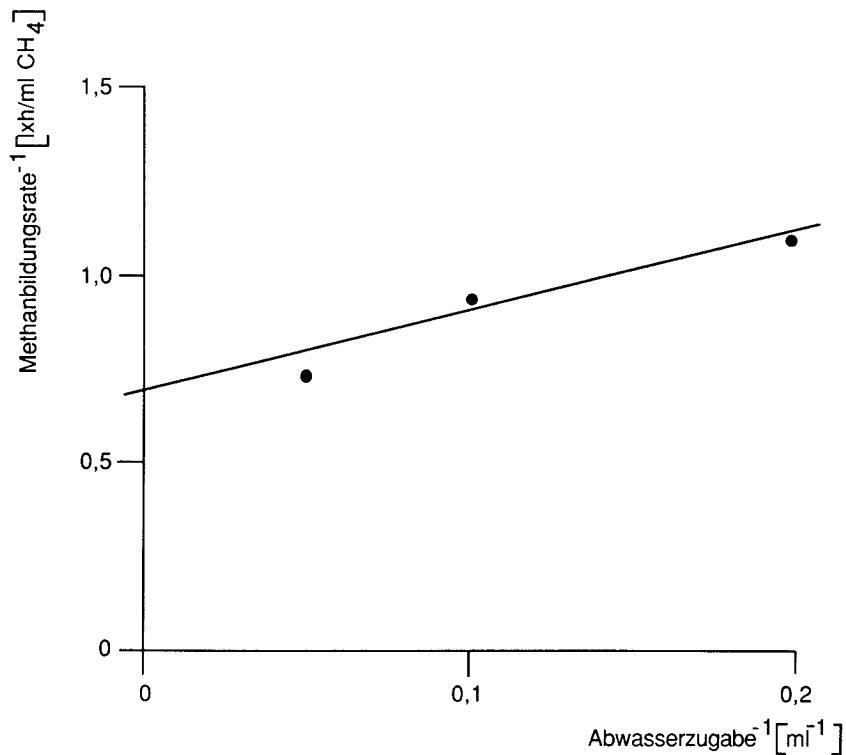


Abb. 13: Lineweaver-Burk-Darstellung der Anfangs-Methanbildungsrate gegen die zugesetzte Abwasser-Menge (0-25 ml)

Bei einer Abwasserzugabe von 4,3 ml war die Methanbildungsrate halbmaximal. Mit steigender Abwasser-Zugabe kam es zu einer Akkumulation von Essigsäure (Abb. 14). Bei einer Abwasserzugabe von 25 ml fiel der pH-Wert auf 6,5. Die Essigsäure-Konzentration stieg auf ca. 50 mMol/l und fiel erst nach etwa 30 h wieder ab. Nun überstieg die Rate des Essigsäure-Abbaues die Rate der Essigsäure-Bildung.

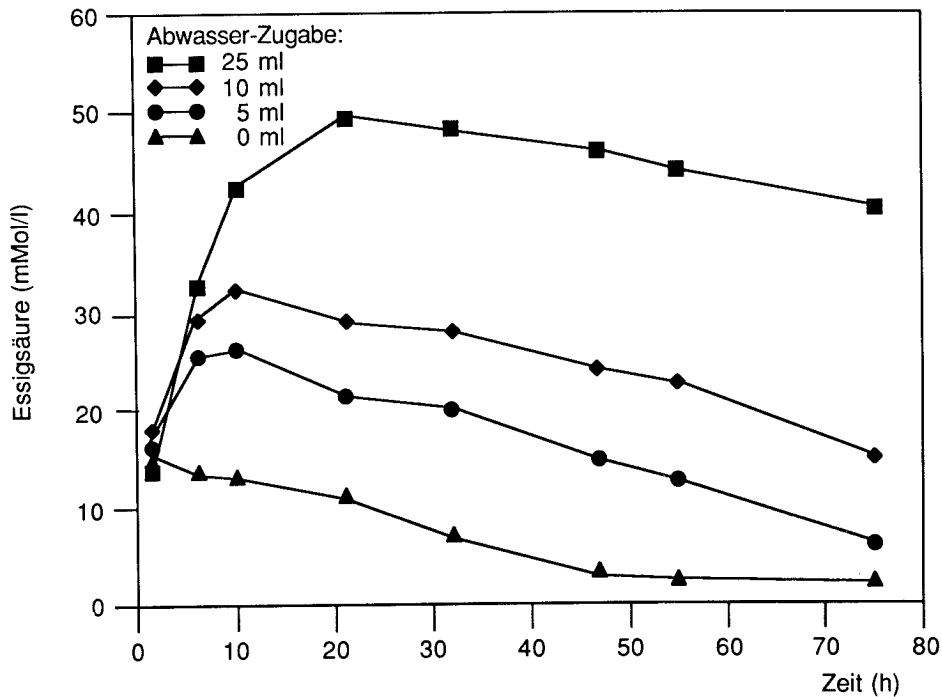


Abb. 14: Essigsäure-Bildung durch eine Anreicherungskultur (50 ml) bei unterschiedlicher Zugabe des Abwassers (0-25 ml)

Da der maximale Abbaugrad des CSB im Abwasser zu Methan nur bei ca. 80 % lag, wurden die beiden Abwasserteilströme (S-Ablauge und Waschwasser) getrennt auf ihre Abbaubarkeit hin untersucht. Abb. 15 zeigt die Methanbildung aus S-Ablauge, Waschwasser und Dünnlauge.

Entsprechend der höheren Substratkonzentration der S-Ablauge (41.000 mg/l CSB) war die hieraus gebildete Methanmenge am höchsten. Nach 10 Tagen betrug der CSB-Abbaugrad für die S-Ablauge 68 %, für das Waschwasser 79 % und für die Dünnlauge 67 %. Wie schon bei der Dünnlauge in unterschiedlichen Konzentrationen, kam es auch beim anaeroben Abbau der S-Ablauge und des Waschwassers zu einer Akkumulation von Essigsäure (Abb. 16).

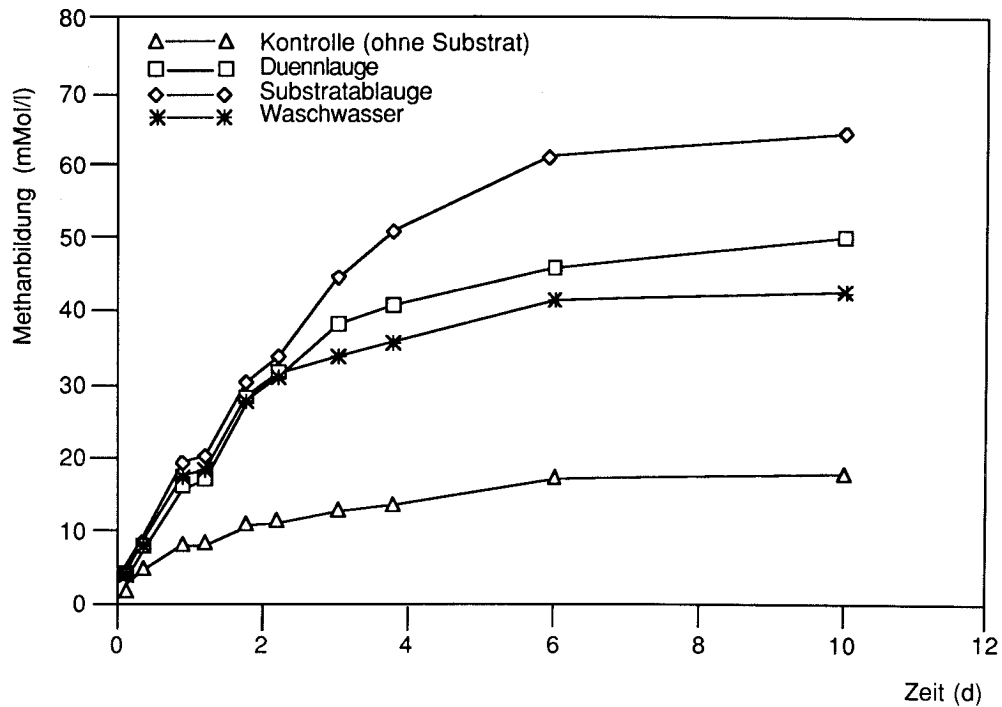


Abb. 15: Methanbildung bei Zugabe von je 5 ml S-Ablauge, Waschwasser und Dünnlauge zu 50 ml einer Anreicherungskultur

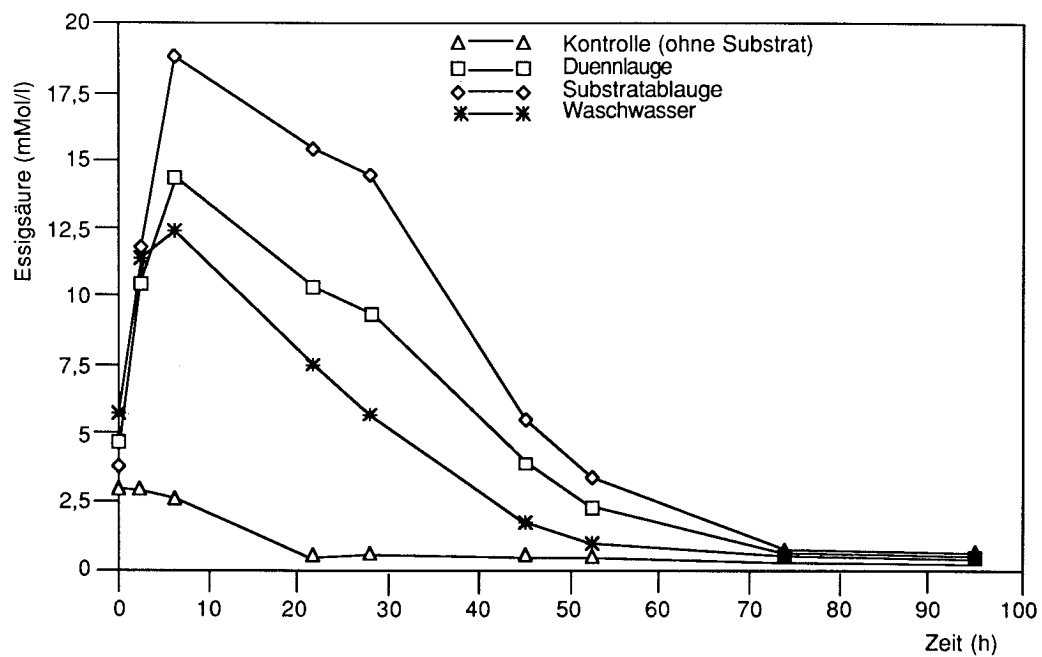


Abb. 16: Essigsäure-Bildung bei Zugabe von je 5 ml S-Ablauge, Waschwasser und Dünnlauge zu 50 ml einer Anreicherungskultur

Entsprechend der höheren organischen Belastung war beim Abbau der S-Ablauge sowohl die Essigsäure-Akkumulation als auch die Abbaurrate der Essigsäure am höchsten. Bei allen 3 Substraten sank die Essigsäure-Konzentration nach 3 Tagen auf unter 1 mMol/l.

Einfluß von Temperatur und pH-Wert

Zur Optimierung des anaeroben Abbaues des Abwassers bzw. einzelner Abwasserinhaltsstoffe wurde der Einfluß der Temperatur und des pH-Wertes auf die Methanbildung untersucht. Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde der Abbau der Dünnlauge zu Methan mit Hilfe eines Temperatur-Gradienten-Inkubators im Temperaturbereich von 5 - 80°C untersucht.

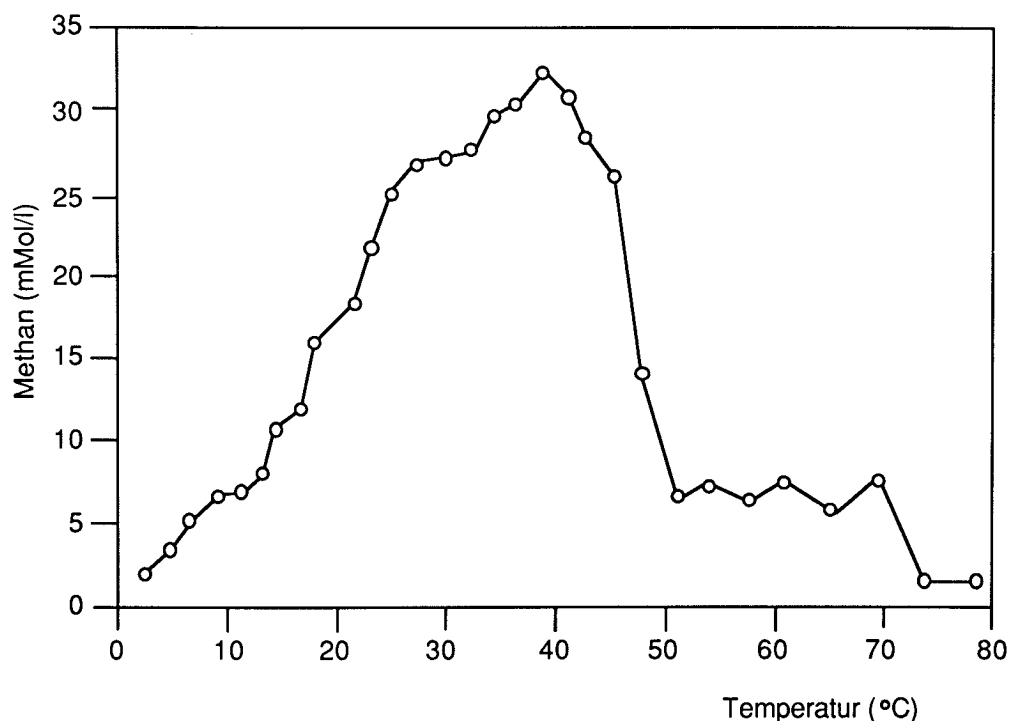


Abb. 17: Temperatur-Abhängigkeit der Methanbildung bei Abbau von Abwasser (5 ml) durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

Wie Abb. 17 zeigt, war die Methanbildung im mesophilen Temperaturbereich von 25°C - 45°C am höchsten. Das Temperaturoptimum lag bei etwa 37°C bis 39°C. Im unteren Temperaturbereich von 18°C - 30°C nahm die Methanbildung nur langsam ab, während sie oberhalb von 45°C steil abfiel.

Im mesophilen Bereich von 20°C - 45°C wurde Essigsäure fast vollständig abgebaut (Abb. 18).

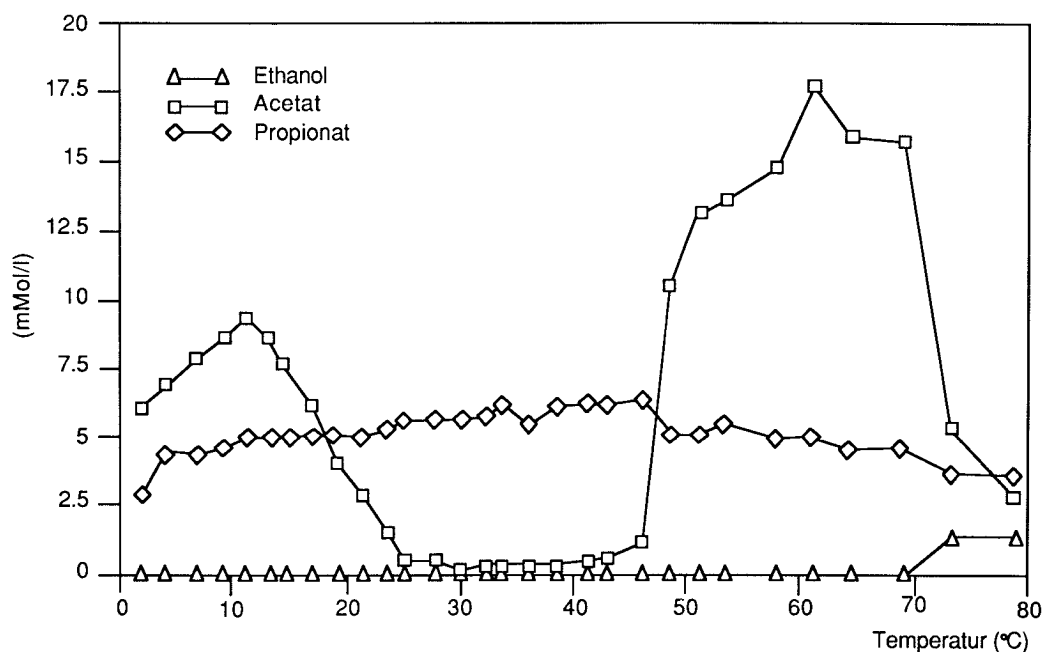


Abb. 18: Abhängigkeit der Ethanol-, Essigsäure- und Propionsäure-Konzentration von der Temperatur bei Abbau von Abwasser (5 ml) durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

Die höhere Essigsäure-Konzentration im Temperaturbereich oberhalb von 45°C deutete auf eine höhere Temperaturtoleranz der acetogenen im Vergleich zu den methanogenen Bakterien hin.

Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf die Methanbildung wurden je 50 ml der Anreicherungskultur mit

5 ml Dünnlauge bei 37°C und unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Der pH-Wert wurde mit anaerober 1N HCl bzw. 1N NaOH zweimal täglich korrigiert.

Abb. 19 und 20 zeigen die maximalen Methan- und Essigsäure-Bildungsraten bei verschiedenen pH-Werten. Der optimale pH-Wert lag bei 7,2. Für die Methanbildung war der optimale pH-Bereich relativ eng. Bereits geringe pH-Wert-Veränderungen hemmten die Methanbildung (halbmaximale Methanbildungsraten bei pH 6,4 und pH 8,1). Demgegenüber tolerierten die acetogenen Bakterien einen weiteren pH-Bereich (halbmaximale Essigsäurebildungsraten bei pH 5,5 und pH 8,6).

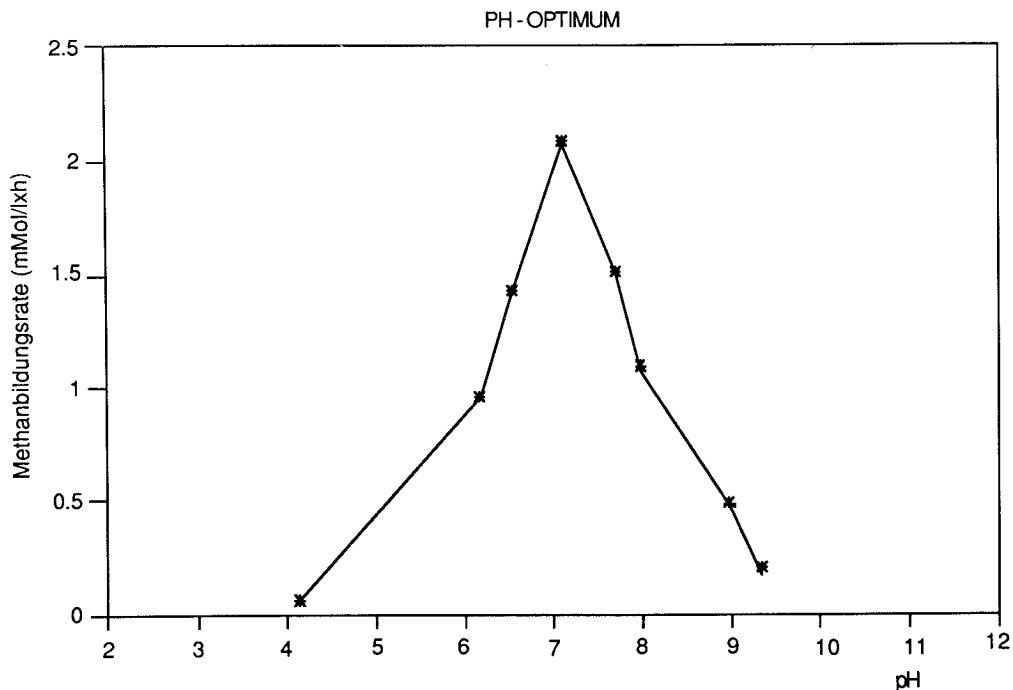


Abb. 19: Abhängigkeit der Methanbildung vom pH-Wert bei Abbau von Abwasser(5 ml) durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

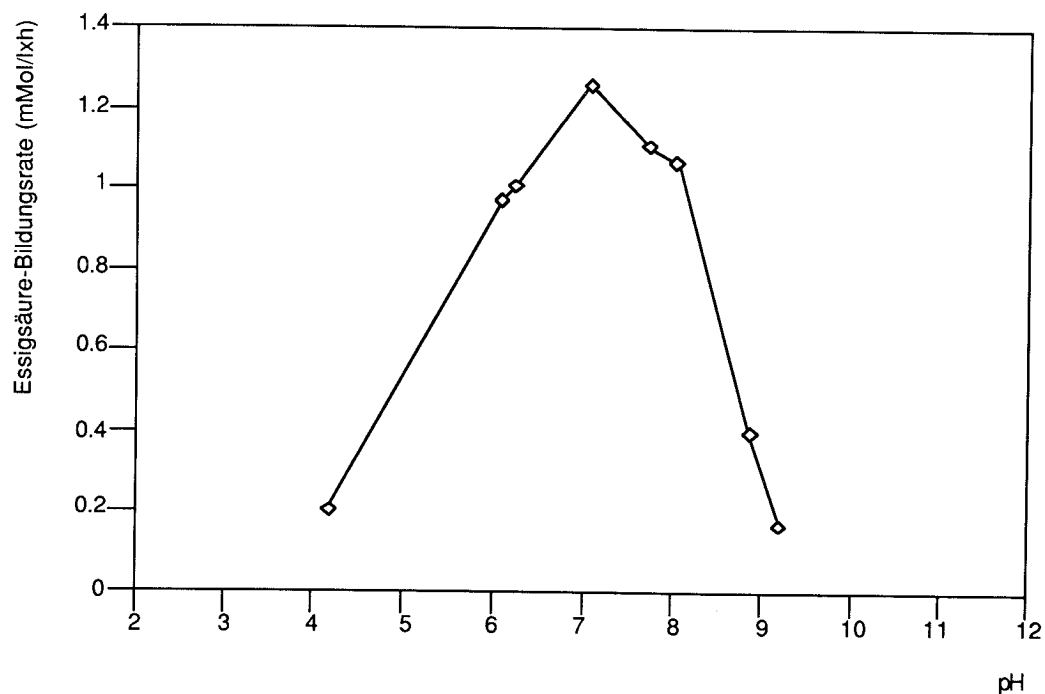


Abb. 20: Abhängigkeit der Essigsäure-Bildung vom pH-Wert bei Abbau von Abwasser (5 ml) durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

Einfluß von Phosphat, Ammoniumchlorid und Kaliumhexacyanoferrat

Wie die Abwasseranalysen ergeben hatten, lag Phosphat möglicherweise in zu niedriger Konzentration im Abwasser vor. Deshalb wurde der Einfluß weiterer Phosphat-Zugaben auf die Methanbildung aus der Dünnlauge untersucht. Ebenfalls getestet wurde der Einfluß von Abwasserinhaltsstoffen, die möglicherweise inhibierend auf die Methanbildung wirkten, wie Ammonium und Kaliumhexacyanoferrat. Untersucht wurde der Einfluß der genannten Substanzen auf den Abbau von jeweils 5 ml Dünnlauge zu Methan. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Eine Veränderung des C:N:P-Verhältnisses durch Zugabe von $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ führte zu keiner Verbesserung der Methanbildung. Der pH-Wert in allen Versuchsansätzen lag zwischen 7,04 und 7,16.

Phosphat (Zugabe von $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$):

Phosphatkonzentration (mMol/l):	0	2	5	10
Methanbildungsrate (ml/l.h):	6,4	6,2	2,8	3,7

Kaliumhexacyanoferrat (Kfc):

Kfc-Konzentration (mMol/l):	0	2	5	10
Methanbildungsrate (ml/l.h):	9,6	9,6	8,9	9,0

Ammoniumchlorid:

Ammoniumchlorid-Konzentration (mMol/l)	0	3,7	9,4	18,8	37,7	94,3
Methanbildungsrate (ml/l.h):	29,1	33,6	31,3	29,1	30,2	28,0

Tab. 7: Einfluß von Phosphat, Ammoniumchlorid und Kaliumhexacyanoferrat auf die Methanbildung bei Abbau von je 5 ml Abwasser durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

Phosphor liegt in der Dünnlauge, wie die Analysen gezeigt hatten, fast vollständig als Phosphat in einer Konzentration von 0,9 mMol/l vor. Auch eine 10fache Erhöhung dieser Konzentration führte zu keinem verbesserten Abbau des Abwassers.

Kaliumhexacyanoferrat wird als Komplexbildner der Melasse während der Citronensäure-Fermentation zugesetzt (Schulz u. Rauch, 1975). Ein Rest von ca. 0,3 g/l findet sich anschließend noch in der Ablauge, der überwiegende Teil als Berliner Blau oder als Komplexsalz ausgefallen (Ahrens, 1982).

Jedoch führte auch eine 10fach höhere Konzentration in Kurzzeitexperimenten zu keiner deutlichen Hemmung der Methanbildungsrate.

Der Gehalt an organischem Stickstoff in der Dünnlauge liegt bei etwa 0,6 g/l. Bei Zumischung von Abwasser aus der Citronensäure-Produktion mit Rübenmelassen als Ausgangssubstrat kann diese Konzentration aufgrund des höheren Stickstoff-Gehaltes (Betain) der Rübenmelassen (Schneider, 1968) steigen. Eine Hemmung der Methanbildung durch höhere NH_4Cl -Konzentrationen war jedoch bis zu einer Konzentration von 94 mMol/l nicht deutlich zu erkennen. Allerdings wirkt nur der undissoziierte NH_3 -Anteil toxisch, der vom pH-Wert abhängig ist (Kroiss, 1983).

Abbau einzelner Abwasserinhaltsstoffe

Die Zusammensetzung des untersuchten Abwassers schwankte je nach Melassequalität, Fermentationsprozeß und Lagerzeit des Abwassers. Bei sehr langen Lagerzeiten des Abwassers in den Vorratsbehältern kam es dort bereits zu einer Säuregärung (Ahrens, 1982). Da eine vollständige Analyse aller Abwasserinhaltsstoffe nicht möglich war, wurde der Abbau der analysierten Hauptinhaltsstoffe durch die Anreicherungskultur untersucht.

Während Essigsäure neben einigen anderen Substraten von den methanogenen Bakterien direkt verwertet werden kann (Mah u. Smith, 1981), erfolgt der Abbau der übrigen Verbindungen vorwiegend über Essigsäure als Zwischenprodukt (Gujer u. Zehnder, 1983). Folglich war nicht die Anfangsrate der Methanbildung alleine von Interesse, sondern auch der weitere Verlauf des Abbaues und die mögliche Akkumulation von Zwischenprodukten.

Zur Kontrolle wurde das Trockengewicht der Anreicherungskultur bestimmt sowie die endogene Methanbildung (ohne Substrat) und die Methanbildung aus 10 mMol/l Glucose als Vergleichssubstanz gemessen. Die Methanbildung aus 10 mMol/l Glucose lag bei $99 \pm 28 \mu\text{Mol CH}_4/\text{g TS.h}$.

Die Bestimmung der Methanbildungsraten in Kurzzeitexperimenten (1 - 8 h) gewährleistete, daß Einflüsse durch das Biomasse-Wachstum gering gehalten wurden. Aus dem anfänglichen Anstieg der Methanbildung wurden die Methanbildungsraten berechnet, wie in Abb. 21 am Beispiel der Buttersäure-Umsetzung gezeigt.

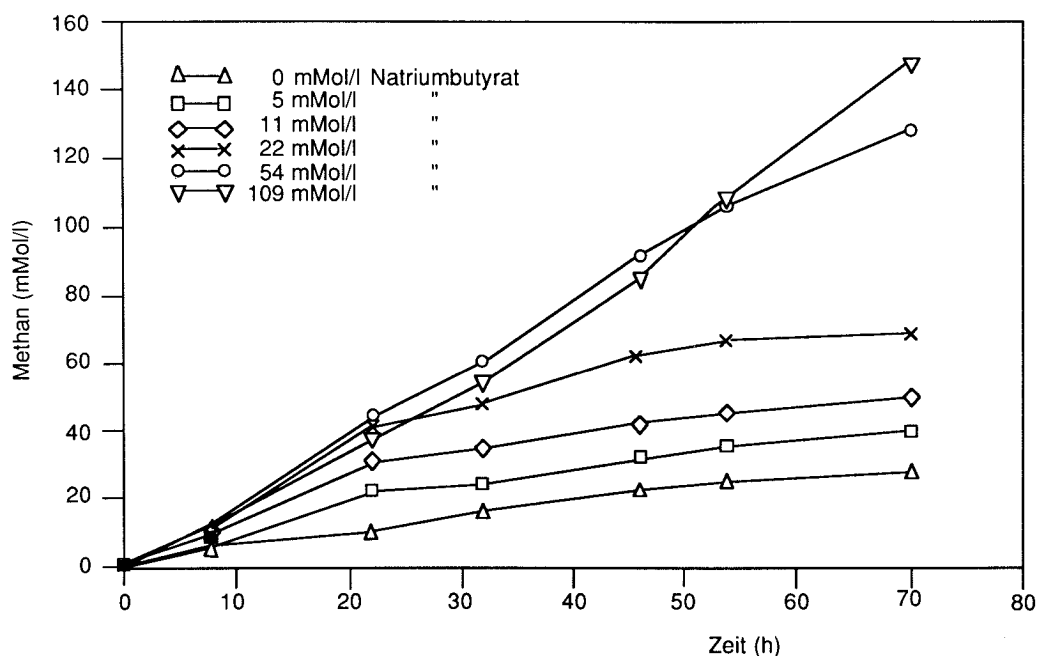


Abb. 21: Abbau von Natriumbutyrat (0 - 108,9 mMol/l) durch eine Anreicherungskultur

Zur Untersuchung des Einflusses einzelner Abwasserinhaltsstoffe auf die Methanbildung der Anreicherungskultur wurden die Substrat- und Inhibierungskonstanten, bezogen auf die Methanbildung, gemessen.

Die Methanbildungsrate der Kontrolle (ohne Zugabe von Substrat) wurde jeweils abgezogen. Ausnahmen waren Propionsäure und Citronensäure, die in höheren Konzentrationen zu einer niedrigeren Methanbildungsrate als die jeweilige Kontrolle führten.

Die Berechnung der K_s -Werte erfolgte nach dem bei Andrews u. Graef (1971) angegebenen Verfahren. Zur Bestimmung der Substratinhibierungskonstanten K_i diente folgende Gleichung:

$$K_i = \frac{S}{\frac{V_{\max}}{V} - \frac{K_s}{S}} - 1 \quad (\text{nach Andrews u. Graef, 1971})$$

mit:

V = gemessene Methanbildungsrate

$V_{\max}$ = maximale Methanbildungsrate

K_s = Substrat-Konstante

K_i = Inhibierungskonstante

Die Berechnung der K_s - und K_i -Werte erfolgte nach der Methode der kleinsten Quadrate (Nelder-Mead, modifizierte Simplex-Strategie, Programm W. Berke, 1982).

Abb. 22 zeigt die Methanbildungsraten für den Abbau von Kohlenhydraten in verschiedenen Konzentrationen. Für Glucose ergab sich ein K_s -Wert von 2,4 mMol/l und keine Substrathemmung im untersuchten Konzentrationsbereich bis 50 mMol/l.

