

Entwicklung eines Frühwarnsystems zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute einstufiger NawaRo-Biogasanlagen durch Additivzugabe

vorgelegt von
M.Sc. der Biotechnologie
Patrick Schröder
geb. in Potsdam

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

Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof Dr. Ferdi Hellweger
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Szewzyk
Gutachterin: Prof. Dr.-Ing. Hilke Würdemann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 29.Oktober 2018

Berlin 2018

Danksagung

Die Bearbeitung des Themas dieser Arbeit und ihre Fertigstellung wären ohne eine Reihe von Personen nicht möglich gewesen, bei denen ich mich hiermit bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Hilke Würdemann für die Möglichkeit mein Promotionsprojekt in ihrer Arbeitsgruppe am Deutschen GeoForschungszentrum GFZ bearbeiten zu können und für ihre Betreuung und Hilfestellung während meiner Promotion. Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulrich Szewzyk von Fachgebiet Umweltmikrobiologie möchte ich mich für die Betreuung und Begutachtung meiner Doktorarbeit bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen lieben Kollegen der Arbeitsgruppe „Mikrobielles GeoEngineering“, Frau Dr. Stephanie Lerm, Frau Jennifer Weigt, Frau Anke Westphal und Herrn Dr. Tobias Lienen für die vielen schönen Momente gemeinsam auf Hermannswerder und die Hilfestellung bei meinen Experimenten und bei der Büroarbeit. Hierbei gilt mein Dank insbesondere Frau Dr. Anne Kleyböcker für ihre hervorragende Bereuung.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Sebastian Teitz für die Hilfestellung mit der Versuchsanlage und bei der Gasmessung und bei Frau Dr. Monika Kasina für die Anfertigung der REM-EDX-Aufnahmen. Bei Frau Lorina Schmalz bedanke ich mich für die Fettsäureanalytik, bei Frau Michaela Hache für die Fluoreszenzfärbungen und bei Frau Andrea Kassahun für ihre Hilfe bei der Interpretation der Daten.

Bei Herrn Peter Wirth bedanke ich mich für die Möglichkeit Versuche an der Kläranlage Rosental in Leipzig durchführen zu können und bei Frau Nadine Weis und Herrn Paul Winkler für ihr Mitwirken bei diesen Versuchen. Frau Dr. Marietta Liebrich und Frau Klaudia Kaminska danke ich für ihr Mitwirken bei den Versuchen am GFZ.

Bei meinen Eltern Dirk und Catrin Schröder und meinen Schwestern Romina und Pia-Loreen Schröder bedanke ich mich, dass sie mich stets bei all meinen Lebenswegen unterstützt haben.

Bei meinem Freund Marius Humpert bedanke ich mich für seine Liebe und sein stets offenes Ohr während meiner Promotionszeit.

Berlin, Oktober 2018

Patrick Schröder

Kurzfassung

Zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute in einstufigen, landwirtschaftlichen Biogasanlagen wurden Versuche zur Entwicklung von Frühwarnindikatoren (FWI) für Prozessstörungen und von Maßnahmen zur Prozessstabilisierung, sowie zur Substratzusammensetzung durchgeführt.

Ein neuer FWI wurde entwickelt, der $A/eICon$, das Verhältnis aus der Konzentration organischer Säuren (engl.: org. acids) zur elektrischen Leitfähigkeit (engl.: electr. conductivity), der im Labor und in der Großtechnik am effektivsten vor drohenden Prozessstörungen warnte.

Als Maßnahme zur Prozessstabilisierung wurde die Zugabe von Additiven untersucht. Grundsätzlich wurde durch die Additivzugabe eine Übersäuerung bei hohen Raumbelastungen vermieden. Im Unterschied zur Leistungssteigerung ohne Additivzugabe, passte sich die mikrobielle Lebensgemeinschaft durch Zunahme der relativen Abundanz hydrogenotropher und säuretoleranter mixotropher Methanogener an hohe Raumbelastungen (B_R) an. Eine Kombination aus Spurenelementen und NaOH eignete sich am besten zur Prozessstabilisierung und wurde zusammen mit dem $A/eICon$ erfolgreich zur Etablierung einer Langzeit-Hochlast-Vergärung (bis $B_R = 7,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, $t > 100 \text{ d}$) von NawaRo eingesetzt.

Eine weitere Leistungssteigerung wurde durch Co-Vergärung energiereicher lipidhaltiger Substrate erzielt. Wie aus Anlagen der Abfallwirtschaft bekannt, wurden die Hochlast-Co-Vergärungen bei CaO-Zugabe durch eine Aggregatbildung stabilisiert. Die Aggregate binden toxische, langkettige Fettsäuren und bilden Oberflächen für Biofilme. Es wurde auch eine Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung ($t > 100 \text{ d}$) durch Zugabe von CaO etabliert. Dabei wurde die Ausbildung einer hocheffektiven fettsäureabbauenden mikrobiellen Lebensgemeinschaft, bestehend aus syntrophen Bacteria und hydrogenotrophen Archaea detektiert, die entscheidend zur Prozessstabilität beitrug.

Bei der Charakterisierung der mikrobiellen Biozönosen wurden die Ergebnisse der Metagenomanalyse und des klassischen genetischen Fingerprintings mittels DGGE verglichen. Beide Methoden zeigten eine Zunahme acidogener Bacteria und dabei speziell von Milchsäurebakterien mit zunehmender Raumbelastung. Die Ergebnisse der Metagenomanalyse waren deutlich detaillierter.

Abstract

For an enhancement in the time-space-yield of one-stage agricultural biogas plants, experiments for developing early warning indicators (EWI) for process failures and countermeasures for process stabilization and for adapting the substrate composition were conducted.

A new EWI was developed, the **A/eICon**, the proportion of the concentration of organic acids to the electrical conductivity, which warned most effectively in lab- and full-scale experiments.

As a countermeasure against process failures, the addition of different additives was tested. In general, the addition of additives counteracted over-acidifications at high organic loading rates (OLR). In contrast to increased OLRs without countermeasures, the microbial communities adapted to high OLRs, if additives were added, by an increase in the relative abundance of hydrogenotrophic and acid tolerant mixotrophic methanogens. The combination of trace elements and NaOH was most beneficial for stabilizing agricultural biogas processes and was successfully used in combination with the A/eICon to maintain a long-term high-performance digestion (up to $OLR = 7.5 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, $t > 100 \text{ d}$).

A further increase in the time-space-yield was achieved by co-digesting energy-rich lipid-containing substrates. As known from the digestion of biological waste, the high-performance co-digestions were stabilized by CaO additions leading to an aggregate formation. The stabilization was based on the precipitation of toxic long-chain fatty acids with calcium and thus the formation of surfaces for biofilms. Even a long-term high-performance co-digestion (up to $OLR = 9 \text{ kg VS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, $t > 100 \text{ d}$) was established by adding CaO. In this connection the formation of highly effective fatty acid degrading microbial consortia was detected consisting of syntrophic bacteria and hydrogenotrophic archaea that contributed to the process stability.

Analyzing the microbial communities the results of the metagenome analysis and of the classical genetic fingerprinting via DGGE were compared. Both methods showed an increase in acidogenic bacteria and thereby especially in lactic acid producing bacteria with increasing loading rates. The results of the metagenome analysis were much more detailed.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Kurzfassung	II
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	VI
Hinweis zur Nomenklatur der Methanogenen	VIII
1. Einleitung und Zielstellung.....	1
2. Stand der Wissenschaft und Technik	4
2.1 Der Biogasprozess	4
2.2 Prozessführung und Kontrollparameter	6
2.2.1 Aufbau einer typischen landwirtschaftlichen Biogasanlage.....	6
2.2.2 TS-, oTS-Wert, Raumbelastung und Verweilzeit	7
2.2.3 Temperatur, pH-Wert und Carbonat-Puffersystem.....	8
2.2.4 Biogas- und Methanausbeute	11
2.3 Prozessstörungen in Biogasanlagen	12
2.3.1 Verlauf einer Prozessstörung/Übersäuerung und Auslöser	12
2.3.2 Frühwarnindikatoren FOS/TAC, FWI-VFA/Ca, und FWI-P/Ca	15
2.3.3 Maßnahmen zur Prozessstabilisierung	17
2.4 Charakterisierung mikrobieller Biozönosen in Umweltproben	19
2.4.1 Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE).....	19
2.4.2 Metagenom- und Mikrobiomanalyse.....	20
3. Material und Methoden	22
3.1 Versuchsanlagen und Messmethoden	22
3.1.1 Laborreaktoren und Probennahme	22
3.1.2 Großtechnische Biogasanlage.....	23
3.1.3 pH-Wert-, Temperatur- und Leitfähigkeitsmessung	23
3.1.4 FOS/TAC-Bestimmung	24
3.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von organischen Säuren, Calcium, Carbonat und Phosphat	24
3.1.6 Bestimmung Trockensubstanz- und organischer Trockensubstanzanteil.....	24
3.1.7 Gaschromatographie (GC) und GC mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS).....	25
3.2 Versuchsdurchführung	25
3.2.1 Übersäuerungsversuche (ÜberV) - Identifizierungen eines Frühwarnindikators	25
3.2.2 Großtechnischer Versuch (GroßV) – Erprobung des neuen FWI A/elCon im Industriemaßstab	25
3.2.3 Entsäuerungsversuche (EntV) - Prozessstabilisierungen durch Additivzugabe	26
3.2.4 Etablierung einer NawaRo-Langzeit-Hochlastvergärung (HochV).....	26
3.2.5 Etablierung einer stabilen Co-Vergärung von NawaRo und Rapsöl (CoV)	27
3.2.6 Etablierung einer Hochlast-Co-Vergärung von NawaRo und Öl (HochCoV).....	27

3.2.7 Etablierung einer Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung von Klärschlamm mit Rapsöl (LangCoV)	27
3.3 Molekularbiologische und mikroskopische Analysen	28
3.3.1 Genetisches Fingerprinting mittels Denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)	28
3.3.2 Quantitative PCR (qPCR)	29
3.3.3 Metagenom- und Mikrobiomanalyse	29
3.3.4 Fluoreszenzmikroskopische Analysen	30
3.3.5 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FE-REM) und energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)	31
3.3.6 Lichtmikroskopische und stereomikroskopische Analysen	31
4. Ergebnisse und Diskussion	32
4.1 Entwicklung eines Frühwarnindikators für NawaRo-Biogasanlagen	32
4.2 Erprobung des neuen FWI A/eICon in der Großtechnik	37
4.3 Prozessstabilisierung übersäuerter NawaRo-Biogasanlagen durch Additivzugabe	38
4.4 Langzeit-Hochlast-Vergärung von NawaRo	48
4.4.1 Langzeit-Hochlast mit Zugabe von EnviTal constant und NaOH	48
4.4.2 Langzeit-Hochlast mit Zugabe von CaO	50
4.4.3 Langzeit-Hochlast mit Zugabe von NaOH und wechselnden Additiven	52
4.4.4 Vergleichende Betrachtung der Hochlast-Vergärungen	54
4.5 Co-Vergärung fett- und ölhaltiger Substrate und Aggregatbildung in NawaRo-Biogasanlagen..	58
4.6 Hochlast-Co-Vergärung von NawaRo mit fett- und ölhaltigen Substraten	63
4.7 Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung fett- und ölhaltiger Substrate	68
4.7.1 Langzeit-Hochlast mit langsamer Steigerung der Raumbelastung	68
4.7.2 Langzeit-Hochlast mit schneller Steigerung der Raumbelastung	70
4.7.3 Aggregatbildung bei der Co-Vergärung von Klärschlamm mit Rapsöl	72
4.8 Auswirkungen verschiedener Prozessbedingungen auf die mikrobielle Biozönose	74
4.8.1 Auswirkungen einer Übersäuerung auf die mikrobielle Biozönose	74
4.8.2 Auswirkungen eines Hochlastbetriebes auf die mikrobielle Biozönose	85
4.8.3 Auswirkungen einer Hochlast-Co-Vergärung fett- und ölhaltiger Substrate auf die mikrobielle Biozönose	95
5. Zusammenfassende Diskussion	103
5.1 Vergleich molekularbiologischer Methoden zur Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in NawaRo-Biogasanlagen	103
5.2 Abhängigkeit der Prozessstabilität von der Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose	107
5.3 Vorhersage von Prozessstörungen in NawaRo-Biogasanlagen	109
5.4 Möglichkeiten der Leistungssteigerung von NawaRo-Biogasanlagen	113
6. Zusammenfassung	120
7. Literaturverzeichnis	122

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

A/elCon	Verhältnis org. Säuren zur Leitfähigkeit	
Al	Aluminium	
AlCl ₃	Aluminiumchlorid	
Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid	
B _R	Raumbelastung	[kg oTS m ⁻³ d ⁻¹]
BGA	Biogasanlage	
Ca	Calcium	
CoV	NawaRo-Öl-Co-Vergärungsversuch	
c	Substratkonzentration	[%oTS]
Cl	Chlor	
Co	Kobalt	
Cu	Kupfer	
DBFZ	Deutsches Biomasseforschungszentrum	
DID	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodi- carbocyanine, 4-Chlorobenzenesulfonate	
DTAF	5-(4,6-dichlorotriazinyl)aminofluorescein	
EntV	Entsäuerungsversuch	
ETI	Brandenburgische Energie Technologie Initiative	
FOS	flüchtige organische Säuren	[mg L ⁻¹]
HochVNawaRo-Langzeit-Hochlastversuch		
HochCoV	NawaRo-Öl-Hochlast-Co-Vergärungsversuch	
HRT	hydraulische Verweilzeit	[d]
LangCoV	Langzeit-Hochlast-Co-Vergärungsversuch	
LCFA	langkettige Fettsäuren	
UBA	Umweltbundesamt	
ÜberV	Übersäuerungsversuche	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	
bp	Basenpaare	
C	Kohlenstoff	
CaO	Calciumoxid	
CH ₄	Methan	
CH ₃ COOH	Acetat	
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	

CO ₃ ²⁻	Carbonat-Ion	
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie	
EEG	Erneuerbare Energien Gesetz	
Fe	Eisen	
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V	
FE-REM	Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie	
FWI	Frühwarnindikator	
GBR	Gasbildungsrate	[L d ⁻¹]
GC	Gaschromatograph	
GC-MS	GC mit Massenspektrometrie-Kopplung	
GPS	Ganzpflanzensilage	
H ₂	Wasserstoff	
H ₂ O	Wasser	
H ₂ CO ₃	Kohlensäure	
H ₂ S	Schwefelwasserstoff	
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat-Ion	
HCOOH	Ameisensäure	
ṁ	Masseneintrag	[kg d ⁻¹]
Mg	Magnesium	
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	
MnO ₂	Manganoxid	
Mo	Molybdän	
N	Stickstoff	
Na	Natrium	
NawaRo	nachwachsende Rohstoffe	
NaOH	Natronlauge	
NH ₃	Ammoniak	
NH ⁴⁺	Ammonium	
Ni	Nickel	
O, O ₂	Sauerstoff	
oTS	organische Trockensubstanz	[%]
P	Phosphor	
PAO	Polyphosphat akkumulierende Organismen	
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	

PO_4^{3-}	Phosphat-Ion	
qPCR	quantitative PCR	
RDP	Ribosomal Database Project	
RNA	Ribonukleinsäure	
rRNA	ribosomale RNA	
S	Schwefel	
Se	Selen	
Si	Silizium	
t	Zeit	[d]
TAC	totaler anorganischer Kohlenstoff	[mg L ⁻¹]
TS	Trockensubstanz	[%]
UASB	Upstream Anaerobic Sludge Blanket	
V_{Reaktor}	Reaktorvolumen	[m ³]
$\dot{V}_{\text{Substratinput}}$	Substratvolumeneintrag	[m ³ d ⁻¹]
VFA	flüchtige organische Säuren	
W	Wolfram	
y_B	Biogasausbeute	[L (g oTS) ⁻¹]
y_{CH_4}	Methanausbeute	[L (g oTS) ⁻¹]
$\Delta G^{0'}$	Gibbs-Energie unter Standardbedingungen	[kJ Mol ⁻¹]

Hinweis zur Nomenklatur der Methanogenen

Patel und Sprott (1990) wiesen darauf hin, dass die Einordnung des Organismus *Methanotherix soehngeniei* nach dem „International Code of Nomenclature of Bacteria“ (Lapage 1975), in die Gattung *Methanotherix* ungültig sei und ordneten den Organismus zusammen mit *Methanotherix concilii* (neu: *Methanosaeta concilii*) und *Methanotherix thermophila* (neu: *Methanosaeta thermophila*) in die Ordnung *Methanosaeta* ein. Tindall (2014) stellte jedoch fest, dass die ursprüngliche Bezeichnung der Organismen *Methanotherix soehngeniei* und *Methanotherix thermophila* korrekt war und machten die Umbenennung von Patel und Sprott rückgängig, während die Einordnung des Organismus *Methanosaeta concilii* nicht ungültig zu sein scheint. Da in den verwendeten Sequenzdatenbanken nur die Bezeichnung *Methanosaeta* verwendet wird, wird zur Vereinfachung in dieser Arbeit ebenfalls nur die Bezeichnung *Methanosaeta* verwendet.

1. Einleitung und Zielstellung

Im Jahr 2000 wurde in Deutschland das Erneuerbare-Energien-Gesetzes (EEG) verabschiedet, das unter anderem die Produktion von erneuerbarer Energie aus Biogas stark förderte. Innerhalb von nur 15 Jahren stieg die Zahl der Biogasanlagen (BGA) in Deutschland von ca. 1000 auf 8000 an (FNR 2016a). Dabei nahm vor allem die Zahl landwirtschaftlicher Biogasanlagen zu, die mit nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) wie z.B. Mais-, Gras-, Zuckerrübensilage und/oder verschiedenen tierischen Ausscheidungen betrieben werden. Neben der Produktion erneuerbarer Energie ergeben sich zusätzliche Synergieeffekte bei der Verwendung der Biogastechnologie. Tierische Ausscheidungen werden in der Landwirtschaft üblicherweise als Wirtschaftsdünger direkt aufs Feld aufgebracht. Die vorherige anaerobe Vergärung in einer Biogasanlage kann die Düngeeigenschaften deutlich verbessern (FNR 2016b). Neben einer Abnahme der Geruchsemissionen durch den Abbau flüchtiger organischer Stoffe wird die Verfügbarkeit des Stickstoffes für die Pflanzen deutlich erhöht und das Gesamtvolumen der Abfallstoffe reduziert.

Der aus Biogas produzierte Strom machte im Jahr 2017 bereits 17,2 % der Bruttostromerzeugung aus erneuerbaren Energien und 5,4 % der Gesamtbruttostromerzeugung in Deutschland aus. Beim Wärmeverbrauch liegt der Anteil immerhin bei 10,4 % für Wärme aus erneuerbaren Energien und 1,4 % für den Gesamtwärmeverbrauch (UBA 2017). Im Unterschied zur Energie aus Photovoltaik oder Windkraftanlagen ist die aus Biogas produzierte erneuerbare Energie unabhängig vom Wetter und damit in der Lage einen Teil der Grundlastversorgung zu decken.

Trotz der offensichtlichen Vorteile der Biogastechnologie wurde nach einer Revision des EEG im Jahr 2014 der Neubau von Biogasanlagen weniger wirtschaftlich und so stagniert die Zahl der Anlagen heute (FNR 2016a; Thrän et al. 2014). Die Biogasbranche konzentriert sich daher mittlerweile auf die Flexibilisierung und das „Repowering“ bestehender Anlagen, das heißt auf eine bedarfsgerechtere Energiebereitstellung und eine Steigerung der Effizienz der Biogasproduktion zur Verbesserung der Wirtschaftlichkeit (Effenberger and Lebuhn 2011; Häring et al. 2016). Dies geschieht in der Regel auf technischer Ebene durch beispielsweise die Installation von Gasspeichern und weniger auf der Prozessebene.

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten sind die Mechanismen des Biogasprozesses nach wie vor noch nicht ausreichend erforscht. Ein umfangreiches Verständnis der zugrundeliegenden mikrobiologischen und biochemischen Vorgänge ist jedoch Grundvoraussetzung für eine Optimierung des Prozesses und einen sicheren Anlagenbetrieb. Das unzureichende Verständnis führt in der Praxis häufig dazu, dass Biogasanlagen unterhalb ihres Produktionsoptimums betrieben werden (Kissel et al. 2009). Da zuverlässige Monitoringsysteme und universell einsetzbare Frühwarnindikatoren (FWI) fehlen, werden viele Anlagen bei niedrigen Raumbelastungen gefahren, um Prozessstörungen in Form von Übersäuerungen zu vermeiden. Insbesondere bei hohen Raumbelastungen oder wechselnder Betriebsführung ist der Biogasprozess anfällig für Störungen (Preißler 2010).

In Bezug auf jahreszeitlich und markttechnisch bedingte Schwankungen des Substratpreises, der Substratverfügbarkeit und des Energiebedarfs, ist eine Variation der Betriebsführung aber sowohl aus ökonomischer als auch aus ökologischer Sicht sinnvoll. Eine Strategie zur Optimierung des Prozesses und zur Erhöhung der Anlagenauslastung ist beispielsweise die Zugabe von Additiven. Zwar ist eine Reihe von leistungssteigernden und prozessoptimierenden Präparaten für Biogasanlagen auf dem Markt verfügbar, ihre tatsächliche Wirkung weicht jedoch häufig von den Angaben der Hersteller ab oder sie wirken nur unter spezifischen Bedingungen positiv auf den Prozess (Krieg and Wachsmann 2011). Eine Anwendung von Additiven zur Prozessstabilisierung und Leistungssteigerung ist in der Praxis also noch deutlich optimierbar.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Frühwarnsystems und von Handlungsempfehlungen für einen sicheren und effizienten Betrieb von einstufigen NawaRo-Biogasanlagen, dem häufigsten Anlagentyp in Deutschland. Dies ist von besonderer Bedeutung im Hinblick auf eine bedarfsgerechte Energiebereitstellung bei hohen Raumbelastungen. Außerdem soll zum besseren Prozessverständnis der Einfluss verschiedener Prozessbedingungen auf die mikrobielle Biozönose untersucht werden. Die dazu durchgeführten Versuchsreihen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Folgenden Forschungsfragen sollen beantwortet werden:

- Kann ein FWI für NawaRo-Systeme entwickelt werden, der ausreichend früh vor Prozessstörungen warnt?
- Können die für Abfallanlagen entwickelten FWI zu belastbaren universellen FWI weiterentwickelt werden?
- Kann der NawaRo-Biogasprozess durch Zugabe von Additiven stabilisiert werden?
- Wird durch Zugabe von Additiven eine prozessstabilisierende Aggregatbildung in NawaRo-Biogasanlagen induziert?
- Kann die Raum-Zeit-Ausbeute in NawaRo-Biogasanlagen durch Steigerung der Raumbelastung und/oder Co-Vergärung energiereicher Substrate gesteigert werden?
- Gibt es Indikatororganismen oder Mikroorganismengruppen, die auf eine Prozessstörung und deren Ursache hinweisen?
- Können aus den gewonnenen Erkenntnissen allgemeingültige Aussagen und Handlungsempfehlungen für einen sicheren Betrieb von NawaRo-Biogasanlagen bei der bedarfsgerechten Energiebereitstellung abgeleitet werden?

Tabelle 1: Übersicht über die durchgeführten Versuchsreihen und Zielstellungen

Versuchsreihe	Abkürzung	Zielstellung
Übersäuerungsversuche	ÜberV	Entwicklung eines FWI für NawaRo-Gärsysteme
Großtechnischer Versuch	GroßV	Erprobung des neuen FWI im Industriemaßstab
Entsäuerungsversuche	EntV	Stabilisierung von NawaRo-Systemen durch Additivzugabe
NawaRo-Langzeit-Hochlastversuche	HochV	Etablierung einer NawaRo-Hochlastvergärung
NawaRo-Öl-Co-Vergärungsversuche	CoV	Etablierung einer stabilen Co-Vergärung von NawaRo mit Öl
NawaRo-Öl-Hochlast-Co-Vergärungsversuche	HochCoV	Etablierung einer Hochlast-Co-Vergärung von NawaRo und Öl
Öl-Langzeithochlast-Co-Vergärungsversuche	LangCoV	Etablierung einer Langzeithochlast-Co-Vergärung von Klärschlamm mit Öl

2. Stand der Wissenschaft und Technik

2.1 Der Biogasprozess

Biogas wird natürlicherweise in anoxischen Umgebungen wie z. B. im Rinderpansen, Sümpfen oder Sedimentschichten durch komplexe mikrobielle Biozönosen beim Abbau von organischem Material als Nebenprodukt gebildet (Schieder et al. 2010). In Biogasanlagen werden diese Biozönosen genutzt, um das Biogas im technischen Maßstab zur Energiegewinnung aus biologischen Abfällen oder nachwachsenden Rohstoffen unter anaeroben Bedingungen zu produzieren. Abhängig vom Ausgangsmaterial besteht das Biogas zu 50 - 75 % aus Methan. Die restlichen Bestandteile sind vor allem Kohlenstoffdioxid und geringe Mengen der Gase Wasserstoff, Schwefelwasserstoff und Ammoniak. Allgemein wird der Abbau des organischen Materials in vier Stufen unterteilt, die von unterschiedlichen, teils in enger Wechselbeziehung lebenden Mikroorganismengruppen ausgeführt werden, die Hydrolyse, die Acidogenese, die Acetogenese und die Methanogenese (Bauer et al. 2009) (Abb. 1).

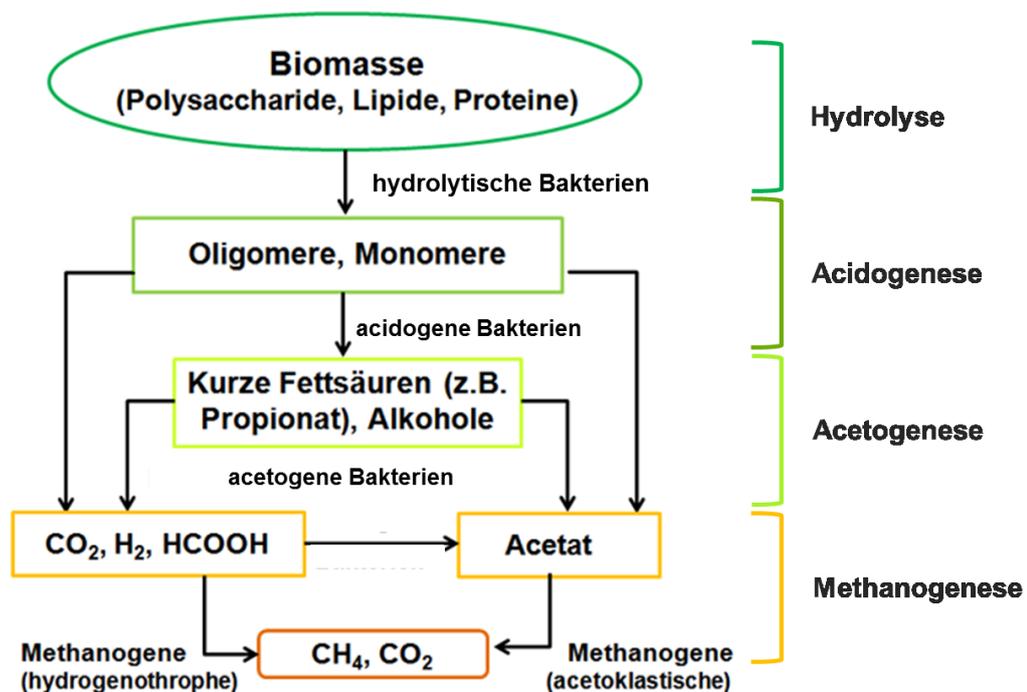


Abbildung 1: Stufen des Biogasprozesses, modifiziert nach Brade und Distl (2015)

Bei der **Hydrolyse** werden die komplexen polymeren Makromoleküle des Substrates, also Kohlenhydrate, Lipide und Proteine, zu kleineren Oligo- und Monomeren, wie Zucker, Amino- und Fettsäuren degradiert. Katalysiert werden diese Reaktionen durch hydrolytische Exoenzyme, wie Cellulasen, Lipasen und Proteasen, die von hydrolytischen Bakterien in Ihre Umgebung sekretiert werden (Schink 1997; Weiland 2010).

Im nächsten Abbauschritt, der **Acidogenese**, werden die Oligo- und Monomere zu kurzkettigen Fettsäuren, wie Propion-, Milch- und Essigsäure, sowie zu Alkoholen, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid abgebaut. In der Regel sind Mikroorganismen sowohl an der Hydrolyse als auch an der Acidogenese beteiligt. Hydrolytisch/acidogene Bacteria sind ubiquitär verbreitet und finden sich z. B. in den Phyla Actinobacteria, Bacteroidetes und Firmicutes, hier vor allem in der Klasse der Clostridia (Bauer et al. 2009; Krause et al. 2008).

In der **Acetogenese** werden die kurzkettigen Fettsäuren weiter zu Essigsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid abgebaut (Schink 1997). Aus thermodynamischer Sicht ist diese Reaktion jedoch nur bei einem niedrigen Wasserstoffpartialdruck mit Energiegewinn möglich. Daher leben die acetogenen Bacteria in enger syntropher Wechselbeziehung mit den methanogenen Archaea, die die energiereichen Reaktionsprodukte ihrer syntrophen Partner direkt weiterverwerten. Eine Akkumulation von Essigsäure und Wasserstoff wird verhindert und der Wasserstoffpartialdruck bleibt niedrig. Syntrophe Mikroorganismen finden sich beispielsweise in den Gattungen *Syntrophomonas* und *Syntrophobacter*, aber auch in der Klasse der δ -Proteobacteria (Bauer et al. 2009).

Im letzten Schritt des Biogasprozesses, der **Methanogenese**, bilden die methanogenen Archaea entweder durch Spaltung der Essigsäure über den acetoklastischen, oder aus Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff über den hydrogenotrophen Reaktionsweg das Methan (Tab. 2) (Bauer et al. 2009; Schieder et al. 2010). Einige methylotrophe Methanogene können auch durch Disproportionierung von Methylverbindungen Methan produzieren (Liu und Whitman 2008). Methanogene Archaea der Gattung *Methanosaeta* können nur acetoklastisch Methan bilden und Vertreter der Gattungen *Methanospirillum* und *Methanoculleus* beispielsweise nur hydrogenotroph (Ferry et al. 1974). Dagegen können die mixotrophen methanogenen Archaea der Gattung *Methanosarcina* alle drei bekannten Stoffwechselwege zur Bildung von Methan nutzen. Zwar scheint die

Zusammensetzung der methanogenen Biozönosen stark anlagen- und substratspezifisch zu sein, die Ergebnisse einiger Studien deuten jedoch darauf hin, dass acetoklastische Methanogene aufgrund des niedrigeren Energiegewinns nur bei niedrigeren Raumbelastungen und entsprechend langen Verweilzeiten schnell genug wachsen, um nicht aus dem System ausgewaschen zu werden (Bauer et al. 2008; Lebuhn et al. 2008a).

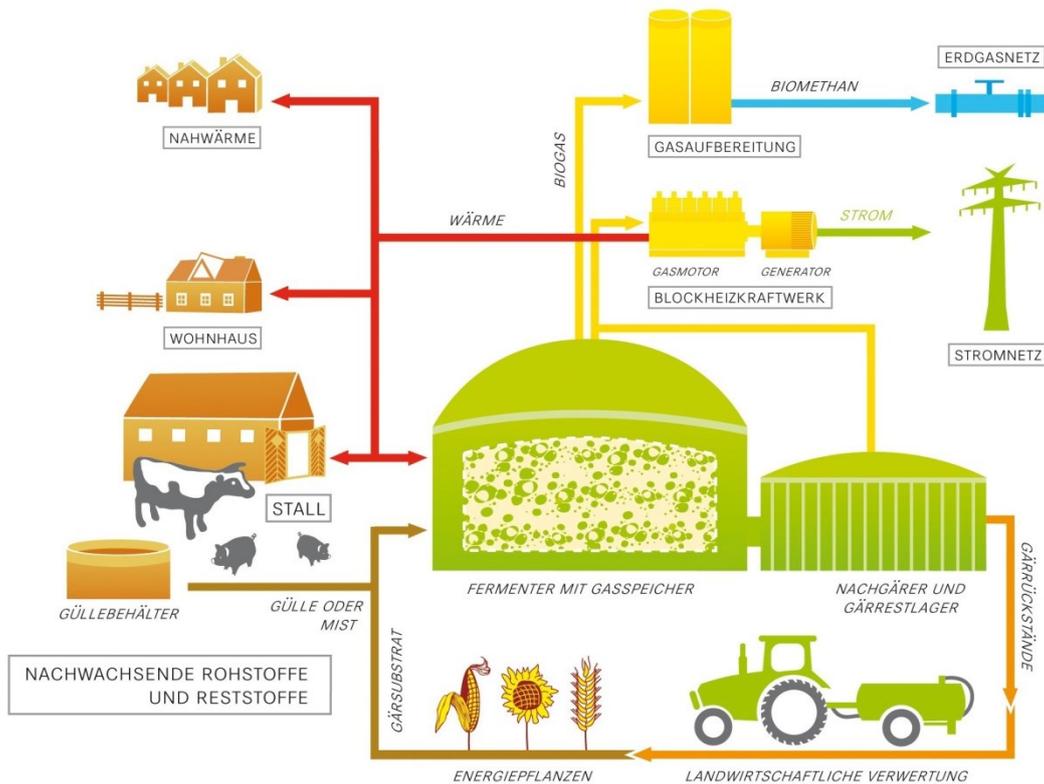
Tabelle 2: Reaktionsgleichung der acetoklastischen und hydrogenotrophen Methanogenese mit Änderungen der Gibbs-Energie unter Standardbedingungen $\Delta G^{0'}$ (Bauer et al. 2009)

Reaktionsweg	Gibbs-Energie unter Standardbedingungen $\Delta G^{0'}$
Acetoklastisch:	
$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-35,9 kJ Mol ⁻¹
Hydrogenotroph:	
$\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-131,0 kJ Mol ⁻¹

2.2 Prozessführung und Kontrollparameter

2.2.1 Aufbau einer typischen landwirtschaftlichen Biogasanlage

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute einstufiger landwirtschaftlicher Biogasanlagen, die mit NawaRo, wie Energiepflanzen (meist siliert), und/oder mit tierischen Reststoffen (z.B. Gülle oder Mist) betrieben werden (Abb. 2). Die Substrate werden in der Regel halbkontinuierlich in den Hauptfermenter eingebracht, in dem der Biogasprozess stattfindet (siehe 2.1) (FNR 2016b). Das vergorene Material wird in einem Nachgärer/Gärrestlager zwischengelagert, bevor es als Dünger wieder ausgebracht wird. Der größte Teil des Biogases wird im Hauptfermenter produziert, jedoch wird im Nachgärer ebenfalls Methan gebildet. Das Biogas wird entweder auf Erdgasqualität aufbereitet und in das Erdgasnetz eingespeist oder in Blockheizkraftwerken zur Energieerzeugung verbrannt. Der dabei produzierte Strom wird in das Stromnetz eingespeist und die Abwärme zur Beheizung von Wohngebäuden, Ställen oder des Hauptfermenters genutzt.



Quelle: FNR e. V.

Abbildung 2: Schema einer typischen einstufigen, halbkontinuierlich betriebenen, landwirtschaftlichen Biogasanlage (Quelle: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR))

2.2.2 TS-, oTS-Wert, Raumbelastung und Verweilzeit

Der Gär Schlamm und die eingesetzten Substrate sind Mischungen aus verschiedenen organischen Substanzen. Daher werden zur Quantifizierung des Organikanteils der Substrate die jeweiligen Konzentrationen als **Trockensubstanzanteil (TS [%])** und/oder als **organischer Trockensubstanzanteil (oTS [%], selten [%TS])** bestimmt (DBFZ 2012; Weiland 2008). Außerdem werden beide Parameter häufig routinemäßig für den Gärrest bestimmt, da steigende TS- bzw. oTS-Anteile einen Hinweis auf verminderten Substratabbau und damit auf eine mögliche Prozessstörung geben können.

Die **Raumbelastung B_R** [$\text{kg oTS m}^{-3} \text{d}^{-1}$] gibt an, wieviel organische Trockensubstanzmasse dem System pro Arbeitsvolumeneinheit und Zeit zugeführt wird (Gl. (1)) (FNR 2016b). Für NawaRo-Systeme sind, abhängig vom Anlagentyp und Substratmix, Raumbelastungen $< 4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{d}^{-1}$ üblich (Oechsner 2011). In deutschen Biogasanlagen liegt sie im Durchschnitt bei $3,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{d}^{-1}$ (FNR

2016a). Bei zu hohen Substratfrachten kann es zur Überfütterung und damit zu Prozessstörungen kommen (siehe 2.3.1). Bleibt der Prozess jedoch stabil, kann durch eine Erhöhung der Raumbelastung die Raum-Zeit-Ausbeute des Systems erhöht werden.

Raumbelastung:

$$B_R = \frac{\dot{m} \cdot c}{V_{\text{Reaktor}} \cdot 100} \text{ [kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}] \quad \begin{array}{l} \dot{m} = \text{Masseneintrag [kg d}^{-1}] \\ c = \text{Substratkonz. [\%oTS]} \end{array} \quad (1)$$

Ein wichtiger Parameter für die Dimensionierung einer Biogasanlage ist die **hydraulische Verweilzeit HRT [d]**. Sie errechnet sich aus dem Arbeitsvolumen der Anlage geteilt durch den Substratstrom und gibt an, wie lange das zugeführte Substrat rein rechnerisch bei optimaler Durchmischung in der Anlage verbleibt, bis es als Gärrest wieder ausgetragen wird (Gl. (2)) (FNR 2016b). Damit ist die hydraulische Verweilzeit bei gleichbleibender Substratzusammensetzung abhängig von der Raumbelastung. Mit steigender Raumbelastung sinkt die hydraulische Verweilzeit und umgekehrt. Bei zu kurzen hydraulischen Verweilzeiten kann es zu Auswaschungen der am Biogasprozess beteiligten Mikroorganismen kommen, was zu Prozessstörungen führen kann (siehe 2.3.1) oder die Zeit für den Abbau der Substrate ist zu kurz und ein Teil des Substrates wird unvergoren wieder ausgetragen. Lange Verweilzeiten wiederum senken die Raum-Zeit-Ausbeute und können die Anlage unwirtschaftlich machen. Bei einstufigen NawaRo-Systemen werden typischerweise Verweilzeiten von 80 bis 100 Tagen eingestellt (FNR 2016a; Oechsner 2011).

Hydraulische Verweilzeit:

$$HRT = \frac{V_{\text{Reaktor}}}{\dot{V}_{\text{Substratinput}}} \quad (2)$$

2.2.3 Temperatur, pH-Wert und Carbonat-Puffersystem

Bei der Prozessführung von Biogasanlagen unterscheidet man grundsätzlich drei mögliche Temperaturbereiche (FNR 2016b; Weiland 2008; Weiland 2010). Der **psychrophile** (< 20 °C) Temperaturbereich hat sich in der Praxis nicht bewährt und findet daher heute quasi keine Anwendung. Im Gegensatz dazu ist die

Prozessführung im **mesophilen** Temperaturbereich zwischen 35 und 42 °C am weitesten verbreitet. Ein Großteil der erforschten methanogenen Archaea hat in diesem Temperaturbereich ihr Wachstumsoptimum. Mesophil betriebene Biogasanlagen weisen daher eine gute Prozessstabilität auf. Eine Prozessführung im **thermophilen** Temperaturbereich zwischen 50 und 60 °C bietet sich immer dann an, wenn im Substrat potentiell pathogene Keime abgetötet werden sollen oder das Substrat über hohe Eigentemperaturen verfügt. Die hohen Temperaturen führen zu einer Erhöhung der Prozessgeschwindigkeit und damit zu einer potentiellen Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute. Dem gegenüber stehen allerdings auch ein höherer Energiebedarf zum Aufheizen der Fermentationsbrühe und eine geringere Prozessstabilität.

Es wurde gezeigt, dass sich die mikrobielle Biozönose bei einer langsamen Änderung der Prozesstemperatur an neue Temperaturbereiche ohne Auftreten von Prozessstörungen anpassen kann (Lienen et al. 2014b). Sprunghafte Temperaturänderungen hingegen können zu Prozessstörungen führen (Boušková et al. 2005; Weiland 2010). Daher sollte die Temperatur beim Betrieb von Biogasanlagen möglichst konstant gehalten werden.

Der Biogasprozess wird, wie in 2.1 beschrieben, in vier Stufen unterteilt, an denen jeweils verschiedene Mikroorganismengruppen beteiligt sind, die Hydrolyse, die Acidogenese, die Acetogenese und die Methanogenese. Die verschiedenen Mikroorganismen haben dabei bei unterschiedlichen **pH-Werten** ihr Wachstumsoptimum (FNR 2016b; Schieder et al. 2010). Hydrolytisch/acidogene Mikroorganismen bevorzugen einen pH-Wert zwischen 4,7 und 7, während die methanogenen Archaea im leicht alkalischen Milieu zwischen pH 7 und 8 am meisten Biogas produzieren (Schieder et al. 2010; Weiland 2010). Da die methanogenen Archaea im Biogasprozess am langsamsten wachsen, wird in der Praxis in einstufigen Anlagen mit einem pH-Wert von ≥ 7 zugunsten der Methanogenen gearbeitet. Daneben existieren auch technisch anspruchsvollere, zweistufige Systeme, bei denen die Hydrolyse und Acidogenese räumlich getrennt von der Aceto- und Methanogenese stattfinden (Ghosh 1987; Sträuber et al. 2016). Dies ermöglicht eine bessere Einstellung des pH-Wertes an die jeweiligen Optima der an den Prozessphasen beteiligten Organismen.

Der pH-Wert stellt sich im stabilen Betrieb i. d. R. von selbst ein und bleibt aufgrund von natürlicherweise im Schlamm vorkommenden Puffern (Säure-Base-Gleichgewichten) auch bei leichten Schwankungen der Konzentration kurzkettiger Säuren stabil. Im Falle einer Prozessstörung fällt der pH-Wert deshalb erst bei bereits eingetretener Übersäuerung unter 7. Daher ist der pH-Wert als Frühwarnindikator für Prozessstörungen ungeeignet (Weiland 2008). Das wichtigste Puffersystem in Biogasanlagen ist das **Carbonat-Puffersystem** (Hecht 2009; McCarty 1964). Bei den für einstufige Biogasanlagen typischen pH-Werten zwischen 7 und 8 liegt das Carbonat im chemischen Gleichgewicht des Puffersystems fast vollständig als Hydrogencarbonat vor (Abb. 3). Bei einer übermäßigen Produktion organischer Säuren oder bei verringertem Abbau durch eine Prozessinstabilität, werden die akkumulierenden Protonen durch den Puffer aufgefangen. Das Gleichgewicht des Carbonatpuffers verschiebt sich auf die Seite der Kohlensäure, die in Kohlenstoffdioxid und Wasser zerfällt. Da es sich bei einer Biogasanlage um ein offenes System handelt, entweicht ein Teil des Kohlenstoffdioxids als Gas aus dem Gärschlamm. Der Puffer wird dadurch verbraucht. Der pH-Wert kann durch den Carbonat-Puffer daher nur bei kurzzeitigen Prozessschwankungen stabil gehalten werden. Sinkt die Säure/Protonenkonzentration wieder, kann der Carbonatpuffer durch das im Biogasprozess gebildete Kohlenstoffdioxid wieder regeneriert werden.

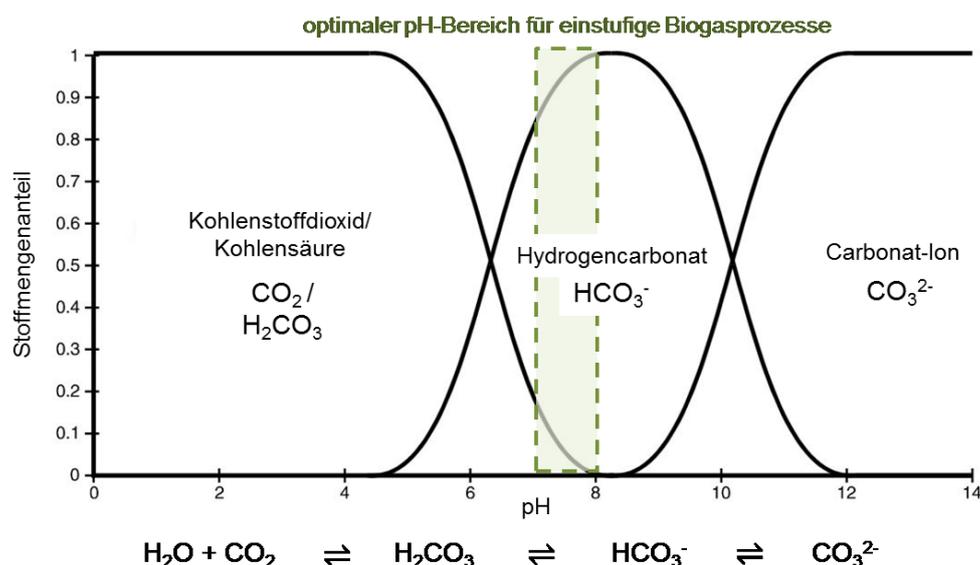


Abbildung 3: Carbonatpuffersystem, Stoffmengenanteile der jeweiligen Carbonatformen in Abhängigkeit vom pH-Wert, Abbildung modifiziert nach Wojtowicz (2001)

2.2.4 Biogas- und Methanausbeute

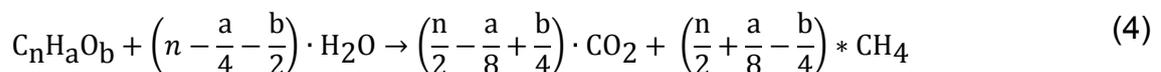
Die Biogas- (y_B) bzw. Methanausbeute (y_{CH_4}) gibt an, wie viel Biogas bzw. Methan im Verhältnis zum eingesetzten Substrat produziert wurde (Effenberger und Lebuhn 2011). Sie berechnet sich aus dem Quotienten des gebildeten Gasvolumens und der eingesetzten Masse organischer Trockensubstanz (Gl. (3)).

Gasausbeute:

$$y_{Gas} = \frac{V_{Gas}}{m_{oTS}} \quad [L (g \text{ oTS})^{-1} \text{ bzw. } m^3 (kg \text{ oTS})^{-1}] \quad (3)$$

Die Biogasausbeute ist sowohl von der Zusammensetzung des eingesetzten Substrats, als auch von der Raumbelastung des Systems und vom Zustand des Prozesses abhängig. Je nach Energiegehalt und Zusammensetzung des Substrats (Kohlenhydrate, Fette, Eiweiße) können unterschiedliche Mengen Methan im Biogasprozess gebildet werden. Ist die chemische Zusammensetzung des Substrates bekannt, kann mit der vereinfachten Buswell-Gleichung die theoretisch zu produzierende mögliche Menge an Methan berechnet werden (Gl. (4)) (ETI 2011).

Buswell-Gleichung:



Für viele gängige Substrate sind die zu erwartenden Biogas- bzw. Methanausbeuten in der Literatur angegeben. Tabelle 3 zeigt exemplarisch die Biogas- und Methanausbeuten, sowie TS- und oTS-Werte für typische NawaRo-Substrate.

Neben dem Energiegehalt und der Zusammensetzung des Substrates beeinflusst auch die Raumbelastung die Biogas- und Methanausbeute (Linke et al. 2006). So hat eine Erhöhung der Raumbelastung zugleich eine Verringerung der Verweilzeit des Substrates im Reaktor zur Folge (siehe 2.2.2). Schwer abbaubare Bestandteile mit niedriger Abbaugeschwindigkeit werden bei kurzen Verweilzeiten nur unvollständig umgesetzt und verlassen als Abbaureste das System. Die Gasausbeute kann daher mit steigender Raumbelastung sinken.

Die Biogas- und Methanausbeute ist außerdem vom Zustand des Prozesses abhängig. Während einer Prozessstörung werden die Mikroorganismen und damit die Gasproduktion gehemmt, wodurch die Ausbeute sinkt (Linke et al. 2006).

Entsprechen die Biogas- und Methanausbeute dem Erwartungswert, kann im Gegenzug von einem stabilen Prozess ausgegangen werden. Da für eine exakte Bestimmung sowohl die genauen oTS-Anteile der Substratfrachten, deren Messung i. d. R. zwei Tage dauert, als auch das exakte produzierte Gasvolumen bekannt sein müssen, sind die Biogas- und Methanausbeute nur bedingt als Frühwarnindikatoren in der Praxis anwendbar (DBFZ 2012).

Tabelle 3: Übersicht über TS- und oTS-Werte und Biogas- und Methanausbeuten typischer NawaRo-Substrate (FNR 2016b)

Substrat	TS	oTS	Biogasausbeute	Methanausbeute
	[%]	[%]	[m³ (kg oTS)⁻¹]	
Maissilage	33	31	0,64	0,34
Getreide-GPS*	33	31	0,6	0,33
Grassilage	35	32	0,57	0,31
Zuckerrübensilage	23	21	0,63	0,35
Rindergülle	10	8	0,38	0,21
Rindermist	25	20	0,45	0,25
Schweinegülle	6	4,8	0,41	0,25

*GPS - Ganzpflanzensilage

2.3 Prozessstörungen in Biogasanlagen

2.3.1 Verlauf einer Prozessstörung/Übersäuerung und Auslöser

Der Biogasprozess ist ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von Mikroorganismen mit unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen und Wachstumsoptima. Für eine ökonomisch optimale Biogasproduktion müssen sowohl die Abundanz, als auch die Stoffwechselaktivität der unterschiedlichen Mikroorganismengruppen im Gleichgewicht zueinander stehen (siehe 2.1). Wird dieses empfindliche Gleichgewicht gestört, besteht die Gefahr einer Prozessstörung (Kissel et al. 2009; Kleyböcker et al. 2012b; Kliche et al. 2015; Weiland 2010). Dabei sind vor allem die methanogenen Archaea am Ende des Biogasprozesses entscheidend. Ihre Substrate sind die in den vorangegangenen Schritten gebildeten Produkte Essigsäure, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Diese Stoffe akkumulieren,

wenn sie nicht schnell genug durch die Methanogenen abgebaut werden. Ist das Puffervermögen erschöpft, bedingen die steigenden Säurekonzentrationen ein Absinken des pH-Wertes in den sauren Bereich. Dies führt zu ungünstigen Lebensbedingungen für die methanogenen Archaea, was die Zunahme der Säurekonzentration weiter vorantreibt. Es kommt zu einer **Übersäuerung** und die Methanbildung wird gehemmt. Zudem schließen hohe Wasserstoffpartialdrücke das thermodynamische Fenster für den Abbau von Fettsäuren in der Acetogenese. Neben der Essigsäure kommt es dadurch auch zur Akkumulation längererkettiger organischer Säuren, wie beispielsweise der Propionsäure (Nielsen et al. 2007). Werden keine Gegenmaßnahmen eingeleitet, kommt es zu einer vollständigen Übersäuerung und zum Erliegen der Biogasbildung. Die Biogasanlage muss daraufhin häufig komplett entleert und der Prozess langwierig wieder angefahren werden, was mit hohen ökonomischen Verlusten für den Anlagenbetreiber einhergeht (Balussou et al. 2012; Kliche et al. 2015).

Die **Ursachen für Prozessstörungen** sind vielfältig. Häufig können bereits schwankende oder für den Prozess ungünstige Prozessparameter (z.B. **Temperatur** oder **Raumbelastung**) eine Störung hervorrufen (Boušková et al. 2005; Burgstaler et al. 2011; Hecht et al. 2007). Schwankt beispielsweise die Raumbelastung oder wird diese plötzlich angehoben (**Stoßbelastung**), werden generell zu hohe Raumbelastungen gefahren (**Überfütterung**) oder wird ein neues Substrat eingesetzt, kann es zu einer plötzlichen Überproduktion von Säuren und Wasserstoff durch hydrolytisch/acidogene Bacteria kommen (Preißler 2010). Diese nehmen aufgrund des erhöhten oder geänderten Substrataufkommens plötzlich in ihrer Stoffwechselaktivität und darauf in ihrer Abundanz zu. Die deutlich langsamer wachsenden methanogenen Archaea können die Säuren nicht schnell genug abbauen und es kommt zu einer Prozessstörung/Übersäuerung (s. o.). Außerdem können zu hohe Raumbelastungen durch die Verkürzung der Verweilzeit des Substrates im Reaktor zur Auswaschung von langsam wachsenden, acetogenen und methanogenen Mikroorganismen mit denselben Konsequenzen für die Prozessstabilität führen (Gerardi 2003).

Neben der optimalen Raumbelastung ist auch die Zusammensetzung des Substrates entscheidend für die Prozessstabilität, da über das Inputmaterial alle für die verschiedenen Mikroorganismengruppen nötigen **Nährstoffe** in das System

eingetragen werden müssen. Man unterscheidet dabei die Makro- und Mikronährstoffe (Bauer et al. 2009). Zu den **Makronährstoffen** zählen beispielsweise Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H₂), Stickstoff (N), Phosphor (P), Schwefel (S), aber auch Eisen (Fe), Calcium (Ca) und Natrium (Na). Die Makronährstoffe sind meist in ausreichenden Mengen im Substrat enthalten, allerdings ist für eine stabile Prozessführung nicht nur ihre reine Masse, sondern auch ihr Konzentrationsverhältnis zueinander entscheidend. Idealerweise sollte z.B. ein C/N/P/S-Verhältnis von 600 : 15 : 5 : 1 eingehalten werden, um Prozessstörungen zu vermeiden (Weiland 2010).

