

# Untersuchung der methanbildenden Mikroorganismengemeinschaft in Biogasanlagen

**Prof. Dr. rer. nat. Christiane Zell**

Fakultät Maschinenbau und Verfahrenstechnik (M+V)

Programmverantwortliche Biotechnik

Badstraße 24 77652 Offenburg

Tel.: 0781 205-100

E-Mail: [christiane.zell@hs-offenburg.de](mailto:christiane.zell@hs-offenburg.de)

**1965:** Geboren in Merzig (Saar)

**1992:** Diplom Biologie (Mikrobiologie, Biochemie, Biophysik), Universität des Saarlandes

**1992:** Freie Mitarbeit bei Prof. Dr. H.-U. Meisch – Staatlich anerkannter Gutachter für Umweltfragen, Saarbrücken; wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie, Universität des Saarlandes

**1995:** Promotion zum Thema „Entfernung von Schwermetallen aus wäßrigen Medien durch Retention an chemisch modifizierter, chitinhaltiger Abfallbiomasse“, Institut für Biochemie /Zentrum für Umweltforschung der Universität des Saarlandes

**1995:** Leiterin der mikrobiologischen Abteilung der Umweltlabor Westpfalz GmbH

**1997:** Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Gesellschaft für Umweltkompatible Prozesstechnik GmbH

**Seit 2003:** Professorin für Biotechnologie, Gentechnik, Zellkulturtechnik und Bioinformatik an der Hochschule Offenburg



## 3.7 Untersuchung der methanbildenden Mikroorganismengemeinschaft in Biogasanlagen

Prof. Dr. rer. nat. Christiane Zell  
K. Haas (B. Sc.)

### Zusammenfassung

Die optimale Zusammensetzung und Aktivität der Mikroorganismengemeinschaft ist für den stabilen und effizienten Betrieb einer Biogasanlage essentiell. Moderne kultivierungsunabhängige Nachweismethoden können erstmals die Basis für eine rationale mikroorganismenfokussierte Verfahrensoptimierung liefern.

Als erster Schritt für den Aufbau eines aussagekräftigen Monitoringsystems für die Biogasmikrobiologie wurde ein nucleinsäurebasiertes Verfahren (TaqMan Real-time PCR) zum Nachweis der methanbildenden Mikroorganismen (Archaeen) sowie von vier Untergruppen etabliert und auf Proben aus zwei unterschiedlich betriebenen Biogasanlagen in Neuried und Oberried angewandt.

Bei der Anlage in Oberried in der Nähe von Freiburg, betrieben von örtlichen Landwirten (Substrat: Gülle, Grassilage, Maissilage, Mist, Anlage mit Güllevorgrube, Fermenter und Gärrestlager) konnten insgesamt höhere absolute Konzentrationen an Archaeen nachgewiesen werden als in der Anlage in Neuried in der Nähe von Offenburg, betrieben durch die Fa. badenova AG & Co. KG, Freiburg (thermophil betrieben, Substrat:

Maissilage, Anlage mit Hauptfermenter, Nachfermenter und Gärrestlager).

Auch hinsichtlich der vier untersuchten Untergruppen zeigten sich deutliche Unterschiede, die auf die unterschiedlichen an der Methanbildung beteiligten Abläufe hinweisen.

### Einleitung und Zielsetzung

Die Kenntnis der Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft und der ablaufenden biochemischen Prozesse bieten entscheidende Interpretationshilfen sowohl für die Verfahrensoptimierung als auch für die Stabilität einer Biogasanlage im Routinebetrieb. Trotz dieser offensichtlichen Relevanz der Bioreaktionen sind die genauen Abläufe bislang nur unzureichend verstanden. Vielmehr wurden die aus Abwasserreinigungsanlagen abgeleiteten Konzepte zum anaeroben Abbau von Biomasse ohne ausreichende Überprüfung auch für Biogasanlagen angenommen [1].

Man geht dabei davon aus, dass die anaerob ablaufende Biogasbildung die Folge komplexer biochemischer Prozesse mit Hydrolysephase, Versäuerungsphase (Acidogenese), Essigsäurebildungsphase (Acetogenese) und eigentlicher methanbildender Phase (Methanogenese) darstellt. An dieser Fütterungskette ist eine Vielzahl verschiedener Mikroorganismen mit unterschiedlichen Bedürfnissen beteiligt, sodass für die Prozessführung immer ein Kompromiss gefunden werden muss [2]. Besondere Berücksichtigung müssen im Hinblick auf die Effizienz der Biogasproduktion immer die

schwächsten und limitierenden Mitglieder der Mikroorganismengemeinschaft finden.

