

Zusammenhänge zwischen Prozessstörungen und der mikrobiellen Biozönose in Biogasanlagen aus der Abfallwirtschaft

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Tobias Lienen
aus Salzkotten

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Martin Jekel (TU Berlin)

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Szewzyk (TU Berlin)

Berichter: Prof. Dr.-Ing. Matthias Kraume (TU Berlin)

Berichterin: Prof. Dr. rer. nat. Elke Dittmann (Universität Potsdam)

Berichterin: Prof. Dr.-Ing. Hilke Würdemann (GFZ Potsdam)

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18. März 2016

Berlin 2016

Danksagung

Ich möchte mich nach der Fertigstellung meiner Doktorarbeit bei einer Reihe von Personen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zuerst gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr.-Ing. Hilke Würdemann vom Deutschen GeoForschungsZentrum GFZ in Potsdam für die Überlassung des sehr interessanten Promotionsthemas, für die Bereitstellung der benötigten Infrastruktur und für die Hilfe bei der Erstellung meiner Publikationen. Prof. Dr. Ulrich Szewzyk vom Fachgebiet Umweltmikrobiologie an der Technischen Universität Berlin danke ich ganz herzlich für die Betreuung und Begutachtung meiner Doktorarbeit. Bei Prof. Dr.-Ing. Matthias Kraume und Prof. Dr. Elke Dittmann möchte ich mich für die Begutachtung meiner Arbeit bedanken. Prof. Dr.-Ing. Martin Jekel danke ich für die Übernahme des Vorsitzes.

Des Weiteren möchte ich einigen Personen vom Deutschen GeoForschungsZentrum GFZ danken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Hierzu zählen vor allem Dr.-Ing. Anne Kleyböcker und Marietta Liebrich aus der Biogasgruppe sowie Anke Westphal, mit denen ich meine Doktorarbeit und unzählige andere Themen immer gerne diskutiert habe. Linda Pellizzari, Dr. Dominik Neumann, Dr. Hannah Halm, Dr. Daria Morozova, Dr. Monika Kasina, Dr. Mashal Alawi, Heiko Baschek und Jennifer Weigt danke ich für die vielen fröhlichen Stunden und ihre Hilfe in Labor und Büro. Bei Dr. Rona Miethling-Graff möchte ich mich für die Unterstützung bei der Erstellung meiner Veröffentlichungen bedanken. Den studentischen Hilfskräften Wojciech Urlich, Tina Schmidt, Carina Wischhöfer, Michaela Letz und Isabel Dziduch danke ich für ihr Engagement.

Meiner Mutter Margret, meinem Vater Hans und meinen Geschwistern Kerstin und Sebastian danke ich ganz herzlich, dass sie mich immer auf meinem Lebensweg unterstützt haben.

Meiner Frau Jenny gilt mein großer Dank, da sie immer für mich da ist, mir den Rücken stärkt und mir immer die besten Ratschläge gibt.

Berlin, März 2016

Tobias Lienen

Kurzfassung

In dieser Doktorarbeit wurden die Zusammenhänge zwischen Prozessstörungen und der mikrobiellen Biozönose in großtechnischen Biogasanlagen aus der Abfallwirtschaft und in Laborversuchen mikrobiologisch und chemisch analysiert und verschiedene Gegenmaßnahmen untersucht.

Unter Einsatz von Calciumoxid als Additiv wurde die Raumbelastung in einem Laborreaktor stufenweise bis auf $9,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ erhöht und ein Frühwarnindikator gegen Übersäuerung zur Steuerung der Zugabe eingesetzt. Die Zusammensetzung der methanogenen Gemeinschaft blieb unter dem Einfluss höherer Raumbelastungen konstant und gewährleistete eine stabile Biogasproduktion. Genetische Fingerprintanalysen zeigten, dass syntrophe Mikroorganismen aus Wasserstoff-produzierenden Bakterien und Wasserstoff-oxidierenden Archaeen die Gemeinschaft dominierten. Infolge der Calciumoxid-Zugabe bildeten sich Aggregate, die zur Stabilität des Prozesses beitrugen und wahrscheinlich als Mikrohabitat für die Mikroorganismen fungierten.

Ein Ausfall der Rührwerke und die daraus resultierende ungünstige Durchmischung verursachten eine Schwimmschichtbildung sowie eine drohende Übersäuerung in einer großtechnischen Biogasanlage. Infolge des Rührwerksausfalls und der ungleichmäßigen Verteilung des organischen Materials, verstärkten sich lokale Heterogenitäten, Säuren reicherten sich an und die Gasproduktion fiel ab. Die mikrobielle Biozönose veränderte sich durch die ungünstige Durchmischung und passte sich nach der Wiederherstellung der Durchmischung wieder an.

In Verbindung mit der Zugabe von hydrophoben Substanzen wurde das filamentöse Bakterium *Microthrix parvicella* als Verursacher einer Schaumbildung in einer Mischschlamm und Fett Co-vergärenden großtechnischen Biogasanlage identifiziert. Die Schaumbildung ereignete sich, wenn Fett zugeführt und ein Schwellenwert von 2×10^8 *M. parvicella* Genkopien überschritten wurde. Die Erhöhung der Genkopienzahlen im nachgeschalteten Reaktor der Kaskade wies auf anaerobes Wachstum ohne Nitrat hin.

Der Einfluss einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 56 °C auf die Abundanz von *Microthrix parvicella* und die damit verbundene Bildung einer Schwimmschicht wurde in zwei parallel betriebenen Laborreaktoren untersucht. Die mikrobielle Biozönose passte sich an die Temperaturerhöhung von 1 °C pro Woche an, so dass der Biogasproduktionsprozess stabil ablief. Die Abundanz von *M. parvicella* verringerte sich bei einer Erhöhung von 37 °C auf $39\text{-}41 \text{ °C}$ um den Faktor 10. Die Schwimmschicht löste sich bei der Erhöhung von 37 °C auf 56 °C auf.

Abstract

In this PhD thesis, the interaction of the microbial biocenosis and process disturbances in full-scale biogas plants and laboratory-scale reactors were analysed microbiologically and chemically and several countermeasures were investigated.

In a sewage sludge and rapeseed oil fed laboratory-scale reactor, addition of calcium oxide was used to increase the organic loading rate stepwise up to $9.5 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. The process was controlled by applying an early warning indicator regarding overacidification. Genetic fingerprint analysis showed that the methanogenic community composition stayed constant during the increase in organic loading rate warranting a stable biogas production process. Syntrophic microorganisms of hydrogen producing bacteria and hydrogen consuming archaea dominated the biocenosis. Due to the addition of calcium oxide, granules were formed, which contributed to the stabilization of the process and probably served as microhabitat for the microorganisms.

A formation of floating sludge as well as a threatening overacidification in a full-scale biogas plant were caused by a disturbance of the agitators. Due to the mixing failure and the uneven distribution of the organic material, local heterogeneities appeared, organic acids accumulated and the gas production decreased. The microbial biocenosis changed due to the agitator breakdown and adapted again after the mixing was re-established.

The introduction of hydrophobic substances and the filamentous bacterium *Microthrix parvicella* were identified as the cause of a foam formation in a full-scale biogas plant fed with sewage sludge and fat, oil and grease (FOG). Foaming was caused if FOG was fed and a threshold amount of 2×10^8 *M. parvicella* gene copies was exceeded. As the biogas plant is operated as a cascade, increased gene copy numbers of *M. parvicella* in the downstream reactor indicated anaerobic growth without reduction of nitrate as the energy source.

The influence of a temperature increase from $37 \text{ }^\circ\text{C}$ to $56 \text{ }^\circ\text{C}$ on the presence of *Microthrix parvicella* and the associated formation of floating sludge was investigated in two parallel operated laboratory-scale reactors. The microbial biocenosis was shown to adapt to the increase in temperature by $1 \text{ }^\circ\text{C}$ per week, so that the biogas production process worked properly. The occurrence of *M. parvicella* already decreased with an increase from $37 \text{ }^\circ\text{C}$ to $39\text{-}41 \text{ }^\circ\text{C}$ by a factor of 10. The floating sludge dissolved completely after increasing the temperature from $37 \text{ }^\circ\text{C}$ to $56 \text{ }^\circ\text{C}$.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Kurzfassung	III
Abstract	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Biogas als erneuerbare Energiequelle	1
1.2 Anaerober Abbau organischer Verbindungen.....	3
1.3 Wichtige mikrobiologische Parameter der Biogasproduktion	6
1.4 Zusammenhänge zwischen Prozessstörungen und der mikrobiellen Biozönose	8
1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit	11
2. Methoden	12
2.1 Anlagenbeschreibung.....	12
2.1.1 Zweistufige Biogasanlage.....	12
2.1.2 Biogasanlage mit kaskadenförmiger Vergärung.....	13
2.1.3 Laboranlage	13
2.2 Physikalische und Chemische Analytik.....	15
2.2.1 pH-Wert und Temperatur	15
2.2.2 Trockenrückstand und organischer Trockenrückstand	15
2.2.3 Organische Säuren, Calcium, Phosphat und Frühwarnindikator	16
2.2.4 Gasanalysen.....	16
2.3 Molekularbiologische Methoden	16
2.3.1 DNA-Extraktion	17
2.3.2 Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	17
2.3.3 Quantitative PCR.....	21
2.4 Mikroskopische Analysen.....	22
2.4.1 Lichtmikroskopie.....	22
2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie	22
3. Übersicht der Veröffentlichungen zu den Zusammenhängen zwischen Prozessstörungen und der mikrobiellen Biozönose in Biogasanlagen aus der Abfallwirtschaft	23
4. Ergebnisse	26
4.1 Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose bei Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute durch Zugabe von CaO und Prozesssteuerung mit einem Frühwarnindikator.....	26
4.2 Einfluss einer ungünstigen Durchmischung auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose und den Biogasproduktionsprozess.....	29
4.3 Schaumbildung und erhöhtes Vorkommen eines filamentösen Mikroorganismus in Verbindung mit der Zugabe von hydrophoben Substanzen.....	33

4.4 Einfluss einer Temperaturerhöhung auf die Bildung und Stabilität von durch filamentösen Bakterien verursachten Schwimmschichten	38
5. Diskussion	44
5.1 Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasreaktoren	44
5.2 Stabiler Biogasproduktionsprozess durch gleichbleibende mikrobielle Gemeinschaft, Syntrophien und Mikrohabitate durch Aggregatbildung	46
5.3 Ungünstige Durchmischung als Ursache für eine drohende Übersäuerung und eine Veränderung der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft	47
5.4 Verringerung des Abbaugrads organischer Substanz in Schwimmschichten durch eine Anreicherung organischer Säuren und Hemmung der mikrobiellen Biozönose	48
5.5 Molekularbiologischer Nachweis von <i>Microthrix parvicella</i> als Indikatororganismus für Schaum- und Schwimmschichtbildung in Biogasanlagen	49
5.6 Vermeidung von durch filamentöse Mikroorganismen verursachte Schwimmschichten durch geringe Erhöhung der Reaktortemperatur	51
6. Zusammenfassung	53
7. Literaturverzeichnis	55
8. Veröffentlichungen	64
8.1 Application of an early warning indicator and CaO to maximize the time-space-yield of an completely mixed waste digester using rape seed oil as co-substrate	64
8.2 Floating layer formation and microbial community structure change during disruption of mixing in full-scale biogas plant	84
8.3 Foam formation in a downstream digester of a cascade running full-scale biogas plant: Influence of FOG addition and abundance of the filamentous bacterium <i>Microthrix parvicella</i>	109
8.4 Moderate temperature increase leads to disintegration of floating sludge and lower abundance of the filamentous bacterium <i>Microthrix parvicella</i> in anaerobic digesters	127

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BDEW	Bundesverband der Energie- und Wasserwirtschaft
BHKW	Blockheizkraftwerk
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff, Cytosin
CaO	Calciumoxid
CH ₃ COOH	Acetat
CH ₃ OH	Methanol
CH ₃ NH ₂	Methylamin
C ₂ H ₅ OH	Ethanol
C ₃ H ₆ O ₃	Laktat
C ₃ H ₇ OH	Propionat
C ₄ H ₉ OH	Butyrat
CH ₄	Methan
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EDX	Energiedispersive Röntgenstrahlenanalyse
EEG	Erneuerbare Energien Gesetz
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
Fe ³⁺	Eisen
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FM	Frischmasse
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.
FWI	Frühwarnindikator

G	Guanin	
GC	Gaschromatograph	
H ₂	Wasserstoff	
HCOOH	Formiat	
kJ	Kilojoule	
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	
MW	Megawatt	
N	Stickstoff	
NGS	Next Generation Sequencing	
NH ₃	Ammoniak	
NH ₄ ⁺	Ammonium	
Nm ³	Normkubikmeter	
NO ₃ ⁻	Nitrat	
O ₂	Sauerstoff	
oTS/oTR	organische Trockensubstanz / organischer Trockenrückstand	[g L ⁻¹ ; g kg ⁻¹]
P	Phosphor	
PAO	Polyphosphat akkumulierende Organismen	
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	
qPCR	quantitative PCR	
RDP	Ribosomal Database Project	
REM	Rasterelektronenmikroskop	
RNA	Ribonukleinsäure	
rRNA	ribosomale RNA	
S	Schwefel	
SAO	Syntrophe Acetat Oxidation	
SAOB	Syntrophe Acetat oxidierende Bakterien	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
SO ₄ ²⁻	Sulfat	
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism	
T	Thymin	
TAE	TRIS-Acetat-EDTA	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism	
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	
TS/TR	Trockensubstanz / Trockenrückstand	[g L ⁻¹ ; g kg ⁻¹]
VFA	organische Säuren (volatile fatty acids)	[mg L ⁻¹]

1. Einleitung

1.1 Biogas als erneuerbare Energiequelle

Der Ausbau der erneuerbaren Energien in Deutschland schreitet im Zuge der Einführung des Erneuerbaren-Energien-Gesetzes (EEG) im Jahr 2000 sowie des Beschlusses zur Wende von fossilen hin zu erneuerbaren Energiequellen stetig voran. Derzeit werden 24 % der Stromerzeugung durch erneuerbare Energien bereitgestellt (BDEW 2014). Es ist geplant, im Jahr 2020 einen Anteil von 35 % zu erreichen (BMU 2012). Bis zum Jahre 2050 wird ein Anteil von 80 % der erneuerbaren Energien am Stromverbrauch angestrebt. Neben Wasserkraft, Windenergie und Photovoltaik nimmt die Energieerzeugung aus Biomasse einen entscheidenden Anteil ein, wobei in diesem Bereich speziell der Ausbau der Biogasproduktion stetig wächst. Während im Jahr 1992 139 Biogasanlagen installiert waren, verzehnfachte sich die Anzahl bis zum Jahr 2002 auf 1600 Anlagen. Für das Jahr 2014 wird ein Betrieb von 7960 Biogasanlagen prognostiziert (Fachverband Biogas e.V. 2014). Die installierte elektrische Leistung stieg von 300 Megawatt (MW) im Jahr 2004 auf 3543 MW im Jahr 2013 (Fachverband Biogas e.V. 2014). Dies entspricht in etwa der Leistung zweier großer Kernkraftwerke.

Die dezentrale Energieerzeugung, die Gasspeicherung, die Einsparung von Treibhausgasen und die Nutzung des Gärrestes als Düngemittel sind als Vorteile der Biogastechnologie zu nennen. Sowohl Strom als auch Wärme können über den Energieträger Biogas erzeugt werden. Das aufbereitete Biogas kann als Biomethan ins Erdgasnetz eingespeist und auch als Treibstoff in Kraftfahrzeugen verwendet werden. Biogas setzt sich aus den Hauptkomponenten Methan (CH_4) und Kohlendioxid (CO_2) zusammen. Daneben können Spuren von z. B. Schwefelwasserstoff (H_2S), Ammoniak (NH_3), Stickstoff (N_2) und Wasserstoff (H_2) auftreten. Der Methangehalt im Biogas hängt von der Substratzusammensetzung ab (Tabelle 1). Die Anlagentypen zur Produktion von Biogas unterscheiden sich in der Bauweise (horizontal oder vertikal), dem Aufbau (ein- oder mehrstufig), dem Verfahren (kontinuierlich oder Batch), dem Wassergehalt des Substrats (Nass- oder Trockenvergärung), dem Volumen der Reaktoren (durchschnittlich 1000-4000 m^3), der Mischtechnik (mechanisch, pneumatisch oder hydraulisch) und der Betriebstemperatur (in der Regel mesophil oder thermophil) sowie dem Substratspektrum. Mit einem Anteil von 54 % werden vorwiegend nachwachsende Rohstoffe wie Mais, Zuckerrübe oder Grassilage als Substrate in Biogasanlagen eingesetzt (FNR 2013). Der Einsatz von Exkrementen wie Gülle und Klärschlamm wird mit einem Anteil von 41 %

angegeben, während Bioabfälle und landwirtschaftliche sowie industrielle Reststoffe 5 % der Substrate ausmachen. Der Biogasertrag ist bei den als Energiepflanzen bezeichneten nachwachsenden Rohstoffen durchschnittlich größer als bei der Vergärung von biogenen Abfällen (Tabelle 1). Je nach Fettgehalt der Substrate übersteigt der Biogasertrag beim anaeroben Abbau von Speiseresten und Bioabfällen den der Energiepflanzen.

Tabelle 1: Biogasertrag und Methangehalt nachwachsender Rohstoffe und biogener Abfälle.
Nm³, Normkubikmeter; t, Tonne; FM, Frischmasse (modifiziert nach FNR 2005, 2013).

Substrat	Biogasertrag (Nm ³ /t FM)	Methangehalt
Bioabfall	120	60 %
Speisereste	100	60 %
Futtermüllsilage	100	52 %
Getreideschlempe	40	55 %
Grassilage	180	53 %
Geflügelmist	150	55 %
Maissilage	190	52 %
Rindergülle	30	55 %
Rindermist	100	55 %
Getreide-GPS	180	53 %
Schweinegülle	20	60 %
Zuckerrübensilage	150	52 %
Fette aus Fettabscheidern	250	67 %
Altfette	961	67 %

Durch den Anbau von Energiepflanzen ergibt sich eine Flächenkonkurrenz zur Herstellung von Lebens- und Futtermitteln. Daneben wirkt sich die Bewirtschaftung der Äcker mit dem Hauptanbaurohstoff Mais negativ auf die Fruchtbarkeit und Biodiversität des Bodens aus. Aus diesen Gründen wurde der Mais- und Getreideanteil am Gärsubstrat in der Novelle des Erneuerbaren-Energien-Gesetzes (EEG 2012) auf 60 % begrenzt. Die Biogaserzeugung aus biogenen Reststoffen und Abfällen wird nach der Novellierung stärker gefördert. Für Bioabfälle wurde eine Sonderregelung eingeführt, die die kombinierte Vergärung und Kompostierung der Abfälle fördern soll. Die Bioabfälle sollen zuerst vergoren und die Gärreste im Anschluss kompostiert werden. Jährlich werden weltweit bis zu 1,3 Milliarden Tonnen an Nahrungsmitteln unverbraucht entsorgt (FAO 2013). Eine energetische Verwertung dieser biogenen Abfälle birgt daher ein großes Potential und sie trägt gleichzeitig zur Verringerung der anfallenden Abfallstoffe bei.

1.2 Anaerober Abbau organischer Verbindungen

Der anaerobe Abbau von organischen Verbindungen bis zum Biogas ist ein energiebringender Prozess, bei dem als Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird (Fuchs et al. 2007). Die Biogasproduktion unterteilt sich in die vier Phasen Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese (Abbildung 1). Die ersten drei Phasen werden von Bakterien und die Methanbildung von Archaeen katalysiert.

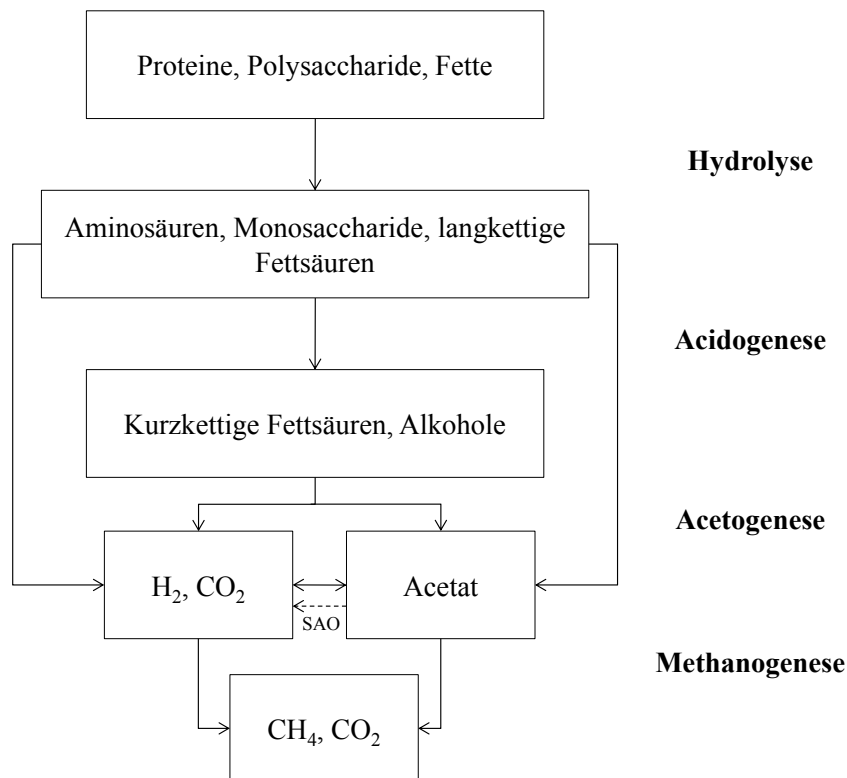


Abbildung 1: Vierphasiger Prozess der anaeroben Vergärung organischen Materials zu Biogas. SAO, Syntrophe Acetat Oxidation (modifiziert nach Gujer und Zehnder 1983).

Komplexe organische Verbindungen wie Proteine, Polysaccharide oder Fette werden in der **Hydrolyse** zu Aminosäuren, Monosacchariden und langkettigen Fettsäuren abgebaut. Die Polymere und Oligomere werden durch Exoenzyme wie Lipasen, Cellulasen oder Proteinasen/Peptidasen zu vergärbaren Monomeren überführt. In der anschließenden **Acidogenese** (Versäuerung) werden die Monomere durch Gärung (Fermentation) oder anaerobe Oxidation weiter abgebaut. Bei der Gärung werden die Substrate unter Bildung von ATP zu Intermediaten wie Pyruvat, Acetaldehyd, Acetyl-CoA, Fumarat oder Acetoacyl-CoA oxidiert. Die Zwischenprodukte werden durch die bei der Fermentation freiwerdenden Reduktionsäquivalente zum Endprodukt reduziert. Typische Endprodukte sind Wasserstoff (H₂), Kohlendioxid (CO₂), Ethanol (C₂H₅OH), Laktat (C₃H₆O₃), Formiat (HCOOH), Acetat (CH₃COOH), Propionat (C₃H₇OH) oder Butyrat (C₄H₉OH). Hydrolytische und acidogene

Bakterien gehören typischerweise der Klasse *Clostridia* und des Phylums *Bacteroidetes* an und sie sind durch lipolytische, peptolytische als auch saccharolytische Fähigkeiten charakterisiert. Kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat (C_4H_9OH) und Propionat (C_3H_7OH) sowie Alkohole werden in der **Acetogenese** (Essigsäurebildung) durch sekundäre Gärer in Acetat (CH_3COOH), CO_2 und H_2 umgewandelt. An diesem Schritt sind typischerweise syntrophe Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien aus der Familie der *Syntrophomonadaceae* oder acetogene Clostridien beteiligt (Schink 1997). Die acetogenen Mikroorganismen werden durch einen Wasserstoffpartialdruck über 0,1 mbar (unter Standardbedingungen) gehemmt (Harper und Pohland 1986). Aus diesem Grund leben sie in einer syntrophen Gemeinschaft mit H_2 -oxidierenden methanogenen Archaeen (Schink 1997). Es handelt sich um einen „Interspezies-Wasserstoff-Transfer“ (Deublein und Steinhauser 2008). In wässrigen Phasen diffundiert H_2 nur sehr schlecht, so dass die syntrophen Partnerorganismen auf einen engen Zellkontakt angewiesen sind, um eine effiziente H_2 -Übertragung zu ermöglichen und den Partialdruck niedrig zu halten (Stams und Plugge 2009). Die H_2 -oxidierenden methanogenen Archaeen katalysieren die letzte Phase der Biogasproduktion, die **Methanogenese** (Methanbildung). Durch die geringe Energieausbeute der Methanogenese und das langsame Wachstum der Methanbildner ist dieser Prozess der zeitlich limitierende Schritt der Biogasbildung und bestimmt die Verweilzeit des Substrats im Reaktor (Deublein und Steinhauser 2008). Die methanogenen Archaeen gehören den *Euryarchaeota* an und werden in die fünf Ordnungen *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales* eingeteilt. Methanogene Archaeen sind strikt anaerob. Sie exprimieren charakteristische Coenzyme, die an wichtigen Reaktionen der Methanogenese beteiligt sind. Dies sind vor allem Tetrahydromethanopterin, Coenzym M, Coenzym F_{430} und F_{420} (Fuchs et al. 2007). Nach Ferry (2002) unterteilt sich die Methanogenese in drei hauptsächliche Wege: a) Reduzierung von CO_2 mit H_2 oder Formiat ($HCOOH$), b) Fermentation von Acetat (CH_3COOH), c) Dismutation von Methanol (CH_3OH) oder Methylamin (CH_3NH_2). Liu und Whitman (2008) unterteilen die methanogenen Reaktionen ebenfalls in drei Wege mit insgesamt 12 Unterreaktionen (Tabelle 2). In Biogasanlagen wird Methan vorwiegend über den hydrogenotrophen Weg der Reduzierung von CO_2 mit H_2 sowie den acetoklastischen Weg der Acetat-Fermentation gebildet (Liu und Whitman 2008). Aufgrund des langsameren Wachstums der acetoklastischen Methanogenen macht die Methanbildung aus Acetat nur bei langen Verweilzeiten des Substrates einen größeren Mengenanteil aus, während Methan bei kürzeren Verweilzeiten des Substrates überwiegend auf dem hydrogenotrophen Weg gebildet wird (Bauer et al. 2008, Bauer et al. 2009).

Tabelle 2: Methanogene Reaktionen und freie Energie ΔG^0 . kJ, Kilojoule (nach Liu und Whitman 2008).

Reaktion	ΔG^0 [kJ/mol CH ₄]
I. CO₂-Typ	
4 H ₂ + CO ₂ → CH ₄ + 2 H ₂ O	-135
4 HCOOH → CH ₄ + 3 CO ₂ + 2 H ₂ O	-130
CO ₂ + 4 C ₃ H ₈ O → CH ₄ + 4 C ₃ H ₆ O + 2 H ₂ O	-37
4 CO + 2 H ₂ O → CH ₄ + 3 CO ₂	-196
II. C₁-Methylverbindungen	
4 CH ₃ OH → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 H ₂ O	-105
CH ₃ OH + H ₂ → CH ₄ + H ₂ O	-113
2 (CH ₃) ₂ S + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 H ₂ S	-49
4 CH ₃ NH ₂ + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₃	-75
2 (CH ₃) ₂ NH + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 2 NH ₃	-73
4 (CH ₃) ₃ N + 6 H ₂ O → 9 CH ₄ + 3 CO ₂ + 4 NH ₃	-74
4 CH ₃ NH ₃ Cl + 2 H ₂ O → 3 CH ₄ + CO ₂ + 4 NH ₄ Cl	-74
III. Acetat	
CH ₃ COOH → CH ₄ + CO ₂	-33

Nahezu alle methanogenen Archaeen sind in der Lage, CH₄ auf dem hydrogenotropen Weg zu bilden. Nur die methanogenen Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta* aus der Ordnung der *Methanosarcinales* sind acetoklastisch und können Acetat zu CH₄ und CO₂ umsetzen. Sie konkurrieren mit Acetat-oxidierenden Bakterien um das Acetat. Bei hohen Ammoniumkonzentrationen werden die acetoklastischen Archaeen inhibiert, so dass das Acetat durch syntrophe Acetat oxidierende Bakterien (SAOB) zu H₂ und CO₂ umgesetzt und somit für die hydrogenotropen methanogenen Archaeen verfügbar gemacht wird (Schnürer et al. 1999, Westerholm et al. 2011). Die acetoklastischen Methanogenen werden durch die Exprimierung des Coenzym Methanophenazin charakterisiert. Bei niedrigen Acetatkonzentrationen (7-70 μM) dominiert die Gattung *Methanosaeta*, während die Gattung *Methanosarcina* bei höheren Acetatkonzentrationen (0,2-1,2 mM) überwiegt (Jetten et al. 1992, Zheng und Raskin 2000). Bei der Reaktion von Acetat zu CH₄ und CO₂ wird die Methylgruppe des Acetats zu CH₄ reduziert und die Carboxylgruppe wird zu CO₂ oxidiert (Fuchs et al. 2007). Die Energiekonservierung verläuft über eine an einen Protonengradienten gekoppelte ATP-Synthase. Da der Transport in die Zelle sowie die Aufspaltung des Acetats zu Beginn energieaufwendig sind, ist der Energiegewinn aus der acetoklastischen Methanogenese geringer als aus der hydrogenotropen Methanbildung (Tabelle 2). Vertreter der Gattung *Methanosarcina* können neben dem acetoklastischen Weg der Methanbildung auch auf hydrogenotropem Weg aus CO₂ oder anderen C₁-Verbindungen wie Formiat oder Methanol und H₂ CH₄ bilden (Fuchs et al. 2007). Sie werden daher als mixotroph bezeichnet.

Die weiteren methanogenen Archaeen aus den Ordnungen *Methanopyrales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales* und *Methanomicrobiales* sind hydrogenotroph und sie erzielen den Energiegewinn aus der Reduktion von CO₂ mit H₂ (Fuchs et al. 2007).

1.3 Wichtige mikrobiologische Parameter der Biogasproduktion

Die Zusammensetzung der am anaeroben Abbau von Substraten wie Gülle, Klärschlamm, Bioabfälle oder Speisereste beteiligten mikrobiellen Biozönose wird durch die Bedingungen im Biogasreaktor bestimmt. Wichtige Parameter der Biogasproduktion sind z. B. die Sauerstoffkonzentration, das Redoxpotential, die Temperatur, der pH-Wert, die Zusammensetzung des Substrats und die Verfügbarkeit von Mikro- und Makronährstoffen.

Der Abbau der organischen Verbindungen in der Biogasanlage läuft unter Ausschluss von molekularem **Sauerstoff** (O₂) ab. Die am Prozess beteiligten Mikroorganismen sind entweder obligat oder fakultativ anaerob (Fuchs et al. 2007). Mit dem Substrat eingetragene geringe Spuren von O₂ als auch von anderen Elektronenakzeptoren wie Nitrat (NO₃⁻), Eisen (Fe³⁺) oder Sulfat (SO₄²⁻) werden von den fakultativ anaeroben Mikroorganismen veratmet, so dass das **Redoxpotential** im Reaktor sinkt. Die Eliminierung des Sauerstoffs und die Verringerung des Redoxpotentials sind essentiell für die Methanbildung, da vor allem Methanogene sensitiv gegenüber O₂ sind und ein niedriges Redoxpotential von < -330 mV für die Methanogenese benötigen (Rieger und Weiland 2006). Biogasreaktoren werden in der Regel bei mesophilen (37-45 °C) oder thermophilen (55-60 °C) **Temperaturen** betrieben. Einzelne Studien beschreiben die Vergärung unter psychrophilen (4-20 °C) (Côté et al. 2006, Massé et al. 2009, McKeown et al. 2009) oder extrem thermophilen (75°C) (Rademacher et al. 2012) Bedingungen. Neben den typischen Bakterien der Phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria* und *Bacteroidetes* (Klocke et al. 2007, McKeown et al. 2009, Rademacher et al. 2011, Regueiro et al. 2012, Wirth et al. 2012), die in allen Temperaturbereichen vorkommen, dominieren im thermophilen Bereich Gattungen des Phylums der *Thermotogae* (Rademacher et al. 2012). Die archaeelle Gemeinschaft im Biogasreaktor wird bei mesophilen und thermophilen Temperaturen von Mikroorganismen der Ordnungen *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* und *Methanomicrobiales* dominiert (Klocke et al. 2007, Rademacher et al. 2011, Regueiro et al. 2012, Wirth et al. 2012). Die Diversität der Archaeen nimmt bei Temperaturen unter 20 °C ab und es dominieren an niedrige Temperaturen angepasste Organismen, wie beispielsweise die Gattungen *Methanosaeta* und *Methanocorpusculum* (McKeown et al. 2009). Bei Temperaturen über 65 °C dominieren die Gattungen *Methanosarcina* und *Methanothermobacter* (Rademacher et al. 2012). Der für die Biogasbildung optimale **pH**-Bereich liegt zwischen 7 und 8. Bei einer pH-Wert-Änderung in einen sauren (< 6) oder alkalischen (> 8,5)

Bereich wird der Prozess gehemmt (Weiland 2010). Die optimale Stoffumsatzrate der methanogenen Archaeen liegt im Bereich von pH 6,8 bis pH 7,2 (Mudrack und Kunst 2003). Die Methanogenen sind empfindlich gegenüber Änderungen im pH-Wert und tolerieren nur geringe Schwankungen (Gerardi 2003). Da sich die pH-Werte für einen optimalen mikrobiellen Stoffumsatz zwischen Hydrolyse/Acidogenese (pH 5,6 bis pH 6,5) und Acetogenese/Methanogenese (pH 6,8 bis pH 7,2) unterscheiden, werden einige Biogasanlagen zweistufig betrieben (Vieitiz und Gosh 1999, Parawira et al. 2008). Eine Hemmung von Säure-abbauenden Mikroorganismen kann zu einer Akkumulierung organischer Säuren und damit zu einer Verringerung des pH-Wertes führen (Mösche und Jördening 1999; Wang et al. 1999). Die Pufferkapazität des Gärschlammes ist entscheidend für die Auswirkungen von höheren Säurekonzentrationen auf den pH-Wert. Gülle beispielsweise stabilisiert den pH-Wert auch bei einer Akkumulierung von Säuren durch seine Alkalinität (Weiland 2010). Eine Erhöhung des pH-Wertes kann die Folge einer Zunahme von Ammoniak (NH_3) durch den Abbau von stickstoffhaltigen Substraten wie beispielsweise Proteinen sein (Chen et al. 2008). Der höhere pH-Wert verstärkt die Bildung von NH_3 aus Ammoniumionen (NH_4^+), so dass Toxizität und Inhibierung erhöht werden (Borja et al. 1996). Der pH-Wert und weitere Milieubedingungen wie die Zufuhr von lebensnotwendigen Nährstoffen wie Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Phosphor (P) oder Schwefel (S) als auch von inhibierenden Substanzen werden von der **Substratzusammensetzung** bestimmt (Bischofsberger et al. 2005). Auch die Geschwindigkeit des Abbaus ist substratabhängig. Polysaccharide werden innerhalb von Stunden hydrolysiert, während die Umsetzung von Proteinen und Fetten Tage dauert (Deublein und Steinhauser 2008). Mit dem Substrat werden **Mikro- und Makronährstoffe** in die Reaktoren eingetragen. Die Verfügbarkeit dieser Nährstoffe ist für das Wachstum der mikrobiellen Gemeinschaft essentiell. Die optimale Relation der Makronährstoffe Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor und Schwefel liegt bei C:N:P:S=600:15:5:1 (Weiland 2010). Für Spurenelemente wie Nickel, Kobalt, Selen, Molybdän und Wolfram wird eine Konzentration von 0,05 bis 0,06 mg L⁻¹ angegeben, wohingegen die optimale Eisenkonzentration zwischen 1 und 10 mg L⁻¹ liegt (Bischoff 2009). Die Spurenelemente Eisen, Kobalt und Nickel sind für das Wachstum der methanogenen Archaeen essentiell (Munk et al. 2008). Nickel ist grundlegend für die Methanbildung, da es Bestandteil des Coenzym F₄₃₀ ist. Ein Spurenelementmangel kann vor allem bei der Monovergärung von Energiepflanzen auftreten, wohingegen die Konzentrationen in Biogasanlagen der Abfallwirtschaft in der Regel ausreichend sind (Demirel und Scherer 2011).

1.4 Zusammenhänge zwischen Prozessstörungen und der mikrobiellen Biozönose

Ein stabiler Prozess ist die Voraussetzung, um eine Biogasanlage nachhaltig und wirtschaftlich zu betreiben (Balussou et al. 2012). Die mikrobielle Lebensgemeinschaft in Biogasanlagen wird einerseits von Störungen im Prozess beeinträchtigt und beeinflusst andererseits die Stabilität der anaeroben Vergärung ihrerseits (Abbildung 2).

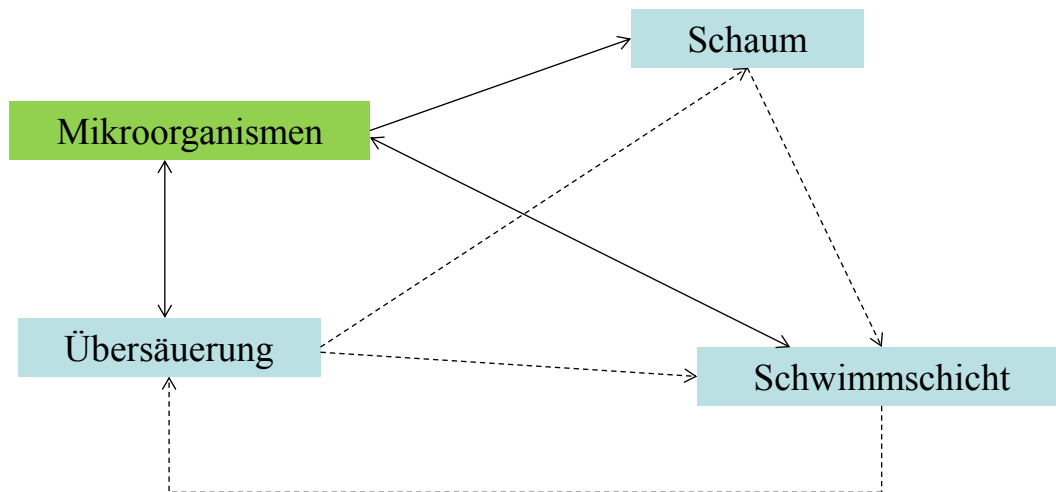


Abbildung 2: Zusammenhänge zwischen Prozessstörungen und mikrobieller Biozönose in Biogasanlagen. Durchgezogene Linien, Zusammenhänge von Mikroorganismen mit Prozessstörungen; Gestrichelte Linien, Zusammenhänge von Prozessstörungen untereinander.

Filamentöse Mikroorganismen können **Schaum-** und **Schwimmschichtenbildungen** verursachen. Aus der Abwasserbehandlung sind vor allem Bakterien der Gattungen *Gordonia* und *Microthrix* in Verbindung mit Schaum- und Schwimmschichtenbildung in Belebtschlammbecken bekannt (Blackall et al. 1988, Blackbeard et al. 1986, Eikelboom und Andreasen 1995, de los Reyes et al. 2002, Martins et al. 2004). Der Eintrag von mit großen Mengen an filamentösen Mikroorganismen belastetem Klärschlamm als Substrat kann zur Schaumbildung in Biogasanlagen führen (Pagilla et al. 1997, Westlund et al. 1998, Marneri et al. 2009). Die filamentöse Struktur und die hydrophoben Zelloberflächen der Mikroorganismen führen dazu, dass sich Gasblasen in den Filamenten verfangen und sie an die Oberfläche transportieren. Die Filamente begünstigen dann die Schaumbildung an der Oberfläche des Gärschlammes (Westlund et al. 1998). Des Weiteren geben die Mikroorganismen hydrophobe Verbindungen in Form von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) ab (Barber et al. 2005). Die Abgabe von EPS sowie die Interaktion mit im Gärschlamm vorhandenen hydrophoben Substanzen verstärken die Schaumbildung zusätzlich. Die wirtschaftlichen Folgen einer Schaum- oder Schwimmschichtenbildung in Biogasanlagen sind erheblich. Das effektive Arbeitsvolumen des Reaktors verringert sich und führt zu

geringeren Biogaserträgen, da weniger Substrat umgesetzt werden kann. Die Akkumulierung von organischem Material in der Schwimmschicht führt zur Verringerung des für die mikrobielle Biozönose zugänglichen Substrats und vermindert den Abbaugrad. Gasleitungen werden verstopft und beschädigt und müssen erneuert werden (Barber 2005). Sensoren zur Prozessüberwachung werden verschmutzt und dies führt zu Ungenauigkeiten in den Messungen der Gasstände und Gärslammfüllstände. Darüber hinaus kann eine übermäßige Schaumproduktion die Ursache für eine Beschädigung des Reaktordachs sein (Moeller et al. 2012). Es entstehen erhöhte Personalkosten für Reparatur- und Reinigungsarbeiten und damit wirtschaftliche Verluste für den Anlagenbetreiber.

Durch das Aufrühren einer Schwimmschicht kann es zu einer Freisetzung von großen Mengen organischen Materials und zu einer Steigerung der Raumbelastung kommen (Bayern Biogas Forum 2010). Die erhöhte Raumbelastung kann zur übermäßigen Vermehrung der schneller wachsenden hydrolytischen und acidogenen Bakterien und somit zu einer Anreicherung von organischen Säuren führen. Es tritt eine **Übersäuerung** ein. Die Anreicherung organischer Säuren inhibiert die Mikroorganismen der Acetogenese und Methanogenese, wodurch die Methanausbeute vermindert wird (Schink 1997, Mösche und Jördening 1999, Wang et al. 1999). Bei einem stabilen Biogasproduktionsprozess liegt die Konzentration von organischen Säuren unter 2000 mg L^{-1} (Kämpfer und Weißenfels 2001). Eine Übersäuerung kann wiederum zu einer Schaum- oder Schwimmschichtenbildung im Reaktor führen, da diese von hydrophoben Substanzen wie langkettigen organischen Säuren verursacht werden können, die an der Gärslammoberfläche flotieren (Westlund et al. 1998, Ganidi et al. 2009, Moeller et al. 2012). Neben der Raumbelastung können über das Substrat in den Reaktor eingetragene Substanzen inhibierend wirken und zu einer Übersäuerung und damit einer Verminderung der Biogasproduktion führen. Werden Antibiotika belastete Wirtschaftsdünger oder Mykotoxine beinhaltende Speisereste und Bioabfälle in die Biogasanlage eingetragen, kann es zur Inhibierung der an der Biogasbildung beteiligten Mikroorganismen und zu einer Verminderung der Methanbildung kommen. Laborversuche mit den Antibiotika Chlortetracyclin und Enrofloxacin zeigten eine Reduktion des Methanertrags von 25-40 % ab einer Antibiotikakonzentration von 100 mg kg^{-1} Trockensubstanz (TS) (Umweltbundesamt 2010). Auch andere antimikrobiell wirkende Substanzen können über das Substrat in den Reaktor eingetragen werden oder sich im Reaktor durch Abbau- und Stoffwechselaktivitäten bilden. Bei einer nicht daran angepassten mikrobiellen Gemeinschaft können Sulfidkonzentrationen von $8-17 \text{ mg L}^{-1}$ (Pender et al. 2004), Ammoniakkonzentrationen von 150 mg L^{-1} (Braun et al. 1981) und hohe Konzentrationen von Schwermetallen (Mudhoo und Kumar 2013) zu einer Inhibierung der

methanogenen Archaeen führen. Dadurch akkumuliert Acetat und der Wasserstoffpartialdruck steigt an. Ein Wasserstoffpartialdruck über 0,1 mbar (unter Standardbedingungen) inhibiert die acetogenen Bakterien, so dass sich Butyrat und Propionat ansammeln (Harper et al. 1986). Neben dem Eintrag von antimikrobiell wirksamen Stoffen kann auch eine Temperaturschwankung im Reaktor zu einer Übersäuerung führen, da sich durch die Temperaturänderung die Aktivität acidogener Bakterien und methanogener Archaeen verringern kann (Donoso-Bravo et al. 2009). Auch in diesem Fall vermindert sich die Abbauleistung und organische Säuren reichern sich an. Die Verringerung der Raumbelastung kann dazu eingesetzt werden, den Prozess bei einer drohenden Übersäuerung zu stabilisieren (Jäkel 2003, Hartmann et al. 2005). Als weitere Gegenmaßnahmen können Substanzen eingesetzt werden, die organische Säuren im Reaktor binden und neutralisieren. Natronlauge und Calciumoxid werden als Mittel gegen Übersäuerungen eingesetzt, wobei die bessere Wirkung für Calciumoxid als Additiv nachgewiesen wurde (Kleyböcker et al. 2012a). Die Zugabe von Calciumoxid führt zur Bildung von Aggregaten, die zur Entsäuerung beitragen. Ausfällungen von Calcium und langkettigen Fettsäuren bilden hierbei vermutlich den Kern und somit das Grundgerüst für die Aggregate. Des Weiteren entwickelten Kleyböcker et al. (2012b) einen Frühwarnindikator, der schon einige Tage vor dem Auftreten einer Übersäuerung warnt. Dieser Indikator wird aus dem Verhältnis der Konzentrationen von organischen Säuren zu Calcium berechnet (FWI-VFA/Ca). Steigt dieses Verhältnis um den zweifachen Wert an, droht eine Übersäuerung und es können frühzeitig Gegenmaßnahmen getroffen werden, wie beispielsweise die Zugabe von Calciumoxid oder die Verringerung der Raumbelastung.

1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Prozessstörungen und die Zusammenhänge mit der mikrobiellen Biozönose in Biogasanlagen der Abfallwirtschaft zu untersuchen. Im Speziellen wurden chemische und mikrobiologische Wirkungsmechanismen für Störungen des Biogasprozesses analysiert und Gegenmaßnahmen untersucht.

Folgende Fragestellungen wurden in der Arbeit bearbeitet:

- Wie verändert sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose bei einer Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute unter Einsatz des FWI-VFA/Ca und Additivs Calciumoxid?
- Welchen Einfluss hat eine ungünstige Durchmischung auf die Prozessstabilität und Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose?
- Welche Ursachen hat der geringe Abbaugrad der organischen Substanz in einer Schwimmschicht?
- Können Indikatororganismen für eine Schaum- und Schwimmschichtbildung identifiziert werden und welche molekularbiologischen Methoden eignen sich für den Nachweis?
- Wie kann eine mikrobiell verursachte Schaum- und Schwimmschichtbildung vermindert oder vermieden werden?

2. Methoden

2.1 Anlagenbeschreibung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Prozessstörungen in zwei großtechnischen Anlagen und einer Laboranlage untersucht. Die Charakteristika der Anlagen werden im Folgenden beschrieben.

2.1.1 Zweistufige Biogasanlage

In der zweistufig betriebenen großtechnischen Biogasanlage kam es zu einer Störung in der Durchmischung in der hinteren Stufe und damit einhergehend zu einer Übersäuerung, Schaum- und Schwimmschichtbildung. Als Substrate wurden Gülle (50000 t a^{-1}) und eine Kombination biogener Abfälle (30000 t a^{-1}) wie beispielsweise Fettabseiderinhalte, Molkereiabwässer und Abfälle aus der Fischindustrie und von Schlachthöfen zugeführt.

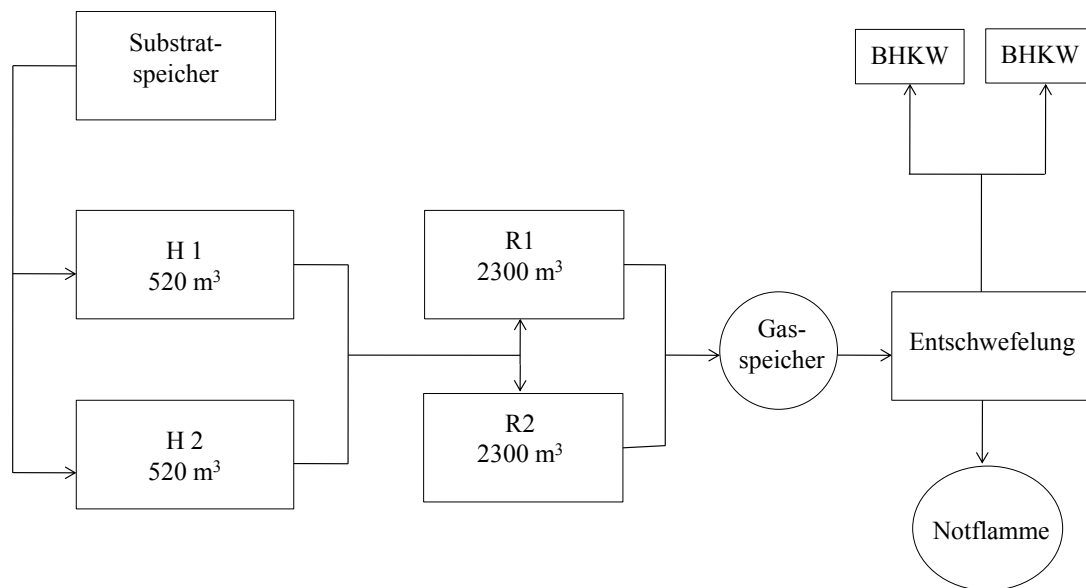


Abbildung 3: Anlagenschema der zweistufigen großtechnischen Biogasanlage. H, Hydrolysestufe; R, Methanisierungsstufe; BHKW, Blockheizkraftwerk.

Die Anlage wurde mit zwei parallel verlaufenden Hydrolysestufen H1 und H2 (520 m^3 , 30 °C) und zwei Methanisierungsstufen R1 und R2 (2300 m^3 , 37 °C) betrieben (Abbildung 3). Die hydraulische Verweilzeit betrug 26 Tage. Die Durchmischung erfolgte durch kontinuierliches Rühren mit in zwei Höhen angebrachten Flügeln. Die Methanisierungsstufen wurden bei einer Raumbelastung zwischen 2 und $2,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ betrieben. Das produzierte Biogas bestand aus 60% bis 65% CH_4 . Die Biogasproduktion lag bei etwa $4,4 \text{ Mio. m}^3 \text{ a}^{-1}$, während die Rückstände an Gärresten etwa 61.000 t a^{-1} ausmachten.

2.1.2 Biogasanlage mit kaskadenförmiger Vergärung

In dieser als Kaskade betriebenen großtechnischen Biogasanlage wurde der Co-vergärende Reaktor durch eine Schaumbildung beeinträchtigt, die sich über zwei Monate erstreckte. Die mesophil (38 °C) betriebene Anlage bestand aus vier Reaktoren R1 bis R4 mit einem Volumen von jeweils 8000 m³ (Abbildung 4). R1 und R2 wurden mit Mischschlamm aus der Abwasserbehandlung und die nachgeschalteten R3 und R4 mit den Gärresten aus R1 und R2 beschickt. R3 wurde zusätzlich mit Fettabscheiderinhalten aus der Lebensmittelproduktion beladen.

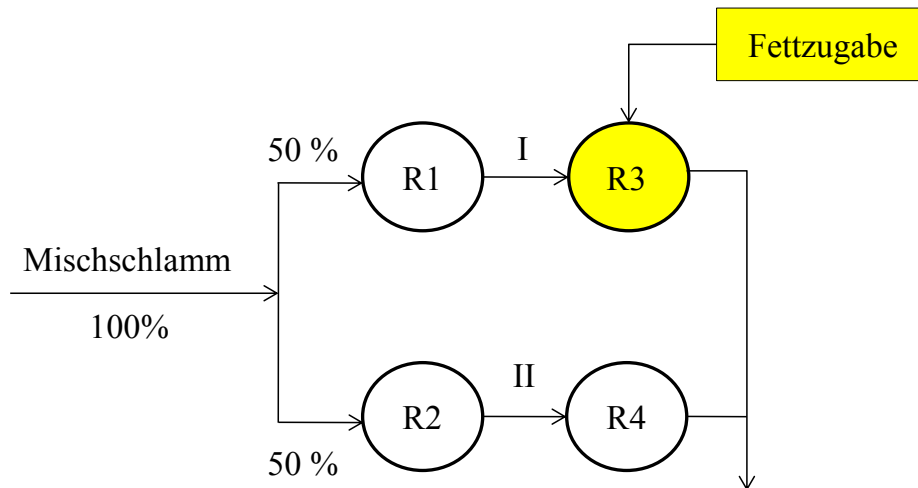


Abbildung 4: Anlagenschema der als Kaskade betriebenen großtechnischen Biogasanlage. R, Reaktor; I/II, Kaskaden.

Die Gärslämme wurden mit einer Pumpe (800 m³ h⁻¹) umgewälzt. R1 und R3 sowie R2 und R4 wurden als hintereinandergeschaltete Kaskaden I und II betrieben. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in Heinzmann und Engel (2006). Die hydraulische Verweilzeit von R1 und R2 betrug etwa 10 Tage und die hydraulische Verweilzeit von R3 und R4 war etwa 15 Tage. Um das Risiko einer Schaumbildung im Winter zu vermeiden, wurde die Raumbelastung von Dezember bis Mai auf 2,5 bis 3 kg oTS m⁻³ d⁻¹ reduziert. Von Juni bis November lag die Raumbelastung bei 4 bis 4,5 kg oTS m⁻³ d⁻¹.

2.1.3 Laboranlage

In der Laboranlage (Abbildung 5) wurde die Möglichkeit einer Leistungssteigerung untersucht sowie die Bildung einer Schwimmschicht simuliert. Das effektive Arbeitsvolumen der Laborreaktoren betrug in etwa 23 L. Der Gärslamm wurde nach Substratzufuhr pneumatisch mit einem Volumenstrom von 150 L h⁻¹ für 15 min am Tag durchmischt. Mit

Hilfe einer Membranpumpe (KNF N86KTE, KNF Neuberger GmbH) wurde das Biogas abgezogen und im unteren Bereich des Reaktors wieder eingeleitet.

