

# Elektrooptische und -chemische Erfassung physiologischer Zustände von Bakterienzellen in Biogasprozessen

*U. Enseleit<sup>1</sup>, S. Sachse<sup>1</sup>, E. Kiehlhorn<sup>2</sup>, S. Junne<sup>2</sup>, W. Vonau<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e.V. Meinsberg,  
Kurt-Schwabe-Straße 4, 04736 Waldheim, Kontakt: [www.ksi-meinsberg.de](http://www.ksi-meinsberg.de)*

<sup>2</sup>*TU Berlin, Fachgebiet Bioverfahrenstechnik, Institut für Biotechnologie,  
Ackerstraße 71-76 ACK 24, D-13355 Berlin, Kontakt: [www.bioprocess.tu-berlin.de](http://www.bioprocess.tu-berlin.de)*

## Zusammenfassung

Vorgestellt wird ein neuartiges Messverfahren zur Bestimmung der Polarisierbarkeit von Bakterienzellen für den Einsatz in Biogaskulturen. Damit kann der physiologische Zustand, insbesondere die Vitalität von Zellen, schnell und genau erfasst werden. Die Ergebnisse erlauben Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der Zellen in einer Biogasanlage. Gekoppelt wird die Atline-Methode mit einem variabel positionierbaren Lanzenkörper, mit dem kritische Zonen hinsichtlich der Mikroflora in der Flüssigphase in Biogasreaktoren detektiert werden können. In diesem Lanzenkörper sind prozess-taugliche miniaturisierte elektrochemische Sensoren integriert und somit Messungen direkt im Fermentermedium einer Biogasanlage möglich. Die unmittelbar zu erfassenden Messgrößen sind der pH-Wert, das Redoxpotential, die Temperatur und die Konzentration von gelöstem Kohlendioxid.

**Schlagwörter:** elektrooptische Messungen, zellphysiologischer Zustand, elektrochemische Sensoren, Multisensorsonde, Biogasanlage

## Einleitung

Der zellphysiologische Zustand stellt ein wichtiges Kriterium zur Bewertung eines Bioprozesses dar. Leider ergeben sich bei Biogasprozessen durch die Komplexität der Probenzusammensetzung und die Notwendigkeit, eine anlagenspezifische Bewertung durchzuführen, verschiedene Herausforderungen. Durch sich dynamisch ändernde mikrobielle Zusammensetzungen ist die Festlegung von Referenzzuständen schwierig, insbesondere bei der Anwendung von Färbemethoden zur Einschätzung des Zellzustandes, denn deren Durchdringungsgrad hängt von der mikrobiellen Zusammensetzung ab [1]. Wenn nicht direkt an Anlagen gemessen werden kann, verändert sich zudem der zellphysiologische Zustand durch die Probenbehandlung.

Weiterhin laufen in einer Biogasanlage auf Mikroorganismen basierende Prozesse ab, die zum Beispiel durch den pH-Wert, das Redoxpotential, die Temperatur und die  $dCO_2$ -Konzentration beeinflusst werden. Bisher gibt es jedoch nur wenig Möglichkeiten zur Prozesskontrolle, so dass viele Anlagen suboptimal arbeiten [2]. Zudem ist zur Erreichung einer hohen Anlagenverfügbarkeit und folglich eines zuverlässigen Prozessverlaufes die Kontrolle von der Substrateinspeisung bis hin zur eigentlichen Produkterzeugung ausschlaggebend. Die große Auswahl an Substraten, die sich hinsichtlich

ihrer Zusammensetzung deutlich unterscheiden können, erschwert jedoch die Prozessüberwachung, da infolgedessen eine Vielzahl an möglichen Einflussquellen vorliegt, die Störungen im Prozessablauf hervorrufen können. Aus diesem Grund ist zur Optimierung des biologischen Abbauprozesses in Biogasanlagen das Wissen von physikalischen und chemischen Größen unabdingbar.

## Elektrooptische Methode

Einen Ansatz zur Charakterisierung zellphysiologischer Eigenschaften bietet das elektrooptische Monitoring bakterieller Kulturen. Das hier vorgestellte Messverfahren erlaubt erstmalig die gleichzeitige Erkennung der Zellgröße, Zellzahl und des Transmembranpotentials in Bakterienkulturen. Diese Parameter liefern wichtige Informationen über den physiologischen Zellzustand, insbesondere über die Stoffwechselleistung.

