



**LfL**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft



**Biogastechnologie zur  
umweltverträglichen  
Flüssigmistverwertung und  
Energiegewinnung  
in Wasserschutzgebieten**



**Schriftenreihe**

**23**

**2006**

**ISSN 1611-4159**

**Impressum:**

Herausgeber: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL)  
Vöttinger Straße 38, 85354 Freising-Weihenstephan  
Internet: <http://www.LfL.bayern.de>  
Redaktion: Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik  
Vöttinger Str. 36, 85354 Freising  
E-Mail: [Landtechnik@LfL.bayern.de](mailto:Landtechnik@LfL.bayern.de)  
Tel.: 08161/71-3450

1. Auflage November / 2006

Druck: Lerchl-Druck, 85354 Freising

© LfL

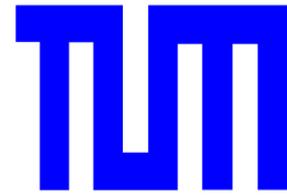
Die elektronische Version dieser Schriftenreihe wird downloadbar von der LfL unter Publikationen angeboten: (<http://www.LfL.bayern.de/publikationen/>) und kann auf Anfrage als CD zugesandt werden.

Die einzelnen Berichtsteile können im Internet von den Seiten der LfL-Landtechnik (<http://www.lfl.bayern.de/ilt/umwelttechnik/23185/>) bzw. des Lehrstuhls für Siedlungswasserwirtschaft der TUM (<http://www.wga.bv.tum.de/Projekte/projekte.htm>) heruntergeladen werden.



**LfL**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft



**Biogastechnologie zur  
umweltverträglichen  
Flüssigmistverwertung und  
Energiegewinnung  
in Wasserschutzgebieten**

**LfL-Landtechnik  
LfL-Agrarökologie  
TUM-Siedlungswasserwirtschaft**

Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft



## *Vorwort*

Gute Ideen werden am Anfang verlacht, dann bekämpft und zum Schluss hoffentlich doch verwirklicht.

1996 hatte Herr Dipl. Landwirt E. Attenberger vom (damaligen) Bayerischen Landesamt für Wasserwirtschaft die Idee, Gülle so zu behandeln, dass diese zumindest in der Schutzzone II B in Wasserschutzgebieten ausgebracht werden kann. Anlass war das Vorhaben der Stadtwerke Rosenheim, das bestehende Wasserschutzgebiet im Unteren Mangfalltal aus Sorge um die Trinkwasserqualität zu erweitern. Das in der Musterschutzgebietsverordnung enthaltene Gülleausbringverbot in der Schutzzone II erzeugt bei vielen Landwirten Unbehagen, bei Bio- Landwirten sogar Existenzängste. Die betroffenen Landwirte, die neu mit Schutzgebietsauflagen konfrontiert werden sollten, standen dieser Lösung offen gegenüber und sahen auch die Möglichkeit, etwas Neues für die Landwirtschaft zu erkunden. Gemeinsam mit den anderen beiden Wasserversorgungsunternehmen, den Stadtwerken Bad Aibling und der Stadt Kolbermoor sollte dieses Vorhaben verwirklicht werden. Dies bot sich auch deshalb an, da sich die Schutzgebiete überschneiden und die Auflagen Landwirte betreffen, die Bürger dieser beiden Nachbarstädte sind. Von Anfang an hat der dort früher selbst als Landwirt praktizierende MdL Josef Ranner sich für das Vorhaben im Landtag und in den beteiligten Ministerien eingesetzt. Neben der politischen Aktivität hat die fachliche Kompetenz des leider schon verstorbenen ehemaligen Präsidenten der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Herrn Prof. Dr. Dr. hc. Hans Schön entscheidend dazu beigetragen, die Forschungsanlage in Berbling bei Bad Aibling entstehen zu lassen.

Nach vielen zähen Gesprächen in den Ministerien, die Herr Dr. Gronauer von der (damaligen) Bayerischen Landesanstalt für Landtechnik und ich als Vertreter der Stadtwerke Rosenheim GmbH & Co. KG geführt haben, ist es gelungen, den Bau einer Versuchsanlage für das Forschungsvorhaben „Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten“ zu verwirklichen. Die beiden Herren Prof. Dr. Peter Wilderer, Ordinarius am damaligen Lehrstuhl für Wassergüte- und Abfallwirtschaft der TU München und Dr. Peter Schindler von der damaligen Landesuntersuchungsanstalt Süd haben uns als anerkannte Hygienefachmänner wertvolle Argumentationshilfen geliefert. Von Seiten der Stadtwerke Rosenheim und den beiden Oberbürgermeistern, H. Dr. Michael Stöcker und seiner Nachfolgerin Frau Gabriele Bauer habe ich dafür von Anfang an Zustimmung erhalten. Dass eine vertrauensvolle nachbarschaftliche Zusammenarbeit möglich ist, zeigt das Engagement der beiden Städte Bad Aibling und Kolbermoor. Immerhin haben alle drei Städte einen Betrag von knapp 200 000 € für diese Forschungsanlage aufgebracht. Aller Einfluss hätte nichts bewirkt, hätten wir nicht einen versierten Landwirt gefunden, dessen Viehbesatz mit dem Konzept übereinstimmte, der sowieso einen neuen Endlagerbehälter errichten wollte und der uns mit seinem Wissen und Können über vier Jahre hinweg half, zu den nun vorliegenden Forschungsergebnissen zu kommen. An dieser Stelle möchte ich im Namen aller Beteiligten einen ganz besonderen Dank an Herrn und Frau Schweiger aus Berbling aussprechen.

Zur endgültigen Bewilligung des Forschungsprojektes hat vor allem Frau Dipl.-Ing. agr. Silvia Schattner und Herr Dipl.-Ing. Mathias Effenberger mit den perfekt ausgearbeiteten Anträgen bei den beiden Bayerischen Staatsministerien für Landwirtschaft u. Forsten bzw. Landesentwicklung, Umwelt und Gesundheit wertvolle Dienste geleistet. Beide Häuser gemeinsam haben einen Zuschuss von knapp 900 000 € ausgereicht.

H. Effenberger verbindet mit den Forschungsaufgaben an „unserer“ Anlage seine Promotion. Dafür alles Gute.

Die Planung und die Bauüberwachung der Pilotanlage übernahm das Planungsbüro Bauer und Wiesner GmbH in Rosenheim. Die Fa. Schmack Biogas GmbH aus Schwandorf als ausführende Firma hat mit dem Planungsbüro, dem Auftraggeber und den Wissenschaftlern, die naturgegeben hin und wieder Änderungswünsche anmeldeten, jederzeit kooperativ zusammengearbeitet. Dem Ingenieurbüro ist es gelungen, während der Bauzeit alle Interessen zu koordinieren und umzusetzen. Dafür gebührt allen Beteiligten ein herzlicher Dank. Herr Staatsminister Josef Miller nahm persönlich die Anlage am 20.09.2002 in Betrieb. Daran kann man auch die politische Bedeutung dieser Forschung abschätzen.

Die Bandbreite der gewonnen Erkenntnisse während des vierjährigen Versuches hat sich vor dem Hintergrund neuer Diskussionen oder gesetzlichen Vorgaben erweitert. Wer sprach 2002 von EHEC in der Landwirtschaft oder von einer zu erwartenden europäischen Badegewässerverordnung?

Das Forschungsvorhaben hat mehr Erkenntnisse gebracht, als in der Aufgabenstellung definiert waren und hat vor allem eine technische Möglichkeit bei schwierigen Wasserschutzgebietsausweisungen aufgezeigt.

Gute Ideen aus denen sich dann Verfahren entwickeln, die wissenschaftlich anerkannt und bewiesen sind, sollten dort, wo dies sinnvoll ist, verwirklicht werden.

Ludwig Nesper  
ehem. Prokurist der SWRO  
und Projektleiter

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	11
Tabellenverzeichnis .....	15
Abkürzungsverzeichnis .....	18
A Berichtsteil der LfL-Landtechnik .....	21
Zusammenfassung Berichtsteil A .....	22
A 1 Einführung und Problemstellung .....	27
A 2 Zielsetzung .....	29
A 3 Stand des Wissens .....	30
A 3.1 Hygienisierung durch anaerobe Behandlung .....	30
A 3.2 Thermophile Vergärung .....	32
A 3.3 Bewertung des Verfahrens durch Energie- und CO <sub>2</sub> -Bilanz .....	33
A 3.3.1 Der Kumulierte Energieaufwand (KEA) .....	33
A 3.3.2 Zusammenhang zwischen KEA und CO <sub>2</sub> -Bilanz .....	34
A 4 Material und Methoden .....	36
A 4.1 Landwirtschaftlicher Betrieb .....	36
A 4.2 Milchviehgülle .....	36
A 4.3 Pilot-Biogasanlage .....	37
A 4.3.1 Anlagenbeschreibung .....	37
A 4.3.2 Messtechnik und Datenaufzeichnung an der Pilotanlage .....	42
A 4.3.3 Betriebstagebuch .....	43
A 4.4 Modell-Biogasanlage .....	44
A 4.4.1 Anlagenbeschreibung .....	44
A 4.4.2 Messtechnik und Datenaufzeichnung an der Modellanlage .....	46
A 4.5 Probenahmen und chemische Analytik .....	47
A 4.6 Markierungsexperimente in den liegenden Reaktoren .....	50
A 4.7 Ermittlung von Leistungskennwerten .....	51
A 4.7.1 Datenerhebung und –verarbeitung von den Versuchsanlagen .....	51
A 4.7.2 Beschickung der Anlagen und resultierende hydraulische Verweilzeiten .....	52
A 4.7.3 Berechnung des Abbaugrades und der Leistungskennwerte .....	53
A 4.8 Bewertung von Umweltwirkungen der Pilot-Biogasanlage .....	54
A 4.8.1 Datengrundlage .....	54
A 4.8.2 Erstellung einer Energiebilanz .....	54
A 4.8.3 Erntefaktoren .....	55
A 4.8.4 Primärenergetische Amortisationszeit .....	56
A 4.8.5 CO <sub>2</sub> -Bilanz .....	57
A 4.9 Betrachtung der Wirtschaftlichkeit .....	57
A 5 Bau und Betrieb der Versuchsanlagen .....	58
A 5.1 Baumaßnahmen an der Pilotanlage .....	58
A 5.2 Baumaßnahmen an der Modellanlage .....	59
A 5.3 Betrieb der Versuchsanlagen .....	59
A 6 Ergebnisse und Diskussion .....	61
A 6.1 Einhaltung der Solltemperatur im thermophilen Fermenter .....	61
A 6.2 Temperatur in den mesophilen Fermentern .....	65
A 6.3 Prozessstabilität und Stoffumsatz .....	66
A 6.3.1 Stabilität des anaeroben Abbauprozesses .....	67
A 6.3.2 Stoffumsatz .....	74

---

A 6.4	Biogaszusammensetzung und –produktionsrate .....	79
A 6.5	Lagerung des Gärrestes .....	92
A 6.6	Leistungskennwerte der Versuchsanlagen .....	94
A 6.7	Mindestverweilzeit in den liegenden Fermentern .....	96
A 6.8	Zuverlässigkeit der Pilot-Biogasanlage .....	97
A 6.8.1	Bau und Technik .....	97
A 6.8.2	Messtechnik .....	98
A 6.8.3	Blockheizkraftwerk .....	99
A 6.8.4	Betreuungsaufwand .....	99
A 6.9	Gärrestverwertung .....	100
A 6.9.1	Grundsätzliches .....	100
A 6.9.2	Düngeplanung und Wasserschutz .....	101
A 6.9.3	Mögliche Ätزشäden .....	103
A 6.10	Betrieb der Pilotanlage im ersten Halbjahr 2005 .....	105
A 6.11	Biogasverwertung im Blockheizkraftwerk der Pilot-Biogasanlage .....	105
A 6.12	Abgasmessungen am BHKW .....	106
A 6.13	Energetische Bilanzierung der Pilotbiogasanlage .....	107
A 6.13.1	Kumulierter Energieaufwand für die Herstellung .....	107
A 6.13.2	Kumulierter Energieaufwand für die Nutzung .....	110
A 6.13.3	Kumulierter Energieaufwand für die Entsorgung .....	115
A 6.13.4	KEA der Pilot-Biogasanlage .....	117
A 6.13.5	Maßnahmen zur Reduzierung des KEA .....	118
A 6.13.6	Erntefaktoren der Pilot-Biogasanlage .....	119
A 6.13.7	Einordnung des Erntefaktors .....	120
A 6.13.8	Primärenergetische Amortisationszeit .....	120
A 6.14	CO <sub>2</sub> -Bilanz der Pilotbiogasanlage .....	121
A 6.15	Energetische Bilanzierung einer zentralen BGA .....	124
A 6.16	CO <sub>2</sub> -Bilanz einer zentralen BGA .....	125
A 6.17	Einordnung des KEA, der Erntefaktoren und der CO <sub>2</sub> -Bilanz einer zentralen Biogasanlage .....	127
A 6.18	Wirtschaftliche Bewertung einer zentralen BGA .....	128
A 6.18.1	Einnahmen .....	128
A 6.18.2	Gesamtinvestition .....	129
A 6.18.3	Jährliche Kosten und Unternehmergewinn .....	129
A 6.18.4	Einordnung der wirtschaftlichen Bewertung .....	132
A 7	Literatur .....	133
Anhang 1	Schutzgebiete für Grundwasser .....	140
Anhang 2	Spezifische Primärenergieaufwendungen für Transporte und Erdbewegungen .....	141
Anhang 3	Ergebnisse der chemischen Analysen der Proben von Milchviehgülle .....	142
Anhang 4	Musterformular des Betriebstagebuches der Pilot-Biogasanlage .....	144
Anhang 5	Materialspezifischer KEA und CO <sub>2</sub> -Äquivalente der Herstellung .....	145
Anhang 6	Chronologische Übersicht über den Betrieb der Pilotanlage .....	146
Anhang 7	Chronologische Übersicht über den Betrieb der Modellanlage .....	148
B	Berichtsteil TUM: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen .....	149
	Zusammenfassung Berichtsteil B .....	150
B 1	Einleitung: Hintergrund, Problemstellung und Zielsetzungen .....	154
B 1.1	Hintergrund der Studie .....	154
B 1.2	Problemstellung und Zielsetzungen .....	155
B 1.2.1	Routinebetrieb in der Praxis .....	155

B 1.2.2	Reduktion bakterieller Keimzahlen und geeignete Verfahren .....	155
B 1.2.3	Einsatz von Molekularbiologie, qPCR .....	156
B 1.2.4	Problematik widerstandsfähiger Krankheitserreger .....	157
B 1.2.5	Rückverkeimung im Endlager .....	157
B 1.2.6	Auswirkungen im Boden .....	157
B 1.2.7	Lysimeterstudien, Keimverlagerung in Böden und Lufthygiene .....	158
B 2	Material und Methoden .....	159
B 2.1	Beschreibung der Untersuchungsobjekte .....	159
B 2.1.1	Fermenterketten .....	159
B 2.1.2	Boden-Beprobung .....	161
B 2.2	Probenahme und -vorbehandlung .....	164
B 2.2.1	Vorgrube- Fermenter- und Endlagerproben .....	164
B 2.2.2	Bodenproben .....	164
B 2.3	Mikrobiologische und molekularbiologische (qPCR) Untersuchungen .....	165
B 2.3.1	Untersuchte Parameter .....	165
B 2.3.2	Kultivierungsabhängige Verfahren .....	167
B 2.3.3	Molekularbiologische, (RT)qPCR basierte quantitative Nachweise .....	174
B 3	Ergebnisse und Diskussion .....	179
B 3.1	Pilotanlage Berbling .....	179
B 3.1.1	Fäkalcoliforme (Keimzahlen) und <i>Escherichia coli</i> (DNA) .....	179
B 3.1.2	Coliforme (Keimzahlen) und <i>Enterobacteriaceae</i> (DNA) .....	186
B 3.1.3	Intestinale Enterokokken, Gesamt-Enterokokken, <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>E. faecium</i> .....	192
B 3.1.4	Thermophile <i>Campylobacter</i> .....	197
B 3.1.5	<i>Yersinia enterocolitica</i> .....	198
B 3.1.6	<i>Bacillus cereus</i> -Gruppe .....	199
B 3.1.7	<i>Clostridium perfringens</i> .....	201
B 3.1.8	<i>Cryptosporidium parvum</i> .....	205
B 3.1.9	<i>Giardia duodenalis</i> .....	212
B 3.1.10	Rotaviren .....	212
B 3.1.11	<i>Enterovirus</i> .....	212
B 3.1.12	<i>Norovirus</i> .....	213
B 3.2	Bodenproben .....	213
B 3.2.1	Fäkalcoliforme .....	214
B 3.2.2	Coliforme .....	216
B 3.2.3	Intestinale (und Gesamt-) Enterokokken .....	217
B 3.2.4	<i>Bacillus-cereus</i> (Gruppe) .....	220
B 3.2.5	<i>Clostridium perfringens</i> .....	222
B 4	Übergreifende Diskussion .....	226
B 4.1	Mikrobiologische Methodik .....	226
B 4.2	Hygienisierungsleistung der Berblinger Biogasanlage .....	226
B 4.3	Effekte der Gärrest-Ausbringung im Boden .....	228
B 4.4	Fazit .....	229
B 5	Referenzen .....	232
C	Berichtsteil LfL-Agrarökologie: Lysimeter-, Labor- und Praxisversuche .....	241
C 1	Einleitung .....	242
C 2	Versuchsanstellung / Methoden .....	242
C 2.2	Probenahme der Sickerwässer .....	243
C 2.3	Wasserhygienische Untersuchungen .....	244
C 2.4	Beregnung für Kurzzeitversuche .....	244

---

C 2.5	Radioaktive Markierung.....	245
C 2.6	Bestimmung fäkalcoliformer Keime.....	245
C 2.6.1	Fluorocult®-Methode.....	245
C 2.6.2	Bestimmung von <i>E. coli</i> nach Merck, Art. Nr. 1.13303 .....	246
C 2.7	Zellzahlbestimmungen .....	246
C 2.8	Messungen der radioaktiv markierten Sickerwässer.....	247
C 2.9	Digitale Autoradiographie / Imaging .....	247
C 2.10	Lufthygienische Untersuchungen.....	247
C 3	Ergebnisse und Diskussion.....	249
C 3.1	Langzeitmessungen über ein Jahr .....	249
C 3.2	Kurzzeituntersuchungen / Berechnungen .....	250
C 3.2.1	Berechnungen im Jahr 2003.....	250
C 3.2.2	Berechnungen im Jahr 2004.....	252
C 3.2.3	Lysimeteruntersuchungen mit Radiotracern .....	254
C 3.2.4	Eindringverhalten der C14-markierten <i>E. coli</i> -Gülle in den Boden.....	257
C 3.3	Lufthygienische Untersuchungen.....	259
C 3.3.1	Massenspektrometrischer Vergleich gasförmiger Emissionen im Überstand von Gärrest und Rohgülle .....	259
C 3.3.2	Emission von Ammoniak im Luftraum über Gärrest und Rohgülle .....	262
C 3.3.3	Emission von Ammoniak bei der Ausbringung von Gärrest und Rohgülle... 263	
C 4	Zusammenfassung und Bewertung .....	265
C 5	Literatur.....	269

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über das zu untersuchende Verfahren zur anaeroben Behandlung von Gülle .....	28
Abbildung 2: Mesophil betriebene Fermenter der Pilotanlage, F1 (rechts) und F3 (links), Blick von Westen .....	38
Abbildung 3: Thermophil betriebener Fermenter (F2) der Pilotanlage, Blick von Westen.....	38
Abbildung 4: Innenansicht des thermophilen Fermenters der Pilotanlage mit Paddelrührwerk und Schikane .....	39
Abbildung 5: Technikcontainer II mit zentraler Schaltanlage (Hintergrund) und Förderpumpen für Gülle .....	39
Abbildung 6: Verfahrensfliessbild der Pilot-Biogasanlage (Endlager für Gärrest nicht dargestellt).....	40
Abbildung 7: Aufbau der Modell-Biogasanlage .....	44
Abbildung 8: Foto der Modell-Biogasanlage mit Vorlagebehälter auf dem Außengelände von TUM-SWW .....	46
Abbildung 9: Rechnerischer Anteil des freien Ammoniak-N an $\text{NH}_4\text{-N}$ bei Temperaturen von 38 bzw. 55°C in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	50
Abbildung 10: Übersicht über den Betrieb der Versuchsanlagen .....	60
Abbildung 11: Tauchhülse eines der Temperaturfühler an den Schikanenblechen .....	62
Abbildung 12: Temperaturprofil im F2 bei unterschiedlichen Betriebszuständen (Monatsmittelwerte der kontinuierlichen Temperaturaufzeichnungen).....	63
Abbildung 13: Beispielhafter Temperaturverlauf im F2 bei stündlicher (links) bzw. vierstündlicher Beschickung (rechts) .....	64
Abbildung 14: Temperaturverlauf in den Fermentern der Pilot-Biogasanlage (Tagebuchaufzeichnungen) .....	66
Abbildung 15: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (Summenparameter) in Proben von Fermenterhalten der Pilotanlage .....	69
Abbildung 16: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (Summenparameter) in Proben von Fermenterhalten der Modellanlage .....	70
Abbildung 17: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (C2 bis C5) in Proben aus dem Ablauf des F1 .....	71
Abbildung 18: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (C2 bis C5) in Proben aus dem Modellfermenter 1 .....	72
Abbildung 19: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (C2 bis C5) in Proben aus dem Ablauf des F2 .....	73
Abbildung 20: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (C2 bis C5) in Proben aus dem Ablauf des Modellfermenters 2.....	73
Abbildung 21: Zeitreihe der täglich gemessenen Methan- und Kohlendioxidgehalte im Biogas in der Zuleitung zum BHKW der Pilotanlage in 2004.....	79
Abbildung 22: Zeitreihe der täglich gemessenen Sauerstoff- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas in der Zuleitung zum BHKW der Pilotanlage in 2004 .....	80
Abbildung 23: Messwerte von Einzelmessungen der Biogaszusammensetzung im Gasdom des Fermenters 1 der Pilotanlage.....	81
Abbildung 24: Messwerte von Einzelmessungen des Methangehaltes in den Gasdomen des Fermenters 2 der Pilotanlage.....	82
Abbildung 25: Messwerte von Einzelmessungen der Biogaszusammensetzung im Gasdom des Fermenters 3 der Pilotanlage.....	82

---

Abbildung 26: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF1 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004.....	84
Abbildung 27: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF2/1 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004.....	84
Abbildung 28: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF2/2 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004.....	85
Abbildung 29: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF2/3 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004.....	86
Abbildung 30: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF2/4 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004.....	87
Abbildung 31: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF3 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004.....	87
Abbildung 32: Zeitreihe der achttägigen gleitenden Mittelwerte der täglich in der Pilotanlage verwerteten Biogasmenge und der berechneten täglich verwerteten Methanmenge im Zeitraum 15.10.2003-07.12.2004 .....	89
Abbildung 33: Zeitreihe der achttägigen gleitenden Mittelwerte der täglich in der Pilotanlage verwerteten Biogasmenge und der berechneten täglich verwerteten Methanmenge im Zeitraum 28.04.-07.12.2004 .....	89
Abbildung 34: Verlauf der nominalen erfassten Biogasmenge aus der Modellanlage in 2004/91	
Abbildung 35: Empfohlene Ausbringzeiten und Ammoniummengen (NH <sub>4</sub> -N) an flüssigen organischen Düngern („Güllekalender“).....	102
Abbildung 36: Mittelwerte der Kohlenmonoxid- und Stickoxid-Konzentration im Abgas des Zündstrahlmotors aus Messungen bei unterschiedlichen Betriebszuständen .....	107
Abbildung 37: Massenflussdiagramm für die Herstellung der Pilotbiogasanlage .....	109
Abbildung 38: Energieflussdiagramm für die Herstellung der Pilotbiogasanlage.....	110
Abbildung 39: Gesamtstromerzeugung, Strom als Nebenprodukt des BHKW-Betriebs auf Heizölbasis zu Heizzwecken, Eigenstrombedarf sowie Fremdstrombezug und die daraus resultierende Nettostromerzeugung.....	111
Abbildung 40: Brennstoffbezug des BHKW .....	112
Abbildung 41: Energieflüsse der Pilot-Biogasanlage je Betriebsjahr .....	114
Abbildung 42: Energieaufwendungen für die Herstellung, Nutzung und Entsorgung der Pilotbiogasanlage .....	118
Abbildung 43: Die CO <sub>2</sub> -Bilanz der Pilotbiogasanlage.....	122
Abbildung 44: Die CO <sub>2</sub> -Bilanz der 550-GV Biogasanlage .....	126
Abbildung 45: Aufteilung der jährlichen Kosten der Biogasanlage (inkl. Ausbringung des Gärrestes) .....	130
Abbildung 46: Schema der Biogasanlage Berbling mit Probenahmepunkten .....	159
Abbildung 47: Lageplan der Versuchsflächen für die Bodenbeprobungen .....	162
Abbildung 48: Wiederfindungsraten für <i>Cryptosporidium parvum</i> Oozysten-DNA in Abhängigkeit verschiedener Extraktion .....	175
Abbildung 49: Typische Ansätze für die (RT)qPCR .....	177
Abbildung 50: <i>Escherichia coli</i> (Genome) und Fäkalcoliforme, Pilotanlage Berbling, Monitoring.....	180
Abbildung 51: Fäkalcoliforme im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage .....	181
Abbildung 52: Jahreszeitlicher Gang der Fäkalcoliformen, <i>E. coli</i> -Genome in der Vorgrube der Berblinger Biogasanlage .....	182
Abbildung 53: Fäkalcoliforme, Modellanlage, Monitoring .....	183
Abbildung 54: <i>Escherichia coli</i> (DNA) und Fäkalcoliforme, Chargenversuche, Pilotanlage Berbling.....	184

Abbildung 55: Fäkalcoliforme, Chargenversuche, kumulierte Reduktion, Pilotanlage Berbling	185
Abbildung 56: Fäkalcoliforme, Endlagerversuche	186
Abbildung 57: <i>Enterobacteriaceae</i> (Genome) und Coliforme, Pilotanlage Berbling, Monitoring	187
Abbildung 58: Coliforme im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage	188
Abbildung 59: Coliforme, Modellanlage, Monitoring	188
Abbildung 60: Chargenversuche zu <i>Enterobacteriaceae</i> (DNA) und Coliformen, Pilotanlage Berbling	190
Abbildung 61: Coliforme in den Chargenversuchen, kumulierte Reduktion in der Berblinger Pilotanlage	191
Abbildung 62: Coliforme, Endlagerversuche	191
Abbildung 63: Gesamt- und intestinale Enterokokken sowie <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>E. faecium</i> (qPCR), Pilotanlage Berbling, Monitoring	193
Abbildung 64: Gesamt- und intestinale Enterokokken im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage	194
Abbildung 65: Gesamt- und intestinale Enterokokken sowie <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>E. faecium</i> (qPCR), Pilotanlage Berbling, Chargenversuche	195
Abbildung 66: Gesamt- und intestinale Enterokokken, kumulierte Reduktion in den Chargenversuchen, Berblinger Pilotanlage	196
Abbildung 67: Thermophile <i>Campylobacter</i> und <i>C. jejuni</i> , Monitoring, Pilotanlage Berbling	197
Abbildung 68: <i>Yersinia enterocolitica</i> , Monitoring, Pilotanlage Berbling	199
Abbildung 69: <i>Bacillus cereus</i> -Gruppe, Kultivierung und qPCR, Pilotanlage Berbling, Monitoring	200
Abbildung 70: Prozentualer über differentielles Bead-Beating ermittelter Gehalt an Sporen, <i>Bacillus cereus</i> -Gruppe, Pilotanlage Berbling, Monitoring	201
Abbildung 71: <i>Clostridium perfringens</i> , Monitoring, Pilotanlage Berbling	202
Abbildung 72: Prozentualer über differentielles Bead-Beating ermittelter Gehalt an Sporen, <i>Clostridium perfringens</i> , Pilotanlage Berbling, Monitoring	204
Abbildung 73: <i>Cryptosporidium parvum</i> -DNA, qPCR-Monitoring, Pilotanlage Berbling	205
Abbildung 74: <i>Cryptosporidium parvum</i> , Wasserbadexperimente, Exzystierbarkeit in Abhängigkeit der Expositionszeit bei verschiedenen Temperaturen	206
Abbildung 75: <i>Cryptosporidium parvum</i> , Wasserbadexperimente, Infektiosität in Abhängigkeit der Expositionszeit bei verschiedenen Temperaturen	207
Abbildung 76: Einfluss 1-stündiger Einwirkzeit auf <i>Cryptosporidium parvum</i> Oozysten, Wasserbadexperiment	208
Abbildung 77: <i>Cryptosporidium parvum</i> , Keimträger-Experiment 1, Modellanlage, qPCR, Exzystierbarkeit, Vitalfärbung und Zellkultur-PCR	209
Abbildung 78: <i>Cryptosporidium parvum</i> , Keimträger-Experiment 3, Modellanlage, lichtmikroskopische Zählung, qPCR, Exzystierbarkeit und Zellkultur-Immunoassay	211
Abbildung 79: Bodenproben Berbling, Gehalte an Fäkalcoliformen kumuliert über die analysierten Tiefenstufen	215
Abbildung 80: Bodenproben Berbling, Gehalte an Coliformen kumuliert über die analysierten Tiefenstufen	217
Abbildung 81: Bodenproben Berbling, Gehalte an intestinalen Enterokokken kumuliert über die analysierten Tiefenstufen	219
Abbildung 82: Vertreter der <i>Bacillus cereus</i> -Gruppe in den Böden der Berblinger Standorte und im Lysimeter-Boden	221
Abbildung 83: Bodenproben Berbling, Gehalte an <i>Clostridium perfringens</i> kumuliert über die analysierten Tiefenstufen	223

---

Abbildung 84: Bodenproben Berbling, Lysimeter, Bayerische Wiesenböden, Gehalte an <i>Clostridium perfringens</i> kumuliert über die analysierten Tiefenstufen .....	225
Abbildung 85: Funktionsbild eines Lysimeters .....	243
Abbildung 86: Probensammler in der Lysimeteranlage .....	244
Abbildung 87: Berechnungskammer über einem Grünlandlysimeter.....	245
Abbildung 88: Visualisierung der Anwesenheit von <i>E. coli</i> im UV-Licht entsprechend der Fluorocult®-Methode.....	246
Abbildung 89: Mikroskopische Auszählung von <i>E. coli</i> in einer Neubauer-Kammer und Auswertung am PC.....	247
Abbildung 90: Untersuchungen gasförmiger N-Emissionen aus Roh- und Biogasgülle mit offenen Küvetten .....	248
Abbildung 91: Verlagerung des im Wasser gelösten Tracers Bromid und die Gesamtmenge an Regen- und Beregnungswasser (Gärrest-Düngung; x-Achse: Datum der Probenahme, Y-Achse: mg Bromid pro Liter Wasser bzw. Regenmenge in mm / 10 m <sup>2</sup> ).....	249
Abbildung 92: Beregnungseinrichtung über einem Lysimeter zur Beregnung.....	250
Abbildung 93: Verlagerung des im Wasser gelösten Tracers Lithium mit den Keimen im Gärrest = Biogasgülle (blaue Säulen: Lithiumkonzentration in g/l, braune Säulen: Keimbelastung in halbquantitativer Darstellung. Die Keimbelastung wurde in 3 Stufen im Bereich von <10 und 30 MPN/100 ml unterschieden.....	251
Abbildung 94: Verlagerung des im Wasser gelösten Tracers Lithium mit den Keimen in der Rohgülle (hblaue Säulen: Lithiumkonzentration in g/l, braune Säulen: Keimbelastung in halbquantitativer Darstellung. Es wurde nur Die Keimbelastung wurde in 5 Stufen zwischen <10 und 100 MPN/100 ml unterschieden.....	251
Abbildung 95: Sickerwasseranfall während der ersten 8 Stunden nach Beregnungsbeginn; Gesamtwassermenge: 40 mm Niederschlagsäquivalente.....	253
Abbildung 96: Ausschwemmung von fäkalcoliformen Keimfrachten ( <i>E. coli</i> ) nach der Gülleausbringung als Summenwert von drei Tagen .....	253
Abbildung 97: Radioaktive Frachten von C 14-markierten <i>E. coli</i> Bakterien im Verlauf eines Tages nach Beregnung mit 40 mm Wasser .....	255
Abbildung 98: Radioaktive Frachten von C 14-markierten <i>E. coli</i> Bakterien im Verlauf von drei Tagen nach der Beregnung .....	256
Abbildung 99: Eindringverhalten radioaktiv markierter Gülle in den Lehmboden.....	257
Abbildung 100: Massenspektrum von Umgebungsluft.....	260
Abbildung 101: Massenspektrum des Luftraums über dem Gärrest im Gleichgewicht .....	261
Abbildung 102: Massenspektrum des Luftraums über der Rohgülle im Gleichgewicht. Grüne Pfeile bedeuten rel. Zunahme des Massesignale gegenüber dem Gärrest. Roter Pfeil bedeutet rel. Abnahme des Massesignals gegenüber dem Gärrest.....	261
Abbildung 103: Drei Messreihen zur gasförmigen Emission von Ammoniak aus dem Gärrest .....	263
Abbildung 104: Drei Messreihen zur gasförmigen Emission von Ammoniak aus Rohgülle	264

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die im Rahmen des Forschungsprojektes bearbeiteten Fragestellungen ( <i>kursiv</i> gedruckte Teilbereiche wurden ganz oder teilweise von LfL-Landtechnik bearbeitet).....	29
Tabelle 2: Technische Daten der Pilot-Biogasanlage .....	41
Tabelle 3: Übersicht über Messtechnik und Datenaufzeichnung zur Dokumentation des Betriebes der Pilotanlage.....	42
Tabelle 4: Technische Daten der Modell-Biogasanlage .....	45
Tabelle 5: Übersicht über Messtechnik und Datenaufzeichnung zur Dokumentation des Betriebes der Modellanlage.....	47
Tabelle 6: Parameter, Methoden und Häufigkeit der chemischen Analysen von Proben von Rohgülle, Fermenterinhalt und Gärrest.....	48
Tabelle 7: Mittlere Raumbelastungen der Fermenter der Pilotanlage und der Fermenterkaskade während der Versuchsabschnitte mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung .....	52
Tabelle 8: Mittlere hydraulische Verweilzeiten in den Fermentern der Pilotanlage während der Versuchsabschnitte mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung .....	52
Tabelle 9: Mittlere Raumbelastungen der Fermenter der Modellanlage und der Fermenterkaskade während der Versuchsabschnitte mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung .....	53
Tabelle 10: Mittlere hydraulische Verweilzeiten in den Fermentern der Modellanlage während der Versuchsabschnitte mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung .....	53
Tabelle 11: Gemessene Umgebungstemperatur und Temperaturen (°C) im F2 während verschiedener Betriebszustände (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung) .....	63
Tabelle 12: Mittelwerte ( $\pm$ Standardabweichung) der Fermentertemperaturen (°C) in der Modellanlage.....	64
Tabelle 13: pH-Werte der Substratproben aus den Fermentern der Versuchsanlagen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von 12-35 Proben).....	67
Tabelle 14: Werte der Alkalinität [g CaCO <sub>3</sub> /l] in Substratproben aus den Fermentern der Versuchsanlagen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von 7-35 Proben).....	67
Tabelle 15: NH <sub>4</sub> -N-Gehalte [mg/l] der Substratproben aus den Fermentern der Versuchsanlagen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von 11-35 Proben).....	68
Tabelle 16: Berechnete Konzentration an NH <sub>3</sub> -N [mg/l] in Substratproben aus den Fermentern der Versuchsanlagen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) .....	68
Tabelle 17: Gehalte an flüchtigen Fettsäuren (Summenparameter) [mg/l] in Substratproben aus den Fermentern der Versuchsanlagen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von 8-34 Proben) .....	69
Tabelle 18: Konzentration an FFS in Proben von 2004 aus den einzelnen Abschnitten des Modellfermenters 2 (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	74
Tabelle 19: Trockenmassegehalte [Massen-% der Frischmasse] der Substratproben aus den Versuchsanlagen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von 13-35 Proben).....	75
Tabelle 20: Organische Trockenmassegehalte [g/kg] der Substratproben aus den Versuchsanlagen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von 13-35 Proben).....	75
Tabelle 21: CSB-Gehalte [g/kg] der Substratproben aus den Versuchsanlagen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von 5-26 Proben) .....	75
Tabelle 22: Verhältnis CSB/oTM in Proben von Rohgülle und Fermenterinhalt und Gärrest (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	75

Tabelle 23: Verhältnis CSB/oTM in Proben aus dem Vorlagebehälter und den Fermentern der Modellanlage (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	76
Tabelle 24: Zusammenstellung von Werten der Weender- und vanSoest-Analyse der organischen Trockenmasse von Gülle unterschiedlicher Herkunft (Mittelwerte; Angaben in % der Trockenmasse).....	76
Tabelle 25: Mittlere Abbaugrade der oTM in der Pilot-Biogasanlage und Anteile der einzelnen Fermenter am oTM-Abbau bis zum F3 .....	76
Tabelle 26: Mittlere Abbaugrade der oTM in der Modell-Biogasanlage und Anteile der einzelnen Fermenter am oTM-Abbau .....	77
Tabelle 27: Mittlere Stickstoffgehalte ( $\pm$ Standardabweichung) in Proben von Rohgülle, Fermenterinhalt und Gärrest und Mittelwertvergleich ( $\alpha = 5\%$ ).....	78
Tabelle 28: Gemessene Biogaszusammensetzung im Biogas aus den einzelnen Fermentern und der Gaszufuhrleitung des BHKW der Pilotanlage (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus Messungen in 2003 und 2004) .....	83
Tabelle 29: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der Messwerte des Methangehaltes im Biogas [Vol.-%] aus den Messstellen der Modellanlage im Zeitraum 06-08/2004 bzw. 10-11/2004 .....	88
Tabelle 30: Mittlere Werte ( $\pm$ Standardabweichung) der täglichen Biogas- bzw. Methanproduktion der Pilotanlage über verschiedene Zeiträume in 2004 .....	90
Tabelle 31: Mittlere Biogasproduktionsrate ( $\pm$ Standardabweichung), prozentuale Anteile an der Biogasproduktion und gärraumspezifische Biogasproduktionsrate der einzelnen Fermenter der Modellanlage aus Messungen mit dem Trommelgaszähler im Oktober 2004.....	92
Tabelle 32: Errechnete mittlere Methanproduktionsraten ( $\pm$ Standardfehler) der Modellfermenter und prozentuale Anteile bei vierstündlicher Beschickung.....	92
Tabelle 33: Analysenwerte von Gärrestproben aus dem Endlager (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von 9 Proben aus dem Zeitraum 14.06.2003 bis 28.04.2004) .....	93
Tabelle 34: Zusammensetzung der Trockenmasse der Proben von Gärrest aus dem Lagerbehälter der Pilot-Biogasanlage (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung von 3-8 Proben aus 2004) .....	93
Tabelle 35: Mittlere Leistungskennwerte der Pilot-Biogasanlage .....	94
Tabelle 36: Mittlere Leistungskennwerte der Modell-Biogasanlage .....	95
Tabelle 37: Ausgewählte Literaturdaten für die Methanausbeute bei der Vergärung von Rindergülle.....	95
Tabelle 38: Verzeichnete Störmeldungen der BHKW-Steuerung an der Pilotanlage in 2004	99
Tabelle 39: Veränderungen des TM-Gehaltes und des NH <sub>4</sub> -N-Anteiles am Gesamt-N im Zuge der Methangärung von Milchviehgülle in der Pilot-Biogasanlage Berbling (Mittelwerte) .....	100
Tabelle 40: Zündölanteile des BHKW-Motors im Biogasbetrieb und im Jahresmittel .....	113
Tabelle 41: Prognose der Energieflüsse der Pilotanlage über ein Jahr bzw. über die Laufzeit von 20 Jahren .....	114
Tabelle 42: Primärenergieeinsatz in der Pilotanlage während der Nutzungsphase .....	115
Tabelle 43: KEA für Gebäudeabbruch und Abtransport der Materialien .....	116
Tabelle 44: KEA für thermische Verwertung .....	116
Tabelle 45: Gutschriften für wiederverwertete Materialien.....	117
Tabelle 46: KEA für die Entsorgung.....	117
Tabelle 47: Kumulierter Energieaufwand der Pilot-Biogasanlage .....	117
Tabelle 48: Ermittelte Erntefaktoren der Pilot-Biogasanlage .....	119
Tabelle 49: Primärenergetische Amortisationszeit der Pilot-Biogasanlage.....	121

---

Tabelle 50: Prognose der Energieflüsse der 550 GV-Anlage über ein Jahr bzw. über die Laufzeit von 20 Jahren .....	125
Tabelle 51: Der $KEA_N$ der 550 GV-Anlage .....	125
Tabelle 52: KEAs und Erntefaktoren der 550 GV-Anlage .....	125
Tabelle 53: Jährliche Einnahmen der Biogasanlage .....	128
Tabelle 54: Investitionskosten einer Biogasanlage zur Behandlung der Gülle von 500 GV .....	129
Tabelle 55: Berechnung des Unternehmergewinns .....	131
Tabelle 56: gesicherte minimale Verweilzeit und mittlere hydraulische Verweilzeiten in den Fermentern .....	160
Tabelle 57: Termine der Probenahmen und jeweils letzten Düngung für die Versuchsvarianten mit Lage der Entnahmestellen .....	163
Tabelle 58: Bodenphysikalische und -chemische Kennwerte der obersten (0 - 10 cm) Bodenlage des Lysimeters und der Bayerischen Wiesenstandorte .....	164
Tabelle 59: Untersuchte mikrobiologische und virale Parameter .....	165
Tabelle 60: Bodenkenndaten der verwendeten Lysimeterböden .....	256
Tabelle 61: Durchschnittliche Gaserträge einiger häufig eingesetzter Substrate pro Tonne Frischmasse (Keymer und Schilcher, 1999) .....	259
Tabelle 62: Ammoniakemissionen im Luftraum über Gärrest und Rohgülle .....	263

## Abkürzungsverzeichnis

ABNC	Active but not cultivable, aktiv aber nicht kultivierbar
ADF	Acid detergent fiber („Säure-Detergentien-Faser“)
ADL	Acid detergent lignin („Säure-Detergentien-Lignin“)
AK	Antikörper
ANOVA	One-way analysis of variance, einfaktorische Varianzanalyse
BB	Bead-beating
BcG	<i>Bacillus cereus</i> -Gruppe
BHKW	Blockheizkraftwerk
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indol
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DüV	Dünge-Verordnung
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EL	Endlager (Gärrestlager) der Pilot-Biogasanlage
EIA	Enzym-Immunoassay
EMBL-EBI	European Bioinformatics Institute
6-FAM	6-carboxyfluorescein
FB	Feuchtboden
FCV	Felines Calicivirus
FFS	Flüchtige Fettsäuren
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FM	Frischmasse
F1	Fermenter 1 der Pilot-Biogasanlage
F2	Fermenter 2 (thermophiler Fermenter) der Pilot-Biogasanlage
F3	Fermenter 3 der Pilot-Biogasanlage
GITC	Guanidinium-Isothiocyanat
Gg	Genogruppe
GV	Großvieheinheit
HBSS	Hank's balanced salt solution
IPL	Institut für Parasitologie, Leipzig
K	Kalium
KBE	koloniebildende Einheiten
KEA	Kumulierter Energieaufwand
KuLaP	Kulturlandschaftspflege-Programm
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
LfL-Agrarökologie	Institut für Agrarökologie und Bodenschutz an der LfL
LfL-Landtechnik	Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik an der LfL
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim
mAK	monoklonaler Antikörper
MF1	Fermenter 1 der Modell-Biogasanlage
MF2	Fermenter 2 (thermophiler Fermenter) der Modell-Biogasanlage
MF3	Fermenter 3 der Modell-Biogasanlage
MGRT	Minimal guaranteed retention time, Minimale gesicherte Verweilzeit
MPN	Most probable number, höchst wahrscheinliche (Keim)Zahl
MPN-qPCR	qPCR mit vorgeschalteter (selektiver) Kultivierung und MPN-Auswertung
NDF	Neutral detergent fiber („Neutral-Detergentien-Faser“)
N	Stickstoff

---

NH <sub>4</sub> -N	Ammoniakalischer Stickstoff (Ammonium-N + Ammoniak-N)
TM	Trockenmasse
oTM	organische Trockenmasse
P	Phosphor
PBS	Phosphate-buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pv.	Pathovar
PI	Propidium-Iodid
StMLF	Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten
qPCR	Quantitative Real-Time-PCR, Echtzeit-PCR
ROX	6-carboxyrhodamine X
RT	Reverse Transkription
RTqPCR	Quantitative Real-Time-PCR mit vorgeschalteter Reverser Transkription
sPCA	selektives Preston <i>Campylobacter</i> Anreicherungsmedium
STEC	Shiga-toxinogene <i>Escherichia coli</i>
StMLU	Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen (jetzt StMUGV)
StMUGV	Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz
StwRo	Stadtwerke Rosenheim GmbH & Co. KG
TAMRA	6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine
TB	Trockenboden
TMR	Total mixed ration
TUM-SWW	Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft (vormals Wassergüte- und Abfallwirtschaft) der Technischen Universität München
VB	Vorlagebehälter der Modell-Biogasanlage
VG	Vorgrube der Pilot-Biogasanlage
WZ	Wasserschutzgebiets-Zone





**Biogastechnologie zur umweltverträglichen  
Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung  
in Wasserschutzgebieten**

**A Berichtsteil der LfL-Landtechnik**

Auftraggeber:	Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten Postfach 22 00 12 80535 München
Autoren:	Dipl.-Ing. M.Sc. Mathias Effenberger Dipl.-Ing. (FH) Johannes Bachmaier Dr. agr. Andreas Gronauer
Berichtsabschluss:	Oktober 2006
Berichtsumfang:	122 Seiten

## Zusammenfassung Berichtsteil A

Für bestehende landwirtschaftliche Betriebe mit Tierhaltung, deren Flächen durch die Verschärfung von Ausbringverböten für Wirtschaftsdünger - z. B. im Falle der Neuausweisung oder Vergrößerung von Trinkwasserschutzgebieten - betroffen sind, kann gegebenenfalls die verbliebene Fläche für die Ausbringung der anfallenden Wirtschaftsdünger nicht mehr ausreichen. Eine Region, in der solche Konflikte auftreten, ist das untere Mangfalltal, wo eine Erweiterung des bestehenden Schutzgebietes für die Trinkwasserbrunnen der Stadtwerke Rosenheim GmbH u. Co. KG (StwRo), der Stadtwerke Bad Aibling und der Stadt Kolbermoor mit Gülleausbringverbot in der Schutzzone II notwendig wurde. Die Stadtwerke Rosenheim begannen daraufhin, nach Möglichkeiten zur Vermeidung des Eintrags pathogener Mikroorganismen in das Grundwasser durch eine präventive Behandlung von Wirtschaftsdünger zu suchen. Als vielversprechendstes Verfahren hierfür wurde wegen der positiven Energiebilanz und der Möglichkeit der Erwirtschaftung von Erlösen aus dem Verkauf des produzierten Stromes die Biogastechnologie ausgewählt.

Von der LfL-Landtechnik wurde eine Kaskade von drei Fermentern entworfen, die im mesophilen, thermophilen und mesophilen Temperaturbereich betrieben wurden. Zielsetzung des Forschungsprojektes war es, auch unter praxisorientierten Bedingungen (d. h. im Pilotmaßstab) zu prüfen, ob das gewählte Biogasanlagenkonzept:

- in der Lage ist, einen seuchenhygienisch unbedenklichen Gärrest zu erzeugen, der (z.B. als Ausnahmeregelung) eine Ausbringung als Wirtschaftsdünger in sensiblen Gebieten wie (z.B. bestimmten Bereichen mit besonderen Merkmalen) der Wasserschutzzone II erlauben könnte und
- in der vorgeschlagenen oder einer abgewandelten Form eine Lösung zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung auf der Ebene eines Wasserschutzgebietes bieten könnte.

Das gewählte Verfahren wurde in einer Modell-Biogasanlage (Modellanlage) im halbtechnischen Maßstab sowie im volltechnischen Maßstab und unter den Bedingungen eines für das betroffene Einzugsgebiet typischen Milchproduktionsbetriebes in einer Pilot-Biogasanlage (Pilotanlage) für die Behandlung der Gülle von 100 GV Milchvieh untersucht. Im Pilotmaßstab wurden zusätzlich zur Leistungsfähigkeit des Verfahrens im Hinblick auf die Hygienisierung und die Methanproduktion auch Betrachtungen zur Wirtschaftlichkeit und Energieeffizienz des ausgewählten Verfahrens vorgenommen.

In der Pilot-Biogasanlage durchlief die Gülle nacheinander einen mesophilen, einen thermophilen und wieder einen mesophilen Fermenter, bevor der Gärrest in ein gasdicht abgedecktes Endlager überlief. Die Biogasverwertung erfolgte in einem Blockheizkraftwerk (BHKW) mit Zündstrahlmotor. Das Verfahrensschema der Modellanlage entsprach dem der Pilotanlage, jedoch ohne Endlager. Die Modellanlage wurde während des gesamten Betriebszeitraumes mit Rohgülle von der Pilotanlage beschickt. Die beiden Anlagen wurden zeitweise parallel betrieben, wobei Versuche bei täglich vierundzwanzigmaliger und sechsmaliger Beschickung der Anlagen durchgeführt wurden.

Auf Grundlage des Standes des Wissens wurde eine Temperatur von 55°C im thermophilen Fermenter als Sollwert für die Sicherstellung einer ausreichenden Hygienisierungsleistung festgelegt. Diese Solltemperatur konnte im liegenden, thermophilen Fermenter der Pilotanlage erst nach technischen Nachbesserungen erreicht werden. Eine exakte Einhaltung der

Solltemperatur konnte jedoch auch dann nicht über die gesamte Fermenterlänge und nicht durchgängig sichergestellt werden. Bei sechsmaliger Beschickung am Tag war das Temperaturlängsgefälle im liegenden Fermenter wesentlich geringer als bei vierundzwanzigmaliger Beschickung. Im thermophilen Modellfermenter wurde eine mittlere Temperatur von 54,7 bis 54,9°C durchgängig mit geringen Schwankungen eingehalten. Einflüsse des Beschickungsintervalles auf die Temperaturverteilung im Fermenter wurden hier durch das Heizungssystem praktisch vollständig eliminiert. Die Erhöhung des Temperaturniveaus im thermophilen Fermenter durch technische Nachbesserungen bewirkte eine deutliche Verbesserung der erzielten Keimzahlreduktion. Die dann noch auftretenden Unterschiede zwischen der Temperaturführung des liegenden Fermenters der Pilot- und der Modellanlage beeinflussten hingegen die Reduktion Fäkalcoliformer Keime nicht. Dies deutet darauf hin, dass – in etwa gleiche Verweilzeiten in den liegenden Fermentern vorausgesetzt – die auftretenden Temperaturunterschreitungen in Teilen des F2 in Bezug auf diesen hygienischen Parameter unkritisch waren bzw. durch teilweise Temperaturüberschreitungen kompensiert wurden.

Im ersten, mesophilen Fermenter der Pilotanlage konnte die Zieltemperatur von 38°C mit ausreichender Genauigkeit eingehalten werden. Während im Sommer zeitweise noch Überschusswärme zur Verfügung stand, waren im Winter die Wärmeverluste der Anlage zu groß, um die Temperatur im dritten, mesophilen Fermenter auf 38°C zu halten. Die mesophilen Modellfermenter 1 bzw. 3 wurden im Mittel bei  $38,3 \pm 1^\circ\text{C}$  bzw.  $37,7 \pm 0,5^\circ\text{C}$  betrieben.

Insbesondere im Falle der Pilotanlage war nach dem (Wieder-)Anfahren des Prozesses ein Zeitraum von mehreren Monaten erforderlich, bis sich in Bezug auf die Konzentration an flüchtigen Fettsäuren in den Fermentern 1 und 2 ein stationärer Prozess eingestellt hatte. Auch bei weitgehend stationärem Betrieb war die FFS-Konzentration in den thermophilen Fermentern tendenziell höher als typischerweise für einen einstufigen, thermophilen Prozess zu erwarten, ohne dass eine Instabilität des Abbauprozesses angezeigt wurde. Der pH-Wert lieferte in dem stark gepufferten Substrat Milchviehgülle keinerlei Hinweise auf eine Instabilität des Prozesses. Eine Hemmung des anaeroben Abbaus in der thermophilen Stufe durch  $\text{NH}_3\text{-N}$  konnte nicht nachgewiesen werden.

Im Vergleich der Pilot- und Modellanlage ließ sich kein klarer Unterschied der ermittelten Abbaugrade der organischen Trockenmasse in den Fermenterkaskaden erkennen, obwohl die mittlere hydraulische Verweilzeit in der Modellanlage in den beiden Versuchsabschnitten um ca. 10 bzw. 20 % geringer war als in der Pilotanlage. Unterschiede ergaben sich bei der Abbauleistung der einzelnen Fermenter, wobei in allen Fällen der größte Anteil des Abbaus bereits in der ersten, mesophilen Stufe beobachtet wurde. Bezogen auf den theoretisch abbaubaren Anteil der oTM zeigte die Fermenterkaskade eine Abbaueffizienz von ca. 51 % bei einer relativ langen hydraulischen Verweilzeit von 45 Tagen. Im Gärrestlager der Pilotanlage fand ein weiterer nennenswerter Abbau organischer Substanz statt. Die Zunahme des anorganischen Stickstoffanteils während des anaeroben Abbaus der Rohgülle in der Pilotanlage von ca. 22 % war im Einklang mit entsprechenden Literaturangaben.

Unregelmäßigkeiten in der Beschickung sowie die Entnahme von Gärrest verursachten deutliche Schwankungen der Biogasproduktionsrate in der Pilotanlage. Die etwas höhere Biogasproduktion bei vierstündlicher Beschickung wurde durch den geringeren Methangehalt in etwa ausgeglichen, sodass sich kein signifikanter Unterschied in der Methanproduktion ergab. Die Anteile der einzelnen Fermenter an der Methanproduktion konnten nicht gemessen werden. In der Modellanlage waren die Schwankungen der Biogasproduktionsrate

erwartungsgemäß deutlich geringer als in der Pilotanlage. Etwas mehr als die Hälfte des produzierten Methans stammte hier aus der ersten, mesophilen Stufe.

Der Fortgang des anaeroben Abbauprozesses im unbeheizten Gärrestlager der Pilotanlage war an erhöhten Fettsäurekonzentrationen in Proben des Gärrestes erkennbar. Eine weitere signifikante Erhöhung des anorganischen Stickstoffanteils während der Lagerung im Vergleich zum dritten Fermenter konnte nicht nachgewiesen werden. Das in Batch-Versuchen ermittelte Restmethanpotential des Gärrestes betrug ca. 15 % der in der Pilotanlage erzielten Methanausbeute.

Aus der mesophil-thermophil-mesophilen Vergärung der Milchviehgülle in der Pilotanlage wurde eine relativ hohe Methanausbeute von  $0,24 \text{ m}^3 \cdot (\text{kg oTM})^{-1}$  erzielt, während die spezifische Methanproduktionsrate mit  $0,33\text{-}0,34 \text{ m}^3 \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$  aufgrund der seriellen Anordnung der Fermenter gering war. Dabei wurde die zweite Stufe nicht so hoch belastet, wie dies für einen thermophilen Prozess anzustreben wäre. Es bleibt daher zu untersuchen, ob durch Verzicht auf die mesophile, erste Stufe und einen Betrieb des Systems bei höherer Raumbelastung die Abbaueffizienz gesteigert werden kann. Vorläufige Ergebnisse deuten auf eine deutlich erhöhte Biogasproduktionsrate bei thermophil-thermophil-mesophiler Betriebsweise hin.

