

**Institut für Biochemie und Biologie  
Arbeitsgruppe Mikrobiologie**

---

**Einfluss von Prozessoptimierungen auf die mikrobielle  
Diversität und die Effizienz der Gasbildung in Co-  
Vergärungsanlagen der Abfallwirtschaft**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
"doctor rerum naturalium"  
(Dr. rer. nat.)**

**eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam**

**von  
Marietta Liebrich**

**Potsdam, 14. April 2016**

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-91066  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-91066>

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Gleichungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Kurzfassung/ Abstract</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2. Stand der Wissenschaft und Technik</b>	<b>5</b>
2.1. Technische Systeme zur Erzeugung von Biogas	5
2.2. Anaerober Abbau organischer Substanz	5
2.3. Chemische Prozessparameter/Milieubedingungen	8
2.3.1. pH- Wert	8
2.3.2. Redoxpotential	8
2.3.3. Sauerstoff	8
2.3.4. Temperatur	9
2.3.5. Nährstoffe und Spurenelemente	9
2.3.6. Hemmstoffe	9
2.4. Prozessstörung durch Übersäuerung und Maßnahmen zur Prozessregenerierung	11
2.5. Rolle der Polyphosphat akkumulierenden Organismen (PAO)	12
<b>3. Ziele der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
4.1. Anlagenbeschreibungen und Probennahme	15
4.1.1. Großtechnische Biogasanlage	15
4.1.2. Laborreaktoren	17
4.2. Kalkulation und Zugabe der alkalischen Lösungen	18
4.2.1. Großtechnische Biogasanlage	18
4.2.2. Laborreaktoren	19
4.3. Analysenmethoden physikalischer und chemischer Prozessparameter	20
4.3.1. pH- Wert und Temperatur	20
4.3.2. Trockensubstanz und organische Trockensubstanz	20
4.3.3. Konzentrationsbestimmung von organischen Säuren, Calcium und Phosphat	20
4.3.4. Nachweis flüchtiger Fettsäuren	21
4.3.5. Gasanalysen	21
4.4. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden	21
4.4.1. DNA-Extraktion (Zellaufschluss und DNA-Isolierung)	21
4.4.2. Vervielfältigung der prokaryotischen 16S rDNA	24
4.4.3. Genetisches Fingerprinting	26
4.4.4. Quantifizierung der Biozönose	30

4.5.	Mineralische Charakterisierung von Gärresten und Pellets	31
4.6.	Mikroskopische Untersuchungen von Gärresten und Pellets	32
4.6.1.	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Calcium, Öl/LCFA und Proteinen	32
4.6.2.	Mikroskopischer Nachweis der Polyphosphatgranula	33
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
5.1.	Prozessstörung und Prozessregenerierung in einer großtechnischen Biogasanlage	34
5.1.1.	Auswirkungen auf den Gärrest	34
5.1.2.	Veränderung der Gärreststruktur und Bildung von Pellets	39
5.1.3.	Auswirkungen auf die Zusammensetzung der mikrobielle Biozönose	40
5.2.	Prozessstörungen und Prozessregenerierungen in einer Laboranlage	48
5.2.1.	Prozessregenerierung mit Natronlauge	49
5.2.1.1.	<i>Auswirkungen auf den Gärrest</i>	49
5.2.2.	Prozessregenerierung mit Calciumoxid	51
5.2.2.1.	<i>Auswirkungen auf den Gärrest</i>	51
5.2.2.2.	<i>Veränderung der Gärreststruktur und Bildung von Pellets</i>	54
5.2.2.3.	<i>Auswirkungen auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose</i>	60
5.2.2.4.	<i>Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose der Pelletzonen</i>	65
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
6.1.	Prozessstörung und Maßnahmen zur Regenerierung in den großtechnischen Biogasreaktoren	70
6.2.	Charakterisierung der Biozönosen bei Normalbetrieb	72
6.3.	Charakterisierung der Biozönosen bei Prozessstörung und Prozessstabilisierung	74
6.3.1.	Veränderungen der Biozönosen der großtechnischen Reaktoren	74
6.3.2.	Veränderungen der Biozönosen der Laborreaktoren	77
6.4.	Bildung von Pellets als Energiequelle und strukturbildendes Material für die Biofilmbildung	79
6.5.	Zusammenfassung	82
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>Anhänge</b>	<b>92</b>
	Anhang A - Chemikalien	92
	Anhang B - DNA-Extraktionsprotokolle	94
	<i>Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit</i>	94
	<i>FastDNA® SPIN KIT FOR SOIL</i>	94
	<i>Enzymatische Lyse mit anschließender DNA-Fällung</i>	95
	Anhang C - PCR-Produkt-Aufreinigung	97
	<i>GeneJET PCR Purification Kit</i>	97
	Anhang D – Zuordnung sequenzierter Banden	98
	<i>Zuordnung sequenzierter Banden im Gärrest</i>	98
	<i>Zuordnung sequenzierter Banden in den Pelletzonen</i>	99
	<b>Dank</b>	100
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	102

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Phasen des Abbaus von organischen Verbindungen unter anaeroben Bedingungen</i>	6
<i>Abbildung 2: Verfahrensschema der großtechnischen Biogasanlage</i>	15
<i>Abbildung 3: Verfahrensschema der halbtechnischen Versuchsanlage</i>	17
<i>Abbildung 4: DNA-Standardkurve für die Quantifizierung der DNA</i>	23
<i>Abbildung 5: Verlauf des pH-Wertes und der Fettsäurekonzentration in R1</i>	35
<i>Abbildung 6: Verlauf der Fettsäurekonzentration und der Gasbildungsrate in R1</i>	35
<i>Abbildung 7: Verlauf des pH-Wertes und der Fettsäurekonzentration in R2</i>	36
<i>Abbildung 8: Verlauf der Fettsäurekonzentration und der Gasbildungsrate in R2</i>	36
<i>Abbildung 9: Verlauf des pH-Wertes sowie der Essig- und der Propionsäurekonzentration in R2</i>	37
<i>Abbildung 10: Verlauf der Fettsäurekonzentration, der Calciumkonzentration und der Phosphatkonzentration in R2</i>	38
<i>Abbildung 11: A - F: Darstellung von zwei Pellets aus Reaktor R2</i>	39
<i>Abbildung 12: Beispiel für eine REM-EDX-Analyse eines Pellets</i>	40
<i>Abbildung 13: Innenseite der aus dem Gärrest entnommenen und aufgebrochenen Pellets</i>	40
<i>Abbildung 14: Bakterienspezifisches Fingerprinting von Gärresten aus Reaktor R1 bzw. Reaktor R2</i>	41
<i>Abbildung 15: Pareto-Lorenz-Analyse der bakteriellen Biozönose von Reaktor R1 und Reaktor R2</i>	43
<i>Abbildung 16: Bakterienspezifisches Fingerprinting von Reaktor R2</i>	44
<i>Abbildung 17: rPAO-spezifische Fingerprintings von Gärresten aus Reaktor R1 und Reaktor R2</i>	45
<i>Abbildung 18: Spezifische Fingerprintings für methanogene Archaeen von Gärresten aus Reaktor R1 und Reaktor R2</i>	46
<i>Abbildung 19: Spezifische Fingerprintings für methanogene Archaeen von Gärresten aus Reaktor R1 und Reaktor R2</i>	48
<i>Abbildung 20: Verlauf des pH-Wertes, der Fettsäurekonzentration sowie die NaOH- Raumbelastung</i>	49
<i>Abbildung 21 : Verlauf der Fettsäurekonzentration, der Gasbildungsrate sowie die NaOH- Raumbelastung</i>	50
<i>Abbildung 22: Verlauf des pH-Wertes sowie der Essig- und der Propionsäurekonzentration</i>	50
<i>Abbildung 23: Verlauf des pH-Wertes, der Fettsäurekonzentration sowie die CaO- Raumbelastung</i>	51
<i>Abbildung 24: Verlauf der Fettsäurekonzentration und der Gasbildungsrate</i>	52
<i>Abbildung 25: Verlauf des pH-Wertes sowie der Essig- und der Propionsäurekonzentration</i>	52
<i>Abbildung 26: Wasserstoffpartialdruck während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid</i>	53
<i>Abbildung 27: Verlauf der Fettsäurekonzentration, der Calciumkonzentration sowie der Phosphatkonzentration</i>	54
<i>Abbildung 28: Gärrest mit verschieden großen Pellets während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid</i>	54
<i>Abbildung 29: REM- EDX- Analyse der Außenseite eines ausgewählten Pellets aus dem Gärrest</i>	55
<i>Abbildung 30: REM- EDX- Analyse des Inneren eines ausgewählten Pellets aus dem Gärrest</i>	55
<i>Abbildung 31: Oberfläche eines Partikel aus dem Gärrest während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid</i>	56
<i>Abbildung 32: Pellet entnommen aus dem Fermenter am Tag 12 nach Versuchsbeginn</i>	56
<i>Abbildung 33: Struktur des organischen Materials des Pellets</i>	57
<i>Abbildung 34: Phosphatminerale, die im Pellet detektiert wurden</i>	57
<i>Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der räumlichen Beziehung zwischen Calcium (rot) und Öl bzw. LCFA (cyan) im Pellet</i>	58
<i>Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der räumlichen Beziehung zwischen Calcium (rot), Öl bzw. LCFA (cyan) und Proteinen (grün) im Pellet</i>	58
<i>Abbildung 37: Polyphosphatgranula nach Neisser-Färbung im Klärschlamm</i>	59
<i>Abbildung 38: Polyphosphatgranula nach Neisser-Färbung im Gärrest</i>	59
<i>Abbildung 39: Polyphosphatgranula nach Neisser-Färbung in den unterschiedlichen Zonen des Pellets</i>	59
<i>Abbildung 40: Bakterienspezifisches Fingerprinting im Vergleich zur Fettsäurekonzentration während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid</i>	60

<i>Abbildung 41: Pareto-Lorenz-Analyse der bakteriellen Biozönose während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid</i>	62
<i>Abbildung 42: rPAO- spezifisches Fingerprinting im Vergleich zur Fettsäurekonzentration während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid</i>	63
<i>Abbildung 43: Spezifisches Fingerprinting der methanogenen Archaeen</i>	64
<i>Abbildung 44: Bakterienspezifisches Fingerprinting der Pelletzonen</i>	65
<i>Abbildung 45: Pareto-Lorenz-Analyse der bakteriellen Biozönose der Pelletzonen</i>	67
<i>Abbildung 46: Relative Quantifizierung der rPAO der Pelletzonen mittels qPCR</i>	67
<i>Abbildung 47: Spezifisches Fingerprinting der methanogenen Archaeen der Pelletzonen</i>	68
<i>Abbildung 48: Relative Quantifizierung der Archaeen der Pelletzonen mittels qPCR</i>	69

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Überblick über verschiedene Reaktionen und die dabei frei werdende Energie</i>	7
<i>Tabelle 2: Betriebs- und Prozessparameter der großtechnischen Biogasreaktoren bei Normalbetrieb</i>	16
<i>Tabelle 3: Betriebs- und Prozessparameter der Laborreaktoren bei Normalbetrieb</i>	18
<i>Tabelle 4: Übersicht über Raumbelastung der alkalischen Lösungen (R2)</i>	19
<i>Tabelle 5: Übersicht über die Natronlauge-Raumbelastung (Labor)</i>	19
<i>Tabelle 6: Übersicht über die Calciumoxid-Raumbelastung (Labor)</i>	19
<i>Tabelle 7: DNA-Standardreihe zur Erstellung der DNA-Standardkurve für die DNA-Quantifizierung</i>	23
<i>Tabelle 8: Zusammensetzung des TE-Puffers</i>	24
<i>Tabelle 9: Verwendete PCR- Primer zur Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose</i>	25
<i>Tabelle 10: Ablauf der PCR für die anschließende DGGE.</i>	25
<i>Tabelle 11: Acrylamidkonzentrationen und Harnstoffgradienten</i>	27
<i>Tabelle 12: Stammlösung 1 (40 % Acrylamidlösung; 0 % Harnstoffkonzentration).</i>	27
<i>Tabelle 13: Stammlösung 2 (40 % Acrylamidlösung; 100 % Harnstoffkonzentration).</i>	27
<i>Tabelle 14: Zusammensetzung des Tris-Acetat-EDTA-Puffers (TAE-Puffer)</i>	27
<i>Tabelle 15: Zusammensetzung des Crush and Soak-Puffers.</i>	29
<i>Tabelle 16: Verwendete Primer für die quantitative real-time PCR.</i>	30
<i>Tabelle 17: Ablauf der quantitativen real-time PCR</i>	30
<i>Tabelle 18: Lösungen 1- 3 für die Neisserfärbung</i>	33
<i>Tabelle 19: Zuordnung der sequenzierten Banden des bakterienspezifischen Fingerprintings</i>	42
<i>Tabelle 20: Zuordnung der sequenzierten Banden des rPAO-spezifischen Fingerprintings</i>	45
<i>Tabelle 21: Zuordnung der sequenzierten Banden des spezifischen Fingerprintings für methanogene Archaeen</i>	47
<i>Tabelle 22: Quantitative Analyse des großen Pellets zur Bestimmung von Trockensubstanz (TS), organischer Trockensubstanz (oTS) und prozentualem Anteil an organischem Material (% oTS)</i>	57
<i>Tabelle 23: Zuordnung der sequenzierten Banden des bakterienspezifischen Fingerprintings</i>	61
<i>Tabelle 24: Zuordnung der sequenzierten Banden des rPAO-spezifischen Fingerprintings</i>	63
<i>Tabelle 25: Zuordnung der sequenzierten Banden des spezifischen Fingerprintings für Methanogene</i>	64
<i>Tabelle 26: Zuordnung der sequenzierten Banden des bakterienspezifischen Fingerprintings der Pelletzonen</i>	66
<i>Tabelle 27: Zuordnung der sequenzierten Banden des spezifischen Fingerprintings für Methanogene der Pelletzonen</i>	68

## Gleichungsverzeichnis

<i>Gleichung 1: Berechnung der Trockensubstanz (TS)</i>	19
<i>Gleichung 2: Berechnung der organischen Trockensubstanz (oTS)</i>	19
<i>Gleichung 3: Berechnung des <math>\delta C_T</math>-Wertes</i>	30
<i>Gleichung 1: Berechnung des <math>\delta \delta C_T</math>-Wertes</i>	30
<i>Gleichung 5: Berechnung der X-fachen Abundanz (Ratio)</i>	30

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosinriphosphat	
ATV-DVWK	abwassertechnische Vereinigung e.V. -Deutscher Verband für Wasserwirtschaft und Kulturbau e.V.	
BHKW	Blockheizkraftwerk	
BMU	Bundesumweltministerium	
bp	Basenpaare (basepairs)	
CaO	Calciumoxid	[mg L <sup>-1</sup> ]
Ca(OH) <sub>2</sub>	Calciumhydroxid	
CH <sub>4</sub>	Methan	
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	
CSTR	volldurchmischer kontinuierlich betriebener Biogasreaktor (Continuous Stirred Tank Reactor)	
Ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus (Cycle Threshold)	
DGGE	Denaturierende Gelgradienten Elektrophorese	
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)	
EBPR	erhöhten biologischen Phosphateleinierung (Enhanced biological phosphorus removal)	
EEG	Erneuerbare Energien Gesetz	
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen	
GC	Gaschromatographie	
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff	
IC	Ionenchromatographie	
IEA	Internationale Energieagentur	
K <sub>s</sub>	Substrataffinität	
LCFA	langkettige organische Säuren (long chain fatty acids)	[mg L <sup>-1</sup> ]
NaOH	Natronlauge	[mg L <sup>-1</sup> ]
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat	
NH <sub>3</sub>	Ammoniak	
NO <sub>x</sub>	Stickoxide	
oTS	organische Trockensubstanz	[g L <sup>-1</sup> ]
PAO	Polyphosphat akkumulierende Organismen	
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)	
PHA	Polyhydroxyalkonoate	
PHB	Poly-β-Hydroxybutyrat	
PHV	Poly-β-Hydroxyvalerat	

Poly-P	Polyphosphat	
qPCR	quantitative PCR (quantitative polymerase chain reaction)	
rDNA	ribosomale DNA (ribosomal deoxyribonucleic acid)	
REM	Rasterelektronenmikroskopie	
rpm	Drehzahl (revolutions per minute)	
SAO	syntrophe Acetatoxidation	
SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid	
SRB	sulfatreduzierende Bakterien	
TCD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (thermal conductivity detector)	
TS	Trockensubstanz	[g L <sup>-1</sup> ]
UASB	Schlammbedtreaktor (Upflow Anaerobic Sludge Blanket)	
VFA	organische Säuren (volatile fatty acids)	[mg L <sup>-1</sup> ]
Vol.	Volumen	

### ***Symbolverzeichnis***

C	(Folgebuchstabe) Steuerung/Regelung (control)	
F	Durchfluss (flow)	[L h <sup>-1</sup> ]
f	(Folgebuchstabe) flüssig	
g	(Folgebuchstabe) gasförmig	
I	(Folgebuchstabe) Anzeige (indicating)	
P	Druck (pressure)	[mbar]
Q	Qualität (Eigenschaft eines Stoffes) (quality)	
Q	(Folgebuchstabe) Laufende Summe/Integral (quantity)	
R	(Folgebuchstabe) Speicherung/Aufzeichnung (recording)	
T	Temperatur	[°C]
T	Zeit (time)	[d]



## Kurzfassung

Im Hinblick auf die Problematik der Umweltverschmutzung durch die Nutzung fossiler Brennstoffe ist es nötig, eine langfristig stabile und umweltfreundliche Energieversorgung zu gewährleisten. Eine Möglichkeit, den Energiebedarf CO<sub>2</sub>-neutral zu decken, ist die Nutzung von Biogas. Hierbei spielt der Einsatz von biogenen Reststoffen, die durch einen hohen Anteil an Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen gekennzeichnet sind und daher ein hohes Biogaspotential besitzen, eine wichtige Rolle. Voraussetzung für die Effizienz und Rentabilität solcher Anlagen ist u. a. ein stabiler Gasbildungsprozess. Da bisher noch nicht alle Aspekte der Biogasbildung vollständig verstanden sind, werden die Anlagen oft nicht optimal ausgelastet, um Prozessstörungen wie z. B. Übersäuerung zu vermeiden.

Um dennoch auftretende Prozessstörungen zu beheben, können unterschiedliche Maßnahmen durchgeführt werden. Neben der Senkung der Raumbelastung, ist es möglich, den pH-Wert durch die Zugabe von Natronlauge oder Calciumoxid anzuheben.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Prozessstörungen als auch Prozessregenerierungen an einer großtechnischen Biogasanlage und in Laborversuchen untersucht. Dabei galt es, neben den physikalischen und chemischen Parametern, die mikrobielle Biozönose mit Hilfe des genetischen Fingerprintings zu charakterisieren und Änderungen zu detektieren.

Während der Prozessregenerierungen wurden nach der Zugabe von CaO Veränderungen des Gärrestes beobachtet. Es bildeten sich Pellets, die im Hinblick auf ihre Funktion für die Prozessregenerierung und die Prozessstabilität molekularbiologisch und mikroskopisch untersucht wurden. Es wurde weiterhin der Frage nachgegangen, welche Rolle die Mikroorganismen bei der Entstehung der Pellets spielen.

Die vor allem aus Calcium und Fettsäuren bestehenden Pellets dienten als Aufwuchsflächen für verschiedene Mikroorganismen. Die Bildung von Biofilmen, wie sie auf und in den Pellets nachgewiesen wurde, bot für Mikroorganismen einen Schutz vor negativen Umwelteinflüssen wie z. B. hohe Propionsäurekonzentrationen. Unter diesen günstigen Bedingungen war die Bildung von Biogas auch unter hohen Wasserstoffpartialdrücken, die den Abbau von Propionsäure hemmten, möglich. Als Indikator für bessere Lebensbedingungen wurde im Laborversuch ein *Methanoculleus receptaculi*-verwandter Organismus identifiziert. Dieses methanogene Archaeon wurde im Pellet nachgewiesen, während es im Gärrest erst nach der Prozessregenerierung detektiert wurde. Der Nachweis eines im Vergleich zum umgebenden Gärrest höheren Anteils an Archaeen im Kern der Pellets sowie von Biofilmen/EPS, verschiedenen Phosphatsalzen und schwerlöslichen Calciumsalzen zeigte, dass sowohl Präzipitation und Adsorption als auch Degradation von LCFA dazu führen, dass deren Konzentration im flüssigen Gärrest gesenkt wird. Dadurch nimmt die Hemmung auf die Biozönose ab und die Biogasbildungsrate steigt. Daher ist der Abbau der Fettsäuren auch bei einem niedrigen pH-Wert und unter hohen Wasserstoffpartialdrücken möglich und der Biogasbildungsprozess ist langfristig stabil. Die Bildung von Pellets unterstützt die Prozessstabilität, sofern diese nicht zu groß werden und dann u. a. die Durchmischung behindern und den Ablauf verstopfen.

Nach erfolgreicher Prozessstabilisierung wurden keine Pellets im Gärrest beobachtet. Der Abbau des organischen Materials wurde sowohl durch die steigende Calciumkonzentration als auch die steigende Gasproduktion angezeigt.

## Abstract

In regard to the problems of the environmental pollution with the use of fossil fuels it is necessary to guarantee a long term stable and environment-friendly energy supply. The production of biogas of such organic substances as waste or renewable raw materials is an economically and ecologically interesting option, intended to reduce the effects of climate change, due to increased CO<sub>2</sub> emissions and to replace traditional fossil fuels. The use of biogenic residues plays an important role, as they are characterised by a high amount of carbohydrates, fats and proteins and therefore have a high biogas potential. To optimise the efficiency and reliability of biogas plants, it is important to ensure a process of stable gas production. However, many aspects of the biogas production process are still unknown. Thus, biogas plants are often run below their maximum loading rate to prevent process failures.

To solve occurring process failures different counter measures can be performed such as decrease of the organic loading rate or raise the pH by adding sodium hydroxide or calcium oxide.

In this work, both process failures and process recovery were studied in a large-scale biogas plant and in laboratory experiments. Physical and chemical parameters were examined, and using genetic fingerprinting the microbial biocenosis was characterised and changes were detected.

During the deacidification process with CaO, the structure of the digestate changed, and pellets were observed. These were examined by molecular biology and microscopy, in terms of their function for the process recovery and process stability. Furthermore the role of microorganisms in the formation of these pellets was investigated.

The pellets consisted predominantly of calcium and fatty acids and were providing a large surface for microbial growth. The detected biofilms out and inside the pellets were offering a protection from environmental influences, such as high propionic acid concentrations. These favourable conditions enabled the formation of biogas in the pellets, despite a hydrogen partial pressure in the digestate that was far too high for an energy gaining degradation of propionic acid. As an indicator of better living conditions, a *Methanoculleus receptaculi*-related organism was identified in laboratory studies. This methanogenic archaea was detected in the pellet during overacidification but only after process recovery in the digestate. The proof of higher abundance of archaea in the core of the pellets as well as the detection of biofilms/EPS, different phosphate minerals and sparingly soluble calcium salts indicates that both precipitation and adsorption and degradation of LCFA cause their decreasing concentration in the liquid digestate. This decreases the inhibition of the microbial biocenosis, and the biogas production rate increases. Therefore, the degradation of fatty acids is also possible with a low pH and high hydrogen partial pressures and the biogas production process is long-term stable. The formation of pellets supports process stability, providing that these are not too big and hamper the mixing or clog the drain.

After successful process recovery no pellets were observed in the digestate. The degradation of organic material was evidenced by both the increasing calcium concentration and increasing gas production rate.

# 1. Einleitung

Aufgrund steigender Bevölkerungszahlen ist weltweit ein allgemein steigender Energiebedarf zu verzeichnen. Die Internationale Energieagentur (IEA) schätzt, dass sich bis zum Jahr 2035 der Weltenergiebedarf um mehr als ein Drittel steigern wird (Internationale Energie-Agentur 2012). Laut diesem Bericht gibt es einen Wandel weg von fossilen Brennstoffen, wie Erdgas, Kohle und Öl, hin zu erneuerbaren Energien, der sich langsam vollzieht. Die weiterhin hohen Subventionen für fossile Brennstoffe führen dazu, dass die Energie, die aus Erdgas, Kohle und Öl gewonnen wird, einen Hauptanteil am weltweiten Energiemix einnimmt. Es wird immer deutlicher, dass nicht die Verknappung der fossilen Brennstoffe, sondern deren Nutzung im Überfluss, zukünftig das größte Problem der Menschheit darstellen wird (Klingholz 2010). Die durch die Nutzung dieser Brennstoffe entstehenden Abfälle wie klimaschädliche Gase ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_2$ ) und Stäube müssen gelagert, entsorgt bzw. unschädlich gemacht werden, um die Schädigung von Klima und Umwelt zu minimieren. Im Hinblick auf eine stabile und umweltfreundliche Energieversorgung gewinnen erneuerbare Energien somit an Bedeutung. Die Bundesregierung beabsichtigt, bis zum Jahr 2020 die Emissionen an Treibhausgasen gegenüber dem Jahr 1990 um 40 % zu senken (BMU 2013).

In dem im Jahr 2012 novellierten Erneuerbare Energien Gesetz (EEG) wurde durch die Bundesregierung festgelegt, dass der Anteil an erneuerbaren Energien im Strombereich bis zum Jahr 2020 auf 35 % erhöht werden soll (BMU 2012). Im Jahr 2008 lag der Anteil noch bei 15 % (BMU 2009). Eine mögliche Lösung, sowohl den steigenden Bedarf an Energie  $\text{CO}_2$ -neutral zu decken als auch fossile Brennstoffe zu ersetzen, ist die Erzeugung von Biogas. Dieses brennbare Gas wird überall dort gebildet, wo organische Substanz unter anaeroben Bedingungen abgebaut wird. Biogas ist ein Gasgemisch, das aus ca. 50- 65 Vol.-% Methan ( $\text{CH}_4$ ) und 49- 39 Vol.-% Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) besteht. Daneben kann Biogas verschiedene Spurengase wie z. B. Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ), Wasserstoff ( $\text{H}_2$ ) und Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) mit bis zu 1 Vol.-% enthalten. Eine natürliche Bildung von Biogas findet u. a. in Mooren (Zellner *et al.* 1988), Meeren (DeLong 1992), Reisfeldern (Rajagopal *et al.* 1988) und den Mägen von Wiederkäuern (Paynter und Hungate 1968) statt. In künstlichen Systemen wie Biogasanlagen werden neben nachwachsenden Rohstoffen auch biogene Reststoffe unter kontrollierten Bedingungen vergoren, um Methan zu erzeugen. Die Nutzung von Biogas ist sowohl aus ökonomischer als auch aus ökologischer Sicht eine gute Lösung (Tilche und Galatola 2008) und hat gegenüber anderen alternativen Energien, wie Wind- oder Sonnenkraft, entscheidende Vorteile. Biogas ist vielseitig einsetzbar und sowohl in Form von Strom und Wärme als auch als Treibstoff nutzbar (Weiland 2009). Es besteht die Möglichkeit, Biogas direkt nach der Entstehung in Blockheizkraftwerken (BHKWs) zu verstromen oder als Gas über das bestehende Gasnetz zu transportiert und unterirdisch in alten Erdgaslagerstätten einzuspeichern. Das bietet die Möglichkeit, Biogas effizient und bedarfsorientiert zu nutzen (Urban 2010). Nach Angaben des Fachverbandes Biogas stieg die Zahl der Biogasanlagen in Deutschland von 850 im Jahr 1999 auf 7515 im Jahr 2012 (Fachverband Biogas e.V. 2013).

Durch die Nutzung von biogenen Reststoffen wie z. B. Fettabscheiderinhalten und Speiseresten, kann die in organischen Abfällen chemisch gespeicherte Energie genutzt und gleichzeitig der anfallende „Müll“ verringert werden. Die Abfälle aus der Lebensmittelindustrie sind durch hohe Anteile an Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen gekennzeichnet. Da sie ein hohes Biogaspotential besitzen sind sie gut als Substrate

geeignet. Auf Grund zu schneller Umsetzung dieser Substrate kommt es zur übermäßigen Bildung von organischen Säuren, die den Methanbildungsprozess stören können. Aus diesem Grund werden solche Abfälle in geringen Mengen als Co-Substrate eingesetzt. Neben der Nutzung biogener Reststoffe (kommunale und industrielle Abfälle), können nachwachsende Rohstoffe als Substrate in Biogasanlagen vergoren werden. Durch die Nutzung von sogenannten Energiepflanzen wie z. B. Mais kann eine Flächenkonkurrenz zwischen Energie- und Lebensmittelwirtschaft entstehen (Meyer und Priefer 2012). Um diese Konkurrenz zu verringern, wurde in der Novelle des EEG (EEG 2012) sowohl der Mais- als auch der Getreideanteil des Gärsubstrates auf 60% begrenzt und die Nutzung von Reststoffen stärker gefördert.

Ein stabiler Prozess der Biogasbildung ist eine wichtige Voraussetzung, um Biogas als Energieträger wirtschaftlich verwenden zu können. Da viele Zusammenhänge der Biogasbildung noch nicht in vollem Umfang verstanden sind, werden die Kapazitäten vieler Biogasanlagen nicht ausgeschöpft. Um die Anlagen optimal nutzen zu können, ist es notwendig, ein tieferes Verständnis über die mikrobielle Biozönose und deren Reaktionen auf verschiedene Stresssituationen zu erhalten. Um die Ausbeute einer Biogasanlage zu optimieren, ist es nötig die mikrobielle Gemeinschaft während Stoßbelastungen, Übersäuerungen und Entsäuerung zu untersuchen. Das vermindert das Risiko von Prozessstörungen und steigert die Profitabilität von Biogasanlagen (Balussou *et al.* 2011; Würdemann *et al.* 2012).

## **2. Stand der Wissenschaft und Technik**

### **2.1. Technische Systeme zur Erzeugung von Biogas**

Es gibt vielfältige technische Systeme für den anaeroben Abbau organischen Materials und die Erzeugung von Biogas. Die Substratzusammensetzung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Wahl des Anlagentyps. Zum einen kann unterschieden werden, welche Konsistenz das eingesetzte Substrat hat. Je nach Wassergehalt unterscheidet man Nass- und Trockenfermentation. Bei der Nassfermentation werden rührfähige Substrate mit einem hohen Wassergehalt vergoren. Hier liegt der Trockensubstanzgehalt (TS-Gehalt) zwischen 3 und 15 %. Die Trockenfermentation wird für nicht pumpfähige Substrate mit einem TS-Gehalt von  $\geq 30$  % genutzt (Wittmaier *et al.* 2006). Substrate, die bei der Nassfermentation eingesetzt werden können, sind: Wirtschaftsdünger aus der Landwirtschaft (Gülle, Mist), nachwachsende Rohstoffe (Mais, Rüben, Gras), Reststoffe aus der Bierherstellung, der Alkoholgewinnung, der Kartoffelverarbeitung und Zuckergewinnung. Des Weiteren können organische Reststoffe aus Haushalten und Kommunen (Biotonne, Marktabfälle, Fettabscheider, überlagerte Lebensmittel, Klärschlamm) gut zur Erzeugung von Biogas eingesetzt werden (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. 2004).

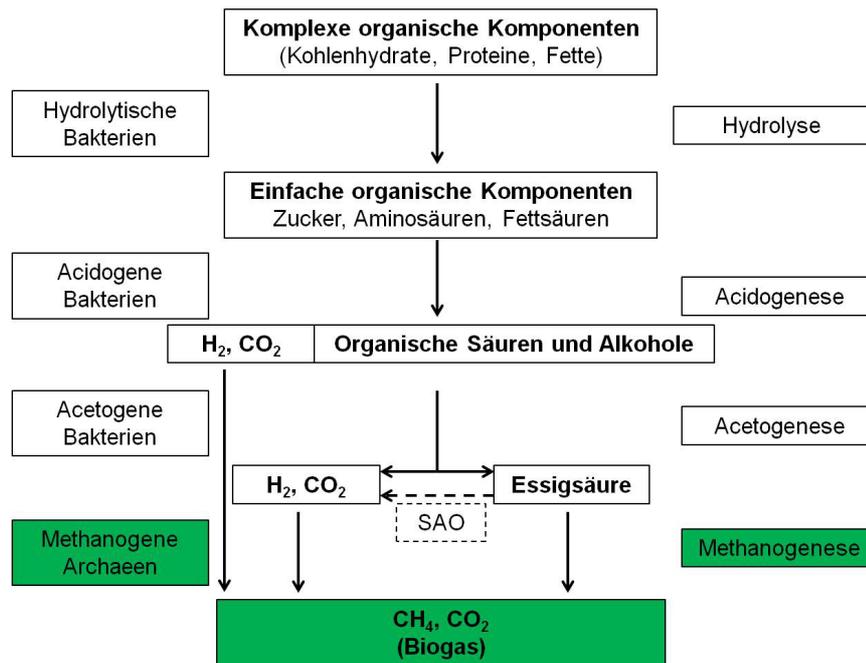
Biogas kann mit Hilfe ein-, zwei- und mehrstufiger Verfahren gebildet werden. Während bei einstufigen Verfahren alle Phasen der Biogasbildung in einem Reaktor ohne räumliche Trennung voneinander ablaufen, werden die Phasen in zwei- bzw. mehrstufigen Anlagen voneinander getrennt (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. 2004). Einen Überblick über die verschiedenen Reaktorsysteme geben (Mudrack und Kunst 2003).

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an einstufigen vollaufmischten kontinuierlich betriebenen Biogasreaktoren durchgeführt (Continuous Stirred Tank Reactor – CSTR). Die genutzten Biogasreaktoren besaßen kein Trägermaterial zur Anreicherung von mikrobieller Biomasse, wodurch eine optimale Durchmischung von zugeführtem Substrat und Gärrest möglich war.

Im Rahmen dieser Arbeit war es ebenso wichtig, sogenannte Schlammbedtreaktoren (UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket) näher zu betrachten. Bei diesem Reaktortyp wird die Eigenschaft von anaeroben Mikroorganismen ausgenutzt, unter Stressbedingungen sogenannte Pellets (Agglomerationen) zu bilden (Bischofsberger *et al.* 2005). Aufgrund ihrer höheren Dichte neigen diese Pellets zur Sedimentation und lassen sich leicht zurückhalten. Die Anreicherung der Biomasse wird zur effizienten Abwasserbehandlung genutzt und ermöglicht u. a. die Behandlung von belasteten Abwässern aus Gerbereien und Schnapsbrennereien (Rajeshwari *et al.* 2000).

### **2.2. Anaerober Abbau organischer Substanz**

Der anaerobe Abbau von organischer Substanz (Gärung) ist ein Prozess, der zur Gewinnung von Energie genutzt werden kann, wobei durch eine Substratkettenphosphorylierung der universelle Energieträger der Zelle Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird (Madigan *et al.* 2001). Dieser Abbau erfolgt in mehreren Phasen, an denen verschiedene Mikroorganismen beteiligt sind (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Phasen des Abbaus von organischen Verbindungen unter anaeroben Bedingungen modifiziert nach (De Vrieze *et al.* 2012; Liu und Whitman 2008); SAO: syntrophe Acetatoxidation durch SAO Bakterien.**

Im ersten Schritt, der **Hydrolyse**, wird mit Hilfe extrazellulärer Enzyme das komplexe organische Material in eine wasserlösliche, niedermolekulare Form überführt, damit es von den Organismen aufgenommen und verstoffwechselt werden kann. Polymere wie Kohlenhydrate, Proteine und Fette werden durch Exoenzyme (wie Cellulasen, Amylasen, Proteasen und Lipasen) in Oligomere und Monomere (wie Oligo- und Monosaccharide, Aminosäuren, Fettsäuren und Glycerol) gespalten. Fakultativ anaerobe oder obligat anaerobe hydrolytische Bakterien wie z. B. *Thermoanaerobium*, *Clostridium*, *Fibrobacter*, *Bacillus* und *Pseudomonas* sind an diesem Prozess beteiligt (Heyer 1990).

In der **Acidogenese**, dem zweiten Schritt des anaeroben Abbaus, werden die durch Hydrolyse gebildeten Monomere und Oligomere von anaeroben Bakterien durch unterschiedliche Gärungen (wie z. B. Propion- und Milchsäuregärung) zu kurzkettigen Fettsäuren und Alkoholen oxidiert. Acidogene Bakterien sind z. B. *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* und *Acetivibrio*. Sie bilden u. a. Ameisensäure (HCOOH), Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH), Propionsäure (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>COOH), Valeriansäure (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>COOH), Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), Propanol (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH) und Butanol (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>OH). Weiterhin entstehen bei diesem Schritt Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) und Wasserstoff (H<sub>2</sub>) (Madigan *et al.* 2001).

In der **Acetogenese** werden die aus der Acidogenese stammenden Substrate wie Propionsäure (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>COOH), Valeriansäure (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>COOH) und die kurzkettigen Alkohole durch sogenannte acetogene Bakterien wie z. B. *Syntrophomonas* und *Acetobacterium* verstoffwechselt. Die entstehenden Produkte sind Essigsäure, Kohlendioxid und Wasserstoff. Der Abbau der flüchtigen Säuren und Alkohole zu Essigsäure läuft nur bei einem niedrigen Wasserstoffpartialdruck (unter 0,1 mbar) energiegewinnend ab. Der entstehende Wasserstoff muss daher sofort von anderen Mikroorganismen umgesetzt werden. Solche wasserstoffzehrenden Organismen sind z. B. hydrogenotrophe Archaeen. Zwischen ihnen und den acetogenen Bakterien besteht eine obligat syntrophe Beziehung (Madigan *et al.* 2001). Die syntrophen Partnerorganismen sind auf Grund der geringeren Diffusionsrate von H<sub>2</sub> in wässrigen Phasen, auf einen

engen Zellkontakt angewiesen, da nur dann eine effiziente H<sub>2</sub>-Übertragung möglich ist (Stams und Plugge 2009; Thiele und Zeikus 1988).

Im letzten Schritt des anaeroben Abbaus von organischem Material, der **Methanogenese**, erfolgt die Bildung von Methan. Dieses Gas wird ausschließlich von Archaeen unter Energiegewinn auf verschiedenen Wegen gebildet: hydrogenotroph, acetoklastisch und methylo-troph (Tabelle 1). Während hydrogenotrophe Archaeen als Substrate Kohlendioxid und Wasserstoff nutzen, verwenden acetoklastische Archaeen Essigsäure. Methylo-trophe Archaeen nutzen neben Methanol (CH<sub>3</sub>OH) verschiedene Methylamine als Substrate zur Methanbildung. Der überwiegende Teil der methanogenen Archaeen bildet Methan auf dem hydrogenotrophen Weg (Madigan *et al.* 2001). Bisher sind zwei Gattungen von Archaeen identifiziert worden, die Methan auf dem acetoklastischen Weg bilden. Es handelt sich hierbei um *Methanosaeta* und *Methanosarcina* (Garcia *et al.* 2000). Obwohl nur diese zwei Arten Essigsäure als Substrat nutzen, werden auf acetoklastischem Weg 66 % der jährlichen Weltmethanproduktion erzeugt (Fournier 2009).

Die Gattung *Methanosarcina* besitzt unter den methanogenen Archaeen das breiteste Substratspektrum und kann als mixotroph bezeichnet werden. Mitglieder dieser Gattung produzieren Methan sowohl auf hydrogenotrophen als auch acetoklastischem Weg. Des Weiteren können sie Methylamine zur Methanbildung nutzen (Madigan *et al.* 2001). Darüber hinaus besitzen Vertreter dieser Gattung die Fähigkeit, Essigsäure zu Wasserstoff und Kohlenstoff zu oxidieren und aus diesen beiden Produkten Methan zu bilden. Auf Grund der Substratvielfalt ist die Gattung *Methanosarcina* in der Lage sich eher an Umweltveränderungen anzupassen als andere Archaeen (Baserba *et al.* 2012; De Vrieze *et al.* 2012).

**Tabelle 1: Überblick über verschiedene Reaktionen und die dabei frei werdende Energie bei der Bildung von Biogas modifiziert nach (Madigan *et al.* 2001).**

Reaktionstyp	Reaktion	Energiegewinn	
		(ΔG <sup>0'</sup> )	(ΔG)
<b>Acidogenese</b>			
Glucose zu Essigsäure, H <sub>2</sub> und CO <sub>2</sub>	$C_6H_{12}O_6 + 4 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + 2 HCO_3^- + 4 H^+ + 4 H_2$	- 207 kJ	
Glucose zu Buttersäure, CO <sub>2</sub> und H <sub>2</sub>	$C_6H_{12}O_6 + 2 H_2O \rightarrow C_3H_7COO^- + 2 HCO_3^- + 2 H_2 + 3 H^+$	- 135 kJ	
<b>Acetogenese</b>			
Buttersäure zu Essigsäure und H <sub>2</sub>	$C_3H_7COO^- + 2 H_2O \rightarrow 2 CH_3COO^- + H^+ + 2 H_2$	+ 48,2 kJ	- 22 kJ
Propionsäure zu Essigsäure und H <sub>2</sub>	$C_2H_5COO^- + 3 H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + H_2$	+ 76,2 kJ	- 21 kJ
<b>Methanogenese</b>			
Aus Essigsäure	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31 kJ	- 36 kJ
Aus H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub>	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$	-136 kJ	- 15 kJ
Aus Methanol	$CH_3OH + H_2 \rightarrow 3 CH_4 + CO_2 + 2 H_2O$	-113 kJ	

ΔG<sup>0'</sup>: Energiegewinn in [kJ mol<sup>-1</sup> CH<sub>4</sub>] unter Standardbedingungen (gelöste Stoffe 1 M; Gase 1 atm)

ΔG: Energiegewinn in [kJ mol<sup>-1</sup> CH<sub>4</sub>] bei syntropher Lebensweise acetogener und methanogener Organismen

Betrachtet man den anaeroben Abbau aus energetischer Sicht, ist die Acidogenese der erste energiegewinnende Schritt (Tabelle 1). Die Acetogenese hingegen kann nur energiegewinnend ablaufen, wenn syntrophe Partnerorganismen den Wasserstoffpartialdruck senken und dieser unter einem Wert von 0,1 mbar bleibt. Der anaerobe Abbau von Propion- und Buttersäure ist endergonisch und daher

thermodynamisch ungünstig. Wenn der erzeugte  $H_2$  als Elektronendonator für die Methanogenese dient, wird die Gesamtreaktion exergonisch und der Abbau der Säuren thermodynamisch möglich (Schink und Stams 2005). Der Energiegewinn ist sehr klein und muss unter allen, an der syntrophen Gemeinschaft beteiligten Organismen, geteilt werden (Stams *et al.* 2006). Nur durch die syntrophe Lebensweise ist das Wachstum aller an der syntrophen Gemeinschaft beteiligten Mikroorganismen erst möglich. Der Energiegewinn während der Methanogenese ist relativ klein.

Die geringe Energieausbeute der unterschiedlichen Phasen des anaeroben Abbaus erklären u. a. die im Vergleich zum aeroben Abbau sehr langen Generationszeiten der beteiligten Mikroorganismen. Während *Escherichia coli* als aerobes Bakterium unter optimalen Bedingungen eine Generationszeit von ca. 20 Minuten hat, benötigen methanogene Archaeen, wie z. B. *Methanosarcina barkeri* 5 bis 15 Tage um ihre Zellzahl zu verdoppeln (Madigan *et al.* 2001).

## **2.3. Chemische Prozessparameter/Milieubedingungen**

Die unterschiedlichen Phasen des anaeroben Abbaus werden durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst, die für eine effiziente und stabile Biogasbildung notwendig sind. Diese Milieubedingungen sind z. B. pH-Wert, Redoxpotential, Sauerstoff, Temperatur, Nährstoffe und Spurenelemente. Aber auch Wasserstoffpartialdruck und Hemmstoffe beeinflussen den anaeroben Abbau.

### **2.3.1. pH- Wert**

Der optimale pH-Wert für die fermentativen Organismen der Hydrolyse liegt bei pH 6,0 (Bischofsberger *et al.* 2005). Bei diesem Wert läuft die Umsetzung des Substrats mit maximaler Geschwindigkeit ab. Bei der Acidogenese liegt der optimale pH-Wert unter 6,5 (Mudrack und Kunst 2003). Die Organismen der Methanogenese haben ihr Optimum bei einem Wert zwischen pH 6,8 und pH 7,2 (Mudrack und Kunst 2003; Röske und Uhlmann 2005).

Aufgrund der unterschiedlichen pH- Optima wird in einstufigen Biogasanlagen der Prozess als Kompromiss bei einem pH-Wert von  $\geq 7$  eingestellt. Der pH-Wert richtet sich hierbei nach dem Optimum der methanogenen Archaeen, da diese Organismen besonders empfindlich auf einen zu geringen pH-Wert reagieren (Gerardi 2003).

### **2.3.2. Redoxpotential**

Das Redoxpotential gibt an, wie groß das Reduktions- bzw. das Oxidationsvermögen in einem geochemischen System ist. Anaerobe Organismen, wie sie in der Biozönose der Biogasanlage vorhanden sind, können nur bei negativen Redoxpotentialen leben. Methanogene Archaeen z. B. benötigen ein Redoxpotential von  $\leq -330$  mV (Rieger und Weiland 2006).

### **2.3.3. Sauerstoff**

Der Abbau des organischen Materials in der Biogasanlage läuft unter Ausschluss von Luftsauerstoff ab. Die Methanogenese erfolgt in einem strikt anaeroben Milieu - Sauerstoff ist für methanogene Archaeen toxisch, da entsprechende Enzyme wie z. B. Superoxid-Dismutase und Katalase fehlen oder eine sehr geringe Aktivität haben (Madigan *et al.* 2001). Während kleine Sauerstoffmengen, die in das System

gelangen, durch fakultativ anaerobe Bakterien veratmet werden können, wirken sich größere Mengen hemmend auf die Methanogenese aus (Jarrell 1985).

#### **2.3.4. Temperatur**

Chemische Reaktionen laufen bei hoher Temperatur schneller ab. Eine beliebige Erhöhung der Temperatur in einem biologischen System wie einer Biogasanlage ist nicht möglich, da die am Abbau beteiligten Organismen und Enzyme jeweils ein bestimmtes Temperaturoptimum haben. Dies ist *per definitionem* die Temperatur bei der die Zellen der Mikroorganismen am schnellsten wachsen. Beim Überschreiten einer bestimmten Temperatur kommt es zu einer irreversiblen Schädigung von Proteinen, infolge dessen Wachstum und Stoffwechselfunktionen abnehmen (Madigan *et al.* 2001).

Mikroorganismen können in die folgenden vier Temperaturklassen eingeordnet werden (Madigan *et al.* 2001):

- (1) psychrophil (Temperaturbereich von -5°C bis 20°C)
- (2) mesophil (Temperaturbereich von 10°C bis 47°C)
- (3) thermophil (Temperaturbereich von 40°C bis 90°C)
- (4) hyperthermophil (Temperaturbereich von 70°C bis 110°C)

Da im psychrophilen Bereich die chemischen Reaktionen für die technische Nutzung zu langsam ablaufen, spielen diese Mikroorganismen bei der Bildung von Biogas keine Rolle. Hyperthermophile Organismen finden z. B. bei der Produktion von Wasserstoff Verwendung (Kanai *et al.* 2005).

