

1 Einleitung

Methanbakterien als Verursacher der Biogasbildung zählen zu den ältesten Lebensformen der Erde. Vermutlich wesentlich länger als durch Funde und Überlieferung bestätigt, machte sich die Menschheit, ohne Kenntnis der ihnen zugrunde liegenden Vorgänge, von Mikroorganismen ausgelöste Prozesse zunutze. Der kontrollierte Einsatz der Stoffwechselaktivitäten von Mikroorganismen in der Lebensmittelindustrie, der pharmazeutischen Industrie sowie in der Abwasser- und Abfallentsorgung hat in den letzten Jahrzehnten gewaltige Fortschritte gemacht und wird auf Grund neuerer Erkenntnisse der Wissenschaft, z.B. in der Molekularbiologie und der Genetik, in naher Zukunft sicherlich noch weiter an Bedeutung gewinnen.

Die Vergärung als anaerobe Methode zur Behandlung von org. Abfällen wird mit einer Vielzahl von auf dem Markt angebotenen Verfahren in der Regel in mittleren und großtechnischen Anlagen betrieben. Bei allen bereits existierenden Verfahren und Vergärungsanlagen ist der Einfahrbetrieb, auch in den hochtechnisierten Ländern mit großem Erfahrungspotential in der Anaerobtechnik, ein Nadelöhr im Gesamtprozess. Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Untersuchung der Möglichkeiten der Verkürzung der Einfahrphase des anaeroben Abbauprozesses von organischen Abfällen und Reststoffen.

Die Optimierung und Beherrschung der Einfahrphase stellt aufgrund der komplexen Reaktionsvorgänge, bedingt durch die Vielzahl essentiell beteiligter und voneinander abhängiger Mikroorganismen sowie einer Fülle von entstehenden Stoffwechselprodukten, eine besondere Herausforderung dar. Auf der Basis einer umfassenden Literaturrecherche und -auswertung im ersten Teil der Arbeit, wurden verschiedene mögliche Inbetriebnahme-Strategien erarbeitet. Anschließend bestand das Ziel darin, in einer Reihe von Versuchen die Inbetriebnahme-Strategien bezüglich einer Verkürzung der dafür benötigten Zeit und des Einleitens eines stabilen Vergärungsprozesses zu testen. Entscheidend dabei war die kürzeste Zeit, in der sich eine stabile Anaerob-Biozönose ausgebildet hat und im Zuge dessen der Methangehalt im gebildeten Biogasfluss angestiegen war. Mit Hilfe von optimierten Einfahrstrategien sollte die vorhandene Mischpopulation und vor allem die sehr langsam wachsenden methanogenen Bakterien in Bezug auf ihre Wachstumsgeschwindigkeit und ihre Stoffwechselaktivität hin positiv beeinflusst werden. Dies bedeutet, durch die Entwicklung solch optimierter Einfahrstrategien soll es abschließend gelingen, eine stabile Anaerob-Biozönose im Vergärungsreaktor zu etablieren, welche eine hohe Abbauleistung gewährleistet.

Die Auswahl der im erstellten Versuchsplan verwendeten Inputstoffe erfolgte im Hinblick auf die anaerobe Behandlung dieser in Kleinreaktoren. Eine solche Ausrichtung auf die anaerobe Behandlung von organischen Abfällen in Kleinreaktoren liegt darin

begründet, dass diese Forschungsarbeit im Rahmen des AiF-Projektes "Anaerobe Behandlung von Fäkalien, organischen Abfällen und Reststoffen in Kleinreaktoren-Schaffung von Verfahrensgrundlagen für Regel- und Steuerungsprozesse" durchgeführt wurde.

Mit der Bearbeitung dieses Themas erweist sich als wichtiger Ausgangspunkt das sorgfältige Studium der zugrundeliegenden biologischen Prozesse, die letztendlich für den Stoffabbau verantwortlich sind. Aus diesem Grund werden im anschließenden Kapitel die am anaeroben Stoffabbau beteiligten biologischen Prozesse und die beteiligten Mikroorganismen näher beleuchtet.

2 Biologische Prozesse des anaeroben Stoffabbaus

Die anaeroben Mikroorganismen gewinnen wie alle Organismen ihre Energie durch Oxidationsvorgänge, jedoch können sie keinen freien Sauerstoff als Elektronenakzeptor für den bei der anaeroben „Atmung“ frei werdenden Wasserstoff bzw. die frei werdenden Reduktionsäquivalente nutzen.

Aufgrund dieser geringen Energieausbeute können anaerobe Organismen aus der sauerstofffreien Oxidation nur etwa 1/20 der Energie aerober Bakterien in Form von ATP (Adenosintriphosphat) gewinnen. Bei der anaeroben Oxidation von schon weitgehend oxidierten Kohlenstoffverbindungen, wie z.B. Acetat, können sogar nur etwa 1/3 ATP pro Mol Substrat gewonnen werden. Mit einer derartig geringen Energieausbeute gehen unmittelbar eine Biomassereduktion und eine Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit einher. In Vergärungsanlagen beträgt die gebildete Biomasse oftmals nur zwischen 3 und 6% des umgesetzten Kohlenstoffs. Die in den Abfallstoffen vorhandene potentielle Energie kann somit durch die anaerobe Stoffwechsellage bis hin zum Produkt Methan (neben dem CO₂ als Produkt) zunächst erhalten bleiben und dann in Elektrizität und Wärme umgewandelt werden (ca. 21 kJ bzw. 6 kWh bzw. 1 m³ Biogas pro 1 kg organische Trockensubstanz). [Kämpfer, 2001]

Somit ist der anaerobe Stoffabbau im Vergleich zum aeroben Abbau ein idealer Entsorgungsweg, da im Verlauf des aeroben Stoffabbaus ca. 50% des Kohlenstoffes aus dem Substrat in Biomasse als Produkt des Stoffabbaus eingebaut werden. Dies trifft jedoch nur unter der Voraussetzung zu, dass die für den anaeroben Prozessumsatz notwendige mikrobielle Biomasse zuvor bereitgestellt und während des Prozesses erhalten werden kann. Aus diesen Gründen ist die Biomassebereitstellung und -erhaltung eine der wesentlichen Voraussetzungen für einen funktionierenden anaeroben Abbau.