In der Modellanlage wurde trotz ca. 10 % kürzerer Verweilzeit praktisch dieselbe Biogasausbeute erzielt wie in der Pilotanlage. Vermutlich kam es durch den Abbauprozess und die Mazerierung der Rohgülle für die Modellanlage zu einer Veränderung der Zusammensetzung der oTM in Richtung einer besseren Abbaubarkeit.

In den liegenden Fermentern wurde in Markierungsexperimenten mit Lithiumchlorid eine mindestens doppelt so hohe Mindestverweilzeit gefunden wie in einem Rührkesselfermenter, wobei die Umstellung auf vierstündliche Beschickung keine Erhöhung der Mindestverweilzeit bewirkte.

Das Heizungssystem der Pilotanlage stieß aufgrund planerischer und technischer Mängel angesichts der geforderten zwei Temperaturniveaus (mesophil und thermophil) an seine Grenzen. Dies konnte durch nachträgliche Umbaumaßnahmen teilweise kompensiert werden. Im ersten mesophilen Fermenter führten Ausfälle des Stabmixers bei gleichzeitigem Heizen wiederholt zum Überschäumen des Fermenterinhalt und zur Verschmutzung des Gasleitungssystems. Die Gründe hierfür konnten nicht abschließend geklärt werden. Abhilfe könnte möglicherweise eine bessere Abstimmung von Heizungs- und Rührtechnik bringen.

Der direkt vor dem Motor installierte Balgengaszähler zeigte bei Vergleichsmessungen eine gute Genauigkeit. Die störungsanfällige Elektronik der BHKW-Steuerung litt vermutlich unter den hohen Temperaturen im BHKW-Container. Hier ist eine separate Temperierung des Schaltschranks oder eine bessere Durchlüftung des BHKW-Raumes vorzusehen.

Die sich aus Sicht der Pflanzenernährung ergebenden Vorteile einer Vergärung der Gülle sind die schnellere Nährstoffwirkung, die höhere Fließfähigkeit, die Verringerung der Geruchsbelastung und die Erhaltung der Humusförderung. Die N-Düngewirkung der Biogasgülle hängt wesentlich stärker von der Vermeidung der gasförmigen Ammoniakverluste ab, als von einer möglicherweise nicht ganz genau bekannten N-Wirkung aus dem Gärrest. Für Biogasgülle können die Ausbringpläne für unvergorene Gülle übernommen werden. Wenn die hygienischen Gefahren durch die Gärrestausrückführung als

niedrig eingestuft werden können, erscheinen aus Sicht der Nitratproblematik zusätzliche Auflagen für die Ausbringung von Gärrest in Wasserschutzgebieten nicht sinnvoll.

Die genauen Ursachen für die beobachteten Ätزشäden nach Ausbringung des unverdünnten Gärrestes auf Grünland konnten nicht geklärt werden. Vermutet wird ein Zusammenhang mit der höheren Mineralstoffkonzentration der Biogasgülle und eine zu bestimmten Zeitpunkten höhere Anfälligkeit der Pflanzen. Als Abhilfemaßnahmen bieten sich die Vermeidung der Ausbringung von Gärrest bei ungünstigen Witterungsbedingungen oder die Verdünnung des Gärrestes an.

Bei der Verwertung des Biogases aus der Pilotanlage im BHKW lag der Zündölanteil wegen des erforderlichen Heizöleinsatzes im Winterhalbjahr im Jahresdurchschnitt bei 25 %. Im reinen Biogasbetrieb betrug der Zündölanteil 16 % bis August 2004, dann reduzierte er sich nach einer Wartung und Neueinstellung des Motors auf 10 %. Einzelmessungen ergaben für das Zündstrahl-BHKW einen elektrischen Wirkungsgrad von knapp 33 %. Im Jahresdurchschnitt betrug der elektrische Wirkungsgrad nur 30 %. Dieser etwas geringere Wert ist vor allem auf den zeitweisen Teillastbetrieb des BHKW zurückzuführen, bei welchem der elektrische Wirkungsgrad verringert ist. Der Teillastbetrieb wurde gewählt, um eine Verlängerung der täglichen Laufzeit des BHKW und damit eine gleichmäßigere Wärmeversorgung der Fermenter zu erzielen. Der thermische Wirkungsgrad des BHKW betrug im Jahresmittel 37 %. Das Blockheizkraftwerk erreichte damit einen Gesamtwirkungsgrad von 67 %.

Als KEA der Pilot-Biogasanlage wurde ein Wert von 3.536 MWh ermittelt, davon 233 MWh (6,6 %) für die Herstellung, 3.347 MWh (94,6 %) für die Nutzung und eine Gutschrift von -44 MWh (1,2 %) für die Entsorgung. Der KEA der Pilotbiogasanlage ist vor allem durch die hohen Aufwendungen an fossiler Betriebsenergie gekennzeichnet. Maßnahmen für einen geringeren Betriebsstoffverbrauch sind ein an die tatsächliche Biogasproduktion angepasstes Blockheizkraftwerk, eine optimierte Fermenterheizung und verbesserte Isolation vor allem des thermophilen Fermenters sowie eine Reduzierung der Rührwerkslaufzeiten auf das absolut Notwendige.

Die bei der Herstellung aufgewendete Energie wurde beim Betrieb der Anlage 4,76 mal wiedergewonnen. (Erntefaktor für die Herstellung). Werden auch der Energieaufwand für Ersatzteile und Entsorgungsaufwendungen bzw. -erlöse mit berücksichtigt, so wird die Energie 5,18-fach wiedergewonnen (Erntefaktor für das Kraftwerk). 31 % der gesamten „investierten“ fossilen Energie werden während des Betriebs und der Entsorgung der Anlage als Nutzenergie frei (Gesamterntefaktor). Eine Erhöhung des Gesamterntefaktors kann vor allem durch eine Erniedrigung des fossilen Energiebedarfs während des Betriebs erreicht werden. Für die Pilotbiogasanlage ergibt sich ein Zeitraum von 1,4 Jahren, bis soviel (primärenergetisch bewertete) Nutzenergie bereitgestellt wurde, wie für die Erstellung der Anlage nötig war (Primärenergetische Amortisationszeit).

Der Vermeidung von Treibhausgasen durch die Bereitstellung von elektrischer Energie und die Lagerung des Gärrestes im abgedeckten Endlager stehen die Errichtung der Biogasanlage, der Methanschluß im Blockheizkraftwerk und der Einsatz von fossilen Betriebsenergien gegenüber. Insgesamt ergibt sich eine positive Bilanz von jährlich 42 t CO<sub>2</sub>-Äquivalenten, die vor allem auch durch eine Erniedrigung des KEA der Nutzung verbessert werden könnte. Für eine 550 GV-Biogasanlage zur Behandlung der Milchviehgülle der gesamten engeren Schutzzone des betrachteten Trinkwassergewinnungsgebietes ergab sich eine positive CO<sub>2</sub>-Bilanz von jährlich 376 t vermiedenen CO<sub>2</sub>-Äquivalenten.

Die 550 GV-Biogasanlage verursacht bei ausschließlicher Behandlung von Milchviehgülle ein jährliches Defizit von 40.600 € (inkl. Ausbringung), was Behandlungskosten in Höhe von 3,69 € pro m<sup>3</sup> Rindergülle entspricht. Bei Umlegung dieser Kosten auf den Trinkwasserpreis, wäre mit einem Anstieg von weniger als einem Prozent des aktuellen Preises zu rechnen.

## A 1 Einführung und Problemstellung

Da viele Infektionen von landwirtschaftlichen Nutztieren mit Beteiligung des Verdauungstraktes verlaufen, stellen die Ausscheidungen der Tiere, die in Form von Stallmist, Jauche und Gülle (sogenannte Wirtschaftsdünger) anfallen, ein ergiebiges Reservoir für die Ausbreitung von Seuchen- und Krankheitserregern dar (STRAUCH, 1996). In den deutschen Bundesländern ist daher die Ausbringung von Wirtschaftsdünger zum Schutz des Trinkwassers vor einer Belastung mit hygienisch bedenklichen Mikroorganismen in der engeren Schutzzone<sup>1</sup> (Zone II) im allgemeinen verboten. In Bayern waren im Jahr 2001 ca. 3,6 % der Landesfläche als Wasserschutzgebiete ausgewiesen, wovon etwas weniger als ein Drittel auf Gebiete der Zone II entfielen (ca. 1,1 % der Landesfläche). Neuere hydrogeologische Untersuchungen gaben hier den Anstoß zu einer geplanten Erweiterung der Wasserschutzgebiete auf 5 % der Landesfläche. Für bestehende landwirtschaftliche Betriebe mit Tierhaltung, deren Flächen durch die Neuausweisung oder Vergrößerung der Trinkwasserschutzgebiete betroffen sind, kann gegebenenfalls die verbliebene Fläche für die Ausbringung der anfallenden Wirtschaftsdünger nicht mehr ausreichen.

Eine Region, in der die oben angedeuteten Konflikte auftreten, ist das untere Mangfalltal. Die Stadtwerke Rosenheim GmbH u. Co. KG (StwRo), die Stadtwerke Bad Aibling und die Stadt Kolbermoor betreiben hier im Gewinnungsgebiet „Willinger Au“ zwölf Trinkwasserbrunnen. Eine Untersuchung der Grundwasserverhältnisse im unteren Mangfalltal auf Basis von hydrogeologischen Modellen ergab, dass für einen ausreichenden Schutz des Trinkwassers eine Erweiterung des bestehenden Schutzgebietes mit Gülleausbringverbot in der Schutzzone II notwendig ist.

Die Stadtwerke Rosenheim begannen daraufhin, nach Möglichkeiten zur Vermeidung des Eintrags pathogener Mikroorganismen in das Grundwasser durch eine präventive Behandlung von Wirtschaftsdünger zu suchen, die eine Alternative zur strikten Durchsetzung des Ausbringverbotes darstellen könnten. In Zusammenarbeit mit der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik (LfL-Landtechnik, vormals Bayerische Landesanstalt für Landtechnik) wurde die Biogastechnologie als vielversprechendstes Verfahren ausgewählt (SCHATTNER-SCHMIDT, 1997).

Die vollständige oder teilweise Abtötung verschiedener Indikatorkeime und pathogener Mikroorganismen in Gülle und anderen Abfallstoffen biologischen Ursprungs (im folgenden als „(teil)hygienisierender Effekt“ bezeichnet) durch eine anaerobe Behandlung wurde in der Vergangenheit wiederholt nachgewiesen (siehe Kapitel 3). Gegenüber anderen Verfahren der teilhygienisierenden Behandlung von Gülle weist diese Technologie eine positive Energiebilanz sowie die Möglichkeit der Erwirtschaftung von Erlösen aus dem Verkauf des produzierten Stromes auf.

Für die Auswahl eines geeigneten Konzeptes für eine Biogasanlage wurde auf Vorarbeiten der Universität Hohenheim und der Technischen Universität München zurückgegriffen. Da für die hygienischen Risiken von Gülle neben Bakterien und Viren auch Parasiten eine Rolle spielen, sollte das ausgewählte Verfahren auch in der Lage sein, vergleichsweise hitzeresistente parasitäre Dauerstadien zuverlässig abzutöten. Es wurde daher von der LfL-

---

<sup>1</sup> Erläuterungen zu Schutzzonen von Wasserschutzgebieten siehe Anhang 1

Landtechnik eine Kaskade von drei Fermentern entworfen, die im mesophilen, thermophilen und mesophilen Temperaturbereich betrieben werden (Abbildung 1).

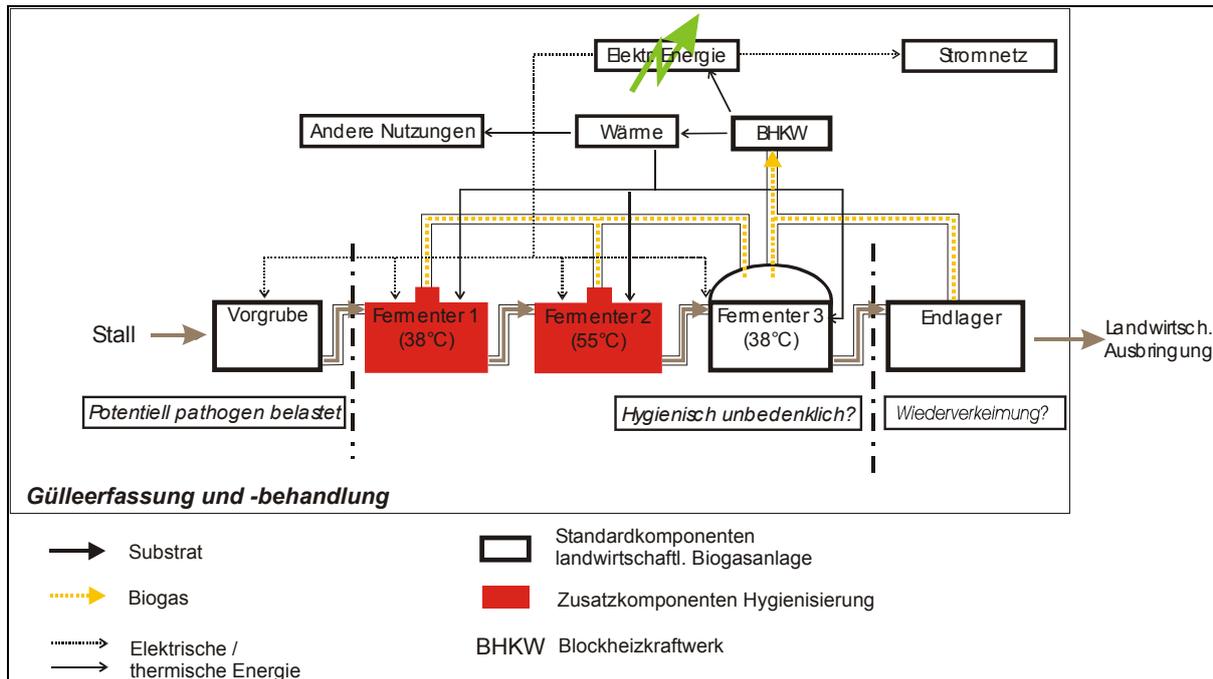


Abbildung 1: Übersicht über das zu untersuchende Verfahren zur anaeroben Behandlung von Gülle

Das breite Spektrum der zu untersuchenden Fragestellungen zu diesem Güllebehandlungsverfahren erforderte eine Kooperation von Fachleuten aus unterschiedlichen Bereichen. Die Umsetzung erfolgte im Rahmen eines Verbundprojektes der Stadtwerke Rosenheim (StwRo), des Instituts für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL-Landtechnik, Projektleitung: Dr. Andreas Gronauer, Förderung durch das StMLF) und des Lehrstuhls für Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München (TUM-SWW, Projektleitung: Prof. Dr. Peter Wilderer, Förderung durch das StMUGV, vormals StMLU).

Die Bearbeitung der verfahrenstechnischen Fragestellungen, d. h. die Bewertung der Leistungsfähigkeit, Wirtschaftlichkeit und Energieeffizienz des ausgewählten Verfahrens oblag der LfL-Landtechnik. Mit der Bewertung des teilhygienisierenden Effektes der anaeroben Behandlung wurde TUM-SWW beauftragt. Die Stadtwerke Rosenheim GmbH & Co. KG als Betreiber der Biogasanlage führten die Ausschreibung und Bauüberwachung durch und koordinierten die Sitzungen des projektbegleitenden Beirates und Fachbeirates sowie die Öffentlichkeitsarbeit.

## A 2 Zielsetzung

Zielsetzung des Forschungsprojektes war es, unter praxisorientierten Bedingungen (d. h. auch im Pilotmaßstab) zu prüfen, ob das gewählte Biogasanlagenkonzept:

- in der Lage ist, einen seuchenhygienisch unbedenklichen Gärrest zu erzeugen, der (z.B. als Ausnahmeregelung) eine Ausbringung als Wirtschaftsdünger in sensiblen Gebieten wie (z.B. bestimmten Bereichen mit besonderen Merkmalen) der Wasserschutzzone II erlauben könnte und
- in der vorgeschlagenen oder einer abgewandelten Form eine Lösung zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung auf der Ebene eines Wasserschutzgebietes bieten könnte.

Die Untersuchungen zur Beantwortung dieser Fragestellungen gliederten sich in unterschiedliche Teilbereiche, die in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst sind. Für die Darstellung der umfangreichen wasserwirtschaftlichen und hygienischen Begleituntersuchungen mit den Teilbereichen mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen sowie Lysimeter-, Labor- und Praxisversuche wird auf die entsprechenden gesonderten Berichtsteile verwiesen (LEBUHN, 2005; HENKELMANN, 2005).

Tabelle 1: Übersicht über die im Rahmen des Forschungsprojektes bearbeiteten Fragestellungen (*kursiv* gedruckte Teilbereiche wurden ganz oder teilweise von LfL-Landtechnik bearbeitet)

<b>Bereich</b>	<b>Teilbereiche</b>	<b>Fragestellungen</b>
Bau und Technik		Zuverlässigkeit der Komponenten
Keimreduktion	<i>Kombination von Temperatur und Verweilzeit</i>	Auswirkung auf die Behandlungsleistung
	Bodenueluate	Keimverlagerungen im Boden
	Methodik des Nachweises	Fortentwicklung der PCR- und Gensondentechnik
Verfahren	<i>Anlieferung/ Vorbehandlung</i>	Effekte einer eventuellen Vorbehandlung
	<i>anaerobe Behandlung</i>	Prozessstabilität, Abbauleistung und Biogasproduktion
	<i>Gasverwertung im BHKW</i>	Wärme- und Stromproduktion Abgasverhalten
	<i>Lagerung</i>	Abbauverhalten (Nährstoffe, Keime)
	<i>Ausbringung</i>	Düngeempfehlung, Gärresthandhabung
Umweltwirkungen		Energiebilanz CO <sub>2</sub> -Bilanz
Wirtschaftlichkeit		Gewinn-Verlust-Rechnung Vergleichbarkeit zur bisherigen Ausgleichszahlungspraxis

## A 3 Stand des Wissens

Auf eine Darstellung der Grundlagen der landwirtschaftlichen Biogastechnik wird hier zur Begrenzung des Berichtsumfanges verzichtet. Ein ausführlicher Überblick und umfangreiche Hinweise auf weiterführende Literatur zu dieser Thematik finden sich beispielsweise in FNR (2004) und BAYERISCHES LANDESAMT FÜR UMWELTSCHUTZ (2004). Im Folgenden werden nur ausgewählte verfahrenstechnische und hygienische Aspekte der Biogastechnologie dargelegt, die für die Beurteilung des gewählten Verfahrenskonzeptes grundlegend sind.

### A 3.1 Hygienisierung durch anaerobe Behandlung

Der Begriff Hygienisierung wird im folgenden nicht im strengen Sinne einer Desinfektion (d. h. Abtötung aller pathogenen Mikroorganismen) sondern in der Bedeutung der teilweisen Entkeimung gebraucht. Generell hängt das Überleben der Mikroorganismen von einer Vielzahl von Faktoren ab, insbesondere der Umgebungstemperatur, der Konkurrenz durch andere Organismen (Antagonismus) und den Eigenschaften der betreffenden Art. Das mehr oder weniger rasche Absterben einer bestimmten Population von Mikroorganismen infolge letaler Einflüsse nimmt im allgemeinen nach dem sogenannten Chick'schen Gesetz einen exponentiellen Verlauf.

Das Überleben von Krankheitserregern in tierischen Fäkalien hängt von deren Handhabung und weiterer Behandlung ab. Für die (teil)entkeimende Behandlung von Wirtschaftsdüngern steht eine Reihe von biologischen, chemischen und physikalischen Verfahren zur Verfügung. Für eine Übersicht siehe z. B. BURTON & TURNER (2003). Wie DOLL et al. (1999) betonen, hätte die Hygienisierung von Gülle in einer Biogasanlage den Vorteil einer großen Energieeinsparung. Während andere Hygienisierungsmethoden, wie etwa die Hitzebehandlung, hohe Energiemengen verbrauchen, stellt die Biogasverwertung elektrische und thermische Energie zur Verfügung.

Wie bei VON STROMBERG (1985) dargestellt, begann man bereits in den 1940er Jahren, sich über die Wirkung der sogenannten Klärschlammfäulung auf seuchenhygienisch relevante Keime Gedanken zu machen. Noch 1980 standen demnach keine konkreten Messergebnisse zur Verfügung, die eine detaillierte Bewertung der hygienisierenden Wirkung der anaeroben Behandlung ermöglichten. In den 80er und 90er Jahren erfolgten dann umfangreiche Studien zur Wirkung der anaeroben Behandlung auf die Keimzahl hygienisch relevanter Mikroorganismen, beginnend vor allem mit Arbeiten zur Klärschlammfäulung (für eine Übersicht siehe CARRINGTON, 2001), dann auch Versuche mit Gülle und Bioabfällen (siehe z. B. KEARNEY et al., 1993; LARSEN & MUNCH, 1990; OLSEN & LARSEN, 1986).

Zusammenfassend haben diese Untersuchungen gezeigt, dass für die Inaktivierung pathogener Organismen durch den Vergärungsprozess bei thermophilen Temperaturen (etwa 50-55°C) die erreichte Prozesstemperatur und die Dauer der Einwirkung maßgebend sind, während im mesophilen Temperaturbereich (etwa 30-42°C) andere mikrobizide Faktoren des Vergärungsprozesses wie der pH-Wert, das Redoxpotential, die NH<sub>3</sub>- und H<sub>2</sub>S-Konzentration, die Konzentration an organischen Säuren und mikrobielle Stoffwechselprodukte in den Vordergrund treten. Die Wirkung der einzelnen letztgenannten Faktoren konnte bisher nicht klar voneinander abgegrenzt werden.

STRAUCH (1998) fasste aus den Ergebnissen von Laborstudien zur Inaktivierung verschiedener Krankheitserreger die Anforderungen an Temperatur und Einwirkungszeit zur

praktisch vollständigen Abtötung verschiedener pathogener Mikroorganismen, in einer Grafik zusammen. Für nicht Sporen bildende Bakterien ergeben sich daraus im mesophilen Temperaturbereich Einwirkungszeiten von mehreren Tagen, bei thermophilen Bedingungen jedoch lediglich von wenigen Stunden.

Für eine effektive Keimzahlreduktion durch einen kontinuierlich betriebenen Vergärungsprozess kommt also nur eine thermophile Verfahrensführung in Frage. Dabei hängt die Effizienz der Keimreduktion – neben der Art des Organismus – davon ab, wie genau die Einwirkung der Solltemperatur (meist 55°C) auf ein zu behandelndes Materialvolumen für eine bestimmte Zeit eingehalten werden kann. In einem kontinuierlichen Verfahren beschreibt die sogenannte hydraulische Verweilzeit die theoretische mittlere Verweilzeit des Substrates im Reaktor (vgl. Kap. 4.6). Ein Reaktor in der Praxis weist jedoch im allgemeinen eine Verweilzeitverteilung auf, d. h. Teilchen, die zur (praktisch) selben Zeit in den Behälter gelangen, verlassen diesen nach unterschiedlichen Zeiträumen wieder. Für die keimzahlreduzierende Wirkung ist dabei die gesicherte Verweilzeit entscheidend, d. h. derjenige Zeitraum, für den ein hinzukommendes Substratteilchen mindestens im Reaktor verbleibt. Die Verweilzeitverteilung kann durch Markierungsexperimente ermittelt werden (LEVENSPIEL, 1962). Voraussetzung für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die seuchenhygienisch relevanten Mikroorganismen ist dabei, dass diese sich hydraulisch so verhalten wie die verwendete Markierungssubstanz.

Im Falle eines Rührkesselreaktors, wie er als dominierender Reaktortyp in Form von stehenden zylindrischen Gärbehältern in der landwirtschaftlichen Biogastechnologie – insbesondere bei Vergärung von Gülle – zu finden ist (EFFENBERGER et al., 2002; WEILAND et al., 2005), kann die Mindestverweilzeit gesichert werden, indem die Substratzufuhr erst nach der Entnahme vergorenen Materials erfolgt, und entspricht dann dem Zeitraum zwischen den einzelnen Entnahme-/Beschickungsvorgängen. Für die Erhöhung der effektiven Verweilzeit gegenüber einem Rührkesselreaktor gibt es verschiedene verfahrenstechnische Möglichkeiten, z. B.:

- die serielle Anordnung zweier (oder mehrerer) Behälter oder
- eine Reaktorgestaltung mit Einbauten, die die Rückvermischung von behandeltem und unbehandeltem Substrat vermeiden.

Die Erfordernisse zur Sicherung der seuchenhygienischen Unbedenklichkeit von behandelten organischen Abfällen werden von BÖHM (2002) ausführlich diskutiert. Diese umfassen:

- die direkte Kontrolle des Produktes,
- die Behandlung nur in validierten Anlagen (direkte Prozessprüfung) und
- die Überwachung der Behandlungsanlagen im Hinblick auf die seuchenhygienisch relevanten Prozessparameter (indirekte Prozessprüfung).

Für die Prozessführung in Vergärungsanlagen stellt die Bioabfallverordnung in Anhang 2 die Anforderung, dass „die Abfallmatrix so behandelt werden [muss], dass eine Mindesttemperatur von 55°C über einen zusammenhängenden Zeitraum von 24 Stunden sowie eine hydraulische Verweilzeit im Reaktor von mindestens 20 Tagen erreicht wird“ (ANON., 1998). Im Rahmen der indirekten Prozessprüfung sind Temperaturmessungen an mindestens drei repräsentativen Stellen in den für die thermische Inaktivierung relevanten Prozessabschnitten vorzunehmen. Für die Überarbeitung des Anhangs 2 der Verordnung ist die Aufnahme von Markierungsexperimenten mit Bakteriensporen und Lithium zur Ermittlung der Mindestverweilzeit im Reaktor vorgesehen (KTBL, 2004).

DOLL (1999) untersuchte die Keimzahlreduktion bei der Vergärung von Milchviehgülle in einer einstufigen, mesophil oder thermophil zu betreibenden Biogasanlage. Der stehende, zylindrische Stahlfermenter war mit einem Absperrschieber in der Überlaufleitung ausgerüstet, um bei einmal täglicher Beschickung eine Mindestverweilzeit von 24 Stunden zu garantieren. Da sich im Tauchrohr des Ablaufes Schaum bildete, konnte dieser Schieber jedoch nicht geschlossen gehalten werden. Dennoch wurde für die Indikatorkeime *E. coli*, Enterobacteriaceae und Fäkalstreptokokken eine vollständige Abtötung erreicht (zu diesen Keimen siehe LEBUHN, 2005).

Während die Inaktivierung von nicht sporenbildenden Bakterien und Viren durch Anaerobbehandlung gut bekannt ist, bestand zu Fragen der Inaktivierung widerstandsfähiger Krankheitserreger wie Dauerstadien bildender Bakterien und Parasiten erheblicher Forschungsbedarf (LEBUHN, 2005). DOLL et al. (1999) leiteten aus Untersuchungen zur aerob-thermophilen Stabilisierung von Gülle die Empfehlung ab, dass für eine sichere Inaktivierung von Kryptosporidien (das sind Dauerstadien bildende protozoische Parasiten) eine Aufwärmphase von mindestens 12 h bei 35-45°C, gefolgt von einer Behandlung bei 50-55°C für mindestens 24 h eingehalten werden sollte. Die Dauerstadien sollten hierbei während der vorgeschalteten mesophilen Phase exzystieren und die freigesetzten, anfälligeren infektiösen Formen dann in der folgenden thermophilen Phase leichter abgetötet werden.

### **A 3.2 Thermophile Vergärung**

Neben der deutlich besseren hygienisierenden Wirkung bietet die thermophile Vergärung weitere Vorteile gegenüber der mesophilen Prozessführung. BUHR & ANDREWS (1977) fassten für die thermophile Vergärung von Klärschlamm zusammen, dass gegenüber dem mesophilen Prozess höhere Reaktionsraten und eine bessere Entwässerbarkeit des behandelten Schlammes erzielt wurde. Demgegenüber stand eine schlechtere Ablaufqualität und eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen.

DOLL (1999) erzielte bei der Vergärung von Milchviehgülle in einer einstufigen Biogasanlage bei thermophiler Prozessführung schlechtere Leistungskennwerte als bei mesophiler Vergärung. Überschreitungen der Solltemperatur von 55°C um mehr als 2-3 K führten zu einer stark verringerten Biogasproduktionsrate und verschlechterten Biogasqualität. Der Autor merkt an, dass es durch Vorlauftemperaturen von 85-95°C möglicherweise zu einer Schädigung der Mikroorganismen an den Heizflächen kam.

AHRING (1994) fand anhand der Daten von vollmaßstäblichen Kofermentationsanlagen keine Unterschiede in der Prozessstabilität zwischen mesophil und thermophil betriebenen Reaktoren. Als optimale Temperatur in Bezug auf die methanbildende Aktivität erschien ein Wert von 60°C, der jedoch sehr genau eingehalten werden musste.

VAREL et al. (1980) stellten in Laborversuchen zur Vergärung von Rindergülle eine erhöhte Methanproduktivität bei Prozesstemperaturen oberhalb 45°C und kurzen Verweilzeiten (< 6 Tage) fest, während der kinetische Vorteil bei 60°C gegenüber 50°C gering war.

MACKIE & BRYANT (1995) ermittelten für die Vergärung von Rindergülle bei 60°C dann eine höhere Energieeffizienz als für die Vergärung bei 40°C, wenn die Fermenter mit hoher Raumbelastung (ab 9 kg oTM\*(m<sup>3</sup>\*d)<sup>-1</sup>) gefahren wurden. Der mesophile Prozess zeigte bei dieser Raumbelastung eine Anreicherung von Propionsäure als Anzeichen einer Überlastung.

CHRIST (1999) erzielte bei der Vergärung von Bioabfällen in einem thermophil-mesophilen Prozess (Verweilzeitenverhältnis ca. 1:3) gegenüber einem einstufigen mesophilen Prozess

eine um 7 % erhöhte Abbauleistung bei im Vergleich zu einem einstufigen thermophilen Prozess verbesserter Ablaufqualität (geringere Fettsäurekonzentrationen) und Entwässerbarkeit der Gärsuspension.

SUNG & SANTHA (2003) erzielten mit einem thermophil-mesophilen System im Labormaßstab bei einer Gesamtraumbelastung mit mazerierter Rindergülle von  $5,82 \text{ kg oTM} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$  eine hohe Methanausbeute von  $0,22 \text{ m}^3 \cdot (\text{kg oTM}_{\text{zugeführt}})^{-1}$ . Die hydraulische Verweilzeit betrug 14 Tage, davon 4 Tage im thermophilen Fermenter, aus dem fast 60 % des Methans gewonnen wurden. Bei der volltechnischen Umsetzung des Verfahrens in einer Biogasanlage zur Behandlung von  $190 \text{ m}^3$  Milchviehgülle täglich konnte jedoch im thermophilen Reaktor kein stabiler Abbauprozess etabliert werden (KATERS & SCHULTZ, 2003).

Auf Grundlage des dargestellten Standes des Wissens wurde für die vorliegenden Untersuchungen eine mesophil-thermophil-mesophile Fermenterkaskade entworfen. Dabei sollte die thermophile Stufe als liegender Fermenter mit Schikanen konstruiert werden, um die Fermenterkaskade in kürzeren Intervallen beschicken zu können und dennoch aus Sicht der Hygienisierung eine ausreichend lange Mindestverweilzeit zu erzielen. Das Verweilzeitverhältnis von thermophiler und nachgeschalteter Stufe wurde dabei mit ca. 1:3 etwas kleiner gewählt als bei SUNG & SANTHA (2003). Die erste mesophile Stufe wies in etwa dieselbe hydraulische Verweilzeit auf, wie die thermophile Stufe. Da im Praxismaßstab die Rohgülle in ihrer Zusammensetzung nicht verändert werden konnte, wäre bei kleinerer Dimensionierung der ersten Stufe die Raumbelastung für einen mesophilen Prozess zu hoch ausgefallen.

### A 3.3 Bewertung des Verfahrens durch Energie- und CO<sub>2</sub>-Bilanz

Die vorliegende Arbeit greift auf die Materialbilanzanalyse als ein vereinfachtes Verfahren zur Bilanzierung der Energie- und Kohlendioxidströme zurück. Bei dieser Art der Analyse werden die Materialmassen erfasst, die für ein Produkt zur Verfügung gestellt oder durch dieses freigesetzt werden (KÖHLER *et al.* 1996). Den Materialströmen können dann Umweltwirkungen zugeordnet werden. Dazu gibt es verschiedene Werkzeuge, eines davon ist die Software GEMIS. Dieses Programm ordnet beispielsweise einer Tonne verbautem Beton, die bei der Herstellung entstehenden Mengen an Emissionen (z.B. Staub, NO<sub>x</sub>, CO<sub>2</sub>...) und den zur Herstellung nötigen Energieaufwand zu. Das Instrument der Materialbilanzanalyse findet breite Anwendung bei der energetischen Bilanzierung von Anlagen zur Energiebereitstellung. Neben grundsätzlichen methodischen Überlegungen (SCHWAIGER 1996) werden verschiedene Kraftwerkstypen für fossile Energieträger, z.B. Steinkohlekraftwerk oder Blockheizkraftwerk (KÖHLER *et al.* 1996), miteinander verglichen. KAYSER *et al.* (1996) wendet die Materialbilanzanalyse an, um die Umweltwirkungen eines Erdwärmesystems mit denen eines klassischen Heizsystems zu vergleichen. In sehr vereinfachter Form werden in GEMIS (2005) über eine Materialbilanzanalyse Umweltwirkungen von Biogasanlagen ermittelt.

#### A 3.3.1 Der Kumulierte Energieaufwand (KEA)

Der Kumulierte Energieaufwand (KEA) wird in der VDI-RICHTLINIE 4600 (1998) beschrieben. Er verfolgt den gleichen Ansatz wie die Ökobilanz. Über den gesamten Lebensweg, von der Rohstoffgewinnung bis zur Entsorgung, sollen sämtliche Energieflüsse, die ein Produkt betreffen, erfasst werden. Es werden nur Energien berücksichtigt, die aus fossilen Quellen stammen.

Die Ermittlung des Kumulierten Energieaufwands stellt in der Praxis meist einen Teilaspekt der Ökobilanzierung und der Materialbilanzanalyse dar (KAYSER *et al.*, 1996 und KÖHLER *et*

*al.*, 1996). Der KEA kann in bestimmten Fällen Anhaltspunkte für eine ökologische Bewertung liefern (UMWELTBUNDESAMT, 1999). JENSEIT *et al.* bestätigt diese Aussage, indem das Treibhauspotential und das Versauerungspotential von Baustoffen mit deren KEA verglichen wird. Für viele Baustoffe besteht demnach ein direkter Zusammenhang zwischen dem Kumulierten Energieaufwand und den verursachten Emissionen an CO<sub>2</sub> und SO<sub>2</sub>. Inwieweit dieser Zusammenhang auch für die Pilotanlage gilt, soll im nächsten Kapitel erörtert werden.

Verschiedene Arbeiten benutzen den KEA als Entscheidungshilfe für Investitionen im Bioabfallbereich. So vergleicht ROTH (1995) den Kumulierten Energieaufwand zweier Bioabfallverwertungssysteme. EGGENMÜLLER (1996) berechnet den KEA einer Bioabfallvergärungsanlage. Für kleine landwirtschaftliche Biogasanlagen ist die Berechnung des KEA nicht verbreitet.

Zunächst wurde eine Materialbilanz der Pilotbiogasanlage erstellt. Diese Materialbilanz wurde mit spezifischen Kumulierten Energieaufwendungen pro t Material bewertet. Welcher Wert als spezifischer KEA zur Anwendung kommt, hat erheblichen Einfluss auf das Ergebnis.

### **A 3.3.2 Zusammenhang zwischen KEA und CO<sub>2</sub>-Bilanz**

Nach MARHEINEKE *et al.* (2000) gibt es zwei Anwendungen des KEA. Die Kenngröße des Kumulierten Energieaufwandes wird einerseits dazu verwendet, um den Verbrauch der endlichen Energieträger Braunkohle, Steinkohle, Erdöl, Erdgas und Uran zu quantifizieren. Andererseits dient der kumulierte Energieaufwand als Indikatorgröße für mögliche Umweltwirkungen. Diesem Vorgehen liegt die Annahme zu Grunde, dass die Höhe der Umweltwirkungen in erster Näherung proportional zur Höhe des Kumulierten Energieaufwandes ist. Inwieweit diese Annahme für Biogasanlagen zutrifft, soll hier kurz erörtert werden.

KALTSCHMITT UND MERTEN (2003) stellen fest, dass CO<sub>2</sub>-Emissionen einer Biogasanlage direkt mit dem Einsatz von fossilen Energieträgern zusammenhängen. CO<sub>2</sub>, das aus der Verbrennung von Biogas stammt, wird nicht bewertet, da es nicht fossilen Ursprungs ist. Einerseits werden fossile Energien zur Herstellung der Baustoffe der Biogasanlage verwendet. Andererseits sind für den Betrieb fossile Energieträger nötig, bei der Pilotbiogasanlage vor allem in Form von Zündöl für den BHKW-Betrieb. Alle diese fossilen Energieträger werden im KEA berücksichtigt. Man kann daher davon ausgehen, dass für den KEA und die CO<sub>2</sub>-Emissionen einer Biogasanlage Richtungssicherheit besteht. Der KEA gilt dann als richtungssicher, wenn die Bewertung anhand des KEA und die Bewertung z.B. anhand des Treibhauspotentials übereinstimmt. Bsp.: KEA ist richtungssicher bezüglich CO<sub>2</sub>-Emissionen, wenn einem doppelt so hohen KEA eine doppelt so hohe CO<sub>2</sub>-Emission zu Grunde liegt (JENSEIT *et al.* 1999).

Die NO<sub>x</sub>- und SO<sub>2</sub>-Emissionen einer Biogasanlage entstehen hauptsächlich während des Betriebs, aus der Verbrennung des Biogases (KALTSCHMITT UND MERTEN 2003). Da der Biogaseinsatz bei der Berechnung des KEA nicht berücksichtigt wird, besteht keine Richtungssicherheit zwischen KEA und emittierten Stickoxiden bzw. Schwefeldioxid. Diese Einschätzung wird auch von NILL *et al.* (2003) vertreten. Bei der Bilanzierung einer landwirtschaftlichen Biogasanlage mit Gas-Otto-Motor-BHKW ergaben sich die gleichen Ergebnisse.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Klimawirksamkeit (verursacht durch CO<sub>2</sub>-Emission) einer Biogasanlage recht gut über den KEA abgebildet wird, die versauernde

Wirkung, verursacht durch  $\text{SO}_2$ - und  $\text{NO}_x$  Emissionen in die Umwelt, lässt sich über den KEA jedoch nicht darstellen. JENSEIT *et al.* (1999) weisen darauf hin, dass der KEA als Indikator-Größe nur anwendbar sei, wenn die zu vergleichenden Anlagen einem ähnlichen Zweck dienen. Konkret bedeutet dies: Anhand des KEA lässt sich die Biogasanlage bezüglich des Treibhauspotentials mit anderen Biogasanlagen und mit anderen Hygienisierungsanlagen vergleichen.

## A 4 Material und Methoden

Um unmittelbar für die Praxis verwertbare Forschungsergebnisse zu erhalten, wurde das gewählte Verfahren im volltechnischen Maßstab in einer Pilot-Biogasanlage (Pilotanlage) und unter den Bedingungen eines für das betroffene Einzugsgebiet typischen landwirtschaftlichen Betriebes untersucht. Um unter verringerten Schwankungen der Versuchsbedingungen arbeiten zu können sowie für spezielle hygienische Untersuchungen, die im Praxismaßstab nicht durchgeführt werden konnten, wurde eine Modell-Biogasanlage (Modellanlage) im halbtechnischen Maßstab gebaut. Die beiden Versuchsanlagen wurden zeitweise parallel betrieben (siehe Kap. 5.3).

### A 4.1 Landwirtschaftlicher Betrieb

Standort der Pilotanlage, Lieferant für die Gülle und Verwerter des Gärrestes war der landwirtschaftliche Betrieb Johann Schweiger in Berbling. Hierbei handelt es sich um eine Teilaussiedlung in Einzellage. Herr Schweiger verfügt über eine Betriebsfläche von 34 ha, davon ca. 30 % absolutes Dauergrünland. Auf ausgewählten Flächen des Betriebes wurden auch die Feldversuche im Rahmen der wasserwirtschaftlichen und hygienischen Begleituntersuchungen durchgeführt (siehe LEBUHN, 2005). Im Kalt-Boxenlaufstall des Hofes werden ganzjährig ca. 55 Milchkühe und ca. 30 Stück Jungvieh gehalten. Die Milchkapazität beträgt 300.000 kg pro Jahr. Verfüttert wird ganzjährig eine „Total mixed ration“ (TMR) aus Grassilage, Heu, Cobs, Getreide und Mineralstoffen.

### A 4.2 Milchviehgülle

Kot und Harn der Milchkühe im Stall des Hofes Schweiger wurden mit automatischen Schiebern in einen quer zum Stall verlaufenden, unterirdischen Kanal gefördert. In diesen Kanal floss auch das gesamte im Stallgebäude anfallende Wasch- und Abwasser. Der tägliche Zufluss an Waschwasser aus dem Stallgebäude betrug nach Auskunft von Herrn Schweiger ca. 0,7 m<sup>3</sup>. Aus dem Kanal wurde die Gülle manuell mit einer Reißmixpumpe in die auf der anderen Stallseite gelegene Vorgrube der Biogasanlage gepumpt. Um die angestrebte Auslastung der Anlage mit 2000 m<sup>3</sup> Gülle pro Jahr (ca. 5,5 m<sup>3</sup> pro Tag) zu erreichen, wurde zusätzlich zum Gülleanfall auf dem Hof Schweiger regelmäßig (Gülle von einem benachbarten Betrieb mit acht Milchkühen zugeführt. Dies war auch insofern erforderlich, als sich herausstellte, dass die Gülle im Kanal unter dem Stall innerhalb von etwa vier Wochen so stark eindickte, dass sie mit der Reißmixpumpe nicht mehr in die Vorgrube gefördert werden konnte. Die zugeführte Gülle vom Nachbarbetrieb, die einen deutlich geringeren Trockensubstanzgehalt aufwies (TM-Gehalt einer Stichprobe: 6,2 %), wurde vom Betriebsleiter etwa alle vier Wochen in einer Menge von ca. 24 m<sup>3</sup> angefahren und der Gülle im Kanal beigemischt, so dass diese wieder pumpfähig wurde. An der Pilotanlage wurden Proben der Rohgülle aus der Leitung von der Vorgrube zum Fermenter 1 entnommen; Proben des Substrates für die Modellanlage wurden während der Abfüllung an der Pilotanlage und aus dem Vorlagebehälter der Modellanlage gewonnen (siehe Kap. 4.5).

Die Ergebnisse der chemischen Analysen der Proben von Rohgülle für das Jahr 2004 sind in den Tabellen in Anhang 3 zusammengefasst. Der mittlere Trockenmassegehalt der Proben von Gülle für die Pilot- bzw. Modell-Biogasanlage betrug 7,8 bzw. 7,4 %, wobei die Unterschiede in der mittleren Zusammensetzung des Rohmaterials für die Pilot- und Modellanlage nicht signifikant waren. Die Gülle enthielt beträchtliche Mengen an mineralischen Bestandteilen (ca. 22 % der Trockenmasse), bei denen es sich hauptsächlich um Sandabrieb vom Stallboden handelte. Im Vergleich mit Literaturangaben (STRAUCH et al.,

1977; SCHULZ, 1991) erscheint der gefundene organische Trockenmasseanteil der Milchviehgülle von ca. 78 % typisch, während der mittlere Trockenmassegehalt eher am unteren Ende des in der Praxis beobachteten Wertebereiches lag.

Die 55 Milchkühe auf dem Hof Schweiger sowie weitere acht Milchkühe auf dem Zulieferhof entsprachen einem Tierbestand von ca. 85 GV. Mit der in 2004 in der Biogasanlage verarbeiteten Güllemenge von 1929,2 m<sup>3</sup> abzüglich eines geschätzten Zuflusses von 1 m<sup>3</sup> Wasser pro Tag ergibt sich ein durchschnittlicher täglicher Gülleanfall von ca. 68 l pro Milchkuh bzw. 50 l pro GV. Der gemittelte Anfall an organischer Trockenmasse errechnet sich zu 5,1 kg pro Milchkuh und Tag. Auch diese Werte liegen innerhalb der für die Praxis typischen Wertebereiche.

### A 4.3 Pilot-Biogasanlage

#### A 4.3.1 Anlagenbeschreibung

In der Pilot-Biogasanlage durchlief die Gülle nacheinander einen mesophilen, einen thermophilen und wieder einen mesophilen Fermenter, bevor der Gärrest in ein gasdicht abgedecktes Endlager überlief. Während die beiden mesophilen Fermenter als Rührkesselreaktoren ausgeführt wurden (Abbildung 2), wurde der thermophile Fermenter als zylindrischer, liegender Reaktor konstruiert und zusätzlich mit drei Schikanen ausgestattet, die die Längsvermischung verringern sollten (Abbildung 3 und Abbildung 4). Damit es in der Anlage nicht zu einer Vermischung von Gülle unterschiedlicher Behandlungsstufen kam, wurde jeder Fermenter mit einer eigenen Pumpe beschickt bzw. entleert. Die Fermenter 1 (F1) und 2 (F2) wurden aktiv beschickt bzw. entleert, aus dem Fermenter 3 (F3) floss die Gülle frei in das Gärrestlager über, so dass insgesamt drei Förderpumpen benötigt wurden (Abbildung 5).



Abbildung 2: Mesophil betriebene Fermenter der Pilotanlage, F1 (rechts) und F3 (links), Blick von Westen



Abbildung 3: Thermophil betriebener Fermenter (F2) der Pilotanlage, Blick von Westen

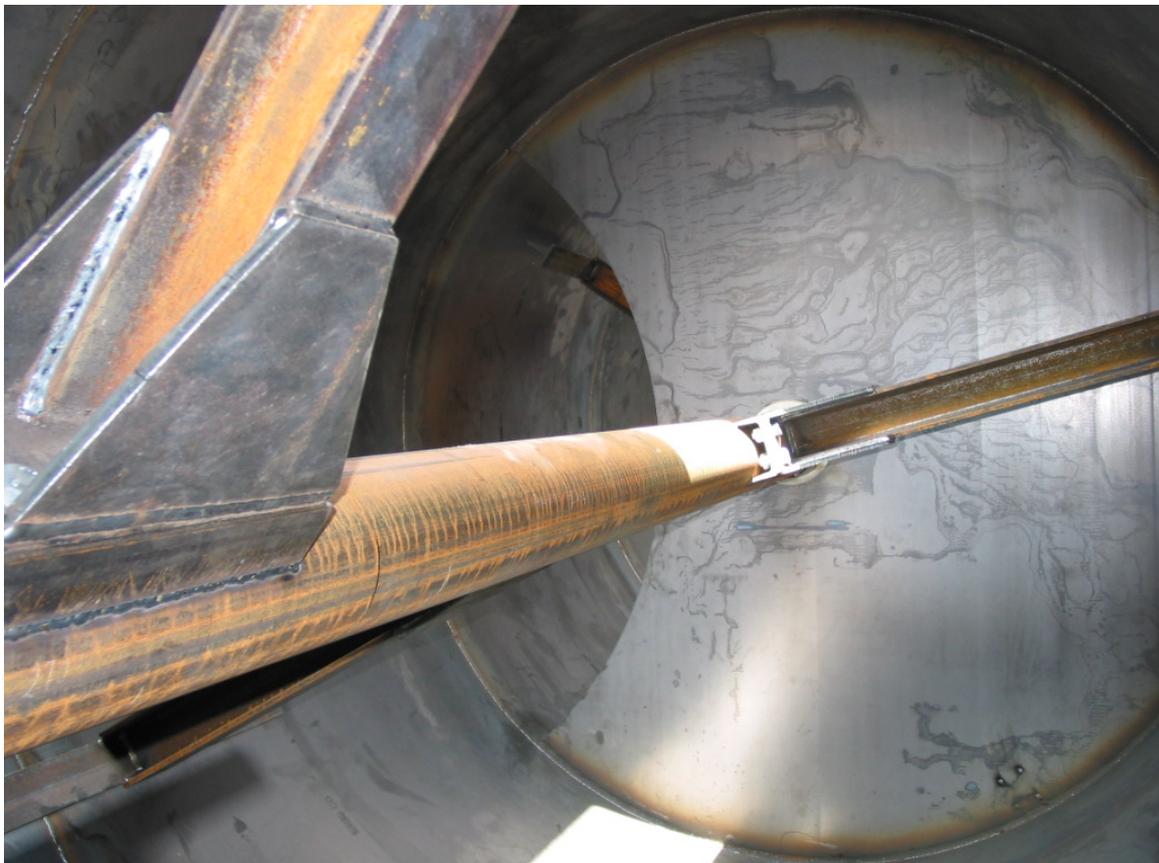


Abbildung 4: Innenansicht des thermophilen Fermenters der Pilotanlage mit Paddelrührwerk und Schikane



Abbildung 5: Technikcontainer II mit zentraler Schaltanlage (Hintergrund) und Förderpumpen für Gülle

Für den Ablauf eines Beschickungsvorganges wurde vorgegeben, dass Entnahme- und Beschickungsvorgang am thermophil betriebenen, liegenden Behälter mit Überschneidung erfolgen konnten, die Zugabe von Rohgülle in den ersten, mesophilen Rührkesselreaktor zur Vermeidung eines Kurzschlussstromes jedoch erst nach Abschluss des Abpumpens in den F2 erfolgen sollte. Dennoch kam es während des Betriebes der Anlage im Falle des F1 immer wieder zu Überschneidungen der Pumpenlaufzeiten.

Das in den Fermentern 1 bis 3 bzw. dem Endlager gebildete Biogas wurde unter der elastischen Folienhaube des Fermenters 3 bzw. der nicht elastischen Folienhaube des Gärrestlagers gesammelt, zusammengeführt und dem Motor des BHKW zugeleitet (Abbildung 6). Zur Verringerung des Schwefelwasserstoffanteils im Biogas wurde in den Gasraum des F1 mit einer Aquariumpumpe ein geringer Luftstrom eingetragen (ca. 7 l/min). Bei diesem sogenannten Verfahren der „biologischen Entschwefelung“ wird der in der Luft enthaltene Sauerstoff von farblosen Schwefelbakterien zur Energiegewinnung durch Oxidation von Sulfid zu elementarem Schwefel bzw. Sulfat verwendet. Die Gasleitungen verliefen streckenweise im Boden, um einen Teil des im Biogas enthaltenen Wasserdampfes abzuschneiden.

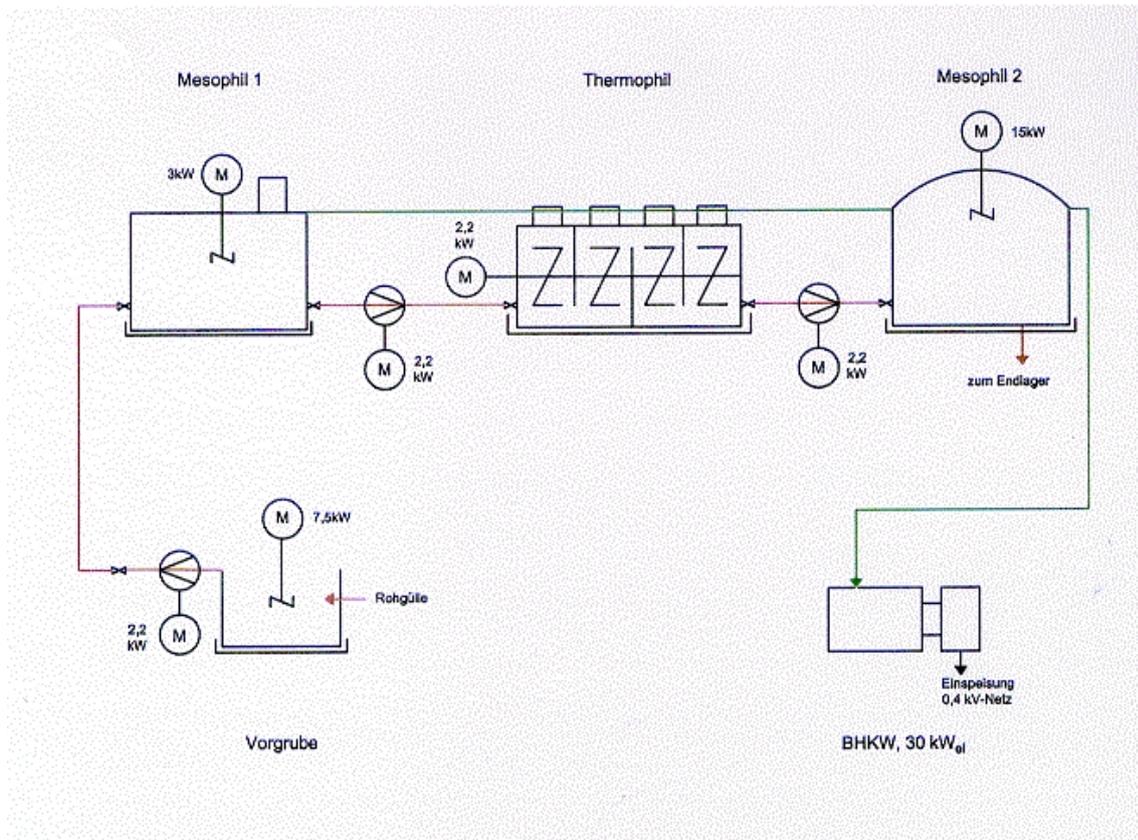


Abbildung 6: Verfahrensfliessbild der Pilot-Biogasanlage (Endlager für Gärrest nicht dargestellt)

Die energetische Verwertung des Biogases erfolgte in einem Zündstrahlmotor, der einen Synchrongenerator antrieb (elektrische Nennleistung: 30 kW). Die erzeugte elektrische Energie wurde vollständig in das öffentliche Stromnetz eingespeist. Die Abwärme des Motors wurde über einen Abgas- und einen Kühlwasser-Wärmetauscher abgenommen und zur Beheizung der Fermenter verwendet. Nicht verwertbare Wärme wurde über einen Notkühler abgegeben. Das BHKW war für die zu erwartende Methanausbeute aus der Milchviehgülle zu groß dimensioniert. Es handelte sich jedoch um das kleinste verfügbare Modul aus der Angebotspalette des Anlagenherstellers.

Einen Überblick über die baulichen Einrichtungen und technischen Daten der Pilot-Biogasanlage gibt Tabelle 2. Im Laufe des Betriebes der Pilotanlage wurden technische Änderungen und Reparaturen am thermophilen Fermenter und am Gülleleitungssystem erforderlich, die im nachfolgenden Kapitel dokumentiert sind.

