

## **Optgas**

(03KB018A-F)

„Vergleichende Untersuchungen an großtechnischen Biogasreaktoren –  
Verfahrenstechnische, mikrobiologische, ökologische und ökonomische  
Bewertung und Optimierung“

Projektleitung: Hilke Würdemann

Verbundkoordination: Hilke Würdemann und Anne Kleyböcker

## **Abschlussbericht**

Teilprojekt: „Prozessverständnis, Durchmischung und Frühwarnsysteme“

Autoren: Anne Kleyböcker, Tobias Lienen, Marietta Liebrich,

Hilke Würdemann

Deutsches GeoForschungsZentrum GFZ, Potsdam

für das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit  
(BMU) im Rahmen der Bekanntmachung „Vorhaben zur Optimierung der  
energetischen Biomassenutzung“

### Projektpartner

Helmholtz-Zentrum für Umwelt (UFZ)

R. Müller

Deutsches BiomasseForschungsZentrum (DBFZ)

H. Lorenz

Technische Universität Berlin Verfahrenstechnik

M. Kraume

Technische Universität Berlin Bodenkunde

M. Kaupenjohann

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

W. Fichtner

## Inhaltsverzeichnis

I. Aufgabenstellung.....	3
1. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde .....	8
2. Planung und Ablauf des Vorhabens .....	8
3. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	9
4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen .....	12
II. Eingehende Darstellung .....	13
1. Darstellung der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele.....	13
1.1. Methoden .....	13
1.2. Ergebnisse der Betriebsaufnahmen und Untersuchungen an großtechnischen Anlagen .....	17
1.2.1. Anlage „KS-Abfall 1“ .....	17
1.2.2. Anlage „KS-Abfall 2“ .....	23
1.2.3. Anlage „Gül-Abfall“ .....	25
1.2.4. Anlage „NawaRo“ .....	28
1.3. Ergebnisse der Untersuchungen im Labor.....	29
1.3.1. Übersäuerung.....	29
1.3.2. Schwimmschichtenbildung und molekularbiologische Untersuchungen zur Schaumbildung .....	34
1.3.3. Hochleistungsbetrieb .....	37
1.4. Zusammenfassung .....	43
2. Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises .....	43
3. Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit.....	44
4. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans.....	44
5. Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	45
6. Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 11 .....	45

## **I. Aufgabenstellung**

Vor dem Hintergrund der Diskussion über den Klimawandel und Maßnahmen zur Minderung der CO<sub>2</sub>-Emissionen sowie auch zur Verbesserung der Versorgungssicherheit durch die Nutzung heimischer Ressourcen wird eine deutliche Erhöhung des Anteils erneuerbarer Energien an der Strom- und Wärmeerzeugung angestrebt. Bis zum Jahr 2020 soll der Anteil der erneuerbaren Energien am Bruttoendenergieverbrauch in Deutschland mindestens 18 % betragen (BMU 2011). Während im Jahre 1999 850 Biogasanlagen in Deutschland in Betrieb waren, stieg ihre Anzahl bis 2011 auf schätzungsweise 7000 an (FNR 2011). Ein Großteil der Biogasanlagen sind mesophile Nassvergärungsanlagen auf Güllebasis, die biogene Rest- und Abfallstoffe sowie nachwachsende Rohstoffe (Nawaros) zur Co-Vergärung einsetzen. In Anbetracht der gestiegenen Kosten für Nawaros und auch aus ökologischer Sicht, ist für die Zukunft ein verstärkter Einsatz von biogenen Rest- und Abfallstoffen wünschenswert. Die unerschlossenen Potentiale an Rückständen, Nebenprodukten und Abfällen sind nach wie vor hoch und können wirtschaftlich erschlossen werden (Scholwin et al. 2008). Für den verstärkten Einsatz von Rest- und Abfallstoffen wird ein technologisch flexibles System benötigt, da Rest- und Abfallstoffe in Abhängigkeit von ihrem Aufkommen stark variieren können. Jede Substratumstellung kann leicht Prozessstörungen wie Schaumbildung, Schwimmschichtenbildung und Übersäuerung im Biogasreaktor verursachen. Diese Störungen können zu wochenlangen Ausfällen der Biogasproduktion führen, die die Anlage nicht nur in eine wirtschaftlich bedrohliche Situation führen, sondern sich auch negativ auf die Ökobilanz einer Anlage auswirken.

### *Übersäuerung*

Bei einer Umstellung der Substratzusammensetzung ist häufig nicht genau bekannt, wie viel Substrat einem Biogasreaktor für den optimalen Betrieb zugeführt werden kann. Oftmals wird die Raumbelastung (tägliche Fracht an organischen Substraten bezogen auf das Reaktorvolumen) wesentlich niedriger gefahren als technisch möglich. Die Anlage wird somit nicht optimal ausgelastet, um das Risiko einer Übersäuerung zu minimieren. Insbesondere bei Anlagen, die einem ständigen Wechsel in der Substratzusammensetzung unterliegen, ist es schwierig die Raumbelastung zu optimieren. Ein Frühwarnsystem hinsichtlich Übersäuerung und eine optimale Methode für die Anpassung der Raumbelastung sind wichtige Voraussetzungen um einen Hochleistungsbetrieb mit maximaler Raum-Zeit-Ausbeute zu etablieren. Eine Übersäuerung wird in der Regel durch eine Substratüberfrachtung, durch organische Verbindungen (Chloroform und Phenole), Metalle und Schwermetalle in toxisch wirkenden Konzentrationen verursacht (ATV-FA 7.5 1990). Der Vergärungsprozess unterteilt

sich in vier Stufen: Hydrolyse, Versäuerung, Essigsäurebildung und Methanbildung. Bei einer Übersäuerung wird entweder die letzte Stufe gehemmt (Mudrack et al. 2003) oder die letzten beiden Stufen laufen verlangsamt ab. Bei der Hemmung der Methanbildner sammeln sich die Zwischenprodukte Essigsäure, Wasserstoff und bei sulfathaltigem Gärschlamm auch Schwefelwasserstoff an. Der pH-Wert nimmt ab und bewirkt gleichzeitig einen prozentualen Anstieg undissoziierter Säuren. Sowohl die undissoziierten Essigsäuren als auch der erhöhte Wasserstoffpartialdruck bewirken eine Hemmung der Essigsäurebildner. Organische Säuren wie Propionsäure, Buttersäure und Valeriansäure reichern sich an. Es tritt eine so genannte Übersäuerung ein, die auch als Säurehemmung bezeichnet wird (Mudrack et al. 2003). Laufen die letzten beiden Stufen verlangsamt ab, kommt es zur Anreicherung längererkettiger organischer Säuren, die einen Abfall des pH-Werts bewirken. Hierdurch werden wiederum die Methanbildung und die Essigsäurebildung gehemmt. Der Vergärungsprozess kommt zum Erliegen. Des Weiteren kann es vorkommen, dass durch eine Substratüberdosierung die hydraulische Verweilzeit so stark verkürzt wird, dass sie für die Reproduktion der methanogenen Mikroorganismen, die Verdopplungszeiten von bis zu 12 Tagen benötigen, nicht mehr ausreicht. Es entsteht der so genannte Auswaschungseffekt. Molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass das Vorkommen bestimmter methanbildender Arten die Prozessstabilität beeinflusst. Während bei niedrigen Essigsäurekonzentrationen ( $K_m = 300 \text{ mg l}^{-1}$ , Kämpfer 2001) Arten der Gattung *Methanosaeta* dominieren, wird bei hohen Konzentrationen ( $K_m = 3000 \text{ mg l}^{-1}$ , Kämpfer 2001) die Gattung *Methanosarcina* dominant (Huser et al. 1982, Jetten et al. 1992, Smith 1978, Smith et al. 2007, Demirel et al. 2008). Die beiden Gattungen können Methan auf acetoclastischem Weg bilden und konkurrieren daher um die Essigsäure. In diesem Zusammenhang ist die Geschichte des Fermentationsprozesses eines Reaktors wichtig. So dominiert in Reaktoren, deren mikrobielle Biozönose einmal einer hohen Essigkonzentration ausgesetzt waren, die Gattung *Methanosarcina*, während in Reaktoren, in denen stets niedrige Essigsäurekonzentrationen herrschten, die Gattung *Methanosaeta* dominiert (Hoffmann et al. 2008, McMahon et al. 2001, Jetten et al. 1992). Es wird davon ausgegangen, dass die Dominanz von *Methanosarcina* zu einem stabileren Prozess führt, da Mikroorganismen aus der Gattung *Methanosarcina* bei einem Anstieg von Essigsäure immer noch aktiv sind und somit eine vorübergehende Substratstoßbelastung besser abbauen können (Conklin et al. 2006). Dahingegen beobachtete Lerm (2012) bei einer Übersäuerung zweier Reaktoren insbesondere eine große Vielfalt an hydrogenotrophen Methanogenen in dem stabileren Reaktor. Der Zeitraum bis zur Übersäuerung und die erforderliche Höhe der Stoßbelastung unterschieden sich trotz parallelem Betrieb erheblich zwischen den Reaktoren. Nach Lerm (2012) war vermutlich die unterschiedliche Zusammensetzung der Biozönose dafür verantwortlich. Auch Montero et al.

(2007) machten die Beobachtung, dass hydrogenotrophe Mikroorganismen besonders bei instabilen Bedingungen wie beim Anfahren eines Reaktors aktiver und in größerer Anzahl vertreten sind als acetolastische Methanogene. Besonders die ständig wechselnden Substratzusammensetzungen beim Einsatz von Rest- und Abfallstoffen erfordern eine äußerst stressresistente und anpassungsfähige mikrobielle Lebensgemeinschaft. Nach Schüsseler (2008) sind vielen Anlagenbetreibern die Prozessdaten seiner Biogasanlage unbekannt. Störungen im Vergärungsprozess werden daher häufig erst dann erkannt, wenn es für erfolgreiche Gegenmaßnahmen zu spät ist. Massive Ertragseinbußen sind die Folge. Selbst Messeinrichtungen für Parameter, die zur Zustandsbeschreibung des Vergärungsprozesses dienen, wie das Gasvolumen und die Gasqualität, sind nur zu 70% bzw. 60% vorhanden. Als so genannte Frühwarnparameter werden heutzutage das Redoxpotential, der FOS/TAC-Wert (Verhältnis aus den flüchtigen organischen Säuren und des gesamten anorganischen Carbonats) und die Konzentration an organischen Säuren eingesetzt. Lediglich 2 von 400 Anlagenbetreiber in Deutschland messen das Redoxpotential (Weiland 2008). Dahingegen wird mittlerweile zunehmend der FOS/TAC-Wert bestimmt. Rieger et al. (2006) stellten in Laborexperimenten jedoch fest, dass das Redoxpotential früher auf eine Überlastung reagiert als der FOS/TAC-Wert. Da das Redoxpotential jedoch mit dem pH-Wert verknüpft ist, können nur bei konstanten Substrat- und pH-Bedingungen Störungen frühzeitig erkannt werden (Weiland 2008). Chynoweth et al. (1994) und Allmann (2007) kritisieren auch, dass das Redoxpotential nicht aussagekräftig genug ist. Eine Hemmung der Mikroorganismen aufgrund von Sauerstoff kann leicht detektiert werden, aber weitere Informationen sind zu ungenau. Die organischen Säuren werden in der Praxis generell nur durch externe Labore bestimmt und dies überwiegend, wenn sich bereits ein deutlicher Einbruch in der Stromproduktion abzeichnet (Weiland 2008). Es gibt noch einen weiteren Frühwarnparameter, der bisher in der Praxis jedoch noch keine Anwendung findet. Wasserstoff ist ein Zwischenprodukt des anaeroben Abbaus. Überschreitet der Wasserstoffpartialdruck im Reaktor einen Grenzwert von ca. 0,06 mbar, wird der Propionsäureabbau energetisch gehemmt (Weiland 2008). Eine Anreicherung des Wasserstoffs im Biogas kann daher frühzeitig auf eine Prozesshemmung hinweisen. Aufgrund häufiger Schwankungen des Wasserstoffgehalts ist jedoch eine Langzeitüberwachung unerlässlich, um eine Frühwarnung zu diagnostizieren (Prechtel et al. 2006). Dennoch konnten Pind et al. (2003) keine langfristige Hemmung mit gasförmigem Wasserstoff als alleinigen Überwachungsparameter detektieren und einen stabilen Prozess nicht wiederherstellen. Zosel et al. (2008) haben amperometrische Wasserstoffsensoren zur Messung von gelöstem Wasserstoff im Gärtschlamm entwickelt und dabei festgestellt, dass in der flüssigen Phase bis zu 50-fach höhere Wasserstoffpartialdrücke gemessen werden können als in der Gasphase. Ein den Biogasbildungsprozess gefährdender Anstieg des

Wasserstoffpartialdrucks kann im flüssigen Medium daher wesentlich eher detektiert werden als im Biogas. In eigenen Arbeiten hat das GFZ zwei Frühwarnindikatoren entwickelt, die sich a) aus der Summe der organischen Säuren und dem Calciumgehalt (FWI-VFA/Ca) sowie b) aus der Phosphatkonzentration in der wässrigen Phase (FWI-PO<sub>4</sub>) zusammensetzen.

### *Schaum- und Schwimmschichtenbildung*

Ein technischer Aspekt des Betriebs von Biogasanlagen, der bisher nicht in Gänze verstanden und beherrscht wird, ist die Schaumbildung in den Reaktoren, die die Produktivität des Prozesses verringert, da der Schaum die Entnahme und Verwertung des Gases behindert und beim Eindringen in nachfolgende Prozessstufen zum Ausfall der Technik führen kann. Grundlage zur Vermeidung dieser Störungen ist das Verständnis der Entstehung des Schaums. Während die Entstehung von Schaum in Biogasanlagen noch weitgehend unverstanden ist, gibt es umfangreiche Untersuchungen aus verwandten Anwendungsgebieten. So ist zum Beispiel bei der Klärschlammfaulung die Schaumbildung unter anderem bei der übermäßigen Dosierung leicht abbaubarer Co-Substrate zu beobachten (Bischofsberger 2005). Außerdem kann starke Schaumbildung ein Indikator für einen nicht-optimalen Betriebszustand bzw. ungeeignete Betriebsführung sein. Als eine mögliche Ursache für Schaumbildung wird ein zu hoher Stickstoffanteil im Substrat beschrieben (z.B. bei Zufuhr von Getreide), der – verstärkt durch die Akkumulation (Rezirkulatwasser) – zur Hemmung des Prozesses aufgrund eines überhöhten Ammoniakgehaltes führt (Schumann et al. 2007, Wetter et al. 2004). Wird das Dosierintervall sehr lang gewählt, muss das Substrat zum Fütterungszeitpunkt in entsprechend großen Mengen zugeführt werden. In der Folge steigt die Konzentration organischer Säuren stark an, was auch in starker Schaumbildung resultieren kann (FAT 2000). Die Schaumbildung kann auch mit ungeeigneten Heiz- und Umwälzeinrichtungen zusammenhängen. So kann z.B. das Aufrühren von Sinkschichten durch einen hohen Eintrag von Rührenergie zu einer starken Schaumbildung führen (Wetter et al. 2004). Ein falsch dimensioniertes oder ungünstig betriebenes Heizsystem kann bei unzureichendem Wärmeübergang in Verbindung mit ungenügender Durchmischung des Reaktorinhaltes ebenfalls zum Schäumen führen (Bayr. Landesanstalt 2006). Besonders beim Einsatz von Rest- und Abfallstoffen kann es aufgrund der fetthaltigen (Abfallstoffe) und faserigen (Reststoffe) Beschaffenheit zur Schwimmschichtenbildung kommen (Bischofsberger et al. 2005). Die Schwimmschichten können bis zu 30 cm dick werden und sind nur sehr schwer zu bekämpfen. Sie behindern vor allem den Gasaustrag und können unter Umständen sogar den Ausfall des kompletten Rührsystems verursachen. In diesem Stadium kann die Prozessstörung nur noch durch Abpumpen des gesamten Reaktorinhalts behoben werden.

Die Folge ist ein Betriebsausfall für mehrere Wochen, wenn nicht sogar Monate. Generell werden für Reaktoren, die zur Schwimmschichtenbildung neigen, Faulraummischer mit umkehrbarer Drehrichtung, keine Gaseinpressung zur Umwälzung (Flotationseffekt für Fette) und die Überprüfung der Viskosität fetthaltiger Substrate bei der vorherrschenden Faulraumtemperatur empfohlen (Bischofsberger et al. 2005). Hier wird deutlich, wie stark die Substratwahl und die Fluidodynamik zusammenhängen. Sobald die Rührtechnik ausfällt oder zu gering ist, kommt es zur Entmischung des Reaktorinhalts. Hierbei schwimmen Stoffe mit geringerer Dichte auf und bilden eine Schwimmschicht, welche den Gasaustritt erschwert (Schattauer et al. 2006). Nach Deublein et al. (2008) sind für eine Schwimmschichtenbildung nicht nur die Substrate verantwortlich, sondern auch in großer Anzahl vorkommende, fadenförmige Bakterien. Die fadenförmigen Organismen bilden grenzflächenaktive Substanzen oder besitzen hydrophobe Zelloberflächen und reichern sich dadurch an der Wasseroberfläche an. Sie können in einer zusammenhängenden Decke von bis zu 30 cm Dicke wachsen. Aus der Abwasserreinigung sind vor allem die Spezies *Microthrix parvicella* und *Gordonia* spp. für die Bildung von Schwimmschichten, aber auch für die Schaumbildung bekannt (Röske et al. 2006). Durch die Zugabe von Klärschlamm als Substrat in die Biogasanlage können diese Mikroorganismen auch in anaeroben Reaktoren zur Schaum- und Schwimmschichtenbildung beitragen (Pagilla et al. 1997; Westlund et al. 1998; Marneri et al. 2009).

#### *Kurzschlussströme, Stagnationszonen und Totzonen*

Kurzschlussströme, Stagnationszonen und Totzonen im Gärreaktor sind häufige Phänomene, die jedoch in der Regel unbemerkt bleiben oder zumindest nicht genau beschrieben werden können. Sie können die Effizienz der Biogasanlage erheblich mindern und zu ungenutzten Restgaspotentialen im Gärrest führen. So wurde in einer großtechnischen Biogasanlage infolge von Kurzschlussströmen durchschnittlich 18 % ihres Biogaspotentials nicht ausgeschöpft (Kleyböcker et al. 2007). Ein größerer Anteil des Substrats wurde umgehend nach der Dosierung in den Reaktor als Gärrest aus dem Reaktor abgepumpt.

#### *Ziel des Forschungsvorhabens*

Das Ziel des Teilprojektes „Prozessverständnis, Durchmischung und Frühwarnsysteme“ war es, prozessgestörte Biogasanlagen chemisch und mikrobiologisch zu analysieren, um Rückschlüsse auf die Ursachen der Prozessstörungen ziehen zu können. Mehrere großtechnische Biogasanlagen wurden bei Normalbetrieb und beim Auftreten von Prozessstörungen (Übersäuerung, Schaumbildung, Schwimmschichtenbildung) untersucht.

Die beobachteten Störungen wurden in einer Laboranlage (23 l Volumen) nachgestellt und Gegenmaßnahmen sowie Frühwarnsysteme erprobt.

