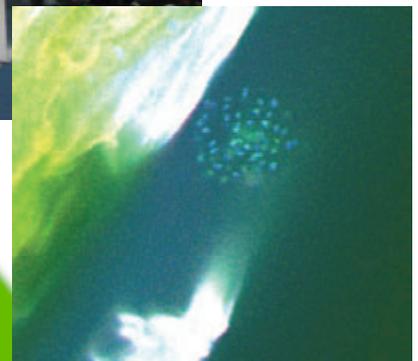
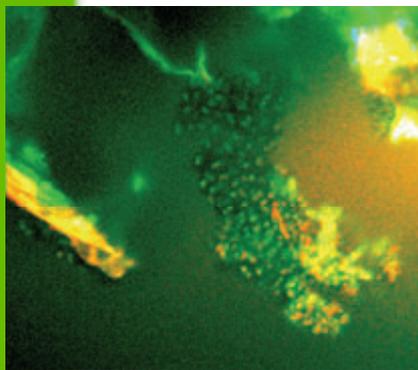




LfL

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen



Schriftenreihe

ISSN 1611-4159

12
2009

Impressum

Herausgeber: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)
Vöttinger Straße 38, 85354 Freising-Weihenstephan
Internet: www.LfL.bayern.de

Redaktion: Institut für Landtechnik und Tierhaltung
Vöttinger Straße 36, 85354 Freising-Weihenstephan
E-Mail: TierundTechnik@LfL.bayern.de
Tel.: 08161/71-3450

1. Auflage: September 2009

Druck: Direkt Marketing & Digitaldruck, 85399 Hallbergmoos

Schutzgebühr: 10.- €

© LfL



Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen

Dipl.-Ing. agr. Christoph Bauer

Dr. Michael Lebuhn

Dr. Andreas Gronauer

Inhaltsverzeichnis		Seite
Zusammenfassung		10
Summary		12
1	Einleitung	15
2	Methanproduktion in Biogasanlagen	16
3	Beteiligte Mikroorganismen	20
3.1	Hydrolytische und acidogene Mikroorganismen	20
3.2	Syntrophe Bakterien	21
3.3	Methanogene Archaeen	22
3.4	Wachstumsgeschwindigkeiten	27
4	Nährstoffversorgung	28
4.1	Makronährstoffe	28
4.2	Mikronährstoffe	29
5	Hemmstoffe	31
5.1	Stickstoff / Ammoniak	31
5.2	Schwefel / Schwefelwasserstoff	32
5.3	Schwermetalle	33
5.4	Antibiotika und Mycotoxine	33
5.5	Tenside	34
6	Ausblick	35
7	Literatur	37

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die unterschiedlichen Stadien der Biogasproduktion mit den wichtigsten Mikroorganismengruppen.....	16
Abbildung 2: Hydrolytische Spaltung von Kohlenhydraten, hier Amylose (Stärke).....	17
Abbildung 3: Hydrolyse eines Triglycerid-Fettes zu Glycerol und längerkettigen Fettsäuren	17
Abbildung 4: Fließschema unterschiedlicher Stoffwechselwege (Gärungen) ausgehend von Glucose bzw. Pyruvat.....	20
Abbildung 5: Eng aneinander lebende Bakterien (grün) und Archaeen (orange) in einem Fermenterschläm-Granulum.....	22
Abbildung 6: Verwandtschaftsverhältnis der drei Domänen des Lebens; rot: Eukaryota (Pflanzen, Tiere, Pilze); blau: Bacteria; grün: Archaea	23
Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahmen von unterschiedlichen methanogenen Archaeen.....	24
Abbildung 8: PCR-SSCP Analyse von Proben aus einem mesophilen Biogasfermenter der LfL.....	26
Abbildung 9: Cofaktor F ₄₃₀ der Methyl-Coenzym-M-Reduktase	29
Abbildung 10: Versorgung mit und Verfügbarkeit von Mikronährstoffen in Biogasfermentern	30
Abbildung 11: Tenside und ihre Wirkungsweise	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Freie Energie von Abbaureaktionen ausgewählter Fettsäuren und Ethanol	18
Tabelle 2:	Die wichtigsten Reaktionswege der Methanogenese	18
Tabelle 3:	Unterschiedliche methanogene Archaeen der DSMZ (2008), ihr methanogener Stoffwechsel und ihre Herkunft.....	24
Tabelle 4:	Zusammensetzung der methanogenen Populationen in mesophil und thermophil mit Maissilage betriebenen Biogasreaktoren.....	27

Abkürzungsverzeichnis / Glossar

Acetogenese: Bildung von Essigsäure

Acetoclastisch: Essigsäure spaltend

Acidogenese: Bildung von (organischen) Säuren

Acidophil: Säureliebend

Alkaliphil: Basische Bedingungen liebend

Amylasen: Stärke-spaltende Enzyme

ATP: Adenosintriphosphat (universeller biochemischer Energieträger)

Benchmark: Festgelegter Referenzwert aus einer vergleichenden Analyse

Biozönose: Gemeinschaft der Mikroorganismen (hier: im Fermenter)

Carrier: Überträger

Cellulolytisch: Cellulosefasern lösend/abbauend

CSB: Chemischer Sauerstoff-Bedarf, Maß für die Summe aller (im Wasser) vorhandenen, unter bestimmten Bedingungen oxidierbaren Stoffe

DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis, Methode zum spezifischen Nachweis bestimmter DNA-Abschnitte unter Zuhilfenahme des Laufverhaltens in einem Gel mit einem Gradienten denaturierender Stoffe

Diversität: Anzahl verschiedener Taxa (meist Spezies) in einer Population

DNA: Deoxyribonukleinsäure, Träger der Erbsubstanz

e⁻: Elektron(en)

Elektronencarrier: Molekül, das Elektronen zur Reduktion eines anderen Moleküls überträgt

Extrazellulär: Außerhalb der Zelle befindlich

FOS/TAC: Verhältnis der flüchtigen organischen Säuren zum anorganischen Carbonat, Parameter zur Einschätzung der Stabilität der Biozönose

Glucose: Traubenzucker

Granulum: Körnchenartige Zusammenballung verschiedener Mikroorganismen

Halophil: Salzhaltige Bedingungen liebend

Hydrogenotroph: Wasserstoff zum Wachstum verwertend

Hydrolyse: Spaltung von Molekülen unter Reaktion mit Wasser

Kation: positiv geladenes Atom bzw. Molekül

kJ: Kilojoule

Klon: Organismus (gewöhnlich Bakterium *Escherichia coli*), in den ein Stück eines fremden Gens eingeführt wurde

Klonierung: Einführung eines artfremden (Teil eines) Gens bzw. von artfremder DNA in einen Organismus (gewöhnlich in das Bakterium *Escherichia coli*)

Lactat: Salz der Milchsäure

Lignocellulose: Verbindung aus Cellulose mit Lignin(-Einlagerungen)

Lipasen: Fett-/Öl-spaltende Enzyme

mcrA/mrtA: Gen der Untereinheit A des Schlüsselenzyms der Methanbildung

Mesophil: Ein mittleres Temperaturniveau (ca. 30 – 40°C) liebend

Methanogenese: Bildung von Methan

Micelle: Aggregat aus grenzflächenaktiven (amphiphilen) Substanzen, das sich in einem Verteilungsmedium (meist Wasser) spontan zusammenlagert

Mikrometer: Ein Tausendstel Millimeter

Mycotoxin: pilzliches Gift

NADH (+H⁺): Nikotinamid-Dinukleotid (reduziert), Elektronencarrier

NADPH (+H⁺): Nikotinamid-Dinukleotid-Phosphat (reduziert), Elektronencarrier

NawaRo: Nachwachsende Rohstoffe

OLR: organic loading rate, organische Raumbelastung

oTS: Organische Trockensubstanz

Oxidation: Zustandsveränderung eines Moleküls unter Elektronenabgabe

PCR: polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion, molekularbiologisches Verfahren zur Vervielfältigung bestimmter Abschnitte der DNA um diese spezifisch nachzuweisen

Polares Molekül: Molekül mit positiv und negativ geladenem Ende

Proteasen: Eiweiß-spaltende Enzyme

Pyruvat: Brenztraubensäure

Reduktion: Zustandsveränderung eines Moleküls unter Elektronenaufnahme

Sequenz: Abfolge der Basen (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin) in der DNA

Sequenzierung: Bestimmung der Basenabfolge der untersuchten DNA (über unterschiedliche Methoden)

Species: Art (taxonomischer Begriff, enge Verwandtschaft: > 97,5: Ähnlichkeit des *rrs*-Gens bei Mikroorganismen)

SpE: Spurenelementcocktail mit definierter Zusammensetzung

SSCP: single strand conformation polymorphism, Methode zum spezifischen Nachweis bestimmter DNA-Abschnitte unter Zuhilfenahme der Faltung einzelsträngiger DNA

Succinat: Salz der Bernsteinsäure

Syntroph: Gemeinsam wachsend, in der Nährstoffverwertung aufeinander angewiesen

Thermophil: Ein hohes Temperaturniveau liebend (ca. 45 – 65°C)

UASB-Reaktor: upflow anaerobic sludge blanket reactor, in der Abwasserreinigung eingesetzter Hochleistungsreaktor mit Rückhaltung der Mikroorganismen

VSS: volatile suspended solids, äquivalent dem oTS, Begriff aus der Abwasserreinigung

Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen

Institut für Landtechnik und Tierhaltung

Dipl.-Ing. agr. Christoph Bauer, Dr. Michael Lebuhn, Dr. Andreas Gronauer

Zusammenfassung

Die Biogasproduktion ist ein gänzlich mikrobiologischer Prozess, der mit den geeigneten verfahrenstechnischen Maßnahmen nutzbare Energieträger (Methan, u.U. Wasserstoff) liefert. Optimierungen des Prozesses betreffen daher nicht nur die Verfahrenstechnik sondern vor allem die mikrobiologischen Schritte der Substratumsetzung von der Hydrolyse bis hin zur Methanogenese. Die einzelnen Schritte müssen optimal aufeinander eingespielt sein, damit der Gesamtprozess reibungslos abläuft.

Das schwächste Glied der Kette bestimmt die Leistung und die Geschwindigkeit des Gesamtsystems. Um spezifische Optimierungen vornehmen zu können, müssen die Einzelglieder, ihre speziellen Leistungen, ihre Interaktionen und Bedürfnisse bekannt sein. Dies ist bisher nur in Ansätzen der Fall, im Prinzip wird eine Biogasanlage noch als „black box“ im „trial-and-error“-Modus betrieben. Besonders bei weniger eingespielten Prozessführungen, Systemänderungen oder Fehlern im Betrieb kann dies fatale Folgen haben, die bei Kenntnis der mikrobiologischen Einzelprozesse und Zusammenhänge hätten vermieden werden können.

Inzwischen wissen wir, dass insbesondere die syntrophen Bakterien und die methanogenen Archaeen nur im engen Zusammenspiel an der Grenze thermodynamisch möglicher Energiegewinnung leben können, und der Elektronenfluss bei höheren Raumbelastungen praktisch nur noch über den „Interspecies-Wasserstoff-Transfer“ (möglicherweise „Interspecies-Elektronen-Transfer“) zu hydrogenotrophen Methanogenen erfolgt. Unter solchen Bedingungen sind die Hydrogenotrophen dominant und produzieren das Methan im Biogas. Acetat wird praktisch nicht gespalten, dessen Verwertung erfolgt wahrscheinlich ausschließlich über die syntrophe Acetat-Oxidation. Die aus der Klärschlammvergärung aufgestellten Dogmen zu den mikrobiologischen Abläufen der Biogasproduktion gelten also allenfalls teilweise für die landwirtschaftlichen Hochlastfermenter mit ihren relativ kurzen Verweilzeiten der Mikroorganismen. Insbesondere die Regel, dass Methan zu 70 % aus der Essigsäurespaltung und zu 30 % aus der Wasserstoffverwertung stammt, ist hier nicht haltbar.

Dies hat u.a. Konsequenzen für die Wahl einer geeigneten Fermenterdurchmischung. Für den Abbau der organischen Substrate müssen einerseits durch Zerkleinerung und Rühren ständig neue Substratoberflächen geschaffen werden. Damit der Interspecies- H_2/e^- -Transfer effizient ablaufen kann, dürfen Syntrophe und Methanogene aber nicht längerfristig räumlich getrennt werden. Hierfür ist ein langsam laufendes Rührwerk mit möglichst gleicher Wirk-Intensität über das gesamte Volumen sinnvoll. Günstige Rührintervalle müssen individuell optimiert werden. Schnellläufer können destruktiv sein.

Syntrophe und Methanogene können nur vergleichsweise langsam wachsen und sich deshalb am schlechtesten an plötzliche Änderungen anpassen. Zu schnelles Anfahren der

Fermenter, zu hohe Raumbelastung (hohe Ausdünnungsrate der Mikroorganismen!), Substratwechsel, aber auch schwankende Milieubedingungen (z.B. im pH-Wert oder der Fermentertemperatur) können ihre Aktivität stark beeinträchtigen.

Auch eine angepasste Nährstoffversorgung ist für eine optimale Stoffumsatzleistung der Mikroorganismen notwendig. Dies gilt nicht nur für die Makronährstoffe, die u.a. wegen der Problematik der Toxizität von Ammoniak und Schwefelwasserstoff in einem ausgewogenen Verhältnis vorliegen sollten, sondern auch für eine Reihe von Mikronährstoffen, für die Spurenelemente. Insbesondere methanogene Archaeen aber auch syntrophe Bakterien haben hier ungewöhnliche Ansprüche. Vor allem Cobalt und Selen sind in Maissilage meist in nicht ausreichender Konzentration vorhanden, aber auch bei Nickel, Molybdän, Eisen und Natrium ist auf ausreichende Gegenwart zu achten. Andere Mikronährstoffe scheinen typischerweise nicht limitierend zu sein.