Tabelle 2: Technische Daten der Pilot-Biogasanlage

Anlagenteil	Lieferant	Beschreibung
Vorgrube (VG)	SCHMACK BIOGAS AG	Untergrundbehälter (teilweise) mit Massivdecke, Ortbeton; d = 4 m, h = 4,5 m, Fassungsvermögen: 56 m <sup>3</sup>
Rührwerk Vorgrube	SUMA	Stabmixer, elektr. Antrieb: 7.5 kW, Umdrehungsgeschw.: 1450 min <sup>-1</sup>
Reißmixpumpe zur Beschickung der Vorgrube aus dem Güllekanal	EISELE	elektr. Antrieb: 15 kW; Förderrate: ca. 40 m <sup>3</sup> /h
Fermenter 1 (F1)	SCHMACK BIOGAS AG	Hochbehälter mit Massivdecke, Ortbeton, außenliegende Wärmedämmung mit Styrodur® ( 7 c m), Blechbeplankung; d = 4 m, h = 4.5 m, Nutzvolumen: 50 m <sup>3</sup>
Rührwerk F1	SUMA	Stabmixer, elektr. Antrieb: 3 kW, Umdrehungsgeschw.: 1450 min <sup>-1</sup>
Fermenter 2 (F2)	SCHMACK BIOGAS AG	Liegender Stahltank, drei eingeschweißte Schikanenbleche (wechselseitig geöffnet); 4 Gasdome; Frontseite mit Rührwerksantrieb, Rückseite mit innenliegendem Gleitlager für Rührwelle; außenliegende Wärmedämmung mit Glaswolle(1)0 Zinkblechverkleidung; d = 2.4 m, l = 12 m, Nutzvolumen: 45,6 m <sup>3</sup>
Rührwerk F2	SCHMACK BIOGAS AG	Paddelrührwerk mit beheizter Rührwelle, elektr. Antrieb: 2.2 kW; Umdrehungsgeschw.: ca 2 min <sup>-1</sup>
Fermenter 3 (F3)	SCHMACK BIOGAS AG	Hochbehälter aus Ortbeton, Holzstützkonstruktion mit Mittelsäule für elastische Gashaube (EPDM), außenliegende Wärmedämmung mit Styrodur® (7cm); Blechbeplankung; d = 7 m, h = 4 m, Nutzvolumen: 150 m <sup>3</sup>
Rührwerk F3	SUMA	Stabmixer, elektr. Antrieb: 11 kW, Umdrehungsgeschw.: 540 min <sup>-1</sup>
Förderpumpen für Gülle und Gärrest	NETZSCH	3 Exzentrerschneckenpumpen; elektr. Antrieb: 2.2 kW, Förderrate: ca. 14 m <sup>3</sup> /h
Gärrestlager		Hochbehälter aus Ortbeton, Holzstützkonstruktion mit Mittelsäule für nicht elastische Gashaube, Blechbeplankung; d = 16 m, h = 4 m, Nutzvolumen: 800 m <sup>3</sup>
Technik- container I: BHKW	SCHMACK BIOGAS AG	Zündstrahl-Motor mit Synchrongenerator (HJS; 30 kW <sub>el</sub> ), Motorsteuerung, Heizungstechnik mit elektr. Heizstab (9kW), Notkühler, Tankanlage, Wärmemengenzähler, Gasanalysator
Technik- container II	SCHMACK BIOGAS AG	zentrale Schaltanlage, Gülleverteilung, Waschtisch und Arbeitsfläche, Datenaufzeichnungsgeräte, Probenaufbewahrung

### A 4.3.2 Messtechnik und Datenaufzeichnung an der Pilotanlage

Die Pilotanlage wurde mit einer über das in der Praxis übliche Maß einer landwirtschaftlichen Biogasanlage hinausgehenden Mess- und Steuerungstechnik ausgestattet (Tabelle 3). Die Daten der zentralen Schaltanlage wurden kontinuierlich auf einem PC aufgezeichnet und von dort in regelmäßigen Abständen zur Weiterverarbeitung per Diskette auf einen Arbeitsplatzrechner der LfL-Landtechnik übertragen. Zusätzlich wurde ein Datenlogger zur Aufzeichnung von Temperatur- und Gasdurchflusswerten betrieben.

Tabelle 3: Übersicht über Messtechnik und Datenaufzeichnung zur Dokumentation des Betriebes der Pilotanlage

Messgröße/ Information	Messtechnik	Aufzeichnung/Messvorgang	
		Logger	Tagebuch
Fermenter- temperaturen	Pt 1000	Ja, kontinuierlich	Ja (Fühler 1-4)
Fermenter- füllstände	Hydrostatische Füllstandsmesser (ENDRESS+HAUSER)	-	Ja
Gülevolumina	magnetisch-induktive Durchflussmesser, saugseitig an allen drei Beschickungspumpen (ENDRESS+HAUSER)	Ja, kontinuierlich	Ja
Schaltvorgänge: Pumpen, Rührwerke	SPS (SCHMACK BIOGAS AG; Bernecker+Rainer)	Ja, kontinuierlich	-
Biogaszusam- mensetzung (Mischgas)	CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> : IR-Sensoren, Zweistrahl- Methode, rel. Messfehler: ± 2 %; H <sub>2</sub> S, O <sub>2</sub> : elektrochemische Sensoren, rel. Messfehler: ± 5 bzw. ± 0.2 % (SCHMACK BIOGAS AG; AWITE)	Ja, mind. täglich	Ja
verwertete Biogasmenge	Balgengaszähler vor dem Motor (ELSTER)	-	Ja
Biogasvolumen- ströme	Differenzdruckmessgeräte (SCHWING)	Ja, kontinuierlich	Nein
zugeführter Luft- strom für Ent- schwefelung	Rotameter (geschätzter rel. Fehler: ± 10 %)	-	Ja, bei Änderungen
BHKW- Betriebszustand	Px-Steuerung (Hans-Jürgen Schnell Anlagenbau; ComAP)	Ja, kontinuierlich	Ja
Zündölverbrauch	Zündölmengensmesser	-	Ja
Wärmemengen	Wärmemengenzähler für Sekundärkreislauf, Fermenter 1 bis 3 und Notkühler (METRONA; ACTARIS)	-	Ja
Strommengen	Zähler für gesamten produzierten, eingespeisten und aus dem Netz bezogenen elektrischen Strom	-	Ja
Außen- temperatur	Min-Max-Thermometer, Außentemperaturfühler vor Ort bzw. an der Agrarmeteorologischen Messstation Karolinenfeld	Ja, Stunden- mittelwerte	Ja, Min-/ Max-Wert
Luftdruck	Barogeber an der Agrarmeteorologischen Messstation Karolinenfeld	Ja, Stunden- mittelwerte	-

Die stehenden Fermenter 1 und 3 waren mit jeweils zwei Temperaturfühlern ausgerüstet. Die Fühler wurden in Tauchhülsen eingeschoben, die ca. 20 cm in den Behälter ragten. Fermenter 2 war anfänglich mit vier Temperaturfühlern versehen, davon einer an der zulaufseitigen Stirnseite (Fühler 1) und drei weitere jeweils an den Schikanenblechen (Fühler 2 bis 4). Ein weiterer Temperaturfühler an der ablaufseitigen Stirnseite stand ab Anfang April 2004 zur Verfügung.

Das an der Anlage installierte Gasanalysegerät (SCHMACK SSM 6000) wurde etwa einmal jährlich kalibriert. Messungen der Biogaszusammensetzung in den einzelnen Fermentern bzw. Gasdomen wurden mit einem alternativen Gasanalysegerät (AWITE Gasanalysator) durchgeführt.

Die messtechnische Aufgabe der Erfassung der Biogasproduktionsrate einzelner Fermenter der Pilotanlage konnte bis zum Ende des Projektes nicht zufriedenstellend gelöst werden. Die Probleme lagen dabei in dem sehr geringen Druckniveau im Gasleitungssystem (max. 2 mbar Überdruck) sowie den durch die Beschickungs- und Entnahmevorgänge ausgelösten Pendelbewegungen bei kurzzeitig stark erhöhten Biogasvolumenströmen.

Im Juni 2003 wurden zunächst drei Fluidistor-Durchflussmesser (Esters Elektronik GmbH) installiert. Bei diesen Messgeräten wird ein Teilgasstrom vor einer Blende in einen Seitenkanal, den sogenannten Fluidistor abgeleitet. Die Schwingungsfrequenz des Gasstromes im Fluidistor wird durch einen Heißdrahtfühler ausgewertet und ist ein Maß für den Volumenstrom. Es wurde jeweils ein Gerät in die Biogasleitung zwischen F1 und F2, zwischen F2 und F3 sowie zwischen Endlager und BHKW eingebaut. Leider erwiesen sich die eingebauten Messgeräte schon bald als ungeeignet. Aufgrund des zu geringen lichten Durchmessers der Blendenöffnung wirkten diese als starke Drossel in der Gasleitung. Bei starker Sonneneinstrahlung und folgender Expansion des Gases im Endlager konnte das Biogas nicht schnell genug über die Pendelleitung in die Gashaube des Fermenters 3 überströmen. Da die Folienabdeckung des Endlagers nicht elastisch ist, bestand die Gefahr des Reißens. Der Gaszähler 3 am Endlager wurde deshalb bereits nach zehn Tagen wieder ausgebaut und es musste auf eine Erfassung der im Gärrestlager gebildeten Biogasmenge verzichtet werden. Beim Entleeren und Füllen des Fermenters 1 kam es aus demselben Grund zu einem Abblasen bzw. Einsaugen von Biogas bzw. Luft. Zudem war die Überdrucksicherung aufgrund der starken Drosselwirkung für die Fermenter 2 und 3 nicht mehr funktionsfähig. Die Durchflussmesser 1 und 2 fielen nach wenigen Wochen Betriebszeit aus und mussten wiederholt gereinigt werden. Im August wurden daher auch diese Geräte wieder ausgebaut. Die vom Hersteller vorgeschlagenen Umrüstmaßnahmen zur Verbesserung der Funktionalität wurden als nicht geeignet erachtet.

Mitte Juni 2004 wurden durch die Stadtwerke Rosenheim GmbH & Co. KG zwei V-Konus-Durchflussmesser (SCHWING Verfahrenstechnik GmbH) in der Biogasstrecke zwischen F1 und F2 bzw. F2 und F3 installiert. Diese Geräte arbeiten nach dem Wirkdruck-Messverfahren, wobei die Druckdifferenz an einem konusförmigen Staukörper ausgewertet wird. Diese Messgeräte sind auch noch bei sehr geringen Differenzdrücken einsetzbar. Die Durchflussmesser schienen zunächst plausible Werte zu liefern, wobei es jedoch insbesondere während der vierstündlichen Beschickung wiederum zu einer Auslösung der Überdrucksicherung kam.

#### **A 4.3.3 Betriebstagebuch**

Neben der automatischen Datenaufzeichnung wurde beginnend im Oktober 2002 über den gesamten Berichtszeitraum vom die Anlage betreuenden Landwirt ein Betriebstagebuch nach

Vorgabe der LfL-Landtechnik geführt (siehe Anhang 4). Diese Aufzeichnungen waren die Grundlage für die Auswertung der Gesamt-Biogasproduktion sowie der Strom-, Wärme- und Zündölmengen und wurden regelmäßig zur weiteren Verarbeitung in eine Excel-Tabelle übertragen.

#### A 4.4 Modell-Biogasanlage

##### A 4.4.1 Anlagenbeschreibung

Das Verfahrensschema der Modellanlage entsprach dem der Pilotanlage, jedoch ohne Endlager und BHKW (Abbildung 7). Alle Komponenten mit Ausnahme des Vorlagebehälters für die Rohgülle waren in einen zwangsbelüfteten Isoliercontainer eingebaut. Der Vorlagebehälter war außerhalb des Containers angeordnet und per Schlauchanschluss mit der Anlage verbunden (Abbildung 8). Tabelle 4 fasst wichtige technische Daten der Modellanlage zusammen.

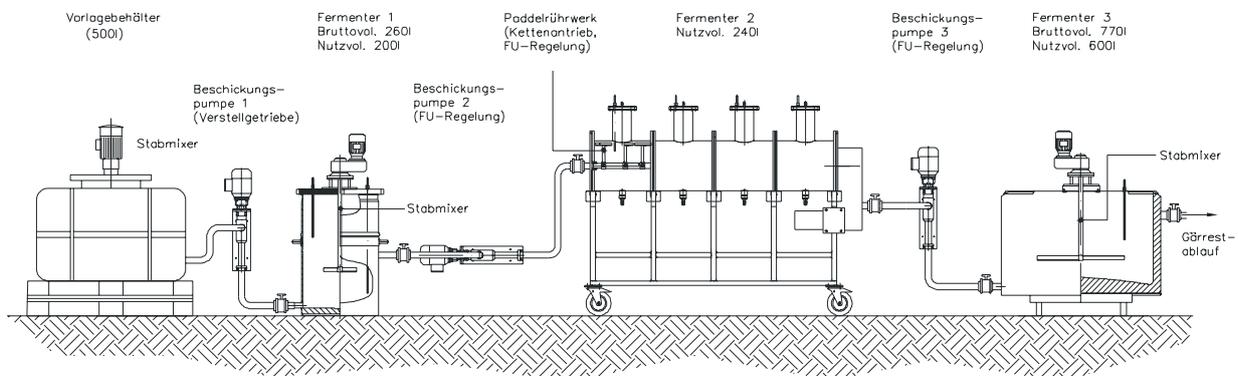


Abbildung 7: Aufbau der Modell-Biogasanlage

Die Modellanlage war mit einer automatischen Steuerung versehen. Mit der technischen Umsetzung der Steuerung der Modellanlage und der Aufzeichnung der Messdaten wurde die Firma AWITE Bioenergie GbR beauftragt. Zum Einsatz kam eine Client-/Server-Architektur. Über die Steuerungssoftware wurden alle Prozessparameter eingegeben und vorgenommene Parameteränderungen dokumentiert. Die Steuerung ermöglichte neben dem automatischen Betrieb der Anlage auch einen manuellen Betrieb einzelner Anlagenteile. Die Einstellungen für den automatischen Betrieb wurden auf Basis von Zeitintervallen mit einer Auflösung von einer Sekunde vorgenommen. Beispielsweise wurde für eine stündliche Beschickung ein Intervall von 3600 s vorgegeben. Durch Vorgabe von Start- und Endzeit (hier zwischen 0 und 3600 s) wurden die einzelnen Prozesse zeitlich aufeinander abgestimmt.

Tabelle 4: Technische Daten der Modell-Biogasanlage

Anlagenteil	Lieferant	Beschreibung
Einhausung	MMS Strobl	Isoliercontainer (Stahl) 6 x 2,50 x 2,50 m
Vorlagebehälter		V = 500 l, mechanisches Rührwerk
Fermenter 1 (MF1)	Gebrauchtkauf (von Privat)	umgebauter Milchbehälter, mechanisches Rührwerk, elektrische Beheizung über Wasserbad; h = 986 mm, d = 635 mm, Bruttovolumen 259 l, Nutzvolumen 200 l
Rührwerk MF1	Turbo Misch- und Rühranlagen	zentral angeordnet, elektr. Antrieb (0,25 kW, 400 V, 50 Hz), Umdrehungsgeschwindigkeit: 145 min <sup>-1</sup> , Propellerdurchmesser: 400 mm
Fermenter 2 (MF2)	Eigenkonstruktion LfL-Landtechnik	zusammengesetzt aus vier identischen Rohrelementen, die über Flansche verschraubt wurden; Schikanenbleche zwischen den Flanschen eingeklemmt; Frontdeckel mit Zulauf und Gleitlager für Rührwelle; Rückseitendeckel mit Ablauf und Rührwellenlager mit Gleitringdichtung; vier aufgeschweißte Stahlrohre als Gasdome; getrennte Erfassung des Biogases aus den vier Abschnitten; elektrische Beheizung mit selbstklebenden Heizmatten (8 x 200 W, 220 V); l = 1.951 mm, d = 400 mm, Nutzvolumen ca. 240 l
Rührwerk MF2	Eigenkonstruktion LfL-Landtechnik	Paddelrührwerk mit Kettenantrieb, elektr. Antrieb (0,75 kW, 400 V, 50 Hz), Umdrehungsgeschwindigkeit FU-gesteuert von 2-30 min <sup>-1</sup>
Fermenter 3 (MF3)	Gebrauchtkauf (Baywa)	umgebauter Milchbehälter, mechanisches Rührwerk, aktive Beschickung, freier Überlauf, elektrische Beheizung über Wasserbad; h=990 mm, d = 1.280 mm, Bruttovolumen 774 l, Nutzvolumen 660 l
Rührwerk MF3	Turbo Misch- und Rühranlagen	zentral angeordnet, elektr. Antrieb (0,75 kW, 400 V, 50 Hz), Umdrehungsgeschwindigkeit: 83 min <sup>-1</sup> , Propellerdurchmesser: 700 mm
Förderpumpen für Substrat	ALLWEILER AG	Exzentrerschneckenpumpen, elektr. Antrieb (0,55 kW, 400 V, 50 Hz), Förderrate: 1,67-10 l*min <sup>-1</sup>



Abbildung 8: Foto der Modell-Biogasanlage mit Vorlagebehälter auf dem Außengelände von TUM-SWW

#### A 4.4.2 Messtechnik und Datenaufzeichnung an der Modellanlage

*Datenaufzeichnung.* Die Aufzeichnung der Daten zu den Fermentertemperaturen, der Biogaszusammensetzung und der Biogasproduktion erfolgte im Zehn-Minuten-Takt auf CompactFlash. Neben dem zentralen Steuerungsrechner (Panel-PC) wurde ein weiterer PC vorgesehen, auf dem die Daten gesichert und verwaltet werden konnten. Über diesen PC wurde auch ein zusätzlicher Datenlogger zur teilweise redundanten Speicherung von Temperaturmesswerten bedient. Außerdem wurden handschriftliche Aufzeichnungen zum Anlagenbetrieb, zu Störfällen und Umbaumaßnahmen gemacht.

*Messung der Biogaszusammensetzung und -produktion.* Die Modellanlage war mit nur einer Gasuhr zur kontinuierlichen Erfassung der gesamten produzierten Biogasmenge aus allen Fermentern ausgerüstet. Zur Messung der Biogasproduktion aus den einzelnen Fermentern bzw. Gasdomen wurde ein Gasbeutel mit Drucksensoren installiert. Die einzelnen Gasleitungen (jeweils eine für MF1 bzw. MF3 und vier für MF2) wurden mittels einer Messgasumschaltung abwechselnd auf diesen Beutel geschaltet und es wurde die Füllzeit gemessen. Gleichzeitig diente der Beutel als Messgasreservoir für das Gasanalysegerät. Die Messgasumschaltung wurde so parametrisiert, dass jede der sechs Messstellen zweimal am Tag für jeweils zwei Stunden aufgeschaltet wurde. Zusätzlich wurde jeweils am Ende des Beobachtungszeitraumes für wenige Tage nur ein Fermenter auf die Gasuhr geschaltet und das Biogas aus den übrigen Fermentern in dieser Zeit ohne Volumenerfassung abgeleitet. Die Ableitung des Biogases in die Atmosphäre erfolgte in einer Höhe von ca. 4 m über dem Boden.

Tabelle 5: Übersicht über Messtechnik und Datenaufzeichnung zur Dokumentation des Betriebes der Modellanlage

Messgröße/ Information	Messtechnik	Aufzeichnung/ Messvorgang
Fermentertemperaturen	Pt 100	kontinuierlich, MF1 und 3 redundant
Über-/Unterschreitung der minimalen bzw. maximalen Fermenterfüllstände	Potentiometrische Füllstandswächter (ENDRESS+HAUSER)	kontinuierlich
Gülle volumina	Erfassung über Laufzeit und Ausliterung der Beschickungspumpen	-
Biogaszusammensetzung	CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> : IR-Sensoren, Zweistrahl-Methode, rel. Messfehler: ± 2 %; H <sub>2</sub> S, O <sub>2</sub> : elektrochemische Sensoren, rel. Messfehler: ± 5 bzw. ± 0.2 % (AWITE Gasanalysator)	kontinuierlich nach Biogasanfall
Gesamt-Biogasmenge	Trommelgaszähler (RITTER) mit Signalgeber (Eigenkonstruktion), Auflösung: 0,2 l	kontinuierlich + Handaufzeichnung
Biogasproduktion aus einzelnen Fermentern / Gasdomen	Messung der Füllzeit eines Beutels (druckgesteuert)	kontinuierlich
Biogastemperatur	Temperaturfühler am Gaszähler	Stundenmittelwerte
Außentemperatur	Außentemperaturfühler	Stundenmittelwerte
Luftdruck	Barogeber an der nächstgelegenen agrarmeteorologischen Messstation	Stundenmittelwerte

*Temperaturmessungen.* Die Temperaturen in den Fermentern wurden mittels Pt 100-Fühlern gemessen, die in Edelstahltauchhülsen in die Fermenter eingebracht wurden. Im Falle von MF1 bzw. MF3 wurden jeweils drei Temperaturfühler vorgesehen, davon zwei für eine redundante Temperaturmessung und einer für die Regelung der Heizung. MF2 war mit jeweils einem Temperaturfühler in jedem der vier Kammern ausgerüstet, der für die Temperaturaufzeichnung und die für jede Kammer getrennte Heizungsregelung herangezogen wurde. Weiterhin erfolgten kontinuierliche Messungen und Aufzeichnungen der Umgebungstemperatur und der Temperatur in der Gasuhr.

*Füllstandsüberwachung.* Eine kontinuierliche Füllstandsmessung in den Fermentern der Modellanlage erfolgte nicht. MF1 und 2 wurden mit Füllstandswächtern versehen, so dass der Füllstand innerhalb eines gewissen Bereiches schwanken konnte. Im Falle des MF2 war der minimale Füllstand so festgelegt, dass der Rohrreaktor stets vollständig gefüllt blieb. Über die Signale der potentiometrische Füllstandswächter wurde gegebenenfalls eine Sperrung der entsprechenden Beschickungspumpe oder – im Falle des MF1 – ein Nachfüllvorgang ausgelöst, um den Füllstand innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen zu halten. MF3 war mit einem Wächter für den maximalen Füllstand versehen.

#### A 4.5 Probenahmen und chemische Analytik

*Pilot-Biogasanlage.* Proben von Rohgülle und Fermenterinhalt wurden über den gesamten Versuchszeitraum in etwa wöchentlich, über kürzere Zeiträume auch täglich entnommen. Zur Bestimmung chemischer Parameter wurden jeweils zwischen 0,5 und 2 Liter Probe in PE-Weithalsflaschen genommen. Proben der Rohgülle und der Gärsuspension in den Fermentern 1 und 2 wurden aus Kunststoffhähnen (1-Zollgewinde) entnommen, die an den Gülleleitungen

auf der Druckseite der Beschickungspumpen angebracht waren. Die Probenahme erfolgte nach Möglichkeit unmittelbar im Anschluss an einen Beschickungsvorgang. Fermenter 3 und das Gärrestlager verfügten über Probenahmehäne in der Behälterwand. Hier erfolgte die Probenahme nach Aufrühren des Behälterinhaltes. Zusätzliche Proben aus den einzelnen Abschnitten des F2 konnten durch die Gasdome entnommen werden, die hierfür mit speziellen Armaturen ausgestattet wurden. Ein eigens von LfL-Landtechnik konstruierter Probenehmer ermöglichte eine tiefenorientierte Entnahme von Fermenterinhalt.

*Modell-Biogasanlage.* Proben von Rohgülle wurden während der Abfüllung an der Pilotanlage und gegebenenfalls mit einem Schöpfer aus dem Vorlagebehälter der Modellanlage gewonnen. Proben von Fermenterinhalt wurden über den gesamten Versuchszeitraum in etwa wöchentlich, über kürzere Zeiträume auch täglich entnommen. MF1 und 3 waren mit je zwei Kunststoff-Probenahmehänen (1-Zollgewinde) in der Behälterwand ausgestattet. Die Probenahme aus MF2 erfolgte aus einem Probenahmehahn in der Entnahmeleitung sowie aus vier Hänen an der Unterseite des Behälters. Am Boden des Fermenters kam es zu Sandablagerungen, was die repräsentative Probenahme aus den Hänen an der Fermenterunterseite sehr erschwerte. Dies zeigte sich daran, dass in den dort entnommenen Proben z. T. unrealistisch hohe TM-Gehalte gefunden wurden.

Mit einem Handmessgerät (EUTECH INSTRUMENTS) wurden vor Ort unmittelbar nach der Probenahme pH-Wert, Temperatur und Leitfähigkeit der Proben bestimmt. Für weitere chemische Analysen wurden die Proben nach Einfrieren (während der warmen Jahreszeit) oder in einem Kühlbehälter (während der kalten Jahreszeit) ins Labor transportiert und bis zur Verarbeitung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Analysen von TM, oTM, pH-Wert,  $\text{NH}_4\text{-N}$  (teilweise), Alkalinität, CSB und flüchtigen Fettsäuren wurden im eigenen Labor der LfL-Landtechnik durchgeführt. Die Bestimmung des TM und oTM-Gehaltes sowie des pH-Wertes erfolgte an allen Proben. Die übrigen Parameter wurden nur für einen Teil der Proben bestimmt. Die im Labor der LfL-Landtechnik verwandten Methoden basierten im wesentlichen auf den Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (ANONYMUS, 1981), die gegebenenfalls modifiziert wurden. Weitergehende chemische Analysen der Trockensubstanz der Proben erfolgte nach Bedarf im Labor der LfL-Abteilung für Qualitäts- und Untersuchungswesen nach den Methoden des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten zur chemischen Untersuchung von Futtermitteln (VDLUFA, 1997). Einen Überblick über Untersuchungsparameter und -methoden gibt Tabelle 6.

Tabelle 6: Parameter, Methoden und Häufigkeit der chemischen Analysen von Proben von Rohgülle, Fermenterinhalt und Gärrest

Parameter	Methode
TM	Trocknung bei $105^{\circ}\text{C}$
oTM	Bestimmung des Glührückstandes ( $550^{\circ}\text{C}$ )
pH-Wert	pH-Meter (Silber-/Silberchlorid-Referenzelektrode; ORION)
$\text{NH}_4\text{-N}$	Messung mit ammoniaksensitiver Elektrode (ORION) nach Zugabe von Natronlauge
Säurekapazität	Säuretitration gegen Methylorange
CSB	Katalytische Oxidation mit schwefelsaurer Dichromatlösung
Flüchtige Fettsäuren gesamt	Wasserdampfdestillation nach Freisetzung mit o-Phosphorsäure, Basentration gegen Phenolphthalein

Parameter	Methode
Flüchtige Fettsäuren, Einzelsubstanzen C1-C5	Gaschromatographische Analyse des Wasserdampfdestillats (Gaschromatograph: Agilent 6890N; Säule: HP FFAP, 25 m, Ø 0,32 mm)
Rohprotein	Berechnung aus Kjeldahl-N: Rohprotein = 6,25*Kjeldahl-N (Annahme eines mittleren N-Gehaltes im Eiweiß von 16 %)
Rohfett (HCl)	Extraktion mit n-Hexan
Rohasche	Bestimmung des Glührückstandes nach Behandlung mit Salzsäure
Rohfaser	Bestimmung des Glühverlustes nach Behandlung der Probe mit kochender Schwefelsäure und Kalilauge
N-freie Extraktstoffe	= oTM - (Rohprotein + Rohfett + Rohfaser)
Stärke	Extraktion enthaltener Zucker mit Ethanol, Verzuckerung der Stärke mit Pankreatin, Hydrolyse mit Salzsäure und Bestimmung der Glucose nach Luff-Schoorl
NDF	Rückstand nach Kochen in neutraler Detergentienlösung
ADF	Rückstand nach Kochen in schwefelsaurer Detergentienlösung
ADL	Rückstand nach Behandlung mit konz. Schwefelsäure
P	Aufschluss mit Schwefelsäure und Salpetersäure, photometrische Bestimmung nach Reaktion mit Vanadatmolybdat
K	Veraschung, Lösung der Asche in Salzsäure und flammenphotometrische Bestimmung
N <sub>ges.</sub>	Bestimmung nach KJELDAHL: Aufschluss mit Schwefelsäure, Destillation und Titration des Ammoniaks

Die Konzentration an freiem Ammoniak wurde aus den ermittelten Werten des ammoniakalischen Stickstoffs nach folgender Formel berechnet (GALLERT & WINTER, 1997):

$$NH_3 - N = \frac{NH_4 - N}{\left(\frac{K_b}{K_w} * 10^{pH} + 1\right)}$$

$$\text{mit } K_b / K_w = e^{(6344/(273+T))} .$$

Zur Vereinfachung der Berechnung wurde für  $T$  die Solltemperatur des jeweiligen Fermenters eingesetzt (F1 und 3: 38°C; F2: 55°C), sofern die aktuelle Fermentertemperatur nicht zu stark von dieser abwich. Soweit verfügbar, wurden für die Berechnung die vor Ort gemessenen pH-Werte verwendet, da diese für die tatsächlichen Konzentrationsverhältnisse im Fermenter repräsentativer sein sollten. Abbildung 9 zeigt den Verlauf des Dissoziationsgleichgewichtes von Ammonium- und Ammoniak-N bei den oben genannten Temperaturen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

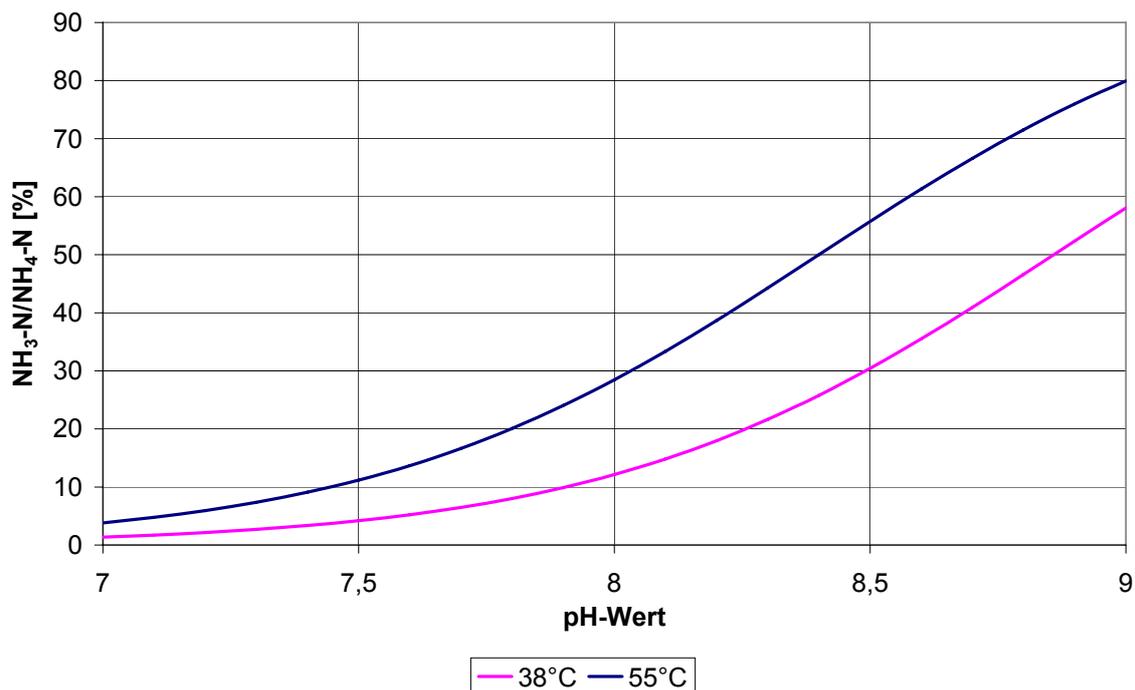


Abbildung 9: Rechnerischer Anteil des freien Ammoniak-N an NH<sub>4</sub>-N bei Temperaturen von 38 bzw. 55°C in Abhängigkeit vom pH-Wert

#### A 4.6 Markierungsexperimente in den liegenden Reaktoren

Um zu überprüfen, ob die Ausführung des thermophilen Fermenters als liegender Behälter mit Prallwänden und Paddelrührwerk im Vergleich zu einem herkömmlichen, stehenden Rührkesselfermenter eine Erhöhung der Mindestverweilzeit gewährleisten würde, wurden im F2 und MF2 jeweils zwei Markierungsexperimente durchgeführt. Als Markierungssubstanz wurde Lithium in Form von Lithiumchlorid (LiCl) verwendet. LiCl ist in Wasser leicht löslich (820 g/l). Die Verwendung von LiCl als chemischer Tracer zur Ermittlung der Mindestverweilzeit in einem Fermenter wurde auch für die Überarbeitung des Anhangs 2 der Bioabfallverordnung vorgeschlagen (KTBL, 2004). Als Mindestverweilzeit wird die Zeitspanne nach Zugabe der Markierungssubstanz angegeben, nach der der Tracer erstmals im Ablauf des Fermenters nachgewiesen werden kann. Aus dem zeitlichen Verlauf der Konzentration der Markierungssubstanz im Ablauf wurde zudem ein Wert für die mittlere Verweilzeit ermittelt. Der Vergleich dieses Wertes mit der rechnerischen hydraulischen Verweilzeit erlaubt eine Aussage über die Vollständigkeit der Durchmischung im Behälter.

Zur Ermittlung der Mindestverweilzeit im liegenden Fermenter wurde eine bekannte Menge an LiCl in ein zuvor der Anlage entnommenes entsprechendes Volumen an Gärsuspension eingerührt. Die mit Lithium markierte Gärsuspension wurde dann im Zuge eines Beschickungsvorganges in den Fermenter eingebracht. Für die Auswertung wurde angenommen, dass die Markierungssubstanz auf diese Weise näherungsweise auf einen Stoß in den Gärraum gelangte (sogenannter Dirac-Stoß). Im Falle der Modellanlage wurden ca. 60 g LiCl in 1 l Gärsuspension gelöst, im Falle der Pilotanlage wurden mehr als 6 kg der Markierungssubstanz eingesetzt. Die daraus resultierenden theoretischen Li-Konzentrationen (Annahme: vollständige Durchmischung des Gärtraumes) errechneten sich zu 22-40 mg/l (3,2-5,8 mmol/l).

Nach Zugabe der Markierungssubstanz wurde der Fermenterablauf während der ersten 24 Stunden nach Möglichkeit nach jedem/jedem zweiten Beschickungsvorgang beprobt, danach mindestens einmal täglich bis zum Ablauf von drei bis vier hydraulischen Verweilzeiten. Der Nachweis von Li erfolgte aus getrockneten Proben, da sich der Aufschluss der flüssigen Gülleproben als nicht praktikabel erwies. Ein Aliquot des gemahlene Trockenrückstandes wurde mit konzentrierter Salpetersäure Mikrowellen-gestützt aufgeschlossen. Die Reaktionslösung wurde durch einen Blaubandfilter filtriert und mit Al-Cs-Puffer sowie Netzmittellösung versetzt. Die Bestimmung von Li erfolgte mit einer Standardadditionsmethode in einem Flammen-Atomabsorptionsspektrometer (ELEX 6361). Die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze lag bei 0,14 bis 0,41 bzw. 0,28 bis 0,81 mmol Li/l.

#### **A 4.7 Ermittlung von Leistungskennwerten**

Auf Basis der Messdaten und chemischen Analysen wurden Abbaugrade der organischen Substanz der Milchviehgülle und Leistungskennwerte der Versuchsanlagen ermittelt.

##### **A 4.7.1 Datenerhebung und –verarbeitung von den Versuchsanlagen**

*Pilotanlage.* Grundlage für die Ermittlung der Biogasproduktion der Pilotanlage waren die Tagebuchaufzeichnungen zur täglich verwerteten Menge an Biogas. Aufgrund variierender täglicher Laufzeiten des BHKW entsprach diese Menge nicht der tatsächlichen Biogasproduktion eines Tages. Für die Berechnung durchschnittlicher Leistungskennwerte wurde daher die gesamte Menge an Biogas, die während eines bestimmten Zeitraumes verwertet wurde, mit der in diesem Zeitraum der Pilotanlage zugeführten Menge an Substrat in Beziehung gesetzt. Die gemessene Biogasmenge wurde um die geschätzte zum Zwecke der Entschwefelung zugeführte Luftmenge bereinigt, um den Feuchtegehalt bei 8°C (angenommene mittlere Temperatur in der Bodenpassage) reduziert und auf Basis von Tagesmittelwerten der Biogastemperatur und des Luftdruckes normiert. Die Abschätzung der Substratmenge erfolgte auf Basis der chemischen Analysen der mindestens wöchentlich entnommenen Proben. Dabei wurde angenommen, dass in der Vorgrube kein nennenswerter Abbau der oTM erfolgte. Grundlage für die Berechnung des oTM-Abbaus in den einzelnen Fermentern waren die zu- und abgeführten oTM-Frachten während des jeweiligen Versuchsabschnittes.

*Modellanlage.* In der Modellanlage erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung der gesamten produzierten Biogasmenge im Zehn-Minuten-Takt sowie eine handschriftliche Aufzeichnung des Zählerstandes des Trommelgaszählers bei jedem Anlagenbesuch. Wie sich bei der Auswertung der Daten zeigte, wurden aufgrund eines Elektronikfehlers zu große Biogasmengen aufgezeichnet. Der Fehler war zunächst nicht aufgefallen und schien sich gegen Ende des Versuchsabschnittes vergrößert zu haben. Um die Daten zur Biogasproduktion dennoch verwenden zu können, wurden durch Vergleich mit den handschriftlichen Aufzeichnungen Korrekturfaktoren berechnet. Mit den interpolierten Korrekturfaktoren wurden dann korrigierte 10-Minuten-Werte der erfassten Biogasmenge berechnet. Die korrigierten Werte wurden dann auf Stundenwerte umgerechnet, um den Feuchtegehalt reduziert und auf Basis von Stundenmittelwerten der Biogastemperatur und des Luftdruckes normiert. Die Berechnung durchschnittlicher Leistungskennwerte erfolgte analog dem Vorgehen für die Pilotanlage. Da der Vorlagebehälter stärker der Witterung ausgesetzt war, wurde in diesem Fall für die Ermittlung der oTM-Fracht ein aus häufigeren Probenahmen abgeschätzter mittlerer oTM-Abbau veranschlagt.

### A 4.7.2 Beschickung der Anlagen und resultierende hydraulische Verweilzeiten

Für die Ermittlung der Leistungskennwerte bei stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung wurde die Anlage mit durchschnittlich 5,5 bzw. 5,7 m<sup>3</sup> Gülle pro Tag beschickt (siehe auch Anhang 6). Für die mittlere Raumbelastung der Pilot-Biogasanlage bezogen auf das summierte Gärraumvolumen der Fermenter 1 bis 3 (ohne Gärrestlager) ergaben sich Werte von 1,36 bzw. 1,49 kg oTM\*(m<sup>3</sup>\*d)<sup>-1</sup> während der ausgewerteten Zeiträume mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung (Tabelle 7). Die resultierenden hydraulischen Verweilzeiten in den Fermentern 1 bis 3, errechnet als Quotient des aktiven Fermentervolumens und der täglichen Beschickungsmenge, betragen bei stündlicher Beschickung im Mittel 9,3, 8,4 bzw. 27,2 Tage (Tabelle 8). Die mittlere hydraulische Verweilzeit in der Fermenterkaskade betrug also ca. 45 Tage. Für den Versuchsabschnitt mit vierstündlicher Beschickung ergaben sich praktisch identische Werte. Der Verweilzeitanteil der thermophilen Stufe lag im Mittel bei ca. 18 %.

Tabelle 7: Mittlere Raumbelastungen der Fermenter der Pilotanlage und der Fermenterkaskade während der Versuchsabschnitte mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung

Beschickungsintervall		1 h	4 h
Fermenter 1	kg oTM*(m <sup>3</sup> *d) <sup>-1</sup>	6,95	6,81
Fermenter 2	kg oTM*(m <sup>3</sup> *d) <sup>-1</sup>	5,89	6,21
Fermenter 3	kg oTM*(m <sup>3</sup> *d) <sup>-1</sup>	1,68	1,74
Kette	kg oTM*(m <sup>3</sup> *d) <sup>-1</sup>	1,37	1,49

Tabelle 8: Mittlere hydraulische Verweilzeiten in den Fermentern der Pilotanlage während der Versuchsabschnitte mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung

Beschickungsintervall		1 h	4 h
Fermenter 1	Tage	9,3	9,1
Fermenter 2	Tage	8,4	8,4
Fermenter 3	Tage	27,7	27,6
Kette	Tage	45,4	45,1

Bei Vorgabe eines Beschickungsintervalles von einer Stunde führte die SPS der Pilotanlage 21 Beschickungsvorgänge pro Tag durch; zwischen ca. 22 und 1 Uhr fand dabei keine Beschickung statt. Bei Vorgabe eines Beschickungsintervalles von vier Stunden erfolgten abwechselnd fünf bzw. sechs Beschickungsvorgänge pro Tag, so dass die tägliche Beschickungsmenge jeweils um bis zu 20 % schwankte.

Für die Ermittlung der Leistungskennwerte der Modellanlage bei stündlicher Beschickung wurde die Anlage mit täglich 24,5 bis 26,5 l Gülle in 24 Teilmengen beschickt (siehe auch Anhang 7). Für die mittlere Raumbelastung bezogen auf das summierte Gärraumvolumen der Fermenter 1 bis 3 ergaben sich ein Wert von 1,43 kg oTM\*(m<sup>3</sup>\*d)<sup>-1</sup> (Tabelle 9). Die mittleren hydraulischen Verweilzeiten in den Modellfermentern 1 bis 3 errechneten sich zu 8,1, 9,6 bzw. 23,4 Tage (Tabelle 10). Die mittlere hydraulische Verweilzeit in der Fermenterkaskade betrug demnach ca. 41 Tage. Während des Versuchsabschnittes mit vierstündlicher Beschickung wurden der Anlage täglich 28,6 bis 29,1 l Gülle in 6 Teilmengen zugeführt; die mittlere Raumbelastung des Systems betrug 1,60 kg oTM\*(m<sup>3</sup>\*d)<sup>-1</sup> (Tabelle 9). Die mittleren hydraulischen Verweilzeiten in den Modellfermentern 1 bis 3 lagen bei 7,5, 8,4 bzw. 20,8 Tagen (Tabelle 10). Die mittlere hydraulische Verweilzeit in der Fermenterkaskade betrug demnach ca. 37 Tage. Der Verweilzeitanteil der thermophilen Stufe lag in der Modellanlage im Mittel bei ca. 23 %.

Tabelle 9: Mittlere Raumbelastungen der Fermenter der Modellanlage und der Fermenterkaskade während der Versuchsabschnitte mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung

Beschickungsintervall		1 h	4 h
Modellfermenter 1	kg oTM*(m <sup>3</sup> *d) <sup>-1</sup>	7,32	7,81
Modellfermenter 2	kg oTM*(m <sup>3</sup> *d) <sup>-1</sup>	5,27	5,95
Modellfermenter 3	kg oTM*(m <sup>3</sup> *d) <sup>-1</sup>	1,93	2,16
Kette	kg oTM*(m <sup>3</sup> *d) <sup>-1</sup>	1,43	1,60

Tabelle 10: Mittlere hydraulische Verweilzeiten in den Fermentern der Modellanlage während der Versuchsabschnitte mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung

Beschickungsintervall		1 h	4 h
Modellfermenter 1	Tage	8,1	7,5
Modellfermenter 2	Tage	9,6	8,4
Modellfermenter 3	Tage	23,4	20,8
Kette	Tage	41,1	36,7

#### A 4.7.3 Berechnung des Abbaugrades und der Leistungskennwerte

Die Berechnungen erfolgten nach folgenden Formeln:

- Biogausbeute bezogen auf die zugeführte Frischmasse:

$$Y_{Biogas,FM} = V_{Biogas} / Q_{FM,zu} \quad [m^3 * m^{-3}]$$

mit  $V_{Biogas}$ : verwertete Menge an Biogas,  $Q_{FM,zu}$ : zugeführte Menge an Rohgülle.

- Biogausbeute bezogen auf die zugeführte oTM:

$$Y_{Biogas,oTM} = V_{Biogas} / Q_{oTM,zu} \quad [m^3 * kg \text{ oTM}^{-1}]$$

mit  $Q_{oTM,zu}$ : mit der Rohgülle zugeführte oTM.

- Spezifische Biogasproduktion bezogen auf das Fermentervolumen:

$$\dot{V}_{Biogas} = V_{Biogas} / \left( \sum_{i=1,2,3} V_{Fi} * \Delta t \right) \quad [m^3 * (m^3 * d)^{-1}]$$

mit  $V_{Fi}$ : mittleres aktives Gärraumvolumen des Fermenters i,  $\Delta t$ : Betrachtungszeitraum [d]

- Spezifische Methanausbeute (bezogen auf zugeführte Frischmasse bzw. oTM):

$$Y_{CH_4,FM/oTM} = \sum V_n (CH_4) / Q_{FM/oTM,zu} \quad [m^3 * m^{-3}] \text{ bzw. } [m^3 * kg \text{ oTM}^{-1}]$$

- Raumbelastung der Fermenterkaskade bzw. eines Fermenters:

$$B_R = Q_{oTM} / (V_i * \Delta t) \quad [kg \text{ oTM} * (m^3 * d)^{-1}]$$

mit  $V_i$ : mittleres aktives Gärraumvolumen der Fermenterkaskade bzw. des Fermenters i.

- Abbaugrad der oTM bis zum i-ten Fermenter:

$$oTM - Abbau_{Fi} = \frac{Q_{oTM,zu} - Q_{oTM,i}}{Q_{oTM,zu}} * 100 \%$$

mit  $Q_{oTM,i}$ : aus dem Fermenter i abgeführte oTM.

- Biogas- bzw. Methanertrag bezogen auf die abgebaute oTM:

$$Y' = V_{\text{Biogas/Methan}} / (Q_{oTM, zu} - Q_{oTM, 3})$$

- Theoretischer (stöchiometrischer) Biogasertrag (bezogen auf die zugeführte Frischmasse):

$$Q_{\text{Biogas}} = \frac{\Delta CSB}{2,86 * f_{CH_4}} \quad [m^3 * kg^{-1}]$$

mit  $\Delta CSB$  = abgebaute CSB-Fracht [ $kg * d^{-1}$ ],  $f_{CH_4}$  = Methananteil im Biogas (um Luftzufuhr korrigiert).

#### A 4.8 Bewertung von Umweltwirkungen der Pilot-Biogasanlage

Aus der ganzen Reihe von Umweltwirkungen, die die Ökobilanzierung kennt, wurde nur auf die Energieflüsse und den  $CO_2$ -Äquivalenzfaktor als Indikatorgröße eingegangen. Der Kumulierte Energieaufwand wurde nach der VDI-Richtlinie 4600 (VDI, 1998) ermittelt.

##### A 4.8.1 Datengrundlage

Zur Erstellung einer Materialbilanz der Pilotanlage wurden Daten aus verschiedenen Quellen recherchiert:

Baupläne und technische Zeichnungen

Abschätzung vor Ort

Angaben von Fa. SCHMACK BIOGAS AG und Zulieferern

Literatur und Internetrecherche

Erfasst wurden nur Bauteile mit einem wesentlichen Gewichtsanteil am Gesamtgewicht (mehr als ca. 100 kg). Konnten über ein Bauteil keine ausreichenden Informationen recherchiert werden, wurde es nicht berücksichtigt.

Die Zuordnung von Energien zu den in der Materialbilanz erfassten Massenströmen erfolgte hauptsächlich mit Hilfe der Software GEMIS 4.2 (2005). Waren in GEMIS die gewünschten Daten nicht vorhanden, so wurden andere Quellen herangezogen. Die verwendeten spezifischen Energieaufwendungen und deren Quellen können in Anhang 2 nachgeschlagen werden.

Um die Energieflüsse während des Anlagenbetriebs zu erfassen, wurde vor allem die Anlagendokumentation (siehe Kap. 4.3.3) genutzt. Einzelne Details wurden in Rücksprache mit dem Betreuer der Anlage, Herrn Johann Schweiger, geklärt.

##### A 4.8.2 Erstellung einer Energiebilanz

Zunächst wurden Materialbilanzen für die Herstellung, die Nutzung und die Entsorgung der Anlage erstellt (Materialbilanzanalyse). Diese Materialbilanzen wurden dann energetisch bewertet, woraus Energieströme ermittelt wurden. Die Sankey-Diagramme zur Darstellung der Material- und Energiebilanzen wurden in Microsoft-Excel erstellt. Aus den Energieströmen ließ sich dann der Kumulierte Energieaufwand der Anlage berechnen. Er setzt sich zusammen aus den Kumulierten Energieaufwendungen für die Herstellung, die Nutzung und die Entsorgung der Anlage:

$$KEA = KEA_H + KEA_N + KEA_E$$

$KEA$  : Kumulierter Energieaufwand [MWh]

$KEA_H$  : Kumulierter Energieaufwand der Herstellung [MWh]

$KEA_N$  : Kumulierter Energieaufwand der Nutzung [MWh]

$KEA_E$  : Kumulierter Energieaufwand der Entsorgung [MWh]

*Der Kumulierte Energieaufwand (KEA).* Die Gesamtheit des primärenergetisch bewerteten Energieaufwandes, der zur Errichtung, zum Betrieb und zur Entsorgung eines ökonomischen Gutes (Produkt oder Dienstleistung) aufgewendet wird, bezeichnet man als Kumulierten Energieaufwand KEA. Dieser Energieaufwand setzt sich zusammen aus den Kumulierten Energieaufwendungen für die Herstellung ( $KEA_H$ ), die Nutzung ( $KEA_N$ ) und die Entsorgung ( $KEA_E$ ) des ökonomischen Gutes (KALTSCHMITT et al., 2003).

*Kumulierter Energieaufwand für die Herstellung ( $KEA_H$ ).*  $KEA_H$  wird die Summe der primärenergetisch bewerteten Energieaufwendungen genannt, die sich bei der Herstellung selbst, sowie bei der Gewinnung, Verarbeitung, Herstellung und Entsorgung der Fertigungs-, Hilfs- und Betriebsstoffe und Betriebsmittel, einschließlich der Transportaufwendungen, für einen Gegenstand oder eine Dienstleistung ergeben (KALTSCHMITT et al., 2003).

*Kumulierter Energieaufwand für die Nutzung ( $KEA_N$ ).*  $KEA_N$  wird die Summe der primärenergetisch bewerteten Energieaufwendungen genannt, die sich für den Betrieb oder die Nutzung eines Gegenstandes oder einer Dienstleistung ergeben. Diese Summe beinhaltet, neben dem Betriebsenergieverbrauch, den Kumulierten Energieaufwand für die Herstellung, Entsorgung von Ersatzteilen, von Hilfs- und Betriebsstoffen sowie von Betriebsmitteln, die für Betrieb und Wartung erforderlich sind. Die zugrundegelegten Betriebs- und Nutzungszeiten sind stets anzugeben. Der Energieaufwand der Transporte ist mit einzuschließen (KALTSCHMITT et al., 2003).

*Kumulierter Energieaufwand für die Entsorgung ( $KEA_E$ ).*  $KEA_E$  wird die Summe der primärenergetisch bewerteten Energieaufwendungen genannt, die sich bei der Entsorgung eines Gegenstandes oder Teilen des Gegenstandes, d.h. dem endgültigen Ausschleusen aus dem Nutzungskreislauf, ergeben. Diese Summe beinhaltet, neben dem Energieaufwand für die Entsorgung selbst den Kumulierten Energieaufwand für die Herstellung und Entsorgung von Hilfs- und Betriebsstoffen sowie von Betriebsmitteln, die für die Entsorgung erforderlich sind. Der Energieaufwand für Transporte ist hier ebenfalls zu bilanzieren (KALTSCHMITT et al., 2003).

### A 4.8.3 Erntefaktoren

Nach SCHWAIGER (1996) war die Grundidee der Definition eines Erntefaktors ursprünglich die Bestimmung einer Kennzahl, aus der sich ableiten lässt, ob ein mit regenerativen Energieträgern betriebenes Kraftwerk während seiner Nutzungsdauer überhaupt soviel Energie erzeugt, wie zu seiner Herstellung notwendig war. Danach wurde der Erntefaktor weiter entwickelt, und auf den gesamten KEA der Herstellung, Nutzung und Entsorgung ausgedehnt. Nach HAGEDORN (1992) müssen dabei vor allem zwei Punkte beachtet werden: (1) Energie aus regenerativen Quellen wird mit 0 bewertet, (2) fossile Energieträger werden über ihre Primärenergie (Heizwert) bewertet.

Der Erntefaktor für die Herstellung (KÖHLER, 1996) setzt die, über die Lebensdauer des Kraftwerks erzeugte, elektrische Nettoenergie in Relation mit dem gesamten Kumulierten Energieaufwand ohne Berücksichtigung der eingesetzten fossilen Betriebsenergien.

$$\text{Erntefaktor}_{\text{für die Herstellung}} = \frac{\text{Nettostromerzeugung}}{KEA_H}$$

Erntefaktor für die Herstellung [-]

Nettostromerzeugung [MWh]

*Kumulierter Energieaufwand der Herstellung* [MWh]

Der Erntefaktor für das Kraftwerk (Schwaiger, 1996) stellt dar, wie oft der Kumulierte Energieaufwand durch die Nettostromerzeugung wiedergewonnen wird. Fossile Betriebsenergien bleiben unberücksichtigt<sup>2</sup>.

$$\text{Erntefaktor}_{\text{für das Kraftwerk}} = \frac{\text{Nettostromerzeugung}}{\text{KEA} - \text{Fossile Betriebsenergien}}$$

<i>Erntefaktor für das Kraftwerk</i>	[·]
<i>Nettostromerzeugung</i>	[MWh]
<i>Kumulierter Energieaufwand</i>	[MWh]
<i>Fossile Betriebsenergien (primärenergetisch bewertet)</i>	[MWh]

Der Erntefaktor  $EF_{\text{ges,el}}$  (SCHWAIGER, 1996) berücksichtigt zusätzlich das eingesetzte Heizöl und den, vom Energieversorger gelieferten, Fremdstrom. Der Fremdstrom wird über seinen Primärenergiegehalt bewertet. Für konventionelle Kraftwerke ergibt sich ein Wert ähnlich dem elektrischen Wirkungsgrad, mit dem Unterschied, dass zusätzlich die Energieaufwendung für Herstellung und Entsorgung berücksichtigt wird.

Da regenerative Energiequellen bei der Ermittlung des Energieaufwands nicht berücksichtigt werden, können sich für mit nachwachsenden Rohstoffen betriebene Kraftwerke Erntefaktoren größer als 1 ergeben. Damit setzt das Kraftwerk mehr Nutzenergie frei, als fossile Energie investiert wurde.

$$\text{Gesamterntefaktor} = \frac{\text{Nettostromerzeugung}}{\text{KEA}}$$

<i>Gesamterntefaktor</i>	[·]
<i>Nettostromerzeugung</i>	[MWh]
<i>KEA</i>	[MWh]

#### A 4.8.4 Primärenergetische Amortisationszeit

Die Primärenergetische Amortisationszeit definiert sich nach KALTSCHMITT (2003) als Zeitraum, innerhalb dessen eine Energiebereitstellungstechnik soviel an (primärenergetisch bewerteter) Nutzenergie bereitgestellt hat, wie für die Erstellung der Anlage nötig ist. Die Nettoenergieerzeugung beschreibt die von der Biogasanlage, während ihrer Lebenszeit, erzeugte Nutzenergie. Da es um die Frage geht, wie viel Primärenergie durch die Bereitstellung dieser elektrischen Energie in deutschen Elektrizitätswerken eingespart werden konnte, wird die erzeugte elektrische und thermische Energie primärenergetisch bewertet (Primärenergetische Nettoenergieerzeugung). Der KEA des verwendeten Brennstoffs (Heizwert) geht dabei nicht mit in die Rechnung ein. Es werden also nur die Betriebsmittel in die Bilanz aufgenommen, also die Stoffe, die nicht primär zur Energieerzeugung dienen.