Der K_s -Wert für Saccharose lag bei 4,0 mMol/l und hier konnte bis zu einer Konzentration von 20 mMol/l keine Hemmung der Methanbildung beobachtet werden. Dagegen zeigte sich bei Fructose eine Substratinhibierung in höheren Konzentrationen. Der berechnete K_s -Wert lag bei 1,4 mMol/l, der K_i -Wert bei 75,2 mMol/l.

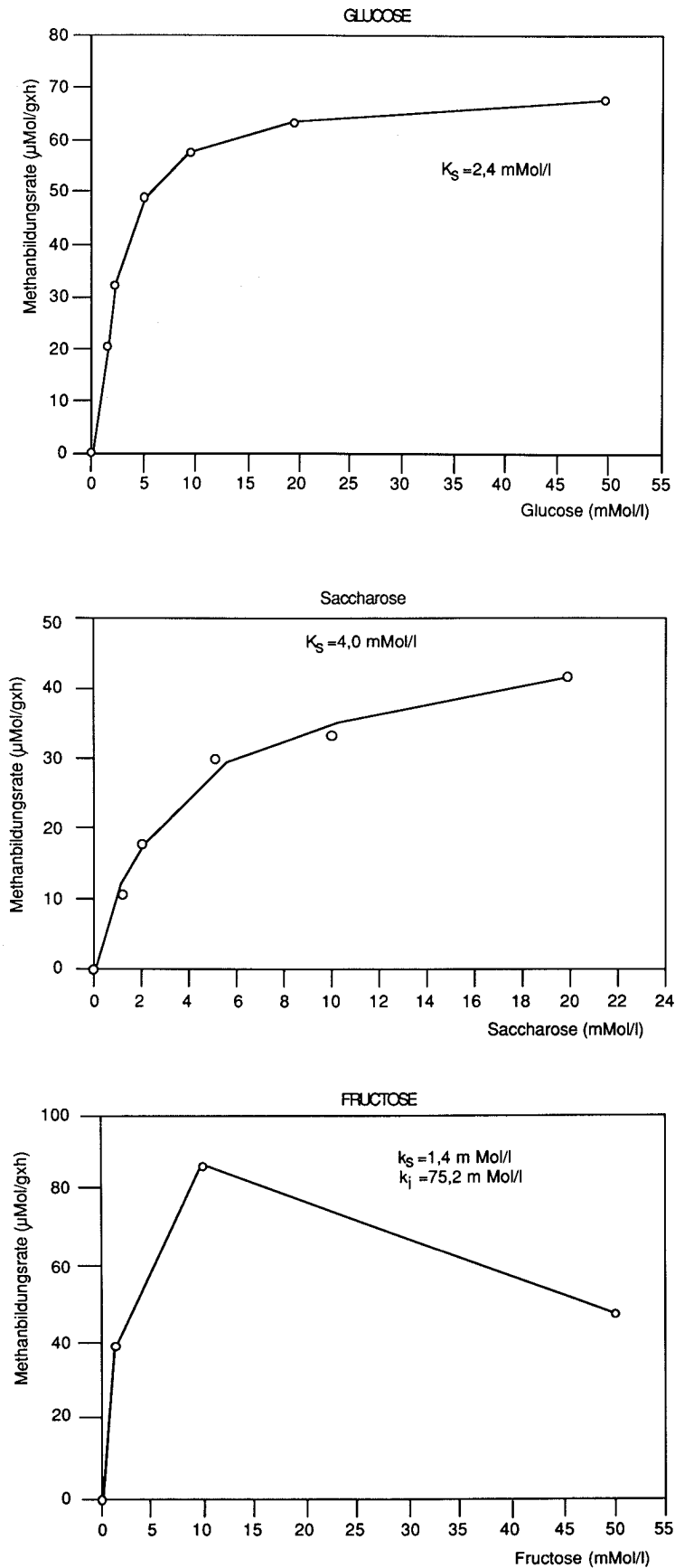


Abb. 22: Kinetik der Methanbildung bei Abbau von Glucose (0 - 50 mMol/l), Saccharose (0 - 20 mMol/l) und Fructose (0 - 50 mMol/l) durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

Abb. 23 zeigt die Methanbildungsraten für den Abbau niederer Fettsäuren durch die Anreicherungskultur. Für Essigsäure konnte bis zu einer Konzentration von 100 mMol/l keine Hemmung der Methanbildung gefunden werden. Der K_s -Wert wurde mit 4,3 mMol/l berechnet. Buttersäure dagegen zeigte in höheren Konzentrationen eine deutliche Substratinhibierung. Der K_s -Wert wurde mit 18,3 mMol/l berechnet, die Inhibierungskonstante K_i mit 36,6 mMol/l. Bei Propionsäure war auch bei niedrigen Konzentrationen eine Hemmung der Methanbildung zu beobachten. Offensichtlich wurde Propionsäure in den Kurzzeitexperimenten nicht abgebaut, vielmehr inhibierte bereits die niedrigste Konzentration die noch vorhandene Restaktivität der Anreicherungskultur.

Abb. 24 zeigt die Methanbildungsraten für den Abbau von Ethanol, Citronensäure und Milchsäure. Bei Ethanol ergab sich eine Substratinhibierung bei höheren Konzentrationen. Ein K_s -Wert von 7,1 mMol/l konnte errechnet werden, ein K_i -Wert von 390 mMol/l. Für Citronensäure wurde kein deutlicher Einfluß auf die Methanbildung gefunden. Milchsäure zeigte im Konzentrationsbereich bis 50 mMol/l keine Hemmung der Methanbildung. Der errechnete K_s -Wert lag bei 3,7 mMol/l.

Zwischenprodukte beim Abbau von Abwasserinhaltsstoffen

Bei den bisher durchgeführten Versuchen wurde der Einfluß einzelner Abwasserinhaltsstoffe allein auf die Methanbildung untersucht. Höhere Konzentrationen einzelner Inhaltsstoffe führten zur Akkumulation von Zwischenprodukten und zu einem Absinken des pH-Wertes. Bei den folgenden Versuchen wurden deshalb die gebildeten Zwischenprodukte analysiert und der pH-Wert registriert.

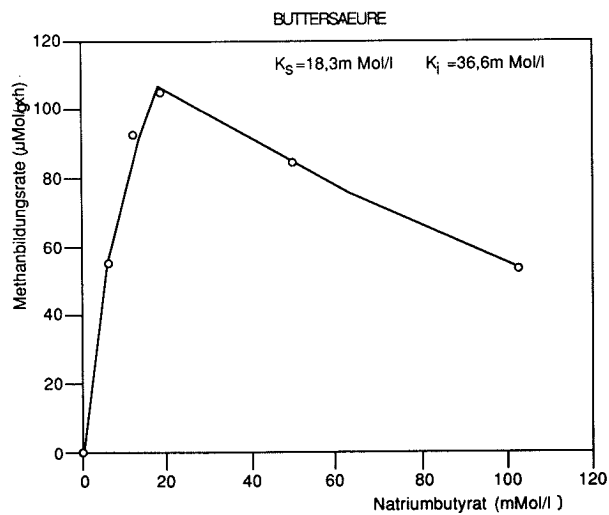
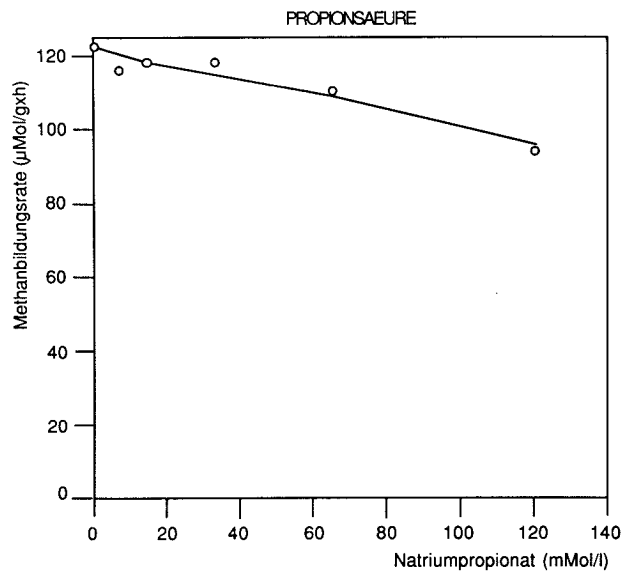
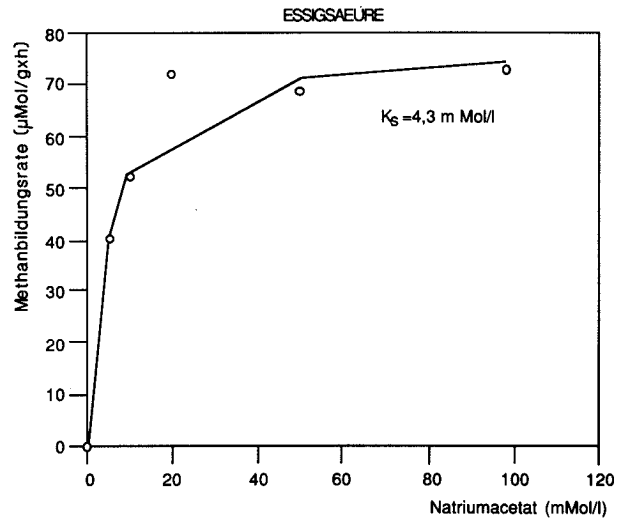


Abb. 23: Kinetik der Methanbildung bei Abbau von Natriumacetat (0 - 100 mMol/l), Natriumpropionat (0 - 120 mMol/l) und Natriumbutyrat (0 - 100 mMol/l) durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

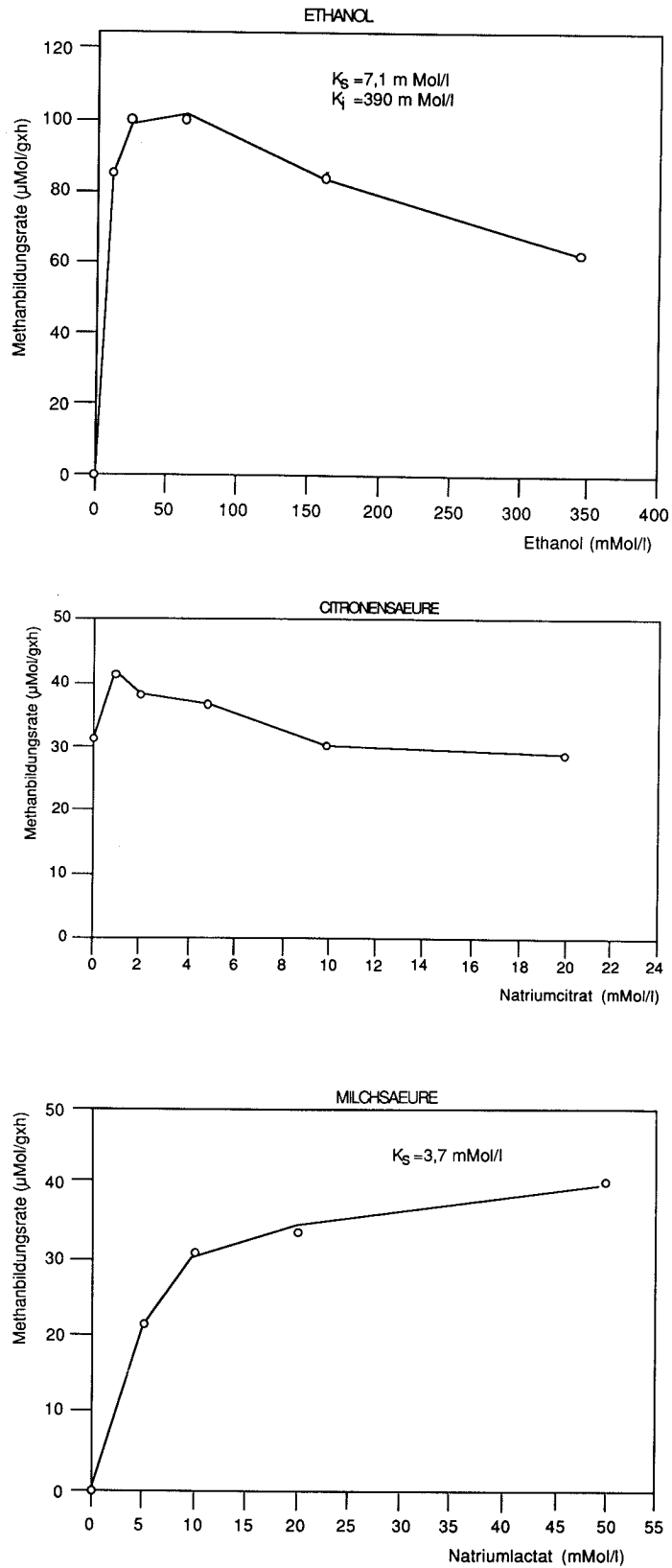


Abb. 24: Kinetik der Methanbildung bei Abbau von Ethanol (0 - 336 mMol/l), Natriumcitrat (0 - 20 mMol/l) und Natriumlactat (0 - 50 mMol/l) durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

Tab. 8 zeigt für den Abbau von Glucose (0 - 100 mMol/l) die Bildung von Methan und die Verteilung der Fermentationsprodukte nach 200 h. Zur Vermeidung von Störungen wurde die Anreicherungskultur nicht gewaschen, was dazu führte, daß in ihr noch vorhandene Zwischenprodukte im Verlaufe der Fermentation abgebaut wurden. Mit steigender Glucose-Zugabe kam es im Verlaufe der Fermentation zur Akkumulation von Fettsäuren und zu einem Absinken des pH-Wertes. Bei einer Glucose-Zugabe von 100 mMol/l sank der pH auf 5,07 ab und änderte sich bis zum Fermentationsende nicht mehr. Da die Aktivität der methanogenen Bakterien bei pH 5,0 nur noch bei etwa 15 % lag (bezogen auf die maximale Methanbildungsrate), nahm die gebildete Methanmenge mit steigender Glucose-Zugabe und fallendem pH-Wert ab. Gleichzeitig trat als Fermentationsprodukt vermehrt Essigsäure auf, daneben Ethanol und Buttersäure. Bei einem pH-Wert von 5,07 wurde anstelle von Essigsäure vermehrt Buttersäure gebildet.

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Fermentation wird noch deutlicher, wenn man die Produkte nach Zugabe von 50 mMol/l Glucose bei konstant gehaltenem und variablem pH-Wert vergleicht. Wurde der pH-Wert mit 1N NaOH konstant bei 7,2 gehalten, so war die Methanbildung etwa viermal so hoch wie bei einem pH-Wert von 6,08. Auch bei der Zusammensetzung der Fermentationsprodukte traten deutliche Unterschiede auf: bei neutralem pH-Wert wurden Ethanol und Buttersäure vollständig und Essigsäure weitgehend abgebaut, während die Propionsäure-Konzentration im Verlaufe der Fermentation nahezu unverändert blieb. Bei niedrigem pH-Wert war dagegen die Essigsäure-Konzentration fast viermal höher und Ethanol und Buttersäure waren ebenfalls noch nachweisbar. Propionsäure wurde auch hier nicht abgebaut.

Die bisherigen Abbauversuche hatten für Ethanol eine Substratinhibierung in höheren Konzentrationen ergeben. Dieser Effekt wurde ebenfalls unter pH-konstanten Bedingungen

Tab. 8: Fermentation von Glucose in unterschiedlicher Konzentration (0 - 100 mMol/l) durch eine Anreicherungskultur (50 ml).
 Angegeben sind die Methanbildung, der pH-Wert und die Verteilung der Produkte nach einer Fermentationsdauer von 200 h (Mittelwerte aus je 3 Ansätzen).

Glucose-Konz. (mMol/l) :	0	10	50	50	100
pH-Wert nach 200 h Fermentationsdauer :	7,40	7,31	6,08	7,20*	5,07
Methan (mMol/l) :	39,6	53,2	25,3	98,8	24,8
Ethanol (mMol/l) :	0	0	8,1	0	13,2
Essigsäure (mMol/l) :	0	2,3	50,9	9,9	45,2
Propionsäure (mMol/l):	9,8	14,1	19,2	20,1	24,2
Buttersäure (mMol/l) :	0	0	14,5	0	43,3

* pH-Wert mit 1 N NaOH konstant gehalten

untersucht. Dazu wurde eine Anreicherungskultur mit 68 mMol/l Ethanol gefüttert und die Fermentationsprodukte bei konstant gehaltenem und variablem pH-Wert analysiert. Wurde der pH-Wert nicht konstant gehalten, so fiel er innerhalb von 54 h auf pH 6,7 ab. Dies war zugleich der Zeitpunkt der maximalen Essigsäure-Akkumulation. Tab. 9 gibt die Fermentationsprodukte nach 54 h an.

	pH konstant (7,2):	pH variabel (6,7):
Ethanol:	0,0 mMol/l	0,0 mMol/l
Essigsäure:	63,2 mMol/l	49,7 mMol/l
Propionsäure:	3,6 mMol/l	16,4 mMol/l
Buttersäure:	0,0 mMol/l	0,0 mMol/l
Methan:	27,3 mMol/l	15,7 mMol/l
H-Bilanz:	0,95	0,92

Tab. 9: Abbau von Ethanol (68 mMol/l) bei konstantem (7,2) und variablem (6,7) pH-Wert

Die beim anaeroben Abbau von Ethanol gebildeten Fermentationsprodukte waren pH-Wert-abhängig. Bei einem konstanten pH-Wert von 7,2 wurde vor allem Essigsäure akkumuliert und Methan gebildet, was auf eine "M. omelianskii"-ähnliche Fermentation zu Methan hinwies. Daneben wurde auch etwas Propionsäure gebildet. Das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure lag bei 17 : 1. Wurde der pH-Wert im Verlaufe der Fermentation nicht konstant gehalten, so sank er auf pH 6,7 und es wurde weniger Essigsäure und Methan, dafür verstärkt Propionsäure gebildet. Das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure lag dann bei 3 : 1.

In den bisherigen Abbauversuchen war für Milchsäure keine Substratinhibierung gefunden worden. Bei einer Substratkonzentration von 50 mMol/l Milchsäure ergab sich kein deutlicher pH-Effekt (Tab. 10):

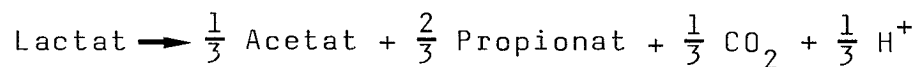
	pH-konstant (7,2):	pH-variabel (7,0)
Milchsäure:	0,0 mMol/l	0,0 mMol/l
Essigsäure:	24,0 mMol/l	24,5 mMol/l
Propionsäure:	16,6 mMol/l	19,6 mMol/l
Methan:	17,2 mMol/l	16,5 mMol/l
H-Bilanz:	1,00	0,94

Tab. 10: Abbau von Milchsäure (50 mMol/l) bei konstantem (7,2) und variablem (7,0) pH-Wert

Die Fermentationsprodukte bei hoher Milchsäure-Konzentration deuten auf einen Abbau sowohl durch sulfatreduzierende Bakterien hin, die noch vorhandene S-Komponenten als externen Elektronenakzeptor nutzen und Milchsäure nach folgender Gleichung abbauen:



als auch auf einen Abbau der Milchsäure über den Acrylat-Weg (Gottschalk, 1979):



Die hohe Propionsäure-Konzentration deutet weiterhin auf einen Abbau der Milchsäure über den Succinat-Weg hin:



Das Hauptzwischenprodukt beim anaeroben Abbau zu Methan stellt Essigsäure dar (Zeikus, 1983). Zur genauen Bestimmung der Kinetik des Essigsäureabbaues wurde eine Anreicherungskultur aus einem Rührkessel-Fermenter mit 2 mMol/l Natriumacetat gefüttert und der Abbau verfolgt. Abb. 25 zeigt den Abbau von 2 mMol/l Essigsäure über 8 Stunden.

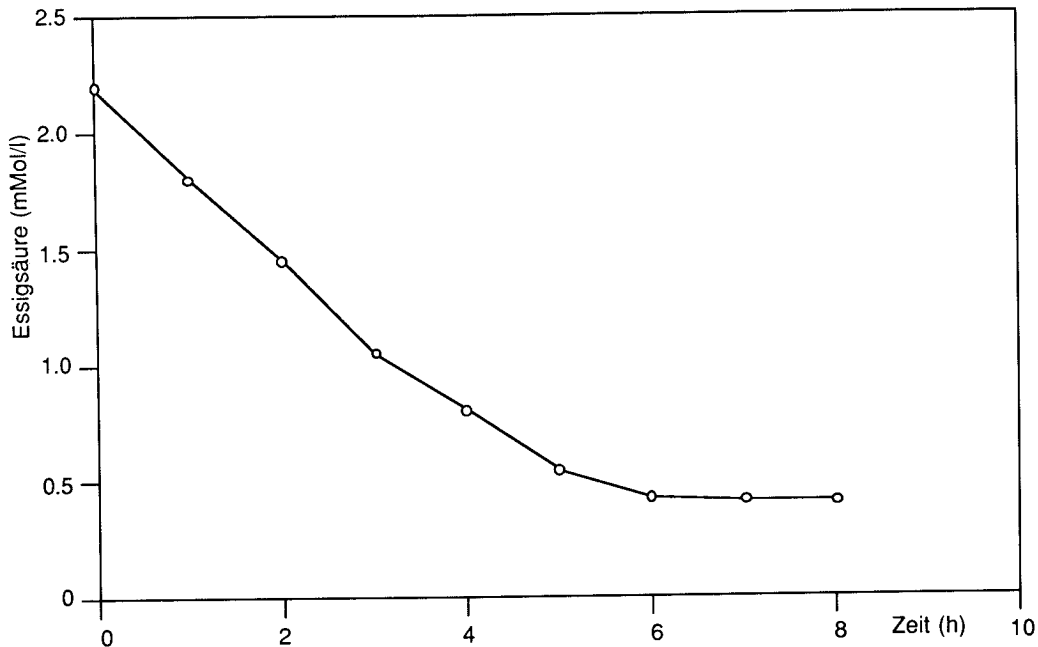


Abb. 25: Abbau von 2 mMol/l Na-Acetat durch eine Anreicherungskultur (50 ml) aus einem Rührkessel-Fermenter (HRT: 13 d)

Bei einer maximalen Abbaurrate von 0,6 mMol/l.h wurde aus der Steigung der Kurve nach Kaspar u. Wuhrmann (1978) ein K_s -Wert von 1,2 mMol/l berechnet.

Die Anreicherungskultur stammte aus einem Rührkessel-Fermenter, der das Abwasser bei einer hydraulischen Verweilzeit von 13 Tagen zu 73 % abbaute. Die stationäre Essigsäure-Konzentration lag bei 0,9 - 1,5 mMol/l.

Abb. 26 zeigt den Abbau von Essigsäure durch eine Anreicherungskultur aus einem anaeroben Filter, der mit einer hydraulischen Verweilzeit von 1,7 Tagen betrieben wurde. Bei einer maximalen Abbaurrate von 0,4 mMol/l.h konnte aus der Steigung der Kurve ein K_s -Wert von 6 mMol/l berechnet werden. Dieser Wert entspricht etwa dem für Methanosarcina

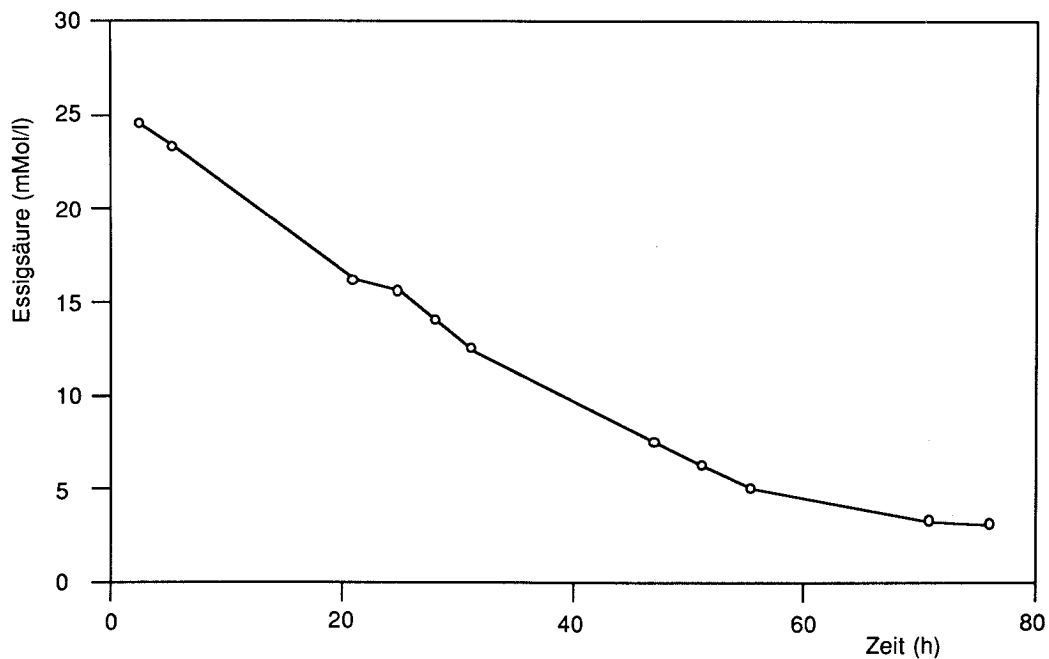


Abb. 26: Abbau von Essigsäure (26,5 mMol/l) durch eine Anreicherungskultur (50 ml) aus einem anaeroben Filter (HRT: 1,7 d)

barkeri bestimmten K_s -Wert von 3 - 5 mMol/l (Smith u. Mah, 1978; Schönheit et al., 1982). In den fluoreszenzmikroskopischen und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Anreicherungskultur waren zahlreiche Methanosarcinen zu erkennen (Abb. 62).

Eine Verbesserung des Essigsäure-Abbaues zu Methan sollte durch Erhöhung der Biomasse-Konzentration der essigsäureabbauenden Methanbakterien möglich sein (Kolot, 1981). Dazu wurde einer Anreicherungskultur (0,79 g/l TS) aus einem Rührkessel-Fermenter 20 Vol. % einer Reinkultur von Methanosarcina barkeri (DSM 804) (0,80 g/l TS) zugesetzt. Die M. barkeri-Kultur baute Natriumacetat (125 mMol/l) mit einer Verdopplungszeit von 16 - 21 h ab (Schug u. Sahm, 1983). Die Anfangskonzentration an Essigsäure betrug 6 mMol/l (Abb. 27).

Nach Zugabe der *M. barkeri*-Kultur verbesserte sich die Abbaurrate von Essigsäure nur geringfügig von 0,18 mMol/l.h auf 0,20 mMol/l.h. Der K_s -Wert veränderte sich ebenfalls nur geringfügig von 1,4 mMol/l auf 1,0 mMol/l.

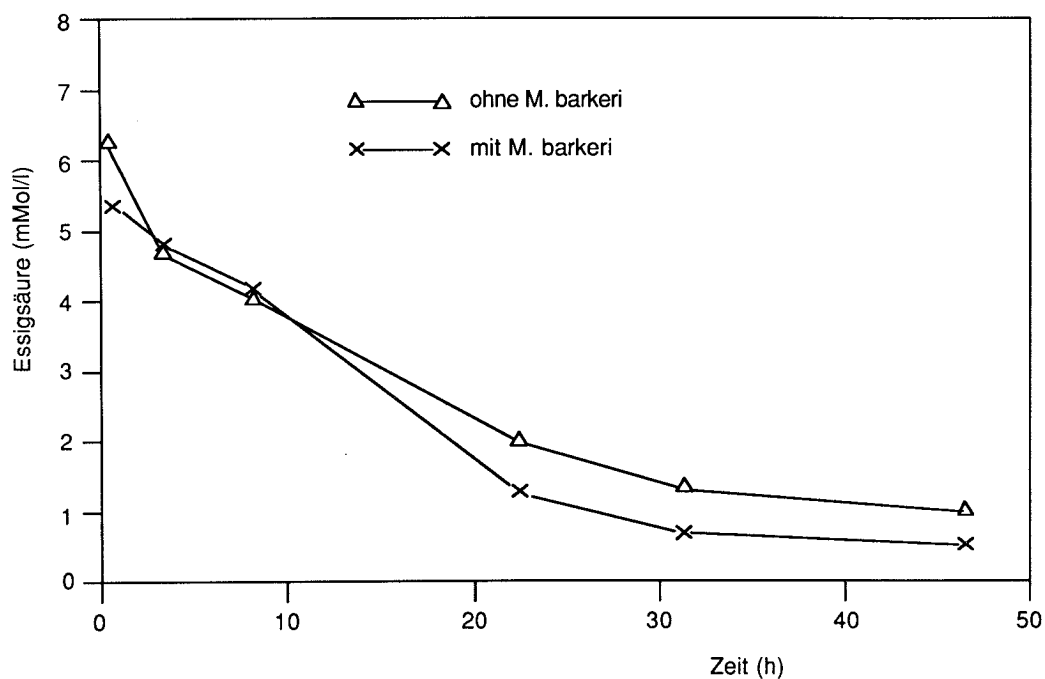
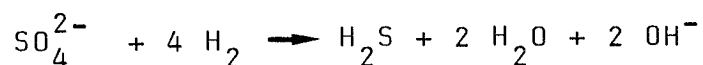


Abb. 27: Abbau von Essigsäure durch eine Anreicherungskultur (50 ml; 0,79 g/l TS) aus einem Rührkessel-Fermenter mit und ohne Zugabe von *Methanosarcina barkeri* (10 ml; 0,80 g/l TS)

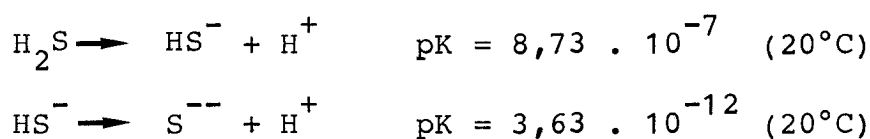
Untersuchungen zur Hemmung der Methanbildung

Bei der Analyse des Abwassers war für Sulfat eine Konzentration von 0,9 - 2,6 g/l bestimmt worden. Entsprechend folgender Gleichung:



wird aus Sulfat durch sulfatreduzierende Bakterien Sulfid gebildet.

Damit treten die sulfatreduzierenden Bakterien in Konkurrenz zu den methanogenen Bakterien um Wasserstoff (Robinson u. Tiedje, 1984). Zugleich wirkt das gebildete Sulfid in höheren Konzentrationen toxisch auf Methanbakterien (Postgate, 1984). Zunächst wurde der Einfluß von Sulfid auf die Methanbildung der Anreicherungskultur untersucht. Nach Kroiss (1981) inhibiert allein der undissoziierte Anteil des H_2S die methanogenen Bakterien. H_2S dissoziiert in Wasser in HS^- und S^{2-} :



(pK-Werte aus: D'Ans u. Lax: Taschenbuch für Chemiker und Physiker, 1967).

Der undissoziierte Anteil f des H_2S läßt sich berechnen nach:

$$f = 1 / (1 + (1,02 \cdot 10^{-7} / 10^{-\text{pH}}))$$

Um den Einfluß von H_2S auf die Methanbildung zu untersuchen, wurde der Abbau von 5 ml Abwasser bei steigenden Na_2S -Konzentrationen verfolgt (bb. 28).