#### **2.3.5. Nährstoffe und Spurenelemente**

Zu einem stabilen Milieu gehört eine regelmäßige Zufuhr von Nährstoffen wie Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Phosphor (P) und Schwefel (S), wobei ein Verhältnis von C:N:P:S=600:15:5:1 ausreichend ist (Weiland 2009). Aber auch Spurenelemente wie z. B. Nickel, Kobalt, Eisen und Selen sind für das mikrobielle Wachstum zwingend notwendig (Weiland 2009). Diese gewährleisten optimale Wachstums- und Vermehrungsbedingungen für die Mikroorganismen.

Der als Substrat genutzte Klärschlamm enthält in der Regel alle Nährstoffe und Spurenelemente in ausreichender Menge (Rulkens 2008).

#### **2.3.6. Hemmstoffe**

Sowohl Schwermetalle als auch Nichtmetalle wirken sich, in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, hemmend auf die Biogasbildung aus. Auch der Eintrag von Lösungs- und Desinfektionsmitteln, Antibiotika und Herbiziden kann den Biogasbildungsprozess stören. Des Weiteren wirken aromatische Verbindungen wie z. B. Kresole als Hemmstoffe auf die mikrobielle Lebensgemeinschaft. Kresole sind Abkömmlinge von Toluol und kommen u. a. im Stein- und Braunkohleteer sowie in Brauereiabwässern (Verstraete 2011) vor. In hohen Konzentrationen haben Kresole bakterizide Eigenschaften und finden u. a. in Desinfektionsmitteln und Pestiziden Verwendung (GisChem 2013). Die Hemmung liegt in der Zerstörung der Zellmembran der Bakterien (Johnston *et al.* 2003).

Darüber hinaus gibt es Hemmstoffe, die als Zwischenprodukte in den einzelnen Phasen des anaeroben Abbaus entstehen. Hierzu zählen u. a. Schwefelwasserstoff, Ammoniak, Wasserstoff und langkettige Fettsäuren (Bischofsberger *et al.* 2005).

**Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S)** kann im Prozess gebildet werden, wenn schwefelhaltige und proteinreiche Substrate wie z. B. Gülle, Schlacht- und Speiseabfälle vergoren werden. Bei hohen Sulfatkonzentrationen können sulfatreduzierende Bakterien (SRB) u. a. erfolgreich mit methanogenen Archaeen um H<sub>2</sub> konkurrieren. SRB bilden Sulfide, die für die methanogenen Archaeen toxisch sind (Chen *et al.* 2008). H<sub>2</sub>S wirkt nicht nur toxisch auf Mikroorganismen, sondern besitzt außerdem korrosive Eigenschaften, welche zu Schäden an der Biogasanlage führen können (Hulshoff Pol *et al.* 1998).

Wenn stickstoffhaltige Substrate wie z. B. Gülle und Festmist durch Mikroorganismen abgebaut werden, entsteht, abhängig vom pH-Wert, **Ammoniak (NH<sub>3</sub>) bzw. Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)**. Beide stehen in einem Gleichgewicht zueinander. Ammonium, als dissoziierte Form, ist ungiftig. Ammoniak, die undissoziierte Form, ist hingegen giftig für die mikrobielle Gemeinschaft (Kroiss 1985). Vor allem die acetoklastischen Methanogenen reagieren sehr empfindlich auf den Anstieg der Ammoniakkonzentration (Braun *et al.* 1981; Karakashev *et al.* 2005). Mit steigendem pH-Wert und steigender Temperatur verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung Ammoniak (Chen *et al.* 2008).

Der **Wasserstoffpartialdruck** spielt beim anaeroben Abbau von organischem Material eine entscheidende Rolle. Steigt dieser auf einen Wert über 0,1 mbar, läuft die Acetogenese nicht mehr energiegewinnend ab (Harper und Pohland 1986). Durch die Anreicherung vor allem von Propionsäure wird die Methanogenese gehemmt. Der Bereich, in dem die Umwandlung von Propion- und Buttersäure in Essigsäure simultan mit der Methanbildung ablaufen kann, wird als thermodynamisches Fenster bezeichnet. Der Abbau der Essigsäure ist, im Gegensatz zu Propion- und Buttersäure, unabhängig vom Wasserstoffpartialdruck (Wandrey und Aivasidis 1983). Das thermodynamische Fenster für den energiegewinnenden Abbau der Propionsäure liegt zwischen 0,001 mbar und 0,1 mbar. Der Buttersäureabbau hingegen ist auch bei Wasserstoffpartialdrücken bis zu 1 mbar möglich (Harper und Pohland 1986).

Fette werden hydrolytisch zu **langkettigen Fettsäuren** (LCFA - long chain fatty acids) und Glycerol gespalten. LCFA können von syntrophen Bakterien zu Wasserstoff, Kohlendioxid und Essigsäure verstoffwechselt werden. Anschließend wird der Wasserstoff vom methanogenen Partnerorganismus zu Methan umgewandelt (Palatsi *et al.* 2010). Die toxische Wirkung von LCFA liegt vor allem in der Adsorption an die Zellwand/Zellmembran. In Folge dessen wird die Transport- und Schutzfunktion der Zellwand/Zellmembran beeinträchtigt (Rinzema *et al.* 1994). Thermophile Organismen sind im Allgemeinen sensitiver gegenüber LCFA als mesophile Organismen, wahrscheinlich auf Grund der unterschiedlich aufgebauten Zellmembran (Hwu und Lettinga 1997).

Es besteht die Möglichkeit, dass sich eine mikrobielle Biozönose an hohe Hemmstoffkonzentrationen anpasst. Dabei kommt es z. B. neben der Anpassung des Stoffwechsels (Adaptation) zu einer Vermehrung solcher Organismen, die in der Lage sind, den Hemmstoff zu mineralisieren, umzubauen oder abzubauen, wie es z. B. für den LCFA-Abbau beschrieben wurde (Palatsi *et al.* 2010).

## 2.4. Prozessstörung durch Übersäuerung und Maßnahmen zur Prozessregenerierung

Von einer Übersäuerung wird gesprochen, wenn der pH-Wert des Gärslamms sinkt, die Gasproduktion abnimmt und Fettsäuren akkumulieren. Die Gesamtsäurekonzentration liegt bei einem stabilen Biogasprozess unter  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  (Kämpfer und Weißenfels 2001). Sowohl durch Stoßbelastungen als auch durch steigende Raumbelastungen ist es möglich, dass sich flüchtige Fettsäuren (VFA - volatile fatty acids) und langkettige Fettsäuren (LCFA) im Biogasfermenter anreichern und zu einer Prozessstörung führen (Bischofsberger *et al.* 2005; Schink 1997).

Als weitere Auslöser für eine Übersäuerung spielen Hemmstoffe eine große Rolle. Durch hohe Hemmstoffkonzentration können die an der Biogasbildung beteiligten Mikroorganismen inhibiert werden. Auf Grund dessen steigt die Konzentration von VFA, der pH-Wert verringert sich und die Gasbildungsrate sinkt. Eine Senkung der Abbaurrate von Fettsäuren deutet auf eine Hemmung des syntrophen Abbaus hin (Schink 1997). Auf Grund des niedrigen pH-Wertes liegen die Fettsäuren zunehmend ungeladen vor und können zur Hemmung der Methanogenese führen. Undissoziierte Fettsäuren diffundieren durch die Zellmembran der Mikroorganismen. Während der Diffusion dissoziieren sie und zerstören den Wasserstoffgradienten an der Zellmembran, wodurch die Verfügbarkeit von ATP für den zellulären Metabolismus und das Wachstum gesenkt wird (Fukuzaki *et al.* 1990). Durch die Akkumulation von Fettsäuren und den sinkenden pH-Wert werden zuerst die methanogenen Archaeen gehemmt, wobei vor allem acetoklastische Archaeen sehr empfindlich sind (Koster und Cramer 1987; Lalman und Bagley 2000). Die Empfindlichkeit ist u. a. darauf zurückzuführen, dass methanogene Archaeen sowohl einen pH-Wert unter 6,8 als auch starke Schwankungen schlechter tolerieren als säurebildende Bakterien (Gerardi 2003). Die Hemmung der acetoklastischen Methanogenese führt zu einer steigenden Essigsäurekonzentration. Acetogene Mikroorganismen werden daher sowohl durch einen steigenden  $\text{H}_2$ -Partialdruck als auch durch hohe Essigsäurekonzentrationen gehemmt, wodurch andere Fettsäuren wie Propion-, Butter- und Valeriansäure akkumulieren. Als Ergebnis tritt eine Übersäuerung des Gärslamms ein.

Um einer Übersäuerung entgegenzuwirken, werden verschiedene Maßnahmen im Anlagenbetrieb durchgeführt. Die erste Maßnahme bei einer drohenden Übersäuerung ist die Senkung der Raumbelastung (McCarty 1964; Mudrack und Kunst 2003). Die Zufuhr von frischem organischem Material wird herabgesetzt, um den im Gärslamm enthaltenen Mikroorganismen weniger Substrat für ihren Metabolismus zuzuführen, was die Bildung von Fettsäuren verringert. Weiterhin werden durch den kontinuierlichen Betrieb der Biogasanlage akkumulierte Fettsäuren verdünnt und ausgewaschen.

Eine weitere Möglichkeit zur Anhebung des pH-Wertes ist der Einsatz von Laugen, z. B. Natronlauge (NaOH). Diese wird sowohl von der Deutschen Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V. (ATV-DVWK) Merkblatt 372 (Burger *et al.* 2003) als auch von Kroiss (1985) empfohlen. Darüber hinaus können Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) und Calciumhydroxid [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ] zur Kontrolle des pH-Wertes eingesetzt werden (McCarty 1964).

Die Untersuchungen von Kleyböcker *et al.* (2012) zeigten, dass sich die Zugabe von NaOH weniger auf die Prozessregenerierung auswirkte als CaO. Ein Grund dafür kann sein, dass Natriumionen als einwertig geladene, kleine Ionen eine dicke Hydrathülle besitzen. Die Ausbildung von Kationenbrücken wird durch

die Dicke der Hydrathülle beeinflusst. Bei zunehmender Ionengröße wird die Hydrathülle dünner. Im Vergleich zu Natriumionen sind zweiwertig geladene Calciumionen größer und haben eine dünnere Hydrathülle. Daher sind sie eher in der Lage, an negativ geladene Zelloberflächen oder EPS zu binden als Ionen mit einer dicken Hydrathülle wie Natrium und andere einwertige Kationen (Kara *et al.* 2007). Folglich kann es vor allem nach der Zugabe von Calcium zur Entstehung von stabilen Verbindungen von Zellen und EPS und zur Bildung von Pellets kommen. Die Untersuchungen von Kara *et al.* (2007) belegen zudem den negativen Einfluss von Natriumionen auf die Bildung von Belebtschlammflocken.

## 2.5. Rolle der Polyphosphat akkumulierenden Organismen (PAO)

Die während einer Übersäuerung im Biogasreaktor herrschenden Bedingungen, sind ideal für sogenannte Polyphosphat akkumulierende Organismen (PAO). Diese nehmen unter anaeroben Bedingungen und bei hohen VFA-Konzentrationen Essigsäure oder Buttersäure auf und geben gleichzeitig Phosphat aus einem internen Speicher (Volutin-Granula) ab. Phosphat wird im aeroben Milieu unter bestimmten Randbedingungen in Form von langen Polyphosphatketten gespeichert. Polyphosphat (Poly-P) besteht aus mehreren hundert Orthophosphatresten ( $P_i$ ), die über energiereiche Anhydridbindungen miteinander verbunden sind (Kornberg 1995). Die Fähigkeit, große Mengen an Phosphat aufzunehmen, wird seit vielen Jahren in Kläranlagen zur erhöhten biologischen Phosphateleminierung (Enhanced biological phosphorus removal - EBPR) genutzt. PAO werden durch wechselnde Milieubedingungen (aerob-anaerob) angeregt, während der aeroben Phase sehr viel mehr Phosphat aufzunehmen als sie anaerob abgeben. In Folge dessen sinkt der Gesamtphosphatgehalt des Abwassers.

Die Akkumulierung von Poly-P in Bakterien wird durch verschiedene biochemische Modelle beschrieben, die häufig aus Belebtschlammuntersuchungen abgeleitet sind (Mino *et al.* 1998; van Loosdrecht *et al.* 1997). Die Modelle unterscheiden sich hauptsächlich darin, ob der Speicherstoff Glykogen eine Rolle im Stoffwechsel der PAO spielt oder nicht.

Das von Comeau *et al.* (1986) entwickelte Modell beruht darauf, dass die Energie, die für die anaerobe Speicherung von Acetat benötigt wird, aus der Hydrolyse des intrazellulär gespeicherten Poly-P stammt. Anschließend wird unter aeroben Bedingungen ein Teil der Speicherstoffe metabolisiert und die entstehende Energie u. a. für die erneute Speicherung von Phosphat im aeroben Milieu genutzt.

Beobachtungen von Mino *et al.* (1987) zeigten, dass Acetat von den PAO aufgenommen wurde, während gleichzeitig die Kohlenhydratkonzentration im Medium sank. Daher erweiterten sie das bestehende biochemische Modell um den Speicherstoff Glykogen.

PAO sind obligat aerobe heterotrophe Organismen und nutzen unter **aeroben Bedingungen** ihre internen Speicherstoffe als Energie- und Kohlenstoffquelle, um zu wachsen. Gleichzeitig wird Phosphat aus dem umgebenden Milieu aufgenommen und der interne Poly-P-speicher aufgefüllt. Aufgrund dessen haben sie einen selektiven Vorteil bei wechselnden Umweltbedingungen. Untersuchungen von (Hu *et al.* 2002; Mino *et al.* 1995) wiesen die vermehrte Aufnahme von Phosphat im anoxischen Milieu nach.

Als Energiequelle nutzen PAO unter **anaeroben Bedingungen** den intern gespeicherten Poly-P-Pool. Die Spaltung der Anhydridbindungen zwischen den  $P_i$ - Resten setzt  $42 \text{ KJ Mol}^{-1}$  frei. Die gewonnene Energie nutzen sie, um aus kurzkettigen Fettsäuren (wie Essig- und Propionsäure) Polyhydroxyalkanoate (PHA)<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Polyhydroxyalkanoate (PHA) sind u. a. Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrat (PHB) und Poly- $\beta$ -Hydroxyvalerat (PHV)

(Comeau *et al.* 1986) und/oder Glykogen (Mino *et al.* 1987) zu synthetisieren. Die kurzkettigen Fettsäuren werden aus dem umgebenden Milieu aufgenommen, wo sie unter anaeroben Bedingungen durch fermentative Bakterien beim Abbau organischen Kohlenstoffs entstehen. Acetat wird nicht nur zu PHA umgesetzt und gespeichert. Ein Teil wird direkt in den Zitronensäurezyklus in Form von Acetyl-Coenzym A zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels eingeschleust (Glöß 2010). Die Rücklösung des Phosphates führt zu einem Anstieg der Phosphatkonzentration im anaeroben Milieu.

Für viele verschiedene Bakterien wurde die vermehrte Einspeicherung von Phosphat beobachtet. Vertreter finden sich unter den  $\beta$ -Proteobakterien (*Rhodocyclus spec.*, *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, *Dechloromonas spec.*), den  $\gamma$ -Proteobakterien (*Acinetobacter spec.*, *Lampropedia spec.*) und den grampositiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt (*Microthrix phosphorus*, *Tetrasphaera spec.*, *Microthrix spec.*, *Micropruina glycogenica*).

In einem Biogasreaktor ist der Gehalt kurzkettiger Fettsäuren wie Essig- und Propionsäure im Normalfall gering, da sie schnell sowohl von acetogenen als auch acetoclastischen Mikroorganismen verstoffwechselt werden. Um Phosphat abzugeben und kurzkettige Fettsäuren aufzunehmen benötigen PAO die sieben- bis zehnfache Menge an kurzkettigen Fettsäuren im Verhältnis zum Gesamtphosphor (Röske und Uhlmann 2005). Liegen nur geringe Konzentrationen bzw. keine kurzkettigen organischen Säuren vor, dann nimmt die Kapazität der Phosphatrücklösung und -aufnahme deutlich ab (Randall *et al.* 1997).

Untersuchungen von (Lerm *et al.* 2012) deuteten darauf hin, dass PAO zu einer Stabilisierung des Biogasprozesses beitragen können. Die Autoren untersuchten Gärreste von Laborfermentern vor und während einer Prozessstörung, die durch eine Substratüberfrachtung mit Rapsöl herbeigeführt wurde. Neben den Klassen Clostridia und Bacteroidetes wurden auch Polyphosphat akkumulierende Actinobacteria nachgewiesen. Nach der Übersäuerung wurden kleine 0,5 bis 2 cm große Pellets beobachtet, die im Inneren vor allem aus organischem Material und verschiedenen Mineralen wie z. B. Vivianit [ $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ] bestanden. Um diesen Kern herum lagen verschiedene Schichten, die aus langkettigen Fettsäuren, die an verschiedene mehrwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  gebunden waren, und Aluminiumphosphat ( $\text{AlPO}_4$ ) bestanden. Dabei waren Polyphosphat akkumulierende Actinobacteria sehr wahrscheinlich an der Bildung dieser Pellets beteiligt. Granuläre Strukturen wurden bis dahin vor allem in sogenannten UASB-Reaktoren (UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket) beobachtet, nicht jedoch in CSTR-Reaktoren (Continuous Stirred Tank Reactor). In UASB-Reaktoren wird die Bildung von Pellets genutzt, um durch hohe Zelldichten eine effiziente Abwasserreinigung von stark belasteten Abwässern zu erreichen (Liu *et al.* 2003).

### **3. Ziele der Arbeit**

Ziel der vorgelegten Arbeit ist es, am Beispiel einer großtechnischen Biogasanlage (Co- Vergärungsanlage Radeberg) und mit begleitenden Laboruntersuchungen die an der Biogasbildung beteiligten mikrobiellen Biozönosen, sowie die Möglichkeiten von Prozessstörungen und Prozessregenerierung zu untersuchen.

Besonders sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welche Änderungen der mikrobiellen Biozönose treten im Zuge von Prozessstörungen (Übersäuerungen) und anschließenden Prozessregenerierungen auf?
2. Welche Rolle spielt die Bildung von Pellets für die Prozessregenerierung und die Prozessstabilität?
3. Ist die Bildung der Pellets mikrobiell induziert?

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Anlagenbeschreibungen und Probennahme

Die Untersuchungen zur Prozessstabilisierung wurden an einer großtechnischen Biogasanlage mit zwei Biogasreaktoren und einer Laboranlage mit drei Biogasreaktoren durchgeführt. Diese Anlagen werden im nach folgenden Abschnitt kurz beschrieben.

#### 4.1.1. Großtechnische Biogasanlage

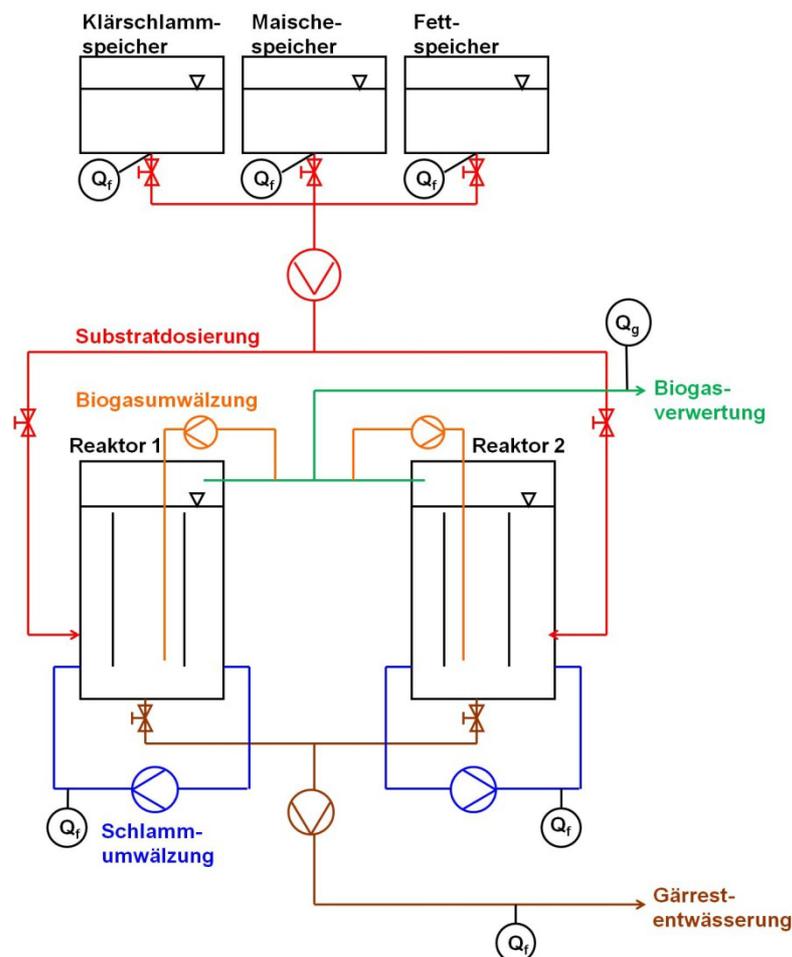


Abbildung 2: Verfahrensschema der großtechnischen Biogasanlage Q<sub>f</sub> – qualitative Flüssiganalysen von Fettsäuren, Calcium, Phosphat, pH-Wert, Trockensubstanz und organischer Trockensubstanz (Probennahmestelle); Q<sub>g</sub> – qualitative Gasanalysen von Methan und Schwefelwasserstoff (Probennahmestelle).

Die großtechnische Biogasanlage bestand aus zwei Biogasreaktoren mit einem Volumen von je 2300 m<sup>3</sup> (Abbildung 2). Diese wurden thermophil bei 47 °C betrieben. Als Substrate dienten Klärschlämme, Maische und Fette. Die Klärschlämme bestanden aus 60% Primärschlamm und 40 % eingedicktem Überschussschlamm aus einem nahe gelegenen Klärwerk mit einer biologischen Phosphateleminierungsstufe. Die Fermenter wurden alternierend sechsmal täglich mit Klärschlamm und sechsmal täglich mit den Co-Substraten Maische und Fett beschickt. Das Volumen der Substrate betrug 50 % Klärschlamm, 30 % Maische und 20 % Fett. Der Untersuchungszeitraum betrug 120 Tage (Tag 31 bis Tag 151). Währenddessen lag die theoretische Verweilzeit der Substrate bei 18 bis 20 Tagen. Die

charakteristischen Betriebs- und Prozessparameter der großtechnischen Biogasreaktoren während des Untersuchungszeitraums sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Betriebs- und Prozessparameter der großtechnischen Biogasreaktoren bei Normalbetrieb; oTS = organische Trockensubstanz.**

<b>Betriebsparameter bei Normalbetrieb</b>	
Reaktorvolumen	2300 m <sup>3</sup>
Betriebstemperatur	47 °C
Raumbelastung	3,2 kg oTS m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>
Gasbildungsrate	Ø 2,3 m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>
<b>Prozessparameter bei Normalbetrieb</b>	
Methangehalt	69 %
pH	7,2 - 7,5
Fettsäuren	250 - 700 mg L <sup>-1</sup>
Calcium	15 - 40 mg L <sup>-1</sup>
Phosphat	80 - 300 mg L <sup>-1</sup>
TS	27 - 38 g L <sup>-1</sup>
oTS	15 - 21 g L <sup>-1</sup>

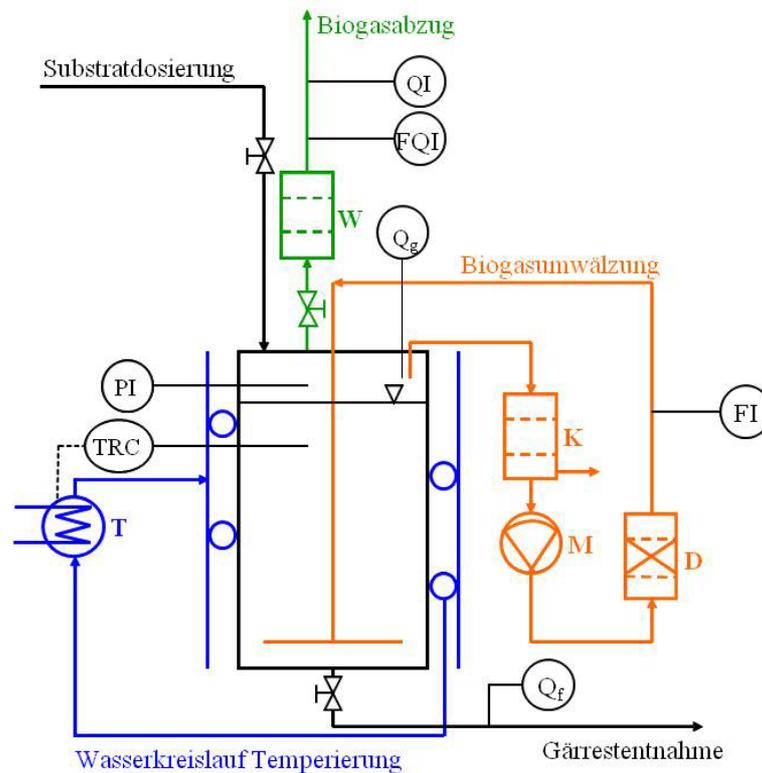
Das Volumen der Fermenter war füllstandsreguliert. Wenn durch die Zufuhr von frischem Substrat, der obere Füllstand erreicht wurde, erfolgte automatisch der Abzug des Gärslammes bis zum unteren Füllstand. Die Gärsubstrate wurden kontinuierlich mittels eines Gaslifts während des Betriebs im Fermenter verteilt. Hierfür wurde ein Teil des erzeugten Biogases zurück in den Fermenter geführt und dort im Zentrum eingeleitet. Zusätzlich wurde der Gärslamm alle zwei Stunden mit Hilfe von Pumpen eine Stunde lang umgewälzt und durchmischt. Der ausgefaulte Schlamm (Gärrest) wurde durch ein Auslassventil im Boden des Fermenters abgezogen, anschließend mit Hilfe von Dekanterzentrifugen entwässert und thermisch verwertet. Die Abwässer aus dem Prozess wurden in das benachbarte Klärwerk eingespeist. Das Biogas wurde in zwei Blockheizkraftwerken (BHKW) in Strom umgewandelt.

Für die Untersuchungen wurden sowohl der Gärrest als auch das produzierte Biogas der beiden Reaktoren kontinuierlich analysiert. Die Probenahmestellen befanden sich an den in Abbildung 2 mit Q<sub>f</sub> bzw. Q<sub>g</sub> gekennzeichneten Stellen. Für die Untersuchung des Gärrests wurden jeweils 1 L Kunststoffflaschen randvoll befüllt. Nachdem noch vor Ort Temperatur und pH-Wert erfasst wurden, wurden die Proben umgehend für die weiteren Analysen gekühlt zum Labor transportiert.

Die molekularbiologische Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose des Gärrests erfolgte in Intervallen an folgenden Tagen: -27 (als Referenz vor der Prozessstörung), 38, 51, 58, 67, 74, 81, 88, 95, 106, 113. Die ionenchromatographische Analyse der flüchtigen Fettsäuren erfolgte in Intervallen an folgenden Tagen: 31, 38, 51, 53, 58, 67, 71, 72, 74, 81, 88, 92, 95, 106, 113, 130, 142, 151.

Der Tag 0 in allen Abbildungen entspricht dem Tag, an dem die Übersäuerung der Gärreste in beiden Biogasreaktoren eingetreten war. Der Betreiber der großtechnischen Biogasanlage informierte über die Prozessstörung erst nach einem Monat. Dem entsprechend beginnt das intensive Monitoring der Anlage erst am Tag 31 nach der Übersäuerung. Alle Proben, die vor dem Tag 0 genommen wurden sind mit einem Minus gekennzeichnet. Angaben wie die Gasbildungsrate, Temperatur und pH-Wert wurden vom Betreiber zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.2. Laborreaktoren



**Abbildung 3:** Verfahrensschema der halbtechnischen Versuchsanlage; D – Trockenturm; FI – Durchflusskontrolle; FQI – Aufzeichnung Biogasmenge; K – Kondensatfalle, M – Membranpumpe; PI – Druckanzeige (mbar); T – Thermostat; TRC – Regelung Temperatur;  $Q_f$  – qualitative Flüssiganalysen von Fettsäuren, Calcium, Phosphat, pH-Wert, Trockensubstanz und organischer Trockensubstanz; Redoxpotential;  $Q_g$  – qualitative Gasanalysen von Methan, Kohlendioxid, Sauerstoff, Stickstoff und Wasserstoff; W – Waschflasche.

Die Laborreaktoren hatten ein Gärslammvolumen von jeweils 23 L (Abbildung 3). Die Umwälzung des Gärslamms erfolgte zweimal täglich mittels Biogas für jeweils 15 min vor der Probenahme und nach der Substratdosierung. Das Biogas wurde mit Hilfe einer Membranpumpe (KNF N86KTE, KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland) abgezogen und im unteren Bereich des Reaktors eingeleitet. Die Beheizung des Reaktors erfolgte von außen über Heizschlangen, die von erwärmtem Wasser aus einem Umwälzthermostat (Thermo Haake B7, Phönix II, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) durchflossen wurden. Die Temperatur des Reaktors lag im thermophilen Bereich bei 50 °C. Die produzierte Gasmenge wurde durch eine Gasmessuhr (Trommel-Gaszähler, Dr.-Ing. RITTER Apparatebau GmbH & Co. KG, Bochum, Deutschland) erfasst. Als Substrate wurden Klärschlamm und Rapsöl eingesetzt. Der Klärschlamm wurde aus der in 4.1.1 beschriebenen großtechnischen Biogasanlage bezogen. Die Substrate wurden manuell dosiert. Um eine Übersäuerung gezielt herbeizuführen, wurde die Raumbelastung 17 Tage vor Versuchsbeginn durch die Zugabe der fünffachen Tagesdosis an Rapsöl von  $3,0 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  auf  $10,0 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  angehoben. Der Versuch dauerte 30 Tage. Währenddessen lag die Raumbelastung der Klärschlammfracht bei  $1,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Um eine hydraulische Verweilzeit von 23 Tagen einhalten zu können, wurde die Menge an Klärschlamm ( $1 \text{ L d}^{-1}$ ) nicht verändert. Das Substrat

wurde täglich manuell nach der Gärrestentnahme in den Fermenter dosiert. Typische Betriebs- und Prozessparameter sind in der Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Betriebs- und Prozessparameter der Laborreaktoren bei Normalbetrieb; oTS = organische Trockensubstanz.**

Betriebsparameter bei Normalbetrieb	
Reaktorvolumen	23 L
Betriebstemperatur	50 °C
Raumbelastung	2,1 - 3,2 kg oTS m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>
Gasbildungsrate	Ø 2,8 m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup>
Prozessparameter bei Normalbetrieb	
Methangehalt	67 – 73 %
pH	7,1 - 7,3
Fettsäuren	400 - 1000 mg L <sup>-1</sup>
Calcium	10 - 30 mg L <sup>-1</sup>
Phosphat	180 - 450 mg L <sup>-1</sup>
TS	38 - 45 g L <sup>-1</sup>
oTS	23 - 27 g L <sup>-1</sup>

Als Co-Substrat wurde Rapsöl (Reines Pflanzenöl, Kaufland Warenhandel GmbH & Co. KG, Neckarsulm, Deutschland) gewählt, da es einen hohen Anteil an langkettigen Fettsäuren hat. Es besteht zu 51- 70% aus Ölsäure, zu 15- 30% aus Linolsäure und zu 5- 14% aus Linolensäure (Fiebig 2011). Neben der Tatsache, dass diese Fettsäuren im realen Abwasser am häufigsten vertreten sind (Komatsu *et al.* 1991), spielt auch deren Toxizität eine große Rolle. Da diese nach (Galbarith *et al.* 1971) sehr hoch ist, ist Rapsöl sehr gut geeignet, um die Prozessstabilität bei Stoßbelastungen zu untersuchen und die Reaktionen der mikrobiellen Biozönose auf extreme Stresssituationen zu analysieren. Rapsöl dient auch als Modellsubstanz für Fettabscheiderinhalte, die als ein energiereiches Substrat sehr gut für die Co-Vergärung geeignet sind.

Das Probenvolumen betrug 1 L. Sofort nach der Gärrestentnahme wurden Temperatur, pH-Wert und das Redoxpotential ermittelt. Aliquote zur Bestimmung von Trockensubstanz und organischer Trockensubstanz, der Fettsäuren und der molekularbiologischen Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose des Gärrests wurden abgenommen. Die molekularbiologische Charakterisierung erfolgte in Intervallen an folgenden Tagen: 0, 7, 10, 21, 28, 34, 35. Auf Grund der langen Generationszeiten der methanogenen Organismen erfolgte die Probennahme fünf Tage über das Versuchsende hinaus. Die ionenchromatographische Analyse der flüchtigen Fettsäuren erfolgte in Intervallen an folgenden Tagen: 0, 3, 6, 8, 10, 14, 17, 19, 22, 24, 26, 30.

## 4.2. Kalkulation und Zugabe der alkalischen Lösungen

### 4.2.1. Großtechnische Biogasanlage

Die Menge an NaOH bzw. CaO zur Anhebung des pH-Wertes auf pH 7,1, wurde wie folgt bestimmt: 500 mL Gärrest wurden aus dem stark übersäuerten **Reaktor R2** entnommen und so lange NaOH bzw. CaO

zugegeben, bis der gewünschte pH-Wert erreicht war. Einen Überblick über die NaOH- bzw. CaO-Raumbelastung ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Übersicht über Raumbelastung der alkalischen Lösungen während der Prozessregenerierung im Reaktor R2 der großtechnischen Biogasanlage.**

Tag [d]	NaOH-Raumbelastung [mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]	CaO-Raumbelastung [mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]
67	30	
73	99	
74	99	
79		261
80		261
86		130
87		130

#### 4.2.2. Laborreaktoren

Die Dosierung von Natronlauge und Calciumoxid waren abhängig vom pH-Wert. Sobald dieser einen Wert von pH 7,1 erreichte, wurde die Zugabe von NaOH bzw. CaO beendet (Tabelle 5, Tabelle 6). Die Raumbelastungen der Laborreaktoren orientierten sich an der Raumbelastung bei Reaktor R2 der großtechnischen Biogasanlage. Nach vier Tagen musste die CaO-Raumbelastung an den Übersäuerungsgrad, der sehr viel höher als bei der großtechnischen Biogasanlage war, angepasst werden.

**Tabelle 5: Übersicht über die Natronlauge-Raumbelastung während der Prozessregenerierung in einem Reaktor der halbtechnischen Versuchsanlage.**

Tag [d]	NaOH-Raumbelastung [mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]
0	121
1	121
2	348
3	348
4	174

**Tabelle 6: Übersicht über die Calciumoxid-Raumbelastung während der Prozessregenerierung in einem Reaktor der halbtechnischen Versuchsanlage.**

Tag [d]	CaO-Raumbelastung [mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ]
0	219
1	219
2	219
3	219
4	439
5	439
6	877
7	877

### 4.3. Analysenmethoden physikalischer und chemischer Prozessparameter

#### 4.3.1. pH- Wert und Temperatur

Im Anschluss an die Probennahme wurden der pH-Wert und die Temperatur mit Hilfe eines kombinierten pH-Wert-/Temperatur-Messgerätes (WTW pH 340i) mit SenTix 41 pH-Elektrode (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland) gemessen. Die Kalibrierung erfolgte wöchentlich mit drei Pufferlösungen (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) unterschiedlicher pH-Werte (pH 4,0 +/- 0,2; pH 7,0 +/- 0,2; pH 10,0 +/- 0,2).

#### 4.3.2. Trockensubstanz und organische Trockensubstanz

Die Bestimmung der Trockensubstanz (TS) und organischen Trockensubstanz (oTS) erfolgte nach DIN 38409-1. Für die Bestimmung der gesamten Trockensubstanz (TS) wurden 50 mL Gärrest in einem Tiegel für 24 Stunden bei 105 °C in einem Trockenschrank (Trockenofen UFE 500, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland) getrocknet. Zur Bestimmung der oTS wurde im Anschluss daran die Probe 2 Stunden bei 550 °C in einem Muffelofen (Muffelofen Controller B170, Nabertherm GmbH, Lilienthal, Deutschland) verglüht.

Die Gewichtsveränderungen durch das Trocknen und Verglühen wurden mit Hilfe einer Waage (CP220S-OCE, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) bestimmt. Vor dem Befüllen wurde das Leergewicht des Tiegels festgestellt. Mit Hilfe der Gleichungen (Gleichung 2 und Gleichung 3) wurden sowohl der TS als auch der oTS berechnet.

$$TS = \frac{(TG - LG)}{V}$$

**Gleichung 2: Berechnung der Trockensubstanz (TS); TG – Trockengewicht; LG – Leergewicht Tiegel; V – Volumen.**

$$oTS = TS - \frac{(GG - LG)}{V} = \frac{(TG - GG)}{V}$$

**Gleichung 3: Berechnung der organischen Trockensubstanz (oTS); TS – Trockensubstanz; GG – Glühgewicht; LG – Leergewicht Tiegel; TG – Trockengewicht; V – Volumen.**

#### 4.3.3. Konzentrationsbestimmung von organischen Säuren, Calcium und Phosphat

Die Analysen der Fettsäurekonzentration (Summenparameter) sowie der Calcium- und Phosphatkonzentration erfolgten mit Hilfe von Schnelltests der Firma Hach-Lange (HACH LANGE GmbH, Berlin, Deutschland). Hierfür wurden ca. 80 g Gärrest in Zentrifugenröhrchen eingewogen und vor der Analyse zweimal 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Centrifuge 5804, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde nach der ersten Zentrifugation in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals zentrifugiert. Für die Bestimmung der organischen Säuren (LCK 365), des Calciums (LCK 327) und des Phosphats (LCK 350) wurde der Überstand des zweiten

Zentrifugationsschritt genutzt. Die Konzentration wurde mittels Photometer (Photometer DR2800, HACH LANGE GmbH, Berlin, Deutschland) bestimmt.

Während der Untersuchungen lag die Calciumkonzentration an einigen Tagen unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze des Schnelltests ( $< 5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Diese Werte wurden in die Abbildungen aufgenommen, um die niedrigen Werte zu verdeutlichen.

#### **4.3.4. Nachweis flüchtiger Fettsäuren**

Die Bestimmung der Konzentration an Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Iso-Buttersäure und Valeriansäure erfolgte mit Hilfe eines Ionenchromatographen (IC) (Dionex ICS 3000, Thermo Fisher GmbH, Idstein, Deutschland), der mit einer AS11- HC Säule ausgerüstet war. Als Eluent diente Natronlauge (NaOH). Für diese Bestimmung wurde der Überstand aus der zweiten Zentrifugation (siehe 4.3.3) genutzt.

#### **4.3.5. Gasanalysen**

Die Analyse des Biogases auf Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Methan und Kohlendioxid erfolgte mittels Gaschromatographie. Der Gaschromatograph (GC) (SRI 8610C SRI Instruments, Torrance, USA), war mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD – thermal conductivity detector), einer  $6' \times 1/8''$  S.S. Silicagelsäule und einer  $6' \times 1/8''$  S.S. Molsieb 13X Säule ausgerüstet. Als Trägergas wurde Argon eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Peak Simple (SRI Instruments, Torrance, USA). Einmal wöchentlich erfolgte eine Kalibrierung mit Luft und mit einem synthetischen Biogasgemisch (Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mit folgender Zusammensetzung: 70 % Methan, 27 % Kohlendioxid, 2 % Stickstoff und 1 % Wasserstoff.

### **4.4. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden**

Für die folgenden Untersuchungen wurde Wasser aus einer Reinstwasseranlage (TKA MicroPure UV/UF, Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert, Deutschland) verwendet. Die für die DNA-Synthese verwendeten Primer wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen. Die Chemikalien und deren Hersteller sind im Anhang A aufgelistet.

Für die molekularbiologischen Analysen wurde das Pellet, das nach der ersten Zentrifugation im Zentrifugenröhrchen zurückblieb (siehe 4.3.3), genutzt. Das Pellet wurde mittels eines Rührstabes homogenisiert. Jeweils drei  $1,5 \text{ mL}$  Reaktionsgefäße wurden bis zur  $1,5 \text{ mL}$ -Markierung gefüllt und die Proben bei  $-20^\circ \text{ C}$  gelagert.

#### **4.4.1. DNA-Extraktion (Zellaufschluss und DNA-Isolierung)**

##### **4.4.1.1. Vergleich verschiedener DNA-Extraktionen**

Die Grundlage für alle in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Arbeiten war die Isolierung und Reinigung prokaryotischer DNA.

Zur Isolierung der genomischen DNA wurden zu Beginn der Arbeit verschiedene Protokolle getestet:

- (1) DNA- Extraktionskit Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, USA)
- (2) FastDNA® SPIN KIT FOR SOIL (MP Biomedicals LLC., Santa Ana, USA)
- (3) Zwei-Phasen-Extraktion (enzymatische Lyse mit anschließender DNA- Fällung mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol)
- (4) mechanischer (physikalischer)/chemischer Aufschluss der Zellen mittels Glass beads und Extraktionspuffer, modifiziertes Protokoll von HOFREITER (Rohland und Hofreiter 2007)

Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Protokolle ist im Anhang B dargestellt. Die DNA-Extraktionen in (1) und (2) erfolgten nach Herstellerangaben.

Die Ausbeute an extrahierter DNA war abhängig von der gewählten Methode. Durch Voruntersuchungen zeigten sich deutliche Unterschiede in Bezug auf die extrahierte DNA-Konzentration und die Bandenzahl im genetischen Fingerprinting. Da bei der Extraktion nach HOFREITER (Protokoll 4; (Rohland und Hofreiter 2007)) sowohl die DNA-Konzentration als auch die Bandenzahl am größten waren, wurden alle DNA-Extraktionen nach diesem modifizierten Protokoll durchgeführt.

Statt enzymatisch mit Proteinase K, wie ursprünglich bei (Rohland und Hofreiter 2007), erfolgte der Zellaufschluss mechanisch mit Hilfe von Glass beads ( $\text{\O} 0,5\text{-}10\mu\text{m}$ ). Der Puffer war eine Mischung aus Extraktions- und Bindepuffer und enthielt: Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 20 mM), Guanidinthioisocyanat (GuSCN, 5 M), Natriumchlorid (NaCl, 25 mM), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, 50 mM, pH 8,0), Natriumlaurylsulfat (SDS, 1 %) und Dithiothreitol (DTT, 50 mM). Gleichzeitig wurde zur Gewinnung einer höheren DNA-Ausbeute Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol eingesetzt. Die Kombination aus chemischer und mechanischer Lyse erhöhte die Ausbeute an extrahierter DNA. Die zugesetzten Detergenzien GuSCN, DTT und SDS minimieren die inhibierende Wirkung von z. B. Proteinen, Huminsäuren und Harnstoff auf die PCR.

Der Zellaufschluss und die DNA-Isolierung wurden wie im Folgenden beschrieben durchgeführt. 500 mg Gärrest wurden mit 500  $\mu\text{L}$  Extraktionspuffer, 250  $\mu\text{g}$  Glass beads und 500  $\mu\text{L}$  Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach 10 Minuten auf dem Schüttler (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., New York, USA) folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min bei 16.000 g und 4 °C). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und, um die DNA zu reinigen, mit derselben Menge an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 min bei 16.000 g und Raumtemperatur) wurde dieser Schritt ein weiteres Mal wiederholt. Hier wurde nur Chloroform zum Überstand gegeben. Durch die Zugabe von 5 M NaCl-Lösung und Isopropanol (99,7 %) zum Überstand wurde die DNA gefällt, letztmalig zentrifugiert (10 min bei 14.000 g und Raumtemperatur) und vorsichtig mit 75 % Ethanol gewaschen. Nach dem Abzug des Ethanols und der Trocknung bei Raumtemperatur wurde die DNA in PCR-Wasser (nucleasefrei) aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung lagerte die extrahierte DNA bei -20 °C im Tiefkühlschrank.

#### **4.4.1.2. Quantitative Analyse der DNA**

Die Menge an extrahierter DNA wurde mit Hilfe eines Plattenfluorimeters (FLUOstar Optima, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) bestimmt und mit Hilfe der dazugehörigen Software (MARS) ausgewertet. Zur Erstellung einer Standardkurve (Abbildung 4) wurden DNA-Verdünnungen in

folgenden Konzentrationen hergestellt:  $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $0,625 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $0,313 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $0,156 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $0,078 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabelle 7). Als Grundlage wurde der DNA-Marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) mit einer Ausgangskonzentration von  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  genutzt.

Zur Quantifizierung der DNA wurde Pico-Green (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent, Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Dieses ist ein sehr sensitiver Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngiger DNA reagiert und einen DNA-Farbstoff-Komplex bildet. Entsprechend der Herstellerangaben wurde der Farbstoff vor der Benutzung mit TE-Puffer (1:200) verdünnt. Zur Messung wurden Mikrotiterplatten (96 Wells; NUNC Microfluor White, Flatbottom Microtiter Plates, Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) benutzt. Darin wurden pro Well  $49 \mu\text{L}$  TE-Puffer (Tabelle 8) vorgelegt und je  $1 \mu\text{L}$  der jeweiligen Verdünnungsstufe zugefügt. Anschließend wurde jeweils  $50 \mu\text{L}$  Pico Green (Arbeitslösung) zu jeder Probe pipettiert. Der Blindwert enthielt  $50 \mu\text{L}$  Puffer und  $50 \mu\text{L}$  Pico Green. Die Messung erfolgte bei einer Extinktion von  $485 \text{ nm}$  und einer Emission von  $520 \text{ nm}$ .

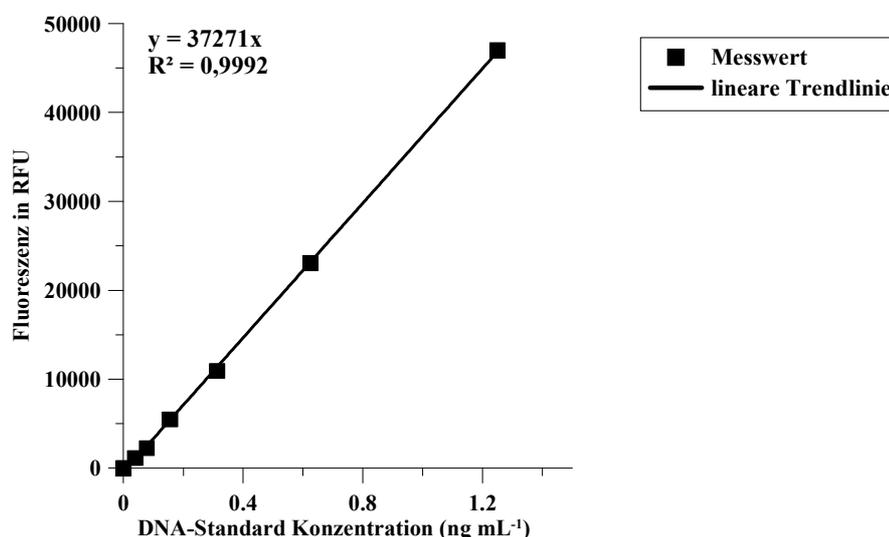


Abbildung 4: DNA-Standardkurve für die Quantifizierung der DNA; mit Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß.