### **1. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Übersäuerung, Schaum- und Schwimmschichtenbildung sind häufige Phänomene in großtechnischen Biogasanlagen. In vorherigen Untersuchungen wurde ein Frühwarnindikator FWI-VFA/Ca entwickelt, der bereits einige Tage vor einer Übersäuerung warnt. Ebenso konnte eine Übersäuerung erfolgreich durch die Zugabe von CaO bekämpft werden. Es war nicht bekannt, ob diese Mechanismen auch bei anderen Substratspektren als denen der oben genannten Versuche funktionieren. Verschiedene Substrate wurden daher in diesem Vorhaben in Bezug auf CaO und den Frühwarnindikator getestet.

Desweiteren sind viele Biogasreaktoren durch eine ungünstige Durchmischung charakterisiert. Eine Tracerstudie konnte bereits in einem vorherigen Projekt Kurzschlussströme identifizieren, die zu einer unvollständigen Vergärung des Substrates führten. In dem hier dargestellten Vorhaben wurde ein weiterer, mit einer anderen Mischtechnik ausgestatteter Reaktor auf seine ideale Durchmischung untersucht.

Lerm et al. (2012) zeigten, dass sich die mikrobielle Biozönose bei einer Übersäuerung verändert. Da sich die Analysen auf Laborversuche beschränkten, wurden im Vorhaben auch großtechnische Anlagen hinsichtlich der Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft unter dem Einfluss von Prozessstörungen untersucht.

Aus einem vorherigen Forschungsprojekt standen dem GFZ Laborreaktoren zur Verfügung. Diese wurden an die neuen Fragestellungen angepasst und verwendet, um Prozessstörungen nachzustellen und Gegenmaßnahmen sowie Frühwarnsysteme zu entwickeln.

### **2. Planung und Ablauf des Vorhabens**

Das Teilprojekt wurde in zwei Abschnitte eingeteilt:

- a) Beprobung und Untersuchung von Prozessstörungen an großtechnischen Biogasanlagen
- b) Untersuchungen von provozierten Störungen an einer Laboranlage

Für die Beprobung der einzelnen Biogasanlagen wurde jeweils zuerst eine zweiwöchige Intensivbeprobung durchgeführt und danach wurden die betroffenen Anlagen über den Zeitraum eines Jahres monatlich beprobt. Die Laboranlage wurde über 1,5 Jahre betrieben und eine Übersäuerung, Schaum- und Schwimmschichtenbildung simuliert.

Die Untersuchungen unterteilten sich in

- Chemische Analysen (Konzentrationen von organischen Säuren, Calcium, Phosphat, Ammonium; pH-Wert; Temperatur)
- Molekularbiologische Analyse der mikrobiellen Biozönose (Genetisches Fingerprinting; quantitative Analyse mit qPCR).

Desweiteren wurde an einer ausgewählten Biogasanlage eine Tracerstudie durchgeführt. Diese diente dazu, die Durchmischung eines Reaktors zu untersuchen. An der gleichen Anlage wurde auch ein langfristiges Monitoring zur Schaumbildung durchgeführt.

### **3. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

#### *3.1. Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden*

Für die Durchführung der Untersuchungen wurde der von Würdemann und Kleyböcker entwickelte Frühwarnindikator [Verfahren zur Prozesssteuerung von Bioreaktoren (Process control of biogas plant comprises measuring quantities of organic acids and calcium ions during operation of biogas plant in predetermined intervals, determining ratio of these quantities and comparing it with previous intervals). Erfinder: Kleyböcker, Anne, 10245 Berlin, DE; Würdemann, Hilke, 14482 Potsdam, am 10.06.2010 veröffentlicht] verwendet. Das Gärmaterial wurde nach DIN-Normen untersucht (Trockensubstanz, organische Trockensubstanz).

#### *3.2. Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste*

##### Fachliteratur für den Abschlussbericht

Allman, A., El-Mansi, E., Bryce, C., Demain, A. (2007): Fermentation Microbiology and Biotechnology, Taylor & Francis Group, LLC, New York, 544 S.

ATV-Fachausschuss 7.5 (1990): Anaerobe Verfahren zur Behandlung von Industrieabwässern, Arbeitsbericht des ATV-FA 7.5 „Anaerobe Verfahren zur Behandlung von Industrieabwässern“, KA 37, 1247-1251.

Bischofsberger, W., Dichtl, N., Rosenwinkel, K., Seyfried, C., Böhnke, B. (2005): Anaerobtechnik, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 718 S.

BMU (2011): Erneuerbare Energien – Entwicklung in Deutschland 2010, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Faltblatt.

Chynoweth, D., Svoronos, S., Lyberatos, G., Harman, J., Pullammanappallil, P., Owens, J., Peck, M. (1994): Real-time expert system control of anaerobic digestion, Water Science and Technology 30, 12, 21-29.

Conklin, A., Stensel, H., Ferguson, J. (2006): Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion, *Water Environment Research*, 78, 5, 486-496.

Demirel, B., Scherer, P. (2008): The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7, 173-190.

Deublein, D., Steinhauser, A. (2008): *Biogas from waste and renewable resources*, Wiley VCH Verlag GmbH & Co.KGAA, Weinheim, 443 S.

FAT-Bericht (2000): Nr. 546 ed. Eidgenössische Forschungsanstalt für Agrarwirtschaft und Landtechnik (FAT).

FNR, BMELV (2011): *Biogas Bioenergie Deutschland*, Gülzow.

Hoffmann, R., Garcia, M., Veskiar, M., Karim, K., Al-Dahhan, M., Angenent, L. (2008): Effect of shear on performance and microbial ecology of continuously stirred anaerobic digesters treating animal manure, *Biotechnology and Bioengineering*, 100, 38-48.

Huser, A., Wuhrmann, K., Zehnder, A. (1982): *Methanotrix soehngenii* gen. nov. spec. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium, *Archives Microbiology*, 132, 1-9.

Jetten, M., Stams, A., Zehnder, A. (1992): Methanogenesis from acetate: A comparison of the acetate metabolism in *Methanotrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiology Reviews*, 88, 181-198.

Kämpfer, P., Weißenfels, W. (2001): *Biologische Behandlung organischer Abfälle*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 192 S.

Kleyböcker, A., Lerm, S., Miethling-Graff, R., Vieth, A., Wittmaier, M., Würdemann, H. (2007): Genetic fingerprints to characterise microbial communities during organic overloading and in large-scale biogas plants. *Internationale Biogaskonferenz "Progress in Biogas" Tagungsband*, Stuttgart-Hohenheim, 261-266.

Lerm, S. (2007): *Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft in einer thermophil betriebenen Co-Vergärungsanlage zur Untersuchung der Auswirkungen organischer Stoßbelastungen auf die Zusammensetzung der Biozönose*, Diplomarbeit, Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, 91 S.

Marneri M, Mamais D, Koutsiouki E. (2009) *Microthrix parvicella* and *Gordona amarae* in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion systems. *Environ Technol.* 2009 Apr 14;30(5):437-44.

McMahon, K., Stroot, P., Mackie, R., Raskin, L. (2001): Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions – II: Microbial population dynamics, *Water Research*, 35, 7, 1817-1827.

Montero, B., García-Morales, J., Sales, D., Solera, R. (2007): Quantification of different microbial population in thermophilic-dry anaerobic digestion, Progress in Biogas, International Conference, Hohenheim, 239-246.

Mudrack, K., Kunst, S. (2003): Biologie der Abwasserreinigung, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin 205 S.

Pagilla, K.R., Craney, K.C., Kido, W.H. (1997) Causes and effects of foaming in anaerobic sludge digesters. Water Science and Technology Vol 36 No 6-7 pp 463–470.

Pelletier, E., Kreimeyer, A., Bocs, S., Rouy, Z., Gyapay, G., Chouari, R., Rivière, D., Ganesan, A., Daegelen, P., Sghir, A., Cohen, G. N., Médigue, C., Weissenbach, J., Le Paslier, D., 2008. “Candidatus *Cloacamonas acidaminovorans*”: Genome Sequence Reconstruction Provides a First Glimpse of a New Bacterial Division. Journal of Bacteriology April 2008, 2572-2579

Pind, P., Angelidaki, I., Ahring, B., Stamatelatou, K., Lyberatos, G. (2003): Monitoring and control of anaerobic reactors, Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, 82, 135-182.

Rieger, C., Weiland, P. (2006): Prozessstörungen frühzeitig erkennen, Biogas Journal, 4, 18-20.

Röske, I., Uhlmann, D. (2005): Biologie der Wasser und Abwasserbehandlung, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart 237 S.

Schattauer, A., Weiland, P. (2006): Grundlagen der anaeroben Fermentation, Handreichung Biogasgewinnung u. –nutzung, Institut für Energetik und Umwelt gGmbH, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V., Gülzow, 25-85.

Scholwin, F.; Thrän, D.; Daniel, J.; Schreiber, K.; Witt, J.; Schumacher, B.; Jahraus, B.; Schüsseler, P. (2008): Zielsetzung des Fachgesprächs, Gülzower Fachgespräche, Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V., 27, 8-16.

Schumann, W., Gurgel, A. (2007): Schwachstellenanalyse an ausgewählten Biogasanlagen in Mecklenburg-Vorpommern, in 1. Rostocker Bioenergieforum, Bioenergieland Mecklenburg-Vorpommern, Universität Rostock.

Smith, J.L., Schnabel, R.R. McNeal, B.L., Campbell, G.S. (1980): Potential Errors in the First-order Model for Estimating Soil Nitrogen Mineralization Potentials. Soil Sci. Soc. Am. J. 44,996-1000.

Smith, K., Ingram-Smith, C. (2007): Methanosaeta, the forgotten methanogen?, Trends in Microbiology, 15, 4, 150-155.

Smith, M., Mah, R., (1978): Growth and methanogenesis by *Methanosarcina* strain 227 on acetate and methanol, Applied and Environmental Microbiology, 36, 6, 870-879.

Weiland, P. (2008): Wichtige Messdaten für den Prozessablauf und Stand der Technik in der Praxis, Gülzower Fachgespräche, Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V., 27, 17-31.

Westlund, A. B., Hagland, E., Rothman, M., 1998. Foaming in anaerobic digesters caused by *Microthrix parvicella*. Water Sci. Technol. 37, 51-55

Wetter, C., Brüggling, E. (2004): Leitfaden zum Bau einer Biogasanlage, ed. Fachhochschule Münster. Vol. 4.

Zosel, J., Oelßner, W., Guth, U., Zimmermann, P., Petersson, E., Sensel, K. (2008): Entwicklung eines Wasserstoff-Sensors für die Flüssigphase von Biogasanlagen, Gülzower Fachgespräche, Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e. V., 27, 58-71.

Weitere Fachliteratur kann in den geplanten und erfolgten Veröffentlichungen (siehe II.6) eingesehen werden.

Desweiteren wurde das Internetportal [www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/) für die Literatursuche und den molekularbiologischen Sequenzdatenbankvergleich verwendet. Die üblichen Internetsuchmaschinen wurden für Literatur- und Konferenzsuche benutzt.

#### **4. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Das Projekt „Prozessverständnis, Durchmischung und Frühwarnsysteme“ ist ein Teilprojekt des vom GFZ koordinierten und vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit geförderten Verbundprojekts „Vergleichende Untersuchungen an großtechnischen Biogasreaktoren – verfahrenstechnische, mikrobiologische, ökologische und ökonomische Bewertung und Optimierung“ (aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages, Förderkennzeichen: 03KB018). Weitere Projektpartner in diesem Projekt sind:

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig (UFZ),

Technische Universität Berlin, Fachgebiet Verfahrenstechnik (VT),

Technische Universität Berlin, Fachgebiet Bodenkunde (BK),

Karlsruher Institut für Technologie (KIT),

Deutsches BiomasseForschungsZentrum (DBFZ).

Für die praktischen Untersuchungen war eine Zusammenarbeit mit Betreibern von Praxisanlagen notwendig. Genaue Angaben sind aus Datenschutzgründen lediglich im vertraulichen Erfolgskontrollbericht aufgeführt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Biofilmbildung wurden in Kooperation mit dem Dresdner Grundwasserforschungszentrum e.V. (DGFZ) durchgeführt.

## **II. Eingehende Darstellung**

### **1. Darstellung der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele**

Im Teilprojekt „Prozessverständnis, Durchmischung und Frühwarnsysteme“ wurden drei Reststoff-Biogasanlagen und eine mit nachwachsenden Rohstoffen betriebene Anlage wissenschaftlich begleitet. Die Anlagen wurden bei Normalbetrieb sowie unter dem Einfluss von Prozessstörungen chemisch und mikrobiologisch untersucht. Zu den Prozessstörungen zählten eine Übersäuerung, Schaumbildungen und eine Schwimmschichtenbildung. Eine Tracerstudie wurde darüberhinaus durchgeführt, um die Durchmischung eines Reaktors einer Biogasanlage zu untersuchen. In Laborversuchen wurden im Anschluss die Prozessstörungen nachgestellt und Gegenmaßnahmen sowie Frühwarnsysteme untersucht.

#### **1.1. Methoden**

##### *1.1.1. Chemische Analysen*

Im Folgenden werden die für die Arbeit verwendeten Flüssig- und Gasanalysen kurz beschrieben.

##### *pH-Wert und Temperatur*

Der pH-Wert und die Temperatur wurden unmittelbar nach der Probenahme mit dem pH-Wert-Messgerät WTW pH 340i und der SenTix 41 pH-Elektrode gemessen.

##### *Trockensubstanz und organische Trockensubstanz*

Die Trockensubstanz (TS) und die organische Trockensubstanz (oTS) wurden nach der DIN 38409-1 bestimmt.

##### *Photometrische Analysen*

Für die photometrischen Analysen wurden die Proben zweimal bei 10.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804) 10 min lang zentrifugiert. Das Pellet aus der ersten Zentrifugation wurde für die anschließende DNA-Extraktion bei -20°C gelagert. Das Zentrat der Flüssigproben wurde mit Schnelltests der Firma Hach-Lange auf die Konzentrationen der organischen Säuren (LCK 365, Summenparameter in Essigsäureäquivalenten), des Calciums (LCK 327) und des Phosphats (LCK 350) untersucht. Die photometrische Auswertung der Schnelltests wurde mit einem Hach-Lange DR2800 Photometer durchgeführt.

##### *Frühwarnindikatoren hinsichtlich Übersäuerung*

Es wurden ein Frühwarnindikator eingesetzt, der aus vorherigen Untersuchungen bekannt war. Er ist als Verhältnis der Konzentration an organischen Säuren zur Calciumkonzentration definiert (FWI-VFA/Ca). Zwei weitere Frühwarnindikatoren wurden in diesem Forschungsvorhaben entwickelt. Der eine ergibt sich aus der Phosphatkonzentration in der wässrigen Phase (FWI-PO<sub>4</sub>) und der andere aus dem Verhältnis aus der Phosphatkonzentration zur Calciumkonzentration (FWI-PO<sub>4</sub>/Ca) (Kleyböcker et al. 2012a).

#### *Ionenchromatographie*

Aus dem zweifach bei 10.000 rpm 10 min lang zentrifugierten Zentrat der Probe wurden Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Iso-Buttersäure und Valeriansäure mit dem Ionenchromatographen (IC) Dionex ICS 3000 bestimmt. Der IC war mit einer AS11-HC Säule ausgerüstet. Als Eluent diente Natronlauge.

#### *Gaschromatographie*

Die Biogasproben wurden mit einem SRI 8610C Gaschromatographen (GC) auf Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Methan und Kohlenstoffdioxid analysiert. Der GC war mit einem TCD (Thermal Conductivity Detector), einer Silicagel Säule und einer Molsieb 13X Säule ausgerüstet. Als Trägergas wurde Argon verwendet.

Während der Probenahme auftretende Luftkontaminationen wurden im Nachhinein herausgerechnet und die Zusammensetzung des Biogases auf 100% korrigiert. Da bei einem anaeroben Prozess der Luftsauerstoff von den Mikroorganismen verwertet wird, während der Stickstoff erhalten bleibt, kann aufgrund des Verhältnisses von Stickstoff zu Sauerstoff und dem Anteil an Sauerstoff im Biogas beurteilt werden, ob es sich um eine Frischluftverunreinigung bei der Probenahme oder um ein Leck am Reaktor handelte. Betrug das Volumenprozentverhältnis von Stickstoff zu Sauerstoff 3,7 und die Menge war gering (< 4%) handelte es sich um eine Frischluftverunreinigung. Spurengase wie Schwefelwasserstoff, Ammoniak und Kohlenmonoxid wurden in der Bilanzierung vernachlässigt.

#### *Tracerstudie*

Als Tracer wurde Uranin (Na<sub>2</sub>C<sub>20</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>), ein fluoreszierender Farbstoff, eingesetzt. Laut Käss (2004) ist Uranin in stark organisch belasteten Grundwässern und Klärschlämmen nicht abbaubar und wird nicht adsorbiert. Eigene Labormessungen bestätigten die Aussagen. Es liegt bei einer Konzentration < 600 g/l gelöst vor, ist biologisch unbedenklich und schon ab geringen Konzentrationen (< 0,002 µg/l) messbar (Käss 2004). Die Fluoreszenz wurde mit einem Lichtleiterfluorimeter mit faseroptischer Sonde der Firma Hermes bestimmt.

Zuerst wurde der Tracer im Labor auf seine Eignung getestet. Im unbehandelten Schlamm war er nicht störungsfrei messbar. Daher wurde die Gärslammprobe (200 ml) bei 10.000 rpm zweimal je 10 min zentrifugiert. Diese Vorgehensweise zur Uraninmessung wird auch von Janke (2008) empfohlen. Zwischen den Zentrifugiervorgängen wurden die Proben dekantiert. Die Probe wurde anschließend unter Lichtausschluss auf ihre Fluoreszenz bestimmt.

Die Fluoreszenzintensität hängt sowohl vom pH-Wert der Probe als auch der Temperatur ab. Daher wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten pH- und Temperaturkorrigiert. Für die pH-abhängige Korrektur wurde der entsprechende Faktor aus Käss (2004, S. 23, Abbildung 10) abgelesen. Für die Temperaturkorrektur wurde die Gleichung nach Herzberg (Käss 2004) verwendet (Formel 1).

Formel 1 
$$F = F_0 e^{-n(t-t_0)}$$

Wobei F, F<sub>0</sub>: Fluoreszenzintensität bei der Temperatur t oder t<sub>0</sub>

t: Temperatur bei der Messung (°C)

t<sub>0</sub>: Bezugstemperatur (°C)

n: Temperaturkoeffizient

Für den Temperaturkoeffizienten gibt es mehrere Vorschläge die sich alle im Bereich zwischen 0,0036 und 0,0041 bewegen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Temperaturkoeffizient gleich 0,004 gesetzt.

Der Tracer wurde als Stoßmarkierung in den großtechnischen Biogasreaktor eingebracht. Das Uranin wurde zuerst in Wasser gelöst und dann über die Zufuhrleitung des Substrats in den Reaktor gepumpt. Die Zufuhr wurde zeitlich mit der nächsten Fettdosierung abgestimmt, so dass eventuelle Reste in der Leitung zusammen mit dem Fett in den Reaktor gelangten. Beprobt wurden der Gärrestabzug und die Schlammumwälzung des Reaktors.

Die Modellierung einer Kaskade idealer Rührkessel wird häufig für die Nachbildung des Verhaltens von technischen Reaktoren verwendet (Kraume 2007). Hierbei wird vorausgesetzt, dass jeder Rührkessel ideal durchmischt ist und kein Rücktransport von Stoff in einem zuvor durchströmten Kessel möglich ist. Zur Charakterisierung der Durchmischung wurden die Messergebnisse sowohl mit einem ideal durchmischten Rührkessel als auch einer Kaskade idealer Rührkessel verglichen. Nach Kraume (2007) berechnet sich die Verteilungsdichtefunktion für einen ideal durchmischten Rührkessel für n = 1 und für eine Kaskade idealer Rührkessel mit n = 2 Rührkesseln und der dimensionslosen Zeitkoordinaten  $t^* = t / \text{HRT}_{\text{ges}}$  nach Formel 2.