Zur Bestimmung der Zellpolarisierbarkeit in Biogaskulturen wurde eine bestehende Messmethode an die Anforderungen von Biogasproben angepasst und in einem tragbaren System angewendet. Ein elektrisches Wechselfeld wirkt bei 4 Frequenzen zwischen 200 kHz und 2100 kHz auf die Zellen ein, und die photometrische Erfassung der optischen Dichteänderung der Zellsuspension ergibt ein Spektrum der Polarisierbarkeit der Zellen in Abhängigkeit der

Frequenz. Um reproduzierbar zu messen, werden zunächst grobe Partikel aus den Proben durch Filtration abgetrennt. Anschließend wird das Filtrat verdünnt, abermals filtriert und diesmal das Retentat resuspendiert. Dabei werden eine immer gleiche optische Dichte und eine ähnliche Leitfähigkeit eingestellt. Die so vorbereitete Suspension wird schließlich in die Messkammer eingeleitet, die von zwei orthogonal zueinander positionierten Lichtquellen durchleuchtet wird. Zwei ebenso orthogonal angeordnete Sensoren erfassen das jeweilige Durchlichtsignal. Im Spannungsfeld richten sich die Zellen aus, was zu einer Verschiebung der Extinktionsstärke führt. Waren im ungeordneten Zustand die Extinktionen in beiden Richtungen gleich hoch, so sinkt diese nun entlang der Ausrichtung, während die orthogonal dazu gemessene steigt. Die Dauer zwischen der Erreichung der stationären Zustände bei Anregung ist ein Maß für die Polarisierbarkeit der länglichen Zellen.

Mehrere Biogaskultivierungen im Labormaßstab, in Batch-Betriebsweise, wurden durchgeführt. In den Versuchen kamen Kulturen aus Kläranlagen und Biogasanlagen zum Einsatz. Gefüttert mit Maissilage, wurden die Kulturen über 20 Tage hinweg analysiert. Neben der Polarisierbarkeit wurden bei allen Versuchen Standardparameter erfasst.

Unterzieht man die erhaltenen Daten für alle Frequenzen einer Hauptkomponentenanalyse (PCA), so ergibt sich eine Korrelation zwischen den Prozessdaten, wie der Entwicklung der Biogasbildungsrate (Abb. 1), dem FOS/TAC-Wert und der Essigsäurekonzentration, zu den elektrochemischen Messwerten. Die Polarisierbarkeit der Zellen liefert damit eine Aussage über den physiologischen Zustand und ermöglicht das Einstellen geeigneter Prozessbedingungen zur Erhöhung von Stoffwechsellleistungen.

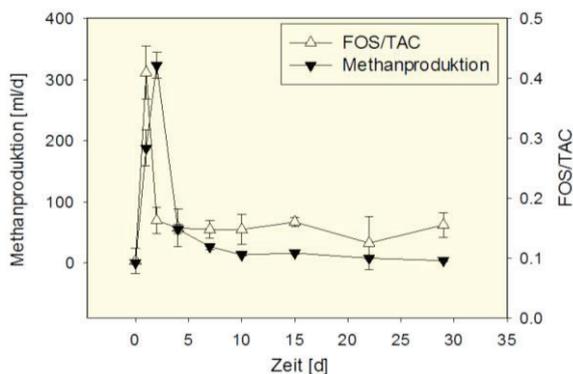


Abb. 1: Polarisierbarkeit und Methanbildungsrate in einer Batch Kultur mit Klärschlamm als Inokulum

## Elektrochemische Untersuchungen

Für die ortsauflösenden Messungen von elektrochemischen Prozessparametern in Biogasreaktoren wurde ein Lanzenkörper, der mehrere Meter in die Flüssigphase eingebracht werden kann, konstruiert (Abb. 3) [3]. In den aus Edelstahl gefertigten Lanzenkopf in Abb. 2 sind miniaturisierte Elektroden zur Bestimmung von pH-Wert, Redoxpotential, Temperatur und der  $dCO_2$ -Konzentration integriert. Die Daten können mit Hilfe eines Messgerätes (KM 3000) der Firma Sensortechnik Meinsberg GmbH online aufgezeichnet werden. Der Datenlogger wurde außerhalb des Fermenters wind- und wassergeschützt angebracht.