<sup>2</sup> Im Unterschied zum Erntefaktor für die Herstellung werden also der Energieaufwand für Ersatzteile und Entsorgungsaufwendungen bzw. -erlöse mit berücksichtigt.

Während der Nutzungsphase der Biogasanlage fallen als nennenswerte Betriebsstoffe die Ersatzteile an.

$$\text{Primärenerget. Amortisationszeit} = \frac{KEA_H \cdot \text{technische Lebensdauer d. Anlage}}{\text{prim. Nettoenergieerzeugung} - KEA_{\text{Betriebsmittel}}}$$

<i>Primärenergetische Amortisationszeit</i>	[a]
<i>Kumulierter Energieaufwand der Herstellung</i>	[MWh]
<i>Primärenergetisch bewertete Nettoenergieerzeugung</i>	[MWh]
<i>KEA<sub>Betriebsmittel</sub></i> :	[MWh]
<i>Technische Lebensdauer d. Anlage</i>	[a]

#### A 4.8.5 CO<sub>2</sub>-Bilanz

Bei der Verbrennung fossiler Energieträger wird CO<sub>2</sub> in die Atmosphäre emittiert. CO<sub>2</sub> ist das mengenmäßig dominierende klimarelevante Gas, es trägt den größten Anteil zum anthropogenen Treibhauseffekt bei. In die Bilanz wird analog zum KEA nur CO<sub>2</sub> aufgenommen, das aus fossilen Quellen stammt. Andere klimawirksame Gase wie z.B. Methan werden anhand von international anerkannten Faktoren in sogenannte Kohlendioxidäquivalente umgerechnet (IPPC, 2001). Die CO<sub>2</sub>-Bilanz der Bau- und Maschinentechnik wurde als Produkt der einzelnen Materialmassen (aus der Massenbilanz) und den materialspezifischen Kohlendioxidäquivalenzfaktoren berechnet. Eine Zusammenfassung der verwendeten Äquivalenzfaktoren findet sich in Anhang 5.

#### A 4.9 Betrachtung der Wirtschaftlichkeit

Die Gesamtinvestitionssumme und die Aufteilung der Kosten auf Bau- und Maschinentechnik stammen aus Angeboten der Firma SCHMACK BIOGAS AG über eine Biogasanlage zur Vergärung von 550 GV Rindergülle (11.000 m<sup>3</sup>/Jahr; SCHMACK BIOGAS AG, 2005). Die Daten zum Anlagenbetrieb wie jährliche Gasproduktion, Zündölverbrauch, Wärmeproduktion, Stromproduktion, Eigenstrombedarf, Fremdstrombedarf oder elektrischer und thermischer Wirkungsgrad des BHKWs stammen aus eigenen Abschätzungen und Berechnungen.

## A 5 Bau und Betrieb der Versuchsanlagen

### A 5.1 Baumaßnahmen an der Pilotanlage

Mit der Planung und dem Bau der Pilot-Biogasanlage wurde die Firma SCHMACK BIOGAS AG beauftragt. Die Vorplanung und Festlegung von Sollvorgaben erfolgte in Zusammenarbeit von LfL-Landtechnik und der Bauer + Wiesner Planungsgesellschaft mbH, Riedering, welche auch die Bauaufsicht übernahm. Die Anlage wurde auf eine Behandlungskapazität von 2000 m<sup>3</sup> Gülle ausgelegt. Baubeginn der Anlage war der 06.04.2002, die technische Abnahme erfolgte am 25.11.2002.

Mit dem Anfahren der Pilot-Biogasanlage wurde am 28.08.2002 begonnen. Die Fermenter 1 und 2 wurden hierzu mit verdünnter Rindergülle aus dem Güllekanal des Hofes Schweiger befüllt und mit der Abwärme des im Heizölbetrieb laufenden BHKW aufgeheizt. Die Solltemperaturen der Fermenter 1 und 2 von 40°C bzw. 55°C wurden am 31.08.2002 erreicht. Am 13.11.2002 wurde die automatische Beschickung der Anlage mit täglich 1,5 m<sup>3</sup> Rindergülle bei stündlicher Beschickung aufgenommen. Im Zeitraum von Anfang Januar bis Anfang März 2003 wurde die tägliche Beschickungsmenge von 2 m<sup>3</sup> auf ca. 6,3 m<sup>3</sup> Rindergülle gesteigert.

Im April 2003 wurden umfangreiche Maßnahmen zur Verbesserung der unbefriedigenden wärmetechnischen Situation durchgeführt. Die einwandigen Kunststoff-Gülleleitungen wurden im Falle der Druckleitungen zu den Fermentern 2 und 3 durch Stahlleitungen mit Kunststoffmantelisolierung bzw. im Falle der Saugleitungen der Fermenter 1 und 2 durch PVC-Leitungen mit Vollisolierung ersetzt. Im Zuge dieser Umbaumaßnahmen wurde der thermophile Fermenter um etwa 40 cm angehoben und auf Konsolen mit thermischer Trennung gestellt. Die außenliegenden, nur punktuell aufgeschweißten Heizleitungen am Fermenter 2, die sich als praktisch wirkungslos erwiesen hatten, wurden durch auf die Unterseite der 1. und 2. Kammer des Fermenters aufgeschweißte U-Profile ersetzt. Hierfür musste die Wärmedämmung teilweise entfernt werden. Dabei zeigten sich vorhandene Mängel in Form von metallischen Abstandshaltern für die Außenverkleidung sowie Eindringen von Feuchtigkeit. Außerdem wurde die Rührwelle des Fermenters 2, die von Anfang an durch eine starke Geräuschentwicklung aufgefallen war, neu ausgerichtet. Für diese Arbeiten musste die Beschickung der gesamten Anlage für 14 Tage unterbrochen werden (siehe auch Anhang 6). Im Juli 2003 wurde die Wärmedämmung und Verkleidung der Mantelfläche des Fermenters nach den oben beschriebenen Umbauarbeiten wiederhergestellt und zusätzlich wurden die stirnseitigen Rahmen gedämmt und mit Blech verkleidet. Diese Arbeiten verursachten eine viertägige Unterbrechung der Beschickung.

In der zweiten Novemberwoche 2003 wurde der starre Rührwellenantrieb durch eine Doppelkette ersetzt; desweiteren wurde der Rührwellenflansch gegen den Rahmen abgestützt. Das undichte Kunststoffgleitlager der Rührwelle des F2 wurde in der KW 50/2003 erneuert. Hierzu musste der Füllstand des thermophilen Fermenters unter das Niveau der Rührwelle abgesenkt werden. Im Zusammenhang mit dieser Maßnahme wurden Bleche auf die Rührwelle aufgeschweißte, die eine Verbesserung des Wärmeüberganges durch Verwirbelung des Substrates bewirken sollten. Weiterhin wurden alle Rührpaddel durch Aufschrauben von Kunststoffflappen (Polyurethan) bis fast zur Mantelinnenfläche verlängert, um die den Wärmeübergang behindernde Sinkschicht am Boden des F2 aufzulösen und deren erneute Bildung zu vermeiden. Zur Durchführung dieser Arbeiten musste die Beschickung der Pilotanlage für fünf Tage ausgesetzt werden.

## A 5.2 Baumaßnahmen an der Modellanlage

Ausgangspunkt für den Entwurf der Modell-Biogasanlage war ein geometrisch ähnliches Modell des liegenden thermophilen Fermenters im Maßstab 1:6. Dieses wurde an der LfL-Landtechnik von Grund auf entworfen und gefertigt. Als Modelle für die beiden stehenden Fermenter 1 und 3 der Pilotanlage wurden gebrauchte Milchbehälter geeigneter Größe umgebaut. Alle Komponenten mit Ausnahme des Vorlagebehälters für das Frischsubstrat wurden von der Werkstatt des LfL-Landtechnik in einem zwangsbelüfteten Isoliercontainer installiert. Standort der Modellanlage für die Dauer des Projektes war das Außengelände von TUM-SWW. Für Probenahmen und Kontrollen wurde die Anlage während der Betriebsphasen durchschnittlich dreimal pro Woche besucht.

Der Betrieb der Modellanlage mit unbehandelter Gülle vom Hof Schweiger führte zu wiederholten Betriebsstörungen durch Verstopfungen und Verzopfungen. Ab 2004 wurde deshalb bei Abfüllung der Gülle an der Pilotanlage ein Mazerator eingesetzt. Hierdurch konnten Betriebsstörungen weitgehend vermieden werden. Die ursprünglich eingebauten Schwimmerschalter zur Füllstandskontrolle wurden durch potentiometrische Füllstandswächter ersetzt. Nach Betriebsstörungen durch Verstopfung des Überlaufes wurde im MF3 ein Wächter für den maximalen Füllstand nachgerüstet und ein Ablaufschlauch größeren Durchmessers installiert, der zusätzlich mit einer Spüleinrichtung versehen war.

## A 5.3 Betrieb der Versuchsanlagen

Offizieller Betreiber der Pilot-Biogasanlage waren die Stadtwerke Rosenheim GmbH & Co. KG. Betreut wurde die Anlage vom Betriebsleiter, Herrn Johann Schweiger. Die wissenschaftliche Begleitung erfolgte hinsichtlich der verfahrenstechnischen und ökonomischen Aspekte durch LfL-Landtechnik, hinsichtlich der hygienischen Aspekte durch TUM-SWW. Die Pilotanlage wurde hierzu fast über die gesamte Projektlaufzeit mindestens einmal wöchentlich besucht, während intensiver Versuchsphasen auch häufiger. Der erste Versuchsabschnitt begann mit der Vorbereitung der beiden ersten Chargenversuche zur Keimreduktion Mitte Juli 2003 (LEBUHN, 2005; Abbildung 10).

Um für diese Versuche eine mögliche, aus dem mangelhaften Betrieb des F2 im ersten Halbjahr 2003 resultierende Keimbelastung im F3 zu beseitigen, wurde der F3 vor Versuchsbeginn auf 55°C aufgeheizt und bei unterbrochener Beschickung 48 h lang auf diesem Temperaturniveau gehalten. Nach der längeren Unterbrechung der Beschickung für die Umbau- und Reparaturmaßnahmen Ende 2003 wurde die Anlage bis Anfang Februar 2004 wieder hochgefahren und dann die Beschickungsrate so wenig wie möglich variiert, um für die Ermittlung von Leistungskennwerten einen quasi-stationären Betriebszustand zu erreichen. Hierbei traten wiederholt kurzfristige Störungen des gleichmäßigen Anlagenbetriebes auf, wie beispielsweise die schlagartige Verdünnung der Gülle nach dem Bruch einer Tränkeleitung im Stall. Die Markierungsexperimente im F2 wurden im Juni/Juli bzw. September/Oktober 2004 durchgeführt. Für eine detaillierte chronologische Übersicht über den Betrieb der Pilotanlage siehe Anhang 6.

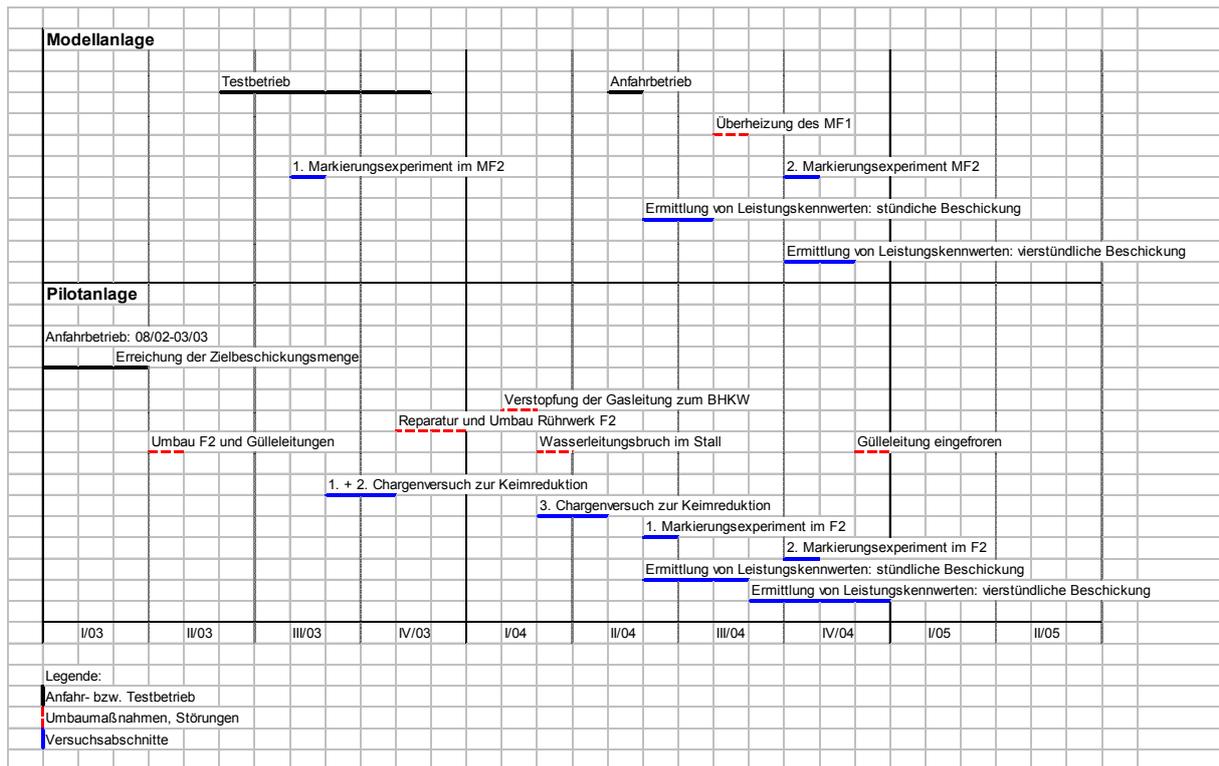


Abbildung 10: Übersicht über den Betrieb der Versuchsanlagen

Die Modellanlage wurde während des gesamten Betriebszeitraumes mit Rohgülle von der Pilotanlage beschickt. Hierzu wurden etwa alle zwei Wochen zur Wiederauffüllung des Vorlagebehälters ca. 0,5 m<sup>3</sup> Rohgülle vom Hof Schweiger angefahren. Die Rohgülle wurde während des Befüllens der Vorgrube der Pilotanlage aus einem Abzweig der Gulleitung vom Güllekanal in die Vorgrube entnommen. Während der kalten Jahreszeit wurde die Modellanlage stillgelegt. Mit Wiederinbetriebnahme der Modellanlage im Frühjahr 2004 wurde bei Abfüllung der Gülle an der Pilotanlage ein Mazerator eingesetzt. von Juni bis November 2004 erfolgte ein weitgehend paralleler Betrieb von Modell- und Pilotanlage. Für eine detaillierte chronologische Übersicht über den Betrieb der Modellanlage siehe Anhang 7.

## A 6 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden werden der gesamte Verlauf des Betriebes der Pilot-Biogasanlage sowie Ergebnisse aus dem parallelen Betrieb der beiden Versuchsanlagen vorgestellt und diskutiert. Die Bezeichnungen „1 h“ bzw. „4 h“ beziehen sich dabei auf den jeweiligen Versuchsabschnitt mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung (siehe Kap. 5.3). Im Falle der Pilotanlage erstreckte sich der erste Versuchsabschnitt vom 01.06. bis zum 06.09.2004 (98 Tage), der zweite vom 21.10. bis zum 07.12.2004 (48 Tage). Im Falle der Modellanlage erfolgte die Auswertung für die Zeiträume 05.06.-05.08.2004 (62 Tage) bzw. 26.09.-08.11.2004 (44 Tage).

### A 6.1 Einhaltung der Solltemperatur im thermophilen Fermenter

Auf Grundlage des Standes des Wissens wurde eine Temperatur von 55°C im thermophilen Fermenter als Sollwert für die Sicherstellung einer ausreichenden Hygienisierungsleistung festgelegt, wie er auch in einschlägigen gesetzlichen Regelungen zur Hygienisierung durch thermophile Vergärung verankert ist, so z. B. in der Bioabfall-Verordnung (Anon., 1998). Hierbei stellt sich die wichtige Frage, an welchen Stellen im Fermenter die Einhaltung dieser Temperatur durch fortlaufende Messungen nachzuweisen ist. Im Falle des liegenden Fermenters der Pilotanlage standen (zeitweise) fünf Temperaturfühler zur Verfügung, davon zwei an den beiden Stirnseiten des Behälters und drei an den Schikanenblechen.

In der vorderen und hinteren Kammer des F2 waren die Wärmeverluste aufgrund der großen Oberfläche gegenüber den mittleren Kammern deutlich höher. In der ersten Kammer trat eine zusätzliche Abkühlung durch das zugeführte Substrat aus dem vorgeschalteten, mesophilen F1 auf. Zudem waren die Tauchhülsen der stirnseitigen Temperaturfühler nur ca. 10 cm lang, so dass die Messwerte stärker von der Außentemperatur beeinflusst wurden als im Falle der Temperaturfühler an den Schikanenblechen, die bis ca. 1/3 des Durchmessers in den Fermenter hineinragten (Abbildung 11). Daher wurden für die Beurteilung der Einhaltung der Solltemperatur in erste Linie die Messwerte der Fühler 2 bis 4 herangezogen.

Nach Aufnahme der automatischen Beschickung am 02.11.2002 liefen die Temperaturen entlang des thermophilen Fermenters mit Steigerung der täglichen Beschickungsmenge bis Anfang Februar 2003 zunehmend auseinander (Temperaturdifferenz Fühler 1 – Fühler 4 bis 10 K). Die Temperatur am Fühler 1, der an der Stirnseite der ersten Kammer platziert war, sank durch die stündliche Zufuhr von Substrat, das in der ungedämmten Leitung von F1 zu F2 stark abkühlte, zeitweise auf unter 50°C ab. Über die Rührwelle und die ineffektive Bodenheizung konnte in die erste Kammer des liegenden Behälters nicht genügend Wärmeenergie eingetragen werden, um diesen Effekt auszugleichen. Die Temperatur an den Fühlern 2 bzw. 3 und 4 (Anordnung jeweils an den Schikanenblechen) lag jeweils um ca. 1,5 K höher, jedoch wurde auch an diesen Stellen im Fermenter 2 die Solltemperatur von 55°C um 2 bis 3 K unterschritten, was vor allem auf den schlechten Wärmeeintrag, aber auch auf die mangelhafte Wärmedämmung hindeutete.



Abbildung 11: Tauchhülse eines der Temperaturfühler an den Schikanenblechen

In den heißen Sommermonaten des Jahres 2003 konnte die Solltemperatur von 55°C an den Fühlern 3 und 4 des thermophilen Fermenters meist eingehalten oder bis auf ein halbes Grad erreicht werden. Geht man von weitgehend gleichen Außentemperaturverhältnissen von Juni bis August aus, war allerdings kein deutlicher Einfluss der zusätzlichen Wärmedämmung des F2 auf die Erreichung der Temperatursollwerte erkennbar. Lediglich im Vergleich zwischen Juni und August 2003 deutete sich ein leichter Anstieg der mittleren Temperaturen in den ersten beiden Kammern an. Ausfälle des BHKW für nur wenige Stunden führten auch bei sommerlichen Umgebungstemperaturen zu einem merklichen Abfallen der Temperaturen im F2.

Auffälligste Änderung nach den Modifikationen am Rührwerk Ende 2003 war die Anhebung der mittleren Temperatur im vorderen Teil des F2. Tabelle 11 zeigt Monatsmittelwerte der Temperaturen der Umgebungsluft und im Fermenter während ausgewählter Versuchsabschnitte. In Abbildung 12 sind die Werte für die Monate September 2003 (vor Umbau der Rührpaddel, stündliche Beschickung), Juni 2004 (nach Umbau der Rührpaddel, stündliche Beschickung) und Oktober 2004 (vierstündliche Beschickung) grafisch dargestellt. Nach Umrüstung des Rührwerkes wurde eine Anhebung des gesamten Temperaturniveaus im F2 beobachtet, die Temperaturspreizung blieb jedoch praktisch unverändert.

Tabelle 11: Gemessene Umgebungstemperatur und Temperaturen (°C) im F2 während verschiedener Betriebszustände (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

Monat	Außenluft	Fühler 1	Fühler 2	Fühler 3	Fühler 4	Fühler 5
Sep 03	12,5 $\pm$ 2,8	51,8 $\pm$ 1,0	53,7 $\pm$ 0,7	54,8 $\pm$ 0,4	55,2 $\pm$ 0,4	n. v.
Okt 03	5,3	51,5	53,7	54,8	55,1	n. v.
Mrz 04	2,6	52,2	54,6	55,3	55,3	n. v.
Apr 04	8,9	52,1	54,1	54,9	55,3	n. v.
Jun 04	15,4 $\pm$ 3,1	52,3 $\pm$ 0,8	54,2 $\pm$ 0,6	55,0 $\pm$ 0,5	55,5 $\pm$ 0,4	n. v.
Sep 04	13,5	53,4	54,8	54,6	54,5	54,0
Okt 04	9,8 $\pm$ 3,7	53,5 $\pm$ 1,0	55,1 $\pm$ 0,5	55,0 $\pm$ 0,4	54,9 $\pm$ 0,1	54,1 $\pm$ 0,4

n. v.: nicht verfügbar

Nach der Umstellung von stündlicher auf vierstündliche Beschickung war das Temperaturgefälle von Fühler 2 zu Fühler 4 praktisch aufgehoben bzw. leicht umgekehrt; lediglich am Fühler 1 war noch die Abkühlung durch zugeführtes kühleres Substrat erkennbar, die jedoch geringer ausfiel als bei stündlicher Beschickung (Abbildung 12 und Abbildung 13). Gleichzeitig sanken die erreichten Höchsttemperaturen leicht, die nun nicht mehr am Fühler 4 (an der dritten Schikane), sondern am Fühler 3 (an der zweiten Schikane, d. h. in der Mitte des Behälters) gemessen wurden (Tabelle 11). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass bei einer nur sechsmaligen Beschickung am Tag das zugeführte Substrat länger in der ersten Kammer des Fermenters verweilt, wo aufgrund der größeren Wärmetauscheroberfläche ein effektiverer Wärmeeintrag erfolgte.

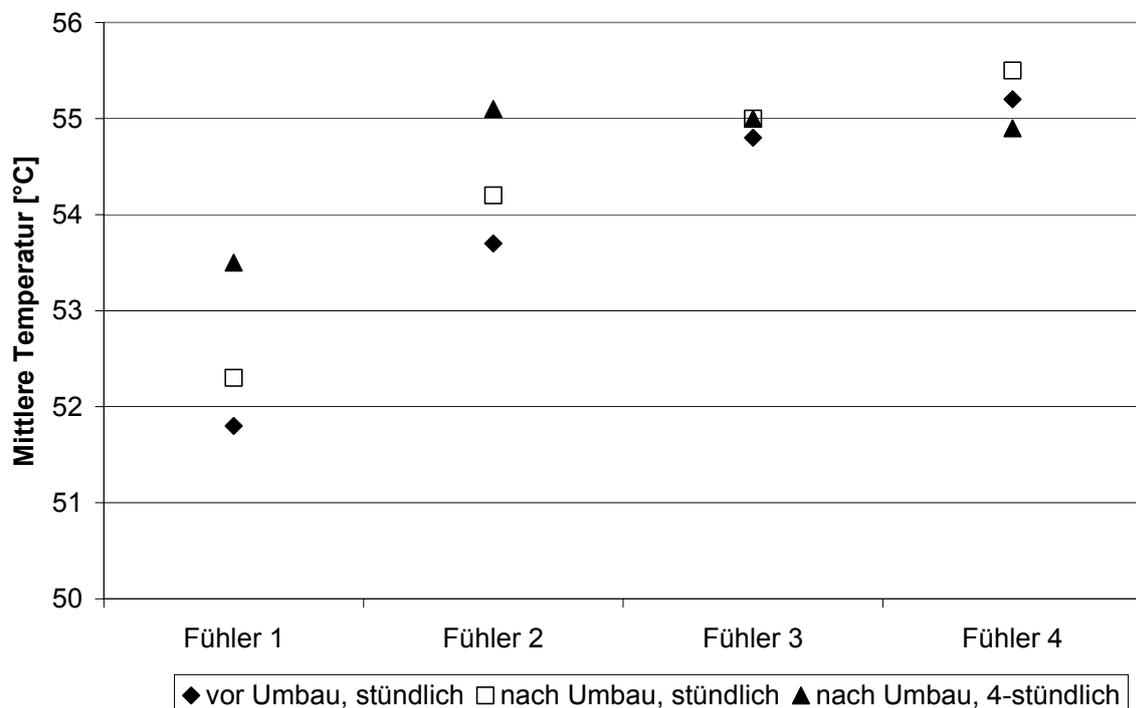


Abbildung 12: Temperaturprofil im F2 bei unterschiedlichen Betriebszuständen (Monatsmittelwerte der kontinuierlichen Temperaturaufzeichnungen)

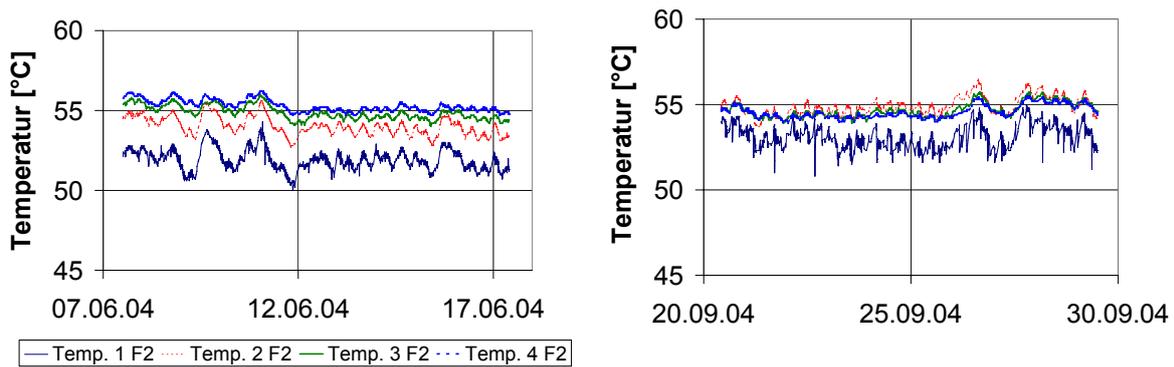


Abbildung 13: Beispielhafter Temperaturverlauf im F2 bei stündlicher (links) bzw. vierstündlicher Beschickung (rechts)

Auf Basis der erreichten Prozesstemperaturen im F2 wurde der Betrieb der Versuchsanlage in zwei Phasen eingeteilt: Phase 1 bis Anfang 2004, während der der Mittelwert der an den Fühlern 2 bis 4 gemessenen Temperatur auch längere Zeit (an mehreren Tagen) unter  $54^{\circ}\text{C}$  und kurzzeitig bis auf  $53^{\circ}\text{C}$  und darunter absank; Phase 2 ab Februar 2004 bis Ende 2004, während der dieser Mittelwert meist bei  $ca. 55^{\circ}\text{C} \pm ca. 1 \text{ K}$  lag und nur kurzfristig unter  $54^{\circ}\text{C}$  absank. Aus den hygienischen Begleituntersuchungen ergaben sich für diese beiden Phasen je nach untersuchtem Organismus mehr oder weniger stark ausgeprägte Unterschiede der erreichten Keimzahlreduktion, während in Phase 2 zwischen der Keimzahlreduktion bei stündlicher und vierstündlicher Beschickung kein Unterschied festgestellt werden konnte (LEBUHN, 2005). Aus den kontinuierlichen Temperatureaufzeichnungen, die für den gesamten Betriebszeitraum der Pilotanlage vorliegen, wurde jedoch auch ersichtlich, dass die Solltemperatur von  $55^{\circ}\text{C}$  im F2 auch in 2004 nicht im gesamten Fermenter und nicht durchgängig sichergestellt wurde. Damit wären die Anforderungen des Anhangs 2 der Bioabfallverordnung (ANON., 1998) mit dem thermophilen Fermenter der Pilotanlage nicht eingehalten worden. Um die Einhaltung der Sollvorgaben für die Prozesstemperatur gewährleisten zu können, wären Maßnahmen zur weiteren Verbesserung des Wärmeeintrages und zur Verringerung der Wärmeverluste erforderlich (siehe Kap. 6.13.6).

Die elektrische Beheizung des thermophilen Fermenters der Modellanlage über vier Regelkreisläufe mit jeweils zwei Heizmatten je Abschnitt arbeitete zuverlässig und regelte die Fermentertemperatur mit geringen Schwankungen auf mittlere Werte von  $54,7$  bis  $54,9^{\circ}\text{C}$  (Tabelle 12). Dabei konnten auch die erhöhten Wärmeverluste in den beiden stirnseitigen Kammern weitgehend ausgeglichen werden. Bei vierstündlicher Beschickung ergaben sich lediglich geringfügig stärkere Temperaturschwankungen und eine um  $0,1$  Grad geringere mittlere Temperatur in der ersten Kammer des MF2.

Tabelle 12: Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) der Fermentertemperaturen ( $^{\circ}\text{C}$ ) in der Modellanlage

	2004	1 h	4 h
Modellfermenter 1	$38,3 \pm 0,98$	$38,4 \pm 1,21$	$38,1 \pm 1,28$
Modellfermenter 2/1	$54,8 \pm 0,28$	$54,8 \pm 0,16$	$54,7 \pm 0,36$
Modellfermenter 2/2	$54,9 \pm 0,05$	$54,9 \pm 0,04$	$54,9 \pm 0,05$
Modellfermenter 2/3	$54,9 \pm 0,06$	$54,9 \pm 0,05$	$54,9 \pm 0,06$
Modellfermenter 2/4	$54,8 \pm 0,09$	$54,8 \pm 0,10$	$54,8 \pm 0,09$
Modellfermenter 3	$37,7 \pm 0,47$	$37,3 \pm 0,32$	$37,9 \pm 0,54$

Signifikante Unterschiede zwischen der Reduktion Fäkalcoliformer Keime in der Pilot- und Modellanlage wurden nicht beobachtet (LEBUHN, 2005). Dies deutet darauf hin, dass – in etwa gleiche Verweilzeiten in den liegenden Fermentern vorausgesetzt – die auftretenden Temperaturunterschreitungen in Teilen des F2 in Bezug auf diesen hygienischen Parameter unkritisch waren bzw. durch teilweise Temperaturüberschreitungen kompensiert wurden.

**Fazit:**

Die Solltemperatur von 55°C im liegenden, thermophilen Fermenter der Pilotanlage konnte erst nach technischen Nachbesserungen erreicht werden. Eine exakte Einhaltung der Solltemperatur konnte jedoch auch dann nicht über die gesamte Fermenterlänge und nicht durchgängig sichergestellt werden. Bei sechsmaliger Beschickung am Tag war das Temperaturlängsgefälle im liegenden Fermenter wesentlich geringer als bei vierundzwanzigmaler Beschickung.

Im thermophilen Modellfermenter wurde eine mittlere Temperatur von 54,7 bis 54,9°C durchgängig mit geringen Schwankungen eingehalten. Einflüsse des Beschickungsintervalles auf die Temperaturverteilung im Fermenter wurden hier durch das Heizungssystem praktisch vollständig eliminiert.

Die Erhöhung des Temperaturniveaus im thermophilen Fermenter durch technische Nachbesserungen bewirkte eine deutliche Verbesserungen der erzielten Keimzahlreduktion. Die dann noch auftretenden Unterschiede zwischen der Temperaturführung des liegenden Fermenters der Pilot- und der Modellanlage beeinflussten hingegen die Reduktion Fäkalcoliformer Keime nicht.

**A 6.2 Temperatur in den mesophilen Fermentern**

In den beiden mesophilen Fermentern wurde eine Temperatur von 38°C angestrebt. Die Einhaltung dieses Temperaturniveaus im F1 stellte während der Projektlaufzeit meist kein Problem dar (nicht dargestellt). Während des Wiederhochfahrens der Anlage Anfang 2004 sanken die Temperaturen im F1 vorübergehend auf minimal ca. 34°C ab (nicht dargestellt). Im weiteren Jahresverlauf bewegten sich die Temperaturen in diesem Fermenter im wesentlichen zwischen 37 und 39°C und erreichten maximal ca. 40°C (Abbildung 14).

Die Temperatur im F3 zeigte im Jahresgang einen außentemperaturabhängigen Verlauf (Abbildung 14). Während im Sommer praktisch ohne zusätzliche Beheizung des F3 Fermentertemperaturen bis zu 43°C registriert wurden, sanken diese bei sehr kalter Witterung bis auf 30°C ab. Während also im Sommer zeitweise noch Überschusswärme zur Verfügung stand, waren im Winter die Wärmeverluste der Anlage – insbesondere des thermophilen Fermenters – zu groß.

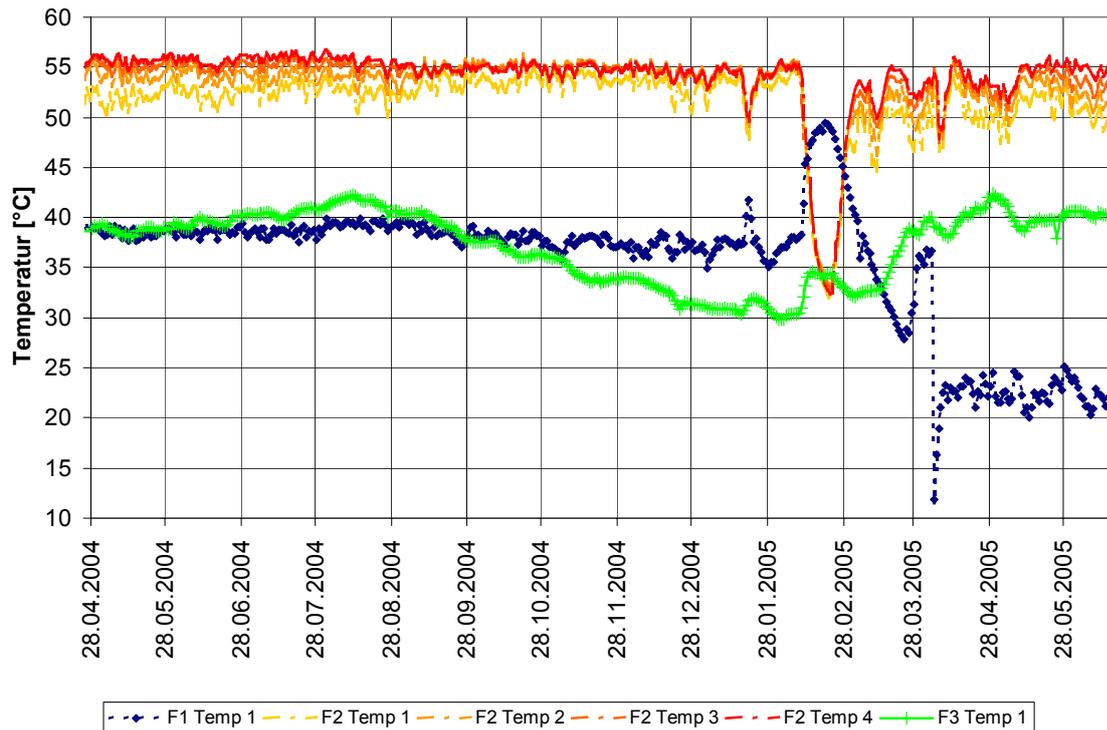


Abbildung 14: Temperaturverlauf in den Fermentern der Pilot-Biogasanlage (Tagebuchaufzeichnungen)

Die Genauigkeit der Temperaturregelung in den Modellfermentern 1 und 3 war ausreichend, wenn auch schlechter als im thermophilen Modellfermenter (Tabelle 12). Im Falle des MF1 kam es am 18.-20.09. und 24.09.2004 zu elektrischen Defekten an der Heizungsregelung. Der Fermenter kühlte dadurch vorübergehend auf ca. 25°C ab. Vom 27.08. bis 02.09.2004 kam es aufgrund eines Bedienfehlers zu einer Überheizung des MF1 auf ca. 45°C. Im Falle des MF3 fiel die Heizwasserpumpe aus, so dass vom 05.06. bis zum 14.06.2004 die Solltemperatur nicht erreicht wurde. Die Temperaturmesswerte aus den entsprechenden Zeiträumen wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

#### Fazit:

Im ersten mesophilen Fermenter der Pilotanlage konnte die Zieltemperatur von 38°C mit ausreichender Genauigkeit eingehalten werden. Während im Sommer zeitweise noch Überschusswärme zur Verfügung stand, waren im Winter die Wärmeverluste der Anlage zu groß, um die Temperatur im F3 auf 38°C zu halten.

Die mesophilen Modellfermenter 1 bzw. 3 wurden im Mittel bei  $38,3 \pm 1^\circ\text{C}$  bzw.  $37,7 \pm 0,5^\circ\text{C}$  betrieben.

### A 6.3 Prozessstabilität und Stoffumsatz

Die folgenden Tabellen zeigen Analysenwerte der während des Berichtszeitraumes entnommenen Proben von Fermenterhalten. Je nach Untersuchungshäufigkeit ergaben sich unterschiedliche Stichprobenumfänge. Insgesamt war der Stichprobenumfang im Falle der Modellanlage etwas größer als bei den Proben von der Pilotanlage. Die Ergebnisse der chemischen Analysen bildeten die Grundlage einerseits für die Beurteilung der Stabilität des komplexen anaeroben Abbauprozesses und andererseits für die Beurteilung des Stoffumsatzes.

### A 6.3.1 Stabilität des anaeroben Abbauprozesses

Aufgrund der hohen Pufferkapazität von Rindergülle ist der pH-Wert ein ungeeigneter Prozessindikator für dieses Substrat, da er Überlastungen erst anzeigt, wenn es für ein Eingreifen bereits zu spät ist. Da nicht in allen Proben vor Ort der pH-Wert bestimmt wurde, wurden im folgenden aus Gründen der Einheitlichkeit jeweils die Labormesswerte angegeben. Diese bewegten sich in den Proben aus den Fermentern der Pilot- und Modellanlage um ca. 8 (Tabelle 13) und damit im Bereich zwischen den Kapazitätsmaxima der beiden dominierenden Puffersysteme Kohlensäure / Hydrogencarbonat ( $\text{pH} = 6,46$ ) und Ammonium / Ammoniak ( $\text{pH} = 9,25$ ). Generell sind Veränderungen des Chemismus flüssiger Proben durch den Transport ins Labor nicht auszuschließen, weshalb der pH-Wert möglichst vor Ort in der frisch entnommenen Probe ermittelt werden sollte.

Tabelle 13: pH-Werte der Substratproben aus den Fermentern der Versuchsanlagen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 12-35 Proben)

	1 h	4 h
Fermenter 1 (F1)	8,0 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,1
Fermenter 2 (F2)	8,2 $\pm$ 0,2	8,1 $\pm$ 0,1
Fermenter 3 (F3)	8,1 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,1
Modellfermenter 1 (MF1)	8,0 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,1
Modellfermenter 2 (MF2)	8,1 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,1
Modellfermenter 3 (MF3)	8,1 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,1

Als Maß für die Pufferkapazität kann der sogenannte Säurekapazitätswert  $K_{S,4,3}$  herangezogen werden. Zugrunde liegt das Puffersystem Kohlensäure / Hydrogencarbonat. Auch dieser Wert ist jedoch für sich allein gesehen ein schlechter Kontrollparameter. Die Alkalinität sollte überschlagsmäßig mindestens 1 g  $\text{CaCO}_3/\text{l}$  betragen, um den pH-Wert um 7 oder höher zu halten (HOBSON & WHEATLEY, 1993). Die verwendete Milchviehgülle wies eine hohe Alkalinität von ca. 12  $\text{CaCO}_3/\text{l}$  auf (siehe Kap. 4.2), die im Laufe des Vergärungsprozesses anstieg (). In den Proben von Fermenterinhalt wurde lediglich als Folge der Überheizung des MF1 eine deutliche Aufzehrung von Pufferkapazität bis auf einen Wert von 7,4  $\text{CaCO}_3/\text{l}$  festgestellt.

Tabelle 14: Werte der Alkalinität [g  $\text{CaCO}_3/\text{l}$ ] in Substratproben aus den Fermentern der Versuchsanlagen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 7-35 Proben)

	1 h	4 h
F1	14,8 $\pm$ 1,4	13,6 $\pm$ 0,8
F2	15,5 $\pm$ 1,4	14,4 $\pm$ 0,3
F3	17,0 $\pm$ 1,2	15,4 $\pm$ 0,1
MF1	14,8 $\pm$ 1,4	12,5 $\pm$ 0,4
MF2	15,3 $\pm$ 1,3	12,9 $\pm$ 0,3
MF3	16,8 $\pm$ 0,7	13,8 $\pm$ 0,2

Die Gehalte an ammoniakalischem Stickstoff in Proben aus den Fermentern der Pilotanlage bewegten sich im wesentlichen im Bereich von 2000 bis 3000 mg/l. In Proben aus dem Zeitraum 19.10. bis 10.11.2004 wurden in den Substratproben  $\text{NH}_4\text{-N}$ -Werte ermittelt, die gegenüber dem bis dahin beobachteten Niveau um bis zu ca. 100 % erhöht waren. Die stark erhöhten Werte traten gleichzeitig in Proben von Rohgülle und Fermenterinhalt auf und waren verantwortlich für die hohen Standardabweichungen der  $\text{NH}_4\text{-N}$ -Werte (Tabelle 15). Im Vergleich zu den entsprechenden Fermentern der Pilotanlage waren die  $\text{NH}_4\text{-N}$ -Gehalte in

den Modellfermentern tendenziell etwas geringer. Die vorübergehende starke Erhöhung der  $\text{NH}_4\text{-N}$ -Gehalte war auch in Proben aus der Modellanlage zu sehen, viel hier allerdings vom Betrag her nicht so stark aus. Der Grund für diese Erhöhung konnte nicht geklärt werden. Da die Proben aus der Pilot- bzw. Modellanlage zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert wurden, handelte es sich nicht um ein analytisches Artefakt.

Tabelle 15:  $\text{NH}_4\text{-N}$ -Gehalte [mg/l] der Substratproben aus den Fermentern der Versuchsanlagen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 11-35 Proben)

	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
F1	2106 $\pm$ 216	3123 $\pm$ 1001
F2	2338 $\pm$ 197	3468 $\pm$ 1168
F3	2712 $\pm$ 246	3517 $\pm$ 1207
MF1	2194 $\pm$ 292	2373 $\pm$ 819
MF2	2372 $\pm$ 207	2106 $\pm$ 621
MF3	2632 $\pm$ 214	2561 $\pm$ 1265

Die aus den  $\text{NH}_4\text{-N}$ -Werten berechneten Werte der Konzentration an  $\text{NH}_3\text{-N}$  in Proben von Fermenterhalten zeigen durch den Einfluss des pH-Wertes verstärkte Schwankungen (Tabelle 16). Bei einem pH-Wert von 8 und einer Temperatur von 55°C liegen theoretisch ca. 30 % des ammoniakalischen Stickstoffs als Ammoniak vor (siehe Kapitel 4.5). Für Proben aus dem F2 errechneten sich maximale freie Ammoniak-Gehalte von bis zu ca. 1,3 g/l, für Proben aus dem MF2 von bis zu ca. 1,0 g/l.

Tabelle 16: Berechnete Konzentration an  $\text{NH}_3\text{-N}$  [mg/l] in Substratproben aus den Fermentern der Versuchsanlagen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
F1	231 $\pm$ 92	275 $\pm$ 128
F2	758 $\pm$ 234	1164 $\pm$ 491
F3	362 $\pm$ 167	438 $\pm$ 198
MF1	290 $\pm$ 94	161 $\pm$ 102
MF2	822 $\pm$ 188	525 $\pm$ 252
MF3	402 $\pm$ 131	208 $\pm$ 142

Freiem Ammoniak wird eine hemmende Wirkung auf den anaeroben Abbau zugeschrieben (ZEEMAN et al., 1985). ANGELIDAKI & AHRING (1993) beobachteten eine Beeinträchtigung des anaeroben Abbaus von Rindergülle unter thermophilen Bedingungen ab einer Ammoniak-Konzentration von ca. 0,7 g/l. Es wurde jedoch auch wiederholt eine Anpassung der Mikroorganismen an wesentlich höhere Ammoniak-Konzentrationen beschrieben. Eine Hemmung des anaeroben Abbaus in den thermophilen Fermentern der beiden Versuchsanlagen konnte nicht nachgewiesen werden.

Die in den Proben von Fermenterhalten gemessenen Gesamtkonzentrationen an flüchtigen Fettsäuren als Summenparameter waren zu Beginn des ersten Versuchsabschnittes zur Ermittlung von Leistungskennwerten der Pilotanlage noch deutlich erhöht (Abbildung 15 und Tabelle 17). Dieser Parameter ist ein häufig eingesetzter Indikator für Überlastungen bzw. Hemmungen der Methan bildenden Biozönose (siehe z. B. AHRING et al., 1995).

Bei einem mesophilen Prozess ist im allgemeinen erst ab einem Niveau von ca. 2000 mg/l FFS eine Hemmung des Abbauprozesses angezeigt (VAREL et al., 1980). Dieser Wert wurde im F1 im ersten Vierteljahr 2004 während des Hochfahrens der Anlage nach unterbrochener

Beschickung überschritten (Abbildung 15). Im F2 wurden während dieser Phase sehr hohe FFS-Konzentrationen gefunden, die eindeutig eine Destabilisierung des Abbauprozesses anzeigten. Das im Mittel niedrigere Niveau und die geringeren Schwankungen der FFS-Konzentration im zweiten Versuchsabschnitt (vierstündliche Beschickung) weisen darauf hin, dass sich die Anlage zu Beginn des ersten Versuchsabschnittes (stündliche Beschickung) noch nicht in einem stationären Zustand befand. Auch dann lagen die FFS-Konzentrationen in Proben aus dem F2 auf einem Niveau, das bei der gegebenen Raumbelastung für einen stationären thermophilen Prozess als relativ hoch erschien. Die FFS-Konzentrationen in Proben aus dem F3 bewegten sich durchgängig auf niedrigem Niveau unter 1000 mg/l und hier war zu keiner Zeit eine Destabilisierung des Abbauprozesses zu erkennen.

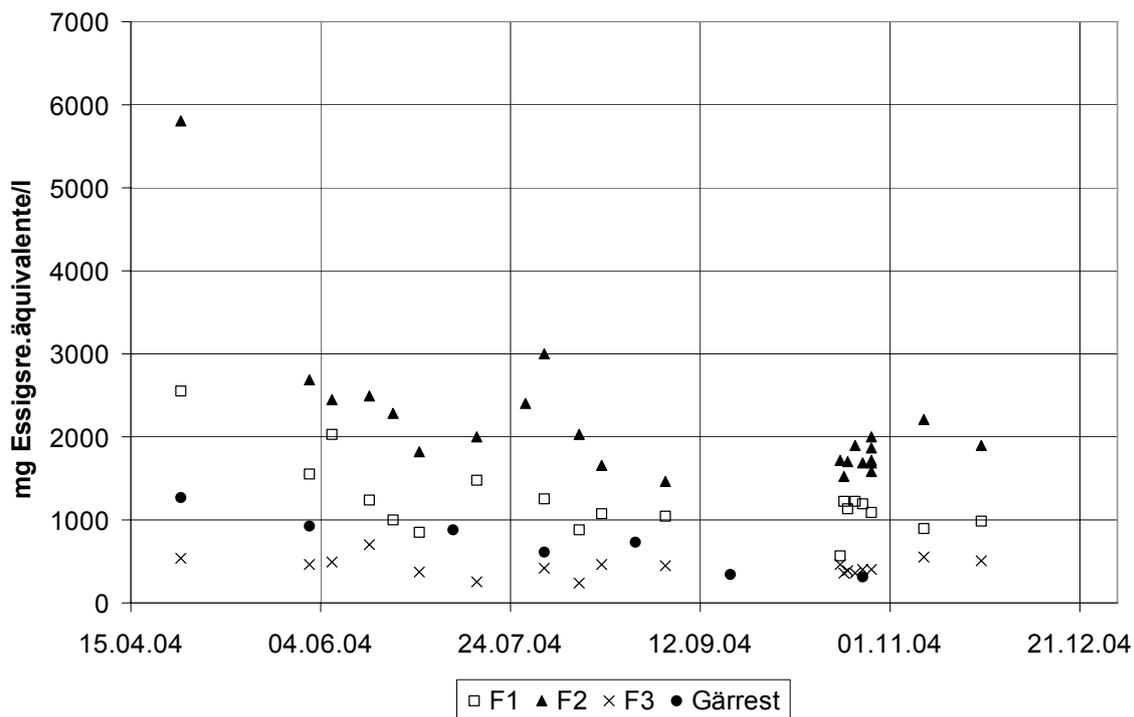


Abbildung 15: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (Summenparameter) in Proben von Fermenterhalten der Pilotanlage

Tabelle 17: Gehalte an flüchtigen Fettsäuren (Summenparameter) [mg/l] in Substratproben aus den Fermentern der Versuchsanlagen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 8-34 Proben)

	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
F1	1241 $\pm$ 361	1042 $\pm$ 224
F2	2207 $\pm$ 527	1790 $\pm$ 209
F3	427 $\pm$ 135	429 $\pm$ 73
MF1	1481 $\pm$ 331	2446 $\pm$ 546
MF2	1980 $\pm$ 484	1342 $\pm$ 180
MF3	390 $\pm$ 131	381 $\pm$ 154

Der insgesamt fallende Trend der FFS-Konzentration in den Proben aus den Fermentern 1 und 2 der Modellanlage in den ersten Monaten nach Wiederinbetriebnahme deutete an, dass trotz Befüllung der Fermenter mit aktivem Material eine gewisse Einfahrphase erforderlich war (Abbildung 16). Bis zum Ende des ersten Versuchsabschnittes nahm die FFS-Konzentration auf Werte um 1000 mg/l, welche dann nur noch geringfügig höher bzw. auf

demselben Niveau lagen wie in Proben aus dem MF1 und damit tendenziell niedriger als im thermophilen Fermenter der Pilotanlage. Als Folge der Überheizung des MF1 Ende August 2004 kam es dort zu einem sprunghaften Anstieg der FFS-Konzentration. In der Probe vom 03.09., einen Tag nachdem die Fermentertemperatur wieder auf den Sollwert 38°C zurückgeregelt worden war, wurde eine FFS-Konzentration von ca. 5600 mg Essigsäureäquiv./l gemessen. Die FFS-Konzentration blieb in der Folge nachhaltig erhöht. Nach eineinhalb Monaten war dieser Wert auf ca. 2500 mg/l zurückgegangen und erst am Ende der Beobachtungsperiode war wieder das Niveau erreicht, das bei gleichmäßigem Betrieb beobachtet worden war (Abbildung 16). Die hohen FFS-Konzentrationen im MF1 verursachten im nachgeschalteten MF2 einen leichten Anstieg der FFS-Konzentration. Die FFS-Konzentrationen in Proben aus dem MF3 lagen noch etwas unter denen im entsprechenden Fermenter der Pilotanlage.

Eine Veränderung der FFS-Konzentrationen als Folge der Umstellung des Beschickungsintervalles war in beiden Versuchsanlagen nicht erkennbar. Mit Ausnahme des MF1 – insbesondere im zweiten Versuchsabschnitt – lag das Konzentrationsniveau der FFS in Proben von der Modellanlage tendenziell niedriger als in der Pilotanlage (Tabelle 17).

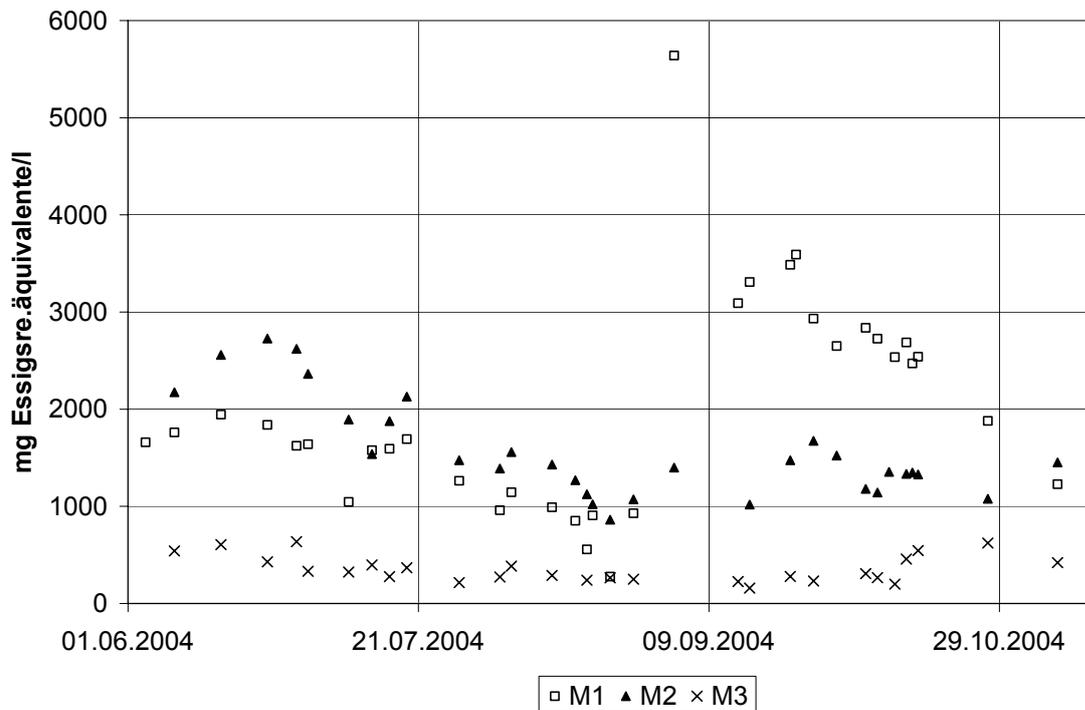


Abbildung 16: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (Summenparameter) in Proben von Fermenterhalten der Modellanlage

Genauere Aussagen über Beeinträchtigungen des Abbauprozesses als der Summenparameter liefert die Konzentration einzelner Fettsäuren. Dabei erwies sich nach AHRING et al. (1995) ein Anstieg der Konzentration der Buttersäureisomere als treffsicherster Indikator für eine Prozessstörung.

In Proben aus dem F1 wurden in den ersten beiden Beobachtungsmonaten nennenswerte Konzentrationen an höheren Fettsäuren nachgewiesen, insbesondere die beiden Isomere der Buttersäure und iso-Valeriansäure (Abbildung 17 und Abbildung 18). Im MF1 war die Störung des Prozessgleichgewichtes als Folge der Überheizung am Konzentrationsverlauf der

flüchtigen Fettsäuren gut nachzuvollziehen. Allerdings war in diesem Fall der Anstieg der Konzentration von iso-Valeriansäure deutlicher und nachhaltiger als der von iso-Buttersäure (Abbildung 18). In dieser Phase wurden iso-Buttersäure und iso-Valeriansäure in Konzentrationen bis 2,1 bzw. 3,0 mmol/l gefunden.

Ein größerer Indikator ist das Verhältnis Propion- / Essigsäure. In der Probe aus dem MF1 vom 03.09.2004 wurde eine Essigsäurekonzentration von 74 mmol/l gemessen, die in der Probe vom 14.09.2004 bereits wieder auf ca. 25 mmol/l zurückgegangen war (Abbildung 18). Die Propionsäurekonzentration stieg hingegen von einem geringen Wert von 0,8 mmol/l in der Probe vom 23.08.2004 mit Verzögerung auf einen erfassten Maximalwert von 16,7 mmol/l an, der in der Probe vom 11.10. bestimmt wurde. Dies bedeutete einen Anstieg des Verhältnisses Propion- / Essigsäure von 0,06 auf 1,13.