Formel 2

$$E(t^*) = ne^{(-nt^*)} \frac{(nt^*)^{n-1}}{(n-1)!}$$

Für die Darstellung der gemessenen Uraninkonzentrationen und den Vergleich mit anderen Modellen wurde der Messwert vereinheitlicht, indem er stets auf die theoretische Anfangskonzentration, die sich nach Janke (2008) nach Formel 3 berechnet, bezogen wurde.

Formel 3

$$c_0 = \frac{M_{Tracer}}{V_{Fluid}}$$

### 1.1.2. Molekularbiologische Analysen

#### *DNA-Extraktion und Genetisches Fingerprinting*

Die DNA aus den Pellets wurde extrahiert und deren Konzentration fluorimetrisch bestimmt. Die mikrobielle Lebensgemeinschaft wurde mit dem genetischen Fingerprinting PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) untersucht, um die dominanten Vertreter der mikrobiellen Gemeinschaft zu identifizieren. Dieses Verfahren hat gegenüber konventionellen mikrobiologischen Verfahren den Vorteil, dass auch schlecht oder nicht kultivierbare Arten erfasst werden. Es handelt sich um ein sensitives Verfahren, da der zu untersuchende Genabschnitt mittels PCR vervielfältigt (amplifiziert) wird. Die amplifizierten Genabschnitte gleicher Größe werden mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend angefärbt. Das somit erzeugte Bandenmuster ist charakteristisch für die untersuchte Biozönose. Dominante Organismen können über die Sequenzierung der DNA einer Bande und mit Hilfe eines Abgleiches mit Datenbanken systematisch eingeordnet werden. Aufgrund der phylogenetischen Einordnung der gefundenen Organismen sind Rückschlüsse auf die von diesen Organismen katalysierten Stoffumsetzungen möglich. Je länger der amplifizierte Genabschnitt ist und je höher die Übereinstimmung der gefundenen Gensequenz mit den in der Datenbank bereits hinterlegten Sequenzen ist, desto genauer ist eine phylogenetische Zuordnung der Sequenz zu einer bestimmten Gattung bzw. Spezies möglich. Ab einer Ähnlichkeit von 96% wird neben der Zuordnung zu einer Gattung auch die Zuordnung zu einer Art vorgenommen. Wenn die gefundenen Mikroorganismen bereits stoffwechselphysiologisch charakterisiert wurden, können Rückschlüsse auf katalysierte Prozesse getroffen werden. Generell ist anzumerken, dass nicht die gesamte Erbinformation, sondern nur ein bestimmter Abschnitt des Gens für die Zuordnung verwendet wird und daher selbst bei 100% Übereinstimmung abweichende Fähigkeiten zu den bereits charakterisierten Organismen möglich sind.

## *Quantifizierung spezifischer Mikroorganismen*

Zur Quantifizierung von Mikroorganismen wurde eine quantitative PCR (qPCR) eingesetzt, womit die Zahl der in einer Probe vorhandenen Genkopien bestimmt wird. Die Genkopien geben Aufschluss über das Vorkommen spezifischer Organismen. Bei der qPCR wird im Gegensatz zur herkömmlichen PCR ein Fluoreszenzfarbstoff mit ins Reaktionsgefäß gegeben, der an doppelsträngige DNA bindet. Im Verlauf der PCR werden Genfragmente vervielfältigt und der Farbstoff bindet an die amplifizierten Fragmente. Je mehr Ausgangsmaterial vorhanden war, desto früher kann eine Fluoreszenz detektiert werden. Somit lassen sich quantitative Aussagen über die untersuchten Mikroorganismen in einzelnen Proben treffen.

## **1.2. Ergebnisse der Betriebsaufnahmen und Untersuchungen an großtechnischen Anlagen**

Der Betrieb der abfallwirtschaftlichen Biogasanlagen KS-Abfall 1, KS-Abfall 2 und Gül-Abfall 1 wurde in dem Vorhaben Optgas wissenschaftlich begleitet und aus den Ergebnissen wurden Optimierungsvorschläge erarbeitet, die den Betreibern zur Verfügung gestellt wurden. Darüberhinaus wurden Gärreste aus der NawaRo-Anlage NawaRo (Referenzanlage) untersucht.

### **1.2.1. Anlage „KS-Abfall 1“**

Die Anlage bestand aus zwei mesophil (38-42°C) betriebenen Kaskaden (1 und 2) mit je 2 vorgeschalteten (R1, R2) und nachgeschalteten Reaktoren (R3, R4) à 8000 m<sup>3</sup> Volumen. Als Substrate wurden eingedickter Mischschlamm (Überschussschlamm und Primärschlamm), Fettabscheiderinhalte, Speisereste und Abfallprodukte aus der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Der vorgeschaltete Reaktor jeder Kaskade wurde mit Mischschlamm beschickt. Der nachgeschaltete Reaktor (R3) in der Kaskade 1 wurde zusätzlich mit Co-Substrat (Fettabscheiderinhalte, Speisereste und Abfallprodukte aus der Lebensmittelindustrie) beschickt. Die Raumbelastung betrug in den Sommermonaten etwa 4 - 4,5 kg oTR m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, während sie in den Wintermonaten wegen vermehrter Schaumbildung auf ca. 2,5 - 3 kg oTR m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> heruntergefahren wurde. Laut Anlagenbetreiber produzierte die Kaskade 1 (Co-Substratzufuhr) ca. 15-20 % zu wenig Biogas bezogen auf die eingesetzte Substratmenge. Als Ursache für die zu geringe Gasausbeute wurde eine Hemmung des biologischen Stoffumsatzes aufgrund der niedrigen Säuregehalte ausgeschlossen, zumal beide Kaskaden auch in etwa gleiche oTS-Abnahmen zeigten. Daher wurde die Durchmischung des nachgeschalteten Reaktors R3 im Hinblick auf mögliche Kurzschlussströme und Stagnationszonen untersucht.

### *Tracerstudie zur Charakterisierung der Durchmischung*

Eine Tracerstudie zeigte, dass der Reaktor unzureichend durchmischt wurde. Hierbei entsprachen 62,5 % des Reaktorinhalts einer Stagnationszone und 37,5 % einer dynamischen Zone (Kleyböcker et al. in prep). In die Stagnationszone wurden 18 % des Substrats und in die dynamische Zone wurden 82 % eingetragen. Die niedrige Verweilzeit von 3,8 d in der dynamischen Zone führte zu einem frühzeitigen Austrag eines Großteils des Substrats aus dem Reaktor. Demnach wurden 19 % des täglich zugeführten Substrates innerhalb eines Tages wieder abgezogen. Wäre der Reaktor ideal durchmischt gewesen, wären täglich 11% des frischen Substrats ausgetragen worden. Es gingen also täglich 8 % des Substrats zur Erzeugung von Energie verloren. Nach einer Verweilzeit von 3,8 d waren somit schon ca. 50 % des frischen Substrates ausgetragen worden. Eine zu kurze Verweilzeit wirkt sich besonders stark bei Fetten aus, da ein vollständiger Abbau in der Regel erst nach 30 Tagen erreicht wird. Es ist daher davon auszugehen, dass die große Stagnationszone für die zu niedrige Methanausbeute ursächlich war.

### *Mikrobielle Gemeinschaft und Ursachen einer Schaumbildung*

Während eines Schaumereignisses im nachgeschalteten Reaktor 3 der Kaskade 1 wurden alle vier Reaktoren (R1, R2, R3, R4) sowie der Schaum vom Überlauf des Reaktors R3 untersucht. Mit Hilfe der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) wurden die Gärreste und der Schaum auf ihre mikrobielle Zusammensetzung hin analysiert. Die Archaea, zu denen die methanproduzierenden Mikroorganismen gehören, unterschieden sich in den einzelnen Reaktoren nicht im Bandenmuster des genetischen Fingerprintings. Die Zusammensetzung der archaeellen Lebensgemeinschaft war demnach für alle vier Reaktoren in Bezug auf die mit der Methode erfassten dominanten Vertreter gleich. Über einen Sequenzvergleich mit einer Online-Datenbank wurde ein unkultiviertes Archaeon der Ordnung Methanomicrobiales identifiziert. Vertreter der Ordnung Methanomicrobiales verwerten hauptsächlich Wasserstoff und Kohlendioxid zur Methanbildung. Im Schaum wurden zwar die gleichen Banden gefunden wie in den Gärresten der Reaktoren, diese waren aber sehr viel schwächer ausgeprägt. Der Grund hierfür könnte eine geringe Anzahl an Archaeen im Schaum sein.

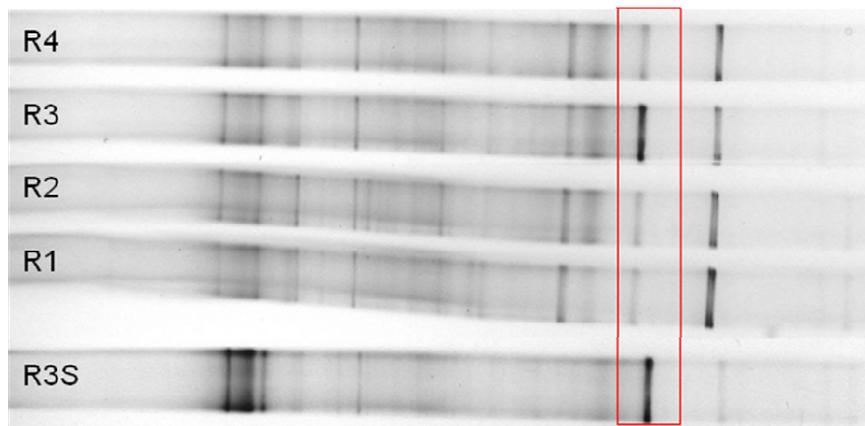


Abbildung 1: Charakterisierung der bakteriellen Biozöosen der Gärreste der 4 Reaktoren (R1-R4) sowie des Schaums von Reaktor 3 (R3S) der Biogasanlage KS-Abfall 1. Banden von *Microthrix parvicella* sind rot markiert.

Ein Vergleich der DGGE-Bandenmuster für Bacteria zeigte eine veränderte Zusammensetzung im Schaum und auch im Gärrest des schäumenden Reaktors 3 (Abbildung 1). Auffällig war, dass in allen Reaktoren Kandidatus *Microthrix parvicella* nachgewiesen wurde, der dafür bekannt ist, dass er in Kläranlagen an der Schaumbildung beteiligt ist und auch in Biogasanlagen mit Schaumbildung in Verbindung gebracht wird. Im schäumenden Reaktor 3 sowie im Schaum dieses Reaktors, waren die Banden von *M. parvicella* im Gelbild erheblich intensiver als in den drei anderen Reaktoren. Dieser semiquantitative Befund deutete darauf hin, dass sich die Menge dieses Mikroorganismus während der Schaumbildung deutlich erhöhte und dieser daher vermutlich ursächlich an der Schaumbildung beteiligt war (Lienen et al. 2013a). Das Vorkommen filamentöser Strukturen im Schaum wurde auch durch mikroskopische Analysen gezeigt (Abbildung 2).

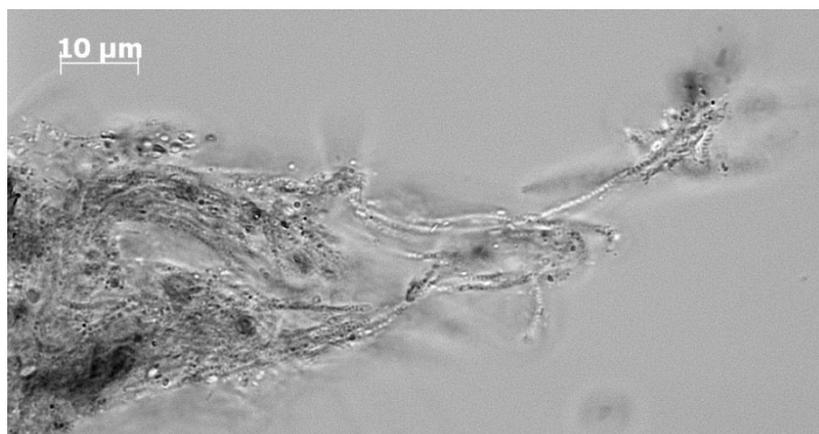


Abbildung 2: Filamentöse Strukturen im Schaum (Durchlicht-Mikroskopie, 63x Vergrößerung)

Neben *M. parvicella* kam auch das Aminosäure fermentierende Bakterium Candidatus *Cloacamonas acidaminovorans* verstärkt im Schaum vor. Da die Schaumbildung häufig im Zusammenhang mit erhöhten Proteinwerten steht, könnte *C. cloacamonas* als Indikator für einen hohen Proteingehalt dienen. Desweiteren wurden in den Reaktoren noch das cellulolytische Bakterium *Ruminococcus flavefaciens* und ein unkultiviertes Bakterium der Klasse Spirochaetes identifiziert. Mitglieder der Klasse Spirochaetes wurden in gegenwärtigen Studien als syntrophe Acetat Oxidierer charakterisiert. Die bei der Acetat-Oxidation entstehenden Wasserstoff und Kohlendioxid können dann von hydrogenotrophen Methanogenen in Methan umgesetzt werden.

#### *Quantifizierung des „Schaumbildners“ Microthrix parvicella*

In einer relativen Quantifizierung mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR) und mit für *M. parvicella* spezifischen Primern wurden die semiquantitativen Ergebnisse des genetischen Fingerprintings verifiziert. Relativ zur Menge der gesamten bakteriellen DNA wurden im schäumenden Reaktor und im Schaum um den Faktor 2 erhöhte DNA-Mengen von *M. parvicella* gefunden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass *M. parvicella* im schäumenden Reaktor Vorteile gegenüber den anderen Bakterien hatte und zum Schaumereignis beitrug. *M. parvicella* begünstigt durch seine filamentöse Struktur und eine hydrophobe Zelloberfläche die Schaumbildung sowohl in Kläranlagen als auch in Biogasanlagen. Das produzierte Biogas trägt die Filamente an die Schlammoberfläche und stabilisiert den Schaum. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung wurden im Anschluss durch eine spezifische absolute Quantifizierung mit der qPCR bestätigt. Hierbei wurden 2-fach höhere Genkopienzahlen von *M. parvicella* im schäumenden Reaktor detektiert (Abbildung 3). Ein zweites Schaumereignis in der betroffenen Biogasanlage zeigte ebenfalls um den Faktor 2 erhöhte Genkopien im schäumenden Reaktor und wies damit auf eine Verdopplung der Zellzahlen hin.

*M. parvicella* wird in der Literatur als aerob wachsendes Bakterium charakterisiert, das unter anoxischen oder anaeroben Bedingungen Speicherstoffe wie langkettige Fettsäuren anlegen und für den Zellstoffwechsel verwenden kann. Wachstum ist auch mit Nitrat möglich, dieses wird allerdings nur bis zum Nitrit reduziert. In der untersuchten Biogasanlage erhöhte sich die *M. parvicella* Genkopienzahl von Reaktor 1 zum nachgeschalteten Reaktor 3 um den Faktor 2. Dieses deutet auf anaerobes Wachstum ohne Nitrat hin, da Nitrat bereits in den vorherigen Schritten der Abwasseraufbereitung bzw. spätestens im vorgeschalteten Reaktor denitrifiziert wurde und dementsprechend in Reaktor 3 nicht mehr zur Verfügung gestanden haben kann. Ein weiterer Grund für die doppelt so hohe Abundanz in Reaktor 3 könnte auch die Verweilzeit

sein, da die Menge in den Reaktoren 1 und 3 zwar zeitgleich untersucht wurde, aber Verweilzeiteffekte können den Vergleich erschweren. So könnte es schon einige Tage vorher zu einem großen Eintrag von *M. parvicella* in Reaktor 3 gekommen sein. Die erhöhte Abundanz im nachgeschalteten Reaktor könnte somit auch durch das Verweilzeitverhalten verursacht sein. Dementgegen spricht allerdings das zweite Schaumereignis einen Monat später. Hier wurde ebenfalls eine Verdoppelung der Abundanz von *M. parvicella* im schäumenden Reaktor nachgewiesen. Die Werte überstiegen den Eintrag von *M. parvicella* aus Reaktor 1, der etwa eine Verweilzeit vorher gemessen wurde, um den Faktor 3. Daher ist davon auszugehen, dass Verweilzeiteffekte nicht die wesentliche Ursache für die erhöhte Abundanz von *M. parvicella* im nachgeschalteten Reaktor sind. Anscheinend konnte er sich im Reaktor vermehren, obwohl hier weder Sauerstoff noch Nitrat als Elektronenakzeptor gewesen sein sollten.

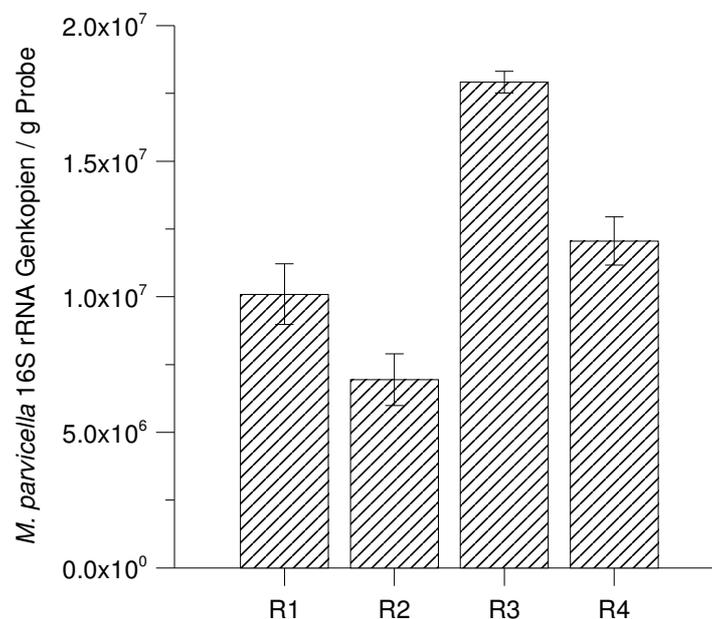


Abbildung 3: *M. parvicella* Genkopien pro g Probe in den Reaktoren 1 bis 4 während des Schaumereignisses (qPCR). Stark erhöhte Werte im schäumenden Reaktor 3 im Gegensatz zu den nicht betroffenen Reaktoren 1, 2 und 4.