Ist die Aktivität der Syntrophen/Methanogenen gehemmt bzw. sind diese Mikroorganismen nicht ausreichend vorhanden, stauen sich die in den Vorprozessen gebildeten Säuren an und es kommt zur Versäuerung des Gesamtprozesses. Wenn die Fütterung nicht zumindest stark reduziert oder der Mangel ausgeglichen wird, kann dies zum „Absturz“ der Biogasanlage führen.

Eine erhöhte Konzentration von bestimmten Schwermetallen bzw. Spurenelementen kann nicht nur auf den Menschen und die Umwelt schädigend wirken sondern auch die Biogasproduktion hemmen. Hier ist vor allem bei Anlagen mit Güllezusatz auf Kupfer und Zink zu achten. Beim Spurenelementzusatz sollten die Elemente nicht überdosiert werden, denn neben einer Toxizitätsschwelle für den Prozess können auch rechtliche Vorgaben überschritten werden. Auch bei stickstoff- und schwefelreichem Substrat können Toxizitäten durch Ammoniak und Schwefelwasserstoff für Mensch, Umwelt und die Fermenterbiologie auftreten. Weitere Hemmstoffe können Antibiotika, Mycotoxine und Tenside sein. Deren Wirkung auf die Biogasproduktion ist anscheinend substanzspezifisch und ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung.

Summary

Biogas production is an entirely microbiological process yielding usable energy carriers (methane, possibly hydrogen) if suitable engineering techniques are applied. Optimization of the process does therefore not only concern process engineering but even more the different microbiological substrate conversion steps from hydrolysis to methanogenesis. The single steps must proceed in optimal coordination in order to run smoothly the whole process.

The weakest link in the chain is governing the performance and the speed of the whole process. In order to be able to realize specific optimization, the elements of the chain, their individual performance and their demands and interactions must be known. However, respective knowledge is scarce and only slowly emerging. In principle a biogas plant is still operated as black-box in trial-and-error mode. This can have fatal consequences particularly with less experienced operation processes, system changes or operation failures. Damage may be avoided if the single microbial conversions and their interdependence are known.

Meanwhile we are aware that particularly syntrophic bacteria and methanogenic archaea can thrive only in very tight cooperation at the limit of thermodynamically possible energy gain. Moreover, the flux of electrons appears to proceed at higher organic loading rate virtually only by “interspecies-hydrogen-transfer” (possibly “interspecies-electron-transfer”) to hydrogenotrophic methanogens. At these conditions, hydrogenotrophs are dominant and produce the biogas methane. Acetate cleavage seems to be insignificant, it is converted almost exclusively via syntrophic acetate oxidation. The dogmas of microbiological biogas production pathways resulting from experience in anaerobic wastewater sludge digestion are hence valid only partially for agricultural high performance biogas plants with their short microbial retention times. Especially the rule that methane is originating by 70 % from acetate cleavage and by 30 % from hydrogen consumption cannot be sustained for such plants.

This has consequences, e.g. for the choice of a suitable fermenter stirring device. On the one hand, new substrate surfaces must be made accessible permanently by comminution and stirring for an efficient substrate degradation. On the other, syntrophic bacteria and methanogenic archaea must not be separated spatially for longer periods in order to allow for efficient interspecies-hydrogen/e⁻-transfer. For this task, slowly running stirring devices working equally as much as possible on the whole volume is suggested. Suitable stirring intervals must be optimized individually. High speed stirrers can be destructive.

Syntrophs and methanogens can grow comparatively only slowly, and therefore adapt the worst to sudden changes of conditions. Too rapid starting up of fermenters, to high loading rate (high microbial dilution rate!), substrate changes as well as fluctuating process conditions (e.g. of pH value or fermenter temperature) can considerably impede their activity.

Adjusted nutrient supply to the microorganisms is also highly important in order to yield optimum substrate conversion. This does not only concern macrolelements that should be present in a well-balanced proportion due to the toxicity of ammonia and hydrogen sulphide. It concerns also micronutrients, especially the trace elements. Particularly cobalt and selenium are typically not present in sufficient concentration in maize silage. Sufficient nickel, molybdenum, iron and sodium has to be available as well. Other micronutrients do not seem to be limiting in typical cases.

If the activity of syntrophs/methanogens is constrained or if these microorganisms are not present in sufficient population density, volatile fatty acids formed in upstream processes accumulate and the whole process acidifies. If feeding is not stopped or at least significantly reduced, this can lead to failure of the biogas plant.

Elevated concentration of certain heavy metals or trace elements can not only be toxic for man and environment but also impede biogas production. Particular attention must be paid to copper and zinc if manure and cowdung is added. When trace elements are supplied additionally, overdosage must be avoided since toxicity thresholds of the process and legal directives may be trespassed. If substrates rich in nitrogen or sulfur are fed, formation of ammonia and hydrogen sulphide can trigger toxic effects for man, environment and fermenter biology. Further inhibitors can be antibiotics, mycotoxins and tensides. Their impact on biogas production appears to be dependent on the nature of the compound and is also investigated currently.

1 Einleitung

Die Energiegewinnung durch Biogasproduktion hat mit der Verknappung fossiler Ressourcen und der Explosion der Preise für die Energieversorgung in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Von den ca. 4000 Biogasanlagen in Deutschland wird die Mehrzahl wegen des höheren Biogas-Ertrags mit nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) betrieben, meist in Co-Vergärung mit Wirtschaftsdüngern. Für einen ökonomisch und ökologisch sinnvollen Betrieb von NawaRo-Biogasanlagen muss größte Effizienz erreicht werden. Dabei ist die Optimierung des Prozesses mit der Steuerung der mikrobiellen Aktivität eng verbunden, der Zustand und die Zusammensetzung der Lebensgemeinschaft der Mikroorganismen ist für die Leistung eines Fermenters entscheidend.

Allerdings sind die mikrobiellen Vorgänge und Bedürfnisse in Biogasfermentern teilweise nur ansatzweise verstanden, typischerweise werden Fermenter von Biogasanlagen als „black box“ betrieben. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft (Biozönose) stellt sich auf die Substrate und die physikalischen Bedingungen ein und kann daher zwischen Fermentern mit unterschiedlicher Beschickung und Betriebsweise stark variieren. Dabei mussten wir bis vor kurzem davon ausgehen, dass weniger als 1 % der Arten in der Fermenter-Biozönose bekannt und von diesen etwa 1 % kultivierbar ist.

Die Umsetzungen in der Biogasproduktion sind sehr komplex. Mittlerweile liegen zwar neben den Erkenntnissen aus der mikrobiologischen Grundlagenforschung auch einige Ergebnisse aus dem Betrieb von Praxisanlagen vor. Allerdings kann besonders in Grenzbereichen dieser Erfahrungen oder jenseits dieser Grenzen – beispielsweise bei einem Substratwechsel - das Treffen einer Entscheidung für den Betreiber schwierig werden. Grundlegende Kenntnisse der mikrobiologischen Umsetzungen und ein Verständnis für die entsprechend nötigen Rahmenbedingungen können hier sehr hilfreich sein, vielleicht sogar ausschlaggebend für den Erfolg.

Die vorliegende Schrift soll den Betreibern und Beratern von landwirtschaftlichen Biogasanlagen Informationen über die mikrobiellen Zusammenhänge in Fermentern liefern, um mit den gewonnenen Erkenntnissen Zustände des Fermenters besser zu erkennen, zu beurteilen und zu steuern. Sie stellt den aktuellen Kenntnisstand der verschiedenen mikrobiologischen Prozesse in der landwirtschaftlichen Biogasproduktion dar, geht auf die bisher bekannten, für die Biogasproduktion wichtigen Mikroorganismen sowie auf deren spezifische Nährstoffansprüche ein und beschreibt wichtige Hemmstoffe sowie bekannte Hemmungsmechanismen.

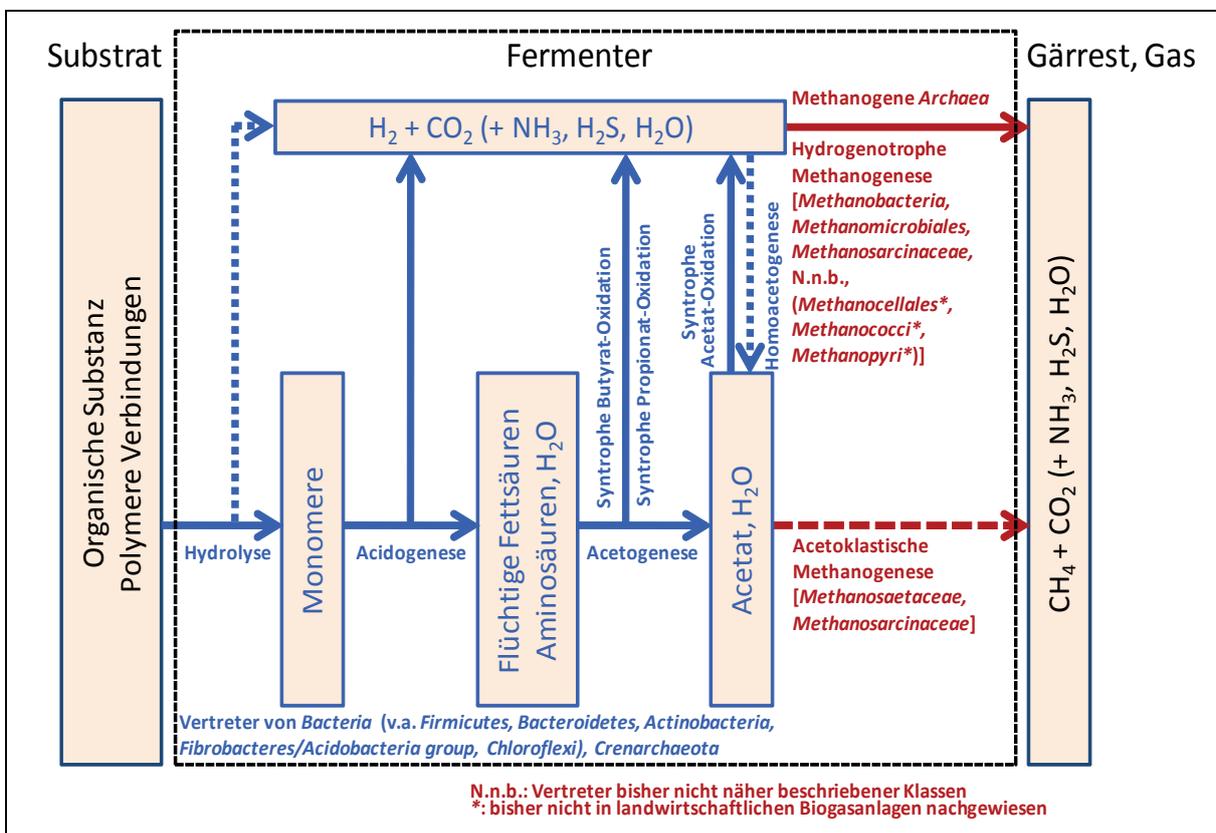
Der Bereich Hygienisierung durch die anaerobe Vergärung ist in der vorliegenden Schrift nicht angesprochen. Für dieses Themengebiet wird auf Lebuhn und Wilderer (2006), Lebuhn et al. (2007) sowie auf die entsprechenden Kapitel im Biogashandbuch Bayern (2008) verwiesen.

2 Methanproduktion in Biogasanlagen

Die mikrobielle Umsetzung von organischem Material zu Biogas (Abbildung 1) setzt sich im Wesentlichen aus vier Schritten zusammen.

Im ersten Schritt, der sogenannten **Hydrolyse** (chemisch: Spaltung von Molekülen unter Reaktion mit Wasser), zerlegen vor allem Bakterien komplexe Makromoleküle aus Kohlenhydraten (zum Beispiel Stärke, Abbildung 2), Fetten (Abbildung 3) und Proteinen enzymatisch. Dabei entstehen vor allem kürzere Spaltprodukte (Oligomere, Monomere), Zucker, Aminosäuren und Fettsäuren.