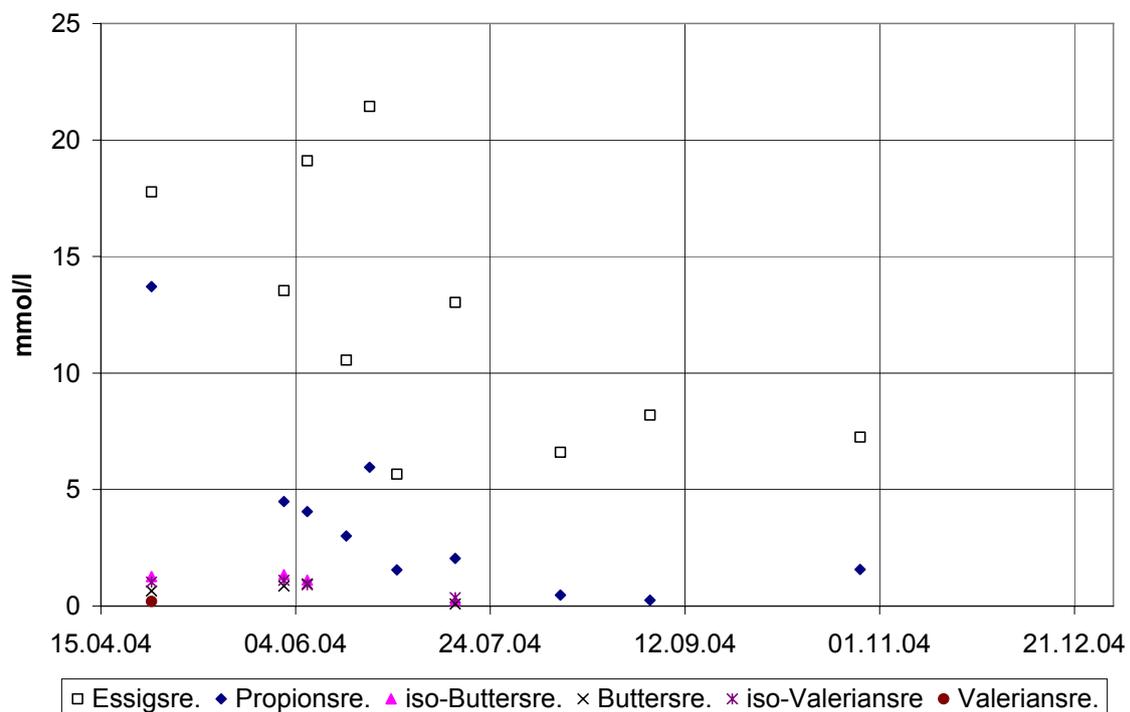


Abbildung 17: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (C2 bis C5) in Proben aus dem Ablauf des F1

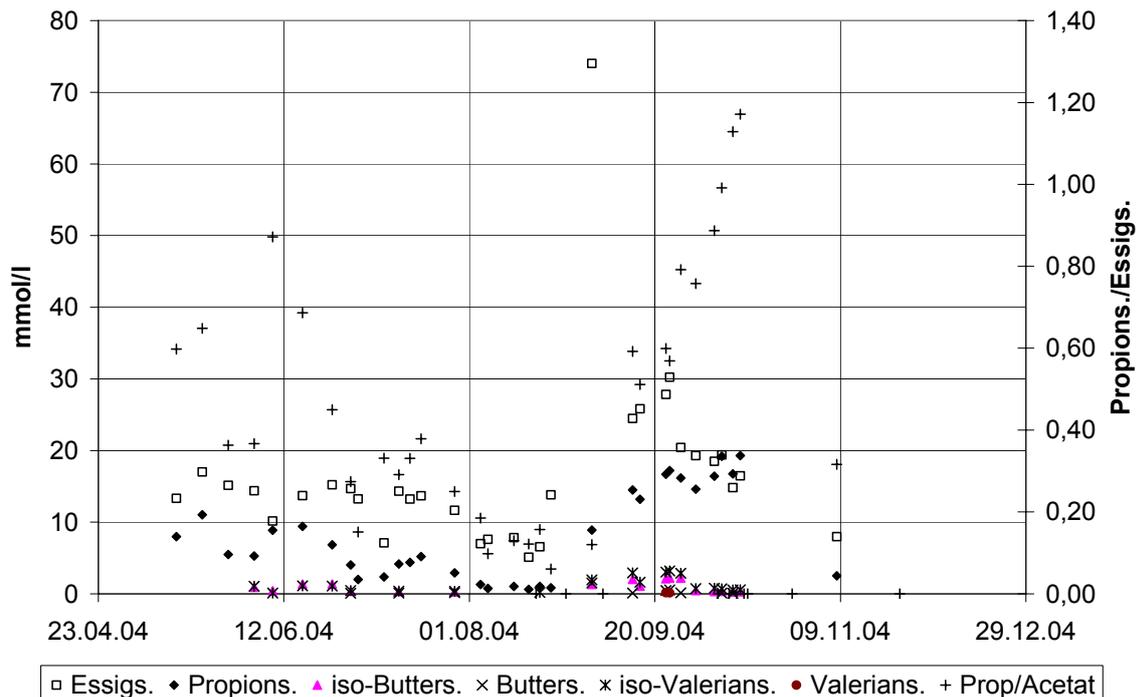


Abbildung 18: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (C2 bis C5) in Proben aus dem Modellfermenter 1

In Proben aus F2 wurde Ende April 2004 eine Propionsäurekonzentration von 16,5 mmol/l nachgewiesen, die dann jeweils eine fallende Tendenz zeigte. Bis Anfang Juni 2004 wurden in diesen Proben auch nennenswerte Konzentrationen an höheren Fettsäuren nachgewiesen, insbesondere die iso-Formen von Buttersäure und Valeriansäure (Abbildung 19). Aus den einzelnen Abschnitten des F2 wurden an vier Terminen Proben entnommen, jeweils an zwei Tagen Ende März 2004 und am 20./27.10.2004. Alle Proben zeigten einen pH-Wert zwischen 8,0 und 8,2. Klare Unterschiede der FFS-Konzentration in den einzelnen Fermenterabschnitten waren anhand dieser Proben nicht zu erkennen. Im Vergleich zu Laborstudien von MACKIE & BRYANT (1995), die bei thermophiler Vergärung von Rindergülle (Fütterung mit hohem Körneranteil) bei einer Raumbelastung von  $6 \text{ kg oTM} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$  eine Essigsäure- bzw. Propionsäurekonzentration von 1,6 bzw. 3,0 mmol/l fanden, waren die Essigsäurekonzentrationen im F2 als Folge der Beschickung mit dem Ablauf aus einer vorgeschalteten mesophilen Stufe und nicht mit Rohgülle auffällig hoch.

Leichte Anzeichen für ein Prozessungleichgewicht im MF2 zeigten sich im Juni/Juli 2004 sowie als Folge der Überheizung des MF1 Ende August 2004 (Abbildung 20). Im letzteren Fall war der Anstieg der Propionsäurekonzentration gegenüber Essigsäure wie auch im MF1 verzögert; das Verhältnis Propion- / Essigsäure stieg bis zum 16.09. auf 0,44. Auch aus den einzelnen Abschnitten des MF2 wurden vereinzelt Proben entnommen, wobei die FFS-Konzentrationen eine von vorne nach hinten abnehmende Tendenz zeigten; die wenigen Analysenwerte waren allerdings mit großen Schwankungen behaftet (Tabelle 28). In Proben aus F3 waren während des Berichtszeitraumes nur ganz zu Beginn geringe Konzentrationen an längererkettigen Fettsäuren als Essigsäure nachweisbar, in Proben aus dem Modellfermenter 3 praktisch gar nicht.

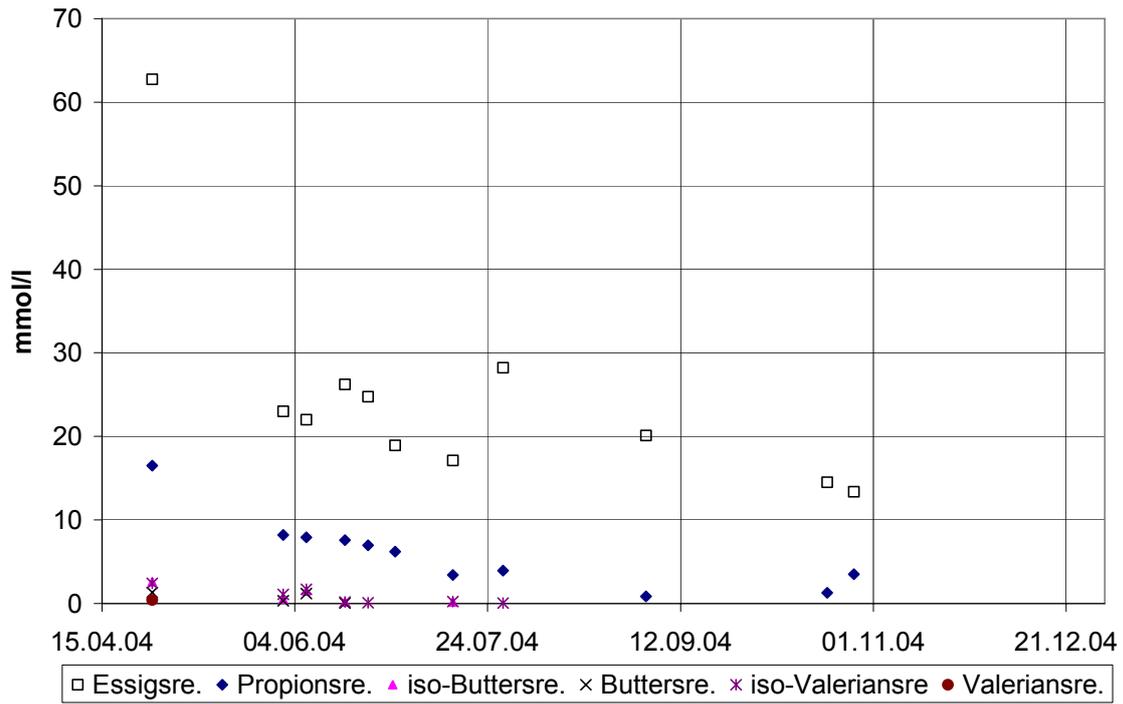


Abbildung 19: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (C2 bis C5) in Proben aus dem Ablauf des F2

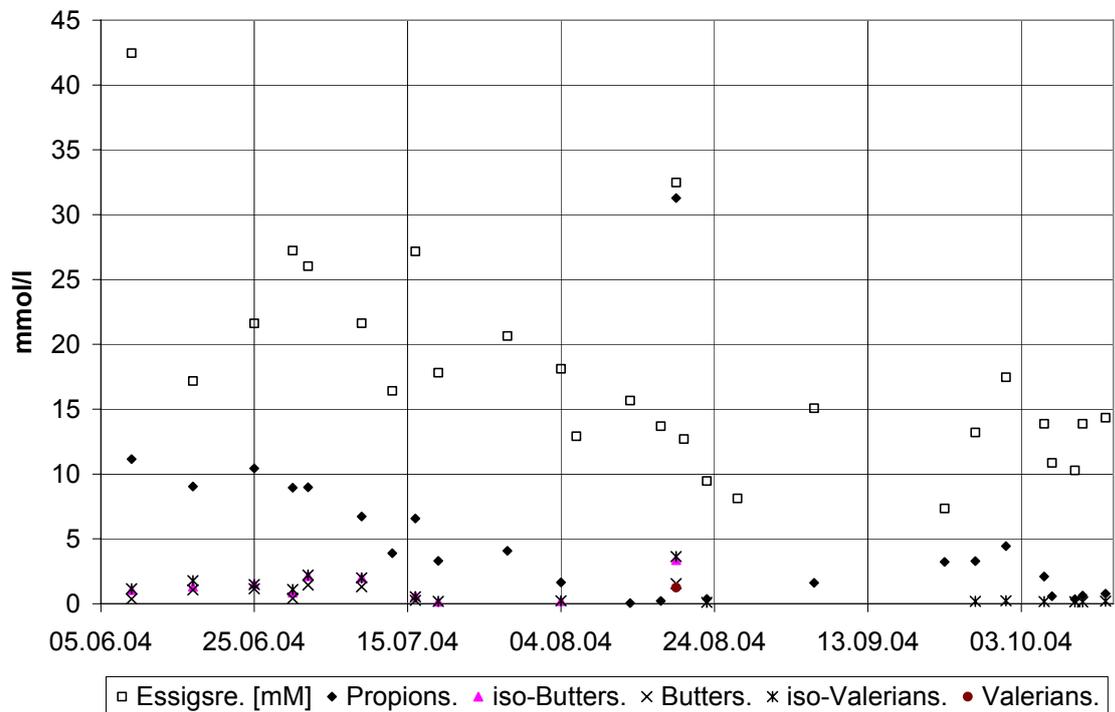


Abbildung 20: Gemessene Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren (C2 bis C5) in Proben aus dem Ablauf des Modellfermenters 2

Tabelle 18: Konzentration an FFS in Proben von 2004 aus den einzelnen Abschnitten des Modellfermenters 2 (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	FFS mg/l
Modellfermenter 2, 1. Kammer (n = 4)	3174 $\pm$ 604
Modellfermenter 2, 2. Kammer (n = 7)	2210 $\pm$ 1148
Modellfermenter 2, 3. Kammer (n = 4)	1638 $\pm$ 1138
Modellfermenter 2, 4. Kammer (n = 2)	1592 $\pm$ 843
Modellfermenter 2, Ablauf (n = 30)	1561 $\pm$ 500

AHRING et al. (1995) berichten von einer merklichen Hemmung des anaeroben Abbauprozesses von Rinder- und Schweinegülle durch Zugabe von Propionsäure bzw. iso-Valeriansäure bei einer Konzentration von 100 mM, während Konzentrationen einzelner flüchtiger Fettsäuren bis 50 mM lediglich als Hinweis auf ein sich anbahnendes Ungleichgewicht des Prozesses hindeuten würden. Demnach wurde lediglich im Falle der Überheizung des MF1 eine Destabilisierung des Abbauprozesses angezeigt, die sich auch deutlich auf die Gasproduktionsrate und -qualität auswirkte (siehe A 6.4).

#### **Fazit:**

Insbesondere im Falle der Pilotanlage war nach dem (Wieder-)Anfahren des Prozesses ein Zeitraum von mehreren Monaten erforderlich, bis sich in Bezug auf die Konzentration an flüchtigen Fettsäuren in den Fermentern 1 und 2 ein stationärer Prozess eingestellt hatte. Auch bei weitgehend stationärem Betrieb war die FFS-Konzentration in den thermophilen Fermentern tendenziell höher als typischerweise für einen einstufigen Prozess zu erwarten, ohne dass eine Instabilität des Abbauprozesses angezeigt wurde.

Klare Hinweise auf eine Destabilisierung des anaeroben Abbauprozesses im MF1 zeigten sich als Folge der vorübergehenden Überheizung um ca. 10 K in Form deutlich erhöhter Konzentrationen an höheren flüchtigen Fettsäuren (Propionsäure, Buttersäureisomere und iso-Valeriansäure) und einer verringerten Gasproduktionsrate- und -qualität.

Der pH-Wert lieferte in dem stark gepufferten Substrat Milchviehgülle keinerlei Hinweise auf eine Instabilität des Prozesses.

Eine Hemmung des anaeroben Abbaus in der thermophilen Stufe durch  $\text{NH}_3\text{-N}$  konnte nicht nachgewiesen werden.

#### **A 6.3.2 Stoffumsatz**

Zur Beurteilung des Abbaus der in der Gülle enthaltenen organischen Substanz wurden neben der Bestimmung des Gehaltes an organischer Trockenmasse (oTM; Tabelle 19 und Tabelle 20) an einem Teil der Proben auch Analysen des chemischen Sauerstoffbedarfes (CSB) durchgeführt (Tabelle 21). Beide Größen wurden aus Gründen der besseren Handhabbarkeit an getrockneten Proben bestimmt. Der oTM-Gehalt wird aus dem Massenverlust während des Verglühens der getrockneten Probe ermittelt und wäre deshalb genauer als organischer Trockenrückstand zu bezeichnen. Im Glührückstand verbleiben alle mineralischen Bestandteile, die sich bei einer Glühtemperatur von 550°C nicht verflüchtigen. Der CSB ist eine abwassertechnische Kenngröße, mit der all jene (organischen) Abwasserinhaltsstoffe erfasst werden, die unter bestimmten Bedingungen oxidiert werden können (siehe auch ANON., 1981). Er wird als Masse an Sauerstoff, die für die Oxidation der oxidierbaren Abwasserinhaltsstoffe nötig ist, ausgedrückt und ist damit auch ein Maß für die Menge an enthaltenen organischen Verbindungen. Aus der gebildeten Biogasmenge und dem Methananteil lässt sich über eine stöchiometrische Betrachtung die abgebaute CSB-Menge

berechnen (siehe Kap. 4.7.3). Tendenziell waren die relativen Schwankungen der Analysenwerte des CSB größer als diejenigen des oTM-Gehaltes.

Tabelle 19: Trockenmassegehalte [Massen-% der Frischmasse] der Substratproben aus den Versuchsanlagen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 13-35 Proben)

	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
F1	6,7 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,2
F2	6,1 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,1
F3	5,8 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,1
MF1	6,7 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,1
MF2	6,1 $\pm$ 0,2	5,9 $\pm$ 0,1
MF3	5,8 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,1

Tabelle 20: Organische Trockenmassegehalte [g/kg] der Substratproben aus den Versuchsanlagen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 13-35 Proben)

	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
F1	50,9 $\pm$ 2,7	55,0 $\pm$ 2,3
F2	44,7 $\pm$ 3,1	47,9 $\pm$ 1,3
F3	40,3 $\pm$ 3,0	41,8 $\pm$ 0,9
MF1	49,9 $\pm$ 0,9	50,5 $\pm$ 0,9
MF2	44,4 $\pm$ 0,9	43,6 $\pm$ 2,0
MF3	40,1 $\pm$ 1,6	37,5 $\pm$ 1,0

Tabelle 21: CSB-Gehalte [g/kg] der Substratproben aus den Versuchsanlagen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 5-26 Proben)

	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
F1	69,8 $\pm$ 9,2	81,8 $\pm$ 3,3
F2	64,0 $\pm$ 4,8	75,2 $\pm$ 1,7
F3	55,6 $\pm$ 7,8	64,9 $\pm$ 1,4
MF1	73,3 $\pm$ 2,7	77,5 $\pm$ 4,5
MF2	66,9 $\pm$ 6,5	63,3 $\pm$ 12,1
MF3	60,9 $\pm$ 4,5	58,8 $\pm$ 2,8

Eine direkte numerische Vergleichbarkeit der Werte des oTM-Gehaltes und des CSB ist nicht gegeben. Es ist jedoch anzunehmen, dass sich das Verhältnis dieser beiden Werte für einen bestimmten Substrattyp in einem relativ engen Bereich bewegt. Die in Proben von den Versuchsanlagen gefundenen Werte lagen größtenteils zwischen 1,4 und 1,6 (Tabelle 22 und Tabelle 23).

Tabelle 22: Verhältnis CSB/oTM in Proben von Rohgülle und Fermenterinhalt und Gärrest (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	<b>04-12/2004</b>	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
Rohgülle	1,42 $\pm$ 0,13	1,41 $\pm$ 0,17	1,48 $\pm$ 0,04
F1	1,45 $\pm$ 0,13	1,39 $\pm$ 0,19	1,50 $\pm$ 0,03
F2	1,53 $\pm$ 0,07	1,50 $\pm$ 0,05	1,56 $\pm$ 0,06
F3	1,48 $\pm$ 0,07	1,42 $\pm$ 0,06	1,52 $\pm$ 0,04

Tabelle 23: Verhältnis CSB/oTM in Proben aus dem Vorlagebehälter und den Fermentern der Modellanlage (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
Rohgülle	1,45 $\pm$ 0,20	1,49 $\pm$ 0,11
MF1	1,47 $\pm$ 0,06	1,53 $\pm$ 0,11
MF2	1,52 $\pm$ 0,14	1,53 $\pm$ 0,13
MF3	1,55 $\pm$ 0,10	1,56 $\pm$ 0,10

Die organische Trockenmasse der auf dem Hof Schweiger anfallenden Gülle wies im Vergleich mit Literaturangaben einen hohen Ligningehalt auf, der auf die hohen Anteile von Grassilage und Heu im Futter der Milchkühe sowie die Einstreu mit Strohmehl zurückzuführen ist. Dieser Anteil ist anaerob praktisch nicht abbaubar. Unter Annahme eines mittleren Glührückstandes von ca. 22 % (Anhang 3) ergibt sich daraus für den theoretischen, anaerob abbaubaren Anteil der organischen Trockenmasse ein Wert von ca. 69 %. GOSCH (1984) nennt für den theoretischen Abbaugrad der organischen Trockenmasse in Milchviehgülle einen Wertebereich von 68-76 %.

Tabelle 24: Zusammenstellung von Werten der Weender- und vanSoest-Analyse der organischen Trockenmasse von Gülle unterschiedlicher Herkunft (Mittelwerte; Angaben in % der Trockenmasse)

Quelle	Tierart / Futter	Rohprotein	Rohfett	Rohfaser	Cellulose	Hemicell.	Lignin
vorliegende Arbeit	Milchvieh / TMR Grassilage	15,0	4,9	16,4	11,4	12,9	23,9
Kaiser, 2005	Milchvieh / k. A.	18,4	3,2	27,4	k. A.	k. A.	15,2
Wohlt et al., 1990	Milchvieh / Mais- u. Grassilage	20,0	k. A.	k. A.	20,8	13,1	9,5
Varel et al., 1977	Stiere / 70 % Mais, 20 % Hafer	k. A.	k. A.	k. A.	17,0	19,0	6,8
Hashimoto, 1983	Rinder / 98 % Mais	k. A.	k. A.	k. A.	11,9	6,7	2,6

Die Berechnung der Abbaugrade der oTM auf Basis der chemischen Analysen von Rohgülle und Fermenterhalten ergab für die Fermenterkaskade der Pilotanlage für beide Versuchsabschnitte einen mittleren Wert von 35 % (Tabelle 25). Die geringfügigen Unterschiede des Abbaus in den einzelnen Fermentern waren auf der verfügbaren Datenbasis nicht statistisch abgesichert.

Tabelle 25: Mittlere Abbaugrade der oTM in der Pilot-Biogasanlage und Anteile der einzelnen Fermenter am oTM-Abbau bis zum F3

	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
Rohgülle – Fermenter 1	20 %	19 %
Rohgülle – Fermenter 2	26 %	26 %
Rohgülle – Fermenter 3	35 %	35 %
Anteil Fermenter 1	57 %	55 %
Anteil Fermenter 2	17 %	20 %
Anteil Fermenter 3	26 %	25 %

Wegen der Wasserzugabe ins Endlager konnten aus den chemischen Analysen keine oTM-Abbaugrade von der Rohgülle bis zum Gärrest berechnet werden. Aus den Werten der absoluten Methanausbeute wurde jedoch die gesamte abgebaute Menge an CSB berechnet. Unter Verwendung der mittleren Werte des Verhältnisses CSB/oTM (Tabelle 22) wurde die der Anlage zugeführte und in den einzelnen Fermentern abgebaute Menge an CSB abgeschätzt. Aus dieser CSB-Bilanz errechneten sich für die Fermenter 1-3 bzw. die gesamte Anlage mittlere CSB-Abbaugrade von 49 bzw. 35 % und 46 bzw. 33 %. Dies würde bedeuten, dass im Gärrestlager weitere 14 bzw. 13 % Abbau des mit der Rohgülle zugeführten CSB oder anteilmäßig 29 bzw. 28 % des gesamten CSB-Abbaus stattfanden.

Aus den zur Verfügung stehenden Ergebnissen der Weender-Analyse von Rohgülle und Fermenterhalten (4 bzw. 5 Proben in 2004) wurden für die Stoffgruppen Rohprotein, Rohfett, Rohfaser und N-freie Extraktstoffe bis zum F3 mittlere Abbaugrade von 20, 27, 31 und 29 % errechnet. Die Tatsache, dass der Abbaugrad der Rohfaser rechnerisch höher lag als derjenige der N-freien Extraktstoffe, weist auf ein analytisches Problem hin: Die Methode der Rohfaserbestimmung erfasst nur einen mehr oder weniger großen Anteil der pflanzlichen Gerüstsubstanzen (Cellulose, Hemicellulose, Lignin), der in Lösung verbleibende Anteil wird rechnerisch den N-freien Extraktstoffen zugeschlagen.

Die Berechnung der Abbaugrade der oTM auf Basis der chemischen Analysen von Rohgülle und Fermenterhalten ergab für die Fermenterkaskade der Modellanlage einen Wert von 30 bzw. 35 % für die beiden Versuchsabschnitte. Der Großteil des oTM-Abbaus erfolgte mit 47 % bzw. 42 % im MF1, während die Modellfermenter 2 und 3 Beiträge von 30 % bzw. 24 % und 23 bzw. 34 % leisteten (Tabelle 26). Für den CSB-Abbau ergab sich auf Basis der aus den mittleren Werten des Verhältnisses CSB/oTM geschätzten CSB-Frachten ein Abbaugrad von 26 bzw. 32 %. Trotz einer um ca. 10 % geringeren hydraulischen Verweilzeit im zweiten Versuchsabschnitt war damit der Abbaugrad bei vierstündlicher Beschickung der Modellanlage etwas höher und zwar im wesentlichen aufgrund eines deutlich verbesserten Abbaus im MF3.

Tabelle 26: Mittlere Abbaugrade der oTM in der Modell-Biogasanlage und Anteile der einzelnen Fermenter am oTM-Abbau

	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
Rohgülle – Modellfermenter 1	14 %	15 %
Rohgülle – Modellfermenter 2	24 %	23 %
Rohgülle – Modellfermenter 3	30 %	35 %
Anteil Modellfermenter 1	47 %	42 %
Anteil Modellfermenter 2	30 %	24 %
Anteil Modellfermenter 3	23 %	34 %

Im Vergleich der Pilot- und Modellanlage ließ sich anhand dieser Daten kein klarer Unterschied der ermittelten Abbaugrade der organischen Substanz (ermittelt als organischer Anteil des Trockenrückstandes) in den Fermenterkaskaden erkennen, obwohl die mittlere hydraulische Verweilzeit in der Modellanlage in den beiden Versuchsabschnitten um ca. 10 bzw. 20 % geringer war als in der Pilotanlage. Allerdings gab es zwischen den beiden Anlagen Unterschiede in den Abbauleistungen der einzelnen Stufen: In der Modellanlage war die Abbauleistung des ersten Fermenters jeweils um etwa 20 % geringer als im entsprechenden Fermenter der Pilotanlage, was im Einklang mit der kürzeren Verweilzeit steht. Für den Modellfermenter 3 war das Bild hingegen uneinheitlich: Hier war bei stündlicher Beschickung die Abbauleistung schlechter, bei vierstündlicher Beschickung besser als diejenige des Fermenters 3 der Pilotanlage. Im Vergleich mit Literaturdaten

erscheint der in der Fermenterkaskade erzielte Abbaugrad der oTM als durchschnittlich. In einer älteren Erhebung zu landwirtschaftlichen Biogasanlagen in Europa wird für den Abbaugrad der oTM in Rindergülle bei mesophiler Vergärung mit einer Verweilzeit von 18 Tagen ein Wert von 33 % angegeben (EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFTEN, 1985). GOSCH (1984) gibt für die mesophile Vergärung von Rindergülle bei üblichen Raumbelastungen von 2-6 kg oTM\*(m<sup>3</sup>\*d)<sup>-1</sup> einen Wertebereich des Abbaugrades von 25-40 % an und ermittelte in einer Praxisanlage bei einer Raumbelastung von 5,6 kg oTM\*(m<sup>3</sup>\*d)<sup>-1</sup> einen Abbaugrad der oTM von 29 %. In weiteren Versuchen war die Abhängigkeit des Abbaugrades von der Raumbelastung im obengenannten Bereich gering ausgeprägt. Dies ist als Folge des hohen Anteils an unter mesophilen Bedingungen nur langsam anaerob abbaubaren Bestandteilen in Rindergülle zu sehen (s. o.).

Wird aus den obigen Angaben jeweils der untere Wert für den erzielten bzw. theoretischen Abbaugrad angenommen, so ergibt sich eine ungefähre Abbaueffizienz der oTM in Rinderflüssigmist von  $25 / 68 = 37 \%$ . In der Fermenterkaskade der Pilotanlage wurde dementsprechend eine Abbaueffizienz von  $35 / 69 = 51 \%$  erzielt, dies allerdings bei einer relativ langen hydraulischen Verweilzeit von ca. 45 Tagen (vgl. Kap. 4.7.2).

Im Zuge der anaeroben Behandlung der Milchviehgülle in der Pilotanlage nahm der Anteil an mineralischem Stickstoff (NH<sub>4</sub>-N) an der Trockenmasse signifikant zu. Auf Basis der Analysenwerte aus dem Jahr 2004 betrug die Zunahme des Verhältnisses von ammoniakalischem Stickstoff zur Gesamtstickstoff in der Trockenmasse der Gärrestproben im Vergleich zu den Proben von Rohgülle 21,6 % (Tabelle 27), eine für die Vergärung von Rindergülle typische Größenordnung (SCHULZ, 1991). Ein signifikanter Unterschied zwischen den NH<sub>4</sub>-N-Anteilen der Proben aus F3 und von Gärrest war nicht gegeben.

Tabelle 27: Mittlere Stickstoffgehalte ( $\pm$  Standardabweichung) in Proben von Rohgülle, Fermenterinhalt und Gärrest und Mittelwertvergleich ( $\alpha = 5 \%$ )

	N <sub>ges.</sub> % der TM		NH <sub>4</sub> -N % der TM		NH <sub>4</sub> -N/N <sub>ges.</sub> -		Veränderung NH <sub>4</sub> -N/N <sub>ges.</sub> %
2003-2004:							
Rohgülle	2,40 $\pm$ 0,42	A	2,80 $\pm$ 0,61	A	0,57 $\pm$ 0,12	A	-
Fermenter 3	2,56 $\pm$ 0,10	B	4,63 $\pm$ 1,19	B	0,63 $\pm$ 0,04	B	+ 10,3
Gärrest	2,67 $\pm$ 0,22	B	4,36 $\pm$ 2,53	B	0,64 $\pm$ 0,08	B	+ 12,1
2004:							
Rohgülle	2,39 $\pm$ 0,08	A	2,73 $\pm$ 0,67	A	0,55 $\pm$ 0,04	A	-
Fermenter 3	2,51 $\pm$ 0,09	B	4,85 $\pm$ 1,38	B	0,65 $\pm$ 0,03	B	+ 17,1
Gärrest	2,59 $\pm$ 0,10	B	5,76 $\pm$ 2,93	B	0,67 $\pm$ 0,08	B	+ 21,6

Durch den Abbau der organischen Substanz und die Abfuhr von Kohlenstoff über das Biogas nimmt im Verlauf der Methangärung das C/N-Verhältnis in der Gülle ab. Basierend auf Analysendaten aus 2004 betrug das C/N-Verhältnis in der Rohgülle 13,8, im Gärrest 6,4.

#### Fazit:

Im Vergleich der Pilot- und Modellanlage ließ sich kein klarer Unterschied der ermittelten Abbaugrade der organischen Trockenmasse in den Fermenterkaskaden erkennen, obwohl die mittlere hydraulische Verweilzeit in der Modellanlage in den beiden Versuchsabschnitten um ca. 10 bzw. 20 % geringer war als in der Pilotanlage. Unterschiede ergaben sich bei der Abbauleistung der einzelnen Fermenter, wobei in allen Fällen der größte Anteil des Abbaus

bereits in der ersten, mesophilen Stufe beobachtet wurde. Bezogen auf den theoretisch abbaubaren Anteil der oTM zeigte die Fermenterkaskade eine Abbaueffizienz von ca. 51 % bei einer relativ langen hydraulischen Verweilzeit von 45 Tagen. Im Gärrestlager der Pilotanlage fand ein weiterer nennenswerter Abbau organischer Substanz statt.

Die Zunahme des anorganischen Stickstoffanteils während des anaeroben Abbaus der Rohgülle in der Pilotanlage von ca. 22 % war im Einklang mit entsprechenden Literaturangaben.

#### A 6.4 Biogaszusammensetzung und –produktionsrate

Während des Anfahrens der Pilotanlage stieg der in der Sammelleitung zum BHKW gemessene Methangehalt im Biogas bis Anfang April 2003 auf ca. 58 Vol.-%. Bei Korrektur um den gemessenen Restsauerstoffgehalt ergab sich daraus ein theoretischer Methangehalt im Biogas von etwas über 60 Vol.-%. Mitte Juli 2003 sank der Methangehalt als Folge des vorübergehenden Aufheizens des F3 auf 55°C auf 53 Vol.-% ab und erreichte das vorherige Niveau von ca. 60 Vol.-% erst wieder nach ca. zweieinhalb Wochen, als der Fermenter auf etwa 43°C abgekühlt war (siehe Kap. 5.3).

Von Mitte September 2003 bis Mai 2004 zeigte der gemessene Methangehalt Schwankungen zwischen 47 und 60 Vol.-% (rechnerisch korrigierter Methangehalt: ca. 53-63 Vol.-%). Am 25.02.2004 wurde das Gasanalysegerät neu kalibriert, wobei eine Drift des Messwertes für den Methangehalt von ca. 1,5 Vol.-% absolut festgestellt wurde. Während der ausgewerteten Versuchsabschnitte bewegten sich die Messwerte des Methangehaltes im Biogas in der Zuleitung zum BHKW zwischen 52,0 und 62,9 Vol.-% (rechnerisch korrigiert: 54,7-60,9 Vol.-%; Abbildung 21). Wurden größere Mengen an Gärrest entnommen, kam es zu einer Einsaugung von Luft, teilweise erkennbar an verringerten Messwerten des Methangehaltes im Biogas (z. B. am 07.09.2004).

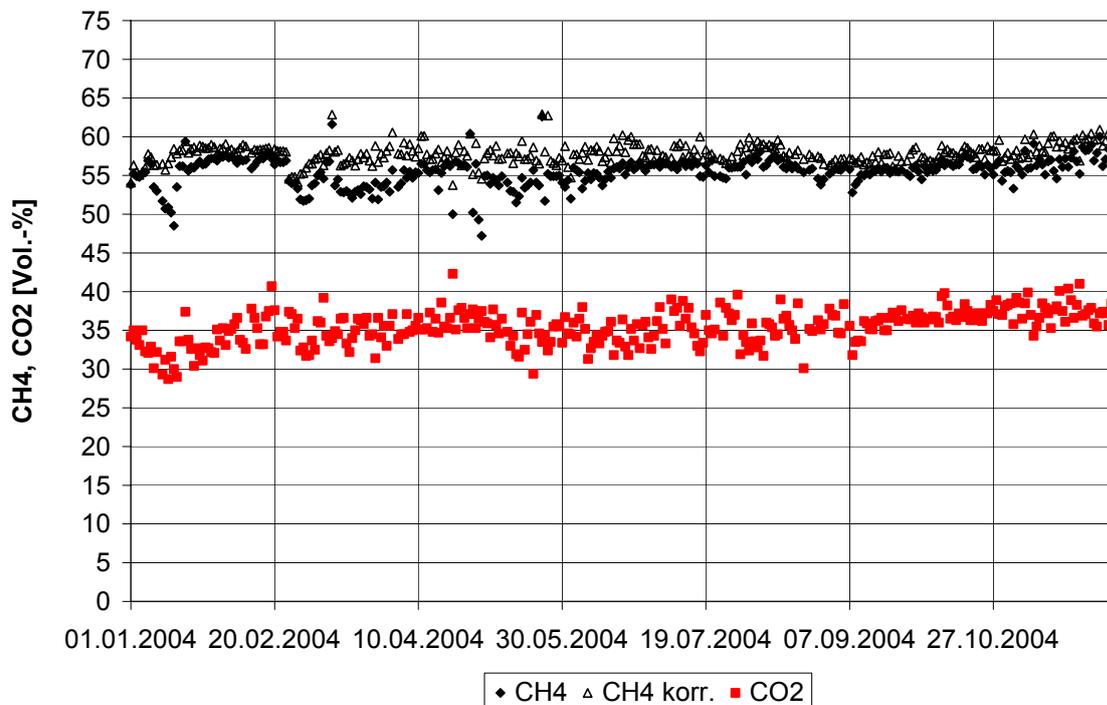


Abbildung 21: Zeitreihe der täglich gemessenen Methan- und Kohlendioxidgehalte im Biogas in der Zuleitung zum BHKW der Pilotanlage in 2004

Der gemessene  $\text{H}_2\text{S}$ -Gehalt im Biogas war während des Betriebes der Pilotanlage starken Schwankungen unterworfen. Bei sehr kalter Witterung wurden Spitzenwerte der  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration im Biogas bis zu 3800 ppm gemessen. Auch bei milden Außentemperaturen wurden jedoch wiederholt  $\text{H}_2\text{S}$ -Konzentration über dem Richtwert des Motorenherstellers von 200 ppm gemessen (Abbildung 22). Eine Korrelation zwischen den gemessenen Sauerstoff- und Schwefelwasserstoffkonzentrationen im Biogas war nicht erkennbar.

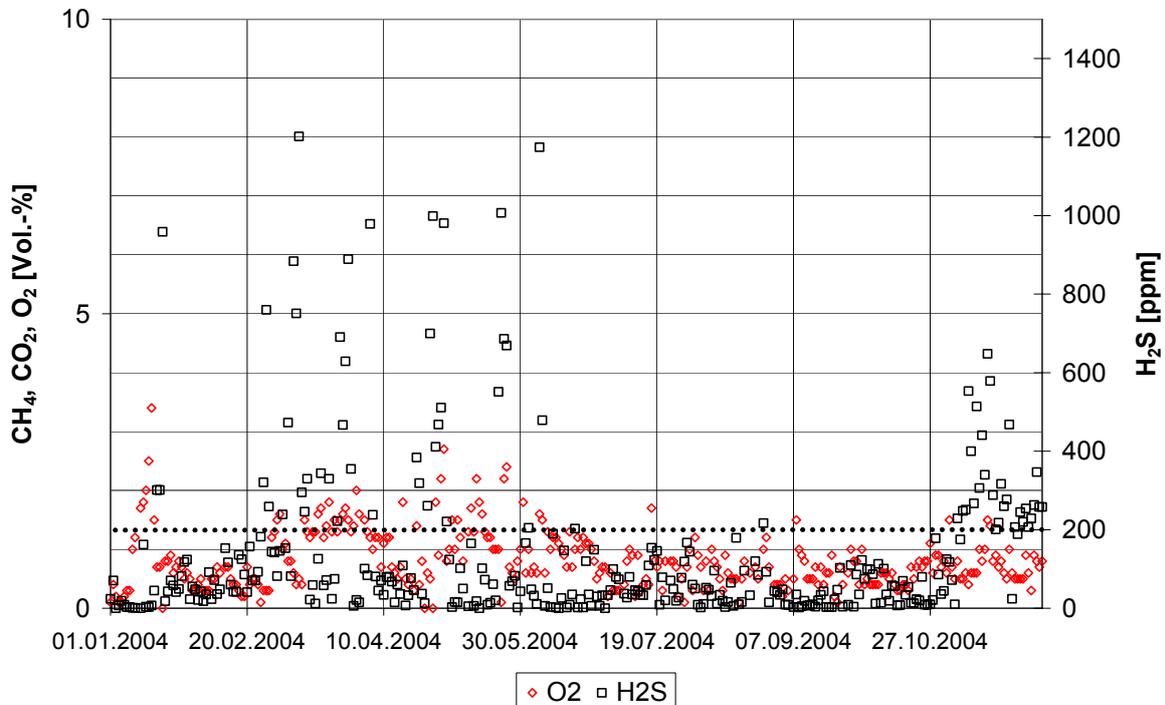


Abbildung 22: Zeitreihe der täglich gemessenen Sauerstoff- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas in der Zuleitung zum BHKW der Pilotanlage in 2004

Die an einzelnen Tagen ermittelten Methangehalte des Biogases im Gasdom des F1 lagen zwischen 42,8 und 58,9 Vol.-% (Abbildung 23; um den Sauerstoffgehalt korrigierte Werte: 54,5-62,4 Vol.-%). Die hier über den Projektzeitraum gemessenen  $\text{H}_2\text{S}$ -Gehalte streuten über einen weiten Bereich von unter 100 bis etwas über 1000 ppm. Wegen der Luftzufuhr für die Entschwefelung wies das Gas aus diesem Fermenter Sauerstoffgehalte von mehreren Vol.-% auf.

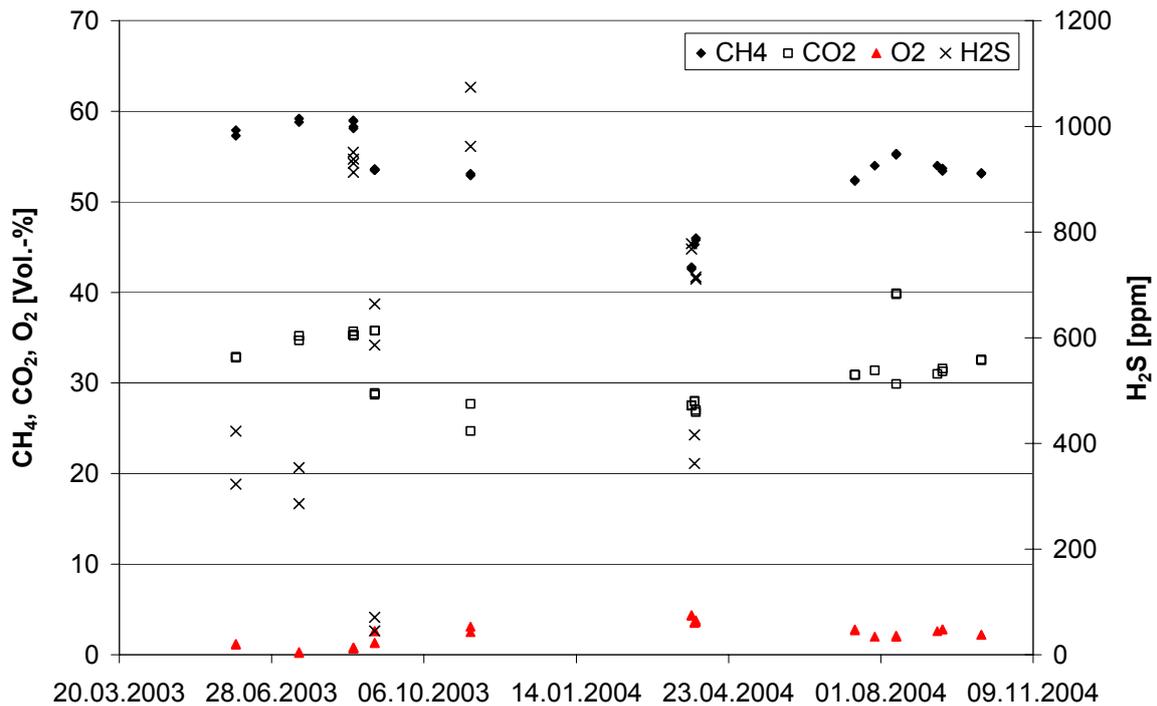


Abbildung 23: Messwerte von Einzelmessungen der Biogaszusammensetzung im Gasdom des Fermenters 1 der Pilotanlage

Das Biogas aus dem Fermenter 2 wies im Vergleich der drei Fermenter die höchsten Schwefelwasserstoffgehalte auf. Bei Messungen um März/April 2004 lagen die mittleren H<sub>2</sub>S-Gehalte in Biogas aus den Gasdomen des F2 zwischen ca. 1350 und 3600 ppm, im Biogas aus den Fermentern 1 bzw. 3 bei 650 bzw. 350 ppm. Vereinzelt wurde bei Messungen in 2003 sogar die obere Grenze des Messbereiches von 5000 ppm H<sub>2</sub>S überschritten. Die Sauerstoffgehalte lagen in allen vier Gasdomen des F2 meist unter 1,5 Vol.-%. Bei monatlichen Messungen von Juli bis Oktober 2004 war der mittlere gemessene Methangehalt im Biogas aus dem F2 mit Werten zwischen 43,7 und 52,9 Vol.-% (korrigiert: 45,8-56,9 Vol.-%) signifikant niedriger als im Biogas aus dem F1 (Abbildung 24 und Tabelle 28). Die Unterschiede zwischen den mittleren Methangehalten im Biogas aus den vier Gasdomen des F2 waren jedoch nicht signifikant ( $\alpha = 5\%$ ).

In der Gashaube des F3 lag eine Mischung des Biogases aus den Fermentern 1 bis 3 vor. Die Abweichungen zwischen der dort und in der Gaszufuhrleitung zum BHKW gemessenen Biogaszusammensetzung ergaben sich durch Vermischung mit dem Biogas aus dem Gärrestlager und die Verminderung des Feuchtegehaltes des Biogases durch die Bodenpassage (Tabelle 28). Die Zusammensetzung des im Gärrestlager gebildeten Biogases wurde nicht analysiert.

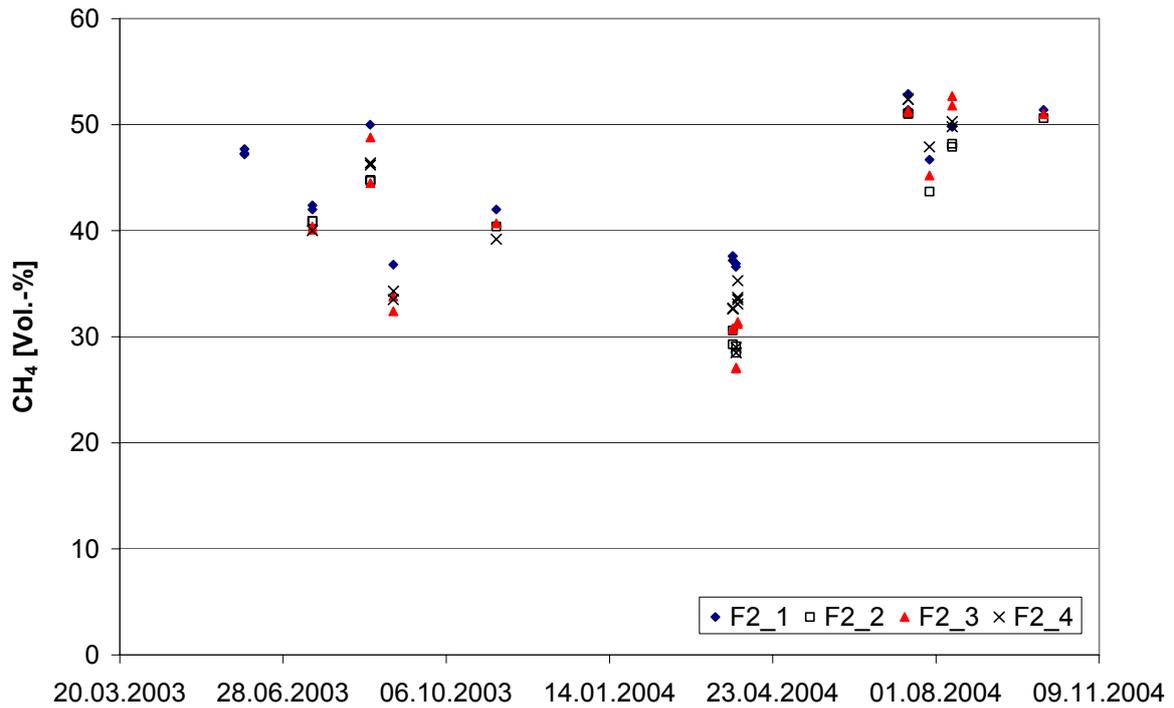


Abbildung 24: Messwerte von Einzelmessungen des Methangehaltes in den Gasdomen des Fermenters 2 der Pilotanlage

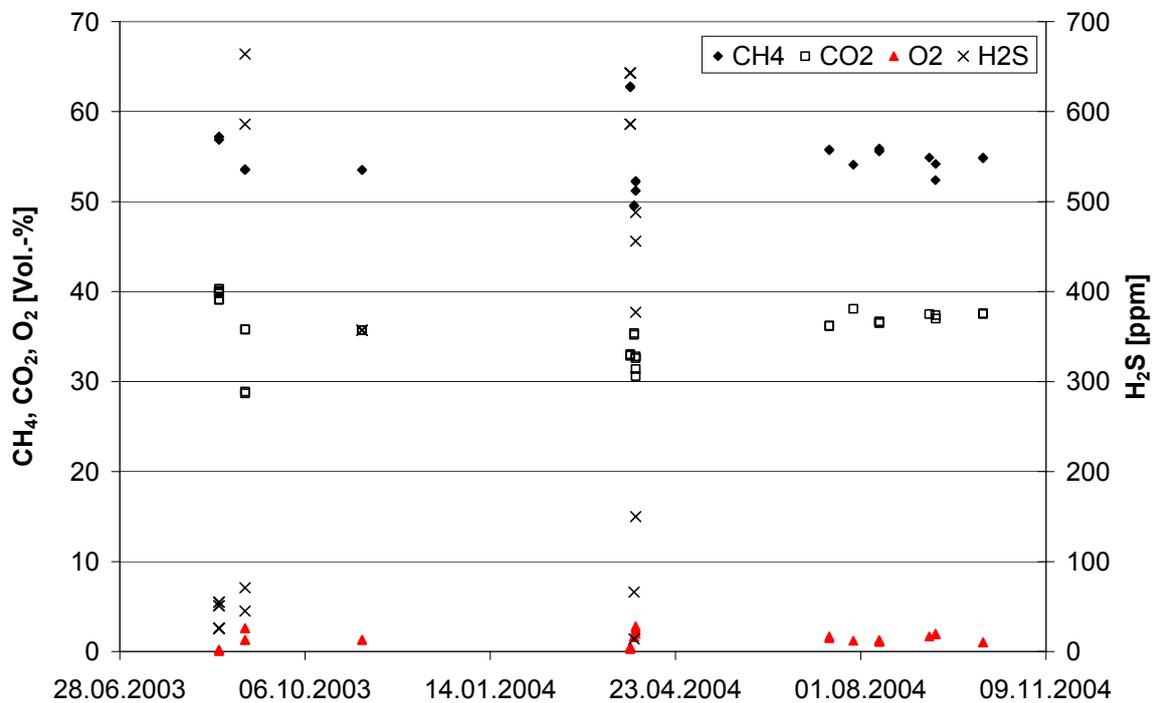


Abbildung 25: Messwerte von Einzelmessungen der Biogaszusammensetzung im Gasdom des Fermenters 3 der Pilotanlage

Tabelle 28: Gemessene Biogaszusammensetzung im Biogas aus den einzelnen Fermentern und der Gaszufuhrleitung des BHKW der Pilotanlage (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Messungen in 2003 und 2004)

	<b>CH<sub>4</sub></b> Vol.-%	<b>CO<sub>2</sub></b> Vol.-%	<b>O<sub>2</sub></b> Vol.-%	<b>H<sub>2</sub>S</b> ppm
F1 (n = 11)	53,8 $\pm$ 1,1	32,9 $\pm$ 3,5	2,4 $\pm$ 0,4 <sup>§</sup>	n.b.
F2/1 (n = 6)	50,3 $\pm$ 2,1	46,4 $\pm$ 2,3	0,9 $\pm$ 0,3	n.b.
F2/2 (n = 6)	48,8 $\pm$ 2,8	49,7 $\pm$ 2,0	0,8 $\pm$ 0,2	n.b.
F2/3 (n = 6)	50,5 $\pm$ 2,7	47,8 $\pm$ 2,4	1,0 $\pm$ 0,2	n.b.
F2/4 (n = 6)	50,7 $\pm$ 1,7	47,2 $\pm$ 1,4	0,9 $\pm$ 0,2	n.b.
F3* (n = 12)	55,0 $\pm$ 1,0	37,0 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,4	n.b.
Zufuhrleitung BHKW (n = 240)	55,9 $\pm$ 1,7	36,2 $\pm$ 2,1	0,8 $\pm$ 0,4	137 $\pm$ 206

n.b., nicht bestimmt; \*, Mischgas aus F1 bis 3; §, Luftzufuhr für biologische Entschwefelung

Die Analyse der Zusammensetzung des Biogases aus den einzelnen Fermentern der Modellanlage erfolgte nach Sammlung des Biogases in einem Beutel (siehe Kap. 4.4.2). Da der Gasbeutel nicht restlos entleert werden konnte und es zu Verschleppungen innerhalb des Gasleitungssystems kam, konnte die Vermischung von Biogas aus verschiedenen Fermentern nicht vollständig vermieden werden. Daher wurden grundsätzlich jeweils nur die Messwerte der zweiten Stunde nach Umschaltung der Messstelle ausgewertet. Dann noch vereinzelt auftretende Ausreißerwerte wurden für die Datenauswertung in Tabelle 29 manuell aussortiert, in den Diagrammen der Zeitreihen jedoch mit dargestellt. Zwischen dem 06.08. und 14.08. sowie vom 22.09. bis zum 15.10.2004 kam es zu einem Verlust der Daten zur Biogasproduktion und –zusammensetzung und – teilweise – der Fermentertemperaturen der Modellanlage, im letzteren Falle aufgrund eines unbemerkten Überlaufens des Speichermediums.

Der gemessene Methangehalt im Biogas aus dem MF1 erhöhte sich innerhalb der ersten 14 Tage nach Wiederinbetriebnahme der Modellanlage Ende April / Anfang Mai 2004 von 50,2 auf Werte um 60 Vol.-%. Während der ausgewerteten Versuchsabschnitte bewegten sich die gemessenen Methananteile im Biogas meist zwischen ca. 55 und maximal 66,5 Vol.-% (Abbildung 26). Infolge der vorübergehenden sprunghaften Erhöhung der Fermentertemperatur im Zeitraum 27.08.-02.09.2004 aufgrund einer fehlerhaften Bedienung des Heizungsreglers sank der Methanwert im Biogas aus dem MF1 auf ca. 30 Vol.-% und die täglich produzierte Biogasmenge sank um 30-50 %. Daraufhin dauerte es ca. zehn Tage bis wieder Werte über 60 Vol.-% Methan erreicht wurden, wobei die Biogasproduktionsrate zu diesem Zeitpunkt das Niveau vor der Prozessstörung noch nicht wieder erreicht hatte. Die Messwerte aus diesem Zeitraum wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Methangehalten bei stündlicher und vierstündlicher Beschickung war im Falle des MF1 nicht erkennbar (Tabelle 29).

