

Christoph Bauer, Bernhard Munk, Michael Lebuhn und Andreas Gronauer

Veränderungen der Mikrobiologie in NawaRo-Biogasfermentern – Gründe und Konsequenzen

Zur indirekten Beurteilung des mikrobiologischen Status von Fermenterhalten werden bei konventioneller Vorgehensweise chemische Analysen durchgeführt; die Interpretation der hierbei gewonnenen Ergebnisse fällt aber oftmals schwer. Im Vergleich dazu können durch eine Analyse der Zusammensetzung der Biozönose Probleme frühzeitig erkannt und spezifiziert werden. Methanogene Archaeen sind häufig der primär limitierende Faktor in der Biogasproduktion. Für die im Folgenden beschriebene Untersuchung wurden in Monovergärung von Mais- und Grassilage die methanogenen Archaeenpopulationen erfasst. Die Konzentration der Methanogenen stand dabei in engem Zusammenhang mit der Methanproduktivität, und die Zusammensetzung der Biozönosen wechselte in unterschiedlichen Zuständen.

Schlüsselwörter

Biogas, Mikrobiologie, Archaeen, Methanogene

Keywords

Biogas, microbiology, archaea, methanogens

Abstract

Bauer, Christoph; Munk, Bernhard; Lebuhn, Michael and Gronauer, Andreas

Shifting of the microbiology in biogas fermenters digesting renewable resources – causes and consequences

Landtechnik 66 (2011), no. 1, pp. 46-49, 2 figures, 1 table, 5 references

Conventionally, chemical analyses of fermenter contents are performed for the indirect assessment of the microbiological status but results are often difficult to be interpreted. Analysis of the microbiological fermenter composition can help to identify problems early and to specify them. Methanogenic archaea are often the primary limiting factor in biogas production. With molecular biological methods the population composition of methanogenic archaea has been determined in monodigestion

of grass and maize silage. Methane productivity was highly related to the concentration of methanogens. The composition of the methanogenic population varied at different conditions.

■ In der Praxis sind bei der Monovergärung nachwachsender Rohstoffe (NawaRo) Leistungseinbrüche beobachtet worden, deren Ursachen zunächst nicht erklärbar waren. Häufige Ursachen für Prozessstörungen sind übermäßige Fütterung, Spurenelementemangel oder Toxizität des Substrates. Im Folgenden wird anhand von Beispielen gezeigt, wie Populationsanalysen dazu beitragen können, Missstände in der Mikrobiologie frühzeitig zu erkennen, was mit herkömmlichen chemisch/physikalischen Methoden nicht möglich war. Die vorgestellten molekularbiologischen Methoden erlauben es, das mikrobiologische Geschehen spezifisch zu analysieren. Das kann dem Betreiber als zusätzliche Grundlage für Entscheidungen in der Prozessführung dienen.

An der Methanproduktion in Biogasanlagen sind verschiedene Mikroorganismen beteiligt, die optimal miteinander interagieren müssen, damit eine intensive Biogasproduktion erzielt werden kann. Im Wesentlichen führen Bakterien die ersten Schritte der Vergärung organischer Substanz durch, der letzte Schritt, die Methanogenese, wird ausschließlich von bestimmten Archaeen geleistet [1]. Die methanogenen Archaeen als letztes Glied der Biogasproduktionskette sind besonders empfindlich und wurden daher vorrangig untersucht.

Betrieb von Biogasfermentern und Bestimmung der methanogenen Archaeen

In sechs Fermentern (B1-B3; C1-C3) wurden Versuche im Rahmen des von der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe geförderten Verbundprojektes IBMN [2] durchgeführt. Untersucht wurde die mesophile (38 °C) und die thermophile (55 °C) Vergärung von Mais- und Grassilage im Monobetrieb. Die Versuche zur Steigerung der Raumbelastung wurden in einstufigen 32-Liter-Durchflussfermentern mit täglicher Fütterung durchgeführt. Analysiert wurden die Biogasproduktion sowie die Zusammensetzung und Konzentration methanogener Archaeen. Zu bestimmten Terminen wurden die Makro- und Mikronährstoffe bestimmt. Die organischen Säuren sowie der pH- und der FOS/TAC-Wert wurden bestimmt. Je nach Betriebszustand wurde eine bestimmte Menge einer eigens dafür entwickelten Spurenelementmischung (SpE) hinzugegeben [2].