Man sollte beachten, dass die strenge chemische Definition der Hydrolyse sich nicht mit dem verfahrenstechnischen Begriff der Hydrolyse als Phase im Anlagenbetrieb deckt. Bei der biochemischen Umsetzung mit Wasser werden kaum Säuren und Gas gebildet, in der „Hydrolysephase“ von Biogasanlagen entsteht das sogenannte Hydrolysegas ($H_2 + CO_2$) sowie der wesentlichste Teil der organischen Säuren und Alkohole. Die „Hydrolysephase“ (in der Praxis zumeist Hydrolysestufe genannt) von Biogasanlagen beinhaltet also den größten Teil der Acidogenese (Säurebildung, s. unten).



nach Lebuhn und Gronauer (2009), verändert

Abbildung 1: Die unterschiedlichen Stadien der Biogasproduktion mit den wichtigsten Mikroorganismengruppen

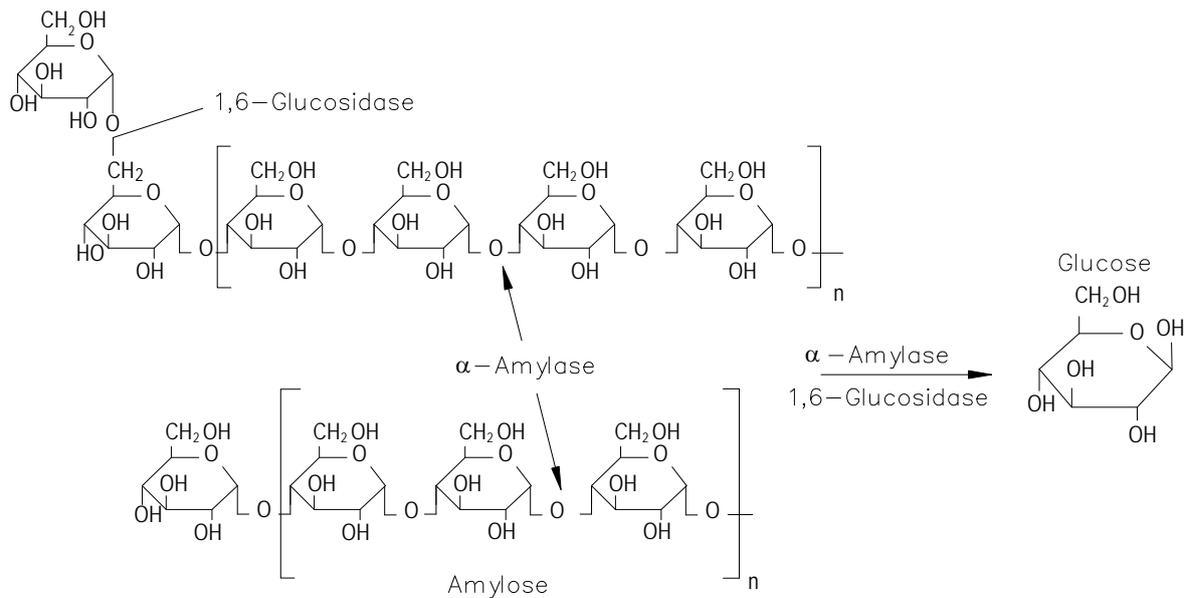


Abbildung 2: Hydrolytische Spaltung von Kohlenhydraten, hier Amylose (Stärke)

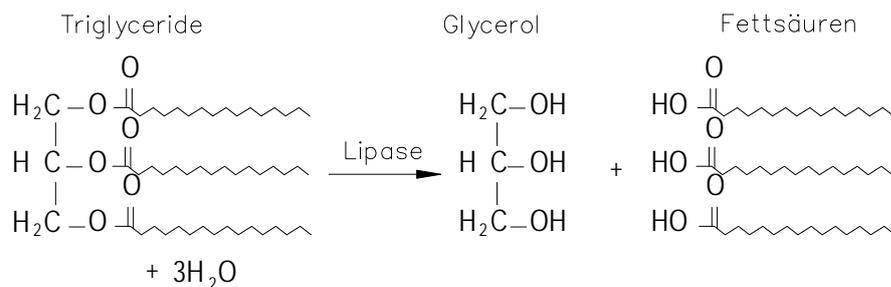


Abbildung 3: Hydrolyse eines Triglycerid-Fettes zu Glycerol und längerkettigen Fettsäuren

Auf Vertreter der hydrolytischen Mikroorganismen wird in 3.1 näher eingegangen.

In der **Acidogenese** (Versäuerungsphase) entstehen aus den Hydrolyseprodukten (vor allem aus den Zuckern, Fetten und Proteinen) Wasserstoff, Kohlendioxid, Alkohole und Fettsäuren. Beim Einsatz von veresterten Ölen/Fetten (z.B. Rapsöl) und proteinlastigen Substraten (z.B. Klee gras) ist zu beachten, dass aus Schwefelverbindungen H_2S (Schwefelwasserstoff) und aus Stickstoffverbindungen NH_3 (Ammoniak) entstehen, die für Mensch, Umwelt und den Prozess toxisch werden können (s. 5).

Ein verstärktes Auftreten von Propionsäure, Isobuttersäure, Isovaleriansäure, Capronsäure und Oenanthsäure ist ein Indikator für einen instabilen Prozess, in dem die folgenden Schritte (Acetogenese, Methanogenese, Abbildung 1) nicht effizient ablaufen.

Auf Vertreter der acidogenen Mikroorganismen wird in 3.1 näher eingegangen.

In der **Acetogenese** (Essigsäurebildung) werden die Produkte der Acidogenese weiter in kleinere Moleküle umgesetzt. Es entstehen vor allem Essigsäure (Acetat), Wasserstoff und Kohlendioxid. Acetogene bzw. syntrophe Bakterien bauen durch Hydrolyse (β -Oxidation der Fettsäuren) oder komplexere Reaktionen die Fettsäuren weiter ab (Tabelle 1).

Tabelle 1: Freie Energie von Abbaureaktionen ausgewählter Fettsäuren und Ethanol

CH ₃ CH(CH ₃)CH ₂ COO ⁻ + H ⁺ + CO ₂ + 2H ₂ O (Isovaleriansäure, Kohlendioxid, Wasser)	→	3CH ₃ COO ⁻ + 3H ⁺ + H ₂ (Essigsäure, Wasserstoff)	ΔG ^{o'} = +25,2 kJ * Mol ⁻¹
CH ₃ (CH ₂) ₂ COO ⁻ + H ⁺ + 2H ₂ O (Buttersäure, Wasser)	→	2CH ₃ COO ⁻ + 2H ⁺ + 2H ₂ (Essigsäure, Kohlendioxid, Wasserstoff)	ΔG ^{o'} = +48,3 kJ * Mol ⁻¹
CH ₃ CH ₂ COO ⁻ + H ⁺ + 2H ₂ O (Propionsäure, Wasser)	→	CH ₃ COO ⁻ + H ⁺ + CO ₂ + 3H ₂ (Essigsäure, Kohlendioxid, Wasserstoff)	ΔG ^{o'} = +76,0 kJ * Mol ⁻¹
CH ₃ CH ₂ OH + H ₂ O (Ethanol, Wasser)	→	CH ₃ COO ⁻ + H ⁺ + 2H ₂ (Essigsäure, Wasserstoff)	ΔG ^{o'} = +9,6 kJ * Mol ⁻¹
CH ₃ COO ⁻ + H ⁺ + 2H ₂ O (Essigsäure, Wasser)	→	2CO ₂ + 4H ₂ (Kohlendioxid, Wasserstoff)	ΔG ^{o'} = +94,9 kJ * Mol ⁻¹

Die Energiebilanz (ΔG^{o'}, Änderung der Gibbs-Energie unter Standardbedingungen) der meisten Reaktionen der Acetogenese ist positiv, das heißt, dass die Mikroorganismen, die die Reaktionen durchführen (s. 3.2), unter Standardbedingungen (Konzentration der an der Reaktion beteiligten Substanzen ist jeweils 1 Mol * L⁻¹, Druck = 1013 millibar, Temperatur = 25°C, pH = 7) mehr Energie investieren müssen als sie gewinnen. Wenn aber die Produkte aus dem vorhergehenden Prozess von anderen Mikroorganismen entfernt werden (sowie zusätzlich bei höherer Temperatur oder wenn sich der pH-Wert erhöht), kann die Gibbs-Energie negativ werden und die Acetogenese zumindest mit geringem Energiegewinn für die Mikroorganismen ablaufen (Schink, 1997).

Der Ablauf der einzelnen syntrophen Reaktionen erscheint zwar auf den ersten Blick einfach, tatsächlich handelt es sich zumindest teilweise (dies konnte z.B. für die Oxidation von Propionsäure gezeigt werden) um komplizierte Umsetzungen über mehrere Zwischenstufen. Diese aufzuklären ist auch Gegenstand aktueller Forschung.

Auf Vertreter der acetogenen Mikroorganismen wird in 3.2 näher eingegangen.

Im letzten Schritt, der **Methanogenese** (Methanbildung), werden vor allem Essigsäure, Wasserstoff und Kohlendioxid von methanogenen Archaeen (s. 3.3) in Kohlendioxid, Wasser und Methan umgewandelt. In landwirtschaftlichen Biogasanlagen geschieht dies entgegen der Lehrbuchmeinung bei höherer Raumbelastung vorwiegend über den hydrogenotrophen (Wasserstoff verwertenden) Reaktionsweg mit starker Beteiligung der syntrophen Acetat-Oxidation (Schnürer et al., 1999) und nur bei relativ geringer Raumbelastung nennenswert über den acetoclastischen (Essigsäure spaltenden) Weg (Bauer et al., 2008; Leuhn et al., 2008a). Ein direkter Transfer von Elektronen zu den Methanogenen über sog. Nanoleiter („Elektromethanogenese“) wird derzeit als möglicher, sehr effizienter Mechanismus der Methanbildung diskutiert (Gorby et al., 2006). Über die Beteiligung der CO₂- und Methylreduktionswege ist wenig bekannt, wahrscheinlich spielen sie hier aber eine untergeordnete Rolle.

Tabelle 2: Die wichtigsten Reaktionswege der Methanogenese

hydrogenotroph:	CO ₂ + 4 H ₂ (Kohlendioxid, Wasserstoff)	→	CH ₄ + 2 H ₂ O (Methan, Wasser)	ΔG ^{o'} = -131,0 kJ * Mol ⁻¹
acetoclastisch:	CH ₃ COO ⁻ + H ⁺ (Essigsäure)	→	CH ₄ + CO ₂ (Methan, Kohlendioxid)	ΔG ^{o'} = -35,9 kJ * Mol ⁻¹

Da die Methanogenese ein energieliefernder Prozess ist (Tabelle 2), kann sie die energiezehrenden Reaktionen der Acetogenese (Tabelle 1) ermöglichen. Wenn die freie Energie in der Summe ein Minimum von -20 kJ übersteigt (Schink, 1997), kann sie zur Bildung des universellen Energieträgers ATP von beiden Partnern für den eigenen Stoffwechsel genutzt werden.

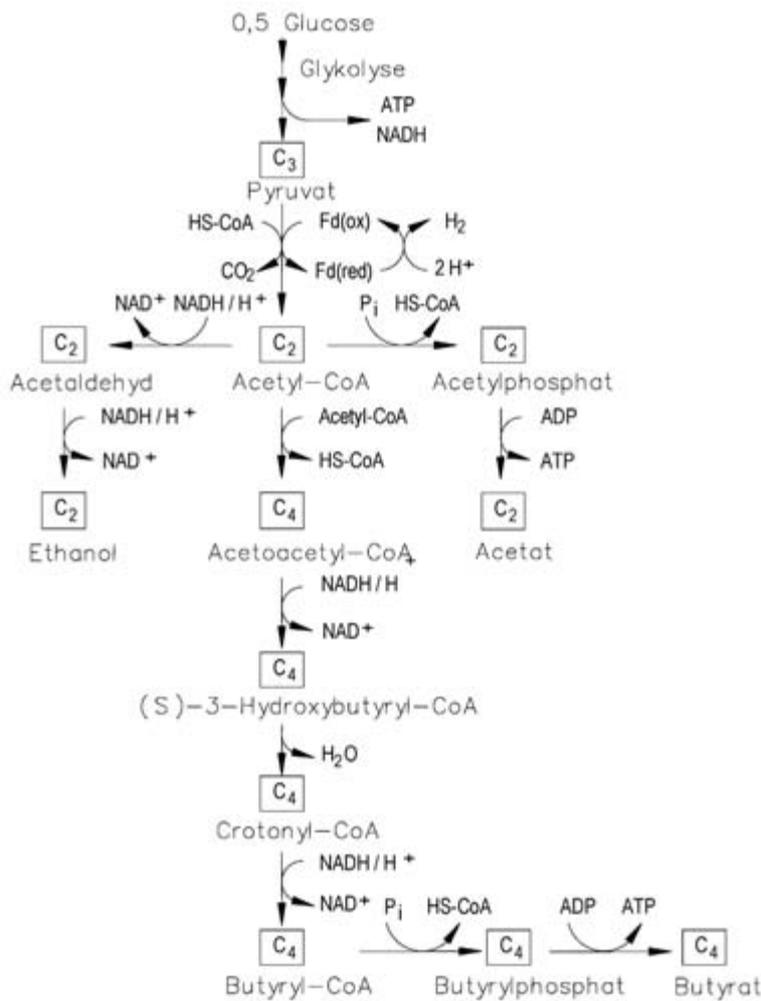
Der ausgefaulte Gärrest besteht typischerweise aus relativ schwer abbaubarem organischem Material (Lignocellulose-Verbindungen) und anorganischen Rückständen (Salze), wenn die Prozesskette insgesamt effizient funktioniert. Wegen der relativ hohen Anteile an Stickstoff, Phosphat und Kalium ist er gut als landwirtschaftlicher Dünger geeignet, allerdings ist zu beachten, dass sich ggf. auch giftige Schwermetalle anreichern können (Lebuhn und Gronauer, 2009; s.a. 5.2).

Auf Vertreter der methanogenen Mikroorganismen wird in 3.3 näher eingegangen.

3 Beteiligte Mikroorganismen

3.1 Hydrolytische und acidogene Mikroorganismen

Viele verschiedene Mikroorganismen können die zum Substratabbau hydrolytischen bzw. acidogenen Prozesse durchführen. Hydrolyse und Acidogenese sind meist nicht klar zu trennen, da sie typischerweise gemeinsam im Stoffwechsel ablaufen - das heißt, dass sich bereits organische Säuren in den von den einzelnen Mikroorganismen ausgeschiedenen, nicht verwerteten Produkten finden.



nach Schlegel, 2007

Abbildung 4: Fließschema unterschiedlicher Stoffwechselwege (Gärungen) ausgehend von Glucose bzw. Pyruvat

Die hydrolytisch/acidogenen Umsetzungen werden vor allem von Bakterien durchgeführt, es scheinen aber auch manche Archaeen (*Crenarchaeota*, Abbildung 6) daran beteiligt zu sein. Hydrolytisch/acidogene Bakterien finden sich insbesondere in der Verwandtschaft der Gram-positiven *Firmicutes* (Abbildung 6); hier sind vor allem Clostridien und Bacillen zu nennen, sie wurden häufig in landwirtschaftlichen Biogasanlagen nachgewiesen (Krause et al., 2008). Daneben scheinen aber auch Vertreter der *Bacteroidetes* und *Actinobacteria* eine wichtige Rolle zu spielen. Für die Biogasproduktion aus NawaRo sind die cellulolytischen Mikroorganismen von besonderem Interesse, die die ersten Schritte des Abbaus der Lignocellulose-Komplexe in der pflanzlichen Biomasse durchführen. Hier sind offenbar manche Arten der Clostridien besonders effizient (Lynd et al., 2002).