Tabelle 7: DNA-Standardreihe zur Erstellung der DNA-Standardkurve für die DNA-Quantifizierung

Bezeichnung	DNA-Konzentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Fluoreszenz in RFU <sup>2</sup> (485 nm; 520 nm)
Standard S0	0	0
Standard S1	0,039	1131
Standard S2	0,078	2244
Standard S3	0,156	5483
Standard S4	0,313	10929
Standard S5	0,625	23047
Standard S6	1,25	46990

<sup>2</sup> RFU = relative fluorescence unit

**Tabelle 8: Zusammensetzung des TE-Puffers , eingestellt auf pH 7,5.**

Chemikalie	Menge
Tris	0,212 g
EDTA	0,038 g
Wasser ad	100 mL

#### 4.4.2. Vervielfältigung der prokaryotischen 16S rDNA

Ribosomen sind für phylogenetische Untersuchungen sehr gut geeignet, da sie ihrer Funktion nach (Proteinbiosynthese) sehr konservativ und universell vorkommende Zellorganellen sind. Sie bestehen aus drei unterschiedlich großen rRNA-Molekülen: 5S, 16S und 23S. Auf Grund der Größe sind 16S und 23S rRNA-Moleküle besser für phylogenetische Untersuchungen geeignet als das 5S rRNA-Molekül. Sowohl 16S als auch 23S rRNA enthalten neben konservativen Sequenzbereichen auch variable Bereiche, die den phylogenetischen Vergleich von Mikroorganismen erlauben. Je geringer die phylogenetische Verwandtschaft von zwei Organismen ist, desto größer sind die Sequenzunterschiede in den variablen Sequenzbereichen (Madigan et al., 2001). Da die DNA im Gegensatz zur RNA ein relativ stabiles Molekül ist, werden häufig die Gene der rRNA, die rDNA, für phylogenetische Untersuchungen genutzt. Für die Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose wurde die 16S rDNA, die für die 16S rRNA codiert, mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Dabei hängt die Spezifität der PCR von der Wahl der Primer ab. Die beiden Domänen der Bakterien und Archaeen wurden getrennt untersucht, da die phylogenetische Distanz zwischen ihnen sehr groß ist.

Die PCR wurde in 0,25 mL Tubes durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 50  $\mu\text{L}$  [5  $\mu\text{L}$  10 x *Taq* DNA Polymerase Puffer, 7  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 2  $\mu\text{L}$  dNTP Mix (je 2 mM), je 3  $\mu\text{L}$  Primer (10 mM), 0,3  $\mu\text{L}$  *Taq* BioThermD-™ (Stammlösung 5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 0,4  $\mu\text{L}$  Serum Albumin (BSA; Stammlösung 20 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), 27,8  $\mu\text{L}$  (Bakterien) bzw. 27,3  $\mu\text{L}$  (Archaeen, PAO) PCR- $\text{H}_2\text{O}$  und jeweils 1,5  $\mu\text{L}$  (Bakterien) bzw. 2  $\mu\text{L}$  (Archaeen, rPAO) Template-DNA.] Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die PCR wurde in einem Thermocycler (FlexCycler, Analytik Jena, Jena, Deutschland) durchgeführt. Zur Kontrolle von falsch positiven Ergebnissen (Kontaminationen) wurde bei jeder PCR eine Probe ohne Template DNA mitgeführt.

Die PCR Zyklen wurden bezüglich der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer und der Größe des erwarteten PCR Produktes eingestellt und die in Tabelle 10 aufgelistete Abfolge durchgeführt. Wenn im Anschluss an die PCR eine denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) erfolgte, enthielt der Vorwärtsprimer eine GC-Klammer (Tabelle 9)

**Tabelle 9: Verwendete PCR- Primer zur Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose des untersuchten Gärrests.**

Primer	Sequenz (5' - 3')	Ziel	Referenz
<b>341F-GC<sup>3</sup></b>	<u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGC</u> <u>CCCCGCCCGCTACGGGAGGCAGCAG</u>	16S; vorwärts, Bakterien	(Muyzer <i>et al.</i> 1997)
<b>907R</b>	CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT	16S; rückwärts, Bakterien	(Muyzer <i>et al.</i> 1997)
<b>PARCH3 40F-GC<sup>4</sup></b>	<u>TCGCCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGG</u> <u>GCACGGGCCCTACGGGGYGCASCAG</u>	16S; vorwärts Archaeen	(Øvreas <i>et al.</i> 1997)
Primer	Sequenz (5' - 3')	Ziel	Referenz
<b>S-P- March- 348-S-a- 17F<sup>5</sup></b>	<u>CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCCGCCGC</u> <u>CCCGCCCGYGCAGCAGGCGCGAAA</u>	16S; vorwärts, methanogene Archaeen	(Takai und Horikoshi 2000); (Sawayama <i>et al.</i> 2004); (Sawayama <i>et al.</i> 2006)
<b>S-D- Arch- 0786-A- a-20R</b>	GGACTACVSGGGTATCTAAT	16S; rückwärts, methanogene Archaeen	(Takai und Horikoshi 2000); (Sawayama <i>et al.</i> 2004); (Sawayama <i>et al.</i> 2006)
<b>462F- GC<sup>6</sup></b>	<u>CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGG</u> <u>GCACGGGGGGCCGTCATCTACWCAGGGTATT</u> AAC	16S; vorwärts, rPAO Cluster	(Crocetti <i>et al.</i> 2000)
<b>846R</b>	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	16S; rückwärts rPAO Cluster	(Crocetti <i>et al.</i> 2000)

**Tabelle 10: Ablauf der PCR für die anschließende DGGE.**

Primerpaar	Bakterien	Archaeen; methanogene Archaeen	rPAO
<b>Initialisierung</b>	95 °C, 3 min		
<b>Denaturierung</b>	95 °C, 40 sec		
<b>Primer- Hybridisierung</b>	54 °C; 45 sec	56,6 °C; 45 sec	52 °C; 40 sec
<b>Amplifikation/Verlängerung</b>	72 °C, 45 sec	72 °C, 45 sec	72 °C, 50 sec
<b>Zyklenzahl</b>	35	40	40
<b>Finale Primer- Hybridisierung</b>	72 °C, 10 min		

<sup>3</sup> 40 bp umfassende GC-Klammer für bakterielles DGGE-Fingerprinting nach MUYZER (Muyzer *et al.* 1993) vor der Primersequenz angefügt

<sup>4</sup> 40 bp umfassende GC-Klammer für archaeelles DGGE-Fingerprinting nach MUYZER (Muyzer *et al.* 1993) vor der Primersequenz angefügt

<sup>5</sup> 40 bp umfassende GC-Klammer für methanogene Archaea-spezifisches DGGE-Fingerprinting nach MUYZER (Muyzer *et al.* 1993) vor der Primersequenz angefügt

<sup>6</sup> 40 bp umfassende GC-Klammer für PAO-spezifisches DGGE-Fingerprinting nach MUYZER (Muyzer *et al.* 1993) vor der Primersequenz angefügt

Die Größe des PCR-Produkts wurde mittels gelelektrophoretischer Auftrennung untersucht. Zur Überprüfung wurden 5 µL des PCR Ansatzes mit 1 µL 6X Ladepuffer vermenget und in einem 1 % Agarosegel (Agarose, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Als DNA-Größenstandard wurde GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) aufgetragen. Dieser diente bei der Auswertung als Größenstandard. Zur Visualisierung der Banden wurde das Agarosegel mit 2 µL Ethidiumbromid (10 mg mL<sup>-1</sup>) versetzt. Nach einer Laufzeit von 30 min bei 115 V wurde das Gel mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage (GeneFlash, Syngene, Synoptics Ltd., Cambridge, Großbritannien) dokumentiert.

PCR-Produkte wurden nur dann für die weiteren Untersuchungen verwendet, wenn in der Negativkontrolle (ohne Template-DNA) im Agarosegel keine Bande zu erkennen war. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) nach Herstellerangaben (Anhang C). Dies sollte sicherstellen, dass keine Reste genomischer DNA, Primern und Nukleotiden die nachfolgenden Untersuchungen störten.

#### **4.4.3. Genetisches Fingerprinting**

Die von MUYZER (Muyzer *et al.* 1993) eingeführte DGGE ist eine gängige Fingerprint-Technik zur Untersuchung von komplexen Biozöosen und der relativ schnellen Abschätzung der mikrobiellen Diversität verschiedener Proben.

Mittels PCR werden DNA-Fragmente mit gleicher Länge generiert. Diese Fragmente werden anschließend anhand unterschiedlicher DNA-Sequenzen in einem denaturierenden Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung basiert darauf, dass DNA-Fragmente derselben Länge aber mit verschiedenen DNA-Sequenzen unterschiedliche Schmelztemperaturen aufweisen (Muyzer und Smalla 1998). Art und Häufigkeit der DNA-Bausteine in einer Sequenz bestimmen die Temperatur, bei der sich die doppelsträngige DNA auftrennt (= Denaturierung). Nicht nur die Temperatur, auch Chemikalien, wie z. B. Harnstoff und Formamid, können eine Denaturierung hervorrufen. Dabei denaturiert nicht das gesamte DNA-Fragment auf einmal. Es kann in verschiedene Schmelzdomänen unterteilt werden, die bei unterschiedlichen Temperaturen denaturieren. So erhält man teilgeschmolzene DNA-Fragmente, die ein anderes Laufverhalten im Gel haben als ungeschmolzene Fragmente. Das Anfügen einer GC-Klammer an den Vorwärtsprimer (Bereich mit hoher Schmelztemperatur) sorgt dafür, dass beide DNA-Stränge zusammengehalten werden. Da bereits Punktmutationen zu einem veränderten Schmelzverhalten führen können, sind auch kleinste Unterschiede zwischen den Organismen darstellbar. Eine semiquantitative Analyse der erhaltenen Bandenprofile bzw. Einzelbanden ist möglich (Schwienhorst und Lindemann 1998).

Ein Nachteil der PCR-DGGE ist das begrenzte Auflösungsvermögen von rDNA-Fragmenten in komplex zusammengesetzten mikrobiellen Biozöosen (Muyzer und Smalla 1998). Hierbei spielen sowohl Primär- und Sekundärstruktur der amplifizierten rDNA-Fragmente als auch die experimentellen Bedingungen eine große Rolle. Ebenso kann die sogenannte Co-Migration von DNA-Fragmenten das qualitative Ergebnis verfälschen. Dies kann dazu führen, dass die mikrobielle Diversität einer Probe unterschätzt wird.

Vor Beginn der DGGE wurde die Konzentration an PCR-Produkt mittels Plattenfluorimeter bestimmt. Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben zu gewährleisten, wurden alle Proben vor dem

Auftragen auf das DGGE-Gel auf eine DNA-Konzentration von  $600 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  eingestellt. Die DGGE wurde wie bei (Muyzer *et al.* 1997) beschrieben durchgeführt. Die Gradienten der Gele (Tabelle 11) waren abhängig davon, welches Primerpaar in der PCR eingesetzt wurde. Diese Gradienten wurden aus zwei unterschiedlich konzentrierten Stammlösungen hergestellt (Tabelle 12; Tabelle 13; Tabelle 14). Durch die Veränderung des Mischungsverhältnisses wurde der Gradient variiert.

**Tabelle 11: Acrylamidkonzentrationen und Harnstoffgradienten, die für das PCR-DGGE-Fingerprinting verwendet wurden.**

Ziel	Acrylamidkonzentration	Harnstoffgradient
Bakterien	6 %	35 % - 65 %
Archaeen; methanogene Archaeen	6 %	40 % - 60 %
rPAO	8 %	25 % - 60 %

**Tabelle 12: Stammlösung 1 (40 % Acrylamidlösung; 0 % Harnstoffkonzentration).**

Substanz	Menge bei 6 % Acrylamidkonzentration	Menge bei 8 % Acrylamidkonzentration
40 % Acrylamidlösung	15 mL	20 mL
50 X TAE-Puffer	2 mL	2 mL
Wasser	83 mL	78 mL

**Tabelle 13: Stammlösung 2 (40 % Acrylamidlösung; 100 % Harnstoffkonzentration).**

Substanz	Menge bei 6 % Acrylamidkonzentration	Menge bei 8 % Acrylamidkonzentration
40 % Acrylamidlösung	15 mL	20 mL
50 X TAE-Puffer	2 mL	2 mL
Formamid (deionisiert)	40 mL	40 mL
Harnstoff	42 g	42 g
Wasser ad	100 mL	100 mL

**Tabelle 14: Zusammensetzung des Tris-Acetat-EDTA-Puffers (TAE-Puffer) (50-fach konzentriert, für Stammlösung 1 und 2).**

Chemikalie	Menge
Tris	$242,28 \text{ g L}^{-1}$ (0,05 M)
Essigsäure	$60,05 \text{ g L}^{-1}$ (1 M)
EDTA	$18,61 \text{ g L}^{-1}$ (2 M)
Wasser ad	1000 mL

Die Polymerisation des Acrylamidgels wurde durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Die APS-Lösung wurde vor jedem Gebrauch frisch hergestellt. Dafür wurden 0,1 g APS in 1 mL Wasser gelöst. Das TEMED (Appllichem, Darmstadt, Deutschland) war gebrauchsfertig und wurde bis zur Verwendung bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Die DGGE wurde im DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. In der Elektrophoresekammer waren 7 L 1 x TAE-Puffer enthalten. Die verwendeten Glasplatten, Spacer und der Gelkamm wurden vor der Verwendung mit Ethanol fussselfrei gesäubert. Die unterschiedlichen Acrylamidlösungen wurden in 50 mL Zentrifugenröhrchen vorbereitet und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von  $125 \mu\text{L}$  APS und

12  $\mu\text{L}$  TEMED zu den vorbereiteten Lösungen wurden diese in den Gradientenmischer (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) gegeben, der auf einem Magnetrührer (MR Hei-Tec, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) stand. Die Rührgeschwindigkeit betrug 600 rpm. Das Gel wurde mit Hilfe eines Schlauches und einer aufgesetzten Injektionsnadel zwischen die Glasplatten gegossen. Eine Schlauchpumpe (Variable-Speed Peristaltic Tubing Pump, Control Company, Texas, USA) sorgte für eine gleichmäßige Fließgeschwindigkeit. Das Trenngel wurde mit einem Sammelgel aus 10 mL 0 % Lösung überschichtet, die mit 90  $\mu\text{L}$  APS (10 %) und 9  $\mu\text{L}$  TEMED vermischt wurde. Danach wurde sofort der Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt. Das Gel war nach 120 min auspolymerisiert, der Kamm wurde entfernt und das Gel in der Elektrophoresekammer installiert. Die Taschen wurden mit 1 x TAE-Puffer gespült und der Puffer in der Elektrophoresekammer auf 60 °C erwärmt. Als die Temperatur erreicht war, wurden 30  $\mu\text{L}$  der eingestellten Proben und der Negativkontrolle mit 10  $\mu\text{L}$  Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Als DNA-Leiter wurden 7  $\mu\text{L}$  GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder in eine Tasche pipettiert.

Die Bedingungen der Elektrophorese waren für Bakterien, Archaeen und rPAO gleich (Laufzeit 17 h, elektrische Spannung 115 V).

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele erst für 30 min in einer Fixierlösung (Benzensulfonsäure 3 % w/v in 24 % Ethanol) fixiert. Danach wurden sie für 30 min mit einer Silbernitratlösung (Silbernitrat 1 % w/v, Benzensulfonsäure 0,35 % w/v in Wasser) gefärbt und 2-mal in Wasser (Aqua dest.) gewaschen. Die anschließende Entwicklung (Natriumcarbonat 12,5 % w/v; Formaldehyd 37 % w/v; Natriumthiosulfat 2 % w/v in Wasser) wurde nach ca. 6 min mit einer Mischung aus Glycerol (50 % w/v), Essigsäure (5 % w/v) und Natriumacetat (25 % w/v) gestoppt. Nach 30 min in der Stopplösung wurden die Gele noch einmal in Wasser (Aqua dest.) gewaschen. Die Dokumentation erfolgte zu Beginn der Arbeit mit einer Digitalkamera (Canon EOS 300D, Canon Inc., Tokio, Japan) und zum Ende mit einem Scanner und der entsprechenden Software (ViewPix 700 mit Software argusX1, biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland). Nachdem die DGGE-Gele dokumentiert waren, wurden alle sichtbaren Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

Um die in den Banden enthaltenen 16s rDNA-Fragmente sequenzieren zu können, musste die DNA aus dem Gel herausgelöst werden. Das erfolgte auf unterschiedlichen Wegen – entweder durch die Zugabe von PCR-Wasser (Methode a) oder durch die Aufbereitung der Banden mit einem sogenannten Crush and Soak-Puffer (Methode b) (Dohrmann und Tebbe 2004).

Bei der **Methode a** wurden die ausgeschnittenen Banden in 1,5 mL Rationsgefäße überführt und zunächst mit jeweils 50  $\mu\text{L}$  PCR-Wasser gespült. Danach wurden die Banden mit je 50  $\mu\text{L}$  PCR-Wasser überschichtet und 3 Stunden bei 37° C im Schüttelschrank (Ecotron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Anschließend wurden je 40  $\mu\text{L}$  Überstand abgezogen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

Für die **Methode b** wurden die in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführten Banden mit 50  $\mu\text{L}$  Crush and Soak-Puffer (Tabelle 15) vollständig überschichtet. Um die Eluierung der DNA zu erleichtern, wurden die Banden mit sterilen Pipettenspitzen zerkleinert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 140 rpm über Nacht im Schüttelschrank. Danach wurde die Probe zentrifugiert (1 min bei 14.000 g und 4 °C), 40  $\mu\text{L}$  des Überstandes abgenommen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Darin wurde die DNA durch die Zugabe von 2 Volumen Ethanol (99,8 %) bei -20 °C über Nacht gefällt. Zur Pelletierung der

DNA wurden die Proben zentrifugiert (1 h bei 14.000 g und 4 °C). Anschließend wurde das Ethanol abgezogen, das DNA-Pellet luftgetrocknet und dann in 10 µL PCR-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

**Tabelle 15: Zusammensetzung des Crush and Soak-Puffers.**

Substanz	Menge
Ammoniumacetat	3,854 g
Magnesiumacetattetrahydrat	0,21446 g
0,5 M EDTA	200 µL
20 % SDS	500 µL
Wasser ad	100 mL

Die DNA-Fragmente wurden erneut in eine PCR eingesetzt und amplifiziert. Für diesen Schritt wurden die Primer aus Tabelle 9 verwendet. Eine GC-Klammer war hierbei nicht nötig. Nach anschließender Kontrolle des PCR-Produktes wurde die DNA vor dem Sequenzieren mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt (Anhang C).

Die Sequenzierung nach Sanger erfolgte extern in der Firma GATC (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland). Um eine phylogenetische Zuordnung treffen zu können, wurden die partiellen 16S rDNA Sequenzen mit Sequenzen der Datenbank BLAST (NCBI) verglichen (Altschul *et al.* 1990).

Für die molekularbiologische Auswertung wurden alle DNA-Sequenzen, die eine Übereinstimmung von mehr als 95 %, aber weniger als 97 % besaßen, in die gleiche Gattung eingeordnet. Waren die Übereinstimmungen geringer als 95 %, wurden die entsprechenden Sequenzen einer Familie bzw. Ordnung zugeordnet. Gensequenzen, die eine Übereinstimmung von mehr als 97 % besaßen, wurden nach ROSSELLO-MORA (Rossello-Mora und Amann 2001) einer Art zugeordnet. Um einen Überblick über die stoffwechselphysiologischen Vorgänge zu erhalten, wurde in den Tabellen, wenn möglich, die nächste charakterisierte Art aufgelistet.

Zur Beschreibung der Gleichverteilung („Evenness“) der bakteriellen Gemeinschaft wurden Pareto-Lorenz-Kurven erstellt (Wittebolle *et al.* 2008). Zur Ermittlung der Bandenintensitäten wurde die Software GelQuantNet (biochemlabsolutions.com) verwendet. Die Intensitäten für jede DGGE-Spur wurden einzeln abfallend sortiert. Für die grafische Darstellung wurden die kumulierten, normalisierten Bandenzahlen als x-Werte und die kumulierten Bandenintensitäten als y-Werte genutzt. Die theoretisch vollkommene Gleichverteilung wird durch eine Diagonale mit einem 45° Winkel dargestellt. Je mehr sich die konvexe Kurve von der Diagonalen unterscheidet, desto geringer ist die Gleichverteilung („Evenness“) innerhalb der untersuchten Biozönose. Weiterhin erfolgte ein Vergleich der Bandenintensitäten nach dem Pareto-Prinzip (Pareto 1897) mit einer vertikalen Linie, die bei 20 % der Bandenzahl (x-Achse) liegt. Wenn bei 20 % der Bandenzahlen die entsprechenden Werte auf der y-Achse 60 % und mehr betragen, dominieren wenige Organismen die Gemeinschaft. Liegen die Werte bei weniger als 50 %, ist die Mikroorganismengemeinschaft eher ausgeglichen.

#### 4.4.4. Quantifizierung der Biozönose

Die Quantifizierung der mikrobiologischen Gemeinschaft der Pellets aus dem Versuch *Prozessregenerierung mit CaO* erfolgte in dieser Arbeit mittels quantitativer real-time PCR (qPCR). Bei dieser auf der Grundlage der herkömmlichen PCR beruhenden Methode wird ein bestimmter DNA-Abschnitt vervielfältigt. Gleichzeitig hat man die Möglichkeit, die DNA mittels Fluoreszenzmessungen zu quantifizieren. Dabei nimmt die Stärke des Fluoreszenzsignals proportional mit der Menge an gebildetem PCR-Produkt zu.

In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green 1 (*Power SYBR® Green PCR Master Mix*, Applied Biosystem, Foster City, Kalifornien, USA) verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert mit der doppelsträngigen DNA, d. h. er lagert sich in die DNA ein.

Die qPCR wurde in 0,2 mL Reaktionsgefäßen (Applied Biosystem) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 20 µL [10 µL Power SYBR® Green PCR Master Mix, je 0,5 µL Primer (10 mM); 0,5 µL BSA (Konzentration 20 mg mL<sup>-1</sup>), 7,5 µL PCR-Wasser und jeweils 1 µL Template-DNA]. Die für die Quantifizierung verwendeten Primer sind in Tabelle 16 aufgelistet. Die Proben wurden jeweils in Triplikaten gemessen. Die DNA wurde mit einer Endkonzentration von 0,2 ng µL<sup>-1</sup> eingesetzt.

**Tabelle 16: Verwendete Primer für die quantitative real-time PCR.**

Primer	Sequenz (5' - 3')	Ziel	Referenz
BAC338F	ACTCCTACGGGAGGCAG	16S, Bakterien	(Yu et al., 2005b); (Yu et al., 2005a)
BAC805R	GACTACCAGGGTATCTAATCC	16S, Bakterien	(Yu et al., 2005b); (Yu et al., 2005a)
ARC787F	ATTAGATACCCSBGTAGTCC	16S, Archaeen	(Yu et al., 2005b); (Yu et al., 2005a)
ARC1059R	GCCATGCACCWCCTCT	16S, Archaeen	(Yu et al., 2005b); (Yu et al., 2005a)
462F	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	16S; rPAO Cluster	(Crocetti et al., 2000)
846R	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	16S; rPAO Cluster	(Crocetti et al., 2000)

Die einzelnen Schritte der qPCR sind in Tabelle 17 aufgeführt. Für die Auswertung wurde die zum Gerät gehörende StepOne Software (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystem, Foster City, Kalifornien, USA) genutzt.

**Tabelle 17: Ablauf der quantitativen real-time PCR in Abhängigkeit vom gewählten Primerpaar.**

Primerpaar	Archaeen/Bakterien	rPAO/Bakterien
<b>Initialisierung</b>	95 °C, 15 min	
<b>Denaturierung</b>	95 °C, 10 sec	95 °C, 15 sec
<b>Primer- Hybridisierung</b>	56 °C; 20 sec	52 °C; 20 sec
<b>Amplifikation/Verlängerung</b>	72 °C, 30 sec	
<b>Zyklenzahl</b>	50	45
<b>Schmelzkurve</b>	56 °C bis 95 °C jeweils 15 sec , 0,3 °C Erhöhung	52 °C bis 95 °C jeweils 15 sec , 0,3 °C Erhöhung

Die relative Quantifizierung erfolgte nach LIVAK (Livak und Schmittgen 2001). Hierbei wurde die DNA-Menge der Archaeen bzw. der rPAO (=Ziel) auf die DNA-Menge der Bakterien (=Referenz) bezogen. Als Kontrolle diente bei den Untersuchungen dieser Arbeit eine Gärrestprobe, die an Tag 7 aus dem Reaktor entnommen wurde.

Für jede Probe (Pelletzone und Kontrolle) wurde zunächst der Mittelwert aus den drei  $C_T$ -Werten ( $C_T$  = *Cycle Threshold* oder Schwellenwert-Zyklus) gebildet. Der  $C_T$  gibt den Zyklus an, in welchem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt.

Danach wurde für jede Probe (auch die Kontrolle) der  $\delta C_T$  nach Gleichung 4 bestimmt. Im nächsten Schritt wurde der  $\delta\delta C_T$  berechnet, in dem nach Gleichung 5 der  $\delta C_T$  der Kontrolle (hier Gärrest) vom  $\delta C_T$  der Probe (Pelletzone) abgezogen wurde. Mit dem  $\delta\delta C_T$ -Wert wurde im letzten Schritt der Berechnung nach Gleichung 6 die Ratio (X-fache Änderung der Abundanz) berechnet.

$$\delta C_T = C_T(\text{Ziel}) - C_T(\text{Referenz})$$

**Gleichung 4: Berechnung des  $\delta C_T$ -Wertes.**

$$\delta\delta C_T = \delta C_T(\text{Aggregatzone}) - \delta C_T(\text{Kontrolle})$$

**Gleichung 5: Berechnung des  $\delta\delta C_T$ -Wertes.**

$$\text{Ratio} = 2^{\wedge -\delta\delta C_T}$$

**Gleichung 6: Berechnung der X-fachen Abundanz (Ratio).**

Während bei der relativen Quantifizierung nach LIVAK (Livak und Schmittgen 2001) alle Werte  $< 1$  bedeuten, dass die Menge an Mikroorganismen geringer ist als im umgebenden Gärrest, bedeuten Werte  $> 1$ , dass die Menge größer ist als im Gärrest. Werte = 1 zeigen, dass die Mengen gleich groß sind (Equilibrium).

## 4.5. Mineralische Charakterisierung von Gärresten und Pellets

Sowohl die chemische Zusammensetzung der mineralischen Bestandteile als auch die Mikrostruktur und die räumliche Beziehung zwischen den einzelnen Komponenten der Pellets und vorhandenen Mikroorganismen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) SMT Ultra 55 Plus (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) untersucht, das mit einem SE2-Detektor gekoppelt war. Dieser Detektor erfasst sowohl Sekundärelektronen (SE – secondary electrons) als auch Rückstreuelektronen (BSE – backscattered electrons) und ist für die Bilderzeugung notwendig. Die Quantifizierung der chemischen Bestandteile erfolgte mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) (UltraDry-SDD-Detektor, Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Durch die dazugehörige analytische Software NSS wurden einzelne Elemente und deren Verteilung innerhalb der Probe durch Punktanalysen identifiziert. Für die verschiedenen Analysen wurde zunächst jeweils 1 mL Gärrest über eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert. Anschließend wurden den Proben im Trockenschrank bei 50 °C die Restfeuchte entzogen. Die getrockneten Proben wurden auf Stift-Probenteller aus Aluminium (Baltic Präparation e. K., Niesgrau, Deutschland) aufgeklebt, die mit Leit-Tabs (Baltic Präparation e. K.) versehen waren. Mikropräparate mit einer Körnung  $< 2$  mm hafteten selbstständig auf den Leit-Tabs. Größere Partikel wurden mit Epoxidharz (Baltic Präparation e. K.) aufgeklebt und anschließend

rundherum mit Leitsilber (Baltic Präparation e. K.) bestrichen. Die Proben wurden mit Kohlenstoff (alle Gärrestproben) bzw. mit Gold/Platin (alle Pelletproben) bedampft und mit dem REM untersucht (Beschleunigungsspannung: 5, 10, 15 und 20 kV).

Verschiedene mineralische und organische Proben wurden mittels Röntgen-Pulverdiffraktometrie (powder X-Ray Diffraction, kurz XRD; Philips X'Pert-APD mit vertikalem Goniometer PW 3020, PANalytical GmbH, Almelo, Niederlande) analysiert. Für diese Untersuchung wurden die Proben pulverisiert und in analytische Küvetten gepresst. Das Diffraktometer war mit einer  $\text{CuK}\alpha$ - Röntgenquelle ausgestattet. Die Untersuchungen wurden in einem Winkelbereich von  $2\text{-}64^\circ\theta$  mit einer Winkelauflösung von  $0.02^\circ$  und der Zeit von 1s/Schritt ( $0,02^\circ$ ) durchgeführt. Die Identifizierung der mineralischen Komponenten erfolgte mittels einer Auswertesoftware (Philips X'Pert Graphics) und durch den Vergleich mit einer Datenbank (PDF2, The International Centre for Diffraction Data (ICDD), Pennsylvania, USA).

## 4.6. Mikroskopische Untersuchungen von Gärresten und Pellets

### 4.6.1. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Calcium, Öl/LCFA und Proteinen

Die Darstellung mittels Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem AF 6000 System (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Das System beinhaltet eine Mikroskopsteuereinheit (Leica CTR 6000), das Mikroskop (Leica DMI 6000B) mit Fernsteuereinheit, Kamera (DFC 340 FX) und eine Fluoreszenzlampe (Leica EL 6000). Das Mikroskop enthielt weiterhin vier Farbfilter (Y5 - Excitation filter BP 620/60, Suppression filter BP 700/75; N3 - Excitation filter BP 546/12; Suppression filter BP 600/40; L5 - Excitation filter BP 480/40; Suppression filter BP 527/30; UV - Excitation filter BP 360/40; Suppression filter BP 470/40). Die Bedienung erfolgte mit Hilfe der dazugehörigen LAS AF-Software.

Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von verschiedenen Biomolekülen wurden ausgewählte Proben mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt – Calcein<sup>7</sup>, DiD<sup>8</sup> und DTAF<sup>9</sup>. Calcein weist freies oder gebundenes Calcium nach. DiD ist ein spezifischer Farbstoff für Öl und LCFA. Mit DTAF ist es möglich sowohl Proteine als auch Polysaccharide nachzuweisen. Diese Färbung ist abhängig vom pH-Wert der Farblösung. Bei einem pH-Wert von pH 9,0 werden sowohl Proteine als auch Polysaccharide nachgewiesen. Hat die Farbstofflösung einen pH-Wert von pH 7,0, wie es in dieser Arbeit der Fall war, werden nur Proteine detektiert.

Die Anregung der einzelnen Farbstoffe erfolgte über separate Farbwürfel mit Einzelbild-Aufnahmen. Durch Überlagerung der Einzelbilder von einer Probe war es möglich, durch die einzelnen Fluoreszenzausbeuten mit ihren entsprechend zugeordneten Farben die räumlichen Zusammenhänge der verschiedenen Biomoleküle optisch darzustellen. Die Überlagerung der einzelnen Bilder führte auch zu Mischfarben, die ebenfalls für ein Biomolekülsystem spezifisch sind, z.B. erscheinen Proteine (grün) und Calciumverbindungen (rot) in der Überlagerung gelb.

<sup>7</sup>Calcein -2,7-Bis(N,N-bis(carboxymethyl)aminomethylene)-fluorescein

<sup>8</sup>DiD - 1,1'-dioctadecyl- 3, 3, 3', 3'-tetramethylindodicarbocyanin

<sup>9</sup>DTAF - 5-(4,6-dichlorotriazinyl)-aminofluorescein

#### 4.6.2. Mikroskopischer Nachweis der Polyphosphatgranula

Zur Darstellung von Polyphosphatgranula in Bakterienzellen, die im Klärschlamm, im Gärrest sowie in den drei Zonen des großen Pellets enthalten waren, wurde eine Neisser-Färbung (Eikelboom und Van Buijsen 1983) durchgeführt. Nach der Färbung erscheinen bei der mikroskopischen Auswertung mittels Durchlichtmikroskopie Neisser-positive Zellen blauschwarz, Neisser-negative Zellen sind gelbbraun. Die Färbung erfolgte mit einem Färbekit (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben. In Tabelle 18 ist die Zusammensetzung der drei verschiedenen Färbelösungen dargestellt.

**Tabelle 18: Lösungen 1- 3 für die Neisserfärbung nach (Eikelboom und Van Buijsen 1983).**

Lösung		Substanz	Menge
<b>1. Lösung</b>	saure Methylenblaulösung	Methylenblau	1 g
		96 %igem Ethanol (w/w)]	20 mL
		Wasser	950 mL
		Essigsäure $\geq$ 96 % (w/w) oder Eisessig	50 mL
<b>2. Lösung</b>	Kristallviolettlösung	Kristallviolettstammlösung [13,87g in 100 mL 96 %igem Ethanol (w/w)]	10 mL
		Wasser	450 mL
<b>3. Lösung</b>	Chrysoidinlösung	Chrysoidin G	2 g
		Wasser	300 mL

Die 1. und 2. Lösung wurden unmittelbar vor dem Gebrauch in einem Verhältnis von 2:1 gemischt.

Das für die Färbung genutzte Probenmaterial war halbfest und musste vor der weiteren Behandlung in Wasser suspendiert werden. Hierfür wurde ein Tropfen Leitungswasser auf die Mitte eines sauberen, fettfreien Objektträgers pipettiert. Danach wurde mit einer sterilen Impföse ein sehr kleiner Teil der Probe in dem Wassertropfen gleichmäßig verteilt und auf dem Objektträger zu einem dünnen Film ausgestrichen. Der Ausstrich wurde an der Luft getrocknet, bevor er hitzefixiert wurde. Die Fixierung erfolgte dadurch, dass der Objektträger dreimal durch Flamme eines Bunsenbrenners (Fireboy plus, INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland) gezogen wurde. Nachdem der Ausstrich abgekühlt war, wurde der Objektträger mit dem frisch hergestellten Gemisch aus Lösung 1 und 2 bedeckt. Nach 30 sec Einwirkzeit wurde die Farblösung abgegossen und der Ausstrich kurz mit Wasser gespült. Die Gegenfärbung mit Chrysoidinlösung wurde nach 1 min Einwirkzeit mit Wasser abgespült. Das Präparat trocknete anschließend an der Luft.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Axio Imager.M2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Die fotografische Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Schwarz-Weiß-Kamera (AxioCam MRm; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Zur Auswertung wurde die Software des Mikroskops (AxioVision 4.8.2) genutzt.

## 5. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Übersäuerung und Prozessregenerierung mit CaO an einer großtechnischen Biogasanlage durchgeführt. Um den Mechanismus der Prozessregenerierung und der Pelletbildung besser zu verstehen, wurden einzelne Versuche an einer halbtechnischen Versuchsanlage nachgestellt.

### 5.1. Prozessstörung und Prozessregenerierung in einer großtechnischen Biogasanlage

#### 5.1.1. Auswirkungen auf den Gärrest

Zur Untersuchung der Übersäuerung und Prozessregenerierung in einer großtechnischen Biogasanlage wurden neben Temperatur, pH-Wert und Gasbildung auch Gesamtfettsäurekonzentration, Essigsäure-, Propionsäure-, Calcium- und Phosphatkonzentration analysiert.

Während des regulären Betriebes der großtechnischen Anlage bei 47°C lag der pH-Wert zwischen pH 7,2 und pH 7,5, die Gasbildungsrate im Durchschnitt bei  $2,3 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  und die Konzentration an Fettsäuren variierte zwischen 250 - 700  $\text{mg L}^{-1}$ . Sowohl die Calcium- als auch die Phosphatkonzentration schwankten während dieser Zeit in einem Bereich von 15 - 40  $\text{mg L}^{-1}$  (Calcium) und von 80 - 300  $\text{mg L}^{-1}$  (Phosphat).

Die Übersäuerung der zwei parallel betriebenen Reaktoren (R1 und R2) der Anlage wurde vor allem durch eine sehr niedrige Gasbildungsrate (R1:  $0,6 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , R2:  $0,3 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) angezeigt. Sowohl pH-Wert als auch Fettsäuregehalt waren nur bei Reaktor R2 deutlich verändert. Hier war der pH mit einem Wert von 6,6 zu niedrig und die Konzentration der organischen Säuren mit 4798  $\text{mg L}^{-1}$  deutlich zu hoch. Bei Reaktor R1 lag der pH-Wert (pH 7,3) noch im normalen Bereich für diese Anlage und die Konzentration an organischen Säuren war leicht erhöht (1528  $\text{mg L}^{-1}$ ).

Um den Prozess der Biogasbildung zu regenerieren, wurden eine Reihe von Maßnahmen wie die Senkung der Raumbelastung und der Einsatz von Additiven, um den pH-Wert anzuheben, durchgeführt. Der kontinuierliche Betrieb (Zufuhr von Substrat und Abzug von Gärrest) und die Senkung der Raumbelastung führten bei beiden Biogasreaktoren zu einer Verminderung der Fettsäurekonzentrationen. 31 Tage nach Eintritt der Prozessstörung lag in **Reaktor R1** die Konzentration an Fettsäuren bei 1528  $\text{mg L}^{-1}$  und das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure bei 1,2:1. Dieses Verhältnis verschob sich bis zum Tag 38 weiter in Richtung Propionsäure (0,2:1). Die Senkung der Raumbelastung um 50 % am Tag 24 führte dazu, dass sich die Konzentration an Fettsäuren innerhalb von 20 Tagen um 79,5 % (von 1528  $\text{mg L}^{-1}$  auf 313  $\text{mg L}^{-1}$ ) reduzierte (Abbildung 5). Das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure verbesserte sich und lag am Tag 51 bei 0,9:1. Mit sinkender Fettsäurekonzentration erhöhte sich auch die Gasbildungsrate von  $1,1 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  auf  $1,6 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (Abbildung 6). Innerhalb von 30 Tagen nach der Senkung der Raumbelastung hatte sich das System stabilisiert und soweit erholt, dass die Biogasbildung ohne weitere Störungen verlief. Eine Zugabe von Additiven zur Anhebung des pH-Wertes war nicht nötig. Nach 95 Tagen war die Essigsäurekonzentration auf 144  $\text{mg L}^{-1}$  gesunken und die Propionsäurekonzentration lag unter der Nachweisgrenze.

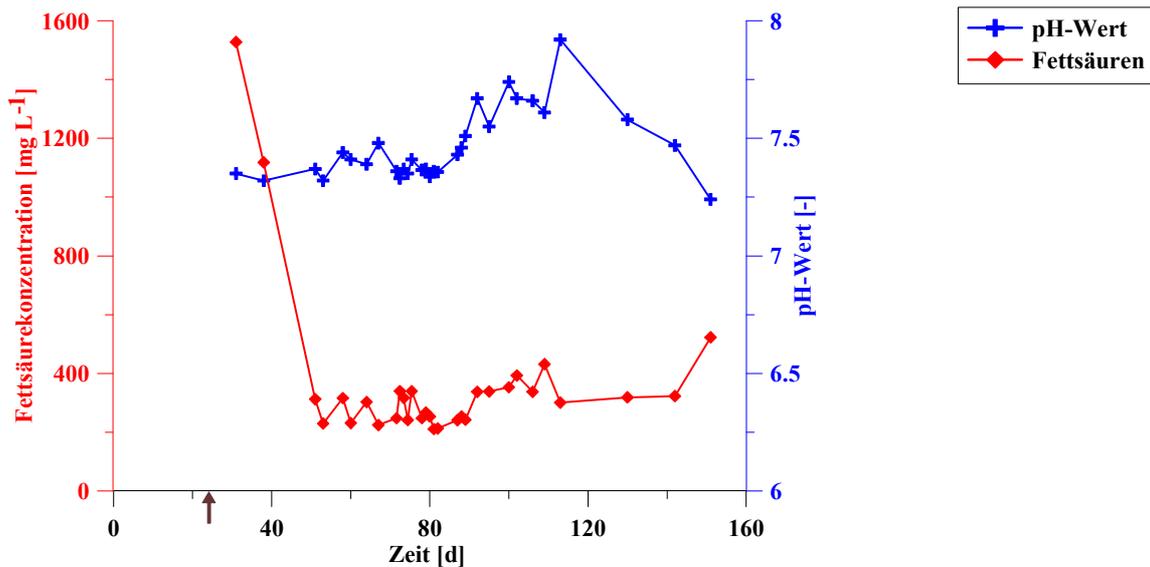


Abbildung 5: Verlauf des pH-Wertes und der Fettsäurekonzentration in Abhängigkeit von der Zeit während Übersäuerung und anschließender Prozessrerholung im Reaktor R1 der großtechnischen Biogasanlage. ↑ Senkung der Raumbelastung.

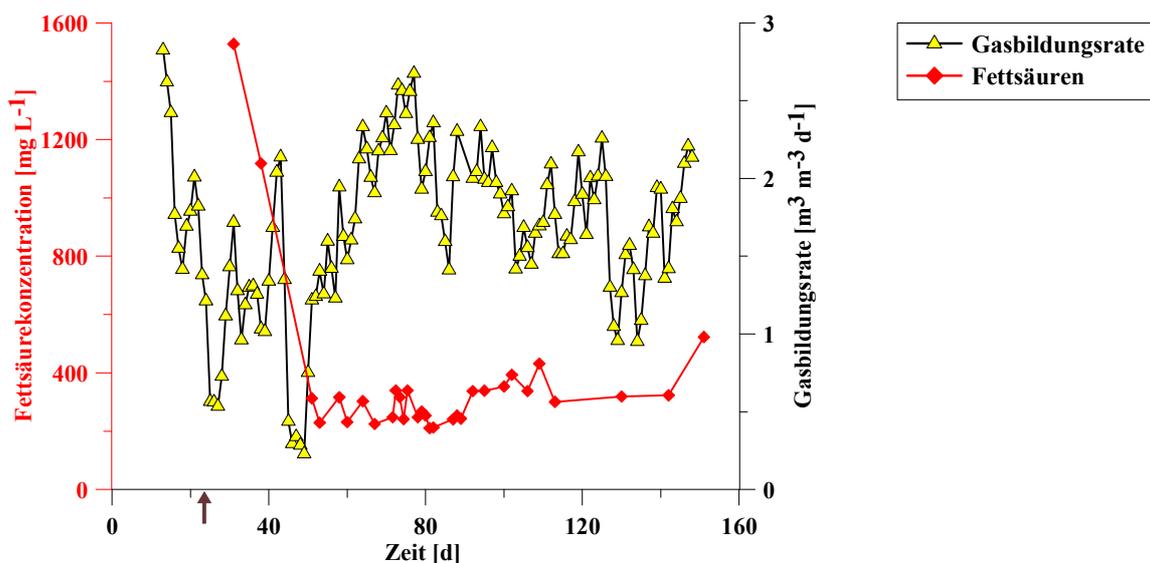


Abbildung 6: Verlauf der Fettsäurekonzentration und der Gasbildungsrate in Abhängigkeit von der Zeit während Übersäuerung und anschließender Prozessrerholung im Reaktor R1 der großtechnischen Biogasanlage. ↑ Senkung der Raumbelastung.

Im **Reaktor R2** betrug die Konzentration an Fettsäuren zur gleichen Zeit (am Tag 31) 4798 mg L<sup>-1</sup> und der pH-Wert lag zwischen 6,5 und 6,9 (Abbildung 7). Die Gasbildungsrate war sehr niedrig und lag bei 0,87 m<sup>3</sup> m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Abbildung 8). Die Raumbelastung wurde auf Grund der niedrigen Gasbildungsrate am selben Tag (Tag 24) zunächst um 50 % und von Tag 32 an für eine Woche auf 23 % reduziert. Obwohl die Konzentration an Fettsäuren zunächst um 50 % abnahm, blieb der pH-Wert unter 7 und die Gasbildungsrate war mit 0,5 m<sup>3</sup> m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> weiterhin sehr niedrig. Um die Gasbildung zu ermöglichen, war es nötig, den pH-Wert für die methanogenen Organismen auf einen optimalen Bereich über pH 7,0 anzuheben. Das erfolgte zunächst durch die Dosierung von Natronlauge (NaOH), wie nach ATV-DVWK Merkblatt 372 empfohlen. Am Tag 67 wurden 30 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, sechs und sieben Tage später jeweils 99 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> NaOH mit dem Mischschlamm in den Reaktor gegeben. In Folge dessen stieg der pH-Wert

für rund eine Woche auf Werte über 7,0 (pH 7,03 – pH 7,08). Die Konzentration der organischen Säuren sank nicht und blieb mit einem Wert um  $3000 \text{ mg L}^{-1}$  stabil hoch. Nachdem der pH-Wert wieder sank, wurde fünf Tage nach der letzten NaOH-Zugabe (Tag 79) erstmalig  $261 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Calciumoxid (CaO) zur Anhebung des pH-Wertes in den Reaktor dosiert. Am nächsten Tag (Tag 80) erfolgte wieder eine Dosierung derselben Konzentration an CaO. Nach der dritten und vierten CaO-Zugabe (jeweils  $130 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) eine Woche nach den ersten beiden Dosierungen stieg der pH-Wert über 7,0, die Konzentration an Fettsäuren sank zügig bis auf  $450 \text{ mg L}^{-1}$  und die Gasbildungsrate stabilisierte sich bei einem Wert um  $1,5 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

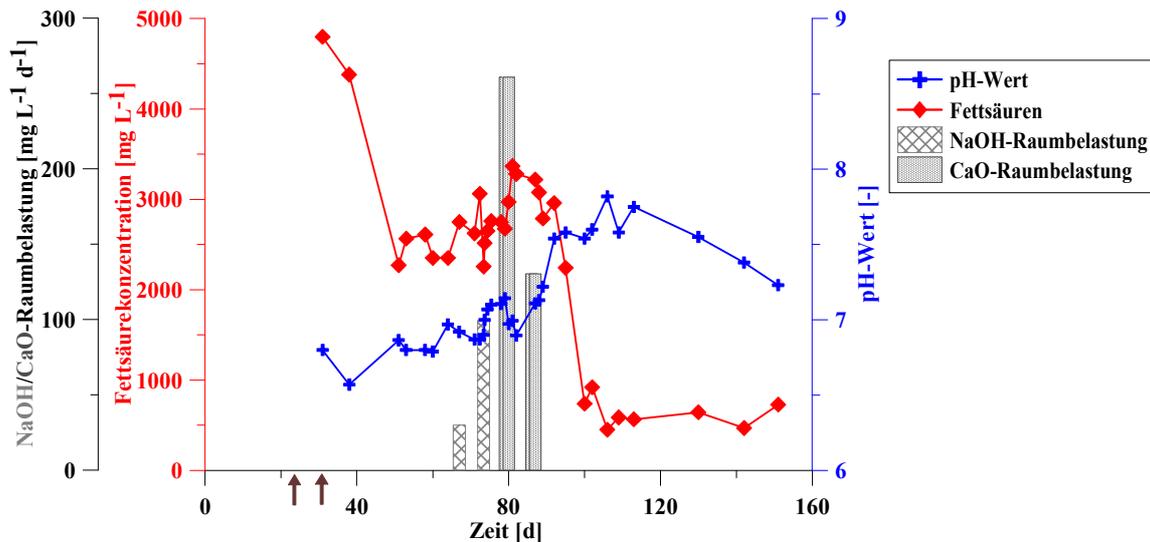


Abbildung 7: Verlauf des pH-Wertes und der Fettsäurekonzentration in Abhängigkeit von der Zeit während Übersäuerung und anschließender Prozessregenerierung mit Natronlauge bzw. Calciumoxid im Reaktor R2 der großtechnischen Biogasanlage. ↑ Senkung der Raumbelastung.