Mit steigender Na_2S -Zugabe nahm die Methanbildung ab. Aus den Steigungen der Methanbildung wurden die Methanbildungsraten berechnet und gegen die Konzentration des undissoziierten H_2S für jeden Ansatz aufgetragen (Abb. 29). (Zur Kontrolle wurde bei Versuchsende die gebildete H_2S -Menge mit Hilfe von DRÄGER-Gasröhrchen gemessen). Aus dem Verlauf der Kurve konnte ein K_i -Wert von 27,5 mmol/l H_2S berechnet werden.

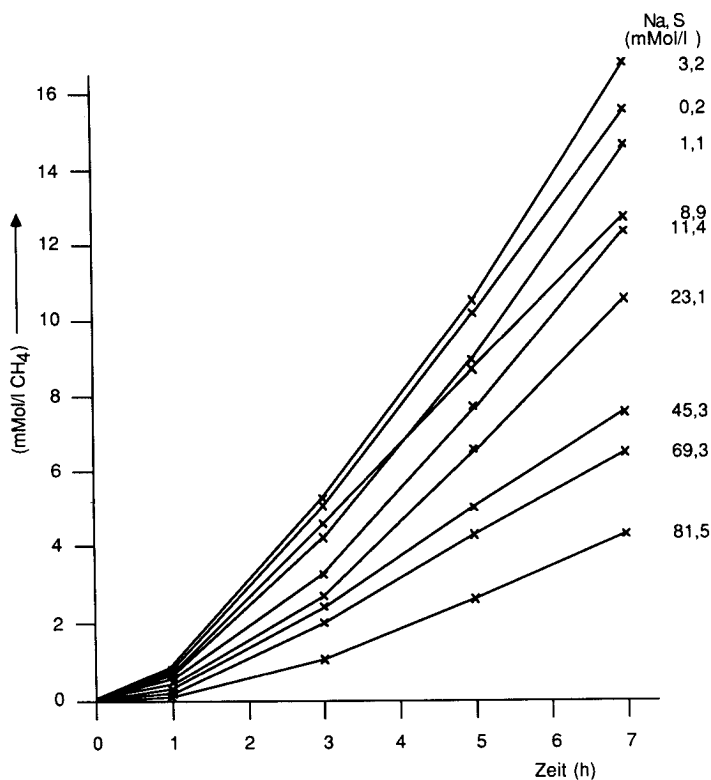


Abb. 28: Abbau von 5 ml Abwasser bei steigender Na₂S-Zugabe (0 - 81,5 mMol/l) zu Methan durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

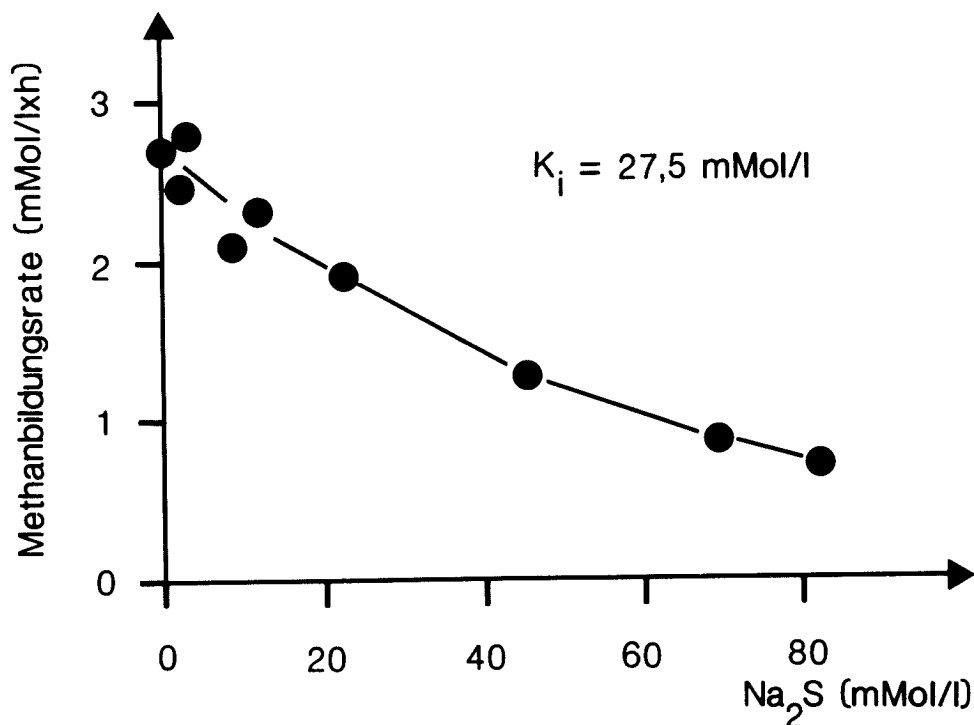


Abb. 29: Abhängigkeit der Methanbildungsraten von der Na₂S-Konzentration bei Abbau von 5 ml Abwasser durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

Nachdem ein hemmender Einfluß von Sulfid auf die Methanbildung der Anreicherungskultur gezeigt werden konnte, wurde im folgenden der Einfluß höherer Konzentrationen von Sulfat auf den Abbau des Abwassers untersucht (Abb. 30).

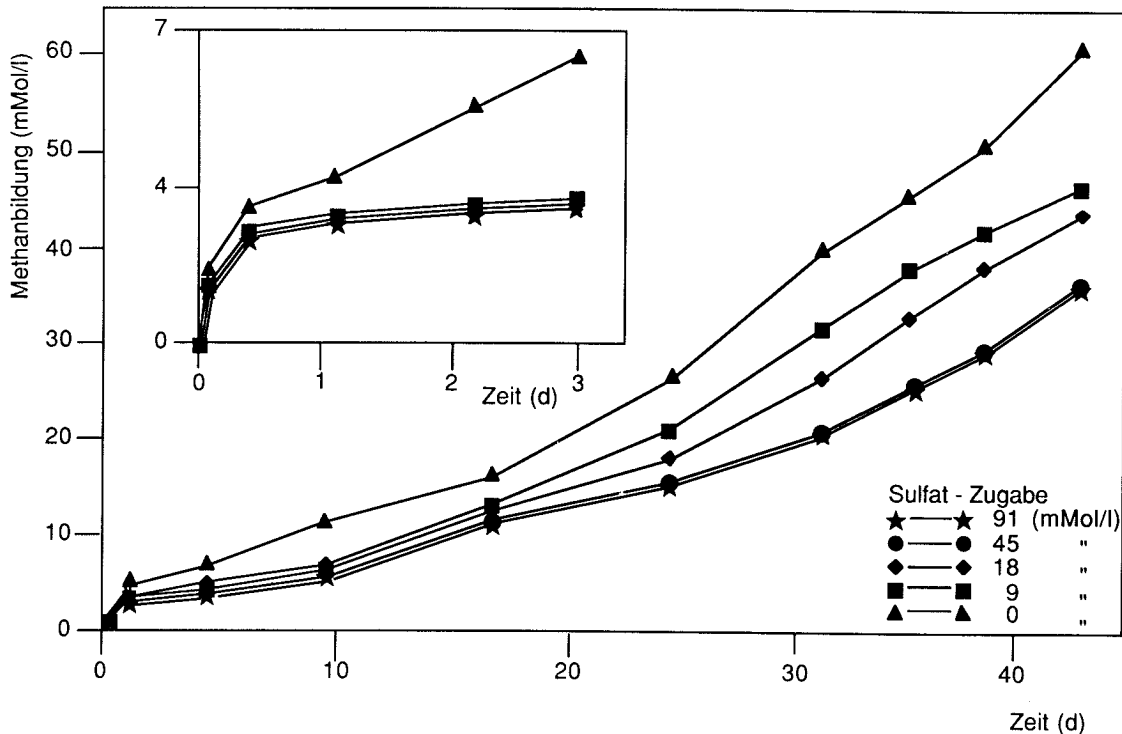


Abb. 30: Einfluß verschiedener Na-Sulfat-Konzentrationen (0-91 mM) auf die Methanbildung bei Abbau von 5 ml Abwasser durch eine Anreicherungskultur (50 ml). Der Einschub gibt eine Vergr. der ersten 80 Stunden.

Höhere Sulfat-Konzentrationen im Abwasser hemmten die Methanbildung. Diese Hemmung verlief in zwei Phasen: in der ersten Phase wurde die Methanbildung aus der Dünnlauge (nach anfänglichem Anstieg der Methanmenge, bedingt durch Ausgasen der Proben) bei allen Sulfat-Konzentrationen zu 64 % - 74 % gehemmt (Tab. 11):

Sulfat-Konzentrationen (mMol/l):	Anfangs-Methanbildungsrate (μ Mol/l.h):	Methanbildungsrate nach 25 Tagen (μ Mol/l.h):
0	74,1	71,6
9	22,4	72,7
18	19,0	54,3
45	26,8	44,7
91	25,8	30,8

Tab. 11: Einfluß von Sulfat (0 - 91 mMol/l) auf die Methanbildung aus 5 ml Abwasser durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

Die Hemmung war jedoch nicht vollständig, vielmehr betrug die Restaktivität noch etwa ein Viertel der Kontrolle (ohne Sulfat). In der zweiten Phase stieg die Rate der Methanbildung bei den Ansätzen mit niedriger Sulfat-Zugabe. Nach 25 Tagen verlief der Anstieg der Methanbildung bei Zugabe von 9 mMol/l Sulfat parallel zur Kontrolle ohne Sulfat-Zugabe.

Im folgenden wurde der Einfluß der im Abwasser enthaltenen Sulfat-Menge auf die Methanbildung untersucht. Da bei einer niedrigen Sulfat-Konzentration hauptsächlich die Konkurrenz um den verfügbaren Wasserstoff die Methanbildung beeinflusst, sollte die aus dem Abwasser produzierte Methanmenge vermindert sein um die im Abwasser enthaltene Sulfat-Menge.

Zunächst wurde die genaue Sulfat-Konzentration im Abwasser bestimmt, 14 mMol/l, und anschließend mit BaCl_2 gefällt. Nach der Fällung betrug die Sulfat-Menge noch 0,6 mMol/l im Abwasser. 50 ml einer Anreicherungskultur wurden jeweils 5 ml des Abwassers zugesetzt. Damit lag die Anfangs-Sulfat-Konzentration bei 1,27 mMol/l bzw. 0,05 mMol/l. Die gebildete Methanmenge nach 56 h lag bei $23,84 \pm 0,88$ mMol/l Methan für das Original-Abwasser und $25,93 \pm 0,60$ mMol/l

Methan für das Abwasser nach Sulfat-Fällung. Abb. 31 zeigt die Methanbildung aus dem Sulfat enthaltenden Abwasser und aus dem Abwasser nach der Fällung des Sulfats.

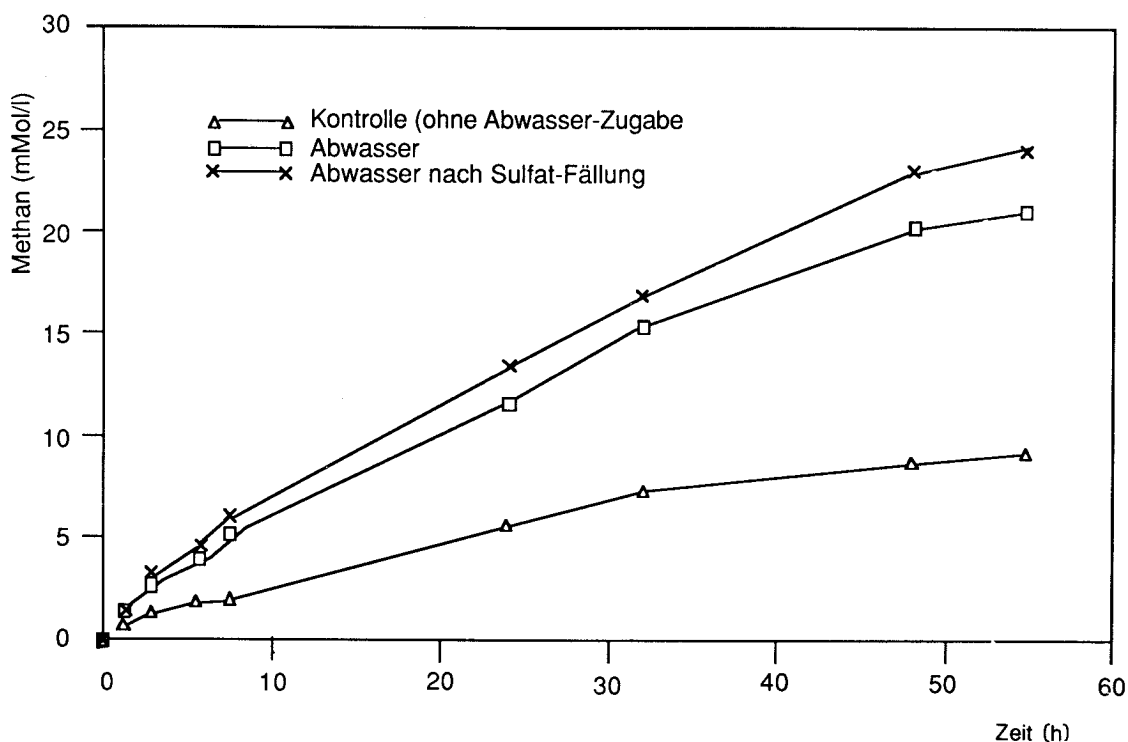


Abb. 31: Methanbildung aus 5 ml Abwasser vor und nach Fällung des darin enthaltenen Sulfats (14 mMol/l) durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

Chloroform ist ein bekannter Inhibitor der Methanbildung (Thiel, 1969; Baresi et al., 1978). Durch die Wahl der geeigneten Konzentration sollte es möglich sein, im anaeroben Abbau des Abwassers selektiv die methanogenen Bakterien zu hemmen und damit eine Anreicherung von Zwischenprodukten zu erzielen. Deshalb wurde zunächst der Einfluß unterschiedlicher Chloroform-Konzentrationen auf den Abbau des Abwassers untersucht. Eine Anreicherungskultur wurde mit 10 % (Vol/Vol) Abwasser gefüttert und Chloroform in einer Konzentration von 0 - 22 μ Mol/l zugesetzt (Abb. 32).

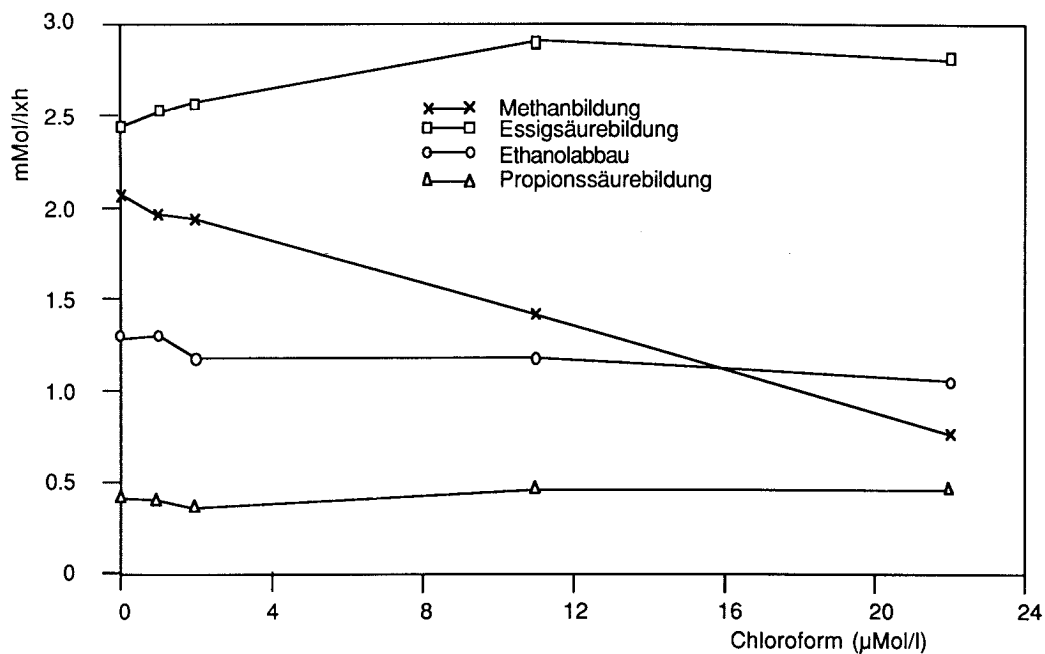


Abb. 32: Einfluß von Chloroform (0 - 22 µMol/l) auf den Abbau von 5 ml Abwasser durch eine Anreicherungs-kultur (50 ml)

Im Konzentrationsbereich von 0 - 22 µMol/l Chloroform wurde kein Einfluß auf die Bildung der Intermediärprodukte Essigsäure und Propionsäure aus dem Abwasser gefunden. Der Abbau von im Abwasser enthaltenen Ethanol wurde bei der höchsten Chloroform-Konzentration (22,1 µMol/l) zu 22 % gehemmt. Die Methanbildungsrate wurde dagegen durch Chloroform stark gehemmt. Die Hemmung verlief im untersuchten Konzentrationsbereich von Chloroform fast linear zur Chloroform-Konzentration ($K = 0,999$). Bei einer Chloroform-Konzentration von 17,5 µMol/l wurde die Methanbildung zu 50 % gehemmt.

Im folgenden wurde der kombinierte Einfluß von Chloroform und Sulfat auf den anaeroben Abbau des Abwassers untersucht. Chloroform hemmt die methanogenen Bakterien und verhindert so die Entfernung intermediär gebildeten Wasserstoffes über die Methanbildung. Durch Fällung des in der Dünnlauge enthaltenen Sulfats wird weiterhin ein möglicher externer Elektronenakzeptor für sulfatreduzierende Bakterien entfernt. Abb. 33 zeigt den Einfluß von Chloroform (48 $\mu\text{Mol/l}$) auf den anaeroben Abbau des Abwassers mit und ohne Sulfat zu Methan. Eine Chloroform-Konzentration von 48 $\mu\text{Mol/l}$ hemmte die Methanbildung in allen Ansätzen vollständig. Nach Sulfat-Fällung stieg die Methanbildungsrate von 1,83 mMol/l.h auf 2,03 mMol/l.h (+ 11 %).

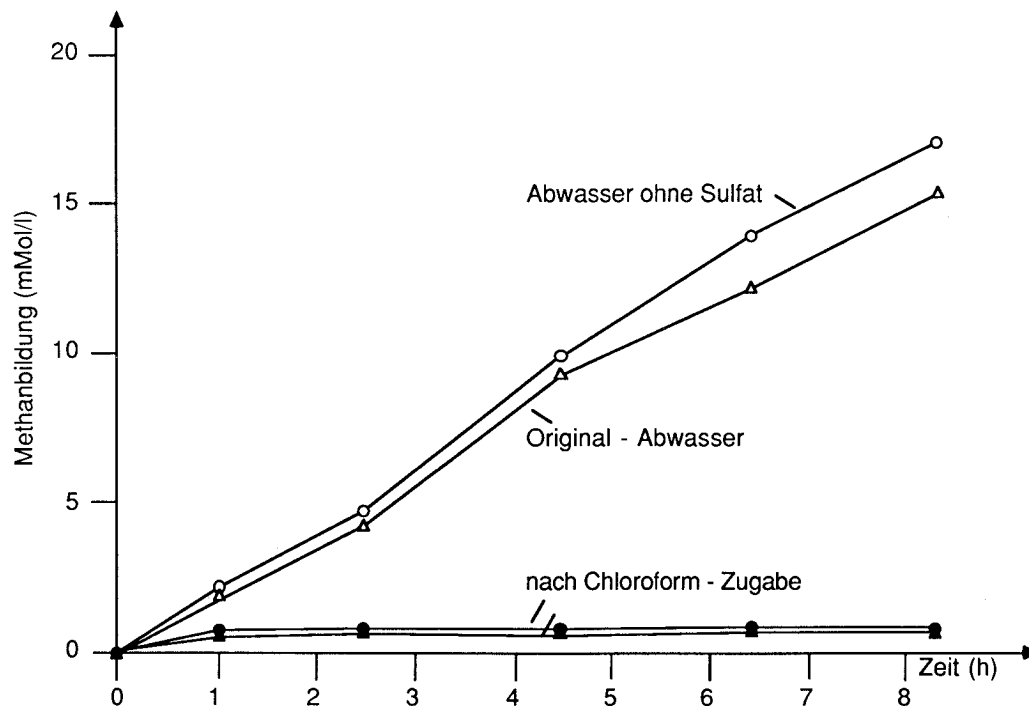


Abb. 33: Einfluß von Chloroform (48 $\mu\text{Mol/l}$) auf den Abbau von 5 ml Abwasser mit (14 mMol/l) und ohne Sulfat zu Methan durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

Beim Abbau des Abwassers trat Essigsäure als Intermediärprodukt auf (Abb. 34). Enthielt der Ansatz Chloroform, so war die Essigsäure-Akkumulation höher, da der weitere Abbau zu Methan inhibiert wurde. Im Vergleich zum Original-Abwasser war die Akkumulationsrate von Essigsäure niedriger, wenn das Abwasser kein Sulfat mehr enthielt. Hierbei entfiel die Möglichkeit, Sulfat als externen Elektronenakzeptor nutzen zu können:

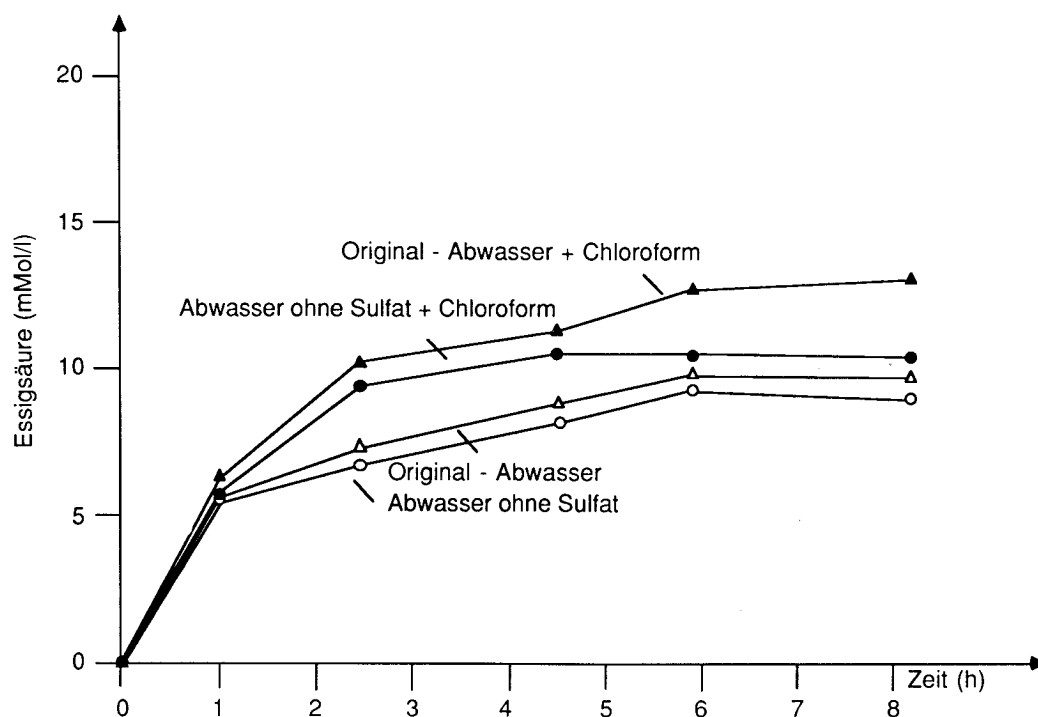
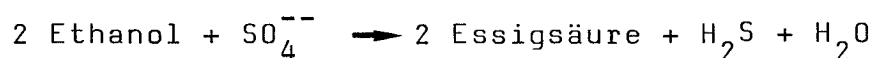


Abb. 34: Einfluß von Chloroform (48 $\mu\text{Mol/l}$) auf die Essigsäure-Bildung aus 5 ml Abwasser mit (14 mMol/l) und ohne Sulfat durch eine Anreicherungskultur (50 ml)

3.2.3 Kontinuierlicher Abbau des Abwassers

Rührkessel-Fermenter

Der anaerobe Abbau des Abwassers aus der Citronensäure-Produktion wurde zunächst in Rührkessel-Fermentern mit einem Arbeitsvolumen von 10,75 l untersucht. Ausgehend von einer an das Abwasser adaptierten Anreicherungskultur, die von der Fa. J. A. Benckiser zur Verfügung gestellt wurde, wurde zunächst eine hydraulische Verweilzeit (HRT) von 13,3 Tagen eingestellt. Im chemostatischen Betrieb führte eine Verkürzung der Verweilzeit zu einem Anstieg der Fettsäure-Konzentrationen im Fermenterablauf, verbunden mit einer pH-Wert-Erniedrigung. Abb. 35 zeigt dies am Beispiel der Verkürzung der hydraulischen Verweilzeit von 5,8 Tagen auf 3,3 Tage. Die Konzentrationen an Essigsäure und Propionsäure stiegen sofort an. Deutlich wurde weiterhin, daß bei dieser kurzen Verweilzeit die Konzentrationen der Fettsäuren und die Rate der Methanbildung größeren Schwankungen unterworfen waren. Die H_2 -Konzentration im Biogas lag mit etwa 0,02 % an der Nachweisgrenze.

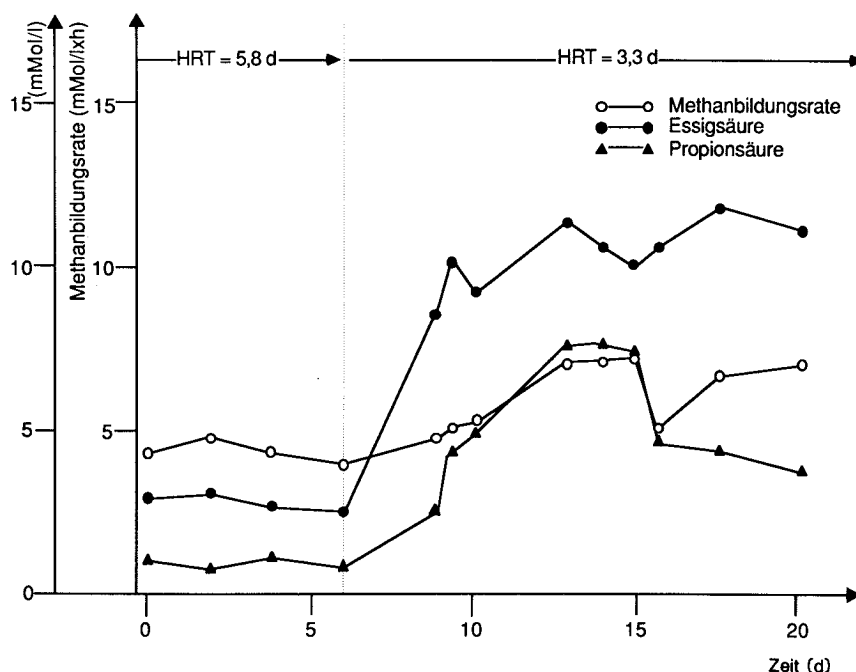


Abb. 35: Einfluß der Verkürzung der HRT von 5,8 auf 3,3 Tage auf die Fettsäure-Konzentration und die Methanbildung im Rührkessel-Fermenter

Eine Zusammenfassung der bei verschiedenen hydraulischen Verweilzeiten erzielten Abbauleistungen sowie der jeweiligen Ablaufkonzentrationen der Fettsäuren geben Abb. 36 und 37.

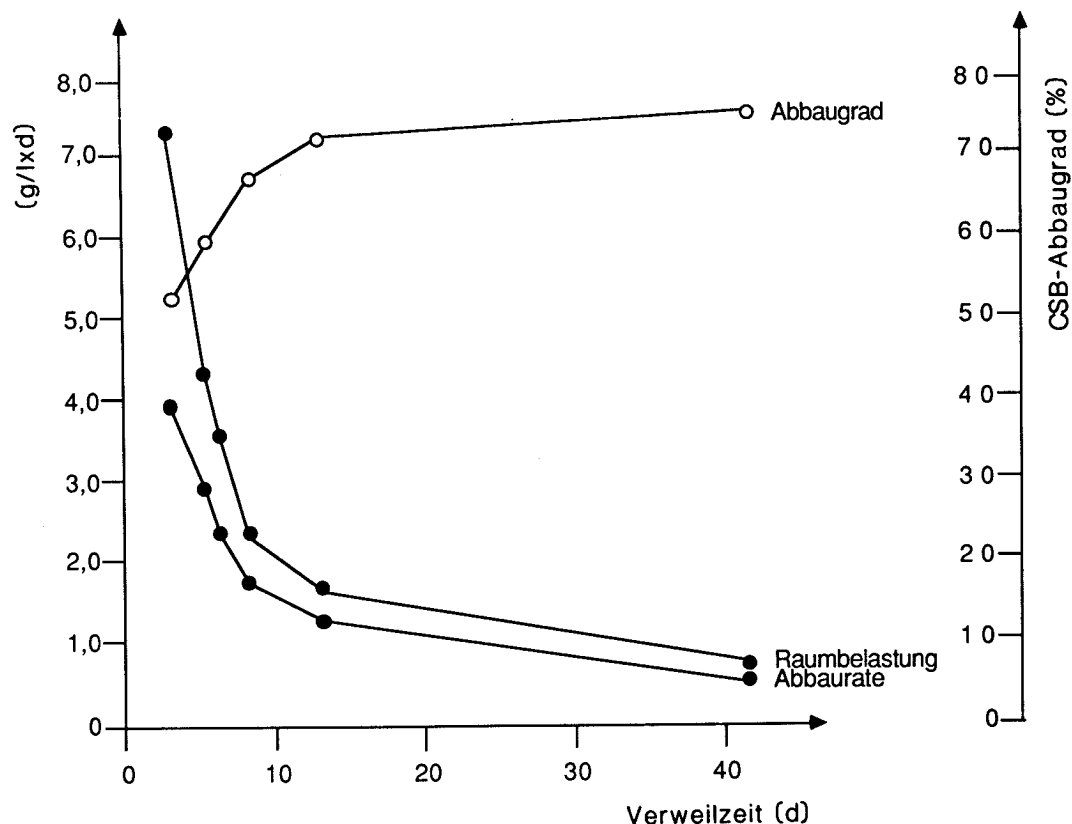


Abb. 36: Abbauleistungen in Rührkessel-Fermentern bei verschiedenen hydraulischen Verweilzeiten (Zulauf von unten)

Die Raumbelastung stieg bei Verringerung der hydraulischen Verweilzeit von 43,0 auf 3,3 Tage in Abhängigkeit von der Substratkonzentration von 0,7 kg/m³.d auf 7,3 kg/m³.d CSB. Die Abbaurrate nahm jedoch nur von 0,5 kg/m³.d auf 3,9 kg/m³.d zu. Bei hydraulischen Verweilzeiten unter 6 Tagen lag der Abbaugrad nur noch bei 50 - 60 %. Die organischen Schmutzstoffe im Abwasser wurden nicht mehr vollständig abgebaut und die Konzentration der intermediär gebildeten Fettsäuren im Fermenterablauf nahm zu. Die hohe Essigsäure-Konzentration von 9,7 bis 12,5 mMol/l bei einer hydraulischen Verweilzeit von 3,3 Tagen kann bereits den weiteren Abbau von Propionsäure inhibieren (Zehnder u. Koch, 1983).