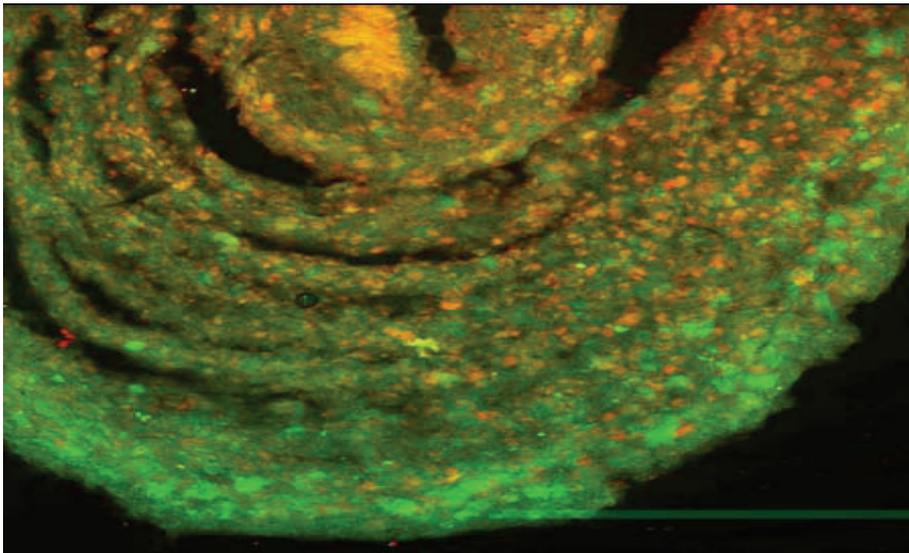
Neben den oben genannten finden sich hydrolytisch/acidogene Bakterien u.a. in den Gattungen *Lactobacillus*, *Desulfovibrio*, *Vibrio*, *Acetovibrio*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* und *Sarcina*; hier besteht noch großer Forschungsbedarf. Sie zersetzen Fette, Zuckerverbindungen oder Proteine mit Hilfe extrazellulärer Enzyme, wie Lipasen, Amylasen oder Proteasen. Typischerweise wachsen sie deutlich schneller (s. 3.4) als syntrophe Bakterien (s. 3.2) und methanogene Archaeen (s. 3.3).

Die Acidogenese kann bei den Bakterien über unterschiedliche Stoffwechselwege ablaufen (Abbildung 4). Das Spektrum der gebildeten Säuren hängt dabei stark vom pH-Wert und den aktuellen Gehalten an längerkettigen Kohlenstoffverbindungen (insbesondere Fettsäuren) ab. Bei niedrigem pH-Wert (H^+ -Überschuss) liegt der Elektronencarrier NAD(P) überwiegend als NAD(P)H/ H^+ vor. Nun fallen beim Substratabbau (Oxidation) Elektronen an, die großenteils über NAD(P)H/ H^+ „entsorgt“ werden. Der entstehende NAD(P)H/ H^+ -Überschuss kann nicht in der Essigsäure-Gärung, wohl aber in der alkoholischen und der Buttersäuregärung sowie in der Milchsäuregärung abgebaut werden (Abbildung 4). Dabei entstehen im Biogasprozess unerwünschte Reaktionsprodukte wie Lactat oder Ethanol aber auch längerkettige Fettsäuren bzw. Alkohole, die besonders bei niedrigem pH-Wert die Aktivität von Mikroorganismen hemmen können (siehe 5.5).

3.2 Syntrophe Bakterien

Syntrophe Bakterien sind strikt anaerob, schwer kultivierbar und daher kaum erforscht. Sie können nur vergesellschaftet mit anderen Mikroorganismen wachsen, da sie auf deren Stoffwechselleistungen angewiesen sind. Sie leben an der Grenze thermodynamisch möglicher Energiegewinnung (Schink, 1997) und wachsen daher typischerweise nur langsam. Beispielsweise ist der energiezehrende Fettsäureabbau (Tabelle 1) durch die syntrophen Fettsäure-Oxidierer ohne Hilfe der methanogenen Archaeen (s. 3.3) nicht möglich (vgl. 2: Acetogenese, Methanogenese). Da methanogene Archaeen im Wesentlichen nur C1-Verbindungen, Wasserstoff und Acetat verwerten können, müssen die Produkte der vorhergehenden Prozesse mit mehr als 2 C-Atomen (z.B. Succinat, Lactat, Fettsäuren, Alkohole, aromatische Reste) für die Methanogenen durch die syntrophen Bakterien oxidiert und zerkleinert werden.

Die Oxidation von Fettsäuren zu Essigsäure und C1-Verbindungen durch syntrophe Bakterien ist wegen des Mangels an geeigneteren Elektronenakzeptoren als H^+ in Biogasreaktoren praktisch nur über Produktion von energiereichem Wasserstoff (u.U. Ameisensäure) möglich. Ein theoretisch hier hilfreicher Zusatz von Sulfat oder Nitrat würde die Methanogenese unterdrücken und kann deshalb nur in Ausnahmefällen empfohlen werden. Da Wasserstoff in Wasser kaum löslich ist, würde sich ohne dessen Weiterverwertung in unmittelbarer Nähe der Syntrophen schnell eine hohe H_2 -Konzentration ausbilden, die die Reaktion thermodynamisch unmöglich macht (Endprodukthemmung, s.a. 2); bei einem Entweichen von H_2 aus dem System wäre die Energie für die Mikroorganismen verloren. Die Fettsäureoxidation wird aber möglich, wenn H_2 aus dem Gleichgewicht entzogen, also weiter umgesetzt wird. Diese Funktion erfüllen die hydrogenotrophen methanogenen Archaeen unter Energiegewinn (Tabelle 2). Deshalb wachsen syntrophe Bakterien und die Methanogenen typischerweise sehr eng assoziiert (Abbildung 5). Man spricht hier von "Inter-Species-Elektronentransfer", da die Elektronen (z.B. in Form des Wasserstoffs; Schink, 1997) zwischen sehr unterschiedlichen Mikroorganismen übertragen werden. Syntrophe und Methanogene leben dabei nicht weiter als wenige Mikrometer (ca. eine Bakterienlänge) von einander entfernt. Inwieweit der Elektronentransfer auch über Ameisensäure als Carrier oder ohne Carrier stattfindet ist noch umstritten.



Sanz et al., 2009

Abbildung 5: Eng aneinander lebende Bakterien (grün) und Archaeen (orange) in einem Fermenterschlämm-Granulum

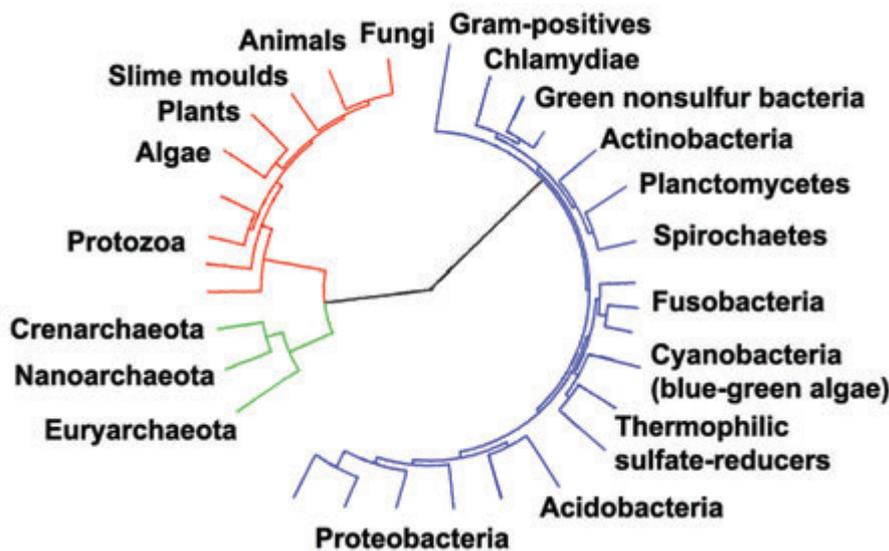
In Biogasanlagen domiert bei höherer Raumbelastung der hydrogenotrophe Weg der Methanbildung (Bauer et al., 2008; Krause et al., 2008; Lebuhn und Gronauer, 2009). Eine Trennung dieser syntrophen Lebensgemeinschaft z.B. durch zu schnelles und häufiges Rühren kann wegen der erforderlichen Nähe der Syntrophen und Methanogenen schädlich für den Biogasprozess werden. Allerdings müssen auch neue Angriffsflächen für den anfänglichen Substratabbau durch die Bakterien geschaffen werden. Daher sollten Rührwerke in Biogasreaktoren langsam laufen und Geschwindigkeit und Rührintervall substratspezifisch optimiert werden.

Syntrophe Bakterien sind (ähnlich wie methanogene Archaeen) praktisch überall zu finden (ubiquitär). Sie sind typischerweise zur Bildung resistenter Überdauerungsformen (z.B. Sporen) fähig, können aber nur im anaeroben Milieu aktiv werden. Fettsäure-oxidierende Bakterien können aus sehr verschiedenen Verwandtschaften (Taxa) kommen. Als Beispiele seien Vertreter der Gattungen *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Syntrophospora*, *Syntrophus*, *Propionibacter*, *Sporotomaculum*, *Pelotomaculum*, *Thermoanaerobium*, *Pelobacter* und *Smithella* genannt, aber auch in der Gattung *Clostridium* und bei den δ -*Proteobacteria* finden sich Syntrophe.

3.3 Methanogene Archaeen

Zu einer nennenswerten Bildung von Methan sind nur bestimmte Archaeen des Phylums *Euryarchaeota* (Abbildung 6) fähig, sie sind damit einzigartig in der Natur. Archaeen sind einzellige Anaerobier, die zwar zu den Prokaryonten (Organismen ohne echten Zellkern) gezählt werden, aber keine Bakterien sind. Sie wurden in den Siebziger Jahren von den Mikrobiologen Carl R. Woese und George E. Fox entdeckt. 1990 wurde offiziell, dass die damals entdeckten „Archaebakterien“ neben den *Eukaryota* (Organismen mit typischen Zellkernen: Tiere, Pflanzen, Pilze) und *Bacteria* (den eigentlichen Bakterien) die eigenständige Domäne „*Archaea*“ des Lebens darstellen. Dabei wurde ein neues, heute allgemein akzeptiertes Klassifizierungsmodell für Lebewesen erstellt, das auf Ähnlichkeitsanalysen der DNA-Zusammensetzung beruht und ständig erweitert wird (Abbildung 6).

Archaeen wurden zunächst bei der Untersuchung extremer Habitate gefunden, daher stammt auch der Name "Extremophile". Sie wurden in stark sauren (acidophile Archaeen) sowie basischen (alkaliphile Archaeen) Umgebungen nachgewiesen, in stark salzhaltigen Gebieten (halophile Archaeen) sowie in Regionen mit Dauerfrost und Umgebungen, die über 100°C heiß sind. Neueren Untersuchungen nach kommen sie praktisch ubiquitär vor und können im anaeroben Milieu Aktivität entfalten. Meeressedimente und Böden, ozeanische und terrestrische vulkanische Gebiete, Salzseen, Sümpfe, Tundren, Moore, Reisfelder, Verdauungstrakte von Mensch und Tier (z.B. Wiederkäuer-Pansen) sowie Biogasanlagen sind typische Lebensräume von Archaeen.



Je kürzer die Distanz über die zum Zentrum weisenden Verbindungslinien, desto ähnlicher ist die DNA und desto größer die Verwandtschaft

Letunic, 2007

Abbildung 6: Verwandtschaftsverhältnis der drei Domänen des Lebens; rot: Eukaryota (Pflanzen, Tiere, Pilze); blau: Bacteria; grün: Archaea

Eine ähnlich ubiquitäre Verbreitung haben offenbar auch methanogene Archaeen (Tabelle 3), die innerhalb der Euryarchaeota in den Klassen *Methanomicrobia*, *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanopyri* zu finden sind. Eine Auswahl kultivierter, bei der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen hinterlegter Stämme, ist in Tabelle 3 aufgelistet. Vertreter der *Methanococci* und *Methanopyri* konnten bisher in Biogasanlagen noch nicht nachgewiesen werden. Aus unseren aktuellen Arbeiten geht hervor (Lebuhn, unveröffentlicht), dass in Biogasanlagen methanogene Vertreter von zumindest 2 noch nicht beschriebenen Klassen der Archaeen vorkommen können. Diese näher zu beschreiben ist Gegenstand künftiger Forschungsarbeit.

In Biogasanlagen produzieren methanogene Archaeen im Normalfall bei einem pH-Wert von 6,8 - 7,5 am meisten Biogas. In Abbildung 7 ist eine Auswahl typischer Vertreter dargestellt. Im Gegensatz zu hydrolytischen und acidogenen Bakterien schaffen Archaeen ein eher alkalisches Milieu. Dies geschieht einerseits direkt durch die Verwertung von Essigsäure (acetoclastische Methanogenese, s. 2), da das entstehende CO₂ sich teilweise im Fermenter löst und Carbonat-Pufferkapazität schafft, während CH₄ entweicht. Andererseits machen sie den Fermenterinhalt indirekt mit Hilfe der Syntrophen basischer durch den Abbau des Wasserstoffs (Tabelle 2), den die Syntrophen beim Säureabbau produzieren (s. 3.2, Tabelle 1). Dieser Effekt ist bei zweistufig-zweiphasigen Biogasanlagen deutlich zu

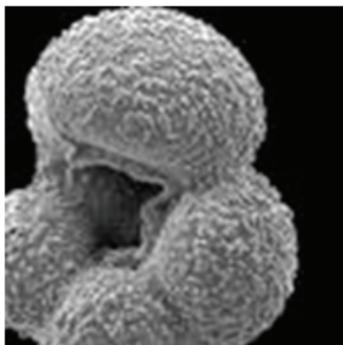
erkennen. Im 2-phasigen Betrieb ist die erste Stufe/Phase (Hydrolyse und Acidogenese) deutlich saurer (gewöhnlich pH 5,5 – 6,5) als die zweite Stufe/Phase (Acetogenese und Methanogenese, gewöhnlich pH 7,5 – 8,5).

