

Michael Lebuhn und Andreas Gronauer

# Mikroorganismen im Biogasprozess – die unbekanntesten Wesen

Die Biogasproduktion aus landwirtschaftlichen Produkten hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen und soll künftig einen wesentlichen Teil der Energieversorgung abdecken. Entsprechend wurde die Forschung über den eigentlichen Motor der Methanproduktion, die Mikroorganismen im Fermenter, stark intensiviert. Wichtige Erkenntnisse sollen in verfahrenstechnische Maßnahmen umgesetzt werden, um die Prozesse zu optimieren. Im vorliegenden Artikel werden neue Erkenntnisse aus dem Bereich Mikro- und Molekularbiologie in der Vergärung nachwachsender Rohstoffe vorgestellt. Diese modifizieren die gängigen Lehrbuchansichten zu den dominanten mikrobiellen Umsatzwegen von Biomasse zu Biogas. Konsequenzen für eine spezifisch optimierte Prozessgestaltung werden diskutiert.

## Schlüsselwörter

Mikrobiologie, Molekularbiologie, Biogas, Methanogenese, nachwachsende Rohstoffe

## Keywords

Microbiology, molecular biology, biogas, methanogenesis, trace elements, renewable resources

## Abstract

Lebuhn, Michael and Gronauer, Andreas

## Microorganisms in the biogas-process – the unknown beings

Landtechnik 64 (2009), no. 2, pp. 127 - 130,  
2 figures, 7 references

The importance of biogas production from agricultural products has recently largely increased in Germany. Biogas production is expected to cover a significant portion of energy supply. Consequently, research on the true motor of methane production, the microorganisms in the fermenter, was intensified. Important results are to be implemented by engineering to optimize the processes. In the current article, latest insights from micro- and molecular biology research are presented modifying established views on dominant microbial transformation pathways of biomass to biogas. Consequences for specifically optimized process design are discussed.

Vergärung zu Biogas, Wärme und Gärrest um und gewinnen daraus Energie und Dünger. Durch die Verknappung fossiler Energieträger und die Explosion der Preise für die Energieversorgung gewinnt Biogas heute wieder an Bedeutung. Dabei kann die Biogastechnologie bei sachgemäßem Einsatz wesentlich zur Einsparung fossiler Energieträger und zur Verringerung der Netto-Emissionen klimarelevanter Gase beitragen.

Von den aktuell rund 4000 Biogasanlagen in Deutschland wird die Mehrzahl wegen des höheren Biogas-Ertrags mit nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) betrieben, häufig in Co-Vergärung mit Wirtschaftsdüngern.

Ein ökonomisch und ökologisch sinnvoller Betrieb von NawaRo-Biogasanlagen ist nur bei größter Effizienz möglich. Dafür muss die prozessstragende Mikroorganismen-Gesellschaft bestmöglich zusammengesetzt und aktiv sein, wofür wiederum ein prozessspezifisch optimal ausgelegter verfahrenstechnischer Rahmen essentiell ist. Die Mikrobiologie der Biogasproduktion aus NawaRo und mikrobiologische Möglichkeiten der Prozessoptimierung sind aber ungenügend erforscht. Teilweise wurden Erkenntnisse kaum geprüft aus den Bereichen Abwasserreinigung und Abfallbehandlung übernommen.

Erst seit Einführung molekularbiologischer Methoden wissen wir um die Existenz dreier Lebenslinien (Domänen Archaea, Bacteria, Eukaryota). Die Methan produzierenden Mikroorganismen zählen zu den Archaeen. Die vorgelagerten Umsetzungen werden im Wesentlichen durch Bakterien durchgeführt (**Abb. 1**). Schätzungen zufolge sind weniger als 1 % der an der anaeroben Vergärung beteiligten Mikroorganismen bekannt. Eine Kultivierung, die ein Studium der Leistungen dieser Organismen erleichtern würde, ist in diesem Bereich besonders schwierig.

Auch bestehen bisher kaum Erfahrungen im Langzeitbetrieb von NawaRo-Biogasanlagen. Die meisten Anlagen werden

■ Bereits vor über 2000 Jahren setzten Menschen organische Masse durch den mikrobiologischen Prozess der anaeroben

als „black box“ nach dem „trial-and-error“-Prinzip betrieben. Entsprechend häufen sich Berichte zu Prozessstörungen, Problemen im Anfahrbetrieb oder gar Havarien insbesondere bei Mono-NawaRo-Betrieb. Zur Vorbeugung oder Abhilfe werden von einigen Betreibern „Zauberpulverchen“ als Prozesshilfsstoffe nach dem Motto „viel hilft viel“ zugesetzt. Die Folgen können für Betrieb und Umwelt fatal sein.