Auch die Fettzugabe in Reaktor 3 könnte aufgrund von Flotationseffekten ursächlich für das Schäumen sein. Fette sind dafür bekannt, dass sie eine Schaumbildung in Kläranlagen und Biogasanlagen verursachen können. Die Fette verfangen sich zwischen den Filamenten der Mikroorganismen und durch ihre hydrophobe Oberfläche steigen diese zusammen mit angehefteten Gasblasen an die Oberfläche des Gärslammes und transportieren damit auch die Filamente (Flotationseffekt). Im Zuge der beobachteten Schaumereignisse wurden etwa 500 Tonnen Fett pro Monat im nachgeschalteten Reaktor co-vergoren. Vermutlich lagerten

sich die Fette an der Schlammoberfläche ab und verursachten in Verbindung mit dem erhöhten Vorkommen von *M. parvicella* die Schaumbildung. Die beim Abbau entstehenden langkettigen Fettsäuren könnten eine Vermehrung von *M. parvicella* gefördert haben. Die langkettigen Fettsäuren dienten vermutlich als Speicherstoff. Somit könnte *M. parvicella* einen Selektionsvorteil gegenüber den anderen Bakterien gehabt haben. Da auch in den Folgemonaten Fettmengen von mehr als 500 Tonnen pro Monat co-vergoren wurden, hier aber kein Schäumen auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass nicht das Fett allein zum Schäumen führte. Vielmehr war auch die Menge an eingetragenen *M. parvicella* entscheidend für das Schäumen. Erst als ein Schwellenwert überschritten wurde, trat Schaum im Reaktor auf.

#### *Einfluss der Temperatur auf das Vorkommen von M. parvicella*

Da aus der Literatur zur Abwasserbehandlung bekannt ist, dass das Vorkommen von *M. parvicella* jahreszeitliche Abhängigkeiten zeigt, wurde der zur Schaumbildung neigende Reaktor über den Zeitraum von einem Jahr auf das Vorhandensein von *M. parvicella* mit der PCR-DGGE (allg. Bacteria-Primer) analysiert. Es zeigte sich, dass *M. parvicella* zwar über das ganze Jahr im Reaktor nachgewiesen wurde, sich die Menge in den kälteren Monaten (Oktober – März) erhöhte (Abbildung 4).

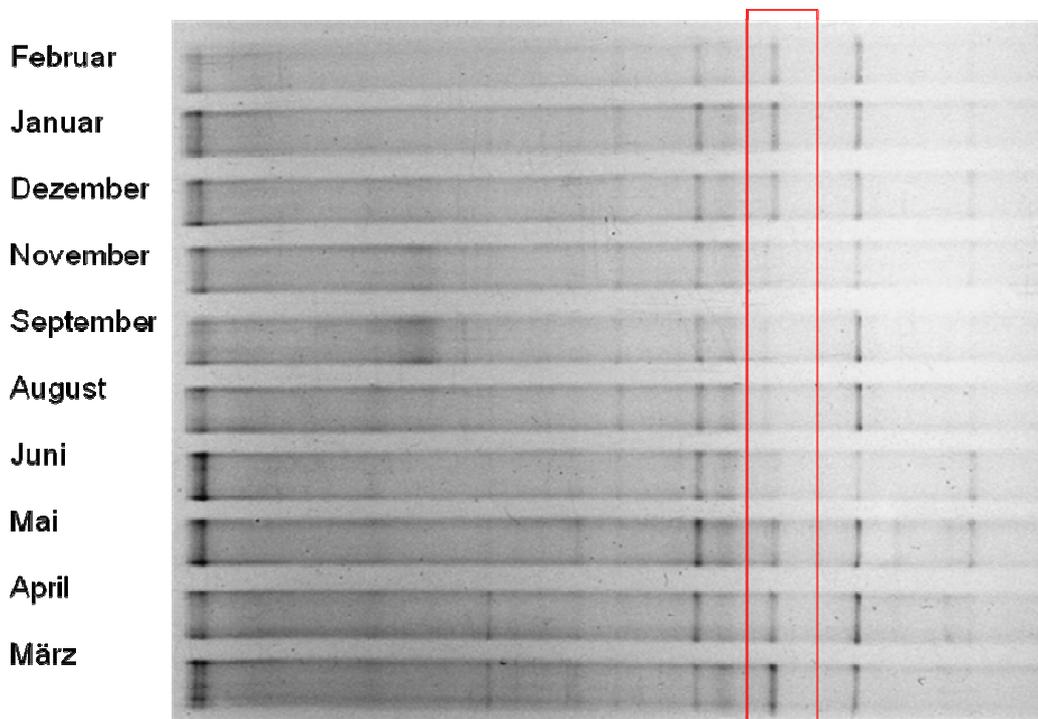


Abbildung 4: Charakterisierung der bakteriellen Biozöosen des zur Schaumbildung neigenden Reaktors 3 über den Zeitraum eines Jahres. Banden von *M. parvicella* sind rot markiert.

Eine spezifische quantitative Analyse mit der qPCR bestätigte die Ergebnisse des genetischen Fingerprintings und belegte ebenfalls ein vermehrtes Vorkommen von *M. parvicella* in den kälteren Monaten (Abbildung 5). Während die Genkopien in Monaten mit durchschnittlichen Temperaturen unter 13°C über  $1 \times 10^6$  / g lagen, nahmen diese in den wärmeren Monaten um den Faktor 10 ab (Lienen et al. 2013a). Auch das Schaumrisiko wurde vom Anlagenbetreiber entsprechend zum stärkeren Vorkommen von *M. parvicella* für die Wintermonate als erhöht angegeben. Wiederum wurden für einige Monate (Mai, Juni, September, November) höhere *M. parvicella* Genkopien im nachgeschalteten Reaktor 3 als in Reaktor 1 detektiert, wodurch die Hypothese des anaeroben Wachstums unterstützt wurde. Analysen des eingetragenen Klärschlammes zeigten die gleichen jahreszeitlichen Verläufe wie der Schlamm aus den Reaktoren 1 und 3. Der Eintrag von *M. parvicella* durch das Substrat war somit ebenfalls ursächlich an der Schaumbildung in den Wintermonaten beteiligt. Höhere Eintragswerte führten auch zu höherem Vorkommen in dem nachgeschalteten Reaktor und damit zu einem höheren Schaumrisiko.

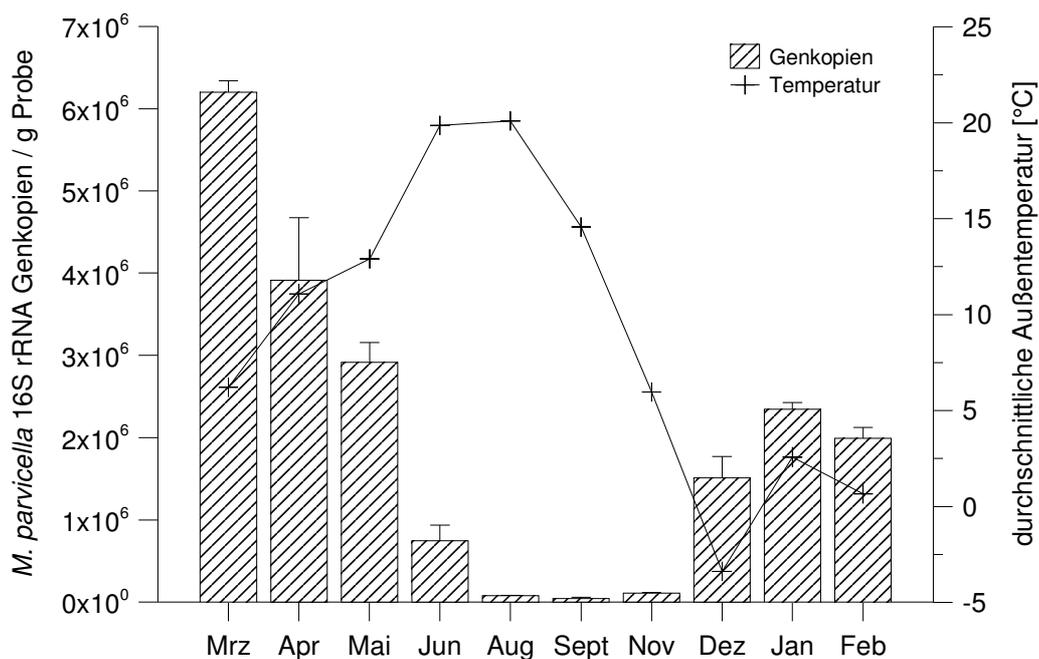


Abbildung 5: Vorkommen von *M. parvicella* über das Jahr (qPCR). Geringere Genkopienanzahl in den wärmeren Sommermonaten von Juni bis November.

### 1.2.2. Anlage „KS-Abfall 2“

Die mesophil (37°C) betriebene Biogasanlage KS-Abfall 2 bestand aus zwei Reaktoren mit jeweils 2300 m<sup>3</sup> Volumen. Als Substrate wurden Mischschlamm (Überschussschlamm und Primärschlamm), Maische (überlagerte Lebensmittel) und Fette (Fettabscheider, Reststoffe aus der Biodieselproduktion) verwendet. Bei einer durchschnittlichen Raumbelastung von ca.

3,2 kg oTS m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> lag die Gasausbeute bei ca. 0,5 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub> (kg oTS d)<sup>-1</sup>. Der pH-Wert befand sich in beiden Reaktoren ca. bei pH 7,2, wobei die Konzentration organischer Säuren zwischen 200 mg l<sup>-1</sup> und 300 mg l<sup>-1</sup> streute. Der Calciumgehalt betrug zwischen 20 mg l<sup>-1</sup> und 60 mg l<sup>-1</sup>.

### *Übersäuerung und Entsäuerung*

Nach Zufuhr eines neuen Substrates „MONG“ (matter organic non glycerin; ein Nebenprodukt der Biodiesel-Herstellung) kam es in beiden Reaktoren zu einer Übersäuerung. Die Säuren stiegen um ihren 10-fachen Wert bei Normalbetrieb auf 3360 mg l<sup>-1</sup> (R1) und 2270 mg l<sup>-1</sup> (R2) an. Die Gasausbeute sank um 60 % auf 0,2 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub> (kg oTS d)<sup>-1</sup> und der pH-Wert fiel auf pH 6,8 (R1) und pH 6,99 (R2). Zur Stabilisierung des Prozesses wurde Calciumoxid eingesetzt. Es wurde einmalig direkt in die Reaktoren und nachfolgend in den Maischespeicher dosiert. Täglich wurde jedem Reaktor 6 Mal Maische zugeführt und somit auch das in der Maische enthaltene Calciumoxid. Der Calciumgehalt der Gärslämme stieg daraufhin kurzzeitig auf 170 mg l<sup>-1</sup> (R1) und 140 mg l<sup>-1</sup> (R2) an. Die Säuren sanken stetig bis beide Reaktoren nach etwa 20 Tagen entsäuert waren.

Während der Entsäuerung wurde die Bildung von kleinen gelblichen Ausfällungen im Gärslamm beobachtet, die eine Größe von etwa 1,5 mm besaßen. Die Analyse der Ausfällungen erfolgte mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops in Kombination mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (REM-EDS). Die Oberfläche der Aggregate war durch einen Überzug mit einem sehr kohlenstoffreichen Material gekennzeichnet (Abbildung 6a).

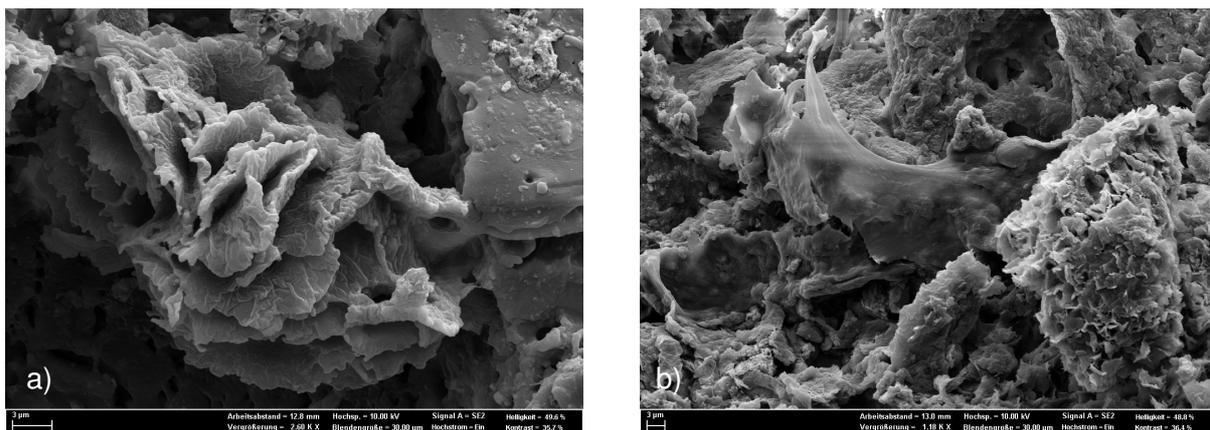


Abbildung 6: a) Kohlenstoffhaltige Oberfläche der Aggregate b) Nachweis von Biofilmen und Magnesium- und Aluminiumphosphate im Kern der Aggregate (REM-EDX).

Es wird vermutet, dass es sich bei dem kohlenstoffhaltigen Material um langkettige Fettsäuren handelt. Wahrscheinlich fanden Adsorptionsprozesse der langkettigen Fettsäuren an die

Aggregate statt. Der Adsorptionsprozess entzog die langkettigen Fettsäuren der gelösten Phase und verringerte somit ihre Verfügbarkeit. Hierdurch wurde die hemmende Wirkung langkettiger Fettsäuren vermindert und der Prozess stabilisierte sich. Im Inneren der Aggregate wurden Biofilme beobachtet, wobei der mineralische Kern aus Magnesium- und Aluminiumphosphaten bestand (Abbildung 6b).

#### *Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft*

Die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose veränderte sich während der Übersäuerung. Mit Beginn der Übersäuerung wurde *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans* mit dem genetischen Fingerprinting (allg. Bacteria-Primer) nicht mehr erfasst, während ein bisher noch nicht weiter charakterisiertes Deltaproteobakterium erst während der Übersäuerung detektiert wurde. Über *C. acidaminovorans* ist wenig bekannt. Umfassende Analysen der Erbinformation deuten auf die Fähigkeit von *C. acidaminovorans* zur Degradation von Proteinen hin (Pelletier et al. 2008). Vermutlich wurde *C. acidaminovorans* durch die erhöhten Säurewerte gehemmt, während das Deltaproteobakterium offensichtlich durch die hohen Säurekonzentrationen begünstigt wurde und die bakterielle Lebensgemeinschaft dominierte. Daneben wurde noch ein uncharakterisiertes Thermotogae Bakterium identifiziert, das über den gesamten Verlauf des Versuchs nachgewiesen wurde und somit offensichtlich an die hohen Säurewerte angepasst war. Bakterien dieser Klasse besitzen die Fähigkeit komplexe Kohlenhydrate zu verwerten. Das genetische Fingerprinting der archaeellen Gemeinschaft war nicht erfolgreich. Vorherige Studien der methanogenen Lebensgemeinschaft während einer Übersäuerung in der untersuchten Biogasanlage zeigten keine Veränderungen im genetischen Fingerprinting.

#### **1.2.3. Anlage „Gül-Abfall“**

In der Biogasanlage Gül-Abfall wurde zweistufig vergoren. Die Anlage bestand aus zwei Hydrolysereaktoren mit einem Volumen von jeweils 520 m<sup>3</sup> sowie zwei mesophil (37°C) betriebenen methanogenen Reaktoren N1 und N2 mit einem Volumen von jeweils 2300 m<sup>3</sup>. Die erste Stufe wurde mit einem pH-Wert zwischen 5 und 6 betrieben, während der pH-Wert in der Zweiten zwischen 7 und 8 lag. Die Raumbelastung lag zwischen 2 und 2,5 kg oTS m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Als Substrate wurden Fisch-, Speise-, Flotatabfälle, Blut, Fettabscheiderinhalte, Bioschlämme, Reststoffe aus der Rapsölpressung, Getreideschlämme und Melasse eingesetzt. Die hydraulische Verweilzeit betrug 26 Tage. Im Normalbetrieb lagen die Konzentrationen der organischen Säuren in der ersten Stufe bei 18.000 mg l<sup>-1</sup> und in der zweiten Stufe bei 1900 mg

l<sup>-1</sup>. Der Trockenrückstand (TR) betrug im Durchschnitt 4,4 % und der organische Trockenrückstand (oTR) 2,6 %.

#### *Langzeitmonitoring: Warnung vor einer Übersäuerung durch FWI und Schaumereignis*

Über einen Zeitraum von einem Jahr wurden in Abständen von etwa zwei Wochen Gärreste der Anlage untersucht. Während des Normalbetriebs lagen die Konzentrationen an organischen Säuren zwischen 600 und 1300 mg l<sup>-1</sup>, der Calciumgehalt zwischen 21 und 78 mg l<sup>-1</sup> und der Magnesiumgehalt zwischen <3 und 16 mg l<sup>-1</sup>. Als der Frühwarnindikator FWI-VFA/Ca nach zwei Monaten Monitoring vor einer Übersäuerung durch seinen fünffachen Anstieg eine Warnung anzeigte, lag der Gehalt der organischen Säuren mit 2700 mg l<sup>-1</sup> wesentlich höher als im Normalbetrieb und der Calciumgehalt war mit 23 mg l<sup>-1</sup> relativ niedrig. Die Gasproduktion sank nach der Warnung des FWI-VFA/Ca um 36 %. Der Prozess stabilisierte sich jedoch innerhalb von 14 Tagen wieder.

Während des Langzeitmonitorings kam es zu einem Schaumereignis. Die Analyse der Gärreste deutete auf keine Hemmung der Mikroorganismen durch organische Säuren oder Ammonium hin. Die Auswertung der betrieblichen Daten zeigte, dass der Grund der Schaumbildung ein plötzlicher Anstieg der Temperatur des Reaktorinhaltes war.

#### *Anlagenstörung: keine Durchmischung*

Der Motor des Rührwerks von Reaktor N1 und das obere Paddel des Rührwerks von Reaktor N2 fielen für vier Monate aus. Dieser Zeitraum wurde genutzt, um die Auswirkung des Rührens auf den Prozess der Biogasbildung zu untersuchen. Um das Paddel des Reaktors N2 zu reparieren, wurde der Reaktor geöffnet und in diesem Zuge wurde auch eine gebildete Schwimmschicht untersucht. Nach zwei Tagen ohne Umwälzung hatte sich der Trockenrückstand des Gärrests von Reaktor N1 um das 1,5-fache erhöht, wobei der organische Anteil konstant blieb. Nach vier Tagen sank der Trockenrückstand jedoch wieder auf das Ausgangsniveau. Der Trockenrückstand des Gärrests aus Reaktors N2 blieb auf dem gleichen Niveau wie der aus Reaktor N1 vor dem Rührerausfall. Die Verläufe der Konzentration der organischen Säuren, des Phosphats, des Calciums und des Magnesiums zeigten keine signifikanten Veränderungen. Nach dem Ausfall des Rührers nahm die Gasproduktion ab. Bezogen auf die Biogasproduktion in den ersten beiden Monaten des Rührwerksausfalls, wurden im dritten Monat 66 % und im vierten Monat 84 % produziert. Bei der Bewertung ist jedoch zu berücksichtigen, dass neben einer unvorteilhaften Durchmischung auch Änderungen der Substratmatrix und –menge die Biogasproduktion beeinflussten.

Während des Rührwerksausfalls und nach Wiederinbetriebnahme wurden die Gärreste beider Reaktoren und die gebildete Schwimmschicht aus Reaktor N2 auf ihre bakterielle Zusammensetzung hin analysiert. Während das genetische Fingerprinting-Muster der Schwimmschicht und des Gärrestes identisch war, zeigten sich zwischen beiden parallel betriebenen Reaktoren Unterschiede (Abbildung 6). Eine Bande, die einem noch nicht weiter klassifizierten Bakterium zugeordnet wurde, wurde über den Verlauf des Rührerausfalls in Reaktor N1 intensiver während ihre Intensität in Reaktor N2 abnahm.