Abb. 2: Sondenkopf mit eingebauten Elektroden



Abb. 3: Lanze im Fermenter installiert

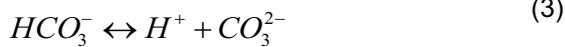
Die verwendeten Sensoren sind in Abb. 4 explizit dargestellt. Der Durchmesser der Elektroden beträgt ca. 3 mm und sie besitzen eine Länge von ca. 4 cm. Bei der Redoxelektrode handelt es sich um einen in Glas eingeschmolzenen Platindraht. Die pH-Elektrode ist eine kugelförmige miniaturisierte Glaselektrode. Für die Messung beider Parameter wird eine separate Flüssigelektrolyt-Elektrode mit einer 3 M KCl-Lösung als Innenelektrolyt verwendet. Zur Temperaturmessung dient ein Pt-1000 Messfühler [4].



Abb. 4: miniaturisierte Sensoren

Die Funktion des elektrochemischen Kohlendioxidensensors beruht auf dem potentiometrischen Messprinzip (Severinghaus-Prinzip), d.h.  $CO_2$  permeiert aus dem Messmedium durch eine sehr dünne gaspermeable Polymermembran in den carbonathaltigen Innenelektrolyten des Sensors und bewirkt eine definierte, reproduzierbare Änderung des pH-Wertes, die mit einer pH-Glaselektrode gemessen wird. Die ablauf-

fenden chemischen Reaktionen sind den Gleichungen 1 bis 3 zu entnehmen.



Der Aufbau des  $\text{CO}_2$ -Sensors ist schematisch in Abb. 5 dargestellt.

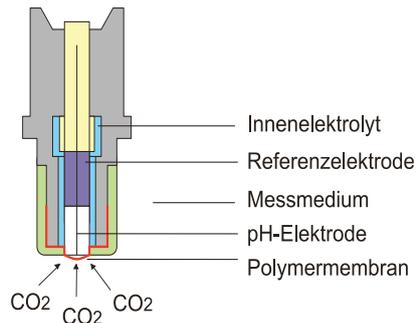


Abb. 5: schematischer Aufbau des membranbedeckten  $\text{dCO}_2$ -Sensors

Der Sensor besteht aus innovativ modular zusammengesetzten Bauteilen (s. Abb. 6). Der äußere Sensordurchmesser beträgt 4 mm. Der Elektrolytbecher kann zur Membran- und Elektrolytregeneration entfernt werden. Das Ausgangssignal  $U$  des Sensors ist über einen weiten Konzentrationsbereich dem Logarithmus der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Messmedium proportional (Gl. 4).

$$U = U_0 + S \cdot F_N \cdot \log[\text{CO}_2] \quad (4)$$

$U_0$  = Sensorpotential bei einer  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 1 mg/L,  $S$  = Steilheit,  $F_N$  = Faraday-Konstante



Abb. 6:  $\text{dCO}_2$ -Sensor, bestehend aus modular zusammengesetzten Bauteilen



Abb. 7: Vorrichtung zur Kalibrierung der  $\text{dCO}_2$ -Sensoren

Die Kalibrierung der  $\text{dCO}_2$ -Sensoren erfolgte ohne den Einsatz von Kalibriergasen mit Hilfe des in Abb. 7 dargestellten Kalibriergefäßes. Die Kalibrierung sollte bei gleich bleibender Temperatur, deren Wert möglichst nahe an der

zu erwartenden Messtemperatur liegen soll, in mindestens zwei Lösungen mit jeweils definiertem Gehalt an gelöstem  $\text{CO}_2$  durchgeführt werden. Diese Standardlösungen werden hergestellt, indem aus einer bekannten Konzentration an Hydrogencarbonat oder Carbonat in Wasser durch Ansäuern bis unter  $\text{pH} = 4$  Kohlendioxid freigesetzt wird. Wichtig ist, dass der Gasaustausch mit der Umgebungsluft unterbunden wird, d.h., der Sensor muss abgedichtet in das Kalibriergefäß hineinragen, das vollständig mit der Kalibrierlösung luftblasenfrei gefüllt ist.