Aus diesen Gründen wurde jüngst die Forschung zur Mikrobiologie und zu Ursachen der Prozessstörungen auch am Institut für Landtechnik und Tierhaltung der LfL stark intensiviert. Einige relevante Erkenntnisse sind bereits entstanden, die nicht zu den gängigen Lehrbuchmeinungen über die dominanten anaeroben mikrobiellen Umsetzungen von Biomasse zu Biogas passen.

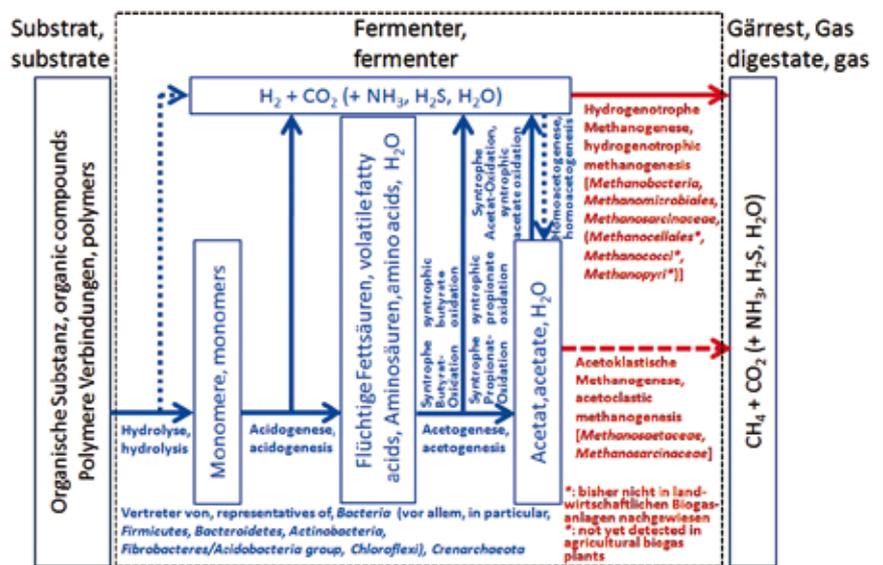
### Bei höherer Raumbelastung mit nachwachsenden Rohstoffen dominiert der Abbauweg über die syntrophe Acetat-Oxidation und die hydrogenotrophe Methanogenese

Der Lehrbuchmeinung nach werden etwa 70 % des Methans im Biogas über Essigsäure (Acetat) und dessen Spaltung (acetoklastischer Weg) und 30 % über die Reaktion von Wasserstoff mit Kohlendioxid (hydrogenotropher Weg) gebildet (**Abb. 1**). Diese Verteilung ist typisch für die in der Abwasserreinigung eingesetzten Hochleistungsreaktoren mit langen Verweilzeiten der Mikroorganismen (die von der Verweilzeit der flüssigen Phase entkoppelt sind) und eher geringen Acetat-Konzentrationen. Dort können sich die obligat acetoklastischen Methanosaeten, sich nur relativ langsam vermehren können [1], wegen ihrer hohen Affinität zu Acetat durchsetzen.

Bei höheren organischen Raumbelastungen mit typischerweise höheren Acetatgehalten ( $> 60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) bekommen die schneller wachsenden Methanosarcinen, die sowohl acetoklastisch als auch hydrogenotroph Methan bilden können, einen Vorteil. Eigenen Erfahrungen nach ist das (zumindest bei Maissilage) in den typischen Rührkessel-Fermentern bereits bei einer organischen Raumbelastung (BR) von etwa  $1,5 \text{ g oTS} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$  der Fall. Methanosaeten werden im Durchfluss-Betriebsverlauf, wohl wegen ihres langsamen Wachstums, schließlich völlig ausgedünnt.