Die in der Natur ablaufenden Faulungsprozesse haben die Gemeinsamkeit, dass dabei entstehendes Biogas etwa zu 50-70% aus Methan sowie zu 50-30% aus Kohlendioxid besteht. In Abhängigkeit vom Ausgangssubstrat kommt noch Schwefelwasserstoff (<1%) hinzu. Weiterhin können je nach Temperatur unterschiedliche Anteile an Wasserdampf (meist im Bereich 1%) entstehen.

2.1 Die vier Phasen des anaeroben Abbaus

Mit der großtechnischen Nutzung der Methangärung zur Stabilisierung von Klärschlamm bei der Abwasserreinigung begannen auch die naturwissenschaftlichen Untersuchungen dieses Prozesses. Zunächst wurde bei allen Betrachtungen das

von Omelianski 1906 entwickelte Einstufenmodell zu Grunde gelegt, bis 1956 von Barker eine Zerlegung der Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße in Fettsäuren und Alkohole und dann deren Umwandlung zu Methan und Kohlendioxid in einem Zweistufenmodell postuliert wurde. Bryant zeigte 1967, dass es sich bei der 1940 von Barker isolierten Kultur *Methanobacterium omelianskii*, die für die Bildung von Essigsäure und Methan aus Ethanol verantwortlich ist, nicht um eine Reinkultur, sondern um eine synergistische Mischkultur eines wasserstoffbildenden und eines wasserstoffverbrauchenden Organismus handelt. Nach der Isolierung von obligat anaeroben Mikroorganismen und der Entdeckung der synergistischen Mischkultur von acetogenen und methanogenen Bakterien hat sich das vereinfachte vierstufige Abbaumodell (siehe Abbildung 2.1), mit der Hydrolyse oder Depolimerisation, der acidogenen Phase, der acetogenen Phase und der methanogenen Phase durchgesetzt, welches vom Grundaufbau auch anderen mehrstufigen Modellen entspricht. [Junghans, 1987]

Aus diesem Modell (in Abbildung 2.1 nach Schmelz [2000]) dargestellt ist ersichtlich, dass am vierstufigen Abbau der hochmolekularen Verbindungen 3 Bakteriengruppen beteiligt sind. Über welche Zwischenstufen das Methan entsteht, hängt von den beteiligten Mikroorganismen und den unter natürlichen Bedingungen in der komplexen Mischkultur herrschenden regulativen Einflüssen auf den Stoffwechsel der Bakterienkultur ab. Die Geschwindigkeit des Umsatzes der komplexen organischen Verbindungen zu Methan wird primär von den Anteilen an Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen im Ausgangssubstrat bestimmt. Während Kohlenhydrate und Eiweiße einem schnellen Abbau durch die Bakterien unterliegen, ist die Dauer des Fettsäureabbaus etwa fünfmal so lang [Junghans, 1987]. Somit ist die Umsetzung der Fettsäuren die langsamste Teilreaktion und wird damit zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und bestimmt den Wirkungsgrad des Prozesses. Radke [2000] beobachtete hingegen, dass bei Substraten mit hohem Anteil an Cellulose bzw. Lignin die Hydrolyse dieser Bestandteile die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses beeinflusst.

Neben dem vierstufigen anaeroben Abbaumodell in Abbildung 2.1 ist als konkretes Beispiel der Weg des anaeroben Abbaus von komplex in Biomasse gebundener Cellulose zu Methan veranschaulicht. Kommunale Küchenabfälle mit Anteilen von Gartenabfällen enthalten häufig 15-20% Cellulose und 5-15% „Lignin“ (gemäß Stoffgruppenanalytik nach von Soest). Mit einigen geringen Modifikationen gibt das Schema auch für andere maßgebliche Ausgangssubstrate von Feststoffen, so von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten [Seyfried et al. 1994], die maßgeblichen Schritte des anaeroben Abbaus wieder.

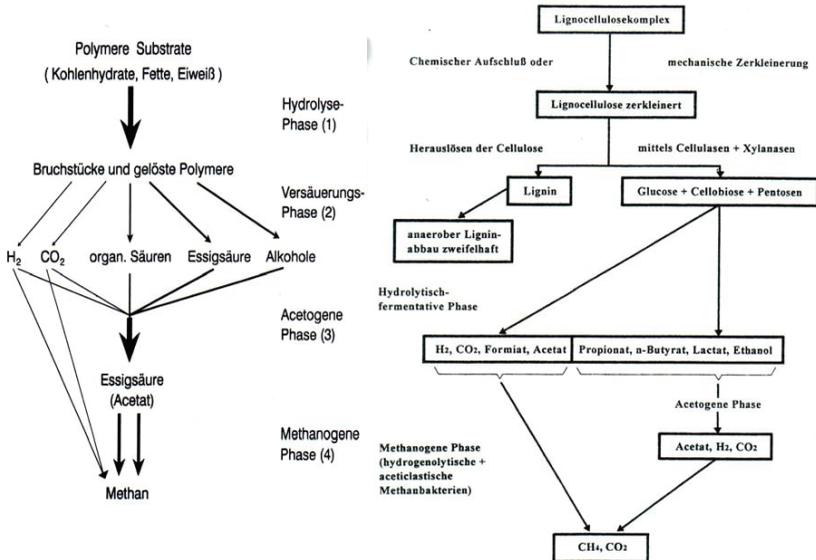


Abbildung 2.1: vierstufig anaerobes Abbau [Schmelz, 2000] und rechts der Kohlenstoff-Fluss beim anaeroben Abbau von Cellulose [Seyfried et al., 1994]

Unter Vergärung oder Faulung wird, wie oben bereits beschrieben, die Reduktion von organischen Kohlenstoffverbindungen unter anaeroben Milieubedingungen verstanden. Der anaerobe Kohlenstoffabbau gliedert sich dabei, wie aus Abbildung 2.1 ersichtlich, in 4 Teilschritte, die jeweils von unterschiedlichen Mikroorganismen ausgeführt werden. Die Teilschritte im Einzelnen sind:

- *Hydrolyse* von partikulärem organischen Substrat
- *Acidogenese* von gelöstem Substrat zu organischen Säuren
- *Acetogenese* von organischen Säuren zu Essigsäure
- *Methanogenese* von Essigsäure zu Methan sowie von Wasserstoff und Kohlendioxid zu Methan.