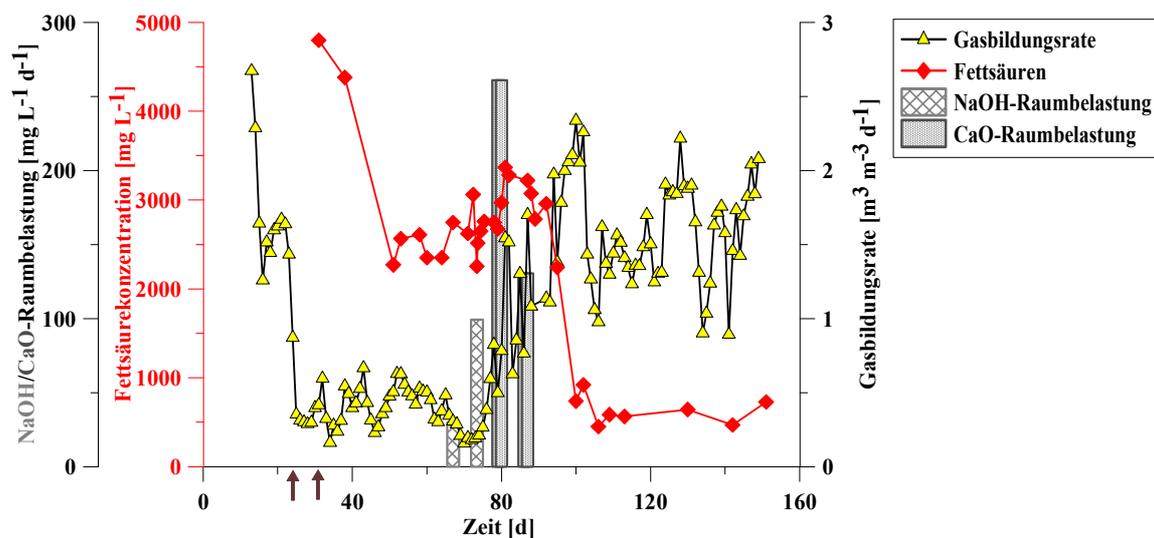
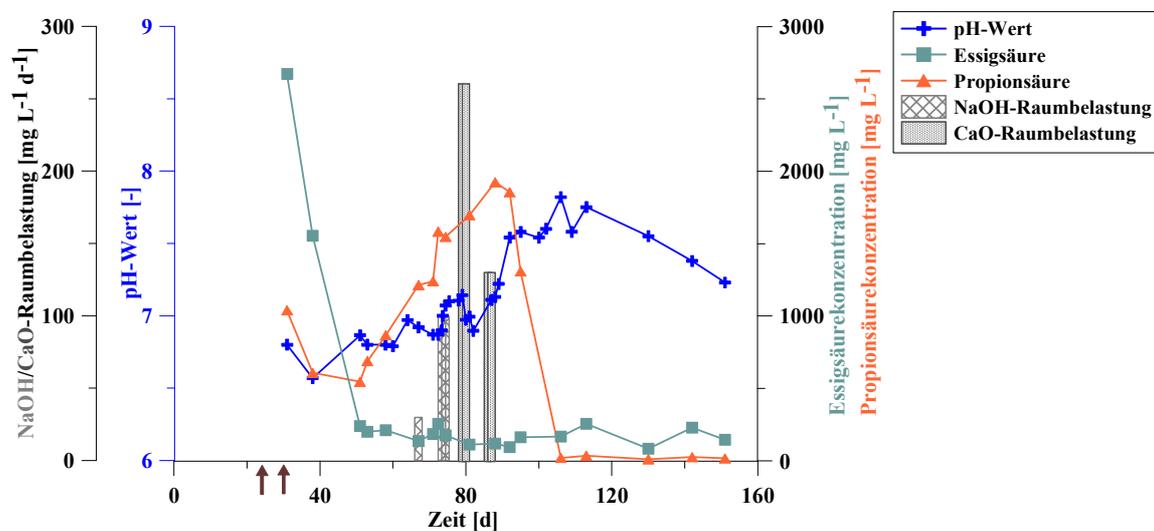


Abbildung 8: Verlauf der Fettsäurekonzentration und der Gasbildungsrate in Abhängigkeit von der Zeit während Übersäuerung und anschließender Prozessregenerierung mit Natronlauge bzw. Calciumoxid im Reaktor R2 der großtechnischen Biogasanlage. ↑ Senkung der Raumbelastung.

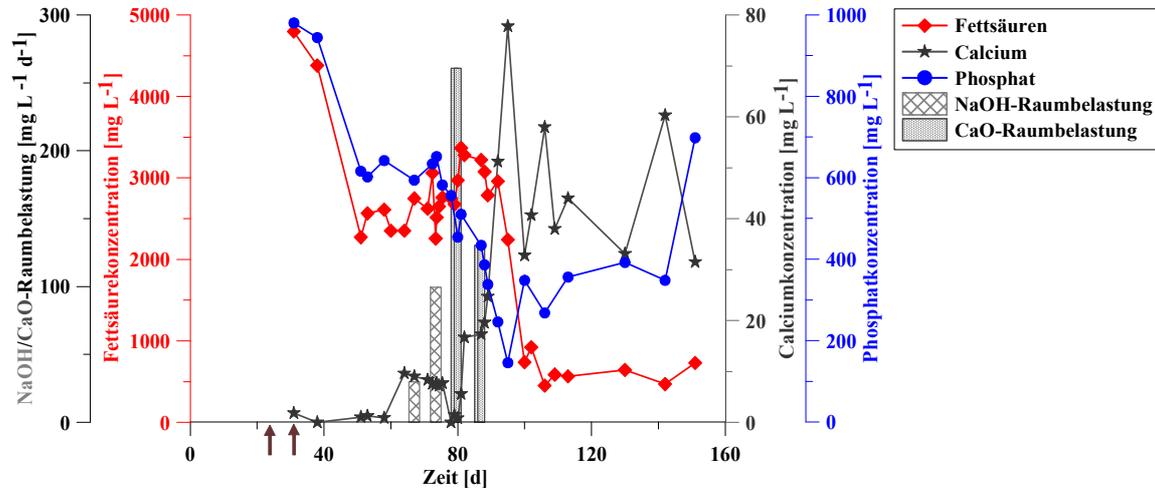
Die Analyse von Essig- und Propionsäure zeigte, dass zu Beginn der Messungen sowohl die Essigsäure ( $2673 \text{ mg L}^{-1}$ ) als auch die Propionsäure ( $1039 \text{ mg L}^{-1}$ ) in hohen Konzentrationen im Gärrest vorlagen (Abbildung 9). Die Konzentration der Essigsäure war ca. 2,6-mal höher als die der Propionsäure. Infolge der verringerten Raumbelastung nahm die Essigsäurekonzentration innerhalb von zwei Wochen von  $1555 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $240 \text{ mg L}^{-1}$  ab. Die Konzentration der Propionsäure sank von  $1039 \text{ mg L}^{-1}$  am Tag 31 auf  $547 \text{ mg L}^{-1}$  am Tag 51. Danach stieg die Konzentration der Propionsäure wieder, so dass ab dem Tag 51 vor allem durch diesen Anstieg die Gesamtsäurekonzentration im **Reaktor R2** wieder zunahm. Das Verhältnis von Essigsäure zur Propionsäure lag an diesem Tag bei 0,4:1 und hatte sich in Richtung der Propionsäure verschoben. Im Gegensatz zur Essigsäurekonzentration, stieg die Propionsäurekonzentration ab dem Tag 51 von  $546 \text{ mg L}^{-1}$  bis zum Tag 88 auf den Höchstwert von  $1924 \text{ mg L}^{-1}$  an und das Verhältnis verschob sich weiter in Richtung der Propionsäure (0,06:1). Die Zugabe der NaOH an den Tagen 67, 73 und 74 führte dazu, dass der pH-Wert zunächst von 6,84 auf 7,14 stieg. Nach einer Woche fiel er wieder unter pH 7 und die Propionsäurekonzentration stieg weiter. Erst nach der Zugabe von CaO an den Tagen 79, 80, 86 und 87 sank die Propionsäurekonzentration innerhalb von sechs Tagen von  $1900 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $1300 \text{ mg L}^{-1}$ . Das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure verschob sich zunächst langsam in Richtung der Essigsäure und betrug am Tag 95 0,12:1. Am Tag 106, 19 Tage nach der letzten CaO-Dosierung (Tag 87), betrug die Propionsäurekonzentration  $21 \text{ mg L}^{-1}$  und das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure hatte sich weiter in Richtung der Essigsäure verschoben (8:1). Gleichzeitig stieg der pH-Wert über 7,5 und der Biogasprozess stabilisiert sich.



**Abbildung 9:** Verlauf des pH-Wertes sowie der Essig- und der Propionsäurekonzentration in Abhängigkeit von der Zeit während Übersäuerung und anschließender Prozessregenerierung im **Reaktor R2** der großtechnischen Biogasanlage. ↑ Senkung der Raumbelastung.

Die Analyse der Calciumkonzentration während der Übersäuerung und der anschließenden Prozessregenerierung zeigte, dass am Tag 31 der Calciumgehalt im Gärrest unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze lag (Abbildung 10). Von Tag 64 an stieg die Calciumkonzentration für zehn Tage auf Werte zwischen  $7,2 \text{ mg L}^{-1}$  und  $9,6 \text{ mg L}^{-1}$ . Danach sank der Gehalt für vier Tage unter die Nachweisgrenze und stieg ab dem Tag 82 zunächst langsam und ab dem Tag 89 sehr schnell. Ihren höchsten Wert von  $77,8 \text{ mg L}^{-1}$  erreichte die Calciumkonzentration erst acht Tage (Tag 95) nach der

letzten CaO-Zugabe (Tag 87). Die Dosierung von CaO an den Tagen 79, 80, 86 und 87 führte nicht sofort zu einem Anstieg der Calciumkonzentration im Gärrest.



**Abbildung 10:** Verlauf der Fettsäurekonzentration, der Calciumkonzentration und der Phosphatkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit während Übersäuerung und anschließender Prozessregenerierung im Reaktor R2 der großtechnischen Biogasanlage. ↑ Senkung der Raumbelastung.

Die Phosphatkonzentration lag am Tag 31 bei einem Wert von  $980 \text{ mg L}^{-1}$  (Abbildung 10). Der Phosphatgehalt sank innerhalb von zwanzig Tagen auf  $616 \text{ mg L}^{-1}$  und blieb bis zur ersten CaO-Dosierung am Tag 79 mit durchschnittlich  $610 \text{ mg L}^{-1}$  stabil. Danach sank der Phosphatgehalt im Gärrest sehr schnell bis auf ein Minimum von  $146 \text{ mg L}^{-1}$  am Tag 95. In der Zeit zwischen den Tagen 31 und 79 waren die Konzentrationsverläufe von Phosphat und den organischen Säuren ähnlich. Beide Verläufe waren dem der Calciumkonzentration entgegengesetzt. Während zu Beginn der Beobachtung die Konzentrationen an Phosphat und organischen Säuren hoch waren, war der Calciumgehalt weitestgehend unter der Nachweisgrenze. Nach der letzten CaO-Dosierung am Tag 87 stieg die Calciumkonzentration sehr schnell und sowohl der Gehalt an organischen Säuren als auch an Phosphat nahmen sehr schnell ab. Gleichzeitig mit der minimalen Phosphatkonzentration ( $146 \text{ mg L}^{-1}$ ) am Tag 95 trat die maximale Calciumkonzentration ( $77,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) auf.

Um die Ursache für die Prozessstörung herauszufinden, wurde vom Betreiber der Biogasanlage eine qualitative Analyse des Mischschlammes in Auftrag gegeben. Die GC-MS-Untersuchung zeigte, dass 4-methyl-Phenol (*p*-Kresol) im Klärschlamm vorhanden war. Eine Quantifizierung wurde nicht durchgeführt und war nachträglich nicht mehr möglich.

### 5.1.2. Veränderung der Gärreststruktur und Bildung von Pellets

Bei der Prozessregenerierung im **Reaktor R2** veränderte sich nach Zugabe von CaO die Konsistenz des Gärrestes und die Bildung kleiner Pellets wurde beobachtet. Zur näheren Charakterisierung wurden diese mit dem Rasterelektronenmikroskop analysiert. Die Pellets wiesen immer ein ähnliches Erscheinungsbild auf (Abbildung 11A, 11B). Sie hatten einen Durchmesser von ca. 2 mm und besaßen eine weiße bis gelbe Farbe. Die Außenseite war relativ glatt und eben (Abbildung 11C, 11D). Das Innere war vor allem durch eine poröse, schuppige Oberfläche gekennzeichnet (Abbildung 11E, 11F).

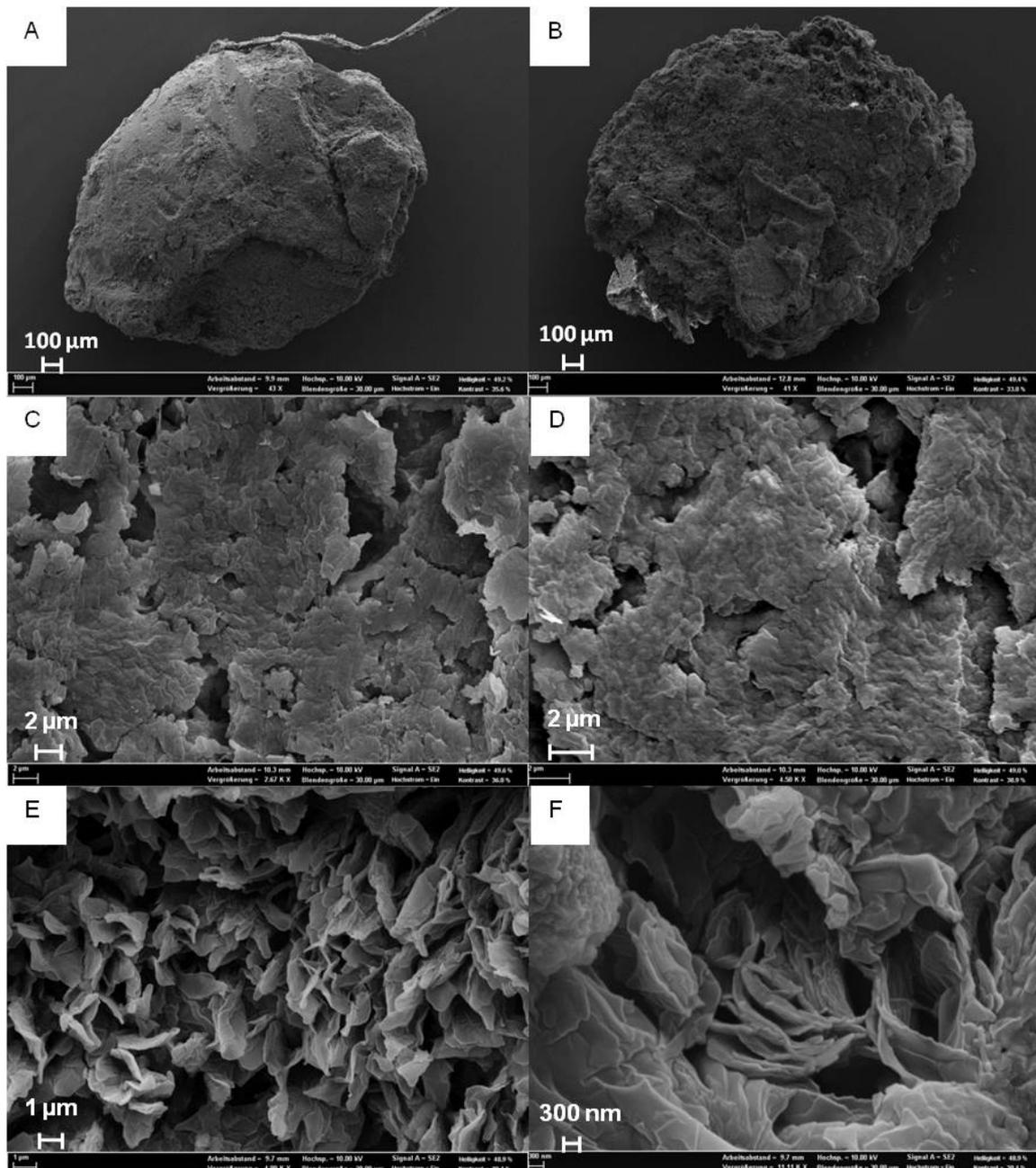


Abbildung 11: A - F: Darstellung von zwei Pellets aus Reaktor R2; A, B: Gesamtansicht bei 41-facher (links) und 43-facher (rechts) Vergrößerung; C, D: Außenseiten bei 2.670-facher (links) und 4.500-facher (rechts) Vergrößerung; E, F: Innenseiten bei 4.990-facher (links) und 11.110-facher (rechts) Vergrößerung; REM; Monika Kasina

Die REM-EDX-Analyse ergab, dass die Pellets vor allem aus Calcium und Kohlenstoff bestanden (Abbildung 12).

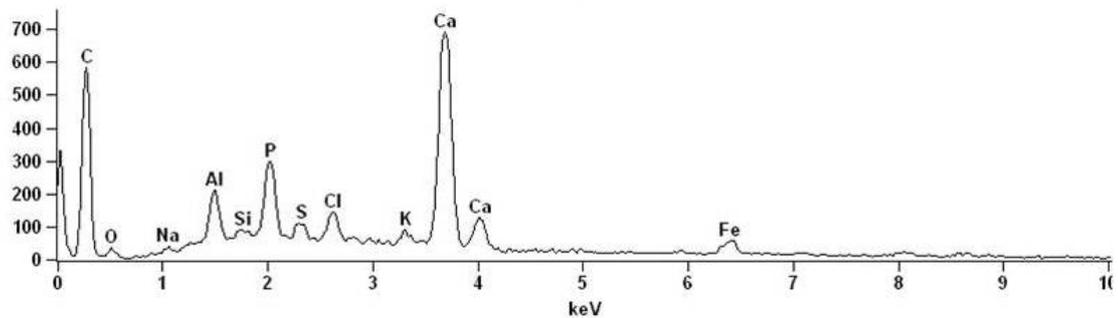


Abbildung 12: Beispiel für eine REM-EDX-Analyse eines Pellets, Calcium und Kohlenstoff dominieren bei dieser Punktanalyse; C – Kohlenstoff, O – Sauerstoff, Na – Natrium, Al – Aluminium, Si – Silicium, P – Phosphor, S – Schwefel, Cl – Chlor, K – Kalium, Ca – Calcium, Fe - Eisen; (Beschichtung mit Kohlenstoff macht nur geringen Teil des C-Peaks aus); Monika Kasina

Bei der Untersuchung mit dem REM wurden auch erste Hinweise auf die Bildung von Biofilmen im inneren Teil der Pellets beobachtet (Abbildung 13). Die kohlenstoffreichen Strukturen bedeckten die Innenseite der Pellets (Abbildung 13A) oder verbanden einzelne Strukturen miteinander (Abbildung 13B).

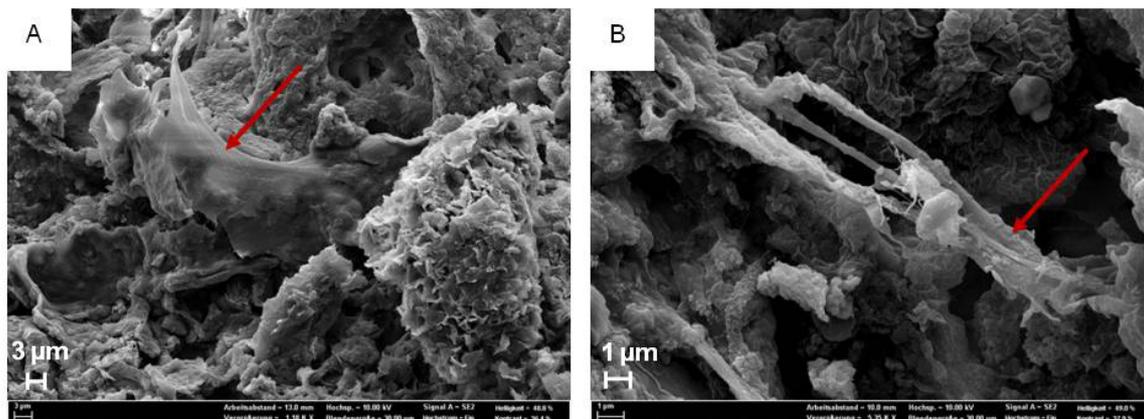
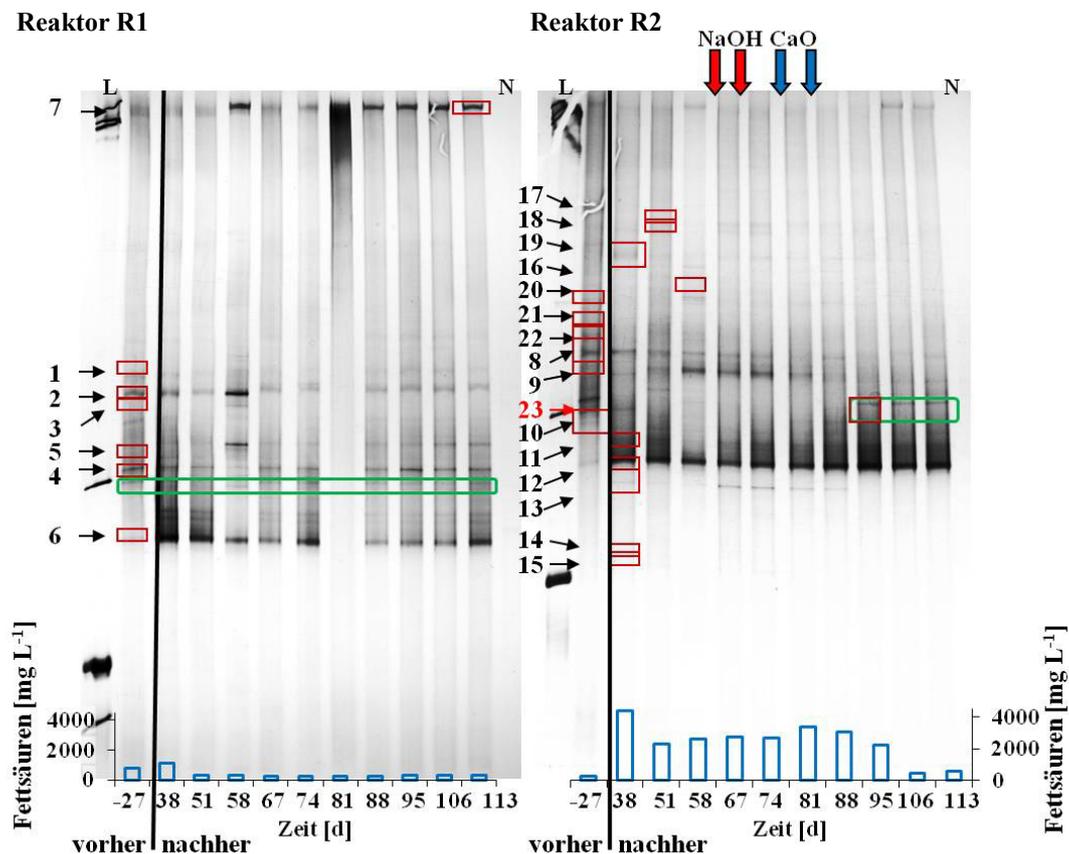


Abbildung 13: Innenseite der aus dem Gärrest entnommenen und aufgebrochenen Pellets, mögliche Biofilmbildung markiert mit roten Pfeilen; REM 1.180-fache (links) und 5.350-fache (rechts) Vergrößerung; Monika Kasina

### 5.1.3. Auswirkungen auf die Zusammensetzung der mikrobielle Biozönose

Die Analyse zur Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose mittels Fingerprintanalysen ergab, dass vor allem die Klasse der *Clostridia* in den Gärresten beider Reaktoren (R1, R2) der großtechnischen Anlage dominierte. Im Verlauf der Übersäuerung und der anschließenden Prozessregenerierung veränderte sich die bakterielle Biozönose.

Bei **Reaktor R1** waren die sieben detektierten Banden bereits vor der Prozessstörung im Gärrest vorhanden (Abbildung 14, Tabelle 19). Die Bandenintensität im Fingerprinting veränderte sich geringfügig während der Übersäuerung und der Prozesserholung. Die Bandenintensität der Bande 7 (*Sedimentibacter*; 91 %), nahm über den Untersuchungszeitraum hinweg zu. Am Tag 58 traten die Banden 2, 5 und 7 stärker hervor als zu den vorherigen oder den nachfolgenden Untersuchungszeitpunkten.



**Abbildung 14:** Bakterienspezifisches Fingerprinting von Gärresten aus **Reaktor R1** bzw. **Reaktor R2** der großtechnischen Biogasanlage während Übersäuerung und Prozesserholung (**Reaktor R1**)/ Prozessregenerierung (**Reaktor R2**) mit Natronlauge und Calciumoxid. L: DNA-Leiter; N: Negativkontrolle;  Fettsäurekonzentration; ↓ NaOH-Dosierung; ↓ CaO-Dosierung;  sequenzierte Banden;  Bereich von Interesse.

Im **Reaktor R2** wurden 16 verschiedene Banden erfolgreich sequenziert und taxonomisch zugeordnet (Abbildung 14, Tabelle 19). Die Bande 13 gehört zur Klasse Clostridia. Der nächste Verwandte, der dem Organismus der Bande 22 zugeordnet wurde, war ein unidentifiziertes Eubakterium. Auch im Reaktor R2 waren einige Organismen, wie z. B. der zur Familie der Lachnospiraceae (Bande 8), der zur Familie der Thermotogaceae (Bande 9) und zwei zur Familie der Thermodesulfobiaceae gehörende Mikroorganismen (Banden 11, 12) während der gesamten Untersuchung vorhanden (Abbildung 14). Ein mit einer Ähnlichkeit von 99% als *Soehngenia saccharolytica* identifizierter Organismus (Bande 19) wurde während des ganzen Versuchs als schwache Bande mittels genetischem Fingerprinting detektiert.

Die Fingerprint-Analysen für Reaktor R1 und Reaktor R2 wiesen einen Organismus nach, der im **Reaktor R1** über den gesamten Zeitraum vorhanden war (grün markierter Bereich). Im **Reaktor R2** wurde dieser zur Familie der Gracilibacteraceae zählende Organismus (*Gracilibacter*; 90 %) erst nach der Prozessregenerierung mit CaO detektiert (Bande 23; Abbildung 14). Um einen eventuellen

Zusammenhang zwischen Veränderungen des genetischen Fingerprint-Profiles und der Fettsäurekonzentration sichtbar zu machen, sind in Abbildung 14 auch die Fettsäurekonzentrationen für beide Biogasreaktoren dargestellt.

**Tabelle 19: Zuordnung der sequenzierten Banden des bakterienspezifischen Fingerprintings von Reaktor R1 (Banden 1-7) und Reaktor R2 (Banden 8- 23) der großtechnischen Biogasanlage.**

Banden	Klasse	Familie	Nächster phylogenetischer Verwandter (GenBank accession number)	Ähnlichkeit [%]
1	<b>Clostridia</b>	Gracilibacteraceae	<i>Gracilibacter thermotolerans</i> (DQ117469.1)	91
2		Clostridiales Family XVIII. Incertae Sedis	<i>Uncultured Symbiobacterium sp.</i> (EU639309.1)	81
3		Clostridiaceae	<i>Clostridium sp.</i> (FJ808605.1)	95
4		Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (AF104841.1)	91
6		Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> (JQ316643.1)	87
7		Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	<i>Uncultured bacterium</i> (FJ825495.1) <i>Sedimentibacter hydroxybenzoicus</i> (NR_029146.1)	96 91
5		<b>Actinobacteria</b>	Propionobacteriaceae	<i>Micropruina glycogenica</i> (JQ899240.1)
8	<b>Clostridia</b>	Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> (AF550610.1)	87
11		Thermodesulfobiaceae	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i> (CP001145.1)	88
12		Thermodesulfobiaceae	<i>Coprothermobacter sp.</i> (AB630185.1)	87
13			<i>Clostridia bacterium HZ254C</i> (JN088203.1)	90
14		Peptococcaceae	<i>Desulfotomaculum sp.</i> (AF529223.1)	86
17		Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> (EU728787.1)	87
18		Ruminococcaceae	<i>Anaerotruncus sp.</i> (EU815226.1)	81
19		Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	<i>Soehngenia saccharolytica</i> (GQ461828.1)	99
20		Peptococcaceae	<i>Desulfotomaculum sp.</i> (AF529223.1)	87
21		Gracilibacteraceae	<i>Gracilibacter thermotolerans</i> (DQ117469.1)	90
22			<i>Unidentified eubacterium</i> (AJ229231.1)	89
23		Gracilibacteraceae	<i>Gracilibacter thermotolerans</i> (DQ117469.1)	90
9		<b>Thermotogae</b>	Thermotogaceae	<i>Thermotogaceae bacterium</i> (FR850164.1)
10	<b>Anaerolineae</b>	Anaerolineaceae	<i>Leptolinea tardivitalis</i> (NR_040971.1)	90
15	<b>Synergistia</b>	Synergistaceae	<i>Anaerobaculum sp.</i> (FJ862996.1)	92
16	<b>Bacteroidia</b>	Porphyromonadaceae	<i>Petrimonas sulfuriphila</i> (NR_042987.1)	90

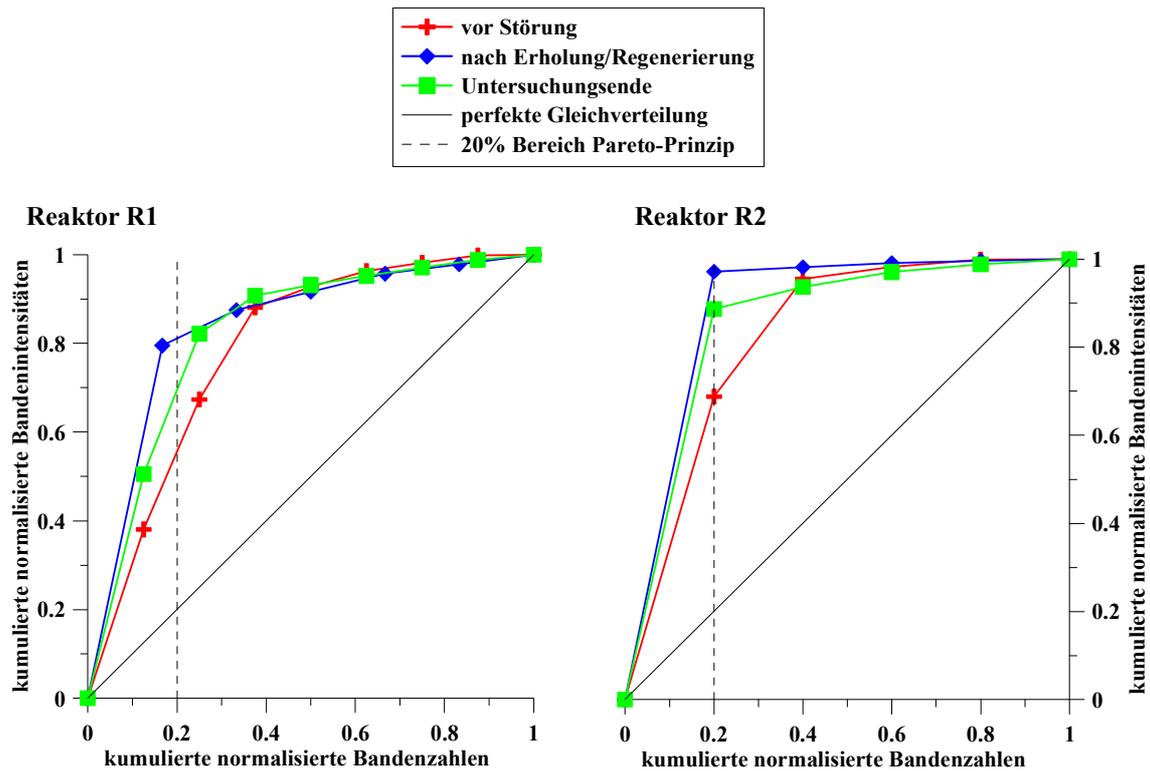


Abbildung 15: Pareto-Lorenz-Analyse der bakteriellen Biozönose von Reaktor R1 und Reaktor R2

Die Gleichverteilung („Evenness“) der bakteriellen Biozönose, dargestellt durch Pareto-Lorenz-Kurven, zeigt vor der Prozessstörung deutliche Unterschiede zwischen den beiden Reaktoren R1 und R2 (Abbildung 15). Während im **Reaktor R1** vor der Übersäuerung 20 % der Mikroorganismen 55 % der Bandenintensitäten repräsentierten, lag dieses Verhältnis für **Reaktor R2** zum gleichen Zeitpunkt bei 20:70. Während der Prozessstörung und der anschließenden Prozesserholung bzw. Prozessregenerierung veränderte sich die Gleichverteilung in beiden Reaktoren. Bis zum Tag 88 verschob sich das Verhältnis im **Reaktor R1** von 20:55 zu 20:80 und im **Reaktor R2** von 20:70 zu 20:97. Zum Ende der Beobachtung näherten sich die Kurven wieder ein wenig der perfekten Gleichverteilung an. Dabei repräsentierten am Tag 113 im **Reaktor R1** 20 % der Mikroorganismen 70 % der Bandenintensitäten und im **Reaktor R2** 88%.

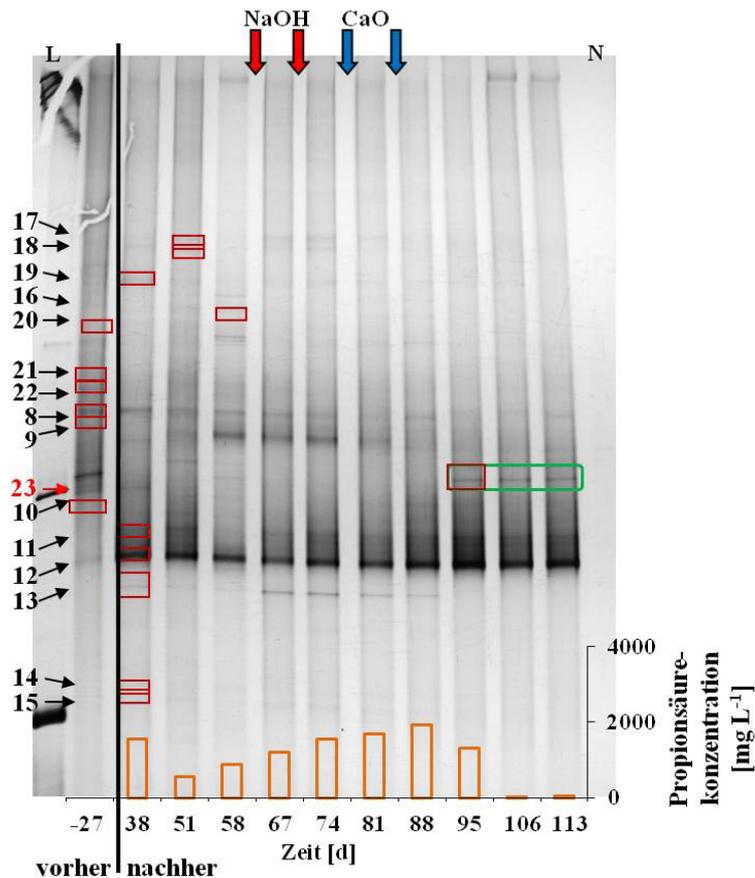


Abbildung 16: Bakterienspezifisches Fingerprinting von Reaktor R2 der großtechnischen Biogasanlage während Übersäuerung und anschließender Prozessregenerierung mit Natronlauge und Calciumoxid. L: DNA- Leiter; N: Negativkontrolle; ▮ Propionsäurekonzentration; ↓ NaOH-Dosierung; ↓ CaO-Dosierung;  sequenzierte Banden;  Bereich von Interesse.

Da im **Reaktor R2** der Anstieg der Gesamtsäurekonzentration vor allem auf einem Anstieg der Propionsäurekonzentration beruhte, wurde die Änderung des genetischen Fingerprintings in Abhängigkeit von der Propionsäurekonzentration betrachtet (Abbildung 16). Es zeigte sich, dass bei steigender Propionsäurekonzentration sich die Abundanz von einem zur Klasse der Clostridia gehörendem Organismus (Bande 13) zunächst verstärkte. Sobald die Propionsäurekonzentration auf einen Wert unter 1900 mg L<sup>-1</sup> sank, verschwand die zugehörige Bande aus dem Gel (Tag 95). Ein zur Familie der Gracilibacteraceae gehörender Mikroorganismus (Bande 23) wurde vor der Prozessstörung nachgewiesen, verschwand im Zuge der Übersäuerung und wurde erst nach der Prozessregenerierung mit CaO (Tag 95) wieder detektiert. Die Bandenintensität der Bande 9 (Familie Thermotogaceae) nahm zunächst mit steigender Propionsäurekonzentration zu. Nach Tag 74 wurde die Bande wieder schwächer.

Bei Untersuchungen von Lerm *et al.* (2012) gab es Hinweise auf den Einfluss von phosphatspeichernden Organismen (PAO) auf die Prozessregenerierung von Gärresten. Daher wurden zur Charakterisierung der Gärreste während der Übersäuerung und der anschließenden Prozesserholung bzw. Prozessregenerierung auch spezifische Primer für *Rhodocyclus*-verwandte PAO (rPAO) eingesetzt. Abbildung 17 zeigt, dass in beiden Reaktoren vor allem drei rPAO-Vertreter die Biozönose beherrschten.

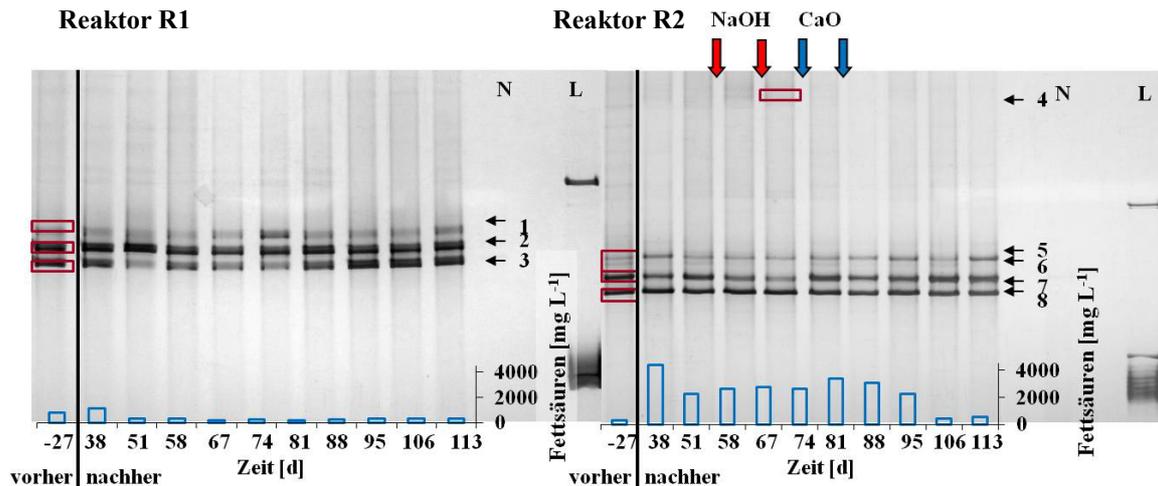


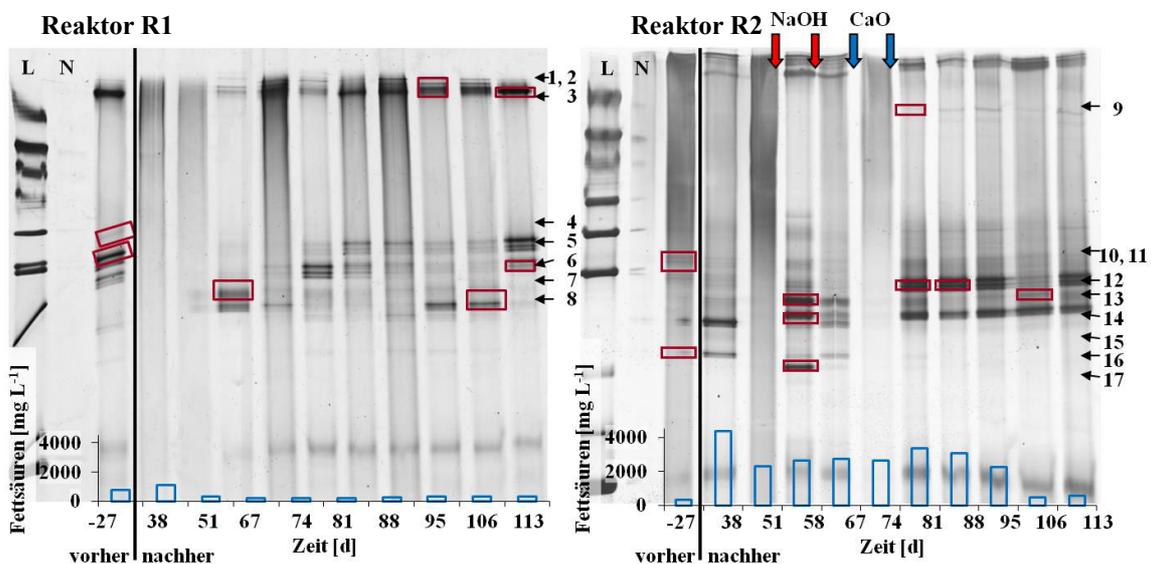
Abbildung 17: rPAO-spezifische Fingerprintings von Gärresten aus **Reaktor R1** und **Reaktor R2** der großtechnischen Biogasanlage während Übersäuerung und Prozesserholung (Reaktor R1)/ Prozessregenerierung (Reaktor R2) mit Natronlauge und Calciumoxid. L: DNA- Leiter; N: Negativkontrolle;  Fettsäurekonzentration; ↓ NaOH-Dosierung; ↓ CaO-Dosierung;  sequenzierte Banden.

Die drei dominanten Banden im Gärrest von **Reaktor R1** wurden der Gattung *Dechloromonas* (Banden 1, 2; je 98 %) und der Spezies Candidatus *Accumulibacter phosphatis clade IIA* (Bande 3; 98 %) zugeordnet (Tabelle 20). Auch in den Gärresten von **Reaktor R2** dominierten drei Banden während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Wie in Reaktor R1 wurden auch hier sowohl Vertreter der Gattung *Dechloromonas* (Bande 5, 6; 96 %, 97 %) als auch die Spezies Candidatus *Accumulibacter phosphatis clade IIA* (Bande 8; 99%) detektiert. Darüber hinaus wurden nur im **Reaktor R2** ein zur Gattung *Rhodocyclus* gehörender Organismus (Bande 4; 96 %) und Organismen der Art Candidatus *Accumulibacter phosphatis* (Bande 7; 99 %) nachgewiesen (Tabelle 20). Ein Vergleich der Bandenintensitäten zeigte, dass diese Mikroorganismen unabhängig von der Konzentration an Fettsäuren über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg im Gärrest beider Reaktoren enthalten waren. Eine Veränderung der Bandenstärke in Abhängigkeit von der Konzentration an organischen Säuren als ein Hinweis auf eine veränderte Abundanz wurde nicht beobachtet (Abbildung 17).

Tabelle 20: Zuordnung der sequenzierten Banden des rPAO-spezifischen Fingerprintings von **Reaktor R1** (Banden 1-3) und **Reaktor R2** (Banden 4- 8) der großtechnischen Biogasanlage.

Bande	Klasse	Familie	Nächster phylogenetischer Verwandter (GenBank accession number)	Ähnlichkeit [%]
1	Betaproteobacteria	Rhodocyclaceae	<i>Dechloromonas sp.</i> (DQ413167.1)	98
2		Rhodocyclaceae	<i>Dechloromonas sp.</i> (DQ413167.1)	98
3			<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis clade IIA</i> (CP001715.1)	98
4	Betaproteobacteria		<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis clade IIA</i> (CP001715.1)	98
5		Rhodocyclaceae	<i>Rhodocyclus sp.</i> (AY691423.1)	96
6		Rhodocyclaceae	<i>Dechloromonas sp.</i> (DQ413167.1)	96
7		Rhodocyclaceae	<i>Dechloromonas sp.</i> (DQ413167.1)	97
8			<i>Candidatus Accumulibacter phosphatis</i> (AY962316.1)	99

Die Zusammensetzung der Biozönose der methanogenen Archaeen wurde mittels genetischem Fingerprinting untersucht (Abbildung 18). In Bezug auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft der Archaeen gab es zwischen Reaktor R1 und Reaktor R2 große Unterschiede (Tabelle 21). Im **Reaktor R1** wurden nicht nur acetoklastische sondern auch hydrogenotrophe Arten nachgewiesen. Vor der Übersäuerung dominierten die Gattungen *Methanosaeta* (Banden 3, 4, 5; je 99 %) und *Methanoculleus* (Banden 1, 2; je 99%) die methanogene Biozönose. Während der Prozesserholung wurden verstärkt Organismen der Gattung *Methanosarcina* nachgewiesen (Bande 7; 99 %). Als der Prozess über längere Zeit stabil und die Essigsäurekonzentration niedrig war (ab Tag 81), dominierte wiederum die Gattung *Methanosaeta* die methanogene Biozönose (Bande 3, 6; 99 %, 98 %). Nach der Übersäuerung wurde ein naher Verwandter der acetoklastischen Art *Methanoculleus receptaculi* (Bande 8; 98 %) in den Proben detektiert.



**Abbildung 18:** Spezifische Fingerprintings für methanogene Archaeen von Gärresten aus **Reaktor R1** und **Reaktor R2** der großtechnischen Biogasanlage während Übersäuerung und Prozesserholung (Reaktor R1)/ Prozessregenerierung (Reaktor R2) mit Natronlauge und Calciumoxid. L: DNA- Leiter; N: Negativkontrolle; ▭ Fettsäurekonzentration; ↓ NaOH-Dosierung; ↓ CaO-Dosierung;  sequenzierte Banden.

Die Biozönose von **Reaktor R2** war vor der Prozessstörung durch das Vorhandensein von *Methanosaeta concilii* (Banden 10, 11; je 99 %), *Methanosarcina thermophila* (Bande 12; 100 %), *Methanoculleus receptaculi* (Banden 14, 15; 100 %, 99 %) und einem zur Familie der Methanospirillaceae gehörendem Organismus (Bande 16; 94 %) gekennzeichnet. Durch die Prozessregenerierung mit CaO wurde die Biozönose verändert und statt durch *Methanosaeta concilii* wurde sie durch *Methanosarcina thermophila* (Bande 12) dominiert. Verwandte der hydrogenotrophen Arten *Methanoculleus bourgensis* (Bande 13; 99 %), *Methanoculleus receptaculi* (Banden 14, 15), *Methanobacterium formicicum* (Bande 17; 98 %) sowie ein zur Familie der Methanospirillaceae gehörender Organismus (Bande 16) wurden bereits während der Prozessregenerierung mit NaOH wieder im Gärrest detektiert. Nach der Prozessregenerierung mit CaO wurde die methanogene Biozönose von einem Verwandten der mixotrophen Art (sowohl acetoklastisch als auch hydrogenotroph) *Methanosarcina thermophila* und der hydrogenotrophen Art *Methanoculleus receptaculi* dominiert.