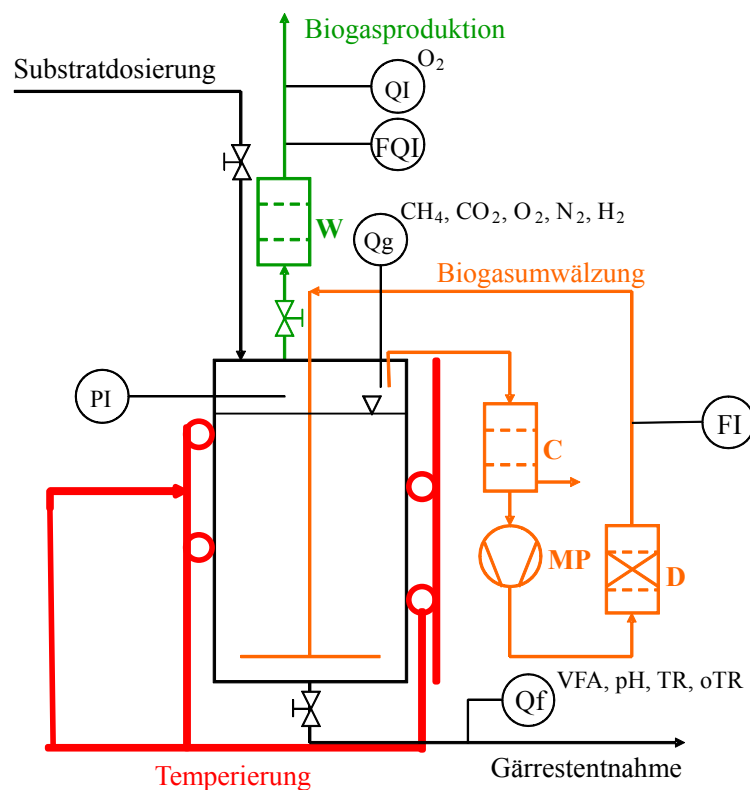


Abbildung 5: Schema der Laboranlage; D – Trockenturm; FI – Durchflusskontrolle; FQI – Aufzeichnung Biogasmenge; C – Kondensatfalle, MP – Membranpumpe; PI – Druckanzeige (mbar); Qf – Analyse von organischen Fettsäuren, Calcium, Phosphat, pH-Wert, Trockenrückstand, organischer Trockenrückstand; Qg – qualitative Gasanalysen von Methan, Kohlendioxid, Sauerstoff, Stickstoff und Wasserstoff; W – Waschflasche.

Die Beheizung beim Schwimmschichtversuch (SW) erfolgte mit einer um die Reaktoren herum gewundenen elektrischen Heizleitung (RS Begleitheizungsband 15W) unter einer Isolierung (Armaflex). Die Regelung wurde in die vorhandene Prozessautomatisierung durch eine SPS (speicherprogrammierbare Steuerung) integriert (Wago 750-841). Beim Leistungssteigerungsversuch (LS) wurden die Reaktoren mit einer Heizschlange temperiert, die von erwärmtem Wasser aus einem Umwälzthermostat (Thermo Haake B7, Phönix II, Thermo Fisher Scientific) durchströmt wurde. Mischschlamm (SW) bzw. Klärschlamm (LS) und Sonnenblumenöl (SW) bzw. Rapsöl (LS) wurden als Substrate verwendet. Die Verweilzeit der Substrate betrug in etwa 20 Tage. Die Raumbelastung wurde bei LS von $3,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ auf $9,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gesteigert. Bei SW war die Raumbelastung zwischen $2,3 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ und $2,7 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

2.2 Physikalische und Chemische Analytik

Zur Beurteilung der Stabilität des Biogasproduktionsprozesses und möglicher physikalischer oder chemischer Gründe für die Prozessstörungen wurden verschiedene analytische Methoden eingesetzt.

2.2.1 pH-Wert und Temperatur

Der pH-Wert und die Temperatur wurden mit einem kombinierten pH-Wert-/ Temperatur-Messgerätes (WTW pH 340i) mit SenTix 41 pH-Elektrode (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH) bestimmt. Zwei Pufferlösungen (VWR International GmbH) unterschiedlicher pH-Werte (pH 4,0 +/- 0,2; pH 7,0 +/- 0,2) dienten der wöchentlichen Kalibrierung des Messgerätes.

2.2.2 Trockenrückstand und organischer Trockenrückstand

Der Trockenrückstand (TR) und organische Trockenrückstand (oTR) wurden nach DIN 38409-1 bestimmt. Für die Bestimmung des Trockenrückstandes wurde ca. 50 g Gärrest in einem Tiegel für 24 Stunden bei 105 °C in einem Trockenschrank (Trockenofen UFE 500, Memmert GmbH + Co. KG) getrocknet. Das Leergewicht des Tiegels (LG, Leergewicht) und das Vollgewicht inklusive Gärrest (VG, Vollgewicht) wurden vor dem Trocknen bestimmt. Die Bestimmung des organischen Trockenrückstandes erfolgte anschließend durch Verglühen des getrockneten Materials für 2 Stunden bei 550 °C in einem Muffelofen (Muffelofen Controller B170, Nabertherm GmbH). Mit Hilfe einer Waage (CP220S-OCE, Sartorius AG) wurden die Gewichtsveränderungen durch das Trocknen (TG, Trockengewicht) und Verglühen (GG, Glühgewicht) bestimmt. Zur Berechnung von TR und oTR wurden die Gleichungen (1) und (2) verwendet.

$$TR = \frac{(TG - LG)}{VG} \quad (1)$$

$$oTR = TR - \frac{(GG - LG)}{VG} = \frac{(TG - GG)}{VG} \quad (2)$$

2.2.3 Organische Säuren, Calcium, Phosphat und Frühwarnindikator

Die Bestimmung der Konzentrationen von organischen Säuren, Calcium und Phosphat erfolgte mit Schnelltests der Firma Hach-Lange (HACH LANGE GmbH). Etwa 80 g Gärrest wurde in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und für 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Centrifuge 5804, Eppendorf AG). Der Überstand nach der Zentrifugation wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut zentrifugiert. Die photometrische Bestimmung (Photometer DR2800, HACH LANGE GmbH) der Konzentrationen von organischen Säuren (LCK 365), Calcium (LCK 327) und Phosphat (LCK 350) erfolgte im zweiten Überstand. Der Wert des Frühwarnindikators FWI-VFA/Ca (Kleyböcker et al. 2012a) wurde aus dem Verhältnis der Konzentrationen von organischen Säuren und Calcium berechnet.

2.2.4 Gasanalysen

Die Analyse des Biogases auf Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Methan und Kohlendioxid erfolgte durch einen Gaschromatographen (GC) (SRI 8610C SRI Instruments). Der GC war mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor, einer Silicagelsäule und einer Molsieb 13X Säule ausgerüstet. Argon fungierte als Trägergas. Die Kalibrierung erfolgte wöchentlich mit Luft. Als Software zur Auswertung der Messungen wurde Peak Simple (SRI Instruments) verwendet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Der Einsatz von molekularbiologischen Techniken trägt dazu bei, das Wissen über die mikrobielle Biozönose und ihre Aktivitäten in Biogasanlagen zu erweitern. Viele Mikroorganismen leben in einer engen Vergesellschaftung (Syntrophie) mit anderen Organismen, so dass eine Kultivierung erschwert wird. Bisher sind über 7000 mikrobielle Arten bekannt (Achtmann und Wagner 2008), es wird aber geschätzt, dass 300000 bis 1000000 verschiedene Spezies vorkommen (Colwell und Grimes 2000). Seit wenigen Jahrzehnten werden vermehrt kulturunabhängige Techniken eingesetzt. Diese Verfahren nehmen weniger Zeit in Anspruch als die Kultivierung und sie haben den Vorteil, dass größere Probenmengen schnell und gleichzeitig analysiert werden können. Dieser Ansatz war aufgrund einer großen Anzahl von Versuchen und Anlagen für die vorliegende Arbeit notwendig.

2.3.1 DNA-Extraktion

Die genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde aus ca. 300 mg des Pellets aus der ersten Zentrifugation (Kapitel 2.2.3) mit Hilfe des FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals LLC.) isoliert. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.2 Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Um die mikrobielle Gemeinschaft zu charakterisieren, wurde das Verfahren der Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) eingesetzt (Muyzer et al. 1993). Bei dieser Technik werden spezifische Genabschnitte vervielfältigt und die Amplifikationsprodukte im Anschluss auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. Das die 16S ribosomale RNA (16S rRNA) codierende Gen eignet sich besonders gut, um phylogenetische Studien durchzuführen, da bestimmte Regionen im Gen konserviert, andere Bereiche aber von Organismus zu Organismus variabel sind (Woese 1987). Die 16S rRNA ist ubiquitär in allen Organismen vorhanden und das Gen ist nur einem geringen Selektionsdruck ausgesetzt, so dass Mutationen zufällig verlaufen und einer evolutionären Veränderung entsprechen. Ein weiterer Vorteil der ribosomalen Sequenzanalyse ist das Vorhandensein großer Datenbanken zum Sequenzabgleich. Somit ist eine Aufschlüsselung der verschiedenen, dominanten Mikroorganismen möglich. Das 16S rRNA Gen umschließt insgesamt 9 variable Regionen (V1-V9) und hat eine Länge von 1500 Basenpaaren (bp) (Abbildung 6). Die in dieser Arbeit eingesetzten Primerpaare erfassten die Regionen V3/V5 für die *Bacteria* und V3/V4 für die methanogenen *Archaea* (Muyzer et al. 1993, Amann et al. 1992, Sawayama et al. 2004).

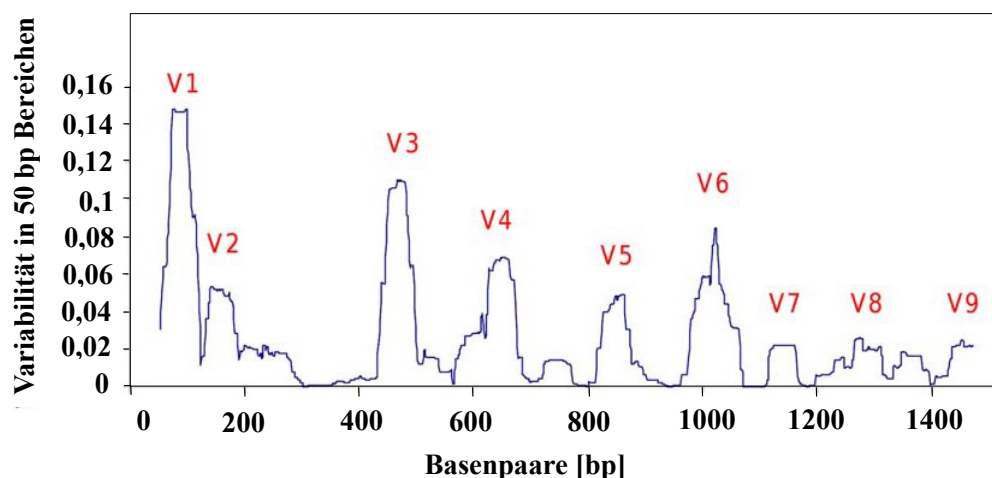


Abbildung 6: Struktur des bakteriellen 16S rRNA Gens mit den hypervariablen Regionen V1 bis V9 am Beispiel der Gattung *Pseudomonas* (modifiziert nach Bodilis et al. 2012).

Die PCR unterteilt sich in mehrere Phasen. Zunächst erfolgt eine Initialisierungsphase, bei der die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA aufgespalten werden und sich der Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufteilt. Darauf folgen mehrere Zyklen von Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Bei der Primer-Hybridisierung binden kurze Oligonukleotide aus etwa 20 bp, die sogenannten Primer, an die Einzelstränge. Es werden Primerpaare eingesetzt, damit jeweils ein Primer an jeden Einzelstrang binden kann. Die Temperatur für die Hybridisierung wird anhand der Nukleotidsequenzen der Primer berechnet. Nach der Hybridisierung erfolgt die Vervielfältigung der Genabschnitte, die Elongation. In diesem Schritt füllt eine DNA-Polymerase die Einzelstränge mit Nukleotiden auf, so dass der zu untersuchende Genabschnitt wieder als Doppelstrang vorliegt. Im Anschluss an die Zyklen wird eine finale Elongation angeschlossen.

Die PCR wurde in dieser Arbeit in einem Thermocycler (FlexCycler, Analytik Jena) mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl [5 µl 10x Taq DNA Polymerase Puffer (Genecraft), 3 µl 50 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) (Thermo Scientific Inc.), 6 µl 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix (Thermo Scientific Inc.), je 3 µl Primer (10 µM), 0,3 µl Taq BioTherm D-™ 5U (Genecraft), 0,4 µl Bovines Serum Albumin (BSA) (20 mg ml⁻¹, Thermo Scientific Inc.), 28,3 µl DNA/RNA-freies Wasser (H₂O) (Thermo Scientific Inc.) und 1 µl DNA] durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotidprimer in der PCR zur Amplifizierung der 16S rRNA Genfragmente von *Bacteria* und *Archaea*. GC, 40 bp umfassende GC-Klammer für DGGE.

Primer	Sequenz (5' - 3')	Zielgen	Referenz
341F-GC	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCG CCGCCCCCGCCCGCCTACGGGAGGCA GCAG	16S rRNA <i>Bacteria</i>	Muyzer et al. 1993
907R	CCGTCAATTCMTTTGAGTTT	16S rRNA <i>Bacteria</i>	Muyzer et al. 1993
348F-GC	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCCGC CGCCCCCGCCCGYGCAGCAGGCGCG AAA	16S rRNA methanogene <i>Archaea</i>	Sawayama et al. 2004
786R	GGACTACVSGGGTATCTAAT	16S rRNA methanogene <i>Archaea</i>	Sawayama et al. 2004

Die einzelnen Phasen der PCR wurden wie folgt durchgeführt: Initialisierung bei 94 °C für 2:45 min, Denaturierung bei 94 °C für 0:45 min, Primer-Hybridisierung bei 56 °C für

0:45 min, Elongation bei 72 °C für 0:50 min und End-Elongation bei 72 °C für 10 min (Archaeen) oder 30 min (Bakterien). Die Schritte zwei bis vier wurden 40-mal wiederholt. Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikationsprodukte [5 µl Produkt, 1 µl Ladepuffer (Thermo Scientific Inc.)] durch Gelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel [1 g Agarose (VWR International GmbH), 100 ml TRIS-Acetat-EDTA (TAE) Puffer, 1,5 µl Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co. KG)] bei 120 V und einer Laufzeit von 30 min überprüft und mittels GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific Inc.) nach Herstellerangaben aufgereinigt, um genomische DNA, Primer und Nukleotide zu entfernen. Die DNA-Konzentration der Fragmente wurde fluorimetrisch (BMG Labtech FLUOstar OPTIMA) mit dem Farbstoff Quant-iT PicoGreen (Invitrogen) bestimmt und die Menge auf 500-600 ng eingestellt. Die Produkte wurden dann auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel [Acrylamid (AppliChem), Formamid (VWR International GmbH), Harnstoff (AppliChem), TAE-Puffer, deionisiertes Wasser (ddH₂O), N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (AppliChem) und Ammoniumpersulfat (APS) (Carl Roth GmbH & Co. KG)] aufgetragen. Zur Auftrennung der Amplifikationsprodukte wurde das Gel mit einem Harnstoff- und Formamidkonzentrations-gradienten hergestellt (Harnstoff: Bakterien: 35-65 %, methanogene Archaeen: 40-75 %; Formamid: 6-9 %). Durch die negative Ladung der DNA wandern die Produkte zur Anode der Gelelektrophoresekammer. Die Auftrennung beruht dabei auf der Basenabfolge der amplifizierten Fragmente und dem dadurch festgelegten Denaturierungsverhalten. Die komplementären Nukleinbasen Adenin (A) und Thymin (T) bilden eine zweifache Wasserstoffbrückenbindung während die komplementären Basen Cytosin (C) und Guanin (G) eine dreifache Wasserstoffbrückenbindung bilden. Je höher der GC-Gehalt im amplifizierten Produkt ist, desto höher muss die Harnstoffkonzentration sein, um die Doppelstrangbindung zu denaturieren. Aus diesem Grund wandern Fragmente von Mikroorganismen mit höherem GC-Gehalt weiter, da sich im der Anode näher befindlichen Bereich die höhere Harnstoffkonzentration befindet. Um eine vollständige Denaturierung des Doppelstranges zu vermeiden, wird dem PCR-Produkt während der Amplifikation eine GC-reiche Klammer angehängt, die die Trennung der beiden Einzelstränge auch bei hohen Harnstoffkonzentrationen verhindert. Die Laufzeit der Gelelektrophorese betrug 17 h bei einer elektrischen Spannung von 110 V (DCodeTM System, Bio-Rad). Im Anschluss wurde die DNA im Gel mit einer Silberfärbung (Tabelle 4) visualisiert. Das entstehende Bandenmuster gibt Aufschluss über die mikrobielle Gemeinschaft. Bei erfolgreicher Auftrennung steht jede Bande für eine Spezies. Anhand der Bandenmuster wurden Pareto-Lorenz Verteilungsmuster erstellt, um Veränderungen in der Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft zu bewerten (Wittebolle et al. 2008). Die Bandenintensitäten wurden mit der Freeware GelQuant.NET

bestimmt und kumulativ von hoher zu niedriger Intensität geordnet. Die kumulativen Bandenintensitäten wurden dann gegen die kumulative Anzahl der Banden aufgetragen und miteinander verglichen.

Tabelle 4: Protokoll der Silberfärbung des Polyacrylamidgels.

Schritt	Reagenzien	Dauer
Fixierung	3 % w/v Benzensulfonsäure (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in 24 % Ethanol (Carl Roth GmbH & Co. KG)	30 min
Färbung	1 % w/v Silbernitrat (AppliChem), 0,35 % w/v Benzensulfonsäure (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in ddH ₂ O	30 min
Waschen	ddH ₂ O	2 x 1 min
Entwicklung	12,5 % w/v Natriumcarbonat (AppliChem), 37 % w/v Formaldehyd (AppliChem), 2 % w/v Natriumthiosulfat (Carl Roth GmbH & Co. KG) in ddH ₂ O	7 min
Abstoppen	50 % w/v Glycerol (AppliChem), 5 % w/v Essigsäure (VWR International GmbH), 25 % w/v Natriumacetat (VWR International GmbH) in ddH ₂ O	30 min

Die Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und die DNA durch Zugabe von DNA/RNA-freiem H₂O (Thermo Scientific Inc.) oder eines Aufschlusspuffers [0,5 M Ammoniumacetat (Carl Roth GmbH & Co. KG), 10 mM Natriumacetat (VWR International GmbH), 1 mM EDTA pH 8 (Calbiochem, Merck KGaA), 0,1 % SDS (Calbiochem, Merck KGaA) in ddH₂O] aus den Gelstücken herausgelöst. Die Reamplifizierung der Genabschnitte wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz [5 µl 10x Taq DNA Polymerase Puffer (Genecraft), 3 µl 50 mM MgCl₂ (Genecraft), 6 µl 10 mM dNTP Mix (Thermo Scientific Inc.), je 4 µl Primer (10 µM), 0,3 µl Taq BioThermD-™ 5U (Genecraft), 0,4 µl BSA (20 mg ml⁻¹, Thermo Scientific Inc.), 23,3 µl DNA/RNA-freies H₂O (Thermo Scientific Inc.) und 4 µl DNA] mit den Primerpaaren 341F/907R und 348F/786R ohne GC-Klammer wie folgt durchgeführt: Initialisierung bei 94 °C für 1:30 min, Denaturierung bei 94 °C für 0:30 min, Primer-Hybridisierung bei 56 °C für 0:30 min, Elongation bei 72 °C für 0:30 min und End-Elongation bei 72 °C für 10 min. Die Schritte zwei bis vier wurden 30-mal wiederholt.

Die Produkte der Reamplifizierung [5 µl Produkt, 1 µl Ladepuffer (Thermo Scientific Inc.)] wurden durch Gelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel [1 g Agarose (VWR International GmbH), 100 ml TRIS-Acetat-EDTA (TAE) Puffer, 1,5 µl Ethidiumbromid (Carl Roth GmbH & Co. KG)] bei 120 V und einer Laufzeit von 30 min überprüft und mittels GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific Inc.) nach Herstellerangaben aufgereinigt, um genomische DNA, Primer und Nukleotide zu entfernen. Die Konzentration der DNA wurde fluorimetrisch bestimmt. Im Anschluss wurde die DNA durch einen externen Anbieter

(GATC Biotech AG) sequenziert. Durch einen Vergleich der Sequenzen mit einer Datenbank (z. B. BLAST – Basic Local Alignment Search Tool oder RDP – Ribosomal Database Project) lassen sich die Banden einer Familie, Gattung oder Art zuordnen. Damit können Rückschlüsse auf deren Physiologie und gegebenenfalls auf den Beitrag zu Prozessstörungen in Biogasanlagen gezogen werden.

2.3.3 Quantitative PCR

Bei der quantitativen PCR (qPCR) wird dem Reaktionsansatz ein Fluoreszenzfarbstoff (z. B. SYBR-Green) zugegeben, der an die sich während der Amplifikation bildende doppelsträngige DNA bindet. Die Auswertung erfolgt über den sogenannten CT-Wert (Cycle of Threshold). Der CT-Wert gibt den Zyklus der qPCR an, an dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Je mehr DNA-Ausgangsmaterial vorhanden ist, desto schneller wird der Schwellenwert erreicht. Die Quantifizierung der Genkopien einzelner Spezies erfolgt über eine Kalibrierreihe. Die Anzahl der Genkopien erlaubt Rückschlüsse auf die Zellzahlen.

Eine absolute Quantifizierung der *Microthrix parvicella* 16S rRNA Genkopien wurde in der vorliegenden Arbeit in einem qPCR-Cycler (StepOne Plus System, Applied Biosystems) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl [10 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), je 0,5 µl Primer (10 mM, S-S-M.par-0828-S-21/S-S-M.par-1018-A-17, Kaetzke et al. 2005), 0,5 µl BSA (20 mg ml⁻¹, Thermo Scientific Inc.), 7,5 µl DNA/RNA-freies H₂O (Thermo Scientific Inc.) und 1 µl DNA] durchgeführt. Die qPCR wurde wie folgt durchgeführt: Initialisierung bei 95 °C für 10:00 min, Denaturierung bei 95 °C für 0:15 min, Primer-Hybridisierung bei 53 °C für 0:20 min und Elongation bei 72 °C für 0:20 min. Die Schritte zwei bis vier wurden 40-mal wiederholt.

Die CT-Werte wurden mit der StepOne Plus Software (Applied Biosystems) bestimmt und die Genkopien anhand einer Kalibrierreihe berechnet. Die Kalibrierreihe wurde aus Verdünnungen von *Microthrix parvicella* 16S rRNA Genfragmenten (160 bp) im Bereich von 10⁻³ bis 10⁻⁹ erstellt. Jedem CT-Wert wurde eine DNA-Konzentration zugeordnet. Die Genkopien wurden mit Hilfe der DNA-Menge (X), der Basenpaarlänge des Fragments (N), der molaren Masse eines Basenpaars (660 g mol⁻¹) und der Avogadro Konstanten (6,022*10²³ mol⁻¹) nach Gleichung (3) berechnet.

$$\text{Genkopien} = \frac{X * 6,022 * 10^{23}}{N * 660 * 1 * 10^9} \quad (3)$$

Für die Berechnung der Primer-Effizienz wurden die CT-Werte gegen den Logarithmus der DNA-Konzentrationen aufgetragen und mit Hilfe der Steigung der sich ergebenden Geraden (m) nach Gleichung (4) berechnet. Die Effizienz der zur Quantifizierung von *M. parvicella* eingesetzten Primer lag bei 98 %.

$$E = 10^{-1/m} - 1 \quad (4)$$

Die Spezifität der Amplifikation wurde im letzten Schritt der qPCR mit einer schrittweisen Erhöhung der Reaktionstemperatur von 72 °C auf 95 °C überprüft. Bei dieser Schmelzkurvenanalyse werden die doppelsträngigen Fragmente getrennt, so dass die Intensität der Fluoreszenz abfällt und sich ein abfallender Kurvenverlauf ergibt. Treten unspezifische Produkte auf, bilden sich mehrere Peaks während der Denaturierung. Die Schmelzkurve zeigte einen spezifischen Peak bei 83 °C.

2.4 Mikroskopische Analysen

2.4.1 Lichtmikroskopie

Die Proben wurden in einen ddH₂O Tropfen auf einem Objektträger überführt, mit einem Deckglas bedeckt und bei Durchlicht mit einer maximalen Vergrößerung von 100x mikroskopiert (Zeiss Axio Imager M2, Carl Zeiss).

2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die Analysen wurden von Monika Kasina durchgeführt. Die Proben wurden auf einem Halter platziert, mit Kohlenstoff bedampft oder Gold versehen und mit einem Rasterelektronenmikroskop mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (Hitachi S-4700; Ultra 55 Plus, Carl Zeiss) untersucht.

3. Übersicht der Veröffentlichungen zu den Zusammenhängen zwischen Prozessstörungen und der mikrobiellen Biozönose in Biogasanlagen aus der Abfallwirtschaft

Diese Doktorarbeit wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit geförderten Projekts “Optgas: Vergleichende Untersuchungen an großtechnischen Biogasreaktoren - Verfahrenstechnische, mikrobiologische, ökologische und ökonomische Bewertung und Optimierung” (Kennzeichen: 03KB018A-F) erstellt. Die Untersuchungen wurden am Helmholtz-Zentrum Potsdam - Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ, unter Betreuung von Prof. Dr.-Ing. Hilke Würdemann, durchgeführt. Daneben wurde die Doktorarbeit von Prof. Dr. Ulrich Szewzyk von der Technischen Universität (TU) Berlin Fachgebiet für Umweltmikrobiologie betreut. Die Ergebnisse der Arbeit wurden in Form von vier Veröffentlichungen präsentiert. Die Publikationen sind in Kapitel 8 dargestellt.

Veröffentlichung 1

Kleyböcker A, Lienen T, Liebrich M, Kasina M, Kraume M, Würdemann H (2014) Application of an early warning indicator and CaO to maximize the time-space-yield of an completely mixed waste digester using rape seed oil as co-substrate. Waste Management, 34, 3, 661-668. doi:10.1016/j.wasman.2013.11.011

Die Publikation wurde von Tobias Lienen und Dr.-Ing. Anne Kleyböcker geschrieben, zusammengestellt und illustriert. Die Laborversuche wurden von Dr.-Ing. Anne Kleyböcker konzeptioniert und in Zusammenarbeit mit Marietta Liebrich durchgeführt. Die Bestimmungen des FWI-VFA/Ca und der Konzentrationen von organischen Säuren, Calcium und Phosphat sowie die Messung der Gasproduktion und Berechnung der Methanausbeute wurden durch Dr.-Ing. Anne Kleyböcker und Marietta Liebrich durchgeführt. Die Charakterisierung der methanogenen Gemeinschaft mit der PCR-DGGE wurde durch Tobias Lienen durchgeführt. Die Charakterisierungen der bakteriellen Gemeinschaft und der rPAO mittels PCR-DGGE wurden durch Marietta Liebrich durchgeführt. Die Rasterelektronenmikroskopischen Analysen wurden durch Dr. Monika Kasina durchgeführt. Dr.-Ing. Hilke Würdemann vom GFZ Potsdam und Prof. Dr.-Ing. Matthias Kraume von der TU Berlin trugen zur Diskussion und Interpretation der Ergebnisse bei und waren an der Strukturierung der Veröffentlichung beteiligt.

Veröffentlichung 2

Lienen T, Kleyböcker A, Brehmer M, Kraume M, Möller L, Görsch K, Würdemann H (2013) Floating layer formation and microbial community structure change during disruption of mixing in full-scale biogas plant. Energy, Sustainability and Society, 3, 20. doi: 10.1186/2192-0567-3-20

Die Publikation wurde von Tobias Lienen geschrieben, zusammengestellt und illustriert. Die Probenahmen, -aufbereitungen und Analysen des FWI-VFA/Ca und der Konzentrationen von organischen Säuren, Calcium und Phosphat wurden durch Tobias Lienen und Dr.-Ing. Anne Kleyböcker durchgeführt. Die Bestimmung vom gesamten Kohlenstoff, gesamten organischen Kohlenstoff, Stickstoff, Protein, der flüchtigen organischen Säuren und der wasserlöslichen Elemente wurden durch Dr. Lucie Moeller und Dr. Kati Görsch vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung in Leipzig durchgeführt. Die rheologischen Untersuchungen wurden durch Manuel Brehmer von der TU Berlin durchgeführt. Die Lichtmikroskopie und die Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft mit der PCR-DGGE wurden durch Tobias Lienen durchgeführt. Dr.-Ing. Hilke Würdemann vom GFZ Potsdam und Prof. Dr.-Ing. Matthias Kraume von der TU Berlin trugen zur Diskussion und Interpretation der Ergebnisse bei und waren an der Strukturierung der Veröffentlichung beteiligt.

Veröffentlichung 3

*Lienen T, Kleyböcker A, Verstraete W, Würdemann H (2014) Foam formation in a downstream digester of a cascade running full-scale biogas plant: Influence of FOG addition and abundance of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella*. Bioresource Technology, 153, 1-7. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.017*

Die Publikation wurde von Tobias Lienen geschrieben, zusammengestellt und illustriert. Die Probenahmen, -aufbereitungen und Analysen des FWI-VFA/Ca und der Konzentrationen von organischen Säuren, Calcium und Phosphat wurden durch Tobias Lienen und Dr.-Ing. Anne Kleyböcker durchgeführt. Die Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft mit der PCR-DGGE wurde durch Tobias Lienen durchgeführt. Die Quantifizierung der Genkopien mittels qPCR wurde durch Tobias Lienen durchgeführt. Dr.-Ing. Hilke Würdemann vom GFZ Potsdam und Prof. Dr. Willy Verstraete vom Laboratory of Microbial Ecology and Technology (LabMET) in Gent, Belgien trugen zur Diskussion und Interpretation der Ergebnisse bei und waren an der Strukturierung der Veröffentlichung beteiligt.

Veröffentlichung 4

*Lienen T, Kleyböcker A, Verstraete W, Würdemann H (2014) Moderate temperature increase leads to disintegration of floating sludge and lower abundance of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella* in anaerobic digesters. Water Research, 65, 203-212. doi:10.1016/j.watres.2014.07.019*

Die Publikation wurde von Tobias Lienen geschrieben, zusammengestellt und illustriert. Die Laborversuche wurden von Tobias Lienen und Dr.-Ing. Anne Kleyböcker konzeptioniert und durchgeführt. Die Probenahmen, -aufbereitungen und Analysen des FWI-VFA/Ca und der Konzentrationen von organischen Säuren, Calcium und Phosphat sowie die Bestimmung der Gasproduktion wurden durch Tobias Lienen und Dr.-Ing. Anne Kleyböcker durchgeführt. Die Charakterisierungen der bakteriellen und methanogenen Gemeinschaften mit der PCR-DGGE wurden von Tobias Lienen durchgeführt. Die Quantifizierung der Genkopien mittels qPCR wurde durch Tobias Lienen durchgeführt. Dr.-Ing. Hilke Würdemann und Prof. Dr. Willy Verstraete trugen zur Diskussion und Interpretation der Ergebnisse bei und waren an der Strukturierung der Veröffentlichung beteiligt.

4. Ergebnisse

Die detaillierten Ergebnisse sind in den Veröffentlichungen zu dieser Doktorarbeit in Kapitel 8 dargestellt. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Studien zusammengefasst.

4.1 Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose bei Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute durch Zugabe von CaO und Prozesssteuerung mit einem Frühwarnindikator

Es wurden molekularbiologische Untersuchungen zu einem Laborversuch von Anne Kleyböcker (2012c) durchgeführt. In einem Laborreaktor (Beschreibung siehe Kapitel 2.1.3) wurde die Raumbelastung durch die Zugabe von Rapsöl stufenweise von $3,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ bis auf $9,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ innerhalb von 40 Tagen erhöht. Die Prozessstabilität wurde über den Frühwarnindikator FWI-VFA/Ca kontrolliert und CaO zur Prozessstabilisierung eingesetzt. Die Methanausbeute schwankte im Bereich von $0,58$ bis $0,88 \text{ m}^3 (\text{kg oTS})^{-1}$ und erreichte bei einer Raumbelastung von $9,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ noch 94 % der erwarteten Ausbeute (Abbildung 7). Die durchschnittliche Konzentration der organischen Säuren blieb über den Versuchsverlauf bei 700 bis 900 mg L^{-1} (Abbildung 7). Der Wasserstoffpartialdruck lag im Durchschnitt bei $0,22 \text{ mbar}$.

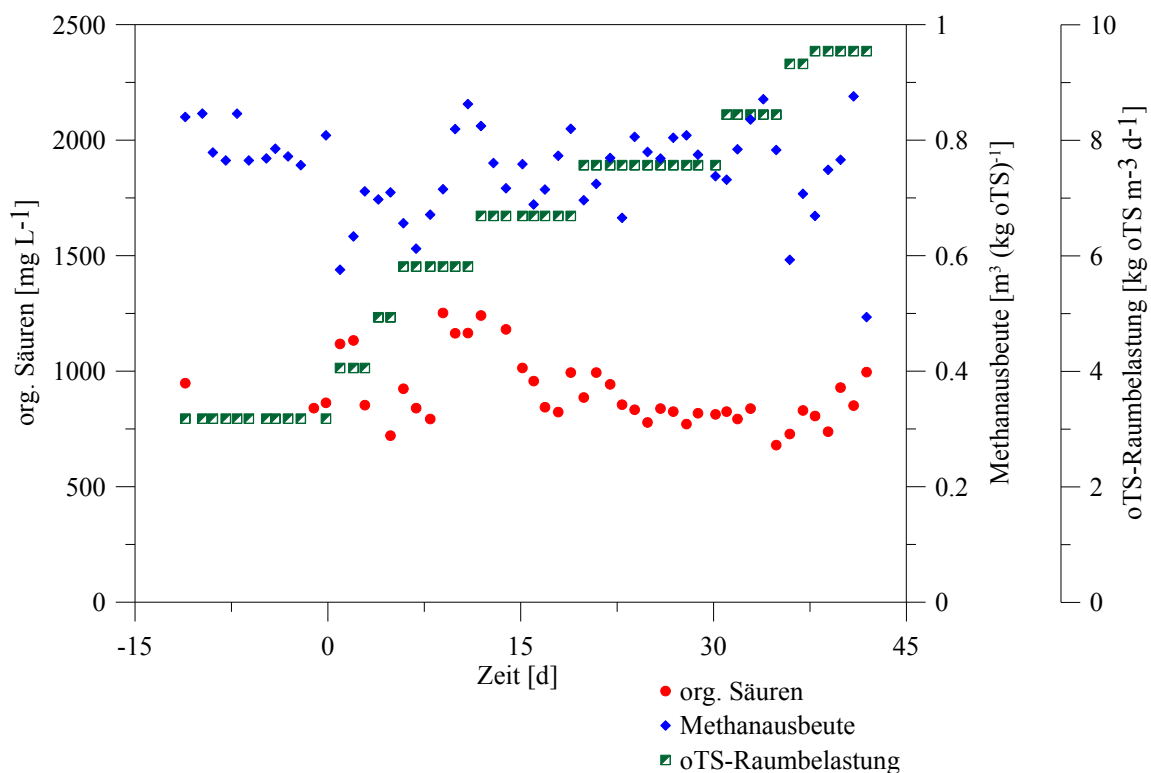


Abbildung 7: Verläufe von Methanausbeute und Konzentration der organischen Säuren in Relation zur Erhöhung der Raumbelastung (modifiziert nach Kleyböcker 2012c).

Im Gärrest wurden weiße Aggregate mit einem Durchmesser von bis zu 1 mm gefunden. Die Aggregate bestanden aus mehreren Schichten. Die inneren Schichten waren kompakt und wurden nach außen hin poröser. Analysen mit dem Rasterelektronenmikroskop und der energiedispersiven Röntgenstrahlenanalyse (REM-EDX) zeigte rosettenförmige Kristalle, die hauptsächlich aus Calcium und organischem Material bestanden, im Kern der Aggregate (Abbildung 8a). Des Weiteren wurden Biofilm- und Stäbchenbakterien-ähnliche Strukturen im Inneren nachgewiesen (Abbildung 8b). Die Oberfläche der Aggregate bestand aus Kohlenstoff und Calcium.

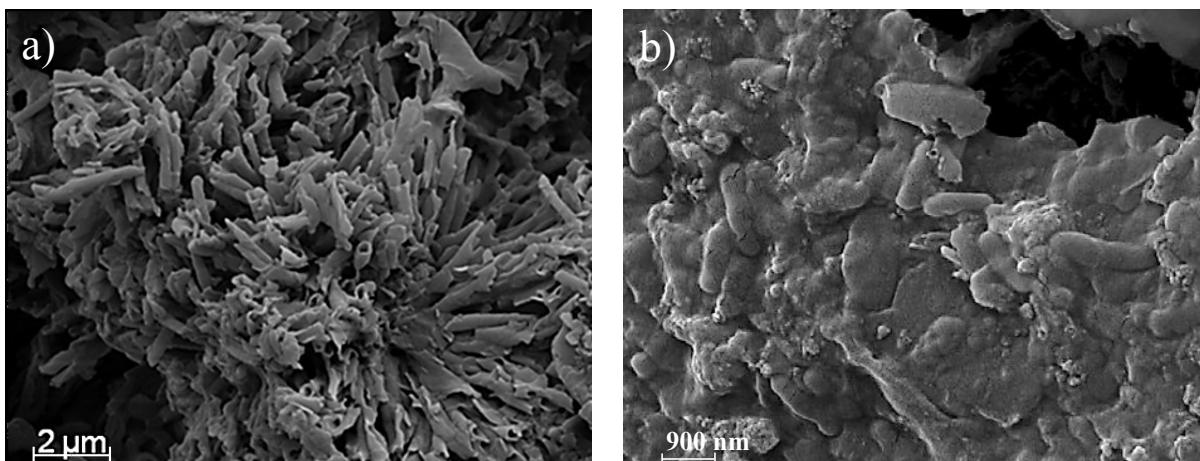


Abbildung 8: Analysen der Aggregate mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM-EDX). a) Rosettenförmige Kristalle aus Calcium und organischem Material im Inneren der Aggregate. b) Biofilm- und Stäbchenbakterien-ähnliche Strukturen bilden die Aggregatwände (Aufnahmen von Monika Kasina).

Die Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft aus den Gärresten des Laborreaktors mit Hilfe der genetischen Fingerprint-Analyse PCR-DGGE zeigte eine Zunahme der Bandenintensität eines der Gattung *Syntrophomonas* zugeordneten Bakteriums bei der Erhöhung der Raumbelastung (Abbildung 9a). Vertreter des Phylums *Firmicutes* wurden als dominante *Bacteria* identifiziert (Tabelle 5). Die Charakterisierung der methanogenen Gemeinschaft aus den Gärresten mittels genetischem Fingerprinting zeigte eine Dominanz von sowohl hydrogenotrophen als auch acetoklastischen Archaeen (Abbildung 9b). Die Sequenzen wurden den Gattungen *Methanobacterium*, *Methanosarcina* und *Methanoculleus* zugeordnet (Tabelle 5). Die Intensität der der Gattung *Methanobacterium* zugeordneten Bande nahm mit der Steigerung der Raumbelastung zu (Abbildung 9).

Tabelle 5: Phylogenetische Zuordnung partieller bakterieller und archaeeller 16S rRNA-Gensequenzen aus den DGGE-Profilen in Abbildung 9.

Nächster verwandter Organismus	Phylum	Ähnlichkeit
<i>Clostridiales</i> Bakterium	<i>Firmicutes</i>	93 %
<i>Clostridiaceae</i> Bakterium	<i>Firmicutes</i>	90 %
<i>Clostridium</i> sp.	<i>Firmicutes</i>	97 %
<i>Clostridiaceae</i> Bakterium	<i>Firmicutes</i>	91 %
<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i>	<i>Firmicutes</i>	96 %
<i>Methanosarcina thermophila</i>	<i>Euryarchaeota</i>	100 %
<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>Euryarchaeota</i>	100 %
<i>Methanoculleus</i> sp.	<i>Euryarchaeota</i>	99 %

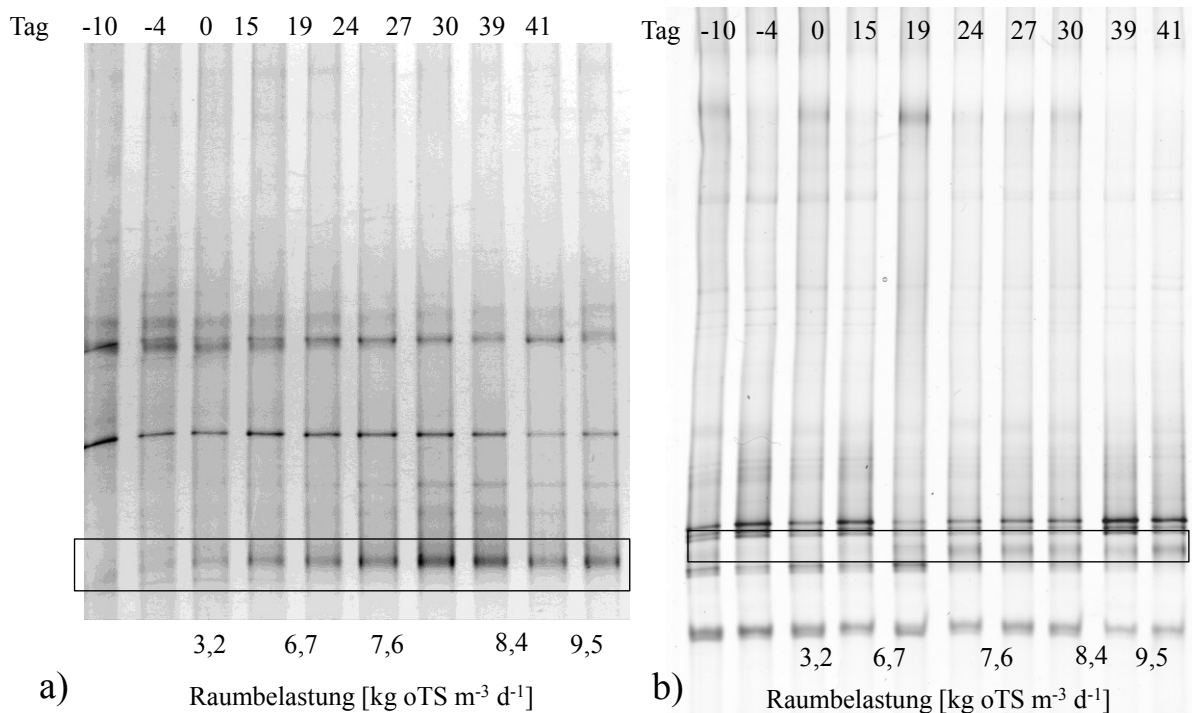


Abbildung 9: PCR-DGGE Analyse von 16S rRNA Genfragmenten bakterieller (a) und archaeeller (b) DNA aus Gärresten des Laborreaktors. Zunahme der Bandenintensität eines der Gattung *Syntrophomonas* zugeordneten Bakteriums und eines der Gattung *Methanobacterium* zugeordneten Archaeons (Markierungen).

4.2 Einfluss einer ungünstigen Durchmischung auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose und den Biogasproduktionsprozess

In der in Kapitel 2.1.1 beschriebenen zweistufigen Biogasanlage kam es zu einer Störung in der Durchmischung. Der Motor des Rührwerks von Reaktor 1 und der untere Flügel des Rührwerks von Reaktor 2 fielen für fünf Monate aus. Während der Reparatur des Flügels in Reaktor 2 wurde das Reaktordach geöffnet und eine Schwimmschichtprobe entnommen. Nach der Störung der Rührsysteme verdoppelte sich die Konzentration der organischen Säuren von 2000 mg L^{-1} auf 4000 mg L^{-1} (Abbildung 10). Der Anstieg des FWI-VFA/Ca zeigte eine drohende Übersäuerung an. Die Gasproduktion nahm von $7500 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ auf $1500 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ ab. Zur Stabilisierung des Prozesses wurde die Raumbelastung in den Reaktoren von $2,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ auf $1,25 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ halbiert. Die Konzentration der organischen Säuren reduzierte sich ab Monat 3 auf 1000 mg L^{-1} und blieb bis Monat 6 konstant. Die Gasproduktion schwankte von Monat 3 bis Monat 6 zwischen 5000 und $6000 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$. Der TR-Gehalt der Schwimmschicht von Reaktor 2 war gegenüber dem Gärrest um das 4-fache, der oTR-Gehalt um das 3,5-fache und der Gehalt an Fettsäuren um das 2-fache erhöht.

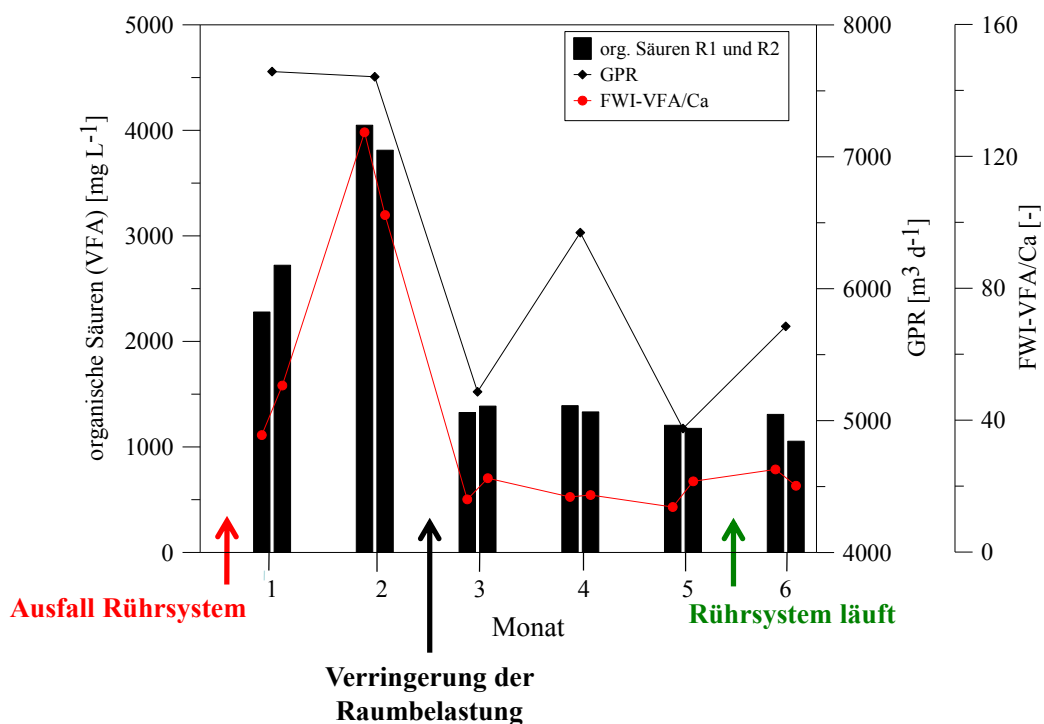


Abbildung 10: Verläufe der Gasproduktion, der Konzentration der organischen Säuren und des FWI-VFA/Ca in den Reaktoren 1 und 2 während der Störung der Durchmischung. Anstieg des FWI-VFA/Ca bei ungünstiger Durchmischung. Abnahme der Konzentration von organischen Säuren nach Halbierung der Raumbelastung.

Die Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft aus den Gärresten der beiden Reaktoren mit dem genetischen Fingerprinting zeigte Unterschiede im Bandenmuster während der ungünstigen Durchmischung (Abbildung 11). Die Analyse der partiellen 16S rRNA Gensequenzen ergab Vertreter des Phylums *Firmicutes* als dominante Bakterien der Gemeinschaft (Tabelle 6). Des Weiteren wurden Bakterien der Phyla *Bacteroidetes* und *Chloroflexi* in den Gärresten beider Reaktoren identifiziert.

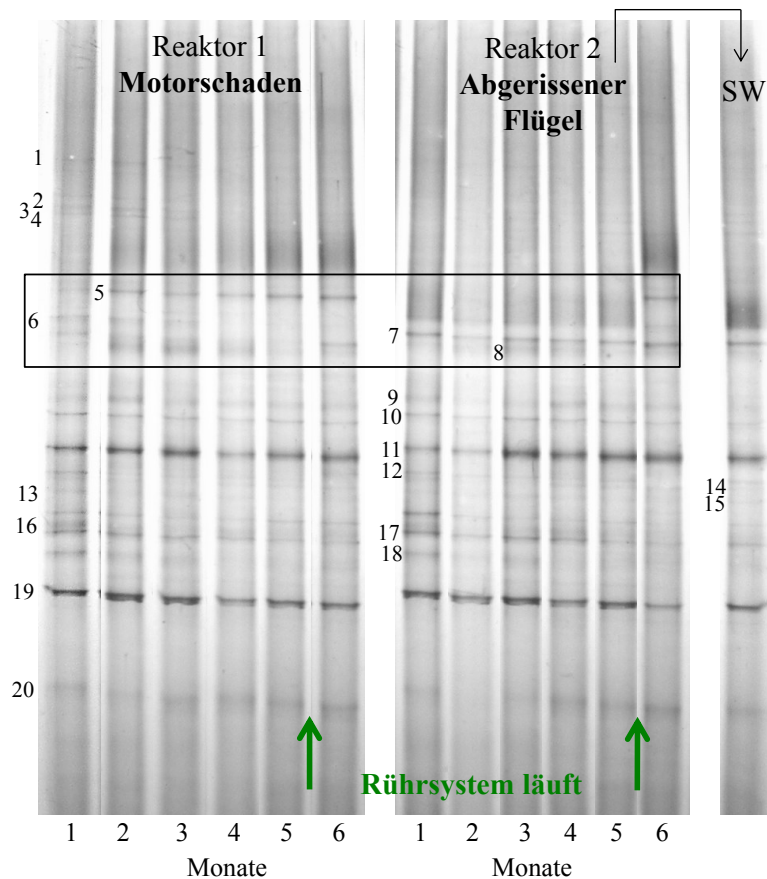


Abbildung 11: PCR-DGGE Analyse von 16S rRNA Genfragmenten bakterieller DNA aus Gärresten von Reaktor 1 und Reaktor 2. Störung der Durchmischung in den Monaten 1 bis 5. Wesentliche Unterschiede in der bakteriellen Biozönose während der ungünstigen Durchmischung und Anpassung der Biozönosen nach Wiederinbetriebnahme der beiden Rührer (markiert). Die Schwimmschicht (SW) aus Reaktor 2 zeigte keine Unterschiede im Bandenmuster im Vergleich zum Gärrest.

Vor allem bei Bande 5 (*Bacteroidales* Bakterium) wurden Veränderungen nachgewiesen. Während diese Bande in Reaktor 1 ab Monat 2 mit zunehmender Intensität detektiert wurde, wurde sie in Reaktor 2 erst nach der Reparatur des Rührsystems in Monat 6 in stärkerer Intensität nachgewiesen. Daneben zeigten sich Unterschiede in der Intensität von Bande 7 (Uncharakterisiertes Bakterium). Die Intensität dieser Bande nahm in Reaktor 1 nach Beginn

der Störung der Durchmischung ab, während die Intensität in Reaktor 2 zunahm. Nach Wiederinbetriebnahme der Durchmischung in Monat 6 glichen sich die bakteriellen Biozönosen wieder an und es traten keine Unterschiede im Bandenmuster des genetischen Fingerprintings auf. Für die Probe der Schwimmschicht aus Reaktor 2 wurde im Vergleich zum Gärrest kein verändertes Bandenmuster detektiert. Eine lichtmikroskopische Analyse der Schwimmschicht zeigte filamentöse Strukturen (Abbildung 12).

Tabelle 6: Phylogenetische Zuordnung partieller bakterieller 16S rRNA-Gensequenzen aus den DGGE-Profilen in Abbildung 11. Die taxonomische Klassifizierung erfolgte über die Datenbank des Ribosomal Database Projects (RDP) mit einem Schwellenwert von 50 %.

Bande	Nächster verwandter Organismus	Ähnlichkeit	Klassifizierung
1	Unkultiviertes <i>Clostridiales</i> Bakterium	91 %	<i>Clostridiales</i>
2	Anaerobes Bakterium	91 %	<i>Clostridiales</i>
3	Unkultiviertes Bakterium	83 %	<i>Bacteria</i>
4	Unkultiviertes Bakterium	83 %	<i>Bacteria</i>
5	Unkultiviertes Bakterium	82 %	<i>Bacteroidales</i>
6	Unkultiviertes <i>Bacteroidetes</i> Bakterium	99 %	<i>Flavobacteriaceae</i>
7	Unkultiviertes Bakterium Candidate Division WWE1	94 %	<i>Bacteria</i>
8	<i>Peptostreptococcaceae</i> Bakterium	94 %	<i>Gallicola</i>
9	<i>Clostridium</i> sp.	98 %	<i>Clostridium sensu stricto</i>
10	Unkultiviertes Bakterium	87 %	<i>Clostridiales</i>
11	Unkultiviertes Bakterium	92 %	<i>Clostridiales</i>
12	Unkultiviertes Kompost Bakterium	90 %	<i>Clostridiales</i>
13	Unkultiviertes <i>Firmicutes</i> Bakterium	90 %	<i>Clostridiales</i>
14	Unkultiviertes Bakterium	91 %	<i>Clostridiales</i>
15	Unkultiviertes Bakterium	89 %	<i>Clostridiales</i>
16	Unkultiviertes <i>Syntrophomonas</i> sp.	95 %	<i>Syntrophomonas</i>
17	Unkultiviertes <i>Clostridia</i> Bakterium	91 %	<i>Syntrophomonas</i>
18	Unkultiviertes <i>Firmicutes</i> Bakterium	92 %	<i>Clostridiales</i>
19	Unkultiviertes Bakterium	88 %	<i>Proteiniphilum</i>
20	Unkultiviertes <i>Chloroflexi</i> Bakterium	99 %	<i>Levilinea</i>



Abbildung 12: Lichtmikroskopische Analyse der Schwimmschichtprobe aus Reaktor 2 bei einer 100x Vergrößerung. Filamentöse Strukturen in der Schwimmschicht.