Die einzelnen Mikroorganismen der jeweiligen Teilschritte leben symbiotisch miteinander, so dass der Gesamtprozess nur durch das Funktionieren der 4 Teilprozesse stabil abläuft. [Christ, 1999]

Hydrolyse

Die vorgelagerte Hydrolyse der Polymere stellt nach Seyfried et al. [1994] den geschwindigkeitslimitierenden Schritt einer Feststoffvergärung dar. Dies trifft insbeson-

dere für die Cellulose zu, die z.B. in Gartenabfällen bzw. im Papier einen großen Anteil bildet. Je nach Abfallzusammensetzung kann jedoch der limitierende Schritt unterschiedlich sein. Bei Essensresten überwiegen die Anteile von leicht abbaubaren Polymeren wie Stärke, Protein und Hemicellulosen [Kämpfer, 2001], so dass hier die Umwandlung der Fettsäuren, wie zuvor beschrieben, limitierend sein können.

Im ersten Schritt, der Hydrolyse von partikulärem organischem Substrat, werden die im organischen Abfallinput enthaltenen polymeren Substrate durch Enzyme gespalten und in gelöste Bruchstücke überführt. Die meisten der organischen Moleküle treten als miteinander verkettete, sich wiederholende Einheiten auf. Zum Beispiel sei Cellulose als pflanzliches Kohlenhydrat genannt, das aus vielen aneinandergelinkten Glucoseeinheiten besteht.



Bakterien können diese Ketten nicht direkt nutzen. Die Bakterien scheiden zur Aufspaltung der organischen Verbindungen Enzyme aus. Die Enzyme werden entsprechend ihrer chemischen Mischung klassifiziert als Oxydoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen, Ligasen (nähere Erläuterung siehe Anhang). Von besonderer Bedeutung für die Hydrolyse sind hierbei die Hydrolasen, die durch die Addition von Wasser den Abbau einer Verbindung bewirken. Bekannte Hydrolasen sind die Esterasen (Fettspaltung), Proteasen (Eiweißspaltung), Amylasen (Verzuckerung von Stärke). [Hartmann, 1992]

Die Hydrolyse von partikulärem organischem Material kann in 3 Unterprozesse aufgeteilt werden [Bischofsberger, 2005]:

- *Kohlenhydrate* (Cellulose, Hemicellulose, Zucker, Pektin, Lignin) sind unterschiedlich gut hydrolysierbar. Zucker und Hemicellulose sind sehr gut aufzuschließen, während die Hydrolyse von Cellulose, Stärkekörnern oder Pektin entsprechend langsamer verläuft. Lignin ist dagegen so gut wie gar nicht hydrolysierbar.
- Der Abbau von *Eiweißen* (Glycerin, Glutamin, Leucin) unterscheidet sich von der Hydrolyse der anderen Stoffe durch seine Komplexität. Es können bis zu 20 verschiedene Aminosäuren gebildet werden. Die Hydrolyserate ist niedriger als bei Kohlenhydraten, häufiger sogar geringer als bei Fetten.
- Die Hydrolyse von *Fetten* erfordert eine Emulgierung des Fettes zur Oberflächenvergrößerung. Dann können fettsplappende Lipasen (Enzyme) besser angreifen. Fette werden bei der Hydrolyse vollständig, aber langsam hydrolysiert, allerdings nur, wenn die Temperatur >20°C beträgt.

Einen weiteren Einfluss auf diese Rate hat neben der Temperatur und der Größe der Partikel, auch das Verhältnis von Partikelvolumen zur Partikeloberfläche. Anorganische Inhaltsstoffe wie beispielsweise Lignin und Waxe können die Hydrolyse hemmen [Seyfried et al., 1994]. Der pH-Wert hat einen signifikanten Einfluss auf die Hydrolyserate. Auch durch unterschiedliche Partikelverweilzeiten konnten verschiedene Hydrolyseraten beobachtet werden. [Christ, 1999]

Acidogenese-Versäuerungsphase

In der Acidogenese – oder auch Versäuerungsphase genannt – werden durch hydrolytisch aktive Bakterien (Clostridien, Bazillen u.a.) wie auch weitere gärende Bakterien aus den gebildeten Monomeren und Dimeren der Polymere verschiedene kurzkettige Fettsäuren gebildet (z.B. Formiat, Acetat, Propionat, Butyrat, Valeriat), die bei neutralem pH-Wert als geladene Salzionen vorliegen. Neben Wasserstoff und Kohlendioxid entstehen weiterhin kurzkettige Alkohole (z.B. Ethanol, Propanol, Butanol) und Milchsäure, wobei hier nur die wichtigsten genannt sind (siehe Phase 2, Abb. 2.1). [Kämpfer, 2001]

Dabei ist zwischen der Versäuerung der Hydrolyseprodukte, die aus Kohlenhydraten, Eiweißen und Fetten entstehen, zu unterscheiden [Christ, 1999]. Diese Mikroorganismen sind fakultativ anaerob und vertragen relativ hohe Säurekonzentrationen. Sie benötigen wie alle lebenden Organismen, zur Erzeugung ihrer Lebensenergie Sauerstoff und Kohlenstoff. Zunächst verwerten die fakultativ anaeroben Bakterien den im Schlamm gelösten Sauerstoff und schaffen dadurch erst die für die Methanbakterien obligaten anaeroben Lebensverhältnisse. Aus diesem Grunde sind sie für die Methangärung von besonderer Bedeutung. Ist dann der gelöste Sauerstoff aufgebraucht, bedienen sie sich der molekularen Atmung, d.h. sie verwerten molekular gebundenen Sauerstoff.

Die Säurebildner genannten Bakterien zerlegen also die bei der Hydrolyse entstandenen molekularen Verbindungen in Spaltprodukte mit niedrigem Molekulargewicht, vor allem in Alkohole, organische Säuren, Aminosäure, Kohlendioxid, Schwefelwasserstoff und geringe Mengen Methan. Die Spalt- und Stoffwechselprodukte der fakultativ anaeroben Bakterien bestehen somit zum größten Teil aus Säuren bzw. aus Stoffen mit Säurecharakter. Hierdurch wird bewirkt, dass der Reaktorinhalt sehr schnell versäuert und der pH-Wert beträchtlich unter 7,0 sinkt [Kaltwasser, 1980]. Eine entscheidende Rolle für die Entstehung dieser Zwischenprodukte spielt der Wasserstoffpartialdruck (p_{H_2}). Bei hohem p_{H_2} überwiegt die Bildung von Propion- und Buttersäure, während bei niedrigem p_{H_2} mehr Essigsäure, H_2 und CO_2 entstehen [Junghans, 1987].