**Tabelle 21: Zuordnung der sequenzierten Banden des spezifischen Fingerprintings für methanogene Archaeen von Reaktor R1 (Banden 1-8) und Reaktor R2 (Banden 9- 17) der großtechnischen Biogasanlage.**

Banden	Klasse	Familie	Nächster phylogenetischer Verwandter (GenBank accession number)	Ähnlichkeit [%]
1, 2	<b>Methanomicrobia</b>	Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus receptaculi</i> (NR_043961.1)	99; 99
3		Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta concilii</i> (AB679168.1)	99
4		Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta concilii</i> (DQ150255.1)	99
5		Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta concilii</i> (AJ244290.1)	99
6		Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta concilii</i> (DQ150255.1)	98
7		Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina thermophila</i> (JQ346758.1)	99
8		Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus receptaculi</i> (NR_043961.1)	98
9		Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i> (JQ346758.1)	95
10, 11		Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta concilii</i> (DQ150255.1)	99, 99
12		Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina thermophila</i> (JQ346758.1)	100
13		Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus bourgensis</i> (JX943602.1)	99
14		Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus receptaculi</i> (NR_043961.1)	100
15		Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus receptaculi</i> (NR_043961.1)	99
16		Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i> sp. (AJ133792.1)	94
17		Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium formicicum</i> (DQ649317.1)	98

Der Vergleich der genetischen Fingerprintings beider Biogasreaktoren verdeutlicht die Veränderung der methanogenen Biozönose in Bezug auf die Gattungen *Methanosaeta* und *Methanosarcina* in Abhängigkeit von der Propionsäurekonzentration (Abbildung 19). Die methanogene Biozönose von Reaktor R1 wurde sowohl vor der Prozessstörung (Tag -27) und am Beobachtungsende (Tag 113) von der Gattung *Methanosaeta* dominiert. Die dazwischen erfolgte Veränderung hin zur Gattung *Methanosarcina* war nur von kurzzeitiger Dauer. Die methanogene Biozönose im Reaktor R2 zeigte eine dauerhafte Veränderung von der Gattung *Methanosaeta* zur Gattung *Methanosarcina* hin, die nach der Prozessstörung auftrat und auch nach der Prozessregenerierung mit NaOH und CaO noch nachgewiesen wurde.

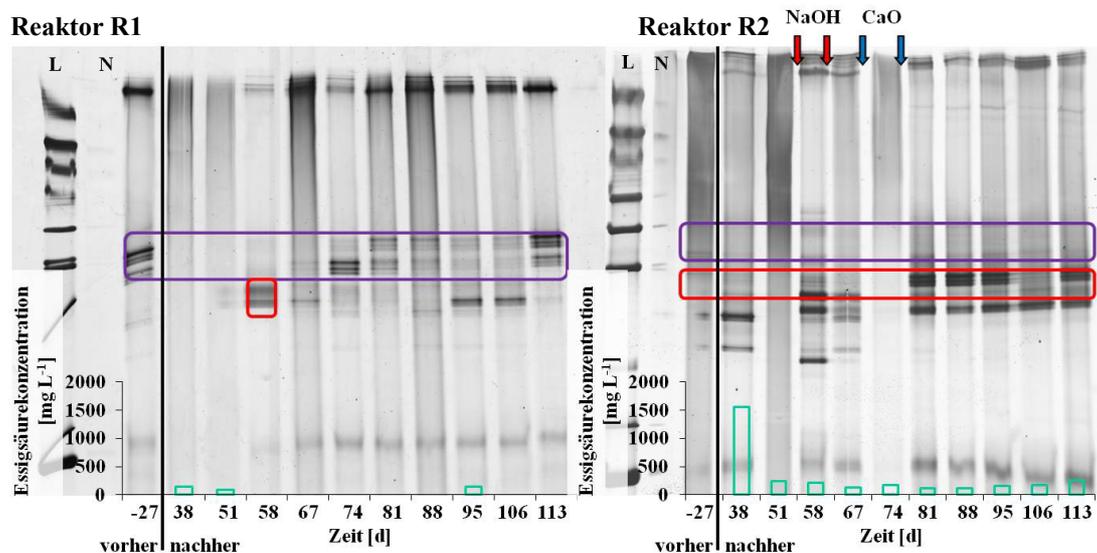


Abbildung 19: Spezifische Fingerprintings für methanogene Archaeen von Gärresten aus Reaktor R1 und Reaktor R2 der großtechnischen Biogasanlage während Übersäuerung und Prozessregenerierung (Reaktor R1)/ Prozessregenerierung (Reaktor R2) mit Natronlauge und Calciumoxid. Veränderung der Gattungen *Methanosaeta*   und *Methanosarcina*  ; L: DNA-Leiter; N: Negativkontrolle;   Essigsäurekonzentration; ↓ NaOH-Dosierung; ↓ CaO-Dosierung.

## 5.2. Prozessstörungen und Prozessregenerierungen in einer Laboranlage

Um den Mechanismus der Übersäuerung und der Prozessregenerierung unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen, wurden Versuche in halbtechnischen Biogasreaktoren durchgeführt. Übersäuerungen wurden gezielt herbeigeführt und, wie an der großtechnischen Anlage, erfolgte die Prozessregenerierung mit Natronlauge (NaOH) bzw. Calciumoxid (CaO). Während der Prozessregenerierung mit CaO wurde die Bildung von Pellets beobachtet. Allein die Behandlung mit CaO führte zu einer nachhaltigen Stabilisierung des Prozesses.

Die Prozessstörungen (Übersäuerungen) wurden durch die Erhöhung der Raumbelastung von  $3,0 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  auf  $10,0 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  kontinuierlich betriebener Laborreaktoren ausgelöst. Während die Raumbelastung mit Klärschlamm vor und während der gesamten Versuche bei ca.  $1,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  lag, wurde die Rapsölmenge vor Versuchsbeginn 17 Tage lang auf das fünffache der Tagesdosis erhöht

(täglich 225 g). Nach Eintritt der Prozessstörung wurde die Zugabe von Rapsöl unterbrochen und die im Folgenden dargestellten Prozessregenerierungsmaßnahmen mit NaOH bzw. CaO wurden durchgeführt.

## 5.2.1. Prozessregenerierung mit Natronlauge

### 5.2.1.1. Auswirkungen auf den Gärrest

Bei diesem Versuch wurde NaOH zusammen mit dem Klärschlamm an den Tagen 0 und 1 ( $121 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), 2 und 3 ( $348 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) und Tag 4 ( $174 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) dosiert. Der pH-Wert befand sich am Tag 0 auf Grund der Überfrachtung im leicht sauren Bereich (pH 6,7). Als der pH-Wert am Tag 5 über 7 stieg, wurde die Zugabe von NaOH eingestellt. Die Konzentration an organischen Säuren lag zu Beginn bei  $6660 \text{ mg L}^{-1}$  und sank in den ersten fünf Tagen um 8% auf  $6155 \text{ mg L}^{-1}$  (Abbildung 20). Eine Woche später (Tag 13) hatte sich die Fettsäurekonzentration deutlich verringert und die Gasbildungsrate stieg von  $0,2 \text{ L h}^{-1}$  auf  $1,0 \text{ L h}^{-1}$  (Abbildung 21). Am Tag 22 wurde der Reaktor angefahren, indem die Raumbelastung durch die Zugabe von Rapsöl von  $1,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  auf  $3,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  erhöht wurde. Während des Anfahrens sank der pH-Wert auf Werte unter 7. Sowohl die Fettsäurekonzentration als auch die Gasbildungsrate stiegen und erreichten innerhalb von acht Tagen Werte von  $2240 \text{ mg L}^{-1}$  (Fettsäurekonzentration) und durchschnittlich  $1,5 \text{ L h}^{-1}$  (Gasbildungsrate).

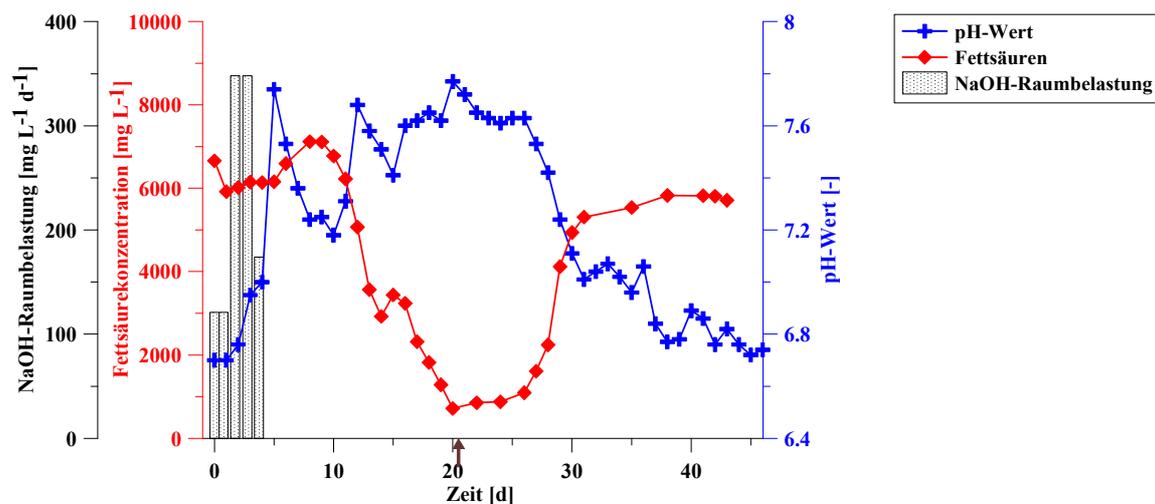


Abbildung 20: Verlauf des pH-Wertes, der Fettsäurekonzentration sowie die NaOH- Raumbelastung in Abhängigkeit von der Zeit während der Prozessregenerierung in einem halbtechnischen Biogasreaktor; ↑ Steigerung der Raumbelastung.

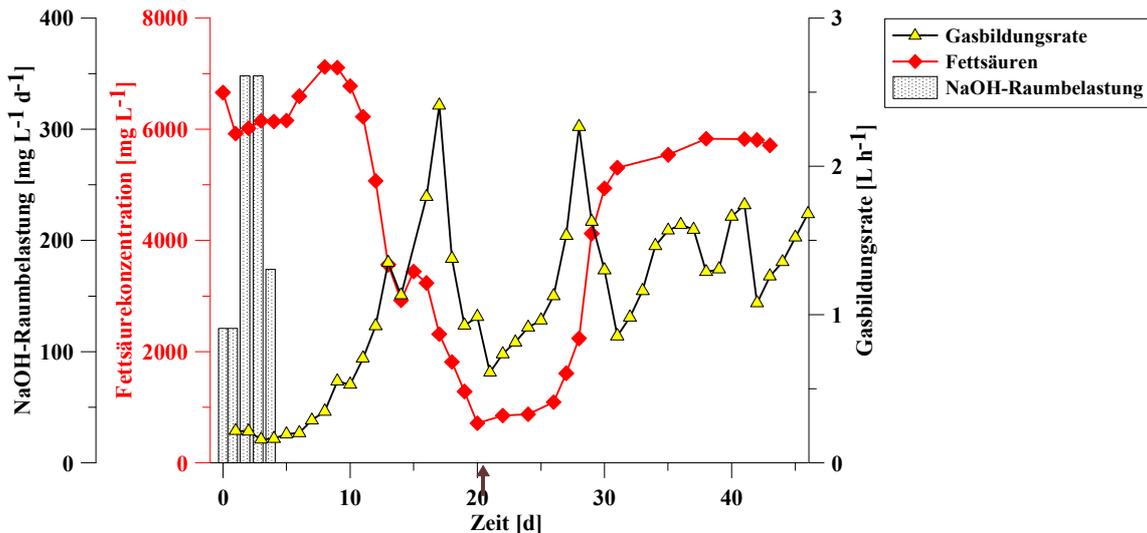


Abbildung 21 : Verlauf der Fettsäurekonzentration, der Gasbildungsrate sowie die NaOH- Raumbelastung in Abhängigkeit von der Zeit während der Prozessregenerierung in einem halbertechnischen Biogasreaktor; ↑ Steigerung der Raumbelastung.

Sowohl die Essig- als auch die Propionsäurekonzentration veränderten sich nach der ersten NaOH-Zugabe (Abbildung 22). Zunächst verringerten sich beide in den ersten drei Tagen um ca. 15 %. Danach stieg die Essigsäurekonzentration kurzzeitig auf  $1200 \text{ mg L}^{-1}$  und sank ab Tag 16 innerhalb von vier Tagen bis auf  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Die Propionsäure schwankte bis einschließlich Tag 12 zwischen Werten von  $700 - 800 \text{ mg L}^{-1}$ . Danach stieg die Konzentration innerhalb von einem Tag um mehr als das Doppelte. Innerhalb von sieben Tagen verringerte sich die Konzentration und lag am Tag 20 bei  $40 \text{ mg L}^{-1}$ . Nach dem Anfahren am Tag 22, akkumulierten sowohl die Essig- als auch die Propionsäure innerhalb von sechs Tagen. Die Konzentrationen beider Fettsäuren blieben auf einem hohen Niveau und zeigten die erneute Übersäuerung des Gärrestes an.

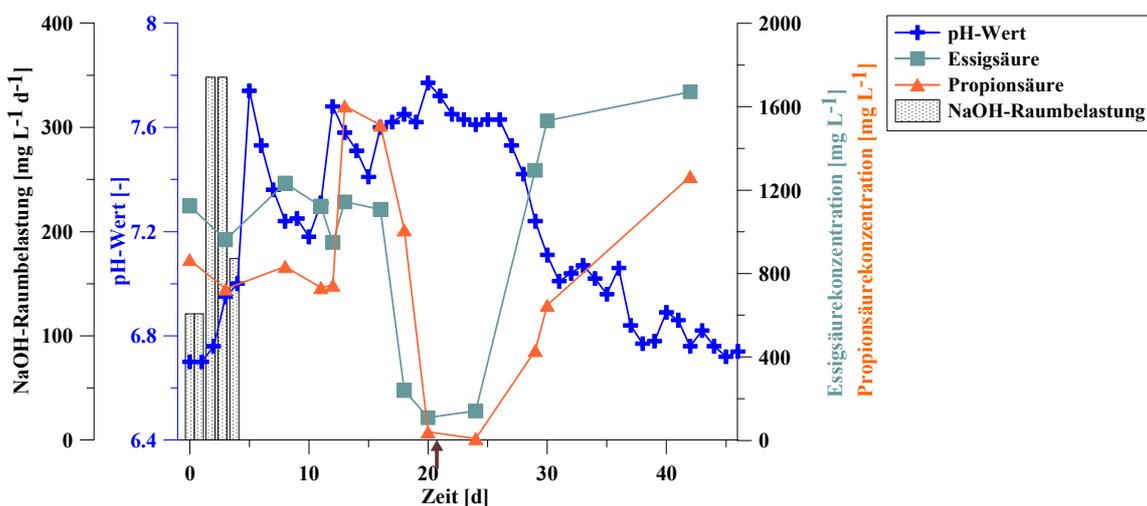


Abbildung 22: Verlauf des pH-Wertes sowie der Essig- und der Propionsäurekonzentration in Abhängigkeit von der Zeit während der Prozessregenerierung mit Natronlauge in einem halbertechnischen Biogasreaktor; ↑ Steigerung der Raumbelastung

Die Zugabe von NaOH führte zu einem Anstieg des pH-Wertes, aber nicht zu einer langfristigen Stabilisierung des Biogasprozesses. Die Bildung von Pellets wurde nicht beobachtet. Molekularbiologische Untersuchungen wurden in geringem Umfang durchgeführt und werden auf Grund der geringeren Praxisrelevanz hier nicht dargestellt.

## 5.2.2. Prozessregenerierung mit Calciumoxid

### 5.2.2.1. Auswirkungen auf den Gärrest

Bei diesem Versuch wurde CaO zusammen mit dem Klärschlamm an den Tagen 0 bis 3 ( $157 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), 4 bis 5 ( $313 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) und 6 bis 7 ( $626 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) dosiert. Der pH-Wert lag auf Grund der Übersäuerung am Tag 0 bei 5,7 und stieg in Folge der CaO-Dosierung bis zum Tag 8 auf 7,25 an. Die Konzentration an organischen Säuren sank zu Beginn des Experiments von Tag 0 bis zum Tag 8 um 55 % (von  $8750 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $4850 \text{ mg L}^{-1}$ ), obwohl der pH-Wert noch im sauren Milieu lag (5,7 bis 6,8) (Abbildung 23). Nach der letzten CaO-Zugabe nahm die Konzentration an organischen Säuren weiter ab und erreichte innerhalb von 10 Tagen (Tag 18) einen Wert von  $800 \text{ mg L}^{-1}$ . Gleichzeitig stieg die Gasbildungsrate von  $0,5 \text{ L h}^{-1}$  auf  $4,3 \text{ L h}^{-1}$  und erreichte innerhalb von acht Tagen (Tag 16) nach der letzten CaO-Zugabe ihr Maximum (Abbildung 24). Am Tag 22 wurde der Reaktor angefahren. Die Raumbelastung wurde durch die Zugabe von Rapsöl von  $1,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  auf  $3,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  erhöht. In dieser Phase akkumulierten kurzzeitig Fettsäuren, deren Konzentration von  $579 \text{ mg L}^{-1}$  (Tag 22) auf  $1723 \text{ mg L}^{-1}$  (Tag 23) stieg. Innerhalb von vier Tagen sank die Fettsäurekonzentration auf  $960 \text{ mg L}^{-1}$  (Tag 27). Die Gasbildungsrate stieg während der leichten Akkumulation der Fettsäuren, sank bei ihrem Abbau und stabilisierte sich innerhalb von vier Tagen bei einem Wert um  $3 \text{ L h}^{-1}$  (Tag 27). Der Biogasbildungsprozess lief nach dem Anfahren ohne eine weitere Zugabe von CaO störungsfrei weiter.

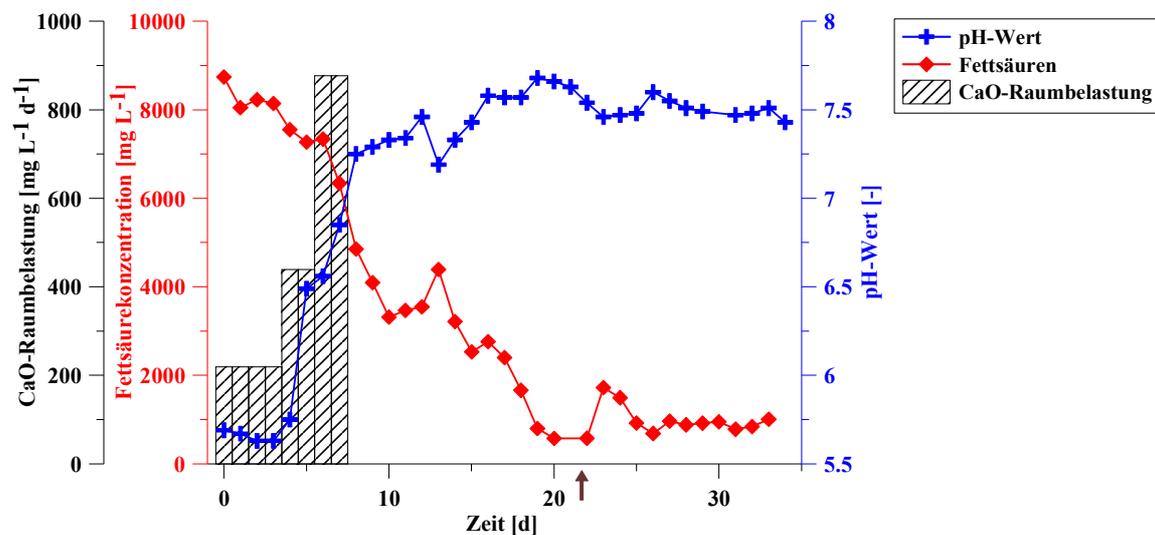


Abbildung 23: Verlauf des pH-Wertes, der Fettsäurekonzentration sowie die CaO- Raumbelastung in Abhängigkeit von der Zeit während der Prozessregenerierung mit CaO in einem halbtechnischen Biogasreaktor; ↑ Steigerung der Raumbelastung.

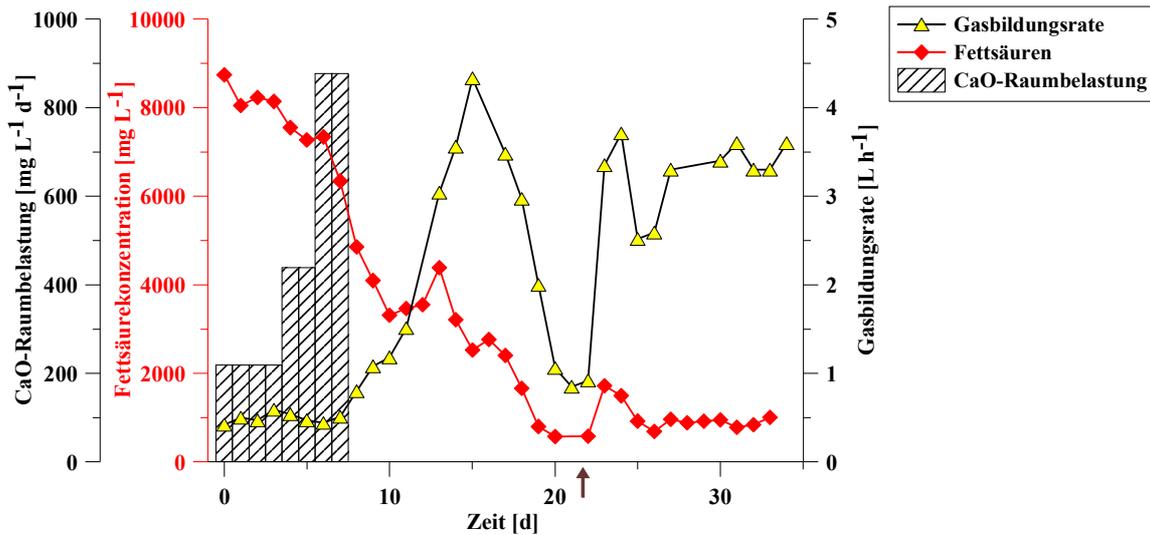


Abbildung 24: Verlauf der Fettsäurekonzentration und der Gasbildungsrate in Abhängigkeit von der Zeit während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid in einem halbtechnischen Biogasreaktor; ↑ Steigerung der Raumbelastung.

Mit der ersten CaO-Zugabe veränderten sich Essig- und Propionsäurekonzentration (Abbildung 25). Die Essigsäure stieg von  $2796 \text{ mg L}^{-1}$  (Tag 0) bis auf einen Wert von  $3450 \text{ mg L}^{-1}$  (Tag 3) noch leicht an. Danach verringerte sich die Konzentration zügig um 62 % bis auf  $1302 \text{ mg L}^{-1}$  (Tag 8). Im Gegensatz dazu nahm die Propionsäurekonzentration in derselben Zeit (bis Tag 8) nur um 30 % (von  $2659 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $1863 \text{ mg L}^{-1}$ ) ab. Die Konzentration der Propionsäure stieg von Tag 8 bis zum Tag 10 vorübergehend auf  $2016 \text{ mg L}^{-1}$ . Danach sank sie bis zum Tag 17 leicht und verringerte sich dann innerhalb von zwei Tagen (Tag 19) auf einen Wert von  $182 \text{ mg L}^{-1}$ . Am Tag 22 kam es zu einem kurzzeitigen Anstieg sowohl der Essig- als auch der Propionsäure im Zuge der Erhöhung der Raumbelastung am Tag 21. Innerhalb von zwei Tagen erreichten beide Säuren wieder das Konzentrationsniveau vom Tag 21.

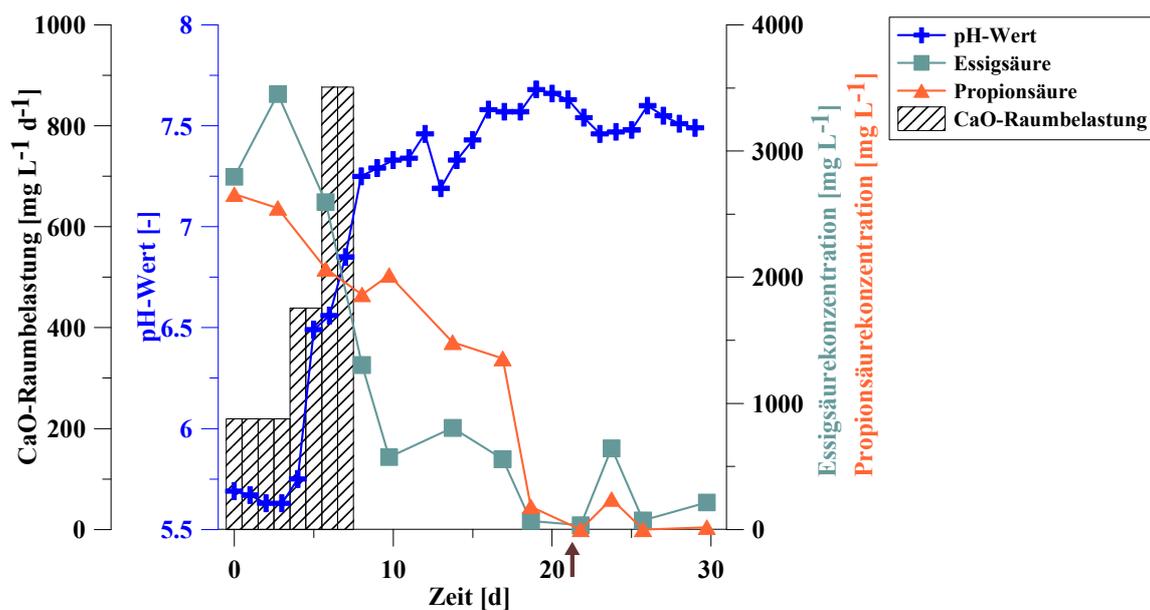


Abbildung 25: Verlauf des pH-Wertes sowie der Essig- und der Propionsäurekonzentration in Abhängigkeit von der Zeit während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid in einem halbtechnischen Biogasreaktor; ↑ Steigerung der Raumbelastung.

Das Verhältnis von Essigsäure zu Propionsäure betrug zu Beginn des Versuchs 1:1. Es verschob sich bis zum Tag 10 in Richtung der Propionsäure (0,3:1). Zum Ende des Versuchs (Tag 30) hatte sich das Verhältnis wieder umgekehrt und lag bei 12,4:1.

Für den energiegewinnenden Abbau der Propionsäure ist ein niedriger Wasserstoffpartialdruck nötig. Während des Versuchs lag dieser die meiste Zeit außerhalb des thermodynamischen Fensters für einen energiegewinnenden anaeroben Abbau der Propionsäure (Abbildung 26). Dessen ungeachtet sank deren Konzentration im flüssigen Gärrest kontinuierlich. Das thermodynamische Fenster der Buttersäure ist wesentlich breiter und der Abbau war aus thermodynamischer Sicht zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung gehemmt.

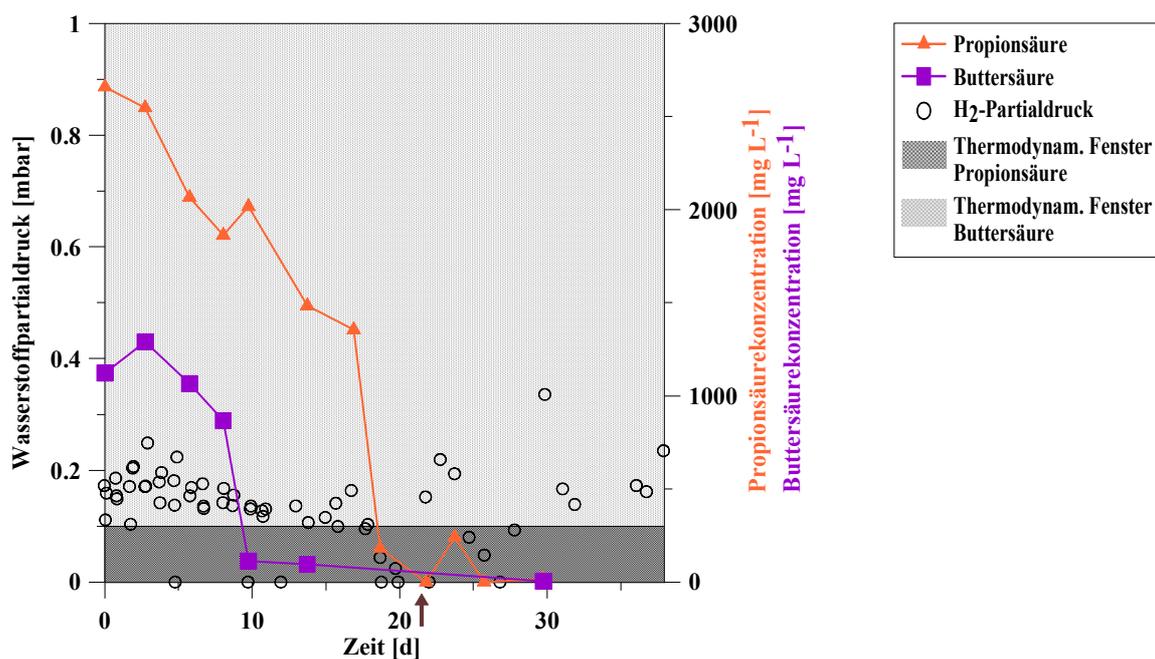


Abbildung 26: Wasserstoffpartialdruck während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid in einem halbtechnischen Biogasreaktor in Abhängigkeit der thermodynamischen Fenster für den energiegewinnenden Abbau von Propion- und Buttersäure zu Methan unter anaeroben Bedingungen; ↑ Steigerung der Raumbelastung.

Die Calciumkonzentration im flüssigen Gärrest sank von  $23 \text{ mg L}^{-1}$  am Tag 0 bis unter die Nachweisgrenze am Tag 5, obwohl CaO in den Fermenter dosiert wurde (Abbildung 27). Erst ab Tag 14 kam es zu einer deutlichen Zunahme der Calciumkonzentration. Innerhalb von zwei Tagen verdreifachte sie sich und erreichte am Tag 16 mit  $90,6 \text{ mg L}^{-1}$  ihr Maximum. Die Konzentrationsverläufe der Fettsäuren und des Phosphats waren sehr ähnlich. Beide Kurven verliefen gegenläufig zu der Kurve der Calciumkonzentration. Zu Beginn sank die Calciumkonzentration während die des Phosphats zunahm (von  $950 \text{ mg L}^{-1}$  auf  $1200 \text{ mg L}^{-1}$ ). Erst mit der Zunahme von Calcium im flüssigen Gärrest (Tag 14) nahm die Konzentration des Phosphats deutlich ab und erreichte am Tag 17 mit  $90 \text{ mg L}^{-1}$  ihr Minimum.

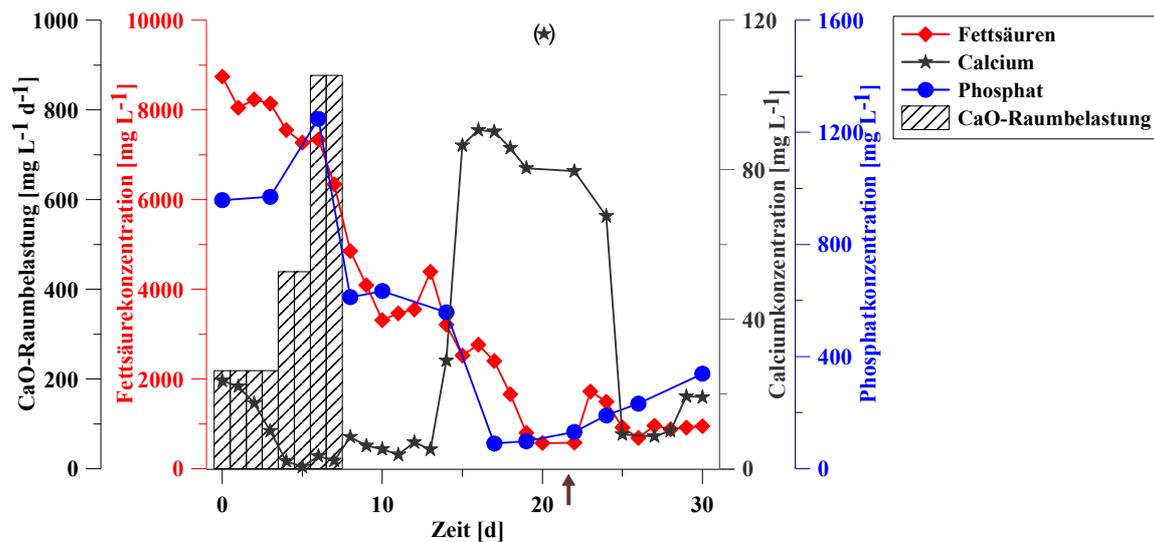


Abbildung 27: Verlauf der Fettsäurekonzentration, der Calciumkonzentration sowie der Phosphatkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid in einem halbertechnischen Biogasreaktor; ↑ Steigerung der Raumbelastung.

#### 5.2.2.2. *Veränderung der Gärreststruktur und Bildung von Pellets*

Während der Prozessregenerierung mit CaO wurde eine Veränderung der Gärreststruktur beobachtet. Der Schlamm wurde körniger und enthielt zunehmend kleine weiße bis gelbe Pellets (Abbildung 28). Es handelte sich nicht um Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), da nach der Zugabe von Salzsäure (rauchend, 37 %) zu den Pellets keine Gasbildung beobachtet wurde. Carbonate reagieren mit Säuren unter Entwicklung von Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ).

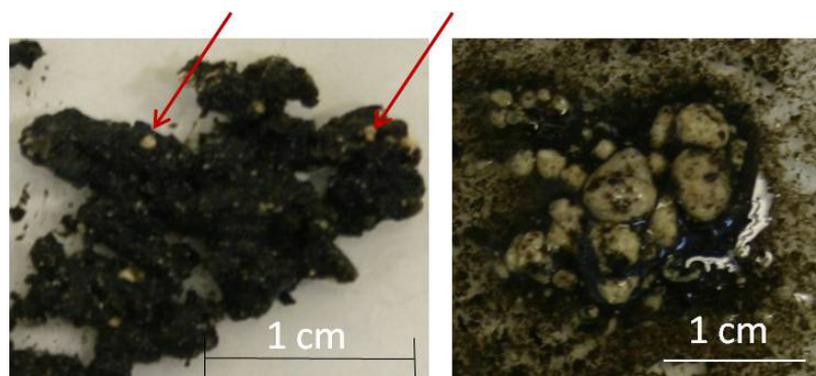


Abbildung 28: Gärrest mit verschiedenen großen Pellets während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid in einem halbertechnischen Biogasreaktor; Marietta Liebrich

Die Pellets waren unterschiedlich groß (zwischen 0,5 mm und 5 mm). Sie besaßen eine weiche Konsistenz, waren rund und bestanden aus zwei Schichten.

Um die Zusammensetzung der Pellets zu untersuchen, wurden ausgewählte Proben einer Röntgenstrukturanalyse gekoppelt mit REM (REM-EDX) unterzogen. Die Oberfläche der Pellets bestand neben geringen Mengen von Magnesiumphosphat ( $Mg_3(PO_4)_2$ ) und  $CaCO_3$  vor allem aus an Kohlenstoff gebundenem Calcium (Abbildung 29). Das Innere wurde vor allem von Calcium und Phosphat dominiert (Abbildung 30).

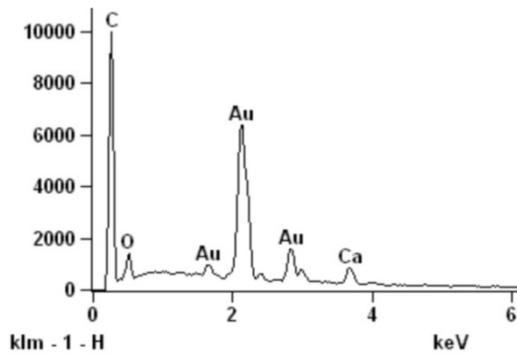


Abbildung 29: REM- EDX- Analyse der Außenseite eines ausgewählten Pellets aus dem Gärrest während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid; C – Kohlenstoff, O – Sauerstoff, Ca – Calcium, Au – Gold; Beschichtung mit Gold erzeugte den Au-Peak; Monika Kasina.

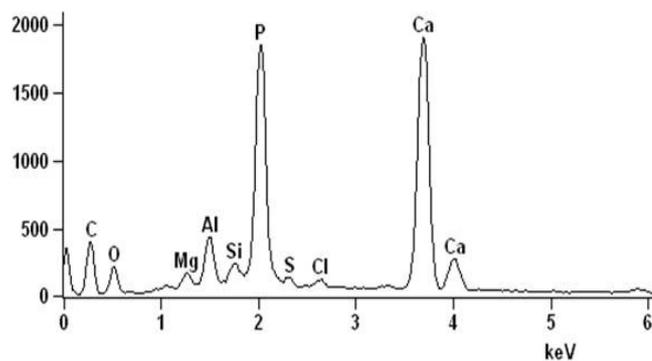
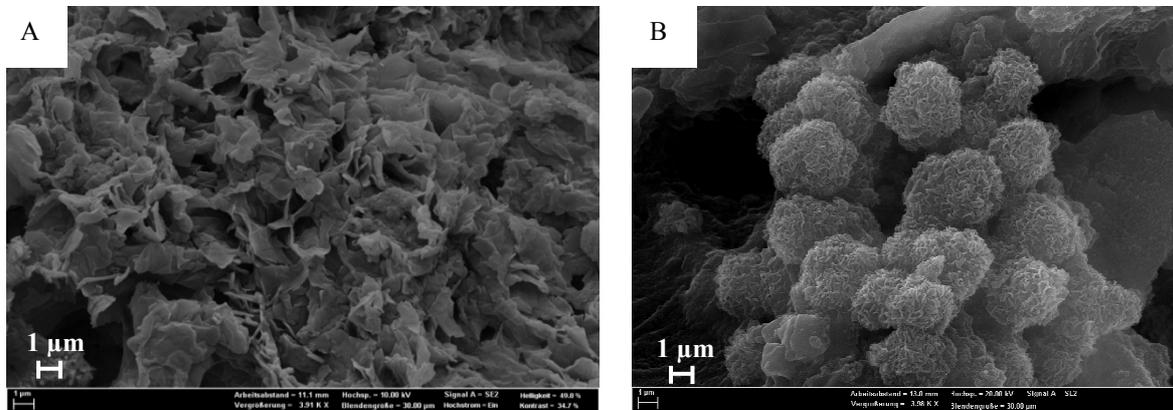


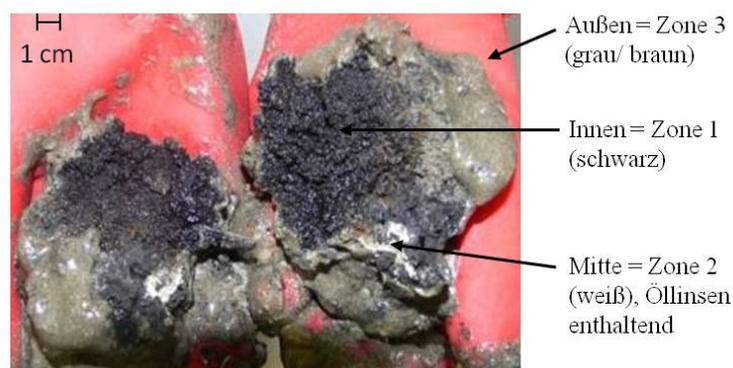
Abbildung 30: REM- EDX- Analyse des Inneren eines ausgewählten Pellets aus dem Gärrest während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid; C – Kohlenstoff, O – Sauerstoff, Mg – Magnesium, Al - Aluminium, Si – Silicium, P – Phosphor, S – Schwefel, Cl – Chlor, Ca – Calcium; Beschichtung mit Kohlenstoff erzeugte den (niedrigen) C-Peak; Monika Kasina.

Die bei der Prozessregenerierung mit CaO gebildeten Pellets (Abbildung 31) glichen in ihrem Aussehen sehr stark den Pellets, die im Reaktor R2 der großtechnischen Biogasanlage beobachtet wurden. In Abbildung 31 A ist die plattenähnliche Struktur der Pellets erkennbar. In Abbildung 31 B sind Calcitkristalle abgebildet, die auf der Oberfläche eines Pellets detektiert wurden.



**Abbildung 31: A: Oberfläche eines Partikel aus dem Gärrest während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid; REM 3.910 fache Vergrößerung; B: Calcitkristalle ( $\text{CaCO}_3$ ) von der Oberfläche eines Partikels, REM 3.980 fache Vergrößerung; Monika Kasina.**

Neben diesen kleinen Pellets wurden am Tag 12 bei der Öffnung des Fermenters auch deutlich größere Pellets gefunden (Abbildung 32). Eines dieser Pellets, welches für weitergehende Analysen entnommen wurde, hatte einen Durchmesser von 7 cm. Anhand der Farben wurden drei Zonen unterschieden. Die Mitte des Pellets war schwarz und wird im Folgenden als Zone 1 bezeichnet. Diese Zone war von einer weißlichen Zone (Zone 2) und einer graubraunen Zone (Zone 3) umgeben. Nach der Beprobung wurde das Pellet wieder in den Reaktor eingebracht. Am Ende des Versuchs (Tag 30) erfolgte eine erneute Öffnung des Fermenters. Zu diesem Zeitpunkt waren weder kleine noch große Pellets im Gärrest optisch zu detektieren.



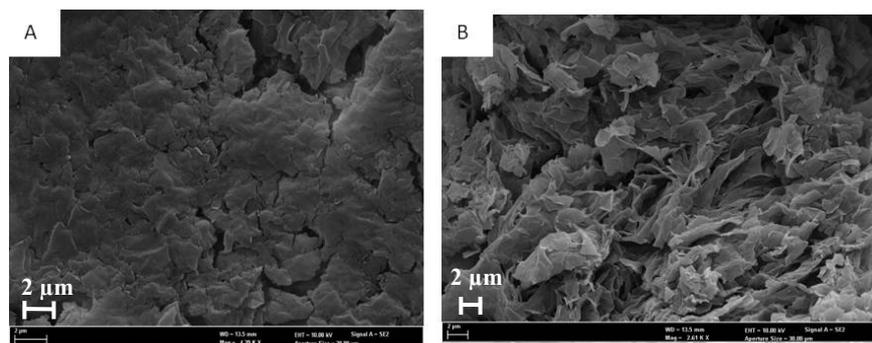
**Abbildung 32: Pellet entnommen aus dem Fermenter am Tag 12 nach Versuchsbeginn. Die Einteilung der Zonen erfolgte durch die unterschiedliche Färbung.**

Etwa 60 % der Trockensubstanz (TS) des großen Pellets bestand aus organischem Material. Der mineralische Anteil war 10 % höher als im flüssigen Gärrest (Tabelle 22).

**Tabelle 22: Quantitative Analyse des großen Pellets zur Bestimmung von Trockensubstanz (TS), organischer Trockensubstanz (oTS) und prozentuaem Anteil an organischem Material (% oTS) für die unterschiedlichen Zonen im Vergleich zum Gärrest**

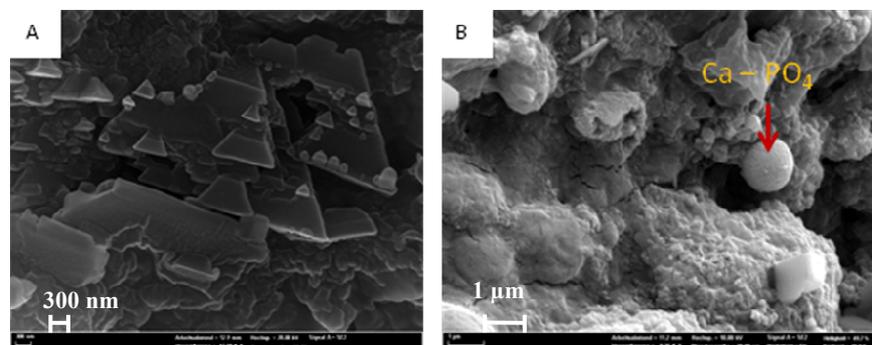
Probe	TS (g L <sup>-1</sup> )	oTS (g L <sup>-1</sup> )	% oTS
Gärrest	66	47	71
Pellet Zone 1	237	149	63
Pellet Zone 2	559	335	60
Pellet Zone 3	701	417	60

Die qualitative REM-EDX-Analyse zeigte, dass das Pellet vor allem aus organischem Material, unterschiedlichen Phosphaten (Eisen-, Aluminium- und Calciumphosphaten), Quartz und Tonmineralen bestand. Das organische Material war auf der Außenseite durch ein dichtes homogenes Gefüge charakterisiert (Abbildung 33 A). Im Gegensatz dazu wies das organische Material im Inneren des Pellets eine poröse Struktur mit flockenartiger oder tränenähnlicher Form auf (Abbildung 33 B).



**Abbildung 33: Struktur des organischen Materials des Pellets: A: Außenseite, charakterisiert durch homogene Struktur; B: Innenseite, gekennzeichnet durch poröse Strukturen mit flockenartiger bzw. tränenähnlicher Form**

Die Struktur der Phosphatminerale war sehr unterschiedlich geformt – von prismatisch, trapezförmig (Abbildung 34 A) und rund (Abbildung 34 B) bis zu formlos. Eisenoxide, Quartz, Tonminerale und Feldspat wurden in geringen Mengen nachgewiesen.