Daneben stellen die Mikroorganismen auch verschiedene Ansprüche an die Versorgung mit **Mikronährstoffen**, die beispielsweise als Zentralatom in Enzymen oder als Co-Faktoren für eine Vielzahl von biochemischen Stoffwechselfvorgängen benötigt werden. Zu den essentiellen Mikronährstoffen zählen unter anderem die Spurenelemente Nickel (Ni), Kobalt (Co), Molybdän (Mo), Wolfram (W) und Selen (Se) (Demirel und Scherer 2011). Bei einer Unterversorgung mit Nährstoffen durch ungünstige Substratmischungen, wie beispielsweise bei der Monovergärung von Maissilage, können Mikroorganismen, aufgrund eines gehemmten Wachstums, ausgewaschen werden, wodurch es zu Prozessstörungen kommen kann (Lebuhn et al. 2009; Weiland 2008).

Obwohl die Makro- und die Mikronährstoffe für einen effizienten Anlagenbetrieb unabdingbar sind, ist auch ihre jeweilige Konzentration entscheidend. Bei zu hohen Konzentrationen können sie neben einer Reihe anderer Verbindungen auch als **Hemmstoffe** wirken (Bauer et al. 2009; FNR 2016b). Wird eine Anlage beispielsweise mit proteinreichem, d.h. stickstoffreichem Substrat gefüttert, kann es zu einem Anstieg der Ammoniumkonzentration kommen, das im chemischen Gleichgewicht mit Ammoniak steht. Vor allem bei hohen pH-Werten kann das Ammoniak dadurch für die Mikroorganismen toxische Konzentrationen erreichen. Ähnlich verhält es sich bei Substraten mit hohem Schwefelanteil, die bei niedrigeren pH-Werten zu einer toxischen Schwefelwasserstoffkonzentration führen können. Auch Schwermetalle/Spurenelemente können bei zu hohen Konzentrationen toxisch wirken. Insbesondere bei NawaRo-Systemen können außerdem Antibiotika und Tenside aus der Viehhaltung oder Mycotoxine aus Schimmelpilzen in Silagen in den Fermenter gelangen und dort das mikrobielle Gleichgewicht stören.

Neben den Störungen, die durch eine ungünstige Substratzusammensetzung hervorgerufen werden, kann auch die Verfahrenstechnik sowohl konstruktiv bedingt, als auch durch Fehler in Bezug auf die Betriebsweise den Prozess beeinträchtigen. So können beispielsweise ungünstige Substratmischungen in Kombination mit einer unzureichenden Umwälzung zur Bildung von **Schwimm- und Sinkschichten** führen (FNR 2016b; Ploechl et al. 2010). Dabei kann das Volumen der Schwimm- und/oder Sinkschicht das tatsächliche Gärvolumen im Reaktorraum erheblich herabsetzen (Gerardi 2003). Der Anlagenbetreiber fährt dadurch höhere Raumbelastungen bezogen auf das tatsächliche Gärvolumen als erwartet, was zur Überfütterung führen kann. Daneben können sich Teile der Schwimm- und/oder Sinkschicht lösen und Stoßbelastungen im System hervorrufen (Preißler 2010).

Des Weiteren können sich durch eine unzureichende oder gestörte Umwälzung, begünstigt durch Schwimm- und/oder Sinkschichten oder eine ungünstige Reaktorgeometrie, **Kurzschlussströme** im Reaktor ausbilden (Lebuhn 2016; Würdemann et al. 2011). Frisch eingebrachtes Substrat verbleibt nur kurz im Fermenter und wird teilweise unvergoren über die Gärrestentnahme wieder ausgetragen. Zwar bleibt die Reaktorbiologie weitgehend ungestört, jedoch wird aus ökonomischer Sicht zu wenig Biogas im Verhältnis zum Substrateinsatz gebildet (Balussou et al. 2012).

2.3.2 Frühwarnindikatoren FOS/TAC, FWI-VFA/Ca, und FWI-P/Ca

Der Biogasprozess ist anfällig für Störungen (siehe 2.3.1). Parameter wie die Gasbildungsrate oder der pH-Wert reagieren erst bei bereits bestehender Übersäuerung. Obwohl verschiedene Frühwarnindikatoren zur Beurteilung des Prozesszustandes und zur möglichst frühzeitigen Vorhersage von Prozessstörungen für anaerobe Gärsysteme entwickelt wurden, besteht nach wie vor großer Forschungsbedarf im Bereich der Anlagenmesstechnik für Biogasanlagen (Schüsseler 2008).

Der am häufigsten eingesetzte Frühwarnindikator ist der **FOS/TAC-Wert** (Lebuhn et al. 2014; McGhee 1968; Rieger und Weiland 2006; Weiland 2008). Er beschreibt das Verhältnis aus der Konzentration der flüchtigen organischen **Säuren (FOS)** und dem **totalen anorganischen Carbonat (TAC)**, einem Hauptbestandteil des Gesamtpuffers

des Systems (siehe 2.2.3). Bei einem beginnenden Prozessungleichgewicht kommt es zu einem Anstieg der Säurekonzentration und einem Abfall der Pufferkapazität, wodurch der FOS/TAC-Wert steigt (siehe 2.3.1). Der FOS/TAC-Wert wird i. d. R. durch Titration ermittelt, was seine Bestimmung günstig und einfach macht. Die am weitesten verbreitete Titrationsmethode zur FOS/TAC-Bestimmung ist die Nordmann-Methode (Nordmann 1977). Dabei wird eine Gärrestprobe mittels Zwei-Punkt-Titration mit 0,1 N Schwefelsäure auf zunächst pH 5 zur Bestimmung des TAC und dann auf pH 4,4 zur Bestimmung des FOS titriert. Anhand der Säureverbräuche zum Erreichen der jeweiligen pH-Werte kann der FOS- und TAC-Wert bestimmt werden. Der FOS/TAC-Wert ist im stabilen Betrieb je nach Anlage und eingesetztem Substrat unterschiedlich. Als grobe Orientierung kann aber bei FOS/TAC-Werten zwischen 0,2 und 0,4 von einem stabilen Prozess ausgegangen werden, während FOS/TAC-Werte $> 0,4$ eine mögliche Überlastung und Werte $< 0,2$ eine mögliche Unterbelastung des Systems anzeigen. In verschiedenen Studien wurde allerdings auch gezeigt, dass die Bestimmung der Säure- und Pufferkonzentration mittels Titration ungenau ist und der FOS/TAC-Wert nicht immer frühzeitig vor Prozessstörungen warnt (Purser et al. 2014; Rieger und Weiland 2006). Außerdem können hohe Ammoniumkonzentrationen die Titration zur Bestimmung des TAC-Wertes verfälschen (Bauer et al. 2011; Lebuhn et al. 2014).

Ein weiterer Frühwarnindikator ist der **FWI-VFA/Ca**, der das Verhältnis der Konzentration der flüchtigen organischen Säuren (engl.: **volatile fatty acids**) zur Konzentration des gelösten **Calciums** beschreibt (Kleyböcker et al. 2012b). Der FWI-VFA/Ca wurde für Anlagen entwickelt, die Abfall- und Klärschlamm zusammen mit fettreichen Co-Substraten vergären. Im Falle einer Prozessstörung kommt es zu einer Akkumulation flüchtiger und langkettiger Fettsäuren. Dabei präzipitieren langkettige Fettsäuren mit Calcium-Ionen und bilden unlösliche Salze. Dieser Effekt führt zu einer deutlichen Abnahme der Konzentration an gelöstem Calcium. Die Zunahme der Säurekonzentration und die Abnahme der Calciumkonzentration führen zu einer Zunahme des FWI-VFA/Ca. In verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, dass eine Verdopplung des Wertes des FWI-VFA/Ca verlässlich eine drohende Prozessstörung bei der Co-Vergärung fettreicher Substrate anzeigt (Kleyböcker et al. 2014; Lienen et al. 2013; Lienen et al. 2014b).

Der Frühwarnindikator **FWI-P/Ca** wurde für die Co-Vergärung fettreicher Substrate mit Klärschlamm aus Kläranlagen mit biologischer Phosphatelimination entwickelt (Kleyböcker et al. 2012b). Er beschreibt das Verhältnis der Konzentration von gelöstem **Phosphat** zur Konzentration von gelöstem **Calcium**. In Kläranlagen mit biologischer Phosphatelimination werden durch einen Wechsel von aeroben und anaeroben Bedingungen phosphatakkumulierende Mikroorganismen (PAO) gezielt angereichert (Oehmen et al. 2007). Über den Klärschlamm gelangen die mit Poly-Phosphaten beladenen PAO in die Biogasanlage. Im Falle einer Prozessstörung nehmen die Konzentrationen von flüchtigen und langkettigen organischen Säuren zu. Bei hohen Konzentrationen flüchtiger organischer Säuren beginnen die PAO das gespeicherte Phosphat abzugeben und im Gegenzug Säuren aufzunehmen. Die Zunahme der Phosphatkonzentration und Abnahme der Calciumkonzentration (s. o.) führt zu einem Anstieg des FWI-P/Ca, der ab einer Erhöhung des Ausgangswertes um das 1,5-fache eine Prozessstörung anzeigt.

2.3.3 Maßnahmen zur Prozessstabilisierung

Kann eine drohende Prozessstörung mit Hilfe von Frühwarnindikatoren erkannt werden, gibt es verschiedene Strategien zur Vermeidung einer Übersäuerung. Die einfachste und oft auch effektive Maßnahme, sofern die Störung früh genug erkannt wird, ist eine **Senkung der Raumbelastung** (FNR 2013; Preißler 2010). Dadurch wird die Säureproduktion aufgrund des geringeren Substrateintrags verringert und die im Reaktor akkumulierten Säuren können abgebaut werden. Außerdem verlängert sich die hydraulische Verweilzeit, wodurch der Austrag von prozessrelevanten Mikroorganismen gesenkt wird. Eine durch inhibierende Substanzen verursachte Senkung der Abbauleistung der Mikroorganismen kann dadurch teilweise ausgeglichen werden. Ist die Übersäuerung jedoch bereits zu stark fortgeschritten, ist eine Senkung der Raumbelastung allein nicht ausreichend zur Prozessstabilisierung.

Ein weiteres Verfahren zur Prozessstabilisierung ist die **Additivzugabe**. Eine Vielzahl unterschiedlicher Additive und Hilfsstoffe ist auf dem Markt verfügbar. Um den pH-Wert während einer Prozessstörung anzuheben, können alkalisch reagierende Substanzen, wie z. B. Natronlauge (NaOH), zugegeben werden. Es hat sich allerdings gezeigt, dass eine reine Anhebung des pH-Wertes nur temporär stabilisierend wirkt. Meist sind bereits nur schwer abbaubare Verbindungen

(beispielsweise Propionsäure) akkumuliert und der Prozess kann nicht nachhaltig durch pH-Wert-Anhebung stabilisiert werden (Würdemann et al. 2011).

Eine weitere Möglichkeit ist die Zugabe von **Calciumoxid (CaO)**. In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Zugabe von CaO einen prozessstabilisierenden Effekt auf Biogassysteme hat, die fett- und ölhaltige Co-Substrate vergären (Kleyböcker et al. 2012a; Kleyböcker et al. 2014). Die stabilisierende Wirkung beruhte dabei zum einen auf der alkalischen Reaktion des CaO in wässrigen Lösungen, wodurch der pH-Wert angehoben wird (s. o.), zum anderen aber auch auf Fällungsreaktionen. Dabei bildet gelöstes Calcium zusammen mit langkettigen Fettsäuren und Phosphaten wasserunlösliche Verbindungen (Koster 1987) (Abb. 4). Es entstehen Aggregate, die die Säuren binden und Aufwuchskörper für Biofilme darstellen (Liebrich et al. 2016). Innerhalb der Biofilme sind die Mikroorganismen, v. a. die methanogenen Archaea und ihre syntrophen Partner, vor den toxischen Milieubedingungen im Reaktor während einer Prozessstörung geschützt. In den so gebildeten Mikrohabitaten bestehen günstigere Bedingungen für den Abbau der Säuren und der Prozess stabilisiert sich.

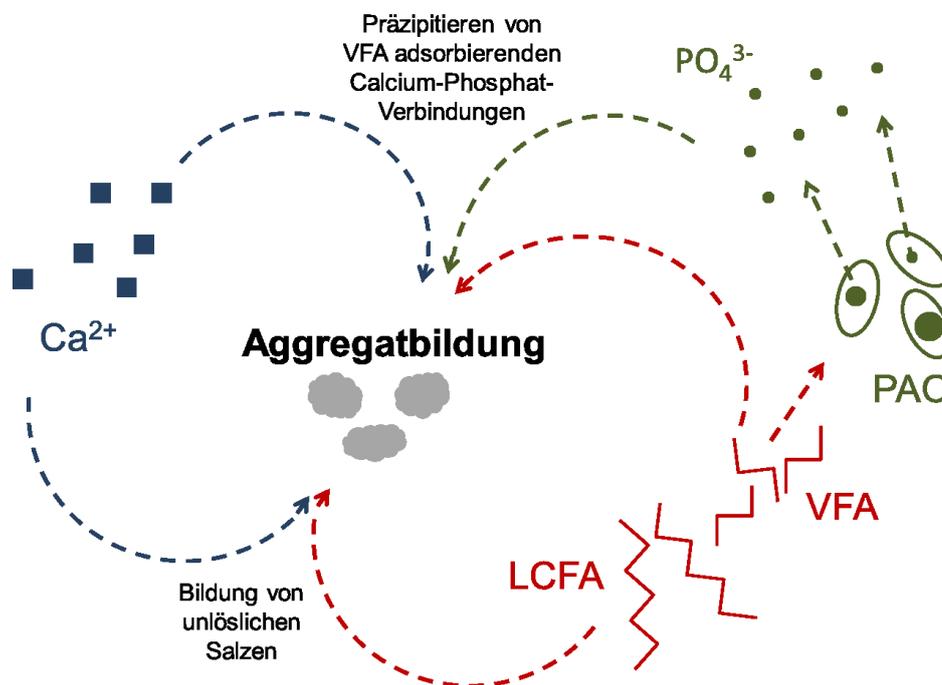


Abbildung 4: Mechanismus der Aggregatbildung bei der Co-Vergärung Fett- und Öl-haltiger Substrate; PAO: phosphatakkumulierende Organismen; VFA: kurzkettige Fettsäuren; LCFA: langkettige Fettsäuren

Ein anderer Ansatz der Prozessstabilisierung ist die Zugabe von **Spurenelementen**. In einigen Biogasanlagen kann der natürliche Bedarf an Mikronährstoffen für die Mikroorganismen durch das zugegebene Substrat nicht gedeckt werden (Demirel

und Scherer 2011; Lebuhn et al. 2009) (siehe 2.3.1). Dies ist vergleichsweise häufig bei NawaRo-Monovergärungen der Fall. Durch Zugabe dieser essentiellen Mikronährstoffe in Form von Spurenelementmischungen wird das Wachstum der entsprechenden Mikroorganismen wieder begünstigt und der Prozess kann sich stabilisieren (Effenberger und Lebuhn 2011).

2.4 Charakterisierung mikrobieller Biozönosen in Umweltproben

Die Stabilität des Biogasprozesses hängt im Wesentlichen von der Aktivität der mikrobiellen Lebensgemeinschaft im Fermenter ab. Ähnlich wie in den meisten Umweltproben, sind auch im Biogasprozess die Funktionen der einzelnen Organismen und ihre Interaktionen untereinander nach wie vor nicht ausreichend erforscht. Für eine optimale Biogasproduktion, auch unter wechselnden Prozessbedingungen, können jedoch genaue Kenntnisse über das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Mikroorganismengruppen entscheidend sein. Da schätzungsweise nur etwa 1 % aller Mikroorganismen kultivierbar sind, wurden in den letzten zwei Jahrzehnten kultivierungsabhängige Methoden zur Analyse mikrobieller Lebensgemeinschaften in Umweltproben immer mehr durch kultivierungsunabhängige, molekularbiologische, DNA-basierte Methoden ersetzt (Akkermans et al. 1994; Bunge et al. 2014). Dabei wird zumeist das 16S rRNA-Gen als Marker-Gen verwendet. Dieses Gen codiert die 16S-Untereinheit des Ribosoms der Mikroorganismen. Aufgrund der essentiellen Funktion des Ribosoms bei der Proteinbiosynthese (Olsen et al. 1986), ist das 16S rRNA-Gen ubiquitär verbreitet und hoch konserviert. An den Variationen der DNA-Sequenzen lassen sich Verwandtschaftsgrade der Mikroorganismen ableiten.

2.4.1 Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)

Eine DNA-basierte Methode zur Bestimmung dominanter Mikroorganismen und zur Analyse der Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften ist das genetische Fingerprinting mittels denaturierender Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE) (Muyzer et al. 1993). Dabei wird die DNA aus einer Umweltprobe extrahiert und spezifisch ein Marker-Gen vervielfältigt, in der Regel ein Abschnitt des mikrobiellen 16S rRNA-Gens (s. o.). Bei diesem Vervielfältigungsschritt mittels Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wird dem 16S rRNA-Genfragment

zusätzlich eine GC-Klammer angeheftet, eine kurze Sequenz aus Guanin- und Cytosinnukleotiden. Dieser Pool aus 16S rRNA-Genfragmenten wird anschließend mittels Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel entlang eines Harnstoffgradienten nach dem GC-Gehalt der einzelnen Sequenzen aufgetrennt, da die einzelnen Genfragmente aufgrund ihres unterschiedlichen GC-Gehaltes bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen denaturieren. Die einzelnen 16S rRNA-Fragmente wandern soweit im Gel in Richtung des Pluspols, bis sie ihre jeweilige Harnstoffdenaturierungskonzentration erreichen. Sobald die DNA-Fragmente denaturieren, werden aus den doppelsträngigen 16S rDNA-Fragmenten, jeweils zwei Einzelstränge, die durch die weitaus stabilere GC-Klammer an einem Ende zusammengehalten werden. Die dabei entstehende Struktur wirkt wie ein Haken und hält das Genfragment an der jeweiligen Position im Gel fest. Es entsteht ein DNA-Bandenmuster, das durch Färbung sichtbar gemacht werden kann und bei dem im besten Fall jede DNA-Bande ein 16S rRNA-Genfragment eines unterschiedlichen Mikroorganismus enthält. Mithilfe des Bandenmusters können die mikrobiellen Lebensgemeinschaften verschiedener Proben miteinander verglichen werden. Die einzelnen Banden können ausgeschnitten und die darin befindlichen 16S rRNA-Genfragmente sequenziert werden. Gleichet man die so bestimmten Sequenzen mit Datenbanken ab, kann in vielen Fällen eine phylogenetische Einordnung der Organismen erfolgen.

2.4.2 Metagenom- und Mikrobiomanalyse

Neuere und modernere Methoden zur Analyse mikrobieller Lebensgemeinschaften als die klassischen genetischen Fingerprinting-Methoden, wie beispielsweise die DGGE (s. o.), sind die Metagenom- und Mikrobiomanalyse. Wie bei den klassischen Methoden wird dabei auch die gesamte DNA aus einer Umweltprobe extrahiert. Bei der Mikrobiomanalyse wird ebenfalls ein bestimmtes Markergen mittels PCR vervielfältigt. Bei der Metagenomanalyse ist der fehleranfällige PCR-Schritt nicht notwendig. Stattdessen wird die genomische DNA mittels „shotgun“ (z. B. durch Endonukleasen oder Ultraschall) in kurze Fragmente zerlegt und die Gesamtheit der Fragmente, d. h. die Gesamtheit der genetischen Information (Metagenom), analysiert. Statt eines einzelnen Marker-Gens wird so die gesamte DNA der Probe für eine phylogenetische Einordnung der verschiedenen Mikroorganismen herangezogen.

Die Markergenfragemente bei der Mikrobiomanalyse bzw. die Metagenomfragmente bei der Metagenomanalyse werden anschließend mittels Hochdurchsatzsequenzierung, beispielsweise mittels Illumina-Technologie, millionenfach sequenziert (Campanaro et al. 2016; Caporaso et al. 2012; Shah et al. 2011). Die dabei erzeugten, riesigen Datenmengen werden mithilfe von Hochleistungscomputern und Datenbanken analysiert, was einen weitaus tieferen Einblick in die Zusammensetzung mikrobieller Lebensgemeinschaften erlaubt als mit bisherigen DNA-basierten Methoden (Wood und Salzberg 2014).

3. Material und Methoden

3.1 Versuchsanlagen und Messmethoden

3.1.1 Laborreaktoren und Probennahme

Für die NawaRo-Laborversuche wurden drei einstufige, voll durchmischte Laborreaktoren mit einem Gärvolumen von je 20 L (Versuchsreihen ÜberV, EntV, HochV, HochCoV) bzw. 23 L (Versuchsreihe CoV) verwendet (Abb. 5). Die Umwälzung erfolgte in den Versuchsreihen ÜberV, EntV, HochV und HochCoV durch ein Rührwerk (Eurostar 60 control, IKA®-Werke GmbH & CO. KG) mit je zwei Schrägblattrührern je Reaktor und in Versuchsreihe CoV pneumatisch durch tägliches 30-minütiges Einleiten von Biogas in den unteren Bereich des Reaktorraums.

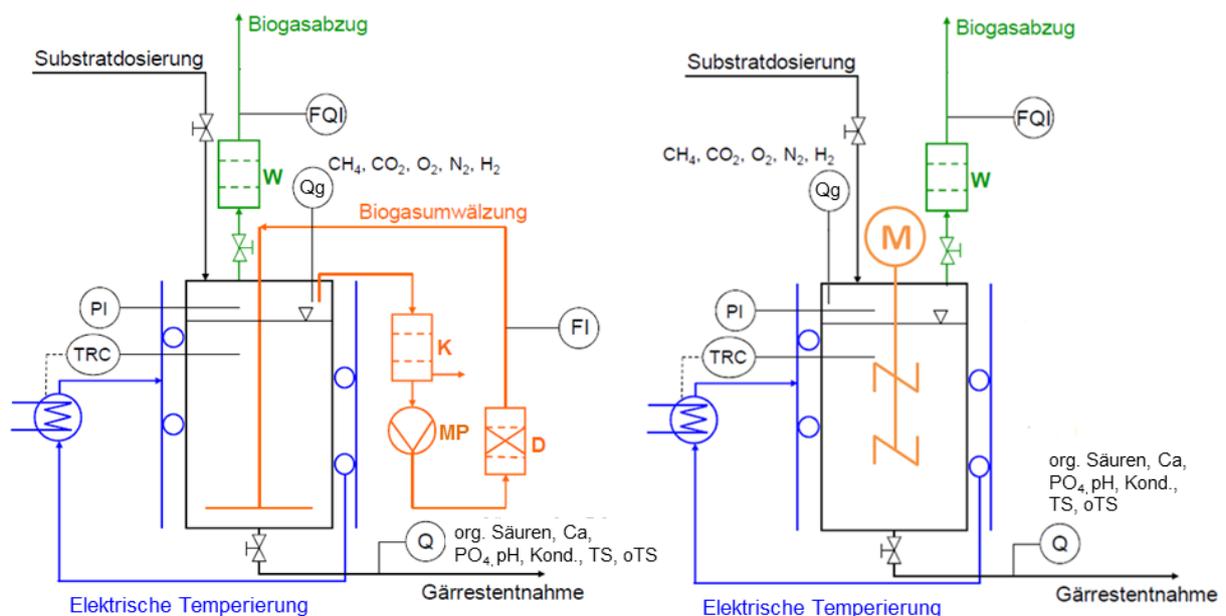


Abbildung 5: Anlagenschema modifiziert nach Kleyböcker et al. (2012a) für NawaRo-Laborversuche CoV (links) und ÜberV, EntV, HochV, HochCoV (rechts); D: Trockenturm; FI: Durchflussmesser; FGI: Volumenmessung des Biogases; K: Kondensatfalle; M: Rührwerk; MP: Membranpumpe; PI: Druckmesser; Q: qualitative nasschemische Analyse des Gärrest; Qg: qualitative Gasanalyse; TRC: Temperaturregelung; W: Waschflasche;

Für Versuchsreihe LangCoV wurden vier einstufige, voll durchmischte, hydraulisch umgewälzte Laborreaktoren mit einem Gärvolumen von je 180 L verwendet (Abb. 6). Die Umwälzung erfolgte dabei täglich für eine Stunde durch eine Exzentrerschneckenpumpe.

Alle Reaktoren wurden mit einer Gärtemperatur von 37 °C betrieben. Bis auf Versuchsreihe LangCoV wurden täglich Biogasproben aus einem Bypass des Gasauslasses für eine Biogasanalyse entnommen. Vor der Probennahme des Gärrests wurde der Gärrestaustauslass mit Gär Schlamm gespült. Die Probenfraktionen für die molekularbiologischen Analysen wurden direkt eingefroren und bei -20 °C gelagert, während die Probenfraktionen für die nasschemischen Analysen direkt weiter verarbeitet wurden.

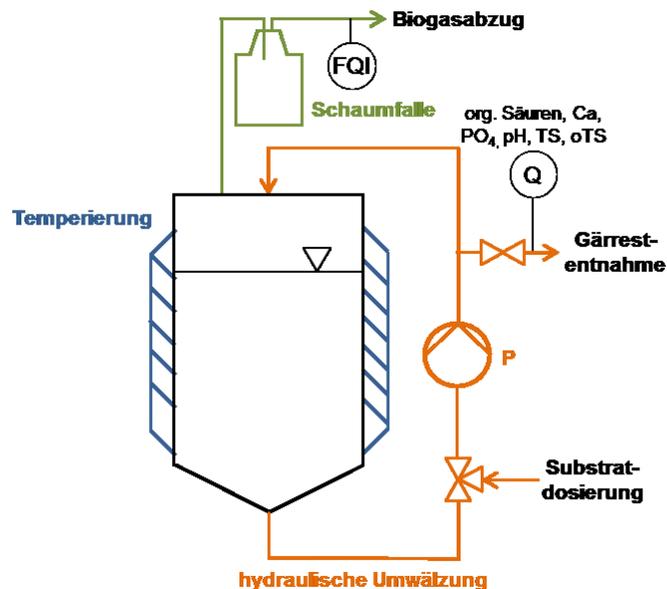


Abbildung 6: Anlagenschema für Versuchsreihe LangCoV; FQI: Volumenmessung des Biogases; P: Exzentrerschneckenpumpe; Q: qualitative nasschemische Analyse des Gärrest

3.1.2 Großtechnische Biogasanlage

Für die Erprobung des neuen FWI im Industriemaßstab wurde die Biogasanlage Friedland 1 (Schwarzer Weg 1, 17098 Friedland) des Anlagenbetreibers EnviTec Biogas AG ausgewählt. Der vollaufgemischte Hauptfermenter der Anlage verfügte über ein Fermentationsvolumen von 2500 m³ und wurde im mesophilen Temperaturbereich betrieben. Nachgeschaltet war ein untemperierter Nachgärer. Bezogen auf die Frischmasse wurden 62,5 % Maissilage, 30 % Rindergülle und 7,5 % Hühnertrockenkot als Substrate verwendet. Die Raumbelastung der Anlage wurde im Normalbetrieb nach dem Gasdruck gesteuert und lag im Durchschnitt bei 4 kg oTS m⁻³ d⁻¹.

3.1.3 pH-Wert-, Temperatur- und Leitfähigkeitsmessung

Unmittelbar nach der Probennahme wurden der pH-Wert und die Temperatur mittels des pH-Wert-Messgeräts WTW pH 340i mit der SenTix 41 pH-Elektrode und die

Konduktivität mittels des Konduktometers WTW Cond 3310 SET1 mit der Sonde WTW TetraCon 325 (Xylem Analytics Germany GmbH) im Gärrest bestimmt. Eine Kalibrierung beider Geräte erfolgte wöchentlich.

3.1.4 FOS/TAC-Bestimmung

Für die Bestimmung des FOS/TAC-Wertes wurden je 5 mL Gärrest mit dem Titrator TitraLab AT1000 und der PHC805 pH-Elektrode (Hach Lange GmbH) mit 0,1 N Schwefelsäure stufenweise auf einen pH Wert von 4,4 titriert. Mithilfe der benötigten Säuremenge wurde der FOS/TAC-Wert automatisch durch den Titrator errechnet.

3.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von organischen Säuren, Calcium, Carbonat und Phosphat

Zur Bestimmung der Konzentration der organischen Säuren (Summenparameter in Essigsäureäquivalenten) und des gelösten Calciums, ortho-Phosphats, und Carbonats wurden die Gärreste doppelt für 10 min bei 12.800 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5804) und eine 1:10-Verdünnung der zweiten Überstände mit den photometrischen Schnelltests LCK365, LCK327, LCK350 und LCK 388 (Hach Lange GmbH), entsprechend der Herstellerangaben, und dem DR2800 Photometer (Hach Lange GmbH) vermessen.

3.1.6 Bestimmung Trockensubstanz- und organischer Trockensubstanzanteil

Der Trockensubstanz- (TS) und organische Trockensubstanzanteil (oTS) der Gärrestproben wurden nach der DIN 38409-1 ermittelt. Das Leergewicht (LG) eines Tiegels wurde gewogen (Waage Sartorius CP220S-OCE), der Tiegel mit ca. 50 mL Gärrest gefüllt und erneut gewogen (Vollgewicht VG). Nach einer 24-stündigen Trocknung bei 105 °C (Memmert Trockenofen) wurde das Gewicht erneut bestimmt (Trockengewicht TG), die Probe für 2 h bei 550 °C verglüht und erneut gewogen (Glühgewicht GG). Mithilfe von Gl. (5) und (6) wurden die entsprechenden TS- und oTS-Anteile errechnet.

Trockensubstanzanteil:

$$TS [\%] = \frac{(TG - LG)}{VG - LG} * 100 \quad (5)$$

Organische Trockensubstanzanteil:

$$oTS [\%] = \frac{(TG - GG)}{VG - LG} * 100 \quad (6)$$

3.1.7 Gaschromatographie (GC) und GC mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)

Zur Bestimmung des Wasserstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff-, Methan- und Kohlenstoffdioxidanteils im Biogas wurde der Gaschromatograph (GC) SRI 8610C mit einer Silicagel-Säule, einer Molsieb 13X-Säule und einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) mit Argon als Trägergas verwendet. Die Auswertung der Peakflächen erfolgte mit der Software Peak Simple (SRI Instruments).

Die organischen Verbindungen (Molekülgewicht 40 – 450 Da) in den Aggregaten wurden von Frau Lorina Schmalz vom Dresdner Grundwasserforschungszentrum e.V. mittels GC-MS analysiert. Es wurde der GC Trace GC-2000 (Thermo-Finnigan) mit einer VF-5ms-Säule (Varian) mit dem Massenspektrometerdetektor Trace-DSQ (Thermo-Finnigan) verwendet. Die Identifizierung der Einzelstoffe erfolgte durch Abgleich der massenspektrometrischen Daten mit der NIST-Bibliothek.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Übersäuerungsversuche (ÜberV) - Identifizierungen eines Frühwarnindikators

Zur Identifizierung eines Frühwarnindikators wurden in drei Laborversuchen (ÜberV 1 - 3), mit kontinuierlicher Rührung bei 90 U min^{-1} , gezielt Prozessstörungen (Übersäuerungen) durch Überfütterung provoziert. Dazu wurde die Raumbelastung stufenweise alle acht Tage um $1 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ erhöht. Bezogen auf den oTS wurde eine Mischung aus 95 % Maissilage ($31,7 \pm 1,7 \text{ \%oTS}$) und 5 % Rindergülle ($1,71 \pm 0,1 \text{ \%oTS}$) als Substrat verwendet, die vor der Fütterung aus verfahrenstechnischen Gründen für 10 s in einem Standmixer (WMF Kult pro Power, WMF) zerkleinert wurde.

3.2.2 Großtechnischer Versuch (GroßV) – Erprobung des neuen FWI A/eiCon im Industriemaßstab

Der neue FWI A/eiCon wurde an einer großtechnischen Biogasanlage in Friedland durch Anheben der Raumbelastung zur Erzeugung einer leichten Prozessinstabilität erprobt. Zunächst wurde die im Normalbetrieb nach dem Gasdruck gesteuerte

Raumbelastung über einen Zeitraum von zwei Wochen konstant bei $4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gehalten, um den Ausgangszustand der Anlage zu charakterisieren und die Prozessparameter bei Normalbetrieb aufzunehmen. Anschließend wurde die Raumbelastung um ca. 6,3 % gesteigert und der Prozesszustand durch tägliche Vor-Ort-Messung verfolgt. Nach erfolgtem Warnsignal wurde die Raumbelastung wieder auf den Ausgangswert gesenkt.

3.2.3 Entsäuerungsversuche (EntV) - Prozessstabilisierungen durch Additivzugabe

Drei durch Überfütterung übersäuerte Biogasprozesse (siehe 3.2.1) wurden in drei Laborversuchen (EntV 1 - 3) bei kontinuierlicher Rührung bei 90 U min^{-1} durch Additivzugabe und Senkung der Raumbelastung stabilisiert. Als Additive wurden jeweils $5 - 2000 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ CaO (EntV 3), $1 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ der Spurenelementmischung EnviTal constant (EnviTec Service GmbH) in Kombination mit $80 - 120 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ NaOH zur pH-Wert-Anhebung (EntV 1), sowie $2500 - 5000 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ des zur Entschwefelung entwickelten, eisenhydroxidhaltigen FerroSorp DG (HeGo Biotech GmbH) (EntV 2) eingesetzt. Bis zum Absinken der Säurekonzentration auf $4 - 6 \text{ g L}^{-1}$ wurde nur Rindergülle ($3,4 \pm 0,2 \text{ \%oTS}$) bei einer Raumbelastung von $0,4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ als Substrat verwendet. Danach wurde eine Mischung aus 80 % Maissilage ($29,9 \pm 2,7 \text{ \%oTS}$) und 20 % Rindergülle, bezogen auf den oTS, verwendet und die Raumbelastung stufenweise auf $2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ angehoben.

3.2.4 Etablierung einer NawaRo-Langzeit-Hochlastvergärung (HochV)

Zur Etablierung einer Langzeit-Hochlastvergärung von NawaRo wurden in drei Laborversuchen (HochV 1 - 3) mit kontinuierlicher Rührung bei 110 U min^{-1} stufenweise die Leistung gesteigert. Dazu wurden 80 % Maissilage ($43,3 \pm 0,9 \text{ \%oTS}$) und 20 % Rindergülle ($4,1 \pm 1,4 \text{ \%oTS}$), bezogen auf den oTS, vergoren und die Raumbelastung stufenweise alle acht Tage um $1 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ auf $7,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ angehoben. Der neue FWI A/eICon wurde zur Beurteilung des Prozesszustandes verwendet. Bei einer drohenden Prozessstörung wurde den Systemen in HochV 1 $1 - 2 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ der Spurenelementmischung EnviTal constant, $80 - 440 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ NaOH und kurzzeitig $750 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ CaO zugegeben. In HochV 2 wurden $100 - 1000 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ CaO und kurzzeitig $90 - 440 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ NaOH eingesetzt und in HochV 3 zunächst $80 - 470 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ NaOH und später $100 - 300 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ FerroSorp DG, $300 - 1500 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$), $50 - 150 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$

Aluminiumchlorid (AlCl_3) und $290 - 590 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ Manganoxid (MnO_2). Bei anhaltendem Warnsignal wurde zusätzlich die Raumbelastung abgesenkt.

3.2.5 Etablierung einer stabilen Co-Vergärung von NawaRo und Rapsöl (CoV)

In drei diskontinuierlich pneumatisch umgewälzten (täglich 30 min) Laborversuchen (CoV 1 - 3) wurde der Gärschlamm einer mit Maissilage und Rindergülle betriebenen Biogasanlage (EnviTec Biogas AG, Anklam, Anlage 3) ($5,2 \pm 0,2 \text{ \%oTS}$) mit Rapsöl co-vergoren. Die Substratzufuhr erfolgte alle 48 h und die Raumbelastung wurde von 2 auf $3 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gesteigert.

3.2.6 Etablierung einer Hochlast-Co-Vergärung von NawaRo und Öl (HochCoV)

Zur Etablierung einer Hochlast-Co-Vergärung von NawaRo und Rapsöl wurde in zwei Laborversuchen (HochCoV 1 und 2) mit kontinuierlicher Rührung bei 50 U min^{-1} Rindergülle ($5,4 \text{ \%oTS}$) und Maissilage ($43,2 \pm 0,8 \text{ \%oTS}$) im oTS-Verhältnis 1:4 mit Rapsöl co-vergoren und die Raumbelastung stufenweise von 7 auf $9 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ und der Ölanteil am Substrat stufenweise von 15 auf 70 % angehoben. Nach 26 Tagen wurde die Fütterung zur Simulation einer Stoßbelastung eingestellt und die Prozesse an Tag 36 mit $9 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ weitergefahren. Der Prozesszustand wurde mit dem neuen FWI A/elCon überwacht und im Falle einer drohenden Prozessstörung wurde in HochCoV 1 $500 - 1000 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ CaO und $1 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ EnviTal constant, sowie in HochCoV 2 $530 - 1060 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ CaO zugegeben.

3.2.7 Etablierung einer Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung von Klärschlamm mit Rapsöl (LangCoV)

In vier Laborversuchen (LangCoV1 - 4) mit je 180 L Gärvolumen und diskontinuierlicher, hydraulischer Umwälzung (täglich 1 h) mittels Exzentrerschneckenpumpe wurden Langzeit-Hochlast-Co-Vergärungen mit Klärschlamm und Rapsöl als Substrate durchgeführt. In zwei Reaktoren wurde die Raumbelastung schnell, d.h. innerhalb von 90 Tagen auf $9 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, und in zwei Reaktoren langsam, d.h. im gleichen Zeitraum auf $6 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ stufenweise gesteigert. Der oTS-Rapsölanteil im Substrat wurde stufenweise auf 90 % bzw. 85 % angehoben. Der Prozesszustand wurde mit dem FWI-VFA/Ca bewertet und bei drohender Prozessstörung wurde $300 - 600 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ CaO als Gegenmaßnahme zugegeben.

3.3 Molekularbiologische und mikroskopische Analysen

3.3.1 Genetisches Fingerprinting mittels Denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE)

Zur Charakterisierung und zur Analyse der zeitlichen Veränderung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften wurden genetische Fingerprintings mithilfe der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) durchgeführt (Muyzer et al. 1993). Bei dieser Methode werden Genfragmente, in dieser Studie 16S rRNA Genfragmente, entsprechend ihres Guanin- und Cytosingehaltes (GC-Gehalt) in einem Polyacrylamidgel durch einen Harnsäuregradienten aufgetrennt. Dazu wurde zunächst die genomische DNA aus je 350 mg gefrorenem Gärrest mit dem Fast DNA Spin kit for soil (MP Biomedicals) nach Herstellerangaben mit einem doppelten Homogenisierungsschritt von jeweils 20 s und einer Geschwindigkeit von 4 m s^{-1} extrahiert. Anschließend wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und universellen Primern die 16S rRNA-Genfragmente aus der genomischen DNA amplifiziert. Für jede Probe wurden zwei 25 μL PCR-Reaktionen mit je 0,25 μL DFS-Taq DNA Polymerase (Bioron), 2,5 μL mitgeliefertem Complete KCl Reaction Buffer, 0,5 μL mitgelieferter MgCl_2 -Lösung, je 1 μL Forward- und Reverseprimer (10 μM), 1,5 μL 1:100 verdünnter Probe und 16 μL DNA/RNA-freiem Wasser angesetzt. Zur Analyse der Lebensgemeinschaft der Bacteria wurde das Primerpaar BAC338F-GC/BAC805R und für die methanogenen Archaea das Primerpaar 348F-GC/786R verwendet (Sawayama et al. 2004; Yu et al. 2005). Die PCR-Programme beinhalteten einen initialen Denaturierungsschritt für 2 min bei 94 °C, 30 Zyklen für Bacteria bzw. 40 Zyklen für methanogene Archaea, bestehend aus Denaturierung für 20 s bei 94 °C, Primerhybridisierung für 30 s bei 62 °C für Bacteria bzw. 35 s bei 56,6 °C für methanogene Archaea und Elongation bei 72 °C für 50 s, sowie einen finalen Elongationsschritt für 5 min bei 72 °C. Die DGGE-Gele wurden mit einem Acrylamidgradienten von 6 - 9 % und einem Harnsäuregradienten von 35 – 60 % für Bacteria und 35 – 65 % für methanogene Archaea hergestellt und mit je 600 ng aufgereinigtem PCR-Produkt (GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Fisher) pro Probe beladen. Die Elektrophorese wurde für 17 h bei 115 V und 60 °C durchgeführt (DCode™ System, Bio-Rad), wodurch die 16S rRNA-Genfragmente entsprechend ihres GC-Gehaltes in Form von DNA-Banden aufgetrennt wurden. Die DNA-Banden, die im Idealfall nur die 16S rRNA-Genfragmente eines bestimmten Organismus enthalten, wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Die DNA-Banden wurden

einzelnen ausgeschnitten, die DNA durch Inkubation in „Crush and Soak“ Puffer bei 37 °C und 100 rpm über Nacht eluiert und mittels Ethanol-fällung aufgereinigt. Die aufgereinigten und vereinzelteten 16S rRNA-Genfragmente wurden mittels PCR reamplifiziert (s. o.), wobei die jeweiligen Forwardprimer ohne GC-Klammer verwendet wurden und das PCR-Programm für die methanogenen Archaea nur 30 Zyklen umfasste. Die Reamplifikate wurden erneut aufgereinigt (GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Fisher) und durch die GATC Biotech AG sequenziert. Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des BioEdit Sequence Alignment Editors 7.2.5 zu auswertbaren DNA-Sequenzen bearbeitet und durch Abgleich mit der NCBI-Datenbank und dem BLAST-Tool phylogenetisch eingeordnet (Altschul et al. 1990; Hall 1999).

3.3.2 Quantitative PCR (qPCR)

Zur Quantifizierung der bakteriellen 16S rRNA-Genfragmente innerhalb einer Gärrestprobe wurde die genomische DNA extrahiert (siehe 3.3.1), die als Template diente. Für die qPCR wurde ein SYBR Green Assay (SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit, Biorline) und das StepOne Plus System (Applied Biosystems) verwendet. Der Reaktionsmix je Probe bestand aus 10 µL Mastermix, je 0,8 µL Primer 331F und 797R, 1 µL Template und 7,4 µL DNA/RNA-freiem Wasser (Nadkarni et al. 2002). Das PCR-Programm bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 min, 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Annealing bei 57 °C für 30 s und Elongation bei 72 °C für 20 s, sowie einer Schmelzkurvenanalyse zum Nachweis der Spezifität des Amplifikats. Als Standard wurde das Plasmid pGEM-T Easy Vector (Promega) mit dem 16S rRNA-Gen von *Escherichia coli* JM109 in 1:5-Verdünnungsschritten von 2,5 ng µL⁻¹ bis 0,004 ng µL⁻¹ verwendet. Die Proben und Standards wurden in Dreifachbestimmung vermessen. Für die Auswertung wurde die Software StepOne Plus (Applied Biosystems) verwendet.

3.3.3 Metagenom- und Mikrobiomanalyse

Für die Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften wurden für ausgewählte Gärrestproben Metagenom- und Mikrobiomanalysen durchgeführt. Dazu wurde zunächst die genomische DNA aus den Gärresten isoliert. Für die Metagenomanalyse wurde die DNA aus jeweils 200 mg Probe mit dem NucleoSpin Soil Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) extrahiert. Für die Mikrobiomanalyse wurde die DNA wie in 3.3.1 beschrieben extrahiert. Für beide Methoden wurde die

genomische DNA mittels Illustra MicroSpin S-400 HR Columns (GE Healthcare) aufgereinigt und anschließend für die Analyse zum Sequenzierdienstleister GATC Biotech AG versandt.

Für die Metagenomanalyse wurde die genomische DNA durch GATC mittels „shotgun“ in kleinere Fragmente zerlegt und je 150 bp lange komplementäre DNA-Fragmentpaare mittels Illumina HiSeq-Technologie sequenziert. Bei der anschließenden bioinformatischen Auswertung wurden Sequenzpaare mit unzureichender Qualität und Sequenzen ohne komplementäre Partnersequenz aussortiert und die übrigen Sequenzpaare mittels Kraken und der Minikraken-Datenbank taxonomisch eingeordnet (Wood und Salzberg 2014). Dabei wird jede erzeugte DNA-Sequenz in kürzere Fragmente mit der Basenlänge k , sogenannte k -mere mit standartmäßig $k=31$, zerlegt. Jedes k -mer wird mit der Datenbank abgeglichen und dem niedrigsten gemeinsamen Vorfahren im Stammbaum zugeordnet. Der Pfad im Stammbaum mit den meisten zugeordneten k -meren entspricht der taxonomischen Einordnung der sequenzierten DNA-Sequenz.

Für die Mikrobiomanalyse wurden die 16S rRNA-Genfragmente aus der genomischen DNA durch GATC mit den Primern 357F und 926R amplifiziert (Methé et al. 2012). Die vervielfältigten Amplicons wurden mittels Illumina HiSeq-Technologie sequenziert und Sequenzen minderer Qualität mittels bioinformatischer Methoden aussortiert. Die verbliebenen Sequenzen wurden mittels Blast-Analyse und der RDP-Datenbank taxonomisch eingeordnet (Altschul et al. 1990; Cole et al. 2008).

Die durch GATC erzeugten Ergebnisse und Abbildungen wurden in modifizierter Form für diese Arbeit verwendet.

3.3.4 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Die Färbung zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Poly-Phosphaten in PAO wurde nach Kawaharasaki et al. (1999) durchgeführt. Die Probe wurde mit einem Deckgläschen abgedeckt und unter dem Mikroskop (Zeiss Axio Imager M2, Carl Zeiss) unter UV-Licht mikroskopiert.

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Aggregate wurden von Frau Michaela Hache vom Dresdner Grundwasserforschungszentrum e.V. durchgeführt. Dazu wurden die Proben einzeln mit DTAF (Proteinfärbung), Calcein (Calciumfärbung),

DiD (Lipidfärbung) und Calcofluor White (Polysaccharidfärbung), gefärbt und anschließend unter UV-Licht mit 200-facher Vergrößerung mikroskopiert.

3.3.5 Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FE-REM) und energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Die Analysen mittels Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie wurden von Frau Dr. Monika Kasina bei 20 kV durchgeführt. Vor der Messung wurden die Proben unter Infrarot getrocknet, mittels Kohlenstoffkleber auf dem Träger fixiert und mit Gold überschichtet (2 x 120 s, je 40 nm Gold). Die quantitative Analyse der chemischen Zusammensetzung erfolgte mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie. Die Elementbestimmung wurde durch Punktanalysen durchgeführt und die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe der Thermo Scientific NSS Software. Die Ergebnisse wurden auf 100 % wasserfreie Base umgerechnet.

3.3.6 Lichtmikroskopische und stereomikroskopische Analysen

Für die lichtmikroskopischen Analysen wurden ca. 5 µL Gärrest in einen Tropfen Reinstwasser auf einem Objektträger pipettiert. Die Probe wurde mit einem Deckgläschen abgedeckt und unter dem Mikroskop (Zeiss Axio Imager M2, Carl Zeiss) bei verschiedenen Vergrößerungsstufen mittels Durchlicht mikroskopiert.

Für die Zählung der Aggregate wurde der Gärrest 1:5 verdünnt und je 500 µL in einen transparenten Deckgläschenendeckel (Grundfläche 4,8 cm²) überführt. In 6-facher Bestimmung wurden die Aggregate in je 1 cm² mittels Stereomikroskopie (Stereomikroskop MZ10 F, Leica) ausgezählt und die Anzahl der Aggregate auf je einen Milliliter hochgerechnet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Entwicklung eines Frühwarnindikators für NawaRo-Biogasanlagen

Für die Entwicklung eines Frühwarnindikators für die Vergärung von NawaRo wurden gezielt Prozessstörungen (Übersäuerungen) im Labormaßstab in drei parallelen Übersäuerungsversuchen (ÜberV 1 - 3) durch Überfütterung provoziert. Dazu wurde die Raumbelastung alle acht Tage um $1 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ angehoben. Abbildung 7 zeigt exemplarisch den Verlauf der Prozessparameter für ÜberV 2.

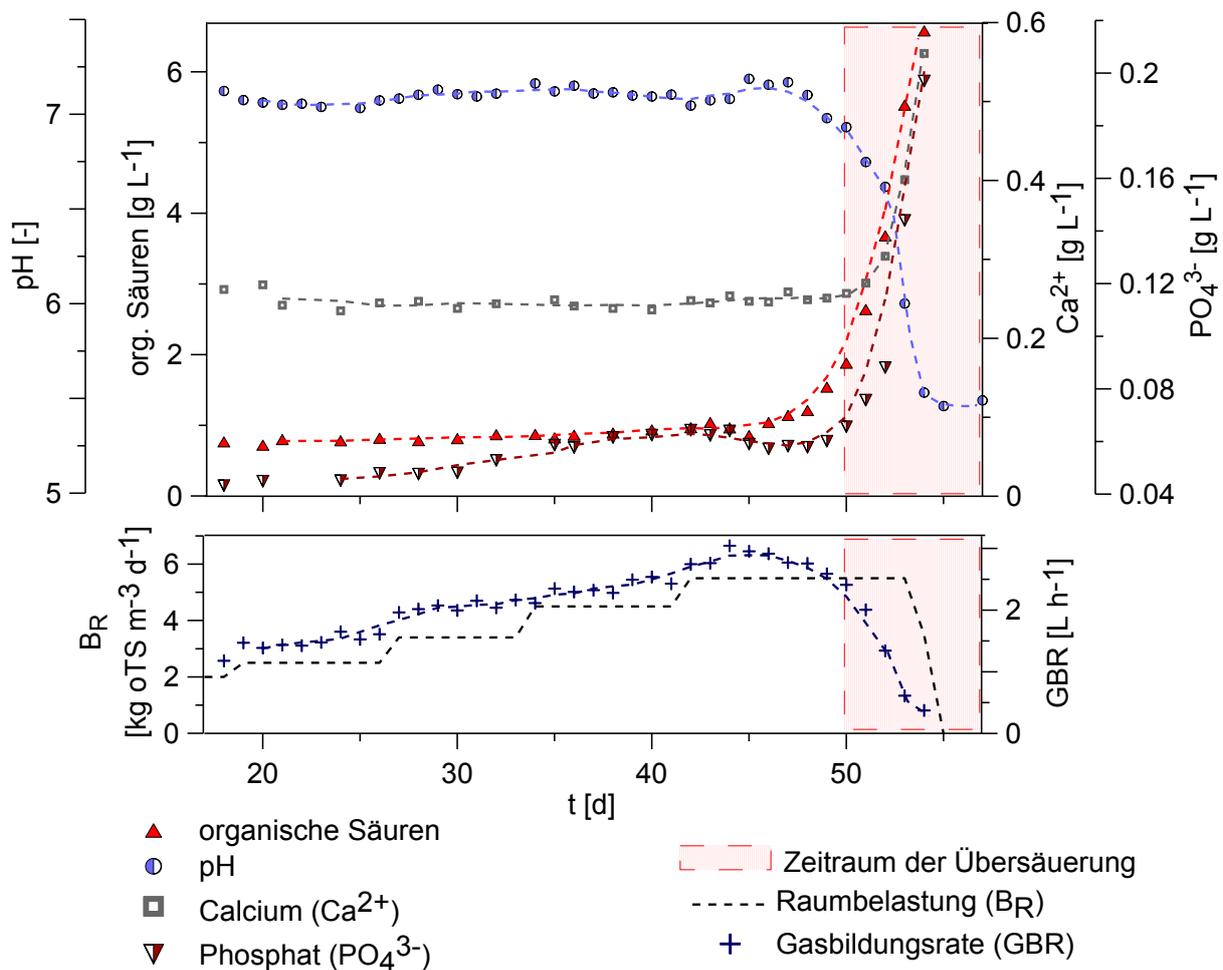


Abbildung 7: Verlauf der Prozessparameter bei der Überfütterung in ÜberV 2. Die Gasbildungsrate steigt bis zum Erreichen der kritischen Raumbelastung von $5,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Im Zuge der Übersäuerung ab Tag 50 wird die Gasproduktion fast vollständig eingestellt.

Mit steigender Raumbelastung nahmen in allen Versuchen zunächst die Gasbildungsraten zu. Die Konzentrationen der organischen Säuren blieben niedrig ($0,5 - 1,8 \text{ g L}^{-1}$), die pH-Werte im neutralen Bereich ($7,0 - 7,3$) und die durchschnittlichen Methanausbeuten ($0,37 - 0,39 \text{ L (g oTS)}^{-1}$) lagen leicht über dem

Erwartungsbereich ($0,23 - 0,36 \text{ L (g oTS)}^{-1}$) (Tab. 3). Ab einer Raumbelastung von $4,5 - 6,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ nahmen die Gasbildungsrate und die Methanausbeuten stark ab, die Konzentrationen der organischen Säuren stiegen auf $6,2 - 6,6 \text{ g L}^{-1}$ an und die pH-Werte fielen auf $5,2 - 5,3$ in den sauren Bereich, was eine Übersäuerungen der Prozesse anzeigte. Ab einem Abfall der Gasbildungsrate um 90 % wurde eine vollständige Übersäuerung angenommen.