Um die Populationszusammensetzung von methanogenen Archaeen zu analysieren, wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ein ausgewählter Abschnitt des Schlüsselgens der Methanogenese vermehrt. Die vermehrte DNA wurde zum Einen direkt kloniert und sequenziert. Über Sequenzvergleiche mit der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) konnten die methanogenen Archaeen in den Proben identifiziert werden. Alternativ wurde mit der SSCP-Technik [2; 3; 4] die vermehrte (doppelsträngige) DNA in einzelsträngige DNA umgewandelt, die sich je nach Sequenz

unterschiedlich faltete. In der darauf folgenden Elektrophorese wanderten die Produkte im Gel unterschiedlich (Abbildung 1). Die Banden wurden aus dem Gel geschnitten, die DNA gelöst, und wie bei der Direktklonierung analysiert.

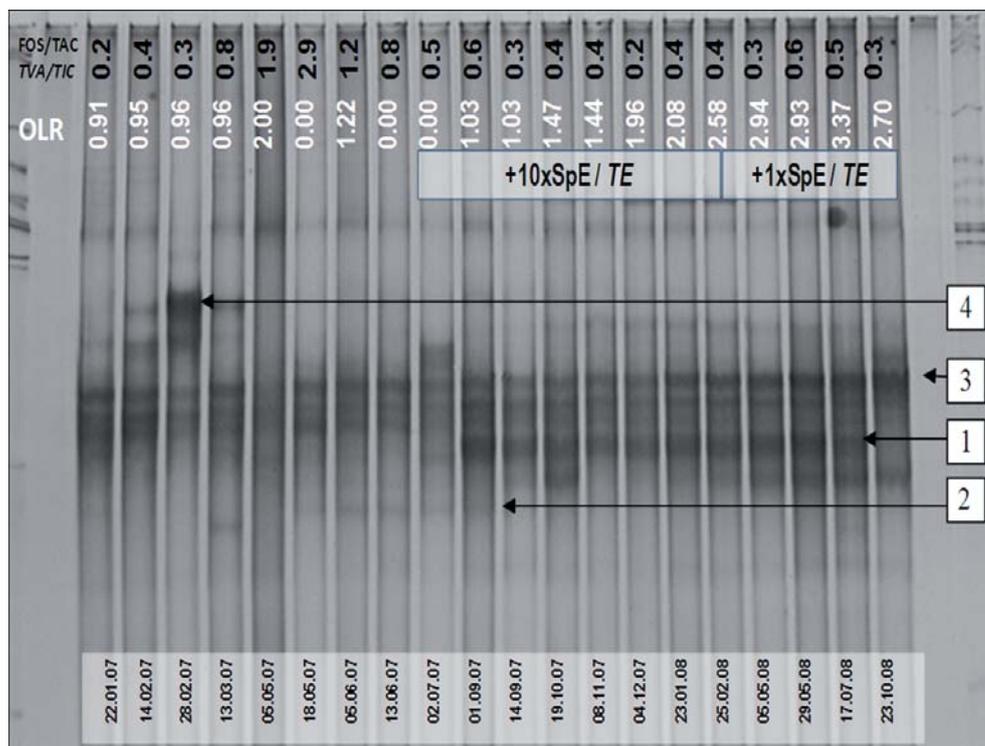
Die Konzentration der methanogenen Archaeen in der Probe wurde mit der quantitativen PCR (qPCR) [2; 3; 5] bestimmt. Die qPCR-Methode entspricht im Wesentlichen der PCR, nur wird hier zusätzlich ein Farbstoff eingesetzt. Dieser fluoresziert während der PCR bei Anregung in Abhängigkeit von der DNA-Menge unterschiedlich stark. Der Vergleich der Fluoreszenz mit einem definierten Standard ermöglichte die Quantifizierung der Methanogenen-DNA in den Proben.

Spurenelementmangel mit Maissilage

Der Vergleich der SSCP-Profile (**Abbildung 1**) deutete an, dass die Archaeenpopulation während des Versuchszeitraumes unterschiedlich zusammengesetzt war. Bei erhöhter Raumbelastung und niedrigen FOS/TAC-Werten (Spurenelementzugabe) traten zwei starke Banden auf (Pfeile 1 und 3), im versäuerten Fermenterzustand dagegen Banden im unteren Segment (Pfeil 2). In der Versäuerung waren die Banden schwächer. Bande 4 wurde aufgrund ihres einmaligen Auftretens als Artefakt bewertet und deshalb nicht berücksichtigt.