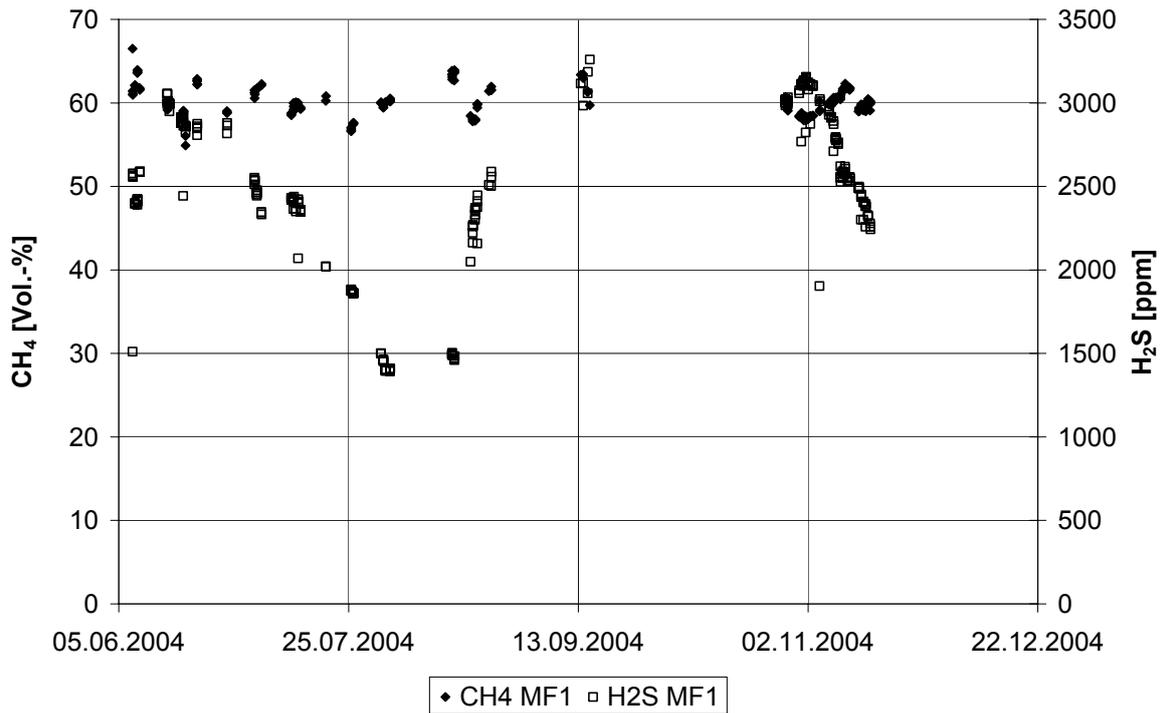


Abbildung 26: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF1 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004

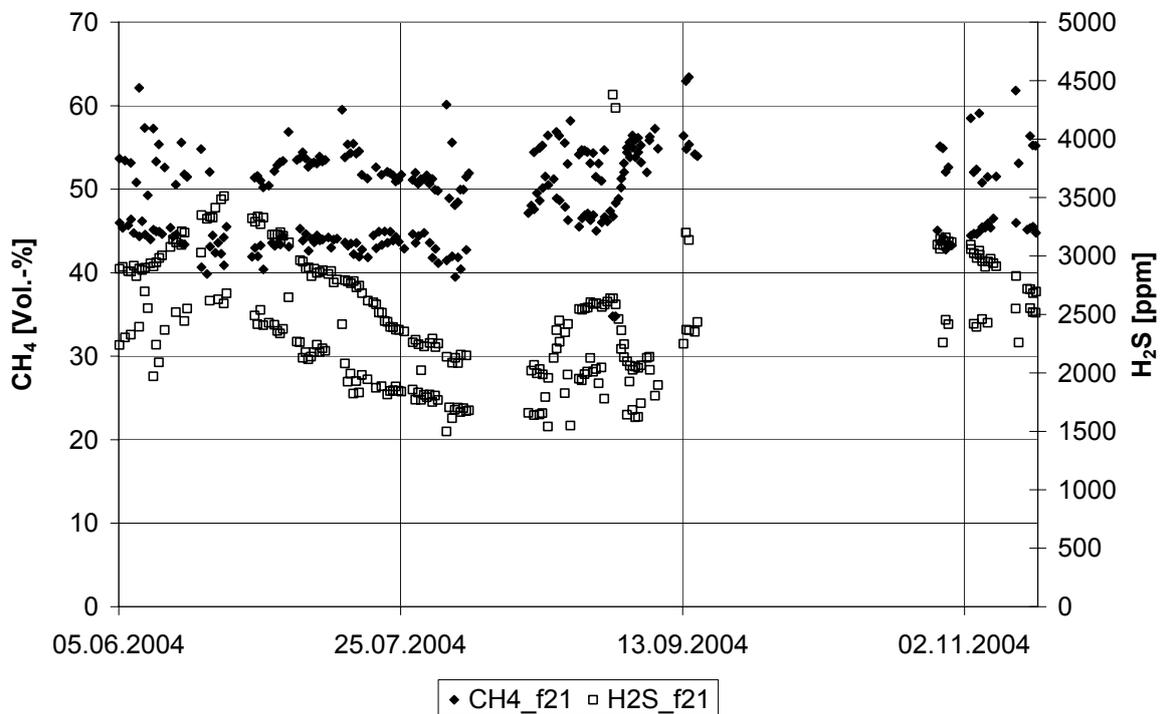


Abbildung 27: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF2/1 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004

Die gemessenen Methangehalte im Biogas aus dem ersten Gasdom des MF2 bewegten sich zwischen 39,9 und 54,6 Vol.-% (Abbildung 27). In der Folge der oben erwähnten Überheizung des vorgeschalteten MF1 stiegen die Methangehalte an der Messstelle MF2/1

um ca. 20 % an. Der Mittelwert der bereinigten Messwerte des Methangehaltes während stündlicher bzw. vierständlicher Beschickung betrug 43,6 bzw. 46,3 % (Tabelle 29).

Die gemessenen Methangehalte im Biogas aus dem zweiten Gasdom des MF2 bewegten sich zwischen 39,4 und 57,1 Vol.-% (Abbildung 28). Auch an der Messstelle MF2/2 stiegen die Methangehalte in Folge der oben erwähnten Überheizung des vorgeschalteten MF1 deutlich an. Der Mittelwert der bereinigten Messwerte des Methangehaltes während stündlicher bzw. vierständlicher Beschickung betrug 42,9 bzw. 47,5 % (Tabelle 29).

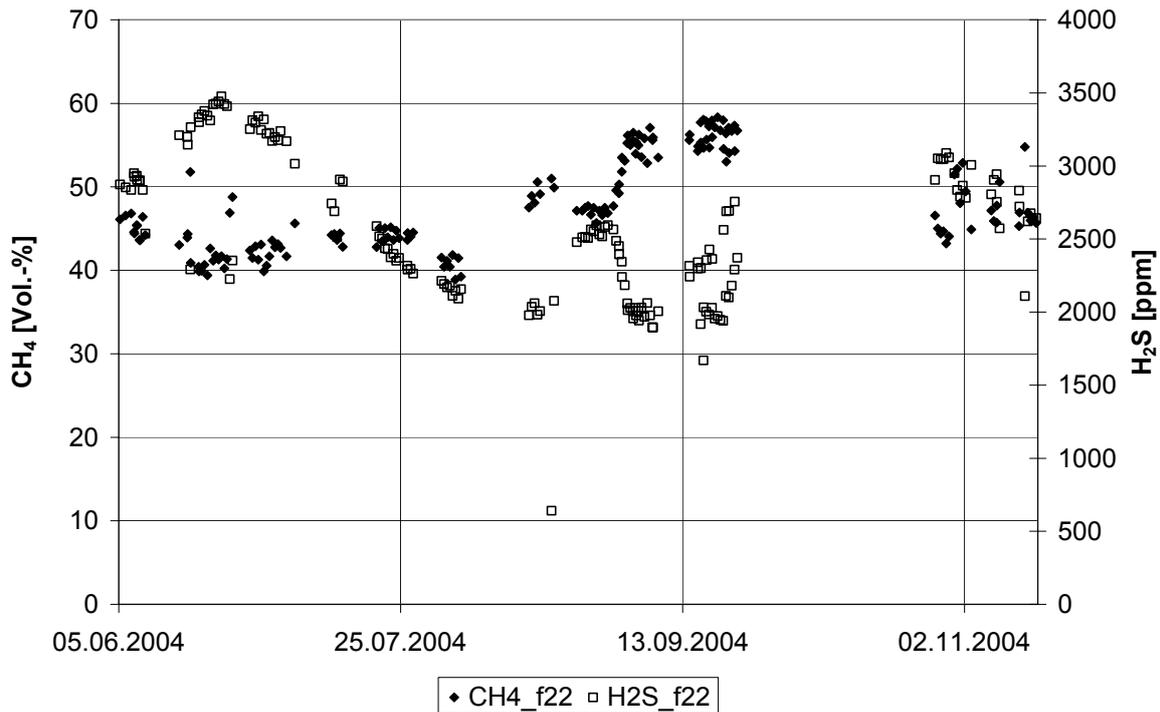


Abbildung 28: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF2/2 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004

Die gemessenen Methangehalte im Biogas aus dem dritten Gasdom des MF2 bewegten sich zwischen 39,9 und 57,9 Vol.-% (Abbildung 29). Deutlich erhöhte Werte traten auch hier in der Folge der Überheizung des vorgeschalteten MF1 auf. Der Mittelwert der bereinigten Messwerte des Methangehaltes während stündlicher bzw. vierständlicher Beschickung betrug 44,3 bzw. 48,7 % (Tabelle 29).

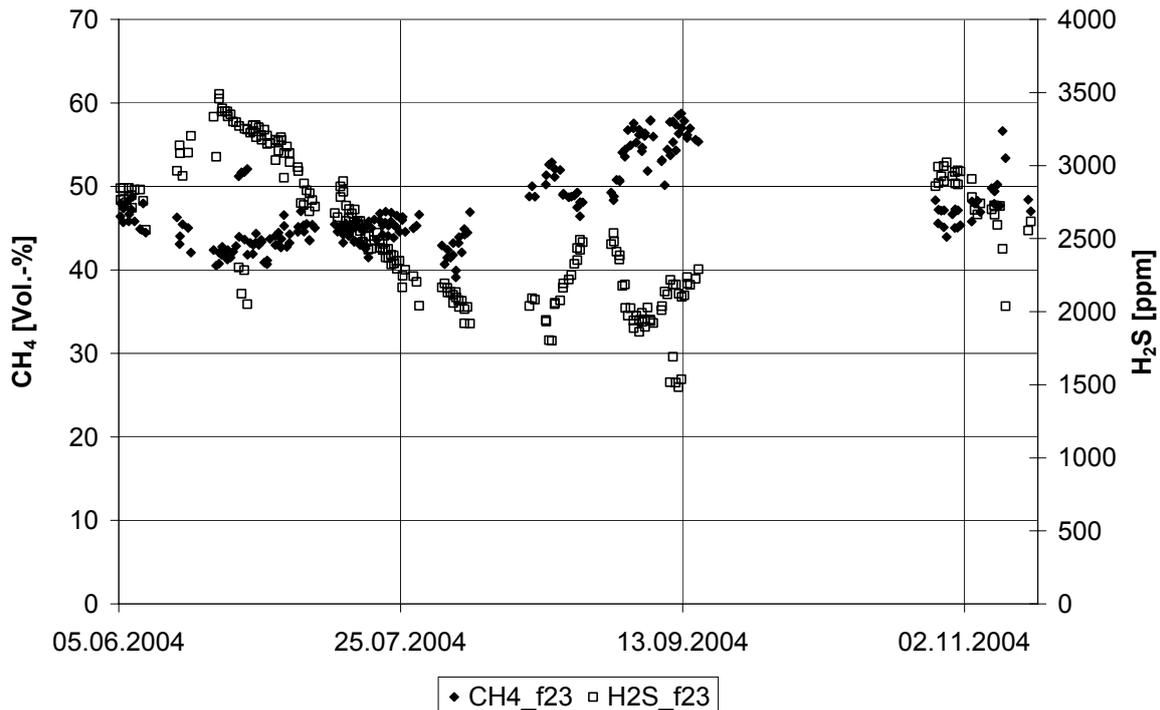


Abbildung 29: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF2/3 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004

Die gemessenen Methangehalte im Biogas aus dem vierten Gasdom des MF2 bewegten sich zwischen 40,4 und 58,4 Vol.-% (Abbildung 30). Auch hier war das Bild als Folge der veränderten Prozessbedingungen im MF1 dasselbe. Der Mittelwert der bereinigten Messwerte des Methangehaltes während stündlicher bzw. vierständlicher Beschickung betrug 44,7 bzw. 49,8 % (Tabelle 29).

Der Anstieg des Methangehalte im Biogas aus dem MF2 infolge der Überheizung des vorgeschalteten MF1 ist vermutlich auf die erhöhten Konzentrationen der flüchtigen Fettsäuren – insbesondere der Essigsäure – im Zulauf zurückzuführen (Abbildung 17). Wurden die Daten aus diesem Zeitraum außer acht gelassen, so ließ sich kein signifikanter Unterschied der Methangehalte während der beiden Versuchsabschnitte nachweisen.

Die Methangehalte im Biogas aus dem MF3 bewegten sich mit relativ geringer Streuung um einen Wert von ca. 60 Vol.-%. Ein signifikanter Unterschied zwischen den während stündlicher bzw. vierständlicher Beschickung gemessenen Werten war nicht feststellbar (Tabelle 29). Als die Solltemperatur in der ersten Junihälfte um ca. 5 bis 10 Grad unterschritten wurde, zeigten sich – vermutlich aufgrund der veränderten Gaslöslichkeiten - Methangehalte im Biogas bis zu 67 % (Abbildung 31). Am 22.06.2004 wurde durch einen Störfall Luft in den Fermenter eingesaugt. Als Folge der Überheizung des MF1 deutete sich mit Verzögerung an der Messstelle MF3 ein leicht steigender Trend des Methangehaltes an.

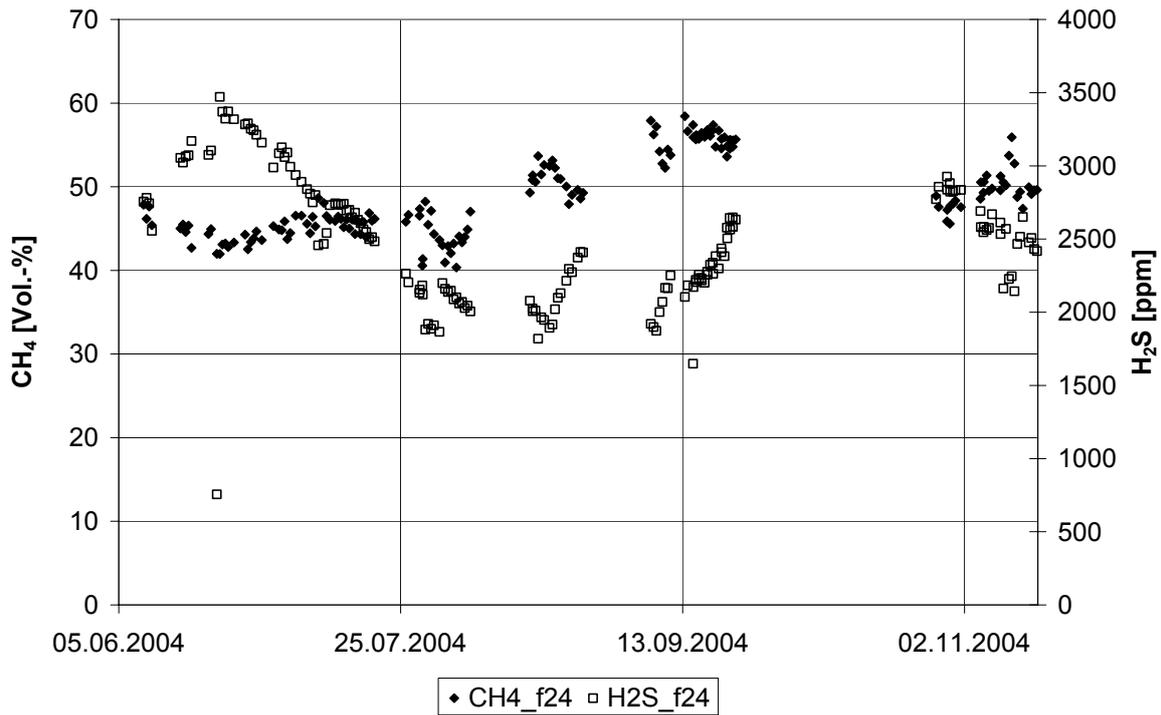


Abbildung 30: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF2/4 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004

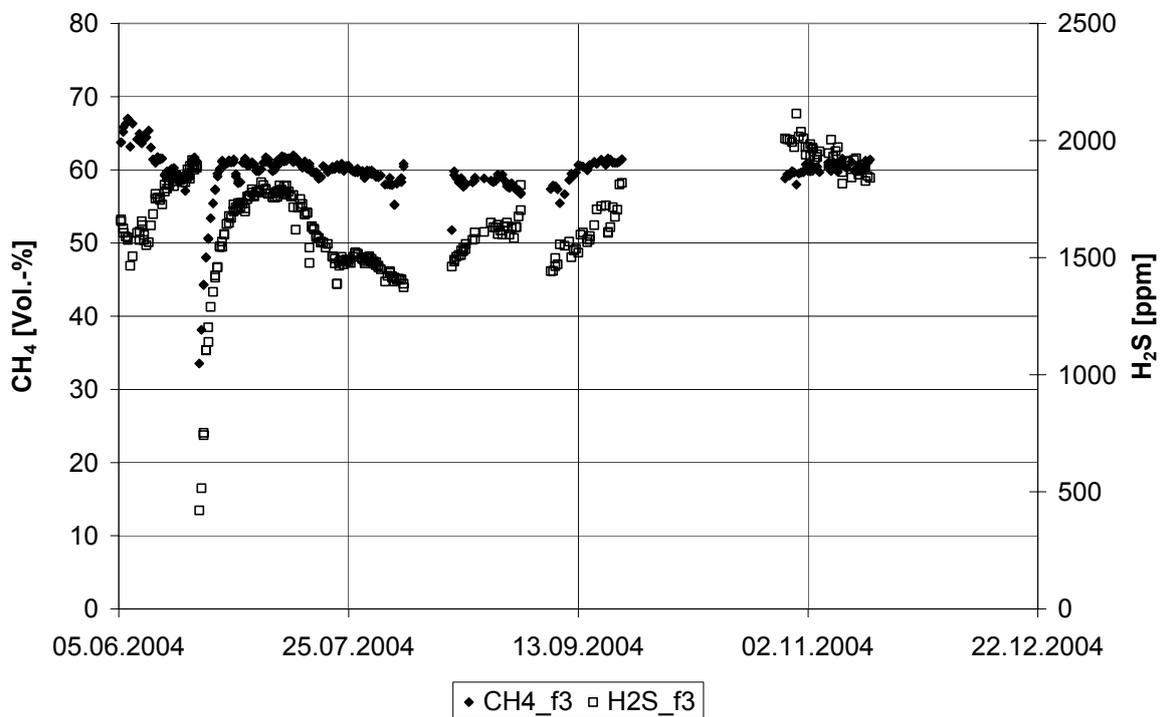


Abbildung 31: Zeitreihe der gemessenen Methan- und Schwefelwasserstoffgehalte im Biogas an der Messstelle MF3 im Zeitraum 05.06.2004 bis 15.11.2004

Tabelle 29: Mittelwerte, Standardabweichung und Stichprobenumfang der Messwerte des Methangehaltes im Biogas [Vol.-%] aus den Messstellen der Modellanlage im Zeitraum 06-08/2004 bzw. 10-11/2004

	<b>MF1</b>	<b>MF2/1</b>	<b>MF2/2</b>	<b>MF2/3</b>	<b>MF2/4</b>	<b>MF3</b>
<b>1h</b>						
MW	60,1	43,6	42,9	44,3	44,7	60,0
STABW	2,0	1,7	1,9	1,9	1,6	1,2
n	96	83	37	67	59	156
<b>4h</b>						
MW	60,0	46,3	47,5	48,7	49,8	59,4
STABW	1,9	2,0	1,7	2,3	2,2	1,5
n	130	39	19	19	16	106

Ein direkter Vergleich der Biogaszusammensetzung ist – mit eingeschränkter Genauigkeit aufgrund der Lufteinblasung in der Pilotanlage – nur jeweils für die ersten beiden Fermenter der Versuchsanlagen möglich. Dabei deuteten sich im Falle der Pilotanlage im ersten mesophilen Fermenter etwas geringere, im thermophilen Fermenter geringfügig höhere Methangehalte als in den entsprechenden Modellfermentern an.

Aufzeichnungen der täglich im BHKW der Pilotanlage verwerteten Biogasmenge erfolgten ab dem 09.11.2002. Bis April 2003 stieg die mittlere tägliche Biogasproduktion (gleitender Mittelwert der verwerteten Biogasmenge über acht Tage) auf 110-120 m<sup>3</sup> an (Abbildung 32). Während der Unterbrechung der Beschickung für die Umbaumaßnahmen ging die Biogasproduktion auf ca. 45 m<sup>3</sup>\*d<sup>-1</sup> zurück. Im Anschluss an die Umbauarbeiten wurde die Beschickung innerhalb weniger Tage wieder auf einen Wert von ca. 6,2 m<sup>3</sup>\*d<sup>-1</sup> hochgefahren. Dies führte nach anfänglicher Steigerung zu einem erneuten Rückgang der Biogasproduktion nach ca. drei Wochen. Nachdem die Beschickung am 22.05.2003 auf 5,72 m<sup>3</sup>\*d<sup>-1</sup> reduziert und dort weitestgehend konstant gehalten wurde, stieg die Biogasproduktion bis Mitte Juli 2003 auf ca. 130 m<sup>3</sup>\*d<sup>-1</sup> an. Nach der viertägigen Unterbrechung der Beschickung im Juli 2003 wurde diese innerhalb von vier Wochen stufenweise wieder auf den Zielwert erhöht. Die Biogasproduktion nahm in dieser Zeit praktisch kontinuierlich bis auf einen Wert von 120-130 m<sup>3</sup>\*d<sup>-1</sup> zu. Bis Ende 2003 zeigte die Biogasproduktion bei prinzipiell gleichbleibender, zeitweise kurzfristig reduzierter Beschickung einen leichten Trend nach unten. Nach einer erneuten Phase unterbrochener bzw. stark reduzierter Beschickung stieg die Biogasproduktion nach dem Wiederanfahren fast kontinuierlich und erreichte Ende März 2004 ein Niveau von ca. 130 m<sup>3</sup>\*d<sup>-1</sup>. Als Folge der dann aufgetretenen Verdünnung der Rohgülle durch einen Wasserrohrbruch im Stall ging die Biogasproduktion vorübergehend um ca. 15 % zurück (Abbildung 32).

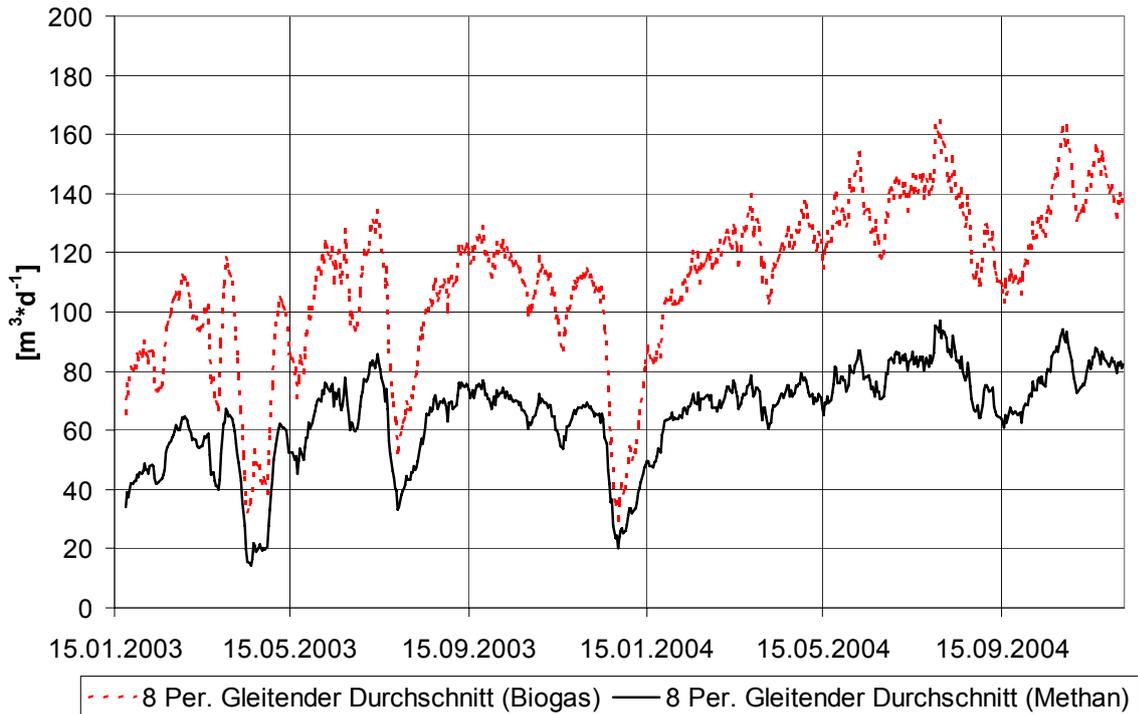


Abbildung 32: Zeitreihe der achttägigen gleitenden Mittelwerte der täglich in der Pilotanlage verwerteten Biogasmenge und der berechneten täglich verwerteten Methanmenge im Zeitraum 15.10.2003-07.12.2004

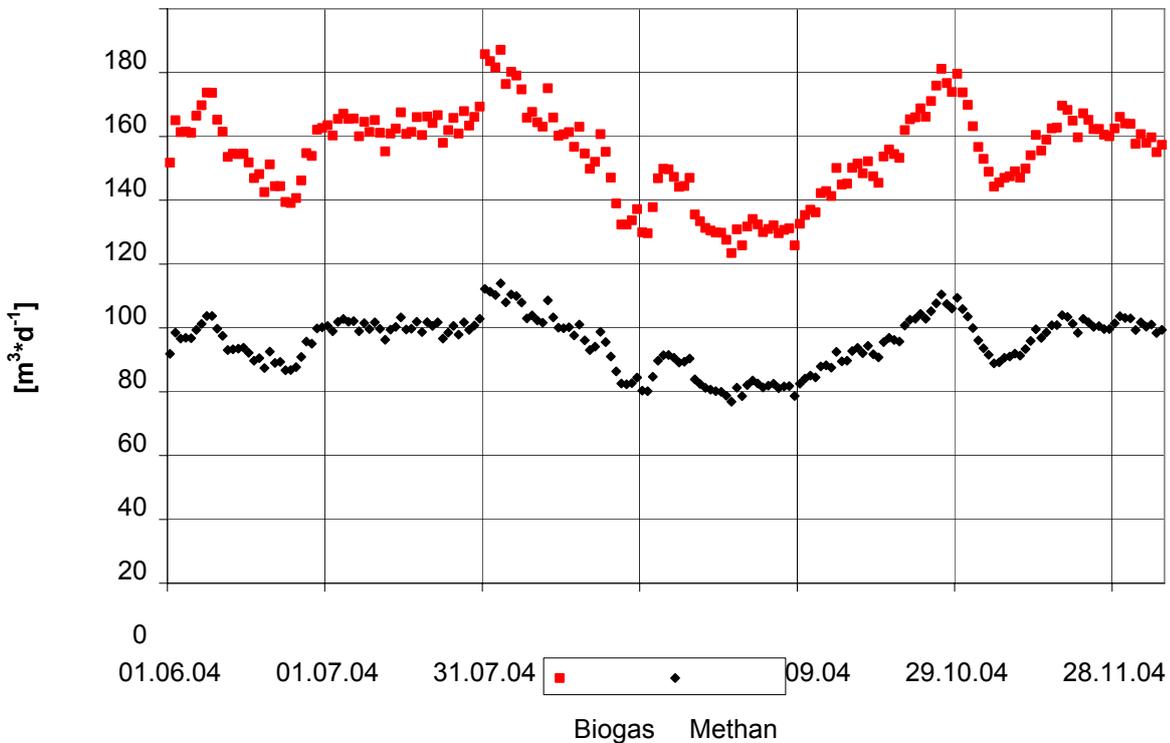


Abbildung 33: Zeitreihe der achttägigen gleitenden Mittelwerte der täglich in der Pilotanlage verwerteten Biogasmenge und der berechneten täglich verwerteten Methanmenge im Zeitraum 28.04.-07.12.2004

Zu Beginn des ersten Versuchsabschnittes für die Ermittlung von Leistungskennwerten hatte die mittlere Biogasproduktion der Pilotanlage wieder einen Wert von  $120 m^3 \cdot d^{-1}$  überschritten und erreichte bis Anfang Juni 2004 Werte von knapp über  $150 m^3 \cdot d^{-1}$ . Am 08./09.06.2004

war die Beschickung aufgrund einer fehlerhaften Einstellung der Anlagensteuerung stark reduziert, was sich in der Biogasproduktionsrate widerspiegelte, die bis zum 24.06.2004 auf ca.  $120 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  fiel. In der Folge stieg diese dann rasch an, um ein Plateau von etwa einem Monat Dauer bei Werten zwischen  $140$  und  $150 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  zu erreichen (Abbildung 33).

Die bis dahin höchsten mittleren Werte der Biogasproduktion der Pilotanlage von etwas über  $160 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  (täglich verwertete Gasmengen bis zu  $226 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ ) wurden Ende Juli/Anfang August 2004 ermittelt. Danach setzte aufgrund der Entnahme größerer Mengen an Gärrest ein fallender Trend ein, der bis Ende September anhielt. In der zweiten Septemberhälfte – nach Umstellung des Beschickungsintervalles – lag die mittlere Biogasproduktion dann bei ca.  $110 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ . Anschließend stieg die Gasproduktion mit zunehmendem Füllstand im Gärrestlager wieder kontinuierlich an, um Ende Oktober 2004 Werte um  $160 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  zu erreichen. Zu diesem Zeitpunkt traten Probleme mit Verstopfungen des Gasdurchflussmessers am F1 auf, die teilweise zum Abblasen nicht quantifizierbarer Biogasmengen führten. Im November 2004 bewegte sich die Biogasproduktion bei Werten knapp über  $140 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$  (Abbildung 33).

Die mittlere tägliche Biogasproduktion der Pilotanlage betrug während der Versuchsabschnitte mit stündlicher bzw. 4-stündlicher Beschickung  $135$  bzw.  $146 \text{ m}^3$ . Für die mittlere tägliche Methanproduktion ergab sich ein Wert von  $79$  bzw.  $83 \text{ m}^3$ . Aus den kumulierten Biogasmengen abzüglich der eingeblasenen Luftmenge errechnete sich für den ausgewerteten Zeitraum mit stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung ein mittlerer Methangehalt des Biogases von  $59,2$  bzw.  $56,8 \text{ Vol.-%}$  (Tabelle 30). Damit wurde die um ca.  $8 \%$  höhere mittlere Biogasproduktion im zweiten Versuchsabschnitt (Kap. 5.3) durch den geringeren mittleren Methangehalt gerade in etwa ausgeglichen, sodass sich kein signifikanter Unterschied in der mittleren Methanproduktion während der beiden Versuchsabschnitte ergab.

Tabelle 30: Mittlere Werte ( $\pm$  Standardabweichung) der täglichen Biogas- bzw. Methanproduktion der Pilotanlage über verschiedene Zeiträume in 2004

	<b>Beschickung F1</b> $\text{m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$	<b>Biogas</b> $\text{Norm-m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$	<b>Methan</b> $\text{Norm-m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$	<b>Methangehalt</b> $\text{Vol.-%}$
05-12/2004	$5,48 \pm 0,67$	$135 \pm 28$	$79 \pm 16$	$58,3$
Versuchsabschnitt 1	$5,47 \pm 0,86$	$135 \pm 28$	$79 \pm 16$	$59,2$
Versuchsabschnitt 2	$5,65 \pm 0,52$	$146 \pm 21$	$83 \pm 12$	$56,8$

Wie in Kap. 4.3 beschrieben, sollten auch die Gasproduktionsraten einzelner Fermenter der Pilotanlage bestimmt werden. Aufgrund der Führung der Gasleitung vom F1 über den F2 in den F3, wo das in den Fermentern produzierte Biogas vermischt wurde, konnte die Biogasproduktion des Fermenters 2 nur durch Differenzbildung ermittelt werden. Eine Trennung der Biogasmengen aus F3 und EL war mangels eines dritten Messgerätes nicht möglich. Da eine Kalibration der Gasdurchflussmesser an der Anlage nicht möglich war, wurden die Geräte mit den werksseitigen Einstellungen betrieben und die Messwerte nachträglich mit den zur Verfügung stehenden Daten zur Biogastemperatur und -zusammensetzung korrigiert. Nach zunächst scheinbar problemloser Funktion der beiden V-Konus-Durchflussmesser lieferte das erste Gerät in der Gasleitung vom F1 zum F2 ca. vier Wochen nach Inbetriebnahme keine plausiblen Werte mehr. Nach Kontrolle des Messgerätes und zeitweisem Tausch wurden ab Anfang September von beiden Geräten wieder plausibel erscheinende Messwerte produziert. Mit dem Auftreten erster Fröste mussten die Durchflussmesser dann außer Betrieb genommen werden, da sie zufroren und so die

Gasleitung blockierten. Die Auswertung der von den V-Konus-Durchflussmessern gelieferten Daten zeigte, dass diese mit den Messwerten des Biogasvolumenzählers am BHKW nicht kompatibel waren. Es errechneten sich meist negative Biogasproduktionsraten für F3 und EL zusammen, d. h. die angezeigten Durchflusswerte waren deutlich zu hoch und konnten daher nicht verwertet werden.

Nachdem die Modellanlage mit aktivem Material aus den Fermentern der Pilotanlage befüllt worden war, wurde innerhalb eines Tages mit der Beschickung begonnen und es setzte unmittelbar die Biogasproduktion ein. Abbildung 34 zeigt wegen der Datenlücken in den automatischen Aufzeichnungen zur Übersicht den Verlauf der erfassten Biogasmenge aus der Modellanlage gemäß der Handaufzeichnungen. Mit Einbringung der ersten mazerierten Charge Mitte Mai 2004 erhöhte sich die Gasproduktionsrate erkennbar. Mitte August und Mitte Oktober wurden jeweils nur einzelne Modellfermenter auf den Trommelgaszähler geschaltet.

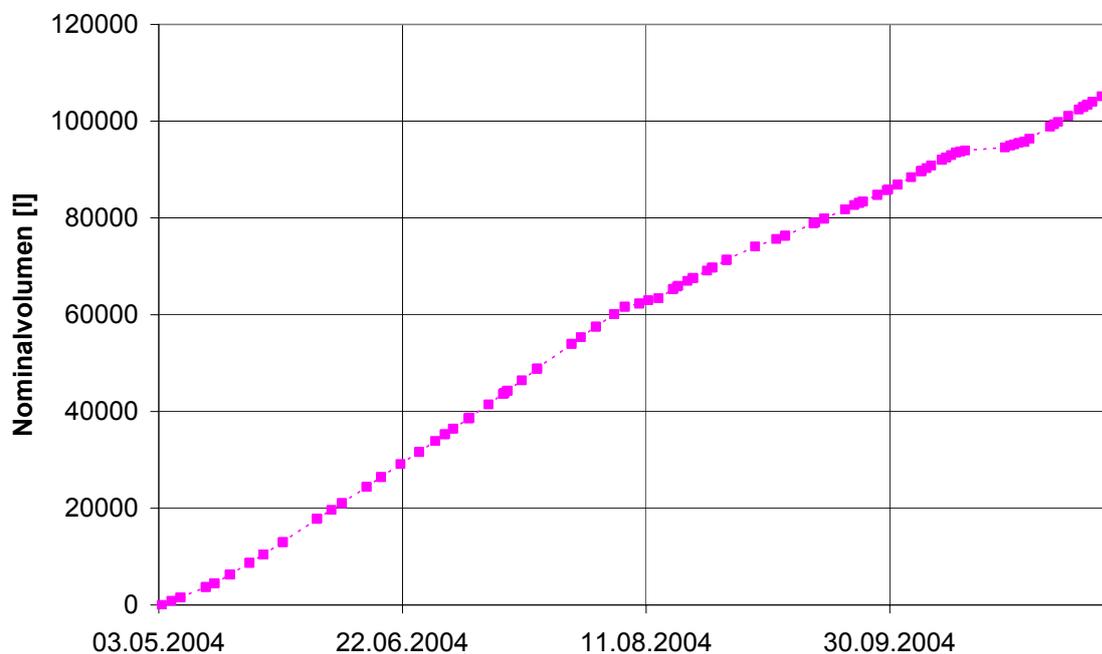


Abbildung 34: Verlauf der nominalen erfassten Biogasmenge aus der Modellanlage in 2004

Die normierte, mittlere tägliche Biogasproduktion ( $\pm$  Standardabweichung) der Modellanlage betrug bei stündlicher Beschickung  $583 \pm 33 \text{ l} \cdot \text{d}^{-1}$ . Messungen der Biogasproduktionsrate der einzelnen Fermenter mit dem Nassgasvolumenzähler wurden im August und Oktober 2004 jeweils über einen Zeitraum von zwei bis drei Tagen durchgeführt. Wegen des Datenverlustes im August 2004 stehen nur die im Oktober 2004 während vierstündlicher Beschickung ermittelten Werte zur Verfügung (Tabelle 31). Das mittlere Verhältnis der Biogasproduktionsraten der Modellfermenter 1 bis 3 betrug demnach in diesem Zeitraum 1:0,55:0,38. In der Summe errechnete sich daraus eine mittlere Biogasproduktionsrate von  $561,6 \text{ l} \cdot \text{d}^{-1}$ .

Tabelle 31: Mittlere Biogasproduktionsrate ( $\pm$  Standardabweichung), prozentuale Anteile an der Biogasproduktion und g arraumspezifische Biogasproduktionsrate der einzelnen Fermenter der Modellanlage aus Messungen mit dem Trommelgaszähler im Oktober 2004

	<b>Biogas</b> l/h	<b>Anteil</b> <b>Biogasproduktion</b> %	<b>Spezif.</b> <b>Biogasproduktion</b> $l^*(l^*d)^{-1}$
Modellfermenter 1	12,1 $\pm$ 1,5	51,7	1,3
Modellfermenter 2	6,7 $\pm$ 0,5	28,6	0,7
Modellfermenter 3	4,6 $\pm$ 0,8	19,7	0,2

Das eingesetzte System mit Gasbeutel und Drucksensoren ermoglichte zwar (mit den oben erwahnten Einschränkungen) eine fortlaufende Analyse der Zusammensetzung des Biogases aus den einzelnen Gasdomen, war jedoch zur Bestimmung der mittleren Biogasproduktionsrate der einzelnen Fermenter nur bedingt geeignet, da das Follen des Gasbeutels kurzzeitig durch Beschickungs- und R uhrvorg ange beeinflusst wurde. Eine höhere Biogasproduktionsrate während des Rührens war im Falle der Modellfermenter 1 und 3 erkennbar.

Aus den verfugbaren Werten der Biogaszusammensetzung der einzelnen Fermenter (Tabelle 29) und der Biogasproduktionsrate (Tabelle 31) errechnen sich für die Modellfermenter 1 bis 3 prozentuale Anteile an der Methanproduktion der Modellanlage im zweiten Versuchsabschnitt von ca. 55, 24 bzw. 21 % (Tabelle 32).

Tabelle 32: Errechnete mittlere Methanproduktionsraten ( $\pm$  Standardfehler) der Modellfermenter und prozentuale Anteile bei vierstundlicher Beschickung

	<b>Methan</b> l/h	<b>Anteil</b> %
Modellfermenter 1	7,26 $\pm$ 0,92	55,1
Modellfermenter 2	3,22 $\pm$ 0,37	24,4
Modellfermenter 3	2,73 $\pm$ 0,48	20,5

**Fazit:**

Unregelmäßigkeiten in der Beschickung sowie die Entnahme von Gärrest verursachten deutliche Schwankungen der Biogasproduktionsrate in der Pilotanlage. Die etwas höhere Biogasproduktion bei vierstundlicher Beschickung wurde durch den geringeren Methangehalt in etwa ausgeglichen, sodass sich kein signifikanter Unterschied in der Methanproduktion ergab. Die Anteile der einzelnen Fermenter an der Methanproduktion konnten nicht gemessen werden.

In der Modellanlage waren die Schwankungen der Biogasproduktionsrate erwartungsgemäß deutlich geringer als in der Pilotanlage. Etwas mehr als die Hälfte des produzierten Methans stammte hier aus der ersten, mesophilen Stufe.

### A 6.5 Lagerung des Gärrestes

Bei einem Durchsatz der Biogasanlage von 5,5 m<sup>3</sup> Gulle täglich reichte die vorhandene Lagerkapazität für den Gärrest von 800 m<sup>3</sup> für ca. 145 Tage (Volumenverluste der Gulle vernachlässigt). Da die letzte Entnahme von Gärrest zur Ausbringung jeweils im September nach dem letzten Schnitt stattfand, die erste Entnahme dann im Februar des neuen Jahres, war die Kapazität des Gärrestlagers nicht ausreichend. Während des Winters wurden daher etwa

200-300 m<sup>3</sup> Gärrest in die Güllegrube der alten Hofstelle des Betriebes Schweiger ausgelagert.

Der Gärrest wurde vom Landwirt nach negativen Erfahrungen mit Verätzungen im Sommer 2003 (siehe A 6.9.3) vor der Ausbringung in einem Verhältnis von bis zu 1:1 mit Wasser verdünnt. Da die hinzugegebenen Mengen an Wasser nicht genau quantifiziert werden konnten, waren die auf die Frischmasse bezogenen Analysen der Gärrestproben ab dem 01.06.2004 nicht auswertbar. Es wurden daher ältere Analysenwerte in den Bericht aufgenommen (Tabelle 33 und 34).

Tabelle 33: Analysenwerte von Gärrestproben aus dem Endlager (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 9 Proben aus dem Zeitraum 14.06.2003 bis 28.04.2004)

TM-Gehalt	Massen-% d. FM	5,5 $\pm$ 1,0
oTM-Gehalt	g/kg	38,6 $\pm$ 8,0
CSB	g/kg	64,7 $\pm$ 9,6
pH	-	7,9 $\pm$ 0,2
FFS gesamt	mg/l	1094 $\pm$ 367
NH <sub>4</sub> -N	mg/l	2334 $\pm$ 464
Alkalinität	g CaCO <sub>3</sub> /l	15,1 $\pm$ 5,8

Tabelle 34: Zusammensetzung der Trockenmasse der Proben von Gärrest aus dem Lagerbehälter der Pilot-Biogasanlage (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 3-8 Proben aus 2004)

oTM-Gehalt	Massen-%	68,9 $\pm$ 3,0
NH <sub>4</sub> -N	Massen-%	n. a.
Kjeldahl-N	Massen-%	2,6 $\pm$ 0,1
Gesamt-P	Massen-%	1,1 $\pm$ 0,2
Rohprotein	Massen-%	16,2 $\pm$ 1,0
Rohfett	Massen-%	5,3 $\pm$ 0,5
Rohfaser	Massen-%	10,1 $\pm$ 2,2
Cellulose	Massen-%	8,3 $\pm$ 9,0
Hemicellulose	Massen-%	n. a.
Lignin	Massen-%	23,7 $\pm$ 2,3

n. a.: nicht auswertbar

In den Gärrestproben wurden (trotz Verdünnung) im Mittel höhere Konzentrationen an Fettsäuren gefunden als in Proben aus dem F3 (vgl. Tabelle 17 und Tabelle 33). Dies zeigte den Fortgang des anaeroben Abbauprozesses im unbeheizten Gärrestlager, der zu einem weiteren Abbau der organischen Substanz führte (siehe A 6.3.2). Ein signifikanter Unterschied zwischen den NH<sub>4</sub>-N-Anteilen der Proben aus F3 und von Gärrest (Proben ohne Verdünnung) wurde jedoch nicht gefunden.

Das in Batch-Tests in 35 l-Fermentern bei 38°C ermittelte Restgaspotential von Gärrest (entnommen aus dem Endlager am 01.06.2004; keine weitere Animpfung) betrug 0,053 m<sup>3</sup> Methan\*(kg oTM)<sup>-1</sup> bzw. 2,1 m<sup>3</sup> Methan pro m<sup>3</sup> Gärrest innerhalb von 70 Tagen. Bezogen auf die ursprüngliche organische Trockenmasse in der Gülle sind dies ca. 0,034 m<sup>3</sup> Methan\*(kg oTM)<sup>-1</sup>, was ca. 15 % zusätzlichem Methanertrag entsprach (siehe A 6.6).

**Fazit:**

Der Fortgang des anaeroben Abbauprozesses im unbeheizten Gärrestlager der Pilotanlage war an erhöhten Fettsäurekonzentrationen in Proben des Gärrestes erkennbar. Eine weitere signifikante Erhöhung des anorganischen Stickstoffanteils im Vergleich zum Inhalt des F3 während der Lagerung konnte nicht nachgewiesen werden. Das in Batch-Versuchen ermittelte Restmethanpotential des Gärrestes betrug ca. 15 % der in der Pilotanlage erzielten Methanausbeute.

**A 6.6 Leistungskennwerte der Versuchsanlagen**

Für die Ermittlung der Leistungskennwerte der Pilotanlage bei stündlicher bzw. vierstündlicher Beschickung wurde der Zeitraum 01.06.-06.09.2004 bzw. 21.10.-07.12.2004 ausgewertet. Diese Leistungskennwerte spiegeln den Betrieb der Pilot-Biogasanlage unter weitgehend stationären Bedingungen wider. Zusätzlich wurden übergreifende Durchschnittswerte für den Zeitraum vom 28.04. bis zum 07.12.2004 ermittelt. Für die Ermittlung der entsprechenden Leistungskennwerte der Modellanlage wurde der Zeitraum 05.06.-05.08.2004 bzw. 26.09.-08.11.2004 zu Grunde gelegt.

Die mittlere Biogas- bzw. Methanausbeute bezogen auf die zugeführte organische Trockenmasse errechnete sich für beide Versuchsabschnitte zu 0,41 bzw.  $0,24 \text{ m}^3 \cdot (\text{kg oTM})^{-1}$ . Für die Methanproduktionsrate bezogen auf den Gesamtgärraum ergaben sich für die beiden Versuchsabschnitte Werte von 0,33 und  $0,34 \text{ m}^3 \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$ . Auch die geringfügigen Unterschiede zwischen weiteren, errechneten mittleren Leistungskennwerten für den Zeitraum „1 h“ bzw. „4 h“ waren nicht signifikant.

Tabelle 35: Mittlere Leistungskennwerte der Pilot-Biogasanlage

		<b>2004</b>	<b>1 h</b>	<b>4 h</b>
Raumbelastung	$\text{kg oTM} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$	1,40	1,37	1,49
Biogausbeute	$\text{m}^3 \cdot (\text{kg oTM}_{\text{zugeführt}})^{-1}$	0,40	0,41	0,41
Biogausbeute (CSB)	$\text{m}^3 \cdot (\text{kg CSB}_{\text{zugeführt}})^{-1}$	0,28	0,29	0,28
Biogasertrag	$\text{m}^3 \cdot (\text{kg oTM}_{\text{abgebaut}})^{-1}$	1,17	1,17	1,18
Biogausbeute FM	$\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$	24,6	25,1	25,8
Biogasproduktionsrate	$\text{m}^3 \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$	0,56	0,56	0,59
Methanausbeute	$\text{m}^3 \cdot (\text{kg oTM}_{\text{zugeführt}})^{-1}$	0,23	0,24	0,24
Methanertrag	$\text{m}^3 \cdot (\text{kg oTM}_{\text{abgebaut}})^{-1}$	0,68	0,69	0,67
Methanausbeute FM	$\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$	14,4	14,9	14,6
Methanausbeute GV	$\text{m}^3 \cdot (\text{GV} \cdot \text{d})^{-1}$	0,93	0,95	0,98
Methanproduktionsrate	$\text{m}^3 \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{d})^{-1}$	0,32	0,33	0,34

Bei geringfügig höherer mittlerer Raumbelastung der Modellanlage errechnete sich im Vergleich mit der Pilotanlage bei stündlicher Beschickung in etwa derselbe Wert für die Biogausbeute bezogen auf die zugeführte organische Trockenmasse; bezogen auf die zugeführte Frischmasse war die Biogausbeute etwas geringer (Tabelle 36). Da keine fortlaufenden Analysen des Mischgases vorgenommen wurden, liegen für die Modellanlage keine Werte für die Methanausbeute vor. Die in Tabelle 36 angegebene Methanproduktionsrate wurde aus den ermittelten Werten der Methanproduktionsrate der einzelnen Modellfermenter errechnet. Die Ermittlung von direkt vergleichbaren Leistungskennwerten für den Betrieb mit vierstündlicher Beschickung war aufgrund der erwähnten Datenverluste nicht möglich.

Tabelle 36: Mittlere Leistungskennwerte der Modell-Biogasanlage

		1 h	4 h
Raumbelastung	$\text{kg oTM}^*(\text{m}^3*\text{d})^{-1}$	1,43	1,60
Biogausausbeute	$\text{m}^3*(\text{kg oTM}_{\text{zu}})^{-1}$	0,41	n. b.
Biogasertrag	$\text{m}^3*(\text{kg oTM}_{\text{abgebaut}})^{-1}$	1,35	n. b.
Biogausausbeute FM	$\text{m}^3*\text{m}^{-3}$	23,2	n. b.
Biogasproduktionsrate	$\text{m}^3*(\text{m}^3*\text{d})^{-1}$	0,56	n. b.
Methanproduktionsrate	$\text{m}^3*(\text{m}^3*\text{d})^{-1}$	n. b.	0,30*

\*) berechnet aus Daten von Messungen an den einzelnen Modellfermentern ; n. b.: nicht bestimmt

Ein möglicher Grund für die trotz der kürzeren hydraulischen Verweilzeit in der Fermenterkaskade und dem fehlenden Gärrestlager praktisch identische Biogausausbeute von Modell- und Pilotanlage könnte darin liegen, dass aufgrund des Abfüllprozesses und die Mazerierung die Zusammensetzung der oTM des Rohmaterials für die Modellanlage gegenüber der Rohgülle, die der Pilotanlage zugeführt wurde, in Richtung einer besseren Abbaubarkeit verändert wurde. Einen Hinweis darauf liefert auch der um ca. 15 % höhere Biogasertrag aus der Modellanlage bezogen auf die abgebaute oTM. Zudem waren – abgesehen von den dokumentierten Störfällen – die Schwankungen der Prozesstemperaturen in der Modellanlage wesentlich geringer als in der Pilotanlage und es traten kaum Unregelmäßigkeiten in der Beschickung auf. Nur so ließe sich auch die Tatsache erklären, dass für die Modellanlage kein höherer Abbaugrad als für die Fermenterkaskade der Pilotanlage ermittelt wurde.

Im Vergleich zu Literaturdaten stellt sich die in der Pilotanlage erzielte Methanausbeute aus Milchviehgülle sehr günstig dar (vgl. Tabelle 35 und Tabelle 37). Diese hohe Methanausbeute relativiert sich, wenn man die Raumbelastung des Gesamtsystems betrachtet. Im allgemeinen ist bei der Methangärung mit abnehmender Raumbelastung eine Zunahme der Gas- bzw. Methanausbeute bei sinkender, gärraumspezifischer Gasproduktionsrate zu erwarten (GOSCH, 1984). Ein Verfahren zur Steigerung der Effizienz der Vergärung von Flüssigmist müsste also darauf abzielen, eine hohe Biogas-/Methanausbeute bei hoher Raumbelastung des Systems zu erreichen, wie dies bei dem in Tabelle 37 zitierten thermophil-mesophilen Prozess im Labormaßstab der Fall war. Die hydraulische Verweilzeit in diesem System betrug dabei lediglich 14 Tage, davon 4 Tage in der ersten, thermophilen Stufe. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass mögliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Gülle aufgrund fehlender Angaben nicht genau eingeschätzt werden können.

Tabelle 37: Ausgewählte Literaturdaten für die Methanausbeute bei der Vergärung von Rindergülle

System / Maßstab (Quelle)	Raumbelastung $\text{kg oTM}^*(\text{m}^3*\text{d})^{-1}$	Methanausbeute $\text{m}^3*(\text{kg oTM}_{\text{zugeführt}})^{-1}$
Richtwert landwirtschaftliche Biogasanlagen (KTBL, 2005)	3,5	0,15
37°C / halbtechnisch (LAMPEL, 1984)	2,9	0,20
mesophil / Praxisanlagen (GOSCH, 1984)	4,1	0,17
36-37°C / Praxisanlagen (EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFTEN, 1985)	4,7	0,17
50°C / Labor (ELMASHAD et al., 2001)	2,1	0,20
55°C / Labor (ANGELIDAKI & AHRING, 1993)	2,8	0,19
55°C - 38°C / Labor (SUNG & SANTHA, 2003)	4,5	0,15
	5,8	0,22

In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten mesophil-thermophil-mesophilen System wird die hohe Methanausbeute in erster Linie auf die lange Verweilzeit von 45 Tagen zurückgeführt. Dabei wurde der größte Anteil der rasch abbaubaren organischen Substanz bei relativ hoher Raumbelastung bereits in der ersten, mesophilen Stufe abgebaut. Die nachgeschaltete, zweite Stufe wurde nicht so hoch belastet, wie dies für einen thermophilen Prozess anzustreben wäre (vgl. MACKIE & BRYANT, 1995). Die dritte, mesophile Stufe war nur noch gering belastet. Zukünftig sollte daher untersucht werden, ob durch Verzicht auf die mesophile, erste Stufe und einen Betrieb des Systems bei höherer Raumbelastung die Abbaueffizienz gesteigert werden kann (siehe A 6.10).

**Fazit:**

Aus der mesophil-thermophil-mesophilen Vergärung der Milchviehgülle in der Pilotanlage wurde eine relativ hohe Biogas- und Methanausbeute erzielt, während die spezifische Methanproduktionsrate aufgrund der seriellen Anordnung der Fermenter gering war. Dabei wurde die zweite Stufe nicht so hoch belastet, wie dies für einen thermophilen Prozess anzustreben wäre. Es sollte daher untersucht werden, ob durch Verzicht auf die mesophile, erste Stufe und einen Betrieb des Systems bei höherer Raumbelastung die Abbaueffizienz gesteigert werden kann.

In der Modellanlage wurde trotz ca. 10 % kürzerer Verweilzeit praktisch dieselbe Biogasausbeute erzielt wie in der Pilotanlage. Vermutlich kam es durch den Abbauprozess und die Mazerierung der Rohgülle für die Modellanlage zu einer Veränderung der Zusammensetzung der oTM in Richtung einer besseren Abbaubarkeit.

**A 6.7 Mindestverweilzeit in den liegenden Fermentern**

In Proben aus dem Ablauf des thermophilen Fermenters der Pilotanlage konnte die Markierungssubstanz bei stündlicher Beschickung erstmals in der Probe nachgewiesen werden, die 11 h nach Start des Experimentes entnommen worden war. Da die 10 h-Probe nicht zur Verfügung stand, muss als Mindestverweilzeit ein Wert von 9 h angegeben werden. Bei vierstündlicher Beschickung war der Tracer erstmals in der Probe nachweisbar, die nach dem zweiten Beschickungsvorgang entnommen wurde (8 h). Es wurde also in dem liegenden Gärbehälter eine mindestens doppelt so hohe Mindestverweilzeit erreicht, wie in einem Rührkesselfermenter. Die aus den experimentellen Daten errechneten mittleren Verweilzeiten waren um ca. 20 % geringer als die entsprechenden hydraulischen Verweilzeiten, was auf das Vorhandensein von nicht bzw. schlecht durchmischten Zonen in diesem Behälter hindeutet.

Das erste Markierungsexperiment, das an der Modellanlage während stündlicher Beschickung durchgeführt wurde, musste vorzeitig abgebrochen werden, so dass hier keine verwertbaren Ergebnisse gewonnen werden konnten. Bei vierstündlicher Beschickung konnte die Markierungssubstanz erstmals in derjenigen Probe nachgewiesen werden, die 8 h nach Start des Experimentes entnommen worden war, d. h. mit dem dritten Beschickungszyklus. Die aus den experimentellen Daten errechnete mittlere Verweilzeit war um 17 % geringer als die entsprechende hydraulische Verweilzeit. Auch der liegende Modellfermenter war demnach unvollständig durchmischt.