Tabelle 3: Unterschiedliche methanogene Archaeen der DSMZ (2008), ihr methanogener Stoffwechsel und ihre Herkunft

Stamm [Familie [#]]	Stoffwechsel*	Herkunft	Stamm [Familie]	Stoffwechsel*	Herkunft
<i>Methanosaeta thermophila</i> (DSM 3870) [MX]	A	thermophiler Biogasreaktor	<i>Methanocorpusculum aggregans</i> (DSM 3027) [MC]	H	Klärschlamm
<i>Methanosarcina mazei</i> (DSM 2244) [MS]	H+A	anaerobes Sediment	<i>Methanobacterium bryantii</i> (DSM 1682) [MB]	H	Klärschlamm
<i>Methanohalophilus portucalensis</i> (DSM 3243) [MS]	H+A	Salinebecken	<i>Methanothermobacter wolfeii</i> (DSM 2970) [MB]	H	Flussschlamm
<i>Methanomicrobium mobile</i> (DSM 1539) [MM]	H	Pansen	<i>Methanococcus maripaludis</i> (DSM 2067) [MCC]	H	marines Sediment
<i>Methanoculleus bourgensis</i> (DSM 3045) [MM]	H	Klärschlamm	<i>Methanocaldococcus vulcanius</i> (DSM 12094) [MCaC]	H	Hydrothermaler Kamin

*A: acetoclastisch; H: hydrogenotroph; MX: *Methanosaetaceae*; MS: *Methanosarcinaceae*; MM: *Methanomicrobiaceae*; #: MC: *Methanocorpusculaceae*; MB: *Methanobacteriaceae*; MCC: *Methanococcaceae*; MCaC: *Methanocaldococcaceae*.

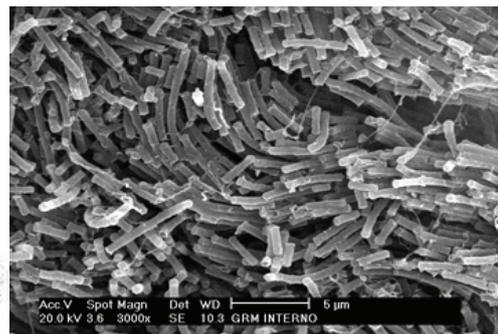
Die Klasse *Methanomicrobia* beinhaltet u.a. MX und MS (Ordnung *Methanosarcinales*) sowie MM und MC (Ordnung *Methanomicrobiales*). Die Klasse *Methanobacteria* beinhaltet MB, die Klasse *Methanococci* beinhaltet MCC und MCaC.



Methanosarcina sp.,
Spiegel, 2009



Methanothermus sp.,
Universität Gießen,
2009



Methanosaeta sp.,
Sanz et al., 2009

Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahmen von unterschiedlichen methanogenen Archaeen

Unseren Untersuchungen zufolge kann sich die Zusammensetzung der methanogenen Biozönose abhängig von Fermenterbetrieb und -zustand stark ändern (Bauer et al., 2008; Lebuhn et al., 2008a). Nur bei niedriger organischer Raumbelastung (lange Verweilzeit im Fermenter) wurden acetoclastische Methanogene (Vertreter der Familien *Methanosaetaceae* und *Methanosarcinaceae*, s.a. Tabelle 3) relativ häufig gefunden. Die relativ lange

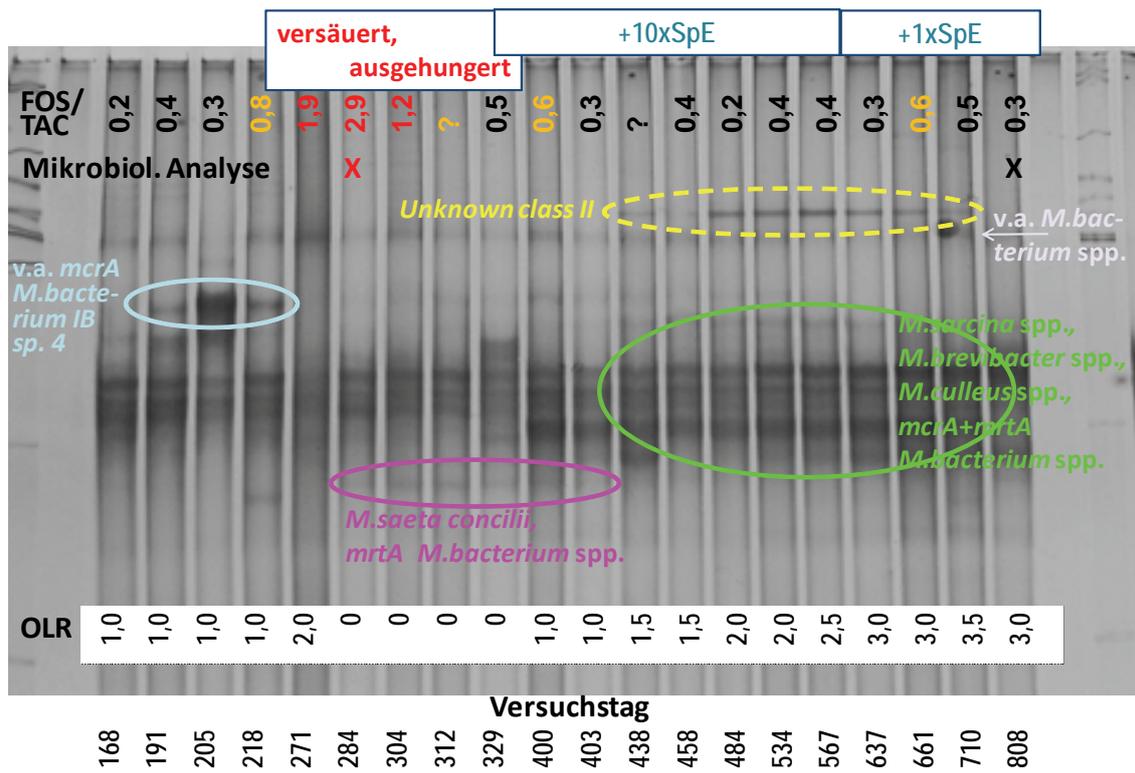
Verweilzeit des Substrats im Fermenter ermöglicht, dass die acetoclastischen Methanogenen trotz ihres relativ langsamen Wachstums (geringerer Energiegewinn bei der Essigsäurespaltung, Tabelle 2, s.a. 3.4) nicht ausgedünnt werden. Eine Ursache für die stärkere Präsenz der Methanosaeten bei geringer Raumbelastung kann ihre hohe Affinität zum Substrat Acetat sein, die sie gegenüber den Methanosarcinen konkurrenzfähig macht (Jetten et al., 1992). Methanosarcinen nutzen dagegen ihren Vorteil bei höheren Acetat-Konzentrationen.

Bei relativ hoher organischer Raumbelastung (etwa ab $2,5 - 3 \text{ kg oTS} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) bzw. geringer Verweilzeit überwogen in unseren Untersuchungen hydrogenotrophe Methanogene (v.a. Vertreter der Ordnungen *Methanomicrobiales* und *Methanobacteriales*, s.a. Tabelle 3) dagegen deutlich (Bauer et al., 2008; Lebuhn et al., 2008a), bei noch höherer Belastung waren acetoclastische Methanogene nicht mehr nachzuweisen und vermutlich ausgedünnt (s. 3.4). Diese Verteilung widerspricht der Lehrbuchmeinung, dass Methan zu 70 % über den acetoclastischen und nur zu 30 % über den hydrogenotrophen Weg entstünde. Das Dogma beruht allerdings vor allem auf Untersuchungen aus dem Bereich Siedlungswasserwirtschaft/Klärschlammvergärung mit typischerweise langen Verweilzeiten der Mikroorganismen und vergleichsweise geringer Acetatbelastung in den Fermentern.

Methanogene Archaeen benötigen eine besondere Versorgung mit bestimmten Spurenelementen in bestimmten Konzentrationsbereichen zur Durchführung ihrer einzigartigen Reaktionen. Besteht hier ein Mangel, können die Methanogenen nicht wachsen bzw. aktiv sein. Die im Prozess zuvor gebildeten Säuren werden nicht abgebaut, und es kommt zur Versäuerung des Prozesses (Lebuhn et al., 2008b; „Säurestau“). In Kap. 4.2 wird darauf näher eingegangen.

Seit etwas mehr als einem Jahrzehnt lassen sich v.a. mit PCR-basierten Verfahren „fingerprints“ anfertigen, Profile der Zusammensetzung der untersuchten Mikroorganismengesellschaft, die für verschiedene Proben verglichen werden können. Dabei existieren unterschiedliche Verfahren (z.B. SSCP, DGGE), mit denen die Produkte der PCR-Vermehrung eines ausgewählten Stück eines bestimmten Gens der Mikroorganismen in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung in einem Gel aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Idealerweise stellt jede Bande das Produkt eines bestimmten Mikroorganismus dar. Unseren Analysen zufolge ist dies zwar nicht immer der Fall, es ergaben sich auch Überlagerungen von Produkten verschiedener Mikroorganismen, die auf gleicher Höhe laufen, Änderungen des Bandenmusters beruhen aber auf Änderungen der Zusammensetzung der untersuchten Biozönose. Bei Banden, die auf gleicher Höhe laufen, handelt es sich um die selben Mikroorganismen. Die einzelnen Banden lassen sich (meist nach einer Klonierung) sequenzieren und die erhaltenen DNA Sequenzen über Ähnlichkeitsanalysen zu Datenbankeinträgen klassifizieren.

Abbildung 8 zeigt eine solche PCR-SSCP-Analyse verschiedener Proben aus einem mesophilen, nur mit Maissilage gefütterten Versuchsfermenter des Instituts für Landtechnik und Tierhaltung der LfL. Dabei wurde ein Teil der DNA des Schlüsselenzyms der Methanogenese (*mcrA/mrtA*) vermehrt und aufgetrennt. Die auftretenden Banden sind also ausschließlich methanogenen Archaeen zuzuordnen. Es ergaben sich deutliche Veränderungen der Bandenmuster in Abhängigkeit der Betriebsweise und des Zustands der methanogenen Population. Beispielsweise nahmen die Diversität und die Anzahl der Methanogenen während der Versäuerung des Fermenters ab. Dagegen entstanden während der Erholung, die durch den Zusatz von Spurenelementen zustande kam, neue Banden, die für das Aufwachsen bestimmter methanogener Archaeen stehen (z.B. Methanogene einer noch nicht beschriebenen Klasse, „unknown class II“, Abbildung 8).



FOS/TAC: Parameter zur Einschätzung der Stabilität der Biozönose; ab etwa 0,6 ist eine Versäuerung indiziert.

SpE: definierter Spurenelementcocktail (Lebuhn et al., 2008b).

OLR: Organic loading rate, organische Raumbelastung ($\text{g oTS} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)

Abbildung 8: PCR-SSCP Analyse von Proben aus einem mesophilen Biogasfermenter der LfL

Um zu erfahren, ob sich thermophil und mesophil nur mit Maissilage betriebene Fermenter voneinander in der Zusammensetzung der methanogenen Populationen unterscheiden, wurde in direkter PCR-Klonierungs-Ansatz gewählt. Dabei wurde wiederum *mcrA/mrtA*, das Schlüsselenzym der Methanogenese, mittels PCR vermehrt und die entstandenen DNA-Produkte über eine Klonierung vereinzelt. Jeder entstandene Klon enthält dabei das PCR-Produkt einer methanogenen Archaeae. Das Ergebnis der Sequenzanalysen ist in Tabelle 4 dargestellt.

Erwartungsgemäß wurde für die mesophilen Fermenter eine höhere Diversität mit Dominanz von Vertretern der Ordnung *Methanosarcinales* erhalten, während in den thermophilen Reaktoren weniger verschiedene Arten von Methanogenen gefunden wurden und Vertreter der hydrogenotrophen Ordnung *Methanobacteriales* dominierten. Dabei handelte es sich fast ausschließlich um Vertreter der Gattung *Methanothermobacter*.

Tabelle 4: Zusammensetzung der methanogenen Populationen in mesophil und thermophil mit Maissilage betriebenen Biogasreaktoren

	A2 (070814); thermophil; (%)	A3 (070914); thermophil; (%)	B1 (080225); mesophil; (%)	B1 (080717); mesophil; (%)
ANME-1	0	0	0	0
<i>Methanopyrales</i>	0	0	0	0
<i>Methanococcales</i>	0	0	0	0
Unknown class	0	0	0	9
<i>Methanobacteriales</i> *	57	80	35	15
<i>Methanomicrobiales</i>	29	0	18	9
<i>Methanosarcinales</i> (<i>M.sarcinaceae</i>) (<i>M.saetaceae</i>)	14 (14) (0)	20 (20) (0)	47 (29) (18)	67 (67) (0)

* Enthalten 1 mcrA und 1 mrtA Gen; thermophile (55°C) Fermenter; mesophile (38°C) Fermenter;

Es gibt also Schlüsselorganismen, die für bestimmte Prozesse spezifisch sind und einen „guten“ oder „schlechten“ Zustand des Fermenters in Abhängigkeit von der Betriebsweise anzeigen. Diesen gilt unser besonderes Interesse, solche Bioindikatoren und ihre Aktivität wollen wir spezifisch quantitativ verfolgen (vgl. 6), um insbesondere für die Praxis eine schnelle und verlässliche Analyse des Prozesszustands von Biogasanlagen zu erhalten.

3.4 Wachstumsgeschwindigkeiten

Mikroorganismen können sich unterschiedlich schnell vermehren. Ihre spezifische Stoffwechselleistung und damit der Umsatz des Substrats hängt stark von günstigen Umweltbedingungen, der Gegenwart von Konkurrenten/Räubern und von der Energie ab, die ihnen die Reaktion zur Verfügung stellt (vgl. Tabelle 1, Tabelle 2). Je dichter die Population und je höher Substratverfügbarkeit und Temperatur sind, desto schneller erfolgt der Substratumsatz – allerdings nur innerhalb gewisser Grenzen, da andere Faktoren limitierend werden können.