Verschiedene Parameter wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Frühwarnindikator untersucht. Die genauen Frühwarnzeiten der einzelnen Parameter für die drei Übersäuerungsexperimente sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Vergleich der Frühwarnzeiten ausgewählter Prozessparameter und Frühwarnindikatoren in den Übersäuerungsexperimenten

Übersäuerungs- Frühwarnzeit [d]							
Experiment	pH	CH ₄ - ausbeute	org. Säuren	FWI- VFA/Ca	FWI- P/Ca	FOS/TAC	A/eICon
ÜberV 1	2	2	3	4	9	4	4
ÜberV 2	4	3	3	4	3	5	7
ÜberV 3	4	3	4	5	3	7	9

Die klassischen Parameter pH-Wert, organische Säurekonzentration und die Methanausbeute warnten nur 2 – 4 Tage vor Eintreten der vollständigen Übersäuerung. Im Vergleich zu den anderen FWI warnte der FOS/TAC-Wert in dieser Versuchsreihe mit einer Warnzeit von 4 – 7 Tagen am zweitfrühesten (Abb. 8). Der FWI-VFA/Ca (Verhältnis aus den Konzentrationen der organischen Säuren und des Calciums) warnte mit 4 - 5 Tagen nur geringfügig früher als die klassischen Parameter.

In den Übersäuerungsexperimenten wurde keine deutliche Abnahme der Konzentration von gelöstem Calcium bei steigender Säurekonzentration beobachtet. Während einer Prozessstörung akkumulieren in Anlagen, die Klärschlamm und lipidhaltige Co-Substrate vergären, langkettige Fettsäuren, die mit Calcium ausfallen und damit eine Abnahme der Konzentration von gelöstem Calcium bewirken (Kleyböcker et al. 2012b; Koster 1987). Offenbar ist der Anteil von langkettigen Fettsäuren in typischen NawaRo-Substraten zu gering und die im Vergleich zu

Klärschlamm 10 – 20 Mal höhere Calciumkonzentration zu hoch, um eine Abnahme der Calciumkonzentration vor einer Übersäuerung hervorzurufen.

In einem der Experimente (ÜberV 1) stieg die Phosphatkonzentration bereits früh an, wodurch der FWI-P/Ca (Verhältnis aus Phosphat- und Calciumkonzentration) mit einer Warnzeit von neun Tagen am frühesten warnte. In den beiden anderen Experimenten betrug die Warnzeit jedoch nur jeweils drei Tage. In Biogasanlagen, in denen Klärschlamm aus Kläranlagen mit biologischer Phosphatelimination vergoren wird, geben phosphatakkumulierende Organismen (PAO) bei hohen Säurekonzentrationen Phosphat an ihre Umgebung ab (Oehmen et al. 2004). Da in dieser Versuchsreihe kein Klärschlamm vergoren wurde, ist der Anstieg der Phosphatkonzentration vermutlich nicht den PAO geschuldet. Mittels DAPI-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie wurden keine Poly-Phosphatspeicher in den Mikroorganismen des Gärschlammes detektiert (Daten nicht gezeigt). In Tiermist ist der Großteil des Phosphats stattdessen anorganisch gebunden und die Konzentration von gelöstem Phosphat wird überwiegend durch den pH-Wert beeinflusst, wobei die Konzentration mit sinkendem pH-Wert zunimmt (Hjorth et al. 2010). Mit der Annahme, dass das Phosphat im Gärschlamm von NawaRo-Biogasanlagen ähnlich gebunden ist, nahm die Phosphatkonzentration in ÜberV 1 vermutlich durch eine minimale und nur schwer messbare Abnahme des pH-Wertes so stark zu. In einem Kurzversuch zur Validierung dieser These wurde NawaRo-Gärschlamm aus einer ebenfalls Maissilage und Rindergülle vergärenden Biogasanlage in Friedland mittels Salzsäure angesäuert. Dabei nahm die Phosphatkonzentration bei einer pH-Senkung von 7,5 auf 7 kontinuierlich um 140 % zu (Daten nicht gezeigt). Die Phosphatkonzentration in NawaRo-Biogasanlagen scheint damit stark abhängig vom pH-Wert zu sein.

Insgesamt reagieren die beiden für die Co-Vergärung von Lipiden entwickelten FWIs FWI-P/Ca und FWI-VFA/Ca aufgrund des höheren Calciumanteils und niedrigeren Lipidanteils weniger sensitiv auf Prozessstörungen, wenn Maissilage und Rindergülle als alleinige Substrate eingesetzt werden.

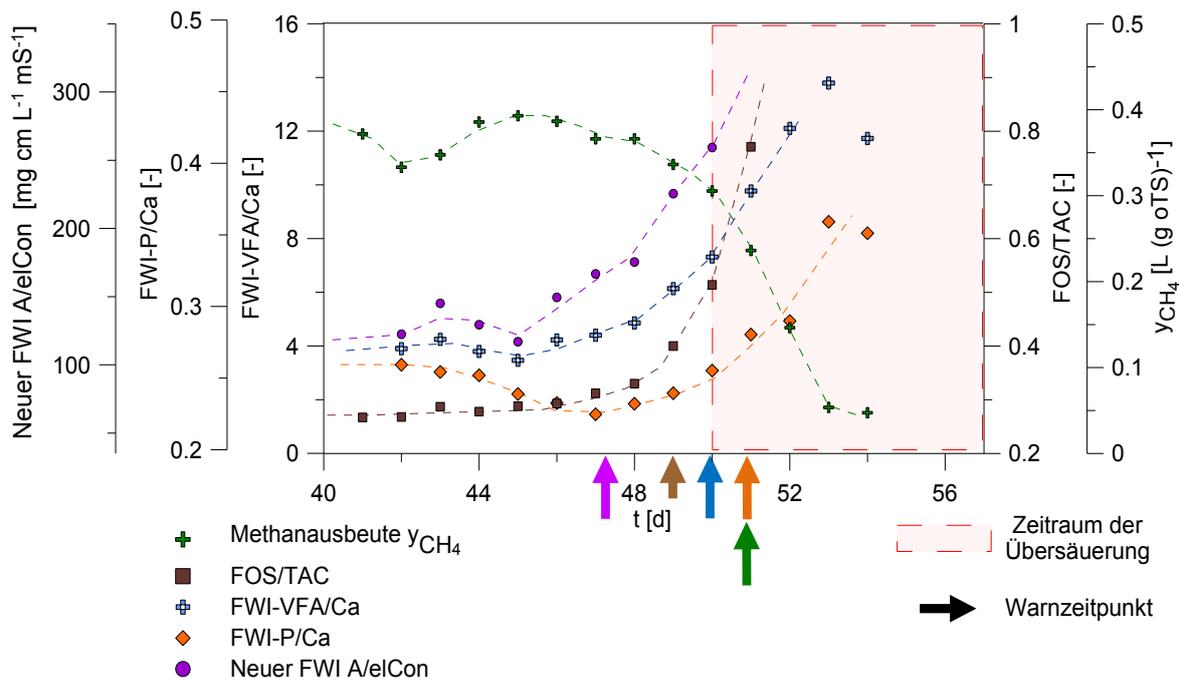


Abbildung 8: Verlauf der Methanausbeute und der Frühwarnindikatoren FWI-VFA/Ca, FWI-P/Ca, A/elCon und FOS/TAC kurz vor der Übersäuerung in ÜberV 2. Der A/elCon warnt bereits sieben Tage vor der vollständigen Übersäuerung, während die anderen Parameter nur 3 - 5 Tage vorher warnen. Farbige Pfeile zeigen den Warnzeitpunkt des jeweiligen FWIs an.

Im Verlauf der Übersäuerungsexperimente wurde eine Abnahme der durch Titration ermittelten Pufferkapazität TAC mit steigender Raumbelastung beobachtet. Gleichzeitig nahm auch die elektrische Leitfähigkeit ab. Da dieser Effekt bereits früher für landwirtschaftliche Biogasanlagen beobachtet wurde (Wiese und Knig 2008), besteht offensichtlich ein Zusammenhang zwischen der Pufferkapazität und der elektrischen Leitfähigkeit. Abbildung 9 zeigt, dass in den Übersäuerungsversuchen zwischen pH 6,5 und 8 eine lineare Abhängigkeit zwischen der elektrischen Leitfähigkeit des Gärschlammes und der Gesamtpufferkapazität bzw. dem Carbonat-Puffer bestand. Die Hauptformen des Carbonats im chemischen Gleichgewicht des Carbonatpuffers sind zwischen pH 4 und 7 Hydrogencarbonat und Kohlenstoffdioxid (Abb. 3) (Hecht 2009; McCarty 1964). Während einer Prozessstörung verschiebt sich mit steigender Säurekonzentration das chemische Gleichgewicht. Die Konzentration des geladenen Hydrogencarbonats nimmt ab, während die Konzentration von ungeladenem Kohlenstoffdioxid ansteigt. Mit der Abnahme der Hydrogencarbonatkonzentration nimmt vermutlich auch die elektrische Leitfähigkeit des Schlammes ab, da das Hydrogencarbonat einen großen Anteil an

der Gesamtleitfähigkeit des Schlammes zu haben scheint. Bei pH-Werten < 6,5 stieg die elektrische Leitfähigkeit jedoch wieder an, vermutlich durch Rücklösung von Ausfällungen (Daten nicht gezeigt).

Die Abhängigkeit der elektrischen Leitfähigkeit von der Pufferkapazität wurde genutzt, um einen neuen FWI als das Verhältnis aus der Konzentration der organischen Säuren (org. acids) zur elektrischen Leitfähigkeit (**electrical conductivity**) zu definieren, den **A/eICon**. Der A/eICon warnte mit Warnzeiten von 4 – 9 Tagen in zwei der drei Übersäuerungsexperimente am frühesten (Abb. 8, Tab. 4). Eine Warnung wurde durch einen Anstieg des Wertes um das 1,5-fache im Vergleich zum Wert während des stabilen Betriebes angezeigt.

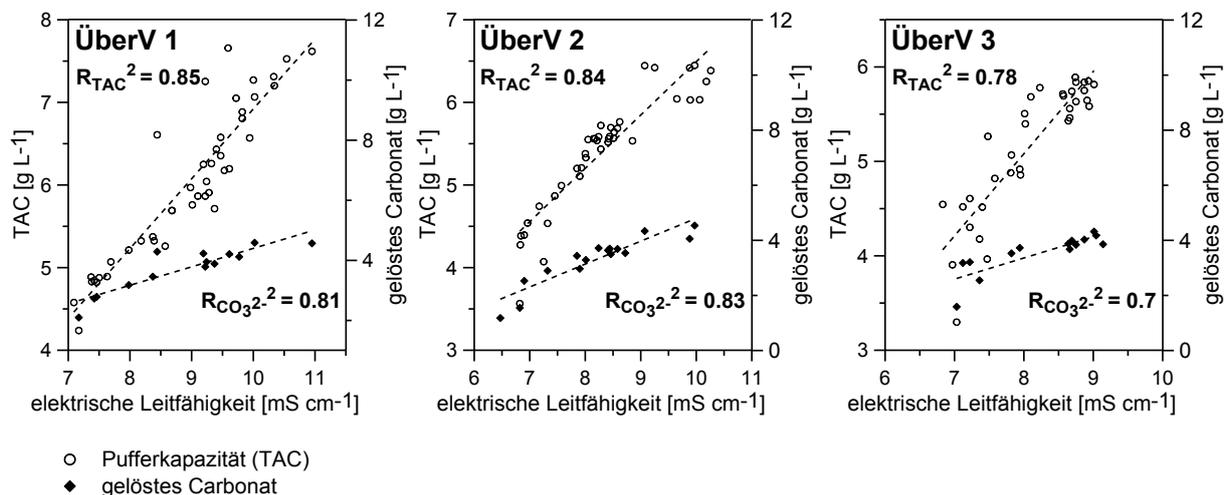


Abbildung 9: Lineare Abhängigkeit zwischen der elektrischen Leitfähigkeit mit der Gesamtpufferkapazität (TAC) und dem gelösten Carbonat im Gärschlamm der Übersäuerungsexperimente ÜberV 1 – 3 für pH > 6,5

Der neue FWI A/eICon ist einfach und günstig messbar, wenn für die Säuremessung ein photometrischer Schnelltest verwendet wird (siehe 3.1.4). Außerdem werden bereits online-Messsysteme für die Bestimmung der Konzentration organischer Säuren in Biogassystemen (Boe et al. 2007; Boe et al. 2010) entwickelt. Da die elektrische Leitfähigkeit bereits online bestimmt wird, wird auch der A/eICon in naher Zukunft online messbar sein.

4.2 Erprobung des neuen FWI A/elCon in der Großtechnik

In einem großtechnischen Versuch (GroßV) an der Biogasanlage Friedland 1 wurde der neue FWI A/elCon im Industriemaßstab erprobt. Zunächst wurde zur Charakterisierung des Ausgangszustandes die Raumbelastung über 18 Tage bei konstant $4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gehalten. In diesem Zeitraum lagen der pH-Wert mit 7,5 bis 7,9 im optimalen Bereich für die Methanogenese und die organischen Säuren bei ca. 2000 mg L^{-1} (Abb. 10). Der FOS/TAC zeigte mit 0,2 einen stabilen Prozess an, der Wert des A/elCon lag im stabilen Betrieb bei ca. 125 und die Energieausbeute betrug durchschnittlich $0,32 \text{ kWh t}_{\text{Substrat}}^{-1}$.

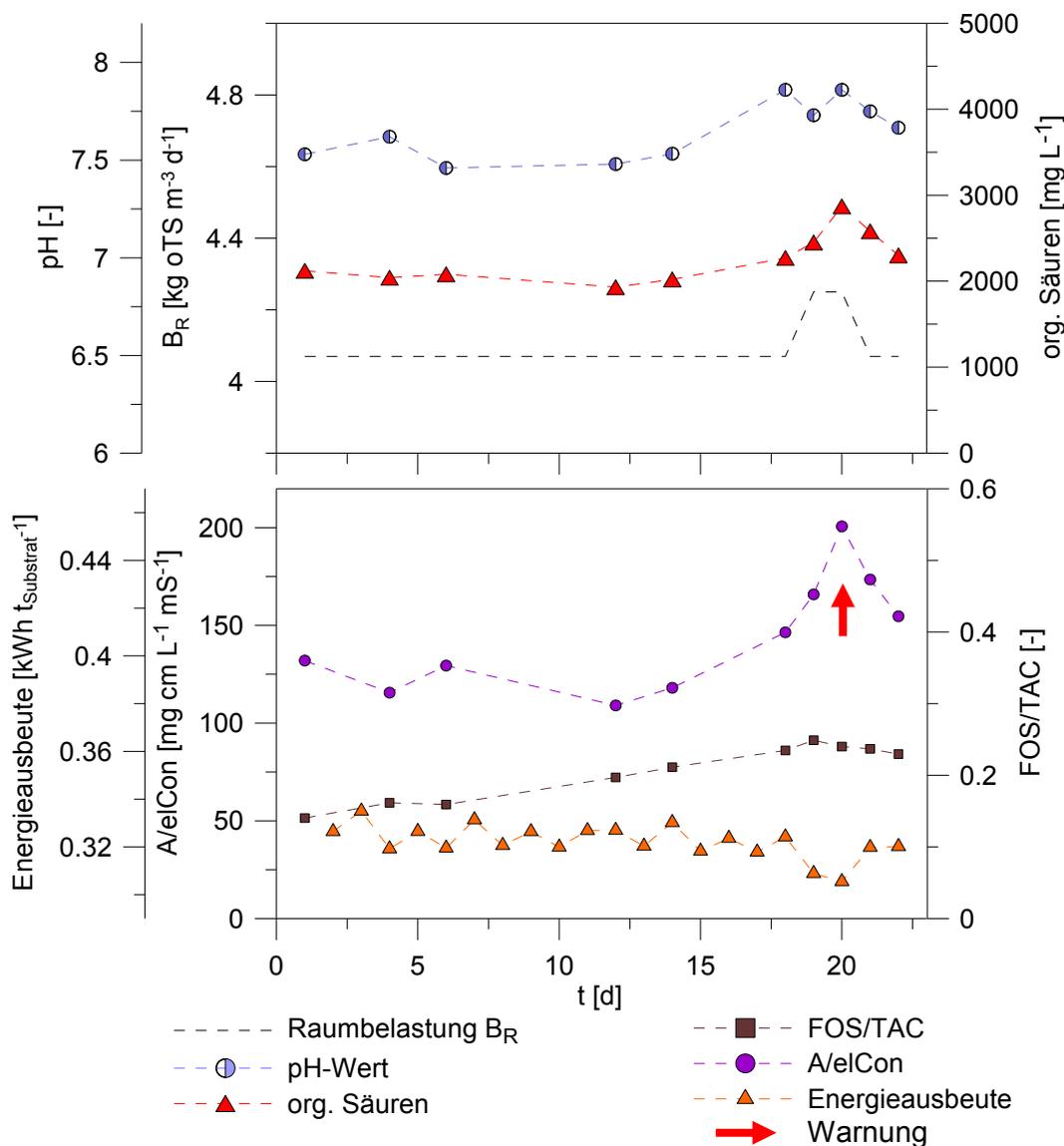


Abbildung 10: Übersicht der Prozessparameter bei der Erprobung des neuen FWI A/elCon an der großtechnischen, einstufigen, halbkontinuierlich betriebenen, landwirtschaftlichen BGA Friedland 1. Das A/elCon-Warnsignal ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Ab Tag 19 wurde die Raumbelastung um 6,3 % angehoben. Innerhalb von nur zwei Tagen nahm die Säurekonzentration um 44 % zu und der A/elCon warnte durch einen Anstieg um das 1,6-fache auf 200 vor einer drohenden Prozessstörung. Diese Prozessinstabilität wurde durch eine Abnahme der Energieausbeute um 6 % bestätigt. Der FOS/TAC-Wert stieg zwar ebenfalls um 24 %, zeigte mit einem Wert von 0,25 aber weiter einen stabilen Prozess an. Aufgrund der Warnsignale durch den A/elCon und durch die Energieausbeute wurde als Gegenmaßnahme die Raumbelastung wieder auf $4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gesenkt, um keinen wirtschaftlichen Schaden für den Anlagenbetreiber zu verursachen. Die Prozessparameter nahmen darauf wieder ihre Ausgangswerte an, was auf eine Stabilisierung des Prozesses hindeutete. Der neue FWI A/elCon zeigte somit auch bei einer großtechnischen NawaRo-Biogasanlage eine drohende Prozessstörung frühzeitig an. Die Warnung erfolgte frühzeitig genug, um eine Übersäuerung durch Einleiten der Gegenmaßnahmen zu verhindern.

4.3 Prozessstabilisierung übersäuerter NawaRo-Biogasanlagen durch Additivzugabe

In drei Entsäuerungsversuchen (EntV 1 - 3) wurde im Labormaßstab die Eignung verschiedener Additive zur Prozessstabilisierung von übersäuerten NawaRo-Biogasanlagen untersucht und verglichen. Das Ziel der Untersuchungen war es durch Zugabe mehrwertiger Kationen in Form von mineralischen Additiven eine prozessstabilisierende Aggregatbildung zu induzieren, ähnlich wie es aus Systemen zur Abfallvergärung bei der Zugabe von CaO bekannt ist (siehe 2.3.3.). Dazu wurde die Raumbelastung, der in 4.1 übersäuerten Biogasprozesse, auf $0,4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ reduziert und nur Rindergülle als Substrat verwendet. Als Additive wurden die Spurenelementmischung EnviTal constant in Kombination mit NaOH (EntV 1, Abb. 11), FerroSorp DG (EntV 2, Abb. 12) und CaO (EntV 3, Abb. 13) zugegeben. Da die Prozessparameter der drei Versuche zum Zeitpunkt der Übersäuerung leicht variierten, wurde zur Vereinheitlichung als Versuchsstart jeweils der Tag ausgewählt, an dem der pH-Wert erstmalig wieder anstieg.

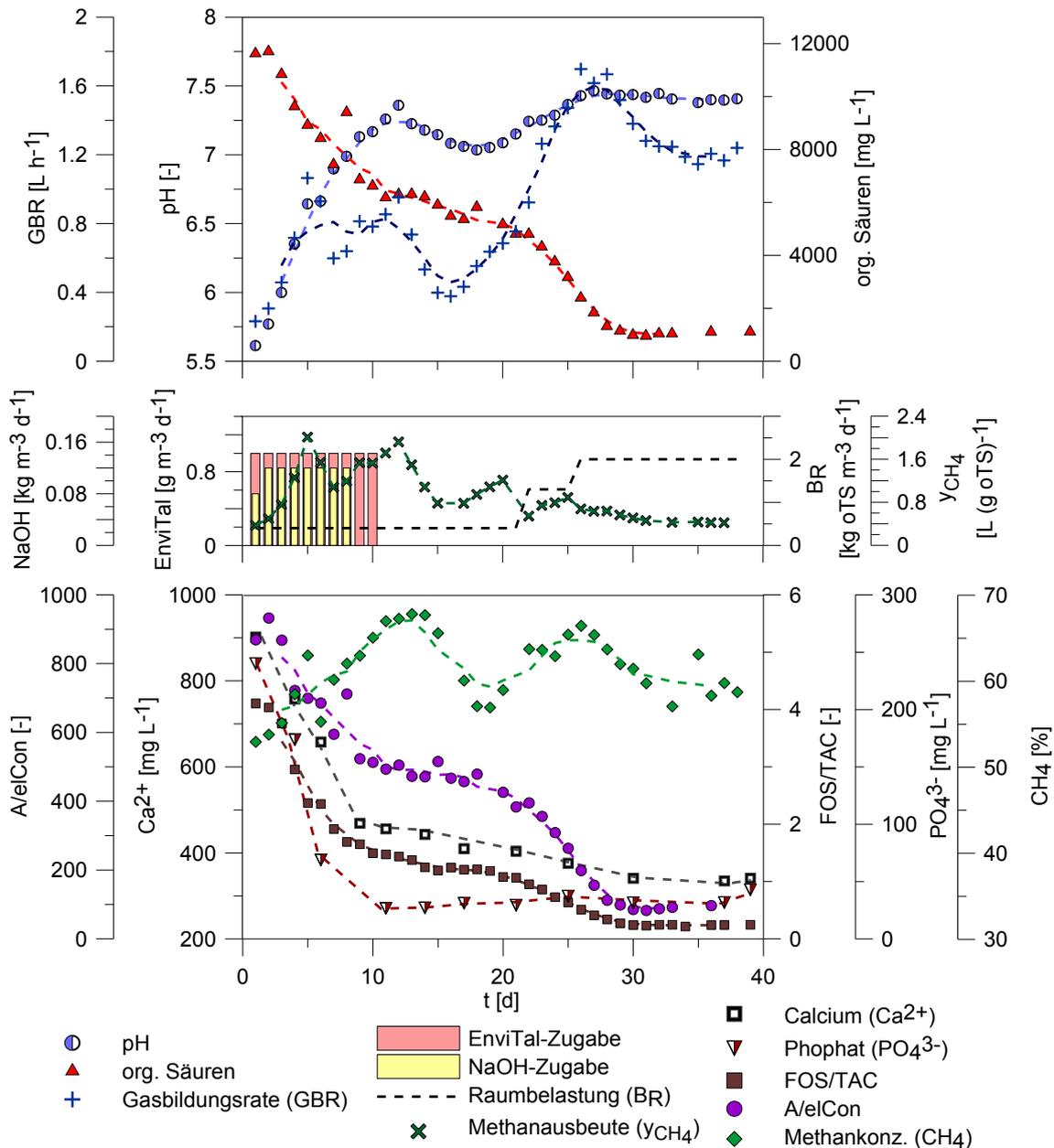


Abbildung 11: Verlauf der Prozessparameter bei der Stabilisierung mittels Spurenelementmischung EnviTal constant und NaOH (EntV 1). Steigender pH-Wert, hohe Methanausbeute und sinkende Säurekonzentration zeigen eine Stabilisierung des Prozesses an. Bereits ab Tag 22 konnte die Raumbelastung gesteigert werden. Der Prozess wurde nach 27 Tagen vollständig stabilisiert.

In allen Versuchen kam es in Folge der Additivzugabe und der geringen Raumbelastung zu einem Abbau der während der Übersäuerung akkumulierten organischen Säuren von 12 – 15 g L⁻¹ auf etwa 1 g L⁻¹, einem Anstieg der Gasbildungsraten und einem Anstieg der pH-Werte von pH < 5,5 auf pH > 7. Infolge des Säureabbaus stieg die Methanausbeute über den Erwartungsbereich dieser Versuchsphase (0,11 – 0,28 L (g oTS)⁻¹) auf 1,2 L (g oTS)⁻¹ bei der FerroSorp DG-Entsäuerung, 1,6 L (g oTS)⁻¹ bei der EnviTal-Entsäuerung und 8,2 L (g oTS)⁻¹ bei der

CaO-Entsäuerung. Ab Tag 12 bei der CaO-Entsäuerung bzw. ab Tag 22 bei der EnviTal-Entsäuerung war die Säurekonzentration auf 4 - 6 g L⁻¹ gesunken und die Additivzugabe wurde eingestellt. Das Substrat wurde, bezogen auf den oTS, auf eine Mischung aus 20 % Rindergülle und 80 % Maissilage umgestellt und die Raumbelastung stufenweise auf 2 kg oTS m⁻³ d⁻¹ angehoben.

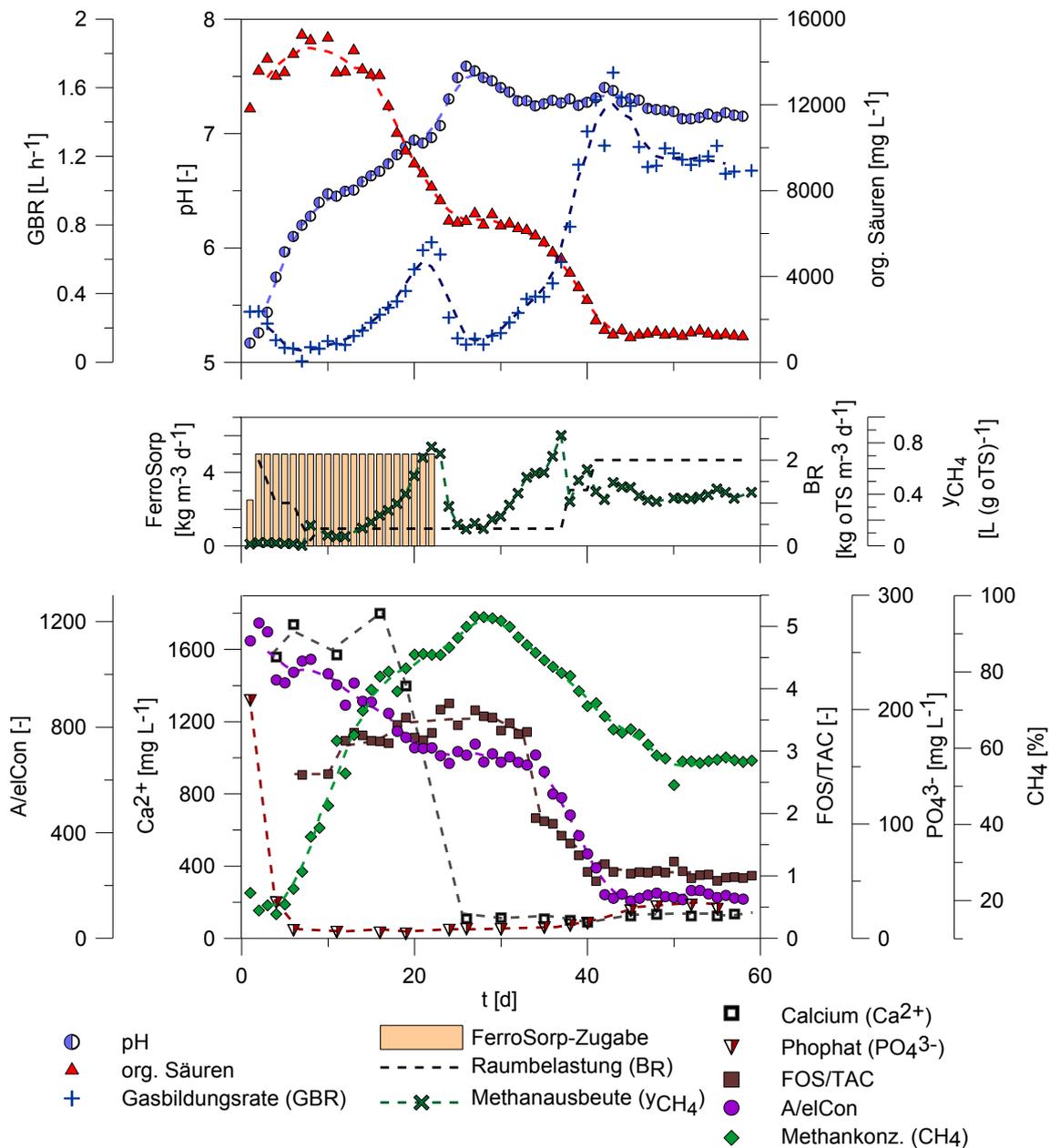


Abbildung 12: Verlauf der Prozessparameter bei der Stabilisierung mittels FerroSorp DG (EntV 2). Steigender pH-Wert, hohe Methanausbeute und sinkende Säurekonzentration zeigen eine Stabilisierung des Prozesses an. Erst nach 40 Tagen war der Prozess vollständig stabilisiert.

Bei der FerroSorp DG-Entsäuerung (EntV 2, Abb. 12) führte das Aussetzen der Additivzugabe zu einer erneuten, 14-tägigen Abnahme der Gasbildungsrate und Methanausbeute. Daher wurde die Raumbelastung erst ab Tag 40 bei einer Säurekonzentration von 2 g L^{-1} und damit nach vollständiger Prozessstabilisierung angehoben. Im Vergleich dazu konnte der EnviTal-Versuch (EntV 1) am schnellsten, nach nur 27 Tagen und der CaO-Versuch (EntV 3) nach 34 Tagen vollständig stabilisiert werden.

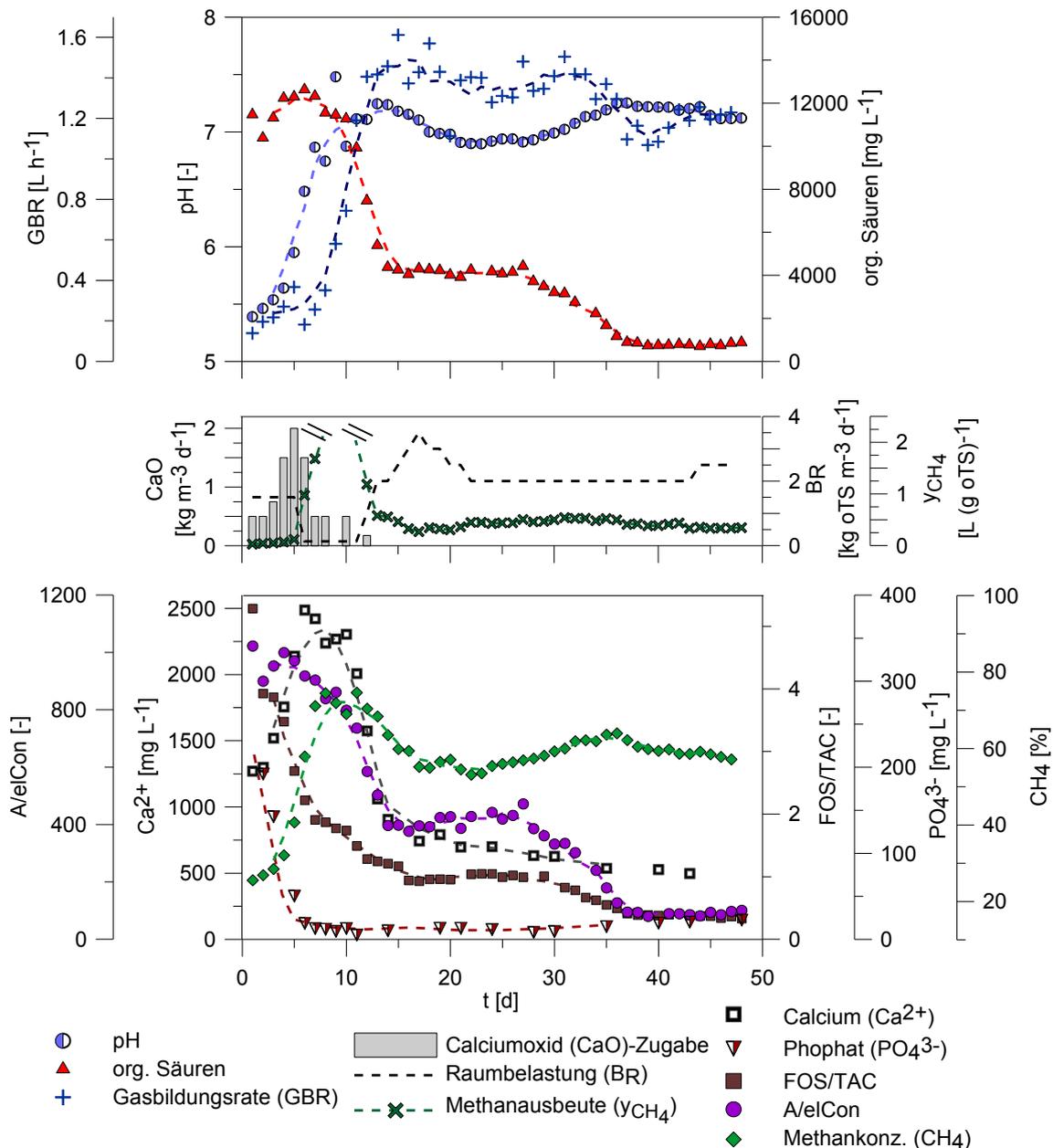


Abbildung 13: Verlauf der Prozessparameter bei der Stabilisierung mittels Calciumoxid (EntV 3). Steigender pH-Wert, hohe Methanausbeute und sinkende Säurekonzentration zeigen eine Stabilisierung des Prozesses an. Bereits ab Tag 12 konnte die Raumbelastung gesteigert werden. Der Prozess war nach 40 Tagen vollständig stabilisiert.

Im Zuge der Prozessstabilisierungen sanken die Werte des neu entwickelten Frühwarnindikators A/elCon und des FOS/TAC wieder bis auf die Ausgangswerte vor der Übersäuerung ab (von 930 – 1200 bzw. 4,1 – 7,8 auf 80 – 150 bzw. 0,3 – 0,38). Bei dem FerroSorp DG-Versuch hingegen blieb der FOS/TAC trotz der Prozessstabilisierung mit Werten > 0,9 auf einem hohen Niveau. Das feinpudrige FerroSorp DG wird in der Praxis zur Entschwefelung eingesetzt und besteht zum größten Teil aus Eisen(III)-hydroxid (Weiland 2010; Ziganshin et al. 2011). Im Biogasreaktor reagiert es zunächst mit Schwefelwasserstoff unter Reduktion zu Eisen(II)-hydroxid und in einem weiteren Schritt erneut mit Schwefelwasserstoff zu Eisensulfid. Eisenhydroxid ist jedoch nur schwer in Wasser löslich. Bei der Titration zur Bestimmung des FOS/TAC-Wertes reagierte das als feine Partikel in der Probe enthaltene Eisenhydroxid vermutlich mit der zur Titration verwendeten Schwefelsäure zu Eisensulfat und Wasser und pufferte dabei den pH-Wert. Dadurch wurde vor allem die FOS-Wert-Bestimmung verfälscht. Im FerroSorp DG-Versuch lag der FOS-Wert nach der Prozessstabilisierung teilweise bis zu 400 % über der durch Photometrie bestimmten Konzentration der organischen Säuren. Der FOS/TAC-Wert ist damit weniger zur Prozesskontrolle geeignet, wenn Eisenhydroxid zur Entschwefelung eingesetzt wird. Der neue FWI A/elCon hingegen wurde durch keines der eingesetzten Additive verfälscht.

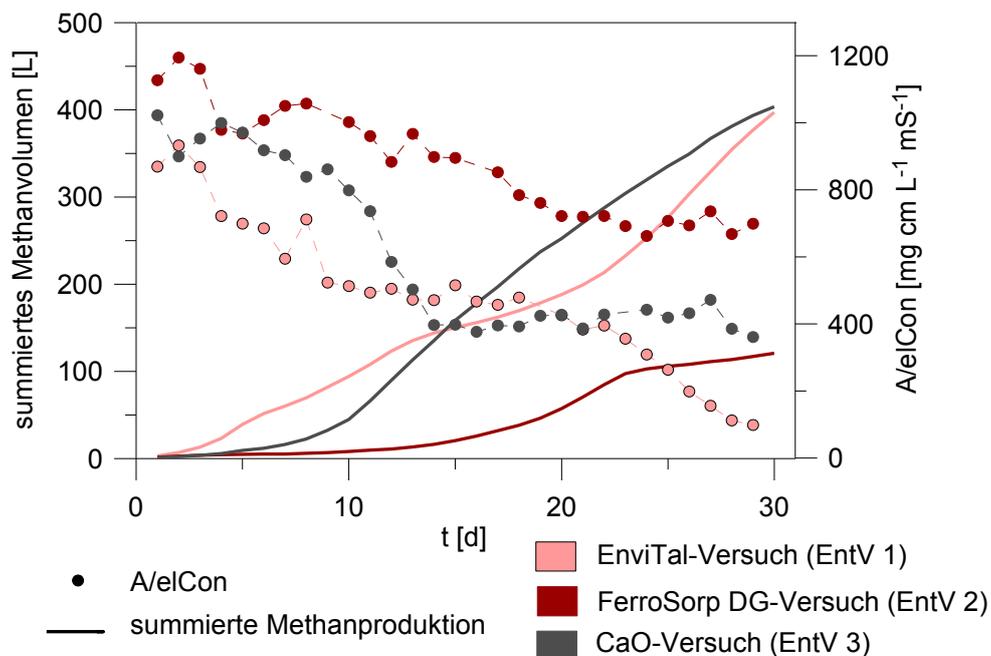


Abbildung 14: Vergleich der Prozessstabilisierungen in EntV 1 – 3; Verlauf des FWI A/elCon als Anzeiger des Stabilisierungsfortschrittes und summierte Methanproduktion; EntV 1 wurde am schnellsten vollständig stabilisiert.

Innerhalb der 27 Tage, in denen sich der Prozess im EnviTal-Versuch vollständig stabilisierte, wurden im EnviTal und CaO-Versuch jeweils ca. 350 L Methan produziert. Im gleichen Zeitraum waren es im FerroSorp DG-Versuch nur 100 L Methan (Abb. 14). Die EnviTal-Spurenelementmischung in Kombination mit Natronlauge eignete sich insgesamt am besten zur Entsäuerung einer übersäuerten NawaRo-Vergärung. Der Prozess wurde nicht nur am schnellsten stabilisiert, sondern auch die Additivkosten waren mit insgesamt 0,30 EUR m⁻³ am niedrigsten (Tab. 5). Die Stabilisierung mittels CaO verlief ebenfalls sehr effektiv, da trotz der etwas längeren Stabilisierungszeit genauso viel Methan wie im EnviTal-Versuch gebildet wurde und die Additivkosten mit insgesamt 1,20 EUR m⁻³ ebenfalls günstig waren. Die Prozessstabilisierung mittels FerroSorp DG erwies sich als ungeeignet, da nur wenig Methan während der Stabilisierungsphase gebildet wurde. Die Additivkosten zur Stabilisierung waren mit 97 EUR m⁻³ für einen Praxiseinsatz deutlich zu hoch. Zudem wurde die Bestimmung des FOS/TAC-Wertes durch das Additiv gestört. Die eingesetzten Additivmengen und Kosten sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht der eingesetzten Additivmengen und -kosten in den Entsäuerungsversuchen

Versuch	Additiv	Anzahl Dosierungen	Ø Dosis [g m ⁻³ d ⁻¹]	Additivmenge _{gesamt} [kg m ⁻³]	Marktpreis [EUR t ⁻¹]	Kosten [EUR m ⁻³]	Kosten _{Großtechnik} * [EUR]
EntV 1	EnviTal constant	10	1	0,01	1260	0,30	840
	NaOH	8	115	0,92	350		
EntV 2	FerroSorp® DG	22	5000	110	850	97,00	234.000
EntV 3	CaO	10	840	8,4	150	1,20	3.200

* Beispiel: Fermentationsvolumen = 2500 m³

Die prozessstabilisierende Wirkung von Spurenelementen auf übersäuerte Biogasprozesse wurde bereits in früheren Studien beobachtet (Lebuhn et al. 2008b). Dabei wurde gezeigt, dass v. a. bei NawaRo-Monovergärungen bereits bei niedrigen Raumbelastungen ein Spurenelementmangel inhibierend auf das Wachstum der Methanogenen wirken kann. Durch manuelle Zugabe von Spurenelementen wird dieser Mangel ausgeglichen und gute Wachstumsbedingungen für die Methanogenen geschaffen, wodurch der Prozess stabilisiert wird. Die in Versuch EntV 1 verwendete Kombination aus Spurenelementen und NaOH führte zusätzlich

zu einer Anhebung des pH-Wertes in Richtung des pH-Optimums der methanogenen Archaea, wodurch deren Wachstumsbedingungen zusätzlich verbessert wurden.

Die prozessstabilisierende Wirkung des CaO in EntV 2 beruhte vermutlich auf der stark alkalischen Wirkung des Additives und der damit verbundenen zügigen Anhebung des pH-Wertes (Marchaim und Krause 1993). Wie auch in EntV 1 wurden die Wachstumsbedingungen durch den höheren pH-Wert für die Methanogenen verbessert, wodurch der Prozess stabilisiert wurde. Anders als in früheren Studien wurde keine zusätzliche prozessstabilisierende Aggregatbildung nach Zugabe des CaO beobachtet (siehe 2.3.3). Dabei werden langkettige Fettsäuren gebunden und es bilden sich Aggregate, die stabilisierend auf den Prozess wirken, da sie Aufwuchskörper für Biofilme darstellen, ähnlich wie in Upstream Anaerobic Sludge Blanket Reaktoren (UASB-Reaktoren) (Bae und Lee 1999; Liebrich et al. 2016). Offensichtlich ist jedoch der Lipidanteil in klassischen NawaRo-Substraten wie Maissilage und Rindergülle mit 10 – 20 % im Vergleich zu 60 – 70 % in Abfällen und Fettschlamm zu gering, um eine Akkumulation von langkettigen Fettsäuren während einer Prozessstörung hervorzurufen, sodass keine Fällungsreaktionen bei Zugabe von CaO in EntV 2 erfolgten (Rojas et al. 2011).

Das in EntV 3 zur Entsäuerung verwendete FerroSorp DG (Hauptbestandteil: Eisen(III)-hydroxid) wurde zur Entschwefelung von Biogasanlagen durch Fällung von Schwefelwasserstoff zu Eisensulfid entwickelt (Gerbeth et al. 2009). Dadurch soll es Korrosionsprozesse in Rohrleitungen und Blockheizkraftwerken reduzieren und zur Stabilisierung von Biogasprozessen beitragen, die aufgrund der Hemmwirkung von zu hohen H_2S -Konzentrationen zu wenig Biogas produzieren. Hohe H_2S -Konzentrationen sind typisch für Biogasanlagen, in denen hohe Frachten an proteinreichem Material vergoren werden. Einige Aminosäuren enthalten Schwefelgruppen, die zu H_2S abgebaut werden (Schieder et al. 2010; Straka et al. 2007). Proteinreiche Substrate sind beispielsweise Schweinegülle oder Geflügelmist, wohingegen die in den Laborversuchen dieser Arbeit verwendeten Substrate Rindergülle und Maissilage nur einen vergleichsweise geringen Proteinanteil aufweisen (FNR 2016b). Eine zu hohe H_2S -Konzentration kann demnach als Ursache für die Prozessstörungen in den Laborversuchen ausgeschlossen werden. Daher beruhte die prozessstabilisierende Wirkung des FerroSorp DG in EntV 3, ähnlich wie in EntV 1 und EntV 2, vermutlich auf der alkalischen, pH-Wert

anhebenden Reaktion. Aufgrund der deutlich schwächeren alkalischen Wirkung des FerroSorp DG im Vergleich zu CaO oder NaOH, wurde der pH-Wert nur sehr langsam angehoben. Es waren deutlich größere Additivmengen nötig und der Prozess stabilisierte sich langsamer. In einer früheren Studie wurde zudem gezeigt, dass durch Zugabe von FerroSorp DG die H₂S-Konzentration zwar gesenkt werden kann, dies aber keinen positiven Effekt auf die Biogasproduktion insgesamt hat (Ziganshin et al. 2013). Außerdem besteht bei der Zugabe von Eisen(III)-Ionen die Gefahr, dass eisenreduzierende Bakterien mit den Methanogenen um Acetat und H₂ als Substrate konkurrieren und dadurch weniger Biogas produziert wird (Achnich et al. 1995).

Das Ziel bei der Zugabe mehrwertiger Kationen in Form von mineralischen Additiven war die Erzeugung von prozessstabilisierenden Aggregaten (siehe 2.3.3). Bei der Entsäuerung mittels EnviTal (EntV 1) und FerroSorp DG (EntV 2) wurde die Bildung von ca. 0,5 – 1 mm kleinen, schwarzen und grauen Partikeln im Gärschlamm beobachtet (Abb. 15). Gleichzeitig wurde ein Anstieg der Methankonzentration im Biogas von 52 – 53 % auf 68 – 94 % und eine Abnahme der Kohlenstoffdioxidkonzentration von 44 – 47 % auf 6 – 32 % beobachtet (Abb. 11 - 13). Außerdem wurde eine Abnahme der Konzentrationen von gelöstem Calcium und Phosphat um 62 – 81 % bzw. 89 – 97 % gemessen. Beides weist auf eine Ausfällung von Calciumcarbonat und -phosphat hin. Die Partikel wurden mittels FE-REM-EDX analysiert, ihre mittlere Elementzusammensetzung mit jeweils ca. 50 Punktanalysen bestimmt und die Oberflächen mittels Fluoreszenzmikroskopie auf organische Verbindung untersucht.

Die mineralogische Zusammensetzung der Partikeln aus den beiden Versuchen ähnelte sich sehr. Wie vermutet, enthielten sie Calciumcarbonat und -phosphat. In dem EnviTal-Versuch wurden zusätzlich Calcium-Magnesium-Carbonate, Natrium- und Calcium-Aluminium-Silikate, sowie Eisen- und Magnesiumphosphate und Natrium- und Calciumchlorid gefunden. Die Partikel des FerroSorp-Versuches enthielten zusätzlich Eisenphosphatverbindungen und Eisenhydroxide. Eisensulfid wurde dagegen nicht detektiert.

Auch die mittlere Elementzusammensetzung der Partikel aus dem EnviTal-Versuch (Abb. 16) und dem FerroSorp DG-Versuch (Abb. 17) ähnelten sich sehr. Ihre Hauptbestandteile waren Kohlenstoff (47 %), Sauerstoff (15 - 25 %) und Calcium (11 - 15 %), gefolgt von Phosphor (3 - 8 %), Eisen (7 %) und Silizium (2 - 3 %). In

den Partikeln beider Versuche wurden außerdem geringe Mengen ($\leq 1\%$) Aluminium, Chlor, Kupfer, Magnesium, Mangan, und Natrium detektiert. In dem EnviTal-Versuch wurde außerdem Zink ($< 1\%$) und in dem FerroSorp DG-Versuch Kalium ($< 1\%$) und Schwefel ($< 1\%$) gefunden.

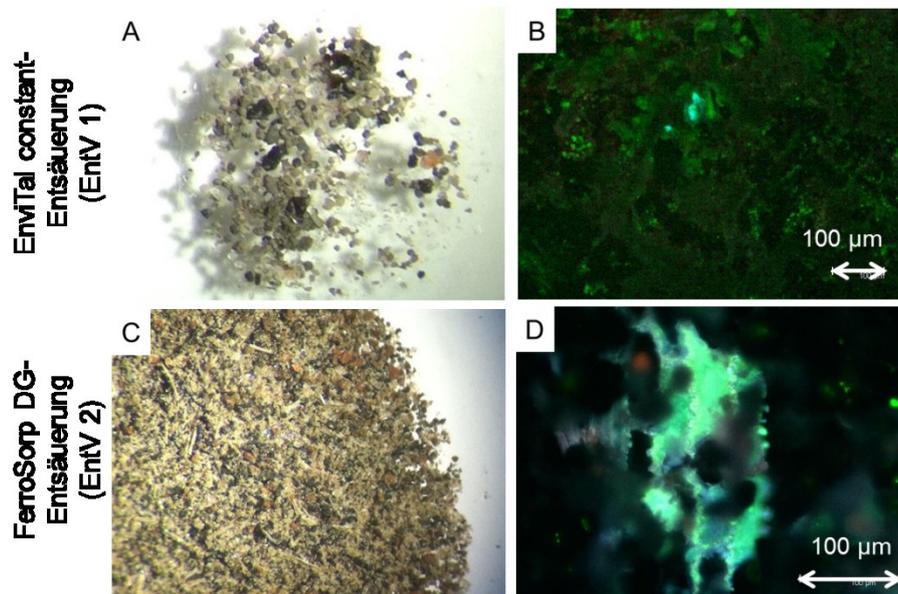


Abbildung 15: In EntV 1 und EntV 2 gebildete Ausfällungen; A,C: stereomikroskopische Aufnahmen; B,D: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Proteinfärbung mit DTAF (grün), Polysaccharidfärbung mit Calcofluor White (hellblau). (Analyse von Michaela Hache vom Dresdner Grundwasserforschungszentrum e.V.)

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte insgesamt nur geringe Mengen organischen Materials an den Partikeln (Abb. 15). Vor allem konnten Proteine, seltener auch Polysaccharide und Lipide detektiert werden.

Die rasterelektronenmikroskopische Analyse mit EDX und die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Partikel deuten darauf hin, dass es sich überwiegend um mineralische Ausfällungen handelte. Wahrscheinlich wurden die Ausfällungen durch Änderungen der Löslichkeitsgleichgewichte im Zuge der Anhebung des pH-Wertes gebildet. Für Klärschlamm vergärende Biogasanlagen wurde bereits gezeigt, dass eine Anhebung des pH-Wertes, entweder durch Strippung von CO_2 oder durch Zugabe alkalischer Reagenzien, zur Ausfällung von u. a. Struvit und auch Calciumphosphat führt (Van Rensburg et al. 2003). Daher und aufgrund der geringen Anteile organischen Materials, ist eine mikrobiologische Beteiligung an der Partikelbildung wahrscheinlich von geringer Bedeutung. Somit waren die Ausfällungen vermutlich kaum an der Prozessstabilisierung beteiligt. Diese Annahme

wird dadurch gestützt, dass der FerroSorp-Versuch trotz starker Partikelbildung am schlechtesten und der CaO-Versuch sehr effektiv stabilisiert werden konnte, obwohl dort keine Partikelbildung beobachtet wurde.