Die Analyse der bakteriellen Lebensgemeinschaften mit Hilfe von Pareto-Lorenz Verteilungsmustern zeigte Unterschiede in den Gärresten von Reaktor 1 und Reaktor 2 (Abbildung 13). Im Gärrest von Reaktor 1 trat keine Veränderung in der Relation von Bandenintensität zu Bandenanzahl während der ungünstigen Durchmischung auf. Dagegen veränderte sich die bakterielle Gemeinschaft im Gärrest von Reaktor 2 während der Störung der Durchmischung. Die Intensität weniger Banden war erhöht, was einer Dominanz weniger Bakterien entsprach. Nachdem das Rührsystem in Reaktor 2 wieder lief, zeigte das Verteilungsmuster eine gleichmäßigere Zusammensetzung der Biozönose.

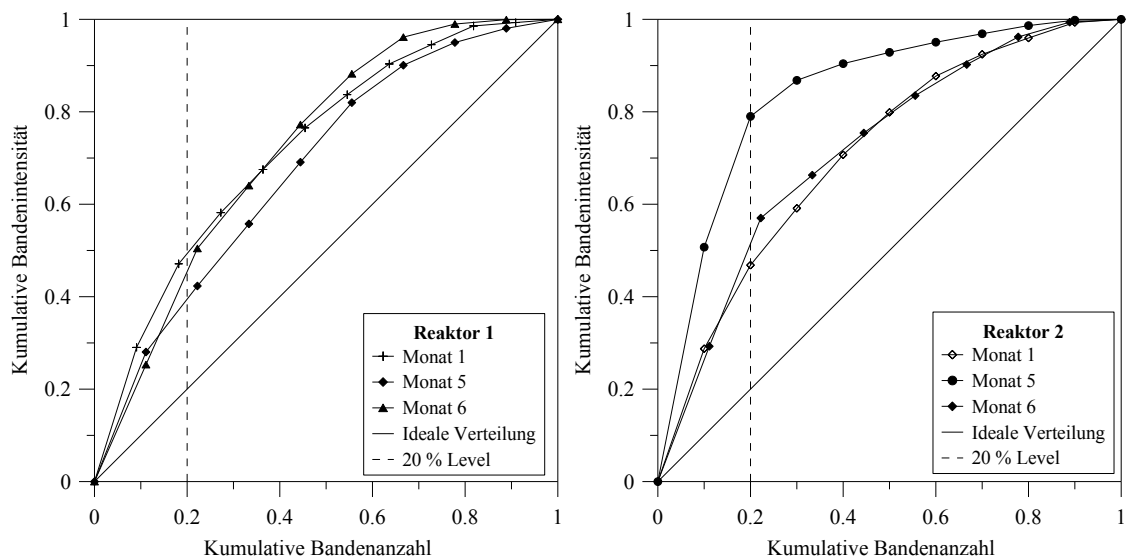


Abbildung 13: Pareto-Lorenz Verteilungsmuster der Gärreste aus den Reaktoren 1 und 2. Gleichmäßige Verteilung der Zusammensetzung der bakteriellen Biozönose im Gärrest von Reaktor 1 während der ungünstigen Durchmischung. Dominanz weniger Bakterien im Gärrest von Reaktor 2 in Monat 5 auf Grund der ungünstigen Durchmischung.

4.3 Schaumbildung und erhöhtes Vorkommen eines filamentösen Mikroorganismus in Verbindung mit der Zugabe von hydrophoben Substanzen

In der in Kapitel 2.1.2 dargestellten Biogasanlage kam es an zwei aufeinander folgenden Monaten zu einer Schaumbildung im nachgeschalteten Mischschlamm und Fett co-vergärenden Reaktor 3. Die Gärreste der vier Reaktoren wurden daraufhin über 12 Monate chemisch und mikrobiologisch untersucht. Die chemischen Analysen zeigten keine wesentlichen Unterschiede im pH-Wert und den TR- sowie oTR-Gehalten zwischen den nicht von einer Schaumbildung betroffenen Reaktoren 1, 2 und 4 und dem zur Schaumbildung neigenden Reaktor 3 (Tabelle 7). Der pH-Wert lag im neutralen Bereich bei 7,2 bis 7,3. Die TR- und oTR-Gehalte waren in den vorgeschalteten Reaktoren 1 und 2 um durchschnittlich 10 % höher als in den nachgeschalteten Reaktoren 3 und 4. In den Monaten mit Fettzugabe war die Konzentration der organischen Säuren in den Gärresten von Reaktor 3 im Durchschnitt um 20 % höher als in den Gärresten vom zweiten nachgeschalteten Reaktor 4.

Tabelle 7: Durchschnittliche pH-Werte, TR- und oTR-Gehalte und Konzentrationen der organischen Säuren (VFA) in den Gärresten der Reaktoren 1 bis 4. a, Monate mit Fettzugabe; b, Monate ohne Fettzugabe.

Reaktor	pH	TR [g L ⁻¹]	oTR [g L ⁻¹]	VFA [g L ⁻¹]
RI	7,2 ± 0,1	35,7 ± 3,1	25,3 ± 1,9	535 ± 113
RII	7,2 ± 0,1	35,0 ± 3,2	24,8 ± 1,9	543 ± 134
RIII	7,3 ± 0,1	33,2 ± 2,2	22,5 ± 2,0	790 ^a ± 50 585 ^b ± 50
RIV	7,3 ± 0,1	32,1 ± 2,0	21,8 ± 2,0	652 ± 62

Die Charakterisierung der bakteriellen Biozönose aus den Gärresten der vier Reaktoren und der am Überlauf von Reaktor 3 genommenen Schaumprobe mit der genetischen Fingerprinting-Analyse ergab ein ähnliches Bandenmuster in allen Reaktoren zum Zeitpunkt der Schaumbildung (Abbildung 14). Die Intensität der dem Bakterium *Microthrix parvicella* zugeordneten Bande 4 war im Gärrest von Reaktor 3 und der Schaumprobe stark erhöht. Ebenso zeigte die der Gattung *Cloacamonas* zugeordnete Bande 1 in der Schaumprobe eine stärkere Intensität. Des Weiteren wurden in den Gärresten der Reaktoren ein nächster Verwandter des Bakteriums *Ruminococcus flavefaciens* und ein unkultiviertes Bakterium der Klasse *Spirochaetes* identifiziert (Tabelle 8).

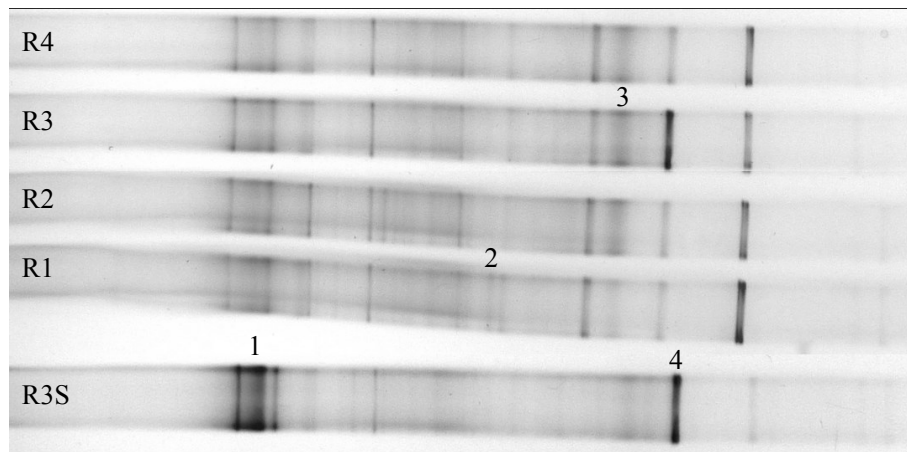


Abbildung 14: PCR-DGGE Analyse von 16S rRNA Genfragmenten bakterieller DNA aus Gärresten der 4 Reaktoren (R1-R4) sowie der Schaumprobe von Reaktor 3 (R3S). Erhöhte Intensität von Bande 1 (Candidatus *Cloacamonas acidaminovorans*) in der Schaumprobe und von Bande 4 (Candidatus *Microthrix parvicella*) in Reaktor 3 und der Schaumprobe.

Mit Hilfe der qPCR und spezifischen Primern wurden die 16S rRNA Genkopien von *M. parvicella* in den Gärresten der vier Reaktoren quantifiziert. Im Gärrest des von der Schaumbildung betroffenen Reaktors 3 wurde eine erhöhte Abundanz von *M. parvicella* nachgewiesen (Abbildung 15). Während die Anzahl der 16S rRNA Genkopien in den Gärresten der Reaktoren 1 und 2 bei 5×10^7 und im Gärrest von Reaktor 4 bei 6×10^7 lag, wurde im Gärrest von Reaktor 3 eine 16S rRNA Genkopienzahl von 9×10^7 detektiert.

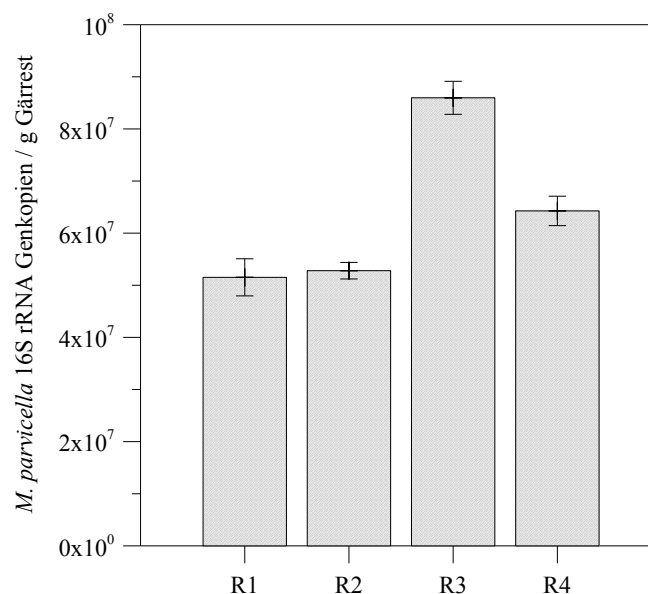


Abbildung 15: Quantifizierung der *M. parvicella* 16S rRNA Genkopien in den Gärresten der Reaktoren 1 bis 4 während der Schaumbildung. Erhöhter Wert im Gärrest des schäumenden Reaktors 3 im Vergleich zu den Gärresten der nicht betroffenen Reaktoren 1, 2 und 4.

Die Charakterisierung der bakteriellen Lebensgemeinschaft aus den Gärresten des zur Schaumbildung neigenden Reaktors mit der genetischen Fingerprint-Analyse zeigte jahreszeitliche Veränderungen in der Intensität der *M. parvicella* zugeordneten Bande. In den kälteren Monaten (Oktober - März) nahm die Bandenintensität zu, während sie in den Sommermonaten abnahm (Abbildung 16). Neben Sequenzen, die *M. parvicella* zugeordnet wurden, wurden vor allem Bakterien aus den Phyla *Proteobacteria* und *Firmicutes* nachgewiesen (Tabelle 8).

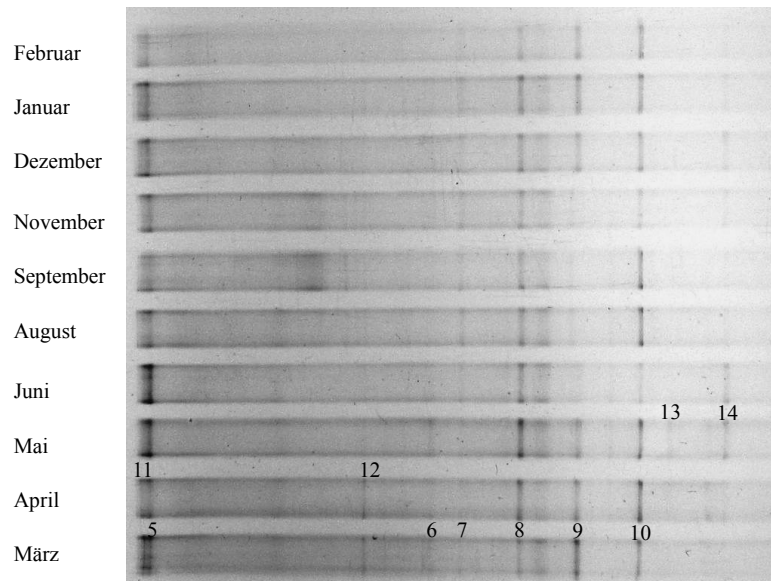


Abbildung 16: PCR-DGGE Analyse von 16S rRNA Genfragmenten bakterieller DNA aus Gärresten des zur Schaumbildung neigenden Reaktors 3 über den Zeitraum eines Jahres. Abnehmende Bandenintensität der *M. parvicella* zugeordneten Bande 9 in den wärmeren Monaten.

Tabelle 8: Phylogenetische Zuordnung partieller bakterieller 16S rRNA-Gensequenzen aus den DGGE-Profilen in den Abbildungen 14 und 16.

Bande	Nächster verwandter Organismus	Phylum	Ähnlichkeit
1	Candidatus <i>Cloacamonas acidaminovorans</i>	WWE1	99 %
2	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Firmicutes</i>	98 %
3	Unkultiviertes <i>Spirochaetes</i> Bakterium	<i>Spirochaetes</i>	98 %
4	Candidatus <i>Microthrix parvicella</i>	<i>Actinobacteria</i>	99 %
5	Unkultiviertes <i>Firmicutes</i> Bakterium	<i>Firmicutes</i>	89 %
6	Unkultiviertes <i>Deltaproteobacteria</i> Bakterium	<i>Proteobacteria</i>	93 %
7	Unkultiviertes <i>Syntrophaceae</i> Bakterium	<i>Proteobacteria</i>	94 %
8	Unkultiviertes <i>Desulfofaba</i> sp.	<i>Proteobacteria</i>	95 %
9	Candidatus <i>Microthrix parvicella</i>	<i>Actinobacteria</i>	97 %
10	Unklassifiziertes Bakterium	n.d.	95 %
11	Unkultiviertes <i>Bacteroidetes</i> Bakterium	<i>Bacteroidetes</i>	91 %
12	Unkultiviertes <i>Clostridiales</i> Bakterium	<i>Firmicutes</i>	96 %
13	Unkultiviertes <i>Clostridiales</i> Bakterium	<i>Firmicutes</i>	89 %
14	Unkultiviertes <i>Pelobacter</i> sp.	<i>Proteobacteria</i>	97 %

Die Quantifizierung der *M. parvicella* 16S rRNA Genkopien in den Gärresten mittels qPCR bestätigte die Ergebnisse des genetischen Fingerprintings und zeigte ein vermehrtes Vorkommen von *M. parvicella* in den kälteren Monaten (Abbildung 17). Die durchschnittliche Außentemperatur lag im Dezember bei 6,5 °C, im Januar bei -1,1 °C, im März bei 6 °C, im Mai bei 16 °C, im Juni bei 28 °C, im September bei 18 °C und im November bei 11 °C. Die Genkopienzahlen waren in den von Schaumbildung betroffenen Monaten Dezember und Januar mit 9×10^7 und 1×10^8 um den Faktor 2 bis 3 höher als in den Monaten ohne Schaumbildung. Im März und Mai wurde eine Genkopienzahl von 4×10^7 nachgewiesen. Die Genkopien nahmen im Juni auf 1×10^7 ab, gefolgt von einer weiteren Abnahme auf 1×10^5 im September. Im November stiegen die Genkopien auf 3×10^6 an.

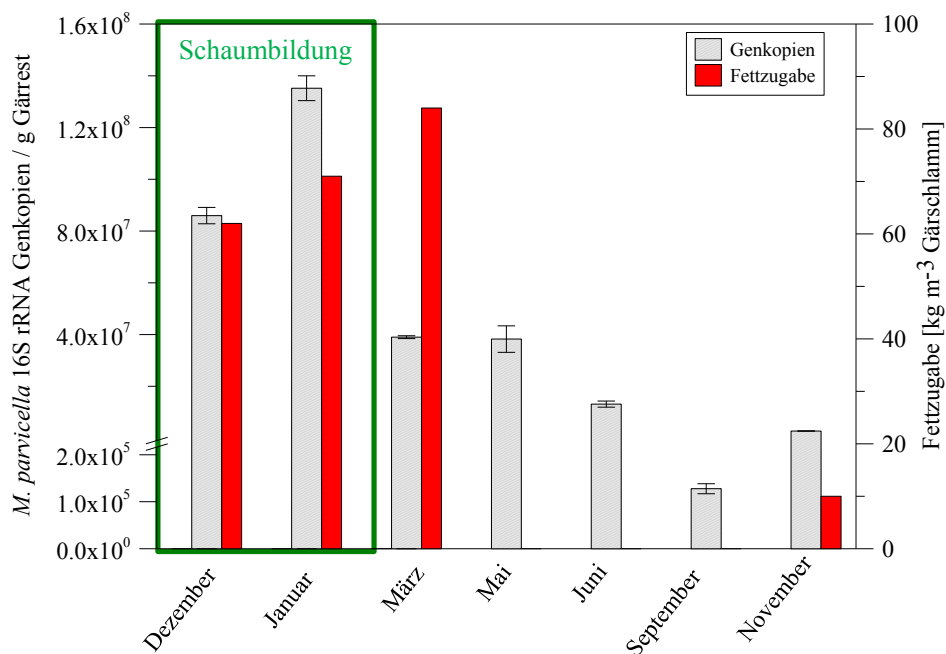


Abbildung 17: Vorkommen von *M. parvicella* über das Jahr in den Gärresten des co-vergärenden Reaktors 3 und Konzentration der Fettzugabe. Geringere Genkopienanzahlen in den wärmeren Sommermonaten von Juni bis November. Erhöhte Genkopienzahlen während der Schaumbildung.

In den Monaten Dezember, Januar, Mai und Juni wurde eine Zunahme der *M. parvicella* 16S rRNA Genkopienzahlen in Reaktor 3 im Vergleich zum vorgeschalteten Reaktor 1 nachgewiesen (Abbildung 18). Die Anzahl der Genkopien stieg im Dezember um 60 %, im Januar um 100 %, im Mai um 60 % und im Juni um 60 % von Reaktor 1 zu Reaktor 3 an.

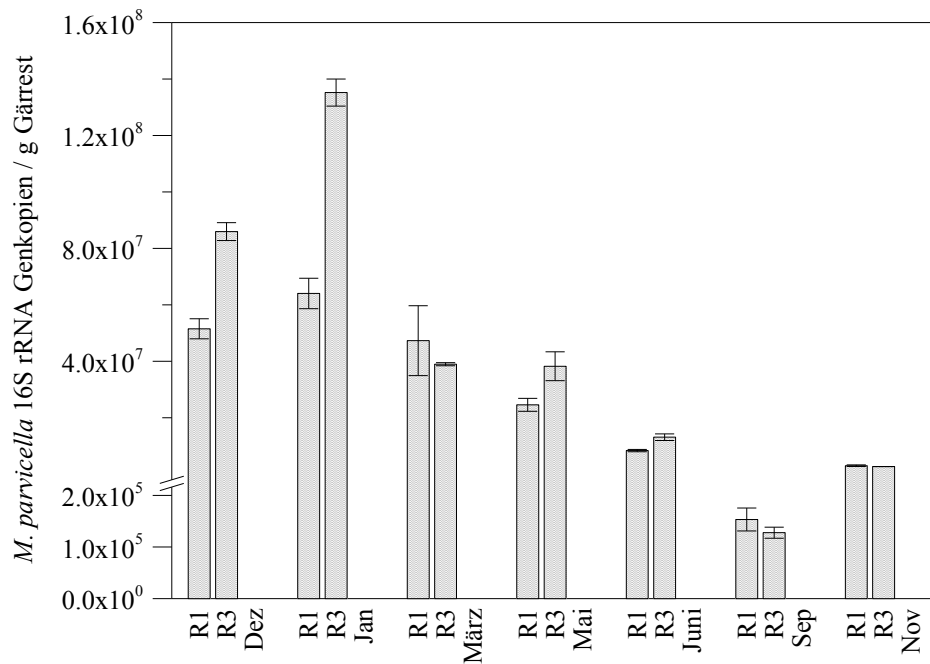


Abbildung 18: Vergleich der *M. parvicella* 16S rRNA Genkopienzahlen in den Gärresten von Reaktor 1 und Reaktor 3 im Verlauf eines Jahres. Zunahme der Genkopien im Gärrest des nachgeschalteten Reaktors 3 in den Monaten Dezember, Januar, Mai und Juni.

Daneben wurde die Anzahl der *M. parvicella* spezifischen 16S rRNA Genkopien im als Substrat eingesetzten Mischschlamm in den Monaten März, September und November quantifiziert. Die Genkopienzahl im Mischschlamm war im März um 50 %, im September um 20 % und im November um 180 % höher als in den jeweiligen Gärresten des in der Kaskade vorgeschalteten Reaktors 1.

4.4 Einfluss einer Temperaturerhöhung auf die Bildung und Stabilität von durch filamentösen Bakterien verursachten Schwimmschichten

In zwei parallel betriebenen Laborreaktoren (Beschreibung siehe Kapitel 2.1.3) wurde der Einfluss einer Temperaturerhöhung auf die Bildung und Stabilität von Schwimmschichten untersucht. In Reaktor 1 wurde die Temperatur innerhalb von 137 Tagen von 37 °C auf 56 °C erhöht. Während die Schwimmschicht bei 37 °C mit ca. 3 cm bemessen wurde, reduzierte sich die Dicke nach der Erhöhung der Temperatur auf 56 °C auf weniger als 1 mm (Abbildung 19). Im parallel betriebenen Reaktor 2 wurde die Temperatur von 37 °C auf 47 °C erhöht. Durch einen technischen Defekt konnte keine weitere Temperaturerhöhung auf 56 °C erfolgen. Die Schwimmschichtdicke nahm mit der Erhöhung der Temperatur von ca. 3 cm auf 7 mm ab.

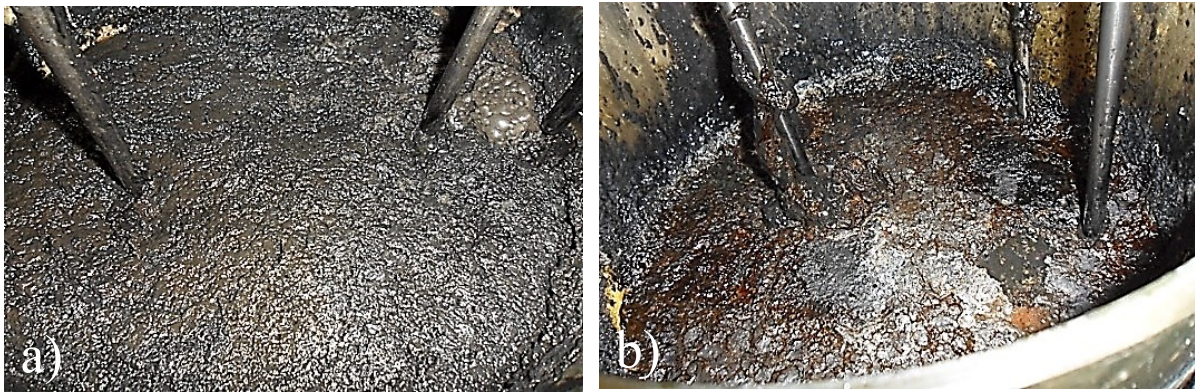


Abbildung 19: Schwimmschicht bei 37 °C (a) und reduzierte Schwimmschicht bei 56 °C (b) in Laborreaktor 1.

Die Prozessstabilität wurde anhand der Gasproduktion, der Konzentration der organischen Säuren und der Werte des FWI-VFA/Ca beurteilt. Die Gasproduktion blieb während der Temperaturerhöhung auf einem konstanten Niveau von durchschnittlich 2 L h⁻¹ (Abbildung 20). Die Konzentration der organischen Säuren halbierte sich bei einer Temperaturerhöhung von 37 °C auf 43 °C von 1000 mg L⁻¹ auf 500 mg L⁻¹ und stieg bei der weiteren Steigerung der Temperatur wieder auf 1000 mg L⁻¹ bei 56 °C an. Der FWI-VFA/Ca zeigte in Laborreaktor 1 bei einer Steigerung der Temperatur von 37 °C auf 40 °C und ab einer Temperatur von 49 °C eine drohende Prozessstörung an (Abbildung 21). Die Konzentration der organischen Säuren in der Schwimmschicht war mit 5000 - 3000 mg L⁻¹ um den Faktor 3 bis 5 höher als im Gärrest, während der Calciumgehalt um den Faktor 6 niedriger in der Schwimmschicht (<5 - 20 mg L⁻¹) war. Der Wert des FWI-VFA/Ca war in der Schwimmschicht um den Faktor >10 höher als im Gärrest.

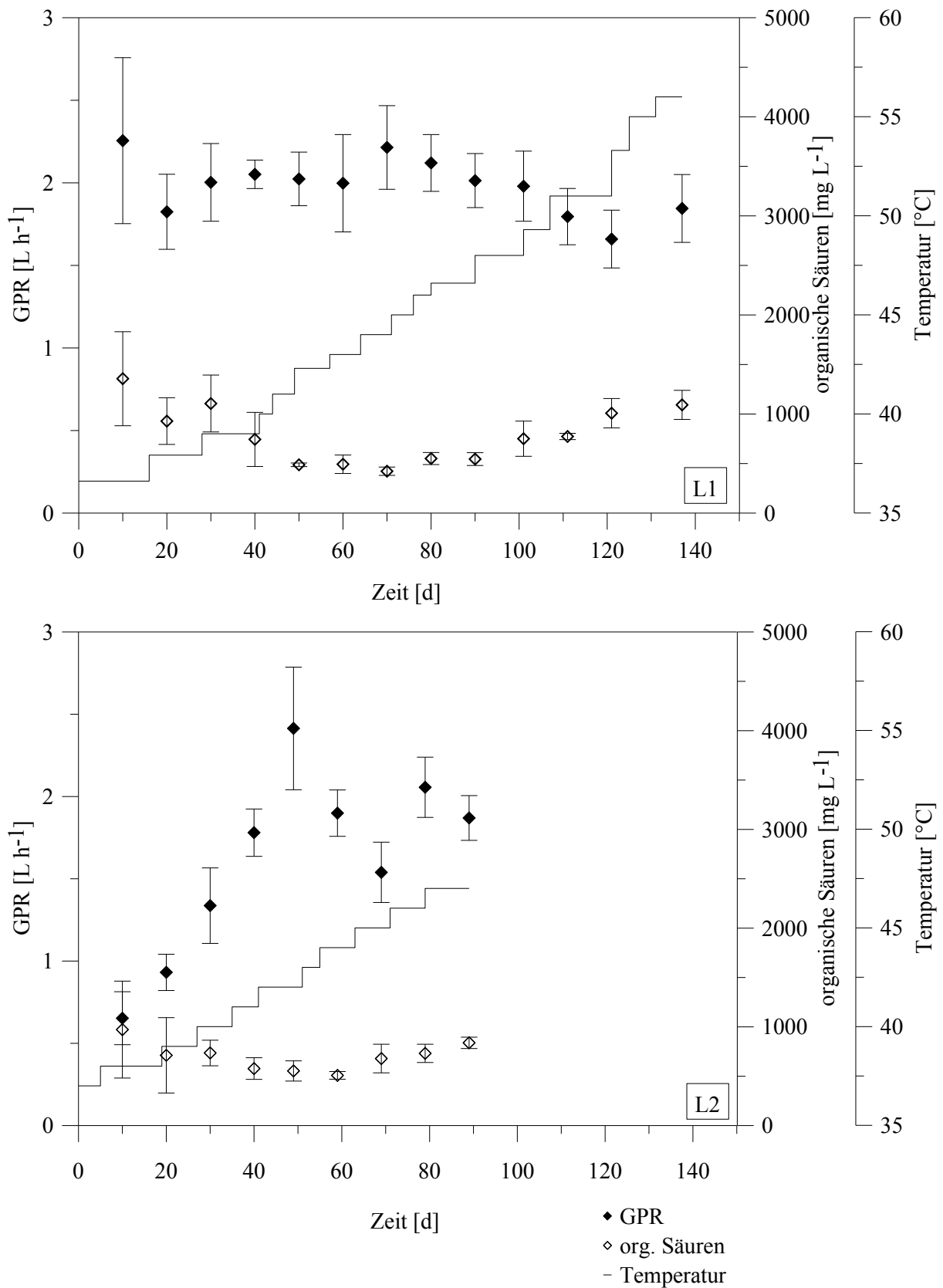


Abbildung 20: Verläufe der Gasproduktion und der Konzentration der organischen Säuren bei Erhöhung der Temperatur in den Laborreaktoren 1 und 2. Gemittelte 10-Tages-Werte. Ölzugabe in L2 ab Tag 20.

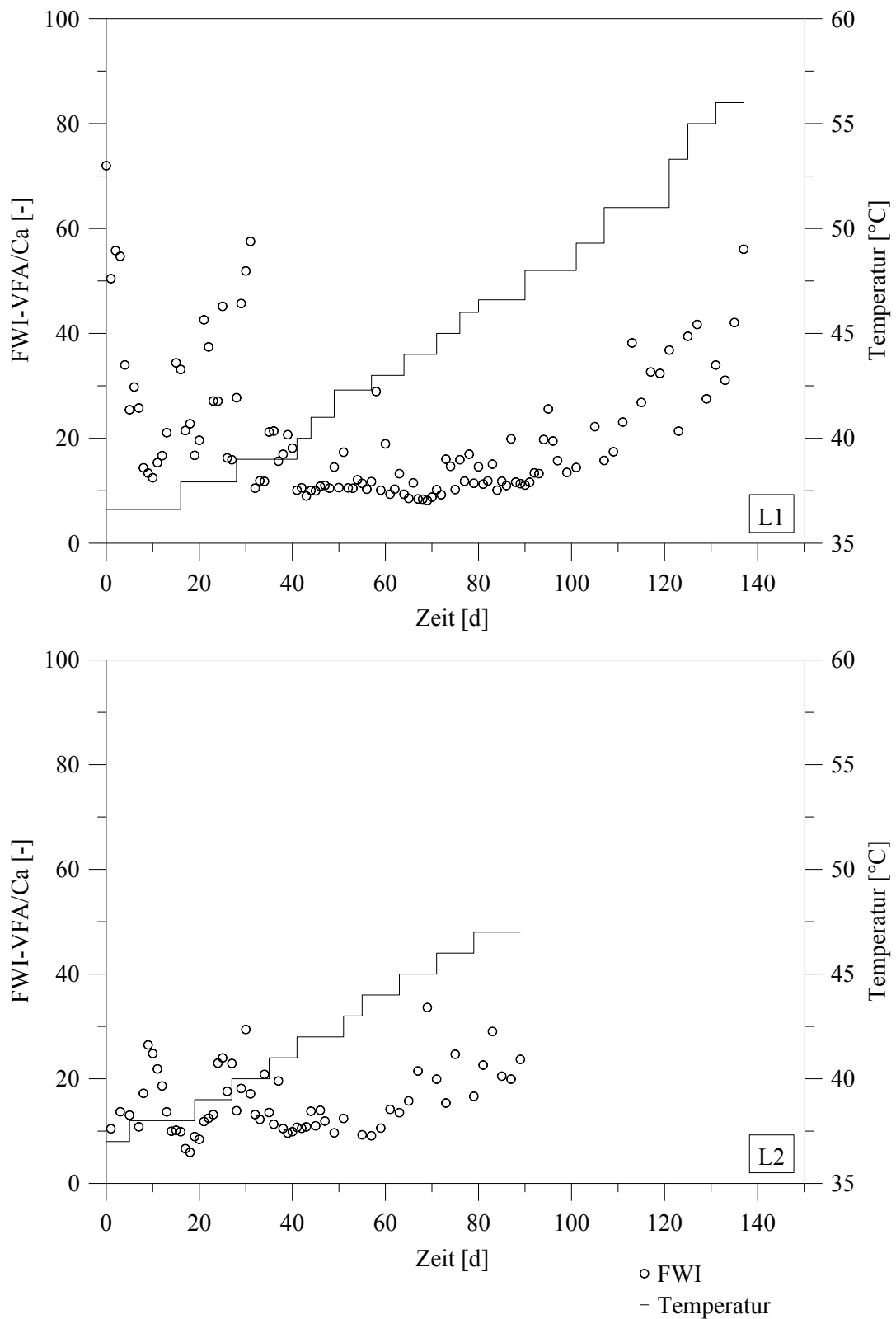


Abbildung 21: Verlauf des FWI-VFA/Ca bei Erhöhung der Temperatur in den Laborreaktoren 1 und 2. Erhöhte Werte zwischen 37 °C und 40 °C und ab 49 °C in L1.

Mit dem genetischen Fingerprinting unter Einsatz von allgemeinen *Bacteria*-Primern und spezifischen Primern für methanogene Archaeen wurden die bakteriellen und methanogenen Gemeinschaften aus den Gärresten von Reaktor 1 bei den Temperaturen 37 °C, 47 °C und 56 °C charakterisiert. Es zeigten sich Veränderungen im Bandenmuster für die bakterielle Gemeinschaft (Abbildung 22). Vor allem Bakterien des Phylums *Firmicutes* wurden über den Sequenzabgleich mit der Gendatenbank identifiziert. Ein noch nicht charakterisiertes Bakterium (Bande 1) wurde nur bei 37 °C nachgewiesen. Die Banden 2 (*Bacteroidetes* Bakterium), 3 (*Clostridium* sp.), 4 (*Ruminococcaceae* Bakterium), 5 (*Syntrophomonas* sp.) und 6 (*Clostridia* Bakterium) wurden in höherer Intensität bei 46 °C detektiert, während die Banden 8 (Uncharakterisiertes Bakterium), 9 (*Thermotogaceae* Bakterium), 10 (*Syntrophomonadaceae* Bakterium) und 12 (*Anaerobaculum mobile*) verstärkt bei 56 °C detektiert wurden. Des Weiteren waren in Reaktor 2 bei 37 °C innerhalb der Schwimmschicht drei verschiedene Zonen mit unterschiedlichen Konsistenzen zu erkennen, deren genetische Fingerprinting-Muster sich unterschieden.

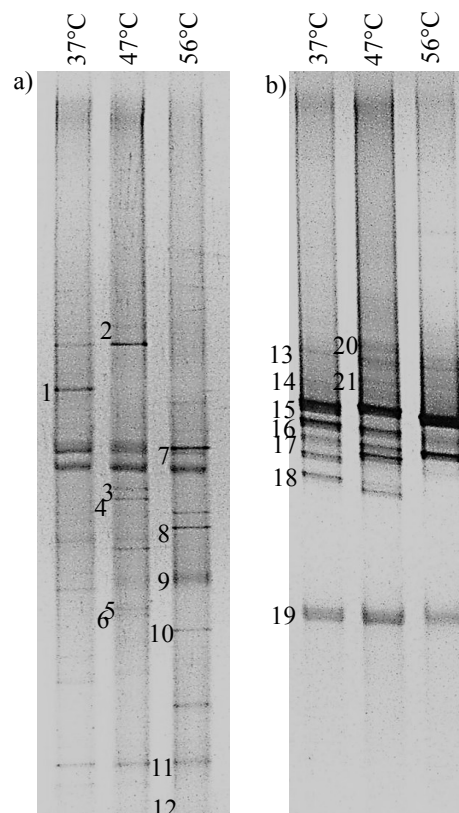


Abbildung 22: PCR-DGGE Analyse von 16S rRNA Genfragmenten bakterieller (a) und archaeeller (b) DNA aus Gärresten von Laborreaktor 1 bei 37 °C, 47 °C und 56 °C. Verändertes Bandenmuster in Abhängigkeit von der Temperatur.

Bei den methanogenen Archaeen wurden sowohl Sequenzen von obligat acetoklastischen (*Methanosaeta concilii*) und fakultativ acetoklastischen Arten (*Methanosarcina thermophila*) als auch von obligat hydrogenotrophen Vertretern (*Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus receptaculi*, *Methanospirillum* sp.) detektiert (Tabelle 9). Die dem Archaeon *Methanospirillum* sp. zugeordnete Bande 18 wurde nicht mehr bei 56 °C nachgewiesen (Abbildung 22).

Tabelle 9: Phylogenetische Zuordnung partieller bakterieller 16S rRNA-Gensequenzen aus den DGGE-Profilen in Abbildungen 22.

Bande	Nächster verwandter Organismus	Phylum	Ähnlichkeit
1	Unkultiviertes Bakterium	n.d.	99 %
2	Unkultiviertes <i>Bacteroidetes</i> Bakterium	<i>Bacteroidetes</i>	99 %
3	Unkultiviertes <i>Clostridium</i> sp.	<i>Firmicutes</i>	95 %
4	<i>Ruminococcaceae</i> Bakterium	<i>Firmicutes</i>	91 %
5	Unkultiviertes <i>Syntrophomonas</i> sp.	<i>Firmicutes</i>	96 %
6	Unkultiviertes <i>Clostridia</i> Bakterium	<i>Firmicutes</i>	92 %
7	Unkultiviertes <i>Bacillus</i> sp.	<i>Firmicutes</i>	98 %
8	Unkultiviertes Bakterium	n.d.	91 %
9	<i>Thermotogaceae</i> Bakterium	<i>Thermotogae</i>	99 %
10	Unkultiviertes <i>Syntrophomonadaceae</i> Bakterium	<i>Firmicutes</i>	91 %
11	<i>Coprothermobacter</i> sp.	<i>Firmicutes</i>	100 %
12	<i>Anaerobaculum mobile</i>	<i>Synergistetes</i>	99 %
13, 14	Unkultiviertes <i>Methanosarcinales</i> Archaeon	<i>Euryarchaeota</i>	92-93 %
15	<i>Methanosarcina thermophila</i>	<i>Euryarchaeota</i>	96 %
16, 19	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	<i>Euryarchaeota</i>	95-99 %
17	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	<i>Euryarchaeota</i>	98 %
18	<i>Methanospirillum</i> sp.	<i>Euryarchaeota</i>	98 %
20, 21	<i>Methanosaeta concilii</i>	<i>Euryarchaeota</i>	98 %

Die Abundanz von *M. parvicella* wurde über die Zahl der 16S rRNA Genkopien in den parallel betriebenen Reaktoren bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Die Analysen zeigten, dass die Abundanz von *M. parvicella* bei einer Erhöhung der Temperatur erheblich abnahm (Abbildung 23). Bereits bei einer Temperatur von etwa 40 °C hatte sich die Genkopienzahl im Gärrest von Reaktor 1 auf 3×10^5 halbiert. Bei einer weiteren Steigerung der Temperatur auf 43 °C verringerte sich die Anzahl der Genkopien um den Faktor 3 auf 1×10^5 und blieb bis zur Erhöhung auf 56 °C auf diesem Niveau. Im Gärrest von Reaktor 2 reduzierten sich die Genkopien bei 41 °C um den Faktor 6 auf 5×10^5 . Die Abundanz blieb bei der weiteren Temperaturerhöhung auf 47 °C konstant. Zusätzlich wurden die Genkopien in den Schwimmschichten von Reaktor 1 und Reaktor 2 bei 37 °C quantifiziert. Die Abundanz von *M. parvicella* war mit durchschnittlich 2×10^7 16S rRNA Genkopien in der Schwimmschicht um den Faktor 10 bis 20 höher als in den Gärresten.

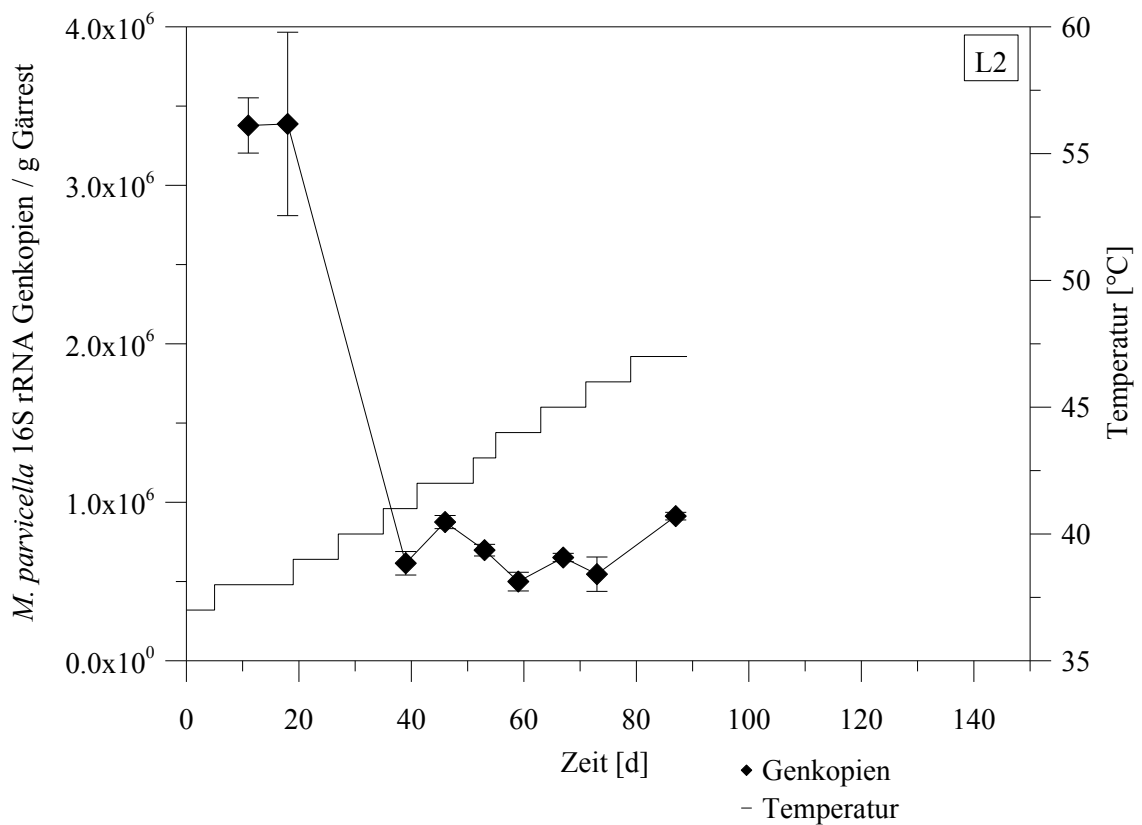
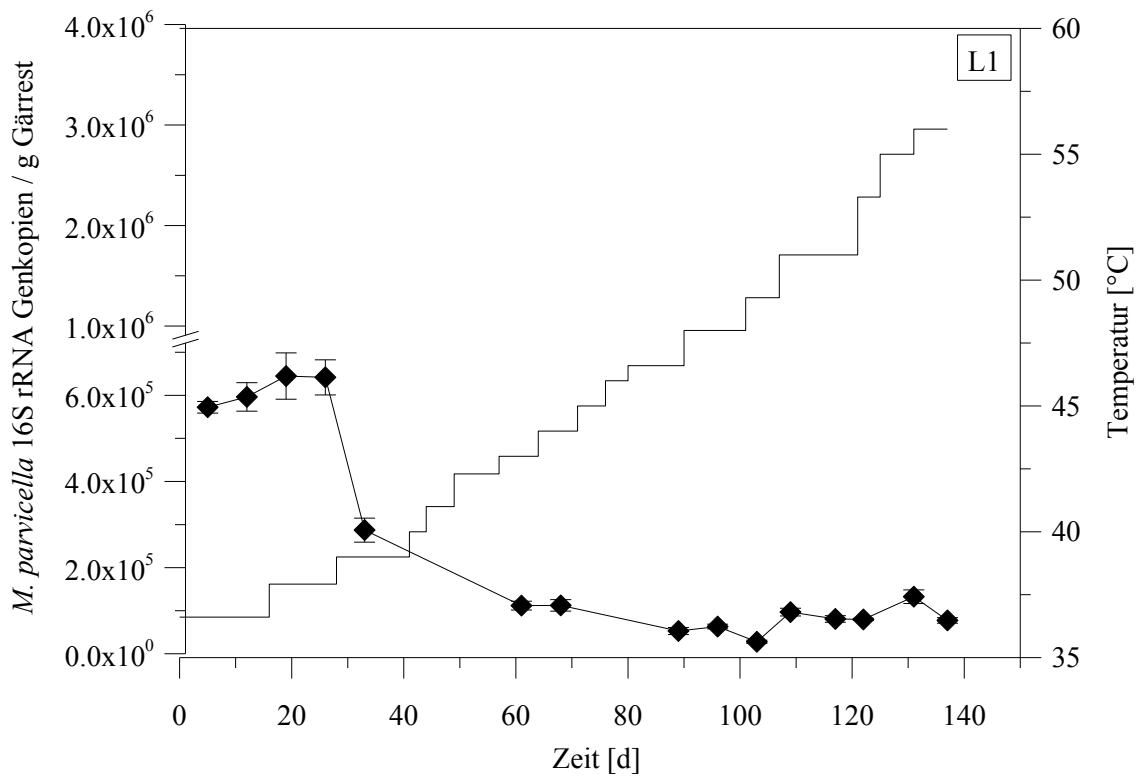


Abbildung 23: Abnahme der 16S rRNA Genkopienzahl von *M. parvicella* nach Erhöhung der Temperatur in den Laborreaktoren 1 und 2. Starke Verringerung der Abundanz bei 40 °C.

5. Diskussion

Mikroorganismen können an Prozessstörungen wie Übersäuerung, Schaum- oder Schwimmschichtbildung beteiligt sein. Andererseits beeinflussen diese Störungen auch die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, wie sich die mikrobielle Zusammensetzung in Biogasanlagen aus der Abfallwirtschaft unter dem Einfluss einer ungünstigen Durchmischung sowie einer Schaum- und Schwimmschichtbildung verändert. Es wurde ein Indikatororganismus für Schaumbildung identifiziert und verschiedene Strategien zur Vermeidung von Prozessstörungen wie die Zugabe von CaO oder die Modifikation der Betriebstemperatur erprobt. Ebenso wurde der Frage nachgegangen, warum der Abbaugrad der organischen Substanz in einer Schwimmschicht gering ist.

5.1 Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in Biogasreaktoren

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Verfahren der PCR-DGGE und qPCR ermöglichten die Analyse einer großen Probenzahl in kurzer Zeit sowie die Erfassung schwer oder nicht kultivierbarer Mikroorganismen. Die erhaltenen Sequenzinformationen der bei der PCR-DGGE auf eine Länge von ca. 500 bp beschränkten Genfragmente (Myers et al. 1985) waren geeignet, um die Veränderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose bei Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute, unter dem Einfluss einer ungünstigen Durchmischung sowie einer Schaum- und Schwimmschichtbildung zu analysieren. Die im genetischen Fingerprinting erhaltenen Sequenzen wurden nach Stackebrandt und Goebel (1994) ab einer Übereinstimmung von 97 % einer Art zugeordnet. Einzelne Sequenzen konnten nicht weiter als bis zur Familie zugeordnet werden, die Zuordnungen waren aber ausreichend, um Aussagen über die Veränderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft zu treffen. Organismen einiger Familien weisen nur geringe Sequenzunterschiede im 16S rRNA Gen auf, so dass keine Zuordnung zur Gattung oder Art möglich ist. Dies betrifft vor allem Arten, die erst in jüngster Zeit divergiert sind (Fox et al. 1992). Banden verschiedener Spezies mit gleichen Lauflängen im denaturierenden Gel traten in den eigenen Untersuchungen nur in geringem Maße auf. Die in der DGGE gewählten Harnstoffkonzentrationsgradienten von 35-65 % für Bakterien und 40-75 % für methanogene Archaeen waren demnach geeignet, um die Bildung von sogenannten Doppelbanden zu vermeiden. Diese werden durch ein identisches Schmelzverhalten von 16S rRNA Genfragmenten unterschiedlicher Mikroorganismen verursacht. In der Sequenzierung werden die Doppelbanden durch Überlagerungen der Sequenzen sichtbar, so dass sie sich nicht mehr

eindeutig einem Mikroorganismus zuordnen lassen. Die Bildung von Doppelbanden kann zu einer Unterschätzung der mikrobiellen Gemeinschaft führen (Muyzer und Smalla 1998). Neben der PCR-DGGE oder anderen Fingerprinttechniken wie beispielsweise der SSCP- (Single-Strand-Conformation-Polymorphism) oder T-RFLP-Analyse (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) wird das sogenannte Next Generation Sequencing (NGS) zur Analyse der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in Biogasanlagen eingesetzt (Jaenicke et al. 2011, Rademacher et al. 2012, Hanreich et al. 2013). Dieses Verfahren liefert große Mengen an Sequenzdaten in kürzerer Zeit und erfasst auch in geringerer Zellzahl vorkommende Mikroorganismen. Dennoch ist das genetische Fingerprinting eine solide und kostengünstige Alternative, um die dominanten Mikroorganismen einer Lebensgemeinschaft nachzuweisen (Cleary et al. 2012). Durch den Vergleich der Bandenintensitäten im genetischen Fingerprinting wurde *Microthrix parvicella* als Verursacher einer Schaumbildung identifiziert. Die Menge an *M. parvicella* wurde anschließend mit der qPCR bestimmt. In Übereinstimmung mit den Studien von Kaetzke et al. (2005) und Kumari et al. (2009) zeigten die eigenen Untersuchungen, dass die qPCR eine sehr gut geeignete Methode ist, um die Abundanz von *M. parvicella* zu quantifizieren. Jeder Reaktionsansatz der qPCR wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt, um den von Smith und Osborn (2009) beschriebenen Einfluss des Geräts, des Experimentators und der Variabilität in den Ansätzen so gering wie möglich zu halten. Das amplifizierte *M. parvicella* 16S rRNA Genfragment lag mit einer Basenpaarlänge von 190 bp nahezu im idealen Bereich von 50-150 bp (Smith und Osborn 2009). Die in den eigenen Untersuchungen errechnete Effizienz der Amplifikation war mit 98 % annähernd optimal. Im Idealfall liegt die Effizienz bei 100 %, was einer Verdopplung der DNA bei jedem Zyklus der qPCR entspricht (Pfaffl 2004). Die Spezifität des amplifizierten 16S rRNA Genfragments wurde durch Sequenzierung überprüft. Bei jeder qPCR wurde zusätzlich die Spezifität der Reaktion mittels Schmelzkurven analysiert. Eine sehr gute Spezifität ist wichtig, um unspezifische Reaktionsprodukte und somit eine Fehleinschätzung der absoluten Genkopienzahlen zu vermeiden (Smith and Osborn 2009). Neben der qPCR wird für die Analyse der Abundanz von *M. parvicella* das mikroskopische Verfahren der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) eingesetzt (de Los Reyes et al. 2002). Die Nachteile von FISH, wie Fehlinterpretationen der Zellzahlen wegen einer unvollständigen Permeabilität der Zellwände für die Sonde oder niedrige rRNA-Mengen auf Grund einer geringen metabolischen Aktivität (Kaetzke et al. 2005), treten bei der DNA-basierten qPCR nicht auf. Eine Aussage bezüglich aktiven oder inaktiven Zellen ist allein auf Grundlage von DNA-basierten Techniken nicht möglich, da mit diesen Verfahren auch inaktive Zellen detektiert werden. Die Aktivität der

Mikroorganismen wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Abbau der organischen Substrate und die Produktion des Methans gezeigt. Auch die Vermehrung der DNA war ein Beleg für Aktivität und Wachstum. Bei den in dieser Arbeit betrachteten anaeroben Anlagen handelte es sich um Systeme, bei der die Biomasse kontinuierlich ausgetauscht wurde. Inaktive Zellen konnten sich nicht über einen längeren Zeitraum im Reaktor halten und sie wurden mit dem Abzug des Gärrestes ausgewaschen. Durch einen Vergleich der zugeführten und abgeführten DNA-Konzentration einzelner Spezies konnten somit Aussagen über die Aktivität getroffen werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das genetische Fingerprinting der PCR-DGGE in Verbindung mit der Quantifizierungsmöglichkeit über die qPCR ein geeignetes Mittel zur Ableitung von Handlungsempfehlungen bei Prozessstörungen in Biogasanlagen ist. Da in der PCR-DGGE und der qPCR unterschiedliche Primersysteme zur Amplifikation der Genfragmente eingesetzt wurden, bestätigten sich die Ergebnisse der beiden Analysemethoden gegenseitig.