Das Wachstum der hydrolytisch/acidogenen Mikroorganismen ist, soweit dies bisher getestet werden konnte, mit einem Massenbildungskoeffizient Y_g von 0,4 - 0,10 g VSS * g $CSB_{umgesetzt}^{-1}$ im Durchschnitt schneller als das von syntrophen Bakterien sowie von methanogenen Archaeen ($Y_g = 0,2 - 0,6$ g VSS * g $CSB_{umgesetzt}^{-1}$, Young and Cowan, 2004). Die Syntrophen und Methanogenen stellen damit dgewöhnlich den Flaschenhals der Biogasproduktion dar. Sie sind das "schwächste" Glied der Biozönose, nach dem sich der Gesamtprozess richten muss.

Beim Anfahren eines Fermenters ist es deshalb sinnvoll, die Substratzugabe langsam zu steigern und eine relativ große Verweilzeit vorzusehen, um allen Mitgliedern der Biogas-Biozönose ausreichend Zeit zum Aufbau einer effizienten Populationsdichte zu gewähren. Wird zu viel Substrat auf einmal zugegeben, wachsen insbesondere die hydrolytisch/acidogenen Mikroorganismen, und die entstehenden Säuren können nicht vollständig

zu Biogas umgewandelt werden. Dies hat einen Abfall des pH-Wertes im Fermenter zur Folge. Da methanogene Archaeen säureempfindlicher reagieren als hydrolytisch/acidogene Bakterien, steigt der Anteil von organischen Säuren im Fermenter immer stärker an, und kann zu einem Absturz führen, wenn die Raumbelastung nicht deutlich reduziert bzw. die Fütterung ausgesetzt wird. Ein Aussetzen der Fütterung senkt die Säurebildung und führt, wenn dies rechtzeitig erfolgte, zu einer Erholung des Prozesses. Eine unterstützende Maßnahme kann eine Erhöhung des pH-Wertes durch Zugabe von basisch wirkenden Substanzen sein (z.B. Natriumhydrogencarbonat, Kalk, Branntkalk/Löschkalk).

Aus den selben Gründen beeinträchtigen plötzliche Veränderungen im Betrieb insbesondere die Syntrophen und Methanogenen. Diese brauchen am längsten, um sich an die neuen Gegebenheiten anzupassen. Die Folge ist gewöhnlich eine Versäuerung wie oben geschildert. Entsprechend ist z.B. bei Substratwechsel oder Änderung der Betriebstemperatur vorsichtig vorzugehen. Wenn der Betrieb vor der Änderung stabil war, sollte die Raumbelastung mit dem neuen Substrat anfangs gering und die Verweilzeit groß gehalten werden, damit die schwachen Kettenglieder ausreichend Zeit zum Aufbau einer effektiven, den neuen Bedingungen angepassten Population mit ausreichender Dichte bekommen. Wenn diese neu zusammengesetzte Biozönose sich stabilisiert hat (typischerweise nach etwa 20 Tagen), kann die Raumbelastung langsam gesteigert werden.

Die Raumbelastung darf nicht zu sehr gesteigert werden, weil sonst die Assoziation Syntrophe/Methanogene nicht schnell genug nachwachsen kann und ausgedünnt wird. Unseren Erfahrungen nach liegt die Grenze beispielsweise für Maissilage und optimaler Spurenelementversorgung im Bereich $6 - 10 \text{ kg oTS} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. Alternativ muss gewährleistet sein, dass die Konzentration der Assoziation Syntrophe/Methanogene verfahrenstechnisch beispielsweise über eine Gärrestrückführung oder künstlich hoch gehalten wird.

4 Nährstoffversorgung

4.1 Makronährstoffe

Kohlenstoff ist nach Wasser der Hauptbestandteil der Mikroorganismen. Als Kohlenstoffquelle dient im Wesentlichen das zugeführte Substrat.

Stickstoff ist nach Kohlenstoff der am meisten benötigte Nährstoff. Er wird insbesondere benötigt für die Proteinbiosynthese, also für die Bildung von Enzymen, die die Reaktionen im Stoffwechsel durchführen. Zu hohe Stickstoffgehalte im Substrat können allerdings zu einer Hemmung der mikrobiellen Aktivität im Fermenter führen. Hierauf wird in Kapitel 5.1 eingegangen.

Schwefel ist Bestandteil der Aminosäuren Cystein und Histidin und damit essentiell zur Bildung wichtiger Enzyme im Stoffwechsel. Auch andere Schwefelverbindungen spielen im Stoffwechselkreislauf eine entscheidende Rolle, z.B. FeS-Komplexe als Redoxpartner im Elektronentransport.

Der Phosphatgehalt ist für die Bildung der Energieträger ATP (Adenosintriphosphat) und NADP (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) im Stoffwechsel der Mikroorganismen mitbestimmend. Phosphatmangel führt deshalb zur Erlahmung des Stoffwechsels.

Natrium ist für (zumindest einige) Archaeen wichtig, da der Energieträger ATP bei diesen nicht nur über die Leistung von „Protonenpumpen“ sondern auch über „Na⁺-Pumpen“ erzeugt wird (Deppenmeier et al., 1999). Bei Unterversorgung mit Na⁺ kann also der Energiestoffwechsel der Methanogenen und damit die Methanogenese in der Biogaspro-

duktion einbrechen. Unseren Daten zufolge kann dies im Bereich $50 \text{ mg Na}^+ \cdot \text{g TS}^{-1}$ der Fall sein (nicht dargestellt).

Neben C, N, P, S und Na^+ erfüllen auch Calcium, Magnesium und Eisen im Bereich der Makronährstoffe wichtige Funktionen im Stoffwechsel. Ca und Mg sind wichtige Strukturelemente z.B. für Enzyme, und Eisen erfüllt u.a. eine zentrale Funktion beim Elektronentransport.

Grundsätzlich zählt nicht nur die Menge eines Nährstoffes sondern auch das optimale Verhältnis aller Nährstoffe zueinander, um optimale Prozessbedingungen zu erhalten. Dazu wurde ein C/N/P-Verhältniss in etwa zwischen 100:5:1 und 200:5:1 empfohlen (Effenberger et al., 2007).

4.2 Mikronährstoffe

Eine ausreichende Gegenwart und Verfügbarkeit mancher Spurenelemente ist für Mikroorganismen lebensnotwendig. Methanogene Archaeen benötigen die Elemente Kobalt (Co), Molybdän (Mo), Nickel (Ni) und Selen (Se). Ni, Co und Mo (alternativ auch Wolfram, W, bei den *Methanococci*) dienen als bzw. in Co-Faktoren für verschiedene, im Stoffwechsel essentielle Reaktionen.

Beispielsweise ist Nickel als Zentralatom im Cofaktor F_{430} (Abbildung 9) unabdingbar zum Funktionieren der Methyl-Coenzym M-Reduktase, die den letzten Schritt der Methanogenese ausführt, die Bildung von CH_4 . Molybdän ist entscheidender Bestandteil des Cofaktors Molybdopterin im zu Methan führenden Stoffwechsel.

Im Elektronentransport ist Kobalt als zentraler Bestandteil von Corrinoiden und Cobamiden essentiell. Ni und Fe-S sind hier ebenfalls wichtig.

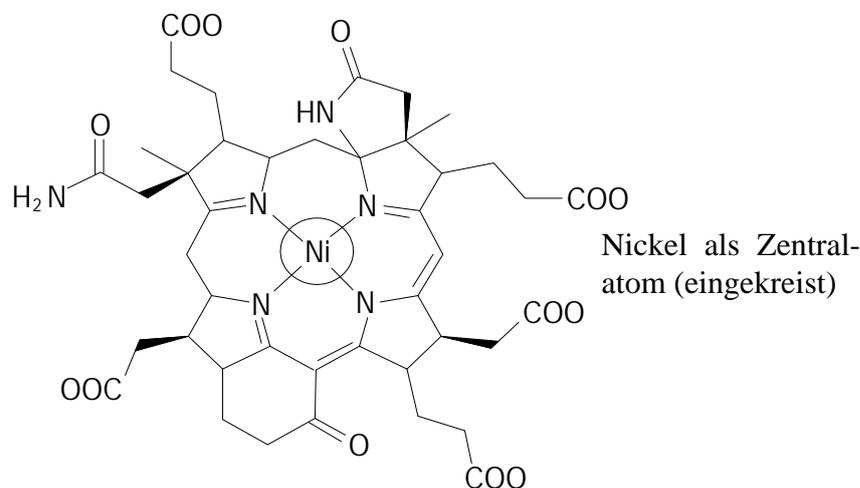


Abbildung 9: Cofaktor F_{430} der Methyl-Coenzym-M-Reduktase

Für die Bildung von ATP, dem wichtigsten Energieträger im Stoffwechsel, sind neben Na^+ (s. 4.1) auch Ni, Co und Se wichtig.

Im Bereich der H_2 -Aufnahme spielen Ni, Se und Zn eine entscheidende Rolle und bei der Aufnahme von CO_2 Mo (W), Zn, Se und Fe.

Unverzichtbar für die Acetatspaltung sind Ni, Fe-S, Co und Zn und für die Nutzung von Methylgruppen Co und Zn.

Die Bedeutung anderer Elemente (z.B. Wolfram, Kupfer, Aluminium, Vanadium und Bor) für die Biogasproduktion ist noch unklar. Schwermetalle wie Kupfer, Silber, Blei, Quecksilber, Cadmium, Gold und Arsen sind typischerweise toxisch (s.a. 5.2).

Um eine „gesunde“ Konzentration von Spurenelementen einzustellen, ist nicht allein die Menge an Spurenelementen und Schwermetallen im Fermenter entscheidend, sondern auch deren Verfügbarkeit für die Mikroorganismen (Abbildung 10).

Spurenelemente und andere Schwermetalle gelangen durch das zugegebene Substrat, über Geräteabrieb sowie durch Prozesshilfsstoffe in gebundener, biologisch häufig nicht verfügbarer Form in den Biogasfermenter. Durch physikalische (z.B. Temperatur, Reibung, Zerkleinern), chemische (z.B. pH-Wert) und biologische (z.B. mikrobieller Abbau) Prozesse werden diese gelöst und mikrobiell verfügbar (1 in Abbildung 10). Während saure Bedingungen ihre Löslichkeit fördern, werden sie bei höherem pH-Wert in Gegenwart von freiem Phosphat, Sulfid, Sulfat und Carbonat zunehmend in schwer lösliche Verbindungen überführt und sind dann dem direkten Zugriff durch Mikroorganismen zunächst entzogen (2). Manche Mikroorganismen können jedoch über Ausschleusung von Komplexbildnern nicht verfügbare Spurenelemente "einfangen" und für sich nutzbar machen (3). Nach dem Absterben von Mikroorganismen werden Spurenelemente in gebundener und gelöster Form wieder freigesetzt (4) und können im internen Kreislauf der Nährstoffe wieder verwendet werden. Der Austrag von Spurenelementen erfolgt mit dem Fermenterinhalt und der Biomasse ins Gärrestlager (5). Im Fall einer Rezirkulation des Gärrests stehen die mitgeführten Spurenelemente und Schwermetalle erneut für die Mikroorganismen im Fermenter zur Verfügung (6).

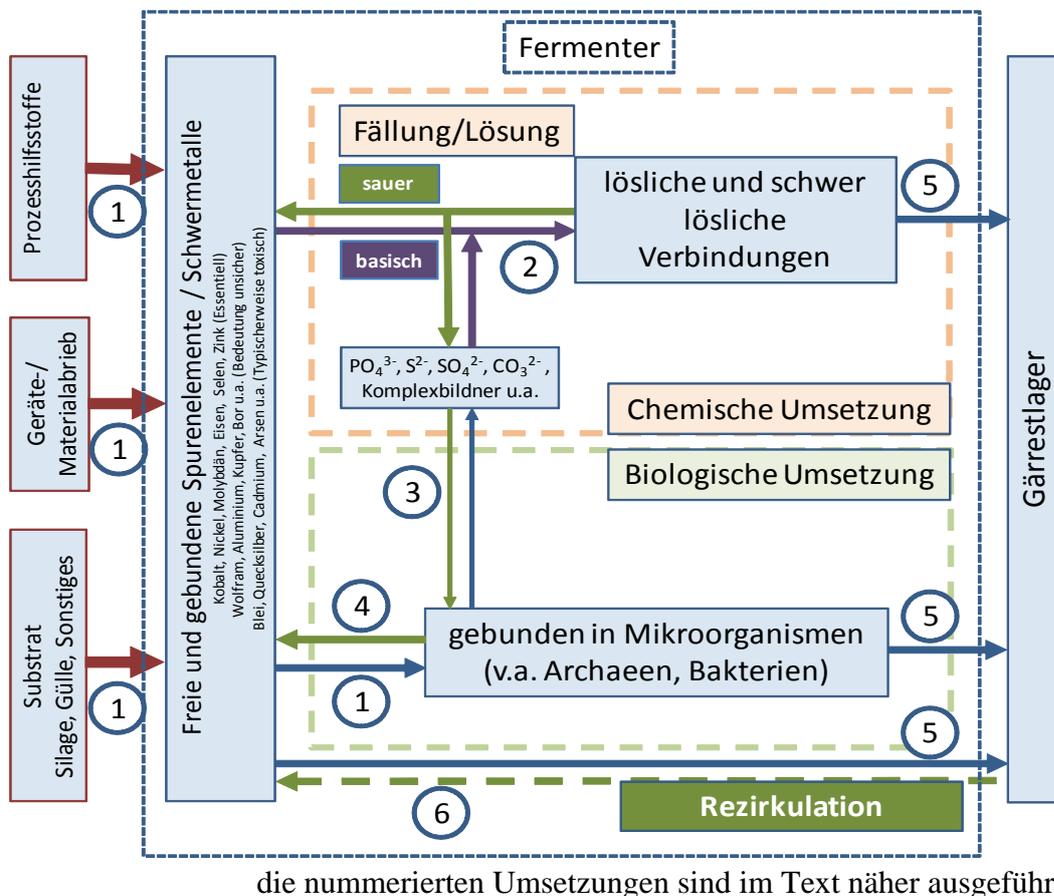


Abbildung 10: Versorgung mit und Verfügbarkeit von Mikronährstoffen in Biogasfermentern

In Biogasanlagen können Spurenelement-Mangelsituationen insbesondere im Mono-NawaRo-Betrieb auftreten - es gibt aber auch derartige Berichte bei Anlagen mit Güllezusatz. Eine typische Folge von Spurenelementmangel ist die Hemmung der Methanogenese und eine damit verbundene Versäuerung (s. 3.3). In entsprechend nachgestellten Versuchen mit Mais-mono Betrieb konnten nur hydrogenotrophe jedoch keine acetoclastischen Methanogene in den versäuerten Fermentern nachgewiesen werden (Lebuhn et al., 2008b). Dabei war die Raumbelastung vor der Versäuerung relativ gering, weswegen die Anwesenheit von acetoclastischen Methanogenen zwar erwartet aber nicht gefunden wurde. Offenbar reagieren hydrogenotrophe Methanogene weniger empfindlich auf einen Spurenelementmangel mit Versäuerung als acetoclastische.