In der „Postgenom-Ära“ wurden leistungsfähige und schnelle Methoden zur Nucleinsäureanalytik (weiter-)entwickelt. Dadurch ist jetzt erstmals auch die Analyse ganzer Mikroorganismengemeinschaften möglich geworden, indem repräsentative Nucleotidsequenzen quantitativ nachgewiesen oder gar ganze Metagenome (die gesamte DNA einer komplexen Probe) sequenziert werden können. Auch wenn die genaue Beschreibung der mikrobiologischen Wechselwirkungen in Biogasanlagen eine hochkomplexe Angelegenheit bleibt, lassen sich mittlerweile zumindest einzelne mikrobiologische Aktivitäten hiermit effizient und schnell nachverfolgen. Als erster Ansatz zur Untersuchung der biogasbildenden Mikroorganismengemeinschaft und ihrer Limitierungen wurde ein Verfahren etabliert und modifiziert, um die besonders störungsanfälligen methanogenen Archaeen sowie von relevanten Untergruppen nachzuweisen.

In zwei unterschiedlich betriebenen Praxisbiogasanlagen wurden anschließend quantitative Bestimmungen durchgeführt und die beiden Anlagen verglichen. Dieser Ansatz soll in weiteren Untersuchungen dazu genutzt werden, anhand der Populationsdynamik der methanbildenden Mikroorganismen den Einfluss von Veränderungen der Verfahrensparameter zu verstehen, um diese rational und nicht nur nach dem Prinzip „Versuch und Irrtum“ optimieren zu können.



Abb. 3.7-1: Biogasanlage Neuried der Fa. badenova AG & Co. KG (jeweils 2 baugleiche Einheiten)

## Angewandte Methoden

### Untersuchte Biogasanlagen

Anlage Neuried (Abb. 3.7-1): Hierbei handelt es sich um eine thermophil betriebene und mit Maissilage gefütterte Biogasanlage mit einer elektrischen Leistung von 2 x 700 kW. In der ersten Stufe der Anlage (Hauptfermenter) finden vorwiegend die hydrolytische Spaltung der Polymere sowie die Versäuerung statt. In der zweiten Stufe (Nachfermenter) schließt sich die Phase der Essigsäurebildung sowie die eigentliche Methanogenese an, die noch bis in das folgende Gärrestlager hin fortgeführt wird. Es findet eine teilweise Rückführung organischer Biomasse aus dem Hauptfermenter in die erste Stufe statt.

Anlage Oberried: Diese Anlage befindet sich auf einem landwirtschaftlichen Hof und besteht aus Vorgrube, Fermenter und Gärrestlager. In der Vorgrube befindet sich Gülle, die von dort in den eigentlichen Fermenter gepumpt wird. Feststoffe wie Maissilage, Grassilage und Festmist werden über eine Förderschnecke aus einer Aufnahmewanne ebenfalls in den Fermenter befördert. Im Fermenter findet wesentlich der Faulprozess statt. Die Anlage liefert eine Leistung von 40 kW.

### Probenahme

Die untersuchten Proben wurden aus den unterschiedlichen Teilbereichen der beiden Biogasanlagen entnommen:

Anlage Neuried: Hauptfermenter, Nachfermenter

Anlage Oberried: Vorgrube, Fermenter

### Nachweismethode

Die Archaeen sowie vier Untergruppen wurden anhand der vorkommenden 16S rDNA quantitativ bestimmt.

Die Extraktion der DNA erfolgte nach einem weiterentwickelten Protokoll von Klocke et al. [3].

Der eigentliche Nachweis der DNA erfolgte durch spezifische Vervielfältigung der DNA-Abschnitte mit Taq-Man-Realtime PCR. Es wurden spezifische Primer-Sets für Gesamtarchaeen sowie für die Untergruppen Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanosarcinaceae und Methanosaetaceae verwendet. Auswahl der Primer-Sets und PCR-Protokoll wurden Nettmann et al. (2008) [4] entnommen.