**Fazit:**

In den liegenden Fermentern wurde in Markierungsexperimenten mit Lithiumchlorid eine mindestens doppelt so hohe Mindestverweilzeit gefunden wie in einem Rührkesselfermenter, wobei die Umstellung auf vierstündliche Beschickung keine Erhöhung der Mindestverweilzeit bewirkte.

## A 6.8 Zuverlässigkeit der Pilot-Biogasanlage

Die Bewertung der Funktionalität und Störanfälligkeit technischer Komponenten sowie des aus technischen Problemen entstandenen zusätzlichen Betreuungsaufwandes für die Pilotanlage beruht auf den Tagebucheinträgen des die Anlage betreuenden Landwirtes sowie auf eigenen Beobachtungen.

### A 6.8.1 Bau und Technik

Im Jahr 2004 gab es neun Tage, an denen die Beschickung der Pilotanlage aus technischen Gründen unterbrochen war, was einer Ausfallzeit von ca. 3 % entspricht. An acht Tagen gab es Verstopfungsprobleme mit der ersten Beschickungspumpe wegen des hohen Fasergehaltes der Gülle. Dies deutet darauf hin, dass der Durchmesser der Gülleleitungen (DN 110) eher etwas zu klein gewählt war.

Technische Probleme traten auch an den Rührwerken auf. Ausfälle des Stabmixers im F1 führten bei gleichzeitigem Heizen wiederholt zum Überschäumen des Fermenterinhalt und zur Verschmutzung des Gasleitungssystems. Vermutlich kam es bei fehlender Durchmischung entlang der Wandheizungsrohre zu einer Überhitzung des Fermenterinhalt. Der hierdurch beschleunigte Gasaustrieb könnte in dem relativ faserreichen Substrat zur Schaumbildung geführt haben. Hinweise auf einen hohen Gasgehalt des Substrates im F1 lieferten Dichtebestimmungen, bei denen für Proben aus diesem Fermenter eine um etwa 4 % geringere Dichte ermittelt wurde als für Proben der Rohgülle und des Inhaltes der Fermenter 2 und 3 (ca.  $970 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  gegenüber ca.  $1010 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ). Um das Überschäumen zu verhindern, musste das Rührwerk im F1 ca. 50 % der Zeit betrieben werden, was einen erheblichen Strombedarf verursachte (siehe Kap. 6.13.3). Um diesen Problemen abzuwehren, wären u. a. folgende Maßnahmen zu prüfen:

- Vergrößerung der Heizflächen bei gleichzeitiger Absenkung der Vorlauftemperatur
- Erwärmung des Substrates in einem externen Wärmetauscher in Verbindung mit einer hydraulischen Durchmischung
- Einsatz eines langsam aber kontinuierlich laufenden Rührwerkes anstelle des Stabmixers.

Auch im F2 trat im ersten Halbjahr 2003 mehrmals Schaumbildung auf, die sich während des weiteren Anlagenbetriebes jedoch nicht mehr zeigte. Die genaue Ursache für das beobachtete Überschäumen konnte nicht abschließend geklärt werden.

Am Rührwerk des F3 war nach ca. zwei Betriebsjahren der Dichtring in der Wanddurchführung der Rührwelle defekt. Daraufhin drang Gärsuspension in den Ausgleichsbehälter für das Schmieröl ein, da dieser unterhalb des Flüssigkeitsspiegels im Fermenter angeordnet war.

Im ersten Betriebsjahr (2003) waren, wie weiter oben beschrieben, umfangreiche Reparatur- und Umrüstmaßnahmen am Rührwerk des F2 erforderlich. Die anfänglich starre Verbindung des Getriebemotors mit der Rührwelle führte in Kombination mit einer leichten Unwucht der 12 m langen Welle zu einer fortlaufenden axialen Verschiebung des Rührwellenflansches in Richtung auf das Getriebegehäuse, das hierdurch beschädigt wurde. Nach Umbau des Antriebes (Kraftübertragung durch eine Doppelkette) und Erneuerung des Kunststoffgleitlagers Ende 2003 traten während der restlichen Projektlaufzeit keine Probleme mit diesem Rührwerk mehr auf.

Anfang 2004 kam es zu einer Verstopfung des Gasleitungssystems. Als Ursache wurde eine Ansammlung von faserigem Material in der Kondensatableitung ausgemacht. Dieses Material war vermutlich bereits während des oben erwähnten Überschäumens des F2 in die Gasleitung gelangt.

Das vom Hersteller ausgeführte Heizungssystem der Pilotanlage stieß aufgrund der geforderten zwei Temperaturniveaus an seine Grenzen. Der Wärmeübergang in den F2 erwies sich als ungenügend und die Wärmedämmung des thermophilen Fermenters, der im Vergleich zu den stehenden Fermentern ein deutlich ungünstigeres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen aufwies (ungefähre Oberfläche-Volumen-Verhältnisse: F1:  $1,22 \text{ m}^{-1}$ , F2:  $2,05 \text{ m}^{-1}$ , F3:  $1,19 \text{ m}^{-1}$ ) war unzureichend. Eine nachträgliche Einhausung des gesamten liegenden Gärbehälters wurde mehrfach diskutiert, aus Kostengründen jedoch nicht realisiert. Durch eine solche Maßnahme hätten erhebliche Mengen an Heizenergie eingespart werden können (vgl. Kap. 6.13.3). Allein die provisorische Einhüllung des F2 mit einer Siloplane brachte im Mai 2005 eine Anhebung der mittleren Temperatur um ca. 2 K innerhalb von drei Tagen (siehe Kap. 6.10).

Die nur manuell und mit geringer Genauigkeit zu regelnde Luftzufuhr für die biologische Entschwefelung erwies sich als nicht sehr zuverlässig und konnte keine durchgängige Einhaltung des  $\text{H}_2\text{S}$ -Richtwertes von 200 ppm im Brenngas gewährleisten (siehe Kap. A 6.4). In einem Fall kam es zu einer Verstopfung der Luftzufuhrleitung. Bei sehr kalter Witterung sank die Temperatur unter der Gashaube, wo in der Hauptsache die Besiedelungsfläche für die sulfidoxidierenden Bakterien angeordnet war, offenbar so weit ab, dass die biologische Entschwefelung praktisch zum Erliegen kam. Eine Ursache für die wiederholt auftretenden  $\text{H}_2\text{S}$ -Spitzen im Biogas auch bei warmer Witterung konnte nicht gefunden werden. Auch wenn nur maximal zwei- bis dreimal täglich eine Gasanalyse durchgeführt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Gesamtheit der Messwerte des  $\text{H}_2\text{S}$ -Gehaltes im Biogas über den Zeitraum des Projektes ein gutes Bild der auch im Tagesverlauf auftretenden Schwankungen vermittelte. Diese Schwankungen sind umso bemerkenswerter, als die Anlage lediglich mit Gülle beschickt wurde, für die keine großen Variationen im Schwefelgehalt anzunehmen sind. Bei lediglich manuell regelbarer Luftzufuhr erscheint daher eine nur gelegentliche Überprüfung des Schwefelwasserstoffgehaltes mit Reaktionsröhrchen, wie sie teilweise auf Biogasanlagen in der Landwirtschaft erfolgt, problematisch und kann den Biogasmotor gefährden. Zur Kontrolle des Schwefelwasserstoffgehaltes im Biogas sollte ein fest installierter Biogasanalysator vorhanden sein. Ist ein solches Gerät installiert, lässt sich mit relativ geringem Zusatzaufwand auch ein einfacher Regelkreis für die Luftzufuhr einrichten, der eine effektivere Entschwefelung ermöglicht.

### **A 6.8.2 Messtechnik**

Das Gasanalysegerät vom Typ SCHMACK SSM 6000 musste während des Projektzeitraumes zweimal zur Reparatur eingesandt werden. Einfache Wartungsarbeiten und die Kalibration konnten selbst durchgeführt werden. Der Biogasanalysator war im BHKW-Container vergleichsweise hohen Temperaturen und vorhandenen Verunreinigungen der Raumluft ausgesetzt. Ob diese Einflüsse für die aufgetretenen Defekte maßgeblich waren, konnte nicht geklärt werden. Ein geschützterer Aufstellungsort für Geräte dieser Art ist grundsätzlich vorzuziehen.

Der Balgengaszähler schien während des gesamten Projektzeitraumes zuverlässig zu arbeiten. Bei Vergleichsmessungen des Biogasverbrauches mit einem Turbinenradzähler in 2004 bzw. 2005 wurde eine mittlere Abweichung der Messwerte des Balgengaszählers von -3,5 % bzw. -0,1 % ermittelt. Für die Funktionstüchtigkeit des Balgengaszählers war die Anbringung

unmittelbar vor dem Motor insofern günstig, als es bei den dort herrschenden warmen Temperaturen zu keiner Bildung von Kondensat kommen konnte. Die ermittelte Messgenauigkeit erscheint gut.

Während des Projektzeitraumes fielen zwei der Wärmemengenzähler aus. In einem Fall war lediglich das Volumenmessteil verschmutzt und konnte in Eigenarbeit wieder funktionstüchtig gemacht werden. An den Füllstandsmessern der Fermenter traten während der Projektlaufzeit keine Defekte auf.

### A 6.8.3 Blockheizkraftwerk

Das BHKW erwies sich während der Projektlaufzeit als störungsanfälligster Teil der Pilot-Biogasanlage. In 2004 wurden insgesamt 30 Tage mit Störungen des BHKW verzeichnet, davon laut Anlagendiagnostik 14 Tage mit elektrischen Störungen. Ausfälle des BHKW bei Nacht führten in Einzelfällen zu einem Gasverlust durch die Überdrucksicherung, der jedoch nicht quantifiziert werden konnte. Eine Auflistung der im Tagebuch verzeichneten Störmeldungen der BHKW-Steuerung für das Jahr 2004 zeigt Tabelle 38.

Tabelle 38: Verzeichnete Störmeldungen der BHKW-Steuerung an der Pilotanlage in 2004

Störungsmeldung	Häufigkeit
Havariestop >el. Störung Rückleistung<	2 x
Havariestop >el. Störung<	11 x
Havariestop >Öldruck<	10 x
Havariestop >el. Störung Überstrom<	4 x

Ein möglicher Grund für die Anfälligkeit der Elektrik waren die hohen Temperaturen im Schaltschrank der BHKW-Steuerung (bis zu 65°C). Hierauf deutete auch die über den Beobachtungszeitraum zunehmende Häufigkeit elektrischer Defekte hin. Im Mai 2005 wurde eine separate Belüftung des Schaltschranks in Betrieb genommen, die die Temperatur auf 35°C reduzierte. Generell ist anzumerken, dass sich zu hohe Temperaturen im BHKW-Raum auch negativ auf den Wirkungsgrad des Biogasmotors auswirken.

### A 6.8.4 Betreuungsaufwand

Über den vertraglich vereinbarten Zeiträumen für die Funktionsüberwachung der Anlage von ca. 30 Minuten täglich verzeichnete der Landwirt für den Zeitraum Mitte Mai bis Ende 2003 bzw. das gesamte Jahr 2004 einen zusätzlichen Betreuungsaufwand von ca. 218 bzw. 110 Arbeitskraftstunden. Wie dieser Zeitaufwand auf verschiedene Tätigkeiten verteilt war (Wartung, Reparaturen etc.) wurde nicht erfasst. Für 2004 ergab sich daraus ein durchschnittlicher Betreuungsaufwand für die Biogasanlage von ca. 50 Minuten am Tag.

#### **Fazit:**

Das Heizungssystem der Pilotanlage stieß aufgrund planerischer und technischer Mängel angesichts der geforderten zwei Temperaturniveaus (mesophil und thermophil) an seine Grenzen. Dies konnte durch nachträgliche Umbaumaßnahmen teilweise kompensiert werden. Im ersten mesophilen Fermenter führten Ausfälle des Stabmixers bei gleichzeitigem Heizen wiederholt zum Überschäumen des Fermenterinhalt und zur Verschmutzung des Gasleitungssystems. Die Gründe hierfür konnten nicht abschließend geklärt werden. Abhilfe könnte möglicherweise eine bessere Abstimmung von Heizungs- und Rührtechnik bringen. Der direkt vor dem Motor installierte Balgengaszähler zeigte bei Vergleichsmessungen eine gute Genauigkeit. Die störungsanfällige Elektronik der BHKW-Steuerung litt vermutlich unter den hohen Temperaturen im BHKW-Container. Hier ist eine separate Temperierung des Schaltschranks oder eine bessere Durchlüftung des BHKW-Raumes vorzusehen.

## A 6.9 Gärrestverwertung

(Franz Peretzki, LfL-Agrarökologie)

### A 6.9.1 Grundsätzliches

Der Abbau der in der Rindergülle enthaltenen organischen Substanz während der Methangärung führt zur Mineralisierung daran gebundener Nährstoffe. Damit erhöht sich der direkt pflanzenverfügbare Anteil des jeweiligen Nährstoffes. Wird z. B. organisch gebundener Stickstoff (N) mineralisiert, entsteht daraus Ammonium-N. Dieser kann direkt oder nach Umwandlung in Nitrat-N von den Pflanzen aufgenommen werden. Je weitergehender der Abbau erfolgt (hoher spezifischer Gasertrag), desto höher wird der Anteil an mineralisiertem Stickstoff in Form von Ammonium-N im Gärrest (Tabelle 39) und auch die Nährstoffkonzentration, bezogen auf den TS-Gehalt, steigt an. Der Gärrest nähert sich in seinen Eigenschaften damit mehr einer mineralischen Nährstofflösung an.

Tabelle 39: Veränderungen des TM-Gehaltes und des NH<sub>4</sub>-N-Anteiles am Gesamt-N im Zuge der Methangärung von Milchviehgülle in der Pilot-Biogasanlage Berbling (Mittelwerte)

Zeit- raum	Probenart	TM-Gehalt	NH <sub>4</sub> -N-Anteil	Veränderung des
		%	(NH <sub>4</sub> -N : N ges.)	NH <sub>4</sub> -N-Anteiles
				%
2003	Rohgülle	7,9	0,57	-
	Gärrest Fermenter 3	6,1	0,63	+ 10,3
	Gärrest Endlager	5,3	0,64	+ 9,5
2004	Rohgülle	7,8	0,55	-
	Gärrest Fermenter 3	6,0	0,65	+ 18,2
	Gärrest Endlager	5,2	0,67	+ 21,6

Weiterhin führt die Mineralisierung zu einer Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich. Proben von Rohgülle wiesen über den Projektzeitraum einen pH-Wert von im Mittel 7,7 auf, im Gärrest war dieser geringfügig auf im Mittel 7,9 erhöht.

Die Verminderung des TM-Gehaltes und der Abbau von Schleimstoffen durch die Vergärung bedingen eine Erhöhung der Fließfähigkeit. Dies und die Veränderung des pH-Wertes sowie des Ammoniumanteiles ist im Hinblick auf den erhöhten Abgasungsdruck in Form von Ammoniak zu berücksichtigen. Bei der Abschätzung des Ausgasungspotentials von Ammoniak wirken sich die vor allem bei Proben von Fermenterinhalt und Gärrest beobachteten Unterschiede zwischen im Labor und vor Ort gemessenen pH-Werten sehr deutlich aus. Werden die im Labor gemessenen pH-Werte zugrundegelegt, so ergaben sich für die Rohgülle bzw. den Gärrest (Einbeziehung älterer Analysenwerte) mittlere Gehalte an NH<sub>3</sub>-N von 16,5 bzw. 60,8 mg/l. Für den Gärrest ergab sich bei Verwendung der vor Ort gemessenen pH-Werte ein NH<sub>3</sub>-N -Wert von 31,6 mg/l.

Die während des Gärprozesses in Methan und Kohlendioxid umgewandelte organische Substanz kennzeichnet die unter anaeroben Bedingungen leichter abbaubare Fraktion. Dementsprechend bleibt schwerer abbaubare, für die Erhaltung des Dauerhumusgehaltes im Boden wichtige stabile organische Masse erhalten. Dies schmälert zwar die Zufuhr an sogenanntem Nährhumus mit dem Gärrest, verringert aber die Gefahr der Denitrifikation (Bildung von Lachgas), wenn ungünstige Bodenverhältnisse (z. B. Sauerstoffmangel) vorliegen. Gleichzeitig verringert sich durch diese Verminderung der mikrobiologischen Aktivität die N-Festlegung (Immobilisierung) im Boden. Ein wichtiger positiver Nebeneffekt

des Abbaues organischer Stoffe ist die Verminderung der Geruchsbelastung. Vergorene Gülle verliert weitgehend den fäkalartigen Geruch.

Als negativ im Hinblick auf die Gefahr von steigenden Ammoniakabgasungen ist die Erhöhung des pH-Wertes bei gleichzeitiger Erhöhung des Ammoniumgehaltes anzusehen. Die verbesserte Fließfähigkeit wirkt dem entgegen. Insgesamt dürfte, nach bisheriger Kenntnis, dadurch das Risiko von gasförmigen Ammoniakverlusten während der Lagerung und insbesondere nach der Ausbringung gleich bleiben. Es wird jedoch auch von einer Erhöhung (ASMUS & LINKE, 1987; BESSON et al., 1985) bzw. einer Verminderung (CLEMENS et al., 2001) der Verluste berichtet. Dies dürfte davon abhängen wie die genannten Einflussfaktoren (pH-Wert, Ammoniakkonzentration, Erhöhung der Ammoniummenge, Fließfähigkeit) im konkreten Fall jeweils verändert werden. Der Ammoniakdampfdruck spielt eine wesentliche Rolle, wenn keine unverzügliche Einarbeitung durchgeführt werden kann.

Die einerseits erwünschte und für viele Nährstoffe positiv zu bewertende Erhöhung des mineralisierten Anteiles könnte andererseits zu einer erhöhten Auswaschungsgefahr z. B. für Stickstoff führen. Diese Gefahr ist aber gering, da der durch die Biogasvergärung zu Ammonium umgewandelte organisch gebundene N als leicht abbaubar einzustufen ist. Demzufolge ist dieser Anteil auch aus unvergorener Gülle als schnell wirksam einzustufen, da er nach der Ausbringung im Boden rasch mineralisiert wird. Dies zeigen auch die Ergebnisse dazu durchgeführter Ertragsversuche (MEBNER, 1988; GUTSER et al., 1987), die keine signifikanten Unterschiede zwischen vergorener und unvergorener Gülle fanden. Allenfalls könnten sich Unterschiede ergeben, wenn die Ausbringung zu Zeiten erfolgt in denen wenig Mineralisierung stattfindet (z. B. Spätherbst). Hier wird mit vergorener Gülle mehr direkt pflanzenverfügbarer N ausgebracht. Da aber die mineralisierte N-Fraktion der Biogasgülle aus Ammonium besteht und dieses im Boden nicht verlagert wird besteht keine unmittelbare Auswaschungsgefahr. Erst nach der Umwandlung zu Nitrat (Nitrifizierung) ist dies möglich. Diese Umwandlung läuft aber unter ähnlichen Bedingungen ab wie die Mineralisierung, sodass die Unterschiede hinsichtlich der Einstufung der Auswaschungsgefahr gering sind.

Durch die erhöhte Mineralstoffkonzentration und den geringen Gehalt an organischer Substanz kann es unter bestimmten Umständen zu Verätzungen des Pflanzenaufwuchses kommen. Die Vorsorgemaßnahmen sind etwa die gleichen wie zur Verminderung der Ammoniakabgasung.

Die sich aus Sicht der Pflanzenernährung ergebenden Vorteile einer Biogasvergärung der Gülle sind zusammengefasst die schnellere Nährstoffwirkung, die höhere Fließfähigkeit, die Verringerung der Geruchsbelastung und die Erhaltung der Humusförderung.

### **A 6.9.2 Düngeplanung und Wasserschutz**

Wesentliches Kriterium für die zeitliche und mengenmäßige Bemessung der Gülleausbringung ist der Bedarf an schnellverfügbarem N der jeweiligen Kultur zu einem bestimmten Zeitpunkt. Ausgegangen wird dabei vom schnellverfügbaren N, der in der Praxis durch den Ammoniumgehalt der Gülle bestimmt wird. Der bei unvergorener Gülle noch vorhandene, schnell abbaubare organisch gebundene N bleibt dabei unberücksichtigt. Biogasgülle enthält diesen Anteil nicht mehr. Daraus ergibt sich eine leichte Überschätzung der N-Wirkung der Biogasgülle.

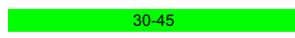
Der Anstieg des Ammoniumgehaltes ist abhängig von dem Gehalt an abbaufähiger N-haltiger organischer Substanz, der je nach Futtervorlage und Intensität des Stoffwechsels der Tiere unterschiedlich ausfällt. Wird z. B. unterstellt, dass der Ammoniumanteil in unvergorener

Rindergülle bei 50 % liegt und durch die Biogasvergärung noch etwa 30 % der restlichen organischen N-haltigen Substanz abgebaut wird (bei gleichem N-Gehalt der verschiedenen org. Substanzarten), so errechnet sich daraus eine Erhöhung des Ammoniumgehaltes am Gesamtstickstoffgehalt von etwa 15 %. Diese Annahme steht im Einklang mit den eigenen Ergebnissen (Tabelle 39). Im Vergleich zu den schwer erfassbaren möglichen gasförmigen Verlusten sind die Unsicherheiten im Gehaltsanstieg für die Praxis als nicht bedeutend einzustufen. Die N-Düngewirkung der Biogasgülle hängt wesentlich stärker von der Vermeidung der gasförmigen Ammoniakverluste ab, als von einer möglicherweise nicht ganz genau bekannten N-Wirkung aus dem Gärrest.

Schnell verfügbarer N muss, um die Nitrat auswaschungsgefahr niedrig zu halten, möglichst nahe am Bedarfszeitpunkt ausgebracht werden. Ausbringzeitpunkt und Menge müssen deshalb auf die jeweilige Kultur abgestimmt werden. Ein auf den bayerischen Durchschnitt ausgelegter Ausbringplan liegt für Normalgülle vor (Abbildung 35). Für Biogasgülle können diese Empfehlungen übernommen werden. Die etwas schnellere N-Wirkung kann in der Praxis unberücksichtigt bleiben.

Früchte	Maximale NH <sub>4</sub> -N-Menge pro ha u. Jahr	Juli	Aug.	Sept.	Okt.	Nov.	Dez.	Jan.	Febr.	März	April	Mai	Juni
Silomais, Körnermais	90										45-60	30-45 <sup>1)</sup>	
Futtermülsen	75									30-75			
Kartoffeln	45									30-45			
Winterraps	75		30-40 <sup>2)</sup>							30-60 <sup>3)</sup>			
Winterweizen, Triticale	60			25 <sup>2)</sup>						30-45 <sup>3)</sup>			
Wintergerste	60		30 <sup>2)</sup>							30-45 <sup>3)</sup>			
Sommerweizen	60									30-45 <sup>3)</sup>			
Sommergerste (Futter)	45									30-45			
Hafer	45									30-45			
Kleegrass (50 % Leguminosen)	60		25-40 <sup>4)</sup>							25-30		25-40	
Feldfutter (ohne Leguminosen)	120		30-40		30-40 <sup>4)</sup>					30-60		30-40	
Zwischenfrucht <sup>5)</sup> , Stroh <sup>6)</sup>	40 <sup>7)</sup>		30-40										
Grünland	120 <sup>8)</sup>		25-40 <sup>8)</sup>		25-40 <sup>8)</sup>					25-40 <sup>8)</sup>		25-40 <sup>8)</sup>	

\*) Die empfohlene Aufwandmenge pro ha und Jahr gilt für ein gutes Ertragsniveau (z.B. 70 dt/ha Weizen).

 Empfohlene Ausbringzeit bei durchschnittlichen Standortbedingungen  
 30-45  
 Empfohlene Ausbringmenge an Ammonium-N (kg/ha), ohne Berücksichtigung von Ammoniakverlusten nach der Ausbringung.

 Ausbringverbot vom 15. Nov. bis 15. Jan. Evt. zeitl. Verschiebung bei Grünland möglich

**1) bis 8): Nebenstehende Hinweise zur Ausbringung beachten:**

- 1) Zwischen die Reihen einarbeiten
- 2) Nur auf Standorten, wo Herbst-Stickstoffgabe erforderlich
- 3) Zweimalige Gabe möglich
- 4) Nur bei überwinternden Pflanzenbeständen
- 5) Zwischenfrucht überwintern oder möglichst spät einarbeiten
- 6) Bei Strohdüngung ohne Zwischenfrucht meist nicht empfehlenswert
- 7) Bei Gründüngung die Nährstoffe der Gülle zur Folgefrucht berücksichtigen
- 8) Einzelgabe von 40 kg Ammonium-N/ha und max. Gesamtmenge nur bei intensiver Bewirtschaftung (4-5 Nutzungen)

Abbildung 35: Empfohlene Ausbringzeiten und Ammoniummengen (NH<sub>4</sub>-N) an flüssigen organischen Düngern („Güllekalender“)

Die Zoneneinteilung in den Wasserschutzgebieten ist vor allem auf hygienische Vorsorge ausgerichtet, weniger auf die Verminderung des Nitratgehaltes. Der Nitratgehalt baut sich im Gegensatz zur hygienischen Belastung im Grundwasserstrom zeitlich gar nicht oder nur gering ab, sodass der Einfluss des ganzen Einzugsgebietes zum Tragen kommt und nicht nur der der Schutzzone. Daraus lässt sich ableiten, dass im Schutzgebiet, wenn die hygienischen

Gefahren durch die Biogasgülle als niedrig eingestuft werden können, aus Sicht der Nitratproblematik zusätzliche Auflagen nicht sinnvoll erscheinen. Es kommt dabei mehr auf die Standortverhältnisse des ganzen Einzugsgebietes an. Diese sind aber in den örtlichen Schutzgebietsverordnungen berücksichtigt.

Unter Grünland besteht im Vergleich zu anderen Kulturarten die geringste Gefahr der Nitratauswaschung. Bedingt ist dies hauptsächlich durch die ganzjährige Bedeckung mit einem aktiven Pflanzenbestand. Außerdem wird hier die Gülle in mehreren Gaben über die gesamte Vegetationszeit sehr gleichmäßig verteilt. Als problematisch stellen sich Ackerkulturen dar, bei denen längere Phasen ohne aktiven Pflanzenbewuchs vorkommen. Dies ist z.B. vor dem Anbau von Mais oft der Fall. Abhilfe kann hier durch den Anbau einer Zwischenfrucht vor dem Mais (möglichst überwintert) geschaffen werden, mit der überschüssiges Nitrat in Pflanzenmasse gebunden wird. Dies gilt natürlich auch für die Anwendung von Biogasgülle und vorsorglich besonders in Wasserschutz- bzw. Wassereinzugsgebieten. Grundsätzlich sollten Zeiten ohne Pflanzenbewuchs kurz gehalten werden.

In Wasserschutzgebieten sind die vorgegebenen Schutzmaßnahmen, die für die Vermeidung von Nitratverlagerungen dienen, auch für Biogasgülle zutreffend. Insbesondere sind die Standortverhältnisse zu berücksichtigen. Unter ungünstigen Bedingungen gehört dazu auch die Aufteilung der Gülle in mehrere Gaben, wenn höhere Mengen in einer Gabe, wie z.B. beim Mais üblich, eingesetzt werden. Dies ist jedoch aus technischen Gründen oft nur schwer durchführbar. Zur Diskussion gestellt werden sollte deshalb auch der Einsatz von Nitrifikationshemmstoffen mit denen die Umwandlung von Ammonium zum auswaschungsgefährdeten Nitrat im Boden verzögert werden kann.

### **A 6.9.3 Mögliche Ätزشäden**

Im Verlauf des Projektes wurden zu mehreren Zeitpunkten, insbesondere jedoch während des sehr heißen Sommers 2003, schwere Ätزشäden auf den Pflanzen nach der Aufbringung von Biogasgülle festgestellt. In anderen Versuchen mit Gärresten war dies nur selten zu beobachten. Die genauen Ursachen konnten im Rahmen des Projektes nicht geklärt werden. Vermutet wird ein Zusammenhang mit der höheren Mineralstoffkonzentration der Biogasgülle und eine zu bestimmten Zeitpunkten höhere Anfälligkeit der Pflanzen. Diese höhere Anfälligkeit wird auf eine geringer ausgebildete Wachsschicht der Pflanzen zurückgeführt. Sie ist besonders schwach ausgebildet nach längeren Regenfällen, schnellem Wachstum (junges Gewebe) und auf taunassen Beständen. Die Ätzwirkung wird noch durch Sonneneinstrahlung verstärkt.

Als Abhilfemaßnahmen bieten sich die Vermeidung der Ausbringung von Gärrest in derartigen Situationen sowie die Verdünnung des Gärrestes an. Durch letztere Maßnahme konnten weitere Ätزشäden im Projektverlauf vermieden werden. Zu berücksichtigen sind allerdings die hierdurch entstehenden Kosten für Frischwasser. Für eine fundierte Ursachenforschung sind genauere Untersuchungen erforderlich.

#### **Fazit:**

Die sich aus Sicht der Pflanzenernährung ergebenden Vorteile einer Vergärung der Gülle sind die schnellere Nährstoffwirkung, die höhere Fließfähigkeit, die Verringerung der Geruchsbelastung und die Erhaltung der Humusförderung.

Die N-Düngewirkung der Biogasgülle hängt wesentlich stärker von der Vermeidung der gasförmigen Ammoniakverluste ab, als von einer möglicherweise nicht ganz genau bekannten N-Wirkung aus dem Gärrest. Für Biogasgülle können die Ausbringpläne für unvergorene

Gülle übernommen werden. Wenn die hygienischen Gefahren durch die Gärrestausbringung als niedrig eingestuft werden können, erscheinen aus Sicht der Nitratproblematik zusätzliche Auflagen für die Ausbringung von Gärrest in Wasserschutzgebieten nicht sinnvoll.

Die genauen Ursachen für die beobachteten Ätزشäden nach Ausbringung des unverdünnten Gärrestes auf Grünland konnten nicht geklärt werden. Vermutet wird ein Zusammenhang mit der höheren Mineralstoffkonzentration der Biogasgülle und eine zu bestimmten Zeitpunkten höhere Anfälligkeit der Pflanzen. Als Abhilfemaßnahmen bieten sich die Vermeidung der Ausbringung von Gärrest bei ungünstigen Witterungsbedingungen oder die Verdünnung des Gärrestes an.

### A 6.10 Betrieb der Pilotanlage im ersten Halbjahr 2005

Nach Ende der Versuchsabschnitte zur Ermittlung von Leistungskennwerten der Pilotanlage bei mesophil-thermophil-mesophilem Betrieb interessierte die Leistungsfähigkeit der Anlage bei thermophil-mesophiler Betriebsweise. Aus den hygienischen Begleituntersuchungen ging hervor, dass die thermophile Stufe für die Keimreduktion während der anaeroben Behandlung der Milchviehgülle maßgeblich war und ein Effekt der vor- und nachgeschalteten mesophilen Stufen auf die Hygienisierungsleistung nicht festgestellt werden konnte (LEBUHN, 2005). SUNG & SANTHA (2003) berichten von hohen erzielten Methanausbeuten bei der Vergärung von Rindergülle in einem thermophil-mesophilen System im Labormaßstab. Die Umsetzung in den volltechnischen Maßstab blieb nach Kenntnis der Autoren des vorliegenden Berichtes bisher allerdings erfolglos.

Ende Februar 2005 wurde die Beschickung des F1 gestoppt und von da an der F2 direkt mit Rohgülle beschickt. Da in diesem Betriebsmodus auch bei reduzierter Beschickung die Solltemperatur von 55°C im F2 nicht erreicht werden konnte, wurde am 05.04.2005 der F1 entleert, mit Rohgülle aus der Vorgrube teilweise neu befüllt und im folgenden auf einer Temperatur von 20-25°C gehalten, um die Gülle für den thermophilen Fermenter vorzuwärmen. Nachdem bei voller Beschickung (5,5-5,7 m<sup>3</sup>\*d<sup>-1</sup>) und starkem Wind auch bei dieser Betriebsweise die angestrebten 55°C im F2 nicht erreicht werden konnten und sich bei stündlicher Beschickung eine starke Temperaturspreizung ergab, wurde der liegende Fermenter provisorisch mit Siloplanen eingehüllt und zeitweise zusätzlich die Abwärme aus dem BHKW-Container unter diese Plane geblasen. Dies brachte innerhalb weniger Tage einen Anstieg der Temperaturen im F2 um 2-3 Grad, sodass zumindest am Fühler 4 – bei zunehmenden Außentemperaturen auch am Fühler 3 – die Zieltemperatur von 55°C erreicht bzw. sogar überschritten wurde. Die täglich produzierte Biogasmenge erreichte daraufhin bis Mitte Juni 2005 Werte von deutlich über 200 m<sup>3</sup>, allerdings bei einem reduzierten Methangehalt von 50-53 Vol.-%. In Bezug auf die Keimreduktion zeigten sich bei dieser Betriebsweise keine Unterschiede im Vergleich zum mesophil-thermophil-mesophilen Betrieb in 2004 (LEBUHN, 2005).

Ab Mitte Juni 2005 wurde auch der F1 auf thermophiles Temperaturniveau angehoben, zu welchem Zweck ca. 20 m<sup>3</sup> Fermenterinhalt aus dem F2 zur Animpfung in den F1 gepumpt wurden. Im Juli 2005 lagen bei einer durchschnittlichen Beschickung von 5,7 m<sup>3</sup> täglich die Prozesstemperaturen im F1 bei 48 bis maximal 52°C, im F2 bei 54 bis 56°C. Dabei deutete sich eine weitere deutliche Steigerung der Biogasproduktion an. Das BHKW wurde jetzt auf Teillast (ca. 22 kW<sub>el.</sub>) betrieben, um möglichst hohe Laufzeiten bei geringem Zündölverbrauch zu erzielen und wenig Überschusswärme zu produzieren. Die Auswertung der in diesem Kapitel beschriebenen Betriebsphase der Pilotanlage wird in Ergänzung zu diesem Bericht an anderer Stelle veröffentlicht werden.

### A 6.11 Biogasverwertung im Blockheizkraftwerk der Pilot-Biogasanlage

Die Biogasverwertung erfolgte in einem Blockheizkraftwerk (BHKW) mit Zündstrahlmotor (siehe Kap. 4.3.1). Die folgenden Ergebnisse beruhen auf dem Untersuchungszeitraum des Betriebsjahres vom 15. Februar 2004 bis zum 14. Februar 2005.

*Betriebsweise des BHKW.* Primäres Ziel des BHKW-Betriebs war die ausreichende Versorgung der Fermenter mit Wärme zur Sicherstellung der Solltemperaturen (siehe Kap. 6.1). Gleichzeitig wurde elektrische Energie erzeugt, die ins öffentliche Netz eingespeist wurde. Vor allem bei kälteren Außentemperaturen waren auch längere Phasen des reinen

Heizölbetriebs nötig, um genügend thermische Energie zur Aufrechterhaltung der Fermentertemperaturen bereitstellen zu können.

*Brennstoffe.* Pro Jahr verwertete das BHKW 47.190 m<sup>3</sup> Biogas. Bei einem Methangehalt von 58,7 % im Jahresdurchschnitt entspricht das einer Energiemenge von 276 MWh. Gleichzeitig wurden 13.305 l Heizöl mit einer Primärenergie von 134 MWh verbraucht. 42 % des eingesetzten Heizöls wurden als Zündöl dem BHKW zugeführt. Das restliche Heizöl diente dem reinen Heizölbetrieb zu Heizzwecken. Im Jahresdurchschnitt lag wegen des hohen zusätzlichen Heizöleinsatzes im Winterhalbjahr der Zündölanteil bei 25 % (siehe Kap. 4). Im reinen Biogasbetrieb betrug der Zündölanteil 16 % bis August 2004, dann reduzierte er sich nach einer Wartung und Neueinstellung des Motors auf 10 %.

*Wirkungsgrade.* Einzelmessungen ergaben für das Zündstrahl-BHKW einen elektrischen Wirkungsgrad von knapp 33 %. Im Jahresdurchschnitt betrug der elektrische Wirkungsgrad nur 30 %. Dieser etwas geringere Wert ist vor allem auf den zeitweisen Teillastbetrieb des BHKW zurückzuführen, bei welchem der elektrische Wirkungsgrad verringert ist. Der Teillastbetrieb wurde gewählt, um eine Verlängerung der täglichen Laufzeit des BHKW und damit eine gleichmäßigere Wärmeversorgung der Fermenter zu erzielen. Der thermische Wirkungsgrad des BHKW betrug im Jahresmittel 37 %. Das Blockheizkraftwerk erreichte damit einen Gesamtwirkungsgrad von 67 %.

#### **A 6.12 Abgasmessungen am BHKW**

An mehreren Terminen wurden Messungen der Abgaszusammensetzung des Zündstrahlmotors (NO<sub>x</sub>- und CO-Gehalt) bei unterschiedlichen Betriebszuständen durchgeführt. Im folgenden werden die Ergebnisse dreier Messungen während des Betriebes des Zündstrahlmotors ausschließlich mit Heizöl sowie während des Betriebes mit Biogas / Zündöl bei Volllast (30 kW) und Teillast (22 kW) vorgestellt. Während des Anfahrens der Pilotanlage, als noch kein bzw. nicht ausreichend Biogas zur Verfügung stand, lief das BHKW im reinen Zündölbetrieb. Hierbei war die elektrische Leistung des Aggregates auf 15 kW beschränkt. Bei dieser Betriebsweise sind die Emissionen an Kohlenmonoxid (CO) und unverbrannten Kohlenwasserstoffen (HC) gering, der Ausstoß an NO<sub>x</sub> jedoch relativ hoch (MOHR, 1997). Dementsprechend lag zu diesem Messtermin der NO<sub>x</sub>-Gehalt im Abgas bei im Mittel 2792 mg\*m<sup>-3</sup> und damit weit über der vom LfU empfohlenen Emissionsbegrenzung für nicht immissionsschutzrechtlich genehmigungsbedürftige Anlagen (Abbildung 36). Der mittlere CO-Gehalt von ca. 1000 mg\*m<sup>-3</sup> unterschritt hingegen den entsprechenden Richtwert von 2000 mg\*m<sup>-3</sup> um mehr als 50 %.

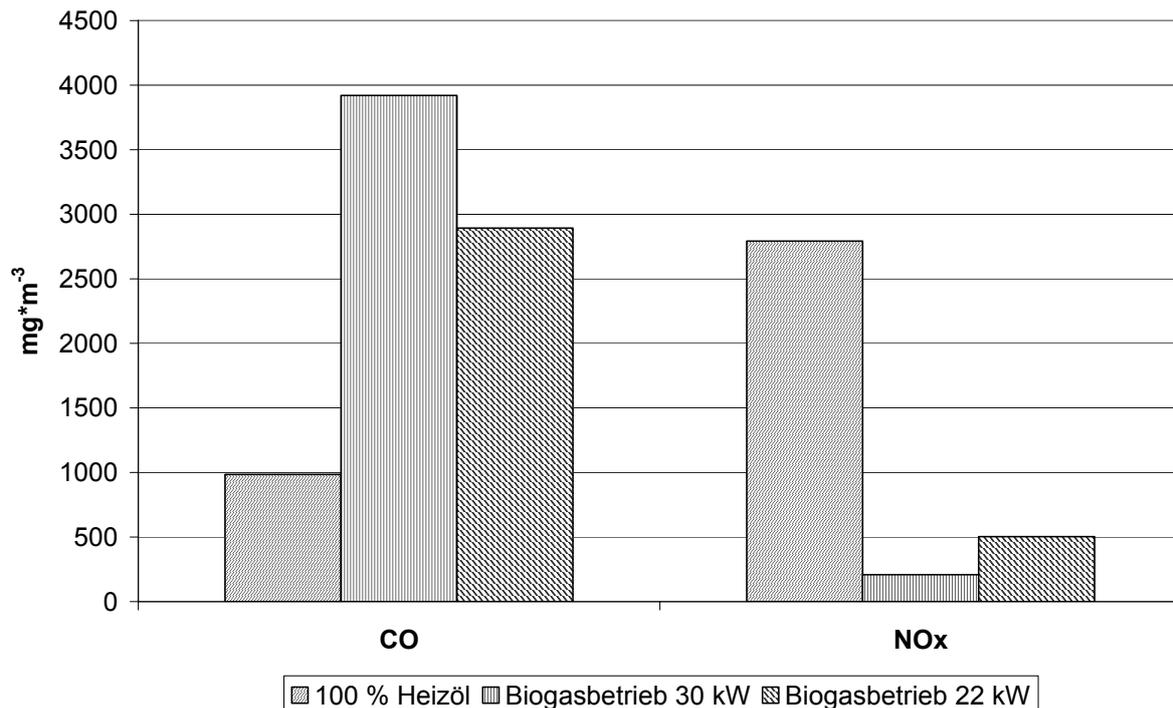


Abbildung 36: Mittelwerte der Kohlenmonoxid- und Stickoxid-Konzentration im Abgas des Zündstrahlmotors aus Messungen bei unterschiedlichen Betriebszuständen

Während beim Betrieb mit Biogas die  $\text{NO}_x$ -Emissionen gegenüber dem reinen Dieselbetrieb stark absinken, nehmen die CO-Konzentrationen im Abgas zu. Dies war auch am Biogasmotor der Pilotanlage zu sehen, wo im Teillast- bzw. Volllastbetrieb in 2003 eine mittlere CO-Konzentration im Abgas von 2894 bzw. 3920  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$  gemessen wurde (Abbildung 36). Die  $\text{NO}_x$ -Konzentration war hingegen in beiden Fällen mit im Mittel 530 bzw. 208  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$  auffallend gering. Bei Abgasmessungen in 2004 wurden während Volllastbetrieb des Motors mit Biogas und einem Zündölanteil von 21,5 % im Mittel 1828  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$   $\text{NO}_x$  und 986  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$  CO gemessen, d. h. hier wurde die empfohlene Emissionsbegrenzung von 1500  $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$   $\text{NO}_x$  noch um etwa 20 % überschritten, während die CO-Emissionen auf vergleichsweise niedrigem Niveau lagen. Aus vorausgegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass es bei Zündstrahlmotoren der unteren Leistungsklasse Probleme bereitet, gleichzeitig die Grenzwerte für CO und  $\text{NO}_x$  einzuhalten (GRONAUER et al., 2002). Weitergehende Untersuchungen zum Abgasverhalten des Motors in Abhängigkeit vom Wartungszustand wurden in einem gesonderten Projekt durchgeführt. Die Ergebnisse werden zu gegebener Zeit an anderer Stelle veröffentlicht.

## A 6.13 Energetische Bilanzierung der Pilotbiogasanlage

### A 6.13.1 Kumulierter Energieaufwand für die Herstellung

Für die Errichtung der Biogasanlage waren eine große Anzahl unterschiedlicher Bauteile und Halbzeuge erforderlich. Ein Bedarf an Energie und/oder Prozesswärme fiel sowohl bei der Herstellung dieser Halbzeuge als auch bei deren Verarbeitung an. Um die Auswirkungen einer modifizierten Bauweise auf den Kumulierten Energieaufwand schnell erfassen zu können, erfolgte eine Zuordnung der Materialien zu den einzelnen Bauteilen wie Fermenter oder Blockheizkraftwerk.

Für die Bereiche Bautechnik und Maschinentechnik wurde eine Materialbilanz erstellt und energetisch bewertet. Zusätzlich wurden die wichtigsten, während der Bauphase anfallenden, energetischen Aufwendungen bzw. Hilfsstoffe betrachtet. Aufwendungen für Betriebsmittel, wie zum Beispiel der Herstellungsaufwand für Baumaschinen oder Schalung, wurden nicht berücksichtigt.

Die Biogasanlage besteht aus drei Hauptfermentern und einer Vorgrube. Das ebenfalls vorhandene Gülleendlager war nicht Teil der Bilanzierung. Die Ausführung der beiden mesophil betriebenen Fermenter erfolgte als Rundbehälter aus Gussbeton, der thermophile Hauptfermenter wurde in Stahl ausgeführt. Das BHKW und die Steuerung der Anlage befand sich in zwei Stahlcontainern (vgl. Kap. 4.3.1).

Abbildung 37 zeigt die Massenbilanz der Herstellung der Pilotbiogasanlage. Die Gesamtmasse der Biogasanlage, die die Bautechnik und die Maschinentechnik umfasst, beträgt 277,4 t. Die Massenbilanz wurde von der Bautechnik (98 %) und hierbei vor allem vom Beton bestimmt (89 %). Die Maschinentechnik trug 1,7 % zur Gesamtmasse der Anlage bei.

Der Kumulierte Energieaufwand der Herstellung der Biogasanlage betrug 277 MWh (Abbildung 38). Der Einfluss der Bautechnik ging im Vergleich zur Massenbilanz auf 84 % (Beton 28,3 %) zurück. Als Folge des hohen Anteils von energetisch aufwendig herzustellenden Materialien wie Metallen und Kunststoffen betrug der Anteil der Maschinentechnik am gesamten  $KEA_H$  13,7 %. Die Betriebsstoffe machten 2,3 % aus.

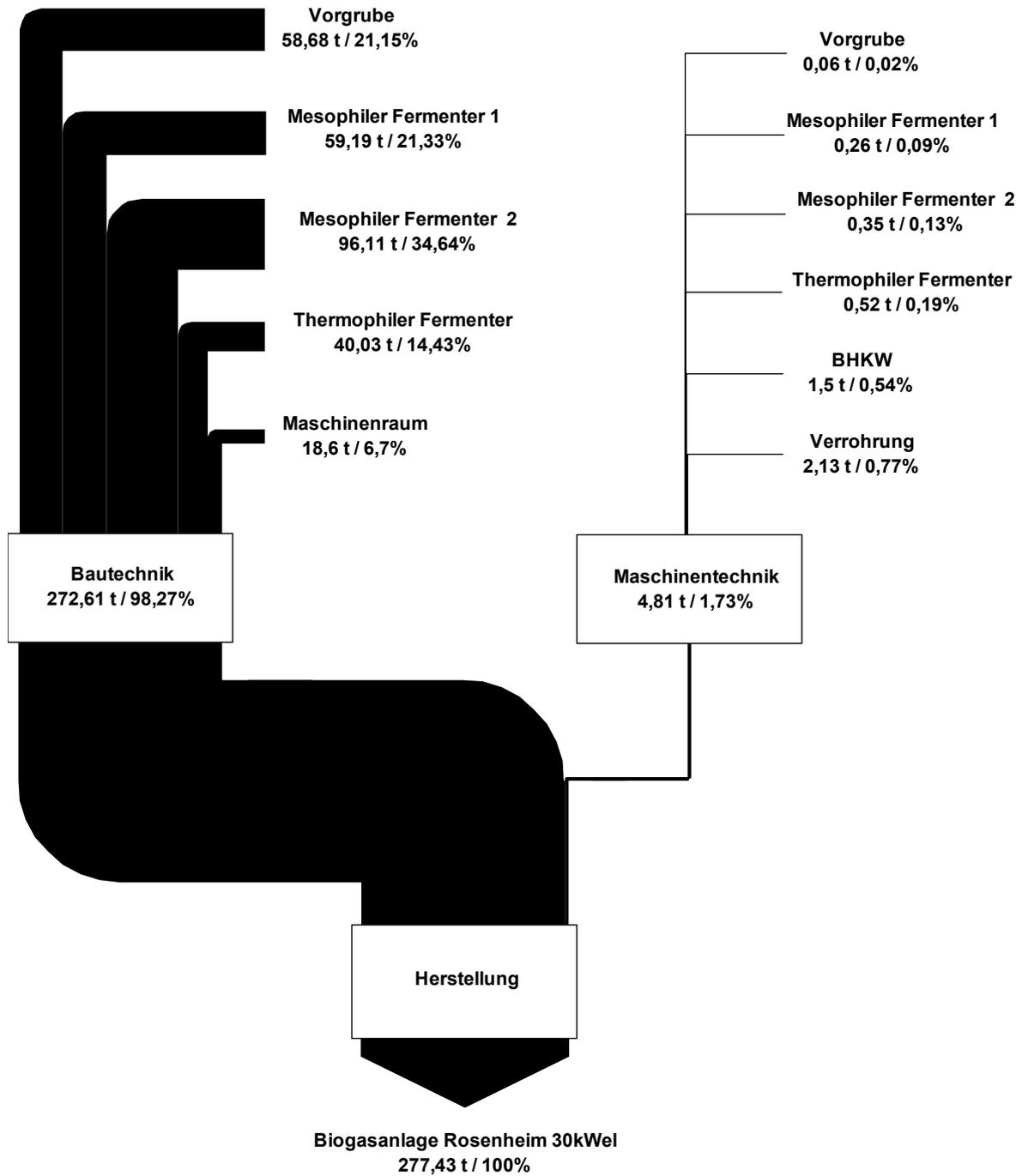


Abbildung 37: Massenflussdiagramm für die Herstellung der Pilotbiogasanlage

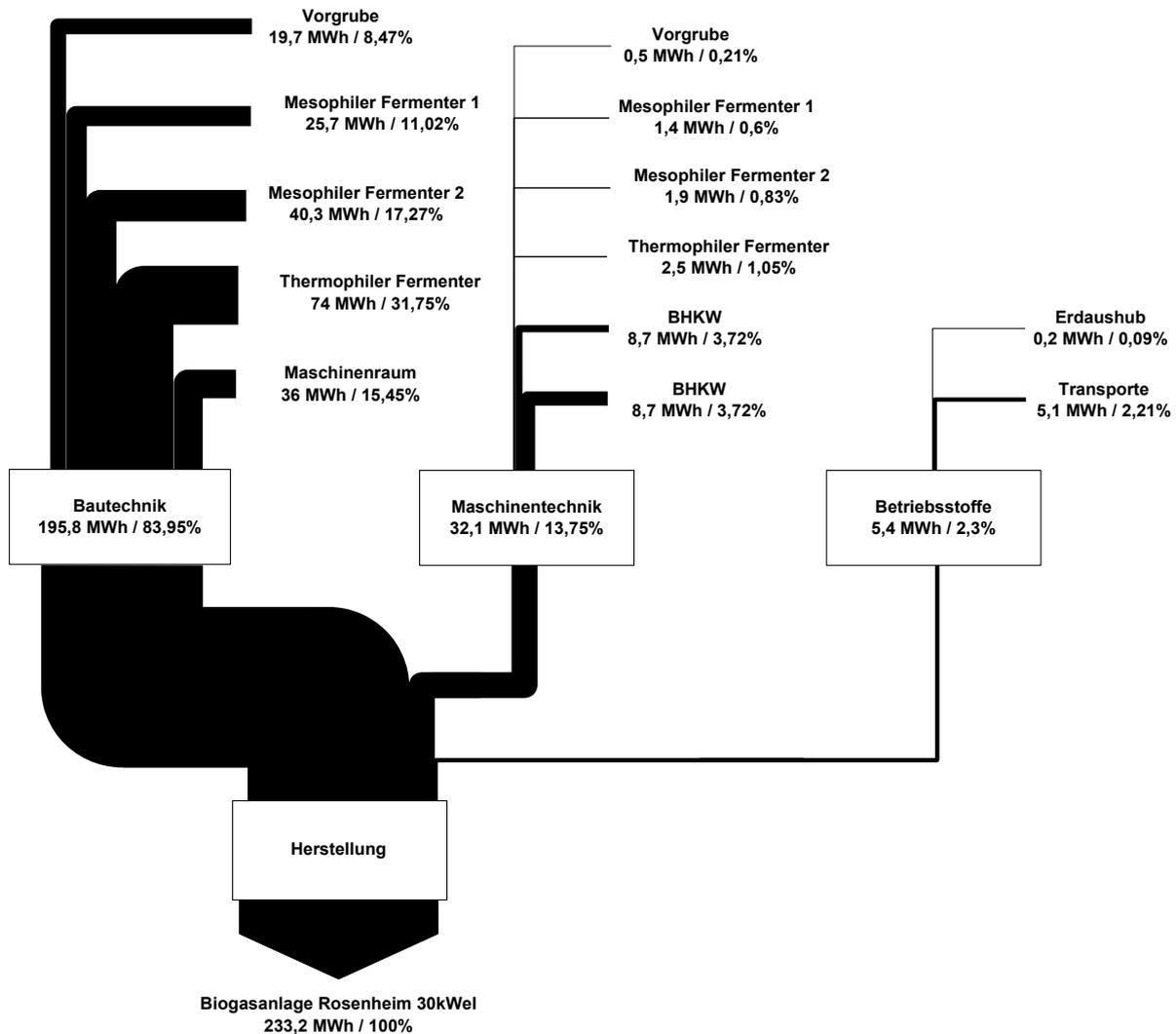


Abbildung 38: Energieflussdiagramm für die Herstellung der Pilotbiogasanlage

### A 6.13.2 Kumulierter Energieaufwand für die Nutzung

In diesem Kapitel werden die Bilanzen für die Wärme- und Stromerzeugung sowie die für den Betrieb der Biogasanlage erforderlichen Aufwendungen an Betriebsstoffen dargestellt. Die Bilanzierung der Energieströme erfolgte über den Zeitraum vom 15. Februar 2004 bis zum 14. Februar 2005 und damit über ein volles Betriebsjahr mit weitgehend regelrechem Betrieb der Pilotanlage

*Betriebsweise.* Auf der Pilotanlage wurden laufend bestimmte hygienische Parameter der rohen und anaerob behandelten Gülle untersucht. Ein konstanter Temperaturverlauf in den Fermentern war anzustreben. Die Fermenter wurden mit Abwärme des Blockheizkraftwerks beheizt. Die Laufzeiten und die Intervalle des BHKW-Betriebes richteten sich einerseits nach der vorhandenen Menge an Biogas, andererseits aber auch nach dem Wärmebedarf der Fermenter. Der Wärmebedarf im Winter und Sommer war unterschiedlich groß. Während die Abwärme aus der Verstromung des Biogases im Sommer zum Beheizen ausreichte, war im Winter zusätzlich Heizölbetrieb des BHKW erforderlich. Lief das BHKW im Biogasbetrieb, so wurde es in aller Regel mit Vollast (30 kW<sub>el</sub>) betrieben, wobei ein höherer elektrischer

Wirkungsgrad als im Teillastbetrieb erreicht wurde. Im reinen Heizölbetrieb wurde das BHKW im Teillastbetrieb bei etwa  $18 \text{ kW}_{\text{el}}$  gefahren.

*Wärmeerzeugung.* Vom Blockheizkraftwerk wurden jährlich 151 MWh an Wärme an das Heizsystem geliefert. Die Wärmeverluste der Wärmeverteilung im BHKW-Raum betragen jährlich 7,91 MWh. Die Wärmelieferung an die Fermenter (inklusive der Leitungsverluste zwischen BHKW-Raum und Fermenter) betrug damit pro Jahr 143 MWh. Die Aufheizung der Gülle, ausgehend von der Temperatur in der Vorgrube auf knapp  $40^\circ\text{C}$ , erfolgte im F1. Dann folgte im F2 die Aufheizung auf  $55^\circ\text{C}$ . Im F3 kühlte das Substrat je nach Umgebungstemperatur unterschiedlich stark ab; eine zusätzlich Beheizung erfolgte nur, wenn anderweitig nicht verwertbare Wärmeenergie zur Verfügung stand.