5.2 Stabiler Biogasproduktionsprozess durch gleichbleibende mikrobielle Gemeinschaft, Syntrophien und Mikrohabitate durch Aggregatbildung

Vor allem die methanogene Gemeinschaft ist empfindlich gegen Störungen des Prozesses wie beispielsweise eine Akkumulierung organischer Säuren. Daher ist ihre Abundanz ein Indikator für Prozessstabilität. In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen der methanogenen Biozönose in Laborreaktoren während einer Erhöhung der Raumbelastung von 3,2 kg oTS m³ auf bis zu 9,5 kg oTS m³ sowie einer schrittweisen Temperaturerhöhung um 1 °C pro Woche untersucht. Die genetischen Fingerprintings zeigten eine gleichbleibende Zusammensetzung der methanogenen Gemeinschaft. Entsprechend dazu zeigten die konstante Methanausbeute und Biogasproduktion einen stabilen Prozess an. Mit dem genetischen Fingerprinting wurden sowohl Verwandte der hydrogenotrophen Gattungen *Methanospirillum*, *Methanoculleus* und *Methanobacterium* als auch der fakultativ acetoklastischen Gattung *Methanosarcina* identifiziert. Archaeen der obligat acetoklastischen Gattung *Methanosaeta* wurden im Gegensatz zum Versuch zur Temperaturerhöhung nicht während des Versuchs zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute detektiert. Durch die hohe Raumbelastung stieg die Konzentration von Acetat auf bis zu 450 mg L⁻¹ an. *Methanosaeta* wird bei Acetatkonzentrationen über 200 mg L⁻¹ gehemmt (Jetten et al. 1992), so dass bei den gegebenen Acetatkonzentrationen *Methanosarcina* dominierte. Weitere Studien zeigen ebenfalls die Dominanz von Mikroorganismen der Gattung *Methanosarcina* bei erhöhten

Raumbelastungen (Sousa et al. 2007a, Sousa et al. 2009, Lerm et al. 2012). Sowohl in den Laborreaktoren als auch in den großtechnischen Biogasanlagen dominierten Vertreter der Phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* die bakterielle Gemeinschaft. Diese kommen typischerweise in anaeroben Reaktoren vor (Klocke et al. 2007, McKeown et al. 2009, Rademacher et al. 2011, Regueiro et al. 2012, Wirth et al. 2012). Der Nachweis von Verwandten der Familie *Syntrophomonadaceae* als auch von hydrogenotrophen Methanogenen lässt vermuten, dass es sich um syntrophe Vergesellschaftungen dieser beiden Gruppierungen handelt. Diese wird beispielsweise bei Sousa et al. (2007b) für die Gattungen *Syntrophomonas* und *Methanobacterium* beschrieben. Bakterien der Familie *Syntrophomonadaceae* produzieren beim Abbau von organischen Säuren H_2 . Der Wasserstoff wird im Gegenzug von hydrogenotrophen Methanogenen für die Reduktion von CO_2 zu CH_4 verwendet. Dieser „Interspezies-Wasserstoff-Transfer“ (Bauer et al. 2008) hält den Wasserstoffpartialdruck auf einem niedrigen Niveau und ermöglicht somit einen weiteren energiegewinnenden Abbau von organischen Säuren wie Butyrat oder Propionat durch den syntrophen Partner. Im Versuch zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute war der Wasserstoffpartialdruck im Gärschlamm höher als 0,1 mbar und hätte nach Harper (1986) zu einer Hemmung des Abbaus der organischen Säuren führen müssen. Kleyböcker et al. (2012b) zeigen in ihrer Studie, dass sich bei Zugabe von CaO Aggregate im Gärschlamm bilden, an deren Oberfläche kurzkettige Fettsäuren adsorbieren und der Prozess somit stabilisiert wird. Auch im Gärschlamm des Versuchs zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute bildeten sich Aggregate. Diese schufen sehr wahrscheinlich Mikrohabitate mit günstigeren Bedingungen, so dass ein Abbau der organischen Säuren trotz hohem Wasserstoffpartialdruck möglich war. Somit trugen die Mikrohabitate vermutlich zur Prozessstabilisierung bei.

5.3 Ungünstige Durchmischung als Ursache für eine drohende Übersäuerung und eine Veränderung der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft

Die Prozessstabilität im Laborversuch zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute wurde mit dem vor einer drohenden Übersäuerung warnenden FWI-VFA/Ca gesteuert. Dieser wird aus dem Verhältnis der Konzentrationen von organischen Säuren und Calcium gebildet (Kleyböcker et al. 2012a). Somit erfasst der FWI-VFA/Ca sowohl eine bei einer Übersäuerung auftretende Erhöhung der organischen Säuren als auch die Pufferkapazität des Gärschlammes über die Calciumkonzentration. Der Indikator wurde in dieser Arbeit auch während einer Störung der Durchmischung in einer großtechnischen Biogasanlage zur Beurteilung der Prozessstabilität verwendet. Die Anlage wurde mit Gülle und biogenen Abfällen und damit mit einem anderen Substratspektrum betrieben als Klärschlamm und

Rapsöl für die der FWI-VFA/Ca eingangs entwickelt wurde (Kleyböcker et al. 2012a). Auch bei diesen Substraten zeigte der FWI-VFA/Ca eine drohende Übersäuerung an. Die ungünstige Durchmischung führte sehr wahrscheinlich zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Substrate in den Reaktoren und somit zu Sedimentationen und Stagnationszonen mit verschiedenen hohen Raumbelastungen. Aufgrund des schnelleren Wachstums hydrolytischer und acidogener Bakterien akkumulierten in den Zonen mit hohen Raumbelastungen organische Säuren. Der hohe Wert des FWI-VFA/Ca zeigte an, dass die Calciumkonzentration im Gärschlamm zu gering war, um das System gegen eine Übersäuerung zu puffern. Durch eine Halbierung der Raumbelastung von $2,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ auf $1,25 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ wurde das Gleichgewicht aus Säureproduktion und -abbau wiederhergestellt. Die Konzentration der organischen Säuren verringerte sich und der Biogasproduktionsprozess stabilisierte sich. Entsprechend reduzierte sich auch der Wert des FWI-VFA/Ca. Der Einfluss der ungünstigen Durchmischung auf die mikrobielle Biozönose wurde mit dem genetischen Fingerprinting untersucht. Der Zustand der Durchmischung, im einen Reaktor ohne Durchmischung und im anderen Reaktor mit teilweiser Durchmischung, beeinflusste die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft. Die Verteilungsmuster der Analysen nach Pareto-Lorenz zeigten, dass besonders im partiell durchmischten Reaktor auch quantitative Unterschiede in der mikrobiellen Struktur auftraten. Die mikrobielle Gemeinschaft wurde mit fortschreitender Dauer der Störung von wenigen Bakterien dominiert. Nach der Wiederherstellung der Durchmischung nahm die Diversität wieder zu. Die Durchmischung beeinflusste somit substantziell die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Biozönose im Reaktor.

5.4 Verringerung des Abbaugrads organischer Substanz in Schwimmschichten durch eine Anreicherung organischer Säuren und Hemmung der mikrobiellen Biozönose

Sowohl in der mit Gülle und biogenen Abfällen betriebenen großtechnischen Biogasanlage als auch in den Laborreaktoren bildeten sich Schwimmschichten. Diese waren durch hohe Konzentrationen von organischen Säuren und einem entsprechend hohen Wert des FWI-VFA/Ca charakterisiert. Organische Substanz lagerte sich in der Schwimmschicht ab, was zu einer hohen Raumbelastung und zu einer Akkumulierung organischer Säuren führte. Wie in anderen Studien beschrieben (Schink 1997, Mösche und Jördening 1999, Wang et al. 1999), werden durch die Anreicherung organischer Säuren die acetogenen und methanogenen Mikroorganismen inhibiert, woraus eine weitere Akkumulierung kurzkettiger Fettsäuren resultiert. Daneben war die Calciumkonzentration zu gering, um eine effiziente Pufferung zu erreichen. Da es zwischen Schwimmschicht und Gärschlamm zu keinem stofflichen

Austausch kam, wurden die Säuren in der Schwimmschicht nicht verdünnt, obwohl die Raumbelastung und damit die Belastung an organischen Säuren im Gärschlamm verringert wurde. Dadurch blieben die organischen Säuren in der Schwimmschicht in einem hohen Bereich und der mikrobielle Abbau der organischen Substrate wurde weiter inhibiert. Mikroskopische Analysen wiesen auf filamentöse Strukturen in der Schwimmschicht des Reaktors der großtechnischen Biogasanlage hin. Diese könnten von Bakterien des Phylums *Chloroflexi* gestammt haben, da zu diesem verwandte Mikroorganismen im Gärschlamm identifiziert wurden und einige Vertreter dieser Gruppe durch eine filamentöse Morphologie charakterisiert werden (Kragelund et al. 2006). Filamentöse Mikroorganismen sind an Schaum- und Schwimmschichtbildung in Anlagen der Abwasserbehandlung und mit Klärschlamm beschickten anaeroben Reaktoren beteiligt (Martins et al. 2004, Ganidi et al. 2009). Da sich das genetische Fingerprinting der bakteriellen Gemeinschaft in der großtechnischen Anlage nicht zwischen Gärschlamm und Schwimmschicht unterschied, wurde kein Zusammenhang zwischen der Schwimmschichtbildung und dem Vorkommen von filamentösen Mikroorganismen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde in der Schwimmschicht in den Laborreaktoren eine Anreicherung des filamentösen Bakteriums Candidatus *Microthrix parvicella* (Blackall 1996) nachgewiesen, die die Ursache der Schwimmschichtbildung war. Die Abundanz von *M. parvicella* war in der Schwimmschicht im Vergleich zum Gärschlamm um den Faktor 10 bis 20 erhöht. Der Vergleich der großtechnischen Anlage mit dem Laborreaktor zeigt, dass die Gründe von Schwimmschichtenbildungen verschiedenartig sein können. Auf der einen Seite war die ungünstige Durchmischung und die Zufuhr von Substraten mit hoher Flotationsneigung entscheidend und auf der anderen Seite wurde die Schwimmschicht von filamentösen Mikroorganismen verursacht.

5.5 Molekularbiologischer Nachweis von *Microthrix parvicella* als Indikatororganismus für Schaum- und Schwimmschichtbildung in Biogasanlagen

Das filamentöse Bakterium *Microthrix parvicella* wurde sowohl mit universellen bakteriellen 16S rRNA Primern im genetischen Fingerprinting als auch mit spezifischen 16S rRNA Primern in der qPCR als Verursacher einer Schaumbildung in einer mit Mischschlamm und Fettabscheiderinhalten betriebenen kaskadenförmigen Biogasanlage nachgewiesen. Die Schaumbildung trat nur im Co-vergärenden stromabwärts gelegenen Reaktor auf. *M. parvicella* ist aus mehreren Studien als Schaumverursacher in Abwasserbehandlungsanlagen und mit Klärschlamm betriebenen Biogasanlagen bekannt (Eikelboom 1975, Blackbeard et al. 1986, Blackall et al. 1988, Pujol et al. 1991, Eikelboom und Andreasen

1995, Westlund et al. 1998, Martins et al. 2004). Die Zelloberflächen von *M. parvicella* sind stark hydrophob und das Bakterium zeigt eine hohe Affinität zu Lipiden als Kohlenstoffquelle. Diese werden auch unter anaeroben und anoxischen Bedingungen in Form von langkettigen Fettsäuren gespeichert und assimiliert (Slijkhuis und Deinema 1982, Slijkhuis und Deinema 1988, Tandoi et al. 1998, Nielsen et al. 2002, Muller et al. 2012). Dementsprechend sind im Genom von *M. parvicella* Gene vorhanden, die extrazelluläre Triacylglycerol-Lipasen und Transportproteine für Glycerol sowie Enzyme für die β -Oxidation langkettiger Fettsäuren codieren (Jon McIlroy et al. 2013). Kurzkettige Fettsäuren und Monosaccharide werden nicht als Kohlenstoffquelle verwendet (Andreasen und Nielsen 1997, Andreasen und Nielsen 1998). Der optimale Wachstumsbereich von *M. parvicella* wird nach Rossetti et al. (2005) mit Temperaturen zwischen 7 °C und 25 °C angegeben. In kälteren Monaten mit geringer Fettlöslichkeit ergibt sich in Anlagen der Abwasserbehandlung ein Selektionsvorteil und somit vermehrtes Wachstum (Rossetti et al. 2005, Mamais et al. 2006). Daher wird *M. parvicella* in den Wintermonaten in größeren Mengen mit dem Klärschlamm in den Reaktor eingetragen und führt hier zur Schaumbildung (Kumari et al. 2009). Auch in der in dieser Arbeit beschriebenen großtechnischen Biogasanlage wurde *M. parvicella* in den Wintermonaten vermehrt über den Mischschlamm eingetragen und führte in Verbindung mit der Zugabe von Fett als Co-Substrat zur Schaumbildung. Sowohl semiquantitative Analysen mit Hilfe der PCR-DGGE als auch absolute Quantifizierungen mittels qPCR zeigten das höchste Vorkommen von *M. parvicella* im von Schaumbildung betroffenen Reaktor. Eine Schaumbildung wurde erst bei Überschreitung einer Schwellenwertabundanz von *M. parvicella* beobachtet. Der Reaktor mit Schaumbildung lag stromabwärts in der Kaskade. Die *M. parvicella* Genkopienzahlen im Mischschlamm waren um 30 bis 170 % höher als in den Reaktoren. Durch die Zufuhr des Mischschlammes als Substrat in den ersten Reaktor der Kaskade wären die höheren Genkopien in diesem Reaktor zu erwarten gewesen. Die erhöhten Genkopienzahlen im nachgeschalteten Reaktor deuteten auf anaerobes Wachstum hin. Die Zunahme der DNA, wie sie mit Hilfe der qPCR detektiert wurde, ist ein Hinweis auf die Vermehrung des Organismus, da Wachstum mit Zellteilung und einer Zunahme von DNA einhergeht. Die Erhöhung der Genkopienzahlen im nachgeschalteten Reaktor könnte auch eine Folge von Verweilzeiteffekten sein. Da die Bestimmung der *M. parvicella* Genkopienzahlen an zwei aufeinander folgenden Monaten sowie an weiteren Monaten der zur Schaumbildung neigenden Kaskade ebenfalls eine Erhöhung des Vorkommens im zweiten Reaktor zeigte, können diese Effekte nahezu ausgeschlossen werden. Die Genkopienzahlen im nachgeschalteten Reaktor waren doppelt so hoch wie im ersten Reaktor. Dies entspricht einer Verdopplung der Zellzahl, da *M. parvicella* nur über eine Kopie des 16S rRNA Gens im

Genom verfügt (Jon McIlroy et al. 2013). *M. parvicella* ist fakultativ denitrifizierend (Tandoi et al. 1998, Nielsen et al. 2002, Rossetti et al. 2005, Muller et al. 2012). Während Studien mit Reinkulturen darlegen, dass *M. parvicella* Nitrat nur bis zum Nitrit reduzieren kann (Rossetti et al. 2005), zeigen Jon McIlroy et al. (2013), dass das die Nitritreduktase codierende *nirK* Gen im Genom vorhanden ist und somit auch eine weitere Reduktion des Nitrits bis hin zum Stickstoffmonoxid möglich ist. Da keine Gene gefunden wurden, die Enzyme für die weitere Reduktion des Stickstoffmonoxids zu Distickstoffoxid und molekularem Stickstoff codieren (Jon McIlroy et al. 2013), scheint *M. parvicella* das Nitrat nicht vollständig zum molekularen Stickstoff reduzieren zu können. Während der Schaumbildung und des einjährigen Monitorings wurden keine Nitratkonzentrationen im Gärschlamm bestimmt, so dass nicht geprüft werden konnte, ob die Reaktoren tatsächlich frei von diesen waren. Der Gärschlamm des Hinteren der beiden Reaktoren enthielt sehr wahrscheinlich kein Nitrat, da die Oxidation von organischen Verbindungen mit diesem Elektronenakzeptor energetisch günstig ist und Nitrat schon im ersten Reaktor reduziert worden wären. Auch Chacin et al. (1994) berichten über Wachstum von *M. parvicella* unter anaeroben, nitratfreien Bedingungen. Ob dem anaeroben Wachstum ohne Nitrat beispielsweise ein fermentativer Abbau zu Grunde liegt, ist unklar und konnte auch nicht durch eine Genomanalyse aufgeklärt werden (Jon McIlroy et al. 2013).

5.6 Vermeidung von durch filamentöse Mikroorganismen verursachte Schwimmschichten durch geringe Erhöhung der Reaktortemperatur

Die Untersuchungen an der großtechnischen Biogasanlage zeigen, dass das Monitoring der Abundanz von *M. parvicella* mit Hilfe der qPCR in mit Klärschlamm betriebenen Biogasanlagen als Frühwarnindikator für Schaum- und Schwimmschichtbildung eingesetzt werden könnte. Somit könnten bereits vor der Zufuhr des Klärschlammes in den Reaktor Maßnahmen getroffen werden, um die filamentösen Strukturen zu reduzieren. In mehreren Studien werden Strategien aufgezeigt, um die filamentösen Strukturen im Klärschlamm und das damit verbundene Schaum- und Schwimmschichtenrisiko zu minimieren. Die Erhitzung des Schlammes über 60 min auf 121 °C im Autoklaven ist eine effektive thermische Vorbehandlung des Klärschlammes, bevor dieser in den anaeroben Reaktor eingeleitet wird, während die Behandlung mit einem Hochdruckhomogenisator keinen Erfolg bringt (Barjenbruch et al. 2003). Auch Westlund et al. (1998) zeigen, dass sich die filamentösen Strukturen durch eine 5-minütige Erhitzung des Substrats auf 70 °C verringern. Neben Maßnahmen, die vor der Zufuhr des Substrats in den Reaktor getroffen werden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Strategie zur Vermeidung von Schaum- und Schwimmschichten

während des Betriebs untersucht. Obwohl *M. parvicella* durch einen optimalen Temperaturbereich von 7 °C bis 25 °C und eine maximale Wachstumstemperatur von 35 °C charakterisiert wird (Rossetti et al. 2005), wurde in der großtechnischen Anlage auch Schaum bei einer Temperatur von 38 °C gebildet. Dieser Aspekt war der Ausgangspunkt für einen Laborversuch, bei dem der Einfluss einer Temperaturerhöhung auf eine Schwimmschichtenbildung in Zusammenhang mit dem Vorkommen von *M. parvicella* untersucht wurde. Die Temperatur wurde vom mesophilen Bereich (37 °C) schrittweise in den thermophilen Bereich (56 °C) überführt und die Veränderungen im Vorkommen von *M. parvicella* untersucht. Obwohl der Mischschlamm für den Laborversuch von der großtechnischen Biogasanlage stammte, ergaben sich Unterschiede in der Abundanz von *M. parvicella*. Während *M. parvicella* in der großtechnischen Biogasanlage mit universellen bakteriellen Primern im genetischen Fingerprinting nachgewiesen wurde, war die Abundanz im Laborversuch geringer und *M. parvicella* wurde nicht mit der DGGE sondern nur mit spezifischen Primern in der qPCR detektiert. Studien von Kaetzke et al. (2005) und Kumari et al. (2009) weisen darauf hin, dass bereits ein geringer relativer *M. parvicella* Anteil von 3-4 % an der Gesamtpopulation zur Schaumbildung in Belebtschlammbecken der Abwasserbehandlung führen kann. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass auch die Bildung von Schwimmschichten schon bei einer geringen Abundanz von *M. parvicella* initiiert wird. Die Verminderung der Schwimmschicht durch die Erhöhung der Temperatur korrelierte mit einer Verringerung der Genkopienzahlen von *M. parvicella*. Interessanterweise wurden bei Temperaturen von 40 °C und 41 °C in zwei parallel betriebenen Reaktoren Abnahmen des Vorkommens von *M. parvicella* um den Faktor 2 bis 6 nachgewiesen. Die Erhöhung der Reaktortemperatur um einige Grad erwies sich als effiziente Maßnahme, um das Vorkommen von *M. parvicella* zu reduzieren und die Schwimmschicht zu verringern. Demnach führt bei mesophil betriebenen Biogasanlagen, die mit Klärschlamm beschickt und gering durchmischt werden, eine geringe Temperaturerhöhung zu einer Minimierung des Risikos einer Schaum- oder Schwimmschichtbildung. Die Maßnahme bietet sich an, da bei der Verstromung des Biogases über das Blockheizkraftwerk (BHKW) ein Großteil der eingesetzten Energie als Abwärme anfällt und diese für die Erhöhung der Reaktortemperatur eingesetzt werden könnte, ohne zusätzliche Energiekosten für den Betreiber zu verursachen.

6. Zusammenfassung

Zur Verbesserung der Effizienz und zur Förderung der Nachhaltigkeit von Biogasanlagen müssen Prozessstörungen vermieden werden. Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Kenntnisse über die gegenseitige Beeinflussung von Betriebsstörungen und Mikroorganismen zu erweitern, Indikatororganismen zu identifizieren und Handlungsempfehlungen für den Anlagenbetreiber abzuleiten. Hierzu wurden Untersuchungen an Laborreaktoren sowie großtechnischen Biogasanlagen aus der Abfallwirtschaft durchgeführt und sowohl chemische Analysen als auch molekularbiologische Techniken eingesetzt.

- Die mikrobielle Zusammensetzung der untersuchten Gärslämme war durch typische Vertreter wie Bakterien der Phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* sowie methanogene *Euryarchaeota* der Ordnungen *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* und *Methanomicrobiales* charakterisiert, die bekannt für ihre Beteiligung am Biogasprozess sind.
- Unter Einsatz von Calciumoxid wurde die Raumbelastung in einem mit Klärschlamm und Rapsöl betriebenen Laborreaktor stufenweise innerhalb von 38 Tagen von $3,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ auf $9,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gesteigert, um die Raum-Zeit-Ausbeute der Anlage zu verbessern. Die Zugabe von Calciumoxid wurde durch einen Frühwarnindikator gegen Übersäuerung gesteuert, der aus dem Verhältnis der Konzentrationen von organischen Säuren zu Calcium besteht. Genetische Fingerprintanalysen der mikrobiellen Biozönose zeigten eine gleichbleibende Zusammensetzung der methanogenen Gemeinschaft während der Erhöhung der Raumbelastung, die mit einer stabilen Methanausbeute korrelierte. Wasserstoff-produzierende syntrophe Bakterien und Wasserstoff-oxidierende methanogene Archaeen dominierten die Biozönose. Durch die Aggregatbildung ergaben sich Mikrohabitate mit günstigeren Bedingungen. Dadurch war auch bei höheren Raumbelastungen der Abbau von organischen Säuren möglich, obwohl der Wasserstoffpartialdruck im Gärslamm in einem Bereich lag, der die Degradation gehemmt hätte.
- In einer mit Gülle und biogenen Abfällen betriebenen zweistufigen Biogasanlage wurde die Durchmischung in den beiden Reaktoren der Methanisierungsstufe durch einen teilweisen bzw. völligen Ausfall des Rührorgans gestört. In der Folge zeigten steigende Konzentrationen von organischen Säuren und eine Abnahme der Biogasproduktion eine drohende Übersäuerung an. Der Frühwarnindikator warnte auch bei dieser Substratmatrix vor der drohenden Übersäuerung. Durch eine Verringerung der Raumbelastung wurde der Prozess stabilisiert. Nach der Störung der Durchmischung bildete sich eine Schwimmschicht, in der sich Säuren anreicherten und der Abbau vermindert war.

Mikroskopische Analysen zeigten filamentöse Mikroorganismen in der Schwimmschicht. Das Bandenmuster im genetischen Fingerprinting zeigte keine Unterschiede zwischen Gär Schlamm und Schwimmschicht, so dass keine Beteiligung der filamentösen Mikroorganismen an der Schwimmschichtbildung nachgewiesen wurde. Mit dem Ausfall der Rührtechnik veränderte sich die mikrobielle Biozönose und sie passte sich nach Wiederherstellung der Durchmischung wieder an.

- In Verbindung mit der Zugabe von hydrophoben Substanzen wurde das filamentöse Bakterium *Microthrix parvicella* als Ursache für eine Schaumbildung in einer mit Mischschlamm und Fettabscheiderinhalten betriebenen kaskadenförmigen Biogasanlage identifiziert. In den Wintermonaten wurde dieser Mikroorganismus vermehrt mit dem Mischschlamm in die Anlage eingetragen und trug hier durch seine filamentöse Struktur, der hydrophoben Zelloberfläche und der Abgabe von hydrophoben Substanzen zur Schaumbildung bei. Die Schaumbildung trat nur auf, wenn eine Abundanz von 2×10^8 *M. parvicella* 16S rRNA Genkopien überschritten und Fett als Co-Substrat zugeführt wurde. Die Quantifizierung der Genkopien im Gär Schlamm könnte demnach als Frühwarnindikator für Schaumbildung eingesetzt werden. Ein in der Kaskade nachgeschalteter Reaktor der Biogasanlage zeigte erhöhte Genkopienzahlen von *M. parvicella*. Da dieser Reaktor sehr wahrscheinlich frei von Nitrat war, wies die Zunahme auf eine anaerobe Vermehrung ohne Sauerstoff oder Nitrat als Elektronenakzeptor hin.
- Die Verringerung einer durch *M. parvicella* verursachten Schwimmschicht durch Erhöhung der Betriebstemperatur wurde in zwei parallel betriebenen Laborreaktoren beobachtet. Nachdem die Temperatur von 37 °C auf 56 °C erhöht wurde, löste sich die Schwimmschicht vollständig auf. Entsprechend dazu sanken die 16S rRNA Genkopienzahlen von *M. parvicella* im Gär Schlamm bei einer Erhöhung von 37 °C auf 41 °C um den Faktor 10. Die mikrobielle Biozönose passte sich an die schrittweise Erhöhung der Temperatur von 1 °C pro Woche an. Dadurch war der Biogasproduktionsprozess auch bei höheren Temperaturen stabil. Eine schrittweise Erhöhung der Temperatur von 37 °C auf 41 °C zeigte sich demnach als ein effektives Mittel, um eine von *M. parvicella* induzierte Schwimmschicht- und Schaumbildung in gering durchmischten Reaktoren zu verhindern.

7. Literaturverzeichnis

- Achtman M, Wagner M (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 431-440.
- Amann RI, Stromley J, Devereux R, Key R, Stahl DA (1992) Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 8, 614–623.
- Andreasen K, Nielsen PH (1997) Application of Microautoradiography to the Study of Substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 9, 3662-3668.
- Andreasen K, Nielsen PH (1998) In situ characterization of substrate uptake by *Microthrix parvicella* using microautoradiography. *Water Science and Technology*, 37, 4-5, 19-26.
- Andreasen K, Nielsen PH (2000) Growth of *Microthrix parvicella* in nutrient removal activated sludge plants: studies of in situ physiology. *Water Research*, 34, 5, 1559-1569.
- Balussou D, Kleyböcker A, McKenna R, Möst D, Fichtner W (2012) An economic analysis of three operational co-digestion biogas plants in Germany. *Waste and Biomass Valorization*, 3, 1, 23–41
- Barber W (2005) Anaerobic digester foaming: causes and solutions. *Water* 21 7 1:45–49.
- Barjenbruch M., Kopplow O (2003) Enzymatic, mechanical and thermal pre-treatment of surplus sludge. *Advances in Environmental Research*, 7, 715–720.
- Bauer C, Korthals M, Gronauer A, Lebuhn M (2008) Methanogens in biogas production from renewable resources-a novel molecular population analysis approach. *Water Science and Technology*, 58, 7, 1433-1439.
- Bauer C, Lebuhn M, Gronauer A (2009) Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising-Weihenstephan.
- Bayern Biogas Forum (2010) Prozessbiologische Störungen in NawaRo- und Gülleanlagen: Symptome, Ursachen und mögliche Lösungsansätze.
- BDEW (2014) Erneuerbare Energien und das EEG: Zahlen, Fakten, Grafiken. Bundesverband der Energie- und Wasserwirtschaft e.V., Berlin.
- Bischoff M (2009) Erkenntnisse beim Einsatz von Zusatz- und Hilfsstoffen sowie von Spurenelementen in Biogasanlagen. *VDI-Ber*, 2057, 111–123.
- Bischofsberger W, Dichtl N, Rosenwinkel K, Seyfried C, Böhnke B (2005) *Anaerobtechnik*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Blackall LL, Habers AE, Greenfield PF, Hayward AC (1988) Actinomycete scum problems in Australian activated-sludge plants. *Water Science and Technology*, 20, 493–495.

- Blackall LL, Stratton H, Bradford D, Del Dot T, Sjørup C, Seviour EM, Seviour RJ (1996) “*Candidatus Microthrix parvicella*”, a filamentous bacterium from activated sludge sewage treatment plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 186–187.
- Blackbeard JR, Ekama GA, Marais GVR (1986) A survey of filamentous bulking and foaming in activated sludge plants in South Africa. *Water SA*, 14, 1, 29–34.
- BMU (2012) Erneuerbare Energien in Zahlen: Nationale und internationale Entwicklung. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Berlin.
- Bodilis J, Nsigue-Meilo S, Besaury L, Quillet L (2012) Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. *PLoS One*, 7, 4, e35647.
- Borja R, Sanchez E, Weiland P (1996) Influence of Ammonia Concentration on Thermophilic Anaerobic Digestion of Cattle Manure in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors. *Process Biochemistry*, 31, 5, 477-483.
- Braun R., Huber P, Meyrath J (1981) Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. *Biotechnology Letters*, 3, 159-164.
- Cardinali-Rezende J, Debarry RD, Colturato LFDB, Carneiro EV, Chartone-Souza E, Nascimento AMA (2009) Molecular identification and dynamics of microbial communities in reactor treating organic household waste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 777–789
- Chacin E, Kocianova E, Forster CF (1994) Foam Formation, Anaerobiosis and *Microthrix parvicella*. *Water and Environment Journal*, 8, 534–537.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99, 4044-4064.
- Cleary DF, Smalla K, Mendonça-Hagler LC, Gomes NC (2012) Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. *PLoS One*, 7, 1, e29380.
- Colwell, R. R. and D. J. Grimes (2000) *Semantics and strategies. Nonculturable Microorganisms in the environment*. Washington, DC, ASM Press: 1-6.
- Côté C, Massé DI, Quessy S (2006) Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. *Bioresource Technology*, 97, 4, 686-691.
- de los Reyes FL 3rd, Rothauszky D, Raskin L (2002) Microbial community structures in foaming and nonfoaming full-scale wastewater treatment plants. *Water Environment Research*, 74, 437-49.

- Demirel B, Scherer P (2011) Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass and Bioenergy*, 35, 3, 992-998.
- Deublein D, Steinhauser A (2008) *Biogas from waste and renewable resources*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- DIN 38409-1 (1987) German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; parameters characterizing effects and substances (group H); determination of total dry residue, filtrate dry residue and residue on ignition (H 1). Deutsches Institut für Normung e.V. DIN 38409-1:1987-01.
- Dohanyos M, Zabranska J, Kutil J, Jenicek P (2004) Improvement of anaerobic digestion of sludge. *Water Science and Technology*, 49, 10, 89-96.
- Donoso-Bravo A, Retamal C, Carballa M, Ruiz-Filippi G, Chamy R (2009) Influence of temperature on the hydrolysis, acidogenesis and methanogenesis in mesophilic anaerobic digestion: parameter identification and modeling application. *Water Science and Technology*, 60, 1, 9-17.
- EEG (2012) *Das Erneuerbare Energien Gesetz – Daten und Fakten zur Biomasse – Die Novelle 2012*. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Berlin.
- Eikelboom DH (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Research*, 9, 365-388.
- Eikelboom DH (1994) The *Microthrix parvicella* puzzle. *Water Science and Technology*, 29, 271-279.
- Eikelboom DH, Andreasen K (1995) Survey of the filamentous population in nutrient removal plants in four European Countries. TNO-report: TNO-MW-R 95/090. TNO Institute of Environmental Sciences. Delft. The Netherlands.
- Fachverband Biogas e.V. (2014) *Branchenzahlen 2013 / Prognose 2014*. Freising.
- FAO (2013) *Food wastage footprint: Impact on natural resources: Summary report*. ISBN 978-92-5-107752-8.
- Ferry JG (2002) *Methanogenesis Chemistry*. Encyclopedia of Life Science, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.
- FNR (2005) *Basisdaten Biogas Deutschland – Stand März 2005*. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow.
- FNR (2013) *Basisdaten Bioenergie Deutschland – Stand August 2013*. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow.

- Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P Jr (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, 42, 1, 166-170.
- Fuchs G (Hg.), Eitinger T, Heider J, Kemper B, Kothe E, Schink, B, Schneider, E, Uden, G (2007) *Allgemeine Mikrobiologie*. 8. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ganidi N, Tyrrel S, Cartmell E (2009) Anaerobic digestion foaming causes-a review. *Bioresource Technology*, 100, 23, 5546–5554.
- Ganidi N, Tyrrel S, Cartmell E (2011) The effect of organic loading rate on foam initiation during mesophilic anaerobic digestion of municipal wastewater sludge. *Bioresource Technology*, 102, 12, 6637–6643.
- Gerardi MH (2003) *The Microbiology of Anaerobic digesters*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Gujer W, Zehnder A (1983) Conversion processes in anaerobic digestion, *Water Science and Technology*, 15, 342-354.
- Hanreich A, Schimpf U, Zakrzewski M, Schlüter A, Benndorf D, Heyer R, Rapp E, Pühler A, Reichl U, Klocke M (2013) Metagenome and metaproteome analyses of microbial communities in mesophilic biogas-producing anaerobic batch fermentations indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 5, 330-338.
- Harper S, Pohland F (1986) Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 585-602.
- Hartmann H, Ahring B (2005) Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of codigestion with manure. *Water Research*, 39, 1543-1552.
- Heinzmann B, Engel G (2006) Two-Stage High Rate Digestion and Phosphorus Recovery. *Proceedings of the IWA Specialist Conference – Sustainable Sludge Management: State of the Art, Challenges and Perspectives*. Moscow, Russia, 435-441.
- Jäkel K (2003) Managementunterlage “Landwirtschaftliche Biogaserzeugung und -verwertung”, Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft.
- Jaenicke S, Ander C, Bekel T, Bisdorf R, Dröge M, Gartemann KH, Jünemann S, Kaiser O, Krause L, Tille F, Zakrzewski M, Pühler A, Schlüter A, Goesmann A (2011) Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS One*, 6, 1, e14519.
- Jetten MSM., Stams AJM, Zehnder AJB (1992) Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngenii* and *Methanosarcina* spp.. *FEMS Microbiology Reviews*, 88, 181–197.

- Jon McIlroy S, Kristiansen R, Albertsen M, Michael Karst S, Rossetti S, Lund Nielsen J, Tandoi V, James Seviour R, Nielsen PH (2013) Metabolic model for the filamentous 'Candidatus *Microthrix parvicella*' based on genomic and metagenomic analyses. *ISME Journal*, 7, 6, 1161-1172.
- Kämpfer P, Weißenfels WD (2001) *Biologische Behandlung organischer Abfälle*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kaetzke A, Jentsch D, Eschrich K (2005) Quantification of *Microthrix parvicella* in activated sludge bacterial communities by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 207–211
- Kleyböcker A, Liebrich M, Kasina M, Kraume M, Wittmaier M, Würdemann H (2012a) Comparison of different procedures to stabilize biogas formation after process failure in a thermophilic waste digestion system: influence of aggregate formation on process stability. *Waste Management*, 32, 6, 1122–1130.
- Kleyböcker A, Liebrich M, Verstraete W, Kraume M, Würdemann H (2012b) Early warning indicators for process failure due to organic overloading by rapeseed oil in one-stage continuously stirred tank reactor, sewage sludge and waste digesters. *Bioresource Technology*, 123, 534–541.
- Kleyböcker A (2012c) *Entwicklung neuer Verfahren der Prozessstörung in Co-Vergärungsanlagen der Abfallwirtschaft*. 1-136, TU Berlin Fakultät III – Prozesswissenschaften, Thesis/Dissertation.
- Klocke M, Mähnert P, Mundt K, Souidi K, Linke B (2007) Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Systematic and Applied Microbiology*, 30, 2, 139-151.
- Kragelund C, Levantesi C, Borger A, Thelen K, Eikelboom D, Tandoi V, Kong Y, van der Waarde J, Krooneman J, Rossetti S, Thomsen TR, Nielsen PH (2006) Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 3, 671–682.
- Kumari SKS, Marrengane Z, Bux F (2009) Application of quantitative RT-PCR to determine the distribution of *Microthrix parvicella* in full-scale activated sludge treatment systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 1135-1141.
- Lerm S, Kleyböcker A, Miethling-Graff R, Alawi M, Kasina M, Liebrich M, Würdemann H (2012) Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload. *Waste Management*, 32, 3, 389-399.

- Levén L, Eriksson AR, Schnürer A (2007) Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 3, 683–693.
- Liu Y, Whitman WB (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Science*, 1125, 171-189.
- Mamais D, Nikitopoulos G, Andronikou A, Noutsopoulos C, Giotakis C, Tsimarakis S (2006) Influence of the presence of long chain fatty acids (LCFAs) in the sewage on the growth of *Microthrix parvicella* in activated sludge wastewater treatment plants. *Global NEST Journal*, 8, 82–88.
- Marneri M, Mamais D, Koutsiouki E (2009) *Microthrix parvicella* and *Gordona amarae* in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion systems. *Environmental Technology*, 14, 30, 437-444.
- Martins A, Pagilla K, Heijnen J, van Loosdrecht M (2004) Filamentous bulking sludge-a critical review. *Water Research*, 38, 4, 793–817.
- Massé DI, Masse L, Xia Y, Gilbert Y (2009) Potential of low-temperature anaerobic digestion to address current environmental concerns on swine production. *Journal of Animal Science*, 88, 112-120.
- McKeown RM, Scully C, Enright AM, Chinalia FA, Lee C, Mahony T, Collins G, O'Flaherty V (2009) Psychrophilic methanogenic community development during long-term cultivation of anaerobic granular biofilms. *ISME Journal*, 3, 11, 1231-1242.
- Moeller L, Goersch K, Neuhaus J, Zehnsdorf A, Mueller RA (2012) Comparative review of foam formation in biogas plants and ruminant bloat. *Energy Sustainability and Society*, 2, 12.
- Mösche M, Jördening HJ (1999) Comparison of different models of substrate and product inhibition in anaerobic digestion. *Water Research*, 33, 2545-2554.
- Mudhoo A, Kumar S (2013) Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10, 1383–1398.
- Mudrack K, Kunst S (2003) *Biologie der Abwasserreinigung*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Muller EEL, Pinel N, Gillice JD, Schupp JM, Price LB, Engelthaler DM, Levantesi C, Tandoi V, Luong K, Baliga NS, Korlach J, Keim PS, Wilmes P (2012) Genome Sequence of “*Candidatus* *Microthrix parvicella*” Bio17-1, a Long-Chain-Fatty-Acid-Accumulating Filamentous Actinobacterium from a Biological Wastewater Treatment Plant. *Journal of Bacteriology*, 194, 6670-6671.

- Munk K (Hg.), Dersch P, Eikmanns B, Eikmanns M, Fischer R, Jahn D, Jahn M, Nethe-Jaenchen R, Requena N, Schultze B (2008) Taschenlehrbuch Biologie: Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695–700.
- Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127-141.
- Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 13, 9, 3131–3145.
- Nielsen PH, Roslev P, Dueholm T, Nielsen JL (2002) *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic – aerobic activated sludge plants. *Water Science and Technology*, 46, 73–80.
- Pagilla KR, Craney KC, Kido WH (1997) Causes and effects of foaming in anaerobic sludge digesters. *Water Science and Technology*, 36, 6–7, 463–470.
- Parawira W, Read JS, Mattiassona B, Björnssona L (2008) Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 32, 44-50.
- Pender S, Toomey M, Carton M, Eardly D, Patching J, Colleran E, O’Flaherty V (2004) Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors, *Water Research*, 38, 619-630.
- Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1, 10. Jahrgang.
- Rademacher A, Zakrzewski M, Schlüter A, Schönberg M, Szczepanowski R, Goesmann A, Pühler A, Klocke M (2011) Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 3, 785-799.
- Rademacher A, Nolte C, Schönberg M, Klocke M (2012) Temperature increases from 55 to 75 °C in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within the bacterial and archaeal community structure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 2, 565-576.

- Regueiro L, Veiga P, Figueroa M, Alonso-Gutierrez J, Stams AJ, Lema JM, Carballa M (2012) Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiological Research*, 167, 10, 581-589.
- Rieger C, Weiland P (2006) Prozesstörungen frühzeitig erkennen, *Biogas Journal*, 4, 18-20.
- Rossetti S, Tomei MC, Nielsen PH, Tandoi V (2005) '*Microthrix parvicella*', a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 49–64.
- Sawayama S, Tada C, Tsukahara K, Yagishita T (2004) Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97, 1, 65-70.
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiological and Molecular Biology Reviews*, 61, 262-280.
- Schnürer A, Zellner G, Svensson BH (1999) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, 3, 249–261.
- Slijkhuis H, Deinema MH (1982) The physiology of *Microthrix parvicella*, a filamentous organism isolated from activated sludge In: *Bulking in Activated Sludge: Preventatives and Remedial Methods* (Chambers, B. and Tomlinson, E.J., Eds.), 75–83, Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- Slijkhuis H, Deinema MH (1988) Effect of environmental conditions on the occurrence of *Microthrix parvicella* in activated sludge. *Water Research*, 22, 825–828.
- Smith CJ, Osborn AM (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 1, 6-20.
- Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44, 4, 846-849.
- Stams AJM, Plugge CM (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nature Reviews*, 7, 568-577.
- Stroot P, McMahon K, Mackie R, Raskin L (2001) Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions – I. Digester performance. *Water Research*, 35, 7, 1804–1816.
- Sousa DZ, Pereira MA, Smidt H, Stams AJM, Alves MM (2007a) Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 2, 252–65.
- Sousa DZ, Smidt H, Alves MM, Stams AJ (2007b) *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long-chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium*

- formicicum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57, 609-615.
- Sousa DZ, Pereira MA, Alves JI, Smidt H, Stams AJM, Alves MM (2009) Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. FEMS Microbiology Ecology, 68, 257-272.
- Tandoi V, Rossetti S, Blackall LL, Majone M (1998) Some physiological properties of an Italian isolate of “*Microthrix parvicella*”. Water Science and Technology, 37, 1–8.
- Umweltbundesamt (2010) Antibiotika in Biogasanlagen: Abbauverhalten und Einfluss auf die Biogasproduktion. Report REP-0287, Wien.
- Vieitez ER, Gosh S (1999) Biogasification of solid wastes by two-phase anaerobic fermentation. Biomass and Bioenergy 16, 299-309.
- Wang Q, Kuninobu M, Ogawa HI, Kato Y (1999) Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. Biomass and Bioenergy, 16, 6, 407-416.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology, 73, 16, 5261–5267.
- Weiland P (2010) Biogas production: Current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 85, 849-860.
- Westerholm M, Dolfing J, Sherry A, Gray ND, Head IM, Schnürer A (2011) Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. Environmental Microbiology Reports, 3, 4, 500-505.
- Westlund AB, Hagland E, Rothman M (1998) Foaming in anaerobic digesters caused by *Microthrix parvicella*. Water Science and Technology, 37, 4-5, 51-55.
- Wirth R, Kovács E, Maróti G, Bagi Z, Rákhely G, Kovács KL (2012) Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. Biotechnology for Biofuels, 5, 41.
- Wittebolle L, Vervaeren H, Verstraete W, Boon N (2008) Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. Applied and Environmental Microbiology, 74, 1, 286–293.
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 51, 2, 221-71.
- Zheng D, Raskin L (2000) Quantification of Methanosaeta Species in Anaerobic Bioreactors using Genus- and Species-Specific Hybridization Probes. Microbial Ecology, 39, 246-262.

8. Veröffentlichungen

8.1 Application of an early warning indicator and CaO to maximize the time-space-yield of an completely mixed waste digester using rape seed oil as co-substrate

Erste Veröffentlichung: Erschienen 2014 in Waste Management, 34, 3, 661-668.
doi:10.1016/j.wasman.2013.11.011

Autoren: Anne Kleyböcker¹, Tobias Lienen¹, Marietta Liebrich¹, Monika Kasina^{1 2}, Matthias Kraume³, Hilke Würdemann¹

¹Helmholtz Centre Potsdam GFZ German Research Centre for Geosciences, Telegrafenberg, 14473 Potsdam, Germany

²Institute of Geological Science, Jagiellonian University, 30-063 Krakow, Poland

³Technische Universität Berlin, Chemical and Process Engineering, 10623 Berlin, Germany

Abstract

In order to increase the organic loading rate (OLR) an early warning indicator (EWI-VFA/Ca) was applied in a laboratory-scale biogas digester to control process stability and to steer additive addition. As soon as the EWI-VFA/Ca indicated the change from stable to instable process conditions, calcium oxide was charged as a countermeasure to raise the pH and to bind long-chain fatty acids (LCFAs) by formation of aggregates. An interval of eight days between two increases of the OLR, which corresponded to 38% of one hydraulic residence time (HRT), was sufficient for process adaptation. An OLR increase by a factor of three within six weeks was successfully used for biogas production. The OLR was increased to 9.5 kg volatile solids (VS) m⁻³ d⁻¹ with up to 87% of fat. The high loading rates affected neither the microbial community negatively nor the biogas production process. Despite the increase of the organic load to high rates, methane production yielded almost its optimum, amounting to 0.9 m³ (kg VS)⁻¹. Beneath several uncharacterized members of the phylum *Firmicutes* mostly belonging to the family *Clostridiaceae*, a *Syntrophomonas*-like organism was identified that is known to live in a syntrophic relationship to methanogenic archaea. Within the methanogenic group, microorganisms affiliated to *Methanosarcina*, *Methanoculleus* and *Methanobacterium* dominated the community.

Keywords

Biogas, early warning indicator, high organic loading rates, genetic fingerprinting, microbial community

Abbreviations

CaO, calcium oxide; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; GC, gas chromatography; HRT, hydraulic residence time; IC, ion chromatography; LCFAs, long chain fatty acids; OLR, organic loading rate; PAOs, phosphorus accumulating organisms; PCR, polymerase chain reaction; SCFAs, short chain fatty acids; SEM, scanning electron microscopy; TS, total solids; VFAs, volatile fatty acids; VS, volatile solids; WWTP, wastewater treatment plant.

Introduction

Due to global warming and climate protection, finding a sustainable energy supply is necessary. One flexible and decentralized renewable energy source is biomass, especially organic residue and waste which can be converted into biogas.

Within the biogas formation process complex organic matter is degraded to methane and carbon dioxide (Schink, 1994; Deublein *et al.*, 2008). The process is defined by four phases: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis. The first three phases are carried out by hydrolytic and fermentative bacteria, while the methanogenesis is performed by archaea.

The biogas production depends on a large number of interactive factors, and many aspects are only incompletely understood, despite decades of research. In consequence, full-scale biogas reactors are still operated as “black boxes”. In order to prevent process failures, waste digesters (continuously stirred tank reactor [CSTR]) are operated at low organic loading rates (OLR) between 1 and 4.5 kg VS m⁻³ d⁻¹ (von Felde *et al.*, 2005; DWA, 2009; Hartmann and Ahring, 2005; Janke, 2008; Röske and Uhlmann, 2005; ATV-DVWK, 2002; Jäkel, 2003; FNR-BMELV, 2005). In consequence, full-scale digesters are usually not run at their maximal OLR, taking a loss in capacity utilization to prevent process failures such as over-acidification. Process failures can be caused by different inhibitors such as sulfides, ammonia, heavy metals, and high (> 0.1 mbar) hydrogen partial pressure (Pender *et al.*, 2004; Braun *et al.*, 1981; Karakashev *et al.*, 2005; Harper and Pohland, 1986). Various parameters such as VOA/TIC (volatile organic acids/total inorganic carbonate buffer) value, redox potential, concentration of fatty acids, and hydrogen partial pressure have been investigated in terms of their suitability as an early warning indicator for over-acidifications (Allmann, 2007; Boe, 2006; Chynoweth *et al.*, 1994; Pind *et al.*, 2003; Prechtel *et al.*, 2006; Rieger *et al.*, 2006). However, the indication of a process failure was usually too late to stabilize the process efficiently (Schüsseler, 2008). The profitability decreases dramatically during a process failure due to the lack of biogas production. Furthermore, greenhouse gas emissions increase while the substrate is not digested completely, and methane and ammonia emissions rise if the incomplete fermented sludge is used by farmers as fertilizer.

In previous studies of Kleyböcker *et al.* (2012a), an early warning indicator, calculated from the relation of the volatile fatty acid (VFA) concentration to the calcium (Ca) concentration (EWI-VFA/Ca), was developed to warn several days before an over-acidification occurs. Additionally, the additive calcium oxide (CaO) was proven to stabilize the biogas production process and the reactor performance after an over-acidification (Kleyböcker *et al.*, 2012b).

The formation of aggregates consisting of calcium and long-chain fatty acids (LCFAs) was observed during the de-acidification process and these aggregates contributed to the de-acidification by binding additional acids at their surfaces. The aggregates provided structures for microbial growth with optimal living conditions promoting the process stabilization. Furthermore, due to higher concentrations of VFA in the digester, phosphorus accumulating organisms (PAOs) took up fatty acids and released phosphate.

The aim of the study presented in this paper was to apply the EWI-VFA/Ca in combination with the addition of CaO to run a laboratory-scale biogas digester at high OLRs. Furthermore, the microbial community composition was monitored during the experiment to investigate effects of the OLR increase and the additive addition.

Material and methods

The EWI-VFA/Ca was monitored to control the process performance and to steer the additive dosage in order to maximize the time-space-yield. Depending on the trend of the EWI-VFA/Ca, CaO was used as a countermeasure to prevent over-acidification of the biogas formation process.

Laboratory-scale biogas digester

The laboratory-scale experiment was conducted according to Kleyböcker *et al.* (2012b) and was run for 41 days. The reactor contained 23 L of sludge. It was regulated at 50°C by a thermostat (Thermo Haake B7, Phoenix II) connected to a heating pipe which was placed around the reactor. The sludge was mixed pneumatically using biogas with a flow of 150 L h⁻¹ each day for 15 min before the samples were taken and 15 min after the substrate was introduced. For the biogas recirculation a KNF N86KTE membrane vacuum pump was used. The substrates were sewage sludge (TS ~38 g L⁻¹, VS ~27.5 g L⁻¹, pH 5.8) and rape seed oil, which were charged manually every day. Rape seed oil was chosen as co-substrate due to its degradability to LCFAs which are frequently found in real wastewaters (Komatsu *et al.*, 1991). The OLR was increased from 3.2 kg VS m⁻³ d⁻¹ at day 0 stepwise to 9.5 kg VS m⁻³ d⁻¹ at day 38 (Table 1). While the amount of rape seed oil varied widely (45-190 g d⁻¹), the sewage sludge ranged between 1.0 and 1.2 kg VS m⁻³ d⁻¹. Accordingly, the fat fraction of the daily substrate comprised a range between 44% and 87% VS. The EWI-VFA/Ca calculated by the relation of VFA to calcium concentration (Kleyböcker *et al.*, 2012a) was applied to control the process performance during the increase of the OLR. Every time the EWI-VFA/Ca indicated an imminent over-acidification, 439 mg CaO L⁻¹ d⁻¹ was added to stabilize the

process. The hydraulic residence time (HRT) was counted between 20 and 23 days depending on the OLR. The produced biogas was measured with a Ritter gas meter (TG05/5).

For the analyses of the digested sludge, the samples were withdrawn at the outlet of the reactor. The biogas samples were taken at a bypass of the gas pipe between the gas outlet and gas wash bottle, which was located before the gas meter.

Table 1: Feeding and OLR increase during experimental time.

Time [d]	Sewage sludge [g VS d ⁻¹]	Rape seed oil [g VS d ⁻¹]	OLR [kg VS m ⁻³ d ⁻¹]
0	27.5	45	3.2
1	27.5	65	4.1
4	27.5	85	4.9
6	27.5	105	5.8
12	27.5	125	6.7
20	27.5	145	7.6
31	27.5	165	8.4
36	27.5	185	9.3
38	27.5	190	9.5

Wet chemical and gas analyses

Chemical and gas analyses were conducted according to Kleyböcker *et al.* (2012a). Temperature and pH of the digested sludge samples were measured by WTW pH 340i using a Sen Tix 41 pH electrode. For the total solids (TS) and the volatile solids (VS) the samples were dried at 105°C in a Memmert drying chamber for 24 h and later on burned at 550°C (Nabertherm Controller B170). The weight of the samples was determined by a Sartorius CP220S-OCE balance. The TS and VS were analyzed according to the German guideline DIN 38409-1. Total VFA (LCK 365), phosphate (LCK 350), and calcium (LCK 327) were determined photometrically (Hach-Lange DR2800) after the samples had been centrifuged twice at 10,000 rpm for 10 min (Eppendorf Centrifuge 5804). After the first centrifugation, pellets were transferred to 1.5 ml Eppendorf tubes and stored at -20°C for DNA extraction. The short chain fatty acids (SCFA) were determined by ion chromatography (DIONEX ICS 3000). The eluent was sodium hydroxide and the IC was equipped with an AS11-HC column. The LCFAs were estimated by the difference of the calculated sum of SCFA (IC) and the sum of VFA (Hach-Lange). The gas composition was analyzed by gas chromatography (GC) (SRI 8610C; SRI Instruments). The GC was equipped with a silica gel column and a 13X mole

sieve column. The carrier gas was argon. The measured gas components were hydrogen, oxygen, nitrogen, methane, and carbon dioxide.

DNA extraction and PCR-DGGE analysis

From 350 mg of the pellets full genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted using a commercial DNA isolation kit according to the manufacturer's instructions (MP Fast DNA Spin Kit for Soil). Additionally, DNA was isolated using a modified protocol according to Rohland and Hofreiter (2007).