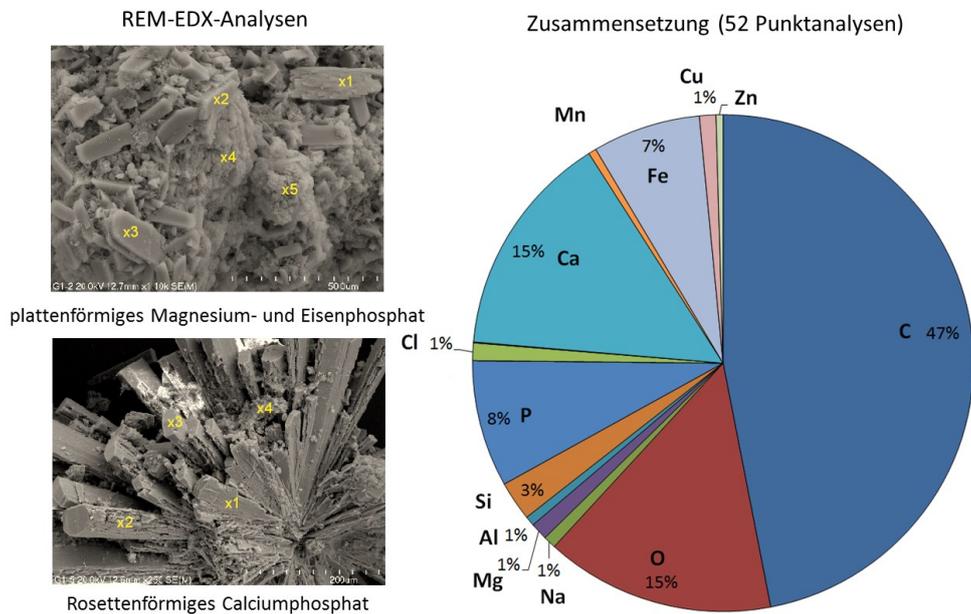


Abbildung 16: FE-REM-EDX-Analyse der Ausfällungen aus EntV 1, Prozessstabilisierung mittels EnviTal und NaOH. Links: FE-REM-Aufnahmen, Rechts: gemittelte Elementzusammensetzung anhand von 52 EDX-Punktanalysen (Analyse von Dr. Monika Kasina)

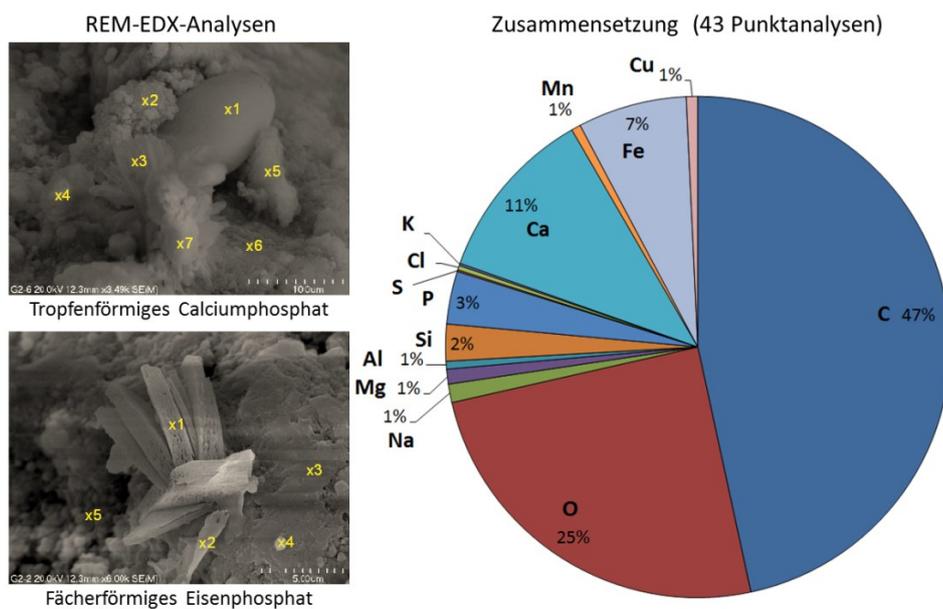


Abbildung 17: FE-REM-EDX-Analyse der Ausfällungen aus EntV 2, Prozessstabilisierung mittels FerroSorp DG. Links: FE-REM-Aufnahmen, Rechts: gemittelte Elementzusammensetzung anhand von 43 EDX-Punktanalysen (Analyse von Dr. Monika Kasina)

4.4 Langzeit-Hochlast-Vergärung von NawaRo

Mit Hilfe des neu entwickelten Frühwarnindikators A/eICon (siehe 4.1 und 4.2) und den Erkenntnissen zur Prozessstabilisierung von NawaRo-Vergärungssystemen durch Additivzugabe aus Versuchsreihe EntV (siehe 4.3) wurden drei NawaRo-Langzeit-Hochlastvergärungen ($t > 100$ d; $B_R > 4$ kg oTS $m^{-3} d^{-1}$) durchgeführt. Dazu wurde in drei Laborversuchen (HochV 1 - 3), bezogen auf den oTS, 20 % Rindergülle und 80 % Maissilage vergoren. Die Raumbelastung wurde stufenweise auf $7,5$ kg oTS $m^{-3} d^{-1}$ angehoben und die Prozessstabilität mithilfe des neu entwickelten A/eICon-Frühwarnindikators überwacht. Im Falle einer Warnung wurden den Systemen Additive als Gegenmaßnahme zugeführt. Als Additive wurden die Spurenelementmischung EnviTal constant in Kombination mit NaOH (HochV 1), CaO (HochV 2) und NaOH, später zusätzlich FerroSorp, $Al(OH)_3$, $AlCl_3$, und MnO_2 (HochV 3) eingesetzt.

4.4.1 Langzeit-Hochlast mit Zugabe von EnviTal constant und NaOH

Bei der Steigerung der Raumbelastung im EnviTal-Versuch (HochV 1) blieben die Konzentration der organischen Säuren zunächst mit 2 bis 3 g L^{-1} auf einem niedrigen Niveau und der pH-Wert im neutralen Bereich bei ca. 7,3. Die Werte des A/eICon-Frühwarnindikators nahmen leicht von 130 auf 230 zu und der FOS/TAC blieb konstant bei ca. 0,3 (Abb. 18).

Ab Tag 50, mit Erreichen der Raumbelastung von $7,5$ kg oTS $m^{-3} d^{-1}$, warnte der A/eICon-Frühwarnindikator durch einen sprunghaften Anstieg um das 1,5-fache im Vergleich zum Mittelwert der letzten zehn Tage. Der FOS/TAC-Wert stieg auf 0,4 und die Konzentration der organischen Säuren stieg von ca. 2,5 auf $3,5$ g L^{-1} an. Beides wies ebenfalls auf eine drohende Prozessstörung hin. Die Raumbelastung wurde trotz der Warnung beibehalten. Zur Stabilisierung des Prozesses wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen je 1 mg $L^{-1} d^{-1}$ EnviTal Spurenelementmischung und $0,2$ mL $L^{-1} d^{-1}$ NaOH (30 %) als Gegenmaßnahme zugegeben. An Tag 55 nahmen der A/eICon, der FOS/TAC und die organischen Säuren zunächst wieder ihre Ausgangswerte an, was eine Stabilisierung des Prozesses anzeigte.

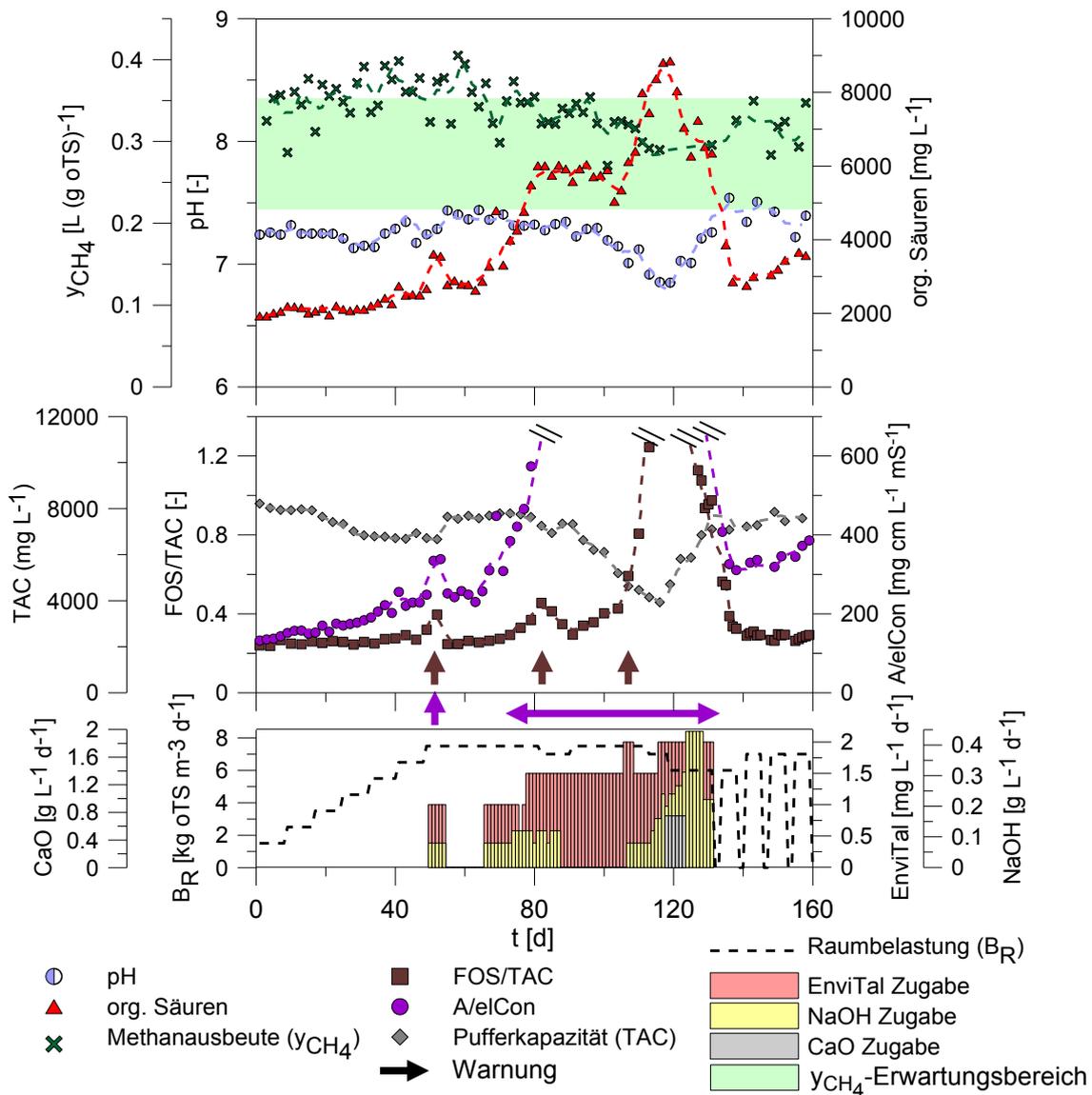


Abbildung 18: Verlauf der Prozessparameter bei der Etablierung einer Langzeit-Hochlastvergärung von NawaRo mittels Prozessüberwachung durch den FWI A/eICon und Zugabe von EnviTal constant und NaOH als Gegenmaßnahme (HochV 1). Farbige Pfeile zeigen den Warnzeitpunkt des jeweiligen FWIs an.

Ab Tag 69 warnte der A/eICon erneut durch einen starken Anstieg bis zu einem maximalen Wert von ca. 1300 an Tag 112. Auch die Konzentration der organischen Säuren stieg bis zu einer maximalen Konzentration von ca. 9 g L^{-1} an Tag 119. Der FOS/TAC-Wert warnte zwischen Tag 74 und 90 durch erhöhte Werte mit einem maximalen Wert von 0,46 an Tag 82 und stieg erneut ab Tag 97 bis zu einem maximalen Wert von 1,8 an Tag 118 an. Ab Tag 108 wurde eine neue Charge Rindergülle (Rindergülle B) als Substrat verwendet, die einen negativen Einfluss auf die Prozessstabilität hatte. Zeitgleich mit Einsatz dieser Gülle kam es zu einer starken Schaumbildung im System. Zudem sank der pH-Wertes von ca. 7,2 - 7,3 auf

6,7 und die Pufferkapazität TAC reduzierte sich von ca. $6 - 8 \text{ g L}^{-1}$ auf 4 g L^{-1} an Tag 117. Der negative Einfluss dieser Rindergülle wurde auch in HochV 2 und 3 beobachtet. Von Tag 66 bis 88 und von Tag 106 bis 131 wurde als Gegenmaßnahme täglich die EnviTal-Spurenelementmischung und NaOH zugegeben. Die EnviTal-Dosis wurde an Tag 78 auf 1,5 und an Tag 116 auf $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ angehoben. Aufgrund der Abnahme der Pufferkapazität TAC wurden zwischen Tag 118 und 123 je $750 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ CaO zugegeben, was zu einer Erhöhung der Pufferkapazität auf $6 - 7 \text{ g L}^{-1}$ führte. Außerdem wurde als weitere Gegenmaßnahme die Raumbelastung leicht an Tag 113 auf 7 und an Tag 119 auf $6 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gesenkt sowie ab Tag 132 die Wochenendfütterung ausgesetzt. Bis Tag 137 sanken sowohl die Werte des A/elCon-Indikators wieder auf 300, die des FOS/TAC auf 0,3 und die Konzentration der organischen Säuren auf ca. 3 g L^{-1} ab, was auf eine Stabilisierung des Prozesses hinwies. Mit dem Einsatz einer abermals neuen Charge Rindergülle (Rindergülle C) an Tag 137 nahm die Schaumbildung im System wieder ab. Daher ist anzunehmen, dass die Zusammensetzung der von Tag 108 – 137 verwendeten Rindergülle B ursächlich für die Schaumbildung war. Die Methanausbeute lag mit Werten zwischen 0,26 und $0,4 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ zeitweise sogar über dem Erwartungsbereich von 0,21 bis $0,35 \text{ L (g oTS)}^{-1}$.

4.4.2 Langzeit-Hochlast mit Zugabe von CaO

Während der Steigerung der Raumbelastung im CaO-Versuch (HochV 2) lag der pH-Wert mit 7,2 - 7,4 zunächst im neutralen Bereich. Die mittlere Methanausbeute lag mit $0,36 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ im optimalen Bereich (Erwartungswert von $0,21 - 0,35 \text{ L (g oTS)}^{-1}$) (Abb. 19). Die Konzentration der organischen Säuren mit 2 - 3 g L^{-1} , der A/elCon mit einem Wert von ca. 200 und der FOS/TAC mit ca. 0,3 blieben bis zum Erreichen der Raumbelastung von $7,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ (Tag 50) niedrig.

Ab Tag 51 zeigte ein sprunghafter Anstieg der drei Indikatoren eine drohende Prozessstörung an. Bis Tag 55 erreichte der FOS/TAC einen Wert von 0,9 und bis Tag 57 die org. Säuren und der A/elCon eine Konzentration von 8 g L^{-1} bzw. einen Wert von 600. Die Methanausbeute sank auf $0,26 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ ab, was ebenfalls auf eine Prozessinstabilität hinwies. Am Tag 51 wurden dem System 0,5, am Tag 52 0,75 und ab Tag 53 $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ CaO als Gegenmaßnahme zugegeben. Ab Tag 54 wurde zusätzlich die Hochlast-Raumbelastung stufenweise auf $4,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gesenkt. Da die Konzentration der organischen Säuren, der FOS/TAC-Wert und der A/elCon weiter anstiegen, wurde die Raumbelastung ab Tag 58 unter die

Hochlastgrenze von 4 auf $3,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gesenkt. Darauf sanken die Konzentration der organischen Säuren, der A/eICon und der FOS/TAC bis Tag 66 wieder auf ihre Ausgangswerte ab, was eine Prozessstabilisierung anzeigte. Zwischen Tag 58 und 66 stieg die Methanausbeute kurzfristig deutlich über den Erwartungswert auf bis zu $0,53 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ an. Dies zeigte einen Abbau organischer Säuren an, die während der kurzzeitigen Prozessinstabilität akkumuliert worden waren. Danach lag die Methanausbeute wieder im Erwartungsbereich.

Ab Tag 66 wurde die Raumbelastung wieder stufenweise bis auf $7,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ angehoben und ab Tag 101 beibehalten. Ab Tag 75 warnten der A/eICon und die Konzentration der org. Säuren erneut durch eine kontinuierliche Zunahme ihrer Werte auf bis zu 900 und 9 g L^{-1} . Ab Tag 101 warnte auch der FOS/TAC durch eine Zunahme auf bis zu 1,2 bis zum Versuchsende an Tag 160. Zwischen Tag 75 und 87 wurden dem System fünfmal $0,1$ und zweimal $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ CaO, sowie einmal $0,1 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und zehnmal $0,2 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ NaOH (30 %) zugegeben. Ab Tag 88 wurde die CaO-Dosis kontinuierlich gesteigert und von Tag 93 - 121 täglich ca. $1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ CaO und ab Tag 121 bis Versuchsende täglich NaOH mit durchschnittlich $0,6 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ als Gegenmaßnahme zugegeben. Ab Tag 108 wurde bis zum Versuchsende eine neue Charge Rindergülle (Rindergülle B) als Substrat verwendet, gleichzeitig kam es in allen drei Versuchen zu einer starken Schaumbildung. Ein sprunghaftes Absinken des pH-Wertes und des TAC, wie in HochV 1 und 3, wurde in diesem Versuch aufgrund der CaO-Zugaben nicht beobachtet. Ab Tag 119 wurde als weitere Gegenmaßnahme die Raumbelastung auf $6 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gesenkt und ab Tag 132 die Wochenendfütterung ausgesetzt. Bis Versuchsende blieb der pH-Wert mit ca. 7,0 nur knapp im optimalen Bereich für die Methanogenese. Die Methanausbeute sank kontinuierlich zur unteren Grenze des Erwartungsbereichs auf bis zu $0,2 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ ab.

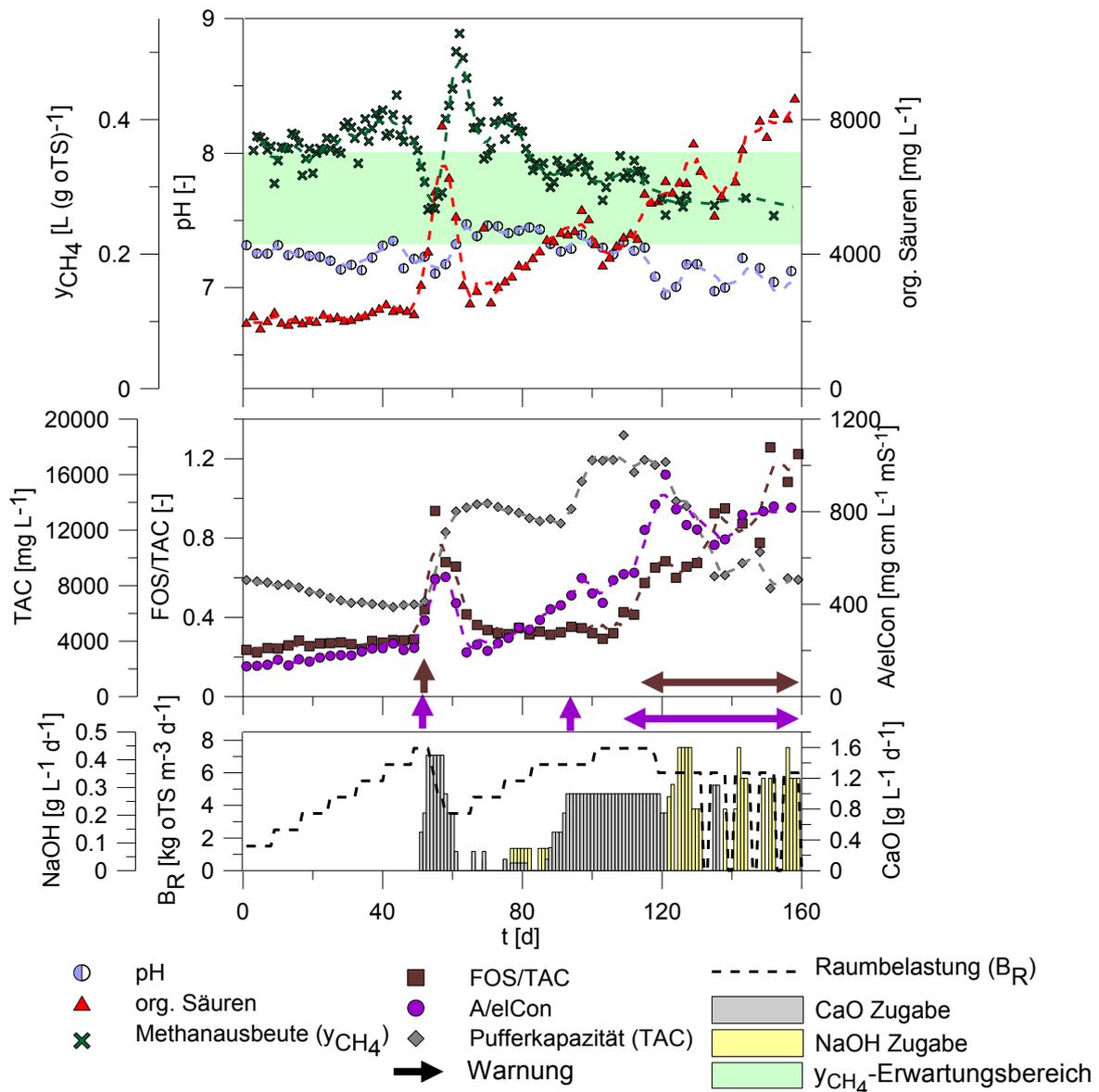


Abbildung 19: Verlauf der Prozessparameter bei der Etablierung einer Langzeit-Hochlastvergärung von NawaRo mittels Prozessüberwachung durch den FWI A/eICon und Zugabe von CaO als Gegenmaßnahme (HochV 2). Farbige Pfeile zeigen den Warnzeitpunkt des jeweiligen FWIs an.

4.4.3 Langzeit-Hochlast mit Zugabe von NaOH und wechselnden Additiven

Bis Tag 52, fünf Tage nach Erreichen der maximalen Raumbelastung von $7,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, blieben die Konzentration der organischen Säuren bei $2 - 2,5 \text{ g L}^{-1}$, der FOS/TAC bei 0,3 und der A/eICon bei ca. 250 konstant niedrig, der pH-Wert im neutralen Bereich bei $7,2 - 7,3$ und die Methanausbeute mit ca. $0,36 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ sogar leicht über dem Erwartungsbereich von $0,21 - 0,35 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ (Abb. 20).

Von Tag 50 bis Tag 62 stiegen der A/elCon-Indikator auf 400, der FOS/TAC auf 0,6 und die Konzentration der organischen Säuren auf 4 g L^{-1} an und warnten damit vor einer drohenden Prozessstörung. Von Tag 50 bis 87 wurde dem Prozess durchschnittlich $0,2 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ NaOH (30 %) als Gegenmaßnahme zugegeben. Zusätzlich wurde an Tag 55 die Raumbelastung auf $6,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ und an Tag 62 auf $5,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ reduziert. Da weder der A/elCon, noch der FOS/TAC und die Konzentration der org. Säuren wieder bis auf ihre Ausgangswerte zurückgingen, wurden neben NaOH ab Tag 65 verschiedene weitere Additive zur Prozessstabilisierung getestet. Von Tag 65 - 71 wurde dem Prozess $0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ FerroSorp DG zugefügt. Die Werte des A/elCon-Indikators, des FOS/TAC und die Konzentration der organischen Säuren nahmen darauf bis Tag 79 wieder auf 340, 0,3 und 3 g L^{-1} ab und zeigten damit eine Prozessstabilisierung an. Aufgrund der Stabilisierung wurde am Tag 77 die Raumbelastung wieder leicht auf $6 - 6,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gesteigert. Bereits ab Tag 80 begannen der A/elCon-Indikator, die organischen Säuren und ab Tag 85 der FOS/TAC-Wert mit leichten Schwankungen wieder zu warnen und kontinuierlich bis Tag 130 auf 700, 1,2 und 8 g L^{-1} zu steigen. Wie auch in HochV 1 und 2 wurde ab Tag 108 eine neue Charge Rindergülle (Rindergülle B) als Substrat verwendet. Gleichzeitig kam es zu einer starken Schaumbildung, die bis zum erneuten Wechsel der Rindergülle (Rindergülle C) an Tag 137 anhielt. Von Tag 89 – 101 wurden durchschnittlich $1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ $\text{Al}(\text{OH})_3$, von Tag 101 – 118 durchschnittlich $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ AlCl_3 , von Tag 107 – 121 $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ FerroSorp DG, von Tag 101 – 122 mit durchschnittlich $0,2 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ niedrigere Mengen und von Tag 123 – 131 mit durchschnittlich $0,9 \text{ mL L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ höhere Mengen NaOH (30 %), sowie von Tag 124 – 131 durchschnittlich $0,45 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ MnO_2 zugegeben. Außerdem wurde ab Tag 131 die Wochenendfütterung ausgesetzt. Bis Tag 140 nahmen die Werte für den A/elCon-Indikator, den FOS/TAC und die Konzentration der organischen Säuren wieder leicht ab, stiegen anschließend bis zum Versuchende aber wieder an. Keines der eingesetzten Additive hatte einen eindeutig prozessstabilisierenden Effekt auf das System. Trotz der Warnungen durch den A/elCon und den FOS/TAC kam es zu keiner Übersäuerung des Prozesses. Zwischen Tag 100 und 140 war die Methanausbeute aufgrund der starken Schaumbildung nur an wenigen Tagen bestimmbar. Davor und danach schwankte sie teils stark mit Werten zwischen $0,25 - 0,37 \text{ L (g oTS)}^{-1}$, lag jedoch stets im Erwartungsbereich.

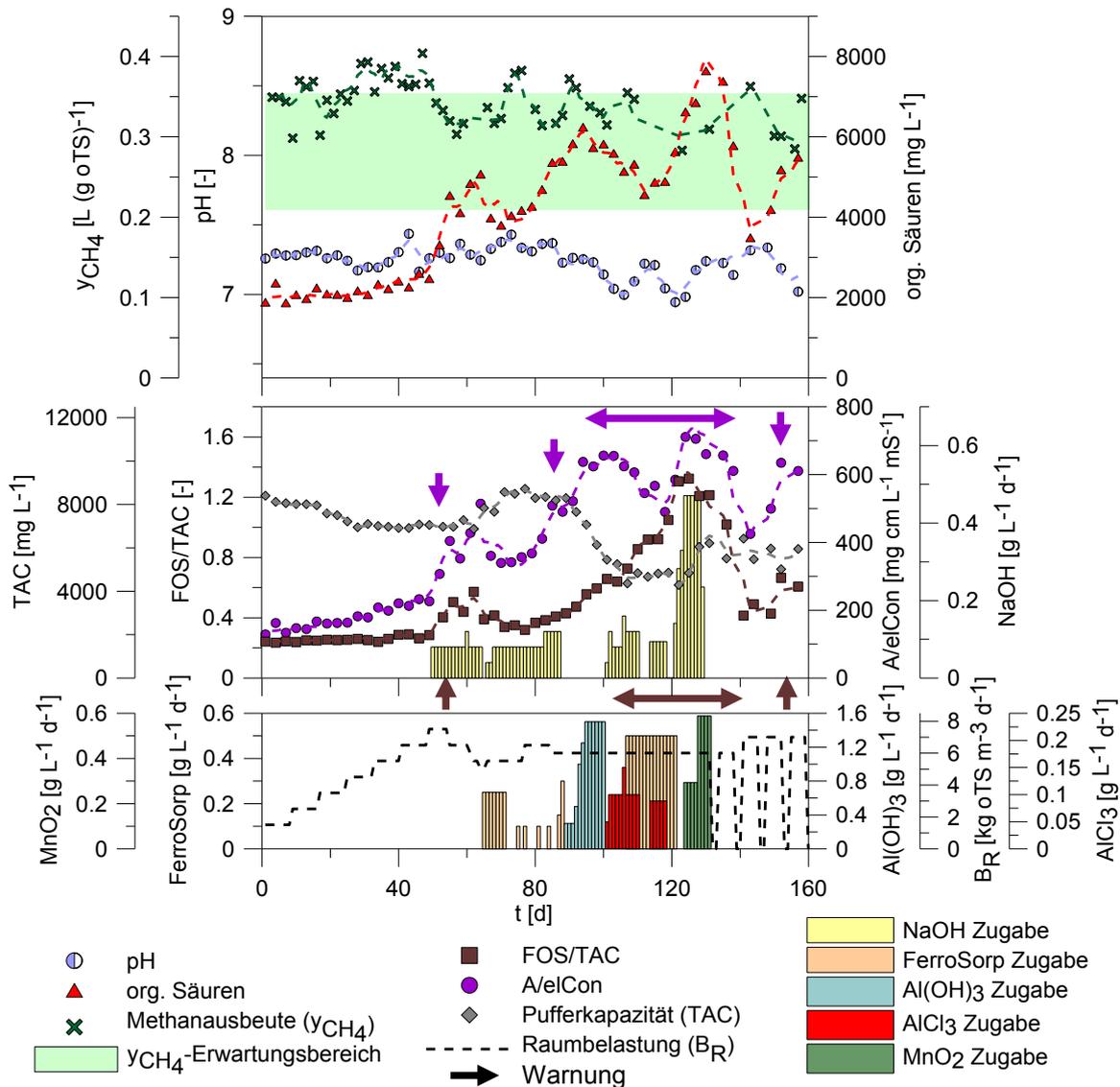


Abbildung 20: Verlauf der Prozessparameter bei der Etablierung einer Langzeit-Hochlastvergärung von NawaRo mittels Prozessüberwachung durch den FWI A/eICon und Zugabe von NaOH und wechselnden Additiven als Gegenmaßnahme (HochV 3). Farbige Pfeile zeigen den Warnzeitpunkt des jeweiligen FWIs an.

4.4.4 Vergleichende Betrachtung der Hochlast-Vergärungen

In allen drei Versuchsansätzen konnte eine Hochlastvergärung etabliert und über einen Zeitraum von 135 Tagen im EnviTal- und NaOH-Versuch (HochV 1 und 3) und über 95 Tage im CaO-Versuch (HochV 2) mithilfe des FWI A/eICon zur Überwachung der Prozessstabilität und durch Zugabe von Additiven als Gegenmaßnahme stabil gehalten werden. Stiegen die Werte des A/eICon trotz Additivzugabe weiter an und/oder nahm zeitgleich die Methanausbeute deutlich ab, wurde zusätzlich die Raumbelastung gesenkt. Die Methanausbeute lag in allen Versuchen

durchschnittlich bei $0,34 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ und damit im oberen Bereich der zu erwartenden Ausbeute von $0,21 - 0,35 \text{ L (g oTS)}^{-1}$.

Insgesamt erwies sich die Additivkombination aus der Spurenelementmischung EnviTal constant und NaOH (HochV 1) am geeignetsten für eine Hochlast-Vergärung, da bei diesem Versuch die Gesamtmenge der eingesetzten Additive mit $12,6 \text{ kg m}^{-3}$ 66 % geringer war als im NaOH-Versuch und 76 % geringer als im CaO-Versuch (Tab. 6).

Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten Additivmengen in den Hochlastversuchen

Versuch	Additiv	Anzahl Dosierungen	Ø Dosis [$\text{g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$]	Additivmenge _{gesamt} [kg m^{-3}]
HochV 1	EnviTal constant	71	1,5	0,1
	NaOH	52	160	8
	CaO	6	750	4,5
	Σ			12,6
HochV 2	CaO	56	800	45
	NaOH	35	240	8,4
	Σ			53,4
HochV 3	NaOH	67	1400	9,3
	FerroSorp® DG	28	361	10,1
	Al(OH) ₃	12	1050	12,7
	AlCl ₃	15	100	1,4
	MnO ₂	8	440	3,5
	Σ			37

Darüber hinaus konnte im EnviTal-Versuch die Raumbelastung von $B_R \geq 7 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ an 85 Tagen beibehalten werden. Im CaO-Versuch (HochV 2) und NaOH-Versuch (HochV 3) war dies nur über 23 bzw. 21 Tage möglich, um eine Übersäuerung der Prozesse zu vermeiden. Über die gesamte Versuchsdauer von 160 Tagen lag auch die durchschnittliche Raumbelastung mit $5,8 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ im EnviTal-Versuch am höchsten, im Vergleich zu den ebenfalls hohen durchschnittlichen Raumbelastungen von $5,1 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ im CaO-Versuch und $5,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ im NaOH-Versuch. In früheren Studien mit ähnlichen Substratzusammensetzungen kam es bereits bei Raumbelastungen zwischen 2 und $5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ zu Prozessstörungen durch Übersäuerung (Lebuhn et al. 2008b; Lv

et al. 2014; Moeller und Zehnsdorf 2016). Aufgrund der höheren Raumbelastung wurde bis Tag 130 im EnviTal-Versuch mit 5200 L ca. 11 % mehr Methan als im CaO-Versuch, 16 % mehr Methan als im NaOH-Versuch und rein rechnerisch 128 % mehr Methan als im Normalbetrieb mit der Durchschnittsraumbelastung deutscher Biogasanlagen von $3,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ gebildet (Abb. 21).

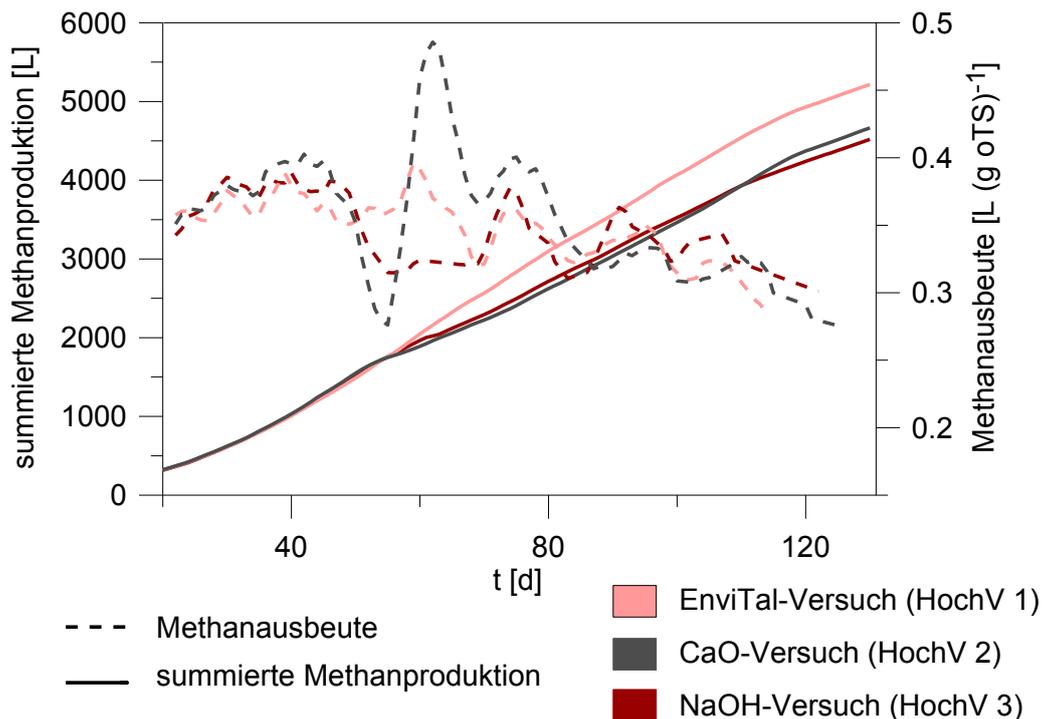


Abbildung 21: Vergleich der Hochlastvergärungen in HochV 1 – 3; Verlauf der Methanausbeute als Anzeiger der Prozessstabilität und summierte Methanproduktion; In HochV 1 wurde am meisten und am stabilsten Methan produziert.

Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die produzierten Gasmengen nur für den Zeitraum bis Tag 130 betrachtet, da anschließend im EnviTal- und NaOH-Versuch eine andere Charge Rindergülle C verwendet wurde. Im CaO-Versuch hingegen wurde die Rindergülle B weiter verwendet, die wahrscheinlich der Auslöser der Schaumbildung in den Systemen war. Diese Annahme wird unterstützt durch das Nachlassen der Schaumbildung in den Versuchen nach Wechsel auf die Güllecharge C, während sie im CaO-Versuch weiter auftrat, der weiterhin Charge B erhielt. Neben hohen Raumbelastungen wurden in früheren Studien sowohl eine Kombination aus hohen Raumbelastungen und proteinreichem Substrat, als auch filamentöse Mikroorganismen als Ursache für Schaumereignisse ausgemacht

(Dalmau et al. 2010; Kougias et al. 2013; Lienen et al. 2014a; Moeller et al. 2012). Eine Analyse des Rohproteingehaltes ergab, dass der Proteingehalt in der schäumenden Rindergülle B 8 % niedriger als in Rindergülle A und 21 % niedriger als in Rindergülle C war (Tab. 7). Der Proteingehalt kann daher als Schaumursache ausgeschlossen werden. Eine lichtmikroskopische Analyse der Schäume aus HochV 1 - 3 zeigte zudem keine fadenförmigen Strukturen, sodass filamentöse Mikroorganismen ebenfalls als Ursache für die Schaumbildung ausgeschlossen werden können (Abb. 22). Eine Befragung des Inhabers des Milchviehbetriebes, von dem die Gülle stammte, brachte auch keine Klärung. In der betriebseigenen Biogasanlage des Milchviehbetriebes kam es bei der Verwendung der Gülle als Substrat zu keinen Störungen im betreffenden Zeitraum. Die Ursache für die Schaumbildung durch Rindergülle B konnte daher nicht abschließend geklärt werden.

Tabelle 7: Trockensubstanz- (TS), organische Trockensubstanz- (oTS) und Rohproteingehalte der Rindergülle A, B und C (Proteinanalyse durchgeführt durch Eurofins Umwelt Ost GmbH)

Rindergülle	A	B	C
TS [%]	5,8	3,9	6,9
oTS [%]	4,3	2,9	5
Rohprotein [% oTS]	1,2	1,1	1,4

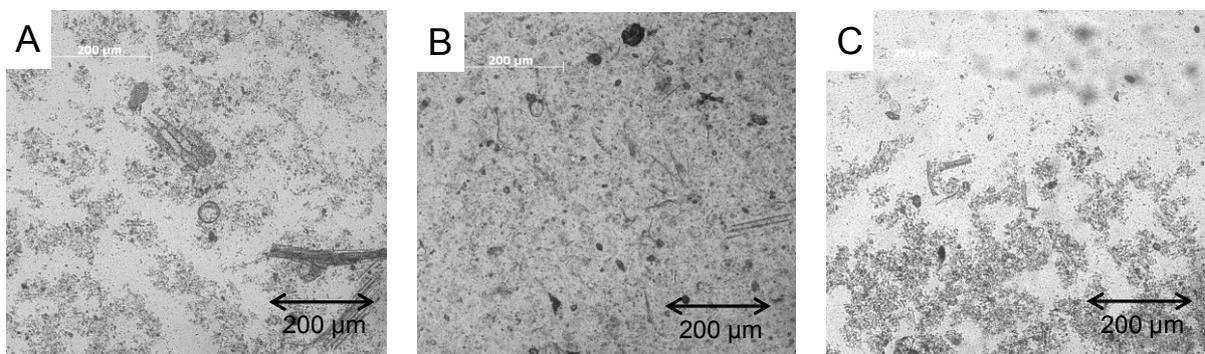


Abbildung 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Schäume aus A: HochV 1, B: HochV 2 und C: HochV 3; keine filamentösen Mikroorganismen erkennbar.

4.5 Co-Vergärung fett- und ölhaltiger Substrate und Aggregatbildung in NawaRo-Biogasanlagen

Für eine weitere Steigerung der Raumbelastung in NawaRo-Biogasanlagen im Vergleich zu den NawaRo-Langzeit-Hochlastversuchen (siehe 4.3), sind energiereichere Substrate als Silagen oder tierische Ausscheidungen nötig. Andernfalls wird eine minimale hydraulische Verweilzeit von 20 Tagen unterschritten und es besteht die Gefahr einer Auswaschung von prozessrelevanten Mikroorganismen. Aus früheren Studien ist bekannt, dass Klärschlamm zusammen mit energiereichen fett- und ölhaltigen Substraten co-vergärt werden kann (Kleyböcker et al. 2012a; Kleyböcker et al. 2014; Liebrich et al. 2016; Würdemann et al. 2011). Dabei wurde außerdem gezeigt, dass solche Systeme im Störfall durch Calciumoxid-Dosierungen stabilisiert werden können. Die Stabilisierung beruhte dabei auf der alkalischen, pH-Wert anhebenden Reaktion und der Bildung von prozessstabilisierenden Aggregaten. (siehe 2.3.3, Abb. 4).

In drei parallelen Laborversuchen (CoV 1 - 3) wurde nun die Möglichkeit der Co-Vergärung von energiereichem Rapsöl und die Erzeugung von prozessstabilisierenden Aggregaten in NawaRo-Systemen untersucht. Dabei wurde über 90 Tage Rapsöl mit Gärschlamm einer großtechnischen NawaRo-Biogasanlage (BGA Anklam) vergoren, die mit Maissilage und Rindergülle betrieben wurde. Die Versuchsreaktoren hatten ein Gärvolumen von je 23 L und wurden pneumatisch umgewälzt. Abbildung 23 zeigt exemplarisch die Prozessparameter CoV 1.

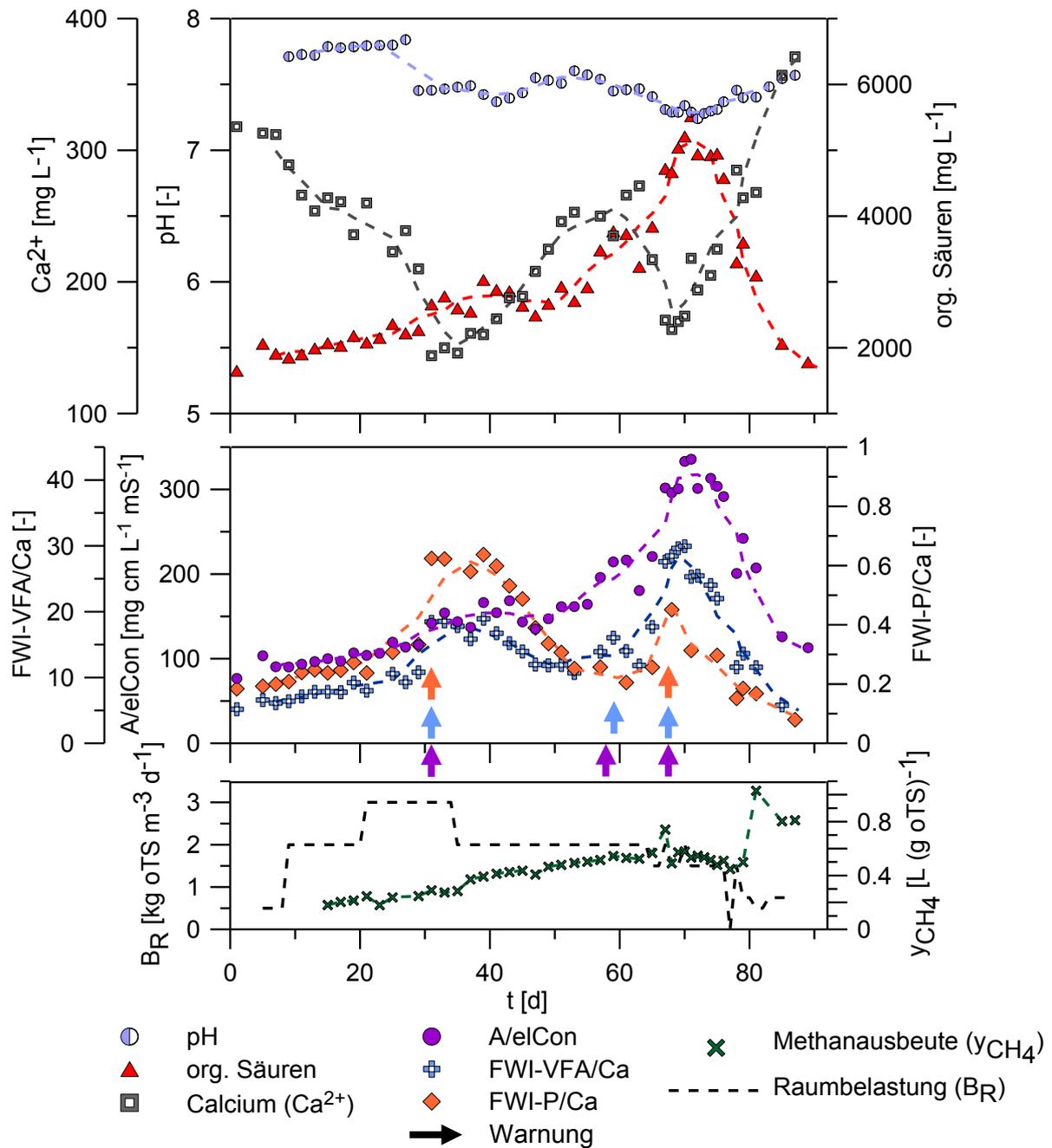


Abbildung 23: Verlauf der Prozessparameter bei der Co-Vergärung von NawaRo-Gärschlamm mit Rapsöl in CoV 1. Trotz der Warnungen durch den A/eICon, FWI-VFA/Ca und FWI-P/Ca blieb die Methanausbeute konstant bzw. stieg. Farbige Pfeile zeigen den Warnzeitpunkt des jeweiligen FWIs an.

Aufgrund einer unzureichenden Durchmischung durch das pneumatische Umwälzsystem, kam es in allen Versuchsreaktoren zur Bildung von Schwimmschichten. Der pH-Wert in den Schwimmschichten sank in den sauren Bereich auf 5,5 – 6,7, während der pH-Wert im Schlamm im neutralen Bereich zwischen 7,1 und 7,7 lag. Die Konzentration der organischen Säuren nahm von 2 auf 5,5 – 6,6 g L⁻¹ und die des gelösten Phosphates von 60 auf 100 - 200 mg L⁻¹ zu. Die

Calciumkonzentration sank um 56 – 85 % auf 50 – 144 mg L⁻¹. Die Werte der Frühwarnindikatoren A/ElCon, FWI-VFA/Ca und FWI-P/Ca nahmen in einem der Versuche ab Tag 25 und in den anderen zwei Versuchen ab Tag 31, sowie in allen Versuchen ein zweites Mal ab Tag 70 zu und warnten damit vor einer drohenden Prozessstörung. Es wurde jedoch trotz der Warnsignale keine Abnahme der Methanausbeute beobachtet. Als Gegenmaßnahme wurde ab Tag 35 die Raumbelastung auf 2 kg oTS m⁻³ d⁻¹ und in zwei Versuchen an Tag 45 ein weiteres Mal auf 1,1 kg oTS m⁻³ d⁻¹ gesenkt.

Ab Tag 31 wurden im Gärrest der drei Versuchsreaktoren unregelmäßig geformte, weiß-gräuliche Aggregate mit einem Durchmesser von 2 - 17 mm detektiert. Die FE-REM-EDX Analyse ergab, dass ihre Hauptbestandteile zu 75 – 90 wt% Kohlenstoff und Calcium waren (Abb. 24).

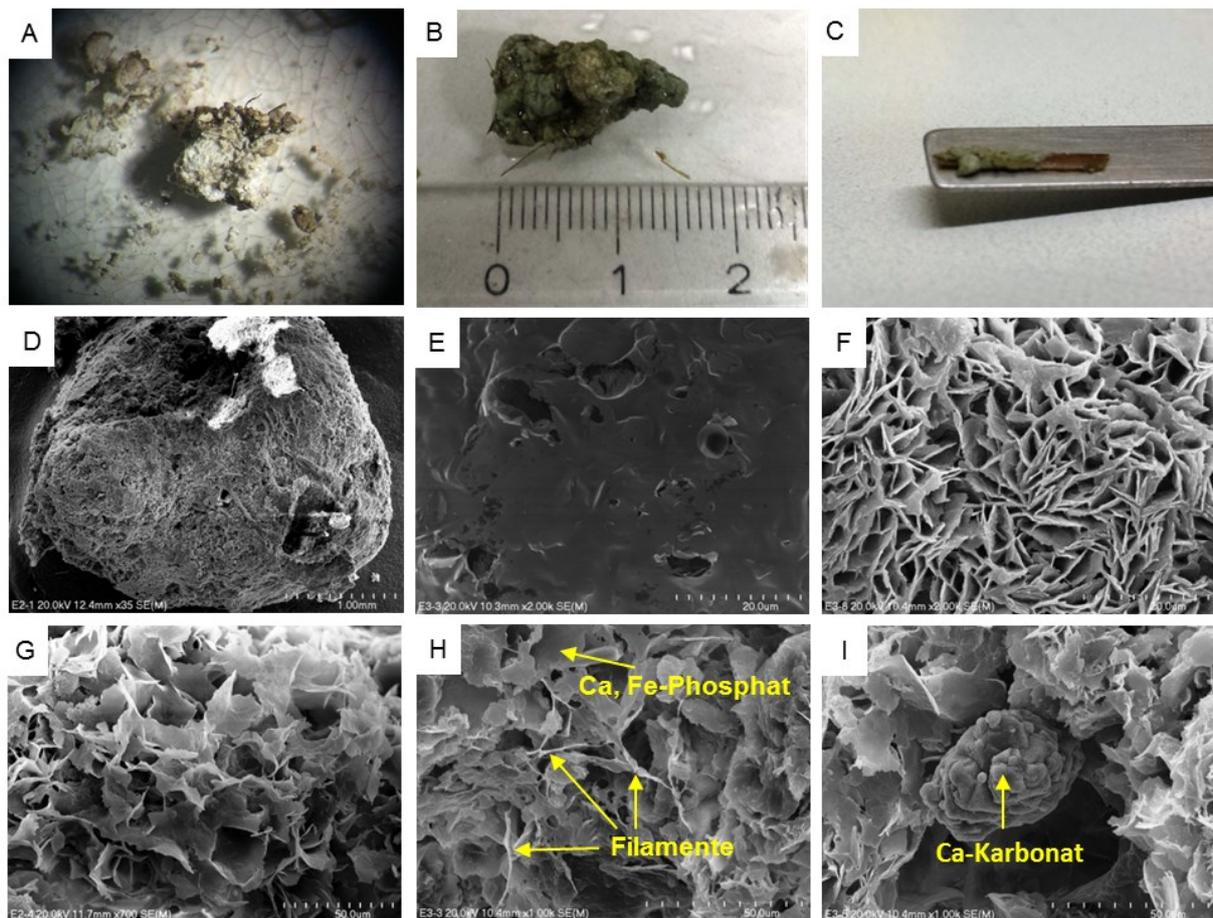


Abbildung 24: Bei der Co-Vergärung von NawaRo und Rapsöl gebildete Aggregate, A: Stereomikroskopische Aufnahme; B,C: Lichtbildaufnahme von Aggregaten mit Pflanzenfasereinschlüssen; D,E: FE-REM-Aufnahme der Aggregatoberfläche mit Poren; F,G: FE-REM-Aufnahme der Flockenstruktur im Aggregatinneren; H,I: FE-REM-Aufnahmen mit EDX-Punktanalysen zeigt Calcium- u. Eisenphosphate, sowie Calciumkarbonate und filamentöse Strukturen, die auf Mikroorganismen im Aggregatinneren hinweisen. (Analyse D-I von Dr. Monika Kasina)

Die Oberfläche der Aggregate bestand aus einer dichten, homogenen Schicht aus Kohlenstoff (100 wt%) mit Poren darin. Im Inneren zeigte sich eine von Filamenten durchzogene, rosettenartige Schuppenstruktur, die nach innen kompakter wurde. Die Schuppen bestanden zu 90 wt% aus Kohlenstoff. Es wurden außerdem Einschlüsse aus Calciumkarbonat und Calcium-Eisen-Phosphaten gefunden.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Aggregate wurden Lipide, Proteine und Calcium jeweils spezifisch angefärbt. Die Aufnahmen zeigen eine Assoziation von Lipiden/Fettsäuren mit Calcium, eingebettet in eine Proteinmatrix, die auf das Vorhandensein von Biofilmen hindeutet (Abb. 23). In ihrem Aufbau und ihrer chemische Zusammensetzung ähneln die Aggregate damit sehr den prozessstabilisierenden Aggregaten bei der Co-Vergärung von Klärschlamm und Rapsöl bei Zugabe von CaO (siehe 2.3.3).

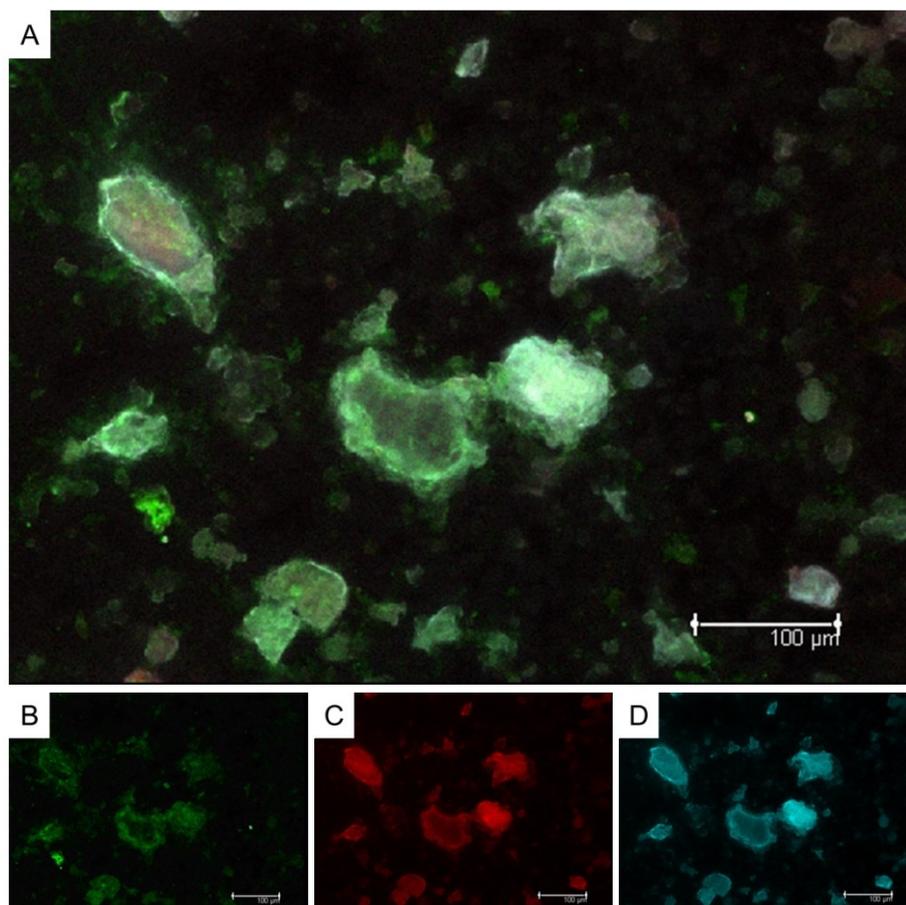


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der bei der Co-Vergärung von NawaRo und Rapsöl in Versuchsreihe CoV gebildeten Aggregate; A: B, C u. D übereinander gelegt; B: Proteinfärbung mit DTAF (grün); C: Calciumfärbung mit Calcein (rot); D: Lipidfärbung mit DiD (blau). (Analyse von Michaela Hache vom Dresdner Grundwasserforschungszentrum e.V.)

Die GC-MS-Messung ergab, dass es sich bei den Lipiden überwiegend um die Fettsäuren Palmitinsäure (C₁₆), Ölsäure (C₁₈), und Myristinsäure (C₁₄) handelte. Hierbei handelt es sich um Bestandteile oder Abbauprodukte des Rapsöls (Rutkowski et al. 1964; Schieder et al. 2010) (Abb. 26). Damit konnte erstmals bewiesen werden, dass die Aggregate neben dem Calcium im Wesentlichen aus langkettigen Fettsäuren bestehen. Pflanzenfasereinschlüsse und an Pflanzenfasern angeheftetes Aggregatmaterial lassen vermuten, dass sich die Aggregate bevorzugt an kleineren Partikeln als Kristallisationskeim bilden (Abb. 24).