Zur Charakterisierung der Sensoren wurden Kennlinien in Abhängigkeit der  $\text{CO}_2$ -Konzentration von drei Kalibrierlösungen (30, 100 und 1000 mg/L) aufgenommen (Abb. 8). Abb. 9 zeigt die Elektrodenfunktion von einem membranbedeckten  $\text{CO}_2$ -Sensoren bei  $40^\circ\text{C}$ .

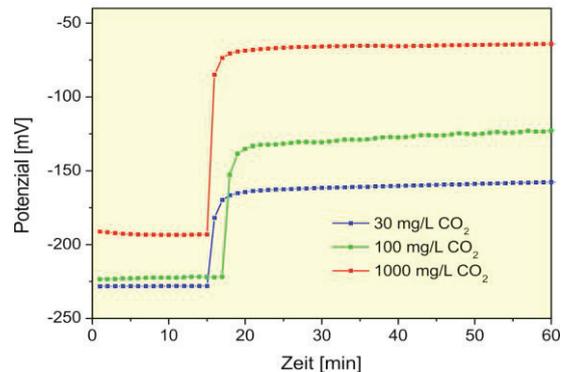


Abb. 8: Kalibrierkurven eines  $\text{dCO}_2$ -Sensors bei einer Temperatur von  $40^\circ\text{C}$ , zeitliche Änderung

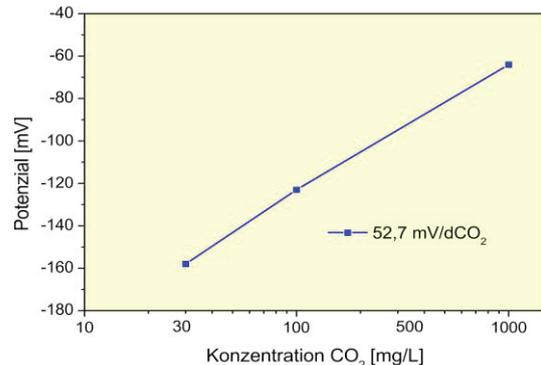


Abb. 9: Kalibrierung eines  $\text{dCO}_2$ -Sensors bei einer Temperatur von  $40^\circ\text{C}$

Die miniaturisierten Sensoren, eingebaut in den Sensorkopf und fixiert an ein 3 m langes Edelstahlrohr, wurden im Fermentermedium einer Biogasanlage über mehrere Wochen getestet. In der Anlage werden hauptsächlich Maissilage, Frischmais und silierte Rüben verarbeitet bzw. dem Fermenter zugeführt.

In Abb. 10 sind die Ergebnisse einer Messkampagne dargestellt. Die Langzeitmessung lief über 54 Tage. Am ersten Tag der Installation der Lanze traten Unregelmäßigkeiten bei der

Messung des pH-Wertes und des Redoxpotentials auf. Diese Störungen können durch eine kurzzeitige Verschmutzung des Diaphragmas der Referenzelektrode eingetreten sein. Die Kurvenverläufe der pH-Glaselektrode und die der Platinelektrode zur Redoxpotentialmessung verhalten sich gegenläufig. Der pH-Wert des Messmediums steigt kontinuierlich an und zeigt

einen deutlich stabileren Potentialverlauf um pH = 7,5 nach 24 Tagen Messzeit. Das Redoxpotential sinkt zu Beginn der Aufzeichnungen und erreicht dann ein stabiles Messsignal bei ca. -580 mV. Weiterhin kann man beobachten, dass die CO<sub>2</sub>-Konzentration ab Tag 44 der Messkampagne ansteigt, bis hin zu einer Konzentration von 100 mg/L.