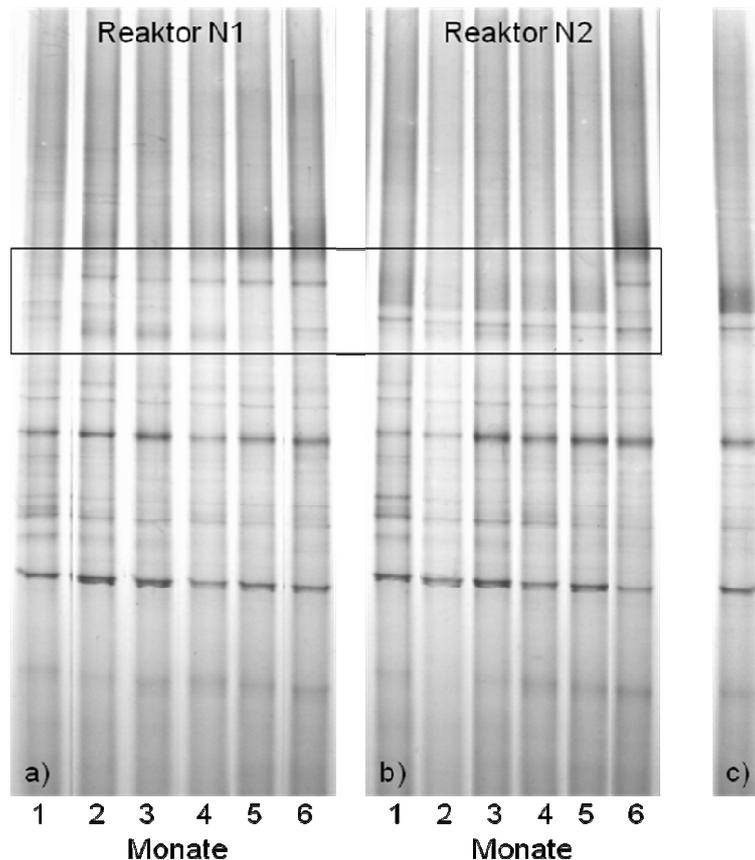


Abbildung 6: Charakterisierung der bakteriellen Biozönosen über einen Zeitraum von sechs Monaten von Reaktor N1 (a) mit komplettem Rührwerksausfall und Reaktor N2 (b) mit Ausfall eines Rührpaddels. In Monat 5 wurden die Störungen behoben. Signifikante Unterschiede in der bakteriellen Biozönose während des Ausfalls der Rührtechnik und Anpassung der Biozönosen nach Wiederinbetriebnahme der beiden Rührer (markiert). Die Schwimmschicht (c) aus Reaktor 2 unterschied sich nicht vom Gärrest.

Nach Wiederinbetriebnahme der Rührwerke glichen sich die Bandenmuster der beiden Reaktoren wieder an. Identifizierungen der dominanten Banden zeigten, dass die mikrobielle Gemeinschaft von Mitgliedern des Stammes Firmicutes dominiert wurde. Bakterien dieser Abteilung verstoffwechseln komplexe organische Verbindungen und kommen in den meisten

Biogasanlagen vor. Desweiteren wurden Mikroorganismen der Stämme Bacteroidetes und Chloroflexi in beiden Reaktoren identifiziert. Mehrere Arten dieser Ordnungen wachsen filamentös. Die Filamente könnten die Schwimmschichtenbildung gefördert haben (Lienen et al. 2013b). Da nur Reaktor N2 geöffnet wurde, ist nicht bekannt, ob sich auch in Reaktor N1 eine Schwimmschicht gebildet hat. Durch den Ausfall des Rührwerks ist dieses aber sehr wahrscheinlich.

Der TR-Gehalt der Schwimmschicht (Reaktor N2) war gegenüber dem Gärrest um das 4-fache, der oTR-Gehalt um das 3,5-fache und der Gehalt an Fettsäuren um das 2-fache erhöht. Dagegen war die Ammoniumkonzentration mit  $2300 \text{ mg l}^{-1}$  in der Schwimmschicht um ca. 1/3 geringer als im Gärrest mit  $3300 \text{ mg l}^{-1}$ . Die Konzentrationen von Phosphat, Calcium und Magnesium zeigten keine signifikanten Unterschiede. Sowohl die organischen Säuren als auch der oTR-Gehalt zeigen eine Akkumulation von organischem Material in der Schwimmschicht. Offensichtlich wurde das Substrat infolge der Rührwerksstörung nicht mehr ausreichend im Reaktor verteilt und es bildete sich eine Schwimmschicht, in der der Abbau suboptimal ablief und die zudem die Gasabfuhr behinderte.

#### **1.2.4. Anlage „NawaRo“**

In der mit nachwachsenden Rohstoffen betriebenen Referenzanlage NawaRo wurden Maissilage und Grassilage co-vergoren. Sie bestand aus 5 Modulen mit jeweils 4 Reaktoren. Jeder Reaktor wies ein Volumen von  $4650 \text{ m}^3$  auf. Die Raumbelastung betrug  $4,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ .

##### *Leistungsabfall in einem Reaktor*

In einem der Module erbrachte ein Reaktor F1 bei einer Raumbelastung von  $4,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  die erwartete Leistung, während Reaktor F2 bereits bei einer Raumbelastung von  $2,9 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  in seiner Leistung stark abnahm. Die organischen Säuren unterschieden sich in der Konzentration um ca.  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ . F1 hatte einen Gehalt von  $3940 \text{ mg l}^{-1}$  und F2 von  $4930 \text{ mg l}^{-1}$ . Die pH-Werte befanden sich für F1 bei 7,5 und für F2 bei 7,6.

Gärreste der beiden Reaktoren wurden mittels genetischem Fingerprinting analysiert. Bei den Bacteria wurden nur geringe Unterschiede im Bandenmuster zwischen den beiden Reaktoren festgestellt. Bei einem Gärrest des leistungsschwachen Reaktors F1, der eine Woche später genommen wurde, ließ sich allerdings ein abweichendes Bandenmuster feststellen, was auf eine Veränderung der bakteriellen Gemeinschaft schließen lässt. Der Gehalt an organischen Säuren war innerhalb dieser Woche um  $500 \text{ mg l}^{-1}$  gesunken, was auf eine Verbesserung des Abbaus der organischen Säuren zu Biogas und somit auf eine Leistungssteigerung des Reaktors hindeutete. Es wurden sowohl dominante Mikroorganismen identifiziert, die in beiden

Reaktoren vorhanden waren, als auch welche, die sich vom leistungsstarken zum leistungsschwachen Reaktor unterschieden. In beiden Reaktoren wurden das Bakterium *Ruminococcus xyloxyticum*, das am Aufschluss von Cellulose beteiligt ist, und ein bisher nicht kultiviertes Bakterium der Ordnung Bacteroidetes identifiziert. Desweiteren wurden zwei weitere aus der Klasse Clostridia stammende Mikroorganismen nur im leistungsschwachen Reaktor F2 nachgewiesen. Die für Biogasreaktoren typischen Clostridien haben lytische Eigenschaften und können sowohl Proteine als auch Kohlenhydrate spalten. Innerhalb der Archaea zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede im genetischen Fingerprinting bezüglich der dominanten Mikroorganismen. *Methanobacterium beijingense* sowie ein unkultiviertes Archaeon wurden als dominante Vertreter identifiziert.

#### *Schaumereignisse*

Im ersten Halbjahr 2010 wurde in Reaktoren eines anderen Moduls mehrmals Schaumbildung beobachtet. Die Fingerprinting-Analyse zeigte keine Veränderungen in der bakteriellen Zusammensetzung. Als Ursache der Schaumbildung wurde vom Betreiber ein geändertes Substrat vermutet.

Aufgrund der Schaumbildung wurden die Reaktoren des Moduls für das Langzeitmonitoring von Januar bis Juni 2011 ausgewählt, sie zeigten jedoch in diesem Zeitraum keine Schaumbildung.

### **1.3. Ergebnisse der Untersuchungen im Labor**

Im Labor des GFZ wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die für die Großtechnik ein zu großes Risiko darstellten bzw. aufgrund der wechselnden Substratzusammensetzung nicht hinreichend genau untersucht werden konnten. Hierzu zählten z.B. schnelle Leistungssteigerungen und provozierte Prozessstörungen, um Frühwarnsysteme für Störungen und geeignete Gegenmaßnahmen zu entwickeln.

#### **1.3.1 Übersäuerung**

*Animpfmaterial und Substrat aus der Anlage „KS-Abfall 1“: Zeigt der FWI-VFA/Ca Störungen auch bei diesem Substratmix frühzeitig an?*

Drei Laborreaktoren wurden mit Animpfmaterial der Biogasanlage KS-Abfall 1 angefahren und mit eingedicktem Mischschlamm beschickt. Die tägliche Raumbelastung betrug  $0,6 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Nach einer zweimonatigen Anfahrphase wurde Rapsöl als Co-Substrat eingesetzt, wodurch die Raumbelastung auf  $1,8 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  erhöht wurde. Die Co-Substratzufuhr verursachte bei allen drei Reaktoren einen Rückgang der Biogausausbeute um ca. 50 %. Weil die Gasbildungsrate infolge der erhöhten Substratzufuhr stieg, war die Hemmung zunächst

nicht offensichtlich. Der Verlauf des FWI-VFA/Ca zeigte bereits beim ersten Einsatz des Co-Substrates einen deutlichen Anstieg über sein Normalniveau ( $< 20$ ) auf 40 bis zu 120.

Die Störung des Prozesses aufgrund eines unbeabsichtigten Sauerstoffeintrags über die pneumatische Umwälzung wurde ebenfalls durch den Verlauf des FWI-VFA/Ca angezeigt. Er stieg von seinem Normalniveau ( $< 20$ ) auf 34. Die kurzfristige Störung wirkte sich jedoch in so einem geringen Maß aus, dass sie die Biogasausbeute nicht verringerte, obwohl der Sauerstoffanteil im Biogas temporär bei 10 % lag.

*Untersuchung eines Reststoffs aus der Biodieselproduktion auf seine Eignung als Co-Substrat in der Biogaserzeugung („Schleimstoff“): Ist die Anwendbarkeit der FWI auf dieses Substrat möglich?*

Ein Reststoff aus der Biodieselproduktion ist der sogenannte „Schleimstoff“. Um die Eignung des Schleimstoffs als Co-Substrat in der Biogasproduktion zu testen, wurde er einem Reaktor zugeführt, der mit Mischschlamm und Sonnenblumenöl betrieben wurde. Die tägliche Schleimstofffracht wurde alle 8 Tage um  $0,44 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  erhöht. Die theoretische Biogasausbeute wurde nach Buswell zu  $1,44 \text{ m}^3 \text{ Biogas (kg oTS)}^{-1}$  bestimmt. Die experimentelle Biogasausbeute betrug bei einer Schleimstofffracht von  $0,44$  und  $0,88 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  unter stabilen Prozessbedingungen ca.  $1,5 \text{ m}^3 \text{ Biogas (kg oTS)}^{-1}$ . Bei der weiteren Erhöhung der Schleimstofffracht auf  $1,3 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  verringerte sich die Biogasausbeute des Schleimstoffs um fast die Hälfte. Bezogen auf die Biogasausbeute der gesamten Substratmatrix machte dies jedoch nur einen Verlust um 15 % aus. Das entspricht einem Schwankungsbereich der in der Praxis oft aufgrund von wechselnden Substratarten auftritt und in der Regel nicht als Indikator für eine Prozessstörung interpretiert wird. Da die Ausbeute in diesem Zeitraum tendenziell wieder anstieg, schien dies auf die Stabilisierung des Prozesses hinzuweisen. Der FWI-VFA/Ca jedoch zeigte eine andere Tendenz an: Während der FWI-VFA/Ca bei der Substratkombination von Mischschlamm und Sonnenblumenöl mit einer Raumbelastung von  $2,4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  bei durchschnittlich 13 lag, blieb er bis zu einer Raumbelastung von  $3,3 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (inkl.  $0,88 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  Schleimstoff) in einem Bereich bis maximal 15. Nachdem die Raumbelastung auf  $3,8 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  (inkl.  $1,3 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  Schleimstoff) erhöht worden war, stieg der FWI-VFA/Ca nach 4 Tagen erst auf 20 und drei Tage später um seinen dreifachen Wert auf 44. Zu diesem Zeitpunkt befand sich der pH-Wert noch in einem neutralen Bereich. Schließlich nahm der FWI-VFA/Ca zwei Tage später auf 83 zu. Er wies somit eindeutig auf die Gefahr einer Übersäuerung hin. Vier Tage danach erreichte die Gasproduktion nur noch 15 % von ihrem Erwartungswert und zeigte somit eine vollständige Übersäuerung an. Die Phosphatkonzentration (FWI- $\text{PO}_4$ ) als zweites

Frühwarnsystem zeigte im Vergleich zum FWI-VFA/Ca einen um 4 Tage früheren Anstieg in ihrem Verlauf. Während sie im stabilen Prozesszustand in einem Bereich von  $1500 \text{ mg l}^{-1}$  lag, stieg sie 3 Tage nach der Erhöhung der Raumbelastung auf  $3,8 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  um das Doppelte und zeigte somit ebenfalls eine Prozessinstabilität an. Beide FWI haben somit zuverlässig und rechtzeitig vor der Übersäuerung gewarnt. Die Schleimstofffracht von  $1,3 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  war für einen langfristig stabilen Betrieb des Reaktors zu hoch. Generell sollte nicht mehr als  $0,9 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  an Schleimstoff in den Reaktor gefahren werden.

### Entsäuerung mit CaO

Während eines Entsäuerungsvorgangs mit CaO wurden die Substrate Mischschlamm, Sonnenblumenöl und organische Reststoffe aus der Biodieselproduktion („Schleimstoff“) eingesetzt.

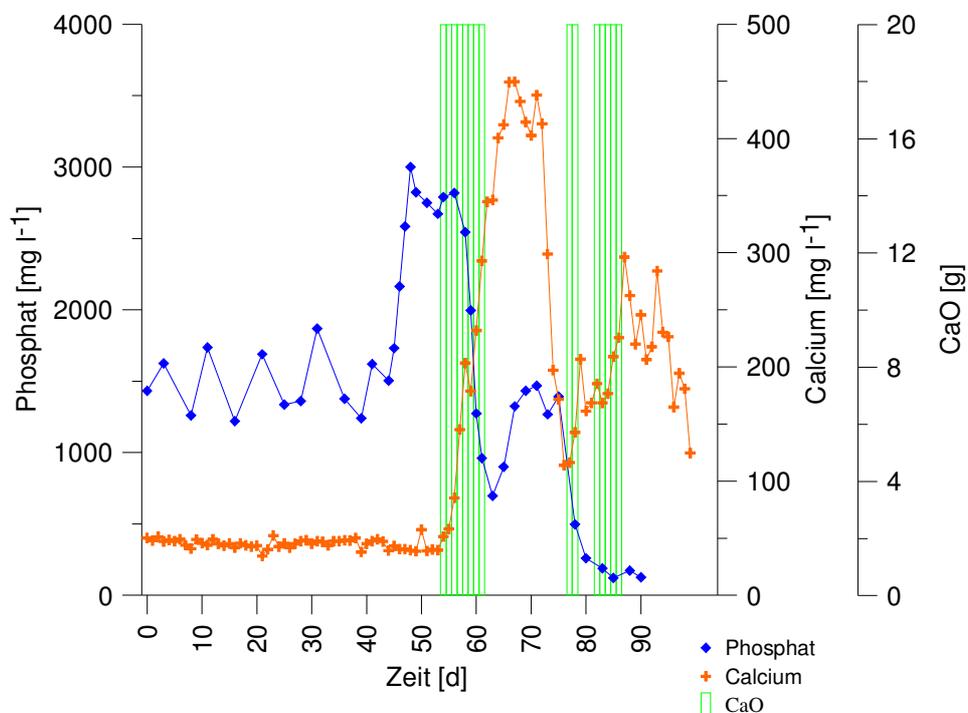


Abbildung 7: Verlauf von Calcium und Phosphat: Absinken der Calcium- und Phosphatkonzentration nach zweiwöchiger Dauer der Prozessstörung.

Nachdem der Gärtschlamm durch eine Überfrachtung mit „Schleimstoff“ übersäuert worden war, wurde eine Woche lang  $20 \text{ g CaO pro Tag}$  zur pH-Wert-Anhebung und Entsäuerung eingesetzt. Der Calciumgehalt nahm in den ersten zwei Wochen der Prozessstörung von  $40 \text{ mg l}^{-1}$  auf  $400 \text{ mg l}^{-1}$  zu, wobei er jedoch um den Faktor 15 niedriger war als rechnerisch zu erwarten war. Der Phosphatgehalt sank zeitgleich von  $4700 \text{ mg l}^{-1}$  auf  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ . Dieses wies auf Ausfällungen von Calciumphosphat hin (Abbildung 7).

Im Gegensatz zu anderen Entsäuerungsversuchen mit CaO nahm die Konzentration an organischen Säuren jedoch weiter bis auf ca. 9000 mg l<sup>-1</sup> zu und zeigte somit die immer noch andauernde Übersäuerung an. Erst nach zwei Wochen sanken die organischen Säuren innerhalb von 10 Tagen auf die Hälfte ihrer Konzentration und die Gasproduktion stabilisierte sich (Abbildung 8). Zeitgleich nahm auch die Calciumkonzentration von 440 auf 150 mg l<sup>-1</sup> ab.

Vermutlich konnten sich erst nach einer ausreichenden Zeitspanne Aggregate bilden. Vorausgegangene Versuche haben gezeigt, dass Aggregate entscheidend zum Entsäuerungsprozess beitragen. Es wird angenommen, dass für die Bildung der Aggregate Calcium mit langkettigen Fettsäuren ausfällt und den Kern bildet. Sowohl Salze aus organischen Säuren mit Calcium als auch organische Säuren adsorbieren dann an die Aggregate. Die organischen Säuren werden somit der gelösten Phase entzogen und können dadurch nicht mehr hemmend auf die Mikroorganismen wirken. Detaillierte Untersuchungen zu dem Mechanismus der Entsäuerung unter anderen Versuchsbedingungen wurden in Kleyböcker et al. (2012b) veröffentlicht.