Es wird vermutet, dass die in diesem Versuch gebildeten Aggregate einen ähnlichen, prozessstabilisierenden Effekt auf die Co-Vergärung von NawaRo mit Rapsöl hatten, wie die aus Versuchen zur Co-vergärung von Klärschlamm und Rapsöl bekannten Aggregate (siehe 2.3.3). Dies wird dadurch gestützt, dass trotz der Warnungen durch die FWI A/elCon, FWI-VFA/Ca und FWI-P/Ca keine Abnahme der Methanausbeute beobachtet wurde (Abb. 23). Im Gegensatz zur Vergärung von Klärschlamm, war bei der Vergärung von NawaRo keine Zugabe von CaO nötig, um die Aggregatbildung zu induzieren, da der NawaRo-Schlamm mit 300 mg L⁻¹ eine 10- bis 20-fach höhere Calciumkonzentration aufweist als Klärschlamm (Kleyböcker et al. 2014).

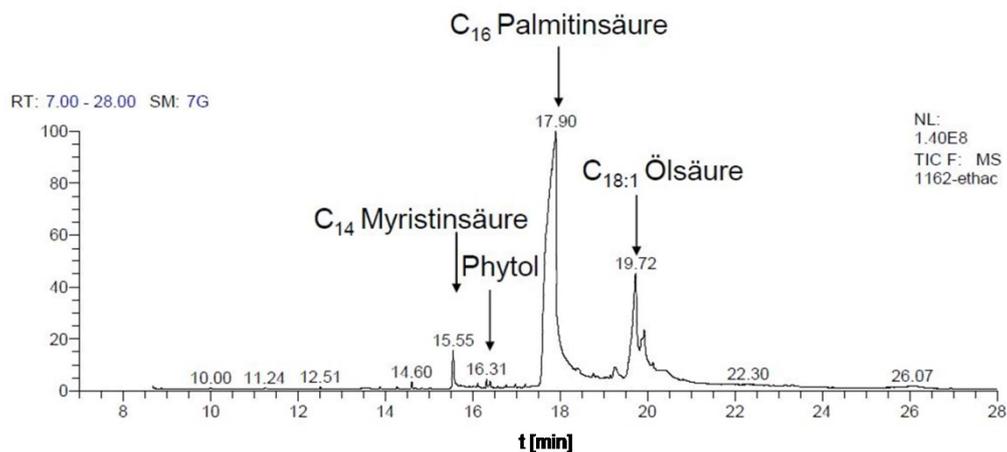


Abbildung 26: GC-MS-Analyse der in den Aggregaten aus CoV 2 enthaltenen Fettsäuren (Analyse von Lorina Schmalz vom Dresdner Grundwasserforschungszentrum e.V.)

4.6 Hochlast-Co-Vergärung von NawaRo mit fett- und ölhaltigen Substraten

Aufgrund der Erkenntnisse aus den Versuchen zur Co-Vergärung von Rapsöl mit NawaRo (siehe 4.5), wurde in zwei Laborversuchen (HochCoV 1 und 2) ein durch Aggregatbildung stabilisierter Hochlastbetrieb untersucht ($B_R > 4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) bei dem NawaRo gemeinsam mit energiereichen fett- und ölhaltigen Substraten co-vergoren wurden. Dazu wurde Rapsöl als Co-Substrat verwendet. Die Prozessstabilität wurde mithilfe des A/eICon-Frühwarnindicators überwacht. Im Falle einer Warnung wurde beiden Prozessen CaO, und in einem der Versuche zusätzlich die Spurenelementmischung EnviTal constant (HochCoV 1) zugegeben. In Abbildung 27 sind exemplarisch die Prozessparameter für den Versuch HochCoV 1 dargestellt.

Bis Tag 20 wurde der oTS-Anteil des Rapsöls am Substrat stufenweise von 15 auf 70 % angehoben und der oTS-Anteil von Maissilage und Rindergülle entsprechend gesenkt. Die Raumbelastung wurde im gleichen Zeitraum von 7 auf $9 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ weiter gesteigert. An Tag 36 wurde eine Stoßbelastung simuliert. Dazu wurde von Tag 26 – 35 die Fütterung ausgesetzt und der Betrieb der Versuchsanlagen ab Tag 36 mit einer Raumbelastung von $9 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ wieder aufgenommen.

Insgesamt wurde in beiden Versuchen eine stabile Hochlast-Co-Vergärung von NawaRo mit Rapsöl etabliert. Im Zuge der Steigerung der Raumbelastungen und der Öl-oTS-Anteile, sowie nach den Stoßbelastungen warnten die Frühwarnindikatoren A/eICon und FWI-VFA/Ca in HochCoV 1 von Tag 9 - 17, 19 - 25 und 44 - 46, sowie im HochCoV 2 von Tag 5 - 17, 21 - 24, und 38 - 49 vor drohenden Prozessstörungen. Während der Warnperioden stieg die Konzentration der organischen Säuren in beiden Versuchen von ca. $3,5$ auf bis zu $5,9 \text{ g L}^{-1}$ an und die Calciumkonzentration sank von ca. 350 auf bis zu 170 mg L^{-1} ab. Auch die Methankonzentration sank während der Warnperioden leicht ab oder blieb trotz Erhöhung des Öl-oTS-Anteils konstant statt zu steigen, was ebenfalls auf eine Instabilität der Prozesse hindeutet. Der FOS/TAC-Indikator zur Vorhersage von Prozessstörungen zeigte nur im HochCoV 2 von Tag 6 – 15 und ab Tag 42 erhöhte Werte, während die Werte im HochCoV 1 nur leicht von $0,28$ auf $0,45$ anstiegen. Der FOS/TAC-Indikator war demnach weniger geeignet, um eine stabile Hochlast-Co-Vergärung zu steuern. Während der A/eICon-Warnperioden wurden den Systemen als Gegenmaßnahme

insgesamt je 16 Calciumoxiddosen zwischen $0,5$ und $1 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und an sieben Tagen im HochCoV 1 zusätzlich $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ EnviTal-Spurenelementmischung zugefügt.

Nach den Additivzugaben und im Zuge des Aussetzens der Fütterung sanken die Werte der beiden FWI und die Konzentration der org. Säuren jeweils wieder auf ihre Ausgangswerte ab und zeigten damit eine Prozessstabilisierung an. Auch die Calciumkonzentration stieg wieder an und wies auf einen Abbau der Aggregate hin. Der pH-Wert nahm während der Versuche kontinuierlich von $7,3$ auf $7,7$ zu.

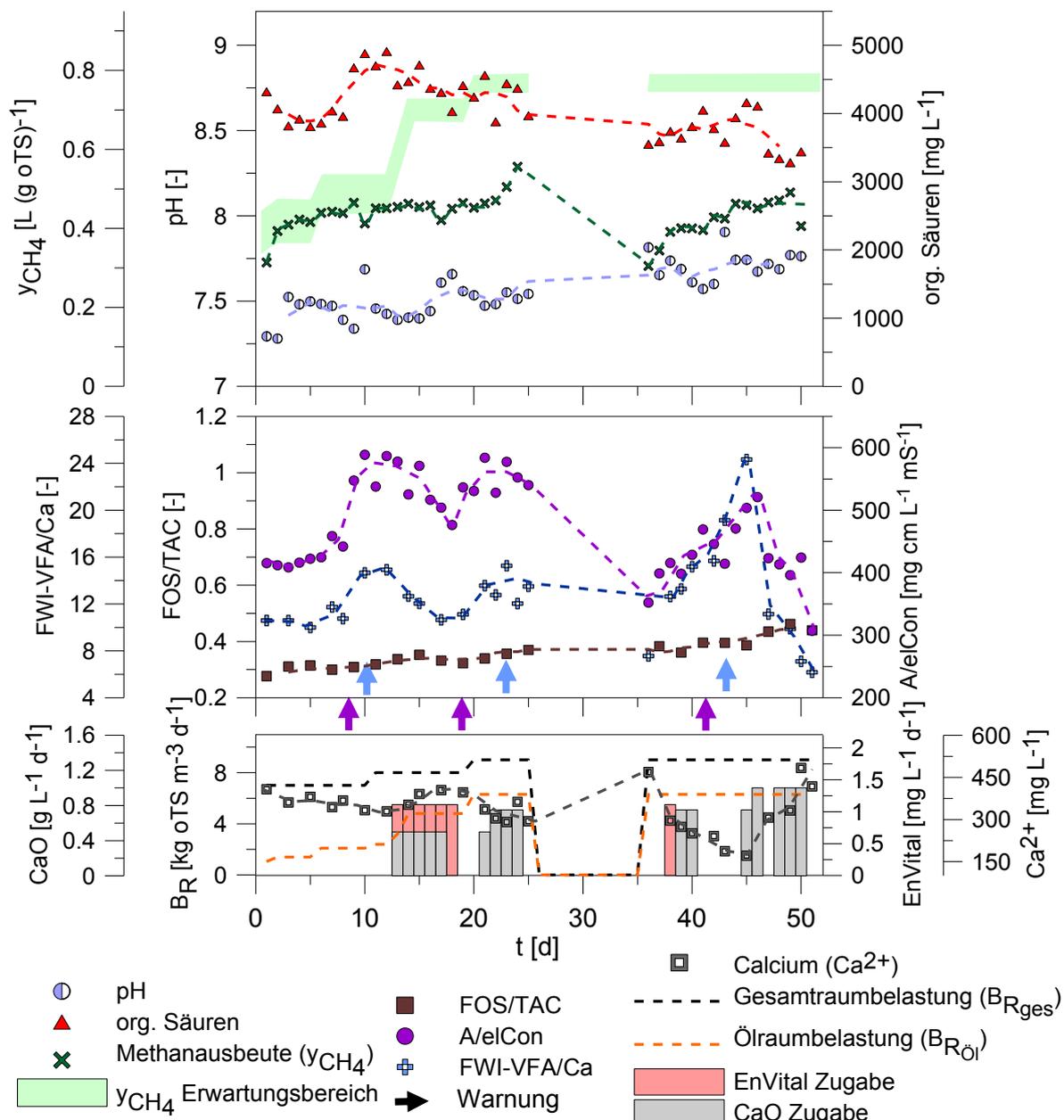


Abbildung 27: Verlauf der Prozessparameter bei der Hochlast-Co-Vergärung von NawaRo mit Rapsöl in HochCoV 1. Mittels Additivzugabe kann der Prozess stabil gehalten werden. Farbige Pfeile zeigen den Warnzeitpunkt des jeweiligen FWIs an.

Bereits ab Tag 6 wurden in beiden Versuchen ca. 1 mm kleine, weiße Aggregate im Gärslamm detektiert (Abb. 26). Nach Versuchsende wurden zudem im Versuchsreaktor aus HochCoV 2 auch größere kugelförmige und unregelmäßig geformte Aggregate mit einer Länge von ca. 1 – 2 cm gefunden (Abb. 28). Die unregelmäßig geformten Aggregate bestanden aus einer schwammartigen Struktur und die kugelförmigen Aggregate aus übereinander gelagerten Schichten aus langkettigen Fettsäuren und Calcium, eingebettet in eine Proteinmatrix, die auf das Vorhandensein von Biofilmen hindeutet. In ihrem Aufbau und ihrer Zusammensetzung ähnelten sie sehr den Aggregaten aus Versuchsreihe CoV (siehe 4.5) und aus vorangegangenen Studien zur Prozessstabilisierung mittels CaO-Zugabe in Systemen mit lipidhaltigen Co-Substraten (Kleyböcker et al. 2012a; Kleyböcker et al. 2014; Liebrich et al. 2016). Die Aggregate stabilisierten den Prozess vermutlich daher auch in dieser Versuchsreihe durch die Bildung von Mikrohabitaten und die Festlegung von Fettsäuren in den Aggregaten, die in hohen Konzentrationen toxisch für Mikroorganismen wirken können. Vermutlich lag aufgrund dieser Festlegung von Fettsäuren, die zu einer verminderten Substratverfügbarkeit führte, die Methanausbeute unterhalb des theoretischen Erwartungswertes (Abb. 27). Im Vergleich wurden bei der Co-Vergärung des Rapsöls mit durchschnittlich $0,44 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ aber trotzdem höhere Methanausbeuten erzielt, als bei der alleinigen Vergärung von typischen NawaRo möglich gewesen wäre ($0,21 - 0,35 \text{ L (g oTS)}^{-1}$) (siehe 4.4 und Tab. 3).

Nach Versuchsende wurde der Laborreaktor des Versuches HochCoV 1 weiter betrieben, die Fütterung jedoch eingestellt, um den Abbau der Aggregate zu beobachten. Drei Mal pro Woche wurden Proben entnommen und die Zahl der kleinen Aggregate mikroskopisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Zahl der Aggregate linear abnahm. Vermutlich wurden die Aggregate durch mikrobiologische Prozesse in den Biofilmen abgebaut, denn nach 32 Tagen wurden keine Aggregate mehr im Gärslamm detektiert (Abb. 29).

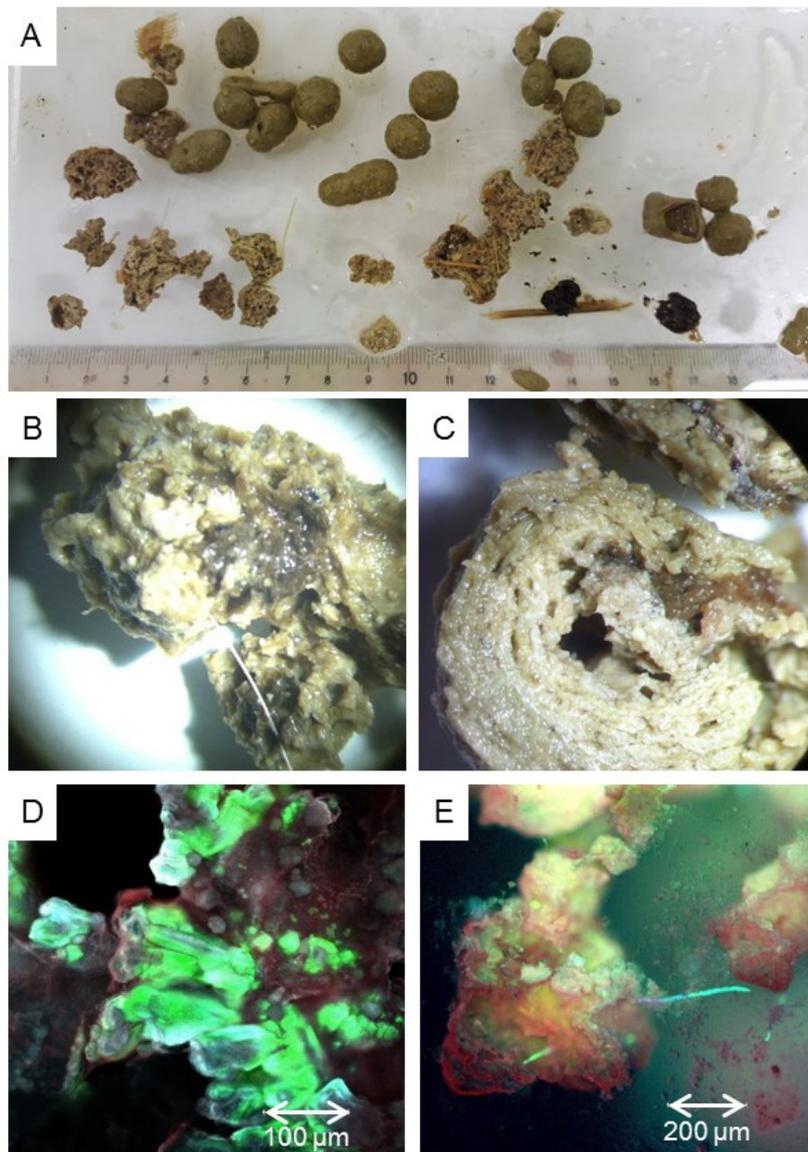


Abbildung 28: Aggregate aus HochCoV 2; A: Große (1 – 2 cm) kugelige und unregelmäßig geformte Aggregate; B, C: stereomikroskopische Aufnahme eines unregelmäßigen (B) und eines aufgeschnittenen, kugelförmigen (C) Aggregats; D, E: fluoreszenzmikroskopische Analyse eines unregelmäßigen (D) und kugelförmigen (E) Aggregats, Calcium (rot, Farbstoff Calcein) und Lipide (blau, Farbstoff DiD) sind in eine Proteinmatrix (grün, Farbstoff DTAF) eingebettet. (Analyse B-E von Michaela Hache vom Dresdner Grundwasserforschungszentrum e.V.)

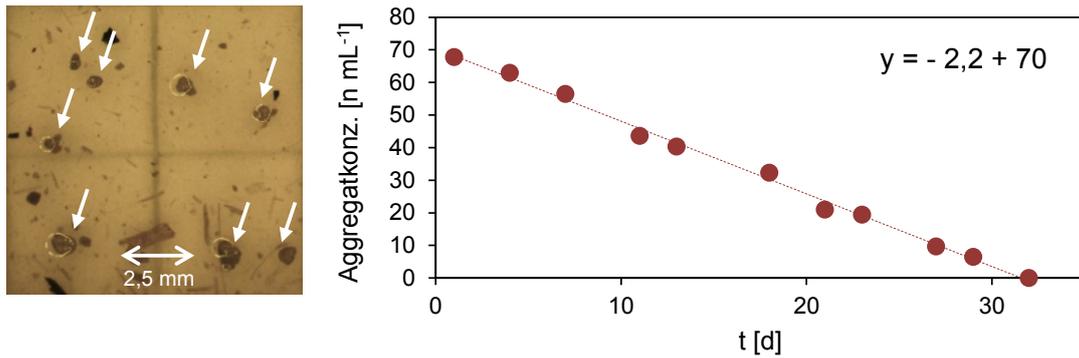


Abbildung 29: Bei der Hochlast-Co-Vergärung von NawaRo und Rapsöl in HochCoV 1 gebildete kleine Aggregate (ca. 1 mm) (links) und die Abnahme ihrer Abundanz nach Aussetzen der Fütterung (rechts)

Die Methanausbeute war im Durchschnitt in beiden Versuchen mit ca. $0,44 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ identisch. Trotzdem eignete sich im direkten Vergleich die Kombination aus der Zugabe von CaO und der EnviTal-Spurenelementmischung in HochCoV 1 etwas besser, um die Co-Vergärung stabil zu halten. Der Wert des Frühwarnindikators A/elCon lag in HochCoV 2 im Durchschnitt um 26 % höher als im HochCoV 1 (Daten nicht gezeigt). Außerdem kam es mit steigendem Öl-oTS-Anteil in HochCoV 2 an insgesamt 13 Tagen zu Schaumereignissen, während in HochCoV 1 kein Schäumen beobachtet wurde. Obwohl Rapsöl in geringen Dosierungen und bei niedrigen Raumbelastungen sogar als effektives Antischaummittel eingesetzt wird, können lipidhaltige Substrate bei hohen Raumbelastungen zu übermäßiger Schaumbildung beitragen (Ganidi et al. 2009; Kougias et al. 2013). Vermutlich waren daher die hohen Öl-Raumbelastungen ursächlich für die Schaumereignisse in HochCoV 2.

4.7 Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung fett- und ölhaltiger Substrate

Im Zuge dieser Arbeit ergab sich die Möglichkeit, Referenzversuche zum Langzeit-Hochlast-Betrieb (100 d , $B_R > 4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) bei der Co-Vergärung von fett- und ölhaltigen Substraten im Technikumsmaßstab (180 L) durchzuführen. Die Versuche erfolgten in Kooperation mit den Leipziger Wasserwerken an der Kläranlage Rosental. In vier Versuchen (LangCoV 1 - 4) wurde CaO als Additiv verwendet, um die prozessstabilisierende Aggregatbildung zu induzieren und dadurch die Prozesse bei hohen Raumbelastungen stabil zu halten. Dabei wurde Klärschlamm mit Rapsöl als Co-Substrat vergoren. In zwei Versuchen (LangCoV 3 und 4) wurde die Raumbelastung von $2,3 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ langsam, d.h. innerhalb von 90 Tagen schrittweise auf $6 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, und in den anderen zwei Versuchen (LangCoV 1 und 2) schnell, d.h. innerhalb des gleichen Zeitraumes schrittweise auf $9 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, durch Erhöhung der Rapsölfracht gesteigert. Der FWI-VFA/Ca wurde zur Prozessüberwachung genutzt, da der A/eICon zum Zeitpunkt der Versuchsreihe noch nicht entwickelt worden war. Bei einer drohenden Prozessstörung, angezeigt durch den FWI-VFA/Ca oder bei $\text{pH} < 7$, wurde den Systemen CaO zur Stabilisierung zugefügt. Mit Hilfe der durch den FWI-VFA/Ca gesteuerten CaO-Dosierungen wurde in allen Versuchen eine stabile Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung über 100 Tage aufrechterhalten.

4.7.1 Langzeit-Hochlast mit langsamer Steigerung der Raumbelastung

Die beiden Versuche zur Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung von Rapsöl mit Klärschlamm bei langsamer Steigerung der Raumbelastung wurden parallel durchgeführt. Abbildung 30 zeigt exemplarisch die Prozessparameter für LangCoV 4.

Bis Tag 21 wurde nur Klärschlamm vergoren, ab Tag 22 erfolgte die erste Erhöhung der Raumbelastung durch Co-Vergärung von Rapsöl. Darauf stieg die Konzentration der organischen Säuren kurzzeitig zwischen Tag 24 und 31 auf bis zu 800 mg L^{-1} an, blieb danach aber konstant niedrig bei $< 200 \text{ mg L}^{-1}$. Der FWI-VFA/Ca warnte im gleichen Zeitraum durch einen Anstieg des Ausgangswertes um das Achtfache vor einer drohenden Prozessstörung. Es ist anzunehmen, dass diese kurzzeitige Prozessinstabilität lediglich durch die Anpassung der mikrobiellen Biozönose an das neue Substrat hervorgerufen wurde, denn bis Tag 33 sank der FWI und die Konzentration der Säuren ohne Einleiten von Gegenmaßnahmen wieder auf den

Ausgangswert ab. Die Stabilisierung des Systems ohne Einleiten von Gegenmaßnahmen wurde durch die zu diesem Zeitpunkt noch niedrigen Raumbelastungen begünstigt.

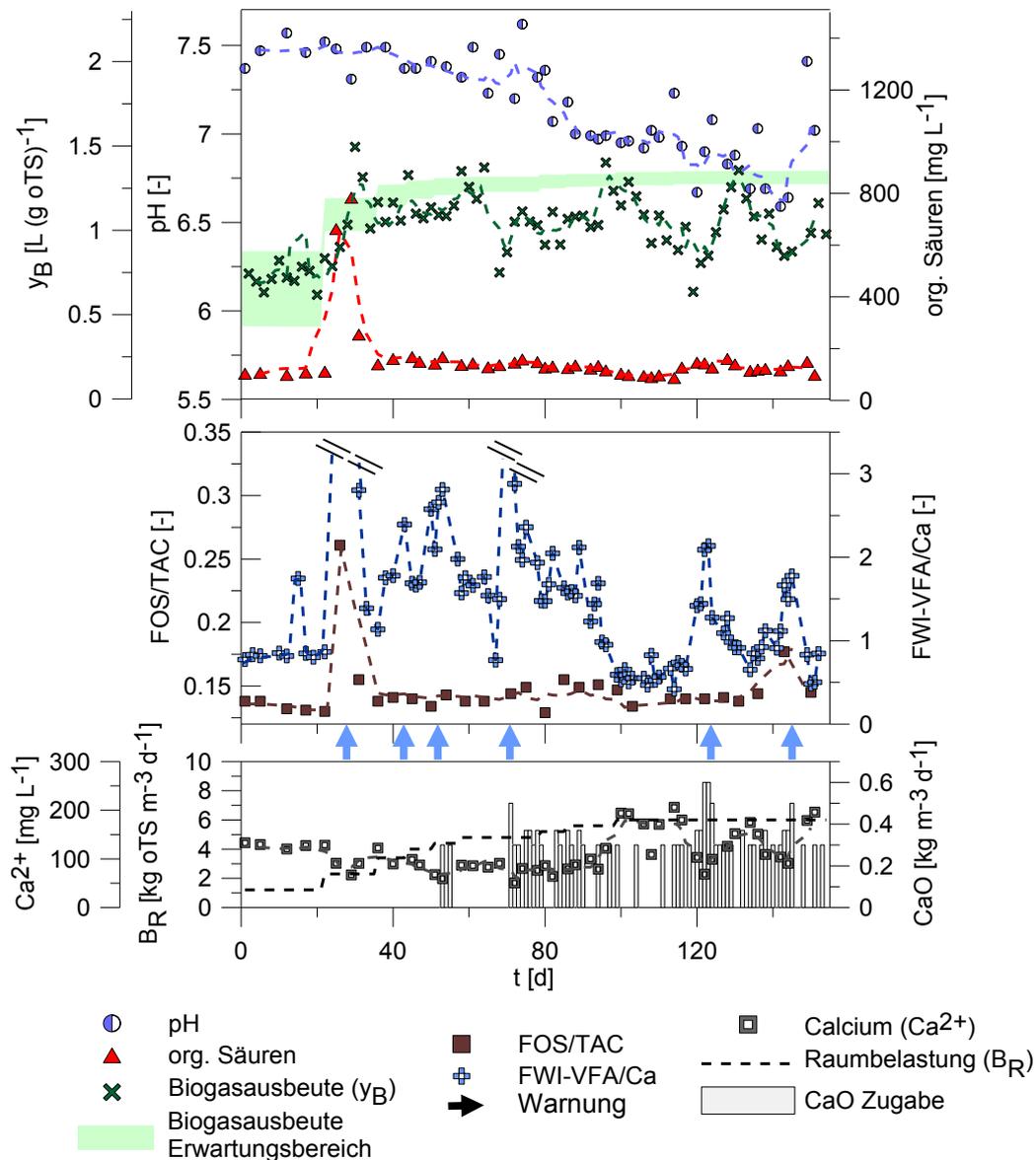


Abbildung 30: Verlauf der Prozessparameter bei der Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung von Klärschlamm und Rapsöl in LangCoV 4 mit langsamer Steigerung der Raumbelastung. Durch CaO -Zugaben bei Warnungen durch den FWI-VFA/Ca kann die Hochlastvergärung über ca. 100 Tage stabil gehalten werden. Farbige Pfeile zeigen den Warnzeitpunkt des jeweiligen FWIs an.

Mit Erreichen der ersten Hochlaststufe ($4,4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) von Tag 50 – 57, sowie zusätzlich von Tag 71 – 78, an Tag 82 und Tag 89 und von Tag 122 – 123 warnte der FWI-VFA/Ca erneut durch mindestens eine Verdopplung des Ausgangswertes vor drohenden Prozessstörungen. Während der Warnperioden sank auch die Biogasausbeute auf bis zu $0,8 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ ab, was ebenfalls auf Prozessinstabilitäten

hindeutete. Der FOS/TAC-Wert blieb bis auf Tag 29 mit einem Wert von 0,32 konstant niedrig bei $< 0,2$. Ab Tag 80 sank der pH-Wert von zuvor 7,2 - 7,5 auf ca. 6,7 an Tag 134 ab. Als Gegenmaßnahme wurde während der Warnperioden durch den FWI-VFA/Ca und bei $\text{pH} < 7$ ca. $0,35 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ an Tag 71 und von Tag 122 – 124 ca. $0,55 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ CaO zugegeben. Nach der Zugabe sank der FWI-VFA/Ca jeweils wieder auf den Ausgangswert ab und die Biogasausbeute stieg auf bis zu $1,4 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ an. Während des Hochlastbetriebes lag die Biogasausbeute im Durchschnitt bei $1,1 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ und damit nur leicht unterhalb des theoretischen Erwartungswertes von ca. $1,3 \text{ L (g oTS)}^{-1}$. Auch die Calciumkonzentration sank während der Warnperioden von ca. 120 g L^{-1} auf bis zu 40 mg L^{-1} ab, stieg nach den CaO-Zugaben aber wieder auf bis zu 210 mg L^{-1} an. In Folge der CaO-Zugabe bildeten sich kleine, weiße Aggregate, die den Prozess stabilisierten (Abb. 32, 33).

4.7.2 Langzeit-Hochlast mit schneller Steigerung der Raumbelastung

Die beiden Versuche zur Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung von Rapsöl mit Klärschlamm bei schneller Steigerung der Raumbelastung wurden parallel durchgeführt. Abbildung 31 zeigt exemplarisch die Prozessparameter für LangCoV 1.

Bis Tag 21 wurde nur Klärschlamm vergoren, ab Tag 22 erfolgte die erste Erhöhung der Raumbelastung durch Co-Vergärung von Rapsöl. Im Zuge der weiteren Erhöhung der Raumbelastung und während des Hochlastbetriebes ab Tag 44 warnte der FWI-VFA/Ca von Tag 40 – 75, 94 – 103, an Tag 121, von Tag 128 – 135 und an Tag 152 vor einer drohenden Prozessstörung durch mindestens eine Verdopplung des Ausgangswertes. Während dieser Warnperioden sank auch die Biogasausbeute auf bis zu $0,7 \text{ L (g oTS)}^{-1}$ ab, was ebenfalls auf eine Instabilität des Prozesses hindeutete.

Die Konzentration der organischen Säuren blieb während des Versuches meist niedrig bei ca. 200 mg L^{-1} , stieg jedoch von Tag 103 – 110 und von 120 – 141 leicht auf ca. 300 bzw. 500 mg L^{-1} an. Der FOS/TAC-Wert blieb bis Tag 100 niedrig mit Werten von $\leq 0,2$ und warnte an Tag 115, von Tag 127 – 136 und an Tag 152 mit Spitzenwerten von 0,6 – 0,7. Ab Tag 57 sank der pH-Wert von zuvor 7,5 – 7,3 auf zunächst 6,8 an Tag 75 ab. Nach einer kurzen Stabilisierungsphase bis zu einem pH-Wert von 7,2 an Tag 80 sank er erneut auf ca. 6,6 – 6,8 bis zum Versuchsende ab. Als Gegenmaßnahme wurde dem System bei einer Warnung durch den FWI-VFA/Ca und bei $\text{pH} < 7$ an Tag 47, 53, 55 und von Tag 58 – 92 annähernd täglich ca.

0,35 kg m⁻³ d⁻¹ und von Tag 94 bis Versuchsende an Tag 150 annähernd täglich 0,55 kg m⁻³ d⁻¹ CaO zugegeben. Nach CaO-Zugabe sank der FWI-VFA/Ca jeweils wieder auf den Ausgangswert ab und die Biogasausbeute stieg auf den Erwartungswert von ca. 1,35 L (g oTS)⁻¹ an. Die durchschnittliche Biogasausbeute während des Hochlastbetriebes lag mit ca. 1,1 L (g oTS)⁻¹ nur knapp unterhalb des Erwartungswertes.

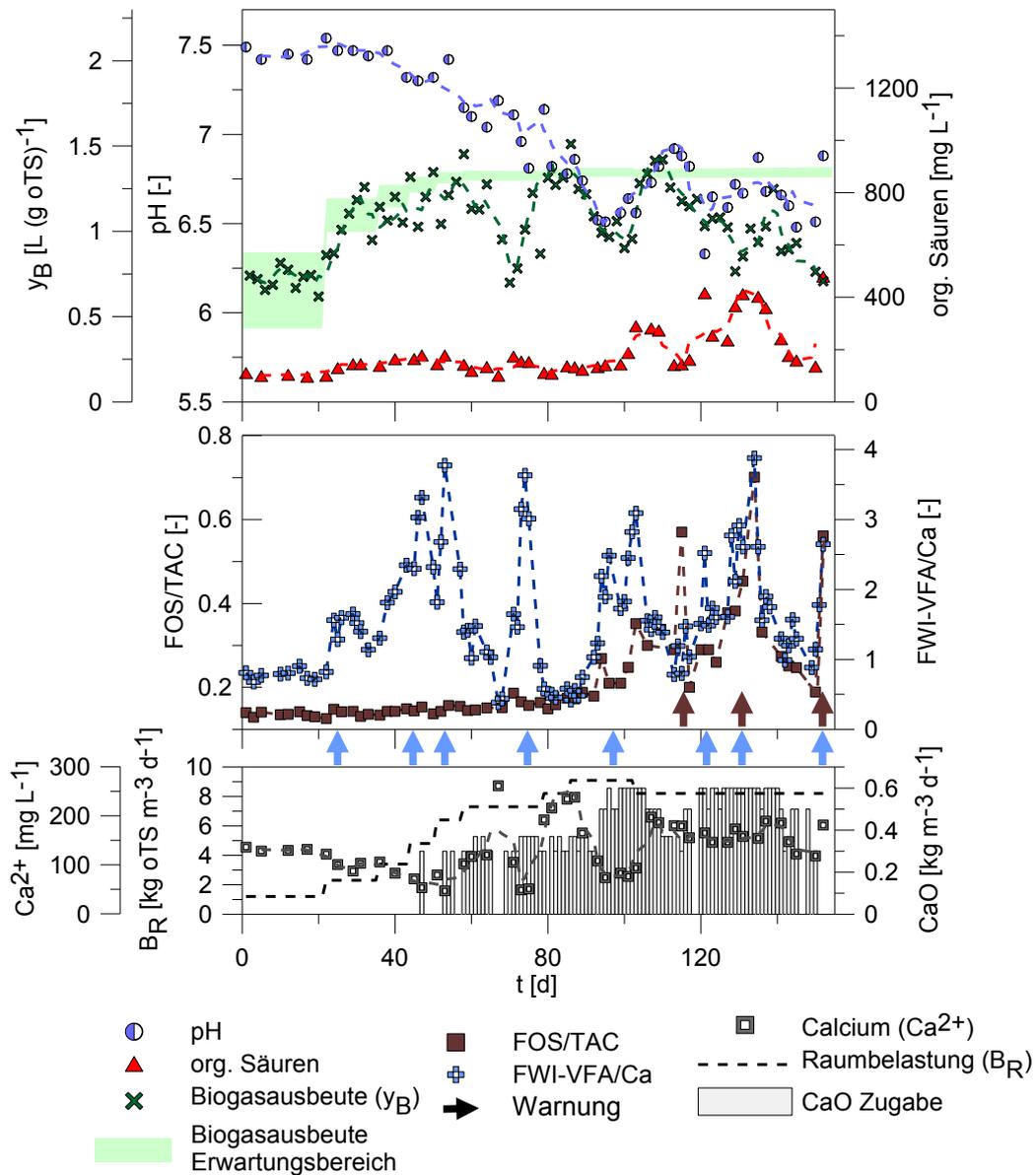


Abbildung 31: Verlauf der Prozessparameter bei der Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung von Klärschlamm und Rapsöl in LangCoV 1 mit schneller Steigerung der Raumbelastung. Durch CaO-Zugaben bei Warnungen durch den FWI-VFA/Ca kann die Hochlastvergärung über ca. 100 Tage stabil gehalten werden. Farbige Pfeile zeigen den Warnzeitpunkt des jeweiligen FWIs an.

Während der Warnperioden sank die Calciumkonzentration von ursprünglich 130 mg L^{-1} auf bis zu 50 mg L^{-1} ab, stieg nach den CaO-Zugaben aber kurzzeitig auf bis zu 300 mg L^{-1} an. Dabei kam es in Folge der CaO-Dosierungen zur Bildung von kleinen weißen Aggregaten im System, die eine stabilisierende Wirkung auf den Prozess hatten (Abb. 32, 33).

4.7.3 Aggregatbildung bei der Co-Vergärung von Klärschlamm mit Rapsöl

Wie bereits in den Versuchsreihen CoV und HochCoV zur Co-Vergärung von NawaRo mit Rapsöl (siehe 4.4 und 4.5), kam es auch in dieser Versuchsreihe zur Bildung von Aggregaten bei Zugabe von CaO. Dabei nahm mit anhaltender CaO-Zugabe im Hochlastbetrieb vor allem die Zahl der Aggregate mit einem Durchmesser von 0,5 - 2 mm kontinuierlich auf bis zu $120 \text{ Aggregate mL}^{-1}$ zu (Abb. 32). Auch die bei der Co-Vergärung von Rapsöl und Klärschlamm gebildeten Aggregate weisen eine starke Assoziation von langkettigen Fettsäuren und Calcium auf, eingebettet in eine Proteinmatrix, die auf das Vorhandensein von Biofilmen hindeutet (Abb. 33). Auch in dieser Versuchsreihe hatten die Aggregate eine stabilisierende Wirkung auf die Prozesse.

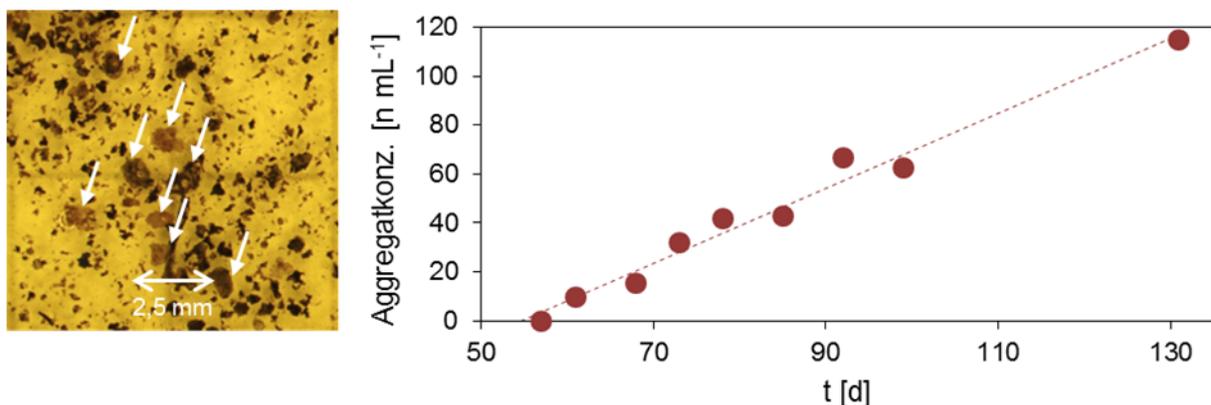


Abbildung 32: Bei der Hochlast-Co-Vergärung von Klärschlamm und Rapsöl in LangCoV 1 gebildeten Aggregate ($d = 0,5 - 2 \text{ mm}$) (links) und ihre Zunahme im Versuchsverlauf mit steigender Raumbelastung (rechts)

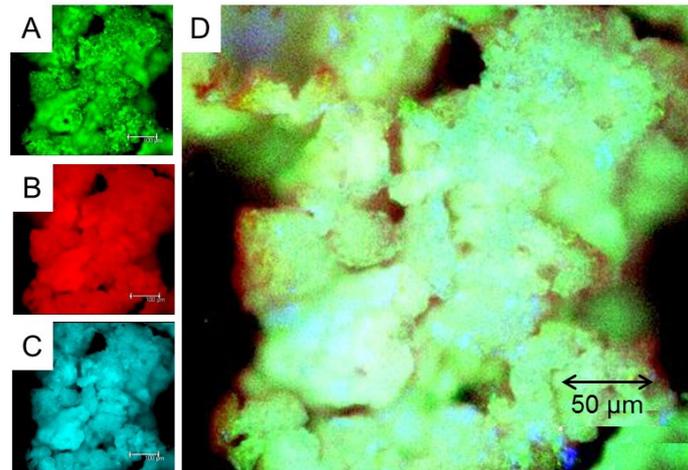


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der bei der Co-Vergärung von Klärschlamm und Rapsöl bei CaO-Zugabe gebildeten Aggregate; A: Proteinfärbung mit DATF (grün); B: Calciumfärbung mit Calcein (rot); C: Lipidfärbung mit DiD (blau); D: A, B, C übereinander gelegt. (Analyse von Michaela Hache vom Dresdner Grundwasserforschungszentrum e.V.)

4.8 Auswirkungen verschiedener Prozessbedingungen auf die mikrobielle Biozönose

4.8.1 Auswirkungen einer Übersäuerung auf die mikrobielle Biozönose

Zur Untersuchung der Veränderung der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft während einer Prozessstörung wurde eine genetische Fingerprintanalyse zur Erfassung der dominierenden Organismen anhand von 16S rRNA-Genfragmenten der Bacteria und der methanogenen Archaea für die drei Übersäuerungsversuche ÜberV 1 – 3 mittels DGGE durchgeführt. Außerdem wurde für einen detaillierteren Vergleich der mikrobiellen Biozönose im stabilen und im übersäuerten Prozess für ausgewählte Proben eine Metagenomanalyse durchgeführt.

Mittels qPCR wurde die bakterielle Abundanz durch Quantifizierung der bakteriellen 16S rDNA-Kopien für die Versuche ÜberV 1 - 3 verfolgt. Die Abundanz der Bacteria blieb trotz steigender Raumbelastung, mit $7,1 \times 10^9 - 3,8 \times 10^{10}$ Genkopien $\text{g}_{\text{Schlamm}}^{-1}$ über den Versuchszeitraum annähernd konstant (Abb. 34). Demnach war die Schwankungsbreite zwischen den Proben sehr gering, obwohl in Systemen, die zu Sedimentation neigen, eine identische Probenahme in Bezug auf die enthaltene Biomasse schwierig ist. Die relative Standardabweichung der qPCR-Triplikate war mit 2 – 22 % ebenfalls gering, die Methode lieferte demnach reproduzierbare Ergebnisse.

Offensichtlich bestand ein Gleichgewicht zwischen dem Eintrag, dem Wachstum und dem Austrag von Bacteria. Durch die Verwendung von Rindergülle und siliertem Mais als Substrate werden große Mengen Bacteria mit der Substratfracht in den Reaktor eingetragen, die trotz ihrer möglicherweise Inaktivität mit der qPCR mitquantifiziert werden (sofern deren DNA intakt bleibt). Vermutlich machen die 16S rDNA-Kopien dieser inaktiven Bacteria einen großen Anteil an der Gesamtzahl der bakteriellen 16S rDNA-Kopien aus. Das Gleichgewicht der Bacteria blieb auch bei steigender Raumbelastung aufrecht, da vermutlich langsamer wachsende Organismen teilweise bei hohen Raumbelastungen ausgewaschen wurden, während schneller wachsende und besser an hohe Raumbelastungen angepasste Organismen in Ihrer Abundanz zunahmen.

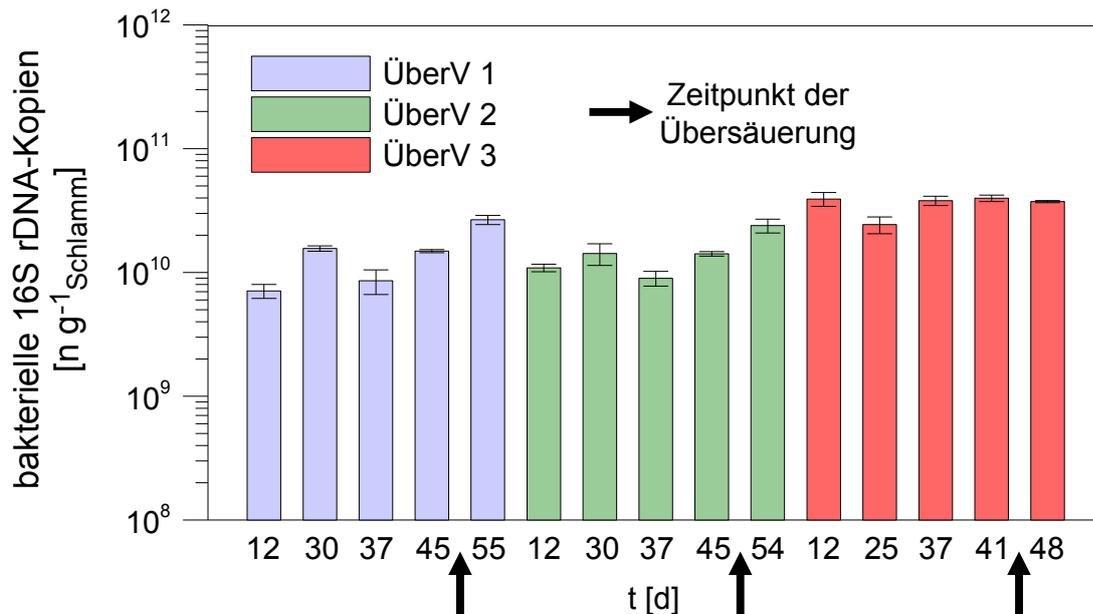


Abbildung 34: Quantifizierung der bakteriellen 16S rDNA-Kopien mittels qPCR in ÜberV 1 - 3 zur Bestimmung der bakteriellen Abundanz über die Zeit. Die bakterielle Abundanz blieb trotz steigender Raumbelastung annähernd konstant.

Untersuchung der mikrobiellen Biozönose mittels DGGE

Die Ergebnisse der genetischen Fingerprintings mittels DGGE ähnelten sich sehr, daher sind exemplarisch die Ergebnisse für ÜberV 2 dargestellt. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft änderte sich im Verlauf der Übersäuerung nur leicht (Abb. 35). Die zu den sequenzierten Banden phylogenetisch nächsten Verwandten sind in Tabelle 8 angegeben. Insgesamt war die Diversität der Archaea geringer als die der Bacteria. Dies wurde auch in früheren Studien beobachtet (Hori et al. 2006; Leclerc et al. 2001; Lerm et al. 2012). Für die Gemeinschaft der methanogenen Archaea wurden überwiegend Organismen der Ordnung Methanosarcinales detektiert, von denen einige dem acetoklastischen Organismus *Methanosaeta concilii* (Familie: Methanosaetaceae) zugeordnet wurden. Organismen der Gattung *Methanosaeta* findet man typischerweise in Biogasanlagen mit einer niedrigen Konzentration organischer Säuren und niedrigen Raumbelastungen, da sie aufgrund ihrer geringen Wachstumsrate bei höheren Raumbelastungen schnell ausgewaschen werden können (Conklin et al. 2006; Demirel und Scherer 2008; Goux et al. 2015; Jetten et al. 1992; Karakashev et al. 2006; Lerm et al. 2012; Munk et al. 2010).

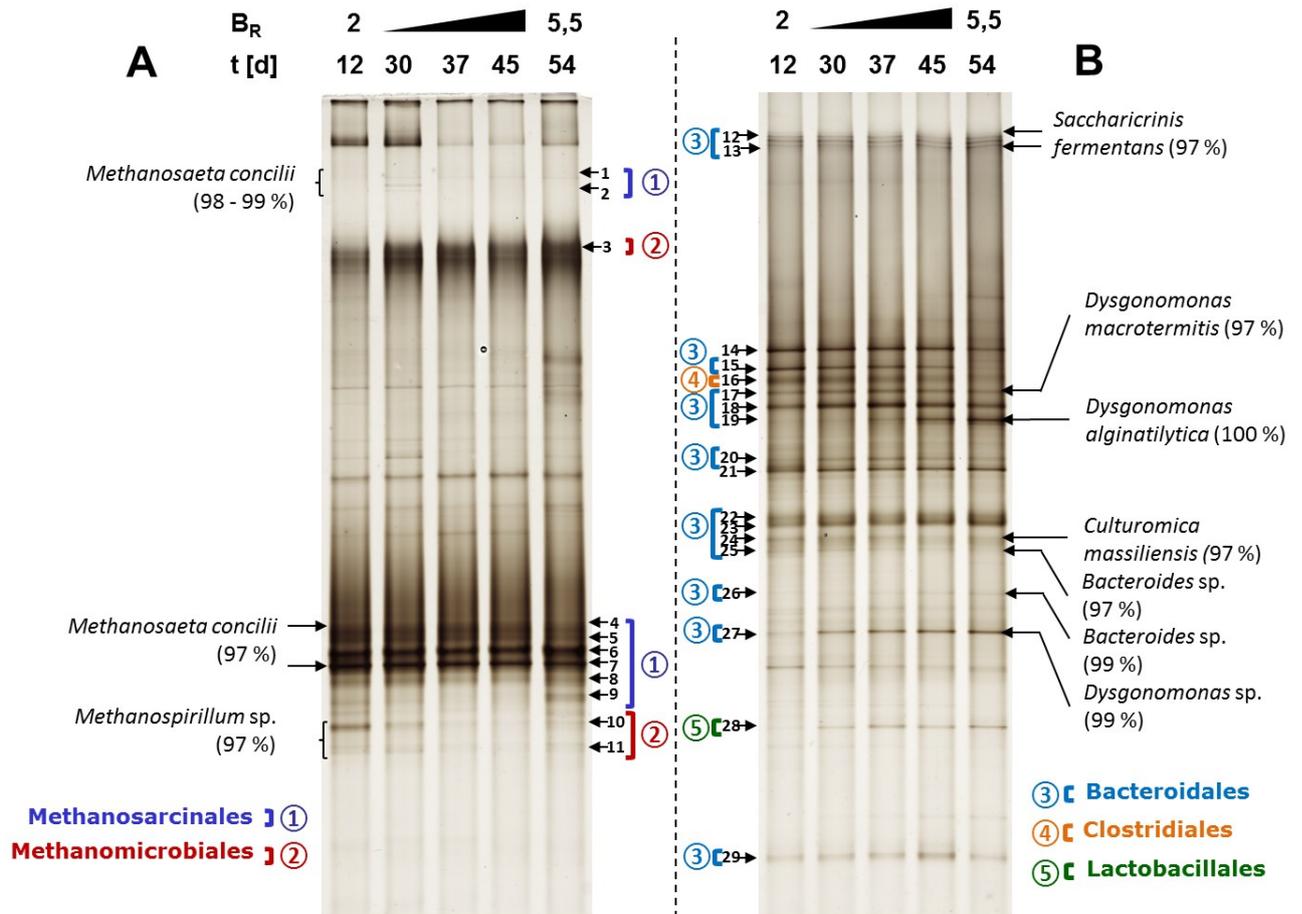


Abbildung 35: Genetisches Fingerprinting (DGGE) der mikrobiellen Lebensgemeinschaften der Archaea (A) und Bacteria (B) in ÜberV 2; Ziffern im Kreis: Phylogenetische Einordnung der Organismen auf Ordnungsebene; 1 – 29: sequenzierte Banden, für detaillierte phylogenetische Einordnung siehe Tab. 8; Raumbelastung B_R in $[\text{kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}]$

Bei höheren Raumbelastungen und den damit verbundenen höheren Säurekonzentrationen, nimmt in vielen Biogasanlagen die relative Abundanz hydrogenotropher Archaea oder von Organismen der säuretolanteren Gattung *Methanosarcina* zu. Zwar wurden in ÜberV 2 auch Organismen der Ordnung *Methanomicrobiales* gefunden, mit Vertretern der hydrogenotrophen Gattung *Methanospirillum*, deren relative Abundanz nahm jedoch trotz steigender Raumbelastung ab Tag 30 deutlich ab. Ein Grund dafür ist, dass die Akkumulierung hydrogenotropher Methanogener teilweise an das Vorhandensein syntropher, fettsäureoxidierender Bacteria geknüpft ist, die die in der Acido- und Acetogenese gebildeten kurzkettigen Fettsäuren für die hydrogenotrophen Archaea in Wasserstoff und Kohlendioxid spalten (Karakashev et al. 2006). Bei der Analyse der bakteriellen Biozönose mittels DGGE wurden jedoch keine Organismen detektiert, die mit

bekannten syntrophen Bacteria nahe verwandt sind. Somit war deren Abundanz vermutlich sehr gering. Offenbar wurde in den Übersäuerungsversuchen die Raumbelastung zu schnell angehoben und die Säurekonzentration stieg zu plötzlich an, sodass eine Aufrechterhaltung der Methanogenese durch Anpassung der Biozönose an die hydrogenotrophe Methanbildung nicht möglich war.

Stattdessen wurden mittels DGGE für die bakterielle Biozönose, wie auch in verschiedenen anderen Studien, vor allem Organismen der Phyla Bacteroidetes und Firmicutes detektiert (Lerm et al. 2012; Theuerl et al. 2015). Speziell dominierten Vertreter der Ordnung Bacteroidales (Phylum: Bacteroidetes) die bakterielle Gemeinschaft, innerhalb derer acidogene Organismen der Gattungen *Bacteroides*, *Dysgonomonas* und *Saccharicrinis*, sowie Organismen der Gattung *Culturomica* gefunden wurden. Für das Phylum Firmicutes wurden zwei Organismen mit je einem Vertreter der Ordnung Clostridiales und Lactobacillales (Milchsäurebakterien) detektiert. Die relative Abundanz acidogener Organismen der Ordnung Lactobacillales und der Gattung *Dysgonomonas* nahm mit steigender Raumbelastung und damit steigender Substratverfügbarkeit zu. Diese Zunahme der Acidogenen führte zu einem Ungleichgewicht zwischen Säureproduktion und Säureabbau, der vorwiegend über die acetoklastische Methanogenese erfolgte (s.o.). Die Akkumulation der Säuren führte zu einer Inhibierung der Methanogenen, wodurch die Übersäuerung hervorgerufen wurde.