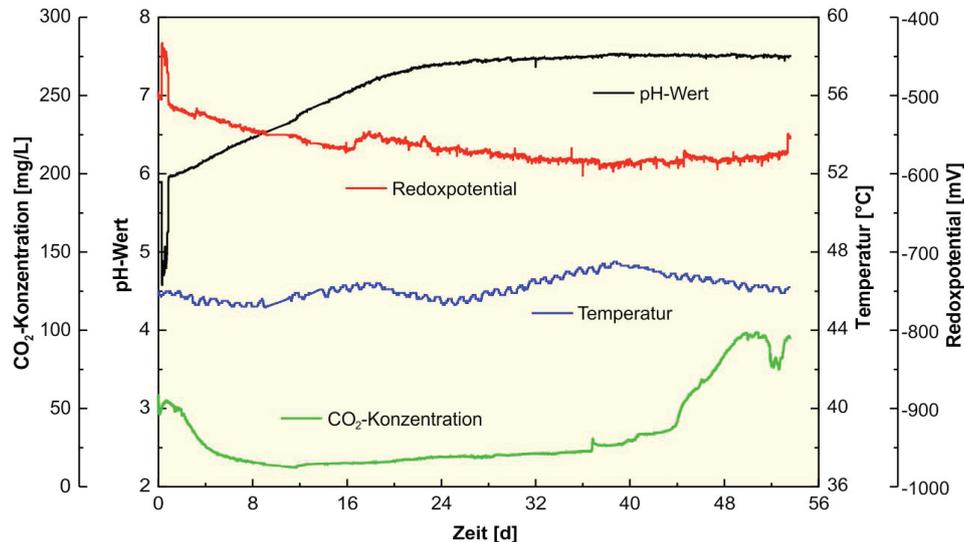


Abb. 10: Verlauf der CO<sub>2</sub>-Konzentration, pH-Wert, Temperatur und Redoxpotential in einem Biogasfermenter

## Diskussion

Die elektrooptische Methode eignet sich grundsätzlich zur Bewertung des zellphysiologischen Zustandes in Komplexkulturen. Insbesondere Zellen, die Mikroben der Acido- und Acetogenese repräsentieren, werden detektiert, da sie oftmals eine längliche Form haben. Eine geringe Polarisierbarkeit entsteht vor allem bei geringen Ionengehalten der Zellen, wie sie bei Substratlimitierung auftreten, aber auch bei Spurenelementmangel. Beide Stadien, die zu Störungen in Biogasprozessen führen können, könnten mit der Methodik detektiert werden. Derzeit werden daher verschiedene Störszenarien im Labormaßstab nachgestellt und der Einfluss auf die Polarisierbarkeit gemessen. Es wird die Frage geklärt, ob die Methode ein prozessanalytisches Werkzeug zur Optimierung von Biogasprozessen darstellt.

Das entwickelte Lanzensystem mit integrierter Sensorik ermöglicht eine orts aufgelöste Messung verschiedener elektrochemischer Parameter in der Flüssigphase einer Biogasanlage. Hierbei können Zusammenhänge bzw. Parallelen zwischen der elektrochemischen und elektrooptischen Methodik aufgezeigt werden und eine Optimierung bzw. Steuerung von biologischen Prozessen in Biogasanlagen erfolgen.

## Literatur

- [1] S. Junne, E. Klein, A. Angersbach, P. Goetz, Electrooptical measurements for monitoring metabolite fluxes in acetone-butanol-ethanol fermentations, *Biotechnology and Bioengineering* 99, 862-869 (2008) 4
- [2] J. Wiese, R. König, Einsatz von Mess- und Automatisierungstechnik auf modernen Biogasanlagen – Ergebnisse großtechnischer Anwendungen, *energie I wasser-praxis* 11, 16-21 (2008)
- [3] E. Kielhorn, S. Sachse, M. Moench-Tegeder, H.-J. Naegele, C. Haelsig, H. Oechsner, W. Vonau, S. Junne, Multiposition Sensor Technology and Lance-Based Sampling for Improved Monitoring of Liquid Phase in Biogas Processes. *Energy and Fuels*, published online, doi:10.1021/ef502816c
- [4] S. Sachse, A. Bockisch, U. Enseleit, F. Gerlach, K. Ahlborn, T. Kuhnke, U. Rother, E. Kielhorn, P. Neubauer, S. Junne, W. Vonau, To the use of electrochemical multi-sensors in biologically charged media, *J. Sens. Syst.* 4, 295-303 (2015); doi: 10.5194/jsss-4-295-2015

## Danksagung

Die Arbeiten wurden gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Förderinitiative „BioProFi“, betreut vom Projektträger Jülich unter dem Förderkennzeichen 03SF0455C.