Ebenso wie bei der Hydrolyse setzt sich die Acidogenese als Abbauphase mit Unterprozessen der 3 Grundstoffgruppen Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette fort. *Koh-*

lenhydrate wie Oligo- und Polysaccharide werden zu Monosacchariden hydrolysiert, die in der Acidogenese von fermentativen Mikroorganismen zu Kohlendioxid und Wasserstoff sowie bei niedrigem Wasserstoffpartialdruck zu Acetat und bei hohem Wasserstoffpartialdruck zu flüchtigen organischen Säuren, wie Propion- und Butter-säure umgewandelt werden. Ein niedriger Wasserstoffpartialdruck ($p_{H_2} < 10^{-4}$ bar) tritt bei einer Substratlimitierung auf, bei der die Methanbakterien in der Lage sind, die Produkte der Acidogenese unmittelbar in Methan umzuwandeln. Werden diese Methanbakterien überlastet, steigt der Wasserstoffpartialdruck an.

Die Produkte aus der *Eiweiß*hydrolyse sind Aminosäuren und Dipeptide, aus denen in der acidogenen Phase Ammonium, Wasserstoff, Kohlendioxid und organische Säuren gebildet werden. Der Prozess läuft nur bei niedrigen Wasserstoffpartialdrücken ab, so dass eine gute Umsetzung des Wasserstoffs in den nachfolgenden Abbauschritten gewährleistet sein muss [Seyfried et al., 1994].

Fette liegen nach der Hydrolyse als Glycerin, Phosphat und Fettsäuren vor. Glycerin wird dann in Abhängigkeit vom Wasserstoffpartialdruck in der gleichen Weise wie Zucker versäuert. Phosphat wird zu Ethanol und Methanol umgesetzt und die Fettsäuren in der sogenannten β -Oxidation zu Acetat, Wasserstoff und Kohlendioxid. Die Acetatbildung über die β -Oxidation ist nur bei sehr geringen Wasserstoffpartialdrücken möglich. [Christ, 1999]

Bei einem größeren Anfall an Fett im Substrat, z.B. von Fettabscheidern, werden primär Fettsäuren beim biologischen Abbau gebildet. Letztlich entsteht aus Fett Acetat oder Propionat (siehe Abb. 2.1). Es kann somit sehr leicht zu einer unspezifischen Überflutung mit Fettsäuren kommen. Insbesondere der Propionatabbau kann besonders problematisch sein und limitierend werden.

Bei einem hohen Proteinanteil im Substrat (z.B. bei Speiseresten) entstehen oftmals vermehrt die allgemein zytotoxischen Produkte Ammonium/ Ammoniak und Schwefelwasserstoff, letzterer vermehrt auch bei sulfathaltigen Abwässern, siehe Phase 2 (Abb. 2.1). Da der mikrobielle Eiweißabbau häufig schnell verläuft (wegen der Wasserlöslichkeit häufig schneller als der von Fett), kann es hier leicht zu einer Hemmung durch Ammoniak oder Schwefelwasserstoff kommen. Oftmals entstehen intermediär Wasserstoff und CO_2 , siehe Phase 3 (Abb. 2.1). Beim Abbau der Cellulose entsteht aber nicht immer H_2 als Zwischenprodukt, da es auch celluloseabbauende Anaerobier gibt (z.B. *Wolinella succinogenes*), die beim Celluloseabbau keinen Wasserstoff produzieren. [Kämpfer, 2001]

Acetogenese

Die während der Versäuerungsphase intermediär gebildeten Stoffwechselprodukte werden bei der Acetogenese durch syntrophe Mikroorganismen je Mol zu 1-2 Mo-

len Acetat und ferner zu H_2 und CO_2 abgebaut, siehe Phase 3 in Abbildung 2.1 [Kämpfer, 2001]. Da bei diesen Prozessen Elektronen abgegeben werden, vor allem H^+ , spricht man auch von anaerober Oxidation [Bischofsberger, 2005].

Die acetogenen Bakterien, welche Propion- und Buttersäure und Alkohole zu Essigsäure, Wasserstoff und Kohlendioxid abbauen, stellen ein Bindeglied zwischen fermentativen und methanogenen Bakterien dar. Als Reinkultur sind diese Organismen nur bei geringem Wasserstoffpartialdruck lebensfähig. Die wasserstoffverbrauchenden methanogenen Bakterien, die Wasserstoff, Kohlendioxid und Essigsäure zu Methan umsetzen, senken den Wasserstoffpartialdruck auf den für die acetogenen Bakterien notwendigen niedrigen Wert ab, so dass sich eine enge Assoziation beider Spezies in einer Mischkultur ergibt. Dieser Austausch der Wasserstoffatome zwischen den verschiedenen Mikroorganismengruppen (Interspecies-Hydrogen-Transfer) ist ein Vorgang, der innerhalb von Bruchteilen einer Sekunde bei einem Abstand von wenigen Mikrometern (ca. 1 Bakterienlänge) abläuft [Bischofsberger, 2005].

Die von Bryant entdeckte Kultur von *Methanobacterium omelianskii*, welche Ethanol zu Methan umsetzt, stellt ein klassisches Beispiel für die synergistische Mischkultur dar [Sahm, 1981]. Die Symbiose der wasserstoffverbrauchenden und -bildenden Bakterien ist für den störungsfreien Ablauf der anaeroben Fermentation von entscheidender Bedeutung, da bei einem Wasserstoffpartialdruck über 10 Pa eine Hemmung der Reaktion aufgrund des Konzentrationsanstieges der Fettsäuren eintritt. Wenn in der Mischkultur die Wasserstoffverwertung durch die methanogenen Bakterien nicht ausreichend ist, kommt es z.B. durch Anreicherung von Propionsäure zur Hemmung der Methangärung bzw. zum Übersäuern der Reaktionsmasse. Aufgrund der Wechselbeziehung der acetogenen und methanogenen Bakterien ist der optimale Ablauf der Abbaureaktionen nur in einem sehr begrenzten thermodynamischen Bereich möglich. Es muss deshalb bei der technischen Durchführung des Prozesses auf die Stabilität dieser engen synergistischen Assoziation der beiden Bakterienarten Rücksicht genommen werden.