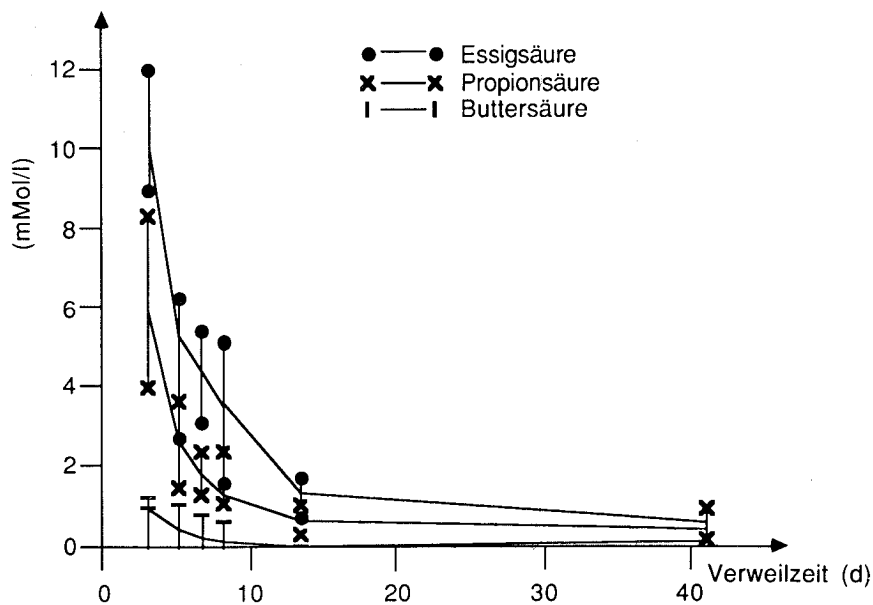


Abb. 37: Ablaufkonzentrationen an Fettsäuren bei Abbau des Abwassers in Rührkessel-Fermentern (Zulauf von unten) in Abhängigkeit von der hydraulischen Verweilzeit

Der Abbau des Kohlenstoffes im Abwasser verlief ähnlich wie der Gesamtabbau, gemessen als CSB-Abbaugrad (Tab 12):

	<u>Kohlenstoff:</u>			<u>CSB:</u>	
	gC/l:	Mol C/l:	%:	mg CSB/l:	%:
<u>Zulauf:</u>					
Gesamt C (org.)	13,11	1,09	100	28.813	100
<u>Ablauf:</u>					
Gelöster C					
organisch (DOC):	2,93	0,24	22,4	8.039	27,9
anorgan. (TIC):	1,49	0,12	11,3	-	-
partikulär gebundener C (POC):	0,74	0,06	5,6	1.432	5,0
Biogas* (15,24 l/l Abw.)	7,33	0,61	55,9	19.342	67,1
			95,2 %		100 %

*berechnet für 20°C und 47,7 % CH₄; 48,5 CO₂; 2,3 % H₂O; 1,5 % H₂S)

Tab. 12: Kohlenstoff- und CSB-Bilanz bei kontinuierlichem Abbau des Abwassers in einem Rührkessel-Fermenter (HRT: 8,9 Tage)

Etwa 5,6 % des zugeführten Kohlenstoffes und 5,0 % des CSB des Abwassers wurden in Biomasse eingebaut. Zusammen mit der in gelöster Form vorliegenden Restbelastung betrug der Kohlenstoff-Abbaugrad 72,0 % und der CSB-Abbaugrad 67,1 %.

Das im Ablauf des Rührkessel-Fermenters vorhandene Sulfid wurde aus dem im Zulauf enthaltenen Sulfat gebildet. Etwa 76 % der S-Konzentration im Abwasser lag als Sulfat vor (Tab. 13):

	mg S/l:	Mol S/l:	Bilanz:
<u>Zulauf:</u>			
- Gesamt-S:	650	0,0203	100,0 %
- Sulfat:	493	0,0154	75,9 %
- Sulfid:	0,5	-	0,1 %
- weitere S-haltige Verbindungen	156	0,0049	24,1 %
<u>Ablauf:</u>			
- Gesamt-S:	195	0,0061	30,0 %
- Sulfat:	78	0,0024	12,0 %
- Sulfid:	15	0,0004	2,3 %
- H ₂ S im Biogas: **	246	0,0077	37,8 %
			67,8 %

* nicht bestimmt

** berechnet für 20°C und 18,6 l Biogas/24 h bei 1,7 % H₂S

Tab. 13: Schwefel-Bilanz bei kontinuierlichem Abbau des Abwassers in einem Rührkessel-Fermenter (HRT: 5,8 Tage)

Nur etwa 68 % des im Zulauf enthaltenen Schwefels fanden sich in Form von Sulfat, Sulfid und H₂S im Ablauf bzw. im Biogas wieder. Darüber hinaus kam es zur Ausfällung unlöslicher Sulfide im Rührkessel-Fermenter.

Nach mehrmonatigem Betrieb der Rührkessel-Fermenter bildeten sich Ablagerungen bis zu mehreren Millimetern Durchmesser am Boden der Fermenter. Da jedoch mit dem Abwasser keine Feststoffe in die Reaktoren eingetragen wurden, deutete dies auf Calcium-carbonat-Ablagerungen hin, wie sie ebenfalls in der Pilotanlage der Fa. J. A. Benckiser zu beobachten waren (Ahrens, 1982).

Abb. 38 zeigt ein Profil der Verteilung von Feststoffen in einem Rührkessel-Fermenter, der mit einer hydraulischen Verweilzeit von 9,4 Tagen betrieben wurde. Die Verteilung der Feststoffe zeigte, daß sich aufgrund der niedrigen Rührerdrehzahl im Fermenter eine deutliche Schichtung gebildet hatte.

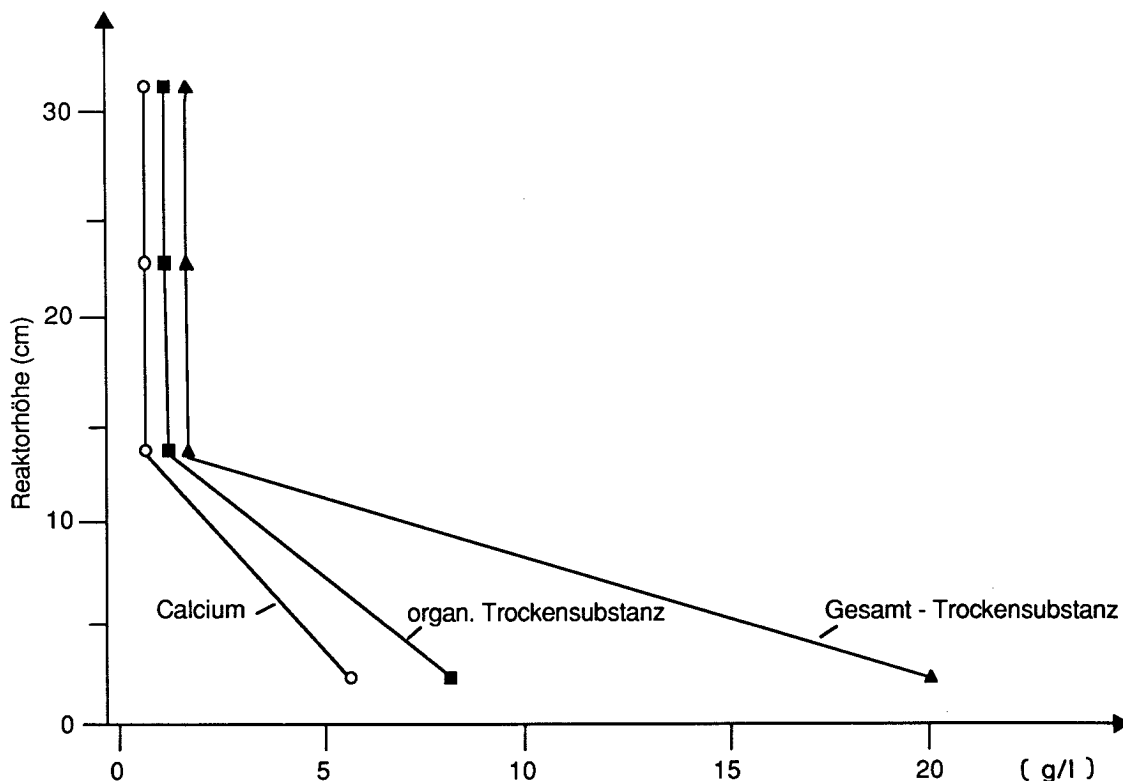


Abb. 38: Bildung eines Feststoff-Profiles in einem Rührkessel-Fermenter (HRT: 9,4 Tage) bei niedriger Rührerdrehzahl

Während der obere Reaktorbereich keine Zonierung aufwies, nahm die Trockensubstanz am Reaktorboden zu. Der Anteil der anorganischen Trockensubstanz nahm von 25 - 35 % im oberen Bereich auf 62 % am Boden des Reaktors zu. Parallel hierzu stieg der Calcium-Gehalt von 0,061 g/l auf 5,626 g/l. Ein Teil des mit dem Abwasser zugeführten Calciums verblieb also im Reaktor, wie Tab. 14 zeigt. Nur etwa 43 % des zugeführten Calciums wurden mit dem Ablauf wieder aus dem Reaktor geführt. Dabei erhöhte sich der Anteil des in ungelöster Form vorliegenden Calciums von 0,1 % im Zulauf auf 12,3 % im Reaktorablauf. 57 % des zugeführten Calciums verblieben, vorwiegend als Calciumcarbonat, im Reaktor.

	Zulauf:	Ablauf:
Gesamt-Calcium:	1,165 g/l	0,496 g/l
Trockensubstanz:	0,126 g/l	1,875 g/l
Calcium i. d. TS:	0,001 g/l	0,061 g/l

Tab. 14: Calcium-Bilanz bei kontinuierlichem Abbau des Abwassers in einem Rührkessel-Fermenter (HRT: 9,4 Tage)

Aufgrund der zu erwartenden geringeren Verstopfungsgefahr wurde der Abbau des Abwassers auch in einem Rührkessel-Fermenter untersucht, bei dem der Substratzulauf nicht vom Boden her, sondern vom Fermenterdeckel her erfolgte. Die bei verschiedenen hydraulischen Verweilzeiten erzielten Abbauleistungen sind in Abb. 39 zusammengefaßt.

Die Raumbelastung wurde durch Erhöhung der Durchflußrate von 0,6 kg/m³.d CSB auf 7,7 kg/m³.d CSB erhöht. Allerdings war der erzielte Abbaugrad in allen Fällen niedriger im Vergleich zu Rührkessel-Fermentern mit Substratzufuhr vom Boden her. Dies könnte auf mögliche Kurzschlußströmungen zurückzuführen sein, da der Ablauf über ein Überlaufrohr im Fermenter erfolgte. Der maximale Abbaugrad lag bei 66 % bei einer hydraulischen Verweilzeit von 30 Tagen. Wurde die Verweilzeit auf 3,3 Tage verkürzt, so sank der CSB-Abbaugrad auf unter 50 %.

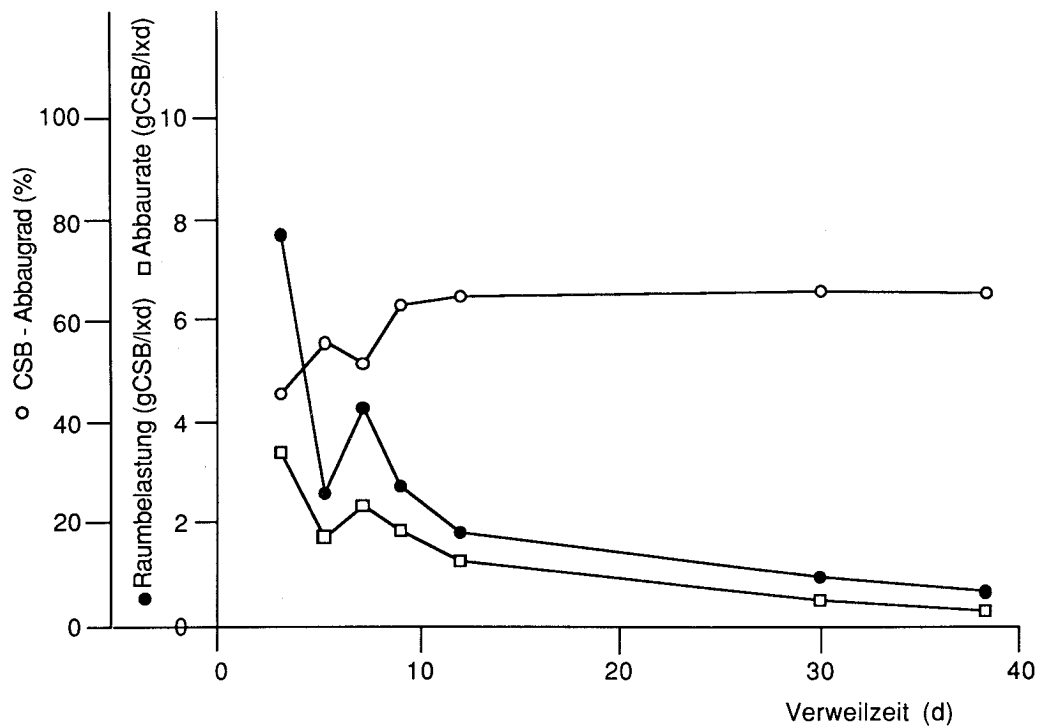


Abb. 39: Abbauleistungen in Rührkessel-Fermentern (Zu-
lauf von oben) bei verschiedenen hydraulischen
Verweilzeiten

Bei Verkürzung der hydraulischen Verweilzeit erhöhte sich die Konzentration der Fettsäuren im Fermenterablauf (Abb. 40).

Lettinga et al. (1980) weisen auf eine gute Pelletbildung im UASB-Reaktor beim Abbau von Melasse-Abwässern hin. Demgegenüber lag die Biomasse in den Rührkessel-Fermentern bei dem hier untersuchten Abwasser überwiegend in frei suspendierter Form vor. Eine Pelletbildung des Schlammes konnte während des dreijährigen Betriebes der Rührkessel-Fermenter nicht beobachtet werden. Ablagerungen am Fermenterboden in Pelletform bestanden zum großen Teil aus anorganischem Material, vorwiegend Calciumcarbonat.

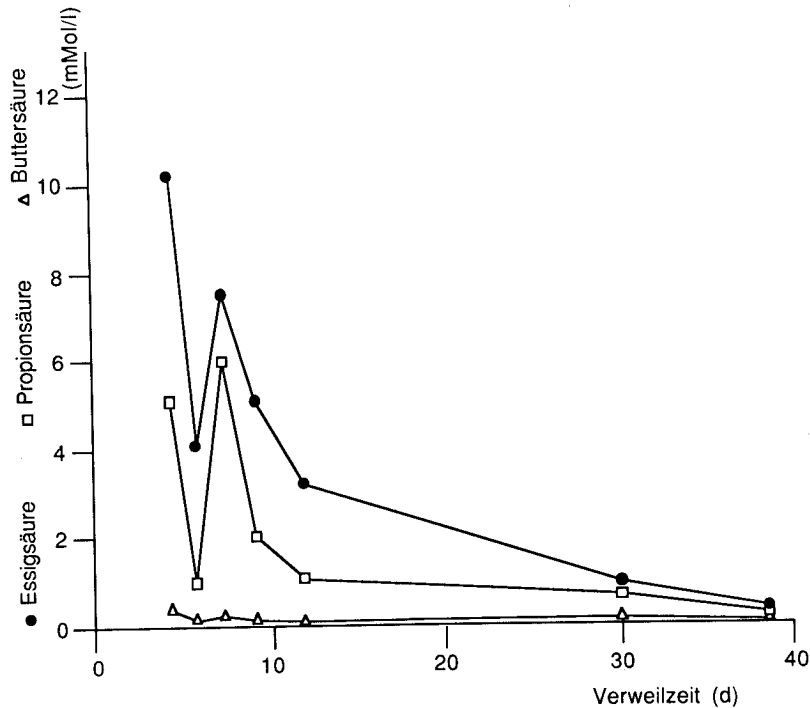


Abb. 40: Ablaufkonzentrationen an Fettsäuren bei Abbau des Abwassers in Rührkessel-Fermentern (Zulauf von oben) in Abhängigkeit von der hydraulischen Verweilzeit

Das mikroskopische Bild (Abb. 41) zeigte neben Kokken sowohl gekrümmte als auch stäbchen- und fadenförmige Bakterien. Auffällig war die geringe Anzahl fluoreszierender Bakterien (Abb. 42). Von der Morphologie her überwogen kurze Stäbchen und Methanokokken. Zellaggregate von Methanocarcin waren nur selten zu beobachten und traten vorwiegend bei kurzen hydraulischen Verweilzeiten auf.

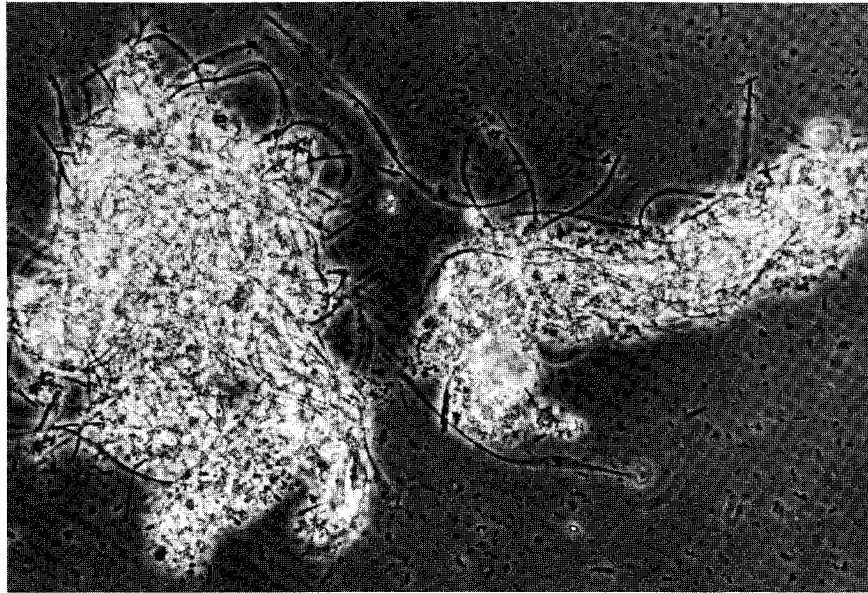


Abb. 41: Phasenkontrast-Aufnahme der Anreicherungskultur aus einem Rührkessel-Fermenter (Vergr.: 450 : 1)

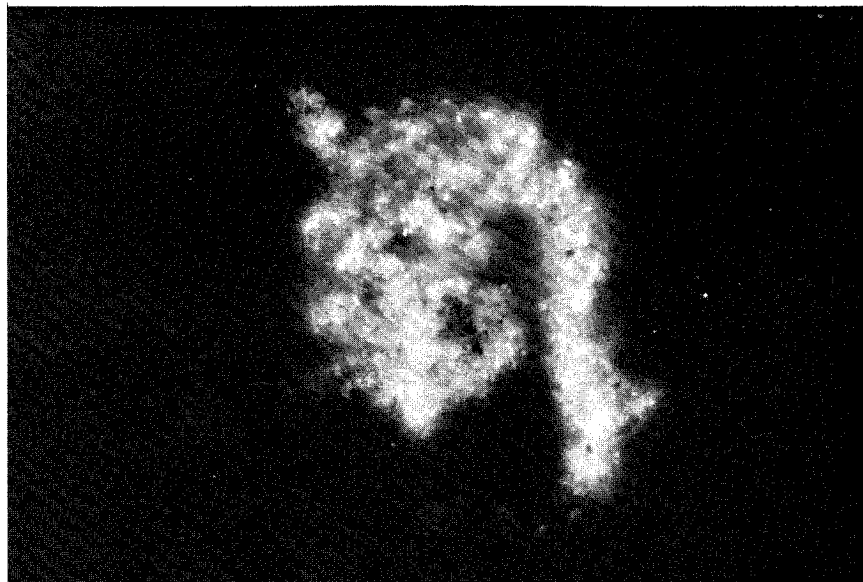


Abb. 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Anreicherungskultur aus einem Rührkessel-Fermenter (Vergr.: 450 : 1)

Festbett-Reaktor

Der mikrobiologische Abbau des Abwassers aus der Citronensäure-Fermentation in anaeroben Rührkessel-Fermentern verlief nur bei hydraulischen Verweilzeiten von mehr als 6 Tagen zufriedenstellend. Bei Verweilzeiten unter 3 Tagen sank der CSB-Abbaugrad unter 50 %. Die maximale Methanproduktion war mit $1,3 \text{ l CH}_4/\text{l Vol.} \cdot \text{d}$ nur gering im Vergleich zu anaeroben Reaktoren mit hoher Biomasse-Konzentration, in denen Methanproduktionsraten von $2,3 \text{ l CH}_4/\text{l} \cdot \text{d}$ erreicht werden (Wiegant et al., 1983). Eine hohe Biomasse-Konzentration im Reaktor, verbunden mit einer kurzen hydraulischen Verweilzeit, ist aufgrund der langen Generationszeiten anaerober Bakterien nur durch Biomasserückhaltung oder -rückführung möglich. Unter den weiter entwickelten Reaktorsystemen zeichnen sich vor allem Anaerobfilter und Wirbelschicht- bzw. Schwebebett-Reaktoren durch eine hohe Effizienz und stabile Betriebsbedingungen aus (Switzenbaum, 1983). Zur Verbesserung der Abbauleistungen wurde deshalb zunächst die Eignung eines Festbett-Reaktors zur anaeroben Reinigung untersucht.

Dieser Reaktortyp wurde von Young und McCarty (1969) entwickelt. Als Trägermaterial wurden Kunststoffkörper, Koks, Kies u.a. verwendet (Sahm, 1984). Hohe Abbauleistungen wurden in den letzten Jahren mit offenporigem Sinterglas als Trägermaterial erreicht (Aivasidis und Wandrey, 1984). Dieses Sinterglas wurde in Form von Raschigringen (Höhe = 0,7 cm; $\varnothing$ = 0,7 cm; Wandstärke = 0,2 cm) als Trägermaterial eingesetzt. Der Reaktor wurde aus einer Plexiglas-Säule (Höhe = 70 cm; $\varnothing$ = 6 cm) gefertigt. Das Gesamtvolumen betrug 1,19 l, das Arbeitsvolumen 1,05 l. Die Säule wurde zu 80 % mit dem Trägermaterial gefüllt; das Flüssigkeitsvolumen der gefüllten Säule betrug anschließend 0,76 l. Die gepackte Säule wurde mit einer Anreicherungskultur (0,96 g/l TS) aus einem Rührkessel-Fermenter gefüllt und das unverdünnte Abwasser mit ca. 47 ml/d zudosiert. Dies entsprach einer hydraulischen Verweilzeit von 22,4 Tagen (bezogen auf das Gesamtvolumen) und einer Anfangs-CSB-Beladung von $1,3 \text{ kg CSB/m}^3 \cdot \text{d}$. Abb. 43 zeigt die Startphase des anaeroben Filters.

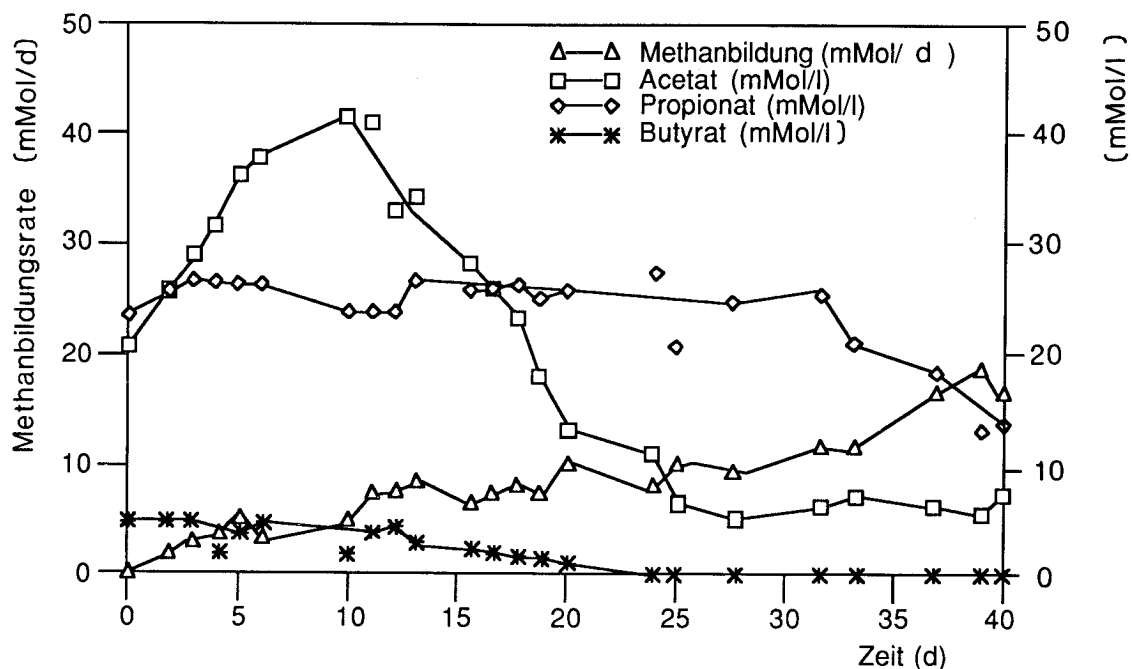


Abb. 43: Methanbildung und Fettsäure-Konzentrationen in der Start-Phase des Festbett-Reaktors

Innerhalb der ersten 12 Tage mit einer hydraulischen Verweilzeit von 22,4 Tagen kam es zu einer starken Akkumulation von Essigsäure bis zu einer Konzentration von 43 mMol/l. Diese hohe Essigsäure-Konzentration wurde in den nächsten Tagen abgebaut, allerdings mit einer leichten Verzögerung, da ab dem 13. Tag die hydraulische Verweilzeit von 22,4 auf 17,4 Tage reduziert wurde. Die Konzentration an Propionsäure verblieb während der Start-Phase fast unverändert bei ca. 26 mMol/l, während die anfängliche Buttersäure-Konzentration im Filterablauf von 5 mMol/l innerhalb der ersten 24 Tage vollständig abgebaut wurde.

Proben des Reaktorinhalts konnten über 7 Stutzen, die über die gesamte Säulenhöhe verteilt waren, entnommen werden (s. Abb. 6).

Ein Profil der Ethanol- und Fettsäure-Konzentrationen über die Säulenhöhe zeigt Abb. 44 für den 3. Tag nach Beginn der kontinuierlichen Abwasserzudosierung. Ethanol lag im Abwasser in einer Konzentration von ca. 23 mMol/l vor und wurde bereits im Substratzufuhrschlauch (Länge: 1 m) vollständig abgebaut, wobei u.a. Fettsäuren gebildet wurden. Die Konzentration an Essigsäure lag an der ersten Probeentnahmestelle mit ca. 40 mMol/l mehr als doppelt so hoch wie im Abwasser (18 mMol/l). Diese hohe Essigsäure-Konzentration wurde über die Filterhöhe zu etwa 30 % abgebaut, während die Propionsäure- und Buttersäure-Konzentrationen unverändert blieben.

Am 13. Tag wurde die hydraulische Verweilzeit auf 17,4 Tage reduziert. Der CSB-Abbaugrad lag zu diesem Zeitpunkt bei 40 %, die Methanbildungsrate bei 0,18 l CH₄/l Vol. · d. Auch nach der Reduzierung der hydraulischen Verweilzeit sank die Essigsäure-Konzentration im Filterablauf weiter und lag nach 40 Tagen bei etwa 3 mMol/l. Auch die Propionsäure-Konzentration wurde allmählich auf ca. 5 mMol/l abgebaut und Buttersäure war nach dem 20. Tag im Filterablauf nicht mehr nachweisbar. Die Methanproduktionsrate lag nun bei 0,42 l CH₄/Vol. · d bei einer CSB-Beladung von 1,7 g/l · d CSB und einem CSB-Abbau zu Methan von 63,1 %.

Abb. 45 zeigt ein Profil der Fettsäure-Konzentrationen im Filter am 41. Tag. Im Substratzufuhrschlauch kam es zu einer Buttersäure-Akkumulation auf etwa 42 mMol/l. Damit lagen fast 28 % des gesamten CSB des Abwassers in Form von Buttersäure vor. Daneben wurde Propionsäure gebildet. Ethanol wurde im Substratzufuhrschlauch vollständig abgebaut, Essigsäure zu 80 %. Die Verweilzeit des Substrats im Zufuhrschlauch lag bei einem Volumen des Schlauches von ca. 7 ml bei etwa 2,8 h. Die hohe Buttersäure-Konzentration im Substratzufuhrschlauch wurde bereits im untersten Bereich der Säule vollständig abgebaut. Im mittleren Bereich der Säule kam es zu einer leichten Akkumulation von Essigsäure und Propionsäure.

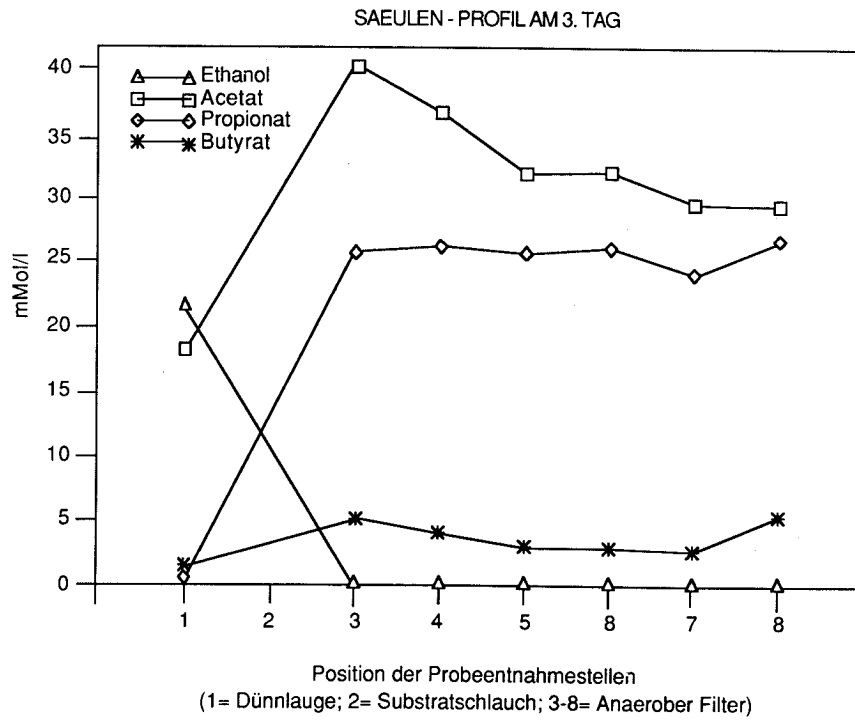
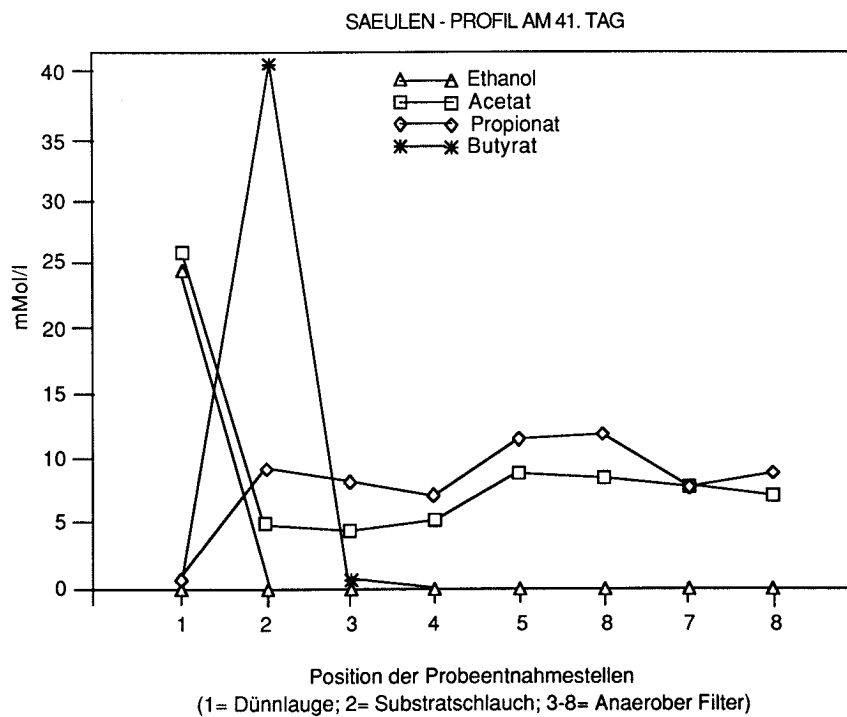


Abb. 44: Profil der Fettsäure-Konzentrationen im Festbett-Reaktor am 3. Tag nach Startbeginn



Nach etwa 5-wöchigem Betrieb des Filters wurde mit nur 0,44 l CH_4/l • d die höchste Methanproduktionsrate erreicht. Der CSB-Abbaugrad lag bei 62,6 %, wobei 59,7 % des Zulauf-CSB zu Biogas abgebaut wurden.