Tabelle 8 : Phylogenetische Einordnung der im genetischen Fingerprinting (DGGE) von ÜberV 2 sequenzierten Banden

Bande	Nächster verwandter nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.	Nächster verwandter, kultivierter Organismus nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.	
methanogene Archaea	1	Unkultivierter Methanosarcinales-Klon	anaerober Gärprozess	99%	KF198714.1	<i>Methanosaeta concillii</i>	Biogasanlage	98%	JN243322.1
	2	Unkultivierter Methanosarcinales-Klon	anaerober Gärprozess	99%	KF198714.1	<i>Methanosaeta concillii</i>	Biogasanlage	99%	JN243322.1
	3	Unkultivierter Methanomicrobiales Klon	anaerober Gärprozess	94%	KF198788.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	anaerober Gärprozess	94%	AJ133792.1
	4	Unkultivierter Methanosarcinales Klon	Seesediment	98%	LN896578.1	<i>Methanosaeta concillii</i>	Industrielles Abwasser	97%	KX261417.1
	5	Unkultivierter Methanosarcinales Klon	anaerober Gärprozess	96%	KF198714.1	<i>Methanosaeta concillii</i>	Biogasanlage	95%	JN243322.1
	6	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Biogasschlamm	95%	KJ782182.1	--			
	7	Unkultivierter Methanosarcinales-Klon	anaerober Gärprozess	97%	KF198714.1	<i>Methanosaeta concillii</i>	Biogasanlage	97%	JN243322.1
	8	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Biogasschlamm	94%	JQ087736.1	--			
	9	Unkultiviertes Archaeon	Biogasschlamm	94%	AB996950.1	<i>Methanosaeta concillii</i>	Biogasanlage	94%	JN243322.1
	10	Unkultivierte <i>Methanospirillum</i> sp.	anaerober Gärprozess	99%	LT625963.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	anaerober Gärprozess	98%	AJ133792.1
	11	Unkultiviertes Archaeon	Biogasschlamm	98%	AB996970.1	<i>Methanospirillum hungatei</i>	Anaerobes Pellet	97%	KM408634.1
Bacteria	12	Unkultivierter Bacteroidetes-Klon	anaerober Gärprozess	100%	KT456605.1	<i>Saccharicrinis fermentans</i>	Biogasschlamm	97%	KT183422.1
	13	Unkultivierter Rikenellaceae-Klon	belasteter Boden	99%	KJ955676.1	<i>Saccharicrinis fermentans</i>	Biogasschlamm	97%	KT183422.2
	14	Unkultivierter Bacteroidetes-Klon	anaerober Gärprozess	99%	CU922970.1	Bacteroidetes-Bakterium	Reisfeldboden	91%	AB623231.1
	15	Unkultivierter Bacteroidales-Klon	Taihu-See	99%	KX367757.1	--			
	16	Unkultiviertes Bakterium	Hoatzinkropf	97%	EU344707.1	<i>Blautia stercoris</i>	Fäkalien	96%	NR_117867.1
	17	Unkultivierter Porphyromonadaceae-Klon	Fäkalien	98%	KP102088.1	<i>Dysgonomonas macrotermitis</i>	Termitenenddarm	97%	NR_134023.1
	18	Unkultivierter Bacteroidetes-Klon	anaerober Gärprozess	99%	LT625197.1	Bacteroidales-Bakterium	Anaerober Schlamm	89%	LC049960.1
	19	Unkultiviertes Bakterium	Boden	100%	LC207196.1	<i>Dysgonomonas alginatilytica</i>	Mikrobielles Konsortium	100%	NR_137388.1
	20	Unkultivierter Porphyromonadaceae-Klon	Fäkalien	97%	KP103653.1	<i>Dysgonomonas</i> sp.	Darm	96%	KR822477.1
	21	Unkultivierter Bacteroidetes-Klon	anaerober Gärprozess	99%	LT624762.1	--			
	22	Unkultiviertes Bakterium	Giraffenfäkalien	97%	EU775291.1	<i>Bacteroides</i> sp.	Fettkörper	95%	KR822442.1
	23	<i>Petrimonas mucosa</i>	Biogasschlamm	95%	LT608328.1	<i>Petrimonas mucosa</i>	Biogasschlamm	95%	LT608328.1
	24	Unkultiviertes Bakterium	Pansen	99%	GU303420.1	<i>Culturomica massiliensis</i>	Fäkalien	97%	NR_144745.1
	25	Unkultiviertes Bakterium	Biofilm	98%	KP377375.1	<i>Bacteroides</i> sp.	--	97%	KR822445.1
	26	Unkultiviertes Bakterium	Fäkalien	100%	GQ448785.1	<i>Bacteroides</i> sp.	Dickdarm	99%	LT631521.1
	27	Unkultiviertes Bakterium	Mausblinddarm	99%	EU458059.1	<i>Dysgonomonas</i> sp.	Enddarm	99%	KR822448.1
	28	<i>Streptococcus henryi</i>	Rindereuter	96%	KX880967.1	<i>Streptococcus henryi</i>	Rindereuter	96%	KX880967.1
	29	Unkultiviertes Bakterium	Biogasschlamm	100%	AB997767.1	<i>Prevotella dantasini</i>	Bauchraumflüssigkeit	94%	KP334248.1

Untersuchung der mikrobiellen Biozönose mittels Metagenomanalyse

Für einen detaillierteren Einblick in die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft und deren Änderung im Verlauf einer Übersäuerung wurde für ausgewählte Proben aus ÜberV 2 eine Metagenomanalyse durchgeführt. Dabei wurden für jede Probe zwischen 450 und 770 Tsd. DNA-Sequenzen erfolgreich phylogenetisch eingeordnet (Tab. 9). Eine Probe (Tag 47) wurde zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Methode doppelt sequenziert. Die Ergebnisse der doppelt bestimmten Probe waren annähernd identisch, dies weist auf eine gute Reproduzierbarkeit der Metagenomanalyse hin (Abb. 34 - 37).

Tabelle 9: Anzahl der bei der Metagenomanalyse für ausgewählte Proben aus ÜberV 2 phylogenetisch klassifizierten DNA-Fragmente und Anteile an der jeweiligen Domäne (Tag 47 a, b - Doppelbestimmung)

Prozesszustand ÜberV 2	stabiler Prozess				übersäuerter Prozess
	Tag 30	Tag 39	Tag 47 a	Tag 47 b	Tag 54
klassifizierte DNA-Fragmente	636.536	633.116	471.352	448.404	769.036
Anteil an Domäne:					
Archaea	37,4%	25,7%	14,7%	14,9%	15,7%
Bacteria	57,7%	69%	78,5%	77,7%	79,3%
Eukaryota	1,6%	2%	2,7%	1,4%	1,7%

Zu Beginn des Versuchs an Tag 30 machten die Archaea (> 99,9 % Euryarchaeota) mit ca. 37 % über ein Drittel der Organismen der mikrobiellen Lebensgemeinschaft aus (Tab. 9, Abb. 36). Mit steigender Raumbelastung und im Zuge der Übersäuerung sank die relative Abundanz der Archaea deutlich auf ca. 15 % ab. Dabei ist vermutlich neben der relativen Abundanz auch die absolute Abundanz der Archaea deutlich zurückgegangen, denn die Abundanz der Bacteria blieb während des gesamten Versuches annähernd konstant (Abb. 34).

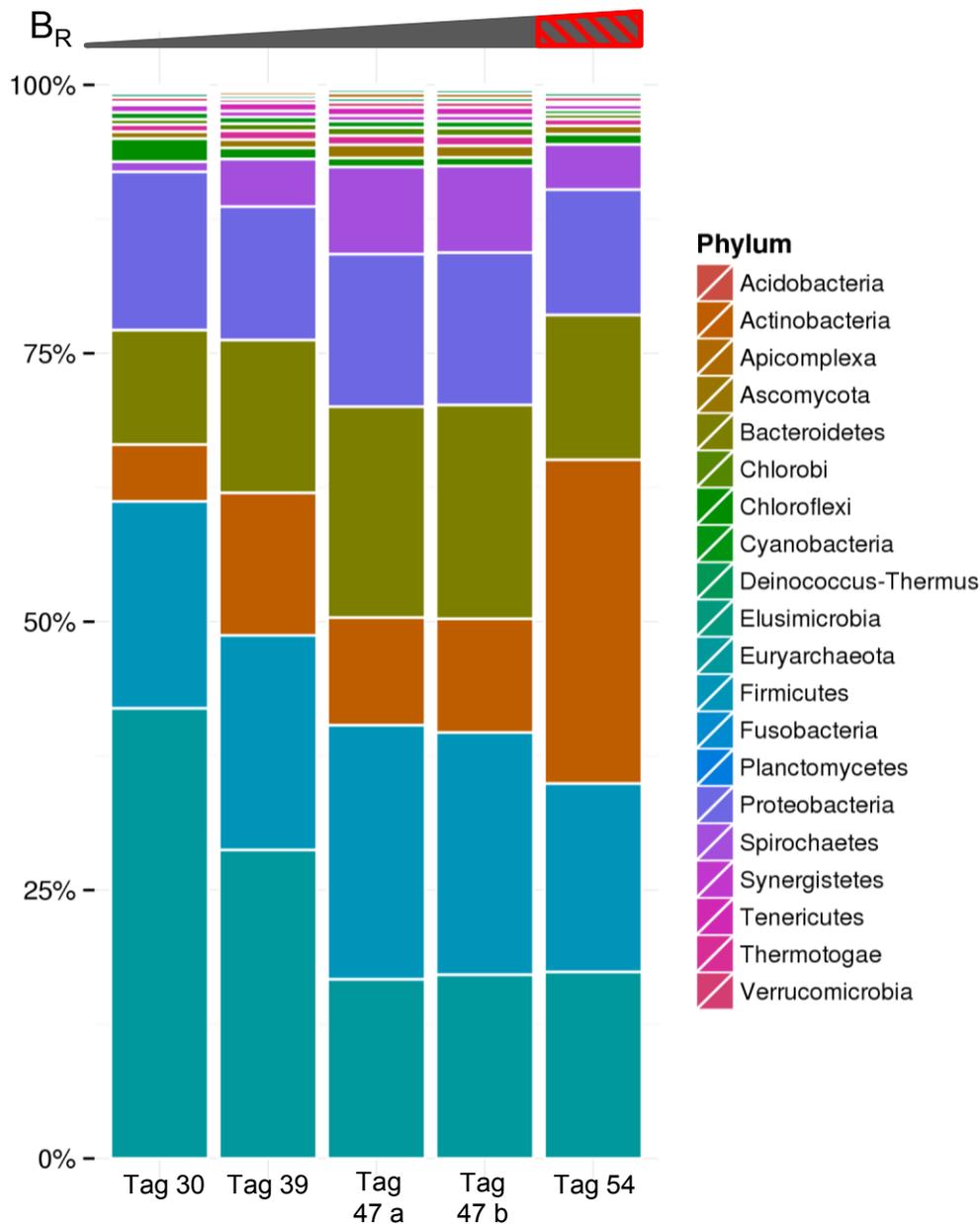


Abbildung 36: Analyse der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften bei steigender Raumbelastung in ÜberV 2 im stabilen (Tag 30 - 47) und übersäuerten Zustand (Tag 54) mittels Metagenomanalyse auf Phylumebene. B_R – Raumbelastung; Tag 47 a, b - Doppelbestimmung (Analyse durchgeführt durch GATC Biotech AG)

Ähnlich zum genetischen Fingerprinting wurde mit einem Anteil von 84 – 88 % an der Lebensgemeinschaft der Archaea eine deutliche Dominanz von Verwandten der Spezies *Methanosaeta concilii* ausgemacht (Abb. 37). Wie bereits diskutiert (s. o.) weist die Gattung *Methanosaeta* eine geringere Säuretoleranz als beispielsweise Organismen der Gattung *Methanosarcina* auf, sodass das ohnehin langsame Wachstum dieses Organismus bei hohen Säurekonzentrationen zusätzlich inhibiert wurde. Dieser Umstand führte zu einer Auswaschung und damit zur Abnahme der

archaellen Abundanz bei hohen Raumbelastungen. Zwar nahm die relative Abundanz säuretoleranterer Organismen der Gattung *Methanosarcina* oder der mit hohen Raumbelastungen assoziierten hydrogenotrophen Gattung *Methanoculleus* leicht von 1 auf 2 % bzw. 4 auf 8 % vom stabilen zum übersäuerten Zustand zu, die Übersäuerung setzte aber zu schnell ein, sodass sich die methanogene Biozönose nicht vollständig an die höheren Säurekonzentrationen anpassen konnte.

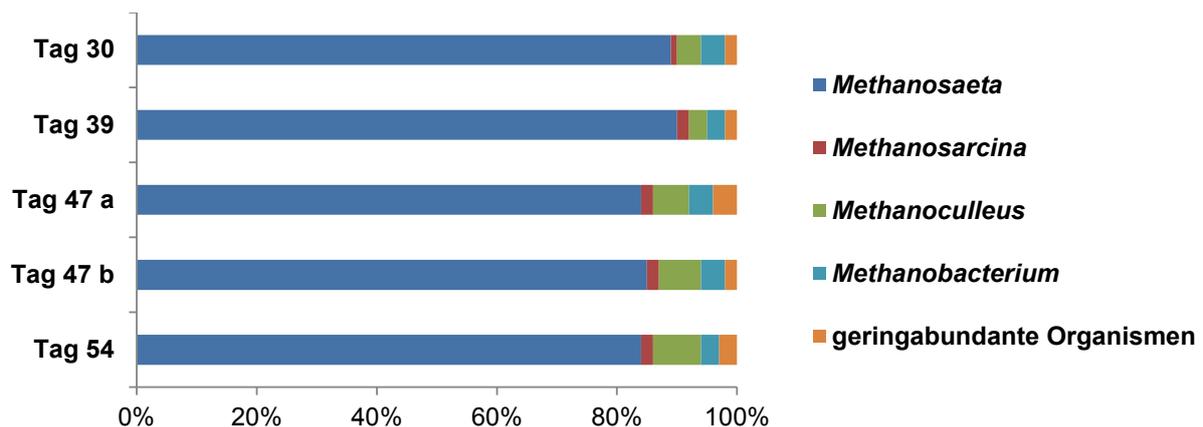


Abbildung 37: Analyse der Zusammensetzung der archaellen Lebensgemeinschaften bei steigender Raumbelastung in ÜberV 2 im stabilen (Tag 30 - 47) und übersäuerten Zustand (Tag 54) mittels Metagenomanalyse auf Gattungsebene. Die Lebensgemeinschaften wurden von Organismen der Gattung *Methanosaeta* dominiert. Tag 47 a, b - Doppelbestimmung (Analyse durchgeführt durch GATC Biotech AG)

Die bakterielle Biozönose wurde vor der Übersäuerung von Organismen der Phyla Bacteroidetes, Firmicutes und Proteobacteria dominiert. Zusammen machten sie drei Viertel der Bacteria aus. Auch Lerm et al. (2012) und Theuerl et al. (2015) wiesen eine Dominanz der Phyla Bacteroidetes und Firmicutes im stabilen Zustand nach. Daneben wurden, ebenfalls mit hohen relativen Abundanzen, Vertreter der Phyla Actinobacteria (10 %), Chloroflexi (4 %), und Spirochaetes (2 %) detektiert (Abb. 38, 39).

Mit steigender Raumbelastung bis zur Übersäuerung zeigte sich ein Anstieg der relativen Abundanz von Bacteria der Gattungen *Bifidobacterium*, *Bacteroides* und *Sphaerochaeta* (Abb. 38, 39). Vertreter dieser Gattungen sind als hydrolytisch/acidogene Bacteria bekannt (MacFarlane und Gibson 1991; Ritalahti et al. 2012; Wirth et al. 2012). Vor allem ein Organismus der Gattung *Bifidobacterium* nahm stark zu und dominierte die Bacteria im übersäuerten Biogasprozess. Sein Anteil an der bakteriellen Lebensgemeinschaft hatte sich von 3 auf 37 % im Zuge der Übersäuerung erhöht. Bifidobakterien sind potentielle Milchsäureproduzenten und

einer der Hauptvertreter in Rinderfäkalien (Delcenserie et al. 2011). Der detektierte Organismus gelangte daher mit großer Wahrscheinlichkeit über die verwendete Rindergülle in den Biogasreaktor. Vermutlich verbesserten sich für diesen Organismus die Lebensbedingungen mit steigender Substrat- und Säurekonzentrationen, sodass es zu einem starken Wachstum kam.

Insgesamt ist die starke Zunahme von Säureproduzenten vermutlich durch die hohen Raumbelastungen und die damit verbundene höhere Substratverfügbarkeit zu erklären. Durch die Zunahme der Säureproduzenten kam zu einem Ungleichgewicht zwischen Säureproduktion und Säureabbau. Als potentielle bakterielle Säurekonsumenten wurden mit sehr geringen relativen Abundanzten lediglich die syntroph fettsäureoxidierenden Gattungen *Syntrophomonas* und *Syntrophus* mit 0,8 – 3 % bzw. 2 - 3 % (Abb. 37) und ein Verwandter des syntroph acetatoxidierenden Bakteriums *Tepidanaerobacter acetatoxydans* mit 0,04 - 0,2 % detektiert (Daten nicht gezeigt) (McInerney et al. 1981; Müller et al. 2013; Westerholm et al. 2016). In dem untersuchten System waren die methanogenen Archaea demnach die wichtigsten Acetatkonsumenten.

Infolge des Ungleichgewichts zwischen Produktion und Verbrauch akkumulierten organische Säuren. Diese inhibierten die meisten Methanogenen, da die Mehrheit der Archaea der wenig säuretoleranten Gattung *Methanosaeta* angehörte (s. o.). Diese Gattung weist zudem eine niedrige Wachstumsrate auf, sodass sie bei hohen Raumbelastungen und damit verbundenen geringen Verweilzeiten aus dem System ausgewaschen wurde. Die gesteigerte Säureproduktion und der gehemmte Säureabbau führten schließlich zur Übersäuerung des Biogasprozesses.

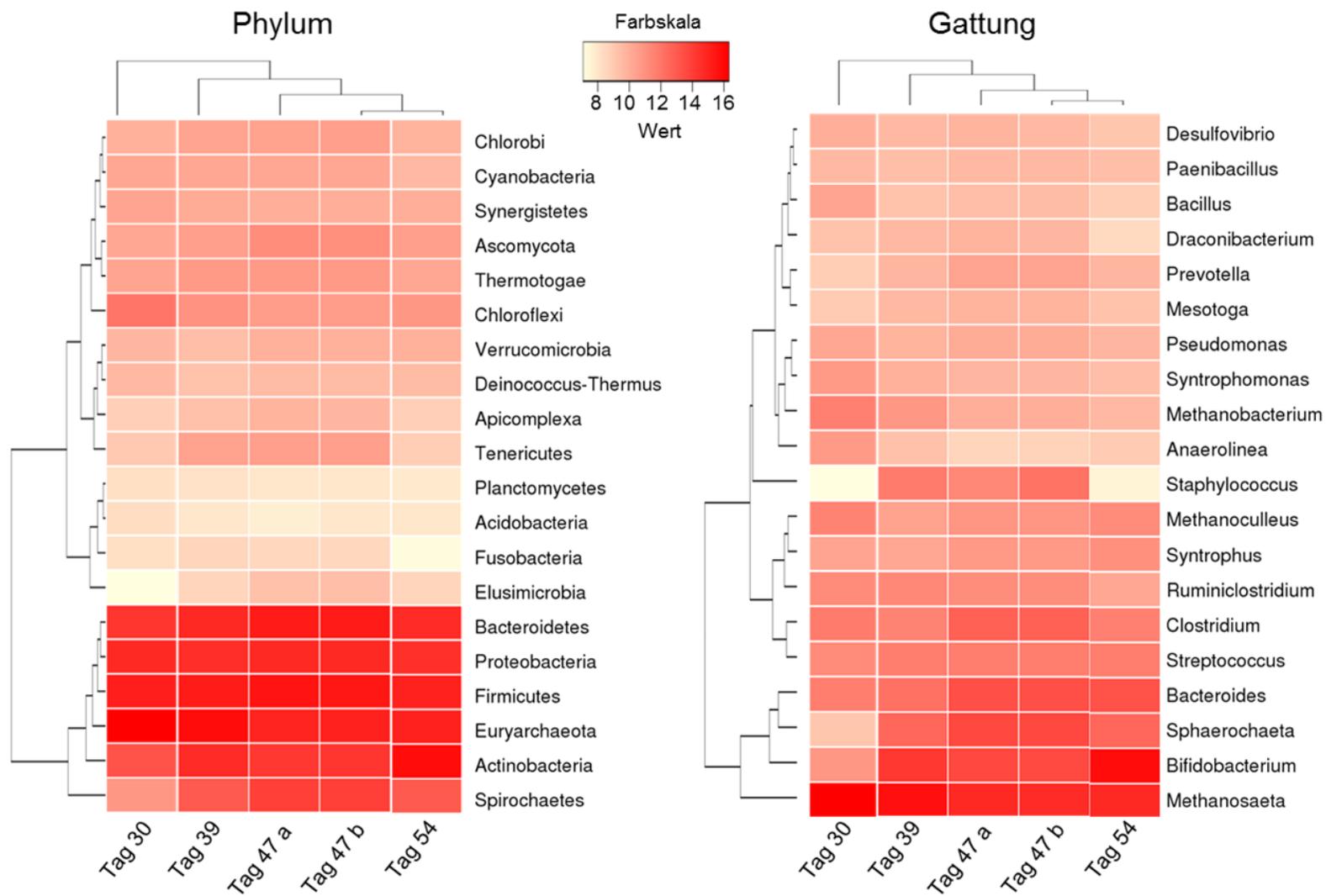


Abbildung 38: Heatmaps zur Veranschaulichung der Unterschiede und Änderungen der relativen Abundanzen für die 20 abundantesten Phyla (links) und Gattungen (rechts), innerhalb und zwischen den untersuchten Proben; dargestellt ist der \log_2 der absoluten Readzahlen zur besseren Veranschaulichung. Tag 47 a, b - Doppelbestimmung (Analyse durchgeführt durch GATC Biotech AG)

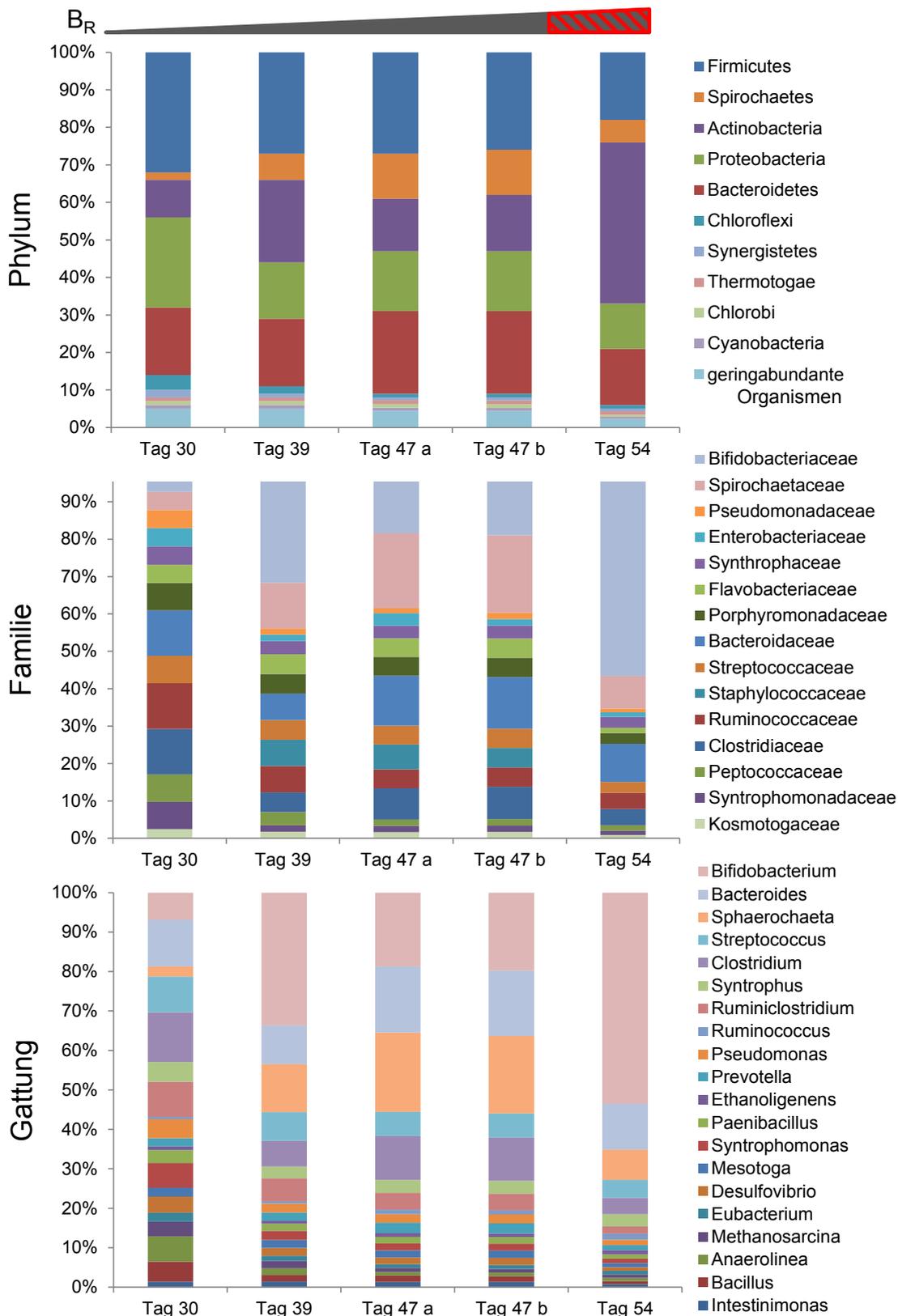


Abbildung 39: Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaften auf Phylum-, Familien- und Gattungsebene mit steigender Raumbelastung bis zur Übersäuerung in ÜberV 2 mittels Metagenomanalyse; B_R – Raumbelastung; Im übersäuerten Prozess dominieren verwandte Organismen der Gattung *Bifidobacterium* die bakterielle Gemeinschaft. Tag 47 a, b - Doppelbestimmung (Analyse durchgeführt durch GATC Biotech AG)

4.8.2 Auswirkungen eines Hochlastbetriebes auf die mikrobielle Biozönose

Zur Charakterisierung der dominierenden Vertreter der mikrobiellen Lebensgemeinschaften der methanogenen Archaea und Bacteria sowie zur Analyse des Einflusses eines Hochlastbetriebes und der Zugabe von Additiven auf ihre Zusammensetzung wurden genetische Fingerprintanalysen mittels DGGE für die Versuche HochV 1 – 3 durchgeführt.

Abbildung 40 zeigt die genetische Fingerprintanalyse für die methanogenen Archaea. Die zu den sequenzierten Banden phylogenetisch nächsten Verwandten sind in Tabelle 10 angegeben. Die Lebensgemeinschaft der Methanogenen wurde in allen Versuchen vor allem von Vertretern der hydrogenotrophen Gattung *Methanoculleus* dominiert. Bei steigender Raumbelastung nahm zwischen Tag 73 und 90 die Zahl der *Methanoculleus*-zugehörigen Banden von einer auf bis zu fünf deutlich zu. Nur zum Versuchsstart an Tag 3 konnte mit einer sehr niedrigen relativen Abundanz je ein Verwandter der Spezies *Methanobacterium formicium* und der Gattung *Methanospirillum* detektiert werden. In HochV 3 zeigte sich zum Versuchsende ein Vertreter der Gattung *Methanocorpusculum*.

Ab Tag 73 nahm im Zuge der Hochlastfahrweise und einer damit verbundenen steigenden Säurekonzentration, die zuvor noch, durch eine starke Bandenintensität ersichtliche, hohe relative Abundanz von Vertretern der Gattung *Methanosaeta* deutlich ab. Ab Tag 90 wurden sie mit dem genetischen Fingerprinting nicht mehr detektiert, weil sie vermutlich aufgrund der hohen Säurekonzentrationen von ca. 4 g L^{-1} inhibiert und darauf zu einem großen Teil ausgewaschen wurden. Ebenfalls ab Tag 90 wurden im Gegenzug verschiedene Vertreter der Gattung *Methanosarcina* detektiert. Organismen dieser Gattung sind mixotroph. Sie können sowohl acetoklastisch als auch hydrogenotroph Methan bilden. Vertreter der Gattung *Methanosarcina* haben zwar eine geringere Substrataffinität, sind aber deutlich flexibler in ihrer Substratauswahl. Bei hohen Säurekonzentrationen besitzen sie einen Selektionsvorteil gegenüber der Gattung *Methanosaeta*, da sie deutlich säuretoleranter sind (Conklin et al. 2006, De Vrieze et al. 2012; McMahon et al. 2001; Schmidt und Ahring 1999).

In der Literatur werden Änderungen der methanogenen Lebensgemeinschaft, wie sie in den Versuchen HochV 1 – 3 beobachtet wurden, als Warnzeichen vor einer

drohenden Prozessstörung bewertet. Nach Goux et al. (2015) kann die plötzliche Zunahme der Abundanz von Organismen der Gattung *Methanoculleus* ein Hinweis auf eine drohende Prozessstörung sein, vor allem wenn sie in Kombination mit einer deutlichen Abnahme der Abundanz von Vertretern der Gattung *Methanosaeta* auftritt. Auch Carballa et al. (2015) sieht die Abnahme von Organismen der Gattung *Methanosaeta* als ein Warnsignal. Nach Kampmann et al. (2014) kann die plötzliche Zunahme der Abundanz von Vertretern der Gattung *Methanosarcina* als Warnung vor einer drohenden Prozessstörung angesehen werden. Obwohl die beschriebenen Änderungen der methanogenen Lebensgemeinschaften in HochV 1 - 3 entsprechend dieser Quellen Anzeichen einer drohenden Prozessstörung anzeigten, blieben die Prozesse stabil und die Methanausbeuten hoch (Abb. 16, 17, 18). Dies ist jedoch kein Widerspruch, denn verschiedene vorangegangene Studien haben auch gezeigt, dass ein hoher Anteil von *Methanosarcina* an der methanogenen Gemeinschaft zu einer erhöhten Prozessstabilität bei hohen Raumbelastungen beiträgt (Kleyböcker et al. 2014; Lerm et al. 2012). Somit hat die Zunahme von Organismen der Gattung *Methanosarcina* mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in HochV 1 - 3 zu einer hohen Prozessstabilität beigetragen.

Insgesamt zeigten sich für die methanogenen Lebensgemeinschaften der drei Versuche sehr ähnliche Veränderungen der relativen Abundanzen einzelner Organismen über die Zeit (Abb. 40, Tab. 10). Demnach war in HochV 1 – 3 die Zusammensetzung der methanogenen Gemeinschaft in erster Linie von der Raumbelastung abhängig. Der Einfluss der Art des eingesetzten Additivs war im Gegenzug eher von geringerer Bedeutung für die Zusammensetzung der Biozönose.

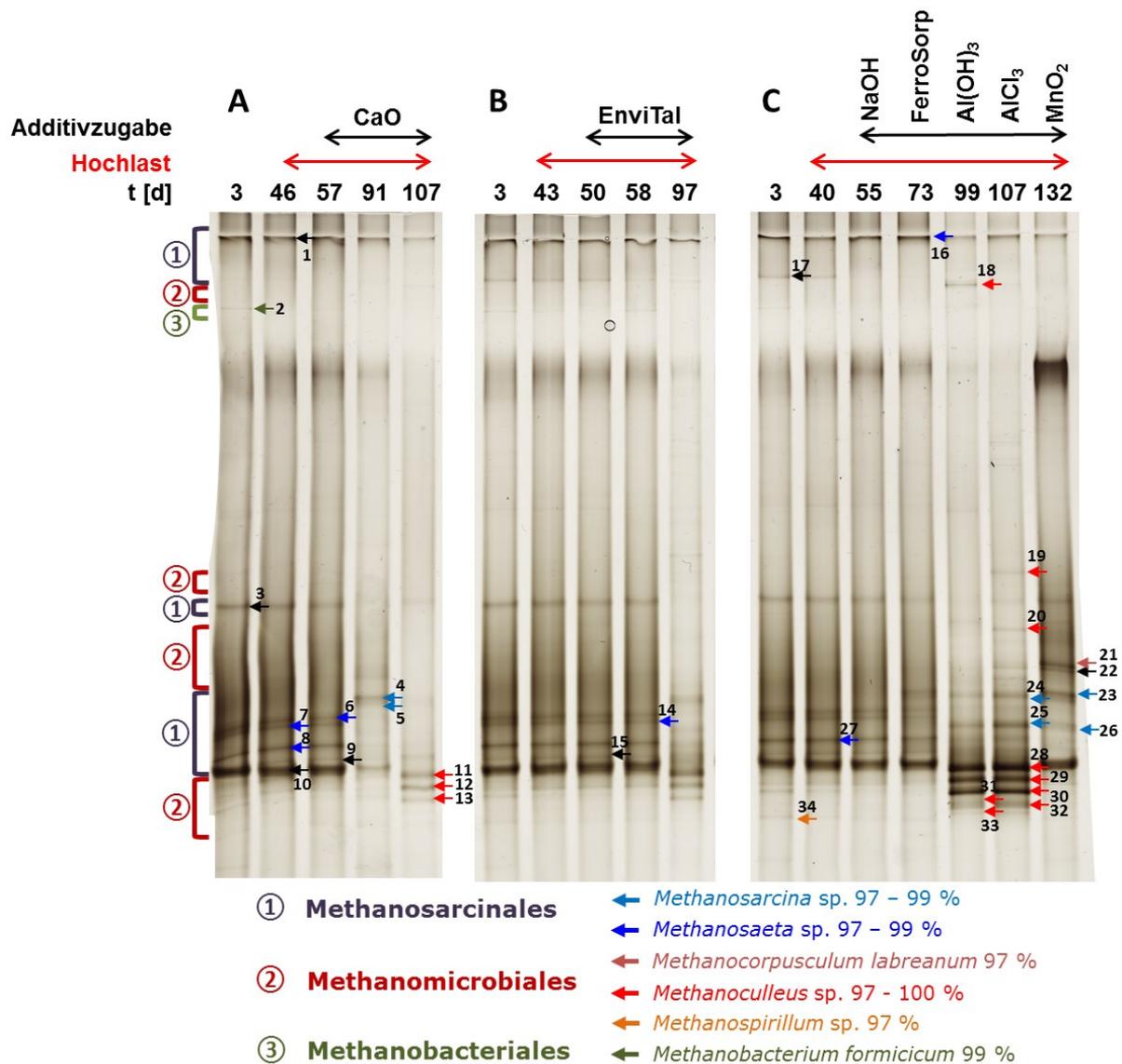


Abbildung 40: Genetisches Fingerprinting (DGGE) der mikrobiellen Lebensgemeinschaft der methanogenen Archaea in HochV 1 (B), HochV 2 (A) u. HochV 3 (C); Ziffern im Kreis: Phylogenetische Einordnung der Organismen auf Ordnungsebene; Farbige Pfeile: Einordnung auf Gattungsebene mit nächstem verwandten Organismus; 1 – 34: sequenzierte Banden, für detaillierte phylogenetische Einordnung siehe Tab. 10

Tabelle 10: Phylogenetische Einordnung der im genetischen Fingerprinting (DGGE) der methanogenen Archaea in HochV 1 - 3 sequenzierten Banden

Bande	Nächster verwandter nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.	Nächster verwandter, kultivierter Organismus nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.
1	Unkultiviertes Archaeon	Biogasanlage	97%	KU168220.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Biogasanlage	93%	JN243322.1
2	Unkultivierte <i>Methanobacterium</i> sp.	Anaerober Gärprozess	99%	LT844441.1	<i>Methanobacterium formicicum</i>	Biogasanlage	99%	JN205061.1
3	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Ölquelle	93%	KJ463616.1	<i>Methanosarcina</i> sp.	Moor	93%	L48408.1
4	Unkultivierte <i>Methanosarcina</i> sp.	Anaerober Gärprozess	99%	LT624826.1	<i>Methanosarcina barkeri</i>	--	97%	CP009526.1
5	Unkultiviertes methanogenes Archaeon	städtische Abfälle	98%	GQ453664.1	<i>Methanosarcina spelaei</i>	Seesediment	97%	NR_148337.1
6	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Orn-See	99%	KX463262.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Biogasanlage	98%	JN243322.2
7	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Orn-See	99%	KX463262.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Biogasanlage	98%	JN243322.2
8	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Orn-See	97%	KX463262.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Biogasanlage	97%	JN243322.2
9	Unkultiviertes Archaeon	Biogasschlamm	97%	AB996913.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Biogasanlage	96%	JN243322.2
10	Unkultiviertes Archaeon	Biogasschlamm	94%	AB997093.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Biogasanlage	93%	JN243322.2
11	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	--	99%	LT549891.1	<i>Methanoculleus bourgensis</i>	--	99%	LT549891.1
12	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	99%	KP702949.1	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	99%	KP702949.1
	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	99%	DQ649317.1	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	99%	DQ649317.1
13	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	99%	KP702949.1	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	99%	KP702949.1
	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	99%	DQ649317.1	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	99%	DQ649317.1
14	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Orn-See	97%	KX463262.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	industrielles Abwasser	96%	KX261417.1
15	Unkultiviertes Archaeon	Biogasschlamm	94%	AB996832.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Biogasanlage	94%	JN243322.1
16	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Orn-See	100%	KX463083.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Biogasanlage	99%	JN243322.1
17	Unkultiviertes Methanosarcinales-Klon	Anaerober Gärprozess	95%	KF198643.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Biogasanlage	94%	JN243322.1
18	Unkultivierte <i>Methanoculleus</i> sp.	Anaerober Gärprozess	98%	KJ561301.1	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	Ölquelle	97%	NR_043961.1
19	Unkultiviertes Bakterium	Kläranlage	100%	CT573802.1	<i>Methanoculleus</i> sp.	Meeressediment	99%	LC183833.1
20	Unkultivierte <i>Methanoculleus</i> sp.	Anaerober Gärprozess	98%	LT844501.1	<i>Methanoculleus</i> sp.	Meeressediment	98%	LC183833.1

Bande	Nächster verwandter nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.	Nächster verwandter, kultivierter Organismus nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.
21	Unkultiviertes Archaeon	Anaerober Gärprozess	98%	KM999368.1	<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	Anaerober Gärprozess	97%	LC014949.1
22	Unkultivierte <i>Methanoculleus</i> sp.	Indien, Festlandssockel	96%	JN030764.1	<i>Methanoculleus</i> sp.	Pansen	96%	EU544029.1
23	Unkultivierte <i>Methanosarcina</i> sp.	Reisfeld	100%	KY851230.1	<i>Methanosarcina spelaei</i>	Seesediment	99%	NR_148337.1
24	Unkultivierte <i>Methanosarcina</i> sp.	Anaerober Gärprozess	100%	LT624826.1	<i>Methanosarcina barkeri</i>	--	98%	CP009526.1
25	Unkultivierte <i>Methanosarcina</i> sp.	Reisfeld	99%	KY851230.1	<i>Methanosarcina spelaei</i>	Seesediment	98%	NR_148337.1
26	Unkultivierte <i>Methanosarcina</i> sp.	Bioreaktor	99%	KY172649.1	<i>Methanosarcina mazei</i>	Biogasanlage	99%	KX826992.1
27	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Orn-See	98%	KX463262.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	industrielles Abwasser	97%	KX261417.1
28	Unkultivierte <i>Methanoculleus</i> sp.	Biogasanlage	99%	GQ501012.1	<i>Methanoculleus receptaculi</i>	Ölquelle	97%	NR_043961.1
29	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	100%	KP702949.1	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	100%	KP702949.1
30	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	100%	DQ649317.1	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	100%	DQ649317.1
31	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	99%	KP702949.1	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	99%	KP702949.1
	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	99%	DQ649317.1	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	99%	DQ649317.1
32	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	99%	KP702949.1	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	99%	KP702949.1
	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	99%	DQ649317.1	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	99%	DQ649317.1
33	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	97%	KP702949.1	<i>Methanoculleus chikugoensis</i>	Danshui-Fluss	97%	KP702949.1
	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	97%	DQ649317.1	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	97%	DQ649317.1
34	Unkultiviertes Methanomicrobiales-Klon	Anaerober Gärprozess	98%	CU916412.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	--	97%	AJ133792.1

Für die bakterielle Lebensgemeinschaft zeigte sich in den Versuchen HochV 1 - 3 eine Dominanz von Vertreter des Phylums Bacteroidetes. Nur drei Banden im Fingerprint konnten dem Phylum Firmicutes zugeordnet werden (Abb. 41, Tab. 11). Beide Phyla werden typischerweise als dominierende bakterielle Taxa in Biogasanlagen detektiert (Goux et al. 2015; Hanreich et al. 2013; Theuerl et al. 2015). Die relativen Abundanzen verschiedener unkultivierter Bacteroidetes-Vertreter (Banden 14, 16, 37,38, 49, 51, 53, 59, 60), sowie Vertreter der als Acidogene bekannten Gattungen *Dysgonomonas* (1) und *Proteiniphilum* (15, 50) blieben über den Versuchszeitraum annähernd konstant. Im Vergleich dazu nahm die relative Abundanz anderer Vertreter der Bacteroidetes (5, 10, 11, 41, 47) sowie von Vertretern der als Acidogene bekannten Gattung *Solitalea* (7) und Organismen mit *Alkalitalea saponilacus* (43) und *Dysgonomonas macrotermis* (46) als nächste Verwandte bis Tag 58 deutlich ab. Vermutlich waren sie, z.B. durch längere Verdopplungszeiten, weniger an die Prozessbedingungen bei hohen Raumbelastungen angepasst und wurden ausgewaschen oder ihr Wachstum wurde durch höhere Säurekonzentrationen inhibiert. Bis Tag 100 zeigte sich eine zunehmende relative Abundanz von Vertretern der Familie Rikenellaceae, innerhalb derer ebenfalls viele Acidogene bekannt sind (24, 70).

Insgesamt zeigte sich auch für die bakterielle Lebensgemeinschaft eine sehr ähnliche Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung über die Zeit für die Versuche HochV 1 - 3, trotz unterschiedlicher Additive. Folglich beeinflusste die Art des Additivs die Zusammensetzung der dominierenden Vertreter der mikrobiellen Lebensgemeinschaft nur in geringem Maße. Stattdessen haben hohe Raumbelastungen die Diversität der bakteriellen Lebensgemeinschaft herabgesetzt. Während zum Versuchsstart noch jeweils 37 - 38 DNA-Banden detektiert wurden, waren es ab Tag 91 nur noch je 13 - 25 Banden. Munk et al. (2010) machten eine ähnliche Beobachtung für methanogene Lebensgemeinschaften.

Die Zunahme hydrogenotropher und Abnahme acetoklastischer Archaea bei hohen Raumbelastungen (s. o.) lassen eine erhöhte Aktivität syntropher Lebensgemeinschaften in den Versuchen vermuten. Es wurden verschiedene potentiell syntrophe Mikroorganismen detektiert, die vor allem Propionat, aber auch Acetat und längerkettige Fettsäuren unter Bildung von Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid oxidieren, den Substraten der hydrogenotrophen Archaea

(McInerney et al. 2009; Westerholm et al. 2016). Speziell wurden Organismen des Phylums Cloacimonetes detektiert, mit Candidatus *Cloacamonas acidaminovorans* als nächsten Verwandten, einem potentiell syntrophen Organismus (Pelletier et al. 2008). Zusätzlich wurde ein Organismus der syntrophen Gattung *Syntrophorhabdus* und ein weiterer Organismus der Klasse Delta-Proteobacteria detektiert, innerhalb derer viele syntrophe Bacteria bekannt sind (McInerney et al. 2009; Qiu et al. 2008; Schieder et al. 2010). Außerdem wurde ein Organismus der Familie Spirochaetaceae (35, 58) (Phylum: Spirochaetes) zugeordnet, innerhalb derer potentielle syntrophe Acetat-Oxidierer vorkommen (Lee et al. 2015).

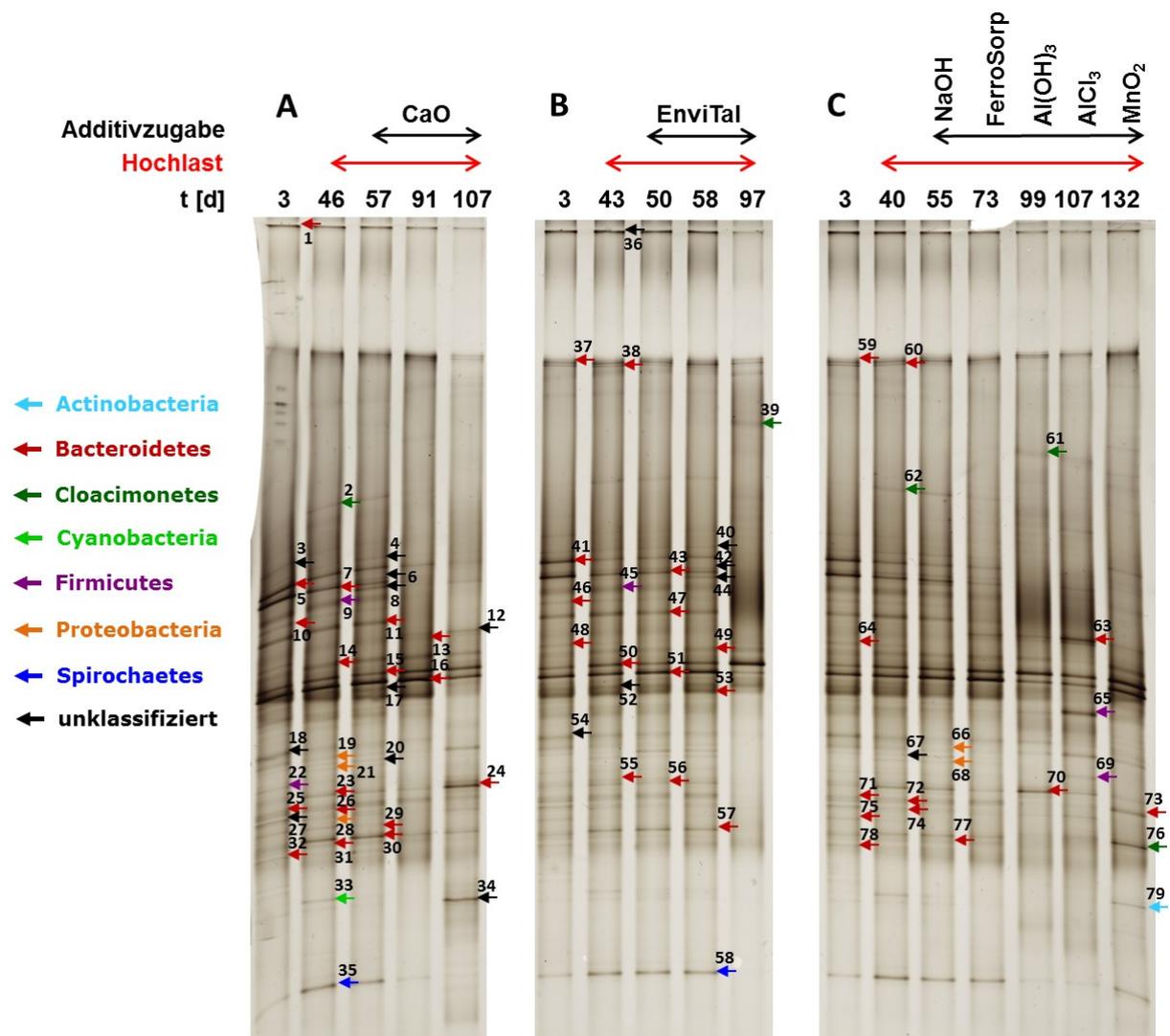


Abbildung 41: Genetisches Fingerprinting (DGGE) der mikrobiellen Lebensgemeinschaft der Bacteria in HochV 1 (B), HochV 2 (A) u. HochV 3 (C); Farbige Pfeile: phylogenetische Einordnung der Organismen auf Phylumebene; 1 – 79: sequenzierte Banden, für detaillierte phylogenetische Einordnung siehe Tab. 11

Tabelle 11: Phylogenetische Einordnung der im genetischen Fingerprinting (DGGE) der Bacteria in HochV 1 - 3 sequenzierten Banden

Bande	Nächster verwandter nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.	Nächster verwandter, kultivierter Organismus nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.
1	Unkultiviertes Bakterium	Tümmlermaul	99%	JQ214991.1	<i>Dysgonomonas</i> sp.	Schlamm	98%	KJ888430.1
2	Unkultiviertes Spirochaetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	99%	LT625683.1	Candidatus <i>Cloacamonas acidaminovorans</i>	anaerober Gärprozess	95%	CU466930.1
3	Unkultiviertes Bakterium	Boden	95%	FJ770046.1	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	--	94%	KT818699.1
4	Unkultivierter Prokaryont	anaerober Gärprozess	97%	KT064256.1	Cloacimonetes-Bakterium	Bioreaktor	90%	KJ535434.1
5	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	Biogasschlamm	99%	AB780945.1	Bacteroidetes-Bakterium	Reisfeldboden	92%	AB623231.1
6	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Gärprozess	94%	KF147567.1	<i>Mobiluncus mulieris</i>	--	92%	X53187.1
7	Unkultivierter Solitalea-Klon	Boden	99%	KR855301.1	<i>Solitalea canadensis</i>	Boden	94%	NR_074099.1
8	Unkultiviertes Bakterium	marines Sediment	97%	EU702978.1	Deferribacteres-Bakterium	Golf von Maine	95%	JF488404.1
9	Unkultiviertes Bakterium	Mäusefäkalien	97%	MF272465.1	<i>Sedimentibacter</i> sp.	PCB-dechlorierende Kultur	94%	EF059533.1
10	Unkultivierter Prokaryont	anaerober Gärprozess	93%	KT058638.1	<i>Petrimonas mucosa</i>	Biogasschlamm	89%	LT608328.1
11	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	99%	LT625197.1	Cytophagaceae-Bakterium	Schwammgewebe	93%	KF282390.1
12	Unkultiviertes Bakterium	Biogasschlamm	97%	AB997419.1	<i>Bacteroides</i> sp.	Hühnerblinddarm	81%	AB714406.1
13	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	97%	LT624762.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	92%	AB596885.1
14	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	98%	JN998182.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	93%	AB596885.1
15	Unkultiviertes Bakterium	Ölreservoir	98%	KC796748.1	<i>Proteiniphilum</i> sp.	anaerober Gärprozess	97%	KP178480.1
16	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	97%	LT624762.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	94%	AB596885.1
17	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	94%	LT842811.1	<i>Porphyromonas</i> sp.	--	89%	KT263531.1
18	Unkultiviertes Clostridiales-Bakterium	Bioreaktor	95%	LT859668.1	Bacteroidetes-Bakterium	Darm von <i>C. formosanus</i>	94%	AY571962.1
19	Unkultivierter Syntrophorhabdus-Klon	anaerober Gärprozess	99%	LT843408.1	<i>Syntrophorhabdus</i> sp.	Endosymbiont in Amöbe	98%	KX156802.1
20	Unkultiviertes Bacteroides-Klon	Fäkalien	92%	KU046508.1	<i>Bacteroides</i> sp.	Dickdarm	89%	LT631521.1
21	Unkultiviertes Deltaproteobakterium	hypersalines Sediment	98%	EU394695.1	Delta-Proteobakterium	Ozean	97%	HQ675291.1
22	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Gärprozess	98%	KF147563.1	<i>Clostridium</i> sp.	Sediment	96%	AB031327.1
23	Unkultiviertes Bakterium	Mäusefäkalien	98%	MF300316.1	Bacteroidetes-Bakterium	Mundhöhle	98%	GU432206.1
24	Unkultiviertes Rikenellaceae-Bakterium	anaerober Gärprozess	100%	LT624989.1	Bacteroidia-Bakterium	Mundhöhle	88%	JN713207.1
25	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	88%	KF462370.1	<i>Dysgonomonas</i> sp.	anaerober Schlamm	85%	KF176996.1
26	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	95%	LT624762.1	<i>Pedobacter</i> sp.	antarktischer Boden	95%	KY476617.1
27	Unkultiviertes Bacteroidales-Bakterium	Bioreaktor	98%	LT859453.1	<i>Dysgonomonas alginatilytica</i>	mikrobielles Konsortium	98%	NR_137388.1
28	Unkultiviertes Bakterium	künstliches Feuchtgebiet	97%	FN429758.1	<i>Succinivibrio</i> sp.	Rinderpansen	96%	AB730639.1

Bande	Nächster verwandter nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.	Nächster verwandter, kultivierter Organismus nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.
29	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	97%	LT624762.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	91%	AB596885.1
30	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	97%	LT624762.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	91%	AB596885.1
31	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	100%	LT624762.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	94%	AB596885.1
32	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	99%	LT624762.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	90%	AB596885.1
33	Unkultiviertes Cyanobakterium	Microbialit	97%	KM019528.1	<i>Phormidium</i> sp. <i>Leptolyngbya</i> sp. <i>Schizothrix arenaria</i>	Wasser und Boden Boden Bodenkruste	97% 97% 97%	KY753386.1 KC695849.1 KC463235.1
34	Unkultiviertes Bakterium	Termite	98%	KP690938.1	--			
35	Spirochaetaceae-Bakterium	anaerober Gärprozess	99%	KX826987.1	siehe links			
36	Unkultivierte <i>Bacteroides</i> sp.	Bioreaktor	95%	LT857663.1	Sphingobacteriales-Bakterium	Travertin	95%	KU695464.1
37	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	93%	LT842158.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	88%	AB596885.1
38	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	95%	LT624151.1	<i>Cytophaga</i> sp.	<i>Styela clava</i>	91%	JF721990.2
39	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Gärprozess	99%	LT624169.1	Candidatus <i>Cloacamonas acidaminovorans</i>	anaerober Gärprozess	90%	CU466930.1
40	Unkultivierter Prokaryont	anaerober Gärprozess	95%	KT064256.1	Cloacimonetes-Bakterium	Bioreaktor	93%	KJ535434.1
41	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Gärprozess	100%	KX255705.1	Bacteroidetes-Bakterium	--	89%	KY053165.1
42	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Gärprozess	92%	FR836447.1	Candidatus <i>Ishikawaella capsulata</i>	Stinkwanze	86%	JF732916.1
43	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Gärprozess	100%	LC174367.1	<i>Alkalitalea saponilacus</i> <i>Natronoflexus pectinivorans</i> <i>Rubidimonas crustatorum</i>	anaerober Schlamm anaerober Schlamm Squilla	98% 98% 92%	KT183418.1 KT183417.1 NR_113282.1
44	Unkultiviertes Bakterium	Dickdarm	93%	KP804692.1				
45	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Gärprozess	98%	MF374257.1	Lachnospiraceae-Bakterium	Mäusefäkalien	96%	KX009929.1
46	Unkultiviertes Bakterium	Sediment	100%	MF454848.1	<i>Dysgonomonas macrotermitis</i>	Termitenenddarm	100%	NR_134023.1
47	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	96%	LT842039.1	Cytophagaceae-Bakterium	Schwmmgewebe	92%	KF282390.1
48	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	99%	LT624762.1	<i>Flexithrix dorotheae</i>	--	93%	NR_113831.1
49	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	98%	JN998182.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	94%	AB596885.1
50	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	Biogasschlamm	100%	AB780951.1	<i>Proteiniphilum</i> sp.	anaerober Gärprozess	98%	KP178480.1
51	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Schlamm	100%	KT819890.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	94%	AB596885.1
52	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	90%	LT842811.1	<i>Parabacteroides</i> sp.	menschlicher Stuhl	88%	LN899828.1
53	Unkultivierter Prokaryont	anaerober Gärprozess	96%	KT066936.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	90%	AB596885.1

Bande	Nächster verwandter nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.	Nächster verwandter, kultivierter Organismus nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.
54	Unkultiviertes Bakterium	Mäusefäkalien	98%	MF299661.1	--			
55	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	Termite	95%	KM650777.1	<i>Porphyromonas gulae</i>	Hundezahnbelag	96%	AY827906.1
56	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	95%	LT624762.1	<i>Alkalitalea saponilacus</i>	--	95%	CP021904.1
57	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	100%	LT624607.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	94%	AB596885.1
58	Unkultivierte <i>Spirochaeta</i> sp.	Fäkalien	96%	KP104571.1	<i>Sphaerochaeta associata</i>	--	95%	KY643672.1
59	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	Chattooga-Fluss	97%	GU247821.1	<i>Porphyromonas circumdentaria</i>	Katzenmundhöhle	96%	KM462040.1
60	Unkultivierter Prokaryont	anaerober Gärprozess	96%	KT044899.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	91%	AB596885.1
61	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Gärprozess	99%	LT624183.1	Candidatus <i>Cloacamonas acidaminovorans</i>	anaerober Gärprozess	89%	CU466930.1
62	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Gärprozess	98%	LT843008.1	Cloacimonetes-Bakterium	Bioreaktor	96%	KJ535434.1
63	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Schlamm	99%	AB997419.1	<i>Bacteroides uniformis</i>	Gewebe	86%	KP944146.1
64	Unkultiviertes Bakterium	Rhizosphärenboden	96%	KX626839.1	<i>Proteiniphilum saccharofermentans</i>	Formationswasser	92%	KY962915.1
65	Unkultiviertes Bakterium	Pansen	99%	GQ327198.1	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Pansen	97%	AM920691.1
66	Unkultiviertes Bakterium	Seewasser	94%	KY520176.1	<i>Desulfobacula toluolica</i>	--	94%	FO203503.1
67	Unkultiviertes Bakterium	hypersaliner Biofilm	96%	KY342967.1	--			
68	Unkultiviertes Bakterium	Biofilm	97%	LN650996.2	<i>Geobacter</i> sp.	--	97%	LT896716.1
					<i>Pelobacter</i> sp.	--	97%	LT841303.1
					<i>Desulfuromonas</i> sp.	terrestrische Untergrundsohle	97%	CP015080.1
69	Unkultiviertes Bakterium	Mäsefäkalien	95%	MF306392.1	<i>Clostridium</i> sp.	Maus	94%	AB622833.1
70	Unkultiviertes Rikenellaceae-Bakterium	anaerober Gärprozess	99%	LT624989.1	Bacteroidia-Bakterium	oral cavity Mundhöhle	87%	JN713207.1
71	Unkultiviertes Bakterium	Dickdarm	97%	KP800231.1	Bacteroidetes-Bakterium	Sodaseesediment	96%	JF304646.1
72	Unkultiviertes Bakterium	Darm	97%	JX457991.1	--			
73	Unkultiviertes Bakterium	anaerober Gärprozess	98%	JF644062.1	<i>Prevotella</i> sp.	Mundhöhle	97%	GU409580.1
74	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	Vulkansee	100%	HF930576.1	--			
75	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	96%	LT624762.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	92%	AB596885.1
76	Unkultivierte Candidatus <i>Cloacimonas</i> sp.	anaerober Gärprozess	98%	LT625932.1	Cloacimonetes-Bakterium	Bioreaktor	95%	KJ535434.1
77	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	96%	LT624762.1	<i>Clostridium</i> sp.	TCE-dechlorierende Kultur	89%	AB596885.1
78	Unkultiviertes Bacteroidetes-Bakterium	anaerober Gärprozess	97%	LT624762.1	Bacteroidales-Bakteriumk	--	89%	CP006772.1
79	Unkultiviertes Bakterium	Mäusefäkalien	99%	MF293042.1	<i>Bifidobacterium</i> sp.	--	98%	LN907737.1

4.8.3 Auswirkungen einer Hochlast-Co-Vergärung fett- und ölhaltiger Substrate auf die mikrobielle Biozönose

Zur Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft bei einer Hochlast-Co-Vergärung von Rapsöl und Klärschlamm und insbesondere zur Untersuchung des Einflusses der Raumbelastung auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft wurden für die Versuche LangCoV 1 und 3 für die Methanogenen genetische Fingerprintanalysen mittels DGGE und für die Bacteria eine Mikrobiomanalyse durchgeführt.