### Ergebnisse und Diskussion

Wie erwartet konnten methanogene Archaeen in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden (Abb. 3.7-2).

Die absoluten Gesamtkonzentrationen waren dabei in den Proben aus der Anlage Oberried am höchsten, wobei das Güllerreservoir (Vorgrube) gegenüber der eigentlichen Prozessstufe (Fermenter) höhere Werte aufwies.

Gülle ist natürlicherweise reich an Archaeen. Die vergleichsweise geringeren Konzentrationen in der Fermenterstufe sind auf einen Verdünnungseffekt durch Eintrag der weiteren Feststoffe zurückzuführen, der nicht vollständig durch die Anreicherung der Archaeen kompensiert wird.

Die Anlage Neuried weist insgesamt geringere Gesamtarchaeenkonzentrationen auf, wobei hier die höheren Konzentrationen wie erwartet im Nachfermenter, wo die eigentliche Methanogenese stattfindet, nachgewiesen werden konnten.

Einen wichtigen Hinweis auf die unterschiedlichen an der Methanbildung be-

teiligten biochemischen Prozesse liefert ein Blick auf die Verteilung der Archaeenuntergruppen (Abb. 3.7-3).

Je nach Probe konnten 16 – 32 % der nachgewiesenen Archaeen einklassifiziert werden (Abb. 3.7-3).

In der Anlage Oberried dominierten Methanobacteriales und Methanosaetacea, wobei im Fermenter im Vergleich zur Vorgrube (Güllevarrat) eine massive Anreicherung der Methanosaetacea stattgefunden hat. Da diese im Gegensatz zu den anderen untersuchten Untergruppen obligat Methan aus Essigsäure bilden (acetoklastische Methanbildner) [5], scheint hier dieser Methanbildungsweg eine erhebliche Rolle zu spielen.

Bei der mit Maissilage gefütterten Anlage in Neuried waren hingegen Methanomicrobiales und Methanosarcinaceae vorherrschend mit jeweils deutlichen Anreicherungen im Nachfermenter.

Methanomicrobiales sind obligat wasserstoffverwertend (hydrogenotrophe Methanbildner). Methanosarcinaceae haben sowohl die Fähigkeit der acetoklastischen als auch der hydrogenotrophen Methanbildung [5]. Bei der Anlage in Neuried scheint daher die hydrogenotrophe Methanbildung im Vergleich zur Anlage Oberried von größerer Bedeutung zu sein.

Der unterschiedliche Anlagenbetrieb hat also nicht nur Auswirkungen auf die Gesamtmenge an Archaeen, sondern führt offensichtlich auch zu deutlichen Verschiebungen der Zusammensetzung bei den Untergruppen. Hieraus lassen sich durch Hinweise auf die unter den Prozessbedingungen ablaufenden unter-

Vergleich der Biogasanlagen Neuried - Oberried: Konzentrationen Archaeen

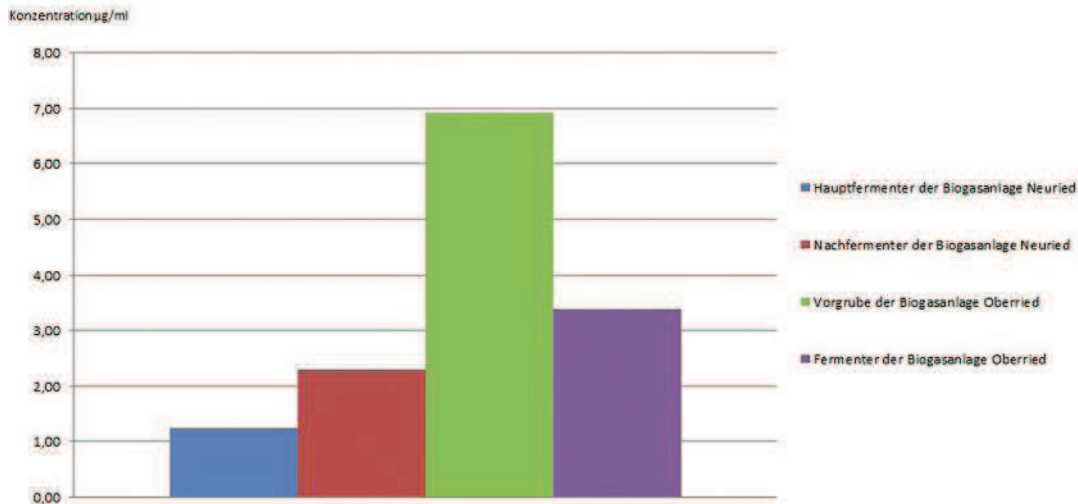


Abb. 3.7-2: Gesamtarchaenkonzentrationen Anlage Neuried und Anlage Oberried

Vergleich der Biogasanlagen Neuried - Oberried: Konzentrationen Archaeenuntergruppen