Methanogenese

Weiterhin ist eine direkte Umwandlung in Methan durch Methanbildner möglich (Phase 4, Abb. 2.1) [Kämpfer, 2001]. Die Methanproduktion erfolgt über zwei unterschiedliche Wege. Rund 30 % des Methans werden aus der Reduktion von Wasserstoff und Kohlendioxid gewonnen. Die beteiligten methanogenen Organismen sind extrem empfindlich gegenüber Sauerstoff, da sie obligate Anaerobier sind. Die weiteren 70 % des Methans werden über den Umsatz des Acetats gebildet. Da die Bakterien jedoch nur die undissoziierte Form der Essigsäure verwerten können, übt der pH-Wert, der den undissoziierten Anteil von schwachen organischen Säuren vorgibt, einen wesentlichen Einfluss auf die verwertbare Essigsäurekonzentration aus. Durch diesen Parameter wird damit die Wachstumsgeschwindigkeit der Methanbakterien

beeinflusst. Da diese Reaktion zudem mit einem sehr geringen Energiegewinn für die Bakterien verbunden ist, ist deren Wachstum sehr langsam. Infolge dessen ist einerseits die erforderliche Biomassenverweilzeit hoch, um ein Auswaschen der Bakterien zu verhindern. Andererseits ist aber auch die Überschussschlammproduktion gering, was zu einem hohen Wirkungsgrad beim organischen Feststoffabbau führt. [Christ, 1999]

2.2 Die Physiologie und das Wachstum der anaeroben Mikroorganismen

Unter den Methanbildnern trifft man nahezu alle Formen an, die von den Eubakterien her bekannt sind: Kokken (*Methanococcus vannielii*), Stäbchen (*Methanobacterium formicicum*), Kurzstäbchen (*Methanobrevibacter ruminantium*, *M. arboriphilicus*), Spirillen (*Methanospirillum hungatei*), Paketkokken (*Methanosarcina barkeri*) oder Filamente (*Methanotherix soehngenii*) und sogar plattenförmige Bakterien (*Methanoplanus limicola*). Man unterscheidet jetzt schon 6 Familien, und die Zahl der beschriebenen Gattungen und Arten nimmt laufend zu. In Tabelle 2.1 sind einige methanogene Bakterien mit ihrer taxonomischen Klassifizierung aufgeführt. [Schlegel, 1985]

Die methanogenen Bakterien sind eine eigene Gruppe, die sich von anderen Bakterien nicht nur durch ihren Stoffwechsellyp, sondern auch durch einige Merkmale bezüglich der Zusammensetzung ihrer Zellbestandteile unterscheiden.

Die Methanbildner sind wie schon beschrieben, streng anaerobe Bakterien: Luftsauerstoff tötet sie ab. Die hohe Sauerstoffempfindlichkeit begründet, warum die physiologischen, biochemischen und ökologischen Kenntnisse über diese Gruppe noch so gering sind. Erst durch die Entwicklung von speziellen Methoden, die HUNGATE-Technik, wurde es möglich, die Methanbildner unter Ausschluss von Sauerstoff zu überimpfen und zu isolieren. [Schlegel, 1992]

Tabelle 2.1: Auflistung einiger taxonomisch klassifizierter methanogener Bakterien, deren Substrat sowie pH- und Temperaturoptimum [nach Spendlin, 1991 und Hartmann, 1992]

Specie	Substrate (H-Donatoren)	pH - Optimum	T- Optimum
Methanobacterium			
M. formicum	H ₂ , Formiat	6,6-7,8	38-45°C
M. bryantii	H ₂	6,9-7,2	37-39°C
M. bryantii M.o.H.G.	H ₂	7,0	37-40°C
M. thermoautotrophicum	H ₂	7,2-7,6	65-70°C
Methanobrevibacter			
M. ruminatum	H ₂ , Formiat	6,3-6,9	37-39°C
M. arboriphilus	H ₂	7,5-8,0	37-39°C
M. arboriphilus AZ	H ₂	7,0	33-40°C
M. arboriphilus DC	H ₂	-	-
M. smithii	H ₂ , Formiat	6,9-7,4	37-39°C
Methanococcus			
M. vanielii	H ₂ , Formiat	7,0-9,0	36-40°C
M. voltae	H ₂ , Formiat	6,7-7,4	32-40°C
Methanomicrobium			
mobile	H ₂ , Formiat	6,1-6,9	38-40°C
Methanogenium			
M. cariaci	H ₂ , Formiat	6,8-7,3	25-30°C
M. marisnigri	H ₂ , Formiat	6,2-6,6	20-25 °C
Methanospirillum			
M. hungatei	H ₂ , Formiat	6,6-7,4	30-37°C
M. hungatei GP1	H ₂ , Formiat		
Methanosarcina			
M. barkeri	H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , Acetat	6,7-7,2	35-40°C
M. barkeri 227	H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , Acetat	7,0	-
M. barkeri W		-	-
UBS	H ₂ , CH ₃ OH, CH ₃ NH ₂ , Acetat		
Z			
Methanothrix			
soehngenii	Acetat	7,4-7,8	35°C

Wird eine solche Bakterienkultur als Batchkultur angelegt, so gestaltet sich das Wachstum der Bakterien derart, dass es in 4 verschiedenen Wachstumsphasen unterteilt werden kann. Die Abbildung 2.2 zeigt diese einzelnen Wachstumsphasen in Abhängigkeit von der Zeit. Nachdem der Fermenter frisch befüllt wurde, adaptieren

sich die Mikroorganismen während einer mehr oder weniger langen lag-Phase (I) an die vorherrschenden Milieubedingungen. Diese Phase geht in eine exponentielle Wachstumsphase (II) über, die durch eine gleichbleibende, maximale Wachstumsgeschwindigkeit der Organismen gekennzeichnet ist. Falls keine Produkthemmung auftritt und kein neues Substrat zugegeben wird, geht die Kultur nach Verbrauch der Nährstoffe in die Verzögerungsphase (III) über, an die sich die Absterbephase (VI) anschließt [Braun, 1982]. Zwischen der jeweiligen Dauer der 4 Phasen und damit verbunden der Dauer des gesamten Prozesses, besteht eine direkte Abhängigkeit mit der Menge und Zusammensetzung des Substratangebotes sowie mit den Milieubedingungen im Fermenter.