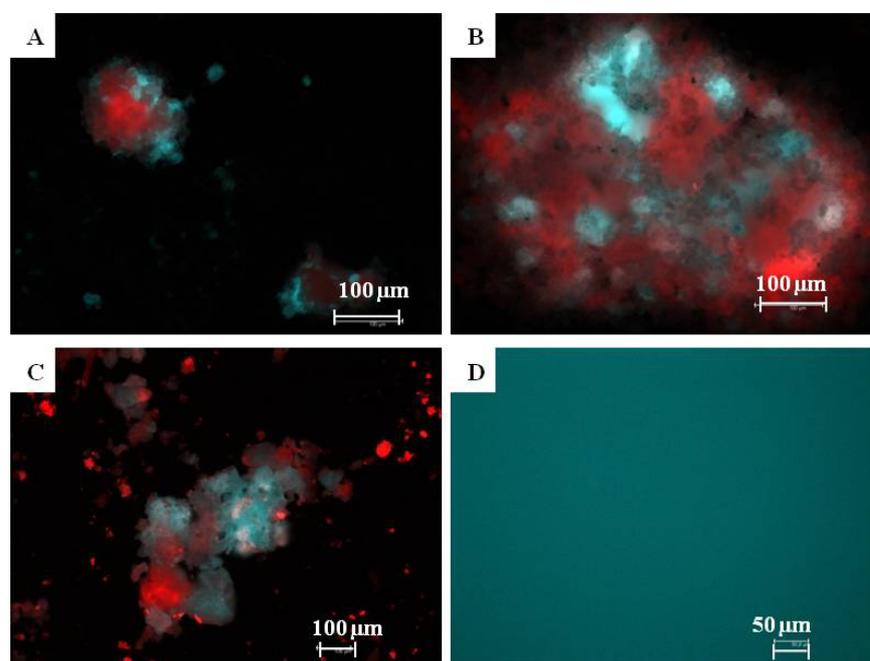


**Abbildung 34: Phosphatminerale, die im Pellet detektiert wurden: A: trapezförmige Mg (Ca)- Phosphate; B: runde Phosphatminerale**

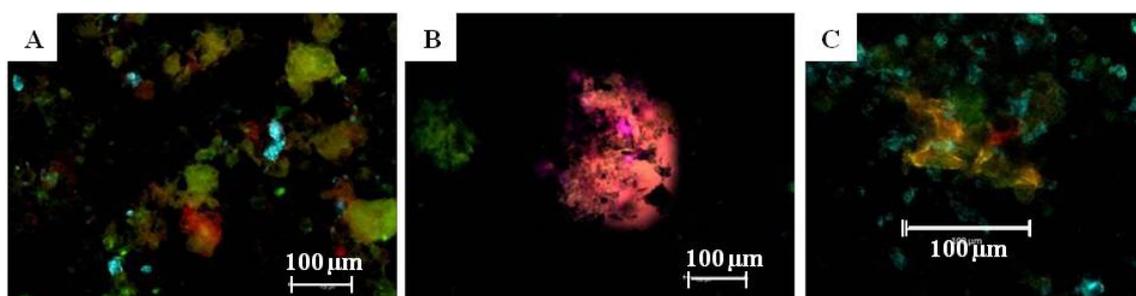
Die Spotanalysen mittels REM-EDX zeigten, dass die unterschiedlichen Zonen (1 – 3) in ihrem Phosphatgehalt variierten. Im Kern des Pellets wurde Phosphat häufiger nachgewiesen als in den anderen zwei Zonen. Nach Außen hin nahm die Häufigkeit ab. Während in den unterschiedlichen Pelletzonen Phosphat sehr selten detektiert wurde, war es in den Proben des umgebenden Gärrestes bei jeder Spotanalyse nachweisbar. Die äußere Zone war durch einen hohen Gehalt an Calcium und organischem Kohlenstoff charakterisiert.

Die Analyse der Pelletzonen zeigte eine sehr enge räumliche Beziehung zwischen Calcium (rot), Öl und /oder LCFA (cyan) in allen Zonen. Beispielhaft ist in Abbildung 35 jeweils ein Foto für jede Pelletzone dargestellt. Weiterhin zeigte sie, dass Proteine in allen Zonen des Pellets vorhanden waren (Abbildung 36). Die spezifische Färbung bestätigte auch hier eine enge räumliche Beziehung zwischen Proteinen, Calcium und Öl bzw. LCFA. Als Beispiel dafür ist in Abbildung 36 jeweils ein Foto für jede Pelletzone

dargestellt.



**Abbildung 35:** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der räumlichen Beziehung zwischen Calcium (rot) und Öl bzw. LCFA (cyan) im Pellet: A: Zone 1 (Innen); B: Zone 2 (Mitte); C: Zone 3 (Außen); D: Blindwert (Ölsäure)



**Abbildung 36:** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der räumlichen Beziehung zwischen Calcium (rot), Öl bzw. LCFA (cyan) und Proteinen (grün) im Pellet: A: Zone 1 (Innen); B: Zone 2 (Mitte); C: Zone 3 (Außen)

Die mit dem Klärschlamm zugeführten PAO hatten große Mengen an Phosphat in Form von Polyphosphaten gespeichert. Eine Analyse mit Hilfe der Neisser-Färbung zeigte, dass sowohl im Klärschlamm (Abbildung 37) als auch im Gärrest (Abbildung 38) Polyphosphatgranula in großer Dichte vorlagen. Alle untersuchten Proben enthielten Neisser-positive und Neisser-negative Zellen. In den Zonen 1 bis 3 des Pellets waren die Polyphosphatgranula weniger gehäuft und wurden seltener nachgewiesen. In Abbildung 39 ist exemplarisch je ein Bild für jede Pelletzone dargestellt.

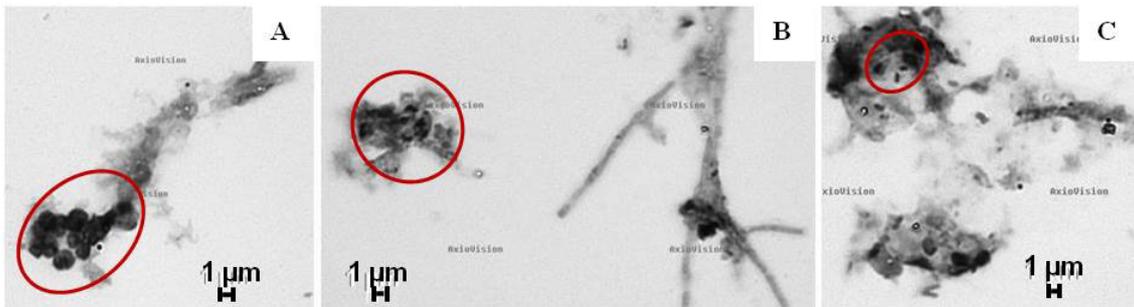


Abbildung 37: Polyphosphatgranula nach Neisser-Färbung im Klärschlamm: A bis C: verschiedene Klärschlammproben; Exemplarisch wurden einige Neisser-positive Zellen mit einer roten Ellipse markiert.

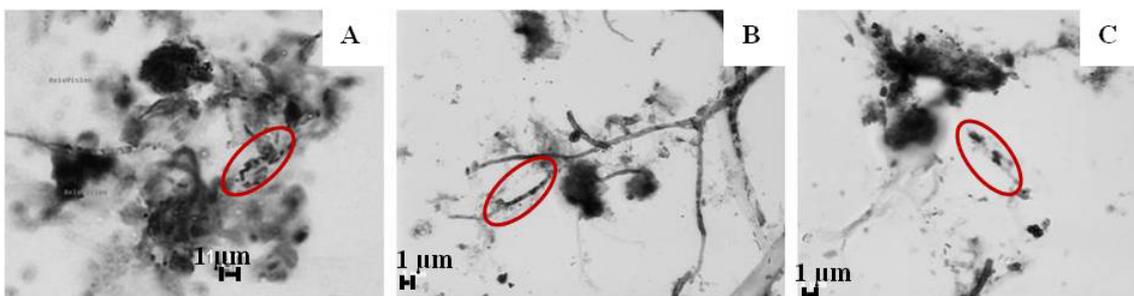


Abbildung 38: Polyphosphatgranula nach Neisser-Färbung im Gärrest während des Versuchs zur Prozessregenerierung mit Calciumoxid; A: t=0 d; B: t= 15 d; C: t= 30 d; Exemplarisch wurden einige Neisser-positive Zellen mit einer roten Ellipse markiert.

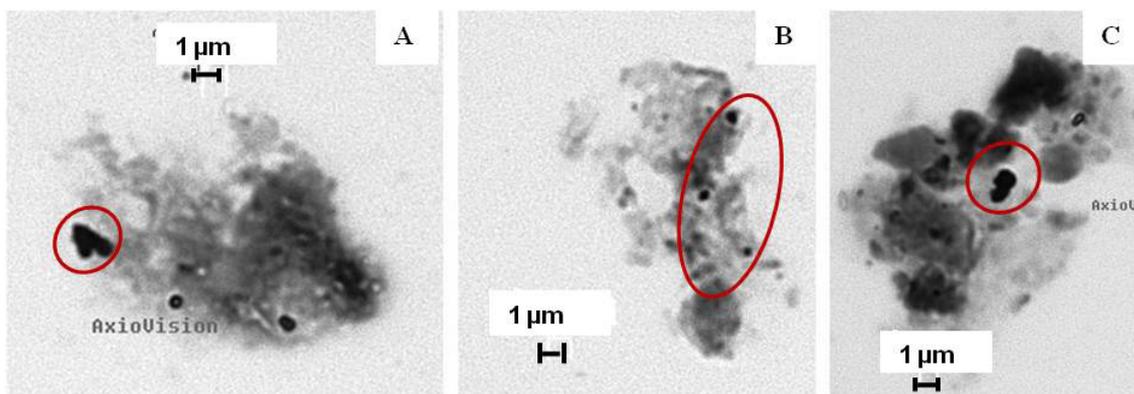
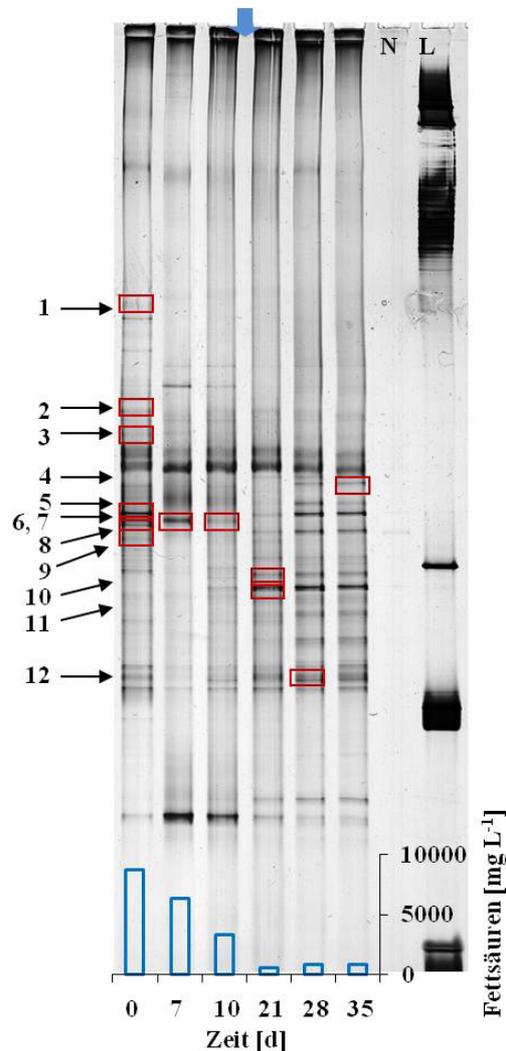


Abbildung 39: Polyphosphatgranula nach Neisser-Färbung in den unterschiedlichen Zonen des Pellets: A: Zone 1 (Innen), B: Zone 2 (Mitte), C: Zone 3 (Außen); Exemplarisch wurden einige Neisser-positive Zellen mit einer roten Ellipse markiert.

### 5.2.2.3. *Auswirkungen auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose*

Bei der Fingerprintanalyse der mikrobiellen Biozönose des **Gärrestes** wurden 12 unterschiedliche Mikroorganismen detektiert (Abbildung 40; Tabelle 23).



**Abbildung 40: Bakterienspezifisches Fingerprinting im Vergleich zur Fettsäurekonzentration während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid. L: DNA-Leiter; N: Negativkontrolle; ↓ Start der Co-Substratdosierung mit Rapsöl; □ Fettsäurekonzentration; □ sequenzierte Bands**

Die bakterielle Gemeinschaft war zu Beginn sehr divers. 10 der 12 sequenzierten Bands wurden vor allem der Klasse Clostridia zugeordnet. Dabei waren u. a. die Familien Clostridiaceae und Syntrophomonadaceae vertreten. Die Fingerprint-Analyse des Gärrestes zeigte weiterhin, dass sich die Biozönose über den Versuch veränderte (Abbildung 40; Tabelle 23). Die schwache Bande 1 z. B., die zu Organismen der Familie der Chitinophagaceae zugeordnet wurde, war nur zu Beginn detektierbar. Auch Organismen der Familie Peptococcaceae (Bande 5) und Aminococcaceae (Bande 8) wurden nur bis zum Tag 10 nachgewiesen. Ab dem Tag 21, als die Fettsäurekonzentration unter  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  gesunken war, wurden die dazugehörigen Bands wieder im Fingerprint sichtbar. Anders verhielt sich der mit der Familie der Lachnospiraceae verwandte Organismus (Bande 6, 7). Die zu diesen Organismen gehörenden Bands wurden nur bis einschließlich Tag 10 im genetischen Fingerprinting detektiert. Die Bands wurden von Tag 7 zu Tag 10 schwächer und verschwanden dann vollständig.

Andere Organismen wurden erst nach der Prozessregenerierung detektiert. Hierzu gehören u. a. die Banden 10 und 11, die der Familie der Syntrophomonadaceae zugeordnet wurden. Am Tag 10 wurden die beiden Banden das erste Mal detektiert. Zu diesem Zeitpunkt waren ihre Signale noch sehr schwach. Bis zum Tag 21 waren sie bereits sehr viel stärker. Auch die Bande 4, die zur Gattung *Clostridium* zugeordnet wurde, erschien erst nach der Prozessregenerierung (ab Tag 28) im Fingerprinting.

Einige Organismen wurden während der gesamten Zeit im genetischen Fingerprinting nachgewiesen. Dabei hatten die Banden 2 (Clostridiales Family XI. Incertae Sedis), 3 (Clostridiaceae, *Clostridium*) und 9 (Thermoanaerobacterales Family III. Incertae Sedis) nur einen geringen Anteil an der Biozönose. Die Bande 12 (*Coprothermobacter proteolyticus* - Thermodesulfobiaceae) blieb während des Versuchs unverändert.

**Tabelle 23: Zuordnung der sequenzierten Banden des bakterienspezifischen Fingerprintings während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid.**

Banden	Klasse	Familie	Nächster phylogenetischer Verwandter (GenBank accession number)	Ähnlichkeit (%)
2	Clostridia	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i> (GQ461827.1)	84
			Uncultured bacterium clone (KC621946.1)	84
3	Clostridia	Clostridiaceae	<i>Clostridium ultunense</i> (NR_026531.1)	96
4			Uncultured bacterium clone (GU320654.1)	99
			<i>Clostridium sp.</i> (AB093546.1)	99
5			Uncultured Clostridium sp. (AB198871.1)	99
			Peptococcaceae	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i> (NR_041320.1)
6, 7	Lachnospiraceae	Uncultured Firmicutes bacterium (HE856458.1)	87	
		Lachnospiraceae bacterium (AF550610.1)	96, 92	
9	Thermoanaerobacterales Family III. Incertae Sedis	Uncultured bacterium (HQ453302.1)	99, 95	
		<i>Thermovenabulum ferriorganovorum</i> (NR_042719.1)	75	
10	Syntrophomonadaceae	Uncultured bacterium clone (JQ799940.1)	77	
		<i>Syntrophomonas sp.</i> (AB021306.1)	78	
11	Syntrophomonadaceae	Uncultured bacterium (GQ138691.1)	79	
		<i>Syntrophomonas wolfei subsp. Saponavida</i> (DQ666176.1)	94	
12	Thermodesulfobiaceae	Uncultured bacterium (JF417905.1)	97	
		<i>Coprothermobacter proteolyticus</i> (NR_074653.1)	98	
8	Negativicutes	Uncultured bacterium (HF938027.1)	98	
		Acidaminococcaceae	<i>Acidaminococcus sp.</i> (EU728758.1)	78
1	Sphingobacteria	Uncultured bacterium (JQ072120.1)	78	
		Chitinophagaceae	<i>Terrimonas sp.</i> (HM124372.1)	93
			Uncultured bacterium (AB657239.1)	95

Weitere genetische Fingerprintings verdeutlichten die Dominanz der Klasse Clostridia, wiesen aber auch die Klasse Actinobacteria nach (Anhang D). Zu den Clostridia wurden folgende Organismen eingeordnet: *Sporanaerobacter acetigenes* (99 %); *Lutispora* (91 %), *Syntrophomonas* (90 %) und ein mit *Thermoanaerobacter*-verwandter Organismus (82 %). Alle 11 Mitglieder der Actinobacteria gehörten zur Familie der Intrasporangiaceae. Zu den Actinobacteria wurden folgende Organismen zugeordnet: *Intrasporangium sp.* (97 %); *Phycococcus jejuensis* und *Phycococcus ochangensis* (98 %; 96 %);

*Janibacter sp.* (97 %) und *Tetrasphaera sp.* (99 %, unkultiviert). Des Weiteren waren verschiedene Familien aus den Klassen der Bacteroidia, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria und Synergistia vertreten.

Auffällig war, dass der Anteil an nichtkultivierten Arten bei der bakteriellen Biozönose generell sehr hoch war. Das bedeutet, dass die Zuordnung zu unkultivierten Organismen häufig eine bessere Übereinstimmung (Ähnlichkeit) in der NCBI-Datenbank ergab als die Zuordnung zu bereits kultivierten Organismen.

Die Auswertung der Pareto-Lorenz-Analyse zeigte deutlich, dass sich die Gleichverteilung der bakteriellen Biozönose während des Versuchsveränderte (Abbildung 41). Zu Beginn war die Biozönose relativ gleichmäßig verteilt. Obwohl der Gärrest stark übersäuert war (Fettsäurekonzentration:  $8750 \text{ mg L}^{-1}$ ), repräsentierten 20 % der Organismen 42 % der Bandenintensitäten. Im Zuge der Prozessregenerierung mit CaO veränderte sich das Verhältnis und lag am Tag 10 bei 20:71. Während dieser Zeit wurde die Biozönose durch wenige Organismen dominiert. Zu Versuchsende veränderte sich die „Evenness“ erneut und führte zu einer gleichmäßiger verteilten bakteriellen Biozönose als am Tag 10. Dabei repräsentierten 20 % der Organismen 55 % der Bandenintensitäten.

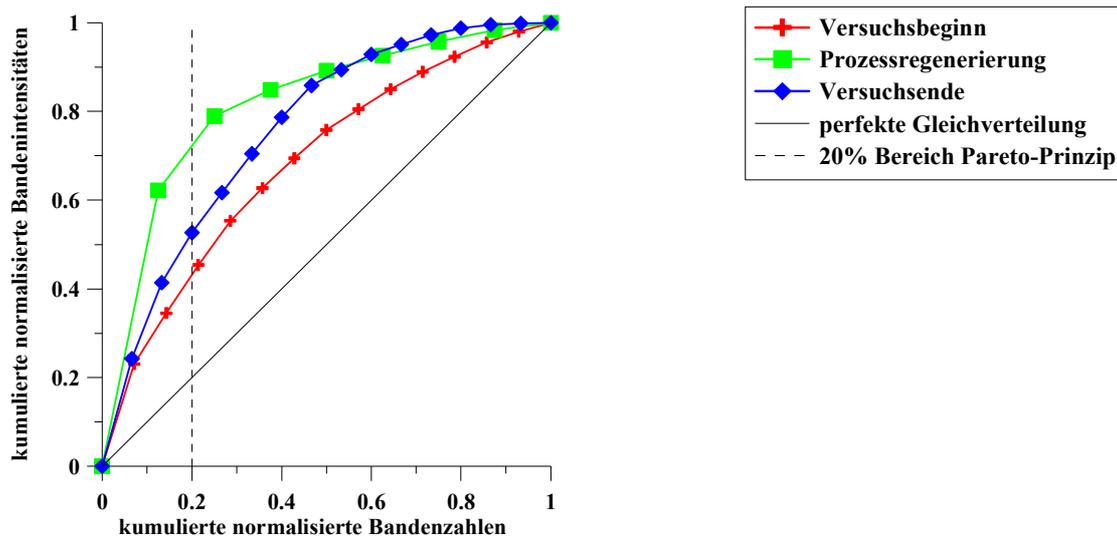


Abbildung 41: Pareto-Lorenz-Analyse der bakteriellen Biozönose während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid

Die Untersuchung der rPAO mittels spezifischer Primer zeigte, dass neben *Candidatus Accumilibacter phosphatis* und *Rhodocylus sp.* auch verschiedene *Dechloromonas* Arten im Gärrest dominant vertreten waren (Abbildung 42). Während des Versuchs wurden mit Hilfe des genetischen Fingerprintings keine Veränderungen, weder in der Zusammensetzung der rPAO-Gemeinschaft noch in der Abundanz einzelner Organismen, detektiert.

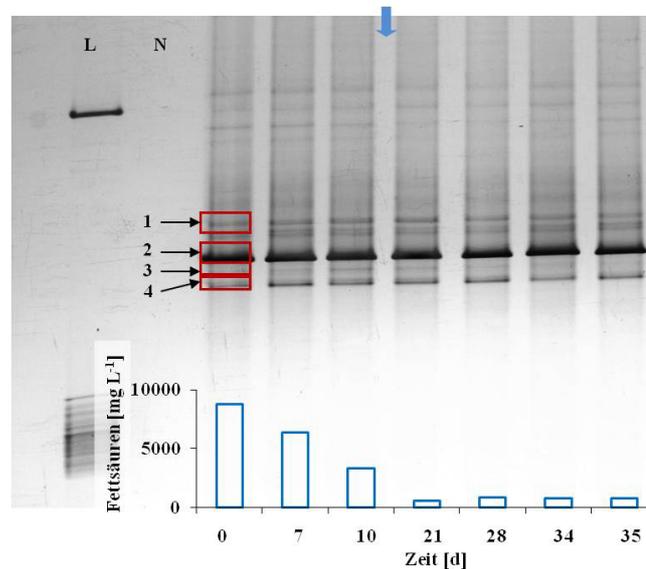
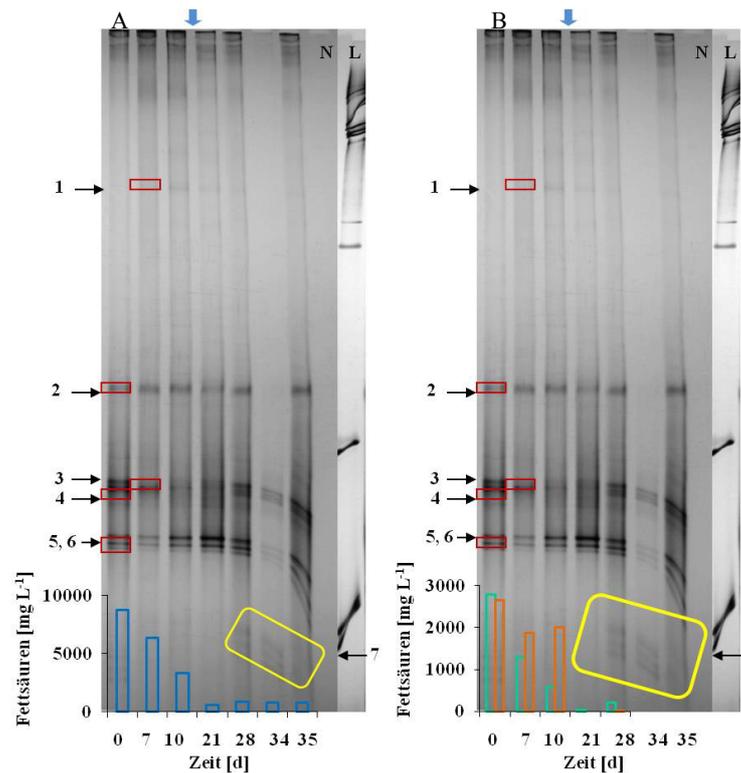


Abbildung 42: rPAO- spezifisches Fingerprinting im Vergleich zur Fettsäurekonzentration während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid. L: DNA-Leiter; N: Negativkontrolle; ↓ Start der Co-Substratdosierung mit Rapsöl; □ Fettsäurekonzentration; □ sequenzierte Banden

Tabelle 24: Zuordnung der sequenzierten Banden des rPAO-spezifischen Fingerprintings während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid.

Bande	Klasse	Familie	nächster phylogenetischer Verwandter (GenBank accession number)	Ähnlichkeit (%)
1	Rhodocyclaceae	Rhodocyclaceae	<i>Dechloromonas sp.</i> (AF288776.1)	98
2		Rhodocyclaceae	<i>Dechloromonas sp.</i> (DQ413167.1)	98
3		Rhodocyclaceae	<i>Rhodocylus sp.</i> (AJ224937.1)	97
4			<i>Candidatus Accumilibacter phosphatis clade IIA</i> (CP001715.1)	97



**Abbildung 43: Spezifisches Fingerprinting der methanogenen Archaeen im Vergleich (A) zur Fettsäurekonzentration und (B) zur Essigsäure- und Propionsäurekonzentration während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid. L: DNA-Leiter; N: Negativkontrolle; ↓ Start der Co-Substratdosierung mit Rapsöl; □ Fettsäurekonzentration; □ Essigsäurekonzentration; □ Propionsäurekonzentration; □ sequenzierte Bands; □ *Methanoculleus receptaculi*-ähnlicher Organismus**

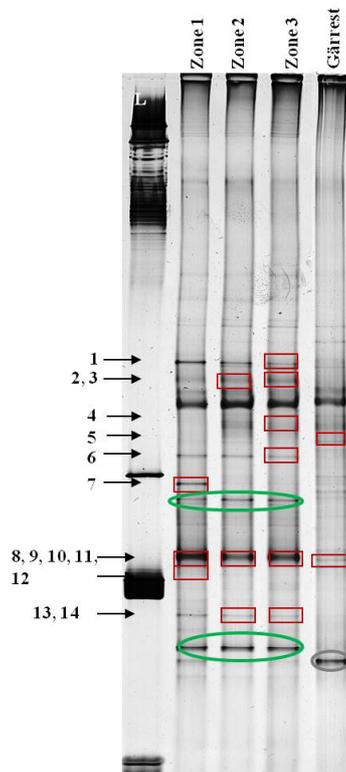
Die Zusammensetzung der archaeellen Biozönose des Gärrestes ist in Abbildung 43 dargestellt und die identifizierten Organismen sind in Tabelle 25 aufgelistet. Während der Prozessregenerierung veränderte sich das Fingerprintmuster nur geringfügig. Sowohl hydrogenotrophe (*Methanoculleus* sp.-ähnlich) als auch acetoklastische Archaeen (*Methanosaeta*-ähnlich, *Methanosarcina*-verwandt) wurden im Gärrest während des gesamten Versuchs nachgewiesen. Nach dem Start der Co-Substratdosierung änderte sich das Fingerprintprofil deutlich. Die Sequenz eines *Methanoculleus receptaculi*-ähnlichen Organismus (Bande 7; 99 %) wurde im Gärrest detektiert als die Fettsäurekonzentration unter  $600 \text{ mg L}^{-1}$  gesunken war (Abbildung 43 A). Die Abbildung 43 B zeigt deutlich, dass die gelb markierten Bands des *Methanoculleus receptaculi*-ähnlichen Organismus erst nach dem Sinken der Propionsäurekonzentration unter einen Wert von  $300 \text{ mg L}^{-1}$  im genetischen Fingerprinting sichtbar wurden.

**Tabelle 25: Zuordnung der sequenzierten Bands des spezifischen Fingerprintings für methanogene Archaeen während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid.**

Bande	Klasse	Familie	nächster phylogenetischer Verwandter	Ähnlichkeit (%)
1	<b>Methanomicrobia</b>	Methanosarcinaceae	Uncultured <i>Methanosarcina</i> sp. (AM418680.1)	91
2		Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta concilii</i> (DQ150255.1)	97
3		Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus thermophilus</i> (EF118906.1)	95
4		Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta concilii</i> (AB679168.1)	97
5		Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina thermophila</i> (JQ346758.1)	99
6		Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina mazei</i> (FJ155845.1)	98
7		Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus receptaculi</i> (NR_043961.1)	99

#### 5.2.2.4. *Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose der Pelletzonen*

Die genetische Fingerprintanalyse des **großen Pellets** zeigte im Hinblick auf die bakterielle Gemeinschaft geringe Unterschiede zwischen den Zonen 1 bis 3 (Abbildung 44). Die mikrobielle Biozönose des Pellets war bezüglich der dominierenden Vertreter ähnlich zusammengesetzt wie die bakterielle Biozönose des umgebenden Gärrestes. Auch hier dominierten die Vertreter der Klasse Clostridia (Tabelle 26).



**Abbildung 44: Bakterienspezifisches Fingerprinting der Pelletzonen im Vergleich zum Gärrest am Tag 7 während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid. L: DNA-Leiter; □ sequenzierte Banden; ○ Bereich von Interesse, nicht sequenziert, nur im Pellet; ○ nicht sequenziert, nur im Gärrest**

Die Abundanz der Bakterien veränderte sich innerhalb der Zonen und unterschied sich auch zum Gärrest, der als Vergleich herangezogen wurde. Auf Grund der stärksten Bandenintensität im genetischen Fingerprinting kann angenommen werden, dass Sequenzen verwandt mit einem Organismus aus der Familie Clostridiales Family XI. Incertae Sedis (Bande 1) die höchste Abundanz in der inneren Pelletzone (Zone 1) hatten. Ein weiterer Organismus, der in allen Pelletzonen, gleichmäßig verteilt, beobachtet wurde, wurde zur Gattung *Clostridium* (2 bzw. 3, ähnlich *Clostridium ultunense*) zugeordnet. Die dazugehörige Bande war im Gärrest sehr schwach. Auch Bande 6 war vor allem im Pellet in allen Zonen enthalten. Dieser zur Familie Thermoanaerobacterales Family III. Incertae Sedis gehörende Organismus war im Gärrest kaum vertreten. Des Weiteren hatten Organismen nah verwandt mit *Coprothermobacter proteolyticus* im Pellet eine höhere Abundanz als im umgebenden Gärrest. Ein zur Familie der Syntrophomonadaceae gehörender Organismus wurde im Inneren, nicht aber in den anderen Zonen, des Pellets nachgewiesen. Im Gärrest war dieser Organismus vertreten, zeigte dort aber eine sehr geringe Abundanz. Ein Organismus nah verwandt mit *Clostridium sp.* (Bande 4) wurde in der mittleren und der äußeren Pelletzone sowie im Gärrest beobachtet, nicht aber in der Mitte des Pellets. Es gab aber auch Organismen, die nur im Pellet detektiert wurden. Hierzu gehörten die zur Gattung *Anaerobaculum* gehörenden Banden 13 bzw. 14. Auffällig sind die im Fingerprinting grün markierten Banden. Sie wurden

nur im Pellet beobachtet. Im Gegensatz dazu steht der zu den Lachnospiraceae gehörende Organismus (Bande 5), der, ebenso wie die grau markierte Bande, nur im Gärrest detektiert wurde.

Weitere genetische Fingerprintings zeigten sehr deutlich, dass die Klasse der Clostridia die Pelletzonen dominierte; aber auch Vertreter der Klasse Actinobacteria wurden detektiert (Anhang D).

**Tabelle 26: Zuordnung der sequenzierten Banden des bakterienspezifischen Fingerprintings der Pelletzonen.**

Bande	Klasse	Familie	Nächster phylogenetischer Verwandter (GenBank accession number)	Ähnlichkeit (%)
1	Clostridia	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i> (GQ461827.1)	84
			Uncultured bacterium clone (KC621946.1)	84
2,3		Clostridiaceae	<i>Clostridium ultunense</i> (NR_026531.1)	96, 96
			Uncultured bacterium clone (GU320654.1)	99, 99
4		Clostridiaceae	<i>Clostridium</i> sp. (AB093546.1)	99
		Clostridiaceae	Uncultured <i>Clostridium</i> sp. (AB198871.1)	99
5		Lachnospiraceae	Lachnospiraceae bacterium (AF550610.1)	96, 92
			Uncultured bacterium (HQ453302.1)	99, 95
6		Thermoanaerobacterales Family III. Incertae Sedis	<i>Thermovenabulum ferriorganovorum</i> (NR_042719.1)	75
			Uncultured bacterium clone (JQ799940.1)	77
7	Syntrophomonadaceae	<i>Syntrophomonas</i> sp. (AB021306.1)	78	
		Uncultured bacterium (GQ138691.1)	79	
8, 9, 10, 11, 12	Thermodesulfobiaceae	<i>Coprothermobacter proteolyticus</i> (NR_074653.1)	100, 99, 100, 98, 95	
		Uncultured <i>Coprothermobacter</i> sp. (KF208636.1)	100, 99, 100, 95	
13, 14	Synergistia	Synergistaceae	<i>Anaerobaculum mobile</i> (NR_102954.1)	95, 93

Die Auswertung der Pareto-Lorenz-Analyse zeigte deutlich, dass sich die Gleichverteilung der bakteriellen Biozönose innerhalb der Pelletzonen voneinander unterschied (Abbildung 45). Im Kern des Pellets (Zone 1) repräsentierten 20 % der Mikroorganismen 49 % der Bandenintensitäten, in der Mitte (Zone 2) waren es 60 % und in der äußeren Zone (Zone 3) 55 %. Der Vergleich der bakteriellen Biozönose der Pelletzonen mit dem Gärrest zeigt, dass die „Evenness“ des Gärrestes mit einem Verhältnis von 20:71 deutlicher von der perfekten Gleichverteilung abwich.

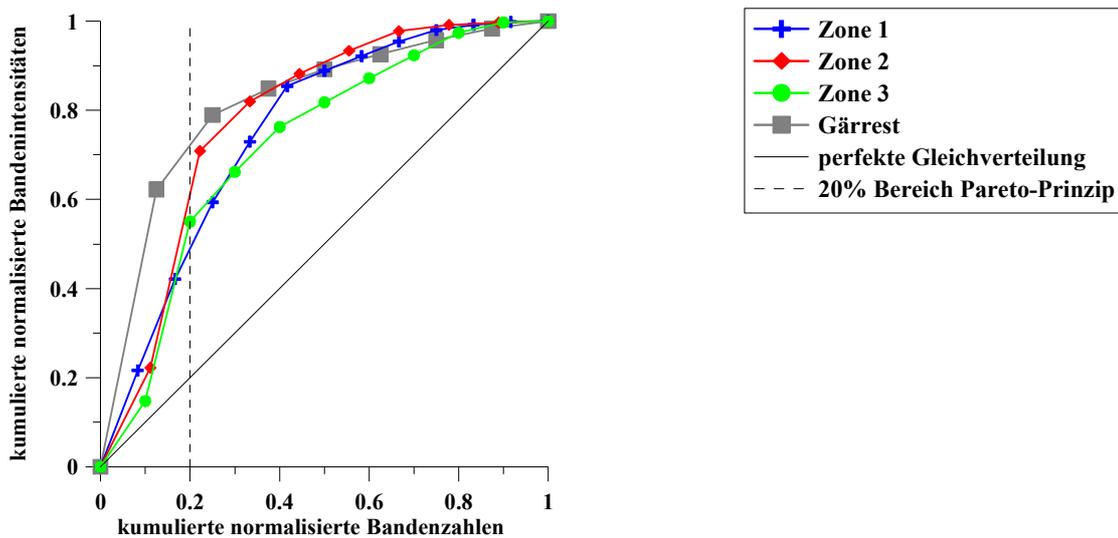


Abbildung 45: Pareto-Lorenz-Analyse der bakteriellen Biozönose der Pelletzonen im Vergleich zum Gärrest am Tag 7 während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid.

Mit Hilfe von spezifischen Primern wurden rPAO in allen Zonen des Pellets nachgewiesen. Die relative Quantifizierung mittels qPCR zeigte, dass die Abundanz an rPAO vom Kern (0,35) des Pellets zur Oberfläche (0,014) hin abnahm. Gleichzeitig wurde ersichtlich, dass im Pellet sehr viel weniger rPAO vorhanden waren als im umgebenden Gärrest (Abbildung 46).

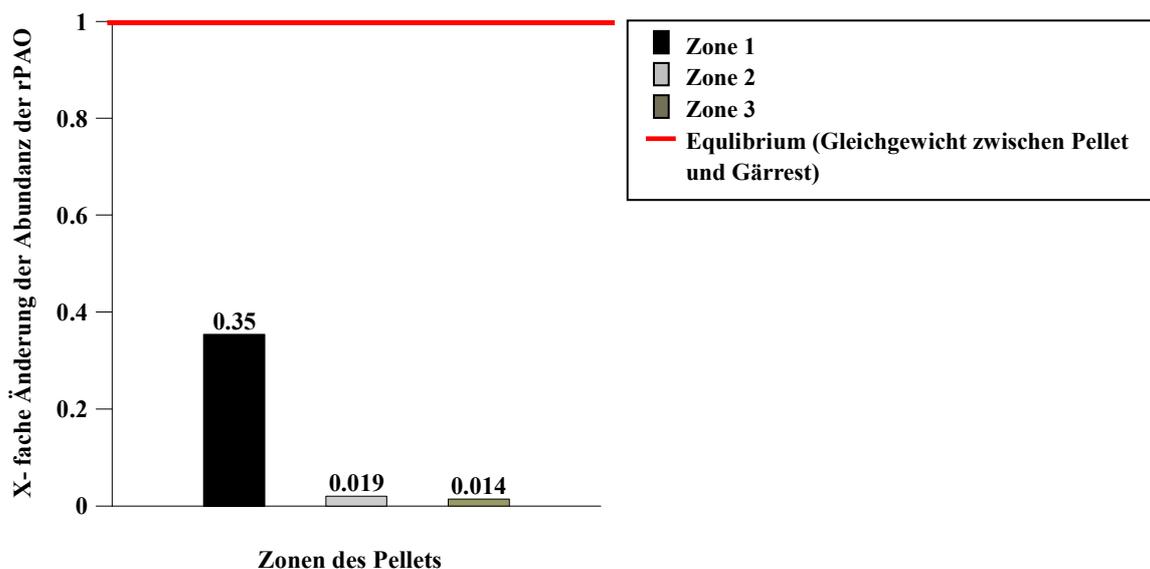


Abbildung 46: Relative Quantifizierung der rPAO der Pelletzonen mittels qPCR; Nachweis mit spezifischen Primern; Berechnung nach LIVAK (Livak und Schmittgen 2001).

Die Zusammensetzung der Biozönose der methanogenen Archaeen variierte nicht zwischen den Pelletzonen (Abbildung 47; Tabelle 27), lediglich die Abundanz einzelner Organismen wies Unterschiede auf. Sequenzen verwandt mit *Methanosaeta concilii* (Bande 2; 97%), *Methanosarcina thermophila* (Bande 5; 98%) und *Methanoculleus receptaculi* (Bande 6; 99%) wurden in allen Zonen des Pellets nachgewiesen. Einen Hinweis auf eine höhere Abundanz von *Methanosaeta concilii* in der äußeren Zone (Zone 3) des Pellets lieferten die höheren Bandenintensitäten. Die Abundanz von *Methanosarcina thermophila* und *Methanoculleus* war unverändert.

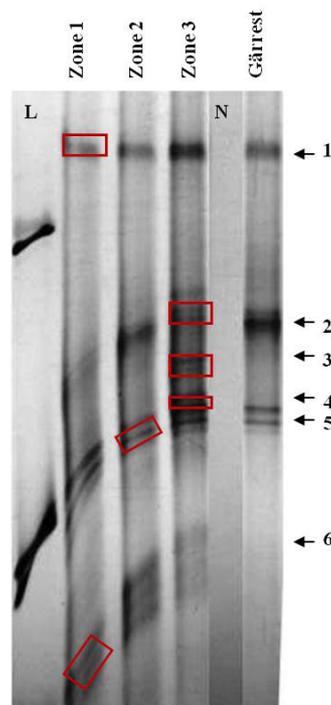


Abbildung 47: Spezifisches Fingerprinting der methanogenen Archaeen der Pelletzonen im Vergleich zum Gärrest am Tag 7 während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid. L: DNA-Leiter; N: Negativkontrolle;  sequenzierte Banden

Tabelle 27: Zuordnung der sequenzierten Banden des spezifischen Fingerprintings für methanogene Archaeen der Pelletzonen.

Bande	Klasse	Familie	Nächster phylogenetischer Verwandter (GenBank accession number)	Ähnlichkeit [%]
1	Methanomicrobia	Methanomicrobiaceae	<i>Methanomicrobiaceae archaeon</i> (GU129088.1)	93
2, 4		Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta concilii</i> (DQ150255.1)	97, 96
3			<i>Methanosaeta concilii</i> (JN243322.1)	96
5		Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina thermophila</i> (JQ346758.1)	98
6		Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus receptaculi</i> (NR_043961.1)	99

Die relative Quantifizierung der Archaeen zeigte, dass im Kern des Pellets 70 % mehr Archaeen vorhanden waren als im Gärrest. Im mittleren Bereich war die Abundanz um 60 % verringert. Zur Oberfläche hin stieg die Abundanz wieder an und war 10 % höher als im Gärrest (Abbildung 48).

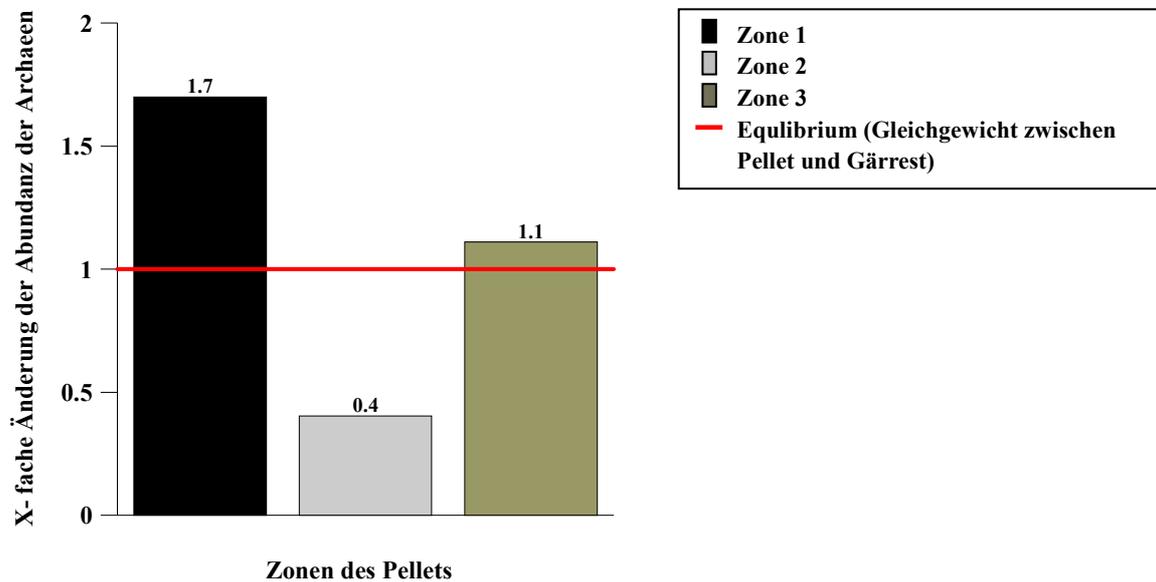


Abbildung 48: Relative Quantifizierung der Archaeen der Pelletzonen mittels qPCR; Nachweis allgemeinen Primern für Archaeen; Berechnung nach LIVAK (Livak und Schmittgen 2001).

## 6. Diskussion

Das industrielle Wachstum sowie die Zunahme der Bevölkerung und des Wohlstandes werden auch in den kommenden Jahren zu einem drastischen Anstieg des Energiebedarfs führen. Dabei werden auf Grund von hohen Subventionen fossile Brennstoffe wie Erdgas, Kohle und Erdöl weiterhin die führenden Energieträger sein. Eine langfristig stabile, effiziente und klimafreundliche Energieversorgung ist dringend notwendig, um den Klimawandel zu begrenzen und gleichzeitig Wachstum und Wohlstand zu fördern.

Laut BMWi (BMWi 2015) ist in Deutschland die Bioenergie bisher der flexibelste und wichtigste erneuerbare Energieträger, deren Nutzung weiterhin ausgebaut werden soll. Hier wird die Verwendung von biogenen Rest- und Abfallstoffen zukünftig in den Mittelpunkt gestellt werden.

Um Bioenergien wie Biogas als Energieträger effizient nutzen zu können, muss ein stabiler Biogasbildungsprozess gewährleistet werden. Das ist in der Praxis oft nicht einfach, da die beteiligten mikrobiellen Biozönosen empfindlich auf Veränderungen z. B. des pH-Wertes, der Temperatur und der Substratzusammensetzung reagieren können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden am Beispiel einer großtechnischen Biogasanlage mit zwei parallel betriebenen Reaktoren und begleitenden Laborexperimenten die Effekte von Prozessstörungen und nachfolgenden Regenerierungsmaßnahmen auf die mikrobiellen Gemeinschaften untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei die Analyse der Biozönosen bei Normalbetrieb, Prozessstörung und Prozessstabilisierung. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Funktion der Pellets, die während der Prozessregenerierung mit CaO gebildet wurden.

### 6.1. Prozessstörung und Maßnahmen zur Regenerierung in den großtechnischen Biogasreaktoren

Die **Prozessstörung** in den beiden **großtechnischen Biogasreaktoren** wurde durch eine um 76 % (R1) bzw. 86 % (R2) verminderte Gasbildungsrate, einen niedrigen pH-Wert und eine stark erhöhte Gesamtsäurekonzentration angezeigt. Die qualitative Analyse des Klärschlammes durch den Betreiber wies zu dieser Zeit eine erhöhte Kresolkonzentration nach. Diese führte vermutlich auf Grund ihrer toxischen Wirkung auf die mikrobielle Biozönose zu einer Störung des Gleichgewichtes von Fettsäureproduktion und Fettsäureabbau. In Folge dessen reicherten sich Fettsäuren an, der pH-Wert sank und die Gasbildungsrate verringerte sich. Auf Grund der im Durchschnitt um mehr als 80 % verminderten Gasproduktion wurden unterschiedliche Maßnahmen zur Prozessregenerierung durchgeführt. Zunächst wurde die Raumbelastung um 50 % gesenkt, indem die Zufuhr von Co-Substrat reduziert wurde. Dadurch stand den hydrolytischen Mikroorganismen weniger organisches Substrat zur Verfügung, das zu Säuren verstoffwechselt werden konnte. Zusätzlich führte die Verdünnung der entstandenen Fettsäuren durch die kontinuierliche Dosierung von Klärschlamm (60 % Primärschlamm, 40 % eingedickter Überschussschlamm) und der Abzug des Gärrestes zu einer Verminderung der Säurekonzentration. Im Zuge der Regenerierung zeigte sich, dass die Senkung der Raumbelastung für den **Reaktor R1** ausreichend war, um den Prozess der Biogasbildung zu stabilisieren. Sowohl die Gesamtsäurekonzentration als auch die Propionsäurekonzentration lagen 30 Tage nach Senkung der

Raumbelastung unterhalb von  $400 \text{ mg L}^{-1}$  (Fettsäuren gesamt) bzw.  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (Propionsäure) und die Gasbildungsrate betrug wieder durchschnittlich  $2,0 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Dies zeigte an, dass der Abbau des organischen Substrates wieder ungehindert ablief. Nach der Prozessregenerierung war der Biogasbildungsprozess langfristig stabil und die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose war ähnlich wie vor der Störung (Vergleich Abschnitt 6.2).