To compare the diversity in the microbial community, the partial 16S rRNA genes of bacteria, PAOs and methanogenic archaea were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer pair 341F-GC/907R (Muyzer *et al.*, 1993; Amann *et al.*, 1992) for the bacteria (94°C 2:45 min, 94°C 0:45 min, 56°C 0:45 min, 72°C 0:50 min, 72°C 30 min, 40 cycles), the primer pair 462F-GC/846R (Crocetti *et al.*, 2000) for the PAO (94°C 2:45 min, 94°C 0:45 min, 56°C 0:45 min, 72°C 0:50 min, 72°C 30 min, 40 cycles), and the primer pair 348F-GC/786R for the methanogens (94°C 2:45 min, 94°C 0:45 min, 56°C 0:45 min, 72°C 0:50 min, 72°C 10 min, 40 cycles). The PAO primer pair was specific for the order *Rhodocyclales*. 50 µl reactions were mixed containing 5 µl 10x buffer (Genecraft), 6 µl dNTPs (10 mM, Fermentas), 3 µl MgCl₂ (50 mM, Genecraft), 3 µl forward primer (10 mM), 3 µl reverse primer (10 mM), 0.4 µl BSA (20 mg/ml, Fermentas), 0.3 µl Taq polymerase (5 u/µl, Genecraft), 28.3 µl RNA/DNA-free water (Fermentas), and 1 µl template. Amplicons were purified subsequently (Fermentas GeneJET PCR Purification Kit). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was performed afterwards with equal DNA concentrations of amplicons and a gradient of 35% to 65% urea and 6% to 9% acrylamid for bacteria and PAO and 40% to 60% urea and 6% to 9% acrylamid for the methanogenic archaea using the Biorad DCode System. The DGGE gel was run for 17 hours at 110 V and 60°C. The gels were silver stained and the gel bands were excised and reamplified using the primer pair 341F/907R (94°C 1:30 min, 94°C 0:30 min, 56°C 0:30 min, 72°C 0:30 min, 72°C 10 min, 30 cycles), 462F/846R and 348F/786R (94°C 1:30 min, 94°C 0:30 min, 56°C 0:30 min, 72°C 0:30 min, 72°C 10 min, 30 cycles). PCR products were cleaned up using the Fermentas GeneJET PCR Purification Kit. Amplicon DNA concentrations were measured fluorimetrically (BMG Labtech FLUOstar OPTIMA). PCR Products were sent in and sequenced by GATC Biotech AG. Sequences homologies were checked by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Results

Increase and optimization of the space-time yield of a biogas reactor using the EWI-VFA/Ca

While the OLR was increased from $3.2 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ at day 0 stepwise to $9.5 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ at day 38, every increase of OLR was accompanied by an increase of EWI-VFA/Ca (Figure 1). As soon as the EWI-VFA/Ca amounted to the two- to three-fold value referring to normal operation conditions at low OLRs, CaO was dosed as a countermeasure.

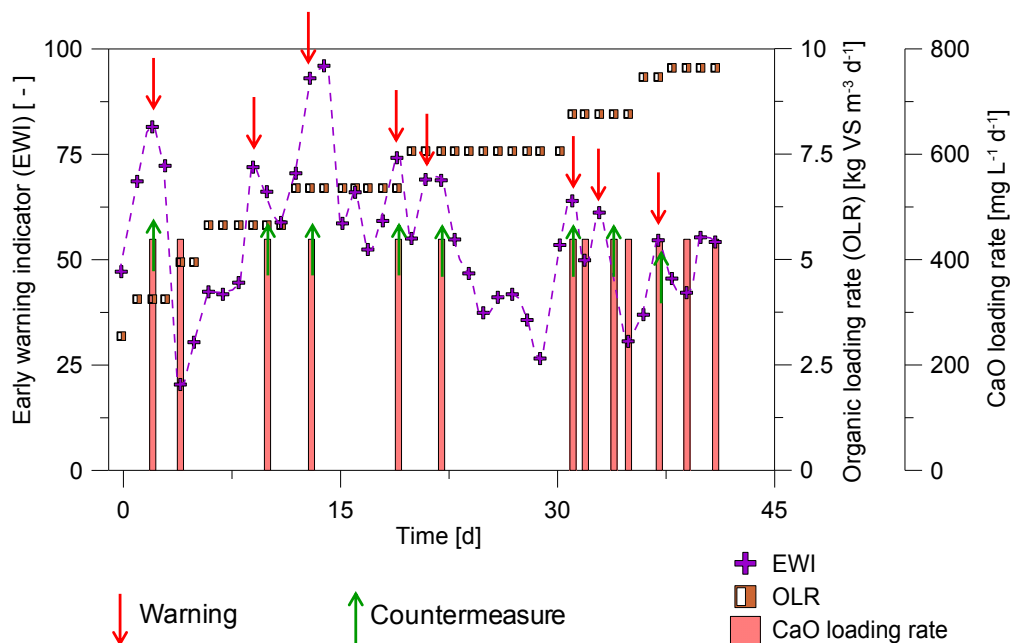


Figure 1: Trend of the EWI-VFA/CA due to the increased OLR and the addition of CaO depending on the trend of the EWI-VFA/CA.

The methane yield ranged between 0.58 and $0.88 \text{ m}^3 (\text{kg VS})^{-1}$ depending on the interval between two OLRs increments and the added amount of CaO (Figure 2). On average, the methane yield was 17% less than its expected value for high OLRs such as $6.7 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and above. At an OLR of $9.5 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ and after the addition of CaO, the methane yield increased to $0.88 \text{ m}^3 (\text{kg VS})^{-1}$ which corresponded to 94% of its expected value. The interval between two OLR rises amounted on average to 7.6 d which corresponded to 38% of the HRT. At low OLRs, such as less than $5 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, the averaged interval between two rises was only 2.5 d. Due to the addition of CaO, the pH was kept neutral. The sum of VFAs usually ranged between 700 mg L^{-1} and 900 mg L^{-1} during the experiment, but on day 13 the

VFA concentration reached $1,180 \text{ mg L}^{-1}$. After the further addition of CaO, the sum of VFAs decreased immediately.

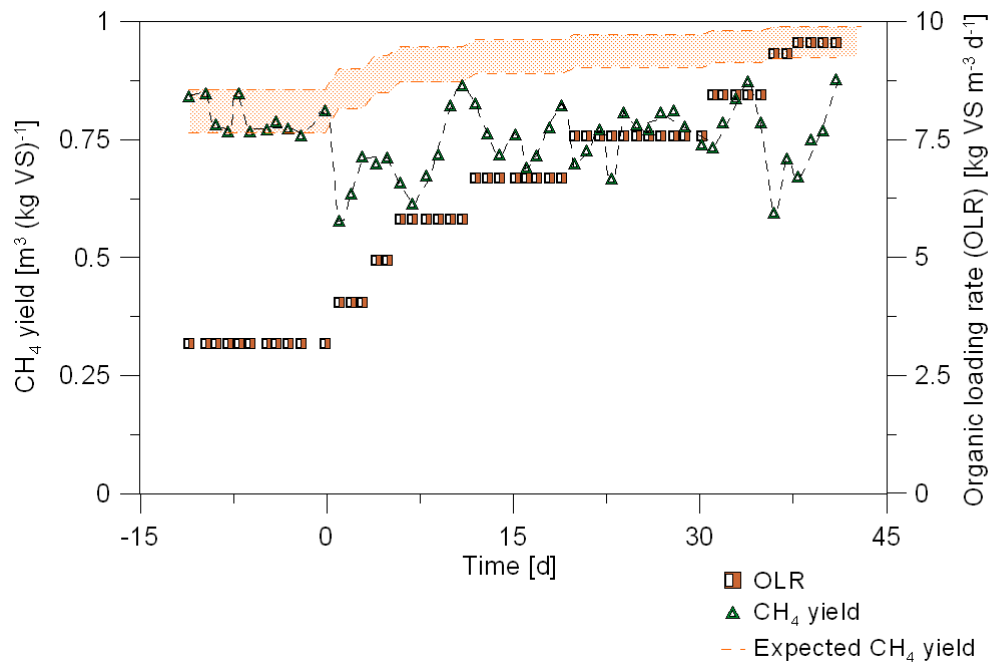


Figure 2: Trend of the methane yield compared to the expected methane yield.

The acetic acid concentration ranged between 130 mg L^{-1} and 450 mg L^{-1} , while the propionic acid did not exceed 190 mg L^{-1} . Butyric acid, iso-butyric acid, and valeric acid remained below 40 mg L^{-1} , 180 mg L^{-1} and 17 mg L^{-1} , respectively. The hydrogen partial pressure was between 0.09 and 0.51 mbar which is in the range to allow for the degradation of butyric acid, but it was actually too high to allow for the degradation of propionic acid referring to standard conditions (Figure 3). Even though the CaO charge was increased from day 31 on, the calcium concentration in the liquid phase did not increase and varied between 15 and 30 mg L^{-1} during the course of the experiment. The phosphate concentration was around 300 mg L^{-1} until day 31 and then decreased to a level around 200 mg L^{-1} within 3 days where it remained until the end of the experiment (Figure 4).

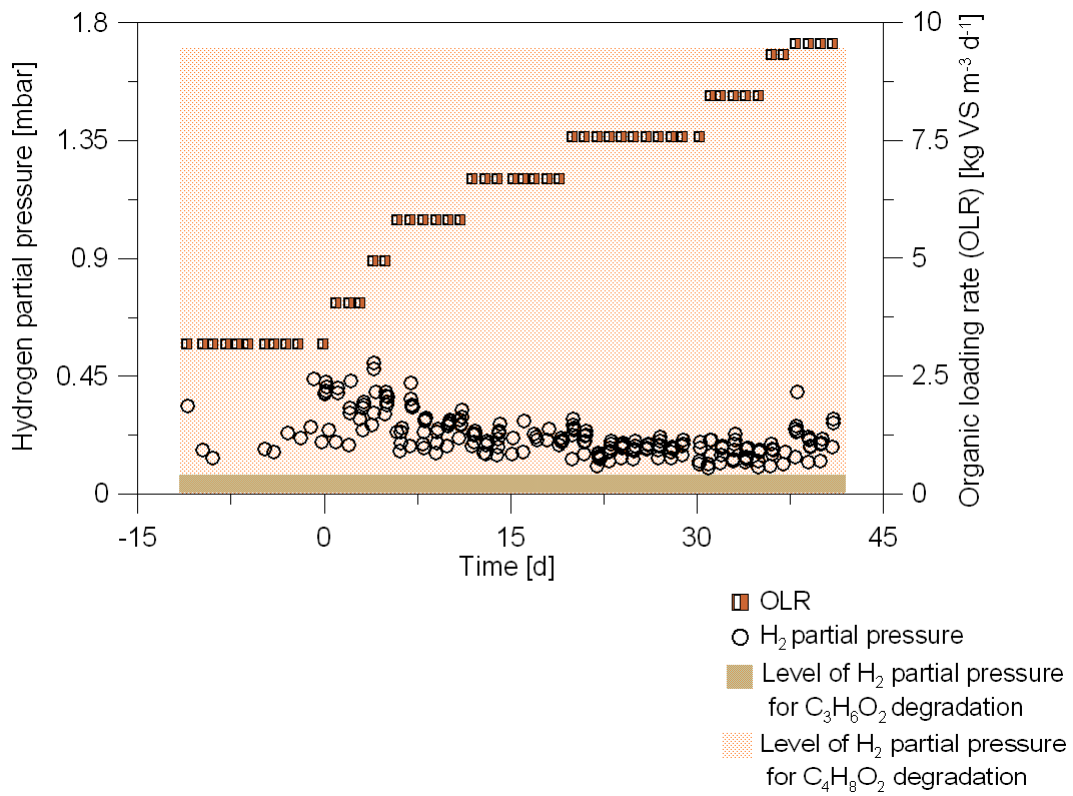


Figure 3: Hydrogen partial pressure and organic loading rate in the course of the experiment.

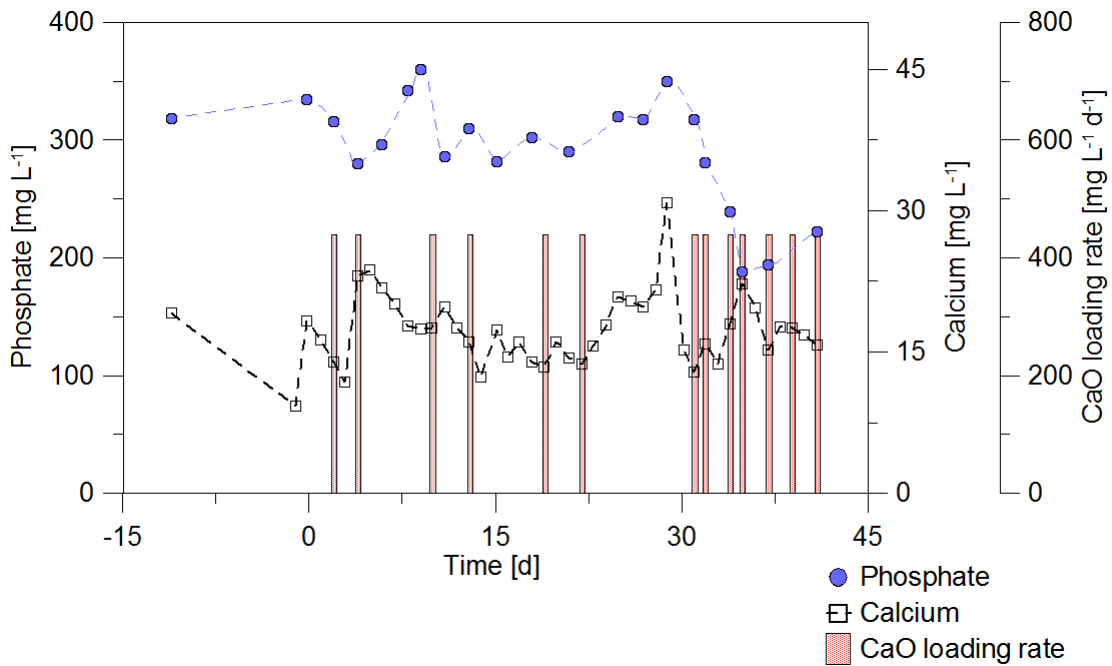


Figure 4: Phosphate and calcium concentrations in comparison to CaO additions.

Aggregate formation during the increase in OLR

After the addition of CaO, irregular shaped aggregates in the size of up to 1 mm were formed. Scanning electron microscopy (SEM-EDS) analyses according to Kasina *et al.* (in prep.) revealed layered structures. The layers differed in the compactness from very dense in the inner part to less compact in the outer part. The surface of the aggregates was homogenous, composed of carbon and calcium, with attached rod-shaped microorganisms. In the inner part rolled, prismatic “crystals” composed of carbon and calcium were noted as well as wall-like biofilms (Figure 5).

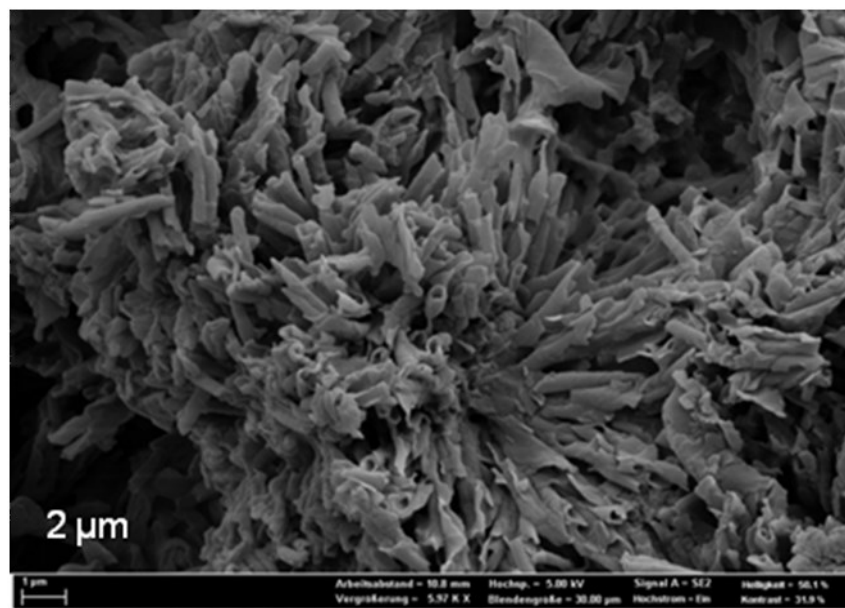


Figure 5: SEM-EDS analyses of inner part of aggregates. Detection of rosette-like crystals with rolled plates consisting of calcium and organic carbon probably originating from LCFA.

Inorganic components such as silicates, carbonates, and phosphates were also detected. However, their content was quantitatively much lower in comparison to the organic material. Carbonates were represented by calcite or aragonite. Iron, aluminium, magnesium, and calcium phosphate minerals with prismatic or rounded crystals or plates were present as well (Figure 6). SEM analysis showed elongated, rod-shaped and rounded microorganisms covered by extracellular polymeric substances (EPS) in the inner part of the aggregates as well as large filamentous structures.

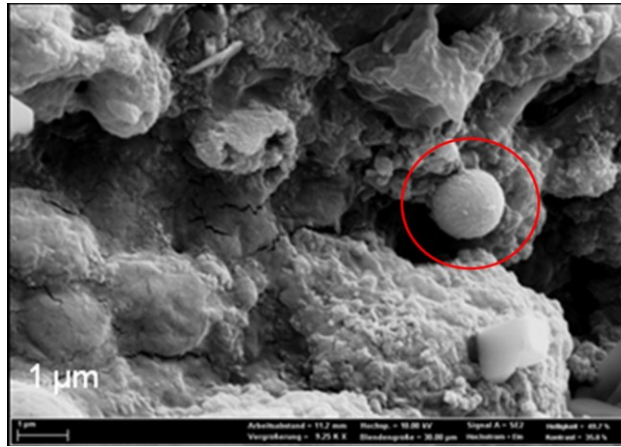


Figure 6: SEM-EDS analyses of the aggregates. Detection of rounded crystal of Ca-phosphate present in the circled area.

Microbial community composition during the increase in OLR

The bacterial community composition was dominated by few organisms indicated by strong band intensities in the genetic fingerprinting (Figure 7). The identified sequences were all affiliated to bacteria of the phylum *Firmicutes* (Table 2).

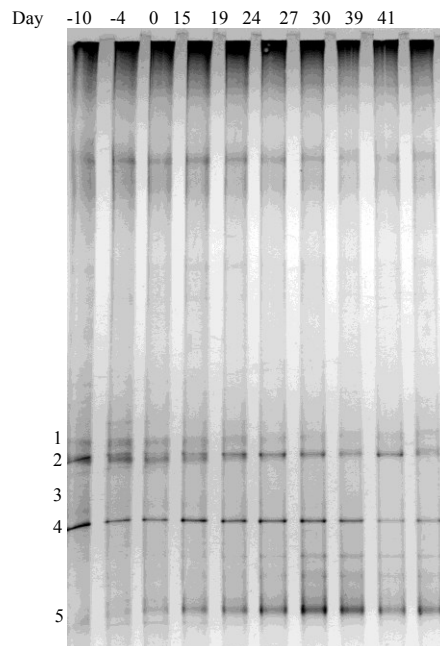


Figure 7: Comparative DGGE-analysis of bacterial 16S rRNA gene fragments DNA from sludge samples taken on several days during the increase in OLR. Numbered bands were sequenced. The band intensity of a *Syntrophomonas*-assigned organism (band 5) increased with higher loading rates.

A *Syntrophomonas*-like organism was present throughout the complete experiment. The associated band intensified with increasing the OLR to 7.6 kg VS m⁻³ d⁻¹ and afterward the band intensity remained consistent when the OLR was further increased to 9.5 kg VS m⁻³ d⁻¹. Additionally, three sequences were detected with *Rhodocyclales*-specific primers (Table 2). While closest relatives of *Dechloromonas* and a *Rhodocyclales* bacterium dominated the PAO community indicated by strong band intensities, the abundance of an *Accumulibacter*-like organism was minor (data not shown). Among the methanogenic archaea, acetoclastic as well as hydrogenotrophic organisms were identified (Table 2).

Table 2: Partial 16S rRNA gene sequences retrieved from DGGE genetic fingerprints and sequencing of excised bands. Closest relatives are shown according to Genbank accession number reference.

Band ID	Closest relatives	Phylum	Genbank accession number	Similarity
1	<i>Clostridiales</i> bacterium	<i>Firmicutes</i>	JF808025.1	93%
2	<i>Clostridiaceae</i> bacterium	<i>Firmicutes</i>	KC594798.1	90%
3	<i>Clostridium</i> sp.	<i>Firmicutes</i>	AB093546.1	97%
4	<i>Clostridiaceae</i> bacterium	<i>Firmicutes</i>	FJ805840.2	91%
5	<i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i>	<i>Firmicutes</i>	NR_074750.1	96%
Not shown	Candidatus <i>Accumulibacter phosphatis</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	CP001715.1	96%
Not shown	<i>Dechloromonas</i> sp.	<i>Betaproteobacteria</i>	DQ413167.1	98%
Not shown	<i>Rhodocyclales</i> bacterium	<i>Betaproteobacteria</i>	EF636146.1	96%
6	<i>Methanosarcina thermophila</i>	<i>Euryarchaeota</i>	JQ346758.1	100%
7	<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>Euryarchaeota</i>	JN205061.1	100%
8	<i>Methanoculleus</i> sp.	<i>Euryarchaeota</i>	GQ872113.1	99%

A *Methanosarcina*-affiliated facultative acetoclastic organism was shown to dominate the community during the whole experiment which was indicated by strong band intensities (Figure 8). Additionally, a closest relative of the hydrogenotrophic methanogen *Methanoculleus* was consistently detected by genetic fingerprinting. Furthermore, a *Methanobacterium*-like hydrogenotrophic organism became more dominant at OLRs higher than 7.6 kg m⁻³ d⁻¹ and the strongest intensity for the *Methanobacterium*-assigned band was detected at an OLR of 9.5 kg m⁻³ d⁻¹.

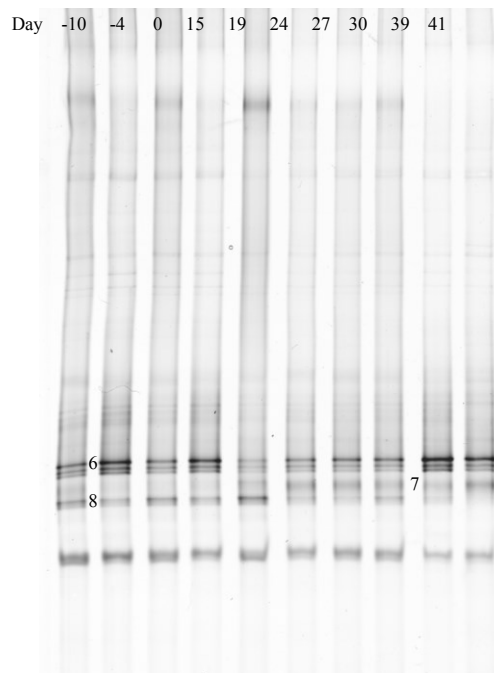


Figure 8: Comparative DGGE-analysis of methanogenic archaeal 16S rRNA gene fragments DNA from sludge samples taken on several days during the increase in OLR. Numbered bands were sequenced and identified as relatives of the genera *Methanosarcina* (band 6), *Methanobacterium* (band 7) and *Methanoculleus* (band 8).

Discussion

Although the OLR was increased by a factor of three within a short period of 38 days, the process of biogas formation was stable with VFA concentrations below 1000 mg L^{-1} and a high methane yield of $0.88 \text{ m}^3 (\text{kg VS})^{-1}$. However, the hydrogen partial pressure in the gaseous phase was actually too high to allow for the degradation of propionic acid to methane. According to Harper and Pohland (1986), the hydrogen partial pressure should remain below 0.1 mbar to allow for propionic acid degradation. Nevertheless, in our experiment, the concentration of propionic acid remained at a low level despite H_2 concentrations of 0.09 to 0.51 mbar. As already proposed in a previous study (Kleyböcker *et al.* 2012b), we assume that aggregation played an important role in terms of process stability and regulated the availability of LCFAs which precipitated and/or adsorbed on the precipitates and subsequently formed the aggregates which served as a buffer for LCFAs. LCFAs are a degradation product of rape seed oil, which was used as substrate. In low concentrations, they are already inhibitory to anaerobic microorganisms as observed by Angelidaki and Ahring, 1992 and Hwu *et al.*, 1998.

Because the concentration of propionic acid remained at a low level, we assume that within these aggregates different microhabitats existed which favoured conditions for propionic acid degradation. The positive effect of aggregation on the process stability due to formation of

interfaces and microhabitats was also discussed in other studies (Kasina *et al.*, in prep.; Kleyböcker *et al.*, 2012b; Rajeshwari *et al.*, 2000; MacLeod *et al.*, 1990; Hwu *et al.*, 1998). In the present study, the surface of the observed aggregates was characterized by SEM analysis as calcium and carbon rich. Probably, LCFAs and calcium precipitated and stimulated the aggregation. However, the methane yield was only 10% to 20% lower than expected because the aggregates were probably degraded by syntrophic consortia located on their interfaces. Among other compounds, the aggregates also contained phosphate. At high acid concentrations, PAOs are known to take up acids and simultaneously release phosphate under anaerobic conditions (Seviour *et al.*, 2003; Röske and Uhlmann, 2005). As already discussed in our previous study (Kleyböcker *et al.*, 2012b), the released phosphate also might contribute to the formation of the aggregates. This assumption is corroborated by the detection of three different sequences by the *Rhodocyclales*-specific genetic fingerprinting analysis, of which especially *Accumulibacter phosphatis* is known to be present in wastewater treatment plants (WWTP) with enhanced biological phosphorus removal (EBPR) and to take part in the acid uptake and phosphate release mechanism (Hesselmann *et al.*, 1999; Fukushima *et al.*, 2007). In contrast, relatives from the genus *Dechloromonas*, which were also detected by the *Rhodocyclales*-specific genetic fingerprinting, were indeed shown to assimilate acetate under anaerobic conditions, while phosphate accumulation under aerobic conditions was not observed (Ahn *et al.* 2007). Therefore, most likely *Accumulibacter phosphatis* and *Dechloromonas* sp. competed for acetate, but the phosphate contained in the aggregates was released only by *Accumulibacter phosphatis*.

Even when utilizing a substrate containing 87% VS of fat fraction, the methane yield accounted on average 86% of the expected value despite the high loading rate and the relatively rapid increase in the OLR to 9.5 kg VS m⁻³ d⁻¹. According to Bischofsberger *et al.* (2005), von Felde *et al.* (2005), Röske and Uhlmann (2005), Janke (2008), and DWA (2009), typical OLRs for completely mixed digesters range between 1 and 4.5 kg VS m⁻³ d⁻¹. Thus, the OLR in the presented experiment was more than two times higher than the typical maximal OLR. The fat fraction of 87% VS was approximately twice as high than in the experiments of Luostarinen *et al.* (2009). Their investigations showed that the digestion of sewage sludge with grease trap sludge was on a high performance until an OLR of approximately 3.5 kg VS m⁻³ d⁻¹ and a maximal fat fraction of 46% VS. It should be noted that Luostarinen *et al.* (2009) did not use any additives. Davidsson and Loevstedt (2008) also investigated co-fermentation of sewage sludge with grease trap sludge without using additives. The OLR was much lower with 2.5 kg VS m⁻³ d⁻¹ than the OLR in the presented experiment, while the fat fraction was only between 10% and 30% VS. Despite the lower

OLR, the methane yield was 10% to 30% below its expected value. It should be noted that the hydraulic residence time was 13 days in the experiments of Davidsson and Loevstedt (2008). According to Angelidaki and Ahring (1992) and Luostarinen *et al.* (2009), the complete degradation process of fat lasts between 25 and 30 days. This might be the reason for the lower methane yields at low OLRs compared to our experiments, in which the hydraulic residence time was 20 days.

Ganesh *et al.* (2013) investigated the effect of increasing the OLR in solid waste co-digestion. At a maximal OLR of $7.5 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, the loss in the methane yield was 20%. In our experiment, at an OLR of $9.5 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, the methane yield still increased to 94% of its expected value. Elango and Pulikesi (2007) used NaOH as additive to adjust the pH, when increasing the OLR during co-digestion of municipal solid waste and domestic wastewater. Despite the addition of additives, the process failed due to over-acidification after the OLR was raised to $3.5 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Thus, we achieved higher OLRs and higher methane yields by the application of the EWV-VFA/Ca and the addition of CaO compared to the results of the other authors. Furthermore, the addition of CaO prevented the system against a process failure at high OLRs.

In our study, the interval between two OLR rises was on average only 38% of one HRT for high OLRs. Gallert *et al.* (2003) also conducted experiments to raise OLR from 3 to $13 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ at a full-scale biogas plant fed by biowaste suspension and applied intervals of two HRTs between two increments. Despite the longer intervals between the OLR rises, propionic acid accumulated up to $3,400 \text{ mg L}^{-1}$ and the system had to be stabilized by periodic feed stops. According to Röske and Uhlmann (2005) the state of equilibrium between acid production and consumption after OLR increase is reached at the best after 20 days and at the worst after 6 months. However, in our experiment, the state of equilibrium between acid production and acid consumption in the fluid could already be reached after one week due to the regulation of the LCFA availability by the addition of CaO.

Genetic fingerprinting with DGGE was used to observe shifts in the diversity of the biocenosis and dominance of species due to changes in the environmental conditions. The microbial community diversity did not significantly change due to the increased OLRs and the addition of CaO, members of the phylum *Firmicutes* dominated the community. Other studies already indicated their participation and dominance in the degradation of LCFAs (Sousa *et al.*, 2007a; Sousa *et al.*, 2008). Furthermore, Baserba *et al.* (2012) showed the importance of members from the phylum *Firmicutes* for the degradation of oleate. A comparison of the DGGE band intensities served as a semiquantitative approach since the DNA concentrations were set equally before separating sequences by DGGE. Particularly at

OLRs higher than $7.6 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, the abundances of *Syntrophomonas* and *Methanobacterium* affiliated organisms increased, which was indicated by stronger band intensities. Bacteria of the genus *Syntrophomonas* were shown to take part in the degradation of LCFA in which they live in close syntrophic relation to hydrogenotrophic methanogens such as *Methanobacterium formicicum* (Sousa *et al.*, 2007b) or *Methanospirillum hungatei* (Hatamoto *et al.*, 2007). As the hydrogen partial pressure was too high for propionic acid degradation, presumably, *Syntrophomonas* was at an advantage compared to other bacteria due to the hydrogen consumption of its syntrophic partner *Methanobacterium formicicum* and probably they were located in microhabitats formed by aggregation. The presence of methanogenic organisms affiliated to the genus *Methanosarcina* was detected with high band intensities over the whole OLR range. *Methanosarcina*-like organisms were already shown to dominate the methanogenic community in case of high loading rates and LCFAs concentrations (Sousa *et al.*, 2007a, 2009; Palatsi *et al.* 2010; Lerm *et al.*, 2012). *Methanosarcina* prefers high acetate concentrations and as the acetate content yielded up to 450 mg L^{-1} during the experiment, *Methanosarcina* probably outcompeted other acetoclastic methanogens such as *Methanosaeta* because of its higher growth rate (Jetten *et al.*, 1992). Beside *Methanobacterium*- and *Methanosarcina*-affiliated methanogens, a close relative of *Methanoculleus* was identified. *Methanoculleus* was recently assumed to be a major contributor in methanogenesis in swine manure storage tanks (Barret *et al.*, 2012) and anaerobic sludge digestion (Hori *et al.*, 2006). The codominance of this hydrogenotrophic methanogen in this study supports the assumption that *Methanoculleus* contributes to the methane production in anaerobic digesters even at high OLRs.

Conclusions

The EWI-VFA/Ca indicated any imbalance in process performance sufficiently early to take action in successful countermeasures, thereby allowing the stepwise increase of OLR and minimizing the risk of process failure. Calcium oxide served as an effective additive for process stabilization. The application of the EWI-VFA/Ca to control the process of biogas formation and to regulate additive dosage was shown to be an adequate procedure to maintain process stability. The precipitation of LCFAs stimulated the formation of aggregates and offered microhabitats for its efficient degradation. Despite LCFA precipitation and subsequent aggregate formation, the methane yield was only 10-20% lower than expected, indicating that decomposition of the aggregates occurred continuously. Precipitation reduced inhibitory effects of LCFAs and thereby regulated availability to allow for an efficient degradation. PAOs were present and may have supported buffering of slight imbalances

during the OLR increase by the uptake of fatty acids. The application of EWI-VFA/Ca and additive addition will help biogas plant operators to react flexibly either to the substrate availability on the market or to the requirements of energy production and supply.

Acknowledgements

Thanks to the German “Federal Ministry for the Environment, Nature and Nuclear Safety” for funding the project “Optgas” (03KB018) and to Dr. Andrea Vieth-Hillebrand and her team (Section for Organic Geochemistry at GFZ) for analyzing short chain fatty acids by ion chromatography and Sebastian Teitz for technical support.

References

- Ahn, J., Schroeder, S., Beer, M., McIlroy, S., Bayly, R.C., May, J.W., Vasiliadis, G., Seviour, R.J. (2007) Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (7), 2257-70.
- Angelidaki, I., Ahring, B., 1992. Effects of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 808-812.
- ATV-DVWK, 2002. M 363 „Herkunft, Aufbereitung und Verwertung von Biogasen“, Hennef
- Barret, M., Gagnon, N., Morissette, B., Topp, E., Kalmokoff, M., Brooks, S.P., Matias, F., Massé, D.I., Masse, L., Talbot, G., 2012. *Methanoculleus* spp. as a biomarker of methanogenic activity in swine manure storage tanks. *FEMS Microbiology Ecology* 80 (2), 427-440.
- Baserba, M. G., Angelidaki, I., Karakashev, D. (2012) Effect of continuous oleate addition on microbial communities involved in anaerobic digestion process. *Bioresource Technology* 106, 74-81
- Bischofsberger, W., Dichtl, N., Rosenwinkel, K., Seyfried, C., Böhnke, B., 2005. *Anaerobtechnik*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., Blackall, L.L., 2000. Identification of polyphosphate accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1175–1182.
- DWA, 2009. M 380 „Co-Vergärung in kommunaler Klärschlammfaulbehältern, Abfallvergärungsanlagen und landwirtschaftlichen Biogasanlagen, Hennef
- Davidsson, A., Loevstedt, C., 2008. Co-digestion of grease trap sludge and sewage sludge. *Waste Management* 28, 986-992.

- Elango, D., Pulikesi, M., 2007. Production of biogas from municipal solid waste with domestic waste sewage. *Journal of Hazardous Materials* 141, 301-304.
- FNR, BMELV (2005): Ergebnisse des Biogas-Messprogramms, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Gülzow
- Fukushima T., Uda N., Okamoto M., Onuki M., Satoh H., Mino T., 2007. Abundance of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* in Enhanced Biological Phosphorus Removal Activated Sludge Acclimatized with Different Carbon Sources. *Microbes and Environments* 22, 346-354.
- Ganesh, R., Torrijos, M., Sousbie, P., Steyer, J., Lugardon, A., Delgenes, J., 2013. Anaerobic co-digestion of solid waste: Effect of increasing organic loading rates and characterization of the solubilised organic matter. *Bioresource Technology* 130, 559-569.
- Gallert, C., Henning, A., Winter, J., 2003. Scale-up of anaerobic digestion of the biowaste fraction from domestic wastes. *Water Research* 37, 1433-1441.
- Harper, S., Pohland, F., 1986. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 28, 585-602.
- Hartmann, H., Ahring, B., 2005. Anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: Influence of codigestion with manure. *Water Research* 39, 1543-1552.
- Hatamoto, M., Imachi, H., Fukayo, S., Ohashi, A., Harada, H. (2007) *Syntrophomonas palmitatica* sp. nov., an anaerobic, syntrophic, long-chain fatty-acid-oxidizing bacterium isolated from methanogenic sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2137-2142.
- Hesselmann, R.P., Werlen, C., Hahn, D., van der Meer, J.R., Zehnder, A.J., 1999. Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology* 22 (3):454-465.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M.Y., 2006. Dynamic Transition of a Methanogenic Population in Response to the Concentration of Volatile Fatty Acids in a Thermophilic Anaerobic Digester. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2): 1623–1630.
- Hwu, C., Tseng, S., Yuan, C., Kulik, Z., Letting, G., 1998. Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water Research* 32, 5, 1571-1579.
- Jäkel, K., 2003. Managementunterlage “Landwirtschaftliche Biogaserzeugung und -verwertung”, Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft.
- Janke, H., 2008. *Umweltbiotechnik: Grundlagen und Verfahren*, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

- Jetten, M.S.M., Stams, A.J.M., Zehnder, A.J.B., 1992. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotheroxobacter* and *Methanosarcina* spp.. FEMS Microbiology Reviews 88: 181–197.
- Kasina, M., Kleyböcker, A., Michalik, M., Liebrich, M., Würdemann, H., in prep. Fast increase of organic loading rate during co-digestion of rape seed oil and sewage sludge in a CSTR - characterization of granules formed due to CaO addition
- Kleyböcker, A., Liebrich, M., Verstraete, W., Kraume, M., Würdemann, H., 2012a. Early warning indicators for process failure due to organic overloading by rape seed oil in one-stage continuously stirred tank reactor, sewage sludge and waste digesters. Bioresource Technology 123, 534-541.
- Kleyböcker, A., Liebrich, M., Kasina, M., Kraume, M., Wittmaier, M., Würdemann, H., 2012b. Comparison of different procedures to stabilize biogas formation after process failure in a thermophilic waste digestion system: Influence of aggregate formation on process stability. Waste Management 32 (6), 1122-1130.
- Lerm, S., Kleyböcker, A., Miethling-Graff, R., Alawi, M., Kasina, M., Liebrich, M., Würdemann, H., 2012. Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload. Waste Management 32 (3), 389-399.
- Luostarinen, S., Luste, S., Sillanpää, M., 2009. Increased biogas production at wastewater treatment plants through co-digestion of sewage sludge with grease trap sludge from meat processing plant. Bioresource Technology 100, 79-85.
- MacLeod, F., Guiot, S., Costerton, J., 1990. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. Applied and Environmental Microbiology 56 (6), 1598-1607.
- Palatsi, J., Illa, J., Prenafeta-Boldú, F.X., Laureni, M., Fernandez, B., Angelidaki, I., Flotats, X. 2010. Long-chain fatty acids inhibition and adaptation process in anaerobic thermophilic digestion: batch tests, microbial community structure and mathematical modelling. Bioresource Technology 101 (7), 2243-2251.
- Rajeshwari, K., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., Kishore, V., 2000. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. Renewable and Sustainable Energy Reviews 4, 135-156.
- Röske, I., Uhlmann, D., 2005. Biologie der Wasser und Abwasserbehandlung, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
- Schüsseler, P., 2008. Zielsetzung des Fachgesprächs, Gülzower Fachgespräche, Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V., 27, 8-16.

- Seviour, R., Mino, T., Onuki, M., 2003. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 99-127.
- Sousa, D.Z., Pereira, M. A., Smidt, H., Stams, A.J.M., Alves, M.M., 2007a. Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Ecology* 60, 252–265.
- Sousa, D.Z., Smidt, H., Alves, M.M., Stams, A.J., 2007b. *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long-chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 609-615.
- Sousa, D.Z., Pereira, M.A., Alves, J.I., Smidt, H., Stams, A.J.M., Alves, M.M., 2008. Anaerobic microbial LCFA degradation in bioreactors. *Water Science and Technology* 57 (3), 439-444.
- Sousa, D.Z., Pereira, M.A., Alves, J.I., Smidt, H., Stams, A.J.M., Alves, M.M., 2009. Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Ecology* 68, 257-272.
- von Felde, D., Staske, S., Wilms, R., 2005. Co-Vergärung von Fettabscheiderrückständen in Faulbehältern kommunaler Kläranlagen, *KA – Abwasser, Abfall*. 52 (10), 1151-1156.

8.2 Floating layer formation and microbial community structure change during disruption of mixing in full-scale biogas plant

Zweite Veröffentlichung: Erschienen 2013 in *Energy, Sustainability and Society*, 3:20.
doi:10.1186/2192-0567-3-20

Autoren: Tobias Lienen¹, Anne Kleyböcker¹, Manuel Brehmer², Matthias Kraume², Lucie Moeller³, Kati Görsch³, Hilke Würdemann¹

¹Helmholtz Centre Potsdam GFZ German Research Centre for Geosciences, Telegrafenberg, 14473 Potsdam, Germany

²Technische Universität Berlin, Chemical and Process Engineering, 10623 Berlin, Germany

³UFZ Helmholtz Centre for Environmental Research, Environmental and Biotechnology Centre, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany

Abstract

Background

The use of biogas as renewable resource of energy is of growing interest. To increase the efficiency and sustainability of anaerobic biogas reactors, process failures such as overacidification, foaming, and floating layers need to be investigated to develop sufficient countermeasures and early warning systems to prevent failure.

Methods

Chemical, rheological, and molecular biological analyses were conducted to investigate a stirring disruption in a full-scale biogas plant.

Results

After the agitation system was disturbed, foaming and floating layer formation appeared in a full-scale biogas plant fed with liquid manure and biogenic waste. Rheological characterizations and computational fluid dynamics (CFD) revealed a breakdown of the circulation within the reactor and a large stagnation zone in the upper reactor volume. Molecular biological analyses of the microbial community composition in the floating layer showed no differences to the digestate. However, the microbial community in the digestates changed significantly due to the stirring disturbances. Foam formation turned out to be a consequence of overloading due to excessive substrate supply and disturbed mixing. The subsequent increase in concentration of both acetic and propionic acids was accompanied by foaming.

Conclusions

Effective mixing in full-scale biogas plants is crucial to avoid foaming and floating layers and to enhance sustainability. Disturbed mixing leads to process imbalances and significant changes in the microbial community structure. Additionally, controlled feeding might help prevent foam formation due to overloading.

Keywords

Full-scale biogas plant; Biogenic waste; Floating layer; Agitator disruption; DGGE; Foam formation

Background

Anaerobic cofermentation of biogenic wastes to produce biogas is of growing interest to generate renewable energy and to reduce greenhouse gas emissions. The production of biogas by biogenic wastes is a decentralized technology and contributes toward the renewable energy turnaround in Germany. Biogas plants are often affected by process failures such as overacidification or foam and floating layers that reduce the efficiency of plants. A breakdown of the biogas production process because of process failures leads to enormous economical loss and deteriorated sustainability (Balussou et al. 2012). Selection of suitable substrates and proper mixing are important challenges in the biogas production industry to avoid failures of the process. Feeding with profitable but unsuitable substrates may lead to serious process interruptions. An overacidification event is often caused by substrate overloading and accumulation of volatile fatty acids (VFA) (Kleyböcker et al. 2012a). Kleyböcker et al. (2012b) developed two early warning indicators in terms of overacidification. The first indicator (EWI-VFA/Ca) is characterized by the relation of VFA to Ca^{2+} and was shown to provide a warning 5 to 7 days before an overacidification appeared. The warning is indicated by a two- to threefold increase of values. The second early warning indicator (EWI- PO_4^{3-} /Ca) is characterized by the relation of PO_4^{3-} to Ca^{2+} . Moeller et al. (2012a) showed a correlation between the fed substrates as well as inadequate plant management and the formation of foam in biogas plants. Foaming can be caused by high concentrations of VFA, surface-active compounds, detergents, proteins, and high nitrogen concentrations as well as organic overloading (Moeller et al. 2012a). In contrast, the formation of floating layers is mainly triggered by inadequate mixing and feeding of fibrous substrates (Bischofsberger et al. 2005). Besides the chemical and physical characteristics of the substrates and the plant management, foam and floating layers are also promoted by growth of filamentous bacteria (Deublein and Steinhauser 2008, Martins et al. 2004). Most of the studies regarding the filamentous bacteria were done in activated sludge treatment plants and anaerobic digesters fed by sewage sludge. In these systems, mainly *Gordonia* spp. and *Microthrix parvicella* were identified as foam causers (Westlund et al. 1998, Frigon et al. 2006). Using their filamentous structure, the microorganisms trap biogas bubbles, which transfer them to the surface. The hydrophobic cell surface promotes and stabilizes the foam as well as the release of hydrophobic substances. Foaming and the formation of floating layers may cause serious damage in biogas plants (Ganidi et al. 2009). The active volume of the digester is reduced leading to an inefficient gas recovery. Furthermore, gas mixing devices may be blocked, gas pipelines may be fouled, and even the roof may be damaged by the pressure of the foam or floating layer. In addition, the economical costs of energy loss,

manpower overtime, and cleaning costs have to be taken into consideration (Barber 2005). Although several studies on foam formation in anaerobic digesters treating activated sludge were published (Westlund et al. 1998, Pagilla et al. 1997), formation of floating layers and foam in anaerobic digesters fed with biogenic waste and the impact of mixing procedures in full-scale biogas plants as well are still rarely investigated. Most importantly, information about the chemical composition and microbial community structure of the floating layer is lacking due to the difficulties of sample collection in full-scale digesters. The objective of the study presented in this paper was to investigate the alterations in rheological, chemical, and microbiological parameters during an agitator disruption accompanying floating layer and foam formation in a full-scale biogas plant treating biogenic waste. In addition, the repair of a broken stirring paddle allowed for analyzing a floating layer chemically and microbiologically. Furthermore, two early warning indicators for overacidifications were used to investigate the process performance in the floating layer. The results of this study give further insight into the improvement of the efficiency of the biogas production process as well as understanding of the complex microbial community composition.

Methods

Biogas plant scheme, process operation, and sampling

The full-scale biogas plant was run as a two-stage plant consisting of two hydrolysis reactors H1 and H2 (520 m³) operated at 30°C and two methanogenic reactors R1 and R2 (2,300 m³) operated at 37°C (Figure 1).

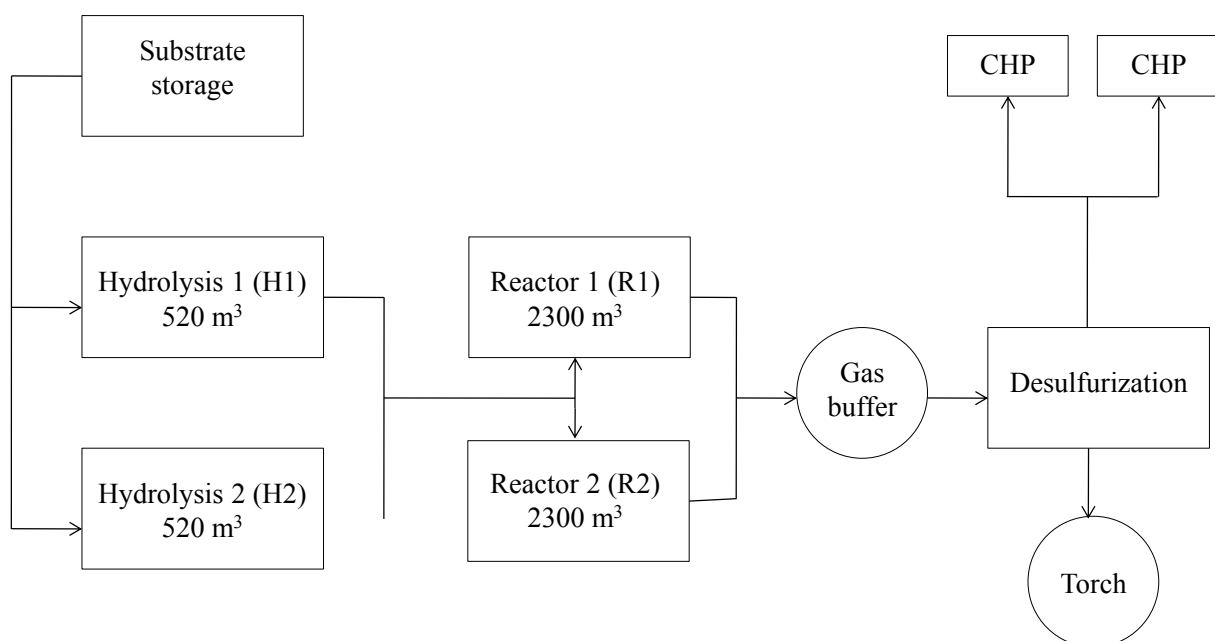


Figure 1: Scheme of the full-scale biogas plant. CHP, combined heat, and power plant.

The hydraulic retention time was kept within the range of 26 days. Liquid manure (50,000 t/a) and a highly variable combination of biogenic wastes (30,000 t/a) from the fish industry and oil from fat separators as well as creamery and slaughterhouse waste were fed as substrates. R1 and R2 were charged in turn every 4 h by 15 m³ substrate. Mixing was conducted by continuous stirring with paddles in two different heights. The methanogenic reactors were operated at an organic loading rate between 2 and 2.5 kg VS m⁻³ day⁻¹. The produced biogas consisted of 60% to 65% CH₄. The biogas production was about 4.4 million m³/a while the digestate residues yielded 61,000 t/a. The methanogenic reactors R1 and R2 were monitored from the start of an agitator breakdown in these reactors over a period of 6 months. In month 5, stirring was reconstituted. While the agitator motor in R1 broke down completely, R2 was affected by one broken stirring paddle (Figure 2a). During the first month, foam was observed in both reactors. The foam disappeared after 1 day without intervention. Additionally, a sample of a floating layer was directly collected during the reparation process of the broken paddle in R2 in month 5 (Figure 2b). In the first month, digester samples were withdrawn at the drain at the bottom of the two reactors bi-weekly. Afterward, sampling was conducted monthly.

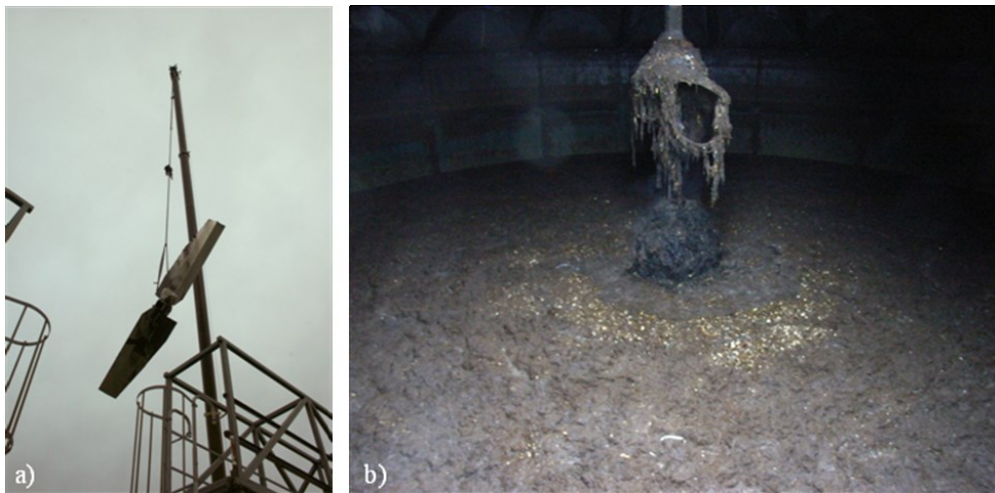


Figure 2: Broken stirring paddle and floating layer in R2. (a) Exchange of broken stirring paddle in R2. (b) Floating layer in R2.

Chemical analyses

For the total solids (TS) and the volatile solids (VS), about 50 g of the samples was dried at 105°C in a Memmert drying chamber (Memmert GmbH, Hannover, Germany) for 24 h and then burned at 550°C (Nabertherm Controller B170; Nabertherm GmbH, Lilienthal/Bremen, Germany). The weight of the samples was determined using a Sartorius CP220S-OCE

balance (Sartorius AG, Goettingen, Germany) (scale ± 0.01 g). The TS and VS were analyzed according to German guideline DIN 38409–1 (1987). For the chemical parameters and for DNA extraction, the samples were centrifuged 10 min at $12,857\times g$ to pelletize solid substances. Pellets were transferred into 1.5 ml tubes and stored at -20°C to extract DNA afterward. The supernatant was centrifuged again for 10 min at $12,857\times g$. The volatile fatty acids (VFA), calcium (Ca^{2+}), and phosphate (PO_4^{3-}) concentrations were measured photometrically (Hach-Lange DR2800, Hach-Lange cuvette tests LCK 365, 327, and 350; Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Germany) in the second supernatant. Additionally, the two early warning indicators EWI-VFA/Ca and EWI- PO_4/Ca for overacidifications and process imbalances (Kleyböcker et al. 2012b) were tested. The nitrogen and organic/inorganic carbon concentrations were detected in homogenized (using a common hand-held blender) samples by a TOC-VCSH/CSN analyzer containing a TN-unit (Shimadzu, Nakagyoku, Kyoto, Japan). The crude protein concentration was determined according to the method of Dumas (Dumas 1831) with a modified determination method of total nitrogen concentration (videsupra). The factor volatile organic acids/total inorganic carbonate buffer (VOA/TIC) determines the buffer capacity of the biogas producing system (Eder and Schulz 2007). The VOA/TIC analysis was carried out according to the Nordmann method (Burchard et al. 2001) using 20 ml of centrifugation supernatant (20 min, 5,300 rpm, and 20°C ; Beckman Avanti 30 centrifuge, Brea, CA, USA). The 10-ml samples were filtered through a membrane filter (nylon, $0.45\ \mu\text{m}$, Pall Corp, Port Washington, NY, USA) for further analysis. The ammonia nitrogen concentration was measured using the spectrophotometric test kit Spektroquant® (Merck KGaA, Darmstadt, German) with photometer MultiLab P5 (WTW, Weilheim, Germany). The concentrations of volatile organic acids (acetic acid, propionic acid, and butyric acid) were measured by use of HPLC (Shimadzu: VA 300/7.8 nucleogelion 300 OA column, 0.01 N H_2SO_4 as eluent, and the detector RID-10A). Water-elutable elements were determined by ICP-AES (according to EN ISO 11885, Spectro, Kleve, Germany).