Die Verteilung der Populationen methanogener Archaeen war abhängig vom Fermenterzustand (**Tabelle 1**): Bei erhöhten Acetatkonzentrationen und FOS/TAC-Werten wurden verstärkt bestimmte Vertreter der Ordnung *Methanomicrobiales*

Abb. 1



SSCP-Gel Zeitreihe von einem Biogasfermenter (C3) mit Monovergärung von Maissilage (mesophil) (SpE, Spurenelemente)
 Fig. 1: SSCP-gel time series of a digester with monofermentation of maize silage (mesophilic) (TE, trace elements)

festgestellt. Eine Dominanz von bestimmten Vertretern der Ordnungen *Methanosarcinales* und *Methanobacteriales* indiziert dagegen offenbar einen gut laufenden Regelbetrieb. Entsprechend ihrem verstärkten Auftreten zu besonderen Prozesszuständen scheinen diese Vertreter geeignete Bioindikatoren darstellen. Die Diversität der methanogenen Archaeen war bei mesophilem und thermophilem Betrieb verschieden: Der Shannon-Index betrug im mesophilen Betrieb im Mittel 1,4 und im thermophilen Betrieb 0,6. Die geringere Diversität ist wohl Ursache der größeren Störungsanfälligkeit im thermophilen Bereich.

Bei der Vergärung von Maissilage wurde ein Zusammenhang zwischen der Konzentration der Methanogenen und der Methanproduktivität festgestellt (**Abbildung 2**). Die Prozessversäuerung beruhte auf niedrigen Gehalten der für die Methanogenen essenziellen Elemente Kobalt ($<0,03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) oder Natrium ($<10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Nach Ausgleich der Defizite stieg die Methanproduktivität und die Archaeenkonzentration stark an (**Abbildung 2**). Die Abnahme der Methanogenen ab Februar 2008 wies auf eine durch Natriummangel bedingte Stresssituation hin. Sie konnten nicht mehr zunehmen, obwohl die Methanproduktivität zunächst noch stieg, dann aber rapide zusammenbrach. Die Mangelsituation konnte durch die Entwicklung der Methanogenen-Konzentration frühzeitig erkannt werden.

Untersuchungen der eingesetzten Substrate ergaben für bestimmte Chargen der Maissilage eine Kobaltkonzentration von $<0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ (in den Grassilagen betrug sie im Schnitt etwa $0,06 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$). Die Natriumkonzentration betrug in Maissi-

lage etwa $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$ (in Grassilage um $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$), in manchen Chargen lag sie aber unter $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$. Für andere wichtige Spurenelemente (Nickel, Selen, Eisen und Molybdän) wurden Mindestkonzentrationen offenbar nicht unterschritten; Schwellenwerte ließen sich somit für diese nicht definieren. Im Praxisbetrieb ist demnach bei der Mais-Monovergärung primär mit Mangel an Kobalt und Natrium zu rechnen. Als Konsequenz sollten die Fermenterinnhalte bei der Vergärung spurenelementarmer Substrate häufiger analysiert werden, um rechtzeitig einem Mangel an Spurenelementen entgegenwirken zu können.

Ammoniaktoxizität bei Grassilage

Mit Grassilage konnte die Raumbelastung mesophil nicht über $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}_{\text{Fi}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ und thermophil nicht über $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}_{\text{Fi}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ gesteigert werden [2]. Ammoniak gilt als Entkoppler der ATP-Synthese und ist für alle Lebewesen toxisch. Als Grund für die Probleme besonders bei der thermophilen Grasvergärung wird die Verschiebung des chemischen Gleichgewichts zwischen Ammoniak und Ammonium gesehen, das bei höheren Prozesstemperaturen zugunsten des Ammoniaks ausfällt. In Reaktoren, die thermophil ausschließlich mit Grassilage betrieben wurden, lagen die (errechneten) Ammoniakgehalte zumeist über $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (bis zu $2,7 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$), dabei war eine starke Prozesshemmung zu beobachten. Bei mesophiler Betriebsweise lag die Ammoniakkonzentration meist zwischen 0,1 und $1,1 \text{ g} \cdot \text{kg}_{\text{FM}}^{-1}$. Bei höherer Raumbelastung konnte mesophil ein höherer Methanertrag als