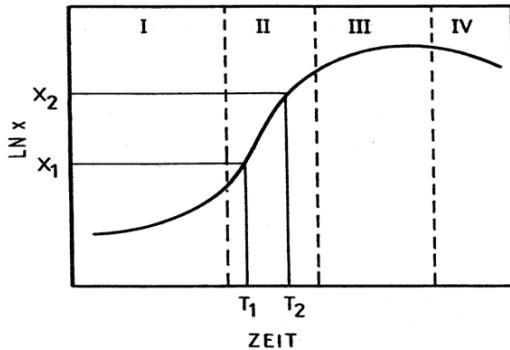
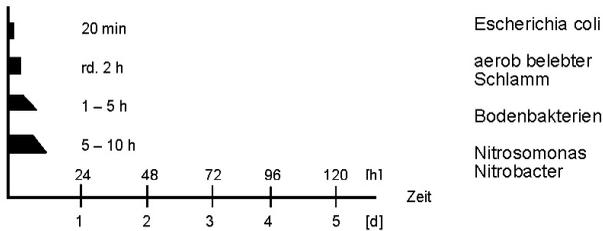


Abbildung 2.2: Wachstumsphasen einer Batchkultur [Braun, 1982]
x = Organismenkonzentration

Vergleicht man nun aerobe Bakterien mit anaeroben Bakterien hinsichtlich ihrer Generationszeiten, so lässt sich feststellen, dass sich anaerobe Bakterien wesentlich langsamer vermehren als aerobe. Zur Verdeutlichung dieser Aussage sind die unterschiedlichen Generationszeiten einiger aerober und anaerober Bakterien in Abbildung 2.3 zusammengestellt. Sie liefern jedoch nur Anhaltswerte, da sie unter optimalen Milieubedingungen gemessen wurden.

Aerobe Mikroorganismen



Fakultativ und obligat anaerobe Mikroorganismen

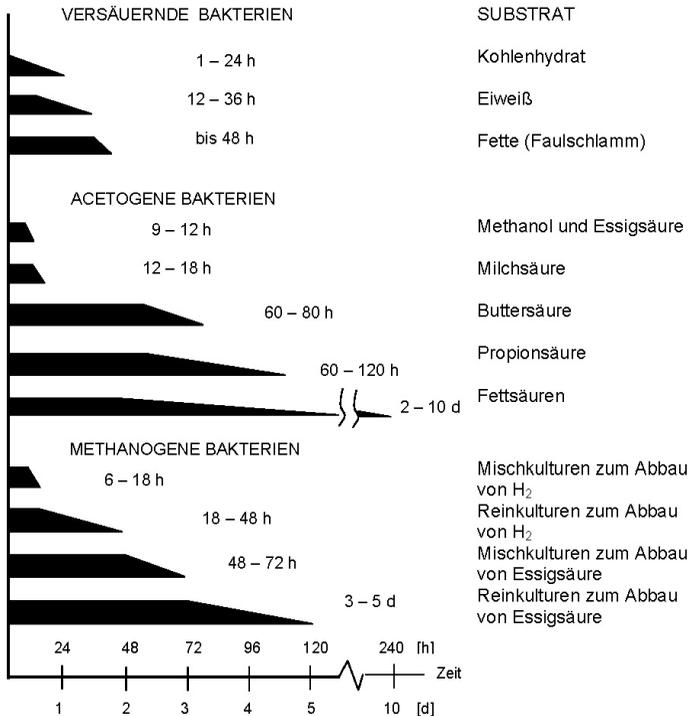


Abbildung 2.3: Generationszeiten aerober und anaerober Mikroorganismen (Anhaltswerte) [nach Seyfried et al., 1986]

Obwohl die Methanbildung zu ca. 70% aus dem Abbau von Acetat resultiert, gelang es bisher nur selten, essigsäureverwertende Bakterienarten zu isolieren (z.B. *Methanosarcina barkeri*). Da der Energiegewinn aus dieser Reaktion nur 32 kJ pro mol

Acetat beträgt, ist das Wachstum auf diesem Substrat gering. Smith und Mah [1978] geben für *Methanosarcina* eine maximale Wachstumsgeschwindigkeit von über 0,4 d⁻¹ und Huser [1981] gab für *Methanotrix* eine solche von über 0,1 d⁻¹ an. Dieser Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten der acetatspaltenden Organismen ist in Abbildung 2.4 dargestellt. [Roediger, 1990]

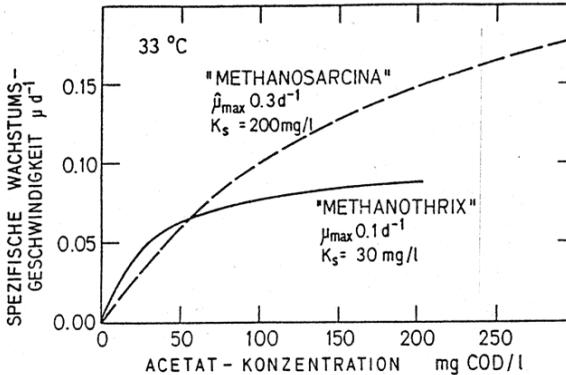


Abbildung 2.4: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit für die acetatspaltenden Organismen Methanotrix und Methanosarcina [Gujer und Zehnder, 1983]

Aus Abbildung 2.4 kann abgelesen werden, dass die Spezies *Methanotrix* bereits bei relativ geringen Substratkonzentrationen mit maximaler Geschwindigkeit wächst. Trotzdem teilt sie sich, unter optimalen Verhältnissen, erst nach 8 Tagen. Auch in anderen Quellen werden Generationszeiten von mehreren Tagen für die Methanbakterien angegeben [Madigan, 2001; Bischofsberger et al., 2005]. Diese, unter Laborbedingungen ermittelten Werte, können nur mit deutlichen Zuschlägen in die Praxis übertragen werden. Denn die Milieubedingungen in der technischen Anwendung, z.B. in einem Faulbehälter, weichen immer in dem einen oder anderen Parameter von den optimalen Bedingungen ab. [Schmelz, 2000]

Auch alle bisher bekannten acetogenen Bakterien wachsen sehr langsam. Ihre Generationszeiten liegen in ähnlicher Größenordnung wie die der Methanbakterien. Beispielsweise wurde für ein buttersaureverwertendes acetogenes Bakterium im Labor eine Generationszeit von 84 Stunden ermittelt. Auch bei Gujer/ Zehnder [1983] werden maximale Wachstumsraten für verschiedene acetogene Bakterien angegeben. Die μ_{max}-Werte liegen zwischen 0,1 und 0,5 pro Tag, d.h. unter optimalen Bedingungen liegen die Generationszeiten zwischen 2 und 10 Tagen. [Schmelz, 2000]