Rheological characterization

Due to the complex structure of the substrate, the viscosity was determined by using different measuring systems. Three relative methods - a pipe viscosimeter, a paddle mixer, and a ball measuring system - were compared with two standardized methods: the double gap and the cylinder measuring system. In the double gap measuring system, an additional static cylinder is in the center and the rotating measuring cylinder is hollow. Thus, two spaces are created between the inner stator and rotor as well as between the rotor and the outer wall. The calculations of the apparent viscosity and the shear rate are summarized in Table 1. The

measurement systems used to describe the rheology differ in their measuring range. Apart from the results of the double gap measuring system, the viscosity showed the expected dependence on the shear rate. The higher values of this measuring system were due to the large friction of the particles contained in the substrate at the stator because of the small gap width. Based on this comparative study, the cylinder measuring system was chosen for further viscosity monitoring because it was easy to handle and required a comparably low sample volume. The rheological characterization of the substrates was performed over a period of more than 1 year, including the period when the agitator system was disrupted. The shear thinning characteristics of the substrate are described by the power law equation, wherein K stands for the Ostwald factor and n for the shear rate exponent. Based on this equation, the flow regime of the biogas plant with its typical rheological characteristic was determined using the computational fluid dynamics (CFD) software CCM+. The cylindrical model, with a diameter of 13 m and a height of 15.3 m, had a two-stage central mixer in line with the plant. The height was equal to the liquid level; therefore, the ceiling of the cylinder and the boundary layer between the liquid and the gas phase was modeled assuming slip conditions. The lower agitator had a diameter of 4.2 m and was installed 4 m above the ground. A second agitator with a diameter of 2 m was placed at a height of 12 m above the ground. Both impellers were attached to the same shaft. The resulting liquid volume was displayed in the CFD software with a polyhedron grid and approximately 4 million cells. This calculation area was broken down into a stagnant self-contained cylinder and a rotating cylinder. To model the transfer of mass, momentum, energy, and other physical quantities between these two regions, the 'indirect' interface was used. For consideration of the agitator moving, the so-called moving reference frame model was applied. The rotation frequency was 42 rpm and steady state conditions were assumed. To compare both relevant process conditions, with and without a disrupted agitator, a second simulation with disrupted stirring was performed, while the boundary conditions were kept constant and the lower agitator blades were removed.

Table 1: The calculation of the apparent viscosity and the shear rate.

Measuring system	Equation	Constant
Double gab measuring system	$\tau = \frac{1 + \delta^2}{(\delta^2 \cdot R_3^2 + R_2^2)} \cdot \frac{M}{4000 \cdot \pi L C_L}$	$C_L = 1.10$
		$\delta = 1.0245$
	$\dot{\gamma} = \omega \cdot \frac{1 + \delta^2}{\delta^2 - 1}$	$R_{MKi} = 20.25\text{mm}$ $R_{MKa} = 21.00\text{mm}$ $L = 78.7\text{mm}$
Cylinder measuring system	$\tau = \frac{1 + \delta^2}{2000 \cdot \delta^2} \cdot \frac{M}{2\pi L \cdot R_i^2 \cdot C_L}$	$C_L = 1.10$
		$\delta = 1.0848$
	$\dot{\gamma} = \omega \cdot \frac{1 + \delta^2}{\delta^2 - 1}$	$R_{MKi} = 13.33$ $L = 40.003\text{mm}$
Ball measuring cell	$\tau = C_{SS} \cdot M$	$C_{SS} = 15.0 \frac{\text{Pa}}{\text{mNm}}$ $C_{SR} = 0.427 \frac{\text{min}}{\text{s}}$
		$\dot{\gamma} = C_{SR} \cdot n$
	Paddle mixer (Metzner and Otto 1957)	$Ne = \frac{P}{\rho \cdot n^3 \cdot d^5} = \frac{C_{lam}}{Re} + C_{turb}$
$C_{lam} = 189.6$		
$\dot{\gamma} = C_{MO} \cdot n$		$C_{turb} = 9.4$ $d_R = 30\text{mm}$ $d_B = 143\text{mm}$
Pipe viscosimeter (Wilkinson 1960)	$\tau_w = \frac{d \cdot \Delta p}{4 \cdot L}$	$L_{pipe} = 2,500\text{mm}$
		$d_{pipe} = 43.2$
	$\left(\frac{dw}{dr}\right)_w = \frac{3n' + 1}{4n'} \cdot \frac{8 \cdot w_m}{d}$ $n' = \frac{d \ln\left(\frac{d \cdot \Delta p}{4 \cdot L}\right)}{d \ln\left(\frac{8 \cdot w_m}{d}\right)}$	

DNA extraction and PCR-DGGE analysis

To compare the diversity in the microbial community compositions, the total genomic DNA was extracted from 350 mg of the pellets using the MP Fast DNA Spin Kit for Soil according to the manufacturer's instructions. The partial 16S rRNA genes (566 bp) of the bacterial community were amplified by polymerase chain reaction (PCR) in 50 μ l reactions with 1 μ l of 1:10 diluted template using the primer pair 341 F-GC/907R (Muyzer et al. 1993, Amann et al. 1992) (94°C 2:45 min, 94°C 0:45 min, 56°C 0:45 min, 72°C 0:50 min, 72°C 30 min, 40 cycles). Amount of 50 μ l of reactions was mixed containing 5 μ l 10 \times reaction buffer (Genecraft, Lüdinghausen, Germany), 6 μ l dNTPs (10 mM, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 3 μ l MgCl₂ (50 mM, Genecraft), 3 μ l forward primer (10 mM), 3 μ l reverse primer (10 mM), 0.4 μ l BSA (20 mg/ml, Fermentas), 0.3 μ l Taq polymerase (5 u/ μ l, Genecraft), 28.3 μ l RNA/DNA-free water (Fermentas), and 1 μ l of 1:10 diluted template. Amplicons were purified subsequently using the Fermentas GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the amplicon concentration was determined fluorimetrically (BMG Labtech FLUOstar OPTIMA; BMG LABTECH GmbH, Allmendgruen, Ortenberg, Germany) by labeling the DNA with QuantiT_{Pico}Green (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was performed afterward with equal concentrations of amplicons and a gradient of 35% to 65% urea and 6% acrylamide (Biorad DCode System, Munich, Germany). The DGGE gel ran for 17 h at 110 V and 60°C. Bands of interest were excised and transferred into a 0.5-ml tube. Amount of 50 μ l of sterile H₂O was added and removed directly to wash the gel pieces. Afterward, 30 μ l sterile H₂O was added. The tube was shaken for 1 h at 37°C to recover the DNA out of the gel. Reamplification was carried out using 4 μ l template of recovered DNA and the primer pair 341 F/907R (94°C 1:30 min, 94°C 0:30 min, 56°C 0:30 min, 72°C 0:30 min, 72°C 10 min, 30 cycles). PCR products were purified using the Avegene Gel/PCR DNA fragments extraction kit (MSP KOFEL, Zollikofen, Switzerland), and the DNA concentrations were measured fluorimetrically according to the procedure mentioned above. The PCR products were sent in and sequenced by GATC Biotech AG (Jakob-Stadler-Platz 7, Konstanz, Germany). Sequences were edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 (Hall 1999). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al. 1990) was used for sequence similarity check, and the taxonomic assignment was done by Ribosomal Database Project (RDP) using the RDP Classifier (Wang et al. 2007). Based on the DGGE profiles, a graphical representation of the bacterial community evenness was set by using Pareto-Lorenz (PL) distribution curves (Lorenz 1905) as previously described by

Wittebolle et al. (2008). GelQuant.NET software provided by biochemlabsolutions.com was used to determine the band intensities. The band intensities for every DGGE lane were ranked from high to low and the cumulative band intensities were used as the y-axis. The cumulative normalized number of bands was set as the x-axis. Evaluation of the curves was conducted by comparison to a vertical 20% x-axis line. The theoretical perfect evenness line was set as 45° diagonal.

Microscopy

The floating layer sample was analyzed by brightfield microscopy at a $\times 100$ magnification (Zeiss Axio Imager M2; Carl Zeiss, Oberaue 3, Jena, Germany). Therefore, the sample was added to a drop of water on an object slide and viewed microscopically afterward.

Results and discussion

Foam formation related to substrate overloading

Formation of foam was observed in both methanogenic reactors on day 12 in the first month after high organic loading and agitator break-down. Since the monitoring started when the stirring was disturbed, chemical analyses for the period before were not accessible. Besides breakdown and disturbance of stirring as a cause for the foam formation during the first month in both methanogenic reactors, changes in the substrate mix also have to be considered (Figure 3).

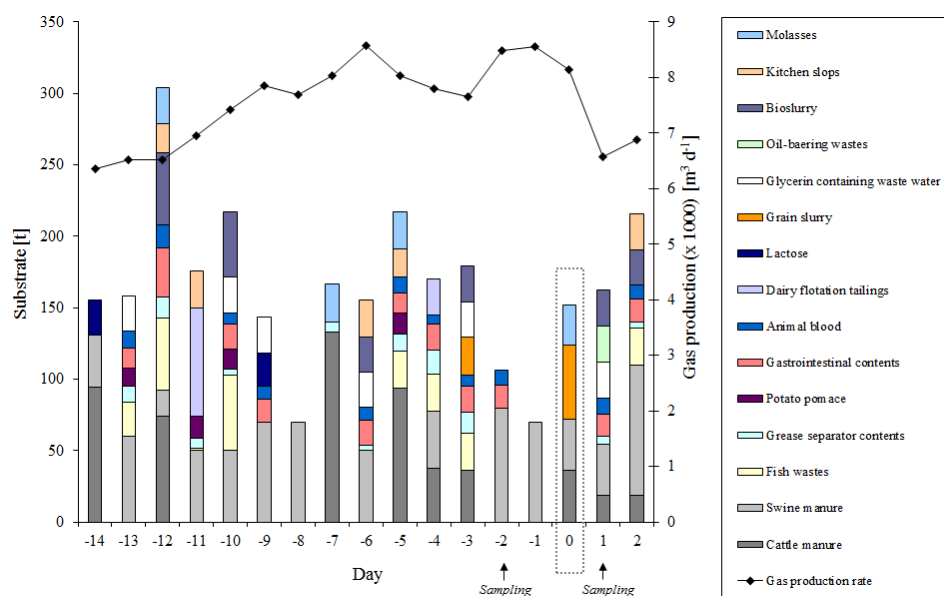


Figure 3: Substrate feeding ratios during and before the foaming period in month 1. The dashed lined rectangle indicates the day when both methanogenic reactors foamed (day '0'). High substrate loading was detected 12 days before the foam appeared.

The hydraulic retention time of the hydrolytic reactors was 11.2 days, and considering that the substrate feeding occurred in the period of 12 days before foaming in the methanogenic reactors, a peak in the total quantity of fed substrates was applied by the operator. After breakdown of agitation foaming occurred. The chemical characterization of the digestate from the time period before and after foaming is shown in Table 2.

Table 2: Chemical characterization of the digestate of the methanogenic reactors R1 and R2 during foaming.

	Two days before foaming		One day after foaming		Five days after foaming	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
VOA/TIC (-)	0.093 ± 0.006	0.098 ± 0.008	0.170 ± 0.023	0.155 ± 0.002	0.134 ± 0.036	0.0173 ± 0.038
Total carbon (g L ⁻¹)	16.42 ± 0.86	15.55 ± 0.69	18.63 ± 1.23	13.67 ± 0.30	15.87 ± 0.58	15.80 ± 0.66
Total organic carbon (g L ⁻¹)	12.23 ± 0.76	11.44 ± 0.64	14.04 ± 0.52	9.793 ± 250	11.87 ± 0.51	11.75 ± 0.66
Total nitrogen (g L ⁻¹)	4.63 ± 0.24	4.57 ± 0.19	5.14 ± 0.14	4.60 ± 0.15	4.21 ± 0.05	4.28 ± 0.05
Ammonia nitrogen (g L ⁻¹)	2.61 ± 0.03	2.69 ± 0.02	2.83 ± 0.01	2.85 ± 0.01	2.94 2.94	2.98 2.98
Crude Protein (g L ⁻¹)	12.67	11.73	14.42	10.97	7.95	8.16
Volatile organic acids:						
Acetic acid (mg L ⁻¹)	<1	126	407	207	215	551
Propionic acid (mg L ⁻¹)	<1	<1	<1	66	<1	<1
Butyric acid (mg L ⁻¹)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Water-eluable elements						
Calcium (mg L ⁻¹)	43.4	56.5	54.3	86.0	36.3	61.8
Iron (mg L ⁻¹)	5.33	5.56	5.20	4.88	4.26	6.91
Magnesium (mg L ⁻¹)	4.57	5.81	6.30	12.5	11.4	9.63
Nickel (mg L ⁻¹)	<4	<4	21.4	20.8	<4	<4
Phosphorus(mg L ⁻¹)	132	145	161	139	151	151
Potassium (mg L ⁻¹)	1,703	1,687	1,682	1,659	1,755	1,690
Sulfur (mg L ⁻¹)	46.6	43.2	56.9	43.1	47.3	49.6

In case of multiple determinations standard deviations are presented.

The increase of VOA/TIC values amounted to 0.08 and 0.06 during 4 days in both methanogenic reactors, respectively. Accordingly, the concentrations of VOA rose from 1,600 mg L⁻¹ (R1) and 1,650 mg L⁻¹ (R2) to 2,700 mg L⁻¹ (R1) and 2,500 mg L⁻¹ (R2), respectively. The concentration of acetate increased in R1 from less than 1 mg L⁻¹ to 400 mg L⁻¹ and in R2 from 100 mg L⁻¹ to 200 mg L⁻¹. Moreover, in only one sample, 66 mg L⁻¹ of propionic acid was detected in R2 1 day after the foaming occurred. The acetic

acid concentration decreased in R1 5 days after foaming, while it was 2.5-fold increased in R2. Presumably, high feeding together with disturbed mixing led to an overloading of the reactors. Some of the fed substrates such as fish and slaughterhouse waste as well as easily degradable substrates such as sugar beet molasses are well known to favor foaming (Switzenbaum et al. 1990, Moeller et al. 2012b). Although the VOA/TIC is specific for each biogas plant, a sudden change in the VOA/TIC curve indicates a process disturbance. The accumulation of intermediates of the biogas producing process is known to be a consequence of failure of the microbial process that can be due to organic overloading (Scholwin et al. 2009). One and two days before foaming appeared, the early warning indicators EWI-VFA/Ca and EWI-PO₄/Ca increased by a factor of 2 (Figure 4). According to Kleyböcker et al. (2012b), the increase indicates a warning in terms of overacidification and overloading. Because the overloading is regarded as a reason for foaming, the EWI-VFA/Ca and EWI-PO₄/Ca warned in terms of foam formation as well.

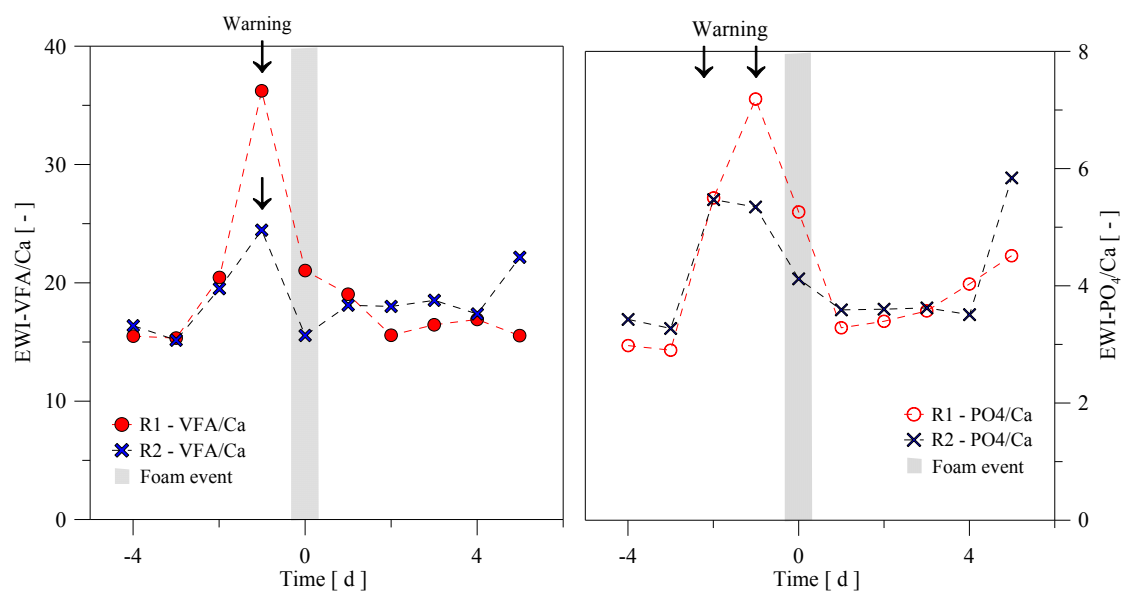


Figure 4: Early warning indicators EWI-VFA/Ca and EWI-PO₄/Ca. Before, during, and after the foam event in the reactors R1 and R2 in month 1. Both indicators increase 1 to 2 days before foaming appeared. The increase is interpreted as a warning in terms of overloading. The overloading is regarded as reason for the formation of foam.

The ammonia nitrogen concentration was more or less constant. One day after foaming, the crude protein concentration increased considerably in R1, while it stayed almost stable in R2. Furthermore, the protein concentration decreased considerably in both methanogenic reactors 5 days after foaming. Concerning water eluable elements, diverse trends were observed. Calcium and magnesium concentrations were higher in both fermenters 1 day after foaming

than in the period before foaming. The calcium concentration decreased again in both methanogenic reactors 5 days after foaming. The magnesium concentration had an opposite tendency in both fermenters; it rose further in R1 while sinking in R2. Nickel was detected with a concentration of about 20 mg L^{-1} in both methanogenic reactors 1 day after foaming. All other element concentrations were either stable or only slightly higher in the period after foaming (Table 2). The role of water eluable elements in the foam formation in biogas plants has not been studied so far. Nevertheless, the experience from fermentation processes in digestive systems of ruminants may help to understand biogas systems. Miltimore (Miltimore et al. 1970) found that calcium, nickel, and zinc were associated with the bloat of ruminants, whereas magnesium had no relation to foaming in the rumen. The increased calcium and nickel concentrations during the foam formation most likely resulted from the variances in the substrate mix. Moreover, there was a considerable drop in the biogas production rate after the foaming (Figure 3), also indicating a process imbalance. Unfortunately, no sampling of the foam from the reactor surface was possible to analyze the chemical composition of the foam in order to confirm these assumptions.

Stagnant zones, sedimentations, and process imbalances due to stirring disturbances

The analysis of the rheology showed that the values for the Ostwald factor and the shear rate fluctuated considerably within the monitoring period of 6 months (Figure 5).

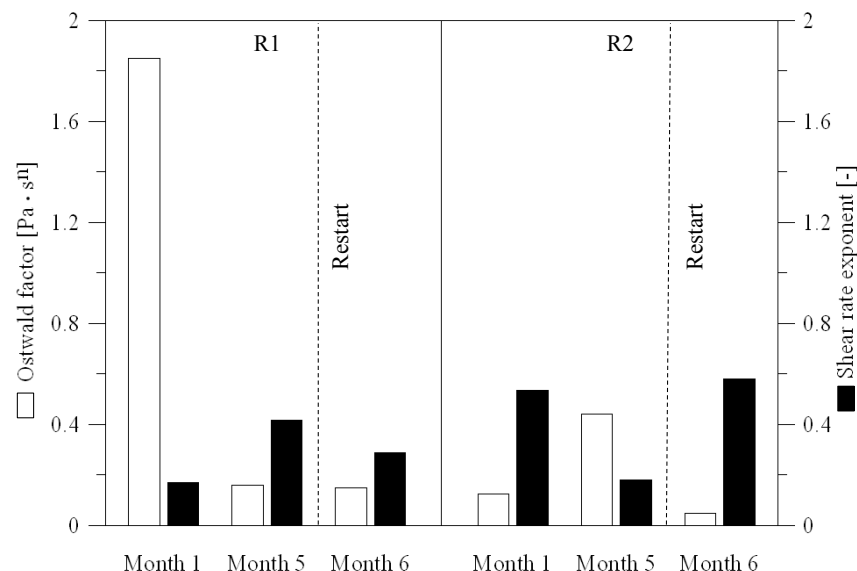


Figure 5: Ostwald factor and the shear rate exponent for R1 and R2. Ostwald factor and the shear rate exponent for R1 and R2 over 6 months covering the period of disturbed stirring. No considerable differences were detected during the stirring breakdown.

Surprisingly, no significant changes of the rheological characteristics were detected during the period without stirring. Based on this rheological result, an Ostwald factor of $0.125 \text{ Pas}^{0.53}$ and a flow exponent of 0.53 were chosen for the CFD simulations. However, the power law approach was used for a shear rate range from 0.01 to 700 s^{-1} only. Outside this range, a constant viscosity of either 0.01 Pas or rather 4.03 was assumed. The open jet of the substrate supply was not considered in the simulation. The thoroughly mixed volume generated by the open jet was estimated as 5% to 10% of the whole reactor. With a feeding interval of 4 h, the mixing process by substrate dosage was negligible. Under undisturbed mixing conditions, the numerical simulations showed a good mixing for the studied biogas plant (Figure 6a). However, the partial stirring did not prevent the formation of floating layers in modeling the flow velocity since especially in the upper reactor volume, stagnant zones appeared (Figure 6b).

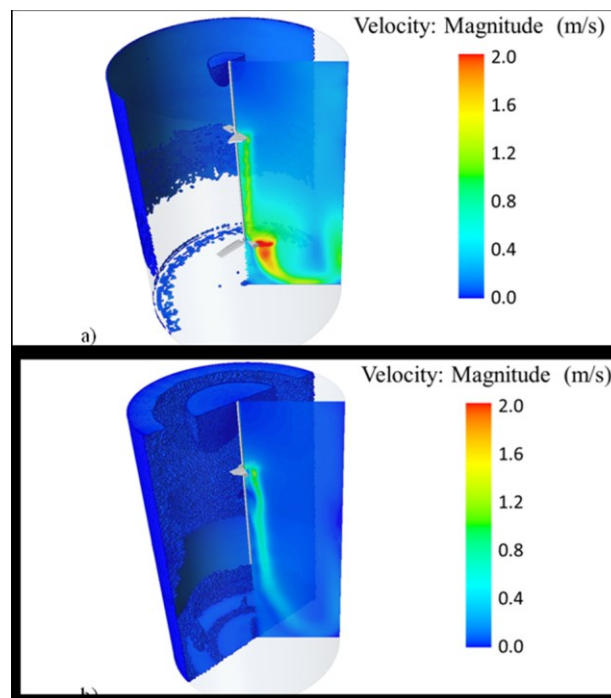


Figure 6: CFD simulations of the flow regime in the biogas plant with the rheology of the original substrate (a) During normal operation. (b) With one broken paddle. The methanogenic reactor showed a good performance during normal operation; whereas the flow regime broke down and stagnant zones appeared when the reactor was only partially stirred.

The stagnation zone with a velocity less than $0.05 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ was limited to a volume of 52.6 m^3 and represented 2.4% of the whole reactor. After breakdown of the lower agitator, large stagnation zones were formed, especially in the upper reactor volume with a volume of 487 m^3 that was about 21.8% of the whole reactor and the whole flow field collapsed (Figure

6b). The concentrations of TS and VS in the monitoring period covering the time from agitator breakdown to the restart of stirring after 5 months differed slightly between R1 and R2 with differences from 3 to 4 g L⁻¹ (Figure 7).

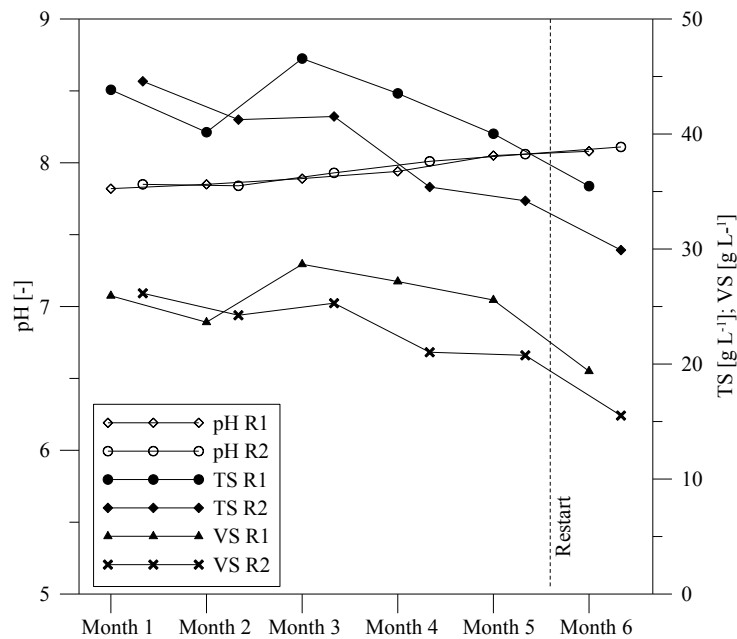


Figure 7: Average values of pH, total solids, and volatile solids. Lower TS and VS values were detected in R2. The pH value increased and TS and VS values decreased slightly after restart of the agitator in month 5.

The complete agitator downtime in R1 most likely led to sedimentations. The small volume of the introduced substrate was not sufficient to blend the reactor, and sedimentation occurred resulting in a 10% higher TS value and 13% higher VS value in R1 than in R2 in which no or less sedimentation occurred due to the partial mixing (Figure 7). The substrates were concentrated at the bottom of R1 and directly withdrawn at the drain during sampling which led to an overestimation of the average TS and VS values. In contrast to the complete stirring downtime in R1, the substrates in the partially stirred R2 were better distributed leading to a more sufficient degradation of organic matter and lower TS and VS values. The average pH values of the digestates of the methanogenic reactors were slight alkaline with a value of about 8 (Figure 7). The gas production rate was decreased by 16% to 36% during the mixing disturbances (Figure 8). Unfortunately, the biogas production of the two reactors was quantified together so that the comparison of the biogas production rate was not feasible. Analysis of the VFA concentrations in the methanogenic reactors showed increasing values after the agitators were broken (Figure 8). In the first 2 months, the VFA in both reactors nearly doubled from about 2,500 mg L⁻¹ to 3,900 mg L⁻¹ and the EWI-VFA/Ca increased two

to three times. According to Kleyböcker et al. (2012b) the two- to threefold increase in the EWI-VFA/Ca indicates a process imbalance. However, the VFA concentrations in the hydrolytic reactors increased as well. In the first month, the VFA concentrations in both hydrolytic reactors reached a value of about 18,500 mg L⁻¹ and increased in the second month up to more than 23,000 mg L⁻¹. Afterward, the concentrations decreased constantly to less than 14,000 mg L⁻¹ in month 5. Correspondingly, from month 3 onward, the VFA concentrations in the two methanogenic reactors decreased and stabilized at a value of around 1,200 mg L⁻¹, and the EWI-VFA/Ca also indicated process stabilization.

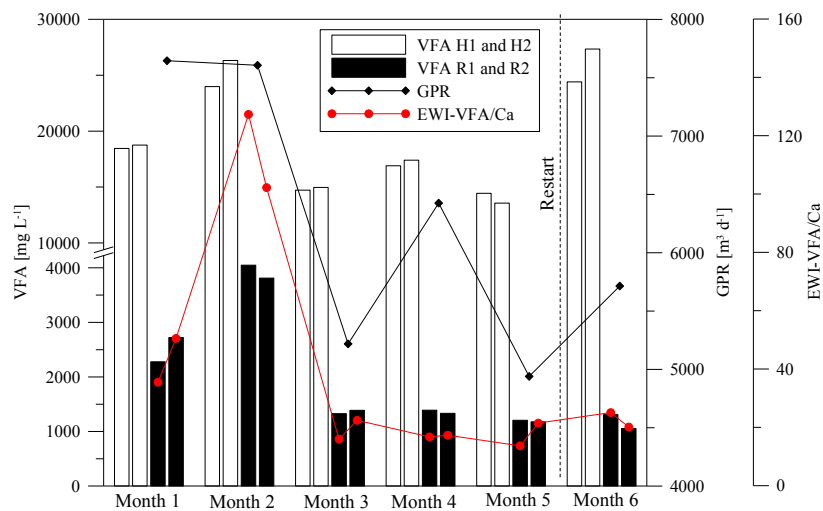


Figure 8: VFA concentrations, GPR, and early warning indicator (EWI-VFA/Ca). Highest VFA values in the hydrolytic reactors H1 and H2 in month 2 and month 6. VFA in the methanogenic reactors R1 and R2 increased and biogas production decreased after agitator disturbance. Afterward, the concentrations of VFA decreased and stabilized.

The small intensity of stirring very likely favored the stabilization process. Stroot et al. (2001), Gomez et al. (2006), and Kaparaju et al. (2008) also observed process stabilization due to gentle and/or minimal mixing (intermittent mixing) after high organic loading. It is probable that the increased concentrations of VFA in the methanogenic reactors were mainly caused by higher VFA concentrations in the fed substrate combined with an insufficient distribution of the substrate due to the stirring disturbances. Rojas et al. (2010) revealed a decreasing performance of the biogas process in a reactor without stirring and related it to the insufficient contact between substrate and microorganisms. After restart of the agitator in month 5, the VFA concentrations in the two methanogenic reactors remained on a low level although the VFA concentrations in the hydrolytic stage increased again to more than 24,000 mg L⁻¹. In month 5, a floating layer sample was collected from the surface of R2

during the exchange of the broken stirring paddle. The TS and VS values of the floating layer were increased four- to fivefold related to the digestate, and the VFA concentration was twofold higher than in the digestate at a value of 2,200 mg L⁻¹ (data not shown). The EWI-VFA/Ca was increased fivefold compared to the digestate, whereas the EWI-PO₄/Ca was increased threefold and indicated a process imbalance (Kleyböcker et al. 2012b). The accumulation of organic components in the layer and very limited exchange of intermediates within the layer led to an accumulation of VFA and therefore the microbial degradation process was inhibited in the floating layer.

Process disruption-associated differences in the microbial community

Genetic fingerprinting of the bacterial community composition in the two methanogenic reactors showed a diverse band pattern after agitator breakdown (Figure 9 a, b). One month after the stirring was disturbed in both reactors, the microbial composition changed and differed between the two reactors.

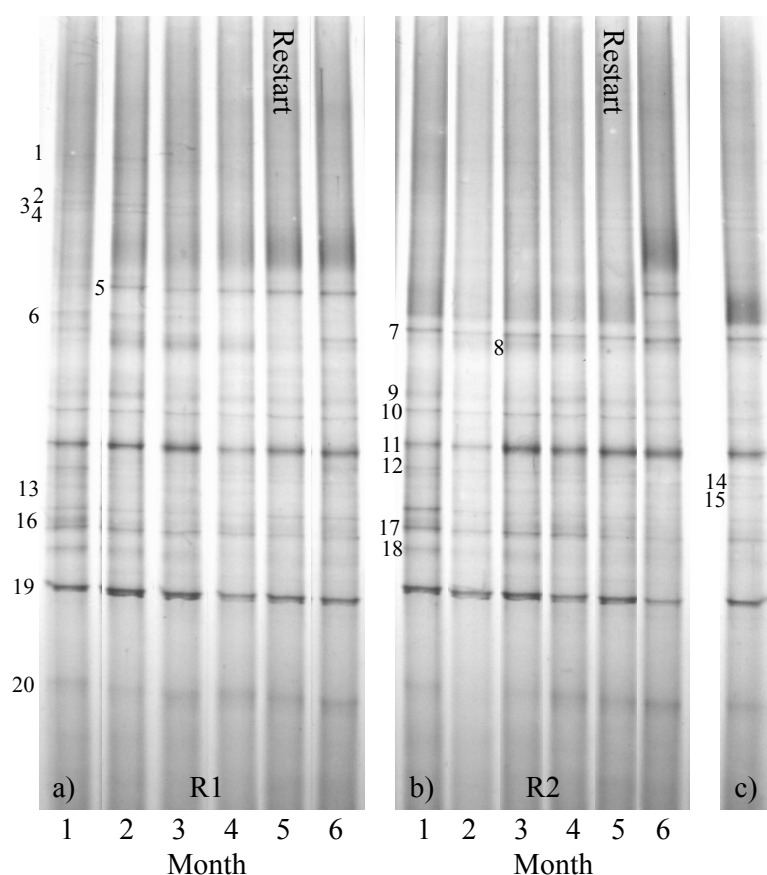


Figure 9: DGGE fingerprinting over 6-month monitoring. (a) R1 and (b) R2. Numbered bands were further identified by sequencing (Table 3). The bacterial community composition changed after the agitator disruption in month 1 and adjusted after restart of the agitator in month 5. (c) DGGE pattern of floating layer showed no differences to the associated digestate of R2 in month 5.

A characteristic band pattern for each reactor was visible at the genetic fingerprinting whereby mostly bacteria of the phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes* dominated the biocenosis (Table 3). Within the phylum *Firmicutes*, members of the order *Clostridiales* were dominant; whereas a *Proteiniphilum*-assigned organism from the phylum *Bacteroidetes* showed strong band intensities throughout the monitoring period, indicating a codominance in the reactors (band 19). In addition, one sequence was affiliated to a bacterium from the phylum *Chloroflexi*. Cardinali-Rezende et al. (2009) as well as Leven et al. (2007) investigated the microbial community of anaerobic reactors treating household waste and also observed bacteria of the *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, and *Chloroflexi* as the dominating phyla.

Table 3: Partial 16S rRNA gene sequences retrieved from DGGE fingerprint and sequencing excised bands.

Band ID	Genbank accession number	Closest relative (accession number)	BLAST similarity (%)	Taxonomic classification
1	KF147561	Uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium (JQ741982.1)	91	Unclassified <i>Clostridiales</i>
2	KF147562	Anaerobic bacterium (AY756145.2)	91	Unclassified <i>Clostridiales</i>
3	KF147563	Uncultured bacterium (GQ132906.1)	83	Unclassified <i>Bacteria</i>
4	KF147564	Uncultured bacterium (JX224468.1)	83	Unclassified <i>Bacteria</i>
5	KF147565	Uncultured bacterium (KC605949.1)	82	Unclassified <i>Bacteroidales</i>
6	KF147566	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium (JX102011.1)	99	Unclassified <i>Flavobacteriaceae</i>
7	KF147567	Uncultured candidate division WWE1 (JX102010.1)	94	Unclassified <i>Bacteria</i>
8	KF147568	<i>Peptostreptococcaceae</i> bacterium (AB377177.1)	94	<i>Gallicola</i>
9	KF147569	<i>Clostridium</i> sp. (FJ424481.1)	98	<i>Clostridium sensu stricto</i>
10	KF147570	Uncultured bacterium (AB273806.1)	87	Unclassified <i>Clostridiales</i>
11	KF147571	Uncultured bacterium (AB850144.1)	92	Unclassified <i>Clostridiales</i>
12	KF147572	Uncultured compost bacterium (FN667344.1)	90	Unclassified <i>Clostridiales</i>
13	KF147573	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium (FN429799.1)	90	Unclassified <i>Clostridiales</i>
14	KF147574	Uncultured bacterium (HQ156179.1)	91	Unclassified <i>Clostridiales</i>
15	KF147575	Uncultured bacterium (FN993992.1)	89	Unclassified <i>Clostridiales</i>
16	KF147576	Uncultured <i>Syntrophomonas</i> sp. (KF511597.1)	95	<i>Syntrophomonas</i>
17	KF147577	Uncultured <i>Clostridia</i> bacterium (JN998166.1)	91	<i>Syntrophomonas</i>
18	KF147580	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium (HM041937.1)	92	Unclassified <i>Clostridiales</i>
19	KF147578	Uncultured bacterium (GQ134523.1)	88	<i>Proteiniphilum</i>
20	KF147579	Uncultured <i>Chloroflexi</i> bacterium (CU923171.1)	99	<i>Levilinea</i>

Taxonomic assignment was done by RDP Classifier with a confidence threshold of 50%. Closest relatives are shown including Genbank accession numbers.

Although the band patterns of both reactors were similar in month 1, differences in the intensities were detected for several bands. A higher abundance of an unclassified bacterium was indicated by the more intensive band 7 in R2 (Table 3). From month 2 on, the band patterns of R1 and R2 differed significantly. The intensity of band 5, which was affiliated to a bacterium from the order *Bacteroidales*, became stronger in R1 and weaker in R2. The unclassified bacterium (band 7) was less dominant in R1 from month four to month five; whereas its dominance increased in R2. After the restart of the agitator in month 5, the band intensities from the *Bacteroidales* bacterium and the unclassified bacterium increased in both reactors again. The Pareto-Lorenz distribution pattern of R1 showed no differences in the functional organization of the microbial community during the agitator breakdown and afterward (Figure 10). Twenty percent of the cumulative number of bands was covered by 45% of the cumulative band intensities. By contrast, the Pareto-Lorenz distribution pattern of the partially stirred reactor R2 showed a difference in the functional organization of the microbial community in month 5 compared to months 1 and 6 as well as to the community in R1. In month 5, only 20% of the bands covered nearly 80% of the band intensities, indicating an uneven microbial community composition with few dominant species. In month 6, after restart of the agitator, the evenness of the microbial composition improved to a value of about 45% and was again on the same level as observed for R1 indicating a similar microbial community composition.

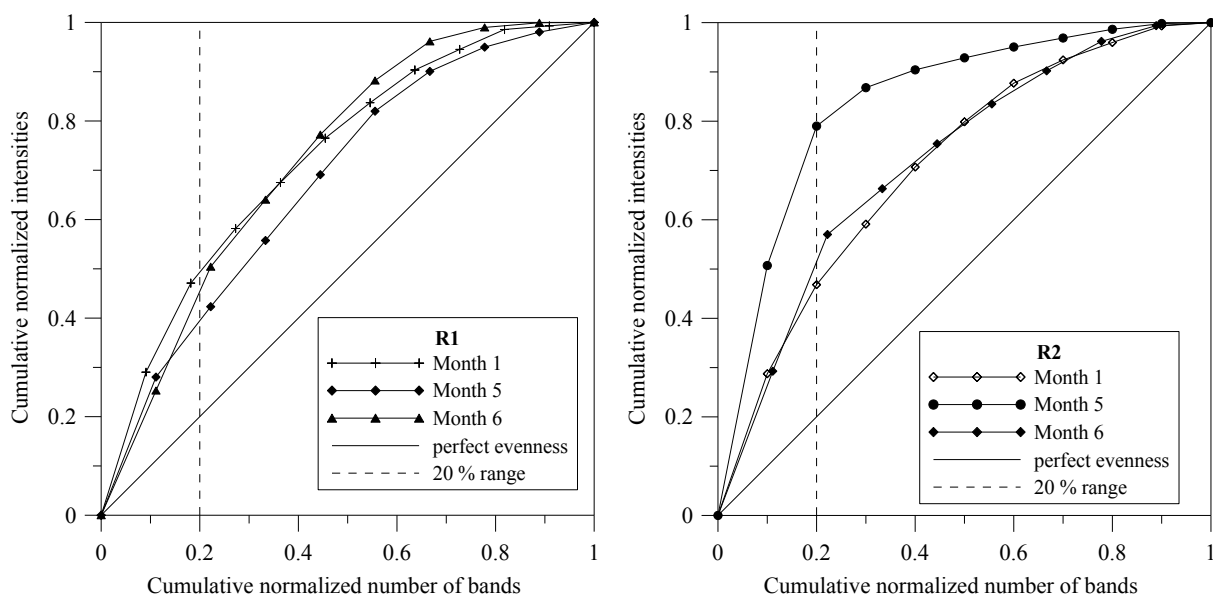


Figure 10: Pareto-Lorenz distribution pattern of R1 and R2 in months 1, 5, and 6. Perfect evenness is illustrated by straight line and 20% range is illustrated by dashed vertical line. Broken stirring paddle in R2 had greater influence on microbial evenness than complete downtime of agitator in R1.

Both reactors were affected by foaming in the first month after agitator disruption and additionally a floating layer formation was found in R2 when the roof of the reactor was opened to repair the broken stirring paddle. Foaming and bulking caused by filamentous bacteria is well known in wastewater treatment plants (WWTP) and anaerobic digesters treating activated sludge (Martins et al. 2004). A *Proteiniphilum*-like bacterium from the phylum *Bacteroidetes* dominated the microbial community in both reactors. Filamentous members of the *Bacteroidetes* phylum have been isolated from many environments (Williams and Unz 1985, Kaempfer et al. 1995, Eilers et al. 2001, Lydell et al. 2004). However, little is known about the involvement of these microorganisms in bulking or foaming up until now (Kragelund et al. 2008), and the morphology of species from the genus *Proteiniphilum* was described as rod-shaped (Chen and Dong 2005). Additionally, a member from the phylum *Chloroflexi* was identified in the reactors. Some members of this phylum have a filamentous morphology occasionally triggering the formation of foam and floating layers in WWTP (Kragelund et al. 2006, Nielsen et al. 2009). Accordingly, microscopic analyses (Figure 11) revealed filaments in the floating layer.

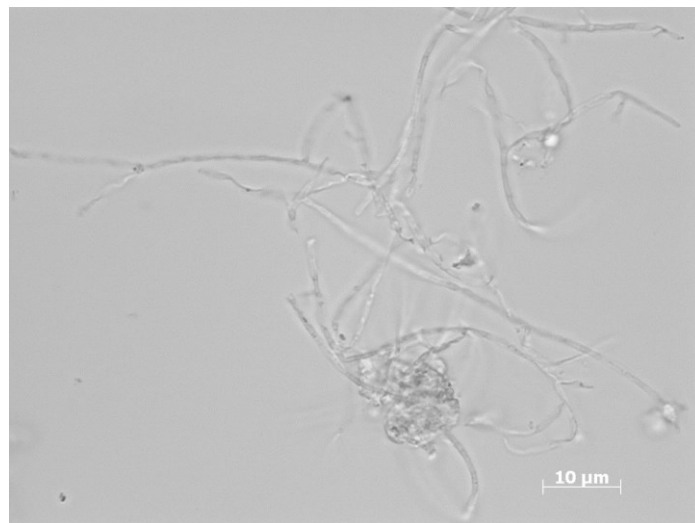


Figure 11: Filamentous structures in the floating layer sample ($\times 100$ magnification).

It is arguable if the filamentous morphology of the microorganisms was an adaptation to the deteriorated distribution of nutrients due to the disturbed mixing in both reactors because the filamentous structure allows an improved nutrient absorption or whether the microorganisms were obligatory filamentous. However, it is not clear if the filamentous bacteria promoted the floating layer formation in this case. Most likely, they were just accompanying bacteria and the floating layer formation was mainly caused by fibrous substrates and especially the stirring failure. Furthermore, it has to be discussed if the alternating substrate mix might have

had an influence on the microbial community composition in the reactors. Since the exact amount of introduced substrates for every month is not known by the authors, a correlation between substrate loading and microbial community change was not possible. However, both methanogenic reactors were fed by the same substrate mix with similar VFA as well as TS and VS concentrations. Moreover, the microbial community structure only changed after the stirring differed in the reactors and adapted again after the stirring was restarted. Therefore, it is reasonable to regard the disturbance of stirring as the main trigger of the microbial community composition change. The band pattern of the floating layer showed no differences to the associated digestate (Figure 9c). Apparently, the microorganisms in the floating layer were not able to degrade efficiently the accumulated organic acids, although *Syntrophomonas*-like organisms which are known to withstand high VFA concentrations were detected in the floating layer (Sousa et al. 2007). Probably, the VFA concentrations were too high for a sufficient degradation leading to an inhibition of the microorganisms. Moreover, the accumulated fibrous substrates in the floating layer were less degradable, as also described by Heiske et al. (2013).

Conclusions

This study shows that the formation of floating layers and foam in full-scale biogas plants can be reduced by proper stirring. A precise knowledge of the rheology of the substrate mix and an appropriate agitation technology is essential for efficient mixing as well as optimized energy consumption. Furthermore, the stirring has a crucial influence on the microbial community structure. As most of the microorganisms are still uncultured and uncharacterized, further investigation on the microbial community composition is fundamental to enhance the efficiency of anaerobic digesters. Additionally, controlled substrate feeding as well as monitoring of EWI might prevent foaming due to overloading.

Abbreviations

CFD, computational fluid dynamics; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; DNA, deoxyribonucleic acid; EWI, early warning indicator; GPR, gas production rate; PCR, polymerase chain reaction; TS, total solids; VFA, volatile fatty acids; VS, volatile solids; VOA/TIC, volatile organic acids/total inorganic carbonate buffer.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TL carried out the molecular biological studies, sequence alignment, and drafted the manuscript. AK coordinated the sampling and carried out chemical analyses. MB conducted the rheological analyses and participated in the design of the study. LM and KG participated in the design of the study and performed detailed chemical analyses of the foaming event. MK and HW conceived of the study, participated in its design and coordination, and helped to interpret the results and to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The Authors wish to thank the German 'Federal Ministry for the Environment, Nature and Nuclear Safety' for funding the project 'Optgas' (FKZ 03 KB018) and the biogas plant operator for the cooperation. Special thanks go to Prof. Dr. Andreas Zehnsdorf and Dr. Roland Müller for helpful discussion and critical reading of the manuscript.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJJ (1990) Basic local alignment search tool. *MolecBiol* 215:403–410
- Amann RI, Stromley J, Devereux R, Key R, Stahl DA (1992) Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol* 58:614–623
- Balussou D, Kleyböcker A, McKenna R, Möst D, Fichtner W (2012) An economic analysis of three operational co-digestion biogas plants in Germany. *Waste Biomass Valor* 3(1):23–41
- Barber W (2005) Anaerobic digester foaming: causes and solutions. *Water* 21 7 1:45–49
- Bischofsberger W, Dichtl N, Rosenwinkel K, Seyfried C, Böhnke B (2005) *Anaerobtechnik*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Burchard CH, Groche D, Zerres HP (2001) *ATV Handbucheinfacher Messungen und Untersuchungen auf Klärwerken*. Hirthammer Verlag München
- Cardinali-Rezende J, Debarry RD, Colturato LFDB, Carneiro EV, Chartone-Souza E, Nascimento AMA (2009) Molecular identification and dynamics of microbial communities in reactor treating organic household waste. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:777–789
- Chen S, Dong X (2005) *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(6):2257–61
- Deublein D, Steinhauser A (2008) *Biogas from waste and renewable resources*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- DIN 38409–1 (1987) German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; parameters characterizing effects and substances (group H); determination of total dry residue, filtrate dry residue and residue on ignition (H 1). DeutschesInstitutFürNormung E.V DIN 38409-1:1987-01
- Dumas JB (1831) *Procedes de l'analyseorganique*. *Ann ChimPhys* 247:198–213
- Eder B, Schulz H (2007) *Anlagentechnik*. In: Eder B, Schulz H (eds) *Biogas praxis*, 4th edn. ÖkobuchVerlag, pp 70–118
- Eilers H, Pernthaler J, Peplies J, Glockner FO, Gerds G, Amann R (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Appl Environ Microbiol* 67:5134–5142
- Frigon D, Guthrie RM, Bachman GT, Royer J, Bailey B, Raskin L (2006) Long-term analysis of a full-scale activated sludge wastewater treatment system exhibiting seasonal biological foaming. *Water Res* 40(5):990–1008
- Ganidi N, Tyrrel S, Cartmell E (2009) Anaerobic digestion foaming causes-a review. *BioresourTechnol* 100(23):5546–54
- Gomez X, Cuetos M, Cara J, Moran A, Garcia A (2006) Anaerobic co-digestion of primary sludge and fruit and vegetable fraction of the municipal solid wastes: conditions for mixing and evaluation of the organic loading rate. *Renewable Energy* 31:2017–2024
- Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids SympSer* 41:95–98
- Heiske S, Schultz-Jensen N, Leipold F, Schmidt JE (2013) Improving anaerobic digestion of wheat straw by plasma-assisted pretreatment. *J Atomic MolPhys*, Article ID 791353
- Kaempfer P, Weltin D, Hoffmeister D, Dott W (1995) Growth requirements of filamentous bacteria isolated from bulking and scumming sludge. *Water Res* 29:1585–1588
- Kaparaju P, Buendia I, Ellegaard L, Andelidaki I (2008) Effects of mixing on methane production during thermophilic anaerobic digestion of manure: lab-scale and pilot-scale studies. *BioresourTechnol* 99(11):4919–4928
- Kleyböcker A, Liebrich M, Kasina M, Kraume M, Wittmaier M, Würdemann H (2012) Comparison of different procedures to stabilize biogas formation after process failure in a thermophilic waste digestion system: influence of aggregate formation on process stability. *Waste Manag* 32(6):1122–30
- Kleyböcker A, Liebrich M, Verstraete W, Kraume M, Würdemann H (2012) Early warning indicators for process failure due to organic overloading by rapeseed oil in one-stage continuously stirred tank reactor, sewage sludge and waste digesters. *BioresourTechnol* 123:534–41

- Kragelund C, Levantesi C, Borger A, Thelen K, Eikelboom D, Tandoi V, Kong Y, van der Waarde J, Krooneman J, Rossetti S, Thomsen TR, Nielsen PH (2006) Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS MicrobiolEcol* 59(3):671–82
- Kragelund C, Levantesi C, Borger A, Thelen K, Eikelboom D, Tandoi V, Kong Y, Krooneman J, Larsen P, Thomsen TR, Nielsen PH (2008) Identity, abundance and ecophysiology of filamentous bacteria belonging to the Bacteroidetes present in activated sludge plants. *Microbiol* 154(3):886–94
- Levén L, Eriksson AR, Schnürer A (2007) Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS MicrobiolEcol* 59(3):683–93
- Lorenz MO (1905) Methods of measuring concentration of wealth. *J Am Stat Assoc* 9:209–219
- Lydell C, Dowell L, Sikaroodi M, Gillevet P, Emerson D (2004) A population survey of members of the phylum Bacteroidetes isolated from salt marsh sediments along the East Coast of the United States. *MicrobEcol* 48:263–273
- Martins A, Pagilla K, Heijnen J, van Loosdrecht M (2004) Filamentous bulking sludge—a critical review. *Water Res* 38(4):793–817
- Metzner AB, Otto RE (1957) Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE J* 3(1):3–10
- Miltimore JE, McArthur JM, Mason JL, Ashby DL (1970) Bloat investigations. The threshold fraction 1 (18S) protein concentration for bloat and relationships between bloat and lipid, tannin, Ca, Mg, Ni and Zn concentrations in alfalfa. *Can J AnimSci* 50:61–68
- Moeller L, Goersch K, Neuhaus J, Zehnsdorf A, Mueller RA (2012) Comparative review of foam formation in biogas plants and ruminant bloat. *Energy Sustainability Soc* 2:12
- Moeller L, Goersch K, Mueller RA, Zehnsdorf A (2012) Formation and suppression of foam in biogas plants – practical experiences. *AgricEng (Landtechnik)* 67(2):110–113
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695–700
- Nielsen PH, Kragelund C, Seviour RJ, Nielsen JL (2009) Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol Rev* 33(6):969–98
- Pagilla KR, Craney KC, Kido WH (1997) Causes and effects of foaming in anaerobic sludge digesters. *Water SciTechnol* 36(6–7):463–470

- Rojas C, Fang S, Uhlenhut F, Borchert A, Stein I, Schlaak M (2010) Stirring and biomass starter influences the anaerobic digestion of different substrates for biogas production. *Eng Life Sci* 10(4):339–347
- Scholwin F, Liebetrau J, Edelmann W, Kaltschmitt M, Hartmann H, Hofbauer H (2009) Biogaserzeugung und -nutzung. In: *Energieaus Biomasse*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 851–990
- Sousa DZ, Pereira MA, Smidt H, Stams AJM, Alves MM (2007) Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol Ecol* 60(2):252–65
- Stroot P, McMahon K, Mackie R, Raskin L (2001) Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions – I. Digester performance. *Water Res* 35(7):1804–1816
- Switzenbaum MS, Giraldo-Gomez E, Hickey RF (1990) Monitoring of the anaerobic methane fermentation process. *Enzyme Microb Technol* 12:22–730
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73(16):5261–7
- Westlund AB, Hagland E, Rothman M (1998) Foaming in anaerobic digesters caused by *Microthrix parvicella*. *Water Sci Technol* 37:51–55
- Wilkinson WL (1960) *Non-Newtonian fluids, fluid mechanics, mixing and heat transfers*. Pergamon Press, London
- Williams TM, Unz RF (1985) Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 22:273–282
- Wittebolle L, Vervaeren H, Verstraete W, Boon N (2008) Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Appl Environ Microbiol* 74(1):286–293

8.3 Foam formation in a downstream digester of a cascade running full-scale biogas plant: Influence of FOG addition and abundance of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella*

Dritte Veröffentlichung: Erschienen 2014 in Bioresource Technology, 153, 1-7.
doi:10.1016/j.biortech.2013.11.017

Autoren: Tobias Lienen¹, Anne Kleyböcker¹, Willy Verstraete², Hilke Würdemann¹

¹Helmholtz Centre Potsdam GFZ German Research Centre for Geosciences, Telegrafenberg,
14473 Potsdam, Germany

²LabMET, Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium

Abstract

The microbial community composition in a full-scale biogas plant fed with sewage sludge and fat, oil and grease (FOG) was investigated over a 15-month period, including two foam formation events. Addition of FOG as a substrate in the biogas plant together with high abundances of *Microthrix parvicella* were found to promote foam formation in the downstream digester of a cascade of two biogas digesters. Genetic fingerprinting and quantitative PCR (qPCR) indicated a higher abundance of *M. parvicella* in the digester, when the digestion process was accompanied by excessive foaming relative to the reference digesters without disturbance. The creation of foam depended on the introduced proportion of FOG and the abundance of *M. parvicella*. Furthermore, shifts in the abundance of *M. parvicella* in the biogas plant were observed within the 15-month monitoring period corresponding to its seasonal abundance in the sludge of the wastewater treatment plant (WWTP).

Keywords

Full-scale biogas plant, foam, FOG addition, *Microthrix parvicella* threshold abundance

List of abbreviations

DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; FOG, fat, oil and grease; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; LCFA, long chain fatty acids; TS, total solids; VFA, volatile fatty acids; VS, volatile solids; WWTP, wastewater treatment plant

Introduction

The use of renewable energy sources is increasing in Germany. As a storable and decentralized energy source, the production of biogas from organic residues is regarded as a very important method for substituting fossil fuels with renewable energy sources (Weiland 2010).