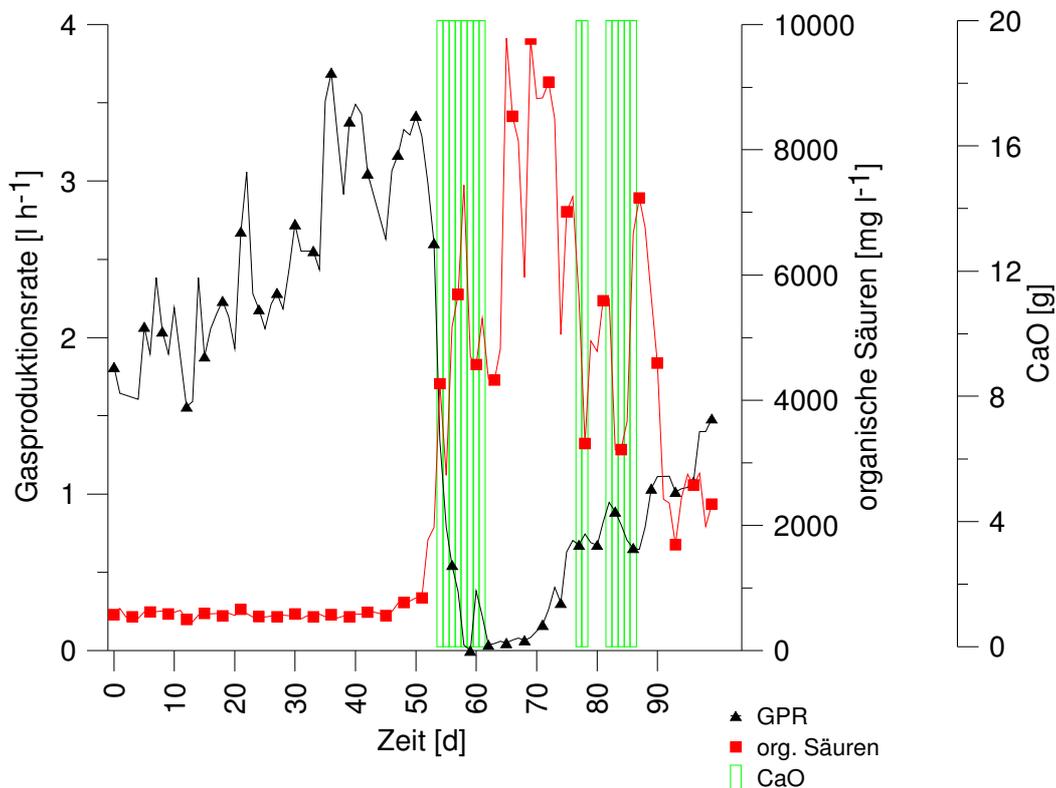


Abbildung 8: Verlauf der Gasproduktionsrate und der Konzentration organischer Säuren. Erst nach einer zweiwöchigen Dauer der Prozessstörung stabilisiert sich der Prozess der Biogasbildung.

### Molekularbiologische Untersuchung einer Über- und Entsäuerung mit Calciumoxid

Das genetische Fingerprinting zeigte deutliche Unterschiede in der bakteriellen Biozönose vor und während der Übersäuerung sowie im Verlauf der Entsäuerung an. Mikroorganismen (*Syntrophomonas sapovorans*), die vor der Übersäuerung dominant waren, wurden bei höheren Säurewerten und auch nach der Entsäuerung nicht mehr nachgewiesen. Andere Mikroorganismen (*Proxilibacter bellariivorans*) wurden zwar vor der Übersäuerung detektiert, wurden aber bei Beginn der Übersäuerung nicht mehr gefunden und dominierten erst wieder bei Zugabe von Calciumoxid. Desweiteren wurden Mikroorganismen identifiziert (*Eubacterium limosum*), die durchgehend nachgewiesen wurden und bei höheren organischen Säurekonzentrationen intensivere Banden zeigten. Hier schien ein Selektionsvorteil bei höheren Säurekonzentrationen gegenüber anderen Mikroorganismen vorzuliegen. Ein genetisches Fingerprinting mit spezifischen Primern für rhodocyclale Phosphat-akkumulierende Organismen (rPAO) zeigte keine Unterschiede im Bandenmuster. Drei Mikroorganismen dominierten im genetischen Fingerprinting, die nicht weiter identifiziert werden konnten, da der Reamplifikationsschritt der Banden, der die Voraussetzung für die spätere Sequenzierung und Identifizierung darstellt, nicht funktionierte.

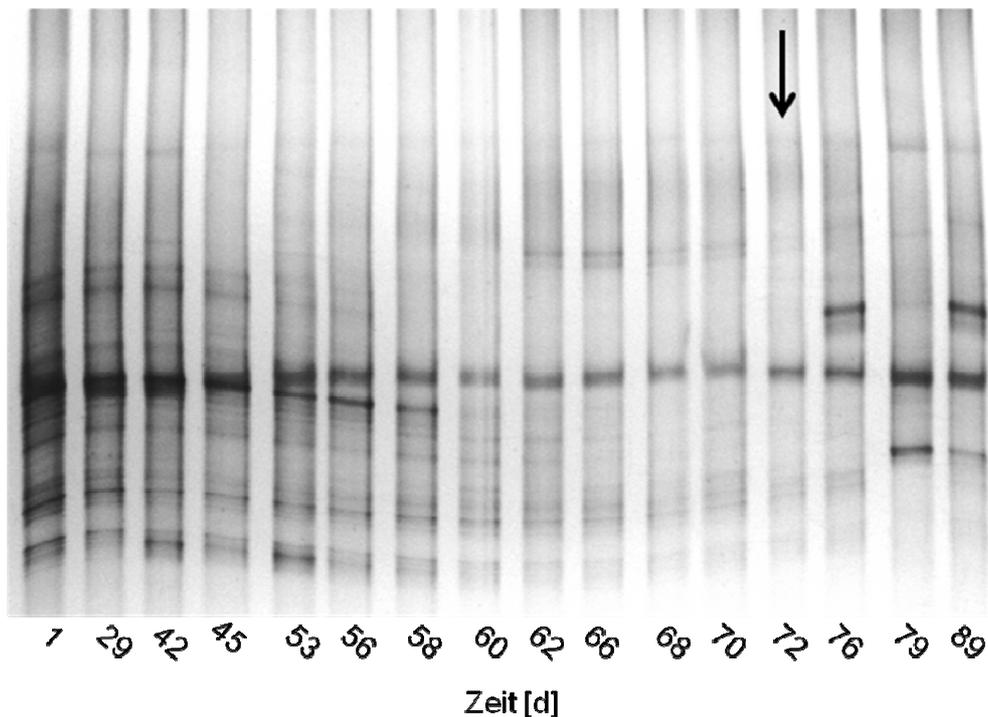


Abbildung 10: Charakterisierung der methanogenen Gemeinschaft vor, während und nach der Übersäuerung. Die Änderung der Durchmischung (Pfeil) und Stabilisierung des Prozesses ging mit einer Veränderung der Biozönose einher.

Im Verlauf der Über- und Entsäuerung zeigten sich Veränderungen in Bezug auf die Zusammensetzung der methanogenen Archaea. (Abbildung 10). *Methanosaeta concilii* dominierte zu Beginn des Versuchs die methanogene Lebensgemeinschaft. Mit steigenden Säurewerten (2000 mg/l) verringerte sich die Dominanz und dieser Mikroorganismus wurde nicht mehr mit dem genetischen Fingerprinting nachgewiesen. *Methanoassiliococcus luminyensis* hingegen wurde erst bei hohen Säurewerten (>6000 mg/l) dominant und wurde wiederum im Verlauf der Entsäuerung mit CaO nicht mehr detektiert. Offensichtlich ist dieser methanogene Mikroorganismus besser an hohe Säurewerte angepasst. Dagegen waren *Methanoculleus receptaculi* und *Methanospirillum hungatei* über den gesamten Versuchszeitraum dominant.

*M. parvicella* gehörte während des Versuches nicht zu den dominanten Bakterien und wurde daher nicht mit dem genetischen Fingerprinting für Bacteria (allg. Primer) nachgewiesen. Mit der qPCR und dem Einsatz von spezifischen Primern wurde das Vorkommen von *M. parvicella* vor, während und nach der Übersäuerung nachgewiesen und auch quantifiziert. *M. parvicella* wurde über den kompletten Zeitraum nachgewiesen. Die Abundanz von *M. parvicella* entsprach dem Eintrag über den Mischschlamm.

### **1.3.2. Schwimmschichtenbildung und molekularbiologische Untersuchungen zur Schaumbildung**

Es wurden zwei Versuche zur Beseitigung von Schwimmschichten mittels Temperaturerhöhung durchgeführt. Der im Laborversuch eingesetzte Gär- und Mischschlamm stammte aus der Biogasanlage KS-Abfall 1 und enthielt *Microthrix parvicella* als dominante Spezies. *M. parvicella* ist dafür bekannt, dass er entscheidend zur Schaum- und Schwimmschichtenbildung in Kläranlagen beitragen kann und wird auch mit Schaumbildungen in Biogasanlagen in Verbindung gebracht. Kläranlagen weisen eine saisonale Abundanz von *M. parvicella* auf. Das Temperaturoptimum von *M. parvicella* wird in der Literatur mit etwa 20°C angegeben. Es wurde bereits in mehreren Studien in Kläranlagen gezeigt, dass Temperaturerhöhungen zur Fragmentierung der Filamente führen können und die Schaumbildung somit vermindert ist. Eine Erhöhung der Reaktortemperatur könnte demnach zur Reduzierung von Schaum und Schwimmschichten beitragen. Daher wurde in zwei parallelen Laborversuchen die Temperatur schrittweise um 1°C pro Woche erhöht, um den Einfluss der Temperatur auf die Schwimmschichtdicke und das Vorkommen von *M. parvicella* zu untersuchen.

Während die Schwimmschicht im ersten Versuch (SW1) zu Beginn des Versuchs ca. 3 cm dick war, verringerte sie sich durch die Temperaturerhöhung auf weniger als 1 mm zu Versuchsende (Abbildung 11).

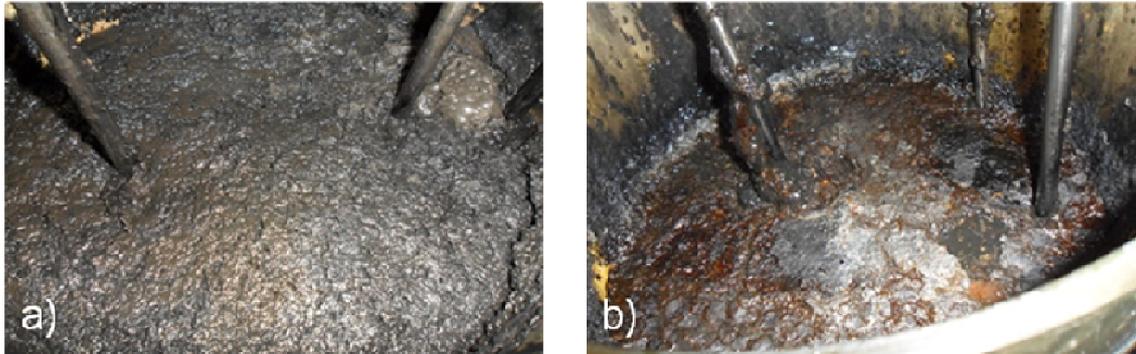


Abbildung 11: Schwimmschicht bei Versuchsbeginn (a) und aufgelöste Schwimmschicht bei Versuchsende (b).

Mittels PCR-DGGE wurden die bakteriellen und methanogenen Gemeinschaften bei den verschiedenen Temperaturen untersucht. Es wurden deutliche Unterschiede im Bandenmuster für die bakterielle Gemeinschaft nachgewiesen (Abbildung 12). Die Bandenanzahlen und -lauflängen unterschieden sich zwischen den drei Temperaturen signifikant. Besonders Bakterien des Stammes Firmicutes wurden während des Temperaturversuches identifiziert. Durch verschiedene Temperaturoptima innerhalb des Firmicutes Stammes dominierten bei den drei Temperaturen jeweils andere Mitglieder dieser Gruppe, wobei besonders die Gattungen *Clostridium* und *Syntrophomonas* identifiziert wurden.

Innerhalb der methanogenen Gemeinschaft wurden sowohl obligat acetoklastische (*Methanosaeta concilii*) als auch fakultativ acetoklastische methanogene Spezies (*Methanosarcina thermophila*,) als auch obligat hydrogenotrophe Vertreter (*Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus receptaculi*, *Methanospirillum* sp.) detektiert. Besonders *Methanospirillum* sp. wurde durch die Temperaturerhöhung beeinflusst und nicht mehr bei der höchsten Temperatur nachgewiesen (Abbildung 13).

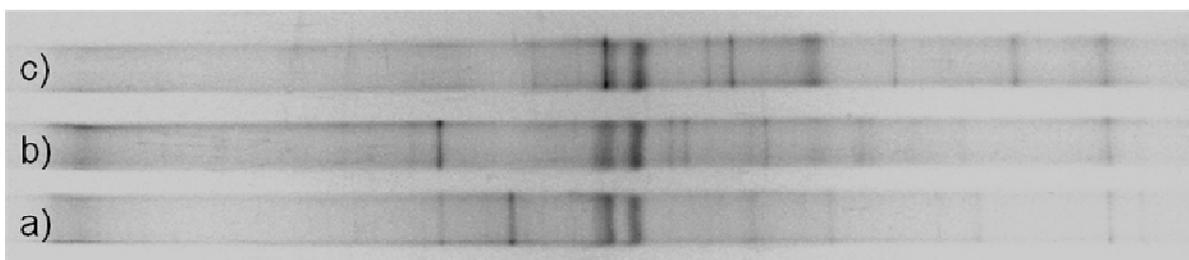


Abbildung 12: Charakterisierung der bakteriellen Gemeinschaft zeigte ein verändertes Bandenmuster in Abhängigkeit von der Temperatur.

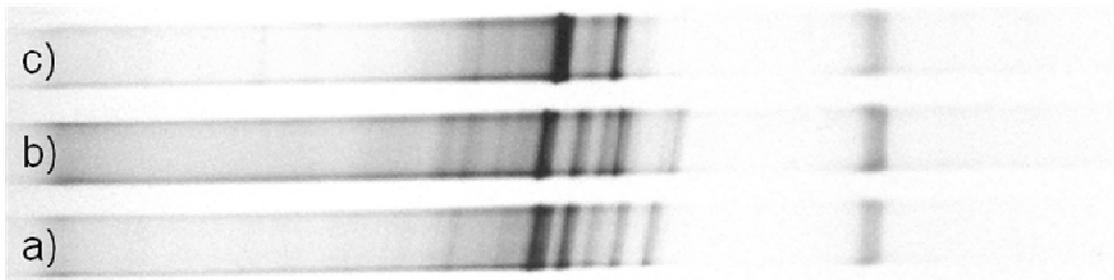


Abbildung 13: Charakterisierung der methanogenen Biozönose zeigte ähnliches Bandenmuster bei verschiedenen Temperaturen.

In einem Parallelversuch (SW2) nahm die Schwimmschichtdicke mit der Erhöhung der Temperatur von ca. 3 cm auf 7 mm ab. Der Gehalt an organischen Säuren in der Schwimmschicht ( $5000 - 3000 \text{ mg l}^{-1}$ ) war um den Faktor 6 höher als im Gärrest ( $1100 - 700 \text{ mg l}^{-1}$ ), während der Calciumgehalt um den Faktor 6 niedriger in der Schwimmschicht ( $<5 - 20 \text{ mg l}^{-1}$ ) war. Während das Verhältnis von organischen Säuren zu Calcium im Gärrest im Durchschnitt bei 19 lag, war es in der Schwimmschicht um den Faktor  $>10$  erhöht. Der FWI-VFA/Ca als Anzeiger für eine drohende Übersäuerung deutet daher auf eine Störung der biologischen Abbauprozesse in der Schwimmschicht hin. Zu Beginn von Versuch SW2 waren innerhalb der Schwimmschicht vier verschiedene Zonen mit unterschiedlichen Konsistenzen zu erkennen, deren genetische Fingerprinting-Muster sich in Bandenanzahl und -lauflänge unterschieden. Weiterhin wurde festgestellt, dass sich mit der Temperaturerhöhung nicht nur die Schwimmschichtdicke sondern auch die Abundanz von *M. parvicella* verringerte. Spezifische Analysen mit der qPCR ergaben, dass die Genkopienzahl von *M. parvicella* mit Erhöhung der Temperatur abnahm, Schon bei einer geringen Erhöhung wurde eine starke Verminderung um den Faktor 2 festgestellt (Lienen et al. 2013c).

Neben den Versuchen SW1 und SW2 zur Vermeidung von Schwimmschichten wurde ein weiterer Versuch zur Schaumbildung (SB) durchgeführt. Der erzeugte Schaum zeigte ein ähnliches Bandenmuster (allg. Bacteria-Primer) wie es in den Schwimmschichten mit der PCR-DGGE nachgewiesen wurde. Dieses weist darauf hin, dass die Schaum- und Schwimmschichtenbildung von identischen Mikroorganismen gefördert wurde bzw. dass sich diese dort anreicherten. Desweiteren wurden in den Schwimmschichten Banden nachgewiesen, die im Schaum nicht detektiert wurden. Diese Mikroorganismen könnten an der Schwimmschichtenbildung beteiligt gewesen sein. Eine Identifikation der Banden war aufgrund der nicht funktionierenden Reamplifikation nicht erfolgreich.

### 1.3.3. Hochleistungsbetrieb

In der Abfallwirtschaft werden volldurchmischte Durchflussfermenter in der Regel mit einer Raumbelastung zwischen 1 und 4,5 kg oTS m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> weit unterhalb der technisch möglichen Grenze betrieben. Zur Entwicklung eines Verfahrens zur schnellen Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute wurde in zwei Experimenten die Raumbelastung durch Rapsöl stufenweise erhöht, die Prozessstabilität über den Frühwarnindikator FWI-VFA/Ca kontrolliert und CaO zur Prozessstabilisierung eingesetzt (Kleyböcker et al. 2013, Kasina et al. in prep.).

In Versuch 1 wurde die Raumbelastung von 3,2 kg oTS m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> bis auf 9,5 kg oTS m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> mit Erhöhungen von ca. 1 kg oTS m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> innerhalb von 40 Tagen gesteigert. Als Substrate wurden Rapsöl und Mischschlamm eingesetzt, der von der Kläranlage aus KS-Abfall 2 stammte und dort ebenfalls in der großtechnischen Biogasanlage verwertet wurde. Die Mischschlammzufuhr wurde mit ca. 1,2 kg oTS m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> konstant gehalten, während der Rapsölanteil gesteigert wurde. Hierbei wurde im Durchschnitt ein Zeitintervall von 8 Tagen (1/3 einer hydraulischen Verweilzeit) zwischen zwei Erhöhungen eingehalten. Selbst bei einer Raumbelastung von 9,5 kg oTS m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> wurde noch 94 % der erwarteten Methanausbeute erreicht (Abbildung 14). Die Konzentrationen der Fettsäuren blieben mit durchschnittlich 900 mg l<sup>-1</sup> in einem für den störungsfreien Ablauf des Biogasbildungsprozesses unbedenklichen Bereich. Der Prozess der Biogasbildung lief folglich trotz der im Vergleich zur Praxis schnellen Steigerung der Raumbelastung stabil ab.