Durch Ausfällung von Calciumcarbonat kam es in der Folge zu einer allmählichen Verfestigung und Verstopfung des Trägerbettes (Abb. 46).

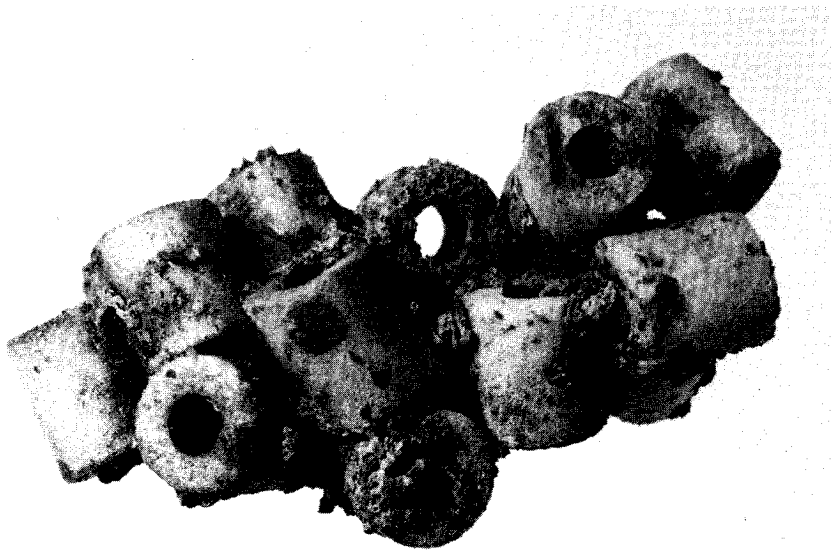


Abb. 46: Durch Calciumcarbonat-Ablagerungen verfestigtes Sinterglas-Trägermaterial aus einem Festbett-Reaktor

Aufgrund des höheren Strömungswiderstandes des Trägers mußte der Substratzulauf sukzessive verringert werden. Mit abnehmender Raumbelastung reduzierte sich die Methanproduktionsrate und mit zunehmender Verstopfung des Festbettes und damit verbundener Abnahme des freien Reaktorvolumens auch der CSB-Abbaugrad.

Tab. 15 faßt die mit dem Festbett-Reaktor erzielten Ergebnisse zusammen:

Tab. 15: Anaerober Abbau des Abwassers im Festbett-Reaktor
(1,05 l Vol.; Trägermaterial: Sinterglas SCHOTT):

Zeitraum (Tage):	0-13	14-43	44-109	110-177
HRT (Tage):	22,4	17,6	28,1	40,1
Raumbelastung (g CSB/l Vol.·d):	1,3	1,7	0,9-1,2	0,5-0,6
CSB-Abaugrad (%):	0-40	40-67	66-69	≤50
Methanproduktionsrate (l CH ₄ /l Vol.·d):	0-0,21	0,39-0,44	0,19-0,26	0,10-0,13
Methan-Ausbeute (l CH ₄ /g CSB):	0,161	0,247	0,214	0,209
Ablauf-Konz. (mMol/l):				
Essigsäure:	33-43	3-6	2-4	4-8
Propionsäure:	22-26	5-10	1-4	4-6
Buttersäure:	3-5	0	0	0

Festbett-Umlauf-Reaktor

Durch Überlagerung des Substratzulaufstromes in einem Festbett-Reaktor mit einem mehrfach höheren Umlaufstrom wird eine Gradientenbildung über die Reaktorhöhe verhindert. Ein weiterer Vorteil des Festbett-Umlauf-Reaktors liegt in der gegenüber dem Festbett-Reaktor geringeren Verfestigungsgefahr (Aivasidis und Wandrey, 1983).

Ein anaerober Filter, dessen Aufbau weitgehend dem bereits beschriebenen Festbett-Reaktor entsprach (Vol.: 1,05 l; Trägermaterial: Sinterglas SCHOTT), wurde zusätzlich mit einer Umlaufpumpe (Pumpleistung: 1,3 l/h) versehen. Das Flüssigkeits-

volumen des Filters (0,765 l) wurde somit ca. 41 mal pro Tag umgewälzt. Der Festbett-Umlauf-Reaktor wurde gleichfalls mit einer Anreicherungskultur aus einem Rührkessel-Fermenter (1,84 g/l TS) gefüllt und zunächst diskontinuierlich mit unverdünntem Abwasser gefüttert (ca. 50 ml/d). Nachdem die Konzentrationen an Fettsäuren (Essigsäure + Propionsäure) auf unter 1 mMol/l abgebaut waren, wurde das Abwasser ab dem 7. Tag kontinuierlich mit einer hydraulischen Verweilzeit von 6,8 Tagen zudosiert. Die Gasproduktion stieg an und erreichte nach 18 Tagen ein Maximum von 1,2 l/24 h. Bei einem Methangehalt von ca. 70 % lag die Methanproduktionsrate bei 0,84 l CH₄/Vol. · d und der CSB-Abbaugrad bei 76,7 %. Im Ablauf betrugen die Konzentrationen für Essigsäure ca. 2 mMol/l und für Propionsäure ca. 0,5 mMol/l.

Mit weiterer Verringerung der hydraulischen Verweilzeit nahm die Gasproduktion zu (Tab. 16). Jede Verringerung der hydraulischen Verweilzeit führte zunächst zu einem Anstieg der Fettsäure-Konzentrationen, die in der Folge wieder abgebaut wurden. Allerdings wurde das Abwasser bei sehr kurzer Verweilzeit (unter 2 Tagen) nicht mehr vollständig abgebaut und die Konzentrationen an Essigsäure und Propionsäure im Filterablauf stiegen an. Der CSB-Abbaugrad bei einer Verweilzeit von 1,02 Tagen lag jedoch noch bei 62 %. Gegenüber dem Abbau in Rührkessel-Fermentern ohne Biomasse-Rückhaltung, bei denen die maximale CSB-Abbaurrate bei 3,8 g CSB/l · d lag, ließen sich im Festbett-Umlauf-Reaktor mit gleichem Abwasser Abbauleistungen von maximal 17,4 g CSB/l · d erreichen. Gegenüber dem Festbett-Reaktor ohne Umlauf bot der Festbett-Umlauf-Reaktor eine höhere Prozeßstabilität, d.h. geringere Schwankungen der Abbauleistungen (CSB-Abbaugrad; Fettsäure-Konzentrationen). Allerdings konnten auch durch den Umlaufstrom Calciumcarbonat-Ablagerungen auf dem Trägermaterial nicht verhindert werden, wie Untersuchungen der auf dem Sinterglas abgelagerten Feststoffe ergaben. Ebenso trug die Zunahme der Biomasse in den Hohlräumen zwischen den Sinterglasträgern zur Erhöhung des Strömungswiderstandes bei (Abb. 47).



Abb. 47: Festbett-Umlauf-Reaktor mit porösem Sinterglas als Trägermaterial nach 6-monatigem Betrieb

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Sinterglas-Trägermaterials zeigten vorwiegend fadenbildende Mikroorganismen. Diese waren eingebettet in eine Matrix von vor allem Calcium-carbonatablagerungen, wie Elementanalysen der Oberfläche (EDAX) ergaben (Abb. 48).

Ein Querschnitt durch einen Sinterglas-Trägerkörper ließ erkennen, daß die überwiegend fadenbildende Biomasse auf den äußeren Randbereich des porösen Sinterglases beschränkt blieb (Abb. 49).

Hierdurch kam es nach ca. 6 Monaten zu Störungen (allmähliche Verstopfung des Festbettes) und zu starken Schwankungen in der Gasproduktion.

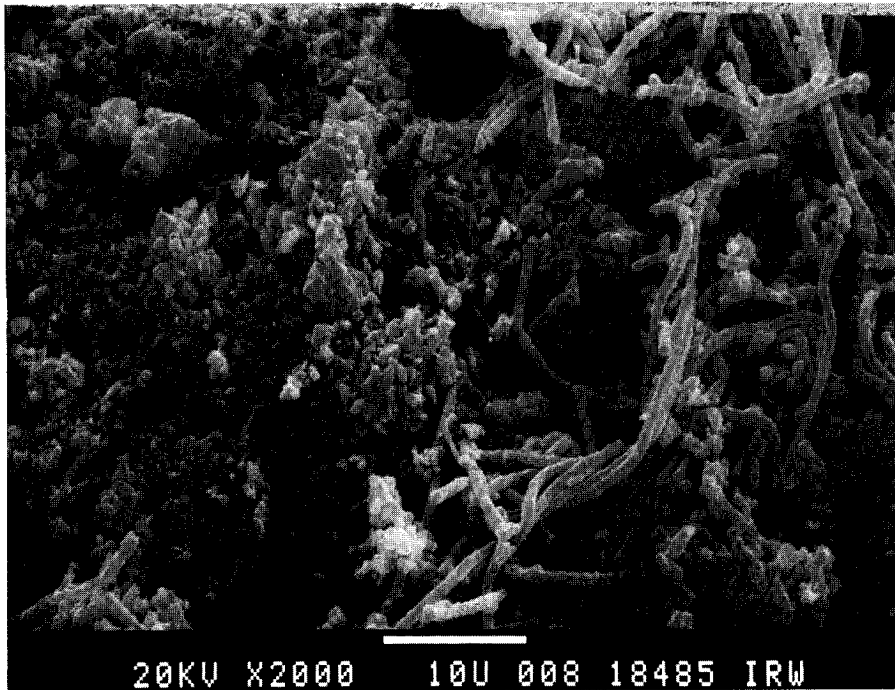


Abb. 48: Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Oberfläche des Sinterglas-Trägermaterials (Vergr.: 2000 : 1)

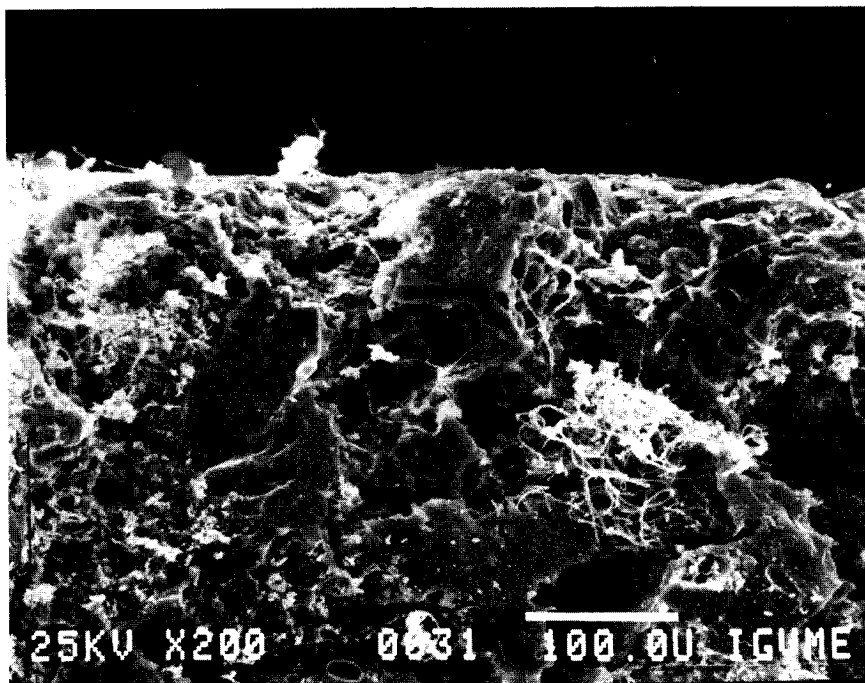


Abb. 49: Rasterelektronenmikroskopischer Querschnitt durch einen Sinterglas-Ring (Vergr.: 200 : 1)

Tab. 16: Anaerober Abbau des Abwassers im Festbett-Umlauf-Reaktor
(1,05 l Vol.; Trägermaterial: Sinterglas SCHOTT)

HRT (Tage):	1,02	1,45	1,65	3,13	4,04	6,80
Raumbelastung (g CSB/l Vol.·d):	28,12	20,31	18,55	9,28	7,29	3,37
Gasbildungsrate (l/24 h):	10,89	8,49	8,79	3,62	3,26	1,19
Methanbildungsrate (l CH ₄ /24 h):	6,62	5,45	5,38	2,53	2,11	0,84
CSB-Abbaureate (g CSB/l Vol.·d):	17,46	14,88	13,95	7,14	5,63	2,58
Ablauf-Konzentrationen:						
- Essigsäure (mMol/l):	8,5-26,4	5,7-6,6	3,2-4,3	2,3-4,3	1,5-1,9	1,3-2,3
- Propionsäure "	7,0-9,9	4,1-5,2	1,9-2,3	1,1-1,5	0,4-0,5	0,4-0,8
- Buttersäure "	0	0	0	0	0	0
CSB-Abbaugrad (%):	62,1	73,2	75,2	76,9	77,2	76,7
Methanausbeute (l CH ₄ /g CSB):	0,224	0,255	0,276	0,259	0,275	0,237

Die Abbauleistungen des Festbett-Umlauf-Reaktors verringerten sich bei Erhöhung des Substratdurchsatzes. Zur Erzielung eines maximalen CSB-Abbaugrades wurden der Ablauf des Festbett-Umlauf-Reaktors anschließend in einem Festbett-Reaktor ohne Umlauf weiter abgebaut. Das Gesamtvolumen dieses Reaktors betrug ebenfalls 1,05 l (Trägermaterial: Sinterglas SCHOTT). Der Festbett-Reaktor wurde nicht mit externem Schlamm angeimpft, sondern allein von den Mikroorganismen besiedelt, die mit dem Ablauf aus dem Festbett-Umlauf-Reaktor ausgeschwemmt wurden.

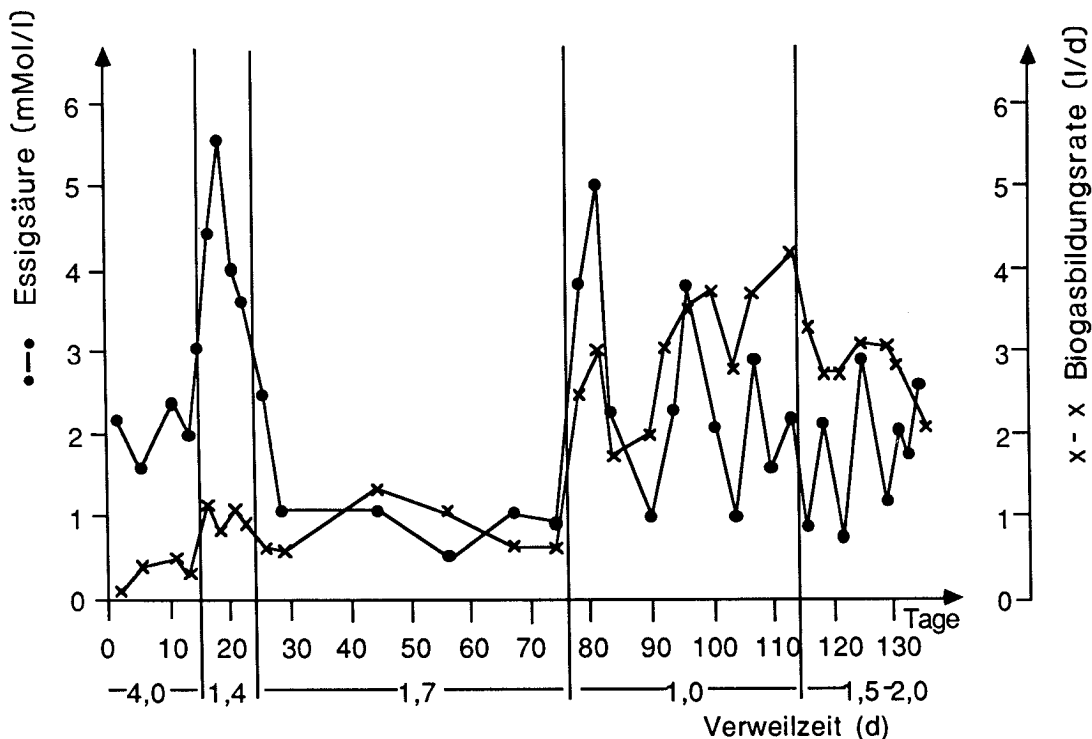


Abb. 50: Biogasbildung und Ablaufkonzentration an Essigsäure im nachgeschalteten Festbett-Reaktor bei Verkürzung der hydraulischen Verweilzeit

Wie beim vorgeschalteten Festbett-Umlauf-Reaktor führte auch beim Festbett-Reaktor eine Verringerung der hydraulischen Verweilzeit zu einem kurzzeitigen Anstieg der Fettsäure-Konzentrationen im Reaktor (Abb. 50). Der CSB-Abbaugrad, bezogen auf den Ablauf des ersten Reaktors, lag bereits am 19. Tag bei 16 % und stieg im Laufe der Betriebsdauer auf 58 %. Der Gesamtabbaugrad des Festbett-Umlauf-Reaktors mit nachgeschaltetem Festbett-Reaktor erreichte einen maximalen Wert von 81 % (Abb. 51), wobei der Anteil des zweiten Reaktors am Gesamtabbau bei Verringerung der hydraulischen Verweilzeit anstieg.

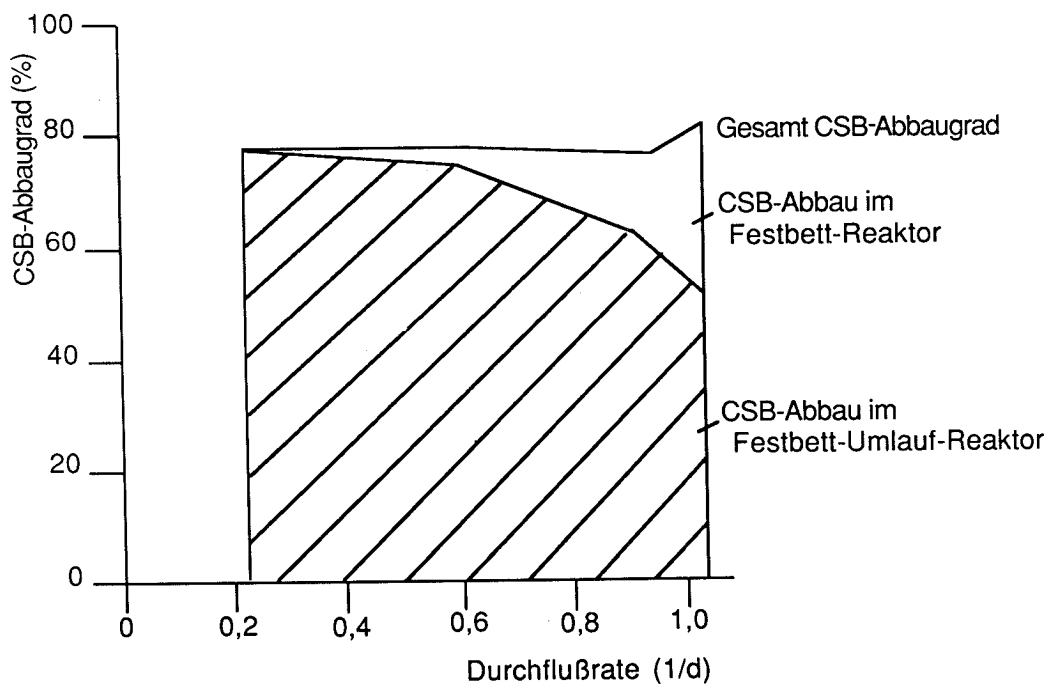


Abb. 51: Anteil des Festbett-Umlauf-Reaktors (F4) und des Festbett-Reaktors (F5) am Gesamt-CSB-Abbau

Expanded-bed-Reaktor

Ein Nachteil sowohl des Festbett- wie des Festbett-Umlauf-Reaktors stellte die Verstopfungsgefahr durch Biomasse-Zuwachs und Calciumcarbonat-Ablagerungen dar. Dieser Nachteil entfällt weitgehend beim Schwebebett-Reaktor (Expanded-bed). Hier bildet das Trägermaterial kein "Festbett", vielmehr kommt es je nach Träger (Sandpartikel, Aktivkohle) und biologischer Aktivität zu einer Expansion des Trägers (Switzenbaum, 1983).

Um den Abbau des Abwassers in einem Expanded-bed-Reaktor zu untersuchen, wurden verschieden modifizierte Aktivkohlen (spez. Gew.: 1,1 g/ml) als Trägersubstanz getestet. Die verschiedenen Aktivkohle-Träger wurden mit unterschiedlichem Schüttvolumen eingesetzt:

Aktivkohle-Typ:	AK1	AK2	AK3
Schüttvolumen:	52,6 g/l	37,5 g/l	123,4 g/l

Als Reaktoren wurden Plexiglas-Säulen wie bei den Festbett-Reaktoren mit einem Gesamtvolumen von 1,2 l verwendet (Abb. 52).

Alle Säulen wurden zunächst bis zum Ablaufrohr (1,05 l) mit den suspendierten Aktivkohle-Sorten gefüllt, kurzzeitig entgast und für 15 Min. mit Argon durchströmt. Zum Animpfen wurden jeweils ca. 800 ml einer Anreicherungskultur aus einem Rührkessel-Fermenter (1,8 g/l TS) langsam zugepumpt, ohne die Aktivkohle dabei auszuspülen. Das unverdünnte Abwasser wurde vom Boden der Säule her zudosiert. Die anfängliche hydraulische Verweilzeit lag bei 4,1 Tagen, wurde jedoch nach Akkumulation von Fettsäuren im Reaktor auf 7,5 Tage erhöht. Tab. 17 zeigt die Höhe der Fettsäure-Akkumulation und die CSB-Reduktion nach 4 Wochen:

Tab. 17: Fettsäure-Konzentrationen und CSB-Reduktionen in Expandend-bed-Reaktoren mit verschiedenen Aktivkohle-Trägern

Aktivkohle-Typ:	AK1	AK2	AK3
Schüttvolumen (g/l):	52,6	37,5	123,4
HRT (Tage):	4,1	4, 1	4,1
Akkumulation von:			
- Essigsäure (mMol/l):	75,1	97,9	68,1
- Propionsäure " :	16,8	22,9	21,7
- Buttersäure " :	32,3	5,94	26,9
CSB-Reduktion (%):	18	11	25

Aufgrund der Gradientenbildung in den Säulen lag der pH-Wert im unteren Bereich der Säulen bei 5,8 - 6,5 und im oberen Bereich bei 6,9 - 7,5.

Nach Erhöhung der hydraulischen Verweilzeit blieben die hohen Fettsäure-Konzentrationen in den beiden ersten Reaktoren bestehen, während sie in der dritten Säule (AK3) abgebaut wurden (Abb. 53). Die weiteren Versuche wurden deshalb nur noch mit der Aktivkohle AK3 durchgeführt. Bei weiterer Verringerung der Verweilzeit nahm die Fettsäure-Konzentration jeweils zu, wurde in der folgenden Zeit jedoch wieder abgebaut.

Die Gasproduktion stieg bei Verringerung der hydraulischen Verweilzeit und erreichte bei einer Verweilzeit von 0,69 Tagen einen maximalen Wert von 20,3 l/l Vol. • d. Allerdings schwankte die Gasbildungsrate bei kurzen Verweilzeiten erheblich (Abb. 54). Eine Zusammenfassung der mit dem Expanded-bed-Reaktor erzielten Abbauleistungen gibt Tab. 18.

Aufgrund des fehlenden Umlaufes stellte sich im Reaktor ein Gradient ein (Abb. 55). Wie die Verteilung der Fettsäuren zeigt, erfolgte der Hauptabbau im unteren Bereich der Säule. Hier kam es, bei einem pH-Wert von 5 - 6 zur Bildung von Ethanol

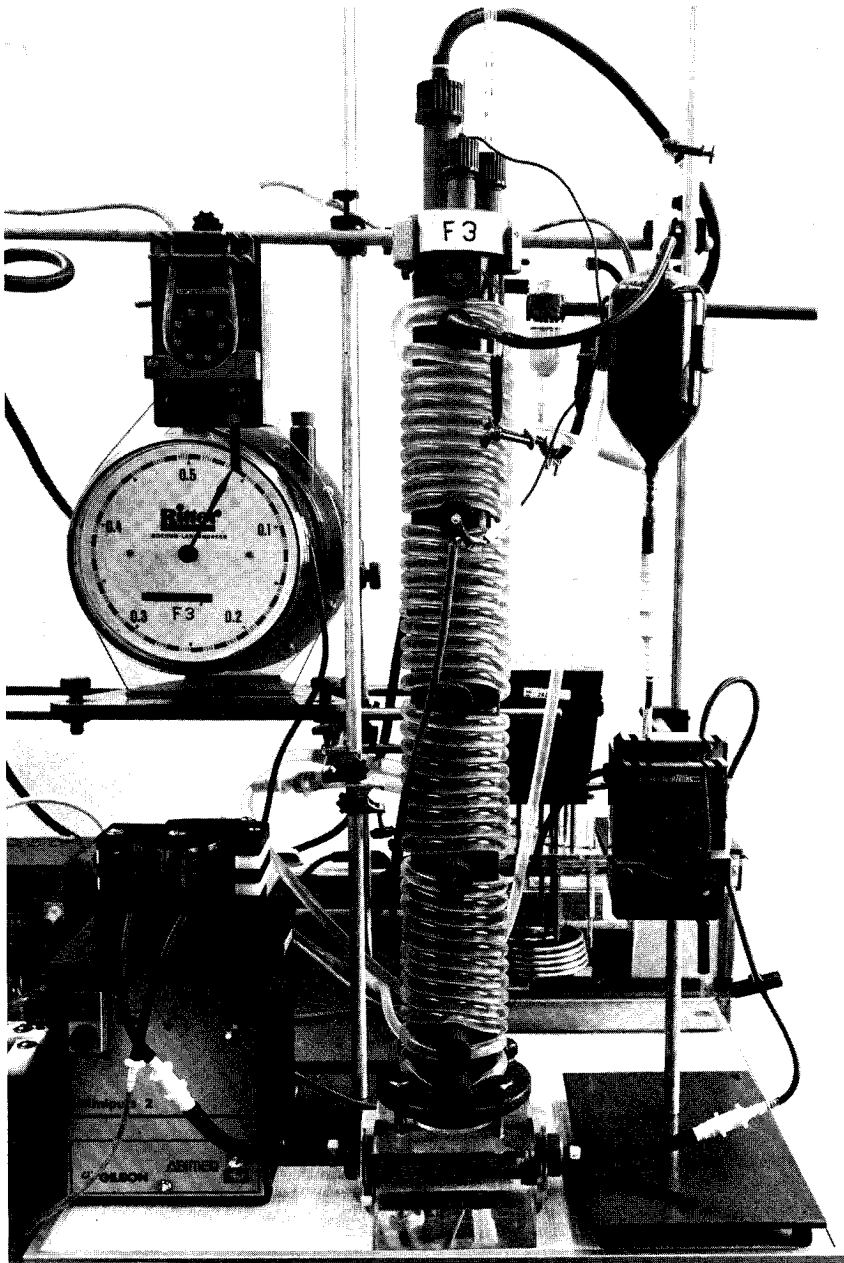


Abb. 52: Gesamtansicht des Expandend-bed-Reaktors mit Sedimenter

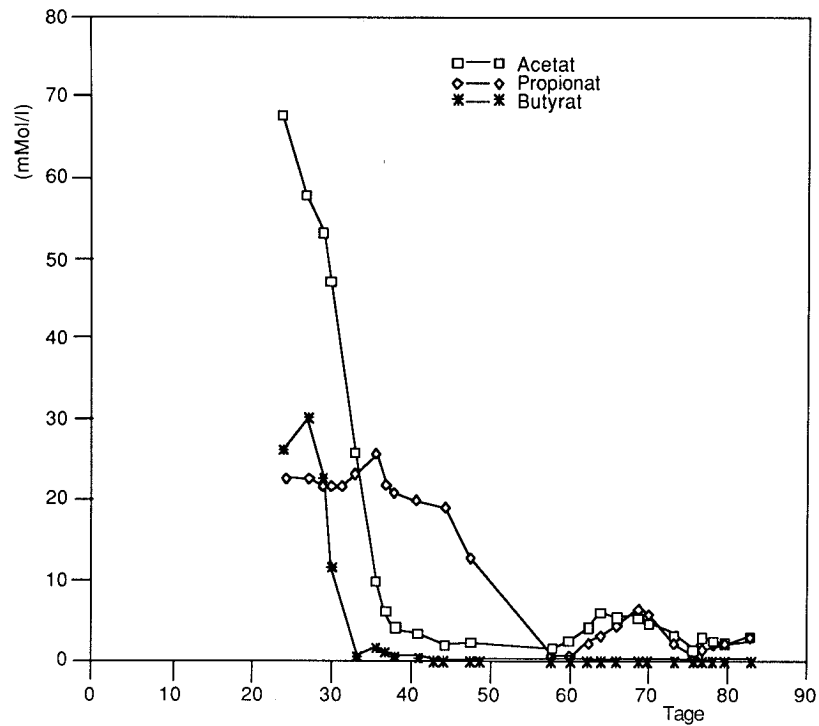


Abb. 53: Abbau der Fettsäuren im Expanded-bed-Reaktor (AK3) nach Verlängerung der hydraulischen Verweilzeit