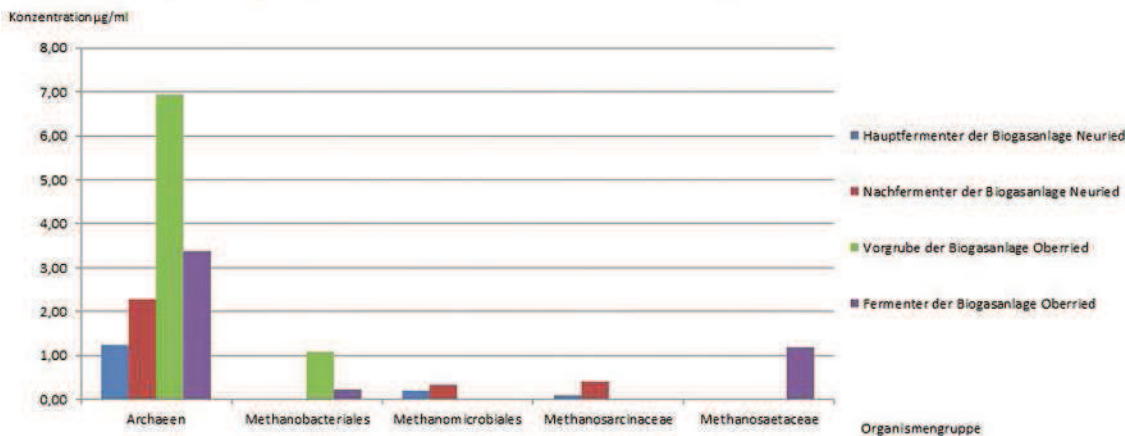


Abb. 3.7-3: Gesamtarchaenkonzentration und Archaeenuntergruppen

schiedlichen Methanbildungsprozesse Möglichkeiten ihrer Feinsteuerung ableiten.

#### Ausblick

In weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wird zurzeit die Bedeutung der Befunde für die Effizienz der Biogasbildung und Zusammensetzung anhand weiterer Prozessdaten interpretiert.

Die hier vorgestellten Ergebnisse stellen dabei nur einen Teilausschnitt der Untersuchungen zur Populationsdynamik der methanogenen Archaeen in Labor- und Praxis-Biogasanlagen dar. Die Korrelationen mit weiteren Messdaten sollen den Weg zu mehr mikroorganismenzentrierten Verfahrensoptimierungen ebnen. Wie kann die Anzahl der sensiblen limitierenden Gruppen an biogasbildenden Mikroorganismen gestei-

gert werden? Hierbei hilft auch der genauere Blick auf die einzelnen Untergruppen und ihrer speziellen Wachstumsbedürfnisse, denen gegebenenfalls durch Veränderung der Verfahrensparameter Rechnung getragen werden kann.

Erhebliche Veränderungen der Mikroorganismenbiozönose scheint auch die Zugabe von cellulosespaltenden Enzymen zu bewirken. Aktuelle Ergebnisse hierzu werden gerade ausgewertet.

#### Referenzen/References

- [1] Munk B. et al.: Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. *Eng. Life Sci.*, 10, No. 6, 496 – 508, 2010
- [2] Kaiser F. et al.: Sicherung der Prozessstabilität in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Bayerische Landes-

anstalt für Landwirtschaft (LfL). Lerchl Druck Freising, 2007

- [3] Klocke M. et al.: Characterization of the methanogenic Archaea within two phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 190 – 205, 2008
- [4] Nettmann et al.: Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16 S rDNA and mcrA analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1835 – 1850, 2008
- [5] Klocke M. et al.: Charakterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor system operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 190 – 205, 2008