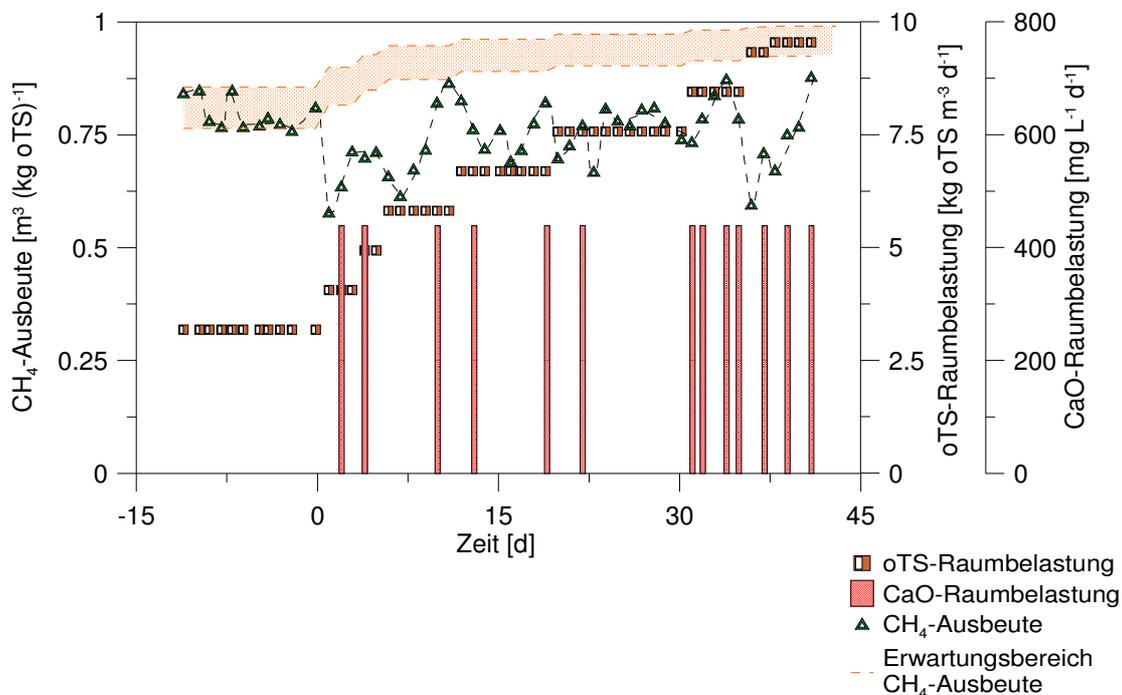


Abbildung 14: Trotz der schnellen Steigerung der Raumbelastung auf 9,5 kg oTS m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> wurden bis zu 94% der erwarteten Methanausbeute erreicht.

In Versuch 2 wurde die Raumbelastung von  $3,2 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  auf  $14,1 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  innerhalb von 60 Tagen gesteigert. Hierbei wurden wesentlich kleinere Zeitintervalle, die teilweise bei  $1/10$  einer hydraulischen Verweilzeit (2-3 Tage) lagen, zwischen zwei Erhöhungen gewählt. Die erhöhte Substratfracht in den kurzen Zeitintervallen erforderte eine deutlich größere CaO-Zugabe zur Stabilisierung des Prozesses der Biogasbildung als in Versuch 1. Trotz der sehr schnellen Steigerung der Raumbelastung blieb der Prozess der Biogasbildung bis zu einer Raumbelastung von  $10,4 \text{ kg oTS m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  stabil, wobei die Methanausbeute jedoch um ca. 27 % vermindert war (Abbildung 15).

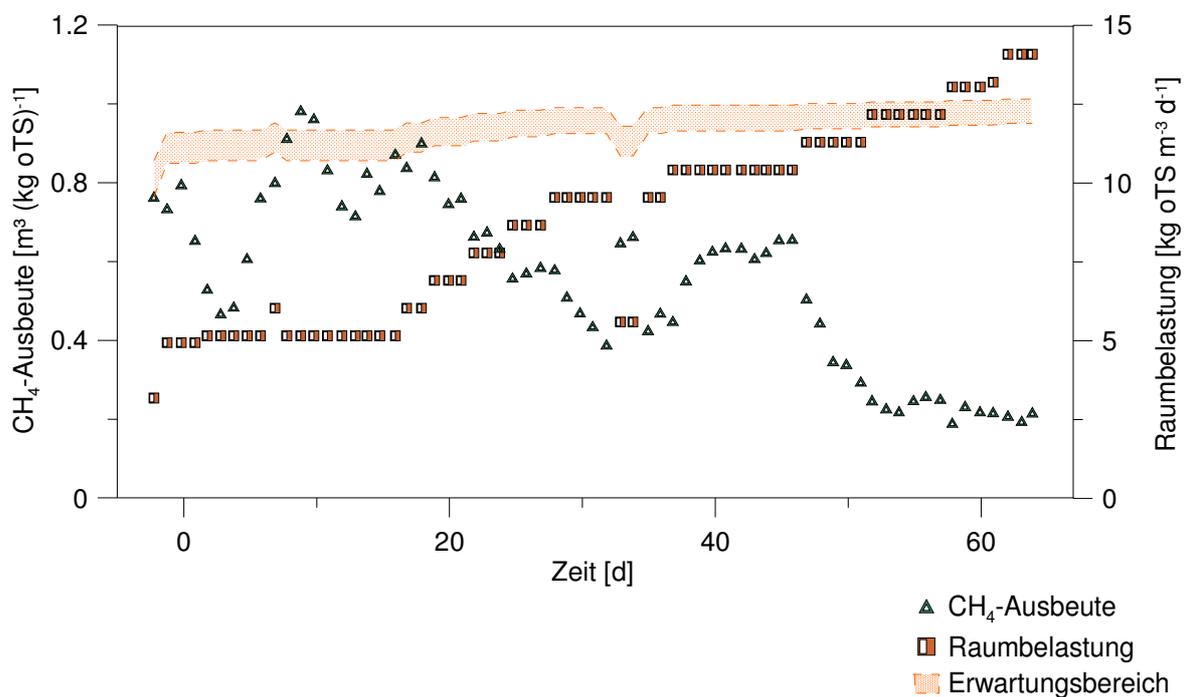


Abbildung 15: Schnelle Erhöhung der Raumbelastung führte zu verminderter Methanausbeute.

Der Gehalt der Fettsäuren lag mit durchschnittlich  $700 \text{ mg l}^{-1}$  jedoch weiterhin auf einem unbedenklichen Niveau. Als die Raumbelastung weiter gesteigert und die CaO-Zugabe ebenfalls erhöht wurde, wurde eine Trennung der festen von der flüssigen Phase im Reaktor beobachtet. Der Prozess der Biogasbildung lief zwar noch ab, erreichte aber nicht mehr die erwartete Leistung, da die feste Struktur des Reaktorinhalts die Durchmischung behinderte und somit keine ausreichende Verteilung des Substrats im Reaktor mehr möglich war.

Die Abnahme der Methanausbeute infolge des hohen Feststoffgehalts zeigte, dass eine Konzentration an Calcium von  $85 \text{ mg l}^{-1}$  für diese Substratzusammensetzung nicht überschritten werden sollte, um einen störungsfreien Prozessablauf zu gewährleisten. Um

übermäßige CaO-Zugaben zu vermeiden, wird die Einhaltung eines Zeitintervalls von 8 Tagen (1/3 einer hydraulischen Verweilzeit) zwischen zwei Erhöhungen der Raumbelastung empfohlen (Kleyböcker et al. 2013). In beiden Versuchen nahm mit der CaO-Zufuhr die Konzentration an Phosphat ab, während die gelöste Calciumkonzentration wider Erwarten nicht oder nur sehr geringfügig zunahm (Abbildung 16). Diese Beobachtung wurde bereits in Experimenten zur Entsäuerung nach einer Überfrachtung des Prozesses mit Öl als Co-Substrat gemacht und deutet auf Fällungsprozesse hin.

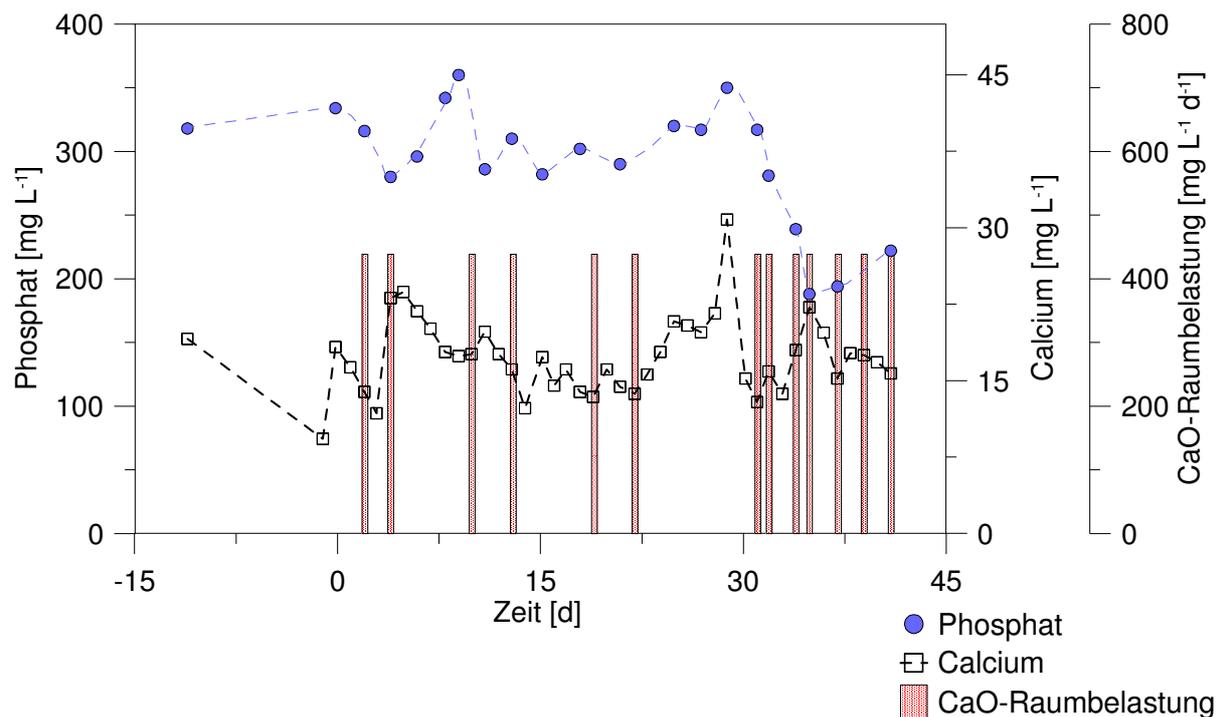


Abbildung 16: Verlauf der Phosphat- und Calciumkonzentrationen. Keine Zunahme von Calcium trotz Fütterung von CaO. Abnahme der Phosphatkonzentration.

Darüberhinaus wurden auch in diesem Versuch kleine weißlich aussehende Aggregate mit einem Durchmesser zwischen 0,5 und 5 mm gefunden, die mit dem REM EDX analysiert wurden. Die Aggregate bestanden aus verschiedenen Schichten, die im Inneren sehr kompakt waren und nach außen hin porösere Strukturen bildeten (Kasina et al. in prep.). An der homogenen Oberfläche der Aggregate wurden Calcium und ein hoher Anteil an Kohlenstoff nachgewiesen sowie stäbchenförmige Bakterien. Es wird davon ausgegangen, dass der hohe Kohlenstoffanteil auf mit Calcium ausgefällten langkettigen Fettsäuren zurückzuführen ist (Kleyböcker et al. 2012). Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten eine enge räumliche Verbindung von Calcium, Fettsäuren und Proteinen und deuteten auf einen komplexen Biofilm an der Aggregatoberfläche hin (Kassahun et al. 2012; Liebrich et al. 2012). Im Kern der Aggregate wurden ebenfalls Calcium und Kohlenstoff haltige Strukturen gefunden, die eine

Rosettenform besaßen (Abbildung 17). Weiterhin wurden im Inneren sowohl filamentöse Strukturen als auch stäbchen- und kokkenförmige Mikroorganismen detektiert, die mit extrazellulären polymeren Substanzen bedeckt waren (Kasina et al., in prep.). Desweiteren wurden mineralische Komponenten wie Silikate und Carbonate sowie in Spuren auch Phosphate nachgewiesen. Derartige Aggregate wurden bereits in Experimenten zur Entsäuerung gefunden, bei denen sie eine entscheidende Rolle bei der Prozessstabilisierung hatten (Kleyböcker et al. 2012). Daher ist davon auszugehen, dass sie auch bei der schnellen Leistungssteigerung maßgeblich zur Prozessstabilisierung beitragen. Die Ergebnisse der beiden Experimente zeigen, dass der Prozess der Biogasbildung auch bei einer schnellen Erhöhung der organischen Raumbelastung durch CaO stabilisiert werden kann. Der FWI-VFA/Ca eignet sich zur Steuerung der CaO-Zugabe und kann daher für eine schnelle Steigerung der Biogasproduktion eingesetzt werden.

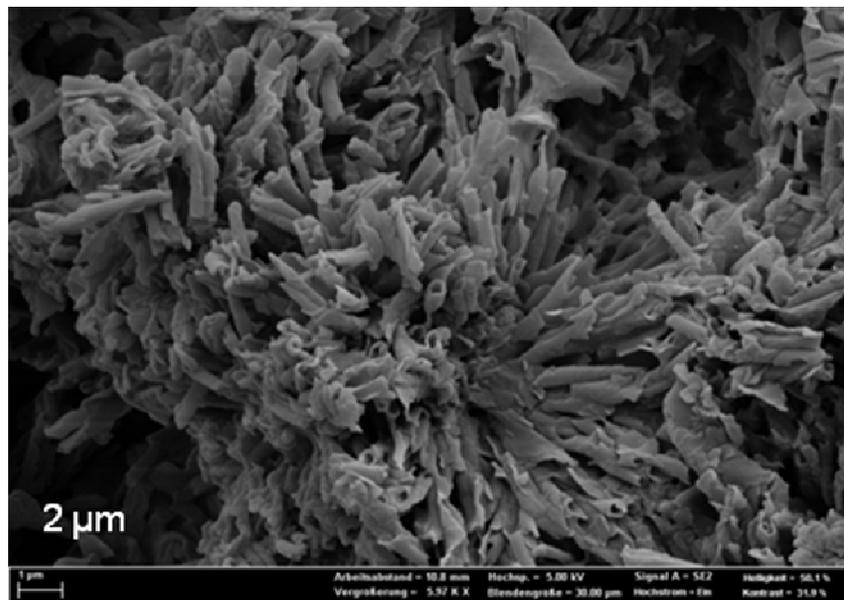


Abbildung 17: Rosettenförmige Kristalle aus Calcium und organischem Material im Kern der Aggregate (REM EDX).

#### Charakterisierung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft während der Leistungssteigerung

Auffallend in Versuch 1 war der im Durchschnitt mit 0,22 mbar relativ hohe Wasserstoffpartialdruck. Da Vertreter der Ordnung Clostridiales (*Soehngenia saccharolytica*, *Clostridium alkalicellum*, *Clostridium* sp., *Syntrophomonas wolfei*) als dominante *Bacteria* identifiziert wurden, waren diese vermutlich auch an der Wasserstoffbildung beteiligt. Mit der halbquantitativen Fingerprinting-Methode (allg. Bacteria-Primer) wurde gezeigt, dass *Syntrophomonas wolfei* während des Versuchs dominanter wurde, während die anderen Arten

keine Veränderungen in ihrer Dominanz zeigten. Der Wasserstoffpartialdruck lag für den Abbau von Buttersäure zu Methan im thermodynamischen Fenster. *Syntrophomonas wolfei* verwertet unter anderem Buttersäure und erzeugt dabei Wasserstoff. Dieses Bakterium ist jedoch von einem Partnerorganismus, wie beispielsweise einem hydrogenotrophen methanogenen Archaeon, abhängig, der den Wasserstoffpartialdruck in dem für den Abbau erforderlichen Bereich hält. Für den Abbau von Propionsäure lag der Wasserstoffpartialdruck jedoch über dem maximalen Grenzwert (0,1 mbar), so dass ein Abbau von Propionsäure zu Methan unter Normalbedingungen hätte gehemmt sein müssen. Dennoch wurde keine Zunahme der Propionsäurekonzentration gemessen. Eine Erklärung hierfür könnte ein effizienter Abbau innerhalb der Aggregate in Mikrohabitaten mit lokal günstigen Abbaubedingungen sein. Eine Analyse der mikrobiellen Biozönose mit rPAO spezifischen Primern zeigte, dass neben den mit allgemeinen Primern nachgewiesenen *Clostridium sp.*, *Syntrophomonas wolfei* und *Soehngenia saccharolytica* auch rPAO vorhanden waren (Abbildung 18).

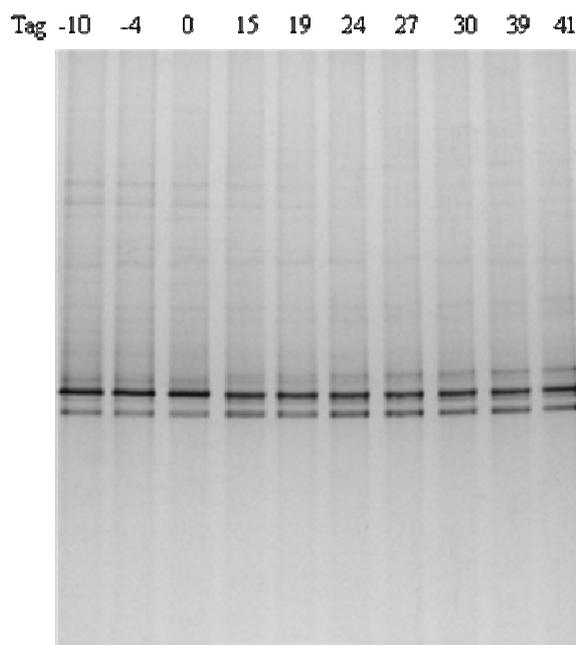


Abbildung 18: Nachweis Phosphat-akkumulierender Organismen (PAO) mit spezifischen Primern mit annähernd konstanter Bandenintensität während des Leistungssteigerungsversuchs.

Die phosphatspeichernden Mikroorganismen (*Dechloromonas sp.* und *Rhodocycales Bakterium*) könnten zur Prozessstabilisierung beigetragen haben, da sie unter anaeroben Bedingungen kurzkettige Fettsäuren, wie Essigsäure und Propionsäure, aufnehmen und gleichzeitig Phosphat abgeben. Die rPAO wurden während des gesamten Versuchs mit

weitgehend konstanter Bandenintensität nachgewiesen. Da sich während des Leistungssteigerungsversuch die Phosphatkonzentration nicht erhöhte, ist davon auszugehen, dass rPAO - im Gegensatz zu Experimenten bei denen es zu einer Übersäuerung kam - nur eine untergeordnete Rolle bei der Prozessstabilisierung spielten bzw. dass das freigesetzte Phosphat mit mehrwertigen Kationen ausfiel.

Mittels genetischem Fingerprinting wurden als Vertreter der methanogenen Mikroorganismen die Gattungen *Methanosarcina*, *Methanoculleus* und *Methanobacterium* gefunden. *Methanoculleus* und *Methanobacterium* produzieren auf hydrogenotrophem Weg Methan, während *Methanobacterium* als syntropher Partner von *Syntrophomonas* vorkommt. Die Gattung *Methanosarcina* aus der Ordnung Methanosarcinales kann sowohl auf hydrogenotrophem, als auch acetoklastischem Weg Methan erzeugen. Darüberhinaus hat sie auch die Fähigkeit, Essigsäure zu Wasserstoff und Kohlenstoff zu oxidieren und aus diesen Produkten wiederum Methan zu bilden. Sie könnte je nach Bedarf ihren Stoffwechselweg geändert bzw. angepasst haben. Diese Flexibilität hat vermutlich auch zu einem äußerst stabilen Prozess beigetragen. Aus der Literatur und auch aus eigenen Untersuchungen ist bekannt, dass *Methanosarcina* insbesondere bei hohen Säurekonzentrationen im Gärrest nachgewiesen wird.