Full-scale biogas plants are often affected by serious process failures. Over-acidification, foaming and the creation of floating layers lead to operational failures or even to complete process interruptions, which results in considerable financial losses (Balussou et al. 2011). From a microbiological point of view, most biogas plants are still operated as so-called “black boxes”. Although they are crucial for the biogas production process, the identities of the microorganisms of the complex ecosystem in the sludge and their interactions are mostly unknown. Changes in the operation of the plant can lead to significant alterations in the composition of the microbial community. Therefore, better knowledge about these complex processes is essential to improve the efficiency and process stability of biogas plants and to reduce the risk of process failure. Early warning indicators for over-acidification based on the chemical composition of the digestate have been developed (Kleyböcker et al. 2012). However, effective warning indicators for foam formation in co-digesters are not currently available. Among other problems, foam formation in anaerobic digesters leads to increased liquid levels that reduce the effective digester volume and block gas tubes (Pagilla et al. 1997, Westlund et al. 1998). Furthermore, it increases costs for anti-foaming agents and personnel as well as reduces the electricity generated from biogas (Barber 2005, Ganidi et al. 2009). A survey of biogas plant operators revealed that 12 out of 15 biogas producers have problems with foam formation in their digesters (Moeller et al. 2012). Excessive foaming can be caused by organic overloading and the subsequent increase of the concentration of volatile fatty acids (Ross and Ellis 1992, Ganidi et al. 2011) or by the introduction of a large amount of hydrophobic materials (Westlund et al. 1998). The formation of foam in wastewater treatment plants (WWTPs) is known to be caused by filamentous bacteria, such as *Gordonia* or *Microthrix* species (Blackall et al. 1988, de los Reyes et al. 2002, Martins et al. 2004, Rossetti et al. 2005). Sewage sludge is widely used as a substrate for anaerobic digesters; thus, large amounts of *Gordonia* spp. and *Microthrix parvicella* can be introduced into the digesters (Pagilla et al. 1997, Westlund et al. 1998, Marneri et al. 2009). Alterations in the microbial community reflect changes of the complex biogas system and might be crucial indicators for foaming in anaerobic digesters. Differences in cell numbers or gene copies of organisms involved in process disturbances can indicate the start of process failure. Molecular biology

approaches, such as genetic fingerprinting, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH), are rapid techniques for monitoring the digestate, especially for indicator organisms. In addition to FISH, which is often used for monitoring the filamentous bacteria in activated sludge systems (de Los Reyes et al. 2002), Kaetzke et al. (2005) and Kumari et al. (2009) established qPCR for monitoring the abundance of *Microthrix parvicella* in WWTPs. This rapid, highly sensitive and reliable DNA-based method is more exact than FISH because incomplete permeability of the cell wall to the probe and low rRNA levels due to low metabolic activity might lead to erroneous quantification results (Kaetzke et al. 2005).

The objective of this study was to identify the reasons for two foam formation events occurring in a sewage sludge and fat, oil and grease (FOG) co-digesting full-scale biogas plant. The plant consisted of four digesters and was run as a cascade of two digesters. Only one of the two downstream digesters that was additionally fed with FOG was affected by foaming. The microbial community composition in the digestates was investigated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and qPCR. The FOG addition and process performance were correlated with changes in the microbial community of the digesters. Furthermore, the microbial community composition was analyzed with respect to the ambient temperature because the digested sewage sludge originated from a WWTP and seasonal changes in the microbial community composition of activated sludge has been shown in previous studies (Eikelboom 1994, Mamais et al. 2006, Kumari et al. 2009).

Material and Methods

Biogas plant scheme

The full-scale biogas plant consisted of four 8000 m³ digesters that were operated mesophilically (Figure 1). Digesters 1 and 3 as well as digesters 2 and 4 were operated in line-forming cascades. Cascade I ran from the upstream digester 1 to the downstream digester 3, and cascade II ran from digester 2 to 4 (Heinzmann and Engel, 2006). The hydraulic retention time of digesters 1 and 2 was approximately 10 days, and the hydraulic retention time of digesters 3 and 4 was approximately 15 days. Digesters 1 and 2 were fed with sewage sludge from a nearby WWTP, and digesters 3 and 4 were charged with the digestates of the upstream reactors. To avoid excessive foaming in wintertime, the organic loading rate (OLR) was reduced to below the regular rate from December to May to 2.5 – 3 kg VS m⁻³ d⁻¹, whereby from June to November, the OLR was raised to 4 – 4.5 kg VS m⁻³ d⁻¹. Digester 3 was additionally fed with FOG from the food industry. From December 2009 to March 2010, approximately 60 – 80 kg FOG m⁻³ digestate were charged. Furthermore, 25 kg FOG m⁻³

digestate were added in April 2010, 10 kg FOG m⁻³ digestate were fed in November 2010 and 2 kg FOG m⁻³ digestate were charged in December 2010. From May to October 2010 as well as in January and February 2011 no FOG was added due to a technical defect. The temperature in the digesters was maintained by heating the substrate before dosage. Online measurements of the plant operators revealed temperatures of 38 – 42 °C in the digesters. A pump was used (800 m³/h) to recirculate the digestate.

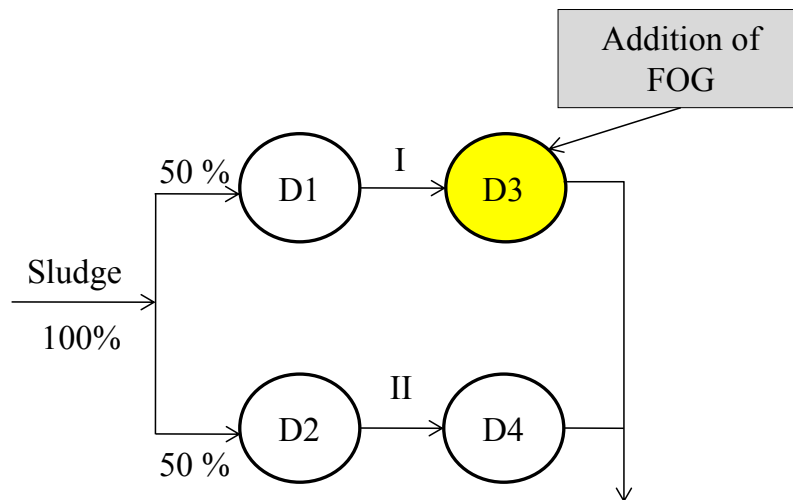


Figure 1: Process scheme for the biogas plant. Cascade I ran from digester 1 to 3 (D1, D3). Cascade II ran from digester 2 to 4 (D2, D4). All digesters were fed with sewage sludge. Digester 3 was additionally charged with FOG. A foam formation event occurred in digester 3 in December 2009 and January 2010.

Sample collection, chemical analyses and DNA extraction

The four digesters of the biogas plant were sampled monthly from September 2009 to February 2011. In December 2009 and January 2010, foaming occurred in the downstream digester 3. From each of these digesters, 1000 ml samples, corresponding to approximately 1000 g, were withdrawn at the outlet of the recirculation pump and additionally at the drain of every reactor. Furthermore, in December 2009, a foam sample was taken directly at the overflow of digester 3. The temperature and pH values of the digestates were measured with a WTW pH 340i, using a Sen Tix 41 pH electrode. The maximum ambient temperature variations were recorded by a nearby weather station (wind.met.fu-berlin.de). For the total solids content (TS) and the volatile solids content (VS) approximately 50 g of the digestates were dried at 105 °C in a Memmert drying chamber for 24 h and then ashed at 550 °C (Nabertherm Controller B170). The weight of the samples was determined using a Sartorius CP220S-OCE laboratory balance (scale ± 0.01 g). The TS and VS were analyzed according to German guideline DIN 38409-1. For the analysis of volatile fatty acids (VFAs) and for DNA

extraction, approximately 60 g of the samples were centrifuged 10 min at 12,857 x g (Eppendorf Centrifuge 5804) to pellet solid substances. Pellets were transferred into 1.5 ml tubes and stored at -20 °C for later DNA extraction. The supernatant was centrifuged again for 10 min at 12,857 x g. In the second supernatant, volatile fatty acids were measured photometrically (Hach-Lange DR2800). To compare the diversity of the microbial community compositions, the total genomic DNA was extracted from approximately 350 mg of the pellets using a commercial DNA isolation kit according to the manufacturer's instructions (MP Fast DNA Spin Kit for Soil).

PCR-DGGE analysis

The partial 16S rRNA genes of the bacterial community were amplified by polymerase chain reaction (PCR) in 50 µl reactions with 1 µl of 1:10 diluted template using the primer pair 341F-GC/907R (Muyzer et al. 1993; Amann et al. 1992) (94 °C 2:45 min, 94 °C 0:45 min, 56 °C 0:45 min, 72 °C 0:50 min, 72 °C 30 min, 40 cycles). Fifty-microliter reactions were mixed containing 5 µl 10x buffer (Genecraft), 6 µl dNTPs (10 mM, Fermentas), 3 µl MgCl₂ (50 mM, Genecraft), 3 µl forward primer (10 mM), 3 µl reverse primer (10 mM), 0.4 µl BSA (20 mg/ml, Fermentas), 0.3 µl Taq polymerase (5 u µl⁻¹, Genecraft), 28.3 µl RNA/DNA-free water (Fermentas) and 1 µl of 1:10 diluted template. Amplicons were subsequently purified using a Fermentas GeneJET PCR Purification Kit.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was performed afterwards with equal concentrations of the amplicons and a gradient of 35 % to 65 % urea and 6 % acrylamide (Biorad DCode System). The DGGE gel was run for 17 hours at 110 V and 60 °C. Bands of interest were excised and transferred into a 0.5 ml tube containing 50 µl of sterile H₂O. The tube was shaken for 1 h at 37 °C. Reamplification was carried out using 4 µl template and the primer pair 341F/907R (94 °C 1:30 min, 94 °C 0:30 min, 56 °C 0:30 min, 72 °C 0:30 min, 72 °C 10 min, 30 cycles). PCR products were purified using the Avegene Gel/PCR DNA fragment extraction kit. DNA concentrations were measured fluorimetrically (BMG Labtech FLUOstar OPTIMA). PCR products were sequenced by GATC Biotech AG. Sequence homologies were examined by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Based on the DGGE profiles, a graphical representation of the bacterial community evenness was developed using Pareto–Lorenz (PL) distribution curves as previously described by Wittebolle et al. (2008). GelQuant.NET software provided by biochemlabsolutions.com was used to determine the band intensities. The band intensities for every DGGE lane were ranked from high to low, and the cumulative band intensities were used as the y-axis. The cumulative normalized number of bands was set as the x-axis. Evaluation of the curves was conducted by

comparison to a vertical 20 % x-axis line. The theoretical perfect evenness line was set as a 45° diagonal.

Quantitative real-time PCR

Quantification of *M. parvicella* was determined by quantitative real-time PCR (qPCR) using the 16S rRNA gene primer set S-S-M.par-0828-S-21/S-S-M.par-1018-A-17 (Kaetzke et al. 2005) (95 °C 10 min, 95 °C 15 sec, 53 °C 20 sec, 72 °C 20 sec) and SYBR Green as the fluorescent dye. All reactions were performed in triplicate. Amplicon length (190 bp) was checked by gel electrophoresis, and PCR products were sequenced. The amplification was carried out in 20 µl reactions containing 1 µl of a 1:100 dilution of extracted DNA, 10 µl SYBR-Green (Applied Biosystems PowerSYBRGreen), 0.5 µl forward primer (10 mM), 0.5 µl reverse primer (10 mM), 0.5 µl BSA (20 mg ml⁻¹ Fermentas) and 7.5 µl RNA/DNA-free water (Fermentas). A standard curve using dilutions of *M. parvicella* PCR products (10⁻³ to 10⁻⁹) was created for absolute quantification. Gene copy numbers of *M. parvicella* 16S rRNA were calculated relative to the standard curve and DNA concentrations (gene copies µl⁻¹ = DNA concentration [g µl⁻¹] / (190 x 660) x 6.022 x 10²³). Melting curve (72 °C to 95 °C) analysis was conducted afterwards to determine the specificity of amplification. The amplification efficiency of the specific qPCR primer set was 98 % with an R² of 0.998 for the standard curve. The melting curve analyses showed one specific peak at 83 °C.

Results and Discussion

This study presents the chemical and molecular biological investigation of a foaming-prone digester in a full-scale biogas plant that failed in operation due to two foaming events. Process performance and the microbial community composition in the sewage sludge and FOG-digesting biogas plant were monitored over a 15-month period including two foam formation events. The FOG co-fermenting digester 3 was termed as a foaming-prone digester by the biogas plant operator, and therefore, this digester was chosen for molecular biological long-term monitoring over one year.

Foam formation related to FOG addition and substrate degradation

Chemical analyses of the digested sludge from December 2009 to February 2011 showed a decrease in TS and VS values between the upstream digesters 1 and 2 and the downstream digesters 3 and 4 (Table 1). While the average TS value in digesters 1 and 2 was approximately 35 g L⁻¹, the TS in the downstream digesters was approximately 32 g L⁻¹. The VS values of digesters 1 and 2 were at 25 g L⁻¹, while the VS values of digesters 3 and 4 were

approximately 22 g L⁻¹. The concentration of volatile fatty acids (VFAs) in digester 3, which was charged with FOG, was at least 17 % higher than in the other digesters, with a value of approximately 790 mg L⁻¹. This was most likely caused by the higher VFA levels in the fed FOG.

Table 1: Digester (D1-D4) performance of the biogas plant. Parameters were measured between December 2009 and February 2011 calculating average values and standard deviations. Total solid content (TS), volatile solid content (VS), volatile fatty acid concentration (VFA). ^aMonths with FOG addition, ^bMonths without FOG addition.

Reactor	pH	TS [g L ⁻¹]	VS [g L ⁻¹]	VFA [g L ⁻¹]
D1	7.2 ± 0.1	35.7 ± 3.1	25.3 ± 1.9	535 ± 113
D2	7.2 ± 0.1	35.0 ± 3.2	24.8 ± 1.9	543 ± 134
D3	7.3 ± 0.1	33.2 ± 2.2	22.5 ± 2.0	790 ^a ± 50 585 ^b ± 50
D4	7.3 ± 0.1	32.1 ± 2.0	21.8 ± 2.0	652 ± 62

Pagilla et al. (1997) and Westlund et al. (1998) identified the accumulation of acetic acid as a foaming cause; however, it was unclear whether the accumulation of VFAs is a cause or the consequence of foaming (Ross and Ellis 1992). FOG addition to the foaming-prone digester was most likely a source of lipids and oleate. Frigon et al. (2006) showed that high lipid-loading rates are a factor for foam promotion in WWTPs, while Boe et al. (2012) observed that the highest potential to create foam in manure digestion systems is due to Na-oleate addition. Remarkably, the addition of FOG in the months of February and March did not provoke foaming; the digester was only affected by FOG addition in December and January. Therefore, the addition of FOG alone did not cause the foam formation in this case.

Microbial community composition

Almost identical diversities in the genetic fingerprints indicated a similar microbial community composition in the four digesters (Figure 2).

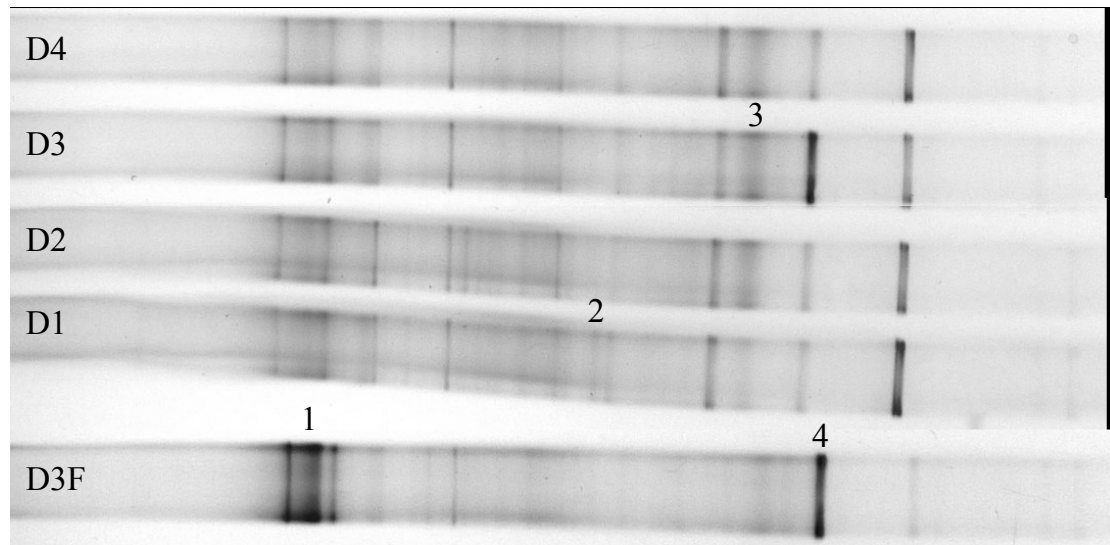


Figure 2: Comparative DGGE-analysis of 16S rRNA gene fragments using bacterial DNA from sludge samples taken from the digesters 1 to 4 (D1-D4) and a foam sample (D3F) taken at digester 3 (D3) of the biogas plant in December 2009. Numbered bands were sequenced. Higher band intensities of *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans* (band 1) and *Candidatus Microthrix parvicella* (band 4) were detected in the foam sample.

Close relatives of the genus *Ruminococcus* and the phylum *Spirochaetes* were identified in the genetic fingerprinting of both cascades (Table 2). Members of the genus *Ruminococcus* are known to ferment cellulose, a typical component of sewage sludge, to acetate in the presence of methanogens (Zhang et al. 2009). A recent study on the physiology of members of the phylum *Spirochaetes* indicated the capability to oxidize acetate syntrophically (Lee et al. 2013). Most likely, the *Spirochaetes* bacteria provide hydrogen for hydrogenotrophic methanogenesis by the oxidation of acetate. Phylogenetic affiliation of the dominant bands revealed sequences assigned to the classes *Proteobacteria* and *Clostridia* in the foaming-prone digester over the one-year monitoring (Figure 3, Table 2), which are typically identified in anaerobic digesters (Regueiro et al. 2012). Furthermore, relatives of *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans* and *Candidatus Microthrix parvicella* were detected in the four digesters. Because the abundance of these microorganisms differed in the foaming digester and foam, they are discussed in detail in the next section.

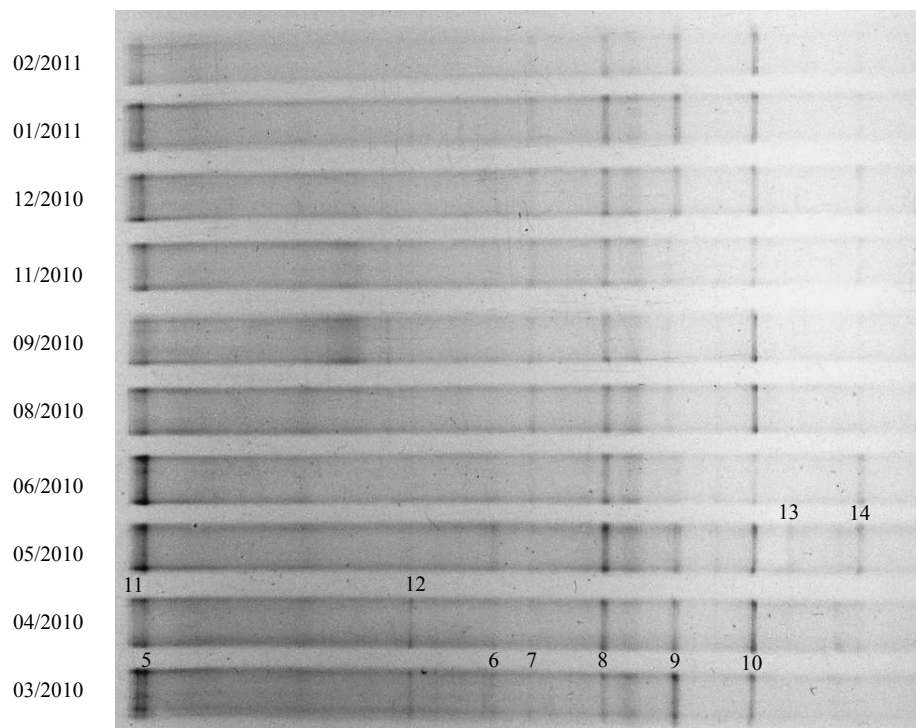


Figure 3: Comparative DGGE-analysis of 16S rRNA gene fragments using bacterial DNA from sludge samples taken from digester 3 (D3) of the biogas plant during a one-year sampling campaign (March 2010 – February 2011). Numbered bands were sequenced. The band intensities of *Candidatus Microthrix parvicella* (band 9) were higher in the wintertime and decreased in the summer.

Table 2: Phylogenetic affiliation of partial bacterial 16S ribosomal RNA gene sequences from DGGE-profiles of sludge samples from the biogas plant.

Band	Closest relative (Reference genbank accession number)	Phylum	Genbank accession number	Similarity
1	<i>Candidatus Cloacamonas acidaminovorans</i> (CU466930.1)	WWE1	KF356037	99 %
2	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (AM748742.1)	Firmicutes	KF356038	98 %
3	Uncultured <i>Spirochaetes</i> bacterium (CU922923.1)	<i>Spirochaetes</i>	KF356039	98 %
4	<i>Candidatus Microthrix parvicella</i> (FJ638889.1)	<i>Actinobacteria</i>	KF356040	99 %
5	Uncultured <i>Firmicutes</i> bacterium (AB780954.1)	<i>Firmicutes</i>	KF356041	89 %
6	Uncultured <i>Deltaproteobacteria</i> bacterium (CU926802.1)	<i>Proteobacteria</i>	KF356042	93 %
7	Uncultured <i>Syntrophaceae</i> bacterium (JX505414.1)	<i>Proteobacteria</i>	KF356043	94 %
8	Uncultured <i>Desulfofabia</i> sp. (GQ183225.1)	<i>Proteobacteria</i>	KF356044	95 %
9	<i>Candidatus Microthrix parvicella</i> (FJ638889)	<i>Actinobacteria</i>	KF356045	97 %
10	Uncultured Unclassified bacterium (CU917887.1)	n.d.	KF356046	95 %
11	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium (CU922385.1)	<i>Bacteroidetes</i>	KF356047	91 %
12	Uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium (JX456421.1)	<i>Firmicutes</i>	KF356048	96 %
13	Uncultured <i>Clostridiales</i> bacterium (JN173135.1)	<i>Firmicutes</i>	KF356049	89 %
14	Uncultured <i>Pelobacter</i> sp. (GU271649.1)	<i>Proteobacteria</i>	KF356050	97 %

The functional organization of the bacterial community in the four digesters (Figure 4a) as well as over the one-year monitoring period (Figure 4b) was analyzed by Pareto-Lorenz distribution patterns. Although the genetic fingerprinting revealed almost the same diversity for both cascades, the band intensities differed between the cascades. In both digesters of cascade I, more than 75 % of the band intensities derived from 20 % of the bands. Therefore, only few bacteria dominated the community in high abundance, whereas the other microorganisms were only present in low abundance. Remarkably, the banding pattern in cascade I did not change in the downstream digester, although FOG was added to this stage. However, the genetic fingerprints showed different intensified bands in digester 3 than in digester 1 that indicated a change in the microbial abundance in the downstream digester. Cascade II showed a different distribution pattern. The microbial community composition of digester 2 was more even than the others, with approximately 50 % of the band intensities derived from 20 % of the microorganisms, whereas the downstream digester 4 was characterized by a more uneven community.

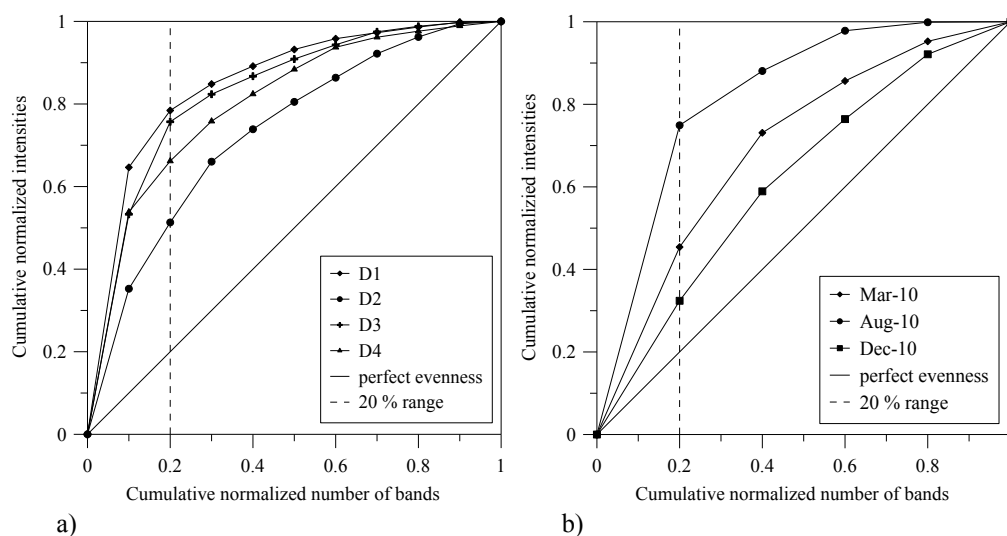


Figure 4: a) Pareto-Lorenz distribution curves based on the DGGE profiles of the digesters 1 to 4 (D1-D4) in December 2009. b) Pareto-Lorenz distribution curves based on DGGE profiles of digester 3 (D3) in the months March 2010, August 2010 and December 2010. Perfect evenness is illustrated as straight line. A dashed vertical line is plotted to evaluate the range of the Pareto value.

In the upstream digester, the availability of organic substrates was higher than in the downstream digester due to previous fermentation in the upstream stage and the residence time. Therefore, other microorganisms prevailed in the first stage. The Pareto-Lorenz distribution over the one-year monitoring period revealed differences in the functional

organization between spring and winter on the one hand and summer on the other hand. The patterns in March and December showed even microbial community compositions with 45 % and 30 % band intensities derived from 20 % of the bands. In contrast, the distribution pattern in August was more uneven, with 75 % of the cumulative band intensity derived from 20 % of the bands. Obviously, the FOG introduction, and thus the higher availability of lipids, in March and December influenced the microbial ecosystem so that more bacteria co-dominated in the digester. Furthermore, the lower temperatures in the spring and winter months most likely affected the bacterial composition in the fed sewage sludge; therefore, a more evenly distributed microbial population was introduced to the digester than in the summer.

Microbial community composition related to foam formation

Using the universal bacterial 16S rRNA gene primer pair, DGGE bands with higher intensities indicating a greater abundance of *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans* were detected in the foam (Figure 2). Genome sequencing of this strain revealed genes for amino acid fermentation and degradation of proteins (Pelletier et al. 2008). Because high protein concentrations are known to promote foaming, *C. acidaminovorans* might serve as indicator for high protein concentrations. However, the physiology of this organism has not been studied so far, and the protein concentrations in the foam were not measured in the present study so that our assumptions regarding an indicator function of *C. acidaminovorans* were not supported.

In addition, the highest DGGE band intensities of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella* were detected in the digestate of the foaming digester and in the foam itself indicating higher abundance (Figure 2). Previous studies in anaerobic digesters have already shown the involvement of *M. parvicella* in foam formation (Pagilla et al. 1997, Westlund et al. 1998, Marneri et al. 2009). In addition to forming a filamentous network, relatives of *M. parvicella* have a hydrophobic cell surface and thus a strong affinity towards the air/liquid interface. Biogas bubbles are trapped by the filaments carrying the microorganism at the surface of the digester, thus stabilizing the foam (Westlund et al. 1998). Furthermore, hydrophobic substances are released by *M. parvicella* that also stabilize the foam (Barber et al. 2005). Since another foam causing bacterium such as *Gordonia* spp. was not detected by DGGE analyses as being a dominant member of the microbial community, the focus of this study was on the investigation of digester foaming caused by *M. parvicella*. Absolute quantification using qPCR and the *M. parvicella* specific 16S rRNA gene primer set showed the highest *M. parvicella* 16S rRNA gene copy numbers per μg DNA in digester 3 during the foam formations, with values of more than 2×10^8 (Figure 5). Therefore, the specific qPCR

results supported the previous DGGE analyses with the universal bacterial 16S rRNA gene primer pair.

The DGGE band intensity as well as the 16S rRNA gene copy numbers, which serve as a quantitative measure of *M. parvicella* abundance, changed during the year and showed the highest abundance of *M. parvicella* in wintertime (Figure 3, Figure 5). The ambient temperatures showed an opposing trend to the gene copy numbers. With increasing temperatures, the abundance of *M. parvicella* decreased and vice versa. Between June and September, the maximum ambient temperature measured at the nearby weather station reached a value of more than 25 °C, while the 16S rRNA gene copy numbers per µg DNA decreased by a factor of 10-100 to less than 1×10^6 . With the decrease in temperatures from September to November, the 16S rRNA gene copies per µg DNA increased again to more than 1×10^7 . The same seasonal trend with increasing *M. parvicella* gene copy numbers in the wintertime was detected for the incoming feed of the biogas plant. At this, in March, the 16S rRNA gene copy number per µg DNA amounted to 2.0×10^8 and decreased in September to 6.6×10^5 . In November, the abundance of *M. parvicella* increased by a factor of 40, rising further to 2.9×10^8 16S rRNA gene copies per µg DNA by February.

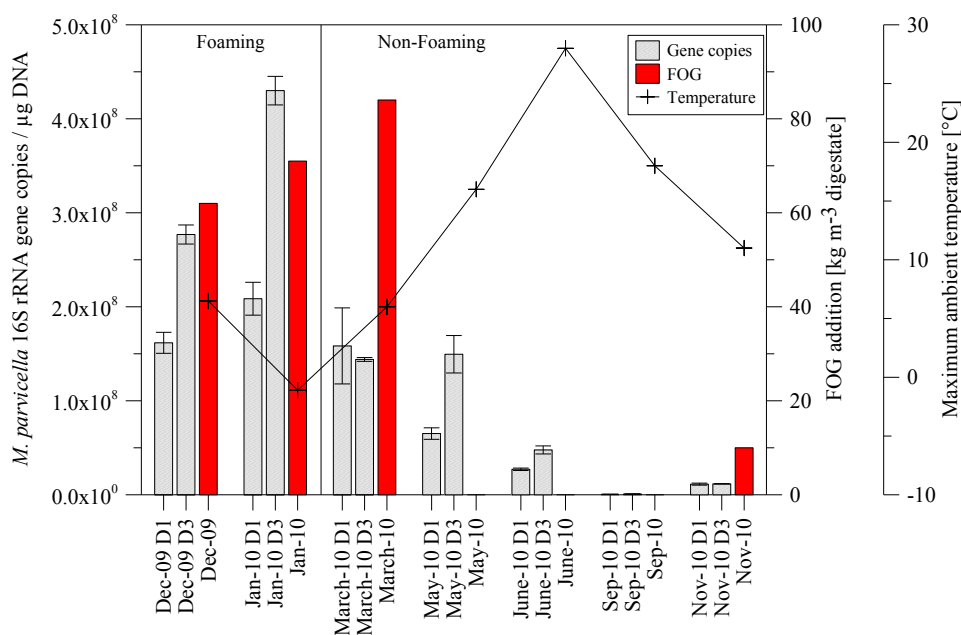


Figure 5: Abundance of *Microthrix parvicella* based on the 16S rRNA gene in sludge samples taken at digester 1 (D1) and digester 3 (D3) of the biogas plant from December 2009 to November 2010 with respect to FOG addition and maximum ambient temperatures.

Several studies showed the influence of temperature on the abundance of *M. parvicella* in activated sludge (Eikelboom 1994, Mamais et al. 2006, Kumari et al. 2009). Foam formation

in sludge digesters mostly occurred in the winter and spring months, when the abundance of *M. parvicella* in the incoming sewage sludge was high due to its low temperature optimum and its high affinity for LCFA. In consequence, higher amounts of *M. parvicella* were introduced to the digesters in the winter season. Mamais et al. (2006) observed a positive correlation between the presence of fatty acids and the amount of *M. parvicella* during the winter periods in WWTP. Under aerobic, anaerobic and anoxic conditions, *M. parvicella* is able to store long chain fatty acids (LCFAs) as a carbon and energy source (Nielsen et al. 2002, Noutsopoulos et al. 2012).

However, because the upstream digesters 1 and 2 that were directly charged with the sewage sludge and the second downstream digester were not affected by foam formation, it is assumed that the FOG addition to digester 3 also favored foam formation. The dependence on foam-stabilizing materials and the abundance of filamentous bacteria with respect to foaming were also shown by Marneri et al. (2009). The comparatively low abundance of *M. parvicella* in the non-foaming month of March 2010 was consistent with a lowered foam formation risk. Only if FOG was added and the abundance of *M. parvicella* exceeded a threshold of 2×10^8 16S rRNA gene copies per μg DNA, as in December 2009 and January 2010, foam formation occurred. The *M. parvicella* threshold of 2×10^8 16S rRNA gene copies per μg DNA was shown to exceed the foaming threshold for mycolata in activated sludge treatment plants, which was given as 2×10^6 mycolata cells per ml liquor (Davenport et al. 2008). Furthermore, the absolute threshold of the present study complements the relative results of Kaetzke et al. (2005) and Kumari et al. (2009) on activated sludge that showed that even a relative *M. parvicella* population of 3-4 % might cause foaming problems.

Indication of anaerobic growth of *Microthrix parvicella*

The investigated biogas plant was operated as a cascade of two digesters. During the foam formations, the digestates of digester 3 showed a 71 % increase in *M. parvicella* 16S rRNA gene copy numbers in December 2009 and a 106 % increase in *M. parvicella* 16S rRNA gene copy numbers in January 2010 in relation to the upstream digester 1 of cascade I (Figure 5). *M. parvicella* was characterized as being able to reduce nitrate only to nitrite (Slijkhuis et al. 1983; Nielsen et al. 2002), and recently, genome sequencing of *M. parvicella* revealed a nitrate reductase but not a nitrite reductase (Muller et al. 2012). The foaming downstream digester was assumed to be nitrate depleted due to a preceding denitrifying step in the WWTP and the upstream digester. However, higher band intensities in the genetic fingerprinting as well as the increased *M. parvicella* specific 16S rRNA gene copy numbers in the downstream digester of the cascade indicated anaerobic growth, since microbial growth leads to higher

amounts of DNA and gene copy numbers, respectively. Chacin et al. (1994) also showed that the growth of *M. parvicella* was possible in the complete absence of molecular oxygen or inorganically bound oxygen. However, it is unclear what metabolism was involved. It has to be taken into consideration that DNA studies deliver no direct information about microbe viability and that even inactive *M. parvicella* cells may promote foaming (de Los Reyes et al. 2002). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) might have been useful in this case, but it was shown that qPCR is more exact for quantification because an incomplete permeability of the cell wall and low rRNA levels due to low metabolic activity might lead to erroneous measurements (Kaetzke et al. 2005). Furthermore, it has to be considered that the effect of the hydraulic retention time as well as short cuts in the digesters might also result in a higher *M. parvicella* abundance in the downstream digester. However, increased gene copy numbers were determined in the downstream digester 3 in January 2010 compared to the upstream digester 1 in December 2009, which was the feedstock of digester 3. Thus, if anaerobic growth did not take place, digester 3 would have shown the same abundance of *M. parvicella* in January 2010 as digester 1 in December 2009. In addition, besides the foaming events, increased 16S rRNA gene copy numbers of *M. parvicella* were also detected in the downstream digester in May, June, September and November 2010. Compared to the upstream digester 1, the *M. parvicella*-specific gene copies per μg DNA in the downstream digester 3 increased by 130 % in May, by 75 % in June, by 50 % in September and by 2 % in November (Figure 5). Therefore, a retention time effect as a cause for an increased abundance of *M. parvicella* in the downstream digester can be excluded.

Conclusions

Mesophilic digesters that are fed with activated sludge rich in *M. parvicella* ($>2 \times 10^8$ gene copies per μg DNA) are prone to intensive foam formation if the digesters are additionally loaded with FOG. In this case, the abundance of *M. parvicella* was shown to increase in the downstream digester of a cascade by a factor of 2. The indication of growth of the filamentous organism in the digester warrants further elucidation. As a matter of early warning, the operator can monitor the abundance of *M. parvicella* in the incoming feed in addition to the amount of FOG introduced.

Acknowledgements

The authors wish to thank the German “Federal Ministry for the Environment, Nature and Nuclear Safety” for funding the project “Optgas” (FKZ 03KB018), the plant operator for the collaboration and the Microbial GeoEngineering group at the GFZ in Potsdam for their

valuable help in the analytical work. Willy Verstraete was supported by the MRP Biotechnology for a sustainable economy (01 MRA 510 W).

References

- Amann, R., Stromley, J., Devereux, R., Key, R., Stahl, D.A., 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 614–623
- Balussou, D., Kleyböcker, A., McKenna, R., Möst, D., Fichtner, W., 2011. An economic analysis of three operational co-digestion biogas plants in Germany. *Waste Biomass. Valor.* 3, 23–41.
- Barber, W., 2005. Anaerobic digester foaming: Causes and solutions. *Water* 21, 7.1, 45-49.
- Blackall, L.L., Habers, A.E., Greenfield, P.F., Hayward, A.C., 1988. Actinomycete scum problems in Australian activated-sludge plants. *Water Sci. Technol.* 20, 493–495
- Boe, K., Kougias, P.G., Pacheco, F., O-Thong, S., Angelidaki, I., 2012. Effect of substrates and intermediate compounds on foaming in manure digestion systems. *Water Sci. Technol.* 66, 2146-54.
- Chacin, E., Kocianova, E., Forster, C.F., 1994. Foam Formation, Anaerobiosis and *Microthrix parvicella*. *Water Environ. J.* 8, 534–537.
- Davenport, R.J., Pickering, R.L., Goodhead, A.K., Curtis, T.P., 2008. A universal threshold concept for hydrophobic mycolata in activated sludge foaming. *Water Res.* 42, 3446-54.
- de los Reyes, F.L. 3rd, Rothauszky, D., Raskin, L., 2002. Microbial community structures in foaming and nonfoaming full-scale wastewater treatment plants. *Water Environ. Res.* 74, 437-49.
- Eikelboom, D.H., 1994. The *Microthrix parvicella* puzzle. *Water Sci. Tech.* 29, 271-279.
- Frigon, D., Guthrie, R.M., Bachman, G.T., Royer, J., Bailey, B., Raskin, L., 2006. Long-term analysis of a full-scale activated sludge wastewater treatment system exhibiting seasonal biological foaming. *Water Res.* 40, 990-1008.
- Ganidi, N., Tyrrel, S., Cartmell, E., 2009. Anaerobic digestion foaming causes-a review. *Bioresour. Technol.* 100, 5546-54
- Ganidi, N., Tyrrel, S., Cartmell, E., 2011. The effect of organic loading rate on foam initiation during mesophilic anaerobic digestion of municipal wastewater sludge. *Bioresour. Technol.* 102 12, 6637–6643.
- Heinzmann, B., Engel, G., 2006. Two-Stage High Rate Digestion and Phosphorus Recovery. Proceedings of the IWA Specialist Conference – Sustainable Sludge Management: State of the Art, Challenges and Perspectives. Moscow, Russia, 435-441.

- Kaetzke, A., Jentsch, D., Eschrich, K., 2005. Quantification of *Microthrix parvicella* in activated sludge bacterial communities by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 207–211
- Kleyböcker, A., Liebrich, M., Verstraete, W., Kraume, M., Würdemann, H., 2012. Early warning indicators for process failure due to organic overloading by rapeseed oil in one-stage continuously stirred tank reactor, sewage sludge and waste digesters. *Bioresour. Technol.* 123, 534-41.
- Kumari, S.K.S., Marrengane, Z., Bux, F., 2009. Application of quantitative RT-PCR to determine the distribution of *Microthrix parvicella* in full-scale activated sludge treatment systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 1135-1141
- Lee, S.H., Park, J.H., Kang, H.J., Lee, Y.H., Lee, T.J., Park, H.D., 2013. Distribution and abundance of *Spirochaetes* in full-scale anaerobic digesters. *Bioresour. Technol.* doi: 10.1016/j.biortech.2013.02.070.
- Mamais, D., Nikitopoulos, G., Andronikou, A., Noutsopoulos, C., Giotakis, C., Tsimarakis, S., 2006. Influence of the presence of long chain fatty acids (LCFAs) in the sewage on the growth of *Microthrix parvicella* in activated sludge wastewater treatment plants. *Global NEST J.* 8, 82–88.
- Marneri, M., Mamais, D., Koutsiouki, E., 2009. *Microthrix parvicella* and *Gordonia amarae* in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion systems. *Environ. Technol.* 14;30, 437-44.
- Martins, A., Pagilla, K., Heijnen, J., van Loosdrecht, M., 2004. Filamentous bulking sludge—a critical review. *Water Res.* 38, 793–817.
- Moeller, L., Goersch, K., Neuhaus, J., Zehnsdorf, A., Mueller, R.A., 2012. Comparative review of foam formation in biogas plants and ruminant bloat. *Energy Sustainability Soc.* 2, 12.
- Muller, E.E.L., Pinel, N., Gillece, J.D., Schupp, J.M., Price, L.B., Engelthaler, D.M., Levantesi, C., Tandoi, V., Luong, K., Baliga, N.S., Korlach, J., Keim, P.S., Wilmesa, P., 2012. Genome Sequence of “*Candidatus Microthrix parvicella*” Bio17-1, a Long-Chain-Fatty-Acid-Accumulating Filamentous Actinobacterium from a Biological Wastewater Treatment Plant. *J. Bacteriol.*, 194, 6670-6671.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Nielsen, P.H., Roslev, P., Dueholm, T., Nielsen, J.L., 2002. *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic – aerobic activated sludge plants. *Water Sci. Technol.* 46, 73–80.

- Noutsopoulos, C., Mamais, D., Andreadakis, A., Stams, A., (2012) A hypothesis on *Microthrix parvicella* proliferation in biological nutrient removal activated sludge systems with selector tanks. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 380-9.
- Pagilla, K.R., Craney, K.C., Kido, W.H., 1997. Causes and effects of foaming in anaerobic sludge digesters. *Water Sci. Technol.* 36, 463–470.
- Pelletier, E., Kreimeyer, A., Bocs, S., Rouy, Z., Gyapay, G., Chouari, R., Rivière, D., Ganesan, A., Daegelen, P., Sghir, A., Cohen, G.N., Médigue, C., Weissenbach, J., Le Paslier, D., 2008. “*Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*”: Genome Sequence Reconstruction Provides a First Glimpse of a New Bacterial Division. *J. Bacteriol.* 190, 2572-2579.
- Regueiro, L., Veiga, P., Figueroa, M., Alonso-Gutierrez, J., Stams, A.J.M., Lema, J.M., Carballa, M., 2012. Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiol. Res.* 167, 581-589.
- Ross, R.D., Ellis, L.A.M., 1992. Laboratory-scale investigation of foaming in anaerobic digesters. *Water Environ. Res.* 64, 154–162.
- Rossetti, S., Tomei, M.C., Nielsen, P.H., Tandoi, V., 2005. ‘*Microthrix parvicella*’, a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 49–64
- Slijkhuis, H., 1983. *Microthrix parvicella*, a Filamentous Bacterium Isolated from Activated Sludge: Cultivation in a Chemically Defined Medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 832-839.
- Weiland, P., 2010. Biogas production: Current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 849-860.
- Westlund, A.B., Hagland, E., Rothman, M., 1998. Foaming in anaerobic digesters caused by *Microthrix parvicella*. *Water Sci. Technol.* 37, 51-55.
- Wittebolle, L., Vervaeren, H., Verstraete, W., Boon, N., 2008. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 286–293.
- Zhang, H., Banaszak, J.E., Parameswaran, P., Alder, J., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., 2009. Focused-Pulsed sludge pre-treatment increases the bacterial diversity and relative abundance of acetoclastic methanogens in a full-scale anaerobic digester. *Water Res.* 43, 4517-26.

8.4 Moderate temperature increase leads to disintegration of floating sludge and lower abundance of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella* in anaerobic digesters

Vierte Veröffentlichung: Erschienen 2014 in Water Research, 65, 203-212.
doi:10.1016/j.watres.2014.07.019

Autoren: Tobias Lienen¹, Anne Kleyböcker¹, Willy Verstraete², Hilke Würdemann¹

¹Helmholtz Centre Potsdam GFZ German Research Centre for Geosciences, Telegrafenberg,
14473 Potsdam, Germany

²LabMET, Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium

Abstract

Filamentous bacteria such as *Microthrix parvicella* can cause serious foaming and floating sludge problems in anaerobic digesters fed with sewage sludge. The sewage sludge and oil co-fermenting laboratory-scale biogas digesters in this study were fed with substrates from a foaming-prone full-scale biogas plant containing the filamentous bacterium *M. parvicella*. At 37 °C, in both pneumatically mixed digesters a highly viscous and approximately 3 cm thick floating sludge was observed. A gradual increase of the temperature from 37 °C to 56 °C led to a significant decrease in the floating sludge thickness, which correlated with a strong decrease in the abundance of *M. parvicella* in the digestate. Furthermore, the stepwise temperature increase allowed for an adaption of the microbial community and prevented process failure. The study indicates that already a moderate temperature increase from 37 °C to 41 °C might help to control the *M. parvicella* abundance in full-scale biogas plants.

Keywords

Biogas digester, floating sludge, *Microthrix parvicella*, temperature increase, DGGE, qPCR

List of abbreviations

DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; Early warning indicator; EWI; FOG, fat, oil and grease; GPR, gas production rate; PCR, polymerase chain reaction; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; LCFA, long chain fatty acid; TS, total solids; VFA, volatile fatty acid; VS, volatile solids; WWTP, wastewater treatment plant

Introduction

The growth of filamentous bacteria in activated sludge from wastewater treatment plants (WWTPs) and the subsequent usage of the sludge as a substrate for anaerobic digestion can cause serious foaming and floating sludge problems (Westlund et al., 1998a) with enormous consequential costs (Barber, 2005). Several studies on activated sludge treatment systems have described microorganisms that affected foaming. In particular, the filamentous bacterium Candidatus *Microthrix parvicella* (Blackall et al., 1996) was found to be involved in foaming and bulking (Eikelboom, 1975, Blackbeard et al., 1986; Martins et al., 2004). *M. parvicella* was characterized as a microaerophilic bacterium with the capability to store lipids as carbon and energy source as well as to reduce exclusively nitrate to nitrite and no further (Slijkhuis et al., 1988; Tandoi et al., 1998; Nielsen et al., 2002; Muller et al., 2012). In contrast, another study has reported that *M. parvicella* was capable of performing complete denitrification (Wanner and Grau, 1988). Several countermeasures against the growth of *M. parvicella* have been tested in WWTPs whereas their use was not sufficiently evaluated in anaerobic digesters. The usage of polyaluminum chloride in activated sludge (Nielsen et al., 2005) was shown to inhibit the lipase activity and therefore the substrate uptake of *M. parvicella* was blocked. Additionally, a slight increase in the sludge loading rate (Schade and Lemmer, 2002) seemed to reduce the growth of *M. parvicella* in activated sludge. Furthermore, Schade and Lemmer (2002) recommended limiting the introduction of long-chain fatty acids (LCFAs) to reduce the advantage of *M. parvicella* due to its storage capacity for LCFA under anaerobic conditions. As a pre-treatment of the activated sludge prior to entering the anaerobic digesters, filamentous structures were successfully reduced by heating the sewage sludge to 121 °C for 60 min in an autoclave; on the other hand, enzymatic pre-treatment with the enzyme carbohydrase and a mechanical pre-treatment with a high-pressure homogenizer did not succeed in reducing the filamentous structures (Barjenbruch et al., 2003). Furthermore, the relationship between temperature and the abundance of *M. parvicella* in WWTPs has been demonstrated in a number of publications. Kumari et al. (2009) observed an increase in *M. parvicella* population in activated sludge systems during the winter and spring seasons and smaller populations in the summer. Knoop and Kunst (1998) demonstrated the elimination of *M. parvicella* filaments in activated sludge by increasing the temperature from 12 °C to 20 °C. With regard to anaerobic digestion, in a previous study we showed decreases in *M. parvicella* abundance in a full-scale biogas plant during the summer months, whereas the high foaming potential during the winter was related to a higher abundance of *M. parvicella* as well as the introduction of fat, oil and grease (FOG) as co-substrates (Lienen et al., 2014). Furthermore, Marneri et al. (2009) observed higher destruction of the filamentous

structures in anaerobic digesters under thermophilic conditions (55 °C) compared to mesophilic conditions (35 °C).

Studies in laboratory-scale experiments with anaerobically operated digesters mostly address over-acidification and the degradation of LCFAs (Sousa et al., 2008; Kleyböcker et al., 2012; Baserba et al., 2012). However, due to the difficulties to simulate exactly the conditions present in full-scale biogas plants laboratory studies concerning foaming and floating sludge in biogas digesters are still limited.

The goal of the current study was to mimic the failure of a full-scale biogas plant and to study the effect of temperature on *M. parvicella* using quantitative PCR (qPCR). The objective was to test whether an increase in temperature is an effective countermeasure against floating sludge formation in sewage sludge and oil co-fermenting biogas digesters. Microbial diversity shifts and the abundance of *M. parvicella* were related to the increase in temperature and process performance. Furthermore, an early warning indicator (EWI) representing the ratio of the concentrations of volatile fatty acids (VFA) and calcium (Ca) in the digestate, which was developed in former studies by Kleyböcker et al. (2012) to prevent overacidifications, was tested to evaluate the process performance.

Material and methods

Laboratory-scale biogas digesters

Two laboratory-scale digesters D1 and D2 (Figure 1 modified to Kleyböcker et al., 2012) operated in parallel were each charged with 23 L of digested sludge of a foaming-prone full-scale biogas plant rich in *Microthrix parvicella* (Genbank accession number KF356040), which was fed sewage sludge and fat, oil and grease (FOG) separator waste and which was formerly affected by *M. parvicella* promoted foam formation (for a detailed description, see Lienen et al., 2014). The sludge in D1 and D2 was mixed pneumatically using biogas with a flow of 150 L h⁻¹ each day for 15 min after the substrates were introduced. For biogas recirculation, a KNF N86KTE membrane pump was used. Sewage sludge (1.4 – 1.8 kg VS m⁻³ d⁻¹) and sunflower oil (0.9 kg VS m⁻³ d⁻¹) were chosen as substrates in D1 and D2. The sewage sludge was characterized by a pH of 5 and volatile fatty acid (VFA) concentrations of 3300 mg L⁻¹ to 6500 mg L⁻¹. The total solids (TS) values fluctuated between 38 g kg⁻¹ and 56 g kg⁻¹ and the volatile solids (VS) values varied between 32 g kg⁻¹ and 40 g kg⁻¹. The sewage sludge was stored at 4 °C in the refrigerator until use and was heated in the microwave for approximately 5 min at 800 watt until a value of 37 °C was reached before being added. The temperature of the added sewage sludge was kept at 37 °C during the temperature increase to avoid a possible influence of excessive microwave radiation on the abundance of *M.*

parvicella. Sunflower oil was chosen as the co-substrate because of its degradability to LCFAs. The digesters were heated by an electric heater around the digesters. The adaptation phase from the digester start-up until biogas formation was stable of the two digesters lasted approximately seven months. However, due to a longer adaptation phase needed for stable process performance after the start-up of the reactor D2, the operation of D2 started 6 weeks later than in D1 and it was firstly fed by oil on day 20.

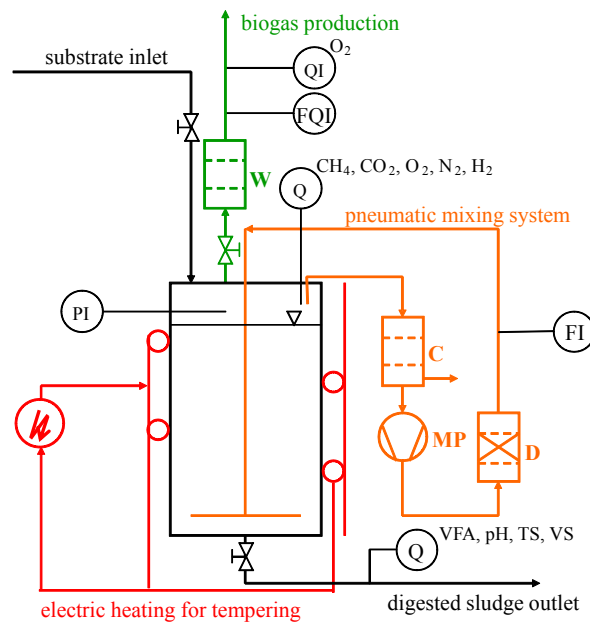


Figure 1: Laboratory-scale reactor scheme: condensate collector (C), membrane pump (MP), drying tower (D), wash bottle (W), quality (Q, if leading letter), quantity (Q, if non-leading letter), indicating (I), flow (F), pressure (P) (modified to Kleyböcker et al., 2012).

Floating sludge appeared in D1 and D2 at 37 °C. To avoid the growth of aerobic floating sludge forming filamentous bacteria caused by oxygen introduction, D1 and D2 were only opened at the beginning and at the end of the experiment to measure the floating sludge thickness. The oxygen levels in the biogas were controlled by gas chromatography, and no oxygenation was detected over the experimental time. The effect of temperature on the floating sludge consistence was investigated by increasing the temperature gradually every week by 1 °C from 37 °C to 56 °C over 137 days in D1 and from 37 °C to 47 °C over 87 days in D2. Due to a technical defect, the experiment in D2 was stopped at a temperature of 47 °C. The retention time of the digested sludge was approximately 23 days.