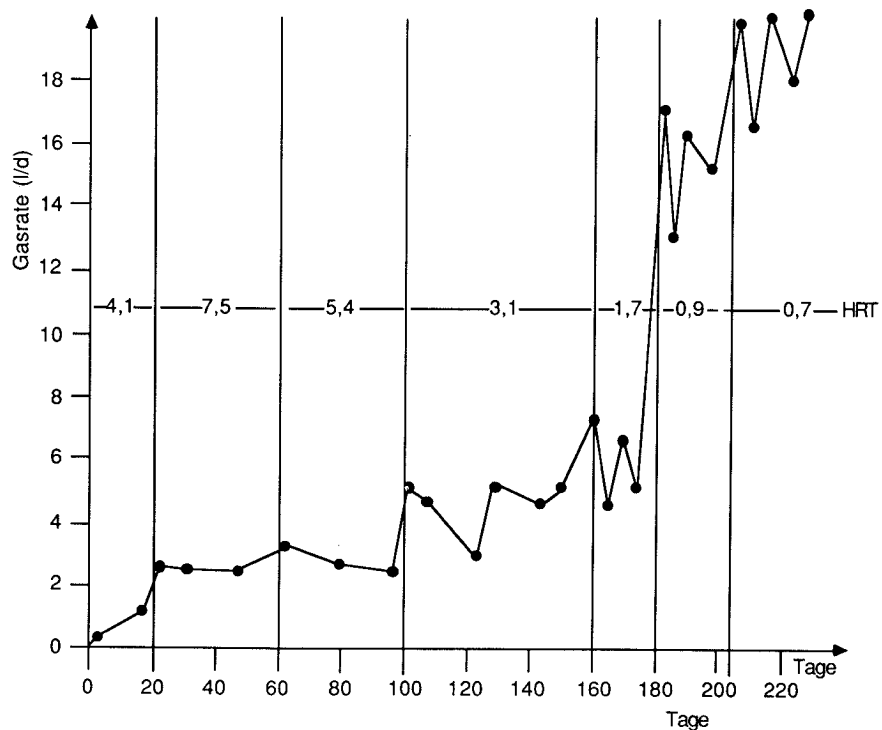


Abb. 54: Gasbildung im Expanded-bed-Reaktor bei Verkürzung der hydraulischen Verweilzeit

Tab. 18: Anaerober Abbau des Abwassers im Expanded-bed-Reaktor
(1,05 l Vol.; Trägermaterial: Aktivkohle)

HRT (Tage):	0,69	0,90	1,70	3,10	5,45	7,50
Raumbelastung (g CSB/l Vol..d):	43,45	36,64	18,23	9,35	5,55	4,20
Gasbildungsrate (l/24 h):	20,30	15,40	8,20	4,35	2,61	2,10
Methanbildungsrate (l CH ₄ /24 h):	11,77	9,70	5,16	2,74	1,65	1,28
CSB-Abbaureate (g CSB/l Vol..d):	30,81	26,78	13,49	7,28	4,33	3,28
CSB-Abbaugrad (%) :	70,9	73,1	74,0	77,9	78,0	78,2
Methanausbeute (l CH ₄ /g CSB):	0,258	0,252	0,269	0,279	0,283	0,290
Ablauf-Konzentration:						
- Essigsäure (mMol/l):	3,1-9,6	3,4-3,9	2,1-3,5	1,2-1,6	1,4-2,8	1,8-4,4
- Propionsäure "	4,8-10,2	3,4-5,0	1,9-2,8	0,2-0,5	0,4-2,2	0,6-2,0
- Buttersäure "	0	0	0	0	0	0

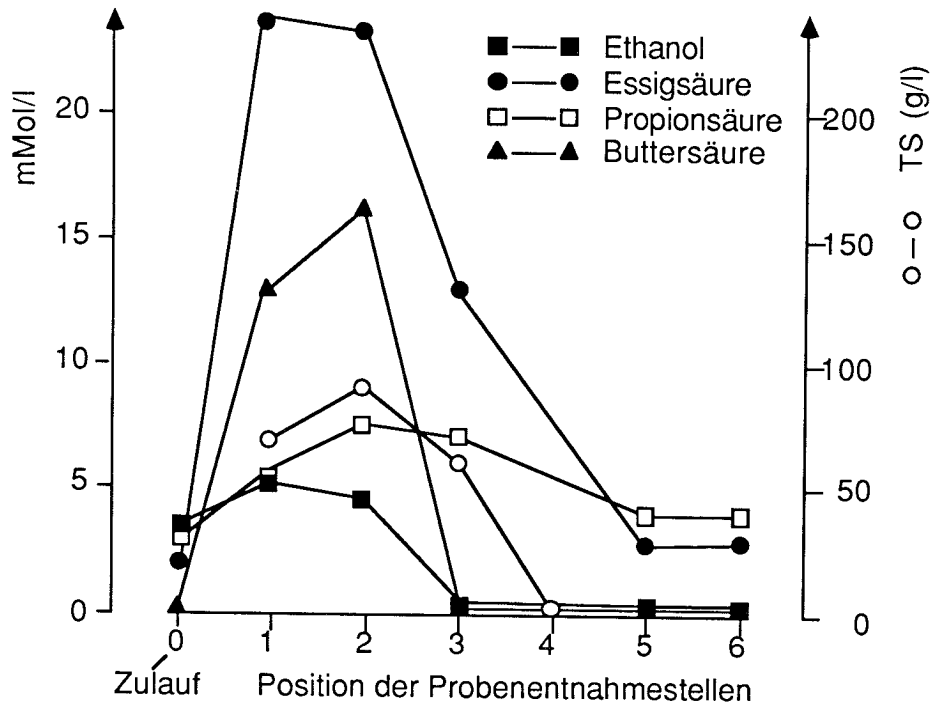


Abb. 55: Gradientenbildung im Expanded-bed-Reaktor: Verteilung der Trockensubstanz (TS) und der Fettsäuren- sowie Ethanol-Konzentrationen über die Filterhöhe

und zu niederen Fettsäuren. Im mittleren Bereich der Säule wurden zunächst Ethanol und Buttersäure vollständig abgebaut, während der Abbau von Essigsäure und Propionsäure nur bis zu einer Rest-Konzentration von 3 - 3,5 mMol/l erfolgte. Zur Bestimmung der Aktivität der Methanbakterien im Filter wurden jeweils 5 - 8 ml Reaktorinhalt aus den Probeentnahmestellen anaerob entnommen und sofort in speziellen, mit einem

Septum versehenen Warburg-Gefäßen (Abb. 8) inkubiert. Die Methanbildung wurde über 2 Stdn. gemessen und die Methanbildungsrate aus den Steigungen berechnet. Wie Abb. 56 zeigt, erfolgte im unteren Bereich der Säule ebenfalls die höchste Methanbildung. Die relativ geringe Methanbildung am Boden des Filters ist wahrscheinlich auf den niedrigen pH-Wert von unter pH 6 zurückzuführen.

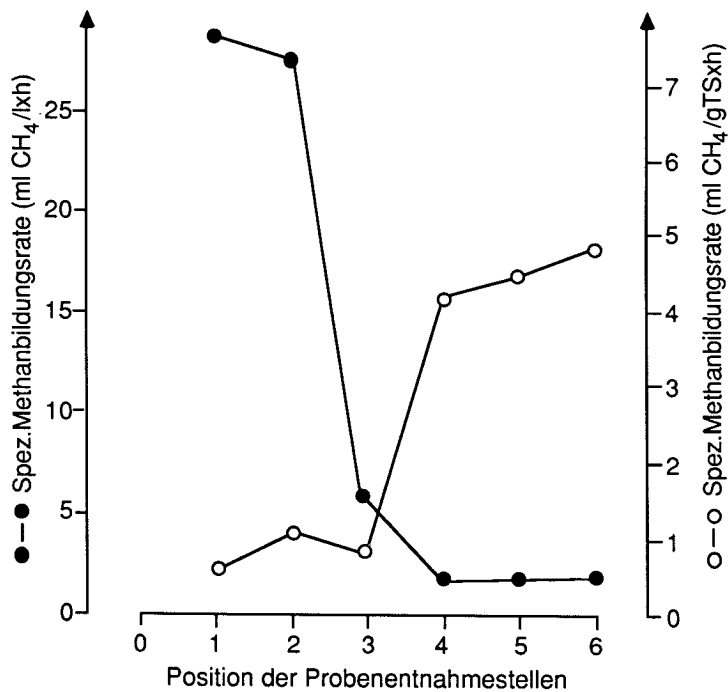


Abb. 56: Methanbildungsaktivität im Expanded-bed-Reaktor über die Filterhöhe

Tab. 19 zeigt die Bilanzen für Schwefel, Calcium und Kohlenstoff bei einer hydraulischen Verweilzeit von 0,69 Tagen.

Wie die Kohlenstoff-Bilanz zeigte, wurde der im Abwasser enthaltene Kohlenstoff zu 65,7 % in Biogas und gelöstes CO_2 abgebaut. Die Restbelastung im Ablauf lag bei 27,2 %. Der von der Biomasse inkorporierte Anteil des Kohlenstoffes (POC) konnte nicht bestimmt werden, da im Ablauf auch Aktivkohlepartikel suspendiert vorlagen.

Etwa 74 % des mit dem Abwasser zugeführten Schwefels fanden sich als H_2S im Biogas oder in gelöster Form im Ablauf. Die restlichen 26 % fielen wahrscheinlich als unlösliche Sulfide im Reaktor aus.

Tab. 19: Ca-, S- und C-Bilanzen bei kontinuierlichem Abbau des Abwassers in einem Expanded-bed-Reaktor (HRT: 0,69 Tage)

Kohlenstoff (mg C/l):

	Zulauf: %:		Ablauf: %:	
Gelöster org. C (DOC):	12.484	100,0	3.402	27,2
Anorg. C (TIC):	394	-	1.793	14,3
C im Biogas*:	-	<u> </u>	6.416	<u>51,4</u>
		100,0 %		92,6 %

Calcium (mg Ca/l):

	Zulauf: %:		Ablauf: %:	
Gesamt-Ca:	1.210	100,0	1.271	105,0
- gelöstes Ca:	1.209	99,9	280	22,0
- Ca i.d. TS:	1	<u>0,1</u>	905	<u>71,2</u>
		100,0 %		93,2 %

Schwefel (mg S/l):

	Zulauf: %:		Ablauf: %:	
Gesamt-S:	859	100,0	190	22,1
- Sulfat:	653	76,0	37	5,6
- Sulfid:	0,1	0,0	19	2,2
H_2S im Biogas*:	-	<u> </u>	445	<u>51,8</u>
		100,0 %		73,9 %

* (berechnet für: 13,34 l/l mit 58,0 % CH_4 ; 37,2 % CO_2 ; 2,5 % H_2S ; 2,3 % H_2O)

Mehr als 70 % des mit dem Abwasser zugeführten Calciums fanden sich in der Trockensubstanz des Ablaufes, vorwiegend als Calciumcarbonat. Zur Klärung der Frage, inwieweit eine Adsorption des Calciums an der Aktivkohle erfolgte, wurden Proben des Trägermaterials nach einjährigem Betrieb des Schwebebett-Reaktors entnommen. Elektronenmikroskopische Dünnschnitte der Aktivkohle zeigten eine ca. 0,2 μm dicke Ablagerungsschicht an der Oberfläche (Abb. 57).



Abb. 57: Elektronenmikroskopischer Dünnschnitt durch ein Aktivkohle-Trägerpartikel (Vergr.: 29250 : 1). Die Pfeile kennzeichnen die Ablagerungsschicht an der Oberfläche der Aktivkohle

Die Bakterien saßen nicht direkt an der Aktivkohle-Oberfläche, sondern außerhalb der Ablagerungsschicht in den Hohlräumen der Trägerpartikel. Mit Hilfe einer Energiedispersiven-Röntgenstrahlen-Mikroanalyse (EDAX-Analyse) wurde die Elementverteilung in der Aktivkohle- und der Ablagerungsschicht an der Oberfläche untersucht (Abb. 58 a) und b)). Ein Vergleich der Element-Spektren der Aktivkohle (a) und der Ablagerungsschicht an der Oberfläche (b) zeigte einen deutlichen Calcium-Peak in der Ablagerungsschicht.

3.3 Mikroorganismen

Aufgrund der zahlreichen verschiedenen Inhaltsstoffe des Abwassers aus der Citronensäure-Fermentation und der damit verbundenen Komplexität der Abbauewege mußte auf eine Bestimmung aller am anaeroben Abbau beteiligten Mikroorganismen verzichtet werden.

Von großer Bedeutung für den anaeroben Abbau sind die acetogenen Bakterien, die oftmals den "Flaschenhals" einer Methangärung darstellen (Schoberth, 1978). Ihre Tätigkeit wird bestimmt von der Aktivität Wasserstoff-verwertender Mikroorganismen (Zeikus, 1977). Zur Untersuchung der Wasserstoff-verwertenden methanogenen und sulfatreduzierenden Bakterien in der Anreicherungskultur wurden anaerob Schrägagarflaschen (117 ml) hergestellt, wobei anstelle einer Nährlösung das unverdünnte Abwasser als Substrat verwendet wurde. Je Flasche wurden 10 ml Abwasser (+ 2 % Agar) eingefüllt und die Gasphase nach dem Autoklavieren mit H_2/CO_2 ausgetauscht. Außerdem wurden weitere Agarflaschen zusätzlich mit 100 mMol/l NaAcetat bzw. 50 mMol/l NaSulfat versehen. Alle Flaschen wurden mit je 0,1 ml der Anreicherungskultur beimpft und bei 37°C inkubiert. Während eine Bildung von Schwefelwasserstoff bereits nach wenigen Tagen (qualitativ mit Bleiacetat-Papier) nachgewiesen

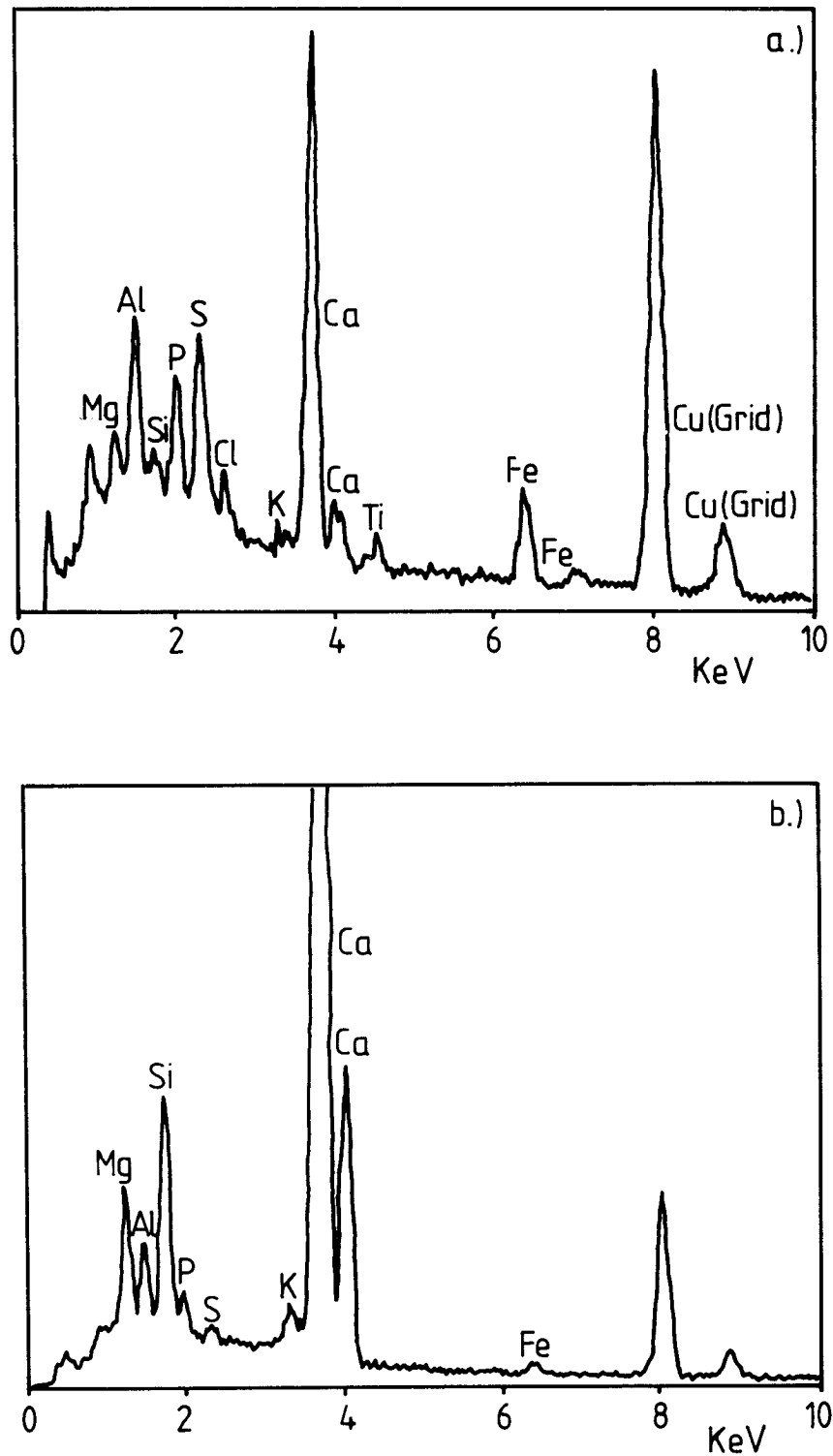


Abb. 58: EDAX-Analyse der Elementverteilung in der Aktivkohle (a) und der Ablagerungsschicht an der Oberfläche (b) mit deutlichem Ca-Peak (Ca)

werden konnte, erfolgte eine meßbare Methanbildung erst nach einer Inkubationszeit von etwa 2 Wochen:

Tab. 19: Bildung von Methan und Schwefelwasserstoff durch eine Anreicherungskultur nach Inkubation bei 37°C in Abwasser-Agar-Flaschen

	Abwasser (10 ml):	Abwasser +100 mMol/l NaAcetat:	Abwasser +50 mMol/l NaSulfat:	Kontrolle: Abwasser, unbeimpft:
Gasbildung bzw. -ver- brauch:	-	+	-	0
Methan- bildung:	-	+	-	-
H ₂ S- Bildung:	+	+	+	-

Während in den übrigen Flaschen keine oder nur wenige fluoreszierende Bakterien zu beobachten waren, fanden sich in den zusätzlich mit 100 mMol/l NaAcetat gefütterten Flaschen zahlreiche Kolonien mit Methanosarcinen (Abb. 59). Diese zeigten im UV-Licht (Anregung bei 390 - 440 nm) eine intensive Fluoreszenz, was zusammen mit der Zellmorphologie auf Methanosarcinen schließen läßt.

Fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der in einem Expanded-bed-Reaktor als Trägersubstanz verwendeten Aktivkohle zeigten, daß deren Oberfläche von einem Netzwerk fluoreszierender, vorwiegend stäbchenförmiger Methanbakterien bedeckt war (Abb. 60).

Diese Beobachtung wurde noch verstärkt durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Aktivkohle nach mehrwöchigem Einsatz im Expanded-bed-Reaktor. Bei schwacher Vergrößerung war

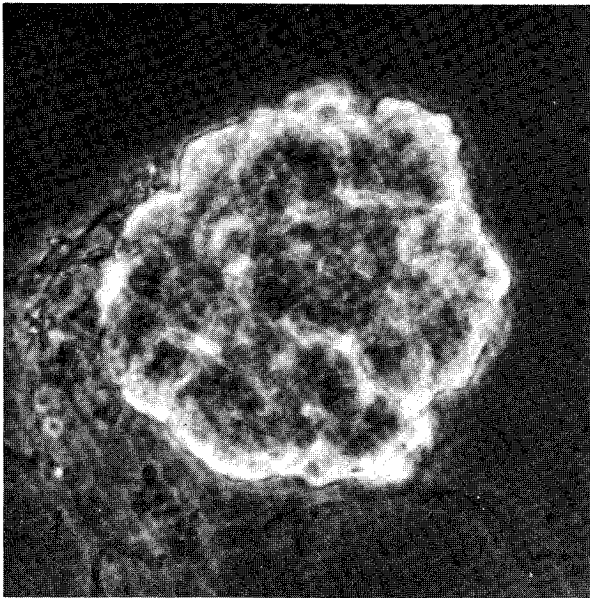


Abb. 59: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopisches Bild von Methanosarcinen aus einer Anreicherungskultur nach Anzucht mit 100 mMol/l Natriumacetat (Vergr.: 1100:1)

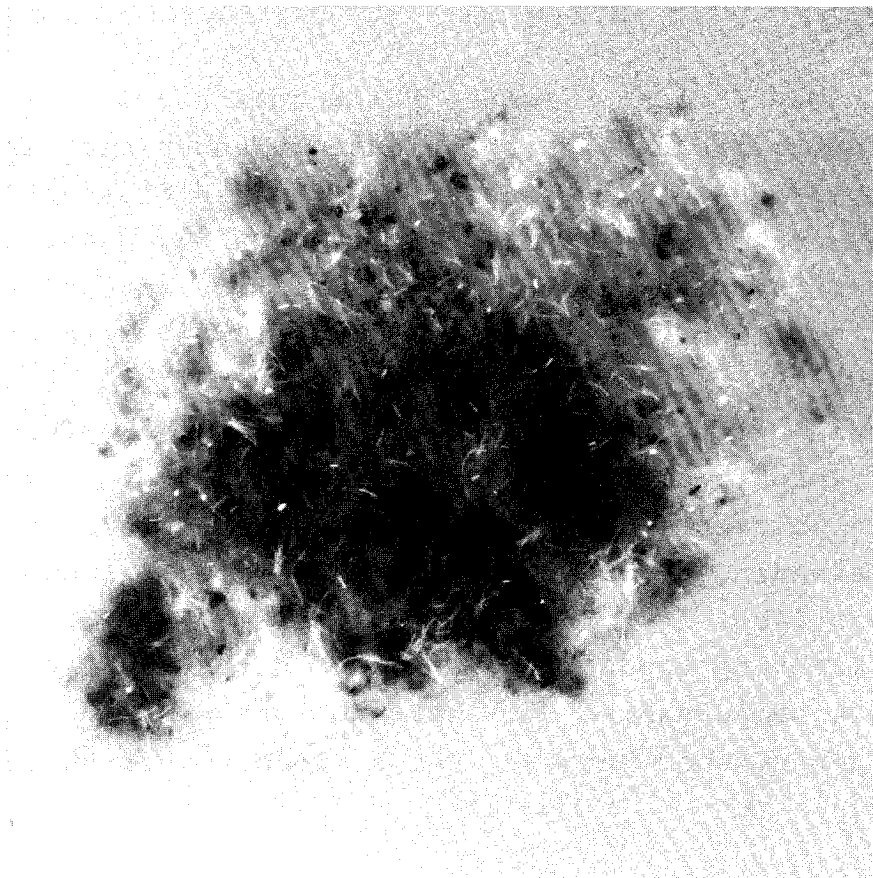


Abb. 60: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines Aktivkohle-Partikels nach Einsatz im Expanded-bed-Reaktor

deutlich der die gesamte Oberfläche der Aktivkohle bedeckende Biofilm zu erkennen (Abb. 61). Innerhalb des vorwiegend aus fadenförmigen Mikroorganismen bestehenden Biofilms fanden sich nur wenige Sarcinenpakete. Diese Methanosarcinen, die auch im fluoreszenzmikroskopischen Bild zu erkennen waren (Abb. 60), ragten zum großen Teil aus dem eigentlichen Biofilm heraus (Abb. 62).

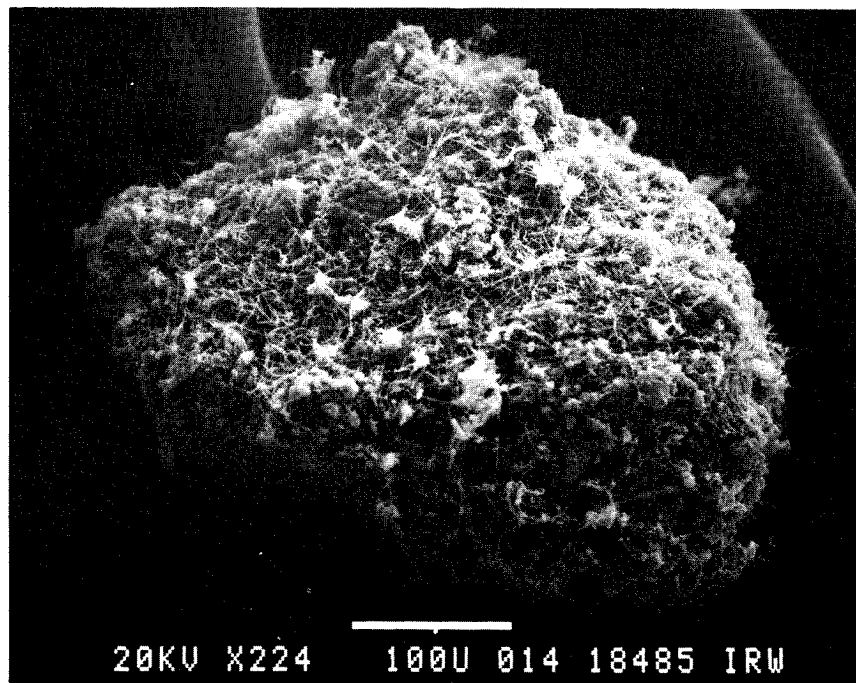


Abb. 61: Rasterelektronenmikroskopisches Bild eines einzelnen Aktivkohle-Partikels nach Einsatz im Expanded-bed-Reaktor (Vergr.: 224 : 1)

Die fadenbildenden und stäbchenförmigen, ebenfalls fluoreszierenden Bakterien besetzten dagegen die zahlreichen Hohlräume der rauhen und stark zerklüfteten Oberfläche der Aktivkohle. Bei stärkerer Vergrößerung zeigte sich, daß die langen Filamente aus zahlreichen stäbchenförmigen Einzelzellen zusammengesetzt waren (Abb. 63). An den glatten Zellenden wiesen die Einzelzellen Verdickungen auf. Diese Morphologie ähnelte stark

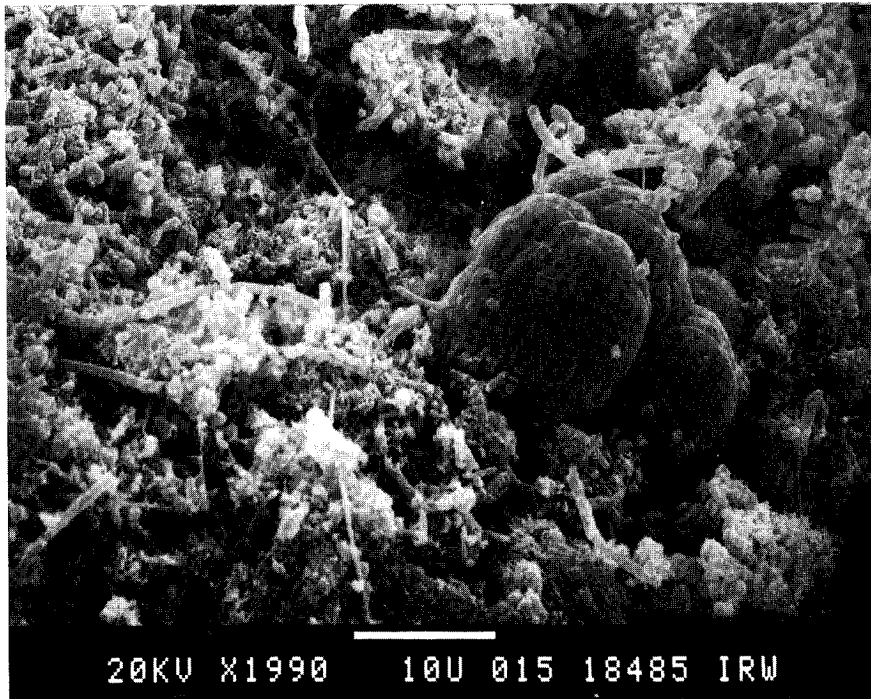


Abb. 62: Rasterelektronenmikroskopische Vergrößerung der Oberfläche eines Aktivkohle-Partikels nach Einsatz im Expanded-bed-Reaktor (Vergr.: 1990 : 1)

der Zellmorphologie von Methanothrix soehngenii (Huser et al., 1982; Zehnder et al., 1982).

Bei der kontinuierlichen Fermentation des Abwassers in Rührkessel-Fermentern konnten in der Anreicherungskultur zahlreiche begeißelte Protozoen beobachtet werden. In den anaeroben Filtern war deren Zahl noch erhöht und lag bei $1,4 - 1,9 \cdot 10^4/\text{ml}$. Während im Abwasser selbst keine Protozoen gefunden wurden, war deren Zahl im oberen Bereich der aufwärts durchströmten Säule am höchsten.

Anaerobe Protozoen wurden in zahlreichen Habitaten, so im Pansen von Wiederkäuern und Insekten und in H_2S -haltigen Sedimenten,

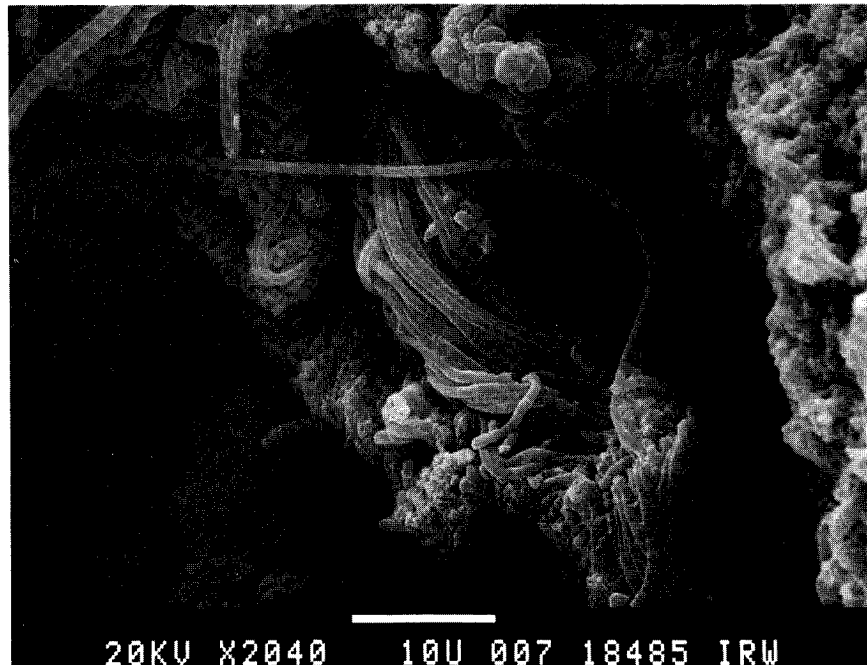


Abb. 63: Rasterelektronenmikroskopische Vergrößerung der Oberfläche eines Aktivkohle-Partikels (Vergr.: 2040 : 1)

gefunden (Hungate, 1943, 1966; Vogels et al., 1980). Bei den in den anaeroben Filtern gefundenen Protozoen handelte es sich um verschiedene Bodo-Arten, wie Bodo cruzi, die von den morphologisch ähnlichen Monas-Arten durch die nach hinten gerichtete Schleppgeißel zu unterscheiden waren (Doflein-Reichenow, 1953). Weitere Flagellaten waren Polytomella citri und Tetramitus sulcatus, die in verschmutzten Gewässern vorkommen und sich ebenfalls von Bakterien ernähren (Huber-Pestalozzi, 1962). (Die Bestimmung der Protozoen erfolgte freundlicherweise durch Herrn Dr. Bretthauer, Uni Konstanz.)