Bei der Hochlast-Co-Vergärung fett- und ölhaltiger Substrate kommt es in typischen NawaRo-Biogasanlagen, bzw. in Klärschlamm vergärenden Biogasanlagen unter Zugabe von CaO, zur Bildung von prozessstabilisierenden Aggregaten (siehe 2.3.3 und 4.4 - 4.6). Diese Form der Aggregatbildung wurde nach Zugabe von CaO auch in den Versuchen LangCoV 1 – 4 beobachtet. Die Aggregate hatten einen Durchmesser von 1 – 5 mm und bestanden hauptsächlich aus Calcium und Fettsäuren, die in eine Proteinmatrix eingebettet waren, die auf das Vorhandensein von Biofilmen hindeutete (Abb. 33). Die Aggregate stabilisierten auch in diesen Versuchen den Biogasprozess. Daher wurde zusätzlich die methanogene Lebensgemeinschaft der Aggregate untersucht.

Insgesamt ähnelten sich die methanogenen Lebensgemeinschaften im Gärschlamm von LangCoV 1 und 3 sehr und ihre Zusammensetzung änderte sich über die Zeit kaum. Dabei zeigte die Biozönose eine Dominanz von acetoklastischen Organismen der Gattung *Methanosaeta* (Abb. 42, Tab. 12). Eine Dominanz dieser Gattung ist typisch für Biogasanlagen mit niedrigen Säurekonzentrationen und damit im Einklang zu den geringen Säurekonzentrationen von $< 0,5 \text{ g L}^{-1}$ in LangCoV 1 und 3 (siehe 4.6) (Lerm et al. 2012; Munk et al. 2010).

Die methanogenen Lebensgemeinschaften in den Aggregaten zeigten dagegen eine Dominanz von hydrogenotrophen Organismen der Gattung *Methanospirillum*. Diese hohe relative Abundanz hydrogenotropher Methanogener beruhte auf der hohen Konzentration von Fettsäuren in den Aggregaten. Langkettige Fettsäuren werden in Biogasprozessen durch syntrophe Bacteria unter Freisetzung von Wasserstoff abgebaut (Schieder et al. 2010). Der Wasserstoff wiederum diente den hydrogenotrophen Archaea als Substrat. Beide Organismen typen bildeten vermutlich eine effektive, fettsäureabbauende Lebensgemeinschaft in Form von Biofilmen in

und auf den Aggregaten aus und trugen dadurch zu einer erhöhten Prozessstabilität bei.

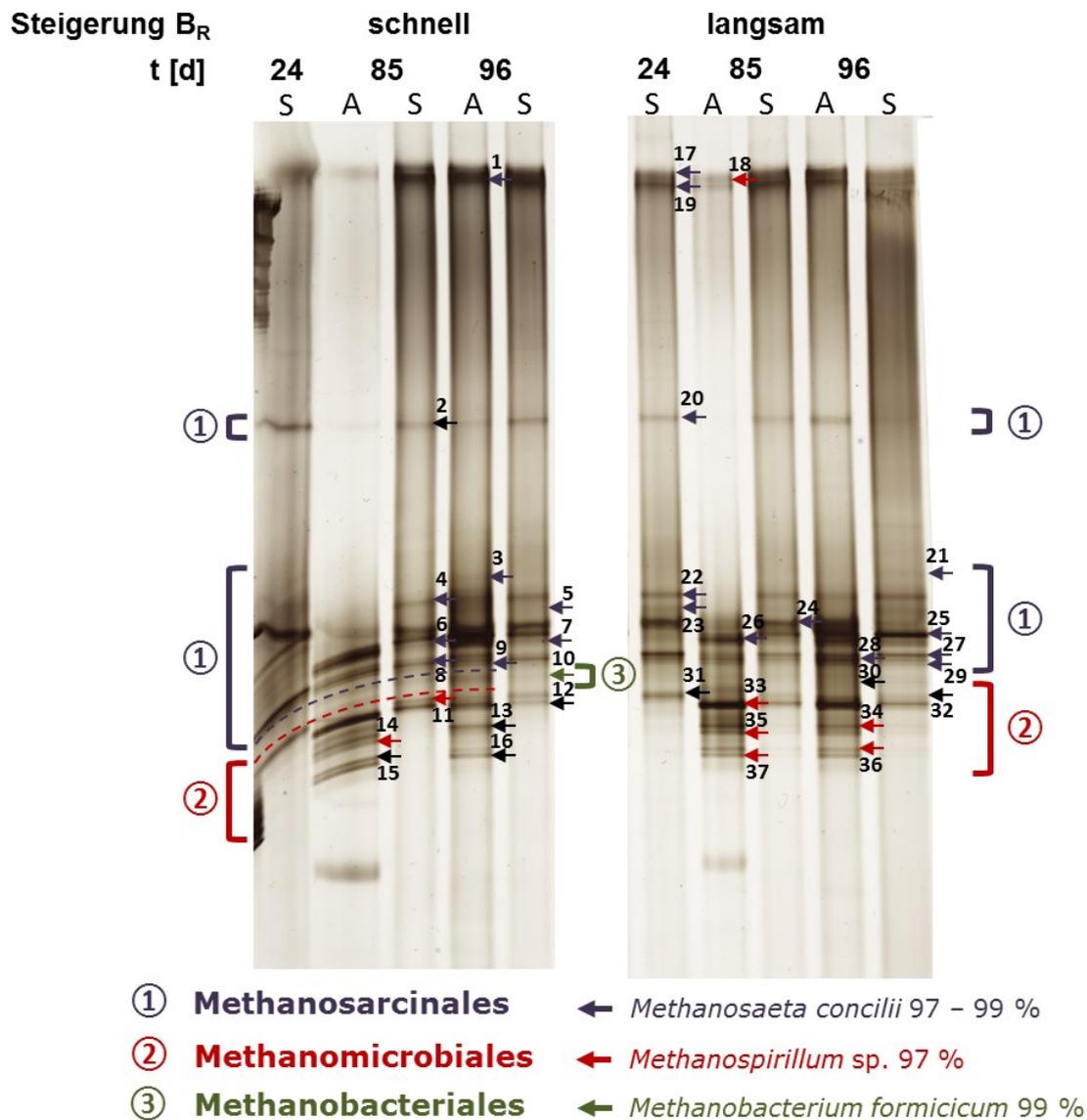


Abbildung 42: Genetisches Fingerprinting (DGGE) der methanogenen Lebensgemeinschaften bei der Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung von Rapsöl und Klärschlamm bei schneller (LangCoV 1) und langsamer (LangCoV 3) Steigerung der Raumbelastung (B_R) für ausgewählte Versuchstage im Schlamm (S) und in den Aggregaten (A); Ziffern im Kreis: Phylogenetische Einordnung der Organismen auf Ordnungsebene; Farbige Pfeile: Organismeneinordnung mit nächster verwandter Spezies; 1 – 37: sequenzierte Banden, für detaillierte phylogenetische Einordnung siehe Tab. 12

Tabelle 12: Phylogenetische Einordnung der im genetischen Fingerprinting (DGGE) der methanogenen Archaea in LangCoV 1 und 3 sequenzierten Banden

Bande	Nächster verwandter nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.	Nächster verwandter, kultivierter Organismus nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.
1	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	98%	NR_102903.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	98%	NR_102903.1
2	Unkultiviertes Archaeon	Anaerober Gärprozess	96%	KC412592.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Biogasanlage	95%	JN243322.1
3	<i>Methanosaeta concilii</i>	anaerober Partikel	100%	KM408635.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	anaerober Partikel	100%	KM408635.1
4	<i>Methanosaeta concilii</i>	marines Sediment	99%	NR_104707.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	marines Sediment	99%	NR_104707.1
5	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	100%	NR_102903.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	100%	NR_102903.1
6	<i>Methanosaeta concilii</i>	anaerober Partikel	99%	KM408635.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	anaerober Partikel	99%	KM408635.1
7	<i>Methanosaeta concilii</i>	anaerober Partikel	100%	KM408635.2	<i>Methanosaeta concilii</i>	anaerober Partikel	100%	KM408635.2
8	Unkultivierter Methanosarcinales-Klon	Anaerober Gärprozess	99%	KF198795.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Reisfeldboden	97%	KF431940.1
9	Unkultiviertes Archaeon	Anaerober Gärprozess	99%	KT955564.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Reisfeldboden	98%	KF431940.1
10	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	99%	CP006933.1	<i>Methanobacterium formicicum</i>	--	99%	CP006933.1
11	<i>Methanospirillum hungatei</i>	--	98%	NR_074177.1	<i>Methanospirillum hungatei</i>	--	98%	NR_074177.1
12	<i>Methanospirillum hungatei</i>	--	95%	NR_074177.1	<i>Methanospirillum hungatei</i>	--	95%	NR_074177.1
13	Unkultiviertes Archaeon	Anaerober Gärprozess	98%	KT955584.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	Anaerober Gärprozess	96%	AJ133792.1
14	Unkultiviertes Archaeon	Anaerober Gärprozess	100%	KT955574.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	Anaerober Gärprozess	98%	AJ133792.1
15	Unkultiviertes Archaeon	Biogasreaktor	96%	LT546383.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	Anaerober Gärprozess	96%	AJ133792.2
16	Unkultiviertes Archaeon	Biogasreaktor	98%	AB997279.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	Anaerober Gärprozess	96%	AJ133792.1
17	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	98%	NR_102903.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	98%	NR_102903.1
18	Unkultivierte <i>Methanospirillum</i> sp.	Biofilm	98%	EU812213.1	<i>Methanospirillum hungatei</i>	--	97%	NR_074177.1
19	Unkultivierter Methanosarcinales-Klon	Anaerober Gärprozess	99%	KF198800.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	98%	NR_102903.1
20	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	100%	NR_102903.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	100%	NR_102903.1

Bande	Nächster verwandter nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.	Nächster verwandter, kultivierter Organismus nach NCBI-Datenbank	Quelle	Identität	Accession-Nr.
21	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Sediment	100%	AY454766.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	99%	NR_102903.1
22	<i>Methanosaeta concilii</i>	Reisfeldboden	99%	KF431940.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Reisfeldboden	99%	KF431940.1
23	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Gärschlamm	100%	KJ806521.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Reisfeldboden	99%	KF431940.1
24	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	99%	NR_102903.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	99%	NR_102903.1
25	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	100%	NR_102903.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	100%	NR_102903.1
26	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	99%	NR_102903.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	--	99%	NR_102903.1
27	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Gärschlamm	100%	KJ806521.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Reisfeldboden	99%	KF431940.1
28	Unkultiviertes Methanosarcinales-Klon	Anaerober Gärprozess	99%	KF198795.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Reisfeldboden	98%	KF431940.1
29	Unkultivierte <i>Methanosaeta</i> sp.	Gärschlamm	100%	KJ806521.1	<i>Methanosaeta concilii</i>	Reisfeldboden	99%	KF431940.1
30	<i>Methanospirillum hungatei</i>	--	96%	NR_074177.1	<i>Methanospirillum hungatei</i>	--	96%	NR_074177.1
31	Unkultiviertes Archaeon	anaerobe Abwasserreinigung	97%	JX000056.1	<i>Methanosphaerula palustris</i>	--	93%	KX261413.1
32	Unkultivierter Methanomicrobiales-Klon	Grundwasser	96%	LN796421.1	<i>Methanosphaerula palustris</i>	Abwasserreinigung	94%	KX261413.1
33	<i>Methanospirillum hungatei</i>	--	100%	NR_074177.1	<i>Methanospirillum hungatei</i>	--	100%	NR_074177.1
34	Unkultivierter Methanomicrobiales-Klon	Anaerober Gärprozess	99%	CU916324.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	Anaerober Gärprozess	97%	AJ133792.1
35	<i>Methanospirillum</i> sp.	Anaerober Gärprozess	98%	AJ133792.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	Anaerober Gärprozess	98%	AJ133792.1
36	Unkultivierter Methanomicrobiales-Klon	Anaerober Gärprozess	100%	KF198791.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	Anaerober Gärprozess	98%	AJ133792.1
37	Unkultivierter Methanomicrobiales-Klon	Anaerober Gärprozess	100%	KF198627.1	<i>Methanospirillum</i> sp.	Anaerober Gärprozess	97%	AJ133792.1

Zur Charakterisierung der bakteriellen Lebensgemeinschaft bei der Co-Vergärung von Rapsöl und Klärschlamm mit Fokus auf dem Einfluss einer Hochlast-Co-Vergärung wurden Mikrobiomanalysen für LangCoV 3 für die Versuchstage 24 und 96 durchgeführt. Außerdem wurde mittels qPCR die Gesamtzahl der bakteriellen 16S rDNA-Kopien für die Versuche LangCoV 1 und 3 bestimmt. Die bakterielle Abundanz blieb mit $1,6 \times 10^9 - 9,7 \times 10^{10}$ Genkopien $\text{g}_{\text{Schlamm}}^{-1}$ über den Versuchszeitraum annähernd konstant (Abb. 43). Demnach war die Schwankungsbreite gering und die relative Standardabweichung war mit 2 - 23 % ebenfalls niedrig. Ähnlich wie in den Übersäuerungsversuchen bestand ein Gleichgewicht zwischen Organismeneintrag, -wachstum und -austrag (siehe 4.8.1).

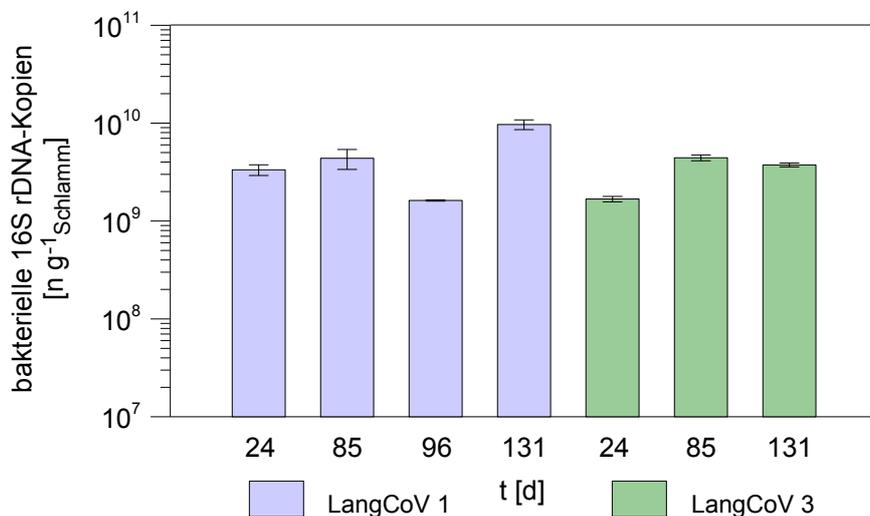


Abbildung 43: Quantifizierung der bakteriellen 16S rDNA-Kopien mittels qPCR in LangCoV 1 u. 3 zur Bestimmung der bakteriellen Abundanz über die Zeit. Die bakterielle Abundanz bleibt in beiden Versuchen trotz steigender Raumbelastung annähernd konstant

Die bakterielle Lebensgemeinschaft zeigte mit 75 – 77 % der Organismen eine für Biogasanlagen typische Dominanz des Phylums Firmicutes (Abb. 44) (Goux et al. 2015; Hanreich et al. 2013; Lerm et al. 2012; Theuerl et al. 2015). Es wurden außerdem Vertreter der Phyla Actinobacteria (5 – 8 %), Bacteroidetes (1 – 4 %), Proteobacteria (12 – 13 %), Thermotogae (1 – 2 %) und Synergistetes (1 – 2 %) detektiert. Bei hohen Raumbelastungen nahm die Abundanz von Vertretern der Phyla Bacteroidetes und Thermotogae leicht zu.

Innerhalb der Firmicutes dominierten mit 59 - 68 % aller Bacteria Organismen der Ordnung Clostridia. Die zweithäufigste Ordnung Selenomonadales (Phylum: Firmicutes) machte 6 - 17 % der Bacteria aus (Abb. 44). Außerdem wurden mit einem Anteil ≥ 2 % der Bacteria Organismen der Ordnungen Acidimicrobiales, Kosmotogales, Micrococcales und Rhodobacterales detektiert.

Es wurden zusätzlich Bacteria der Gattungen *Anaerosinus*, *Clostridium*, *Intestinibacter* und *Romboutsia* detektiert, deren relative Abundanz im Verlauf des Versuches annähernd konstant blieb (Abb. 44). Diese Gattungen sind als hydrolytisch/acidogene Bacteria bekannt (Gerritsen et al. 2014; Horn 1987; Song et al. 2004; Strömpl et al. 1999). Bei hohen Raumbelastungen konnte ein Organismus der Gattung *Bacteroides* detektiert werden, der vermutlich aufgrund des höheren Substrataufkommens günstigere Wachstumsbedingungen vorfand. Einige Vertreter dieser Gattung sind als Acidogene bekannt (Nishiyama et al. 2009).

Bei hoher Raumbelastung und damit hoher Rapsöl-Fracht zeigte sich eine hohe relative Abundanz syntropher, fettsäureoxidierender Bacteria der Gattung *Syntrophomonas*, mit *Syntrophomonas saprovorans* (von 4 auf 30 %) und *Syntrophomonas wolfei* (von 0,1 auf 7 %) als nächste Verwandte, sowie der Gattung *Mesotoga* (von 0,1 auf 2 %) und verschiedenen Organismen der Ordnung Syntrophobacterales (Abb. 44, 45) (Chen et al. 2016; Fadhlouli et al. 2018; McInerney et al. 1981; Roy et al. 1986). Die Zunahme dieser Organismen weist auf eine Anpassung der Biozönose an die geänderte Substratzusammensetzung hin. Unter anaeroben Bedingungen können Fettsäuren nur syntroph abgebaut werden. Daher nahm mit steigender Abundanz der Syntrophen auch die Abbaurate der Fettsäuren zu, die bei einer Akkumulation toxisch auf die Mikroorganismen gewirkt hätten (Kuang et al. 2006; Luostarinen et al. 2009). Dadurch wurde der Prozess durch die Anpassung der Biozönose stabilisiert. Da die Aggregate zu einem Großteil aus langkettigen Fettsäuren bestanden und innerhalb der Aggregate eine Dominanz von hydrogenotrophen Archaea detektiert wurde, den syntrophen Partnern der Fettsäureoxidierer, war vermutlich auch die relative Abundanz der syntrophen Bacteria in den Aggregaten besonders hoch (Abb. 33, 42).

Während ein naher Verwandter von *Clostridium straminisolvens* (Kato et al. 2004) bei niedrigen Raumbelastungen noch 24 % der bakteriellen Lebensgemeinschaft ausmachte, konnte er bei hohen Raumbelastungen nicht mehr detektiert werden. Dafür nahm die Abundanz eines Verwandten der Spezies *Acetivibrio cellulolyticus* deutlich zu (von < 0,1 auf 6 %). Beides sind cellulolytische Mikroorganismen und degradieren celluloseartige Substrate. Vermutlich war die Wachstumsrate des mit *Acetivibrio cellulolyticus* verwandten Organismus höher, sodass dieser einen Selektionsvorteil gegenüber dem mit *Clostridium straminisolvens* verwandten Organismus hatte, der bei hohen Raumbelastungen ausgewaschen wurde.

Phylogenetische
Einordnung nach:

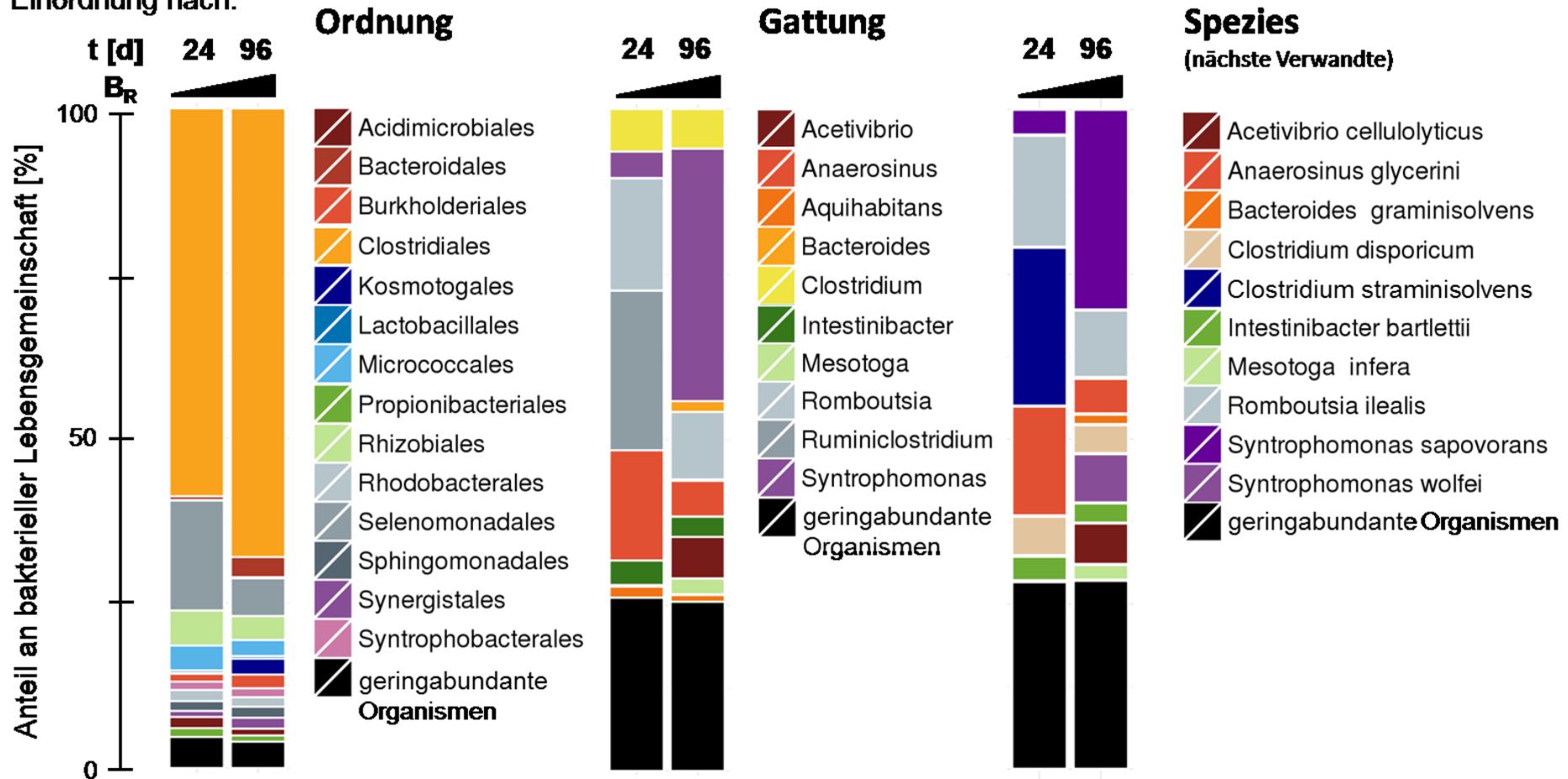


Abbildung 44: Zusammensetzung der bakteriellen Lebensgemeinschaft mit phylogenetischer Einordnung der Organismen nach Ordnung, Gattung und nächster verwandter Spezies für LangCoV 3 für Versuchstage 24 und 96 mittels Mikrobiomanalyse; B_R: Raumbelastung; Mit steigender Raumbelastung und damit steigender Rapsölzugabe nahm vor allem die relative Abundanz syntropher Mikroorganismen zu. (Analyse durchgeführt

5. Zusammenfassende Diskussion

Im Rahmen der zusammenfassenden Diskussion werden die verschiedenen molekularbiologischen Methoden zur Analyse mikrobieller Lebensgemeinschaften verglichen, der Zusammenhang zwischen der Prozessstabilität und der mikrobiellen Gemeinschaft in Biogassystemen diskutiert und die Möglichkeiten zur Vorhersage von Prozessstörungen und zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute in einstufigen NawaRo-Biogasanlagen erörtert.

5.1 Vergleich molekularbiologischer Methoden zur Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in NawaRo-Biogasanlagen

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Methoden zur Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft verwendet, das genetische Fingerprinting mittels DGGE, die Mikrobiomanalyse und die Metagenomanalyse.

Bei der **DGGE** handelt es sich um ein klassisches DNA-basiertes Fingerprintverfahren (siehe 2.4) (Muyzer et al. 1993). In dieser Arbeit wurde die DGGE erfolgreich angewendet, um die mikrobiellen Lebensgemeinschaften in verschiedenen Vergärungsexperimenten zu charakterisieren (siehe 4.8.1 – 4.8.3). Mittels DGGE lassen sich mit vergleichsweise geringem Aufwand die dominierenden Mikroorganismen in einer vergleichsweise hohen Anzahl an Proben gleichzeitig bestimmen.

Die Methode hat jedoch auch Nachteile. Da sich das genetische Fingerprinting nur zur Detektion der dominierenden Organismen eignet, werden geringer abundante Organismen diskriminiert. Diese Organismen könnten aber eventuell wichtige Funktionen innerhalb einer Lebensgemeinschaft erfüllen. In dieser Arbeit wurden mittels DGGE 10-mal weniger Phyla detektiert, als mittels Metagenomanalyse (siehe 4.8.1). Eine Diskriminierung von Organismen ergibt sich beispielsweise durch den PCR-Schritt zur Amplifikation der Markergene. In der Regel werden für diese Amplifikationen möglichst universelle Primerpaare verwendet, die jedoch aufgrund der riesigen Vielfalt an Sequenzvariationen nie universell alle Mikroorganismen erfassen können und dadurch häufig zu Verzerrungen der Ergebnisse führen (de Araújo und Schneider 2008; Frank et al. 2008; Krakat et al. 2017; Youssef et al. 2009). So müssen beispielsweise einzelne Domänen wie Bacteria und Archaea stets

getrennt voneinander analysiert werden (siehe 4.8.1 – 4.8.3). Darüber hinaus können Markergensequenzen, die in der Probe in höherer Abundanz vorkommen oder Sequenzen mit geringerem GC-Gehalt in der PCR verstärkt amplifiziert werden, was ebenfalls die Ergebnisse verzerrt (Theron und Cloete 2000). Auch die Länge des DNA-Fragments von nur ca. 500 bp, im Vergleich zu ca. 1500 bp des gesamten 16S-rRNA Gens, limitiert die Auflösung der Methode. Häufig liegen Banden im Gel auch so dicht beieinander, dass sie schwer voneinander getrennt werden können oder die 16S rRNA-Sequenzen verschiedener Organismen weisen die gleiche Lauflänge im Gel auf. Dieser Umstand führte in den Analysen dieser Arbeit häufig dazu, dass die Sequenz-Elektropherogramme eine Überlagerung mehrerer DNA-Sequenzen zeigten. Um eine mittels BLAST auswertbare Sequenz zu erhalten, musste das ohnehin kurze DNA-Fragment weiter gekürzt werden. Eine phylogenetische Einordnung war dadurch jedoch oft nur noch bis auf Ordnungsebene möglich (siehe 4.8.1 – 4.8.3).

Die Entwicklung von Hochdurchsatz-Sequenziermethoden, wie beispielsweise der Illumina-Technologie, erlaubte in den letzten Jahren die Entwicklung von neuen Methoden mit deutlich höherer Auflösung (Caporaso et al. 2012; Shah et al. 2011). Eine dieser Methoden ist die **Mikrobiomanalyse** (siehe 2.4.2 u. 3.3.3). Wie auch beim genetischen Fingerprinting wird die DNA einer Umweltprobe extrahiert und ein bestimmtes Markergen bzw. Markergenfragment mittels PCR amplifiziert. Im Anschluss werden die so gewonnenen einzelnen Markergenfragmente mithilfe der Hochdurchsatzsequenzierung millionenfach sequenziert. Es ergibt sich dadurch ein deutlich detaillierteres Bild der mikrobiellen Lebensgemeinschaft als mit klassischen DNA-basierten Methoden, wie beispielsweise der DGGE (de Menezes et al. 2011). Abbildung 44 zeigt, dass in dieser Arbeit mittels Mikrobiomanalyse 10 Organismen mit einer relativen Abundanz von > 2 % bis auf Gattungsebene phylogenetisch eingeordnet werden konnten. Innerhalb der weniger abundanten Organismen konnten weitere zehn Gattungen detektiert werden (Daten nicht gezeigt), wohingegen mittels DGGE nur maximal fünf Organismen bis auf Gattungsebene klassifiziert werden konnten (Tab. 11). Der PCR-Schritt als eine mögliche Diskriminierungsquelle von Mikroorganismen besteht jedoch bei dieser Methode weiterhin (s. o.) und daher müssen auch bei der Mikrobiomanalyse einzelne Domänen getrennt voneinander analysiert werden. Außerdem ist die Analyse durch teure Gerätschaften und Chemikalien vergleichsweise kostenintensiv.

Eine weitere Methode zur Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften, die das Verfahren der Hochdurchsatz-Sequenzierung nutzt, ist die **Metagenomanalyse** (siehe 2.4.2 u. 3.3.3). Dabei wird ebenfalls die gesamte DNA einer Probe extrahiert. Es folgt jedoch kein PCR-Schritt, sondern es wird das gesamte Metagenom analysiert, also die Gesamtheit der genetischen Information der Probe. Dies erlaubt die gemeinsame Betrachtung der einzelnen Domänen. Dadurch konnten in dieser Arbeit nicht nur die Lebensgemeinschaften der Bacteria und der Methanogenen einzeln betrachtet werden, sondern es konnten auch Rückschlüsse über ihre relativen Abundanzen zueinander getroffen werden (siehe 4.8.1). Für die phylogenetische Einordnung der Sequenzen wird außerdem nicht nur ein einzelnes Markergen herangezogen, sondern die sequenzierten DNA-Fragmente werden mit ganzen Organismengenomen abgeglichen. Eine Diskriminierung von Organismen ergibt sich dabei lediglich durch die Methode der DNA-Extraktion und durch den Informationsgehalt der Datenbank, anhand derer die Sequenzen phylogenetisch eingeordnet werden (Krakat et al. 2017). Da die Sequenzdaten nur mit Informationen von gesamten Genomen abgeglichen werden, liegt hier ein limitierender Faktor, da die Datenlage für gesamte Genome geringer ist, als beispielsweise für einzelne Genfragmente wie dem 16S rRNA-Gen. Wie auch bei der Mikrobiomanalyse besteht der größte Nachteil dieser Methode in den hohen Kosten. Außerdem wird für die Analyse vergleichsweise viel und qualitativ hochwertige DNA benötigt, was die Zahl der analysierbaren Umweltproben einschränkt. In den Untersuchungen dieser Arbeit mussten vier verschiedene Extraktionsmethoden getestet werden, um ausreichend hochmolekulare DNA für die Analyse zu gewinnen.

In dieser Arbeit wurden die mikrobielle Biozönose und die Änderung ihrer Zusammensetzung bei der Steigerung der Raumbelastung bis zur Übersäuerung sowohl mittels genetischem Fingerprinting mit der DGGE, als auch mittels Metagenomanalyse charakterisiert, um den Unterschied des Informationsgehaltes beider Methoden zu vergleichen (siehe 4.8.1). Für die Lebensgemeinschaft der methanogenen Archaea ergab sich dabei ein sehr ähnliches Bild (Abb. 33, 35). Mit beiden Methoden wurde eine deutliche Dominanz von Organismen der acetoklastischen Gattung *Methanosaeta* detektiert. Die Metagenomanalyse erlaubte aufgrund ihrer höheren Auflösung zusätzlich die Detektion von Vertretern der hydrogenotrophen Gattungen *Methanosarcina*, *Methanoculleus* und *Methanobacterium*, die zusammen laut Metagenomanalyse immerhin ca. 10 % der

methanogenen Lebensgemeinschaft ausmachten. Die Kernaussage, also eine deutliche Dominanz acetoclastischer gegenüber einer geringen Abundanz hydrogenotropher Methanogener, war jedoch mit beiden Methoden identisch.

Bei der Analyse der bakteriellen Lebensgemeinschaften ergaben sich größere Unterschiede (siehe 4.8.1). Mittels genetischem Fingerprinting (DGGE) wurde mit 90 % der Banden (16 Banden) eine deutliche Dominanz von Vertretern des Phylums Bacteroidetes detektiert. Diejenigen Vertreter dieses Phylums, deren relative Abundanz zunahm, wurden acidogenen Gattungen zugeordnet. Die übrigen 10 % (2 Banden) wurden dem Phylum Firmicutes zugeordnet, wobei einer der beiden Organismen der Ordnung Lactobacillales (Milchsäurebakterien) zugeordnet wurde, dessen relative Abundanz mit steigender Raumbelastung zunahm. Dagegen zeigte die Metagenomanalyse ein deutlich diverseres Bild der bakteriellen Lebensgemeinschaft. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der DGGE dominierten vor der Übersäuerung mit 32 % der Bacteria Organismen des Phylums Firmicutes. Aber auch Organismen der Phyla Actinobacteria (10 %), Bacteroidetes (18 %), Chloroflexi (4 %), Proteobacteria (24 %), Spirochaetes (2 %) und 24 weitere Phyla mit einer relativen Abundanz < 2 % wurden detektiert. Mit steigender Raumbelastung und im Zuge der Übersäuerung zeigte sich, wie auch schon mittels genetischem Fingerprinting, eine Zunahme der relativen Abundanz verschiedener säureproduzierender Organismen des Phylums Bacteroidetes und eine deutliche Zunahme von potentiell milchsäureproduzierenden Organismen der Gattung *Bifidobacterium* (Phylum: Actinobacteria). Interessanterweise zeigt sich damit sowohl im genetischen Fingerprinting mit dem Organismus der Ordnung Lactobacillales, als auch mit der Metagenomanalyse mit Vertretern der Gattung *Bifidobacterium* eine Zunahme der relativen Abundanz von potentiell milchsäureproduzierenden Mikroorganismen, obwohl sie taxonomisch unterschiedlichen Phyla zugeordnet wurden. Wie bereits bei der Analyse der methanogenen Lebensgemeinschaft war insgesamt die Auflösung der Metagenomanalyse, derjenigen der DGGE, deutlich überlegen. Aber auch hier war die Kernaussage, dass mit steigender Raumbelastung die relative Abundanz acidogener und potentiell milchsäureproduzierender Bacteria zunahm, identisch.

Der Vergleich belegt, dass beide Methoden für die Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften geeignet sind. Soll beispielsweise eine Übersicht über

dominierende Vertreter in einer Umweltprobe oder eine Ursachenforschung für bestimmte Prozesszustände in Vergärungsanlagen durchgeführt werden, ist das klassische und kostengünstige genetische Fingerprinting zu empfehlen (Lienen et al. 2014b). Bei Untersuchungen jedoch, die ein genaueres Verständnis der Interaktionen einzelner Mikroorganismen oder des Zusammenspiels einzelner Organismengruppen zum Ziel haben, kann die Metagenomanalyse deutlich hochauflösendere Ergebnisse liefern.

5.2 Abhängigkeit der Prozessstabilität von der Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose

Für die Abbauprozesse und die Methanbildung im Biogasprozess sind die Aktivität der am Prozess beteiligten Mikroorganismen und die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsoptima der beteiligten Organismen, muss im Reaktor stets ein Kompromiss der Milieubedingungen eingestellt werden, um so viel Methan wie möglich produzieren zu können. Viele Betriebsparameter, wie der pH-Wert, die Prozesstemperatur, die hydraulische Verweilzeit oder die Durchmischung wurden untersucht und Grenzwerte für Hemmstoffe, wie beispielsweise H_2S , NH_4 und organische Säuren (vor allem Propionsäure) ermittelt, um die Milieubedingungen für die Mikroorganismen im Biogasprozess zu optimieren (FNR 2016b; Lienen et al. 2013; Lienen et al. 2014b; Marchaim und Krause 1993; Weiland 2008).

Weniger erforscht und verstanden ist jedoch der Einfluss der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft auf die Prozessstabilität. In den meisten Biogassystemen kommen vor allem hydrolytisch-acidogene, und cellulytische Bacteria der Phyla Bacteroidetes und Firmicutes in hoher Abundanz vor (Bauer et al. 2009; Hanreich et al. 2013; Lerm et al. 2012; Theuerl et al. 2015; Ziganshin et al. 2013). Vertreter der Phyla Actinobacteria, Chloroflexi und Proteobacteria werden ebenfalls häufig detektiert.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass eine starke Zunahme der Aktivität, resultierend in einer deutlichen Zunahme der relativen Abundanz, von säureproduzierenden Bacteria, vermutlich vor allem Organismen der Gattung *Bifidobacterium* (Phylum: Actinobacteria), eine Übersäuerung anzeigt (siehe 4.7.1). Auch Regueiro et al. (2015) beobachtete eine Zunahme von Organismen des Phylums Actinobacteria im

Zuge einer Übersäuerung. Die Säureproduktion überstieg daraufhin den Säureabbau, sodass es zu einer Akkumulation der Säuren kam. Nach Verbrauch des Puffers führte die steigende Säurekonzentration zu einem Abfall des pH-Wertes wodurch der Säureabbau inhibiert und die Übersäuerung weiter vorangetrieben wurde.

Säureabbauende Mikroorganismen in Biogassystemen sind neben den acetoklastischen methanogenen Archaea auch Bacteria, die lang- und kurzkettige Fettsäuren oxidieren und dabei in syntropher Wechselbeziehung mit hydrogenotrophen oder mixotrophen Archaea leben. In den hier dargestellten Untersuchungen zeigte sich, dass vor allem Systeme mit einer vergleichsweise hohen relativen Abundanz syntroph lebender Bacteria, wie Vertretern der Gattungen *Syntrophomonas* und *Syntrophorhabdus* oder Organismen der Ordnung Syntrophobacterales, eine hohe Prozessstabilität bei hohen Raumbelastungen aufwiesen (siehe 4.7.3). Im Gegenzug kam es in den Systemen mit geringerer Abundanz syntropher Bacteria schnell zu einer Übersäuerung (siehe 4.7.1). Syntrophe verstoffwechseln beispielsweise auch die nur schwer abbaubare Propionsäure, deren Akkumulation als Anzeiger für Übersäuerungen bekannt ist (Marchaim und Krause 1993). In Biogassystemen mit einer sehr geringen Abundanz oder einer Hemmung von acetoklastischen Organismen der Familie Methanosaetaceae ist die syntrophe Acetat-Oxidation sogar der dominierende Abbauweg für Acetat (Karakashev et al. 2006; Ziganshin et al. 2013).

Analog dazu zeigte sich, dass Biogasprozesse, deren methanogene Lebensgemeinschaften nur eine geringe Diversität aufwiesen und von Organismen der langsam wachsenden, acetoklastischen Gattung *Methanosaeta* dominiert wurden, bereits bei vergleichsweise niedriger Hochlast ab $4,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ohne Einleiten von Gegenmaßnahmen übersäuerten (siehe 4.1, 4.8.1). Verfügte die methanogene Lebensgemeinschaft des Biogassystems über eine höhere Diversität mit einer Beteiligung hydrogenotropher Methanogener wie *Methanospirillum* oder *Methanoculleus* und/oder mixotropher Methanogener, wie der säuretoleranten Gattung *Methanosarcina*, blieb der Prozess auch bei hohen Raumbelastungen stabil (siehe 4.4, 4.7, 4.8.2 u. 4.8.3). Conklin et al. (2006) beobachtete ebenfalls, dass bei einer Überfütterung ein *Methanosaeta* dominierter Biogasprozess deutlich weniger Methan produzierte als ein *Methanosarcina* dominierter Prozess. Eine hohe relative Abundanz hydrogenotropher Methanogener bei hohen Raumbelastungen wurde

bereits in vielen Studien beobachtet (Bauer et al. 2009; Lebuhn und Gronauer 2009; Lerm et al. 2012).

Carballa et al. (2015), Goux et al. (2015) und Kampmann et al. (2014) dagegen sehen eine Abnahme der relativen Abundanz von Organismen der Gattung *Methanosaeta* mit gleichzeitiger Zunahme der relativen Abundanz der Gattungen *Methanoculleus* oder *Methanosarcina* als eine Warnung vor einer drohenden Prozessstörung an. Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit sollte dieser Wechsel der dominierenden Gattungen innerhalb der methanogenen Lebensgemeinschaft bei einer Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute eines Biogasprozesses jedoch nicht als Warnung angesehen werden, sondern vielmehr als eine wünschenswerte Anpassung der Biozönose zugunsten einer höheren Prozessstabilität bei hohen Raumbelastungen. Zum einen wird das System durch die deutlich säuretoleranteren und schneller wachsenden Methanogenen resistenter gegenüber Stoßbelastungen und zum anderen sinkt die Gefahr der Auswaschung bei niedrigeren Verweilzeiten, bedingt durch hohe Raumbelastungen (Conklin et al. 2006; Lerm et al. 2012). Außerdem ergibt sich durch die hydrogenotrophe Methanogenese ein alternativer Stoffwechselweg zur Bildung des Methans.

Eine stabile Prozessführung ist demnach am besten mit hochdiversen methanogenen Lebensgemeinschaften mit Anteilen von sowohl acetoklastischen, als auch mixotrophen und hydrogenotrophen Archaea und einer hohen relativen Abundanz syntropher lang- und kurzkettige Fettsäuren abbauender Bacteria möglich. Eine schnelle Zunahme der Abundanz hydrolytisch/acidogener Mikroorganismen infolge einer erhöhten Substratverfügbarkeit ist dagegen schädlich für die Prozessstabilität, weil sie mit einer zu hohen Säureproduktion verbunden ist.

5.3 Vorhersage von Prozessstörungen in NawaRo-Biogasanlagen

Die Prozessstabilität von Biogasanlagen hängt erheblich vom Gleichgewicht der Aktivität der säureproduzierenden und säureabbauenden Mikroorganismen ab. Das macht den Prozess störanfällig, denn die unzähligen Interaktionen zwischen den einzelnen Organismen sind bisher nur unzureichend erforscht und unter Umständen sogar in jedem System, aufgrund unterschiedlicher mikrobieller Zusammensetzungen, einzigartig. Für eine sichere und bedarfsgerechte

Energiebereitstellung sind jedoch robuste, effektive und nach Möglichkeit allgemeingültige Indikatoren und Monitoringsysteme zur Vorhersage von Prozessstörungen unabdingbar.

Der pH-Wert erwies sich zur Vorhersage von Prozessstörungen, obwohl er einen direkten Einfluss auf die Stoffwechselrate der einzelnen Mikroorganismen hat, als ungeeignet für Frühwarnsysteme. In dieser Arbeit sank der pH-Wert erst unter 7 als bereits eine Störung anhand sinkender Methanausbeuten erkennbar war (Tab. 4). Aufgrund verschiedener chemischer Puffer im System wird eine Warnung zumeist erst dann durch ein Absinken unter pH 7 angezeigt, wenn das System bereits nachhaltig gestört wurde (Kleyböcker et al. 2012b; Rieger und Weiland 2006; Weiland 2008).

Vor allem in Deutschland hat sich der FOS/TAC als Parameter für die Vorhersage von Prozessstörungen etabliert (siehe 2.3.2) (Lebuhn et al. 2014; McGhee 1968; Rieger und Weiland 2006; Voß et al. 2009; Weiland 2008). Er beschreibt das Verhältnis aus der Konzentration flüchtiger organischer Säuren (FOS) und der Pufferkapazität (TAC) (Nordmann 1977). Bei einer Prozessstörung steigt die Säurekonzentration und der Puffer wird verbraucht. Dies führt zu einem Anstieg des FOS/TAC-Wertes. Die Vorteile des FOS/TAC liegen v. a. in der einfachen und kostengünstigen Durchführung der Messung. Mit Hilfe von automatischen Titratoren kann die Messung direkt vor Ort durch das Anlagenpersonal durchgeführt werden. Auch für die FOS/TAC-Bestimmung dieser Arbeit wurde ein automatischer Titrator erfolgreich eingesetzt. Jedoch sollten der FOS und TAC nicht einzeln betrachtet werden, da die Bestimmung beider Parameter durch Titration sehr ungenau ist (Purser et al. 2014; Voß et al. 2009). Für eine Beurteilung des tatsächlichen Prozesszustandes kann somit nur der anlagenspezifische, qualitative Verlauf des FOS/TAC-Wertes herangezogen werden.

In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchsreihen war der FOS/TAC-Wert nicht der beste Frühwarnindikator. Bei den Übersäuerungsversuchen (siehe 4.1) warnte er nur am zweitfrühesten (Tab. 4). Bei den Versuchen zur Hochlast-Co-Vergärung (siehe 4.4) zeigte der FOS/TAC in einem Versuch gar keine Warnung und im zweiten Versuch nur ein leichtes Warnsignal, obwohl die anderen untersuchten Parameter eindeutig vor drohenden Prozessstörungen warnten und deren Warnungen mit deutlichen Schwankungen in der Biogasausbeute einhergingen. Bei den

Entsäuerungsversuchen zeigte sich zudem, dass die Titration zur Bestimmung des FOS/TAC-Wertes erheblich von Eisen(III)hydroxid-haltigen Additiven beeinflusst wird (siehe 4.3). Speziell verfälschte bei hoher Dosierung das Additiv FerroSorp DG die Titration zur Bestimmung des FOS-Wertes, sodass deutlich erhöhte Säurewerte angezeigt wurden. Auch in früheren Studien wurde gezeigt, dass der FOS/TAC-Wert im Vergleich zu anderen Parameter nicht immer am frühesten vor einer drohenden Prozessstörung warnt und hohe Ammoniumkonzentrationen die Titration beeinflussen können (Bauer et al. 2011; Rieger und Weiland 2006).

Kleyböcker et al. (2012b) entwickelten zwei FWI für die Vergärung von Klärschlamm mit organischen Abfällen bzw. fett- und ölhaltigen Co-Substraten, den FWI-VFA/Ca und den FWI-P/Ca (siehe 2.3.2). Der Warnmechanismus dieser FWI beruht auf der Akkumulation langkettiger Fettsäuren im Falle einer drohenden Prozessstörung. Die langkettigen Säuren fallen mit gelöstem Calcium aus, sodass die Calciumkonzentration abnimmt. Das Calcium fungiert in dem Fall als eine Art „Puffer“ für langkettige Fettsäuren. Die steigende Säurekonzentration und sinkende Calciumkonzentration bewirken einen Anstieg des FWI-VFA/Ca.

Wird Klärschlamm aus Kläranlagen mit einer zusätzlichen Stufe zur biologischen Phosphateliminierung vergoren, eignet sich außerdem die Phosphatkonzentration als Indikator. Im Schlamm enthaltene Phosphat-akkumulierende Mikroorganismen geben im Falle steigender Säurekonzentrationen Phosphat an den Schlamm ab, wodurch die Phosphatkonzentration und damit auch der Wert des FWI-P/Ca steigen.

Beide FWI zeigen bei etwa einer Verdopplung des Ausgangswertes eine drohende Prozessstörung an. Vor allem der FWI-VFA/Ca hat sich in verschiedenen Studien als belastbarer FWI für Biogassysteme erwiesen, die lipidhaltige Co-Substrate vergären (Kleyböcker et al. 2014; Lienen et al. 2013; Lienen et al. 2014a).