Zehnder und Wurmman [1977] isolierten das wasserstoffoxidierende *Methanobrevibacter arboriphilus*, das eine Wachstumsgeschwindigkeit von $1,4 \text{ d}^{-1}$ erreichen kann. Weiterhin wies Wechs [1985] nach, dass sogar bei einer Faulzeit von nur einem Tag Methan erzeugt wird. Allerdings darf man vermuten, dass es keine acetatabbauenden Methanbakterien gibt, die Wachstumsgeschwindigkeiten von über $0,4 \text{ d}^{-1}$ haben. Dafür spricht auch die Tatsache, dass Wechs [1985] bei einer Faulzeit von nur 3 Tagen knapp 30% der Methanmenge erzeugte im Vergleich zum Referenzprozess von 20 Tagen. Jedenfalls ist die Wachstumsgeschwindigkeit der acetatabbauenden *Methanosarcina* ausreichend für Faulzeiten von 3 Tagen und darüber. [Roediger, 1990]

2.3 Stoffwechselaktivitäten

Gärende Mikroorganismen haben am Stoffkreislauf der Natur einen nicht unerheblichen Anteil. Sie setzen sich überall dort durch, wo organische Verbindungen vorliegen und Sauerstoff fehlt. Diese zur Gärung befähigten Bakterien sorgen für den einleitenden Abbau von Biopolymeren, die durch Verfrachtung an Stellen gelangt sind, zu denen Sauerstoff keinen Zugang hat. Das mengenmäßig überwiegende Polymer, das in den Sedimenten von Seen und Teichen sowie in Faulschlammbehältern abgebaut wird, ist Cellulose. Ein großer Teil der durch pflanzenfressende Tiere mit der Nahrung aufgenommenen Cellulose wird unverdaut wieder ausgeschieden und nach Erreichen von anoxischen Zonen wird dieser Teil von Clostridien und anderen streng anaeroben Bakterien vergoren. Die dabei entstehenden Gärungsprodukte, darunter Alkohole, organische Säuren, Kohlendioxid und Wasserstoff, stehen dann anderen Bakterien zur Verfügung, die durch weitere spezielle Gärungen und anaerobe Atmung schließlich Methan und -in Gegenwart von Sulfat- Schwefelwasserstoff bilden. Die Gärungen leiten also die "Anaerobe Nahrungskette" ein.

In dieser "Anaeroben Nahrungskette" steht neben verschiedenen anderen fermentativen Bakterien die Gruppe der methanbildenden Bakterien als letztes Glied. An den Anfang stehen neben den wie schon erwähnten Polysacchariden (Cellulose, Stärke) auch Proteine und Fette. Der Ablauf dieser anaeroben Nahrungskette gestaltet sich dabei wie folgt:

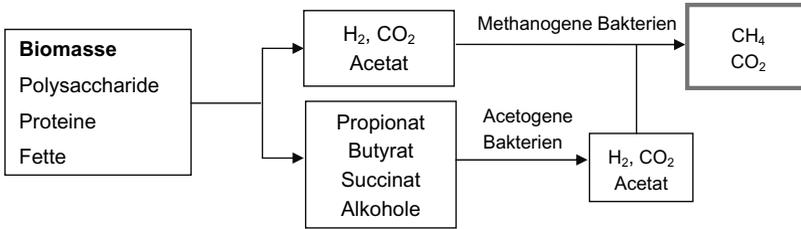


Abbildung 2.5: die anaerobe Nahrungskette [Schlegel, 1992]

Die zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion und zum Aufbau neuer Zellsubstanz notwendige Energie wird durch Abspaltung von Wasserstoff aus organischen Verbindungen gewonnen. Der Energiegewinn hängt von der Potentialdifferenz zwischen dem organisch gebundenen Wasserstoff und dem Wasserstoffakzeptor ab. Bei aeroben Organismen ist der terminale Wasserstoffakzeptor O_2 . Das Endprodukt ist die höchste Oxidationsstufe des Wasserstoffs, also Wasser. Hierbei erreicht die Energieausbeute ihr Maximum. Anaeroben Organismen steht dieser Weg nicht zur Verfügung: Der Wasserstoff wird auf andere organische Verbindungen übertragen, wodurch sich eine wesentlich geringere Energieausbeute ergibt und gleichzeitig eine Vielzahl von Stoffwechselprodukten möglich macht. Die weitere Verwertung dieser Produkte, bis der Kohlenstoff letztendlich in seiner höchsten Reduktionsstufe, dem Methan, vorliegt und somit auf anaerobem Weg die maximale Energieausbeute erfolgt ist, wird als Methangärung bezeichnet. Die im Methangas noch gebundene Energie kann bis zu 90% des Energieinhaltes der Ausgangssubstanz ausmachen. Diese Energie steht den anaeroben Bakterien nicht mehr zur Verfügung. Daraus ergibt sich ein entsprechend geringerer Zuwachs an Biomasse. [Hubert, 1988]

Bei den methanogenen Bakterien wurde anhand der meisten bisher isolierten, in Reinkultur gehaltenen Bakterien festgestellt, dass sie als Wasserstoff-Donator H_2 verwerten können. Einige Bakterien nutzen auch Formiat, Methanol, Acetat oder Methylamine. Im Fall von manchen anaeroben Ökosystemen wurde jedoch Acetat als Hauptsubstrat der Methanbildung erkannt. Dies lässt darauf schließen, dass das Substratspektrum der Methanbildner also sehr eng ist.

Die bei der Spaltung des Substratmoleküls freigewordene Energie wird von der Zelle durch Knüpfung energiereicher Bindungen gespeichert. Als universeller Speicherstoff dient den Zellen aller Lebewesen das Adenosintriphosphat (ATP). Die Struktur der Adenosinphosphate ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Der Energiewechsel erfolgt durch Bindung bzw. Abspaltung der Phosphatgruppen. Bei der An- bzw. Abkopplung der dritten Phosphatgruppe werden ca. 30 kJ gespeichert bzw. wieder frei. [Schmelz, 2000]