Tab. 1

Methanogene Archaeen und charakteristische Daten aus dem mesophilen Monobetrieb mit Mais
 Table 1: Methanogenic archaea and characteristic data from monodigestion (mesophilic) of maize

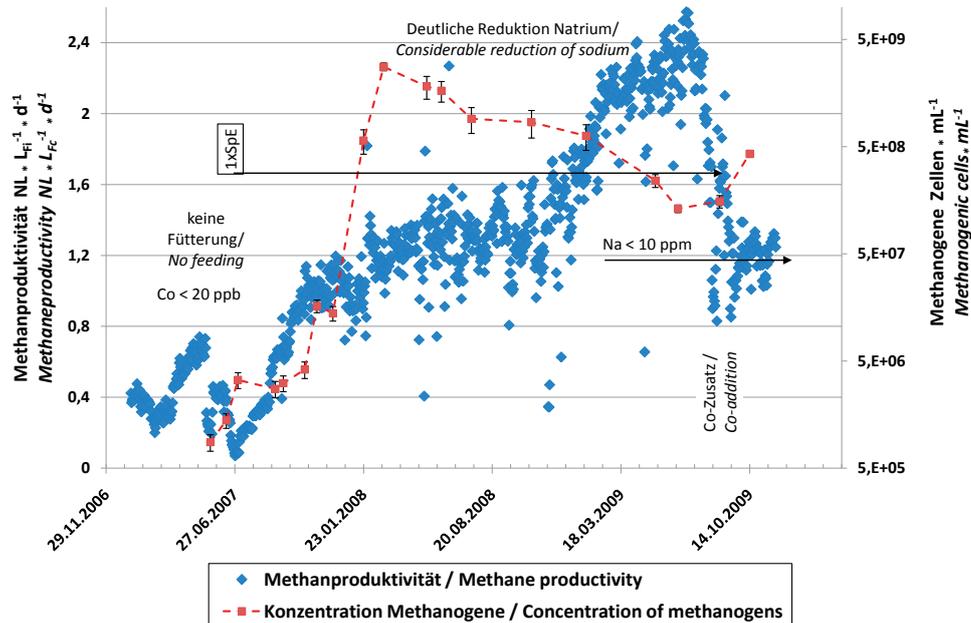
Datum (Fermenter)/ Date (fermenter)	25.02.08 (B1) ¹⁾	17.07.08 (B1) ¹⁾	26.01.07 (B2) ²⁾	13.06.07 (B2) ¹⁾	13.06.07 (B2) ²⁾	17.07.08 (B2) ¹⁾	17.07.08 (B2) ²⁾	18.05.07 (C3) ¹⁾	23.10.08 (C3) ¹⁾
pH [-]	7,7	7,9	8,0	7,7		7,5		6,3	7,6
FOS/TAC [-] TVA/TIC [-]	0,48	0,45	0,2	0,9		0,5		2,9	0,3
OLR [$\text{g oTS} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$] [$\text{g VS} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$]	3,6	4,5	0,9	0		1,1		0	2,6
Acetat [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$] Acetate [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]	n.d.	1010	207	2900		601		2621	1087
<i>M. bacteriales</i> [%]	35	15	22	13	38	<u>56</u>	30	0	<u>68</u>
<i>M. microbiales</i> [%]	18	9	7	87	46	11	16	69	8
<i>M. sarcinales</i> [%] (<i>M. saetaceae</i>) [%]	<u>47</u> (18)	<u>67</u> (0)	<u>70</u> (0)	0	15 (0)	33 (0)	<u>45</u> (2)	31 (0)	24 (0)
Unbekannte Klasse I [%] Unknown class I [%]	0	9	0	0	0,2	0	0	0	0
Unbekannte Klasse II [%]/ Unknown class II [%]	0	0	0	0	0	0	9	0	0
Analysierte Klone/ Analysed clones	23	26	20	13	28	14	49	13	21

¹⁾ Direkte PCR Klonierung/Direct PCR-cloning.

²⁾ PCR-SSCP Klonierung; unterstrichene Werte bezeichnen dominierende Populationen im Regelbetrieb. Fette Werte bezeichnen dominierende Populationen aus versäuerten Fermentern; Prozentwerte wurden unter Berücksichtigung von relativen Bandenintensitäten ermittelt; n.d.: nicht detektiert.

PCR-SSCP-cloning; Underlined data mark dominant populations from regular operation. Bold data mark dominant populations from acidification. Percentage quotation was calculated from relative band intensities; n.d.: not detected.