Wie die Analyse der gefundenen Aggregate zeigt, führt die Zugabe von Calcium zu einer Ausfällung von langkettigen Fettsäuren und regulierte daher deren Verfügbarkeit. Gleichzeitig wurde durch die Aggregate auch die Bildung von Biofilmen und Mikrohabitaten gefördert, in denen offensichtlich günstige Abbaubedingungen bestanden. Daher veränderte sich die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose während der Leistungssteigerung nicht bzw. nur sehr geringfügig und folglich lief der Biogasbildungsprozess auch unter Stressbedingungen wie einer schnell steigenden Substratmenge weiterhin zuverlässig ab. Die Bildung von Aggregaten war der Prozessstabilität förderlich, wenn die Aggregate nicht zu groß wurden und die Durchmischung behinderten bzw. zu Verstopfungen führten. Die größtenteils aus Calcium und Fettsäuren bestehenden Aggregate dienten als Aufwuchsflächen für verschiedene Mikroorganismen. Die Bildung von Biofilmen, wie sie auf und in den Aggregaten nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 7), ist ein Schutz vor negativen Umwelteinflüssen wie z. B. hohe Wasserstoff- oder Propionsäurekonzentrationen. Unter diesen Bedingungen war eine effiziente Biogasbildung auch bei hohem Wasserstoffpartialdruck möglich und Propionsäure reicherte sich vermutlich aufgrund der in den Aggregaten gebildeten Mikrohabitate trotz des zu hohen Wasserstoffpartialdrucks im Biogas nicht im Gärrest an.

#### 1.4. Zusammenfassung

Für eine verstärkte Verwertung von Rest- und Abfallstoffen in Biogasanlagen wird ein zuverlässiges, technologisch flexibles System benötigt, da Substratumstellungen Störungen wie Übersäuerung, Schaum und Schwimmschichten verursachen können, die die Durchmischung und/oder die effektive Ausnutzung der Anlage beeinträchtigen. Zudem treten aufgrund unvorteilhaft geregelter Umwälzungen, Dosier- und Abzugseinheiten in Biogasanlagen regelmäßig Kurzschlussströme auf. Eine Tracerstudie zeigte, dass der durchschnittliche Verlust in der Gasproduktion von ca. 18 % auf den Austrag von unvergorenem Substrat aufgrund von unvorteilhaften Durchmischungsverhältnissen im Reaktor zurückgeführt werden konnte.

Die Untersuchungen zur Übersäuerung an großtechnischen Anlagen und im Labormaßstab zeigten, dass der Mechanismus der Prozessstabilisierung während und nach dem Eintreten der Prozessstörung von chemischen Parametern, wie der Calcium-, Phosphat- und Fettsäurekonzentration abhängt. Als geeignete Frühwarnindikatoren für eine Übersäuerung ließen sich die Konzentrationsverhältnisse aus Fettsäuren zu Calcium (FWI-VFA/Ca) und die Phosphatkonzentration (FWI-PO<sub>4</sub>) an sich identifizieren. Als geeignete Gegenmaßnahme zeigte sich die Zugabe von CaO.

Unter Einsatz des FWI-VFA/Ca wurde eine stufenweise Erhöhung der Raumbelastung vorgenommen. Dabei diente der Frühwarnindikator zur Steuerung der Additiv-Zugabe. In verschiedenen Laborversuchen konnten Raumbelastungen von 6,0 und 9,5 kg<sub>oTS</sub> m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> mit Fettanteilen von bis 87 % bei Methanausbeuten von 0,9 m<sup>3</sup> kg<sub>oTS</sub><sup>-1</sup> erfolgreich gefahren werden. Zwischen zwei Erhöhungen der Substratfracht erwies sich ein Zeitintervall von 8 Tagen als notwendig, um die Methanausbeute im Erwartungsbereich zu halten. Eine Übertragung des entwickelten Steuerungsverfahrens auf den großtechnischen Maßstab und seine Erprobung in der Praxis stehen noch aus.

An einer mit Klärschlamm und Fett beschickten Biogasanlage wurde ein Schaumereignis untersucht. Genetische Fingerprint-Analysen zur Charakterisierung der mikrobiellen Biozönose der im Winter zur Schaumbildung neigenden Anlage wiesen auf die Beteiligung des fädigen Candidatus *Microthrix parvicella* an der Schaumbildung bzw. Schaumstabilisierung hin. Eine Langzeitbeprobung des betroffenen Reaktors zeigte jahreszeitliche Änderungen der Abundanz von *M. parvicella*, die mit der Umgebungstemperatur und der Zufuhr von Fett als Co-Substrat korrelierte. In der Praxis wäre nun zu überprüfen, inwieweit durch eine

Temperaturerhöhung, wie sie im Laborversuch nachgestellt wurde, die Schaumbildung im Winter eingeschränkt bzw. vermieden werden kann.

## **2. Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Der größte finanzielle Aufwand waren die Personalkosten (70 %). Eine wissenschaftliche Mitarbeiterin und ein Doktorand sowie studentische Hilfskräfte wurden über die Projektlaufzeit zur Durchführung und Auswertung von Labor- und Felduntersuchungen finanziert. Desweiteren trugen die Materialkosten zu 25 % der Gesamtkosten bei. Weiterhin sind Kosten durch Reisen zu Konferenzen im In- und Ausland entstanden, die der Diskussion und Verbreitung der Forschungsergebnisse dienen.

## **3. Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Prozessstörungen in Biogasanlagen sind weit verbreitet und Gegenmaßnahmen sowie Frühwarnsysteme sind nur unzureichend bekannt. Durch die Störung des Biogasproduktionsprozesses sinkt die Effizienz der Anlagen und im Extremfall können klimaschädliche Treibhausgase die Anlage ungefiltert verlassen.

Die im Teilprojekt geleisteten Arbeiten tragen dazu bei, den Prozess der Biogasproduktion besser zu verstehen, um Prozessstörungen vorzubeugen und den Prozess zu stabilisieren.

## **4. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Noch immer werden Biogasanlagen weit unterhalb der technisch möglichen Raumbelastung betrieben, um Prozessstörungen wie Übersäuerung und Schaumbildung zu vermeiden. Eine Erhöhung der Raumbelastung würde zu einer höheren Gasproduktion und damit besseren Effizienz der Biogasanlagen führen. Mit Hilfe des im Projekt eingesetzten Frühwarnindicators FWI-VFA/Ca mit Zusatz eines Additivs lässt sich die Raumbelastung steigern und somit die Gasproduktion erhöhen. Neben einem Ausbau von Gasspeichern kann auch eine bedarfsangepasste Fütterung von Biogasanlagen in Verbindung mit einer Prozesskontrolle durch den FWI-VFA/Ca zu einer bedarfsgerechten Stromerzeugung eingesetzt werden. Es ist zu untersuchen, bei welchen Substratspektren der FWI-VFA/Ca funktioniert und inwieweit ein dauerhafter Betrieb bei einer erhöhten Raumbelastung möglich ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass filamentöse Mikroorganismen an der Schaum- und Schwimmschichtenbildung in Biogasanlagen beteiligt sind und sich deren Anzahl durch eine geringe Temperaturerhöhung verringern lässt. Nichtsdestotrotz ist die Mehrheit der am Biogasproduktionsprozess beteiligten Mikroorganismen noch unbekannt. Um das Prozessverständnis zu verbessern und die

Effizienz der Anlagen zu optimieren, ist weitere Forschung im Bereich Biogas-Mikrobiologie zwingend notwendig.

## **5. Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Den Autoren sind keine Fortschritte anderer Stellen über Übersäuerung, Schwimmschichten- und Schaumbildung in Biogasanlagen bekannt, die während des Vorhabens erzielt wurden und den angewendeten Forschungsansatz in Frage stellen.

## **6. Darstellung der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 11**

### Artikel und Buchbeiträge

- 1) Balussou, D., Kleyböcker, A., McKenna, R., Möst, D., Fichtner, W. (2012): An economic analysis of three operational co-digestion biogas plants in Germany, Waste and Biomass Valorization, 3, 1, 23-41.
- 2) Lerm, S., Kleyböcker, A., Miethling-Graff, R., Alawi, M., Kasina, M., Liebrich, M., Würdemann, H. (2012): Archaeal community composition affects the function of anaerobic co-digesters in response to organic overload, Waste Management, 32, 3, 389-399.
- 3) Kasina, M., Kleyböcker, A., Michalik, M., Liebrich, M., Würdemann, H. (in prep.): Fast increase of organic loading rate during co-digestion of rape seed oil and sewage sludge in a CSTR – characterization of granules formed due to CaO addition
- 4) Kleyböcker, A., Brehmer, M., Lienen, T., Teitz, S., Würdemann, H., Kraume, M. (in prep.): Characterization of mixing condition and determination of the residence time distribution using uranine as a tracer in waste treatment anaerobic co-digesters
- 5) Kleyböcker, A., Lienen, T., Liebrich, M., Kasina, M., Würdemann, H. (2013) Application of an early warning indicator to maximize the time-space-yield of completely mixed waste digesters. Eingereicht bei Waste Management.
- 6) Kleyböcker, A., Liebrich, M., Kasina, M., Kraume, M., Wittmaier, M., Würdemann, H. (2012): Comparison of different procedures to stabilize biogas formation after process failure in a thermophilic waste digestion system: Influence of aggregate formation on process stability, Waste Management, 32, 6, 1122-1130.
- 7) Kleyböcker, A., Liebrich, M., Verstraete, W., Kraume, M., Würdemann, H., (2012): Early warning indicators for process failure due to organic overloading by rapeseed oil in one-stage continuously stirred tank reactor, sewage sludge and waste digesters, Bioresource Technology, 123, 534-541.

- 8) Lienen, T., Kleyböcker, A., Verstraete, W., Würdemann, H. (2013a). Foam formation in a downstream digester of a cascade running full-scale biogas plant: Influence of FOG addition and abundance of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella*. Eingereicht bei Bioresource Technology.
- 9) Lienen, T., Kleyböcker, A., Brehmer, M., Kraume, M., Moeller, L., Görsch, K., Würdemann, H. (2013b) Floating layer formation, foaming and microbial community structure change in full-scale biogas plant due to disruption of mixing and substrate overloading. Akzeptiert in Energy, Sustainability and Society..
- 10) Lienen, T., Kleyböcker, A., Verstraete, W., Würdemann, H. (2013c) Disintegration of floating sludge and a concomitant decrease of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella* in anaerobic biogas digester by temperature increment. In Bearbeitung.
- 11) Würdemann, H., Kleyböcker, A., Lienen, T., Liebrich, M., Kasina, M., Lerm, S., Miethling-Graff, R. (2013) Identification and prevention of process failure – Increased process understanding helps to avoid disturbances of biogas production and to develop early warning indicators. In prep..
- 12) Würdemann, H., Kleyböcker, A., Lienen, T., Brehmer, M., Kraume, M., Daniel-Gromke, J., Lorenz, H., Balussou, D., McKenna, R., Moeller, L., Görsch, K., Müller, R. A., Zehnsdorf, A., Zirkler, D., Kaupenjohann, M.: Erkennen und Beheben von Prozessstörungen in Biogasanlagen, Tagungsband zum 4. Statusseminar des BMU-Förderprogramms „Energetische Biomassenutzung“ (5. November 2012 in Berlin).
- 13) Würdemann, H.; Kleyböcker, A.; Liebrich, M.; Lienen, T.; Lerm, S. (2011): Erkennen und Beheben von Prozessstörungen in Biogasanlagen. - In: Bilitewski, B. (Eds.), 8. Biogastagung Dresden : Tagungsband ; [Biogas aus Abfällen und Reststoffen, 28. - 29. September 2011 in Dresden], Eigenverl. des Forums für Abfallwirtschaft und Altlasten e.V., 201-212.
- 14) Methodenhandbuch Biogas des Programmes Energetische Biomassenutzung: Erstellung der Kapitel „Bestimmung des Verweilzeitverhaltens“ und „Mikrobiologische Untersuchungen“.

#### Diplomarbeit

Letz, M. (2012) Untersuchungen zum Einsatz von Reststoffen aus der Biodieselproduktion als Co-Substrat in der Biogaserzeugung. Universität Potsdam

#### Dissertation

Kleyböcker, A. (2012) Entwicklung neuer Verfahren zur Prozesssteuerung in Co-Vergärungsanlagen der Abfallwirtschaft. Technische Universität Berlin

## Vorträge

- 1) Kleyböcker, A. (2011): Ergebnisse der Arbeitsgruppe "Biogastechnologie", 3. Statusseminar Energetische Biomassenutzung, Arbeitsgruppe Biogastechnologie (8./9. Nov. 2011)
- 2) Kleyböcker, A., Lienen, T., Brehmer, M., Würdemann, H. (2011), Methodik und Nachhaltigkeit – Optgas, 3. Statusseminar Energetische Biomassenutzung, Arbeitsgruppe Biogastechnologie (8./9. Nov. 2011)
- 3) Kleyböcker, A., Lerm, S., Seyfarth, D., Liebrich, M., Lienen, T., Würdemann, H. (2011): Early warning indicator in terms of over-acidification in anaerobic waste digesters, World Congress of Environmental Biotechnology, Dalian, China (19.-20.10.2011)
- 4) Kleyböcker, A., Lienen, T., Lerm, S., Liebrich, M., Würdemann, H. (2011): Optimierung der Co-Vergärung, Treffen Praxispartner, Schwabach, (24.8.2011)
- 5) Kleyböcker, A., Liebrich, M., Lienen, T., Würdemann, H. (2011): Stabilization of the biogas production process influenced by mineral and aggregate formation, PhD-Seminar, GFZ Potsdam (26.5.2011)
- 6) Kleyböcker, A., Lienen, T., Würdemann, H. (2011): Vergleichende Untersuchungen an großt. Biogasreaktoren – verfahrenstech., mikrobiol., ökolog. und ökon. Bewertung und Optimierung, Projekttreffen mit Praxispartner, Neubukow (14.5.2011)
- 7) Kleyböcker, A., Seyfarth, D., Liebrich, M., Lienen, T., Würdemann, H. (2011): Early warning indicator in terms of process failure due to organic overloads, Internationale Biogaskonferenz "Progress in Biogas II", Stuttgart Hohenheim (30.3.-1.4.2011)
- 8) Kleyböcker, A., (2010), Optgas – Methodisches Vorgehen, Arbeitsgruppe Biogastechnologie, 2. Statusseminar Energetische Biomassenutzung, (11./12.10.2010)
- 9) Kleyböcker, A., Liebrich, M., Lienen, T., Lerm, S., Würdemann, H. (2010): Biologically induced mineralization in digesters provides a stable biogas production, Seminar (Cockel), GFZ Potsdam, (15.9.2010)
- 10) Kleyböcker, A., (2009), Methodik – Vergleichende Untersuchungen an großtechnischen Biogasreaktoren, 1. Statusseminar, Arbeitsgruppe 1, Leipzig (Okt. 2009)
- 11) Kleyböcker, A., Stephanie Lerm, Dertje Seyfarth, Marietta Liebrich, Hilke Würdemann (2009): Wirkungsmechanismen der Entsäuerung, TU-Berlin (7.10.2009)
- 12) Kleyböcker, A., Seyfarth, D., Liebrich, M., Lerm, S., Günther, K., Vieth, A., Würdemann, H. (2009): Entwicklung neuer Verfahren zur Prozesssteuerung in abfallwirtschaftlichen Co-Vergärungsanlagen, GFZ Potsdam, (13.7.2009)
- 13) Liebrich, M., Kleyböcker, A., Würdemann, H. (2012) Influence of the microbial community and mineral formation on the process performance of biogas production. Fourth International Symposium on Energy from Biomass and Waste in Venedig (November 2012).

- 14) Lienen, T., Kleyböcker, A., Würdemann, H. (2012) *Microthrix parvicella* and *Cloacamonas acidaminovorans*: Indicator organisms for foam formation and protein concentrations in full-scale biogas plants? Fourth International Symposium on Energy from Biomass and Waste in Venedig (November 2012).
- 15) Lienen, T., Kleyböcker, A., Würdemann, H. (2012) *Microthrix parvicella* and *Cloacamonas acidaminovorans*: Indicator organisms for foam formation in full-scale biogas plants? 2<sup>nd</sup> BioProScale Symposium "Inhomogeneities in large-scale bioprocesses: System biology and process dynamics" in Berlin (März 2012).
- 16) Lienen, T., Kleyböcker, A., Liebrich, M., Kasina, M., Würdemann, H. (2010) Turning waste into gold: Influence of the microbial community and mineral formation on the biogas production process. Grandma Talk PhD Day GFZ Potsdam (November 2010).
- 17) Würdemann, H., Kleyböcker, A., Liebrich, M., Lienen, T., Lerm, Stephanie (2012) Early warning indicator – increased process understanding helps to avoid disturbances of biogas production. Fourth International Symposium on Energy from Biomass and Waste in Venedig (November 2012).
- 18) Würdemann, H., Kleyböcker, A., Lienen, T., Brehmer, M., Kraume, M., Lorenz, H., Daniel-Gromke, J., Balussou, D., McKenna, R. (2012) Untersuchungen zur Optimierung der Co-Vergärung hinsichtlich der Durchmischung und der Vermeidung von Prozessstörungen. Statusseminar Energetische Biomassnutzung in Berlin (November 2012).

#### Posterpräsentationen

- 1) Kassahun, A., Hache, M., Liebrich, M., Würdemann, H. (2012) Visualization of biofilm components by fluorescence microscopy. Fourth International Symposium on Energy from Biomass and Waste in Venedig (November 2012).
- 2) Kleyböcker, A., Lienen, T., Liebrich, M., Brehmer, M., Würdemann, H. (2012): Full-scale biogas reactors: Characterization of mixing conditions and counter measures against process failure, Symposium BioProScale, TU Berlin (März 2012)
- 3) Kleyböcker, A. (2011) OPTGAS - Vergleichende Untersuchungen an großtechnischen Biogasreaktoren - verfahrenstechnische, mikrobiologische, ökologische und ökonomische Bewertung und Optimierung, Statusseminar Energetische Biomassnutzung, Potsdam (8./9. Nov. 2011)
- 4) Kleyböcker, A., Liebrich, M., Lienen, T., Kasina, M., Würdemann, H.: Optgas – Optimization of biogas production, Geo.X-Tagung, Potsdam, (Jun. 2011)
- 5) Kleyböcker, A., Lienen, T., Brehmer, M., Ickes, D., Würdemann, H. (2010): Untersuchung zum Verweilzeitverhalten: Tracerstudie an einem großtech. vlldurchmischten Fermenter, Statusseminar Energetische Biomassnutzung, Berlin (Okt. 2010)

- 6) Kleyböcker, A., Lienen, T., Liebrich, M., Würdemann, H.: Optimierung der Co-Vergärung in Bezug auf die Raum-Zeit-Ausbeute, Klimaplattform (Feb. 2010)
- 7) Lienen, T., Kleyböcker, A., Würdemann, H. (2012) Einfluss der mikrobiellen Biozönose auf den Betrieb von Biogasanlagen: *Microthrix parvicella* und *Cloacamonas acidaminovorans* als Indikatororganismen für Schaumbildung. Statusseminar Energetische Biomassenutzung in Berlin (November 2012).
- 8) Lienen, T., Kleyböcker, A., Würdemann, H. (2011) Influence of the microbial biocenosis on the stability of the biogas production process. 1st German-Turkish Biogas Workshop in Izmir (Oktober 2011).
- 9) Lienen, T., Kleyböcker, A., Würdemann, H. (2011) Influence of the microbial biocenosis on the stability of the biogas production process. 1st International Conference on Biogas Microbiology in Leipzig (September 2011).
- 10) Lienen, T., Kleyböcker, A., Würdemann, H. (2011) Influence of the microbial biocenosis on the stability of the biogas production process. Jahrestagung VAAM in Karlsruhe (April 2011).
- 11) Lienen, T., Kleyböcker, A., Würdemann, H. (2011) Influence of the microbial biocenosis on the stability of the biogas production process. Progress in Biogas II in Hohenheim (März 2011).