Abhilfe kann hier der Zusatz Spurenelement-reicherer Substrate schaffen oder ein Zusatz der Elemente. Dies ist in unterschiedlicher Anwendungsform möglich. Unseren Ergebnissen zufolge (Lebuhn und Gronauer, 2009) erscheint für einen stabilen Betrieb einer NawaRo-Anlage ein Gehalt von etwa $50 \mu\text{g Co} \cdot \text{L}^{-1}$ (ca. $750 \mu\text{g Co} \cdot \text{kg TS}^{-1}$) eine sinnvolle Größenordnung zu sein. Für Selen liegen die entsprechenden Konzentrationen etwa 5-fach niedriger (etwa $10 \mu\text{g Se} \cdot \text{L}^{-1}$ bzw. ca. $150 \mu\text{g Se} \cdot \text{kg TS}^{-1}$), für Mo etwa um den Faktor 10 und für Ni etwa um den Faktor 40 höher. Auch aus Abbildung 8 wird die aktivierende Wirkung des Spurenelementzusatzes für die methanogenen Archaeen ersichtlich. Sowohl die Anzahl der PCR-SSCP-Banden als auch deren Intensität nahm deutlich zu.

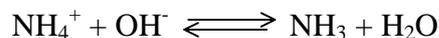
Wichtig für Betreiber von Biogasanlagen ist in diesem Zusammenhang zu bemerken, dass „viel mehr“ nicht viel mehr bringt. Eine Überdosierung kann im Gegenteil toxisch wirken, auch für die Umwelt schädlich sein und zu Konflikten z.B. mit der Düngemittelverordnung führen.

5 Hemmstoffe

5.1 Stickstoff / Ammoniak

Ohne Stickstoff können Mikroorganismen nicht wachsen und keine Aktivität entfalten (s. 4.1). Wird eine Biogasanlage aber mit stickstoffreichem/proteinlastigem Substrat gefüttert (z.B. Gras/Kleegrassilage, Hähnchenmist), kann die Ammoniak (NH_3) –Konzentration zu hoch werden und den Prozess hemmen. Das nicht-ionische, freie NH_3 kann in die Zellen diffundieren und dort über verschiedene Mechanismen verhindern, dass der Energieträger ATP gebildet wird (Entkoppler der ATP-Synthese).

Beim Abbau von Proteinen (Hydrolyse/Proteolyse) entstehen v.a. Aminosäuren, Ammonium (NH_4^+) und Ammoniak (NH_3). Ammonium steht mit Ammoniak im Gleichgewicht:



Wenn der pH-Wert beispielsweise von 6,5 auf 8,0 ansteigt, erhöht sich der NH_3 -Anteil in wässriger Lösung sehr stark - etwa auf das 30-fache (James, 1998). Auch bei Temperaturanstieg im Fermenter kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung des toxischen Ammoniaks.

Die Angaben zur Hemmschwelle von aus dem NH_4^+ -Gehalt berechneten NH_3 -Gehalt gehen in der Literatur wohl auch aus den o.g. Gründen recht weit auseinander. Für ein nicht an hohe Stickstoffgehalte angepasstes Vergärungssystem liegt die Schwelle offenbar im Bereich $80 - 250 \text{ mg freies Ammoniak} \cdot \text{L}^{-1}$ bzw. bei einer Gesamtkonzentration von Ammonium und Ammoniak von $1,7 - 4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Hemmung kann in verschiedenen Stadien im Biogasprozess auftreten. Häufig wurde eine Beeinträchtigung v.a. der acetoclastischen Methanogenese beschrieben, anderen Berichten zufolge war insbesondere die syn-

trophe Acetat-Oxidation betroffen (Abbildung 1). Ergebnisse eigener Untersuchungen (unveröffentlicht) weisen darauf hin, dass auch die Hydrolyse/Acidogenese durch NH_3 gehemmt werden kann.

Allerdings scheint es möglich zu sein, die Mikrobiologie eines Biogassystems an hohe $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ -Gehalte anzupassen. Beispielsweise wurde für adaptierte UASB-Reaktoren ein stabiler Betrieb sogar bei 6 (bis 12) g $\text{NH}_4^+\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$ bzw. 0,8 – 1,1 g $\text{NH}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$ beobachtet (Calli et al., 2005).

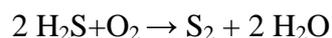
5.2 Schwefel / Schwefelwasserstoff

Schwefel ist ein essentieller Baustein für die im Fermenter vorkommende Mikroorganismen (4.1) und somit essentiell für die Biogasproduktion. Der nicht dissoziierte, gelöste Schwefelwasserstoff (H_2S) kann aber auch toxisch wirken sowie in höheren Konzentrationen den Biogasprozess hemmen. Mit sinkendem pH-Wert steigt der Anteil an freiem H_2S gegenüber dem gelösten Sulfid (S^{2-} , HS^-). Eine Möglichkeit, die Gehalte an S^{2-} bzw. H_2S zu reduzieren, bietet die Fällung der Sulfide mittels Eisenionen.

H_2S ist ein farbloses, nach faulen Eiern riechendes Gas. Es unterbindet die Sauerstoffversorgung und schädigt das periphere Nervensystem. Ab einer Konzentration von ca. 100 ppm führt es zu Konzentrationsschwächen, Müdigkeit, Reizungen der Augen, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Durchfall, Atemnot, Cyanose sowie Bewusstlosigkeit. Ab etwa 150 ppm kann Schwefelwasserstoff nicht mehr wahrgenommen werden, weil er die Geruchsnerven lähmt. Bei Konzentrationen von 300 - 700 ppm kommt es bereits nach 10 min zu (subakuten) Vergiftungen, bei höheren Konzentrationen tritt innerhalb weniger Minuten Bewusstlosigkeit und Tod ein (EG-Sicherheitsdatenblatt, 2005). Daher sollte der H_2S -Gehalt im Biogas vor allem vor einer Öffnung des Fermenters z.B. bei einer Versäuerung bzw. Havarie einer Biogasanlage geprüft werden.

Freies Sulfid fällt Schwermetalle und damit auch Spurenelemente aus. Dadurch kann es zu einem Mangel an Mikronährstoffen kommen (s. 4.2) was wiederum eine Hemmung v.a. der Methanogenese auslösen kann. Eine Hemmung des Biogasprozesses durch H_2S tritt aber offenbar erst bei deutlich höheren Konzentrationen auf. Als grober Richtwert für die H_2S -Konzentration wird $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ genannt (Zell, 2002). Solche Konzentrationen können allerdings auftreten, wenn das Substrat reich an Schwefel (z.B. Rapsprodukte) ist und der pH-Wert relativ niedrig liegt (z.B. in einer „Hydrolyse-“ bzw. Versäuerungsstufe (vgl. 2)). Daher ist insbesondere bei Konzepten mit 2-phasiger Betriebsweise entsprechende Vorsicht zu üben.

Eine erhöhte H_2S -Konzentration im Biogas reduziert die Biogasqualität. H_2S wirkt korrosionsfördernd und kann zu Schäden im Blockheizkraftwerk führen. Um H_2S zu entfernen, werden in vielen Anlagen geringe Luftmengen (ca. 6 %) in den Fermenter geblasen. H_2S wird dann mit Hilfe von „Schwefelbakterien“ (die sich aus verschiedenen Arten zusammensetzen) biologisch zum unschädlichen Schwefel umgewandelt (biologische Biogasentschwefelung; Schwefel-Oxidation).



Unnötiges Lufteinblasen sollte bei der biologischen Gasentschwefelung vermieden werden, da dadurch schwefelige Säure oder Schwefelsäure entstehen kann. Fällt diese in den Fermenter, kann das prozessschädigend wirken.

5.3 Schwermetalle

Schwermetalle wie Kupfer, Silber, Arsen, Blei, Quecksilber und Cadmium sind nicht nur für Mensch und Tier starke Gifte, sie können auch die mikrobielle Aktivität im Fermenter beeinträchtigen. Die Mechanismen der Toxizität von Schwermetallen können sehr verschieden sein. Beispielsweise kann durch Chelatisierung und Sulfidbindung in/an Enzymen oder durch Substitution des richtigen Zentralmetalls deren Funktion gestört oder verhindert werden.

Kupfer (Cu) hat aufgrund seiner antibakteriellen Wirkung und seiner Anwendung in landwirtschaftlichen Betrieben (z.B. als Desinfektionsmittel, Klauendesinfektion) besondere Bedeutung. Zink (Zn) findet ebenfalls in der Veterinärmedizin Anwendung (Wundheilung). Es wird wie auch Cu v.a. aus alten Wasserleitungen und durch Regenwasser aus den Ableitungsrohren gelöst. Geräteabrieb ist ein weiterer Faktor (Abbildung 10). Cu und Zn können vor allem in Biogasanlagen mit Güllezusatz über die Güllegrube in nennenswerten Konzentrationen auftreten.

Die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR, 2006) und das Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft (KTBL, 2007) veröffentlichten Hemmschwellen für freies Kupfer von 40 bzw. 50 mg * L⁻¹ und für freies Zink von 400 bzw. 150 mg * L⁻¹. Einer Untersuchung von 167 Praxis-NawaRo-Biogasanlagen zufolge wurden diese Schwellen nur in einem Fall für Cu erreicht (Hölker und Lenz, 2008). In Batchversuchen wurde der ermittelte Hemm-Schwellenwert von 30 % für CuSO₄ (0,6 – 1,2 g * kg⁻¹) bei einer Gülleprobe aus einem Kuhstall deutlich überschritten (Sayder et al., 2009). Der Prozess in der mit dieser Gülle beschickten Biogasanlage war gehemmt. Sollen also Probleme für die Mikrobiologie im Anlagenbetrieb vermieden werden, muss auch im Fermentervorfeld um- und vorsichtig gehandelt werden.

Schwermetalle können mit Hilfe v.a. von Sulfid, Sulfat und Phosphat ausgefällt werden (Abbildung 10), damit sie ihre toxische Wirkung verlieren. Typischerweise wird in solchen Fällen Eisensulfid zugesetzt. Zu beachten ist aber, dass höhere Gehalte an Schwermetallen im Gärrest – auch als Sulfid gefällt - zu Konflikten mit der Düngemittelverordnung führen können.

5.4 Antibiotika und Mycotoxine

Antibiotika werden in der Medizin zur Bekämpfung von krankheitserregenden Bakterien, Pilzen und Protozoen angewendet. Neben ihren therapeutischen Zwecken wurden Antibiotika bis 2006 auch als Wachstumsförderer in Futtermitteln eingesetzt. Man unterscheidet zwischen der bakteriostatischen Wirkung (Verhinderung der Vermehrung) und der bakteriziden Wirkung (Abtötung).

Der Eintrag von Antibiotika in die Fermenter stammt in der Regel aus der Zugabe von Gülle oder tierischen Fetten. Eine weitere Quelle antimikrobieller Substanzen können "Schimmelpilze" sein, die durch minderwertige pflanzenbauliche Produkte eingebracht wurden. Über die Hemmwirkung von Antibiotika auf den Biogasertrag gibt es sehr unterschiedliche Aussagen. Gründe dafür können z.B. im Einsatz unterschiedlicher Testsysteme, unterschiedlicher Test-Biozönosen, einer verschiedenen biologischen Abbaubarkeit der Antibiotika oder Resistenzbildung in der Biozönose liegen.

Mit dem erwarteten verstärkten Einsatz von Gülle in Biogasanlagen ("Güllebonus") werden auch verstärkt Antibiotika auf ihre Wirkung im Biogasprozess getestet. In Batch-Versuchen wurde für das leicht abbaubare Antibiotikum Sulfadiazin eine 15 %-ige Hemmung der Biogasproduktion ab einer Konzentration von 0,75 – 1 g * kg⁻¹ Gülle festgestellt,

während Tetracyclin in etwa 5-fach niedrigeren Konzentrationen hemmend wirkte. Falls veterinärmedizinisch möglich, könnte demnach Sulfadiazin bevorzugt eingesetzt werden (Sayder et al., 2009). Es sollte aber, wie auch für die Gülleausbringung generell anzuraten ist, Antibiotika-freies Substrat in den Fermenter eingebracht werden. Im ungünstigsten Fall kann die Biogasproduktion zum Erliegen kommen.