Abb. 2



Methanproduktivität und Konzentration methanogener Archaeen im Versuchsverlauf (Mais mono, mesophil, Fermenter B1)

Fig. 2: Methane productivity and concentration of methanogenic archaea in the course of experiment (maize monodigestion, mesophilic, fermenter B1)

thermophil erreicht werden. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Konzentration von Methanogenen und ammoniakbedingten Prozessstörungen konnte hier nicht festgestellt werden.

Bei der Vergärung von Grassilage traten Prozesshemmungen auf ohne dass der FOS/TAC-Wert die kritische Schwelle von ca. 0,7 überschritt, die für maislastige Substrate angegeben wird. Wahrscheinlich waren hier andere Teilschritte des Biogasprozesses, insbesondere die Hydrolyse und Acido-/Acetogenese primär gehemmt. Vor allem syntrophe Bakterien, die mit ihrem Stoffwechsel wenig Energie gewinnen, sind wahrscheinlich besonders anfällig für Entkoppler der ATP-Synthese. Betreiber sollten auf jeden Fall ein noch stärkeres Augenmerk auf die Ammoniakkonzentration richten. Für einen effizienten Prozess sollte proteinlastiges Substrat (z. B. Kleegras oder Hähnchenmist) eher bei einer niedrigen Raumbelastung vergoren werden. Eine Erweiterung des C/N-Verhältnisses kann auch die Ammoniakproblematik mildern.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit der molekularbiologischen Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung konnten bei bestimmten Prozesszuständen typischerweise vorkommende methanogene Archaeen bestimmt werden. Einige identifizierte Mikroorganismen erscheinen dabei als Bioindikatoren geeignet um den Betreiber frühzeitig auf eine beginnende Prozessstörung hinzuweisen. Diese Vorgänge werden derzeit genauer untersucht. Eine standardisierte Anwendung der mikrobiellen Analytik im Praxisbetrieb ist möglich und erscheint sinnvoll. Den Ergebnissen zufolge ist die Konzentration methanogener Archaeen und deren Populationsstruktur vom Fermenterzustand abhängig, was am

Beispiel von Spurenelementmangel gezeigt werden konnte. Es gibt auch andere Ursachen, die zu einem Prozesszusammenbruch führen können. Tenside, hohe Rührintensität und Antibiotika sind mögliche Ursachen von Prozessstörungen. Tenside fördern die Schaumbildung und haben antimikrobielle und zellschädigende Eigenschaften, da sie die Lipid-Doppelschicht von Zellmembranen perforieren und zerstören. Sie können auch die Anheftung der Mikroorganismen an Substrate und deren Abbau verhindern. Solche Substanzen werden in der Tierhaltung eingesetzt. Starkes Rühren des Fermenterinhalt kann die sensiblen mikrobiellen Strukturen ebenfalls stören. Auch hier ist weitere Forschung nötig.

Literatur

- [1] Bauer, C.; Lebuhn, M.; Gronauer, A. (2009): Mikrobiologische Prozesse in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Band 12
- [2] Lebuhn, M.; Andrade, D.; Bauer, C.; Gronauer, A. (2010): Intensivierung des anaeroben Biomasseabbaus zur Methanproduktion aus NawaRo (IBMN). Abschlussbericht der FKZ 220-11-505 und FKZ 220-11-905b
- [3] Bauer, C.; Korthals, M.; Gronauer, A.; Lebuhn, M. (2008): Methanogens in biogas production from renewable resources: a novel molecular population analysis approach. *Water Science and Technology* 58(7), pp. 1433-1439
- [4] Orita, M.; Suzuki, Y.; Sekiya, T.; Hayashi, K. (1989): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5(4), pp. 874-879
- [5] Munk, B.; Bauer, C.; Gronauer, A.; Lebuhn, M. (2010): Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage – a causal analysis. *Engineering in Life Sciences*. Die Schrift befindet sich im Druck.

Autoren

Dipl.-Ing. agr. Christoph Bauer, Mag. rer. nat. Bernhard Munk und Dr. rer. nat. Michael Lebuhn sind wissenschaftliche Mitarbeiter am Institut für Landtechnik und Tierhaltung (Leiter des Arbeitsbereichs: Dr. agr. Andreas Gronauer) an der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Vöttingerstr. 36, 85356 Freising, E-Mail: Michael.Lebuhn@LfL.bayern.de