5. Diskussion

Bei einer Jahresproduktion von ca. 350.000 t stellt die Citronensäure eine vorwiegend im Lebensmittelsektor verwendete Industriechemikalie von hoher wirtschaftlicher Bedeutung dar. Die großtechnische Fermentation erfolgt weitgehend auf der Basis von Rohr- und Rübenmelassen mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger* (Schulz und Rauch, 1975). Diese aus Kostengründen eingesetzten kohlenhydrathaltigen Abfallmaterialien verursachen jedoch erhebliche Abwasserprobleme. Pro Tonne produzierter Citronensäure fallen etwa 18 - 25 t Abwasser mit einem CSB-Gehalt von bis zu 50 kg CSB/l an. Da deren Behandlung in aeroben Kläranlagen wegen des hohen biologischen O_2 -Bedarfs zu kostspielig ist, wurden in den letzten Jahren verstärkt Anstrengungen unternommen, die anfallenden Abwässer anaerob zu entsorgen (Siebert und Hustede, 1982; Kroiss, 1983).

Die vorliegende Untersuchung zeigte, daß eine maximal 80 %ige CSB-Produktion mit verschiedenen anaeroben Reaktorsystemen möglich ist. Dabei wurden etwa 5 % des im Abwasser enthaltenen Kohlenstoffes in Biomasse inkorporiert und 70 - 75 % in Biogas umgewandelt.

Die Zusammensetzung des untersuchten Abwassers aus der Citronensäure-Fermentation ist äußerst komplex. Organische Säuren und Ethanol bilden neben Kohlenhydraten etwa 60 - 75 % des Abwasser-CSB. Der restliche Anteil setzt sich u. a. aus bereits in der Melasse enthaltenen Nichtzuckerstoffen (u. a. Maillard-Produkte) sowie Zusatzstoffen der Zuckerfabrikation zusammen (Binkley und Wolfram, 1953; Schneider, 1968). Etwa 2.000 verschiedene Verbindungen wurden in der Melasse identifiziert (Schulz, 1985). Die Melasse wird zu Beginn der Citronensäure-Fermentation zunächst verdünnt, erhitzt und mit Zusätzen (Nährsalzen, Hexacyanoferrat) versehen (Schulz und Rauch, 1975). Bei der mehrfachen Erhitzung der Fermentationsmedien werden aus den in der Melasse enthaltenen reduzierenden Zuckern und Aminosäuren über die Maillard- oder Carbonylamino-

Reaktion weitere dunkelgefärbte Melanoide gebildet (Poltrock, 1983). Die Charakterisierung dieser in einer sowohl komplexen als auch uneinheitlich verlaufenden Reaktion gebildeten Melanoide und ihrer Vorstufen bereitet große Schwierigkeiten (Angrick und Rewicki, 1980). Auf die hemmende Wirkung der flüchtigen Maillard-Produkte auf das Wachstum von Hefen weisen Misselhorn und Brückner (1979) hin.

Das ebenfalls im Abwasser enthaltene Sulfat führte zu einer Verminderung der Methanbildung. Die Methanbildung aus sulfatfreiem Abwasser war höher als die Methanbildung aus dem sulfatenthaltenden Abwasser.

Eine Verminderung der Methanbildung durch Zugabe von Sulfat ergaben ebenfalls Untersuchungen an marinen und Süßwasser-Sedimenten sowie an Mischkulturen von sulfatreduzierenden und methanogenen Bakterien (Oremland et al., 1982; Winfrey und Zeikus, 1977; Abrahm und Nedwell, 1978). Mögliche Erklärungen hierfür sind der Wettbewerb von sulfatreduzierenden und methanogenen Bakterien um den verfügbaren Wasserstoff und Essigsäure (Bryant et al., 1977; Mountfort und Asher, 1981) sowie thermodynamische Gründe (Zehnder, 1978). Demgegenüber fand Cappenberg (1974, 1975) in der Bildung von H_2S die Hauptursache für die Hemmung der Methanbildung. Hierauf deuteten ebenfalls die eigenen Untersuchungen zum Einfluß von H_2S auf die Methanbildung hin. H_2S -Konzentrationen von 2 % im Biogas führten zu einer deutlichen Verminderung der Methanbildung. Kroiss (1983) gibt für eine Methanfermentation im neutralen pH-Bereich gleichfalls einen oberen Grenzwert von 2 % (Vol.) H_2S an, betont jedoch den Einfluß des CSB-/Sulfat-Verhältnisses und des CSB-Abbaugrades auf die Hemmwirkung des H_2S . Die Hemmung des undissoziierten H_2S ist außerdem abhängig vom pH-Wert, der Biogas-Bildung und dem Anteil des gelösten und ungelösten Sulfids (McCarty, 1964).

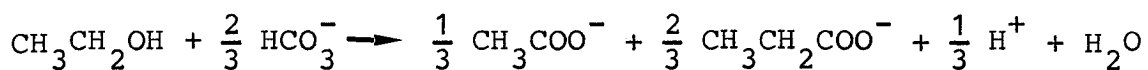
An natürlichen Standorten ist die H_2S -Konzentration im allgemeinen so niedrig, daß eine Inhibierung der Methanbakterien durch H_2S ausgeschlossen werden kann (Wellinger und Wuhrmann,

1977; Montfort und Asher, 1981). Winfrey und Zeikus (1977) konnten eine Unterdrückung der Methanbildung durch Sulfat in Süßwasser-Sedimenten durch Erhöhung der Wasserstoff-Konzentration wieder aufheben. Kristjansson et al. (1982) führen deshalb eine scheinbare Hemmung der Methanbildung durch Sulfat alleine auf unterschiedliche K_s -Werte für Wasserstoff von methanogenen und sulfatreduzierenden Bakterien zurück.

In den Untersuchungen wurde eine Akkumulation von Schwermetallsulfiden im Reaktor beobachtet. Die Bildung von unlöslichen Schwermetallsulfiden beruht vor allem auf der Gesamtkonzentration der mit dem Abwasser zugeführten Kationen (McCarty, 1964). Deren Menge schwankte allerdings bei dem hier verwendeten Abwasser aus der Citronensäure-Fermentation, da Schwermetalle während des Fermentationsprozesses mit Komplexbildnern ausgefällt werden.

Der anaerobe Abbau organischer Verbindungen beginnt mit der Hydrolyse der Biopolymere durch hydrolytische und fermentative Bakterien (Zehnder et al., 1982). Eine mögliche Limitierung dieses ersten Schrittes, wie für bestimmte Abwässer beschrieben (Kaspar und Wuhrmann, 1978; Henze und Harremoes, 1983), wurde für das hier beschriebene Abwasser nicht gefunden. Vielmehr setzte bereits in den Vorratsgefäßen und in den Substratzufuhrschläuchen eine Versäuerung unter Bildung von Essigsäure, Propionsäure und vor allem Buttersäure ein. Zeitweise lagen bis zu 28 % des Gesamt-CSB des Abwassers als Buttersäure vor, während im Reaktorablauf keine Buttersäure mehr nachzuweisen war. Mackie und Bryant (1981) geben für Buttersäure nur einen Anteil von 7 - 9 % an der gesamten Methanbildung an. Da Buttersäure schnell zu Essigsäure abgebaut wird (Braun, 1982), deutet eine Buttersäure-Akkumulation auf ungünstige Kulturbedingungen und einen erhöhten Wasserstoff-Partialdruck hin. Wasserstoff hemmt die eigene Bildung aus NADH, so daß vermehrt Propionsäure und Buttersäure als reduzierte Produkte von den acidogenen Bakterien gebildet werden (McInerney und Bryant, 1981).

Hinweise auf die am aneroben Abbau des Abwassers beteiligten Mikroorganismen ergaben sich aus der Analyse der Intermediär-Produkte beim Abbau einzelner Abwasserinhaltsstoffe. So wurde beim Abbau von Ethanol durch die Anreicherungskultur neben Essigsäure auch Propionsäure gebildet. Dies weist auf einen erst kürzlich beschriebenen neuen Weg hin: Pelobacter propionicus (Schink, 1984) und Desulfobulbus propionicus (Laanbroek et al., 1982) fermentieren Ethanol zu Essigsäure und Propionsäure:



Propionsäure wurde ebenfalls, neben Essigsäure, beim anaeroben Abbau von Milchsäure gebildet. Bei genügend hoher Sulfat-Konzentration oxidieren sulfatreduzierende Bakterien Milchsäure zu Essigsäure und reduzieren dabei Sulfat zu Sulfid (Bryant et al., 1977). Wird Milchsäure dagegen über den Acrylat-Weg abgebaut, z.B. von Clostridium propionicum, so wird neben Essigsäure auch Propionsäure im Verhältnis 1 : 2 gebildet (Gottschalk, 1979). Der weitere Abbau der intermediär gebildeten Fettsäuren verlief unterschiedlich schnell. So wurde Buttersäure fast immer vollständig abgebaut und war nur selten im Reaktorablauf nachweisbar. In den letzten Jahren gelang die Isolierung von obligat syntrophen Bakterien, die in Co-Kultur mit Wasserstoff-verwertenden methanogenen oder sulfatreduzierenden Bakterien Buttersäure abbauen: so werden von Syntrophomonas wolfei Fettsäuren mit 4 - 8 C-Atomen zu Essigsäure, Propionsäure und Wasserstoff abgebaut (McInerney et al., 1979).

Clostridium bryantii oxidiert Fettsäuren mit 4 - 11 C-Atomen zu Essigsäure, Wasserstoff und, je nach Zahl der C-Atome, zu Propionsäure (Stieb und Schink, 1985).

Der weitere Abbau der intermediär gebildeten Propionsäure erwies sich dagegen als einer der limitierenden Schritte im anaeroben Abbau des Abwassers. Bereits geringe Veränderungen der Kulturbedingungen, z. B. bei Substratwechsel, führten zu einer Akkumulation von Propionsäure im Reaktor. Eine hohe

stationäre Konzentration an Propionsäure im Reaktor ist ein Hinweis auf ungünstige Kulturbedingungen (McCarty et al., 1963). Wie der Abbau von Buttersäure, so ist auch der weitere Abbau von Propionsäure nur durch eine syntrophe Mischkultur möglich. Boone und Bryant (1980) isolierten einen obligat syntrophen Syntrophobacter wolinii, der in Co-Kultur mit einer wasserstoffverwertenden Desulfovibrio-Art Propionsäure abbaut. Die gemessenen Verdopplungszeiten lagen allerdings bei 87 h (mit Desulfovibrio) bzw. 161 h (mit Methanospirillum). Hierin lag möglicherweise auch einer der Gründe, weshalb die Methanbildung nach Zugabe von Glucose in höherer Konzentration inhibiert wurde: wird der intermediär gebildete Wasserstoff nicht sofort verwertet, so werden verstärkt reduzierte Fermentationsprodukte gebildet, die, wie Propionsäure, nur langsam abgebaut werden können. Einen ähnlichen Effekt beobachteten Baresi et al. (1978) nach Zugabe von Glucose zu einer Essigsäure-Anreicherungskultur, wobei nach einem anfänglichen Anstieg der Gasbildung die Methanproduktion gleichfalls gehemmt wurde. Er führte dies u. a. auf Endprodukte des Glucose-Metabolismus zurück. Bei unzureichender Pufferung wurde die Methanbildung in den eigenen Untersuchungen jedoch primär durch das Absinken des pH-Wertes aufgrund der Säurebildung inhibiert. In den Abbauversuchen einzelner Abwasserinhaltsstoffe fiel auf, daß Propionsäure erst dann abgebaut wurde, wenn die Essigsäure-Konzentration unter etwa 10 mMol/l fiel. Bei einer Essigsäure-Konzentration von 15 mMol/l fanden Zehnder und Koch (1983) eine Verringerung der Propionsäure-Abbaurrate um 40 %. Bei einer Essigsäure-Konzentration von 80 mMol/l wird die Propionsäure-Oxidation vollständig gehemmt (Kaspar und Wuhrmann, 1978). Dies verdeutlicht die ökologische Bedeutung nicht nur der Propionsäure-Bildung sondern auch des Abbaues zu Essigsäure und letztlich Methan (Goldberg und Cooney, 1981; Schink, 1984). Der wichtigste limitierende Schritt im anaeroben Abbau des Abwassers stellte der Abbau von Essigsäure zu Methan dar, wie auch für zahlreiche andere Abwässer beschrieben (Kaspar und

Wuhrmann, 1977; Brune, 1982; Archer, 1984). Vor allem eine Verkürzung der hydraulischen Verweilzeit führte zu einer Akkumulation von Essigsäure im Reaktor. Unter diesen Bedingungen traten im Reaktor vermehrt Methanosarcinen auf und für die Anreicherungskultur konnte ein K_s -Wert für Essigsäure von 6 mMol/l bestimmt werden. Brune (1982) fand für den anaeroben Abbau eines Brüdenkondensates bei kurzen Verweilzeiten ebenfalls vorwiegend Methanosarcinen und ermittelte für sie einen K_s -Wert von 13,9 mMol/l. Für Reinkulturen von Methanosarcinen wurden K_s -Werte von 3 - 5 mMol/l gemessen (Smith und Mah, 1978; Schönheit et al., 1982). Dolfing (1985) weist auf die Möglichkeit hin, daß ein hoher K_s -Wert möglicherweise auf eine limitierte Diffusion von Essigsäure in die Sarcinenpakete zurückzuführen ist. Für eine Anreicherungskultur aus einem Reaktor mit hoher hydraulischer Verweilzeit wurde ein K_s -Wert für Essigsäure von 0,9 - 1,2 mMol/l bestimmt. Brune (1982) fand bei hohen hydraulischen Verweilzeiten einen K_s -Wert von 0,77 mMol/l Essigsäure und vorherrschend Methanothrix-ähnliche Methanbakterien, für die Huser et al. (1982) einen K_s -Wert von 0,7 mMol/l Essigsäure angeben. Diese fadenbildenden Methanbakterien waren in den anaeroben Filtern mit künstlichen Aufwuchsflächen auch bei kurzen hydraulischen Verweilzeiten noch in großer Zahl zu finden. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Trägerpartikel zeigten zahlreiche lange Filamente, die in der rauhen Oberfläche des Trägermaterials verankert waren. Sowohl in den Rührkessel-Fermentern als auch in den Reaktoren mit Biomasse-Rückhaltung fanden sich zahlreiche Protozoen. Ihre Zahl lag in den anaeroben Filtern bei $1,4 - 1,9 \cdot 10^4$ /ml. Krumholz et al. (1983) fanden im Pansen von Schafen $34,5 \cdot 10^5$ /ml Protozoen. In anaeroben Festbett-Reaktoren fanden Young und McCarty (1969) zahlreiche freischwimmende Ciliaten und Amöben. Henze und Harremoes (1983) weisen auf die Bedeutung der Protozoen für die Erniedrigung der Ablauf-Konzentrationen suspendierter Feststoffe im Festbett-Reaktor hin. Eine Besiedlung der Protozoenoberfläche mit methanogenen Bakterien, wie

sie von Vogels et al. (1980) für Pansen-Protozoen beschrieben wurden, konnte im Fluoreszenz-Mikroskop nicht beobachtet werden. Die auf der Oberfläche von Protozoen gefundenen Bakterien können bis zu 10 % der Gesamtzahl an Bakterien in der Pansenflüssigkeit ausmachen (Krumholz und Forsberg, 1983).

Der anaerobe Abbau des Abwassers in kontinuierlich betriebenen Rührkessel-Fermentern erbrachte stabile Abbauleistungen nur bei hydraulischen Verweilzeiten von mindestens 6 Tagen. Die maximale Abbaurate betrug 3,9 g CSB/l · d bei einem CSB-Abbaugrad von 53 %, während bei längeren Verweilzeiten maximal 76 % des Zulauf-CSB abgebaut wurden. Binot et al. (1983) erreichten mit einem ähnlichen Abwasser aus der Citronensäure-Produktion (CSB: 52 g/l) bei einer maximalen Raumbelastung von 3 g CSB/l · d einen Abbaugrad von 80 % bei einer hydraulischen Verweilzeit von 20 Tagen. Ebenfalls mit einem Abwasser aus der Citronensäure-Produktion (CSB: 47 g/l) erzielte Frostell (1981) mit einem Kontaktschlamm-Verfahren einen CSB-Abbaugrad von 79 % bei einer Raumbelastung von 2,5 g CSB/l · d. Die im Vergleich zu anderen Industrieabwässern relativ niedrige Abbauleistung führt Frostell (1985) auf das Vorhandensein von biologisch nicht abbaubaren bzw. toxisch wirkenden Substanzen sowie den hohen Sulfat-Gehalt zurück.

Aufgrund des hohen Calcium-Gehaltes des hier untersuchten Abwassers und einer Ausfällung von CaCO_3 im Reaktor bildete sich ein Feststoff-Gradient aus. Dieser Gradient konnte auch nicht durch eine stärkere Rührung beseitigt werden. Andererseits wird durch eine Ca^{2+} -Konzentration im Reaktorzulauf die Schlamm-sedimentation verstärkt und damit die Auswaschgefahr für die Biomasse verringert (Hulshoff Pol et al., 1983). Bei einem nur wenig gerührten Fermenter wird außerdem geflockt vorliegende Biomasse leicht zurückgehalten (van den Berg, 1984).

Durch Rückhaltung der Bakterien in einem anaeroben Filter wird eine Entkopplung der Biomasse-Verweilzeit von der hydraulischen

Verweilzeit erreicht. Das Prinzip des anaeroben Filters wurde erstmals von Young und McCarty (1969) demonstriert und seither im Labor- und Industrie-Maßstab angewandt (Henze und Harremoes, 1983). Mit dem anaeroben Filter lassen sich Abbauraten von 25 g CSB/l $\cdot$ d erzielen, wobei der CSB-Abbaugrad im allgemeinen bei über 70 % liegt (Switzenbaum, 1983). Für den anaeroben Abbau des Abwassers aus der Citronensäure-Fermentation erwies sich der Festbett-Reaktor allerdings aufgrund der hohen Verstopfungsgefahr als ungeeignet. Bereits nach nur 5-wöchigem Betrieb und einer erreichten Abbauleistung von 1,1 g CSB/l $\cdot$ d kam es zu einer Verfestigung des Trägerbettes und schließlich zur Verstopfung. Das dabei eingesetzte Trägermaterial, poröses Sinterglas in Form von Raschigringen, wurde bisher erfolgreich bei der anaeroben Reinigung Feststoff-freier Brüdenkondensate verwendet (Aivasidis und Wandrey, 1983). Bei dem hier untersuchten Abwasser waren Calciumcarbonat-Ablagerungen und die in suspendierter Form vorliegende Biomasse die Ursache für die Verstopfung des Festbettes. Nach van den Berg und Lentze (1979) liegt im Festbett-Reaktor der größte Teil der Biomasse in suspendierter Form vor und nur ein geringer Anteil ist auf der Trägeroberfläche fixiert. Begünstigt wird die Verstopfung des Festbettes noch durch die Bildung eines Schleimes, wie sie von Hilton et al. (1983) für eine essigsäureabbauende Anreicherungskultur in einem Festbett-Reaktor beschrieben wird.

Eine Möglichkeit, die Verstopfungsgefahr zu verringern, stellt der Festbett-Umlauf-Reaktor dar (Aivasidis und Wandrey, 1983). Durch den Umlaufstrom wird nicht nur überschüssige Biomasse abgeschert, sondern auch ein pH- und Toxizitäts-Gradient abgebaut (Henze und Harremoes, 1983). Mit einem Festbett-Umlauf-Reaktor und porösem Sinterglas als Trägermaterial wurde eine maximale Abbauleistung von 17,4 g CSB/l $\cdot$ d bei einer hydraulischen Verweilzeit von 1,02 Tagen erreicht. Allerdings führten auch hier nach längerem Betrieb Calciumcarbonat-Ablagerungen und die in den Hohlräumen des Trägerbettes suspendierte

Biomasse zu einer Verstopfung des Reaktors. Zur Entfernung überschüssiger Biomasse aus dem Reaktor sind höhere Scherkräfte, d. h. ein stärkerer Umlaufstrom, erforderlich. Das Recycle-Verhältnis ist dabei abhängig von der Reaktorhöhe und der CSB-Belastung des Zulaufes (Henze und Harremoes, 1983). Auch periodisches Rückspülen führte aufgrund der Calciumcarbonat-Ablagerungen bei den hier untersuchten anaeroben Filtern nicht zu einer Aufhebung der Verstopfung.

Der Expanded-bed-Reaktor bietet gegenüber dem Festbett-Reaktor den Vorteil der geringeren Verstopfungsgefahr und der besseren hydraulischen Zirkulation (Switzenbaum, 1983). Die etwa 10-mal so große spezifische Oberfläche des Trägermaterials ermöglicht eine etwa doppelt so hohe Biomasse-Konzentration im Trägerbett, verglichen mit dem Festbett-Reaktor (Henze und Harremoes, 1983). Mit einer modifizierten Aktivkohle als Trägermaterial wurden mit einem Expanded-bed-Reaktor für das Abwasser aus der Citronensäure-Produktion die höchsten Abbauleistungen erzielt. Die maximale Abbaurrate lag bei $30,8 \text{ g CSB/l} \cdot \text{d}$ bei einer hydraulischen Verweilzeit von 16,5 h. Bei dieser im Vergleich zum Rührkessel-Fermenter 8-fach höheren Abbauleistung lag der CSB-Abbaugrad bei über 70 %. Mit einem ähnlichen Abwasser aus der Citronensäure-Produktion (CSB: 35 g/l) erreichten Binot et al. (1983) mit einem Fluidized-bed-Reaktor bei einer Raumbelastung von bis zu $42 \text{ g CSB/l} \cdot \text{d}$ ebenfalls einen CSB-Abbaugrad von 70 %. Die höhere Abbauleistung war vor allem auf die im Vergleich zu anderen anaeroben Abbausystemen höhere Konzentration an aktiver Biomasse zurückzuführen.

Tab. 20 stellt die in verschiedenen Reaktorsystemen erreichten maximalen Abbauraten zusammen.

Tab. 20: Maximal erzielte Abbauleistungen bei anaerober Reinigung eines Abwassers aus der Citronensäure-Produktion in verschiedenen Reaktorsystemen

Reaktorsystem :	Rührkessel:	Festbett:	Festbett-Umlauf:	Expanded-bed:
Trägermaterial:	-	Sinterglas	Sinterglas	Aktivkohle
Abbaurrate (g CSB/l·d) :	3,9	1,1	17,4	30,8
Raumbelastung (g CSB/l·d) :	7,3	1,7	28,1	43,3
CSB-Abbaugrad (%) :	53	69	62	71
Hydraulische Verweilzeit (d) :	3,3	17,6	1,0	0,7

Aufgrund des fehlenden Umlaufstromes baute sich in dem Expanded-bed-Reaktor ein Feststoffgradient über die Reaktorhöhe auf. Disem Gradienten entgegengesetzt nahm die spezifische Methanbildungsrate mit der Reaktorhöhe zu. Zu gleichem Ergebnis gelangten Wilkie et al. (1983) bei der Untersuchung eines upflow-betriebenen Festbett-Reaktors. Sie führten dies ebenfalls auf eine Akkumulation von nicht-methanogenen Mikroorganismen im unteren Reaktorbereich zurück.

Ein interessanter Nebeneffekt des Aktivkohle-Trägers war die Adsorption von Calciumcarbonat an der Oberfläche. Hier bietet sich die Möglichkeit, durch Veränderung des spezifischen Gewichts der Aktivkohle und der Lineargeschwindigkeit im Reaktor Calciumcarbonat aus dem Reaktor auszuschwemmen. Zugleich läßt sich die Ausdehnung des Schlambettes (10 % - 50 %) steuern (Switzenbaum, 1983). Bei zu starker Expansion des Bettes wird

das Trägermaterial allerdings ausgeschwemmt und muß mit einem Umlaufstrom wieder in den Reaktor zurückgeführt werden (Van den Berg, 1984). Ein wichtiger Faktor vor allem in der Start-Phase eines anaeroben Filters ist die Bildung und Stabilität eines aktiven Biofilms an der Oberfläche des Trägermaterials. Die aktive Biomasse, die in einem Filter zurückgehalten werden kann, sowie die Diffusionsgeschwindigkeit des Substrates durch den Biofilm bestimmen die maximale Beladungsrate eines Reaktors (Kennedy und Van den Berg, 1982). Die Besiedlung der im Expanded-bed-Reaktor eingesetzten Aktivkohle erfolgte sehr schnell und wurde durch die Rauigkeit der Oberfläche unterstützt. Raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen der Trägeroberfläche zeigten einen dichten Bewuchs mit vorwiegend fadenförmigen Methanbakterien und vereinzelt Methanosarcinen. Diese überzogen netzförmig die gesamte Trägeroberfläche.

Vor allem in den offenen Poren der Aktivkohleoberfläche fanden sich lange Ketten stäbchenförmiger Methanbakterien. Durch die Rauigkeit der Trägeroberfläche werden die Mikroorganismen vor Scherkräften geschützt und ein Auseinanderbrechen der Filamente in einzelnen Zellen vermindert (Murray und Van den Berg, 1981). Dabei bestimmt der Porendurchmesser die Akkumulation der Biomasse an der Trägeroberfläche. Durch die Wahl eines geeigneten Porenvolumens konnte mit einem Polyurethanschwamm als Trägermaterial eine fast reine Methanosarcinen-Kultur angereichert werden (de Vocht et al., 1983).

Durch die Verwendung einer pulverisierten Aktivkohle wird weiterhin die Adsorption von Substrat an der Trägeroberfläche gefördert und somit lokal eine höhere Substrat-Konzentration erreicht (McConville und Maier, 1978).

Bei dem hier untersuchten Abwasser führte die Adsorption von Calciumcarbonat an der Aktivkohle-Oberfläche zu einer verringerten Akkumulation im Reaktor. Durch Adsorption von schwer

abbaubaren oder toxischen Substanzen an der Oberfläche wird die Kontaktzeit des Biofilms mit diesen Substanzen verlängert (Mann, 1985). Außerdem ermöglicht die dichte Besiedlung der Oberfläche zugleich Interaktionen zwischen verschiedenen Bakterien einer Mischkultur (Extrazelluläre Enzyme; "Interspecies H_2 -transfer") (Murray und Van den Berg, 1981). Die Bedeutung solcher "Microenvironments" für die Stabilität eines Abbauprozesses wurde in den letzten Jahren verstärkt untersucht (Fletcher, 1979; Fynn und Whitmore, 1984). Die Bildung eines Primär-Biofilms auf der Trägeroberfläche fördert die Anheftung weiterer Mikroorganismen, wodurch sich die Start-Phase eines anaeroben Filters verkürzt. Nach einer Störung, z.B. durch Überladung des Reaktors, und einem Zusammenbruch der Kultur erfolgt die Wiederbesiedlung von solchen "Microenvironments" aus.

Eine weitere Verbesserung des Trägermaterials ließe sich durch Untersuchungen der Mechanismen erreichen, die für die Anheftung der Mikroorganismen auf der Trägeroberfläche verantwortlich sind. Eine Übersicht über die bisher bekannten Mechanismen gibt Kolot (1981). Neben der Förderung einer Bakterienaggregat-Bildung scheinen Mikro-Gradienten der Substratkonzentration für die Abbauleistungen eines Reaktors wichtig zu sein (McConville und Maier, 1978).

Die Untersuchungen bestätigen die anaerobe Abbaubarkeit des Abwassers aus der Citronensäure-Produktion. Die Ergebnisse ermöglichen eine bessere Steuerung des anaeroben Abbaues im Hinblick auf die prozeßlimitierenden Abbauschritte. In Zukunft wird das Abwasser aus der Citronensäure-Produktion in einer anaeroben Anlage gereinigt (Schulz, 1985).

5. Zusammenfassung

Anaerober Abbau eines Abwassers aus der Citronensäure-Produktion

In der vorliegenden Arbeit wurde die anaerobe Umsetzung eines industriellen Abwassers zu Biogas untersucht. Dieses Abwasser fällt an bei der Herstellung von Citronensäure aus Melasse mit Aspergillus niger.

1. Das Abwasser ist organisch hoch belastet (CSB: 20.000 - 50.000 mg O_2 /l) und enthält als Hauptinhaltsstoffe niedere Alkohole und organische Säuren sowie Sulfat und Calciumcarbonat als anorganische Bestandteile.
2. Die Inhaltsstoffe des Abwassers wurden durch eine Anreicherungskultur unterschiedlich schnell abgebaut. Die Umsetzung von Essigsäure und Propionsäure bildeten die limitierenden Schritte. Der K_s -Wert für den Abbau von Essigsäure zu Methan lag bei 0,9 - 1,0 mMol/l für eine Anreicherungskultur aus einem anaeroben Filter. Propionsäure wurde nur bei einer Essigsäure-Konzentration unter 10 mMol/l abgebaut.
3. Die Umsetzung der organischen Schmutzstoffe des Abwassers zu Methan wurde durch das im Abwasser enthaltene Sulfat beeinflusst. Bereits bei einer Sulfat-Konzentration von 9 mMol/l war die Methanbildung zugunsten der Sulfatreduktion vermindert. Höhere Sulfat-Konzentrationen hemmten die Methanbildung aufgrund des gebildeten H_2S . Der K_i -Wert für die H_2S -Hemmung der Methanbildung lag bei 27,5 mMol/l H_2S .
4. a) In einem Rührkessel-Fermenter wurde eine maximale Abbaurate von 3,9 g CSB/l · d bei einer hydraulischen Verweilzeit von 3,3 Tagen und einer CSB-Reduktion von 53 % erreicht. Eine CSB-Reduktion über 70 % war nur bei hydraulischen Verweilzeiten von mehr als 10 Tagen möglich.

- b) Versuche zur Biomasse-Rückhaltung wurden mit verschiedenen Reaktor-Systemen durchgeführt.

In einem Festbett-Reaktor führte der hohe Calciumgehalt des Abwassers zu Ablagerungen von Calciumcarbonat im Trägerbett. Bei einer hydraulischen Verweilzeit von 24 h wurde mit einem Festbett-Umlauf-Reaktor eine maximale Abbaurate von 17 g CSB/l · d erreicht. Calciumcarbonat-Ablagerungen im Trägerbett konnten jedoch durch den Umlaufstrom nicht verhindert werden.

- c) Die höchsten Abbauleistungen wurden mit einem Schwebebett-Reaktor und einer Aktivkohle als Trägermaterial erzielt. Bei einer hydraulischen Verweilzeit von 16,5 h lag die maximale Abbaurate bei 31 g CSB/l · d.

5. Fluoreszenz- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Anreicherungskultur zeigten neben Methanosarcinen vorwiegend fadenförmige Methanbakterien. Es ist bekannt, daß Essigsäure von Methanosarcinen und Methanotherix soehngenii zu Methan abgebaut wird. Während bei langen Verweilzeiten und einem niedrigen K_S -Wert von 0,9 - 1,0 mMol/l Essigsäure vorwiegend fadenförmige Methanbakterien auftraten, charakterisierten kurze Verweilzeiten und ein K_S -Wert von 6,0 mMol/l Essigsäure das Auftreten von Methanosarcinen.