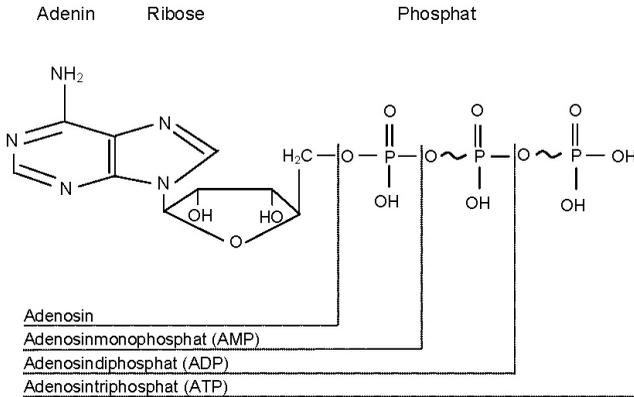


Abbildung 2.6: Struktur der Adenosinphosphate [Schmelz, 2000]

ATP ist als biologisches Energiequantum der universelle Überträger chemischer Energie zwischen energieerzeugenden und energieverbrauchenden biologischen Reaktionen. Die Hydrolyse von ATP zu ADP liefert unter Standardbedingungen 7,5 kcal/ mol. Diese Energie muss bei der Neubildung eines ATP von einem Teilschritt der energieliefernden Reaktion wieder aufgebracht werden. [Zehnder, 1976]

Beim Abbau organischer Substanz stellt man bei energetischer Betrachtung fest, dass die Vergärung für die anaeroben Mikroorganismen wesentlich weniger Energie liefert als die Veratmung durch aerobe Bakterien. So liefert der aerobe biochemische Abbau eines Mols Glucose zu CO₂ und H₂O Energie für 38 Mol ATP. Hingegen werden bei der Vergärung nur 2 Mol ATP gebildet und der Rest der Energie ist im Methanmolekül gebunden (siehe folgende Gleichungen). [Spendlin, 1991]



Der geringe Energiegewinn des anaeroben Stoffwechsels gegenüber dem aeroben bei dem Umsatz eines Mols des gleichen Substrates verdeutlicht, warum die anaeroben Organismen vergleichsweise langsam wachsen. Damit verbunden liegt hierfür

der Grund, warum ein ausreichender Rückhalt von anaeroben Organismen im System eine wichtige Anforderung zur Gewährleistung eines stabilen Betriebs darstellt.

Damit die anaeroben Bakterien die organischen Verbindungen aufspalten und synthetisieren können, wird der Einsatz von Enzymen benötigt. Sie spielen für den gesamten Stoffwechsel innerhalb und außerhalb der Zelle eine herausragende Rolle. Denn die Steuerung aller Stoffwechselprozesse erfolgt durch Enzyme. Diese Enzyme wirken als biologische Katalysatoren. Sie ermöglichen eine chemische Reaktion und/ oder beschleunigen diese, ohne dazu irgendeine Energie zu liefern oder dabei selbst verbraucht zu werden. Das bedeutet, dass die Aktivierungsenergie für eine Reaktion herabgesetzt und die Geschwindigkeit stark beschleunigt wird. Eine enzymkatalysierte Reaktion verläuft etwa um 10 Größenordnungen schneller als eine nicht enzymatische Reaktion. Für ein besseres Verständnis dieser wichtigen Funktion: die Steigerung der Geschwindigkeit um den Faktor 10^{10} verkürzt die Halbwertszeit einer Reaktion von 300 Jahren auf eine Sekunde [Schlegel, 1992]. Eine Auflistung der verschiedenen Enzyme wurde bereits im Kapitel 2.1.1 vorgenommen.

Enzyme werden nach Art der von ihnen katalysierten Reaktion bezeichnet und tragen die Endung -ase. Permeasen und Translocasen katalysieren beispielsweise den Transport von Substraten in die Zelle [Schlegel, 1985]. Zur Aufnahme und zum Weitertransport von Bruchstücken der Substrate oder Wasserstoff stehen den Enzymproteinen niedermolekulare Verbindungen, die Coenzyme und prosthetischen Gruppen, zur Verfügung. Typisches Beispiel für ein Coenzym ist das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD). NAD ist der universellste Überträger von Wasserstoff innerhalb der Zelle.

Die Reduktion von CO_2 und CH_4 erfolgt wie schon erläutert in mehreren Schritten, bei denen je 2 Elektronen übertragen werden. Die an Coenzyme gebundenen Zwischenprodukte durchlaufen die Redoxstufen des Formiats, des Formaldehyds und des Methanols. Als Elektronenüberträger fungieren dabei weder NAD (Nicotinamidadeninucleotid) noch FAD (Flavinadeninucleotid), sondern ein als Faktor F_{420} bezeichnetes Coenzym, das durch seine Fluoreszenz bei UV-Bestrahlung methanogene Archaeen im Mikroskop erkennbar macht. Die anderen beteiligten Coenzyme (Methanofuran, Tetrahydromethanopterin und die Coenzyme M und B) sind ebenfalls bei Eubakterien nicht bekannt. Die Umsetzungen sind teilweise an die Translokation von Natrium-Ionen oder Protonen gekoppelt (siehe Abbildung 2.6). Der wichtigste Schritt ist dabei der letzte, bei dem ein sogenanntes Heterodisulfid aus Coenzym M und Coenzym B an der Membran reduziert und dadurch gespalten wird. Coenzym M ist das einfachste bekannte Coenzym. Es handelt sich um Mercaptoethansulfonsäure ($\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3$), die an der Thiolgruppe methyliert werden kann. [Cypionka, 1999]

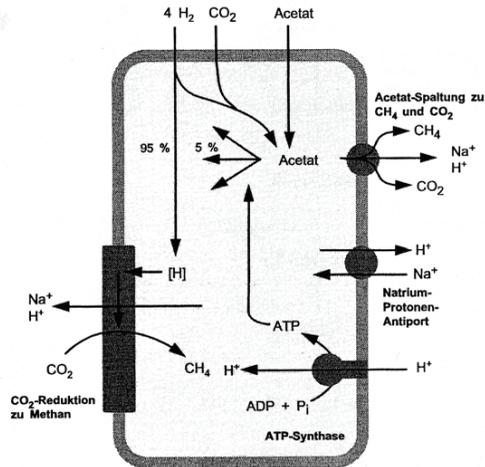


Abbildung 2.7: Überblick über den Stoffwechsel methanogener Archaeen [Cypionka, 1999]

Die Abbildung 2.7 gewährt einen Überblick über den Stoffwechsel der methanogenen Archaeen. Es werden nur Wasserstoff und Acetat verwertet. Für Elektronentransport und chemiosmotische Energiekonservierung durch Translokation von Protonen und Natrium-Ionen steht nur eine sehr geringe Redoxspanne zur Verfügung.