From each digester, 1,000 ml of sludge were sampled every day from the lower outlet of the digester. For the analysis of TS and VS, the samples were dried at 105 °C for 24 h in a Memmert drying chamber and then ashed at 550 °C (Nabertherm Controller B170). The

weight of the samples was determined using a Sartorius CP220S-OCE balance (scale \pm 0.01 g). The TS and VS were analyzed according to the German guideline DIN 38409-1. For the VFA, calcium (Ca) and DNA extraction, the samples were centrifuged 10 min at 10,000 rpm to pellet the solid substances. The pellets were transferred into 1.5 ml tubes and stored at -20 °C until DNA extraction. The supernatant was centrifuged again for 10 min at 10,000 rpm. The VFA and Ca concentrations were quantified photometrically (Dr. Lange LCK 365 and LCK327, Hach-Lange DR2800) from the second supernatant. Furthermore, an early warning indicator (EWI) was determined in the digestates of D1 and D2 and in the floating layer of D2. The EWI is defined by the ratio of the concentration of VFA and the Ca concentration. The produced biogas volume was measured using a Ritter gas meter (TG05/5). Gas samples were taken at a bypass of the biogas pipes and analyzed by gas chromatography (SRI 8610C; SRI Instruments). The gas chromatograph was equipped with a thermal conductivity detector, a silica gel column and a 13x mol sieve column (SRI, USA). The carrier gas was argon and the analyzed gas components were hydrogen, oxygen, nitrogen, methane and carbondioxide.

DNA extraction

Genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from 350 mg of digestate from D1 and D2 using a commercial DNA isolation kit according to the manufacturer's guidelines (MP Fast DNA Spin Kit for Soil).

PCR-DGGE analysis

To investigate the microbial diversity during the temperature experiments three different samples from D1 of day 0 (37 °C), day 89 (47 °C) and day 137 (56 °C) were analyzed. Partial 16S rRNA genes from bacteria and methanogenic archaea were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer pair 341F-GC/907R (Muyzer et al., 1993; Amann et al., 1992) for bacteria (94 °C for 2:45 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 0:45 min, 56 °C for 0:45 min, and 72 °C for 0:50 min, followed by 72 °C for 30 min) and the primer pair 348F-GC/786R (Sawayama et al., 2004) for the methanogenic archaea (94 °C for 2:45 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 0:45 min, 56 °C for 0:45 min, and 72 °C for 0:50 min, followed by 72 °C for 10 min). PCR was performed in 50 μ l reactions containing 5 μ l of 10x buffer (Genecraft), 6 μ l of dNTPs (10 mM, Fermentas), 3 μ l of MgCl₂ (50 mM, Genecraft), 3 μ l of forward primer (10 mM), 3 μ l of reverse primer (10 mM), 0.4 μ l of BSA (20 mg/ml, Fermentas), 0.3 μ l of Taq polymerase (5 u/ μ l, Genecraft), 28.3 μ l of RNA/DNA-free water (Fermentas) and 1 μ l of 1:10 diluted template DNA. Amplicons were subsequently purified (Fermentas GeneJET PCR Purification Kit). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

was performed using equal concentrations of amplicons and a gradient of 35 % to 65 % urea and 6 % to 9 % acrylamide was used for the bacterial samples and a gradient of 40 % to 75 % urea and 6 % to 9 % acrylamide was used for the methanogenic archaea samples using the Biorad DCode System.

The DGGE gels were run for 17 hours at 110 V and 60 °C. The gel bands were excised and reamplified using the primer pairs mentioned above (94 °C for 1:30 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 0:30 min, 56 °C for 0:30 min, 72 °C for 0:30 min, followed by 72 °C for 10 min). The PCR products were purified using the Fermentas GeneJET PCR Purification Kit. The concentrations of the amplicons were measured fluorimetrically (BMG Labtech FLUOstar OPTIMA) by labeling the DNA with Quant-iT PicoGreen (Invitrogen). The PCR products were sequenced by GATC Biotech AG. Sequence homologies were checked using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Based on the DGGE profiles, a graphical representation of the bacterial community evenness was prepared using Pareto–Lorenz (PL) distribution curves as previously described by Wittebolle et al. (2008). The GelQuant.NET software, provided by biochemlabsolutions.com, was used to determine the band intensities. The band intensities for every DGGE lane were ranked from high to low, and the cumulative band intensities were used as the y-axis values. The cumulative normalized number of bands was used as the x-axis values. Evaluation of the curves was conducted by comparing the samples to a vertical 20 % x-axis line. The theoretical perfect evenness line was set as the 45° diagonal.

Quantitative real-time PCR

The abundance of *M. parvicella* was determined by quantitative real-time PCR (qPCR) using the primer set S-S-M.par-0828-S-21/S-S-M.par-1018-A-17 (Kaetzke et al., 2005) for the *M. parvicella* 16S rRNA gene (95 °C for 10 min, followed by 95 °C for 15 sec, 53 °C for 20 sec, and 72 °C for 20 sec), and SYBR Green (Applied Biosystems Power SYBR Green) was used as a fluorescent dye. The amplicon length (160 bp) was checked by gel electrophoresis, and the PCR products were sequenced to confirm their identity. The amplification was carried out in 20 µl reactions containing 1 µl of 1:100 diluted extracted DNA, 10 µl of SYBR-Green (Applied Biosystems PowerSYBRGreen), 0.5 µl of forward primer (10 mM), 0.5 µl of reverse primer (10 mM), 0.5 µl of BSA (20 mg/ml Fermentas) and 7.5 µl of RNA/DNA-free water (Fermentas). Reactions were performed in triplicate. The specificity of the primer pair was checked by sequencing analysis. A standard curve using dilutions of *M. parvicella* PCR products (10^{-3} to 10^{-9}) was created for absolute quantification. Gene copy numbers of *M. parvicella* 16S rRNA were calculated relative to the standard curve and DNA

concentrations using the following equation: $\text{gene copies}/\mu\text{l} = x \text{ g}/\mu\text{l} / [160 \times 660] \times 6.022 \times 10^{23}$. Melting curve (72 °C to 95 °C) analysis was conducted to check the specificity of the amplification. The amplification efficiency of the specific qPCR primer set was 98 % with an R^2 value of 0.998. The melting curve analyses showed one specific peak at 83 °C. The number of 16S rRNA gene copies was related to g of digestate and it is further called gene copies.

Results

Floating sludge thickness and chemical analyses

At 37 °C, the floating sludge in both pneumatically mixed digesters was highly viscous and approximately 3 cm thick. After increasing the temperature to 56 °C in D1, the floating sludge had completely vanished, and the thickness was below 1 mm. In D2, the thickness of the floating sludge at 47 °C was approximately 0.7 mm, which corresponded to a 75 % reduction in thickness.

The digestates of D1 were characterized by average TS values of 47 g kg^{-1} and VS values of 34 g kg^{-1} at 37 °C (Figure 2). After a temperature increase to 56 °C, both values decreased by 40 %. The TS and VS values of digester D2 increased after the first addition of oil from day 20 on, reaching concentrations of 38 g kg^{-1} TS and 26 g kg^{-1} VS (Figure 2). From 40 °C to 47 °C, TS and VS remained at 35 g kg^{-1} and 25 g kg^{-1} , respectively. The gas production rate (GPR) of D1 ranged from 1.7 to 2.9 L h^{-1} during the experiment, while the GPR of D2 maintained an average of 1.0 L h^{-1} until day 20 and it doubled after the start of co-digestion by the daily addition of oil (Figure 3). During a slow temperature rise from 38 °C to 43 °C within 7 weeks, the VFA concentrations in D1 decreased from $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ by a factor of two (Figure 3). A further temperature increase from 43 °C to 47 °C within almost 4 weeks led to an increase in VFA concentration to 800 mg L^{-1} , ending at a concentration of $1,000 \text{ mg L}^{-1}$ at 56 °C. The VFA concentrations in D2 showed the same trend as D1, but the values were lower (Figure 3). In digester D1 at 37 °C and 38 °C, the EWI, representing the ratio of VFA and Ca concentrations, showed values up to 60 (Figure 4). While the temperature was increased from 39 °C to 49 °C, the EWI decreased by a factor of 4 and remained between 10 and 20. Above a temperature of 49 °C, the EWI increased constantly to a final value of 60 at 56 °C. In digester D2, the EWI mainly remained in the range between 10 and 20 during the temperature increase from 37 °C to 47 °C and increased only slightly over 20 during three times. However, the EWI in the floating sludge in digester D2 was more than 10 times higher than in the digestate.

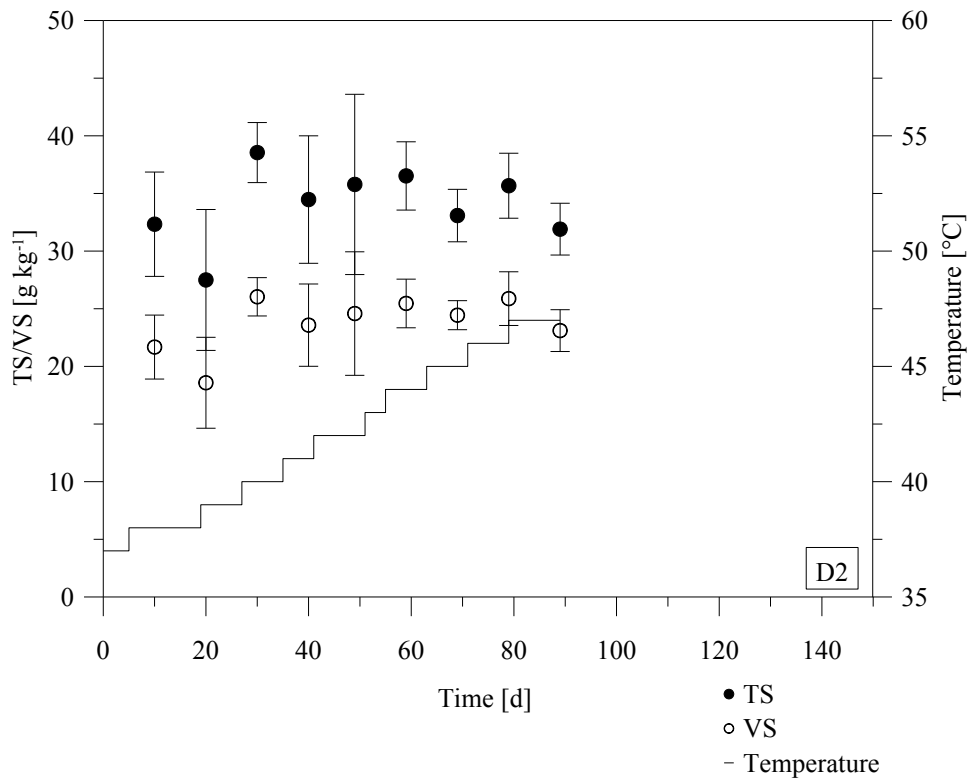
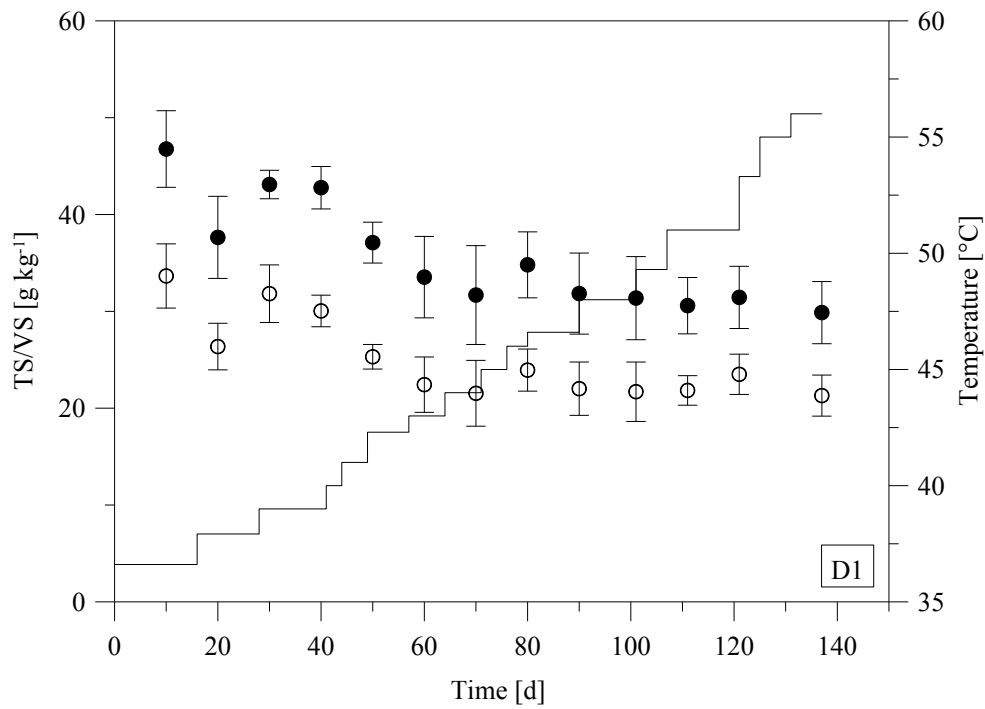


Figure 2: Total solids (TS) and volatile solids (VS) in relation to the temperature increase over time in digesters D1 and D2. Each data point represents the average of 10 days. Decrease in TS and VS values in relation to the increase in temperature during the first 60 days in D1 and constant values afterward. TS and VS values in D2 increased after daily oil addition from day 20 on.

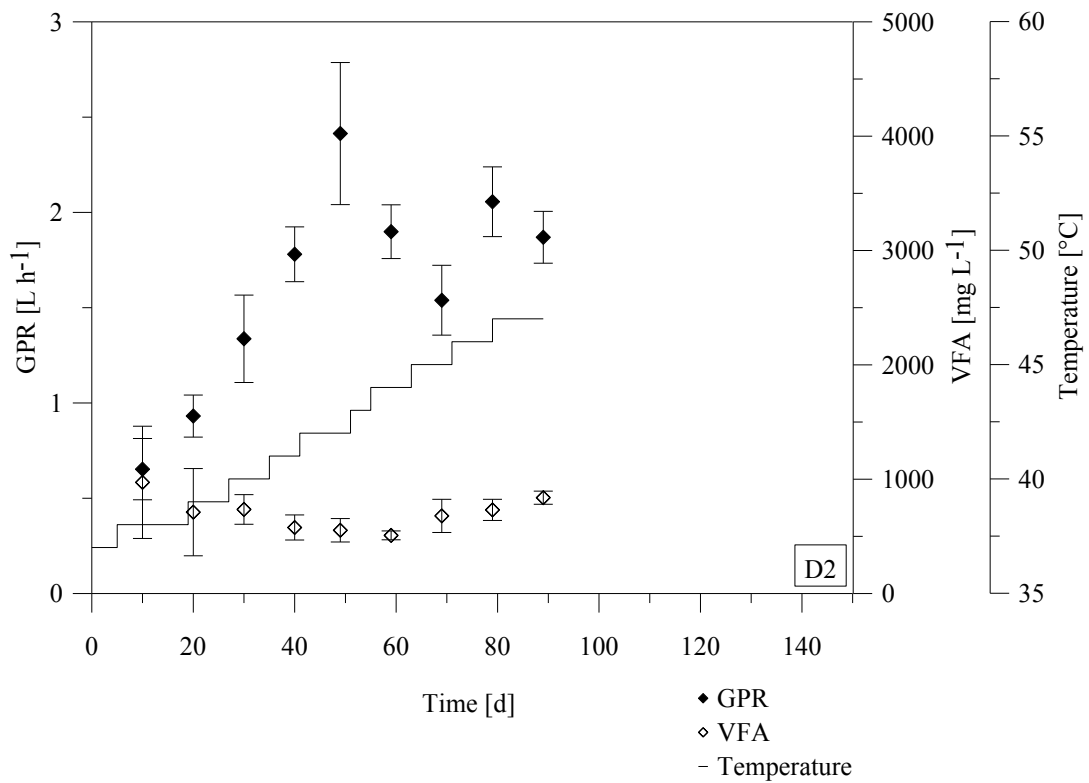
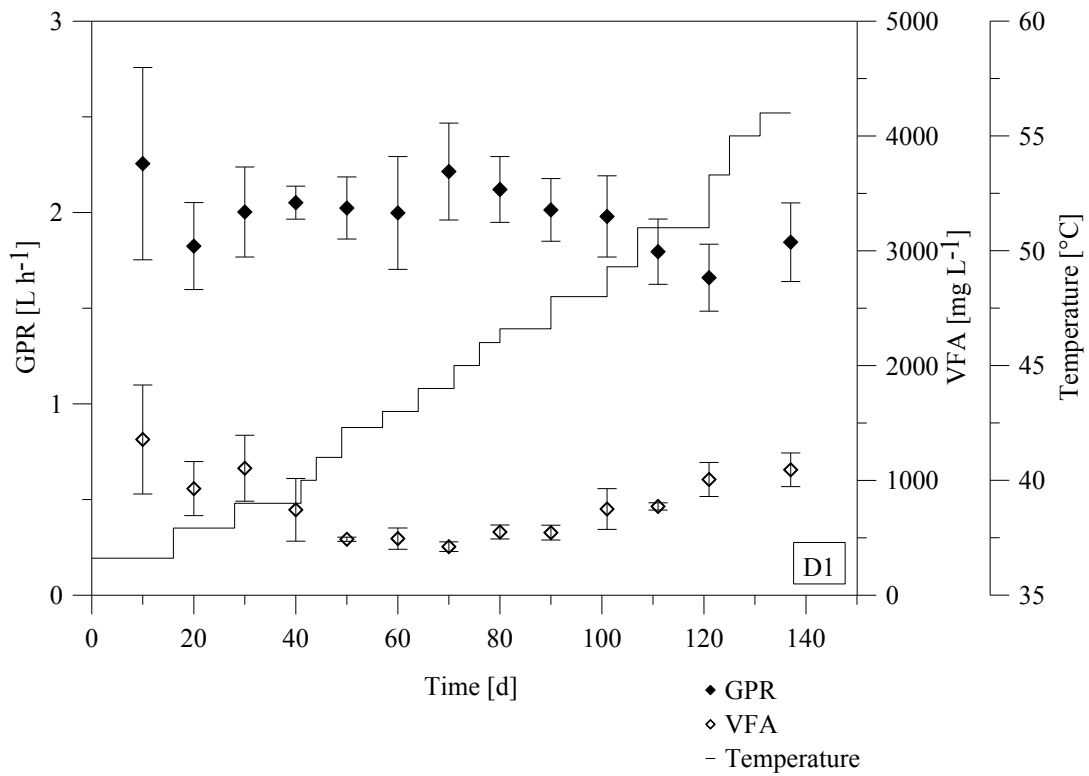


Figure 3: Volatile fatty acids (VFA) and gas production rate (GPR) in relation to the increase in temperature in digesters D1 and D2. Each data point represents the average of 10 days. GPR in D2 increased after daily oil addition from day 20 on.

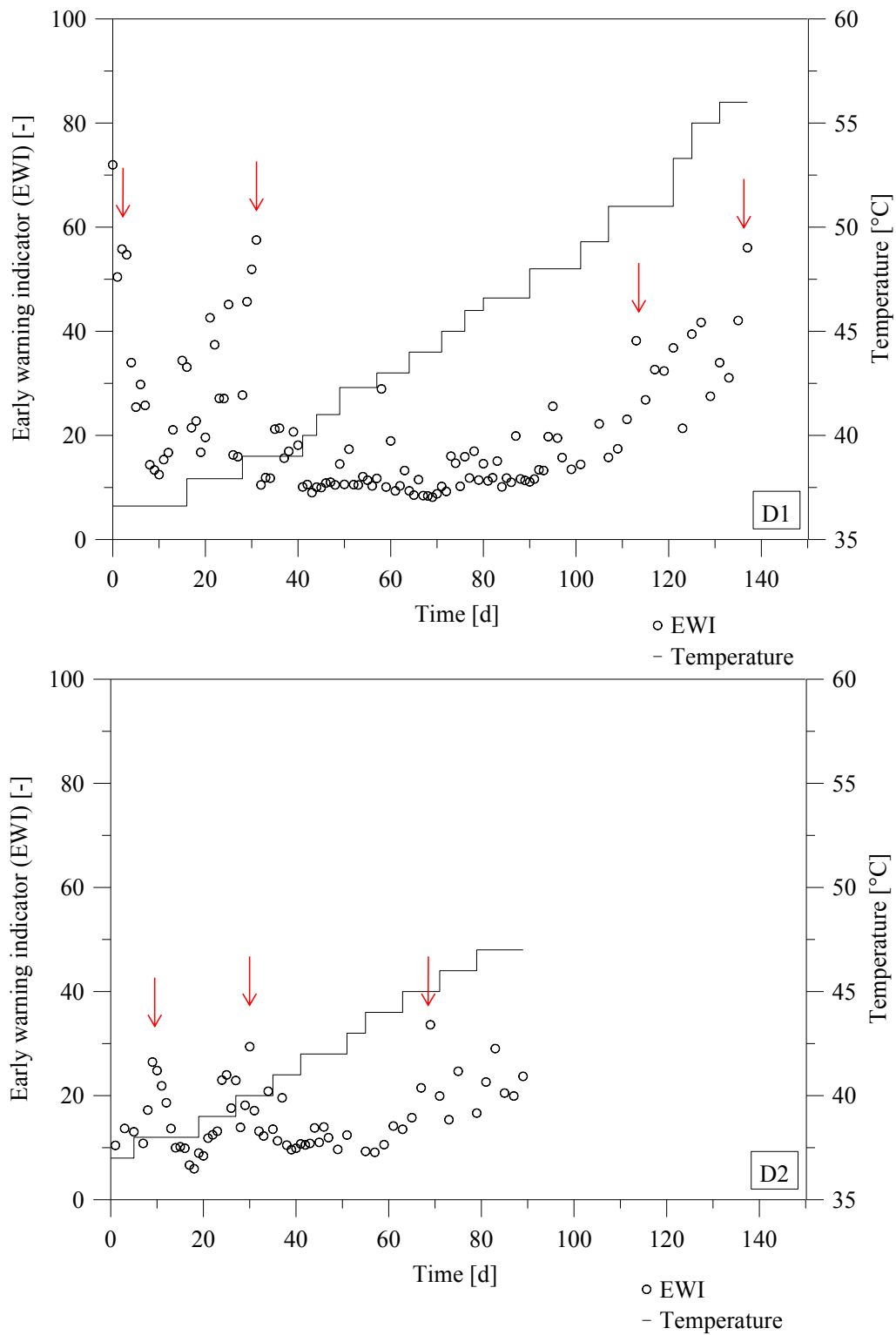


Figure 4: Early warning indicator (EWI) during temperature increase: in digester D1, the EWI showed high values during the first 30 days and increased again starting on day 110. In digester D2, the EWI remained at a low level. Warning of the indicator is illustrated by red arrows.

Microbial community composition during the temperature increase

Genetic fingerprinting analysis revealed differences in the DGGE band patterns but similar taxonomic bacterial groups during the temperature increase from 37 °C to 56 °C in D1 (Figure 5a). The results of sequencing of the dominant bands are summarized in table 1. The reamplification and identification of the other bands of interest failed.

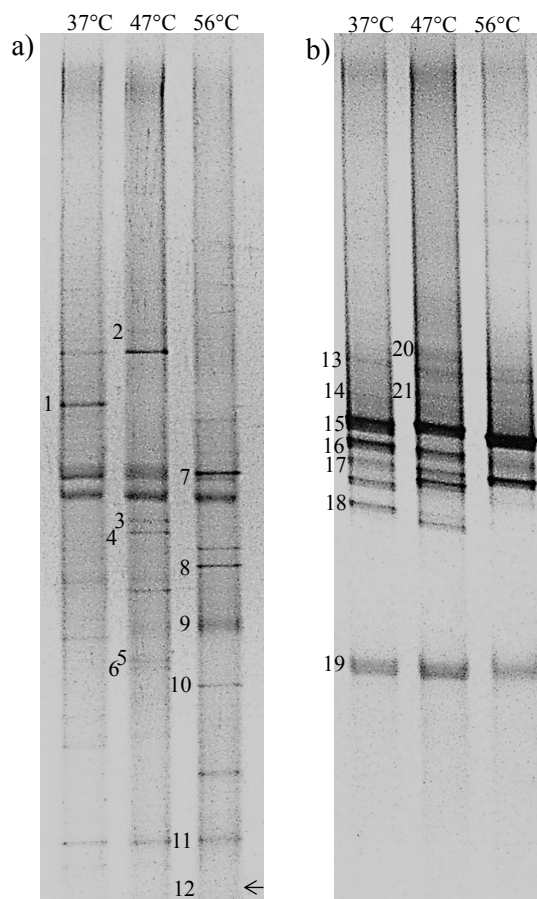


Figure 5: D1: DGGE profiles of bacteria (a) and methanogenic archaea (b): alterations in the band pattern during the increase in temperature. Sequenced bands are labeled with numbers. The taxonomic affiliation is shown in table 1. Weak band number 12 is labeled by black arrow.

Most of the detected bacterial sequences were assigned to the class *Clostridia*, belonging to the phylum *Firmicutes*. Phylogenetic affiliation of the bacterial partial 16S rRNA gene sequences showed members of the family *Syntrophomonadaceae* at 47 °C and 56 °C. A microorganism of the family *Thermotogaceae* was detected at 47 °C and 56 °C with increasing band intensity at 56 °C. Sequences assigned to the genera *Bacillus* and *Coprothermobacter* were found at all temperatures, whereas, *Anaerobaculum mobile* was detected exclusively at 56 °C. The Pareto-Lorenz distribution pattern at the three temperatures showed similar patterns for 37 °C and 47 °C (Figure 6). The microbial community was dominated by only a few microorganisms, which accounted for more than 50 % of the

community's band intensity. The distribution pattern at 56 °C showed slight differences compared to the other temperatures, indicating a more even microbial community with 40 % dominant bacteria.

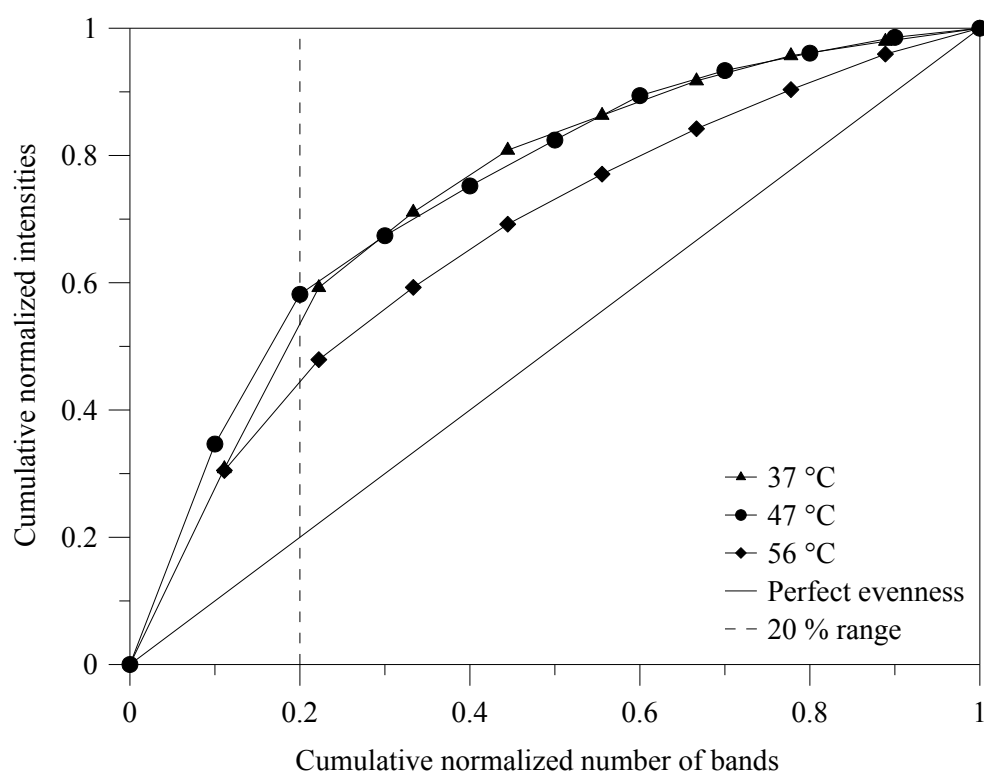


Figure 6: D1: Pareto-Lorenz distribution curves based on bacterial DGGE profiles at 37 °C, 47 °C and 56 °C. Perfect evenness is illustrated as a straight line. The dashed vertical line was plotted to evaluate the range of the Pareto value. Similar patterns for 37 °C and 47 °C were detected, while the Pareto-Lorenz distribution showed a more even bacterial community at 56 °C.

Changes in the methanogenic community were observed exclusively at 56 °C (Figure 5b). At all temperatures, partial 16S rRNA gene sequences from acetoclastic and hydrogenotrophic methanogens were detected. The methanogens were affiliated with the acetoclastic genus *Methanosaeta*, the facultative acetoclastic genus *Methanosarcina* and the hydrogenotrophic methanogenic genera *Methanoculleus* and *Methanospirillum*. The band intensity of a *Methanoculleus bourgensis* affiliated organism became weaker at 56 °C. Furthermore, a *Methanospirillum*-like organism was not detected at temperatures above 47 °C.

Table 1: Sequencing of partial 16S rRNA genes retrieved from DGGE fingerprints. Taxonomic assignment was performed using NCBI's BLAST tool. n.d., not determined.

Band ID	Closest relatives	Phylum	Genbank accession number	Similarity
1	Uncultured bacterium (KC747796.1)	n.d.	KJ561285	99%
2	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium (AB603834.1)	<i>Bacteroidetes</i>	KJ561286	99%
3	Uncultured <i>Clostridium</i> sp.(AY330125.1)	<i>Firmicutes</i>	KJ561287	95%
4	<i>Ruminococcaceae</i> bacterium (JN656278.1)	<i>Firmicutes</i>	KJ561288	91%
5	Uncultured <i>Syntrophomonas</i> sp. (KC502886.1)	<i>Firmicutes</i>	KJ561289	96%
6	Uncultured <i>Clostridia</i> bacterium (AB669236.1)	<i>Firmicutes</i>	KJ561290	92%
7	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. (HQ183761.1)	<i>Firmicutes</i>	KJ561291	98%
8	Uncultured bacterium (HQ453299.1)	n.d.	KJ561292	91%
9	<i>Thermotogaceae</i> bacterium (FR850164.1)	<i>Thermotogae</i>	KJ561293	99%
10	Uncultured <i>Syntrophomonadaceae</i> bacterium (JN173140.1)	<i>Firmicutes</i>	KJ561294	91%
11	<i>Coprothermobacter</i> sp. (AB630185.1)	<i>Firmicutes</i>	KJ561295	100%
12	<i>Anaerobaculum mobile</i> (CP003198.1)	<i>Synergistetes</i>	KJ561296	99%
13, 14	Uncultured <i>Methanosarcinales</i> archaeon (AB721088.1)	<i>Euryarchaeota</i>	KJ561297, KJ561298	92-93%
15	<i>Methanosarcina thermophila</i> (KC203046.1)	<i>Euryarchaeota</i>	KJ561299	96%
16, 19	<i>Methanoculleus bourgensis</i> (JN413087.1)	<i>Euryarchaeota</i>	KJ561300, KJ561303	95-99%
17	<i>Methanoculleus receptaculi</i> (NR_043961.1)	<i>Euryarchaeota</i>	KJ561301	98%
18	<i>Methanospirillum</i> sp. (AJ133792.1)	<i>Euryarchaeota</i>	KJ561302	98%
20, 21	<i>Methanosaeta concilii</i> (AB679168.1)	<i>Euryarchaeota</i>	KJ561304, KJ561305	98%

Abundance of the filamentous *M. parvicella* during the temperature increase

The absolute quantification of the filamentous bacterium *M. parvicella* by qPCR revealed significant decreases in *M. parvicella* abundance in D1 and D2 after the temperature was increased (Figure 7). In D1, the 16S rRNA gene copies amounted to approximately 6×10^5 until the temperature was increased to 39 °C; subsequently, the gene copies decreased to half of their former level. When the temperature was increased further to 43 °C, the *M. parvicella* abundance decreased to approximately 1×10^5 gene copies and remained at this low level till the temperature was increased onward to 56 °C. Similar to the results of D1, the *M. parvicella* 16S rRNA gene copies in D2 also strongly decreased with increasing temperatures (Figure 7). In this digester, the gene copies amounted to 3×10^6 at day 11. After increasing the temperature to 41°C, the gene copies dropped by 80 % and remained at a level of approximately 7×10^5 until day 87 at 47 °C.

Strong variations in *M. parvicella* abundance were detected in the fed sewage sludge, with values varying between 3×10^5 and 4×10^6 16S rRNA gene copies (data not shown). The gene copies in the floating sludge of both digesters collected before the temperature increase yielded in average values of 2×10^7 (data not shown).

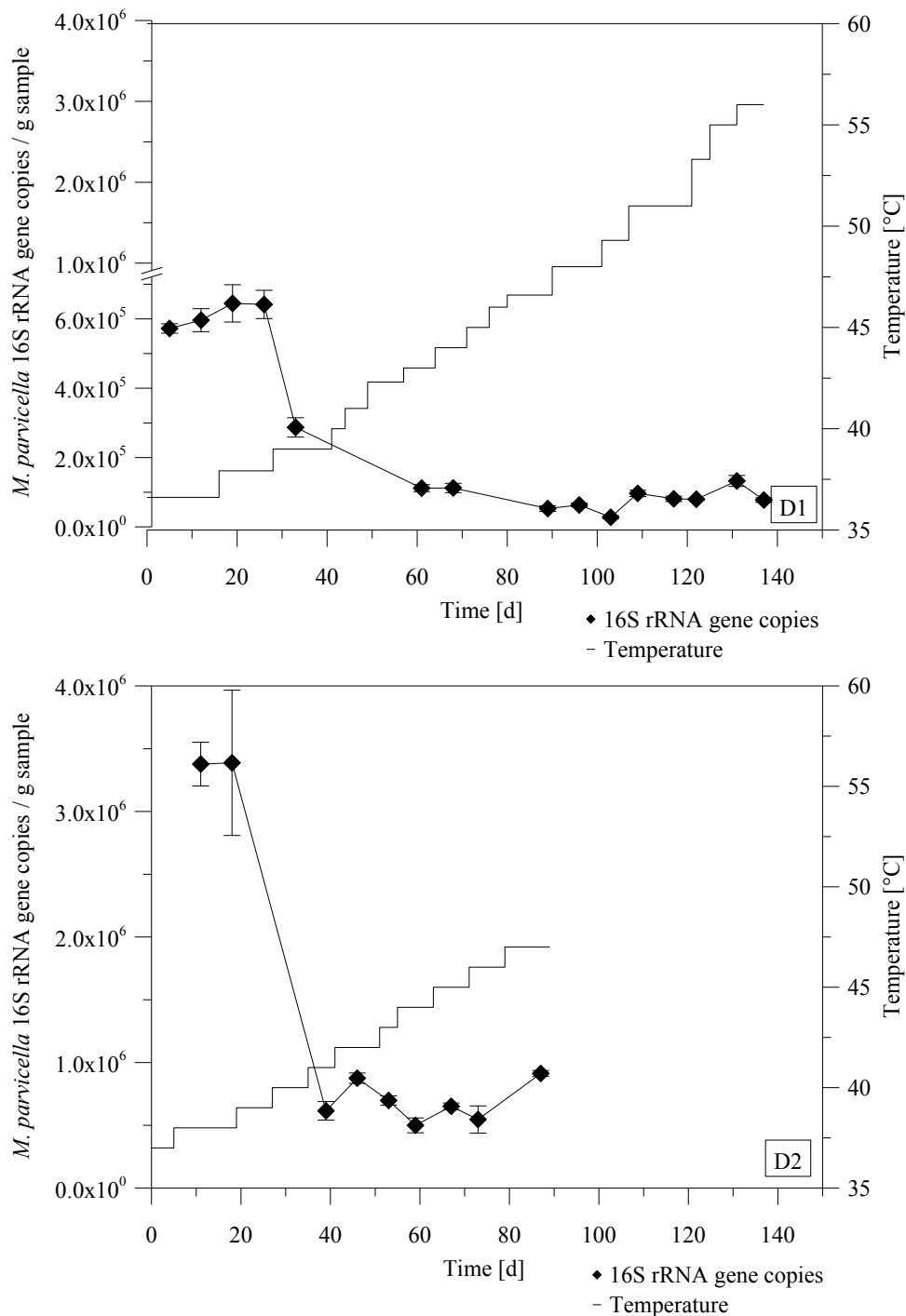


Figure 7: Quantification of *M. parvicella* in D1 and D2 in relation to the increase in temperature. 16S rRNA gene copy number per g of digestate decreased with increasing temperatures. In D1, a 6-fold decrease was detected at 43 °C. In D2, a decrease of about 10-fold was observed once the temperature was increased to 41 °C.

Discussion

Process performance during increase in temperature

The effects of temperature increase on floating sludge formations were studied in laboratory-scale experiments performed over a period of 140 days in two co-fermenting biogas digesters. While D1 showed a 40 % decrease in TS and VS concentrations when the temperature

increased, this was not observed in D2. The differences in the TS and VS values in both digesters were attributed to changes in the TS and VS contents in the fed sewage sludge (data not shown). The operation of D1 started six weeks before D2 was started and the TS and VS values in the fed sewage sludge were higher at this time, leading to higher concentrations in the digester. However, both digesters showed similar trends in VFA concentrations. At the beginning of the experiment, the VFA contents were high and decreased with rising temperature. Subsequently, the VFA increased again while the biogas yield was still unaffected. Most likely due to the temperature increase from mesophilic to thermophilic conditions, some of the VFA degrading microorganisms needed to adapt to the new conditions; therefore less organic acids were consumed, and the VFA concentrations increased slightly but without causing an over-acidification and breakdown of the biogas production. Moreover, the 4-fold higher values of the EWI at the beginning of the experiment in D1 indicated an imbalance in the process of biogas formation. However, from day 30 on at a temperature of 39 °C, the EWI remained at a low level indicating a stable process, even though the temperature was further increased. When the temperature exceeded 49 °C, the EWI also increased and indicated the beginning of a process imbalance. Yet, the GPR did not decrease, and the process did not fail until the end of the experiment. In experiment D2, the EWI showed only slight imbalances in the process of biogas formation, which lasted only one to three days, indicating that the process remained stable. In contrast, the value for the EWI in the floating layer was 10 times higher than in the digestate of both digesters. Since the EWI has been used up to now only to detect over-acidifications in the digestate (Kleyböcker et al., 2012), this time, it also indicated a disturbance in the floating sludge in which the VFA concentration and the calcium concentration were by a factor 4 higher and a factor 3 lower than in the digestate, respectively. Because the floating layer was on the top of the digestate, it did not interact with the digestate and the process did not cease at all. However, the high VFA content in the floating sludge was a hint that a part of the sunflower oil was held back by the floating sludge and thus was not converted to biogas efficiently.

Temperature influence on changes of the microbial community

The Pareto-Lorenz distribution pattern indicated only slight differences in the microbial community composition at temperatures between 37 °C and 56 °C. Especially at 56 °C, a more even community structure and less dominant species were observed. In particular, members of the *Firmicutes* phylum belonging to the *Clostridiaceae* and *Syntrophomonaceae* families were detected. The high availability of oil might have promoted their presence in this study. Accordingly, Baserba et al. (2012) observed a dominance of *Firmicutes* bacteria in

anaerobic digestion processes with high contents of long chain fatty acids. In addition, members of *Clostridiaceae* and *Syntrophomonaceae* were shown to be involved in the degradation of long chain fatty acids (Sousa et al., 2008). In the present study, *Coprothermobacter* and *Bacillus* were detected during the complete temperature range from 37 °C to 56 °C. In accordance, *Coprothermobacter* was shown to grow between 35 °C and 65 °C (Etchebehere et al., 1998), and the genus *Bacillus* was characterized by a temperature range from 31 °C to 76 °C (Warth, 1978). Corresponding to the findings of Menes and Muxi (2002) that determined an optimal growth temperature of 55 °C to 60 °C, an *Anaerobaculum mobile* affiliated organism was only detected at 56 °C. The dominance of *Firmicutes* bacteria is also in accordance with the results from our investigation at a full-scale biogas plant, as the digestate of this plant was used to start-up the laboratory-scale digesters studied here. Besides the phylum *Firmicutes*, the phyla *Proteobacteria* and *Actinobacteria* were additionally detected at the full-scale biogas plant (Lienen et al., 2014). Although the laboratory-scale experiments were operated with the same sludge and temperature as the full-scale biogas plant, differences between the microbial communities developed. Most likely the microbial community adapted to the different feeding and mixing conditions in the laboratory-scale digesters in the seven month period before the temperature experiment started, thus leading to the altered genetic fingerprinting pattern compared to the full-scale biogas plant. While the full-scale biogas plant was mixed using an eccentric screw pump, the laboratory-scale digester was mixed pneumatically, and different mixing conditions may have an influence on the microbial community composition. Accordingly, in another study, we observed that the microbial communities of two previous equally operated biogas reactors differed significantly after the stirring was completely disrupted in one reactor and the other reactor was only partly stirred (Lienen et al., 2013).

The methanogenic community only varied slightly over the temperature range from 37 °C to 56 °C. Moreover, the stable GPR indicated constant methanogenic activity over the temperature increase. Apparently, the identified methanogenic members of the genera *Methanosarcina*, *Methanosaeta* and *Methanoculleus* adapted to the smooth temperature increase, while methanogens of the genus *Methanospirillum* were no longer detected at 56 °C. However, Bourque et al. (2008) observed growth of *Methanospirillum* at thermophilic temperatures. It can be speculated that in the present study the other methanogens outcompeted *Methanospirillum* at 56 °C. Furthermore, the band intensity of the *Methanoculleus bourgensis* affiliated organism decreased at 56 °C. This corresponds to the observed temperature range for optimum growth of *Methanoculleus bourgensis* between 37 °C and 45 °C (Asakawa and Nagaoka, 2003).

Temperature influence on the abundance of *M. parvicella*

The *M. parvicella* abundance was amounted to 5×10^5 to 3×10^6 gene copies by qPCR indicating a 10-100-fold lower abundance than in our previous study at the full-scale biogas plant (Lienen et al., 2014). One reason for the initially lower abundance in the laboratory-scale experiment may be the storage of the sewage sludge for one to two weeks prior to the experiment. Another reason could be that *M. parvicella* accumulated in the floating sludge, as indicated by the 10-fold higher 16S rRNA gene copy numbers. The accumulation most likely occurred because of the smooth mixing in the digester using a pneumatic device, and therefore the filamentous bacterium *M. parvicella* was enriched at the surface of the sludge, promoting the formation of floating sludge. Increasing the temperature led to a decrease of *M. parvicella*, and this correlated with a reduced floating layer. Remarkably, the presence of *M. parvicella* was already strongly repressed after a temperature increase from 37 °C to 39 °C in D1 or after an increase from 37 °C to 41 °C in D2. Our recent study in a full-scale biogas plant (Lienen et al., 2014) has shown that temperature has a significant influence on the distribution of *M. parvicella* showing a higher abundance in the winter. In pure culture studies, Slijkhuis (1983) determined an optimum temperature for *M. parvicella* of 25 °C. Another study on activated sludge systems demonstrated growth in long filaments at temperatures ≤ 12 °C to 15 °C, and they observed fragmentation of the *M. parvicella* filaments from a length of 300 μm at 12 °C to a length of 30-80 μm at 20 °C. It was assumed that, compared to the long filaments, the short filaments do not influence the sludge settleability negatively (Knoop and Kunst, 1998). However, the anaerobic system investigated here was affected by floating sludge although the temperature was maintained at 37 °C. Obviously, the *M. parvicella* filaments were still long at this temperature, and they were only fragmented after the temperature increased further to 39 °C in D1 and to 41 °C in D2. The present study indicates that anaerobic digesters being operated at temperatures above 40 °C repress the abundance of *M. parvicella*. This is in accordance with Marneri et al. (2009) who demonstrated also the destruction of *M. parvicella* filaments under thermophilic conditions at 55 °C. Westlund et al. (1998a, 1998b), as well as Barjenbruch and Kopplow (2003), suggested heating the incoming sewage sludge for 5 min at 70 °C or 60 min at 121 °C, respectively, to prevent foaming in anaerobic digesters. Dohanyos et al. (2004) postulated that thermophilic digestion at 55 °C was more resistant to foam formation than mesophilically operated digesters. However, running the anaerobic digester thermophilically is less efficient in terms of energy consumption, whereas running the biogas plant at a constant temperature of approximately 41 °C might be more efficient.

Mesophilic vs. thermophilic operation in anaerobic digesters

The results revealed that mesophilically and thermophilically operated reactors cannot be clearly differentiated concerning the organic matter degrading microbial community. In contrast to the work of Donoso-Bravo et al. (2009), which showed that a temperature increase from 37 °C to 40 °C negatively affected acidogenesis and subsequent methanogenesis, our results indicate that a smooth transition from mesophilic operation at 37 °C to thermophilic operation at 55 °C enables a stable biogas production. Reasons might be a diverse microbial community composition with a methanogenic community that is characterized by a high temperature range. Accordingly, a gradual transition from 37 °C to 55 °C, in which only minor instabilities in volatile fatty acid accumulation were detected, was also shown in anaerobic digestion experiments with high palm oil mill effluent loading rates (Choorit and Wisarnwan, 2007). Furthermore, Boušková et al. (2005) also performed a successful stepwise transition from mesophilic (37 °C) to thermophilic (55 °C) operation in an anaerobic digester treating sewage sludge.

Conclusions

Increasing the temperature moderately from 37 °C to 41 °C was an appropriate countermeasure against the formation of floating sludge in pneumatically mixed sewage sludge and oil co-fermenting biogas digesters. The filamentous bacterium *Microthrix parvicella* causing foam and bulking was negatively influenced by a temperature increase of about 4 K, which resulted in a decrease in the floating sludge layer. Taken into account that most biogas plants produce excess heat when the biogas is converted into electricity, a moderate temperature increase in mesophilically operated digesters might be a promising option to prevent foam and floating sludge formation.

Acknowledgements

The Authors wish to thank the German “Federal Ministry for the Environment, Nature and Nuclear Safety” for funding the project “Optgas” (FK 03KB018) and the Microbial GeoEngineering group at the GFZ in Potsdam for their valuable help in the analytical work. Willy Verstraete was supported by the MRP Biotechnology for a sustainable economy (01 MRA 510W).

References

Amann, R., Stromley, J., Devereux, R., Key, R., Stahl, D.A., 1992. Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. Applied

- and Environmental Microbiology 58, 614–623.
- Asakawa, S., Nagaoka, K., 2003. *Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus olentangyi* and *Methanoculleus oldenburgensis* are subjective synonyms. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53 (5), 1551-1552.
- Barjenbruch, M., Kopplow, O., 2003. Enzymatic, mechanical and thermal pre-treatment of surplus sludge. Advances in Environmental Research 7, 715–720.
- Baserba, M.G., Angelidaki, I., Karakashev, D., 2012. Effect of continuous oleate addition on microbial communities involved in anaerobic digestion process. Bioresource Technology 106, 74-81.
- Blackall, L.L., Stratton, H., Bradford, D., Del Dot, T., Sjorup, C., Seviour, E.M. and Seviour, R.J., 1996. “*Candidatus Microthrix parvicella*”, a filamentous bacterium from activated sludge sewage treatment plants. International Journal of Systematic Bacteriology 45, 186–187.
- Blackbeard, J.R., Ekama, G.A., Marais, G.V.R., 1986. A survey of filamentous bulking and foaming in activated sludge plants in South Africa. Water SA 14 (1), 29–34.
- Bourque, J.S., Guiot, S.R., Tartakovsky, B., 2008. Methane Production in an UASB Reactor Operated Under Periodic Mesophilic–Thermophilic Conditions. Biotechnology and Bioengineering 100 (6), 1115-1121.
- Boušková, A., Dohányos, M., Schmidt, J.E., Angelidaki, I., 2005. Strategies for changing temperature from mesophilic to thermophilic conditions in anaerobic CSTR reactors treating sewage sludge. Water Research 39, 1481–1488.
- Choorit, W., Wisarnwan, P., 2007. Effect of temperature on the anaerobic digestion of palm oil mill effluent. Electronic Journal of Biotechnology 10 (3), 376-385.
- Dohányos, M., Zabranska, J., Kutil, J., Jenicek, P., 2004. Improvement of anaerobic digestion of sludge. Water Science and Technology 49 (10), 89-96.
- Donoso-Bravo, A., Retamal, C., Carballa, M., Ruiz-Filippi, G., Chamy, R., 2009. Influence of temperature on the hydrolysis, acidogenesis and methanogenesis in mesophilic anaerobic digestion: parameter identification and modeling application. Water Science and Technology 60 (1), 9-17.
- Eikelboom, D.H., 1975. Filamentous organisms observed in activated sludge. Water Res. 9, 365-388.
- Etchebehere, C., Pavan, M. E., Zorzopulos, J., Soubes, M., Muxi, L., 1998. *Coprothermobacter platensis* Spm now, a new anaerobic proteolytic thermophilic bacterium isolated from an anaerobic mesophilic sludge. International Journal of Systematic Bacteriology 48, 1297-1304.

- Kaetzke, A., Jentsch, D., Eschrich, K., 2005. Quantification of *Microthrix parvicella* in activated sludge bacterial communities by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* 40 (3), 207–211.
- Kleyböcker, A., Liebrich, M., Verstraete, W., Kraume, M., Würdemann, H., 2012. Early warning indicators for process failure due to organic overloading by rape seed oil in one-stage continuously stirred tank reactor, sewage sludge and waste digesters. *Bioresource Technology* 123, 534-541.
- Knoop, S., Kunst, S., 1998. Influence of temperature and sludge loading on activated sludge settling, especially on *Microthrix parvicella*. *Water Science and Technology* 37 (4-5), 27-35.
- Kumari, S.K.S., Marrengane, Z., Bux, F., 2009. Application of quantitative RT-PCR to determine the distribution of *Microthrix parvicella* in full-scale activated sludge treatment systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, 1135-1141.
- Lienen, T., Kleyböcker, A., Brehmer, M., Kraume, M., Moeller, L., Görsch, K., Würdemann, H., 2013. Floating layer formation, foaming and microbial community structure change in full-scale biogas plant due to disruption of mixing and substrate overloading. *Energy Sustainability and Society* 3, 20.
- Lienen, T., Kleyböcker, A., Verstraete, W., Würdemann, H., 2014. Foam formation in a downstream digester of a cascade running full-scale biogas plant: Influence of FOG addition and abundance of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella*. *Bioresource Technology* 153, 1–7.
- Marneri, M., Mamais, D., Koutsouki, E., 2009. *Microthrix parvicella* and *Gordona amarae* in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion systems. *Environ. Technol.* 30 (5), 437-444.
- Martins, A., Pagilla, K., Heijnen, J., van Loosdrecht, M., 2004. Filamentous bulking sludge—a critical review. *Water Research* 38 (4), 793–817.
- Menes, R.J., Muxi, L., 2002. *Anaerobaculum mobile* sp. nov., a novel anaerobic, moderately thermophilic, peptidefermenting bacterium that uses crotonate as an electron acceptor, and emended description of the genus *Anaerobaculum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 157–164.
- Muller, E.E., Pinel, N., Gillece, J.D., Schupp, J.M., Price, L.B., Engelthaler, D.M., Levantesi, C., Tandoi, V., Luong, K., Baliga, N.S., Korlach, J., Keim, P.S., Wilmes, P., 2012. Genome sequence of "Candidatus *Microthrix parvicella*" Bio17-1, a long-chain-fatty-acid-accumulating filamentous actinobacterium from a biological wastewater treatment plant. *Journal of Bacteriology* 194 (23), 6670-6671.

- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.
- Nielsen, P.H., Roslev, P., Dueholm, T., Nielsen, J.L., 2002. *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic and aerobic activated sludge plants. *Water Science and Technology* 46, 73–80.
- Nielsen, P.H., Kragelund, C., Nielsen, J.L., Tiro, S., Lebek, M., Rosenwinkel, K.H., Gessesse, A., 2005. Control of *Microthrix parvicella* in Activated Sludge Plants by Dosage of Polyaluminium Salts: Possible Mechanisms. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 33 (2005) 3, 255–261.
- Sawayama, S., Tada, C., Tsukahara, K., Yagishita, T., 2004. Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97 (1), 65-70.
- Schade, M., Lemmer, H., 2002. Charakterisierung von Fadenbakterien zur Bekämpfung von Schaum in Belebungsbecken. *Materialien* Nr. 104, Bayrisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München.
- Slijkhuis, H., 1983. *Microthrix parvicella*, a Filamentous Bacterium Isolated from Activated Sludge: Cultivation in a Chemically Defined Medium. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 832-839.
- Slijkhuis, H., Deinema, M.H., 1988. Effect of environmental conditions on the occurrence of *Microthrix parvicella* in activated sludge. *Water Research* 22, 825–828.
- Sousa, D.Z., Pereira, M.A., Alves, J.I., Smidt, H., Stams, A.J.M., Alves, M.M., 2008. Anaerobic microbial LCFA degradation in bioreactors. *Water Science and Technology* 57 (3), 439-444.
- Tandoi, V., Rossetti, S., Blackall, L.L., Majone, M., 1998. Some physiological properties of an Italian isolate of “*Microthrix parvicella*”. *Water Science and Technology* 37, 1–8.
- Wanner, J., Grau, P., 1988. Filamentous bulking in nutrient removal activated sludge system. *Water Science and Technology* 20 (4-5), 1-8.
- Warth, A.D., 1978. Relationship between the Heat Resistance of Spores and the Optimum and Maximum Growth Temperatures of *Bacillus* Species. *Journal of Bacteriology* 134 (3), 699-705.
- Westlund, A.B., Hagland, E., Rothman, M., 1998a. Operational aspects on foaming in digesters caused by *Microthrix parvicella*. *Water Science and Technology* 38 (8-9), 29-34.
- Westlund, A.B., Hagland, E., Rothman, M., 1998b. Foaming in anaerobic digesters caused by

Microthrix parvicella. Water Science and Technology 37 (4-5), 51-55.

Wittebolle, L., Vervaeren, H., Verstraete, W., Boon, N., 2008. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. Applied and Environmental Microbiology 74 (1), 286-293.