6. Literaturverzeichnis

- Abram, J.W.; Nedwell, D.B. (1978): Inhibition of Methanogenesis by Sulphate Reducing Bacteria Competing for Transferred Hydrogen. Arch. Microbiol. 117, 89-92
- Ahrens, W. (1982): Persönliche Mitteilung
- Aivasidis, A.; Wandrey, C. (1983): Different Methods of Biomass Retention in Continuous Anaerobic Digestion. In: Biochemical Engineering III. Annuals of the New York Academy of Science; Dec. 27, 1983, 486-488
- Aivasidis, A.; Wandrey, C. (1984): Ein "Glasschwamm" als Bakterienspeicher - Abwasserreinigung ohne Sauerstoff. Berichte der KFA Jülich - Nr. 1900
- Aivasidis, A.; Wandrey, C. (1985): Anaerobe Behandlung von Brüdenkondensaten der Zellstoffindustrie mit immobilisierten Bakterien in einem Festbett-Umlaufreaktor. Wissenschaft und Umwelt 1, 48-57
- Andrews, J.F.; Graef, S.P. (1971): Dynamic Modeling and Simulation of the Anaerobic Digestion Process. In: Anaerobic Biological Treatment Process (Gould, R.F., ed.), American Chemical Society, Advances in Chemistry Series 105, Washington, 126-162
- Angrick, M.; Rewicki, D. (1980): Die Maillard-Reaktion. Chemie in unserer Zeit 14, 149-157
- Archer, D.B. (1984): Hydrogen-using bacteria in a methanogenic acetate enrichment culture. J. Appl. Bacteriol. 56, 125-129
- Balch, W.E.; Wolfe, R.S. (1979): Specificity and biological distribution of coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid). J. Bacteriol. 137, 256-263
- Balch, W.E.; Fox, G.E.; Magrum, L.J.; Woese, C.R.; Wolfe, R.S. (1979): Methanogens: Reevaluation of a Unique Biological Group. Microbiol. Rev. 43, 260-296
- Baresi, L.; Mah, R.A.; Ward, D.M.; Kaplan, J.R. (1978): Methanogenesis from Acetate: Enrichment Studies. Appl. Environ. Microbiol. 36, 186-197

- Barker, H.A. (1940): Studies upon the methane fermentation. IV. The isolation and culture of *Methanobacterium omelianskii*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 6, 201-220
- Barker, H.A. (1956): *Bacterial fermentations*. John Wiley & Sons, New York
- Bastin, K.-H. (1983): *Reaktionstechnische Untersuchungen zur kontinuierlichen anaeroben Fermentation, dargestellt an der Reinigung essigsäurehaltiger Abwässer mit methanogenen Bakterien*. Dissertation TU Clausthal
- Béchamp, A. (1868): Lettre à M. Dumas. *Ann. Chim. Phys. Ser.* 4, 103-111
- van den Berg, L.; Lentz, C.P. (1979): Performance of fixed film reactors in anaerobic digestion of wastes. In: *First International Symposium on Anaerobic Digestion*, Cardiff, England
- van den Berg, L. (1984): Developments in methanogenesis from industrial waste water. *Can. J. Microbiol.* 30, 975-990
- Binkley, W.W.; Wolfram, M.L. (1953): Composition of Cane Juice and Cane Final Molasses. *Advances Carbohydrate Chemistry* 8, 291-314
- Binot, R.A.; Naveau, H.P.; Nyns, E.-J. (1981): Methanogenic Potential Activity of Mixed Liquors: Fluorimetric Monitoring. *Biotech. Letters* 3, 623-628
- Binot, R.A.; Bol., T.; Naveau, H.P.; Nyns, E.-J. (1983): Biomethanation by Immobilised Fluidised Cells. *Wat. Sci. Tech.* 15, 103-115
- Boone, D.R.; Bryant, M.R. (1980): Propionate-Degrading Bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen., from Methanogenic Ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 626-632
- Bradford, M.M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Using the Principle of Protein-Dye Binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254

- Braun, R. (1982): Biogas - Methangärung organischer Abfallstoffe. Springer, Wien
- van Bruggen, J.; Stumm, C.K.; Vogels, G.D. (1983): Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. Arch. Microbiol. 136, 89-95
- Brune, G. (1982): Mikrobieller anaerober Abbau von Brüdenkondensaten aus der Zellstoffindustrie. Dissertation Uni Düsseldorf
- Bryant, M.P.; Wolin, E.A.; Wolin, M.J.; Wolfe, R.S. (1967): Methanobacillus omelianskii, a symbiotic association of two species of bacteria. Arch. Microbiol. 59, 20-31
- Bryant, M.P.; Campbell, L.L.; Reddy, C.A.; Crabill, M.R. (1977): Growth of Desulfovibrio in Lactate or Ethanol Media Low in Sulfate in Association with H₂-Utilizing Methanogenic Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1162-1169
- Cappenberg, T.E. (1974): Interrelations between sulfate-reducing and methane-producing bacteria in bottom deposits of a fresh-water lake. II. Inhibition experiments. Antonie van Leeuwenhoek 40, 297-306
- Cappenberg, T.E. (1975): A Study of Mixed Continuous Cultures of Sulfate-Reducing and Methane-Producing Bacteria. Microbiol. Ecol. 2, 60-72
- Cheeseman, P.; Toms-Wood, A.; Wolfe, R.S. (1972): Isolation and Properties of a Fluorescent Compound, Factor₄₂₀, from Methanobacterium Strain M.o.H. J. Bacteriol. 112, 527-531
- Conway de Macario, E.; Macario, A.J.L.; Wolin, M.J. (1982): Specific antisera and immunological procedures for characterization of methanogenic bacteria. J. Bacteriol. 149, 320-328
- Daniels, L. (1984): Biological methanogenesis: physical and practical aspects. Trends in Biotech. 2, 91-98
- Daniels, L.; Sparling, R.; Sprott, G.B. (1984): The Bioenergetics of Methanogenesis. Biochim. Biophys. Acta 786, 113-163

- D'Ans, L.; Lax, E. (1967): Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Springer, Berlin
- Doflein, F.; Reichenow, E. (1953): Lehrbuch der Protozoenkunde. Fischer, Jena
- Dolfing, J. (1985): Kinetics of methane formation by granular sludge at low substrate concentrations. Appl. Microbiol. Biotech. 22, 77-81
- Douglas, C.; Achatz, F.; Böck, A. (1980): Electrophoretic Characterization of Ribosomal Proteins from Methanogenic Bacteria. Zbl. Bact., I. Abt., Org. C, 1-11
- Eastman, J.P.; Ferguson, J.F. (1981): Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. Journal WPCF 53, 352-366
- Eker, A.P.M.; Pol, A.; van der Meyden, P.; Vogels, G.D. (1980): Purification and properties of 8-hydroxy-5-deazaflavin derivatives from Streptomyces griseus. FEMS Microbiol. Lett. 8, 161-165
- Ellefson, W.L.; Wolfe, R.S. (1981): Component C of the methyl-reductase system of Methanobacterium. J. Biol. Chem. 256, 4259-4262
- Fletcher, M. (1979): The attachment of Bacteria to Surfaces in Aquatic Environments. In: Adhesion of Microorganisms of Surfaces (Ellwood, D.C.; Melling, J., eds.), Academic Press, London
- Fox, G.E.; Stackebrandt, E.; Hespell, R.B.; Gibson, J.; Maniloff, J.; Dyer, T.A.; Wolfe, R.S.; Balch, W.E.; Tanner, R.S.; Magrum, L.J.; Blakemore, R.; Gupta, R.; Bonen, L.; Lewis, B.J.; Stahl, D.A.; Luehrsen, K.R.; Chen, K.N.; Woese, C.R. (1980): The phylogeny of prokaryotes. Science 209, 457-463
- Frostell, B. (1981): Anamet - Anaerobic-Aerobic Treatment of Concentrated Waste Water. 36th Industr. Waste Conf., West Lafayette, USA
- Frostell, B. (1985): The ANAMET and BIOMET systems for biomethanation of organic materials. Conservation & Recycling 8, 233-249

- Fry, L.J. (1973): Methan digesters for fuel gas and fertilizers. Edit. Rougemont, Schweiz
- Fuchs, G.; Stupperich, E. (1984): CO₂ Reduction to Cell Carbon in Methanogens. In: Microbial Growth on C₁-compounds. (Crawford, R.L.; Hanson, R.S., eds.), Proc. 4th Int. Symp. ASM, Washington D.C.
- Fynn, G.H.; Whitmore, T.N. (1984): Retention of Methanogens in Colonized Reticulated Polyurethane Foam Biomass Support Particle. Biotech. Letters 6, 81-86
- Goldberg, J.; Cooney, C.L. (1981): Formation of Short-Chain Fatty Acids from H₂ and CO₂ by a Mixed Culture of Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 41, 148-154
- Gottschalk, G. (1979): Bacterial Metabolism. Springer, New York
- Gujer, W.; Zehnder, A.J.B. (1983): Conversion Process in Anaerobic Digestion. Wat. Sci. Tech. 15, 127-167
- Hattingh, W.H.J.; Thiel, P.G.; Siebert, M.L. (1967): Determination of Protein Content of Anaerobic Digestion Sludge. Warter Research 1, 185-189
- Heijnen, J.J. (1983): Anaerobic Wastewater Treatment. Proc. of the European Symposium: Anaerobic Waste Water Treatment, Noordwijkerhout, Netherlands
- Henze, M.; Harremoes, P. (1983): Anaerobic Treatment of Wastewaters in Fixed Film Reactors - A Literature Review. Wat. Sci. Tech. 15, 1-101
- van den Heuvel, J.C.; Zoetemeyer, R.J. (1982): Stability of the Methane Reactor: A simple Model including Substrate Inhibition and Cell Recycle. Process Biochemistry, May/June, 14-19
- Hilton, M.G.; Turner, R.J.; Powell, G.E.; Archer, D.B. (1983): Methanogenesis from Acetate by a Mesophilic Anaerobic Filter. Process Biochemistry, Dec., 2-5
- Hobson, P.N.; Shaw, B.G. (1971): The Role of Strict Anaerobes in the Digestion of Organic Material. In: Microbial Aspects of Pollution (Sykes, G.; Skinner, D.A., eds.), Academic Press, London

- Hobson, P.N. (1981): Microbial Pathways and Interactions in the Anaerobic Treatment Process. In: Mixed Culture Fermentations (Bushell, M.E.; Slater, J.H., eds.), Academic Press, London
- Höllriegel, V.; Scherer, P.; Renz, P (1983): Isolation and characterization of the Co-methyl and Co-aquo derivate of 5-hydroxybenzimidazolylcobamide (factor III) from *Methanosarcina barkeri* grown on methanol. FEBS Lett. 151, 156-158
- Hoppe-Seyler, F. (1887): Die Methangärung der Essigsäure. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 11, 561-568
- Huber-Pestalozzi, G. (1962): Das Phytoplankton des Süßwassers. In: Die Binnengewässer (Thienemann, A., Hrsg.) XVI, 2/1, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart
- Hulshoff Pol, C.W.; de Zeeuw, J.; Velzeboer, C.T.M.; Lettinga, G. (1983): Granulation in UASB-Reactors. Wat. Sci. Tech. 15, 291-304
- Hungate, R.E. (1943): Quantative Analyses on the Cellulose Fermentation by Termite Protozoa. Annals of the Entomological Society of America. Columbus 36, 730-739
- Hungate, R.E. (1950): The anaerobic mesophilic cellolytic bacteria. Bact. Rev. 14, 1-63
- Hungate, R.E. (1966): The Rumen and Its Microbes. Academic Press, New York
- Hungate, R.E. (1967): Hydrogen as an Intermediate in the Rumen Fermentation. Arch. Microbiol. 59, 158-164
- Hungate, R.E. (1969): A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In: Methods in Microbiology, 3B (Norris, J.R.; Ribbons, D.W., eds.), 117-132
- Huser, B.A.; Wuhrmann, K.; Zehnder, A.J.B. (1982): *Methanotrix soehngenii* gen. nov. sp. nov., a New Acetotrophic Non-hydrogen-oxidizing Methane Bacteria. Arch. Microbiol. 132, 1-9
- Inden, P.P. (1977): Mikrobielle Methanerzeugung aus Biomasse durch anaerobe Fermentation im technischen Maßstab. Dissertation TH Aachen

- Jones, W.J.; Leigh, J.A.; Mayer, F.; Woese, C.R.; Wolfe, R.S. (1983): *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* 136, 254-261
- Jung, H. (1949): Schnellfaulung zur Behandlung stark organisch verschmutzter Abwässer. *Vom Wasser* 17, 38-43
- Kandler, O. (Hrsg.) (1982): *Archaeobacteria*. Proc. 1st International Workshop on Archaeobacteria, München, 27.01. - 01.07.1981. Fischer, Stuttgart
- Kaspar, H.F.; Wuhrmann, K. (1978): Kinetic Parameters and Relative Turnovers of Some Important Catabolic Reactions in Digesting Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 1-7
- Kennedy, K.J.; van den Berg, L. (1982): Anaerobic digestion of piggery waste using a stationary fixed film reactor. *Agricultural Wastes* 4, 151-158
- Kiener, A.; Leisinger, T. (1983): Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 4, 305-312
- Klass, D.L. (1984): Methane from Anaerobic Fermentation. *Science* 223, 1021-1028
- Kleinzeller, A.; Malek, J.; Longmuir, J.S.; Kovac, L.; Cerkasov, J.; Chaloupka, J.; Kotyk, A.; Burger, M. (1965): *Manometrische Methoden und ihre Anwendung in der Biologie und Biochemie*. Fischer, Jena
- König, H.; Stetter, K.O. (1982): Isolation and Characterization of *Methanlobus tindarius*, sp. nov., a Coccoid Methanogen Growing only on Methanol and Methylamines. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3*, 478-490
- Kolot, F.B. (1981): Microbial Carriers - strategy for selection. *Process Biochemistry*, Aug./Sept., 2-9
- Kristjansson, J.K.; Schönheit, P.; Thauer, R.K. (1982): Different K_s Values for Hydrogen of Methanogenic Bacteria and Sulfate Reducing Bacteria: An Explanation for the Apparent Inhibition of Methanogenesis by Sulfate. *Arch. Microbiol.* 131, 278-282

- Kroiss, H. (1981): Anaerobe Abwasserreinigung. Österr. Wasserwirtschaft 33, 56-64
- Kroiss, H.; Wabnegg, F. (1983): Testing Method to Characterize Anaerobic Sludge and Anaerobic Removal of Substrates. Poster, 3rd Int. Conf. Anaerobic Digestion '83, Boston, USA
- Krumholz, L.R.; Forsberg, C.W. (1983): Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. Can. J. Microbiol. 29, 676-680
- Kuenen, J.G.; Harder, W. (1982): Microbial competition in Continuous Culture. In: Experimental Microbial Ecology (Burns, R.G.; Slater, J.H., eds.) 20, 342-367
- Laanbroek, H.J.; Abee, T.; Voogd, J.L. (1982): Alcohol Conversions by *Desulfovibrio propionicus* Lindhorst in the Presence and Absence of Sulfate and Hydrogen. Arch. Microbiol. 133, 178-184
- Large, P.J. (1984): Methylo-trophy and Methanogenesis. In: Aspects of Microbiology (Cole, J.A.; Knowles, C.J.; Schlesinger, D., eds.), Vol. 8, Van Nostrand Reinhold, UK
- Latham, M.J.; Wolin, M.J. (1977): Fermentation of Cellulose by *Ruminococcus flavefaciens* in the Presence and Absence of *Methanobacterium ruminantium*. Appl. Environ. Microbiol. 34, 297-301
- Latham, M.J.; Wolin, M.J. (1978): Use of the Serum Bottle Technique to Study Interactions between Strict Anaerobes in Mixed Culture. In: Techniques for the Study of Mixed Populations (Soc. Appl. Bacteriol., Technical Ser. 11) Academic Press, London
- Leigh, J.A.; Wolfe, R.S. (1983): Carbon Dioxide Reduction Factor and Methanopterin, Two Coenzymes Required for CO₂ Reduction to Methane by Extracts of *Methanobacterium*. J. Biol. Chem. 258, 7536-7540
- Lettinga, G.; van Velsen, A.F.M.; Hobma, S.W.; de Zeeuw, W.; Klapwijk, A. (1980): Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) reactor concept for biological waste water treatment, especially for anaerobic treatment. Biotechn. Bioeng. 22, 699-734

- Liebmann, H (Hrsg.) (1956): Gewinnung und Verwertung von Methan aus Klärschlamm und Mist. Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flußbiologie, 3., Oldenburg, München
- Mackie, R.J.; Bryant, M.P. (1981): Metabolic Activity of Fatty Acid-Oxidizing Bacteria and the Contribution of Acetate, Propionate, Butyrate, and CO₂ to Methanogenesis in Cattle Waste at 40° and 60°C. Appl. Environ. Microbiol. 41, 1363-1373
- Mah, R.A.; Smith, M.R. (1981): The Methanogenic Bacteria. In: The Prokaryotes (Starr, M.P. et al., eds.), Vol. 1, 76, Springer, Berlin, 948-977
- Mah, R.A.; Kuhn, O.A. (1984): Transfer of the Type Species of the Genus Methanococcus to the Genus Methanosarcina, Naming it Methanosarcina mazei (Barker, 1936) comb. nov. et emend. and Conservation of the Genus Methanococcus (Approved Lists 1980) with Methanococcus vanniellii (Approved Lists 1980) as the Type Species. Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 263-265
- Mann, Th. (1985): Verbesserung des Belebungsverfahrens durch Aktivkohle. Korrespondenz Abwasser 32, 148-149
- Matheson, A.T.; Yaguchi, M. (1982): The Evolution of the Archaeobacterial Ribosome. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. C3, 192-199
- McCarty, P.L.; Jeris, J.S.; Murdoch, W. (1963): The Significance of Individual Volatile Acids in Anaerobic Treatment. 3. WPCF 35, 1501-1516
- McCarty, P.L. (1964): Anaerobic Waste Treatment Fundamentals. Part I - IV. Public Works; 95, 9-12
- McConville, T.; Maier, W.J. (1978): Use of Powdered Activated Carbon to Enhance Methane Production in Sludge Digestion. Biotechn. Bioeng. Symp. 8, 345-359
- McInerney, M.J.; Bryant, M.P.; Pfennig, N. (1979): Anaerobic Bacterium that Degrades Fatty Acids in Syntrophic Association with Methanogens. Arch. Microbiol. 122, 129-135

- McInerney, M.J.; Bryant, M.P. (1981): Basic Principles of Bioconversions in Anaerobic Digestion and Methanogenesis. In: Biomass conversion process for energy and fuels (Sofer, S.S.; Zaborsky, O., eds.), Plenum Press, New York
- Miller, T.L.; Wolin, M.J. (1985): *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. Arch. Microbiol. 141, 116-122
- Misselhorn, K.; Brückner, H. (1979): Flüchtige Maillardprodukte und ihre Wirkung auf die Atmung der Hefezelle. In: Proc. 4. Symp. Techn. Mikrobiol. (Dellweg, H., Hrsg.), Berlin, 95-106
- Mountfort, D.O.; Asher, R.A. (1981): Role of Sulfate Reduction Versus Methanogenesis in Terminal Carbon Flow in Polluted Intertidal Sediment of Waimea Inlet, Nelson, New Zealand. Appl. Environ. Microbiol. 42, 252-258
- Mudrak, K.; Kunst, S. (1985): Biologie der Abwasserreinigung. Fischer, Stuttgart
- Murray, W.D.; van den Berg, L. (1981): Effects of Support Material on the Development of Microbial Fixed Film Converting Acetic Acid to Methane. J. Appl. Bacteriol. 51, 257-265
- Nyns, E.J.; Naveau, H.P.; Chome, R.; Bertrand, Y. (1980): Digesters - a worldwide review. In: Proc. 1st Int. Symp. Anaerobic Digestion, Cardiff, UK
- Omeliński, W. (1906): Über Methanbildung in der Natur bei biologischen Prozessen. Zbl. Bakt. Parasitenkunde II, 15, 673-687
- Oremland, R.S.; Marsh, L.; De Marais, D.J. (1982): Methanogenesis in Big Soda Lake, Nevada: an Alkaline, Moderately Hypersaline Desert Lake. Appl. Environ. Microbiol. 43, 462-268
- Patel, G.B. (1984): Characterization and nutritional properties of *Methanothrix concilii* sp. nov., a mesophilic, aceticlastic methanogen. Can. J. Microbiol. 30, 1383-1396

- Paynter, M.J.B.; Hungate, R.E. (1968): Characterization of *Methanobacterium mobilis*, sp. n., Isolated from the Bovine Rumen, J. Bacteriol. 95, 1943-1951
- Poltrock, U. (1983): Beitrag zur Kenntnis der Farbbildung in Zuckersäften, insbesondere im Verlauf des technischen Reinigungsprozesses. Dissertation, TU Braunschweig
- Postgate, J.R. (1984): The Sulphate-Reducing Bacteria. 2nd ed., Cambridge University Press, London
- Robinson, J.A.; Tiedje, J.M. (1984): Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H_2 under resting and growing conditions. Arch. Microbiol. 137, 26-32
- Sahm, H. (1984): Anaerobic Wastewater Treatment. In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 29 (Fiechter, A., ed.), Springer, Berlin, 83-115
- Scherer, P.; Sahm, H. (1981): Effect of trace elements and vitamins on the growth of *Methanosarcina barkeri*. Acta Biotechnologica 1, 57-65
- Scherer, P.; Bochem, H.-P.; Lippert, H.; Wolff, G. (1982): Das Spurenelementbedürfnis methanbildender Bakterien und die atomare Zusammensetzung von 10 Arten. In: Proc. 5. Symp. Techn. Mikrobiol., Berlin, 9-13
- Schink, B. (1984): Fermentation of 2,3-butanediol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov. and *Pelobacter propionicus* sp. nov., and evidence for propionate formation from C_2 compounds. Arch. Microbiol. 137, 33-41
- Schlegel, H.G. (1985): Allgemeine Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart
- Schmid, G.; Pecher, T.H.; Böck, A. (1982): Properties of the Translational Apparatus of Archaeobacteria. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C3, 209-217
- Schneider, F. (Hrsg.) (1968): Technologie des Zuckers. Schaper, Hannover

- Schoberth, S.M. (1978): Mikrobielle Methanisierung von Klärschlamm. Chemie - Biologie - Potential. In: Biologische Abfallbehandlung: Klärschlamm. Stand und Aussichten. Bundesministerium für Forschung und Technologie (Hrsg.), 87-135
- Schoberth, S.M. (1981): Anaerobe Prozeßführung - grundsätzliche Mikrobiologische Überlegungen. In: 11. Abwassertechn. Sem.: Biologische Stabilisierung von Schlämmen und hochkonzentrierten Abwässern. Berichte aus Wassergütwirtschaft und Gesundheitsingenieurwesen. TU München 33, 91-119
- Schoberth, S.M.; Brune, G.; Brunner, M.; Kneifel, H.; Sahm, H. (1985): Gewinnung von Biogas aus ungewöhnlichen Reststoffen: Brüdenkondensat, Polyamine, halogenierte Aromaten. Wissenschaft und Umwelt 1, 58-64
- Schönheit, P.; Kristjansson, J.K.; Thauer, R.K. (1982): Kinetic Mechanism for the ability of Sulfate Reducers to Out-compete Methanogens for Acetate. Arch. Microbiol. 132, 285-288
- Schug, A.; Sahm, H. (1983): Anaerobic Degradation of Lactose to Methane by a Defined Mixed Culture. Proc. Europ. Symp.: Anaerobic Waste Water Treatment. Noordwijkerhout, Netherlands
- Schulz, G.; Rauch, J. (1974): Citronensäure. In: Ullmanns Enzyklopädie d. techn. Chemie, 4. Aufl., Band 9, 624-635
- Schulz, G. (1985): Biotechnologie und Umweltschutz bei Benkiser. Vortrag v. 18.01.1985 in Ladenburg
- Siebert, D.; Hustede, H. (1982): Citronensäure - Fermentation - biotechnologische Probleme und Möglichkeiten der Rechnersteuerung. Chem.-Ing.-Tech. 54, 659-669
- Sixt, H. (1979): Reinigung organisch hochverschmutzter Abwässer mit dem anaeroben Belebungsverfahren am Beispiel von Abwässern der Nahrungsmittelherstellung. Veröffentlichungen des Inst. f. Siedlungswasserwirtschaft der Universität Hannover, Heft 50

- Sixt, H. (1981): Einsatz und Verfahrenstechnik der anaeroben Abwasserreinigung. Chem.-Ing.-Tech. 53, 844-849
- Skogman, H. (1979): Effluent Treatment of Molasses Based Fermentation Wastes. Process Biochemistry Jan., 5-25
- Smith, M.R.; Mah, R.A. (1978): Growth and Methanogenesis by Methanosarcina Strain 227 on Acetate and Methanol. Appl. Environ. Microbiol. 36, 870-879
- Smith, M.R.; Zinder, S.H.; Mah, R.A. (1980): Microbial Methanogenesis from Acetate. Process Biochemistry, May, 34-39
- Söhngen, M.N.L. (1906): Sur le role du methane dans la vie organique. Rec. Trav. Chin. 29, 238-273
- Sowers, K.R.; Johnson, J.L.; Ferry, J.G. (1984): Phylogenetic Relationships Among the Methylophilic Methane-Producing Bacteria and Emendation of the Family. Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 444-450
- Stadlbauer, E.A. (1982): Methanbildung durch anaerobe Fermentation. In: Biogasanlagen (Stadlbauer, E.A.; Sixt, H.; Konstandt, H.G., Hrsg.), Kontakt & Studium, Band 103, Grafenau
- Stetter, K.O. (1985): Extrem thermophile Bakterien. Naturwissenschaften 72, 291-301
- Stieb, M.; Schink, B. (1985): Anaerobic oxidation of fatty acids by Clostridium bryantii sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium. Arch. Microbiol. 140, 387-390
- Stupperich, E.; Fuchs, G. (1984): Autotrophic synthesis of activated acetic acid from two CO₂ in Methanobacterium thermoautotrophicum. I/II. Arch. Microbiol. 139, 8-13/14-20
- Switzenbaum, M.S. (1983): A Comparison of the Anaerobic Filter and the Anaerobic Expanded/Fluidized Bed Processes. Wat. Sci. Tech. 15, 345-358
- Thauer, R. (1976): Limitation of microbial H₂-formation via fermentation. In: Microbial energy conversion (Schlegel, H.-G.; Barnea, J., eds.), 201-204

- Thauer, R.K.; Fuchs, G. (1979): Methanogene Bakterien. Naturwissenschaften 66, 89-94
- Thauer, R.K. (1985): Nickelenzyme im Stoffwechsel von methanogenen Bakterien. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 103-112
- Thiel, P.G. (1969): The Effect of Methane Analogues on Methanogenesis in Anaerobic Digestion. Water Research 3, 215-223
- Toerien, D.F.; Siebert, M.L.; Hattingh, W.H.J. (1967): The Bacterial Nature of the Acid-Forming Phase of Anaerobic Digestion. Water Research 1, 497-507
- de Vocht, M.; van Meenen, P.; Van Asche, P.; Verstraete, W. (1983): Influence of Sedimentation and Adhesion on Selection of Methanogenic Associations. Process Biochemistry, Dec., 31-34
- Vogels, G.D.; Hoppe, W.F.; Stumm, C.K. (1980): Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. Appl. Environ. Microbiol. 40, 608-612
- Vogels, G.D.; van der Drift, C.; Stumm, C.K.; Keltjens, J.T.M.; Zwart, K.B. (1984): Methanogenesis: surprising molecules, microorganisms and ecosystems. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. 50, 557-567
- Wagner, R. (1976): Neue Gesichtspunkte zur Methodik und zur Beurteilung des Verdünnungs-BSB. gwf-wasser/abwasser 117, 443-450
- Wellinger, A.; Wuhrmann, K. (1977): Influence of Sulfide Compounds on the Metabolism of Methanobacterium Strain AZ. Arch. Microbiol. 115, 13-17
- Wiegant, W.M.; Claasen, J.A.; Borghans, A.J.M.L.; Lettinga, G. (1983): High rate thermophilic anaerobic digestion for the generation of methane from organic wastes. Proc. Europ. Symp.: Anaerobic Waste Water Treatment. Noordwijkerhout, Netherlands
- Wilkie, A.; Reynolds, P.J.; Colleran, E. (1983): Media effects in anaerobic filters. Proc. Europ. Symp.: Anaerobic Waste Water Treatment. Noordwijkerhout, Netherlands

- Winfrey, M.R.; Zeikus, J.G. (1977): Effect of Sulfate on Carbon and Electron Flow During Microbial Methanogenesis in Freshwater Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 275-281
- Winter, J. (1984): Methanogenese und ihre praktische Anwendung bei der Biogasgewinnung. Vortrag des 4. Filderstädter Colloquiums: Biotechnologie, Abwasser, Abfallrecycling, 25-37
- Woese, C.R.; Fox, G.E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5088-5090
- Wolfe, R.S. (1971): Microbial Formation of Methane. *Adv. Microbiol. Phys.* 6, 107-146
- Young, J.C.; McCarty, P.L. (1969): The Anaerobic Filter for Waste Treatment, *J. WPCF* 41, 160-173
- Zehnder, A.J.B. (1976): Ökologie der Methanbakterien. Dissertation ETH Zürich
- Zehnder, A.J.B.; Wuhrmann, K. (1977): Physiology of a Methanobacterium strain AZ. *Arch. Microbiol.* 111, 199-205
- Zehnder, A.J.B. (1978): Ecology of Methane Formation. In: *Water Pollution Microbiology* (Mitchell, R., ed.), Vol. 2, Chap. 13, Wiley & Sons, New York, 349-376
- Zehnder, A.J.B.; Huser, B.A.; Brock, T.D.; Wuhrmann, K. (1980): Characterization of an acetate decarboxylating non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Arch. Microbiol.* 124, 1-11
- Zehnder, A.J.B.; Ingvorsen, K.; Mart, Th. (1982): Microbiology of methane bacteria. In: *Anaerobic Digestion 1981* (Hughes et al., eds.), Elsevier, Biomed. Press, Amsterdam, 45-68
- Zehnder, A.J.B.; Koch, M.E. (1983): Thermodynamic and kinetic interactions of the final steps in anaerobic digestion. *Proc. Europ. Symp.: Anaerobic Waste Water Treatment*. Noordwijkerhout, Netherlands

- Zeikus, J.G. (1977): The Biology of Methanogenic Bacteria. Bacteriol. Rev. 41, 514-541
- Zeikus, J.G. (1983): Chemical and Fuel Production from One-Carbon Fermentations: A Microbiological Assessment. In: Organic chemicals from biomass (Wise, D.L., ed.), Biotechnology Series Vol. 4, 359-383
- Zeikus, J.G.; Kerby, R.; Krzycki, J.A. (1985): Single-Carbon Chemistry of Acetogenic and Methanogenic Bacteria. Science 227, 1167-1173
- Zillig, W.; Schnabel, R.; Tu, J.; Stetter, K.O. (1982): The Phylogeny of Archaeobacteria, Including Novel Anaerobic Thermoacidophiles in the Light of RNA Polymerase Structure. Naturwissenschaften 69, 197-204
- Zinder, S.H.; Mah, R.A. (1979): Isolation and Characterization of a Thermophilic Strain of Methanosarcina Unable to Use H_2/CO_2 for Methanogenesis. Appl. Environ. Microbiol. 38, 996-1008