Mycotoxine zählen zwar eigentlich nicht zu den Antibiotika, sollen aber kurz hier angesprochen werden, da eine Vergärung mycotoxinbelasteten Substrats (v.a. Getreide) in der Praxis ein Thema ist. Hier liegen zwar Berichte vor, dass manche Substanzen (z.B. Deoxynivalenol, DON) im Prozess (teilweise) abgebaut werden, anderen Berichten nach gilt dies aber nicht für alle Mycotoxine und nicht unter allen Rahmenbedingungen (z.B. verschiedene Temperatur) für einen Abbau. Das Feld ist Gegenstand aktueller Forschung.

5.5 Tenside

Tenside sind langkettige organische Verbindungen, die ein polares (wasserlösliches) und ein unpolares (fettlösliches) Ende besitzen. Sie werden in vier Gruppen eingeteilt. Bei den nichtionischen Tensiden besteht das polare Ende aus einem Alkohol oder einer Esterverbindung. Bei den anionischen Tensiden setzt sich der polare Teil aus Carboxylaten, Sulfonaten oder Sulfaten zusammen, bei den kationischen Tensiden aus einer positiv geladenen Gruppe. Kationische Tenside mit tertiärer Aminogruppe werden aufgrund ihrer stark bioziden Wirkung als Desinfektionsmittel eingesetzt und sind biologisch schwer abbaubar. Weiterhin gibt es zwitterionische Tenside, die beispielsweise aus einer Carboxyl- und einer quartären Aminogruppe bestehen.

Da sich Tenside mit dem polaren Teil an Wasser und mit dem unpolaren Teil an lipophile Medien/Substanzen (z.B. Fette, Öle) anlagern bzw. diese binden können, ermöglichen sie die Lösung sonst nur fettlöslicher Substanzen in Wasser (Abbildung 11). Sie fördern die Schaumbildung und haben antimikrobielle, zellschädigende Eigenschaften, da sie die Lipid-Doppelschicht von Zellmembranen, die aus polaren und unpolaren Bestandteilen aufgebaut ist, perforieren oder zerstören. Dadurch können toxische Verbindungen in die Zelle eindringen. Tenside können über die Bindung an die Membran von Mikroorganismen auch deren Anheftung an Substrate verhindern und sie in „Micellen“ abkapseln (Abbildung 11).

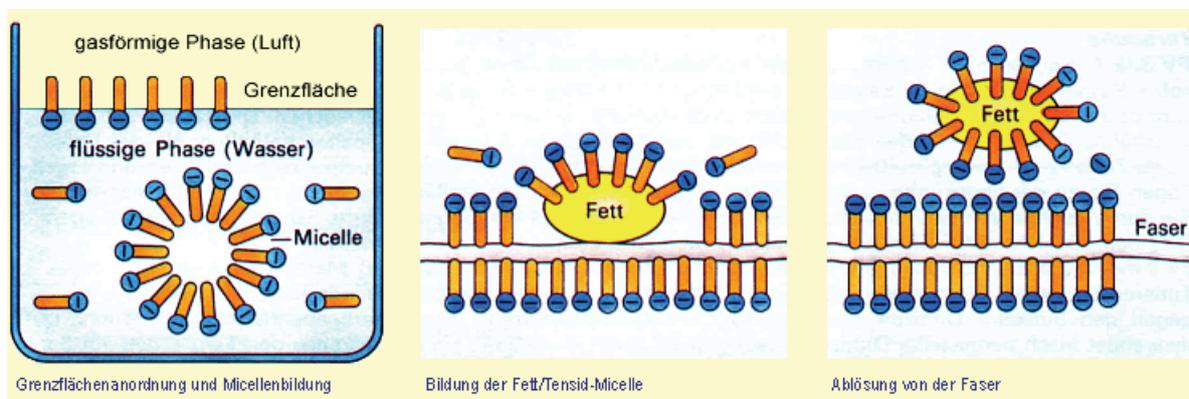


Abbildung 11: Tenside und ihre Wirkungsweise

Tausch et al., 1998

Tenside gelangen beispielsweise durch Reinigungsrückstände (Anwendung z.B. im Melkstand) über das Güllelager in den Fermenter. Als langkettige Fettsäuren und Alkohole werden Tenside aber auch als Stoffwechselprodukte bei der anaeroben Vergärung v.a. in der Versäuerungsphase (s. 2, Acidogenese) gebildet. Bei höheren Konzentrationen dieser Substanzen, die typischerweise bei einer Prozesshemmung auftreten („Säurestau“, s. 3.3), kann die Biozönose zusätzlich geschädigt werden.

6 Ausblick

Neue analytische Methoden der Molekularbiologie erlauben seit einigen Jahren, die Mitglieder der Biozönose in Biogasfermentern verlässlich zu analysieren. Arbeiten, diese auch über PCR-basierte Systeme zu quantifizieren, sind im Laufen. Die jüngste Forschung mit molekularbiologischen Methoden hat bereits etwas Licht in das Dunkel der „black-box“ Biogasfermenter gebracht, dennoch ist eine Reihe von Einzelprozessen weitgehend unverstanden. Offenbar gegenwärtige und für den Prozess wichtige aber noch nicht näher bekannte Mikroorganismen müssen untersucht und charakterisiert werden. Besonders zur Assoziation zwischen syntrophen Bakterien und methanogenen Archaeen, zu ihren spezifischen Stoffwechselwegen und ihren Prozessansprüchen besteht noch erheblicher Forschungsbedarf. Zusammen mit den etablierten molekularbiologischen Techniken könnte hier der gleichzeitige Einsatz von mit stabilen Isotopen arbeitenden Techniken deutlich weiterhelfen. Die eigentliche Herausforderung ist die Detailanalyse der Einzelschritte des Abbaus praxisrelevanter Substrate mit gleichzeitiger Identifizierung und Quantifizierung der Organismen und ihrer spezifischen Aktivität bei der Durchführung dieser Schritte.

Gleichzeitig gilt es, die spezifischen Stoffwechselleistungen der beteiligten Mikroorganismen im Biogasprozess zu optimieren. Dies muss auf 2 Ebenen geschehen, zum einen müssen die Einzelleistungen weitestmöglich gesteigert und aufeinander abgestimmt werden. Den „Flaschenhälsen“ (besonders der Assoziation Syntrophe/Methanogene) gilt dabei besondere Aufmerksamkeit. Zum anderen müssen die Umweltbedingungen bestmöglich angepasst werden. Das betrifft beispielsweise die Verfahrenstechnik mit einem adäquaten Prozessdesign (z.B. Temperatur, Durchmischung, ggf. Phasentrennung, Gärrestrückführung) und die bedarfsgerechte Versorgung mit Nährstoffen (ausgewogene Zusammensetzung der Makro- und Spurenelemente).

Besonders wichtig ist es, einen stabilen, effizienten Betrieb zu gewährleisten und einen Mangel oder ggf. eine Überversorgung rechtzeitig zu erkennen. Ergänzend zur etablierten chemischen Analytik kann die Molekularbiologie hier wesentlich beitragen, verlässlichere Diagnosen als Grundlage zielgerichteter Maßnahmen zu stellen. Sind die Schlüsselorganismen in einem Prozess bekannt, können sie und ihre spezifische Aktivität quantifiziert werden. Über dann zu erhebende benchmarks ließe sich dann der Zustand von Einzelprozessen beurteilen und ein Mangel spezifisch und bedarfsgerecht beheben.

Ähnlich wie in anderen biotechnologischen Prozessen wird die Entwicklung auch in Richtung einer gezielten Anzucht von Mikroorganismengemeinschaften gehen, die für ganz bestimmte Prozesse unter definierten Bedingungen optimale Umsatzraten erzielen. Für den großtechnischen Maßstab liegt darin sicher ein Potenzial, eher weniger für die kleine „Hofbiogasanlage“. Eine (ggf. kontinuierliche) Beimpfung mit solchen Hochleistungskulturen könnte nicht nur bei suboptimalem Betrieb die Effizienz verbessern (Ersatz fehlender oder wenig effektiver Leistungsträger im Prozess), vor allem ließe sich Betriebszeit

einsparen. Dadurch könnte die Anfahrphase verkürzt werden, es ließe sich auch eine Verkürzung der Verweilzeit im Fermenter bzw., wenn eine bestimmte Lagerkapazität vorgehalten werden muss, eine Verringerung des Fermentervolumens erreichen.

Unser Ziel ist es schließlich, die Schlüsselorganismen in Biogasanlagen und ihre Bedürfnisse zu kennen und die einzelnen Schlüsselprozesse zu verstehen, um den Gesamtprozess optimal steuern zu können. Im Vergleich zu den Bereichen Land- und Forstwirtschaft sowie im Gartenbau beispielsweise ist dort das entsprechende Wissen bei den „Betreibern“ um ihre Pflanzen und deren Bedürfnisse weitgehend vorhanden. Dort können sie auf einen enormen Erfahrungsschatz aus Forschung und Praxis zurückgreifen, um die richtigen Maßnahmen zu ergreifen. Im Bereich Mikrobiologie des Biogasprozesses besteht ein erheblicher Nachholbedarf, um ein ähnliches Wissensniveau und damit eine ähnliche Steuerungsqualität zu erreichen.

7 Literatur

Bauer C., Korthals M., Gronauer A., Lebuhn M. (2008). Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Sci. Tech.* 58(7), 1433-1439

Biogashandbuch Bayern (2008)

http://www.lfl.bayern.de/arbeitschwerpunkte/as_biogas/11515/

<http://www.lfu.bayern.de/abfall/fachinformationen/biogashandbuch/index.htm>

Calli B., Mertoglu B., Inanc B., Yenigun O. (2005). Effects of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. *Proc. Biochem.* 40, 1285-1292

Deppenmeier U., Lienard T., Gottschalk G. (1999). Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Lett.* 457, 291-297

DSMZ (2008). Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, <http://www.dsmz.de/>

Effenberger M., Lebuhn M., Gronauer A. (2007). Fermentermanagement – Stabiler Prozess bei NawaRo-Anlagen. Kongressband der 16. Jahrestagung des Fachverbands Biogas e.V.: Biogas im Wandel, 31.1. – 2.2. 2007, Leipzig, 99-105

EG-Sicherheitsdatenblatt (2005).

<http://www.riessner.cz/files/sondergase/sdb/schwefelwasserstoff.pdf>

FNR (2006). Handreichung Biogasgewinnung und –nutzung. ISBN 3-00-014333-5

Gorby Y.A., Yanina S., McLean J.S., Rosso K.M., Moyles D., Dohnalkova A., Beveridge T.J., Chang I.S., Kim B.H., Kim K.S., Culley D.E., Reed S.B., Romine M.F., Saffarini D.A., Hill E.A., Shi L., Elias D.A., Kennedy D.W., Pinchuk G., Watanabe K., Ishii S., Logan B., Nealson K.H., Fredrickson J.K. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103(30), 11358-11363

Hölker U., Lenz J. (2008). <http://www.biogas-wissen.de>

James E. (Stand 2009). School of civil engineering. Purdue University

<http://cobweb.ecn.purdue.edu/~piwc/w3-research/free-ammonia/nh3.html>

Jetten M.S.M., Stams A.J.M., Zehnder A.J.B. (1992). Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol. Rev.* 88, 181–198

Krause L., Diaz N.N., Edwards R.A., Gartemann K.H., Krömeke H., Neuweiger H., Pühler A., Runte K.J., Schlüter A., Stoye J., Szczepanowski R., Tauch A., Goesmann A. (2008). Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *J. Biotechnol.* 136(1-2), 91-101

KTBL (2007). Faustzahlen Biogas. ISBN 978-3-939371-46-5

Lebuhn M., Wilderer P. (2006). Abschlussbericht des StMUGV-Projekts "Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung, Berichtsteil TUM: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen". In: LfL-Schriftenreihe 23/2006, ISSN 1611-4159, S. 151-242

Lebuhn M., Effenberger M., Bachmaier J., Gronauer A. (2007). Biogastechnologie für Hygiene und Umwelt in wasserwirtschaftlich sensiblen Gebieten. LfL-Information, Baye-

rische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Vöttinger Straße 38, D-85354 Freising-Weihenstephan. Lerchl Druck, Freising

Lebuhn M., Bauer C., Gronauer A. (2008a). Probleme der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen im Langzeitbetrieb und molekularbiologische Analytik. In: VDLUFA-Schriftenreihe 64, 118-125, ISBN978-3-941273-05-4

Lebuhn M., Liu F., Heuwinkel H., Gronauer A. (2008b). Biogas production from monodigestion of maize silage – long-term process stability and requirements. *Water Sci. Tech.* 58(8), 1645-1651

Lebuhn M., Gronauer A. (2009). Microorganisms in the biogas-process - the unknown beings. *Agric. Engin. (Landtechnik)* 64/2, 127-130

Letunic I. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation, *Bioinformatics* 23(1), 127-128

Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3), 506-77

Sanz J.L., Díaz E., Amils R. (2009).
<http://www.bvsde.patho.org/bvsacd/unam7/molecular.pdf>

Sayder B., Vitz H., Mohring S., Merrettig-Bruns U., Kabasci S., Hamscher G., Türk J. (2009). Gehemmte Biologie. *Biogas Journal* 02/09, 44-45

Schink B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61/2, 262-280

Schlegel H., Fuchs G. (2007). *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme-Verlag, 8. Auflage, 553 ff.

Schnürer A., Zellner G., Svensson, B.H. (1999) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 249–261

Spiegel (2009). <http://www.spiegel.de/wissenschaft/natur/0,1518,grossbild-1063307-527532,00.html>

Tausch M., von Wachtendonk M., Deissenberger H., Porth H.-R., Weißenhorn R.G. (1998). *Chemie S II, Stoff-Formel-Umwelt*, C.C. Buchner, Bamberg (1993)

Universität Gießen (2009). <http://www.uni-giessen.de/~gf1265/GROUPS/KLUG/Methanogene.html>

Young J.C., Cowan R.M. (2004). *Respirometry for environmental engineering*. SJ Enterprises Springdale, Arkansas USA. ISBN 0-9759595-0-6

Zell B. (2002). *Biogasanlagen - Anforderung zur Luftreinhaltung*. Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, 42 ff.