Auch in den Öl-Co-Vergärungsversuchen dieser Arbeit (siehe 4.5 – 4.7) warnte der FWI-VFA/Ca verlässlich und frühzeitig vor drohenden Prozessstörungen. Bei der alleinigen Vergärung typischer NawaRo-Substrate (Maissilage und Rindergülle) hingegen warnte der FWI weniger sensitiv vor drohenden Prozessstörungen, da bei diesen Versuchen die charakteristische Abnahme der Calciumkonzentration vor einer drohenden Prozessstörung ausblieb (siehe 4.1). In typischen NawaRo-Substraten ist der Lipidgehalt zu gering und die natürliche Calciumkonzentration zu hoch, um im Falle einer Betriebsstörung eine Akkumulation langkettiger Fettsäuren und damit eine Abnahme der Calciumkonzentration auszulösen. In einem Versuch zur

Übersäuerung (ÜberV 1) stieg die Phosphatkonzentration bereits früh an, sodass der FWI-P/Ca am frühesten vor der Übersäuerung warnte. Generell konnte auch in den anderen beiden Übersäuerungsversuchen eine Zunahme der Phosphatkonzentration beobachtet werden. Das Phosphat nahm dabei vermutlich durch Rücklösung von Phosphatverbindungen im Schlamm durch ein Absinken des pH-Wertes zu (siehe 4.1).

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein neuer FWI für NawaRo-Biogasanlagen entwickelt (siehe 4.1). In den Übersäuerungsversuchen wurde beobachtet, dass für pH-Werte zwischen 6,5 und 8 bei abnehmender Gesamtpufferkapazität bzw. abnehmender Carbonatkonzentration, auch die elektrische Leitfähigkeit des Gärschlammes abnimmt. Da dieser Effekt bereits früher beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass in typischen NawaRo-Biogasanlagen eine Abhängigkeit zwischen der Pufferkapazität und der Leitfähigkeit besteht (Wiese und Knig 2008). Das zwischen pH 6,5 und 8 hauptsächlich als geladenes HCO_3^- vorliegende, gelöste Carbonat macht offenbar einen großen Anteil an der Gesamtleitfähigkeit des NawaRo-Schlammes aus. Bei steigenden Säurekonzentrationen und abnehmendem pH-Wert verschiebt sich das chemische Gleichgewicht des Carbonats in Richtung der ungeladenen Reaktionsprodukte CO_2 und H_2O , wodurch die Leitfähigkeit sinkt (Hecht 2009; McCarty 1964). Diese Entdeckung wurde genutzt, um einen neuen Frühwarnindikator für NawaRo-Biogasanlagen zu entwickeln, den *A/elCon*. Der **A/elCon** ist das Verhältnis aus der Konzentration der org. Säuren (engl.: organic Acids), die im Falle einer Prozessstörung ansteigt und der vom Puffer abhängigen elektrischen Leitfähigkeit (engl.: **e**lectrical **C**onductivity). Der *A/elCon* zeigte eine drohende Prozessstörung durch eine Erhöhung des Wertes im Vergleich zum stabilen Betrieb um das 1,5-fache an.

Der *A/elCon* wurde in dieser Arbeit in insgesamt zwölf Versuchen erfolgreich zur Vorhersage von Prozessstörungen verwendet. Dabei hat er in den Übersäuerungsversuchen, mit Ausnahme von ÜberV 1 (s. o.), am frühesten vor einer drohenden Prozessstörung gewarnt (siehe 4.1, Tab. 4). In den Hochlastversuchen zeigte er 60 % häufiger eine drohende Prozessstörung an als der für NawaRo-Vergärungen etablierte FOS/TAC-Indikator (siehe 4.4) und in den Entsäuerungsversuchen wurde die Messung im Gegensatz zum FOS/TAC-Indikator nicht durch die eingesetzten Additive verfälscht (siehe 4.3). In den Versuchsreihen zur Co-Vergärung von NawaRo mit Rapsöl zeigte sich, dass der *A/elCon* genauso

effektiv und frühzeitig vor drohenden Prozessstörungen warnt, wie die für die Co-Vergärung lipidhaltiger Co-Substrate entwickelten FWI-VFA/Ca und FWI-P/Ca (siehe 4.5 u. 4.6). Der A/elCon eignet sich somit im Gegensatz zu FWI-VFA/Ca und FWI-P/Ca sowohl für die alleinige Vergärung typischer NawaRo-Substrate, als auch für die Co-Vergärung von NawaRo mit lipidhaltigen Co-Substraten. In einer weiteren Versuchsreihe (GroßV) wurde getestet, ob der A/elCon auch in der Praxis als Frühwarnindikator verwendet werden kann (siehe 4.2). Dabei zeigte er an einer großtechnischen einstufigen Biogasanlage bereits zwei Tage nach Erhöhung der Raumbelastung um lediglich 6,3 % eine Warnung an, die mit einer Abnahme der Energieausbeute einherging. Der FOS/TAC-Wert zeigte im Gegenzug einen stabilen Prozess an. Der A/elCon eignet sich damit nicht nur im Labormaßstab zur Anzeige der Gefahr einer möglichen Prozessstörung, sondern auch im Praxisbetrieb.

Einer der größten Vorteile des A/elCon im Vergleich zu den heute bereits etablierten FWI ist seine potentielle online-Messbarkeit. Die online-Messung der Leitfähigkeit ist bereits heute Stand der Technik und wird beispielsweise in der Abwasserreinigung eingesetzt (Vanrolleghem und Lee 2003). Online-Messsysteme zur Bestimmung der Säurekonzentration werden derzeit entwickelt. Dabei wird sowohl an optischen Messmethoden mittels Infrarotspektroskopie im nah- und mittelinfraroten Bereich geforscht, als auch an automatisierten Titrationsvorrichtungen (Boe et al. 2007; Boe et al. 2010; Falk et al. 2015; Stockl et al. 2010). In Zukunft wird der A/elCon somit online-messbar sein und damit das Anlagen-Monitoring im Vergleich zu den bestehenden Möglichkeiten entscheidend verbessern, sodass Energie aus Biogasanlagen nicht nur deutlich sicherer, sondern auch bedarfsgerechter bereitgestellt werden kann.

5.4 Möglichkeiten der Leistungssteigerung von NawaRo-Biogasanlagen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl eine schnelle Steigerung der Raumbelastung als auch die Aufrechterhaltung eines Hochlastbetriebes bei der Vergärung typischer NawaRo-Substrate durch Zugabe von mineralischen Additiven möglich sind. Im Gegensatz zu den Prozessen in den Übersäuerungsversuchen (siehe 4.1) blieben die Prozesse in den NawaRo-Hochlastversuchen (siehe 4.4) trotz deutlich höherer Raumbelastungen stabil, wenn Additive im Falle einer drohenden

Prozessstörung zugegeben wurden. Dabei war die Art des mineralischen Additivs zur Vermeidung einer Übersäuerung von geringerer Bedeutung.

Nichtsdestotrotz zeigte sich in den Versuchen zur Prozessstabilisierung (siehe 4.3) und in den NawaRo-Hochlastversuchen (siehe 4.4), dass sich die Additive CaO und insbesondere die Spurenelementmischung EnviTal constant in Kombination mit NaOH besser zur Prozessstabilisierung eigneten, weil mit diesen Additiven die Prozesse am schnellsten stabilisiert wurden und höhere Raumbelastungen gefahren werden konnten als mit den anderen getesteten Additiven.

CaO wurde bereits in früheren Studien erfolgreich zur Stabilisierung von Biogassystemen eingesetzt, die fett- und ölhaltige Substrate co-vergären. Zum einen hob das basisch reagierende CaO erfolgreich den pH-Wert an (Marchaim und Krause 1993), zum anderen fiel Calcium mit langkettigen Fettsäuren aus, sodass prozessstabilisierende Aggregate entstanden (Kleyböcker et al. 2012a; Kleyböcker et al. 2014; Koster 1987; Liebrich et al. 2016) (siehe 2.3.3). Aufgrund des geringen Lipidanteils in typischen NawaRo-Substraten konnte in den Versuchen zur Prozessstabilisierung jedoch keine Aggregatbildung beobachtet werden. Da im NawaRo-Schlamm viele Pflanzenbestandteile enthalten sind, die eine große Oberfläche für Biofilmbildung darstellen, war vermutlich die pH-Wert anhebende Wirkung erheblich für die Prozessstabilisierung verantwortlich. Die Beobachtung, dass unterschiedliche mineralische Additive ähnliche stabilisierende Effekte auf Biogasprozesse haben, machten auch Heuwinkel et al. (2009). Sie führten den stabilisierenden Effekt der Additive auf zum Teil unspezifische Wirkungen zurück, beispielsweise auf deren große Oberfläche zur Biofilmbildung oder auf deren Fähigkeit zur Adsorption toxischer Verbindungen. Neben der alkalischen Wirkung des CaO könnten demnach auch die von Heuwinkel et al. (2009) beschriebenen unspezifischen Wirkungen zur Prozessstabilisierung bei CaO-Zugabe beigetragen haben.

Sowohl in Versuchen zur Prozessstabilisierung als auch in den Hochlastversuchen eignete sich die Spurenelementmischung EnviTal constant in Kombination mit NaOH am besten zur Stabilisierung eines NawaRo-Prozesses (siehe 4.3 u. 4.4). Ähnlich wie das CaO (s. o.) stabilisierte das NaOH den Prozess durch Anhebung des pH-Wertes (Strik et al. 2006). In früheren Studien und in den Hochlastversuchen wurde jedoch gezeigt, dass eine NaOH-Zugabe alleine den Prozess nicht nachhaltig stabilisiert

(Kleyböcker et al. 2012a). Die Spurenelementzugabe muss demnach erheblich zur Stabilisierungsleistung beigetragen haben. Generell sind Spurenelemente essentiell für die Stoffwechselfvorgänge der Mikroorganismen. Über das Substrat gelangen sie in den Fermenter. Speziell die Methanogenen benötigen u. a. Kobalt, Molybdän, Nickel und Selen für viele Stoffwechselfvorgänge und für den Aufbau verschiedener Co-Faktoren (Bauer et al. 2009; Demirel und Scherer 2011; Lebuhn und Gronauer 2009; Scherer et al. 1983). Nickel wird beispielsweise als Zentralatom im Co-Faktor F₄₃₀ benötigt, einem entscheidenden Molekül bei der Methanogenese. Vor allem in NawaRo-Monovergärungen von z. B. Maissilage oder Rübensilage wurden Prozessstörungen aufgrund von Spurenelementmangel beobachtet, aber auch Fälle von Spurenelementmangel in Gülle co-vergärenden Anlagen sind bekannt (Bauer et al. 2009). Wie in dieser Arbeit beobachtet, fördert die manuelle Zugabe von Spurenelementen jedoch nicht nur in Systemen mit einem Spurenelementmangel, sondern auch in Systemen mit hohen Raumbelastungen die Aktivität der archaeellen Gemeinschaft und deren Anpassung an höhere Säurekonzentrationen.

Trotz unterschiedlicher mineralischer Additive zeigten die mikrobiellen Lebensgemeinschaften in den NawaRo-Hochlastversuchen eine sehr ähnliche Veränderung in ihrer Zusammensetzung über die Zeit (siehe 4.8.2). Daher wird vermutet, dass es einen zusätzlichen, gemeinsamen Wirkmechanismus gibt, der bei Zugabe von mineralischen Additiven den Prozess stabilisiert. Im Gegensatz zu den Übersäuerungsversuchen passten sich die Lebensgemeinschaften an die höheren Raumbelastungen an, wenn die Steigerung der Raumbelastung durch die Zugabe von Additiven unterstützt wurde. Dies zeigte sich vor allem dadurch, dass die relative Abundanz säuretolanterer und hydrogenotropher Methanogener deutlich zunahm (vgl. Abb. 35 u. 40). Ohne die Zugabe von mineralischen Additiven und deren stabilisierende Eigenschaften scheint diese Anpassung der mikrobiellen Gemeinschaften langsamer zu verlaufen, was zu einer Übersäuerung des Biogasprozesses führen kann (siehe 4.1). Eine Hypothese zum Wirkmechanismus der Additive ist, dass durch die Zugabe mehrwertiger Kationen die Verfügbarkeit von Spurenelementen erhöht wurde. Für die Mikroorganismen ist nicht nur die absolute Konzentration an Spurenelementen im Schlamm entscheidend, sondern auch deren Verfügbarkeit. Hohe pH-Werte und/oder hohe Konzentrationen an Phosphat, Sulfid, Sulfat oder Carbonat können zu einer Fällung von Spurenelementen führen und somit deren Verfügbarkeit herabsetzen. In solchen Fällen hat sich in früheren Studien

eine manuelle Zugabe von Spurenelementen positiv auf die Prozessstabilität ausgewirkt (Facchin et al. 2013; Zhang und Jahng 2012). Die Zugabe von mehrwertigen Kationen in Form von mineralischen Additiven könnte in den Hochlastversuchen die Fällung von Spurenelementen reduziert haben, in dem diese Kationen zum Teil statt der Spurenelemente mit Anionen, wie Phosphat, Sulfid, Sulfat oder Carbonat ausfielen. Dadurch könnte die Verfügbarkeit der Spurenelemente erhöht worden sein. Letztlich wäre die Stabilisierung in allen Prozessen auf eine Verbesserung der Wachstumsbedingungen der Methanogenen durch erhöhte Spurenelementverfügbarkeit zurückzuführen. Dies würde die sehr ähnlichen Veränderungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in den Hochlastversuchen erklären, obwohl unterschiedliche Additive zum Einsatz kamen.

Bei der Leistungssteigerung typischer NawaRo-Systeme (Gülle- und Silagevergärend) sollte die hydraulische Verweilzeit einen Wert von 20 Tagen nicht unterschreiten, um eine Auswaschung von prozessrelevanten Mikroorganismen zu vermeiden. Dadurch ergibt sich je nach Substratzusammensetzung und dem damit verbundenen oTS-Gehalt eine natürliche Leistungsgrenze, da mit steigender Raumbelastung die Verweilzeit abnimmt (siehe 2.2.2). In den NawaRo-Hochlastversuchen dieser Arbeit lag diese Leistungsgrenze bei einer Raumbelastung von $7,5 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

Eine weitere Steigerung ist jedoch möglich, wenn ein Teil des Substrates durch deutlich energiereichere fett- und ölhaltige Co-Substrate substituiert wird. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass damit die Biogasproduktion und der Methangehalt des Biogases deutlich gesteigert werden können (Mata-Alvarez et al. 2014). Durch CaO-Zugabe können Systeme, die Klärschlamm mit fett- und ölhaltigen Substraten bei hohen Raumbelastungen co-vergären, durch Aggregatbildung stabilisiert werden (Kleyböcker et al. 2012a; Kleyböcker et al. 2014; Liebrich et al. 2016).

Diese Aggregatbildung und eine damit verbundene Stabilisierung des Prozesses fanden auch bei der Co-Vergärung von NawaRo mit fett- und ölhaltigen Substraten statt. In einer der Versuchsreihen zur Co-Vergärung von NawaRo mit Pflanzenöl fand sie aufgrund der natürlicherweise hohen Calciumkonzentration im NawaRo-Schlamm sogar ohne Zugabe von CaO statt (siehe 4.5). In weiteren Versuchen zur Co-Vergärung von NawaRo mit Pflanzenöl wurde zudem gezeigt, dass ein solcher

Prozess auch bei hohen Raumbelastungen durch Zugabe von CaO stabilisiert werden kann und auch dabei die prozessstabilisierende Aggregatbildung stattfindet (siehe 4.6). Ähnlich wie in den Versuchen zur alleinigen Hochlastvergärung typischer NawaRo (siehe 4.4) eignete sich die zusätzliche Zugabe der EnviTal-Spurenelementmischung noch etwas besser, um den Prozess stabil zu halten. In diesem Fall profitierte der Prozess nicht nur von der stabilisierenden Wirkung der Aggregate und der pH-Wert anhebenden Wirkung des CaO, sondern auch von der aktivitäts-/wachstumsfördernden Wirkung der Spurenelemente auf die methanogenen Archaea (s. o.).

Bei der Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung von fett- und ölhaltigen Substraten und Klärschlamm wurde eine deutliche Dominanz der hydrogenotrophen Gattung *Methanospirillum* in den Aggregaten und eine deutliche Zunahme der relativen Abundanz von syntrophen Organismen der Gattung *Syntrophomonas* nachgewiesen (siehe 4.8.3). Syntrophe Bacteria bauen Fettsäuren ab und leben dazu in einer engen Wechselbeziehung mit hydrogenotrophen Archaea, der Syntrophie, denn der Fettsäureabbau ist unter anaeroben Bedingungen aus energetischen Gründen nur bei sehr niedrigen Wasserstoffpartialdrücken möglich. Der Wasserstoff dient den hydrogenotrophen Methanogenen als Substrat und wird direkt weiter verwertet. Die Biofilmbildung und damit die Fixierung der Mikroorganismen in und auf den Aggregaten begünstigt die syntrophe Lebensweise, da durch die räumliche Nähe der Wasserstoffproduzenten zu den Wasserstoffkonsumenten der Transport vereinfacht wird (Bauer et al. 2009). Dadurch bilden beide Organismen eine hocheffektive fettsäureabbauende, syntrophe Lebensgemeinschaft. Die Ausbildung dieser fettsäureabbauenden Gemeinschaften fand dabei vermutlich hauptsächlich in Form von Biofilmen in den Aggregaten statt, innerhalb derer die Mikroorganismen vor Scherung oder toxischen Substanzen im Schlamm geschützt waren (Liebrich et al. 2016; Ward et al. 2008). Dafür sprechen auch der hohe Fettsäureanteil in den Aggregaten und damit das hohe Substrataufkommen für fettsäureabbauende Lebensgemeinschaften.

Bereits Roy et al. (1985) erkannten, dass bei der Zugabe von Calciumsalzen zu Biogassystemen, die lipidhaltige Co-Substrate vergären, Aggregate entstehen, innerhalb derer sich fettsäureabbauende, syntrophe, mikrobielle Lebensgemeinschaften ausbilden. Diese Gemeinschaften bestanden ebenfalls aus

methanogenen Organismen der Gattung *Methanospirillum* und fettsäureoxidierenden Organismen der Gattung *Syntrophomonas*.

Kleyböcker et al. (2012a, 2014) und Liebrich et al. (2016) nutzten die Aggregatbildung zur Leistungssteigerung und erkannten, dass die fettsäureabbauenden Gemeinschaften in den Mikrohabitaten der Aggregate geschützt sind und trotz toxischer Prozessbedingungen in Bezug auf den pH-Wert und den Wasserstoffpartialdruck im Fermenter weiter Biogas produzieren. Die Aggregate fungierten dabei als Aufwuchskörper für Biofilme und förderten die Ausbildung syntropher, fettsäureabbauender Biozönosen. Zusätzlich stabilisierten sie den Prozess durch Festlegung langkettiger Fettsäuren.

In dieser Arbeit wurde nun erstmals mit den Ergebnissen der GC-MS-Analyse bewiesen, dass die Aggregate neben dem Calcium im Wesentlichen aus langkettigen Fettsäuren bestehen und damit aus Abbauprodukten des Pflanzenöls (siehe 4.5). Es wird außerdem vermutet, dass es sich bei der Aggregatbildung weniger um eine klassische Ausfällung, sondern vielmehr um eine Kristallisation flüssigkeitsähnlicher Kolloide handelt, die emulsionsartige Gele bilden und durch Destabilisierung verfestigt werden (Schröder et al 2018, Schlussbericht zum Projekt ProGas). Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen zeigen die enge Assoziation von Calcium, langkettigen Fettsäuren und Biofilmen (siehe 4.5 und 4.6). Innerhalb der Biofilme verstoffwechseln die Mikroorganismen die Fettsäuren, sodass die Aggregate nach der Prozessstabilisierung wieder vollständig abgebaut werden (siehe 4.6). Die Aggregate wirken dadurch neben ihrer Funktion als Aufwuchskörper für Hochleistungsbiozönosen wie ein „Puffer“ für langkettige Fettsäuren.

Somit tragen die Aggregate und deren fettsäureabbauende Hochleistungsbiozönosen erheblich zur Aufrechterhaltung der Prozessstabilität bei der Co-Vergärung lipidhaltiger Substrate bei und ermöglichen die Etablierung einer Hochlast-Co-Vergärung auch über lange Zeiträume.

In den Versuchen zur Hochlast-Vergärung in einstufigen NawaRo-Systemen (siehe 4.4 und 4.6) wurde stets der in den Übersäuerungsversuchen neu entwickelte Frühwarnindikator A/eICon zum Prozess-Monitoring und zur Steuerung der Additivzufuhr verwendet. Im Vergleich zu den anderen Frühwarnindikatoren eignete sich dieser Parameter in den genannten Versuchen am besten zur Vorhersage von Prozessstörungen und Steuerung der Additivzugabe.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Raum-Zeit-Ausbeute für eine bedarfsgerechtere Biogasproduktion in einstufigen NawaRo-Biogasanlagen durch Erhöhung der Raumbelastung und/oder Co-Vergärung fett- und ölhaltiger Substrate mit dem A/eICon zur Überwachung des Prozesszustandes und im Bedarfsfall mit Zugabe der Spurenelementmischung EnviTal constant in Kombination mit NaOH sicher gesteigert werden kann. CaO eignete sich ebenfalls gut zur Prozessstabilisierung und sollte im Falle einer Co-Vergärung fett- und ölhaltiger Substrate im Bedarfsfall zur Bildung prozessstabilisierender Aggregate zugegeben werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine temporäre Co-Vergärung von ölhaltigen Substraten in NawaRo-Biogasanlagen unter Zugabe von CaO dazu genutzt werden könnte, die Raum-Zeit-Ausbeute schnell und nachhaltig zu steigern. Die daraus resultierende Aggregatbildung würde dazu beitragen, gezielt mikrobielle Hochleistungsbiozöten im Fermenter anzureichern. Die temporäre Substitution eines Teils des Substrates durch Pflanzenöl verringert den Effekt, dass mit Erhöhung der Raumbelastung die Verweilzeit abnimmt. Dadurch würden weniger Mikroorganismen austragen werden als bei einer Erhöhung der Raumbelastung durch klassische NawaRo. Der verringerte Austrag und die Aggregatbildung könnten dazu beitragen, dass sich die Biozönose schnell an höhere Raumbelastungen anpassen kann. Dieses Verfahren sollte jedoch in weiteren Versuchsreihen validiert werden. Derzeit ist der Einsatz von Pflanzenöl in NawaRo-Anlagen aus genehmigungsrechtlichen Gründen allerdings nur schwer umzusetzen.

6. Zusammenfassung

Zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute in einstufigen NawaRo-Biogasanlagen wurden verschiedene Untersuchungen zur Verbesserung des Anlagen-Monitorings, zur Entwicklung von Maßnahmen zur Prozessstabilisierung und zur Anpassung der Substratzusammensetzung durchgeführt.

Bei der Untersuchung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften zeigte sich, dass das klassische DNA-basierte Fingerprintverfahren DGGE geeignet war, um die dominanten Vertreter der bakteriellen Biozönose zu charakterisieren. Im Vergleich ergab die PCR-unabhängige Metagenomanalyse mittels Hochdurchsatzsequenzierung ein detaillierteres Bild der bakteriellen Gemeinschaft. Obwohl mit der Metagenomanalyse insgesamt sogar 10-mal so viele Phyla detektiert wurden wie mit der DGGE, war die Kernaussage, dass mit steigender Raumbelastung die relative Abundanz von Acidogenen und speziell von potentiellen Milchsäureproduzenten zunahm, mit beiden Methoden identisch.

Mit Hilfe gezielter Überfrachtungen von Biogasprozessen, die zu Übersäuerungen führten, wurde ein neuer Frühwarnindikator für Prozessstörungen in NawaRo-Biogasanlagen entwickelt, der A/eICon. Der A/eICon ist das Verhältnis aus der Konzentration der organischen Säuren zur elektrischen Leitfähigkeit und zeigte im Vergleich zu anderen FWI sowohl im Labor-, als auch im Industriemaßstab am sichersten und effektivsten drohende Prozessstörungen an. Aufgrund seiner in naher Zukunft möglichen online-Messbarkeit hat der A/eICon das Potential das Monitoring von Biogasanlagen entscheidend zu verbessern.

In Versuchen zur Entsäuerung übersäuerter NawaRo-Prozesse wurde zudem die Kombination aus der EnviTal-Spurenelementmischung und NaOH als eine effektive Additivkombination erkannt, die sich am besten eignete, um den Prozess zu stabilisieren. Auch mit CaO wurde der Prozess effektiv stabilisiert. Die Stabilisierung dauerte geringfügig länger und es war mehr Additiv nötig.

Die Additivkombination aus EnviTal und NaOH eignete sich ebenfalls am besten zur Stabilisierung von NawaRo-Langzeit-Hochlastvergärungen ($t > 100$ d; $B_R > 4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$), wenn sie im Falle einer drohenden Prozessstörung zugegeben wurde, angezeigt durch den FWI A/eICon. Grundsätzlich wurde eine

Übersäuerung auch durch Zugabe anderer Additive vermieden, jedoch wurde dabei weniger Biogas produziert.

Im Unterschied zur Steigerung der Raumbelastung ohne Additivzugabe passen sich die mikrobiellen Lebensgemeinschaften mit Additivzugabe besser an die sich ändernden Prozessbedingungen bei hohen Raumbelastungen an. Generell nahm mit steigender Raumbelastung die relative Abundanz säureproduzierender Bacteria zu. Im Vergleich zu Systemen ohne Additivzugabe wurde jedoch durch die Zugabe von Additiven eine Zunahme der relativen Abundanz von hydrogenotrophen und säuretoleranten, mixotrophen methanogenen Archaea der Gattungen, *Methanoculleus*, *Methanosarcina* und *Methanospirillum* begünstigt, was die Prozesse stabilisierte.

Die Raum-Zeit-Ausbeute in NawaRo-vergärenden Biogassystemen wurde durch Co-Vergärung von Rapsöl noch weiter gesteigert. Die aus Abfallbiogasanlagen bekannte prozessstabilisierende Aggregatbildung fand sogar ohne Zugabe von CaO statt. Dabei fiel Calcium mit langkettigen Fettsäuren aus und schaffte Oberflächen zur Biofilmbildung, was eine stabilisierende Wirkung auf den Prozess hatte.

Auch eine Hochlast-Co-Vergärung von NawaRo und Rapsöl wurde mit Hilfe der Aggregatbildung erfolgreich etabliert, bei der die Zugabe des CaO mit dem neuen FWI A/elCon gesteuert wurde. Eine zusätzliche Zugabe der Spurenelementmischung aus EnviTal constant führte zu einer noch höheren Prozessstabilität.

In einem Referenzversuch, bei dem Klärschlamm mit Rapsöl co-vergoren wurde, konnte zudem gezeigt werden, dass mit Hilfe von CaO-Zugaben zur Aggregatbildung auch eine stabile Langzeit-Hochlast-Co-Vergärung ($t > 100$ d; $B_R > 4$ kg oTS $m^{-3} d^{-1}$) etabliert werden kann. Dabei zeigte sich innerhalb der Aggregate eine deutliche Dominanz hydrogenotropher Archaea der Gattung *Methanospirillum*, den syntrophen Partnern fettsäureoxidierender Bacteria, wie Organismen der Gattung *Syntrophomonas*. Deren relative Abundanz nahm bei steigender Raumbelastung und damit steigenden Ölfrachten deutlich zu. Die Ausbildung dieser hocheffektiven fettsäureabbauenden syntrophen Gemeinschaft wurde durch die Aggregate als Aufwuchskörper stark begünstigt und trug entscheidend zur Prozessstabilität bei.

7. Literaturverzeichnis

- Achnich C, Bak F, Conrad R (1995) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biology and Fertility of Soils* 19(1):65-72
- Akkermans AD, Mirza MS, Harmsen HJ, Blok HJ, Herron PR, Sessitsch A, Akkermans WM (1994) Molecular ecology of microbes: A review of promises, pitfalls and true progress. *FEMS Microbiology Reviews* 15(2-3):185-194
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3):403-10
- Bae J-W, Lee S-T (1999) Layered structure of UASB granules gives microbial populations resistance to toxic chemicals. *Biotechnology letters* 21(2):159-162
- 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
- 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. LfL
- Bauer C, Munk B, Lebuhn M, Gronauer A (2011) Shifting of the microbiology in biogas fermenters digesting renewable resources—causes and consequences. *Landtechnik* 66(1):46-49
- Boe K, Batstone DJ, Angelidaki I (2007) An innovative online VFA monitoring system for the anaerobic process, based on headspace gas chromatography. *Biotechnology and bioengineering* 96(4):712-721
- Boe K, Batstone DJ, Steyer J-P, Angelidaki I (2010) State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. *Water research* 44(20):5973-5980
- Boušková A, Dohanyos M, Schmidt JE, Angelidaki I (2005) Strategies for changing temperature from mesophilic to thermophilic conditions in anaerobic CSTR reactors treating sewage sludge. *Water Research* 39(8):1481-1488
- Brade W, Distl O (2015) Das ruminale Mikrobiom des Rindes Teil 2: Archaeen - Substratspezialisten im Pansenmikrobiom. *Berichte über Landwirtschaft-Zeitschrift für Agrarpolitik und Landwirtschaft* 93(3)
- Bunge J, Willis A, Walsh F (2014) Estimating the number of species in microbial diversity studies. *Annual Review of Statistics and Its Application* 1:427-445
- Burgstaler J, Wiedow D, Godlinski F, Kanswohl N (2011) Einsatz von Natriumhydrogencarbonat in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. *Landbauforschung-vTI Agriculture and Forestry Research* 4:343-352
- Campanaro S, Treu L, Kougias PG, Francisci D, Valle G, Angelidaki I (2016) Metagenomic analysis and functional characterization of the biogas microbiome using high throughput shotgun sequencing and a novel binning strategy. *Biotechnology for biofuels* 9(1):26
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal* 6(8):1621
- Carballa M, Regueiro L, Lema JM (2015) Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current opinion in biotechnology* 33:103-111
- Chen H, Wan J, Chen K, Luo G, Fan J, Clark J, Zhang S (2016) Biogas production from hydrothermal liquefaction wastewater (HTLWW): Focusing on the microbial communities as revealed by high-throughput sequencing of full-length 16S rRNA genes. *Water research* 106:98-107

- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen A, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM (2008) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research* 37(suppl_1):D141-D145
- Conklin A, Stensel HD, Ferguson J (2006) Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. *Water Environment Research* 78(5):486-496
- Dalmau J, Comas J, Rodríguez-Roda I, Pagilla K, Steyer J-P (2010) Model development and simulation for predicting risk of foaming in anaerobic digestion systems. *Bioresource technology* 101(12):4306-4314
- DBFZ (2012) Messmethodensammlung Biogas: Methoden zur Bestimmung von analytischen und prozessbeschreibenden Parametern im Biogasbereich. Leipzig: Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH (DBFZ)
- de Araújo JC, Schneider RP (2008) DGGE with genomic DNA: suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms. *Water research* 42(20):5002-5010
- de Menezes AB, Lewis E, O'Donovan M, O'Neill BF, Clipson N, Doyle EM (2011) Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS microbiology ecology* 78(2):256-265
- De Vrieze J, Hennebel T, Boon N, Verstraete W (2012) *Methanosarcina*: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource technology* 112:1-9
- Delcenserie V, Gavini F, China B, Daube G (2011) *Bifidobacterium pseudolongum* are efficient indicators of animal fecal contamination in raw milk cheese industry. *BMC microbiology* 11(1):178
- Demirel B, Scherer P (2008) The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 7(2):173-190
- 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
- Effenberger M, Lebuhn M Repowering von Biogasanlagen zur Steigerung der Prozesseffizienz. In: *Biogas in Der Landwirtschaft-Stand und Perspektiven, FNR/KTBL-Kongress am, 2011. vol 20. p 21*
- ETI B (2011) *Biogas in der Landwirtschaft - Leitfaden für Landwirte im Land Brandenburg.*
- Facchin V, Cavinato C, Fatone F, Pavan P, Cecchi F, Bolzonella D (2013) Effect of trace element supplementation on the mesophilic anaerobic digestion of foodwaste in batch trials: the influence of inoculum origin. *Biochemical Engineering Journal* 70:71-77
- Fadhlaoui K, Ben Hania W, Armougom F, Bartoli M, Fardeau ML, Erauso G, Brasseur G, Aubert C, Hamdi M, Brochier-Armanet C (2018) Obligate sugar oxidation in *Mesotoga* spp., phylum Thermotogae, in the presence of either elemental sulfur or hydrogenotrophic sulfate-reducers as electron acceptor. *Environmental microbiology* 20(1):281-292
- Falk HM, Reichling P, Andersen C, Benz R (2015) Online monitoring of concentration and dynamics of volatile fatty acids in anaerobic digestion processes with mid-infrared spectroscopy. *Bioprocess and biosystems engineering* 38(2):237-249
- Ferry JG, Smith PH, Wolfe R (1974) *Methanospirillum*, a New Genus of Methanogenic Bacteria, and Characterization of *Methanospirillum hungatii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 24(4):465-469
- FNR (2013) *Leitfaden Biogas – Von der Gewinnung zur Nutzung. Gülzow, Germany 6*
- FNR (2016a) *Basisdaten Bioenergie Deutschland 2016.*
- FNR (2016b) *Leitfaden Biogas – Von der Gewinnung zur Nutzung. Gülzow, Germany 7*

- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ (2008) Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology* 74(8):2461-2470
- Ganidi N, Tyrrel S, Cartmell E (2009) Anaerobic digestion foaming causes—a review. *Bioresource technology* 100(23):5546-5554
- Gerardi MH (2003) *The microbiology of anaerobic digesters*. John Wiley & Sons
- Gerbeth A, Gemende B, Eichert H, Krauthem G, Röhlig S, Jahn M, Hädrich P, Buschner G (2009) Vergleichende Testung unterschiedlicher Adsorbentien zur Entfernung von Schwefelwasserstoff aus Gasgemischen vor deren Einsatz als Brenngas in Hochtemperaturbrennstoffzellen.
- Gerritsen J, Fuentes S, Grievink W, van Niftrik L, Tindall BJ, Timmerman HM, Rijkers GT, Smidt H (2014) Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastrointestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64(5):1600-1616
- Ghosh S (1987) Improved sludge gasification by two-phase anaerobic digestion. *Journal of environmental engineering* 113(6):1265-1284
- Goux X, Calusinska M, Lemaigre S, Marynowska M, Klocke M, Udelhoven T, Benizri E, Delfosse P (2015) Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnology for biofuels* 8(1):122
- Hall TA BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series*, 1999. vol 41. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., p 95-98
- 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
- Häring G, Sonnleitner M, Wiedemann L, Zörner W, Aschmann V Technische Anforderungen an Biogasanlagen für die flexible Stromerzeugung. In: ALB Bayern eV http://www.biogas-forum-bayern.de/publikationen/Technische_Anforderungen_an_Biogasanlagen_für_die_flexible_Stromerzeugung.pdf, accessed on, 2016. vol 31.
- Hecht M (2009) Die Bedeutung des Carbonat-Puffersystems für die Stabilität des Gärprozesses landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz (INRES)
- Hecht M, Clemens PDJ, Wulf S (2007) Entwicklung eines einfachen und für den Landwirt durchführbaren Verfahrens zur Überwachung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. *Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL*:51
- Heuwinkel H, Andrade D, Wagner D, Bredendiek K, Bischoff M (2009) Optimierung der anaeroben Fermentierung durch mineralische Zusatzstoffe. *Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009 Band*:85
- Hjorth M, Christensen KV, Christensen ML, Sommer SG (2010) Solid–liquid separation of animal slurry in theory and practice. A review. *Agronomy for sustainable development* 30(1):153-180
- Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi 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
- Horn N (1987) *Clostridium disporicum* sp. nov., a saccharolytic species able to form two spores per cell, isolated from a rat cecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 37(4):398-401

- Jetten MS, Stams AJ, Zehnder AJ (1992) Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiology Letters* 88(3-4):181-197
- Kampmann K, Ratering S, Geißler-Plaum R, Schmidt M, Zerr W, Schnell S (2014) Changes of the microbial population structure in an overloaded fed-batch biogas reactor digesting maize silage. *Bioresource technology* 174:108-117
- Karakashev D, Batstone DJ, Trably E, Angelidaki I (2006) Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *Methanosaetaceae*. *Applied and environmental microbiology* 72(7):5138-5141
- Kato S, Haruta S, Cui ZJ, Ishii M, Yokota A, Igarashi Y (2004) *Clostridium straminisolvans* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54(6):2043-2047
- Kawaharasaki M, Tanaka H, Kanagawa T, Nakamura K (1999) In situ identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4', 6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. *Water Research* 33(1):257-265
- Kissel R, Bachmaier H, Effenberger M, Gronauer A (2009) Auslastungsgrade und Ursachen für Ertragseinbußen an Biogasanlagen unterschiedlicher Konzeptionierung. Degree of utilization and reasons for reduced yields of biogas plants of different conceptual design:227-236
- 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, 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
- Kliche R, Effenberger M, Lebuhn M, Götz J Hinweise zum (Wieder) Anfahren von Biogasanlagen. In: *Biogas Forum Bayern Nr, 2015. vol 3. p 2015*
- Koster I (1987) Abatement of long-chain fatty acid inhibition of methanogenesis by calcium addition. *Biological wastes* 22(4):295-301
- Kougias P, Boe K, Angelidaki I (2013) Effect of organic loading rate and feedstock composition on foaming in manure-based biogas reactors. *Bioresource technology* 144:1-7
- Krakat N, Anjum R, Demirel B, Schröder P (2017) Methodological flaws introduce strong bias into molecular analysis of microbial populations. *Journal of applied microbiology* 122(2):364-377
- Krause L, Diaz NN, Edwards RA, Gartemann K-H, Krömeke H, Neuweger H, Pühler A, Runte KJ, Schlüter A, Stoye J (2008) Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Biotechnology* 136(1):91-101
- Krieg A, Wachsmann G (2011) Umgang mit Biogasadditiven und Wirkungsweise in der Praxis. Fachtagung „Spurenelemente in Biogasanlagen - Wirkungsweise, Versorgungswege, Handlungsempfehlungen“ am 17.5.2011
- Kuang Y, Pullammanappallil P, Lepesteur M, Ho GE (2006) Recovery of oleate-inhibited anaerobic digestion by addition of simple substrates. *Journal of chemical technology and biotechnology* 81(6):1057-1063
- Lapage S (1975) International code of nomenclature of bacteria and status of the International Committee on Systematic Bacteriology and status of the bacteriology section of the International Association of Microbiological Societies. *Bacteriological code*:1-180
- Lebuhn M (2016) Empfehlungen für eine gute fachliche Praxis in landwirtschaftlichen Biogasanlagen aus hygienischer Sicht.

- Lebuhn M, Bauer C, Gronauer A (2008a) Probleme der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen im Langzeitbetrieb und molekularbiologische Analytik. VDLUFA-Schriftenreihe 64:118-125
- Lebuhn M, Bauer C, Munk B, Gronauer A (2009) Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage—a causal analysis. Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science 2009 Band 2:319
- Lebuhn M, Gronauer A (2009) Microorganisms in the biogas-process—the unknown beings. Landtechnik 64(2):127-130
- Lebuhn M, Liu F, Heuwinkel H, Gronauer A (2008b) Biogas production from mono-digestion of maize silage—long-term process stability and requirements. Water science and technology 58(8):1645-1651
- Lebuhn M, Munk B, Effenberger M (2014) Agricultural biogas production in Germany—from practice to microbiology basics. Energy, Sustainability and Society 4(1):1-21
- Leclerc M, Delbes C, Moletta R, Godon JJ (2001) Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester. FEMS microbiology ecology 34(3):213-220
- Lee S-H, Park J-H, Kim S-H, Yu BJ, Yoon J-J, Park H-D (2015) Evidence of syntrophic acetate oxidation by Spirochaetes during anaerobic methane production. Bioresource technology 190:543-549
- 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
- Liebrich M, Kleyböcker A, Kasina M, Miethling-Graff R, Kassahun A, Würdemann H (2016) Process Recovery after CaO Addition Due to Granule Formation in a CSTR Co-Digester—A Tool to Influence the Composition of the Microbial Community and Stabilize the Process? Microorganisms 4(1):17
- 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(1):20
- Lienen T, Kleyböcker A, Verstraete W, Würdemann H (2014a) Foam formation in a downstream digester of a cascade running full-scale biogas plant: Influence of fat, oil and grease addition and abundance of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella*. Bioresource technology 153:1-7
- Lienen T, Kleyböcker A, Verstraete W, Würdemann H (2014b) 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
- Linke B, Vollmer GR, Mähner P (2006) Kinetik der Biogasgewinnung aus nachwachsenden Rohstoffen bei kontinuierlicher Prozessführung als Grundlage für die Bemessung von landwirtschaftlichen Biogasanlagen, Schlussbericht zum verbundvorhaben, Projektträger Fachagentur nachwachsende Rohstoffe e.V.
- Liu Y, Whitman WB (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. Annals of the New York Academy of Sciences 1125(1):171-189
- 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 a meat processing plant. Bioresource technology 100(1):79-85
- Lv Z, Hu M, Harms H, Richnow HH, Liebetrau J, Nikolausz M (2014) Stable isotope composition of biogas allows early warning of complete process failure as a result of ammonia inhibition in anaerobic digesters. Bioresource technology 167:251-259
- MacFarlane GT, Gibson GR (1991) Co-utilization of polymerized carbon sources by *Bacteroides ovatus* grown in a two-stage continuous culture system. Applied and environmental microbiology 57(1):1-6

- Marchaim U, Krause C (1993) Propionic to acetic acid ratios in overloaded anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 43(3):195-203
- Mata-Alvarez J, Dosta J, Romero-Güiza M, Fonoll X, Peces M, Astals S (2014) A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 36:412-427
- McCarty PL (1964) Anaerobic waste treatment fundamentals. *Public works* 95(9):107-112
- McGhee T (1968) A method for approximation of the volatile acid concentrations in anaerobic digesters. *Water Sewage Works* 115(162):e166
- McInerney M, Bryant M, Hespell R, Costerton J (1981) *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 41(4):1029-1039
- McInerney MJ, Sieber JR, Gunsalus RP (2009) Syntrophy in anaerobic global carbon cycles. *Current opinion in biotechnology* 20(6):623-632
- McMahon KD, Stroot PG, Mackie RI, Raskin L (2001) Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions—II: microbial population dynamics. *Water research* 35(7):1817-1827
- Méthé BA, Nelson KE, Pop M, Creasy HH, Giglio MG, Huttenhower C, Gevers D, Petrosino JF, Abubucker S, Badger JH (2012) A framework for human microbiome research. *Nature* 486(7402):215
- Moeller L, Görsch K, Müller RA, Zehnsdorf A (2012) Formation and suppression of foam in biogas plants-practical experiences. *Agric Eng (Landtechnik)* 67(2):110-113
- Moeller L, Zehnsdorf A (2016) Process upsets in a full-scale anaerobic digestion bioreactor: over-acidification and foam formation during biogas production. *Energy, Sustainability and Society* 6(1):30
- Müller B, Sun L, Schnürer A (2013) First insights into the syntrophic acetate-oxidizing bacteria—a genetic study. *MicrobiologyOpen* 2(1):35-53
- Munk B, Bauer C, Gronauer A, Lebuhn M (2010) Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. *Engineering in Life Sciences* 10(6):496-508
- 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(3):695-700
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148(1):257-266
- Nielsen HB, Uellendahl H, Ahring BK (2007) Regulation and optimization of the biogas process: propionate as a key parameter. *Biomass and Bioenergy* 31(11):820-830
- Nishiyama T, Ueki A, Kaku N, Watanabe K, Ueki K (2009) *Bacteroides graminisolvans* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 59(8):1901-1907
- Nordmann W (1977) Die Überwachung der Schlammfäulung. KA-Informationen für das Betriebspersonal, Beilage zur Korrespondenz Abwasser 3(77):77
- Oechsner H (2011) Biogasanlagen in ökologisch wirtschaftenden Betrieben-verfahrenstechnische Aspekte. *Landinfo* 1
- Oehmen A, Lemos PC, Carvalho G, Yuan Z, Keller J, Blackall LL, Reis MA (2007) Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water research* 41(11):2271-2300
- Oehmen A, Yuan Z, Blackall LL, Keller J (2004) Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Science and Technology* 50(10):139-144
- Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA (1986) Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual reviews in microbiology* 40(1):337-365

- Patel G, Sprott G (1990) *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("Methanothrix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 40(1):79-82
- Pelletier E, Kreimeyer A, Bocs S, Rouy Z, Gyapay G, Chouari R, Rivière D, Ganesan A, Daegelen P, Sghir A (2008) "Candidatus Cloacamonas acidaminovorans": genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division. *Journal of Bacteriology* 190(7):2572-2579
- Ploechl M, Hilse A, Heiermann M, Quinones TS, Budde J, Prochnow A (2010) Application of hydrolytic enzymes for improving biogas feedstock fluidity. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*
- Preißler D (2010) Prozessbiologische Störungen in NawaRo und Gülleanlagen: Symptome, Ursachen und mögliche Lösungsansätze. *Biogas Forum Bayern Nr III – 4/2010, ALB Bayern eV*
- Purser BJ, Thai S-M, Fritz T, Esteves S, Dinsdale R, Guwy A (2014) An improved titration model reducing over estimation of total volatile fatty acids in anaerobic digestion of energy crop, animal slurry and food waste. *Water research* 61:162-170
- Qiu Y-L, Hanada S, Ohashi A, Harada H, Kamagata Y, Sekiguchi Y (2008) *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. *Applied and environmental microbiology* 74(7):2051-2058
- Regueiro L, Lema JM, Carballa M (2015) Key microbial communities steering the functioning of anaerobic digesters during hydraulic and organic overloading shocks. *Bioresource technology* 197:208-216
- Rieger C, Weiland P (2006) Prozessstörungen frühzeitig erkennen. *Biogas Journal* 4(06):18-20
- Ritalahti KM, Justicia-Leon SD, Cusick KD, Ramos-Hernandez N, Rubin M, Dornbush J, Löffler FE (2012) *Sphaerochaeta globosa* gen. nov., sp. nov. and *Sphaerochaeta pleomorpha* sp. nov., free-living, spherical spirochaetes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62(1):210-216
- Rojas C, Uhlenhut F, Schlaak M, Borchert A, Steinigeweg S (2011) Simulation des anaeroben Prozesses bei der Biogaserzeugung. *Chemie Ingenieur Technik* 83(3):306-321
- Roy F, Albagnac G, Samain E (1985) Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophic cultures degrading long-chain fatty acids. *Applied and environmental microbiology* 49(3):702-705
- Roy F, Samain E, Dubourguier HC, Albagnac G (1986) *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Archives of microbiology* 145(2):142-147
- Rutkowski A, Grynberg H, Szczepańska H (1964) Über die Struktur der Rapsöl-Glyceride. *European Journal of Lipid Science and Technology* 66(12):1017-1020
- 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
- Scherer P (2007) Operating analytics of biogas plants to improve efficiency and to ensure process stability. *Progress in Biogas Stuttgart-Hohenheim*:77-84
- Scherer P, Lippert H, Wolff G (1983) Composition of the major elements and trace elements of 10 methanogenic bacteria determined by inductively coupled plasma emission spectrometry. *Biological trace element research* 5(3):149-163
- Schieder D, Gronauer A, Lebuhn M, Bayer K, Beck J, Hiepp G, Binder S (2010) Prozessmodell Biogas. *Biogas Forum Bayern Nr III – 3/2010, ALB Bayern eV*
- Schink B (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and molecular biology reviews* 61(2):262-280
- Schmidt JE, Ahring BK (1999) Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Applied and environmental microbiology* 65(3):1050-1054

- Schröder P, Kleyböcker A, Kassahun A, Hache M, Schmalz L, Würedemann H (2018) ProGas – Einsatz von Frühwarnindikatoren und Additiven zur Leistungssteigerung in einstufigen Biogasanlagen, Entwicklung von Regelungsverfahren zur Prozessstabilisierung; Teilvorhaben 1: MiProTec; Teilvorhaben 3: Biofilme. Unveröffentlichter Schlussbericht, FNR-FKZ 22019512 und 22019712
- Schüsseler P (2008) Zielsetzung des Fachgesprächs „Messen-Steuern-Regeln bei der Biogaserzeugung“. Gülzower Fachgespräche–Messen, Steuern, Regeln bei der Biogaserzeugung Technische Informationsbibliothek und Universitätsbibliothek:8-16
- Shah N, Tang H, Doak TG, Ye Y (2011) Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics Biocomputing 2011. World Scientific, pp 165-176
- Song Y, Liu C, McTeague M, Summanen P, Finegold S (2004) *Clostridium bartlettii* sp. nov., isolated from human faeces. *Anaerobe* 10(3):179-184
- Stockl A, Oechsner H, Jungbluth T (2010) Online-Messung von Fettsäuren in Biogas-Fermentern mit Nah-Infrarot-Reflexions-Spektroskopie (NIRS). *LANDTECHNIK–Agricultural Engineering* 65(4):264-267
- Straka F, Jenicek P, Zabranska J, Dohanyos M, Kuncarova M (2007) Anaerobic fermentation of biomass and wastes with respect to sulfur and nitrogen contents in treated materials.
- Sträuber H, Lucas R, Kleinstaub S (2016) Metabolic and microbial community dynamics during the anaerobic digestion of maize silage in a two-phase process. *Applied microbiology and biotechnology* 100(1):479-491
- Strik D, Domnanovich A, Holubar P (2006) A pH-based control of ammonia in biogas during anaerobic digestion of artificial pig manure and maize silage. *Process Biochemistry* 41(6):1235-1238
- Strömpl C, Tindall B, Jarvis GN, Lünsdorf H, Moore ER, Hippe H (1999) A re-evaluation of the taxonomy of the genus *Anaerovibrio*, with the reclassification of *Anaerovibrio glycerini* as *Anaerosinus glycerini* gen. nov., comb. nov., and *Anaerovibrio burkinabensis* as *Anaeroarcus burkinensis* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49(4):1861-1872
- Theron J, Cloete T (2000) Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical reviews in microbiology* 26(1):37-57
- Theuerl S, Kohrs F, Benndorf D, Maus I, Wibberg D, Schlüter A, Kausmann R, Heiermann M, Rapp E, Reichl U (2015) Community shifts in a well-operating agricultural biogas plant: how process variations are handled by the microbiome. *Applied microbiology and biotechnology* 99(18):7791-7803
- Thrän D, Krautz A, Scheffelowitz M, Lenz V, Liebetrau J, Daniel-Gromke J, Zeymer M, Nelles M (2014) Auswirkungen der gegenwärtig diskutierten Novellierungsvorschläge für das EEG-2014. Deutsches Biomasseforschungszentrum, Leipzig
- Tindall B (2014) The genus name *Methanotherix* Huser et al. 1983 and the species combination *Methanotherix soehngeni* Huser et al. 1983 do not contravene Rule 31a and are not to be considered as rejected names, the genus name *Methanosaeta* Patel and Sprott 1990 refers to the same taxon as *Methanotherix soehngeni* Huser et al. 1983 and the species combination *Methanotherix thermophila* Kamagata et al. 1992 is rejected: Supplementary information to Opinion 75. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64(10):3597-3598
- UBA (2017) Erneuerbare Energien in Deutschland Daten zur Entwicklung im Jahr 2016. Umweltbundesamt
- Van Rensburg P, Musvoto E, Wentzel M, Ekama G (2003) Modelling multiple mineral precipitation in anaerobic digester liquor. *Water Research* 37(13):3087-3097
- Vanrolleghem PA, Lee DS (2003) On-line monitoring equipment for wastewater treatment processes: state of the art. *Water Science and Technology* 47(2):1-34
- Voß E, Weichgrebe D, Rosenwinkel K (2009) FOS/TAC: Herleitung, Methodik, Anwendung und Aussagekraft. *Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science* 3:675-682

- Ward AJ, Hobbs PJ, Holliman PJ, Jones DL (2008) Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource technology* 99(17):7928-7940
- Weiland P (2008) Wichtige Messdaten für den Prozessablauf und Stand der Technik in der Praxis. *Gülzower Fachgespräche* 27:17-31
- Weiland P (2010) Biogas production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* 85(4):849-860
- Westerholm M, Moestedt J, Schnürer A (2016) Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance. *Applied Energy* 179:124-135
- Wiese J, Knig R (2008) Einsatz von Mess- und Automatisierungstechnik auf modernen Biogasanlagen Ergebnisse grotechnischer Anwendungen, *energie I wasser-praxis*, 11, 1621, 2008. van Leeuwen. M, Krommenhoek, EE, Heijen, JJ, Gardeniers, H, van der Wielen, LAM, and van Gulik, WM: Aerobic Batch Cultivation in Micro Bioreactor with Integrated Electro-chemical Sensor Array, *Biotechnol Progr* 26:293300
- 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(1):1
- Wojtowicz JA (2001) The carbonate system in swimming pool water. *Journal of the Swimming Pool and Spa Industry* 3(1):54-59
- Wood DE, Salzberg SL (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology* 15(3):R46
- Würdemann H, Kleyböcker A, Liebrich M, Lienen T, Lerm S, Brehmer M, Kraume M (2011) Erkennen und Beheben von Prozessstörungen in Biogasanlagen. 8 Biogastagung Dresden: Tagungsband
- Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, Najar FZ, Roe BA, Elshahed MS (2009) Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and environmental microbiology* 75(16):5227-5236
- Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S (2005) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and bioengineering* 89(6):670-679
- Zhang L, Jahng D (2012) Long-term anaerobic digestion of food waste stabilized by trace elements. *Waste Management* 32(8):1509-1515
- Ziganshin AM, Liebetrau J, Pröter J, Kleinsteuber S (2013) Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Applied microbiology and biotechnology* 97(11):5161-5174
- Ziganshin AM, Schmidt T, Scholwin F, Il'inskaya ON, Harms H, Kleinsteuber S (2011) Bacteria and archaea involved in anaerobic digestion of distillers grains with solubles. *Applied microbiology and biotechnology* 89(6):2039-2052