In Versuchen mit Maissilage im Mono-Betrieb waren Methanosarcinen bei günstigen äußeren Bedingungen (vor allem optimale Spurenelement-Versorgung, s. unten) und Acetat-Konzentrationen bis zu  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  noch bei BR  $4 \text{ g oTS} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$  dominant [2, 3]. Bei höheren Gehalten flüchtiger Fettsäuren infolge von Spurenelementmangel waren praktisch nur noch obligat hydrogenotrophe Methanogene (vor allem Vertreter der

Abb. 1



Anaerober Abbau von nachwachsenden Rohstoffen im einphasigen Biogasprozess mit beteiligten Mikroorganismen (systematische Gruppen, Taxa)

Fig. 1: Anaerobic degradation of organic matter (renewable resources, silages) in one-phase biogas process with participating systematic groups (taxa) of microorganism

Archaeen-Ordnungen *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*) zu finden, Methanosarcinen gingen dafür stark zurück [2, 3]. Acetat wurde offenbar kaum noch zu CH<sub>4</sub> und CO<sub>2</sub> gespalten, die Methanbildung erfolgte praktisch ausschließlich über den hydrogenotrophen Weg (**Abb. 1**). Auch in einer mit Rindergülle und Maissilage betriebenen Praxisbiogasanlage dominierten hydrogenotrophe Methanogene [4]. Der Anteil der Methanbildung aus H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> an der Biogasbildung aus NawaRo wurde offensichtlich bisher stark unterschätzt.

In diesem Zusammenhang besonders interessant sind Befunde, dass Essigsäure bei Abwesenheit von Methanosaeten sowie höheren Gehalten an flüchtigen Fettsäuren und Ammoniak verstärkt über die syntrophe Acetat-Oxidation (SAO, **Abb. 1**) zu Wasserstoff und CO<sub>2</sub> umgesetzt wird; entsprechend erfolgt die Methanbildung in Übereinstimmung mit den eigenen Befunden vorwiegend hydrogenotroph [5]. Nun verläuft die Übergabe von CO<sub>2</sub> und insbesondere H<sub>2</sub> von den SAO-Bakterien zu den hydrogenotrophen methanogenen Archaeen nur dann effizient, wenn sich die beiden Partner in engster Nähe befinden, und die Methanogenen erst durch Entfernen von H<sub>2</sub> aus dem Reaktionsgleichgewicht die Produktion von H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> durch die SAO energetisch ermöglichen [6]. Eine Konsequenz daraus ist beispielsweise, dass Rühren zwar zum Schaffen frischer Oberflächen für den Substratabbau nötig ist, die Übergabe des Wasserstoffs vom einen zum anderen Partner aber nicht durch zu schnelles Rühren gestört werden sollte. Der gesamte Prozess kann sonst zum Erliegen kommen.

Solche Syntrophien (symbioseähnliche Verhältnisse) haben sich in der Evolution besonders unter anaeroben Verhältnissen herausgebildet, da der Energiegewinn beim anaeroben Substratabbau wesentlich geringer ist als beim aeroben, wo Sauerstoff

der Elektronen-Endempfänger ist. Vor allem die oben genannte Oxidation bestimmter Fettsäuren kann nur syntroph über der Grenze thermodynamisch möglicher Energiegewinnung durchgeführt werden [6]. Entsprechend ist der gesamte Prozess hinsichtlich der Energieausbeute extrem effizient, einzelne Schritte können aber ohne spezifische Eingriffe nur relativ langsam verlaufen. Diesen energetisch ungünstigen Reaktionen, den „Flaschenhälsen“, gilt unsere besondere Aufmerksamkeit, hier kann der Prozess verfahrenstechnisch optimiert werden.

### Die Methanogenese benötigt bestimmte Spurenelemente in einem optimalen Konzentrationsbereich

Die Grundlagenforschung zur Methanbildung konnte mittlerweile einzigartige Reaktionswege aufdecken und die Essentialität ungewöhnlicher Spurenelemente wie zum Beispiel Kobalt (Co), Nickel (Ni), Molybdän (Mo) und Selen (Se) für Teilprozesse im anaeroben Abbau nachweisen. Co, Ni, Mo und Se sind zentrale Bestandteile von Stoffwechselwegen der methanogenen Archaeen (zum Beispiel Elektronentransportkette, ATP-Gewinnung, Methanbildung, Wasserstoff- und  $\text{CO}_2$ -Aufnahme, Acetat-spaltung, Methylgruppen-Verwertung) oder von essentiellen Cofaktoren zum korrekten Ablauf dieser Wege.