Die Senkung der Raumbelastung führte zwar beim **Reaktor R2** auch zu einer Verringerung der Säurekonzentration um 50 %. Diese war in erster Linie auf die Abnahme der Essigsäurekonzentration zurückzuführen. Für eine langfristige Stabilisierung des pH-Wertes und der Biogasbildung war diese Maßnahme allein nicht ausreichend, da die Propionsäurekonzentration nicht sank und sogar noch zunahm. Um den pH-Wert anzuheben, wurde NaOH mit dem Substrat zugeführt. Trotz des kurzfristigen Anstiegs des pH-Wertes über 7, verschlechterte sich das Essigsäure-Propionsäure-Verhältnis weiter und verschob sich in Richtung der Propionsäure. Auf Grund des Anstiegs der Propionsäure, wahrscheinlich die Ursache für die langanhaltende Hemmung der acetogenen und methanogenen Mikroorganismen, sank mit der Co-Substratzufuhr der pH-Wert erneut ab. Studien von Barredo und Evison (1991) und Hajarnis und Ranade (1994) belegen, dass die Anreicherung von Propionsäure sowohl das Wachstum als auch die Aktivität und die Diversität von methanogenen Organismen durch die Senkung des pH-Wertes negativ beeinflusst, da diese auf pH-Änderungen empfindlicher reagieren als säurebildende Bakterien. Die Hemmung wird durch einen niedrigen pH-Wert weiter verstärkt, da die Propionsäure dann vor allem in ihrer undissoziierten Form vorliegt und somit eine Diffusion durch die mikrobielle Zellmembran möglich ist (Fukuzaki *et al.* 1990; Nanba *et al.* 1983). Dementsprechend erfolgt die Umsetzung der Propionsäure im neutralen Milieu schneller als im sauren, so dass ein niedriger pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf den Propionsäuremetabolismus hat (Dhaked *et al.* 2003; Mösche und Jördening 1999). Da die Konzentration der Propionsäure nicht abnahm, obwohl der pH-Wert durch die Dosierung von NaOH eine Woche lang über einem Wert von 7 lag, müssen weitere Faktoren die Prozessstabilität beeinflusst haben.

Erst die Zugabe von CaO zur Anhebung des pH-Wertes führte im Reaktor R2 auf Grund der Bildung von Pellets (Kapitel 6.4) zu einer langfristigen Senkung der Propionsäurekonzentration. In Folge der Dosierung stabilisierte sich der pH-Wert in einem Bereich um 7,5 und die Gasbildungsrate stieg auf durchschnittlich  $1,8 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

Die Unterschiede der beiden Biogasreaktoren bezüglich der Regenerierung waren sehr wahrscheinlich auf eine **unterschiedlich starke Schädigung der mikrobiellen Biozönosen** zurückzuführen, wofür mehrere Ursachen in Frage kommen.

Eine Ursache ist die *Zufuhr unterschiedlicher Substratmengen* durch alternierende Beschickung mit Substraten und das Auftreten von Kurzschlussströmen. Bauartbedingt sind Kurzschlussströme in den beiden Biogasreaktoren möglich. Die Leitungen für die Substratdosierung und den Gärrestabzug liegen ca. 3 m auseinander. Da das Gär Schlammvolumen füllstandsreguliert ist, ist es möglich, dass das frische Substrat sofort nach der Zugabe abgezogen wurde, wenn der Gaslift zu diesem Zeitpunkt nicht in Betrieb war. Kleyböcker *et al.* (2014) haben nachgewiesen, dass in diesen großtechnischen Reaktoren Kurzschlussströme auftreten und bis zu 70 % des frischen Substrates ausgetragen werden können.

Der **Reaktor R1** könnte daher durch einen geringeren Kresoleintrag belastet gewesen sein als Reaktor R2. Auf Grund von differierenden Konzentrationen könnte die vorhandene Biozönose nicht gleichermaßen gestört worden sein. Dadurch war die toxische Wirkung auf die Biozönose im R1 weniger

stark ausgeprägt. Die höhere Verdünnung und/oder die Auswaschung des Kresols durch Kurzschlussströme führten vermutlich zu einem geringeren Anstieg der Fettsäurekonzentration. Damit verbunden war eine schwächere Hemmung der methanogenen Organismen, wodurch eine schnelle Prozessrerholung und wieder einsetzende Biogasbildung in diesem Reaktor möglich war. Der **Reaktor R2** hingegen wurde wahrscheinlich mit einer höheren Konzentration an Kresolen belastet. Dies führte zu einer Hemmung der Mikroorganismen und in Folge dessen zu einem Anstieg der Fettsäuren.

Da die Kresolkonzentration nur in einer Klärschlammprobe bestimmt wurde und nicht im Gärrest der einzelnen Biogasreaktoren, kann diese Vermutung nicht verifiziert werden. Es ist aber anzunehmen, dass die im Gärrest vorhandenen Kresole nach 80 Tagen, die etwa fünf hydraulischen Verweilzeiten entsprechen, fast vollständig ausgewaschen wurden und somit zu diesem Zeitpunkt nicht mehr für die Störung ursächlich waren. Die langanhaltende Hemmung der Biogasbildung im stark übersäuerten Reaktor (R2) muss daher auch durch andere Faktoren bedingt worden sein. Als das Kresol theoretisch bereits ausgewaschen war, lag die Konzentration der Propionsäure bei  $1697 \text{ mg L}^{-1}$  und war 77-mal höher als bei ungestörter Betriebsweise. Dies war vermutlich entscheidend für die langanhaltende Störung in diesem Biogasreaktor.

Eine weitere Ursache für die unterschiedlich starke Schädigung der Biozöten könnte die *Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft* sein. Vor der Prozessstörung ähnelten sich die Bandenmuster im genetischen Fingerprinting der Gärreste beider Biogasreaktoren im Bezug auf die Zusammensetzung, aber nicht bezüglich der Gleichverteilung (Evenness). Hier unterschieden sie sich bereits vor der Prozessstörung deutlich voneinander. Dies ist ein klarer Hinweis auf eine unterschiedliche Vorgeschichte bezüglich der Beschickung beider Reaktoren. Es ist möglich, dass sich die Biozönose des stabileren Reaktors (R1) durch eine vorherige Dosierung von Co-Substraten mit einer hohen Fettsäurekonzentration bereits an höhere VFA-Konzentrationen anpassen konnte. Die Geschichte von Biogasreaktoren ist von großem Interesse, denn laut Stroot *et al.* (2001) sind Reaktoren mit einer instabilen Vorgeschichte resistenter gegenüber kurzzeitigen Substratüberfrachtungen. Anhaltende Instabilitäten führen demnach zu einer Adaptation der Biozönose an solche schwankenden Umweltbedingungen. McMahon *et al.* (2004) leiten davon ab, dass die Geschichte eines Reaktors ein guter Prädiktor für die Leistungsfähigkeit des Reaktors während einer Substratüberfrachtung ist. Es ist deshalb möglich, dass die mikrobielle Gemeinschaft von Reaktor R1 auf Grund seiner Vorgeschichte eine höhere Stressresistenz aufwies.

## 6.2. Charakterisierung der Biozöten bei Normalbetrieb

In den beiden thermophilen, parallel betriebenen Reaktoren der **großtechnischen Biogasanlage** lagen vor Eintritt der Prozessstörung die Werte für pH, Gasbildung und Fettsäuren in einem für diese Anlage typischen Bereich.

Eine Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft beider Biogasreaktoren zeigte während des gesamten Beobachtungszeitraumes eine für solche Anlagen charakteristische Biozönose.

Vor Eintritt der Prozessstörung dominierte in beiden Reaktoren aus dem Reich der **Bakterien** die Klasse der Clostridia. Sie wird häufig in Biogasanlagen nachgewiesen und ist dafür bekannt, komplexe organische Verbindungen abzubauen (Shiratori *et al.* 2006; Sizova *et al.* 2011). Weiterhin wurden

Vertreter der Klassen Actinobacteria, Synergistia, Thermotogae, Anaerolineae und Bacteroidia sowie die Ordnung der Rhodocyclales (rPAO) in den Gärresten detektiert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Ritari *et al.* (2012). Ihre Studie zeigt ebenfalls eine Dominanz der Stämme Bacteroidetes, Firmicutes und Thermotogae. Während der Stamm der Thermotogae ausschließlich in den Gärresten thermophiler Anlagen detektiert wird, wird die Klasse der Clostridia (Stamm Firmicutes) auch in mesophilen Anlagen nachgewiesen.

Viele Banden der bakterienspezifischen Fingerprintings konnten keiner bereits kultivierten Art zugeordnet werden. Häufig waren sie eng verwandt mit unkultivierten Klonen aus ähnlichen Habitaten, die z. B. aus Gärresten von mesophilen (Krakat *et al.* 2011) und thermophilen Biogasanlagen (Weiss *et al.* 2009), ebenso wie aus tierischen Verdauungstrakten (Arias-Cordero *et al.* 2012; Kong *et al.* 2010) und Abwasserbehandlungsanlagen (Oshiki *et al.* 2009) isoliert wurden.

Aus dem Reich der **Archaeen** dominierten im Reaktor R1 Verwandte von *Methanosaeta concilii* die Biozönose. Aber auch *Methanoculleus receptaculi*- und *Methanosarcina thermophila*- ähnliche Organismen wurden nachgewiesen. Im Reaktor R2 wurden als dominante Vertreter Verwandte von *Methanosaeta concilii*, *Methanospirillum sp.*, *Methanoculleus receptaculi* und *Methanosarcina thermophila* identifiziert. Der Nachweis einer diversen Gemeinschaft aus hydrogenotrophen und acetoklastischen Archaeen zeigt deutlich, dass auf Grund der geringen Säurekonzentration von durchschnittlich 600 mg L<sup>-1</sup> keine Hemmung der Mikroorganismen vorlag und die Methanbildung ungehindert ablief.

Im **Labor** wurden die Effekte der Prozessregenerierung mit CaO, die in den Gärresten der großtechnischen Reaktoren beobachtet wurden, nachgestellt. Die Reaktoren im Labor wurden ebenfalls thermophil betrieben, hatten eine ähnliche Verweilzeit und das gleiche Substrat (Klärschlamm). Das Anfahren der Laborreaktoren erfolgte mit Gärrest aus der großtechnischen Anlage. Dem entsprechend unterschied sich die mikrobielle Biozönose in den Laborreaktoren vor der Prozessstörung nur minimal von der Biozönose der großtechnischen Biogasreaktoren. Diese Unterschiede können auf eine unterschiedliche Vorgeschichte zurückgeführt werden. Diese wird u. a. bedingt durch Substratzusammensetzung, Substratzufuhr, Durchmischung und auftretende Temperaturschwankungen. Aus Gründen der Energieeffizienz entstehen in den großtechnischen Reaktoren Temperaturschwankungen, da im Sommer die Überschusswärme genutzt wird und die Vergärung bei einer durchschnittlich um 5° C höheren Temperatur abläuft als im Winter. Diese Schwankungen wurden im Labor nicht nachgebildet, können aber dazu geführt haben, dass sich eine andere Biozönose etablierte. Des Weiteren wurden die Laborreaktoren über ein Jahr hinweg stabil betrieben, bevor sie für die Untersuchungen genutzt wurden. In der großtechnischen Anlage hingegen kommt es u. a. bedingt durch wechselnde Substrate zu häufigen Schwankungen der Substratqualität. Während den Laborreaktoren als Co-Substrat nur Rapsöl zugesetzt wurde, wurden die großtechnischen Reaktoren mit wechselnden Co-Substraten beschickt. In der großtechnischen Anlage wird der Reaktorinhalt durch Gaseinpressung kontinuierlich durchmischt. Zusätzlich wird der Gärrest alle zwei Stunden für eine Stunde durch Umpumpen des Schlamms umgewälzt. Im Gegensatz dazu erfolgte die Durchmischung des Gärrestes in den Laborreaktoren zwei Mal täglich für jeweils 15 Minuten. Lienen *et al.* (2013) zeigen in ihren Studien, dass die Rührintervalle (Durchmischung) die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose

beeinflussen. Dabei wirken sich vor allem geringe Rührintensitäten positiv auf die Stabilität des Biogasprozesses aus.

Wie bereits in den Gärresten der großtechnischen Anlage beobachtet, gehörten aus dem Reich der **Bakterien** die Clostridia zur vorherrschenden Klasse. Die Klassen Negativicutes und Sphingobacteria wurden ausschließlich in den Laborreaktoren detektiert. Auch im Hinblick auf die Familien innerhalb der Klasse der Clostridia wurden Unterschiede festgestellt, da auch die Familie Thermoanaerobacterales Family III. Incertae Sedis nur in den Gärresten der Laborreaktoren nachgewiesen wurde.

Wie bei der großtechnischen Anlage wurden aus dem Reich der **Archaeen** Verwandte von *Methanosarcina thermophila*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosaeta concilii* und *Methanoculleus thermophilus* im Laborreaktor nachgewiesen. Die Gattungen *Methanospirillum* und *Methanobacterium* hingegen wurden nicht detektiert.

### 6.3. Charakterisierung der Biozöosen bei Prozessstörung und Prozessstabilisierung

#### 6.3.1. Veränderungen der Biozöosen der großtechnischen Reaktoren

Während die Zusammensetzung der **bakteriellen Biozönose** im Verlauf der Prozessstörung und – regenerierung im leicht übersäuerten Reaktor (R1) unverändert blieb, änderte sie sich im stark übersäuerten Reaktor (R2) sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in der Abundanz einzelner Organismen.

Im leicht übersäuerten Reaktor (**R1**) wurde u. a. ein zur Familie Clostridiales Family XI. Incertae Sedis gehörender Organismus bereits vor dem Kresoleintrag nachgewiesen, dessen Abundanz während der Prozessstörung und -regenerierung zunahm. Dieses Bakterium hatte einen Selektionsvorteil, da es scheinbar weder durch den Kresoleintrag noch durch die erhöhte Säurekonzentration und den niedrigeren pH-Wert inhibiert wurde. Ein weiterer Organismus, der während der gesamten Untersuchung detektiert wurde, war ein mit *Gracilibacter*-verwandter Organismus. Während seine Abundanz im Reaktor R1 unverändert blieb, nahm sie vermutlich auf Grund der hohen Fettsäurekonzentration im Reaktor R2 ab.

Weiterhin wurden im stark übersäuerten Reaktor (**R2**) Organismen nachgewiesen, die zur Familie der Thermodesulfobiaceae bzw. Familie der Thermotogaceae zugeordnet wurden und bereits vor dem Auftreten der Störung detektiert wurden. Die zunehmende Abundanz während der Störung deutet darauf hin, dass diese Organismen bei hoher Säurekonzentration und niedrigem pH-Wert einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen hatten.

Der Familie Thermodesulfobiaceae wird u. a. die Gattung *Coprothermobacter* zugeordnet. Diese kann Essigsäure, Propionsäure, Wasserstoff und Kohlendioxid bilden. Bisher wurden für diese Gattung zwei Arten beschrieben, die pH-Werte um 5,0 tolerieren (Etchebere *et al.* 1998; Ollivier *et al.* 1985). Es ist anzunehmen, dass auf Grund der Wasserstoffbildung die Gattung *Coprothermobacter* von syntroph lebenden wasserstoffzehrenden Organismen, wie hydrogenotrophen Archaeen, profitierte. Diese Annahme wird durch die Studie von Sasaki *et al.* (2011) unterstützt, die den Abbau von Proteinen durch *Methanothermobacter thermautotrophicus* und *Coprothermobacter proteolyticus* untersuchten. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass diese proteolytischen Bakterien die syntrophe Lebensweise bevorzugen.

In den genetischen Fingerprintings wurden in beiden Reaktoren rPAO nur mit Hilfe von spezifischen Primern nachgewiesen. Das bedeutet, dass diese Organismen in geringer Abundanz in den Gärresten vorhanden waren. Auf Grund der relativ gleichbleibenden Abundanz während der gesamten Untersuchung liegt die Vermutung nahe, dass die rPAO nur mit den Substraten zugeführt wurden. Die tägliche Zugabe von Klärschlamm bzw. Entnahme von Gärrest führte dazu, dass sich ein Gleichgewicht zwischen abgezogenen und neu zugegebenen rPAO einstellte. Da rPAO einen Wechsel zwischen aerobem und anaerobem Milieu für das Zellwachstum benötigen (Mino *et al.* 1998), findet bei gleichbleibenden anaeroben Bedingungen kein Wachstum statt. Das hat in den kontinuierlich durchflossenen Reaktoren die Auswaschung dieser Organismen zur Folge. Würden rPAO nicht kontinuierlich in das System eingetragen werden, könnten sie nicht im genetischen Fingerprinting nachgewiesen werden.

Die hohen Fettsäurekonzentrationen in den Reaktoren begünstigten die Phosphatrücklösung und die gleichzeitige Aufnahme von kurzkettigen Fettsäuren, wodurch deren Konzentration gesenkt wurde. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass rPAO, obwohl sie in den Reaktoren nicht wuchsen, das System beeinflussten und die Prozessregenerierung unterstützten.

Die Pareto-Lorenz-Analysen der genetischen Fingerprintingmuster zeigten bereits vor der Prozessstörung unterschiedliche Verhältnisse bezüglich der Gleichverteilung (Evenness) der bakteriellen Biozönose in den beiden Reaktoren. Im **Reaktor R1** repräsentierten 20 % der Organismen 55 % der Bandenintensitäten (20:55). Im **Reaktor R2** lag das Verhältnis bei 20:70. Das belegt, dass in diesem Reaktor weniger Organismen die Biozönose dominierten. Untersuchungen von Wittebolle *et al.* (2009) zeigen, dass die ursprüngliche Gleichverteilung „Evenness“ die Stabilität eines Ökosystems stärker beeinflusst als die Zahl der Organismen selbst. Eine Biozönose, in der unterschiedliche Organismen eine ähnliche Funktion übernehmen, führt während Umweltveränderungen zu einer höheren funktionellen Stabilität und demzufolge zu einer belastbareren Biozönose. Das könnte dazu beigetragen haben, dass die Organismen in den Gärresten beider Reaktoren im Zuge der Prozessstörung unterschiedlich stressresistent waren. Im Vergleich zum Reaktor R2 war die ursprüngliche „Evenness“ Reaktor R1 deutlich gleichmäßiger und es waren mehr Organismen dominant an der Biozönose beteiligt. So konnten Veränderungen des Milieus, die z. B. durch die Intoxikation durch Kresole oder auch wechselnde Substratzusammensetzungen hervorgerufen wurden, besser toleriert werden.

In Folge der Prozessstörung veränderte sich die Zusammensetzung **der methanogenen Lebensgemeinschaft** in den Gärresten beider Reaktoren und es zeigten sich Unterschiede im genetischen Fingerprintmuster. Im Gegensatz zum Normalbetrieb wurde im leicht übersäuerten Reaktor (**R1**) das acetoklastische Archaeon *Methanosaeta concilii* während der Störung nicht detektiert. Verwandte von *Methanoculleus receptaculi* und *Methanosarcina thermophila* hingegen wurden mit einer schwachen Abundanz nachgewiesen. Im stark übersäuerten Reaktor (**R2**) dominierten während der Prozessstörung hydrogenotrophe Archaeen, wie Verwandte von *Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus receptaculi* und *Methanospirillum* sp. Diese Organismen wurden anscheinend nicht durch die hohen Essigsäurekonzentrationen inhibiert. Im Gegensatz dazu wurden Verwandte von *Methanoculleus receptaculi* und *Methanosarcina thermophila* während der Störung nur in sehr geringer Abundanz detektiert. Einige Studien belegen, dass vor allem die acetoklastischen Archaeen wie die Gattung *Methanosaeta* durch LCFA wie z. B. Ölsäure gehemmt werden, während hydrogenotrophe Archaeen

weniger stark beeinflusst werden (Koster und Cramer 1987; Lalman und Bagley 2000, 2001, 2002; Lerm *et al.* 2012).

Die Inhibierung der Methanogenese führte in beiden Reaktoren der Biogasanlage zu einem Anstieg der Fettsäurekonzentration. Auf Grund der Hemmung wurde zunächst u. a. Wasserstoff und Essigsäure nicht mehr verwertet. In Folge des steigenden Wasserstoffpartialdrucks wurden die syntrophen Wasserstoffproduzenten inhibiert. Dadurch wurde die Propionsäure nicht umgesetzt und reicherte sich im Gärrest an. Die steigende Konzentration an Essigsäure beeinflusste den Propionsäureabbau zusätzlich, da nur bei niedrigen Essigsäurekonzentrationen ( $<600 \text{ mg L}^{-1}$ ) die Propionsäure effektiv umgesetzt werden kann (Ahring und Westermann 1988; Beaty und McInerney 1989; Dong *et al.* 1994). Durch die Senkung der Raumbelastung und die Verdünnung der entstandenen Fettsäuren durch die kontinuierliche Dosierung von Klärschlamm und den Abzug des Gärrestes nahm die Gesamtsäurekonzentration in beiden Biogasreaktoren ab. Während im leicht übersäuerten Reaktor (R1) die Konzentration aller Säuren sank, war die Abnahme im stark übersäuerten Reaktor (R2) vor allem auf die Senkung der Essigsäurekonzentration zurückzuführen. Die Zunahme der Propionsäurekonzentration in Folge der steigenden Raumbelastung beim Anfahren des Biogasreaktors (R2) zeigte deutlich die weiterhin bestehende Inhibierung der syntrophen LCFA-abbauenden Mikroorganismen an.

Während der **Regenerierung** des nur leicht übersäuerten Reaktors (**R1**) änderte sich das Fingerprintmuster und die Abundanz naher Verwandter von *Methanosaeta concilii*, *Methanoculleus receptaculi* und *Methanosarcina thermophila* verstärkte sich. Wie bereits vor der Störung dominierten Verwandte der Art *Methanosaeta concilii* die methanogene Biozönose und zeigten u. a. die Anpassung an günstigere Bedingungen (niedrige Fettsäurekonzentrationen) an.

Anders als im R1 wurden im stark übersäuerten Reaktor (**R2**) erst im Zuge der langwierigen Prozessregenerierung Verwandte von *Methanosarcina thermophila* zur vorherrschenden Art. Sowohl die hohe Propionsäurekonzentration als auch die schwankende Essigsäurekonzentration hatten einen großen Einfluss auf die Dominanz der Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta* innerhalb der methanogenen Biozönose im Reaktor R2. Dies wird durch die Ergebnisse von Demirel und Scherer (2008), Huser *et al.* (1982), Jetten *et al.* (1992), Karakashev *et al.* (2005), Smith und Ingram-Smith (2007) und Smith und Mah (1978) bestätigt, in deren Studien sich die Zusammensetzung der methanogenen Biozönose auf Grund von unterschiedlichen Essigsäurekonzentrationen verändert. Bei niedrigen Konzentrationen ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ , (Kämpfer und Weiffenfels 2001) und gleichmäßigem Konzentrationsverlauf dominiert die Gattung *Methanosaeta* den Gärrest (Hoffmann *et al.* 2008; Jetten *et al.* 1992; McMahon *et al.* 2001). Bei hohen Essigsäurekonzentrationen ( $3000 \text{ mg L}^{-1}$ , (Kämpfer und Weiffenfels 2001) und schwankendem Konzentrationsverlauf hingegen dominiert die Gattung *Methanosarcina* (Conklin *et al.* 2006). Beide Gattungen sind acetoklastische Methanogene<sup>10</sup>, bilden aus Essigsäure Methan und konkurrieren daher um dieses Substrat. Bei niedrigen Konzentrationen hat die Gattung *Methanosaeta* auf Grund der höheren Substrataffinität ( $K_s = 0,5 \text{ mM}$ ) einen Selektionsvorteil (Zehnder *et al.* 1980). Obwohl die Gattung *Methanosarcina* eine niedrigere Substrataffinität ( $K_s = 3-5 \text{ mM}$  (Smith und Mah 1978)) aufweist, hat sie bei einem Anstieg der Essigsäurekonzentration, auf Grund der höheren Säuretoleranz, einen selektiven Vorteil gegenüber der Gattung *Methanosaeta*, die eine geringere Säuretoleranz aufweist. Das wird durch

---

<sup>10</sup> *Methanosaeta*: obligat acetoklastisch; *Methanosarcina*: fakultativ acetoklastisch

Untersuchungen von Conklin *et al.* (2006) und Lerm *et al.* (2012) bestätigt. Diese Studien zeigen, dass die Gattung *Methanosarcina* Stoßbelastungen besser abbaut als die Gattung *Methanosaeta*.

Die höhere Säuretoleranz und das vielseitige Substratspektrum der Gattung *Methanosarcina* haben vermutlich dazu beigetragen, dass diese Gattung in allen untersuchten Proben beider Reaktoren nachgewiesen wurde. Infolge dieser Flexibilität auf veränderte Umweltbedingungen trägt die Gattung *Methanosarcina* zu einem stabilen Biogasbildungsprozess bei (Kleyböcker *et al.* 2014).

### 6.3.2. Veränderungen der Biozöosen der Laborreaktoren

Der Prozess der Biogasbildung wurde in den zwei parallel betriebenen **Laborreaktoren** gezielt durch eine Substratüberfrachtung gestört. Das führte zu einem Anstieg der Fettsäurekonzentration und der Hemmung der mikrobiellen Biozönose. Obwohl die Zugabe sowohl von NaOH als auch von CaO zu einer Anhebung des pH-Wertes führte, wirkte sich nur CaO langfristig stabilisierend auf die Prozessregenerierung aus. Dieser Effekt wurde bereits an der großtechnischen Anlage (im Anschluss an die Inhibierung durch Kresol) beobachtet und konnte im Labor erfolgreich nachgestellt werden. Schon mit der ersten Dosierung von CaO nahm die Fettsäurekonzentration ab, obwohl der pH-Wert zu diesem Zeitpunkt noch im sauren Milieu lag. Auf Grund der Bildung von Pellets (Kapitel 6.4), in und auf denen sich Mikrohabitate bildeten, lief der Biogasbildungsprozess nach der letzten CaO-Dosierung wieder störungsfrei ab, obwohl die Fettsäurekonzentration über 3000 mg L<sup>-1</sup> lag.

Mit Hilfe der molekularbiologischen Analyse des Gärrestes wurde sowohl während der Prozessstörung als auch der Prozessregenerierung mit CaO eine diverse **bakterielle Gemeinschaft** nachgewiesen. Wie bei der großtechnischen Biogasanlage bestand die Biozönose vor allem aus Vertretern der Klasse Clostridia. Des Weiteren wurden Vertreter der Klassen Negativicutes, Sphingobacteria und Actinobacteria sowie die Ordnung der Rhodocyclales detektiert. Im Hinblick auf die Klasse der Clostridia wurden die Familien Clostridiales Family XI. Incertae Sedis, Clostridiaceae, Peptococcaceae, Lachnospiraceae und Thermodesulfobiaceae in den Gärresten der großtechnischen Reaktoren und den Laborreaktoren detektiert, die Familien Clostridiales Family XVIII. Incertae Sedis, Ruminococcaceae und Gracilibacteraceae nur in den großtechnischen Reaktoren und die Familien Thermoanaerobacterales Family III. Incertae Sedis, Syntrophomonadaceae und Thermoanaerobacteraceae nur in den Laborreaktoren. Wie bereits in Abschnitt 6.2 diskutiert können u. a. die Zufuhr unterschiedlicher Co-Substrate und die Durchmischung ursächlich für diese Unterschiede sein.

Innerhalb der Klasse der Clostridia wurden u. a. Organismen der Familien Clostridiaceae und Syntrophomonadaceae nachgewiesen, von denen bekannt ist, dass sie LCFA-abbauende Gemeinschaften dominieren (Sousa *et al.* 2008; Sousa und Pereira 2007). In der Familie Syntrophomonadaceae ist vor allem die Gattung *Syntrophomonas* für den Abbau von LCFA in Biogasreaktoren bekannt (Hatamoto *et al.* 2007; Sousa *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2004). *Syntrophomonas wolfei* z. B. kann neben gesättigten Fettsäuren mit 4 bis 8 C-Atomen auch Buttersäure und Propionsäure verstoffwechseln (McInerney *et al.* 1981a). Der entstehende Wasserstoff kann unter anderem von der Gattung *Methanosarcina* aufgenommen werden (McInerney *et al.* 1981b). Aber auch andere hydrogenotrophe Archaeen wie z. B. Vertreter der detektierten Gattung *Methanoculleus* verstoffwechseln den von *Syntrophomonas wolfei* produzierten

Wasserstoff. Neben der Entstehung von Methan wird dadurch der Wasserstoffpartialdruck gesenkt und der Abbau der Propionsäure ist thermodynamisch möglich.

Während der Prozessregenerierung mit CaO traten Veränderungen hinsichtlich der Abundanz einzelner Organismen auf. Einige, wie z. B. die zur Familie der Aminococcaceae und der Peptococcaceae gehörenden Organismen, wurden zu Beginn der Störung nachgewiesen, während die zu den Syntrophomonadaceae gehörenden Organismen erst zum Ende der Prozessregenerierung im Fingerprinting detektiert wurden.

Weiterhin wurden Organismen nachgewiesen, die mit *Candidatus Accumulibacter phosphatis* und *Dechloromonas sp.* verwandt sind. Wie in der großtechnischen Anlage beobachtet, veränderte sich auch in dem mit CaO regenerierten Laborreaktor weder die Diversität noch die Abundanz der rPAO.

In Bezug auf die „Evenness“ der bakteriellen Biozönose zeigte die Auswertung der Pareto-Lorenz-Analysen im Vergleich zur großtechnischen Anlage (R1 20:55; R2 20:70) vor der Störung ein ausgeglicheneres Verhältnis, in dem 20 % der Organismen 42 % der Bandenintensitäten repräsentierten. Während der Prozess gestört war, veränderte sich die Biozönose und wurde, wie bereits bei den großtechnischen Reaktoren beobachtet, durch weniger Organismen dominiert (20:71). Nach der erfolgreichen Prozessstabilisierung mit CaO war die Zusammensetzung wieder gleichmäßiger (20:55). Im Vergleich zu den großtechnischen Reaktoren war die „Evenness“ nicht nur vor sondern auch nach der Prozessstörung wesentlich gleichmäßiger. Das belegt, dass die mikrobielle Gemeinschaft auf Grund einer anderen Vorgeschichte flexibler auf Veränderungen (Prozessstörung, Prozessregenerierung) reagierte.

Anders als in den großtechnischen Reaktoren wurden in der **methanogenen Gemeinschaft** des Laborreaktors sowohl während der Störung als auch nach erfolgreicher Prozessstabilisierung Organismen nachgewiesen, die mit den acetoklastischen Archaeen *Methanosaeta concilii* und den mixotrophen Archaeen *Methanosarcina thermophila* und *Methanosarcina mazei* verwandt sind. Die Abundanz der Verwandten von *Methanosaeta concilii* verringerte sich in Folge der hohen Essigsäurekonzentrationen. Im Gegensatz zu den großtechnischen Reaktoren wurden hydrogenotrophe Organismen während der Störung nur mit einer sehr geringen Abundanz nachgewiesen. Ein *Methanoculleus receptaculi*-ähnlicher Organismus wurde im Gärrest erst nach erfolgreicher Prozessregenerierung detektiert, als die Fettsäurekonzentration bei  $600 \text{ mg L}^{-1}$  lag. *Methanoculleus receptaculi* ist ein obligat hydrogenotropher Organismus, der aus einem Ölfeld mit einer *in situ* Temperatur von 75-80 °C isoliert wurde (Cheng et al. 2008). Offensichtlich wies der *Methanoculleus receptaculi*-ähnliche Organismus eine geringere Säuretoleranz gegenüber Propionsäure auf als andere methanogene Organismen wie z. B. *Methanosarcina thermophila*. Dementsprechend wurde der Verwandte von *Methanoculleus receptaculi* auf Grund der hohen Propionsäurekonzentration während der Übersäuerung auskonkurriert. Dieses Ergebnis wird durch die Studie von Hori *et al.* (2006) unterstützt. Die Autoren weisen in ihren Untersuchungen an einem thermophilen Bioreaktor nach, dass die Abundanz von *Methanoculleus sp.* bei steigender Propionsäurekonzentration abnahm, während andere Parameter wie pH und Essigsäurekonzentration sich nur wenig änderten.

Im Vergleich war die Gesamtfettsäurekonzentration im Laborreaktor mit  $8740 \text{ mg L}^{-1}$  ca. 1,8-mal höher als im großtechnischen Reaktor (R2). Die Propionsäurekonzentration war sogar 2,6-mal höher. Vermutlich haben im Laborversuch vor allem die LCFA die Biogasbildung inhibiert. Diese reagierten mit

dem zur Prozessstabilisierung eingesetzten CaO, fielen als Calciumfettsäuresalze aus und bildeten Pellets. Zusätzlich adsorbierten LCFA an der Oberfläche der Pellets. Da im großtechnischen Reaktor der Anteil an LCFA wesentlich niedriger war, war hier die Prozessstabilisierung mit CaO auf Grund der geringeren Bildung von Pellets weniger effektiv als im Labor.

#### 6.4. Bildung von Pellets als Energiequelle und strukturbildendes Material für die Biofilmbildung

Im Zuge der Prozessstabilisierung mit CaO im großtechnischen Reaktor R2 und im Laborreaktor veränderte sich die Struktur des Gärrestes und es entstanden Pellets. Ihre **Oberfläche** bestand vor allem aus Calcium und kohlenstoffreichem Material, während im Inneren Calcium und Phosphat dominierten. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem detektierten Kohlenstoff um LCFA handelte, die mit Calcium ausgefallen waren und somit dem Gärrest entzogen wurden. Untersuchungen von Kasina *et al.* (2014) zeigen, dass die in einem ähnlichen Experiment mit den gleichen Substraten gebildeten Pellets auch überwiegend aus organischem Kohlenstoff bestehen. Die Ergebnisse der FTIR-Analyse von Kasina *et al.* (2014) deuten darauf hin, dass es sich vor allem um Fettsäuren handelt. Neben der Ausfällung mit Calcium erfolgte vermutlich auch eine Adsorption von LCFA an die Oberfläche der Pellets. Beide Reaktionen verringerten die Verfügbarkeit der LCFA im Gärrest und reduzierten damit ihre hemmende Wirkung auf die Mikroorganismen (Kleyböcker *et al.* 2012). Somit war die Metabolisierung von Essigsäure bzw. Wasserstoff und Kohlendioxid durch methanogene Archaeen möglich. Die Bildung von Fettsäurecalciumsalzen wurde bereits von Roy *et al.* (1985) beobachtet. Die Autoren weisen solche Ausfällungen nach, die nach der Zugabe von Calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) zu einer syntrophen Kultur auftreten und die Hemmung von LCFA senken. Auch andere Studien von Angelidaki *et al.* (1990) und Hanaki *et al.* (1981) weisen darauf hin, dass die Zugabe von Calcium zu einer Verringerung der Inhibierung durch LCFA führt. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde in den Studien nicht diskutiert.

Die Calciumkonzentration im Gärrest lag zu Beginn der Dosierung von CaO unterhalb der Nachweisgrenze. Sie stieg erst mit einer Verzögerung von fünf bis zehn Tagen deutlich an. Dabei wurde eine Differenz zwischen der zugegebenen Menge und der gemessenen Calciumkonzentration verzeichnet (Kleyböcker 2012). Dieser Befund ist ein Anhaltspunkt dafür, dass ein Teil des Calciums durch Fällungs- und Adsorptionsprozesse dem Gärrest entzogen wurde.

Im **Inneren** der Pellets wurden mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie biofilmartige Strukturen nachgewiesen. Biofilme bilden für Mikroorganismen einen Schutz vor negativen Milieubedingungen wie z. B. hohen Propionsäurekonzentrationen und niedrigen pH-Werten (Flemming 1993). Dadurch war es möglich, dass nach der Dosierung von CaO der Biogasbildungsprozess schnell und effektiv wieder hergestellt wurde.

Auf Grund der im Vergleich zum großtechnischen Reaktor hohen CaO-Zugabe und einer geringeren Durchmischungsintensität im Laborexperiment bildeten sich **größere Pellets** mit einem Durchmesser von bis zu 7 cm. Bereits makroskopisch wurden bei diesen drei Zonen identifiziert. Die REM-EDX-Analyse zeigte einen Gradienten in Bezug auf die Phosphatminerale innerhalb der drei Pelletzonen mit dem höchsten Gehalt im Kern und dem niedrigsten in der äußeren Zone. Vermutlich fungierten diese Minerale zusammen mit den Ausfällungen von Calcium und LCFA als Nucleus, an den sich Mikroorganismen und

weitere Ausfällungen anhefteten. Die Phosphatminerale waren teilweise von trapezförmiger und runder Struktur. Nach Konhauser (2007) ist die trapezförmige Form ein Hinweis auf deren chemische Bildung, während die beobachtete runde Form auf mikrobielle Genese hinweist. Der Phosphatgradient korreliert positiv mit dem Anteil an rPAO. Dieser war im Kern der Pellets 18-mal höher als im mittleren bzw. 24-mal höher als im äußeren Bereich. Bessere Bedingungen wie ein niedriger Wasserstoffpartialdruck und geringe Fettsäurekonzentrationen ermöglichten einen effektiven Substratabbau in den mikrobiellen Habitaten und führten zu einem Anstieg des Mineralgehaltes, welcher 10 % höher als im Gärrest war.

Untersuchungen der Pelletzonen durch spezifische Färbungen mit Calcein und DiD zeigten, dass in allen Zonen des Pellets eine enge räumliche Beziehung zwischen Calcium und LCFA/Öl vorlag. Bereits in den Untersuchungen von Kleyböcker *et al.* (2012) wird vermutet, dass die schnelle Abnahme von VFA im Gärrest nach der Zugabe von CaO darauf basiert, dass LCFA mit  $\text{Ca}^{2+}$  ausfallen oder an die Oberfläche der Pellets adsorbieren. Die Adsorption von LCFA an granuläre Partikel wurde auch in UASB-Reaktoren beobachtet, die u. a. zur Behandlung von Abwässern aus der Kartoffelverarbeitung, der Zuckerrübenindustrie (Hwu *et al.* 1998; Rinzema *et al.* 1993) und von Schlachtbetrieben (Hwu *et al.* 1998) genutzt werden.

Die in allen drei Zonen des Pellets nachgewiesenen Proteine gehörten wahrscheinlich zu extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die von angesiedelten Mikroorganismen ausgeschieden wurden und Bestandteil eines Biofilms waren. Die Proteine waren heterogen auf der Oberfläche der Pellets verteilt und hatten eine enge räumliche Beziehung zu Calcium und LCFA/Öl. Eigene Beobachtungen von biofilmartigen Strukturen in den Pellets mittels REM und weiterführenden Untersuchungen von Kasina *et al.* (2014) an Pellets aus einem Experiment mit ähnlichen Substraten unterstützen die Annahme, dass die Proteine zu EPS gehören, die von Mikroorganismen des Biofilms gebildet wurden. Weiterhin untermauern auch die Ergebnisse von Davey und O'Toole (2000) und Flemming (1993) diese Vermutung. Die Autoren untersuchten die Zusammensetzung der EPS und wiesen Proteine, Glykoproteine, Glycolipide und auch extrazelluläre DNA (e-DNA) nach.

Die poröse Struktur der Pellets, die sowohl im Inneren als auch auf der Oberfläche beobachtet wurde, ermöglichte es dem gebildeten Methan auf Grund seiner geringeren Dichte die Pellets zu verlassen. Die dabei entstehenden Turbulenzen förderten den Stoffaustausch mit dem Gärrest (Kasina *et al.* 2014). Im Rahmen dieser Studie wurde auch die Abhängigkeit von der Porengröße und dem Alter der Pellets analysiert. Bei diesen Untersuchungen wurde ebenfalls CaO zur Prozessstabilisierung und Rapsöl als Co-Substrat zur Erhöhung der Raumbelastung eingesetzt. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen wurde bei dieser Studie CaO zur Prozessstabilisierung und nicht zur -regenerierung eingesetzt. Die Analysen der Pelletstrukturen zeigen eine zunehmende Porengröße mit dem Alter der Pellets, die auf den Abbau von organischem Material im Inneren zurückgeführt wird.

Die **Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose im Pellet** unterschied sich deutlich von der des Gärrestes. Der Nachweis von Organismen, die verwandt sind mit *Anaerobaculum mobile*, *Coprothermobacter proteolyticus*, *Clostridium ultunense*, *Syntrophomonas spec.* und *Sporanaerobacter acetigenes*, ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass sich im Inneren Mikrohabitate ausgebildet hatten. Diese Organismen wurden entweder ausschließlich (*Anaerobaculum mobile*, *Syntrophomonas spec.*) oder

mit einer höheren Abundanz (*Coprothermobacter proteolyticus*, *Clostridium ultunense*, *Sporanaerobacter acetigenes*) in den Pellets detektiert.

Zugleich zeigt die Pareto-Lorenz-Analyse der bakteriellen Lebensgemeinschaft, dass die "Evenness" in den Zonen des Pellets ( $\sigma$  20:55) gleichmäßiger war als im Gärrest (20:71). Die Diversität der Mikroorganismen war im Gärrest deutlich geringer als in den Pelletzonen. Durch die gleichmäßigere Verteilung der Organismen im Pellet erhöhte sich die Stabilität der bakteriellen Biozönose gegenüber Störungen.

Verwandte der Gattung *Syntrophomonas* wurden während der Prozessstörung nur im Pellet nachgewiesen. Im Gärrest hingegen wurden diese Organismen erst nach der Prozessregenerierung detektiert, als die Fettsäurekonzentration  $800 \text{ mg L}^{-1}$  betrug. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass im Pellet günstigere Bedingungen für den Substratabbau herrschten als im Gärrest. Entweder wurden diese Organismen beim Abbau der Pellets freigesetzt und/oder sie konnten sich auf Grund der verbesserten Lebensbedingungen wieder im Gärrest etablieren. Da die Reaktoren kontinuierlich durchflossen sind, müssen die Organismen wachsen, um im genetischen Fingerprinting detektiert werden zu können. Bei schlechten Lebensbedingungen ist das Wachstum eingeschränkt, weshalb die Organismen sehr schnell ausgewaschen werden und im Gärrest nicht nachweisbar sind.

Die Aktivität von hydrogenotrophen Archaeen wie z. B. dem *Methanoculleus receptaculi*-ähnlichen Organismus und dem zur Familie Methanomicrobiaceae zugeordneten Mikroorganismus führte vermutlich dazu, dass der  $\text{H}_2$ -Partialdruck im Inneren der Pellets gesenkt wurde. Dadurch war ein Abbau der Propionsäure thermodynamisch möglich. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Propionsäurekonzentration nach der Dosierung von CaO sehr schnell sank, obwohl der  $\text{H}_2$ -Partialdruck in der flüssigen Phase zu diesem Zeitpunkt größer als  $0,1 \text{ mbar}$  war. Während die Sequenzen des mit *Methanoculleus receptaculi*-verwandten Organismus in allen Zonen des Pellets nachgewiesen wurden, wurden diese im Gärrest erst nach der Prozessregenerierung detektiert. Vermutlich reagierte der mit *Methanoculleus receptaculi*-verwandte Organismus empfindlicher auf die hohe Fettsäurekonzentration im Gärrest als andere methanogene Archaeen. Erst nachdem die Konzentration unter  $600 \text{ mg L}^{-1}$  gesunken war, verstärkte sich die Abundanz dieses Organismus in der wässrigen Phase des Gärrestes. Dies ist ein Hinweis darauf, dass im Inneren des Pellets günstigere Lebensbedingungen herrschten als im umgebenden Gärrest. Das wird dadurch unterstützt, dass die quantitative PCR eine höhere Abundanz von Archaeen im Kern des Pellets zeigte. Der *Methanoculleus receptaculi*-verwandte Organismus kann in Bezug auf die Fettsäurekonzentration als ein Indikator für bessere Lebensbedingungen fungieren.

Sowohl die höhere Abundanz an Archaeen als auch die höhere Diversität von Methanogenen ist ein deutlicher Beleg für eine effiziente Methanogenese innerhalb des Pellets. Die durch die quantitative PCR angezeigte 60 %ige Verminderung der Abundanz von Archaeen in der mittleren Zone des Pellets kann entweder darauf zurückgeführt werden, dass auf Grund des hohen Ölgehaltes die DNA-Extraktion beeinträchtigt wurde oder die hohe Öl- bzw. LCFA-Konzentration einen negativen Einfluss auf das mikrobielle Wachstum hatte (Koster und Cramer 1987).

Im Anschluss an eine erfolgreiche Prozessstabilisierung wurden weder kleine noch große Pellets im Gärrest des Laborfermenters gefunden. Der Abbau des im Reaktor akkumulierten und in den Pellets gespeicherten organischen Materials wurde sowohl durch die steigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als auch die kurzzeitig steigende Gasproduktion angezeigt, die über ihrem Erwartungswert für die vorliegende

Raumbelastung lag. Dabei wurden vermutlich u. a. die adsorbierten LCFA durch Organismen wie den mit *Syntrophomonas wolfei*-verwandten Organismus abgebaut.

Die Bildung der Pellets war vermutlich mikrobiell induziert. In der ersten Phase des anaeroben Abbaus werden Fette wie das in den Laborversuchen genutzte Rapsöl von hydrolytischen Mikroorganismen zu LCFA verstoffwechselt. Eine Störung des weiteren Substratabbaus führt zu einem Ungleichgewicht zwischen LCFA-Produktion und LCFA-Abbau, in dessen Folge sich LCFA im Gärrest anreichern können. Die Aktivität von rPAO führte dazu, dass die von ihnen ausgeschiedenen Phosphate mit den akkumulierten LCFA ausfielen und Pellets bildeten. Diese mikrobielle Bildung wird durch die rundliche Form der Phosphatminerale bestätigt.

## 6.5. Zusammenfassung

Die Zugabe von CaO zu übersäuerten Biogasreaktoren führte zu einer zügigen Verringerung der Fettsäurekonzentration und zu einer langfristigen Stabilisierung des Gasbildungsprozesses. Ausfällungen von Calcium mit LCFA, die mittels REM-EDX und Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen wurden, führten zu einer Senkung der LCFA-Konzentration im Gärrest. Gleichzeitig war der Abbau von LCFA durch die mikrobielle Biozönose möglich, die vor allem durch LCFA-abbauende Organismen (Syntrophomonadaceae, Clostridiaceae) geprägt war.

Die Prozessregenerierung wurde durch Mikroorganismen wie rPAO unterstützt, da sie bei der Rücklösung von Phosphat Essigsäure aufnahmen und so deren Konzentration im flüssigen Gärrest senkten. Das abgegebene Phosphat fiel mit LCFA aus, die damit dem Gärrest entzogen wurden und die mikrobielle Biozönose nicht mehr hemmten.

Die bakterielle Biozönose des stark übersäuerten Reaktors (R2) veränderte sich im Verlauf der Prozessstörung und Prozessregenerierung, während sie im nur leicht übersäuerten Reaktor (R1) unverändert blieb. Die Pareto-Lorenz-Analysen der genetischen Fingerprintings wiesen bereits vor der Prozessstörung Unterschiede in den mikrobiellen Biozönosen zwischen R1 und R2 auf und deuteten auf Grund der besseren Gleichverteilung in R1 auf eine höhere funktionelle Stabilität hin. Die Unterschiede bezüglich der mikrobiellen Gemeinschaften zwischen den großtechnischen Reaktoren und den Laborreaktoren waren vor allem auf die unterschiedliche Geschichte der Reaktoren zurückzuführen. Diese wird durch Faktoren wie Substratqualität, Temperatur und Durchmischung beeinflusst und wirkt ihrerseits selektiv auf die mikrobielle Gemeinschaft.