Die Bedeutung zum Beispiel von Bor, Vanadium Wolfram und Aluminium ist umstritten. Zink, Eisen und Kupfer sind zwar wichtig, sie kommen aber – insbesondere bei Covergärung mit Wirtschaftsdüngern – typischerweise in ausreichend

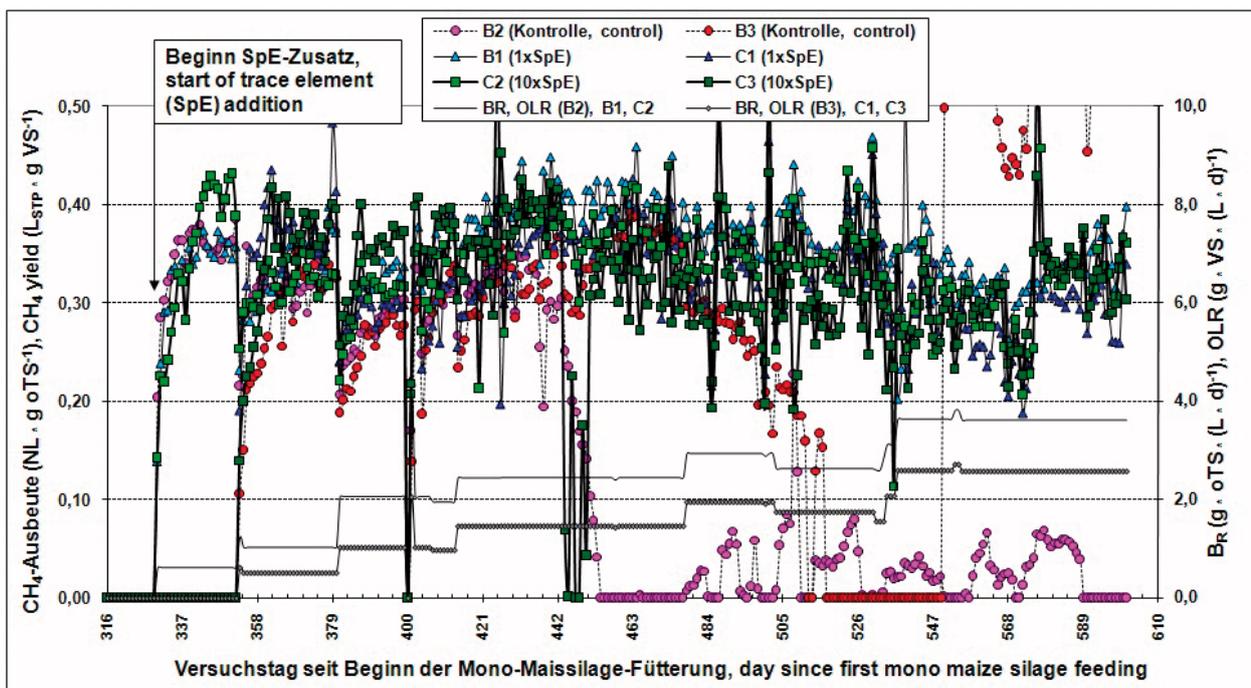
hohen Konzentrationen in NawaRo-Fermentern vor. Für andere Schwermetalle wie zum Beispiel Cadmium, Arsen, Quecksilber, Silber und Blei sind bisher nur toxische Wirkungen bekannt.

Co, Ni, Mo und Se können in zu hohen Konzentrationen auch toxisch wirken. Dies ist insbesondere bei der Weiterverwertung der Gärreste zu beachten – vor allem wenn die Gültigkeitsbereiche der Düngemittel- oder Bioabfallverordnung betroffen sind. Spezifisch für die einzelnen Spurenelemente (und die anderen Schwermetalle) sind also Optima zwischen Mindest- und Höchstkonzentration einzustellen.

Aus dem Bereich Abwasserreinigung ist bekannt, dass eine ausreichende Versorgung mit Spurenelementen für eine funktionsfähige Methanisierung essentiell ist. Allerdings ist hier eine Mangelversorgung bei der Beschaffenheit der Substratströme weniger ein Thema als eventuelle toxische Wirkungen, des Klärschlammes. Es ist zu bedenken, dass sich die Konzentration der Schwermetalle im Gärrest wegen des Masseverlusts bei der Biogasproduktion erhöht, weil die Metalle nicht in die Gasphase übergehen.

Die Biogas-Szene war erstaunt, als erste Berichte zu mangelhafter Prozessleistung oder gar zu Havarien von landwirtschaftlichen NawaRo-Biogasanlagen auftauchten. Im Langzeitversuch, in sechs 32-L-Labor-Durchflussfermentern nachgestellt, verringerten sich trotz relativ geringer alleiniger Fütterung mit Maissilage etwa nach 200 Betriebstagen die Biogasproduktion, der Methangehalt und der  $\text{oTS}$ -Abbau. Die Gehalte flüchtiger Fettsäuren stiegen stark an, die Fermenter versäuerten.

Abb. 2



Methanausbeute und organische Raumbelastung der 6 versäuert/ausgehungenen Mono-Mais-Fermenter B1 bis C3 nach Spurenelement-(SpE)-Zusatz und Wiederanfahren

Fig. 2: Methane yield and organic loading rate (OLR) of the 6 acidified/starved mono maize fermenters B1 – C3 after addition of a trace element (SpE) cocktail and feeding restart

Reprinted from *Water Science and Technology*, volume 58, issue number 8, pages 1645-1651, with permission from the copyright holders, IWA.

Ein Wiederanfahren war nicht erfolgreich, die Fütterung musste schließlich eingestellt werden. Aufgrund der Vermutung, dass ein Mangel an Spurenelementen für die methanogenen Archaeen die Ursache des Prozesszusammenbruchs war, wurde ein Spurenelement-Cocktail (SpE) zusammengestellt [7] und nach Abbau der überschüssigen Fettsäuren in unterschiedlicher Konzentration mit der gefütterten Maissilage zu 4 Fermentern zugesetzt (**Abb. 2**). Schon bald brach der Prozess bei den 2 Kontrollen (ohne SpE-Zusatz) wieder zusammen, während mit SpE-Supplementierung ein stabiler Hochleistungsbetrieb erreicht wurde (**Abb. 2**).

Erste Ergebnisse weisen auf einen Mangel an den „Verdächtigen“ Ni, Mo, Se und insbesondere Co hin.

Den ICP-OES- bzw. ICP-MS-Analysen der Fermenterinhalt zuzufolge waren unter etwa  $20 \mu\text{g Co} \cdot \text{L}^{-1}$  (ca.  $300 \mu\text{g Co} \cdot \text{kg TS}^{-1}$ ) Mangelerscheinungen deutlich sichtbar. Ein Gehalt von etwa  $50 \mu\text{g Co} \cdot \text{L}^{-1}$  (ca.  $750 \mu\text{g Co} \cdot \text{kg TS}^{-1}$ ) erscheint für einen stabilen Betrieb günstig zu sein. Die entsprechenden Konzentrationen lagen für Selen etwa 5-fach niedriger für Mo etwa um den Faktor 10 und für Ni etwa um den Faktor 40 höher. Aus **Abb. 2** geht auch deutlich hervor, dass viel mehr (10-fache SpE-Dosierung) nicht viel mehr bringt. Die Methanausbeuten waren für beide SpE-Zusatzvarianten gleich. Wichtig ist es abschließend, optimale Konzentrationsbereiche einzustellen!

Aus den Analysen der gefütterten Maissilage ergab sich auch, dass im Langzeitbetrieb Mangelerscheinungen auftreten mussten. Die Frachten der Spurenelemente reichten ohne einen Zusatz nicht für die Einstellung der erwünschten Konzentrationen aus. Die aufgetretene Versäuerung lässt sich so erklären: Durch die nach wie vor aktive Hydrolyse, Acido- und Acetogenese wurden zwar noch Fettsäuren gebildet, diese konnten aber wegen des Ausfalls der Methanogenese infolge des Spurenelementmangels nicht mehr abgebaut werden (**Abb. 1**), und es ergab sich ein „Säurestau“. Eine erneute Versäuerung nach dem Wiederanfahren konnte nur durch Reaktivierung der Methanogenese, die die Säuren abzieht, verhindert werden.

### Eine regelmäßige Analytik ist wichtig

Anderen Berichten zufolge reicht auch eine Cofermentation mit Wirtschaftsdüngern nicht in allen Fällen aus, die gewünschten Konzentrationen der Spurenelemente im Fermenter herzustellen. Zudem können sich die zu fütternden NawaRo in ihren Spurenelement- und Schwermetallgehalten je nach Art und Herkunft (Standortigenschaften) deutlich unterscheiden.