Nicht nur die bakterielle sondern auch die methanogene Biozönose wurde durch die Prozessstörung und die -stabilisierung beeinflusst. Hydrogenotrophe Organismen wie *Methanoculleus receptaculi* wurden im Gegensatz zu den großtechnischen Biogasreaktoren im Labor während der Störung nur mit einer sehr geringen Abundanz nachgewiesen. Während die Gattung *Methanosarcina* in allen Proben nachgewiesen wurde. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich das vielseitige Substratspektrum, das zu einer höheren Flexibilität und einer besseren Anpassung an veränderte Umweltbedingungen führt. Daher trägt diese Gattung zu einem stabilen Biogasbildungsprozess bei.

Die im Inneren der Pellets detektierte Biozönose unterschied sich sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in der Abundanz einzelner Organismen von der flüssigen Phase des Gärrestes. Hier kann u. a. der Nachweis von Verwandten von *Methanoculleus receptaculi* und *Syntrophomonas spec.*, die während der Übersäuerung nur in den Pellets detektiert wurden, als Hinweis darauf gewertet werden, dass im Inneren

andere Lebensbedingungen herrschten als im Gärrest. Diese Organismen wurden im Gärrest erst nachgewiesen als die Fettsäurekonzentration unter  $600 \text{ mg L}^{-1}$  gesunken war und können daher als Indikatoren für besserer Lebensbedingungen gewertet werden.

Durch das Zusammenwirken von Präzipitation, Adsorption und Degradation der LCFA wurde deren Konzentration im Gärrest gesenkt und der Biogasbildungsprozess konnte ungehindert ablaufen. Der Abbau von Fettsäuren war daher bei einem niedrigen pH-Wert und unter einem hohen Wasserstoffpartialdruck möglich. Durch die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse wird die Hypothese von Kleyböcker *et al.* (2012) zur stabilisierenden Wirkung von CaO durch die Bildung von Pellets bei der Prozessregenerierung bestätigt.

Die Bildung von Pellets war für die Prozessstabilität nur dann förderlich, wenn diese nicht zu groß wurden und dadurch die Durchmischung behinderten oder den Ablauf verstopften. Nach der erfolgreichen Prozessstabilisierung wurden weder im großtechnischen Reaktor noch im Laborreaktor Pellets im Gärrest beobachtet. Als deutlicher Hinweis auf ihren Abbau im Zuge der Prozessstabilisierung können der Anstieg sowohl der Gasbildungsrate als auch der Calciumkonzentration im Gärrest gewertet werden.

## 7. Literatur

- Ahring, B. K. and Westermann, P. Product Inhibition of Butyrate Metabolism by Acetate and Hydrogen in a Thermophilic Coculture. 1988. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2393-2397.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. J. Basic local alignment search tool. 1990. *Molecular Biology* 215: 403-410.
- Angelidaki, I., Petersen, S. P. and Ahring, B. K. Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. 1990. *Applied Microbiology and Technology* 33: 469-472.
- Arias-Cordero, E., Ping, L., Reichwald, K., Delb, H., Platzer, M. and Boland, W. Comparative evaluation of the gut microbiota associated with the below- and above-ground life stages (larvae and beetles) of the forest cockchafer, *Melolontha hippocastani*. 2012. *PLoS One* 7: 1-10.
- Balussou, D., Kleyböcker, A., McKenna, R., Möst, D. and Fichtner, W. An economic analysis of three operational co-digestion biogas plants in Germany. 2011. *Waste and Biomass Valorization* 3: 23-41.
- Barredo, M. S. and Evison, L. M. Effect of Propionate Toxicity on Methanogen-Enriched Sludge, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatii* at Different pH Values. 1991. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1764-1769.
- Baserba, M. G., Angelidaki, I. and Karakashev, D. Effect of continuous oleate addition on microbial communities involved in anaerobic digestion process. 2012. *Bioresource Technology* 106: 74-81.
- Beaty, P. S. and McInerney, M. J. Effects of Organic Acid Anions on the Growth and Metabolism of *Syntrophomonas wolfei* in Pure Culture and in Defined Consortia. 1989. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 977-983.
- Bischofsberger, W., Dichtl, N., Rosenwinkel, K. H., Seyfried, C. F. and Böhnke, B. 2005. *Anaerobtechnik*. Springer, Berlin Heidelberg.
- BMU. Neues Denken - Neue Energie Roadmap Energiepolitik 2020. Krassuski, M., Jochum, P., Rufin, J., Ortmann, H., and Graichen, P. 1-32. 2009. Berlin, BMU. Ref Type: Report
- BMU. Erneuerbare Energien in Zahlen - Nationale und Internationale Entwicklung. Böhme, D., Dürrschmidt, W., and van Mark, M. 1-136. 2012. Berlin, BMU. Ref Type: Report
- BMU. Klimaschutzpolitik in Deutschland. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit . 2013. Ref Type: Electronic Citation
- BMW. Bioenergie. Bundesministerium für Wirtschaft und Energie . 2015. Ref Type: Electronic Citation
- Braun, R., Huber, P. and Meyrath, J. Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. 1981. *Biotechnology Letters* 3: 159-164.
- Burger, W., Böhm, R., Fischer, T., Frank, J., Fricke, K., Greilich, J., Kahmann, L., Kosak, G., Kübler, H., Kühn, W., Langhans, G., Loll, U., Scherer, P., Weiland, P., Wiemer, K. and Winter, J. Technische Rahmenbedingungen für die Vergärung biogener Abfälle - Merkblatt 372. 2003. Hennef, ATV-DVWK Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Chen, Y., Cheng, J. J. and Creamer, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. 2008. *Bioresource Technology* 99: 4044-4064.
- Cheng, L., Qui, T. L., Li, X., Wang, W. D., Deng, Y., Yin, X. B. and Zhang, H. Isolation and characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp. nov. from Shengli oil field, China. 2008. *FEMS Microbiology Letters* 285: 65-71.
- Comeau, Y., Hall, K. J., Hancock, R. E. W. and Oldham, W. K. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. 1986. *Water Research* 20: 1511-1521.

- Conklin, A., Stensel, H. D. and Ferguson, J. Growth kinetics and competition between *Metnanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. 2006. *Water Environment Research* 78: 486-496.
- Crocetti, G. R., Hugenholtz, P., Bond, P. L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D. and Blackall, L. L. Identification of polyphosphate- accumulating organisms and design of 16S rRNA- directed probes for their detection and quantification . 2000. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1175-1182.
- Davey, M. E. and O'Toole, G. A. *Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics*. 2000. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 847-867.
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N. and Verstraete, W. *Methanosarcina*: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. 2012. *Bioresource Technology* 112: 1-9.
- DeLong, E. F. Archaea in coastal marine environments. 1992. *PNAS* 89: 5685-5689.
- Demirel, B. and Scherer, P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. 2008. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 7: 173-190.
- Dhaked, R. K., Waghmare, C. K., Alam, S. I., Kamboj, D. V. and Singh, L. Effect of propionate toxicity on methanogenesis of night soil at psychrophilic temperature. 2003. *Bioresource Technology* 87: 299-303.
- Dohrmann, A. B. and Tebbe, C. C. 2004. Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Pages 809-838 *In*: G. A. Kowalchuk, F. J. d. Bruijn, I. M. Head, A. D. L. Akkermans and J. D. v. Elsas, Editors. *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Dong, X., Plugge, C. M. and Stams, A. J. M. Anaerobic Degradation of Propionate by a Mesophilic Acetogenic Bacterium in Coculture and Triculture with Different Methanogens. 1994. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2834-2838.
- Eikelboom, D. H. and Van Buijsen, H. J. J. 1983. *Handbuch für die mikroskopische Schlammuntersuchung*. F. Hirthammer Verlag München,
- Etchebehere, C., Pavan, M. E., Zorzopulos, J., Soubes, M. and Muxi, L. *Coprothermobacter platensis* sp. nov., a new anaerobic proteolytic thermophilic bacterium isolated from an anaerobic mesophilic sludge. 1998. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1297-1304.
- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. *Biogasgewinnung und -nutzung*. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. 1-235. 2004. Leipzig, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Fachverband Biogas e.V. *Branchenzahlen 2012 und Prognose der Branchenentwicklung 2013*. Fachverband Biogas e.V. 1-2. 2013. Fachverband Biogas e. V. Ref Type: Electronic Citation
- Fiebig, H.-J. *Fettsäurezusammensetzung wichtiger pflanzlicher und tierischer Speisefette und -öle*. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e.V. 2011. Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft e. V. Ref Type: Electronic Citation
- Flemming, H. C. Biofilms and environmental protection. 1993. *Water Science and Technology* 27: 1-10.
- Fournier, G. Horizontal Gene Transfer and the Evolution of Methanogenic Pathways. 2009. *Methods in Molecular Biology* 532: 163-179.
- Fukuzaki, S., Nishio, N., Shobayashi, M. and Nagai, S. Inhibition of the Fermentation of Propionate to Methane by Hydrogen, Acetate, and Propionate. 1990. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 719-723.
- Galbarith, G., Miller, T., Paton, A. and Thompson, J. Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. 1971. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 719-723.

- Garcia, J. L., Patel, B. K. C. and Ollivier, B. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. 2000. *Anaerobe* 6: 205-226.
- Gerardi, M. H. 2003. *The Microbiology of Anaerobic digesters*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- GisChem. Kresol (o,m,p), (CAS-Nr.: 1319-77-3). 2013. Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie. Gefahrstoffinformationssystem Chemie . Ref Type: Video Recording
- Glöß, S. Detektion und Charakterisierung Polyphosphatspeichernder Bakterien in Gewässersedimenten. 1-179. 2010. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Hajarnis, S. R. and Ranade, D. R. Effect of propionate toxicity on some methanogens at different pH values and in combination with butyrate. 7, 46-49. 1994. International Symposium on Anaerobic Digestion. 1994. Ref Type: Conference Proceeding
- Hanaki, K., Matsuo, T. and Nagase, M. Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. 1981. *Biotechnology and Bioengineering* 23: 1591-1610.
- Harper, S. R. and Pohland, F. G. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. 1986. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 585-602.
- Hatamoto, M., Imachi, H., Fukayo, S., Ohashi, A. and Harada, H. *Syntrophomonas palmitatica* sp. nov., an anaerobic, syntrophic, long-chain fatty-acid-oxidizing bacterium isolated from methanogenic sludge. 2007. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2137-2142.
- Heyer, J. 1990. *Der Kreislauf des Methans*. Mikrobiologie, Ökologie, Nutzung. Akademie Verlag Berlin, Berlin.
- Hoffmann, R. A., Garcia, M. L., Veskivar, M., Karim, K., Al-Dahhan, M. H. and Angenent, L. T. Effect of Shear on Performance and Microbial Ecology of Continuously Stirred Anaerobic Digesters Treating Animal Manure. 2008. *Biotechnology and Bioengineering* 100: 38-48.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M. and Igarashi, Y. Dynamic Transition of a Methanogenic Population in Response to the Concentration of Volatile Fatty Acids in a Thermophilic Anaerobic Digester. 2006. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1623-1630.
- Hu, Z. R., Wentzel, M. C. and Ekama, G. A. Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge systems. 2002. *Water Research* 36: 4927-4937.
- Hulshoff Pol, L. W., Lens, P. N. L., Stams, A. J. M. and Lettinga, G. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. 1998. *Biodegradation* 9: 213-224.
- Huser, B. A., Wuhrmann, K. and Zehnder, A. J. B. *Methanotherix soehngeni* gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. 1982. *Archives of Microbiology* 132: 1-9.
- Hwu, C. and Lettinga, G. Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges. 1997. *Enzyme and Microbial Technology* 21: 297-301.
- Hwu, C., Tseng, S., Yuan, C., Kulik, Z. and Lettinga, G. Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. 1998. *Water Research* 32: 1571-1579.
- Internationale Energie-Agentur. *World Energy Outlook 2012*. 1-10. 2012. France, IEA. Ref Type: Report
- Jarrell, K. F. Extreme Oxygen Sensitivity in Methanogenic Archaeobacteria. 1985. *BioScience* 35: 298-302.
- Jetten, M. S. M., Stams, A. J. M. and Zehnder, A. J. B. Methanogenesis from acetate: A comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngeni* and *Methanosarcina* spp. 1992. *FEMS Microbiology Letters* 88: 181-198.
- Johnston, M. D., Hanlon, G. W., Denyer, S. P. and Lambert, R. J. W. Membrane damage to bacteria caused by single and combined biocides. 2003. *Journal of Applied Microbiology* 94: 1015-1023.

- Kämpfer, P. and Weißenfels, W. D. 2001. Biologische Behandlung organischer Abfälle. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Kanai, T., Imanaka, H., Nakajima, A., Uwamori, K., Fukui, T., Atomi, H. and Imanaka, T. Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. 2005. Journal of Biotechnology 116: 271-282.
- Kara, F., Gurakan, G. C. and Sanin, F. D. Monovalent Cations and Their Influence on Activated Sludge Floc Chemistry, Structure, and Physical Characteristics. 2007. Biotechnology and Bioengineering 100: 231-239.
- Karakashev, D., Batstone, D. and Angelidaki, I. Influence of environmental conditions on methanogenic composition in anaerobic biogas reactors. 2005. Applied and Environmental Microbiology 71: 331-338.
- Kasina, M., Kleyböcker, A., Michalik, M. and Würdemann, H. Fast increase in the organic loading rate during co-digestion of rape seed oil and sewage sludge in a CSTR - characterization of granules formed due to CaO addition. 2014. Water Research.
- Kleyböcker, A. Entwicklung neuer Verfahren der Prozessstörung in Co-Vergärungsanlagen der Abfallwirtschaft. 1-136. 2012. TU Berlin Fakultät III - Prozesswissenschaften. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Kleyböcker, A., Brehmer, M., Lienen, T., Teitz, S., Würdemann, H. and Kraume, M. Characterization of mixing conditions using uranine as a tracer in waste treatment anaerobic co-digesters. 2014. Ref Type: Unpublished Work
- Kleyböcker, A., Liebrich, M., Kasina, M., Kraume, M., Wittmaier, M. and Würdemann, H. Comparison of different procedures to stabilize biogas formation after process failure in a thermophilic waste digestion system: Influence of aggregate formation on process stability. 2012. Waste Management 32: 1122-1130.
- Klingholz, R. Energie. Klingholz, R. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung , 1-7. 2010. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung. Ref Type: Electronic Citation
- Komatsu, T., Hanaki, K. and Matsuo, T. Prevention of lipid inhibition in anaerobic processes by introducing a two-phase system. 1991. Water Science and Technology 23: 1189-1200.
- Kong, Y., Teather, R. and Forster, R. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. 2010. FEMS Microbiological Ecology 74: 612-622.
- Konhauser, K. 2007. Biomineralization. Pages 139-191 In: K. Kohnhauser, Editor. Introduction to Geomicrobiology. Blackwell Publishing, Oxford.
- Kornberg, A. Inorganic Polyphosphate: Toward Making a Forgotten Polymer Unforgettable. 1995. Journal of Bacteriology 177: 491-496.
- Koster, I. W. and Cramer, A. Inhibition of Methanogenesis from Acetate in Granular Sludge by Long-Chain Fatty Acids. 1987. Applied and Environmental Microbiology 53: 403-409.
- Krakat, N., Schmidt, S. and Scherer, P. Potential impact of process parameters upon the bacterial diversity in the mesophilic anaerobic digestion of beet silage. 2011. Bioresource Technology 102: 5692-5701.
- Kroiss, H. Anaerobe Abwasserreinigung. Wiener Mitteilungen 62. 1985. Ref Type: Journal (Full)
- Lalman, J. A. and Bagley, D. M. Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. 2000. Water Research 34: 4220-4228.
- Lalman, J. A. and Bagley, D. M. Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. 2001. Water Research 35: 2975-2983.
- Lalman, J. A. and Bagley, D. M. Effects of C18 long chain fatty acids on glucose, butyrate and hydrogen degradation. 2002. Water Research 36: 3307-3313.

- Lerm, S., Kleyböcker, A., Miethling- Graff, R., Alawi, M., Kasina, M., Liebrich, M. and Würdemann, H. Archaeal community composition affects the function of anaerobic codigesters in response to organic overload. 2012. *Waste Management* 32: 389-399.
- Lienen, T., Kleyböcker, A., Brehmer, M., Kraume, M., Moeller, L., Görsch, K. and Würdemann, H. Floating layer formation, foaming, and microbial community structure change in full-scale biogas plant due to disruption of mixing and substrate overloading. 2013. *Energy, Sustainability and Society* 3: 1-14.
- Liu, Y. and Whitman, W. B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. 2008. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 171-189.
- Liu, Y., Xu, H.-L., Yang, S.-F. and Tay, J. H. Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. 2003. *Water Research* 37: 661-673.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. 2001. *Methods* 25: 402-408.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. 2001. *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin.
- McCarty, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals. 1964. *Public Works* 95: 1-66.
- McInerney, M. J., Bryant, M. P., Hespell, R. B. and Costerton, J. W. *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an Anaerobic, Syntrophic, Fatty Acid-Oxidizing Bacterium. 1981a. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 1029-1039.
- McInerney, M. J., Macki, R. I. and Bryant, M. P. Syntrophic association of a butyrate-degrading bacterium and methanosarcina enriched from bovine rumen fluid. 1981b. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 826-828.
- McMahon, K. D., Stroot, P. G., Mackie, R. I. and Raskin, L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions – II: Microbial population dynamics. 2001. *Water Research* 35: 1817-1827.
- McMahon, K. D., Zheng, D., Stams, A. J. M., Mackie, R. I. and Raskin, L. Microbial Population Dynamics During Start-Up and Overload Conditions of Anaerobic Digesters Treating Municipal Solid Waste and Sewage Sludge. 2004. *Biotechnology and Bioengineering* 87: 823-834.
- Meyer, R. and Priefer, C. *Ökologischer Landbau und Bioenergieerzeugung - Zielkonflikte und Lösungsansätze*. 151, 1-236. 2012. Berlin, Büro für Technikfolgen-Abschätzung beim Deutschen Bundestag (TAB). Ref Type: Report
- Mino, T., Liu, W. T., Kuriso, F. and Matsuo, T. Modelling glycogen storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal processes. 1995. *Water Science and Technology* 31: 25-34.
- Mino, T., Tsuzuki, Y. and Matsuo, T. Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. 27-38. 1987. Pergamon Press. *Advances in Water Pollution Control*. Ramadori, R. Ref Type: Conference Proceeding
- Mino, T., van Loosdrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. 1998. *Water Research* 32: 3193-3207.
- Mösche, M. and Jördening, H. J. Comparison of different models of substrate and product inhibition in anaerobic digestion. 1999. *Water Research* 33: 2545-2554.
- Mudrack, K. and Kunst, S. 2003. *Biologie der Abwasserreinigung*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H. and Wawer, C. 1997. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology . Pages 1-27 *In*: A. D. Akkermans, J. D. van Elsas and F. J. d. Bruijn, Editors. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic.

- Muyzer, G., de Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. 1993. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer, G. and Smalla, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. 1998. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Nanba, A., Nukada, R. and Nagai, S. Inhibition by Acetic and Propionic Acids of the Growth of *Propionibacterium shermanii*. 1983. *Journal of fermentation technology* 61: 551-556.
- Ollivier, B. M., Mah, R. A., Ferguson, F. J., Boone, D. R., Garcia, J. L. and Robinson, R. Emendation of the Genus *Thermobacteroides*: *Thermobacteroides proteolyticus* sp. nov. a Proteolytic Acetogen from a Methanogenic Enrichment. 1985. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35: 425-428.
- Oshiki, M., Onuki, M., Satoh, H. and Mino, T. Polyhydroxyalkanoates (PHA)-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment plants. 2009. Ref Type: Unpublished Work
- Øvreas, L., Forney, L., Daae, F. L. and Torsvik, V. Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Sælenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. 1997. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3367-3373.
- Palatsi, J., Illa, J., Prenafeta-Boldú, F. X., Laureni, M., Fernandez, B., Angelidaki, I. and Flotats, X. Long-chain fatty acids inhibition and adaptation process in anaerobic thermophilic digestion: Batch tests, microbial community structure and mathematical modelling. 2010. *Bioresource Technology* 101: 2243-2251.
- Pareto, V. 1897. *Cours d'Économie politique*. Macmillan, London.
- Paynter, M. J. B. and Hungate, R. E. Characterization of *Methanobacterium mobilis*, sp. n., Isolated from the Bovine Rumen. 1968. *Journal of Bacteriology* 95: 1943-1951.
- Rajagopal, B. S., Belay, N. and Daniels, L. Isolation and characterization of methanogenic bacteria from rice paddies. 1988. *FEMS Microbiology Letters* 53: 153-158.
- Rajeshwari, K. V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K. and Kishore, V. V. N. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. 2000. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 4: 136-156.
- Randall, A. A., Benefield, L. D., Hill, W. E., Nicol, J.-P., Boman, G. K. and Jing, S.-R. The effect of volatile fatty acids on enhanced biological phosphorus removal and population structure in anaerobic/aerobic sequencing batch reactors. 1997. *Water Science and Technology* 35: 153-160.
- Rieger, C. and Weiland, P. Prozessstörungen frühzeitig erkennen. 2006. *BIOGAS Journal* 4: 18-20.
- Rinzema, A., Alphenaar, A. and Lettinga, G. Anaerobic digestion of long-chain fatty acids in UASB and expanded granular sludge bed reactors. 1993. *Process Biochemistry* 28: 527-537.
- Rinzema, A., Boone, M., van Knippenberg, K. and Lettinga, G. Bactericidal effect of long chain fatty acids in anaerobic digestion. 1994. *Water Environment Research* 66: 40-49.
- Ritari, J., Koskinen, K., Hultman, J., Kurola, J. M., Kymäläinen, M., Romantschuk, M., Paulin, L. and Auvinen, P. Molecular analysis of meso- and thermophilic microbiota associated with anaerobic biowaste degradation. 2012. *BMC Microbiology* 12: 1-14.
- Rohland, N. and Hofreiter, M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. 2007. *BioTechniques* 42: 343-352.
- Röske, I. and Uhlmann, D. 2005. *Biologie der Wasser und Abwasserbehandlung*. Verlag Eugen Ullmer, Stuttgart.
- Rossello-Mora, R. and Amann, R. The species concept for prokaryotes. 2001. *FEMS Microbiological Reviews* 25: 39-67.

- Roy, F., Albagnac, G. and Samain, E. Influence of calcium addition on growth of high purified syntrophic cultures degrading long chain fatty acids. 1985. *Applied and Environmental Microbiology* 9: 702-705.
- Rulkens, W. Sewage Sludge as a Biomass Resource for the Production of Energy: Overview and Assessment of the Various Options. 2008. *Energy & Fuels (ACS)* 22: 9-15.
- Sasaki, K., Morita, M., Sasaki, D., Nagaoka, J., Matsumoto, N., Ohmura, N. and Shinozaki, H. Syntrophic degradation of proteinaceous materials by the thermophilic strains *Coprothermobacter proteolyticus* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. 2011. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112: 469-472.
- Sawayama, S., Tada, C., Tsukahara, K. and Yagishita, T. Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion. 2004. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97: 65-70.
- Sawayama, S., Tsukahara, K. and Yagishita, T. Phylogenetic description of immobilized methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester. 2006. *Bioresource Technology* 97: 69-76.
- Schink, B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. 1997. *Microbiological and Molecular Biology Reviews* 61: 262-280.
- Schink, B. and Stams, A. J. M. 2005. Syntrophism among prokaryotes. *In*: M. Dworkin, Editor. *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. Springer, New York.
- Schwienhorst, A. and Lindemann, B. F. Determination of Transgene Copy Number and Expression Level Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. 1998. *BioTechniques* 24: 126-131.
- Shiratori, H., Ikeno, H., Ayame, S., Kataoka, N., Miya, A., Hosono, K., Beppu, T. and Ueda, K. Isolation and characterization of a new *Clostridium* sp. that performs effective cellulosic waste digestion in a thermophilic methanogenic bioreactor. 2006. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3702-3709.
- Sizova, M. V., Izquierdo, J. A., Panikov, N. S. and Lynd, L. R. Cellulose- and Xylan-Degrading Thermophilic Anaerobic Bacteria from Biocompost. 2011. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 2282-2291.
- Smith, K. S. and Ingram-Smith, C. Methanosaeta, the forgotten methanogen? 2007. *Trends in Microbiology* 15: 150-155.
- Smith, M. R. and Mah, R. A. Growth and methanogenesis by *Methanosarcina* strain 227 on acetate and methanol. 1978. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 870-879.
- Sousa, D. Z. and Pereira, M. A. Molecular assessment of complex microbial communities degrading long chain fatty acids in methanogenic bioreactors. 2007. *FEMS Microbiological Ecology* 60: 252-265.
- Sousa, D. Z., Pereira, M. A., Alves, J. I., Smidt, H., Stams, A. J. M. and Alves, M. M. Anaerobic microbial LCFA degradation in bioreactors. 2008. *Water Science and Technology* 57: 439-444.
- Sousa, D. Z., Smidt, H., Alves, M. M. and Stams, A. J. M. *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long-chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. 2007. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 609-615.
- Stams, A. J. M., de Bok, F. A. M., Plugge, C. M., van Eekert, H. A., Dolfing, J. and Schraa, G. Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities. 2006. *Environmental Microbiology* 8: 371-382.
- Stams, A. J. M. and Plugge, C. M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. 2009. *Nature Reviews* 7: 568-577.
- Stroot, P. G., McMahon, K. D., Mackie, R. I. and Raskin, L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions—I. digester performance. 2001. *Water Research* 35: 1804-1816.

- Takai, K. and Horikoshi, K. Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes. 2000. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5066-5072.
- Thiele, J. H. and Zeikus, J. G. Control of Interspecies Electron Flow during Anaerobic Digestion: The Role of Formate versus Hydrogen Transfer during Syntrophic Methanogenesis in Flocs. 1988. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 20-29.
- Tilche, A. and Galatola, M. The potential of bio-methane as bio-fuel/bio-energy for reducing greenhouse gas emissions: a qualitative assessment for Europe in a life cycle perspective. 2008. *Water Science and Technology* 57: 1683-1692.
- Urban, W. Biomethan als flexibler Energieträger - Energetische Effizienz und Wirtschaftlichkeit. 2010. *Energie/ Wasser- Praxis* 9: 82-87.
- van Loosdrecht, M. C. M., Smolders, G. J., Kuba, T. and Heijnen, J. J. Metabolism of micro-organisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater, Use of dynamic enrichment cultures. 1997. *Antonie van Leeuwenhoek* 71: 109-116.
- Verstraete, W. Cresol in brewery wastewater. 2011. Ref Type: Personal Communication
- Wandrey, C. and Aivasidis, A. Zur der Reaktionstechnik anaeroben Fermentation. 1983. *Chemie Ingenieur Technik* 55: 516-524.
- Weiland, P. Biogas production: current state and perspectives. 2009. *Applied Microbiology and Technology* 85: 849-860.
- Weiss, A., Jérôme, V., Burghardt, D., Likke, L., Pfeiffer, S., Hofstetter, E. M., Gabler, R. and Freitag, R. Investigation of factors influencing biogas production in a large-scale thermophilic municipal biogas plant. 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 987-1001.
- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., Der Vos, P., Verstraete, W. and Boon, N. Initial community evenness favours functionality under selective stress. 2009. *Nature LETTERS* 458: 623-626.
- Wittebolle, L., Vervaeren, H., Verstraete, W. and Boon, N. Quantifying Community Dynamics of Nitrifiers in Functionally Stable Reactors. 2008. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 286-293.
- Wittmaier, M., Wöltje, M., Kleyböcker, A. and Würdemann, H. Trockenfermentation versus Nassfermentation. 46, 1-14. 2006. TU Dresden, Eigenverlag des Forums Abfallwirtschaft und Altlasten e. V. *Anaerobe Biologische Abfallbehandlung - Entwicklung, Nutzen und Risiken der Biogastechnologie*. Biltewski, B., Werner, P., Stegmann, R., and Rettenberger, G. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- Würdemann, H., Kleyböcker, A., Lienen, T., Liebrich, M. and Lerm, S. Early warning indicator – increased process understanding helps to avoid disturbances of biogas production". 2012. 14-11-2012. Ref Type: Conference Proceeding
- Zehnder, A. J. B., Huser, B. A., Brock, T. D. and Wuhrmann, K. Characterization of an Acetate-Decarboxylating, Non-Hydrogen-Oxidizing Methane Bacterium. 1980. *Archives of Microbiology* 124: 1-11.
- Zellner, G., Bleicher, K., Braun, E., Kneifel, H., Tindall, B. J., Conway de Macario, E. and Winter, J. Characterization of a new mesophilic, secondary alcohol-utilizing methanogen, *Methanobacterium palustre* spec. nov. from a peat bog. 1988. *Archives of Microbiology* 151: 1-9.
- Zhang, Ch., Liu, X. and Dong, X. *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 969-973.

# Anhänge

## Anhang A - Chemikalien

Die während dieser Arbeit genutzten Chemikalien sowie deren Hersteller sind in Anhang A, Tabelle 1 aufgeführt.

**Anhang A, Tabelle 1: Während der Arbeit verwendete Chemikalien.**

Chemikalien	Hersteller
40% Acrylamidlösung (4K-Lösung 40% Mix 37,5:1) 6x Ladepuffer	Applichem, Darmstadt, Deutschland Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Acrylamidlg. (Stammlösung)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Beads; Silicon dioxide; 0,5-10µm (approx. 80% between 1-5µm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Benzensulfonsäure	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
BSA	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Calcein [2,7-Bis(N,N-bis(carboxymethyl)aminomethylene)fluorescein], Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DiD (1,1'-dioctadecyl- 3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanin) Dithiothreitol (DTT)	Biotium, Inc., Hayward, Kalifornien, USA Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
dNTPs	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
DTAF [5-(4,6-dichlorotriazinyl)aminofluorescein]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EDTA	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (0,5 µg mL <sup>-1</sup> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Formamid	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
GeneRuler 100bp DNA Ladder (0,5 µg µL <sup>-1</sup> )	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (0,5 µg µL <sup>-1</sup> )	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Glycerol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Guanidinthioisocyanat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Harnstoff	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol (99,7 %)	Applichem, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Leiter DGGE	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Magnesiumacetattetrahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Genecraft, Ares Bioscience GmbH, Köln, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Neisser-Lösung 1 - Methylenblaulösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Neisser-Lösung 2 - Kristallviolettlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Neisser-Lösung 3 - Chrysoidinlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PCR- H <sub>2</sub> O	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystem, Foster City, Kalifornien, USA
Primer (10 mM)	Eurogentec S. A., Seraing, Belgien
Quant-iT™ PicoGreen ® dsDNA Reagent	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Rinderserumalbumin (BSA), 20 mg mL <sup>-1</sup>	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Silbernitrat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Taq BioThermD-™, 5 u µL <sup>-1</sup>	Genecraft, Ares Bioscience GmbH, Köln, Deutschland
Taq Puffer	Genecraft, Ares Bioscience GmbH, Köln, Deutschland
TEMED	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## Anhang B - DNA-Extraktionsprotokolle

### *Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc., Carlsbad, USA)*

#### Kurzprotokoll

1. Gefäße, die „Bead Solution“ enthalten, mit 250 mg Probe befüllen und vorsichtig mischen
2. Lösung S 1 auf Ausfällung überprüfen. Falls die Lösung ausgefallen ist, muss sie vor Gebrauch bis zur vollständigen Resuspendierung auf 60 °C erhitzt werden.
3. Zugabe von 60 µL Lösung S 1 zu Gefäßen mit Probe, danach 3-4 sec schwenken
4. 200 µL IRS-Lösung (Inhibitor Removal Solution) zugeben, erneut für 3-4 sec schütteln und danach 5 min bei 70 °C erhitzen (mischen und erhitzen einmal wiederholen); am Ende wieder 3-4 sec mischen
5. Bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
6. Überstand in neues 1,5 mL Reaktionsgefäß (dem Kit beigelegt) überführen
7. 250 µL Lösung S2 zum Überstand pipettieren und 5 sec mischen; danach 5 min bei 4 °C inkubieren
8. Reaktionsgefäße 1 min bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
9. 450 µL Überstand in ein neues 1,5 mL Probengefäß (dem Kit beigelegt) überführen ohne Pellet aufzuwirbeln
10. Zum Überstand 900 µL Lösung S 3 geben und 5 sec mischen
11. 700 µL auf den Filter (im Kit enthalten) laden und 1 min bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren; Durchfluss verwerfen und restlichen Überstand auf Filter laden, Zentrifugationsschritt wiederholen
12. 300 µL der Lösung S 4 zugeben und 30 sec bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
13. Durchfluss verwerfen
14. 1 min bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
15. Filter vorsichtig in neues 1,5 mL Reaktionsgefäß (dem Kit beigelegt) überführen (Achtung: Dabei keine Lösung S 4 auf Filter spritzen!)
16. 50 µL Lösung S 5 auf die Mitte der Filtermembran pipettieren
17. 30 sec bei 10.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
18. Filter verwerfen; DNA befindet sich nun im 1,5 mL Reaktionsgefäß
19. Bis zur weiteren Verwendung, zu je 10 µL in 1,5 mL Tubes aliquotiert, bei -20 °C einfrieren

### *FastDNA<sup>®</sup> SPIN KIT FOR SOIL (MP Biomedicals LLC., Santa Ana, USA)*

#### Kurzprotokoll

1. 250 mg Probe in das mitgelieferte mit Lysing Matrix E beschriftete Reaktionsgefäß einwiegen
2. 978 µL Natrium-Phosphat-Puffer zur Probe
3. 122 µL MT-Puffer dazupipettieren
4. Reaktionsgefäß in das FastPrep<sup>®</sup> Instrument stellen und 30 sec bei einer Geschwindigkeit von 4 m sec<sup>-1</sup> homogenisieren
5. 10 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren

6. Überstand in neues 2 mL Reaktionsgefäß überführen und mit 250 µL PPS-Lösung versetzen und durch 10x-iges Schwenken mischen
7. 5 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren und den Überstand in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführen
8. Bindematrixlösung resuspendieren und 1 mL zum Überstand im Zentrifugenröhrchen geben
9. 2 min von Hand oder auf einem Schüttler mischen; anschließend 3 min stehen lassen
10. Danach 500 µL vom Überstand abziehen und verwerfen
11. Nach dem Mischen der verbliebenen Mischung 600 µL abnehmen und auf SPIN™ Filter geben; danach 1 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
12. Durchfluss verwerfen und die restliche Lösung auf den Filter laden und wieder 1 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
13. Durchfluss verwerfen
14. 500 µL vorbereitetes SEWS-M- Medium auf das Pellet pipettieren und darin vorsichtig lösen
15. 1 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren, Durchfluss verwerfen und Filter wieder auf das Reaktionsgefäß setzen
16. 2 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
17. Danach den Filter 5 min bei Raumtemperatur lufttrocknen lassen
18. DNA in 50-100 µL DES lösen, dabei die DES-Lösung vorher auf 55 °C erwärmen
19. 1 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren; nun befindet sich die DNA im Reaktionsgefäß
20. Bis zur weiteren Verwendung, zu je 10 µL in 1,5 mL Tubes aliquotiert, bei -20 °C einfrieren

### ***Enzymatische Lyse mit anschließender DNA-Fällung mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkoholfällung (25:24:1)***

#### Kurzprotokoll

1. 250 mg Probe mit 250 µL Lysispuffer und 10 mg Lysozym (20 mg mL<sup>-1</sup>) mischen
2. 30 min bei 37 °C inkubieren (zwischendurch schütteln)
3. 35 µL Proteinase K und 285 µL AL-Puffer (beide aus DNeasy Blood & Tissue Kit, Quiagen, ) mischen
4. 30 min bei 56 °C inkubieren
5. 0,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) dazugeben und mischen
6. 5 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugieren
7. Wässrige Phase in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführen
8. Wässrige Phase mit der gleichen Menge Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) überschichten und mischen
9. 5 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
10. Wässrige Phase abnehmen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführen
11. DNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 5 M NaCl und 0,7 Volumen Isopropanol (99,7 %) fällen, Lösungen vorsichtig mischen
12. 10 min bei 14.000rpmg und Raumtemperatur zentrifugieren
13. Überstand vorsichtig abnehmen

14. Dann das Pellet mit 500  $\mu$ l 75 % Ethanol waschen
15. Überstand vorsichtig abnehmen und das Pellet bei Raumtemperatur trocknen lassen
16. Getrocknetes DNA-Pellet in 50  $\mu$ l PCR- $H_2O$  aufnehmen; zu je 10  $\mu$ L in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotieren und bis zur Verwendung bei -20 C im Tiefkühlschrank lagern

## Anhang C - PCR-Produkt-Aufreinigung

### *GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA)*

#### Kurzprotokoll

1. Bindepuffer und kompletten PCR-Ansatz im Verhältnis von 1:1 mischen und Farbe der Lösung kontrollieren; gelb zeigt optimalen pH-Wert für DNA-Bindung an, ändert sich die Farbe der Lösung zu orange oder violett, müssen 10 µL 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.2) dazugegeben werden
2. Bis zu 800 µL PCR/Bindepuffergemisch auf eine mitgelieferte Säule geben
3. 30-60 sec zentrifugieren bei 14.000rpm und Raumtemperatur
4. Filter entfernen und Durchfluss verwerfen
5. Anschließend Filter wieder einsetzen und gegebenenfalls Schritte 2. Bis 5. wiederholen
6. 700 µl Waschpuffer auf den Filter geben
7. 30-60 sec bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
8. Filter entfernen, Durchfluss verwerfen und Filter wieder einsetzen
9. 60 sec bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
10. Filter in ein neues 1,5 mL Tube überführen (im Kit nicht enthalten)
11. 50 µl Elutionspuffer oder PCR-Wasser auf die Mitte des Filters pipettieren
12. 60 sec bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
13. DNA ist im Durchfluss enthalten und kann entweder gleich benutzt oder bei -20°C eingefroren werden

Anmerkung: Die Menge des Elutionspuffers bzw. des PCR-Wassers kann verringert werden, um die DNA-Konzentration zu erhöhen. Elutionsmengen unter 10 µL werden vom Hersteller nicht empfohlen.

Vor dem Einfrieren wurde die DNA zu je 10 µL in 1,5 mL Tubes aliquotiert.

## Anhang D – Zuordnung sequenzierter Banden

### *Zuordnung sequenzierter Banden im Gärrest während des Versuchs zur Prozessregenerierung mit Calciumoxid*

Anhang, Tabelle 2: Zuordnung der sequenzierten Banden des Bakterien-spezifischen DGGE-Profiles während der Prozessregenerierung mit Calciumoxid.

Klasse	Familie	Nächster phylogenetischer Verwandter (GenBank accession number)	Ähnlichkeit [%]
<b>Clostridia</b>	Clostridiales Family XI. Incertae Sedis	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i> (GQ461827.1)	99
		<i>Lutispora</i> (AB186360.1)	91
	Clostridiaceae	<i>Uncultured bacterium</i> (FJ825464.1)	92
		<i>Gracilibacter thermotolerans</i> (DQ117469.1)	85
		<i>Clostridium termitidis</i> (FR733680.1)	78
	Syntrophomonadaceae	<i>Clostridium sp.</i> (FJ808600.1)	84
		<i>Syntrophomonas wolfei subsp. wolfei str. Goettingen</i> (CP000448.1)	96
Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermoanaerobacter uzonensis</i> (HM228409.1)	82	
<b>Actinobacteria</b>	Intrasporangiaceae	<i>Intrasporangium sp.</i> (FJ487951.2)	97
		<i>Phycococcus jejuensis</i> (AB530140.1)	99
		<i>Janibacter sp.</i> (HQ188604.1)	97
		<i>Uncultured bacterium</i> (HQ911112.1)	98
		<i>Phycococcus ochangensis</i> (GQ344407.1)	97
		<i>Uncultured Tetrasphaera sp.</i> (GU552256.1)	99
<b>Bacteroidia</b>	Bacteroidaceae	<i>Acetomicrobium faecale</i> (FR749981.1)	88
	Porphyromonadaceae	<i>Proteiniphilum acetatigenes</i> (HQ710548.1)	90
<b>Betaproteobacteria</b>	Alcaligenaceae	<i>Uncultured Alcaligenaceae bacterium</i> (JN630821.1)	91
	Comamonadaceae	<i>Comamonas sp.</i> (AY965248.1)	91
	Rhodocyclaceae	<i>Dechloromonas sp.</i> (DQ413167.1)	96
		<i>Uncultured bacterium</i> (FN827228.1)	97
<b>Gammaproteobacteria</b>		<i>Uncultured gamma proteobacterium</i> (AB611208.1)	88
<b>Synergistia</b>	Synergistaceae	<i>Pyramidobacter piscolens</i> (GU410623.1)	88
		<i>Uncultured Unclassified bacterium</i> (CU919207.1)	87

***Zuordnung sequenzierter Banden in den Pelletzonen während des Versuchs zur Prozessregenerierung mit Calciumoxid***

**Anhang, Tabelle 3: Zuordnung der sequenzierten Banden des Bakterien-spezifischen DGGE-Profiles der unterschiedlichen Pelletzonen.**

<b>Klasse</b>	<b>Familie</b>	<b>Nächster phylogenetischer Verwandter (GenBank accession number)</b>	<b>Ähnlichkeit (%)</b>	
<b>Clostridia</b>	Ruminococcaceae	<i>Uncultured bacterium</i> (GQ134285.1)	85	
		<i>Uncultured bacterium</i> (AB092863.1)	92	
		<i>Sporobacter termitidis</i> (NR_044972.1)	95	
		<i>Uncultured Firmicutes bacterium</i> (CU927388.1)	99	
		<i>Ruminococcus bromii</i> (FP929051.1)	86	
	Ruminococcaceae	<i>Uncultured bacterium gene</i> (AB494308.1)	91	
		<i>Anaerotruncus colihominis</i> (DQ168656.1)	92, 92	
	Ruminococcaceae	<i>Uncultured bacterium</i> (FJ032491.1)	99, 99	
			<i>Uncultured Firmicutes bacterium</i> (CU918788.1)	99
<b>Actinobacteria</b>	Intrasporangiaceae	<i>Phycococcus jejuensis</i> (AB530140.1)	84, 90	
		<i>Uncultured bacterium</i> (HQ910996.1)	90	
	Intrasporangiaceae	<i>Intrasporangium sp.</i> (FJ487951.2)	95	
		<i>Uncultured bacterium</i> (HQ911118.1)	98	
			<i>Uncultured actinobacterium</i> (JN371276.1)	92

## Dank

Diese Arbeit ist das Ergebnis der Zusammenarbeit vieler Beteiligter. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, ohne deren Hilfe und Vertrauen meine Dissertation in dieser Form nicht vorliegen würde. Für die fachliche und organisatorische Hilfe, die Kritik und die Anregungen, die Gespräche, die Geduld und nicht zu Letzt die menschliche Unterstützung und die Freundschaften möchte ich mich an dieser Stelle bei Allen herzlich bedanken, die mich auf diesem langen Weg begleitet haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau **Dr. Hilke Würdemann** für die Überlassung dieses spannenden Themas, die Betreuung meiner Arbeit, die konstruktive Kritik, die Diskussionen und die aufmunternden Worte, immer wenn es wirklich nötig war.

Herrn **Professor Schneider** möchte ich einen von Herzen kommenden Dank zuteil werden lassen. Er hat mich über eine sehr lange Zeit betreut und nie den Glauben an mich verloren. Mit seiner herzlichen und humorvollen Art hat er mich immer wieder motiviert, nicht aufzugeben und mich durchzubeißen.

Herrn **Professor Scherer** und Herrn **Professor Schauer** möchte ich für die Begutachtung meiner Dissertation danken.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe *Mikrobielles Geoengineering* am GFZ Potsdam, die mir so oft mit Rat und Tat zur Seite standen und das ein oder andere wissenschaftliche Tief erträglicher machten.

Einen persönlichen Dank möchte ich Frau **Dr. Anne Kleyböcker** aussprechen. Ihre offene Art, ihre Freundlichkeit und ihre Geduld waren mir während unserer gemeinsamen Zeit an den Biogasanlagen, im Labor und im Büro eine sehr große Hilfe. Sie ist eine nie versiegende Inspirationsquelle und ein berufliches Vorbild für mich gewesen. Vielen Dank für das Lesen meiner Texte!

Mein Dank gilt auch Herrn **Dipl.-Biol. Tobias Lienen** und Frau **Dipl.-Geoökol. Anke Westphal**, die mich oft aufmunterten, meine wissenschaftlichen Ergüsse lasen und stets konstruktiv kritisierten und ohne die ich manchmal im Labor oder beim Schreiben verloren gewesen wäre.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Frau **Jennifer Weigt**, die gute Seele des Labors, für ihren humorvollen Beistand bei den Höhen und Tiefen des Laboralltags und die kritische Durchsicht meiner Methodik.

Für die Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop möchte ich mich herzlich bei Frau **Dr. Helga Kemnitz** (Sektion 3.1 Dynamik der Lithosphäre) vom GFZ Potsdam bedanken. Ein großer Dank geht auch an Frau **Dr. Andrea Vieth-Hillebrand** (Sektion 4.3 Organische Geochemie) und ihre Arbeitsgruppe für die ionenchromatographischen Analysen.

Frau **Dr. Monika Kasina** danke ich für ihre vielen Untersuchungen meiner Proben am Rasterelektronenmikroskop und ihre Freundschaft, die mich auch heute noch sehr bereichert.

Der Offenheit und Neugierde von Frau **Dr. Andrea Kassahun** und Frau **Michalea Hache** verdanke ich nicht nur wunderbare fluoreszenzmikroskopische Bilder sondern auch einen Blick über den eigenen Tellerrand hinaus.

Bei Frau **Dr. Maren Wandrey** möchte ich mich für ihre konstruktiven Ratschläge, die Manuskripte und ihren Glauben an meine Person bedanken. Sie gab mir viel wissenschaftliches Selbstvertrauen.

Als von unschätzbarem Wert hat sich die Hilfe von Herrn **Sebastian Teitz** erwiesen, der mit seiner Neugierde, seiner offenen Art und seinem technischen Geschick, nicht nur Fehlfunktionen von Laboranlage und Computern behob, sondern auch ein sehr interessanter und inspirierender Gesprächspartner war.

Frau **Dr. Hannah Halm** danke ich für ihre kritische Durchsicht meiner Arbeit, die vielen Anregungen beim Schreiben und im Laboralltag und ihre Freundschaft.

Ein großer Dank gebührt auch den studentischen Hilfskräften Frau **Kerstin Altenwerth** und Herrn **Wojciech Urlich** deren unermüdlicher Einsatz eine große Hilfe bei der Probennahme und Datenerfassung an den Biogasanlagen war.

Mein Dank gilt nicht zu Letzt meiner Familie, die viel Verständnis und Geduld aufbrachte und mir immer wieder den richtigen Weg zeigte. Ein großes Dankeschön gilt meinem Mann, der mich unterstützte und bestärkte, auch wenn ich an mir zweifelte. Danke für die moralische Unterstützung, deine Geduld und dein Verständnis. Du hast mir zusammen mit unseren Kindern das Leben außerhalb des Institutes gezeigt und mir damit viel Energie und innere Ausgeglichenheit gegeben.

Meiner Mama möchte ich ganz besonders für die gemeinsame Zeit (nicht nur während der Arbeit an der Dissertation) danken. Meiner Schwester gilt ein großer Dank für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Marietta Liebrich, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel selbständig angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Diese Dissertation hat weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Marietta Liebrich

A handwritten signature in blue ink, reading "Marietta Liebrich". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping tail on the final letter.

Bergholz-Rehbrücke, 14. April 2016