Regelmäßige Analysen der gefütterten Substrate (insbesondere bei Substrat- und Chargenwechseln), eine Bilanzierung der Spurenelementgehalte und etwa monatliche Analysen auf Spurenelemente sind also wichtig für ein frühzeitiges Erkennen von Mangelzuständen. Je nach Status kann ein spezifisch zusammengestellter SpE-Zusatz definiert werden.

Weiterhin erscheint es ratsam, in regelmäßigen Abständen den Fermenterstatus molekularbiologisch untersuchen zu lassen, um festzustellen, ob die gewünschte Zusammensetzung der Mikroorganismen und ihre Anzahl (insbesondere der me-

thanogenen Archaeen) vorhanden ist, oder ob Veränderungen eingetreten sind, die künftige Schwierigkeiten im Betrieb andeuten können.

### Ausblick

Zur Analyse der methanogenen Archaeen im Fermenter sind noch eine Reihe von Fragen zu klären:

- Wie hängt die Populations-Zusammensetzung von der Art der gefütterten Substrate und vom Futterzustand ab?
- Sind die über DNA-Analytik gefundenen Organismen auch entsprechend ihrer Anzahl im Fermenter aktiv?
- Gibt es „biologische Marker“ für einen guten und einen schlechten Prozesszustand, und reicht es aus, diese Leitorganismen über quantitative PCR-Analytik zu messen?
- Welche Organismen spielen in den der Methanogenese vorgelagerten Prozessen wichtige Rollen, und welche dieser Organismen sollten in der Routine erfasst werden?

Auch bei der Frage der Versorgung mit Makro- und Mikronährstoffen bzw. Prozesshilfsstoffe sind Fragen offen:

- Welche (Mikro-)Nährstoffe sind für welche Prozesse in welchen Konzentrationen nötig und gleichzeitig für die gesamte Biozönose im Fermenter sowie die Umwelt tolerierbar?
- Welche nachhaltigen Strategien können zur Ammoniak-Entgiftung beitragen?

Derzeit ist eine Bilanzierung der Spurenelemente im Fermenter in Arbeit. Dabei werden die optimale Versorgung des Prozesses, die Gehalte in den Substraten und die Erfordernisse von Seiten der Umwelt berücksichtigt. Dies soll eine sachgerechte landwirtschaftliche Verwertung der Gärreste ermöglichen.

### Literatur

- [1] Jetten, M. S. M., A. J. M. Stams and A. J. B. Zehnder: Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol. Rev.* 88 (1992), 181-198.
- [2] Lebuhn, M., C. Bauer and A. Gronauer: Probleme der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen im Langzeitbetrieb und molekularbiologische Analytik. In: *VDLUFA-Schriftenreihe* 64 (2008), 118-125, ISBN 978-3-941273-05-4.
- [3] Bauer, C., M. Korthals, A. Gronauer and M. Lebuhn: Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Sci. Tech.* 58(7) (2008), 1433-1439.
- [4] Nettmann, E., I. Bergmann, K. Mundt, B. Linke and M. Klocke: Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcrA* analysis. *J. Appl. Microbiol.* 105(6) (2008), 1835-1850.
- [5] Schnürer A and A. Nordberg: Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Sci. Tech.* 57(5) (2008), 735-740.
- [6] Schink, B.: Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(2) (1997), 262-280.
- [7] Lebuhn, M., F. Liu, H. Heuwinkel and A. Gronauer: Biogas production from mono-digestion of maize silage – long-term process stability and requirements. *Water Sci. Tech.* 58(8) (2008), 1645-1651.

### Autoren

**Dr. Michael Lebuhn** ist wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Landtechnik und Tierhaltung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) und leitet die Arbeitsgruppe Mikrobiologie im Arbeitsschwerpunkt Biogas der LfL. E-mail: michael.lebuhn@lfl.bayern.de

**Dr. Andreas Gronauer** koordiniert den Arbeitsschwerpunkt Biogas der LfL sowie den Arbeitsbereich Umwelttechnik in der Landnutzung. Adresse: Vöttinger Str. 36, 85354 Freising, E-Mail: andreas.gronauer@lfl.bayern.de