Der horizontal angeordnete thermophile Fermenter wies im Vergleich zu den mesophilen Fermentern eine größere spezifische Oberfläche auf (ungefähre Oberfläche-Volumen-Verhältnisse: F1:  $1,22 \text{ m}^{-1}$ , F2:  $2,05 \text{ m}^{-1}$ , F3:  $1,19 \text{ m}^{-1}$ ). Gleichzeitig war der Fermenter schlechter wärmedämmend. Er benötigte daher mit 55 % den größten Anteil der Heizwärme. Etwa 40 % der Wärmelieferung des Blockheizkraftwerks wurde für die Beheizung des F1 verwendet, F3 bezog nur knapp 5 % der Heizenergie.

*Stromerzeugung und -einspeisung.* Auf der Anlage wurden pro Jahr 124 MWh elektrische Energie erzeugt. Davon wurden 30 MWh als Nebenprodukt des Heizölbetriebs für Heizzwecke erzeugt. Aus Biogas (incl. zum Betrieb notwendiges Zündöl) wurden damit 94 MWh elektrische Energie bereitgestellt (Bruttoenergieerzeugung; Abbildung 39).

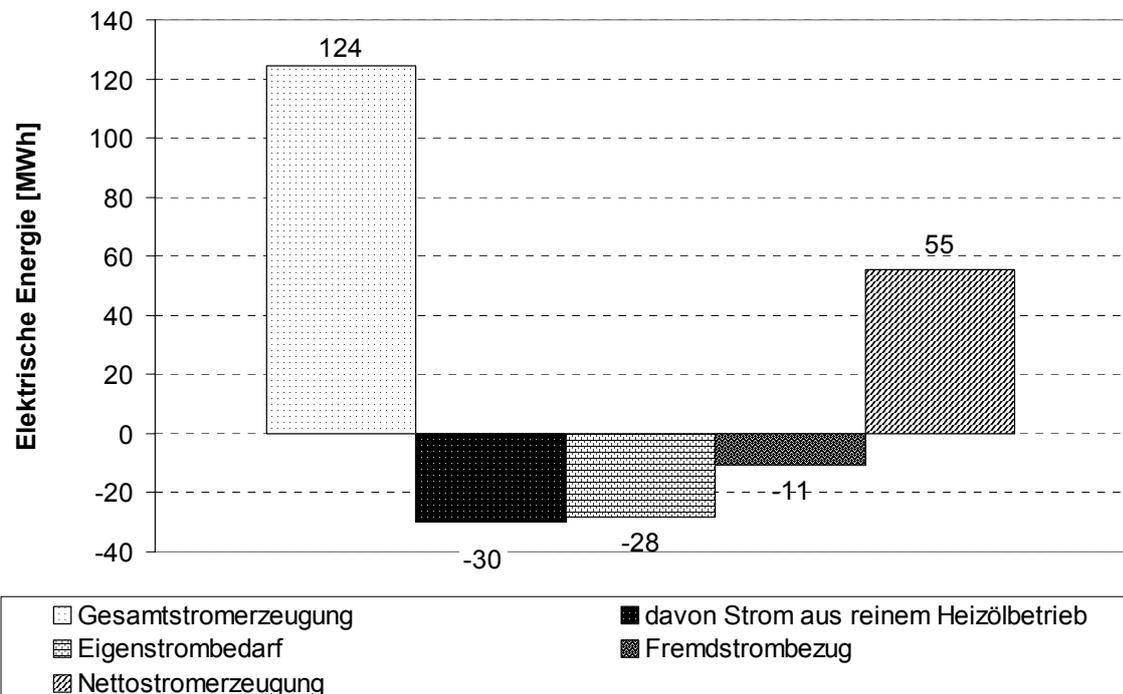


Abbildung 39: Gesamtstromerzeugung, Strom als Nebenprodukt des BHKW-Betriebs auf Heizölbasis zu Heizzwecken, Eigenstrombedarf sowie Fremdstrombezug und die daraus resultierende Nettostromerzeugung

Der Eigenstromverbrauch der Anlage (inkl. Bezug von Netzstrom) betrug 39 MWh. Damit konnten 55 MWh ins öffentliche Netz eingespeist werden (Nettoenergieerzeugung). Auf die Bruttoenergieerzeugung bezogen, betrug der Eigenstromverbrauch 41 %. Hauptverbraucher

der elektrischen Energie waren Pumpen und Rührwerke. Der erzeugte Strom wurde vollständig ins 0,4 kV-Netz eingespeist. Ein Transformator war nicht notwendig.

Bei Praxisbiogasanlagen wird ein Stromverbrauch in Höhe von 4 bis 5 % der Bruttoenergieerzeugung geschätzt (FNR, 2004) Diese Werte werden von den auf der Pilotbiogasanlage gemessenen weit übertroffen. Zunächst ist die Anlage sehr klein dimensioniert, und es wird ausschließlich Substrat mit einer geringen Energiedichte eingesetzt. Zusätzlich ist der Betrieb der Versuchsanlage technisch sehr aufwendig (3 Fermenter mit 3 Rührwerken und 3 Pumpen). Bei den gegebenen verhältnismäßig langen Laufzeiten der Rührwerke ergibt sich ein extrem hoher Betriebsenergieverbrauch.

*Brennstoffe.* Die Biogasanlage produzierte pro Jahr ein Normvolumen von 47.190 m<sup>3</sup> Biogas. Bei einem Methangehalt im Jahresdurchschnitt von 58,7 % entsprach das einer Energiemenge von 276 MWh. Diese wurde dem BHKW-Modul zugeführt (Abbildung 40).

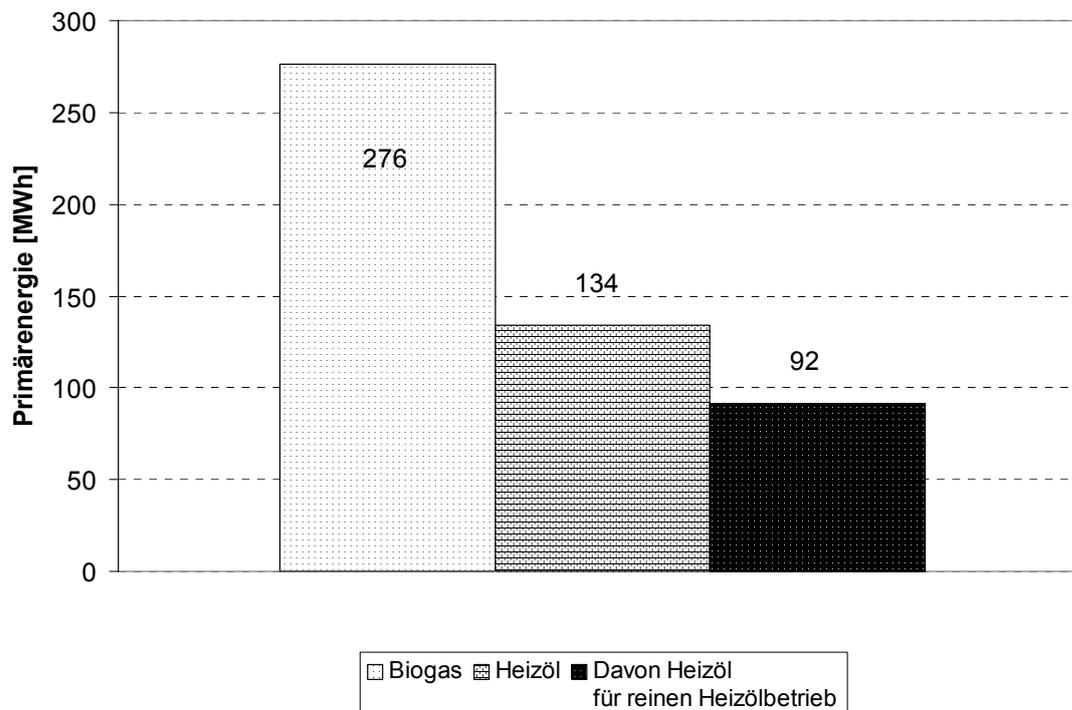


Abbildung 40: Brennstoffbezug des BHKW

Der Heizölverbrauch des BHKW-Moduls lag bei 134 MWh (Primärenergie), was einem Volumen von 13.305 l entspricht. Davon wurden 92 MWh für den reinen Heizölbetrieb zu Heizzwecken gebraucht. Im Biogasbetrieb wurden 42 MWh Heizöl als Zündöl verbraucht. Der als Quotient der erzeugten elektrischen Energie und der Brennstoffzufuhr berechnete elektrische Wirkungsgrad des Aggregats beträgt somit 30 %.

Zwischen 15. Februar und 26. August 2004 wurde das BHKW im Biogasbetrieb mit einem Zündölanteil von ca. 16 % betrieben, dann erfolgte bei einer Wartung die Neueinstellung der Einspritzpumpe und damit eine Senkung auf 10 %. Im Jahresdurchschnitt errechnete sich für die Pilotanlage wegen des hohen Heizöleinsatzes im Winterhalbjahr ein Zündölanteil von 25 % (Tabelle 40).

Tabelle 40: Zündölanteile des BHKW-Motors im Biogasbetrieb und im Jahresmittel

Primärenergie Biogas MWh	Primärenergie Zündöl MWh	Zündölanteil	
			%
276	42	13	Biogasbetrieb
276	92	25	Jahresdurchschnitt

*Strombezug.* Der Verbrauch der Biogasanlage an elektrischer Eigen- und Betriebsenergie wurde bei BHKW-Betrieb aus der eigenen Stromproduktion gedeckt, bei BHKW-Stillstand wurde der benötigte Strom aus dem 0,4 kV-Netz bezogen. Da die Pumpen und Rührwerke Tag und Nacht in regelmäßigen Intervallen liefen, das BHKW jährlich jedoch nur 5.617 Stunden (64 % der Jahresarbeitszeit) in Betrieb war, musste ein großer Teil der zum Betrieb nötigen elektrischen Energie aus dem Netz bezogen werden.

Der Gesamtstromverbrauch der Anlage lag bei 39 MWh pro Jahr (Abbildung 41), was 31 % der Bruttostromproduktion entsprach. Etwas mehr als ein Viertel (28 %) dieses benötigten Stroms musste mit Fremdstrom gedeckt werden.

Wegen der automatisch etwas verkürzten Laufzeiten der Rührwerke bei BHKW-Stillstand lag der Anteil des Fremdstroms an der gesamten für den Betrieb notwendigen elektrischen Energie bei weniger als 36 % (wie es eigentlich aus der Jahresarbeitszeit des BHKWs zu erwarten gewesen wäre). Mögliche Maßnahmen zur Verringerung des Strombedarfs sind:

- die Reduktion der Rührarbeit auf das Notwendigste.
- die Anpassung der Größe des BHKW an die Biogasproduktion, denn eine möglichst ganztägige Laufzeit vermeidet den Bezug von elektrischer Energie aus dem öffentlichen Netz.

*Schmiermittel und Ersatzteile.* Da die anfallenden Mengen an Schmiermitteln vergleichsweise gering waren und das Schmieröl teilweise wieder rückgeführt wurde, somit energetisch nur ein geringer Verbrauch stattfand, blieb der Schmierölverbrauch unberücksichtigt. Bisher wurden noch keine größeren Reparaturarbeiten aufgrund normalen Verschleißes an den Maschinenteilen der Biogasanlage durchgeführt. Aus diesem Grund standen zum KEA der Ersatzteile keine Daten zur Verfügung.

*Energiebilanz eines Betriebsjahres.* Im nachfolgenden Sankey-Diagramm (Abbildung 41) wurden die Energieflüsse, aufgeteilt in Energiebezug, Wärme- und Stromproduktion, Betriebsstoffe sowie Eigen- und Betriebsenergieverbrauch während eines Jahres dargestellt. Die eingezeichneten Motorverluste entstanden durch ungenutzte Abwärme aus dem Abgas und durch Wärmeabstrahlung. Die Verluste des Heizsystems umfassten nur die Verluste der Heizwasserverteilung im BHKW-Raum. Die Wärmemenge pro Fermenter beinhaltet auch die Wärmeverluste, die in der Wärmeleitung vom BHKW-Raum zum Fermenter auftraten.

*Prognose für den weiteren Betrieb.* Hochgerechnet auf die gesamte 20-jährige Nutzungsphase der Biogasanlage (technische Lebensdauer). ergeben sich die in Tabelle 41 zusammengestellten Energieflüsse Die Nettostromerzeugung errechnet sich aus der Bruttostromerzeugung abzüglich dem Eigenstrombedarf und dem Fremdstrombezug.

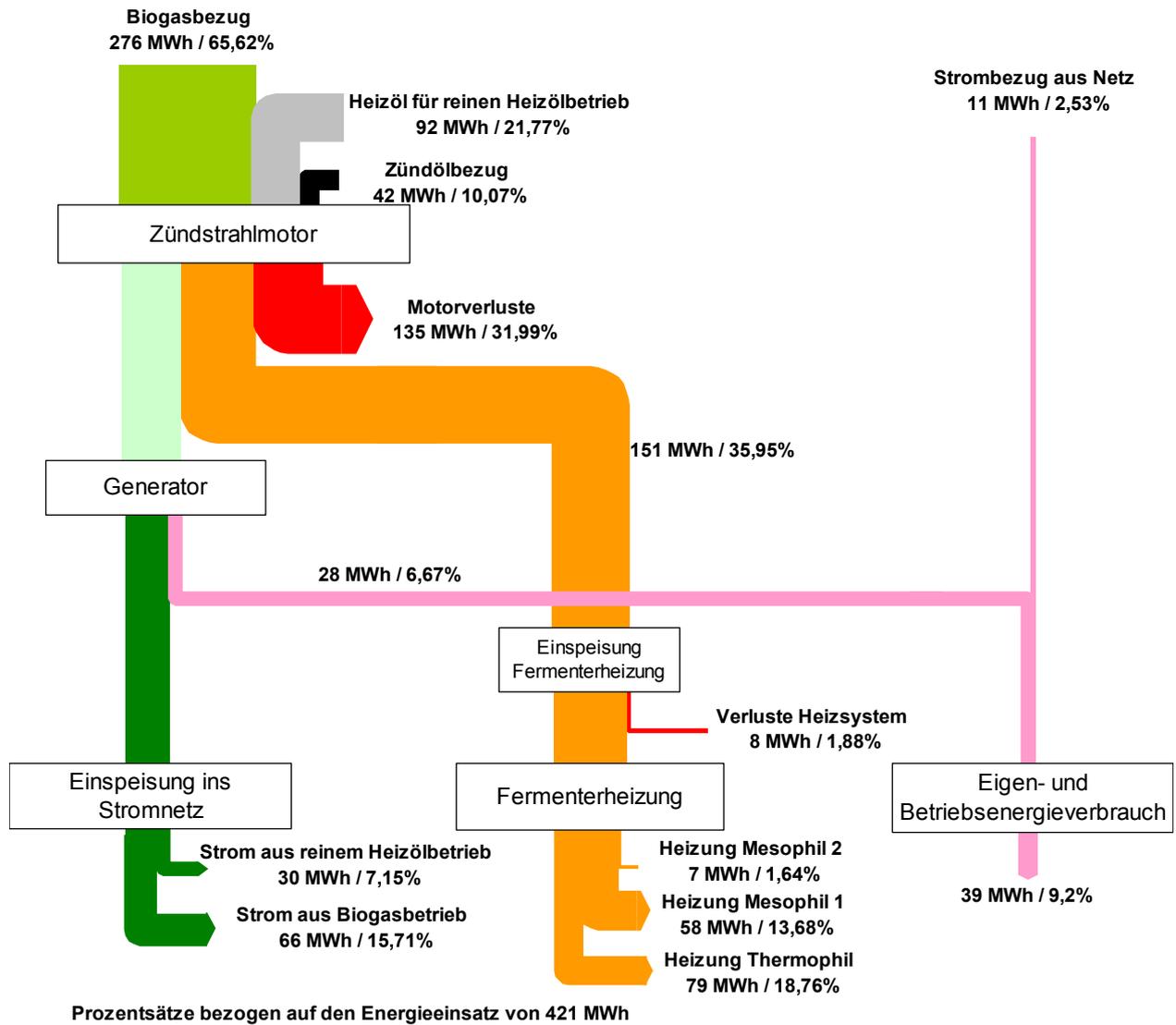


Abbildung 41: Energieflüsse der Pilot-Biogasanlage je Betriebsjahr

Tabelle 41: Prognose der Energieflüsse der Pilotanlage über ein Jahr bzw. über die Laufzeit von 20 Jahren

	Energiezu- und abfuhr MWh	
	pro Jahr	während gesamter Lebensdauer (20 Jahre)
Biogasbezug	276	5.527
Heizölbezug	134	2.682
Eigenstrombedarf	28	562
Fremdstrombezug	11	213
Ersatzteilbedarf	-	25
Wärmelieferung	151	3.028
Strom aus reinem Heizölbetrieb	30	602
Bruttostromerzeugung aus Biogas	94	1.884
Nettostromerzeugung aus Biogas	66	1.323
Nettostromerzeugung (zusätzlich Strom aus Netz abgezogen)	55	1.109

Es wurde ein „technischer“ Abschreibungszeitraum von 20 Jahren für die Bautechnik und von 10 Jahren für die Anlagentechnik der Biogasanlage angesetzt. Für den Motor des Blockheizkraftwerks wurde ein Abschreibungszeitraum von 5 Jahren angenommen. Das bedeutet, dass während der 20-jährigen Laufzeit einmal die gesamte Anlagentechnik (ohne Verrohrung) erneuert, sowie zusätzlich zweimal der BHKW-Motor ausgetauscht werden muss. Zusammen ergab sich so ein Energieaufwand für Ersatzteile in Höhe von 25 MWh.

*Zusammenfassung des  $KEA_N$ .* Aus Tabelle 42 ist der Kumulierte Energieaufwand für die Nutzung der Pilot-Biogasanlage ersichtlich. Biogas wird nicht zum kumulierten Energieaufwand gezählt, da der Energieträger nicht fossilen Ursprungs ist. Der Primärenergieeinsatz von 3.347 MWh für den Betrieb der Anlage setzt sich damit aus den Primärenergien für Heizöl, Fremdstrom und Ersatzteilen zusammen. Den maßgeblichen Energieaufwand während der Nutzungsphase stellt Heizöl, mit einem Anteil von 80 % dar. Der auffallend hohe Fremdstrombezug geht mit 19 % in den  $KEA_N$  ein. Der Ersatzteilbedarf macht weniger als 1 % aus.

Tabelle 42: Primärenergieeinsatz in der Pilotanlage während der Nutzungsphase

	<b><math>KEA_N</math> der Pilot-Biogasanlage</b>	
	MWh	
Heizölbezug	2.682	80 %
Fremdstrombezug	640	19 %
Ersatzteilbedarf	25	1 %
Summe	3.347	100 %

### A 6.13.3 Kumulierter Energieaufwand für die Entsorgung

Da die betrachtete Biogasanlage erst am Beginn ihrer Nutzungsdauer steht, ist der Energieaufwand der Entsorgung nicht bekannt. Es müssen verschiedene Entsorgungsarten und Entsorgungswege berücksichtigt werden, wobei davon ausgegangen wurde, dass das stoffliche und energetische Recycling im Vergleich zum heutigen Stand weiter zunimmt. Die Entsorgungsarten wurden mit Hilfe einer Studie über die Verwertung und Behandlung von Bauabfällen festgelegt (Bundesamt für Energiefragen, 1992).

Beim Energieaufwand für die Entsorgung sind die Transporte zu den Entsorgungs- bzw. Aufbereitungsanlagen und der anteilige Energieaufwand der entsorgten Stoffe an der Erstellung dieser Anlagen zu berücksichtigen. Für alle rückgeführten Materialien erfolgte eine Gutschrift in Form des Heizwertes. Ausgangspunkt war eine komplette Demontage und Verwertung bzw. Entsorgung der Anlage nach 20 Jahren.

*Rückbau der Anlage und Transporte.* Für den Abbruch der Fermenter wurde nach Schäfer et al. (1992) ein spezifischer Dieselverbrauch von 4,0 l/t Abbruch (0,42 MWh/t) angenommen. Der Bewehrungsstahl wird herausgebrochen und einer Aufbereitungsanlage zugeführt. Der gebrochene Beton wird als Zuschlagstoff im Straßenbau verwendet. Als Transportentfernung des Betons wurde die Entfernung zur derzeit nächstgelegenen Bauschutttaufbereitungsanlage in Schwabering (30 km einfach) veranschlagt. Als Transportmittel wurden LKW (Baustellenverkehr) angenommen. Für die sonstigen Metalle der Bautechnik, die Metalle der Anlagentechnik und für den herausgebrochenen Bewehrungsstahl wurde eine Wiederverwertung durch Einschmelzen angenommen. Als Transportart wurden LKW im Fernverkehr mit einer Transportentfernung von 150 km angenommen (Anhang 2). Die

Energieaufwendungen, die für die Aufbereitung nötig sind, können zwar recht hoch sein, da diese aber dem Sekundärprodukt zugeschlagen werden, fanden sie hier keine Beachtung.

An thermisch verwendbaren Stoffen fallen lediglich geringe Mengen an. In Frage kommen die Kunststoffbauteile wie Isolierung, Verrohrung und Gashaube. Hier wurde ein Transport mit Baustellenfahrzeugen zur Müllverbrennungsanlage Rosenheim angenommen (15 km). Über die Entsorgung von Kunststoffverbundmantelrohren lagen keine Daten vor, weswegen ihre Entsorgung hier nicht berücksichtigt wurde. Tabelle 43 zeigt den Kumulierten Energieaufwand für den Gebäudeabbruch sowie für den Abtransport der Materialien. Mehr als die Hälfte der gesamten Energie werden zum Abbruch der Fermenter und der Fundamente benötigt, knapp 30 % nimmt der Transport des Betons zur Aufbereitungsanlage ein.

Tabelle 43: KEA für Gebäudeabbruch und Abtransport der Materialien

	Masse t	benötigte LKW- Fahrten	Transport- entfernung km	Gesamt- strecke km	spez. KEA kWh/t bzw. kWh/km	KEA MWh
Abbruch der Fermenter und Fundamente	247				43,25	10,67
Transport von Beton zur Weiterverwertung	247	17	30	1020	5,31	5,42
Transport brennbarer Stoffe zur Müllverbren- nungsanlage	1,5	1	15	30	5,31	0,16
Transport der Metalle zur Aufbereitung	28	2	150	600	4,42	2,65
Summe						18,90

*Thermische Verwertung.* Für die thermische Behandlung der Reste der Biogasanlage können Energiegutschriften erlangt werden. Geht man davon aus, dass der KEA einer Müllverbrennungsanlage  $0,34 \text{ MWh/t}_{\text{verbranntes Gut}}$  beträgt, und nimmt man einen durchschnittlichen Heizwert von  $2,36 \text{ MWh/t}_{\text{verbranntes Gut}}$  an (KÖHLER *et al.* 1996), so ergibt sich die in Tabelle 44 aufgeführte Energiegutschrift in Höhe von  $3,01 \text{ MWh}$ .

Tabelle 44: KEA für thermische Verwertung

Masse [t]	KEA <sub>Müllverbrennungsanlage</sub> [MWh/t <sub>verbranntes Gut</sub> ]	Heizwert [MWh/t <sub>verbranntes Gut</sub> ]	Netto-Heizwert [MWh/t <sub>verbranntes Gut</sub> ]	Energiegutschrift [MWh]
1,49	0,34	2,36	2,02	-3,01

*Gutschriften.* Wiederverwertete Stoffe wurden nach der VDI-Richtlinie 4600 (1998) bewertet. Verlassen Materialien einen Energiebilanzraum und werden sie danach anderweitig verwendet, so ist der Heizwert dieser Materialien dem Energiebilanzraum gutzuschreiben. Nach Schwaiger (1996) beträgt der gut zu schreibende Heizwert für Stahl  $2,1 \text{ MWh/t}$  und für Nichteisenmetalle  $8,6 \text{ MWh/t}$ .  $27,85 \text{ t}$  Stahl stammten aus der Bautechnik,  $2,85 \text{ t}$  aus der Anlagentechnik. Die Nichteisenmetalle ( $283 \text{ kg}$ ) beinhalten Aluminium und das Kupfer der Motoren und des Generators. Nach Tabelle 45 ergab sich so eine Energiegutschrift von  $60 \text{ MWh}$ .

Tabelle 45: Gutschriften für wiederverwertete Materialien

	<b>Masse</b> t	<b>Heizwert</b> MWh/t	<b>KEA</b> MWh
Stahl	27,85	2,1	-57
NE-Metalle	0,28	8,6	-2
<b>Summe</b>			<b>-60</b>

*Zusammenfassung des  $KEA_E$ .* Der  $KEA_E$  setzt sich aus den Aufwendungen für den Gebäudeabbruch und Transport sowie den Gutschriften für energetisches und stoffliches Recycling zusammen. Für die Entsorgung errechnete sich nach Tabelle 46 eine energetische Gutschrift von 44 MWh.

Tabelle 46: KEA für die Entsorgung

	<b><math>KEA_E</math></b> MWh
Gebäudeabbruch und Transporte	19
Gutschrift thermische Verwertung	-3
Gutschrift stoffliche Verwertung	-60
<b>Summe</b>	<b>-44</b>

#### A 6.13.4 KEA der Pilot-Biogasanlage

Der KEA der Biogasanlage setzt sich aus den Ergebnissen der vorigen Kapitel zum  $KEA_H$ ,  $KEA_N$  und  $KEA_E$  zusammen (Tabelle 47 und Abbildung 42). Zum überwiegenden Teil wird der KEA durch den Energieaufwand während der Nutzung bestimmt (94,6 %). Der KEA der Herstellung hat am gesamten KEA einen Anteil von 6,6 % während der Energiegewinn aus der Entsorgung 1 % ausmacht.

Tabelle 47: Kumulierter Energieaufwand der Pilot-Biogasanlage

	<b>KEA</b> MWh	
Herstellung: $KEA_H$	233	6,6 %
Nutzung: $KEA_N$	3.347	94,6 %
Entsorgung: $KEA_E$	-44	-1,2 %
<b>KEA</b>	<b>3.536</b>	<b>100 %</b>

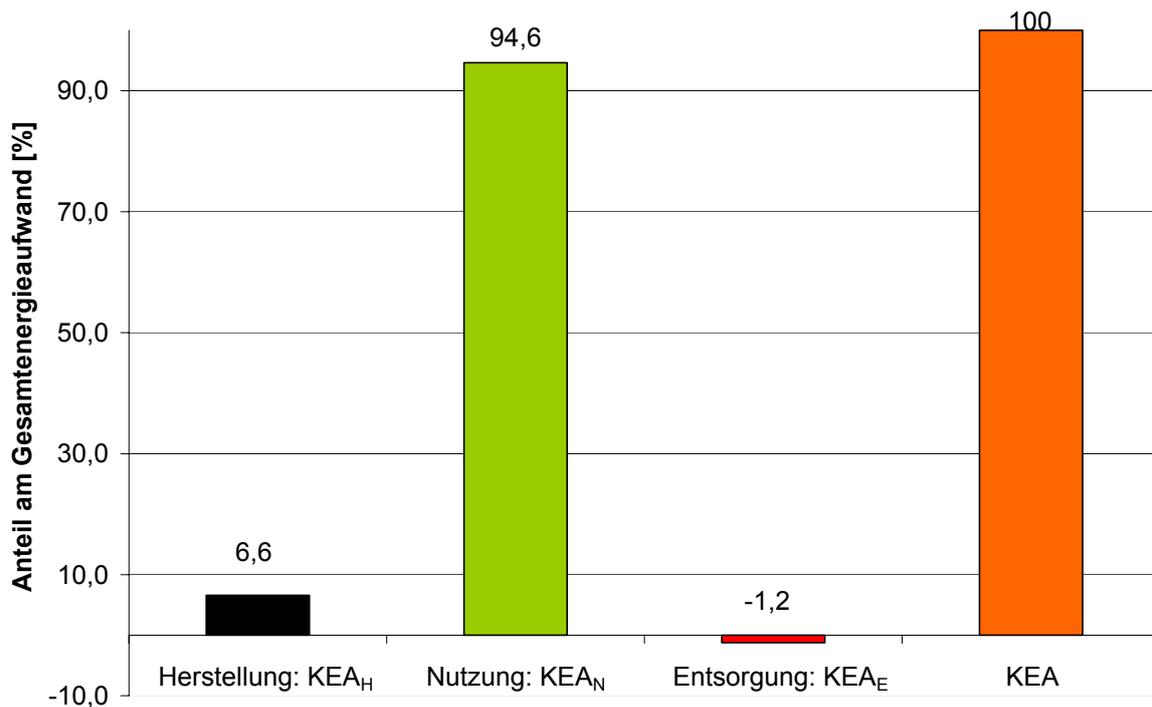


Abbildung 42: Energieaufwendungen für die Herstellung, Nutzung und Entsorgung der Pilotbiogasanlage

### A 6.13.5 Maßnahmen zur Reduzierung des KEA

Der geringe Anteil des  $KEA_H$  am KEA der gesamten Anlage und die dominierende Stellung des  $KEA_N$  zeigt, dass vor allem Maßnahmen, die einen geringeren Betriebsstoffverbrauch zur Folge haben, einen großen Nutzen bringen:

- Die Senkung des Heizölverbrauchs ist anzustreben. Dies könnte durch ein richtig dimensioniertes BHKW erfolgen. Das bestehende BHKW lief nur zu 64 % der Zeit. Bedingt durch die kurze tägliche BHKW-Laufzeit wurde die Anlage unregelmäßig mit Wärme versorgt. Aus Forschungszwecken war jedoch ein immer gleiches Temperaturniveau vor allem im thermophilen Fermenter erforderlich. Im Winterhalbjahr war so der Betrieb des BHKWs im reinen Heizölbetrieb nötig, um die Temperaturen konstant zu erhalten. Ein kleineres BHKW würde dagegen den Heizölverbrauch drastisch senken, da eine konstante Versorgung der Anlage mit Wärme gewährleistet wäre. Nach Berechnungen von BAUER (2003) kann die Anlage bei verbesserter Bauweise (v.a. Optimierung der Isolierung der Fermenter und an Biogasproduktion angepasste Leistung des BHKWs) ganz ohne Zusatzheizung mit Heizöl auskommen. Dadurch würde der Primärenergiebedarf um 92 MWh pro Jahr sinken.
- Auch durch eine optimierte Fermenterheizung kann der Heizbedarf gesenkt werden. Ein konstruktives Defizit der bestehenden Anlage war beispielsweise die zu klein dimensionierte Heizfläche am thermophilen Fermenter. Durch die nachträgliche Ausrüstung des Paddelrührwerks des thermophilen Fermenters mit Wischblättern wurde eine deutliche Verbesserung des Wärmeüberganges und eine Anhebung des Temperaturniveaus erzielt (siehe Kapitel 6.1). Auf der Biogasanlage hat das BHKW grundsätzlich die Funktion die Anlage zu beheizen. War gerade kein Biogas vorhanden, aber die angestrebten Temperaturen in den Fermentern nicht erreicht, wurde das BHKW mit Heizöl betrieben. Das BHKW hat aber nur einen thermischen

Wirkungsgrad von 33 %. Sehr viel effektiver ließe sich das Heizen bewerkstelligen, wenn man mit dem Heizöl einen Heizkessel mit einem thermischen Wirkungsgrad von 85 % beheizte. Der Bedarf an Heizöl für die Phasen des reinen Heizölbetriebs des Blockheizkraftwerks könnte so um über 50 % reduziert werden.

- Die langen Stillstandszeiten des BHKWs sorgen dafür, dass der Fremdstrombezug ansteigt, da die Rührwerke und Pumpen 24 Stunden laufen, auch wenn das BHKW gerade keinen Strom liefert. Hier sollte die Steuerung der Anlage dahingehend verändert werden, während BHKW-Stillstand weniger Fremdstrom zu beziehen. Die Rührzeiten der einzelnen Fermenter ließen sich weiter verkürzen. Darauf deutet das Nichtvorhandensein einer Schwimmschicht auf den Fermentern hin. Die Firma SCHMACK BIOGAS AG weist in Betreiberschulungen darauf hin, dass eine dünne Schwimmschicht in den Fermentern wünschenswert ist. Auf der Pilotbiogasanlage findet sich jedoch keine Schwimmschicht auf der Gülle in den Fermentern, was auf ein zu intensives Rühren hindeutet.

#### **Fazit:**

Als KEA der Pilot-Biogasanlage wurde ein Wert von 3.536 MWh ermittelt. Der  $KEA_H$ , der hauptsächlich von der Bautechnik der Anlage bestimmt wird, beträgt 233 MWh (6,6 % des KEA). Der  $KEA_N$  (3.347 MWh bzw. 94,6 % des KEA) wurde aus den über ein Jahr gemessenen Energieströmen der Pilotbiogasanlage errechnet. 80 % des  $KEA_N$  wurden vom Heizölbezug verursacht. Bei der Entsorgung der Anlage wird durch thermische und stoffliche Verwertung ein Teil der bei der Herstellung aufgewendeten Energie zurückgewonnen. Als  $KEA_E$  ergibt sich eine Energiegutschrift von 44 MWh bzw. -1,2 % des KEA.

Der KEA der Pilotbiogasanlage ist vor allem durch die hohen Aufwendungen an fossiler Betriebsenergie gekennzeichnet. Maßnahmen für einen geringeren Betriebsstoffverbrauch sind ein an die tatsächliche Biogasproduktion angepasstes Blockheizkraftwerk, eine optimierte Fermenterheizung und verbesserte Isolation vor allem des thermophilen Fermenters sowie eine Reduzierung der Rührwerkslaufzeiten auf das absolut Notwendige.

#### **A 6.13.6 Erntefaktoren der Pilot-Biogasanlage**

Als Zusammenfassung und Bewertung der einzelnen KEAs wurden der Erntefaktor für das Kraftwerk, der Erntefaktor für die Herstellung und der Gesamterntefaktor berechnet (Tabelle 48). Der Erntefaktor für das Kraftwerk betrug 5,18, d. h. die bei der Herstellung, beim Betrieb und bei der Entsorgung „investierte“ fossile Energie ließ sich 5,18-fach zurückgewinnen. Fossile Betriebsstoffe (Heizöl, Netzstrom) bleiben hier unberücksichtigt.

Tabelle 48: Ermittelte Erntefaktoren der Pilot-Biogasanlage

Nettostromerzeugung	MWh	1.109
KEA Gesamt	MWh	3.536
Heizölbezug	MWh	2.682
primärenergetisch bewerteter Fremdstrom	MWh	640
<b>Erntefaktor für das Kraftwerk</b>	-	<b>5,18</b>
KEA der Herstellung	MWh	233
<b>Erntefaktor der Herstellung</b>	-	<b>4,76</b>
<b>Gesamterntefaktor</b>	-	<b>0,31</b>

Der Erntefaktor der Herstellung beträgt 4,76, d. h. die bei der Herstellung der Biogasanlage investierte Energie lässt sich 4,76-fach wiedergewinnen. Wie beim Erntefaktor des

Kraftwerks werden fossile Betriebsstoffe nicht bewertet, zusätzlich dazu bleiben die energetischen Aufwendungen bzw. Energiegutschriften für Ersatzteilbeschaffung und Entsorgung unberücksichtigt. Weil für die Pilotbiogasanlage die energetischen Gutschriften aus der Entsorgung die energetischen Aufwendungen für die Ersatzteilbeschaffung übersteigen, ist der Erntefaktor für das Kraftwerk höher als der Erntefaktor für die Herstellung.

In die Rechnung geht der für den Anlagenbetrieb aus dem Netz bezogenen Fremdstrom primärenergetisch bewertet ein: Im deutschen Kraftwerksmix wird Strom mit einem durchschnittlichen Wirkungsgrad von 33 % (GEMIS 2005) Haushalten und Kleinverbrauchern bereitgestellt. Dem aus dem Netz bezogenen Strom (213 MWh) liegt damit ein Primärenergieaufwand von 640 MWh zu Grunde. Der Gesamterntefaktor der Pilotbiogasanlage beträgt 0,31. Bei der Berechnung werden alle für den Betrieb, die Nutzung und die Entsorgung der Anlage aufgewendeten fossilen Energien berücksichtigt. Pro MWh investierter fossiler Energie wurden auf der Pilotbiogasanlage 0,31 MWh elektrische Nutzenergie erzeugt.

#### **A 6.13.7 Einordnung des Erntefaktors**

Für den Erntefaktor ähnlich konstruierter Biogasanlagen liegen keine Vergleichsdaten vor. Eine Grobeinschätzung lässt sich aber dennoch vornehmen:

Der Erntefaktor stellt nach Kapitel 4 das Verhältnis von gewonnener Energie zu „investierter“ Energie dar. Einerseits war die spezifische gewonnene Energie (Stromertrag pro GV) in der Pilotbiogasanlage sehr gering. Bei Rindergülle handelt es sich um ein Substrat, mit einem sehr geringen spezifischen Biogasertrag. Nach Berechnungen von JÄGER (2003) können mit der Rindergülle von 10 GV etwa 1kW elektrische Leistung erzielt werden. Damit liegt Rindergülle was den Biogasertrag angeht an der untersten Grenze der vergärbaren Materialien.

Andererseits ist die investierte Energie bei der Pilotbiogasanlage sehr hoch. Zum einen bedingt durch die aufwendige dreistufige Bauweise (hoher  $KEA_H$ ), zum anderen verursacht durch den hohen Heizölbedarf während des Betriebs (hoher  $KEA_N$ ). Konventionelle Anlagen zur Vergärung von Rindergülle sind nur einstufig gebaut, benötigen so nur einen Fermenter und entsprechend weniger Maschinentechnik (z.B. nur eine Pumpe und ein Rührwerk). Bestehende Anlagen zur Vergärung von Rindergülle sind etwa um das 10-fache größer. Auch dieser Größenunterschied bedingt einen geringeren Einsatz an Energie je produzierter Einheit an Strom, da energetische Synergieeffekte (z.B. 10-fach größerer Fermenter braucht nur 3-fach so starkes Rührwerk wie kleine Anlage) auftreten.

#### **A 6.13.8 Primärenergetische Amortisationszeit**

Geht man von einer technischen Nutzungsdauer von 20 Jahren aus, so ergibt sich eine primärenergetische Amortisationszeit ( $AZ_{prim}$ ) von 1,40 Jahren, d. h. nach einer Betriebszeit von knapp 17 Monaten stellt die Biogasanlage „Netto“ Energie zur Verfügung. Bei der Berechnung der  $AZ_{prim}$  wird nicht unterschieden ob der gelieferte Strom aus fossilen oder erneuerbaren Quellen stammt (Tabelle 49).

Tabelle 49: Primärenergetische Amortisationszeit der Pilot-Biogasanlage

Nettostromerzeugung, primärenergetisch bewertet	MWh	3.325
KEA der Herstellung	MWh	233
Technische Lebensdauer der Biogasanlage	Jahre	20
primärenergetische Amortisationszeit	Jahre	1,40

*Einordnung der primärenergetischen Amortisationszeit.* Die primärenergetische Amortisationszeit ist die Zeit, in der die Biogasanlage soviel Energie erzeugt hat, wie zu ihrer Herstellung investiert wurde. Niedrige Energieerzeugung kombiniert mit hoher investierter Energie lässt erwarten, dass  $AZ_{\text{prim}}$  länger dauert, als bei konventionellen Biogasanlagen.

**Fazit:**

Die bei der Herstellung aufgewendete Energie wurde beim Betrieb der Anlage 4,76 mal wiedergewonnen. (Erntefaktor für die Herstellung). Werden auch der Energieaufwand für Ersatzteile und Entsorgungsaufwendungen bzw. –erlöse mit berücksichtigt, so wird die Energie 5,18-fach wiedergewonnen (Erntefaktor für das Kraftwerk).

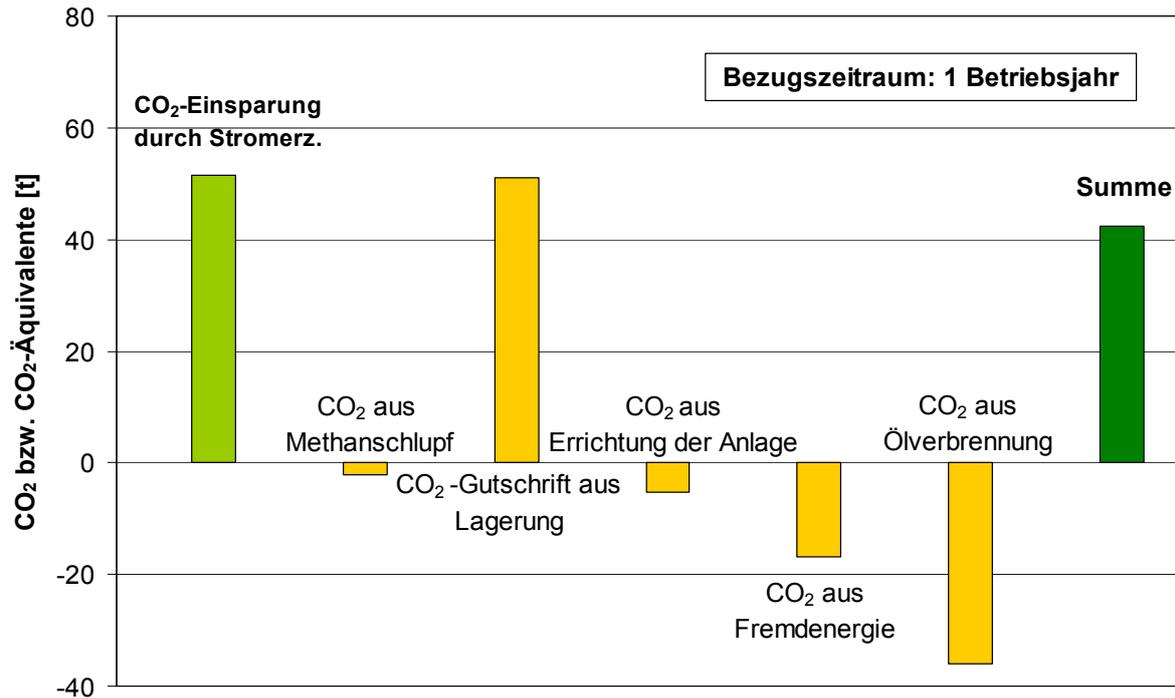
31 % der gesamten „investierten“ fossilen Energie werden während des Betriebs und der Entsorgung der Anlage als Nutzenergie frei (Gesamterntefaktor). Eine Erhöhung des Gesamterntefaktors kann vor allem durch eine Erniedrigung des fossilen Energiebedarfs während des Betriebs erreicht werden. Geeignete Maßnahmen dazu siehe unter Kapitel A 6.13.5.

Für die Pilotbiogasanlage ergibt sich ein Zeitraum von 1,40 Jahren bis soviel (primärenergetisch bewerteter) Nutzenergie bereitgestellt wurde, wie für die Erstellung der Anlage nötig ist (Primärenergetische Amortisationszeit).

**A 6.14 CO<sub>2</sub>-Bilanz der Pilotbiogasanlage**

Die CO<sub>2</sub>-Bilanz gibt Aufschluß über die Klimawirksamkeit der Errichtung, und des Betriebs der Biogasanlage. Die Bezugsgröße ist hier, wie international üblich, das sogenannte CO<sub>2</sub>-Äquivalent.. Methan beispielsweise verursacht über einen Zeitraum von 100 Jahren den 23-fachen Treibhauseffekt wie eine entsprechende Masse Kohlendioxid. Die Masse von Methanemissionen (z.B. in Form von Methanschluß aus dem BHKW) wurde mit dem Faktor 23 in CO<sub>2</sub>-Äquivalente umgerechnet (IPPC 2001). Wie sich die einzelnen Komponenten der in wiedergegebenen Komponenten der Bilanz errechneten, wird in folgenden Einzelkapiteln erläutert. Die Bezugszeit ist jeweils ein Betriebsjahr.

*Zusammenfassung der CO<sub>2</sub>-Bilanz.* Die Quellen von Treibhausgasen fossiler und biogener Quellen teilen sich wie folgt auf: 9% der treibhauswirksamen Emissionen wurden beim Bau erzeugt, die Verbrennung von Heizöl und der Bezug von Fremdstrom verursachte 60% bzw. 28% der Emissionen. Der Methanschluß des Blockheizkraftwerks erzeugte 4% der Emissionen. Durch die Vermeidung von Emissionen nach dem deutschen Kraftwerksmix durch die Bereitstellung von Strom und durch die CO<sub>2</sub>-Gutschrift aus der Gärrestlagerung ergibt sich eine jährliche Einsparung klimawirksamer Gase in Höhe von 42 Tonnen CO<sub>2</sub>-Äquivalenten (Abbildung 43).

Abbildung 43: Die CO<sub>2</sub>-Bilanz der Pilotbiogasanlage

*CO<sub>2</sub>-Einsparung.* Die Biogasanlage speiste jährlich 85,6 MWh elektrischen Strom ins öffentliche Netz ein (inklusive Strom aus reinem Heizölbetrieb). Im deutschen Kraftwerksmix wird eine MWh Strom unter Freisetzung von 601 kg Kohlendioxid erzeugt (GEMIS 2005). Die Einspeisung von jährlich 85,6 MWh elektrischer Energie vermied zunächst 51,4 Tonnen Kohlendioxidemissionen aus dem deutschen Kraftwerksmix. (Abbildung 43).

*CO<sub>2</sub> aus Methanschluß.* Unverbranntes Methan im Abgas des Blockheizkraftwerks wird als „Methanschluß“ bezeichnet. Messungen am BHKW ergaben einen Methanschluß von 2,38 g/m<sup>3</sup> dem BHKW zugeführtes Biogas. Bei einer jährlichen Biogasmenge von 43.952 m<sup>3</sup> werden 2,2 Tonnen Kohlendioxidäquivalente über den BHKW-Auspuff emittiert.

*CO<sub>2</sub> –Gutschrift für Lagerung von Gärrest.* Nach WULF et al. (2003) emittiert vergorene Rindergülle 23 bis 33 % weniger Treibhausgase als unvergorene Gülle. Da im vorliegenden Fall die Treibhausgasemissionen der frischen Gülle nicht gemessen wurden, wird konservativ angenommen, dass sich die Emission klimawirksamer Gase auf 50 % reduziert. Zur Gasproduktion im Gärrestlager der Pilotanlage im Vergleich zur Lagerung von Rohgülle in einer Güllegrube stehen nur wenig Daten zur Verfügung. Eine direkte Messung auf der Pilotanlage war technisch nicht möglich. Zur Abschätzung wurde der oTS-Unterschied zwischen Fermenter 3 und Endlager zu Grunde gelegt. Hier sind nur Daten aus dem Winterhalbjahr auswertbar, da im Sommer vor dem Ausbringen oft Wasser ins Endlager gefüllt wurde, was den oTS-Gehalt verändert. Der hier zu Grunde gelegte Wert stammt aus dem Winterhalbjahr 04/05. Der beobachtete oTS-Unterschied betrug 0,40 %. Multipliziert mit dem jährlichen Volumenstrom der 100 GV-Anlage von 1.951 m<sup>3</sup> Rindergülle ergeben sich 7,8 Tonnen oTS, die im Endlager in Biogas umgewandelt werden. Bei einer Biogasproduktion von 390 m<sup>3</sup> Biogas pro kg oTS entstehen so 3.044 m<sup>3</sup> bzw. 1.705 m<sup>3</sup> Methan (Methangehalt 56 %). Nach obiger Überlegung tritt die doppelte Menge an Methan (3.410 m<sup>3</sup>) aus einem nicht gasdicht abgeschlossenen Güllelager für Rohgülle aus. Diese klimawirksamen Emissionen werden der CO<sub>2</sub>-Bilanz der Biogasanlage gut geschrieben, weil durch die

gasdichte Abdeckung des Endlagers diese (potentiellen) Emissionen zu 100 % vermieden werden. Ein Kubikmeter Methan wiegt 0,71 kg, das  $GWP_{\text{Methan}}$  (Global warming potential) beträgt 23, damit ergibt sich für die Pilotanlage eine Gutschrift in Höhe von 51,14 Tonnen  $\text{CO}_2$ -Äquivalenten.

*CO<sub>2</sub> aus Errichtung der Anlage.* Aus der Materialbilanz lassen sich die materiellen Aufwendungen für die Errichtung und auch für Ersatzteillieferungen im Laufe der Betriebszeit ersehen (Kapitel A 6.13.1). Werden die einzelnen Materialmassen mit ihren jeweils spezifischen Kohlendioxidemissionen, die bei der Herstellung direkt und indirekt entstehen, bewertet (Anhang 5), so ergibt sich die Menge an Kohlendioxid, die für den Bau und den baulichen Erhalt der Biogasanlage investiert werden mussten. Im vorliegenden Fall summierte sich die „investierte“ Menge an  $\text{CO}_2$ -Äquivalenten fossilen Ursprungs auf 5,3 Tonnen. Dabei wurde die gesamte  $\text{CO}_2$ -Menge gleichmäßig auf die technische Lebensdauer der Anlage (20 a) aufgeteilt. Da der Bezugszeitraum im vorliegenden Fall ein Jahr ist, entspricht das einem Zwanzigstel der Emissionen aus der Errichtung der Anlage.

*CO<sub>2</sub> aus Fremdenergie.* Lieferte das BHKW keinen Strom, so musste zum Betrieb der technischen Geräte auf der Biogasanlage Strom aus dem öffentlichen Netz bezogen werden. Dieser Strom wird unter Erzeugung von Emissionen erzeugt. Im deutschen Kraftwerksmix entstehen nach GEMIS 601 kg Kohlendioxidäquivalente pro an den Verbraucher gelieferte  $\text{MWh}_{\text{el}}$ . Der Fremdstrombezug betrug 28,1  $\text{MWh}$ . Das entspricht 16,9 Tonnen Kohlendioxidäquivalenten.

*CO<sub>2</sub> aus Zündöl.* Zum Betrieb der Anlage ist Heizöl nötig, einerseits zum Betrieb des BHKWs im Biogasbetrieb, andererseits um den Wärmehaushalt der Fermenter aufrecht zu erhalten. Es wurde angenommen, dass die Verbrennung von einem Liter Heizöl 2,70 kg  $\text{CO}_2$  freisetzt. Der Einsatz von 13.305 l Heizöl verursachte Emissionen in Höhe von  $\text{kg/m}^3$  Methan 35,9 Tonnen  $\text{CO}_2$ . Optimierungsmaßnahmen (vgl. Kap. A 6.13.5) könnten diese  $\text{CO}_2$ -Emissionen um 24,6 auf 11,4 t/a reduzieren.

*Einordnung der CO<sub>2</sub>-Bilanz.* Wie unter Kapitel 3 erläutert, verhalten sich der KEA und die  $\text{CO}_2$ -Bilanz einer Biogasanlage richtungsgleich. Eine unter A 6.13.5 und A 6.13.7 beschriebene Verringerung des KEA bzw. Erhöhung des Erntefaktors führt sogleich auch zu einer Verringerung des eingesetzten fossilen Kohlendioxids. Besonders stark lässt sich die  $\text{CO}_2$ -Bilanz beeinflussen durch den Fremdstromanteil. Durch die primärenergetische Bewertung des Fremdstroms wirkt sich der Fremdstromverbrauch mit dem Faktor 3 auf den Primärenergieeinsatz aus. Für die Energiebilanz und die Kohlendioxidbilanz ist es auf jeden Fall sinnvoller den Eigenstrombedarf aus Biogasstrom zu begleichen. Diese Vorgehensweise kann sich aber negativ auf die Wirtschaftlichkeit auswirken, weil die Vergütung für Biogasstrom höher sein kann als die Kosten für Netzstrom.

Der Methanschluß fällt bei Zündstrahlmotoren generell etwas höher aus als bei Gasmotoren. Das liegt an der höheren Verdichtung im Zündstrahlmotor im Zusammenspiel mit Kurzschlussströmen von unverbranntem Biogas über die Ventilüberschneidung (Aschmann *et. al* 2005). Die zur Berechnung der  $\text{CO}_2$ -Gutschrift angenommene Gasproduktion im Endlager wurde geschätzt. In zukünftigen Untersuchungen sollte Aufschluss über die tatsächliche Gasproduktion in Gärrestlagern gewonnen werden. Die Schätzung basiert auf Daten aus dem Winterhalbjahr. Vermutlich war zu diesem Zeitpunkt wegen der niedrigen Außentemperaturen die Biogasproduktion aus dem (unbeheizten) Gärrestlager relativ niedrig. Die Emissionen aus der Errichtung der Anlage wurden analog zum KEA aus der Massenbilanz errechnet, indem die jeweiligen Materialien mit einem  $\text{CO}_2$ -Äquivalenzfaktor

multipliziert wurden (Anhang 5). Da es sich bei der Pilotanlage um eine technisch relativ aufwendige Anlage handelt, dürfte der Anteil an der Kohlendioxidbilanz höher sein, als bei Praxisanlagen.

**Fazit:**

Der Vermeidung von Treibhausgasen durch die Bereitstellung von elektrischer Energie und die Lagerung des Gärrestes im abgedeckten Endlager stehen die Errichtung der Biogasanlage, der Methanschluß im Blockheizkraftwerk und der Einsatz von fossilen Betriebsenergien gegenüber. Insgesamt ergibt sich eine positive Bilanz von jährlich 42 t CO<sub>2</sub>-Äquivalenten. Da der KEA und die CO<sub>2</sub>-Bilanz einer Biogasanlage miteinander korrelieren, könnte auch hier vor allem eine Erniedrigung des KEA<sub>N</sub> zu einer höheren CO<sub>2</sub>-Vermeidung führen.

**A 6.15 Energetische Bilanzierung einer zentralen BGA**

In der engeren Schutzzone des Trinkwassergewinnungsgebietes Willinger Au fällt Wirtschaftsdünger von etwa 550 Großvieheinheiten an. Die Ergebnisse der Pilotanlage sollen auf eine (hypothetische) zentrale Güllebehandlungsanlage für diesen Bereich bezogen werden. Folgende Annahmen zum Energieaufwand der 550-GV Anlage im Vergleich zu Pilotbiogasanlage wurden getroffen:

- Der Zusammenhang zwischen zu verarbeitendem Güllevolumen und Biogasproduktion ist linear.
- Der KEA<sub>H</sub> beträgt nur zwei Drittel des linearen Werts.
- Es wurde ein Eigenstrombedarf von 5 % angenommen, die Jahresarbeitszeit des BHKWs betrug 7.500 h. Damit ergibt sich eine höhere Nettostromproduktion und ein erheblich reduzierter Fremdstrombedarf.
- Da mit Rindergülle von 550 GV etwa ein BHKW der Leistung 80 kW ausgelastet werden kann, ist hier der Einsatz eines Zündstrahlmotors angenommen. Für niedrigere Leistungsklassen sind Zündstrahlmotoren wirtschaftlicher zu betreiben als Gasmotoren.
- Der postulierte Zündölverbrauch liegt bei 10 % des Energiegehalts der zugeführten Brennstoffmenge.

Die Energieflüsse über die technische Laufzeit der Anlage, sind in Tabelle 50 zusammengefasst. Die Nettostromerzeugung errechnet sich dabei als Differenz von Bruttostromerzeugung und Eigenstrombedarf. Tabelle 51 zeigt die Berechnung des KEA<sub>N</sub>.

Tabelle 50: Prognose der Energieflüsse der 550 GV-Anlage über ein Jahr bzw. über die Laufzeit von 20 Jahren

	Energiezufuhr- und abfuhr MWh	
	pro Jahr	während gesamter Lebensdauer (20 Jahre)
Biogasbezug	1.558	31.152
Heizölbezug	173	3.461
Ersatzteilbedarf	-	141
Jährliche Wärmelieferung	853	17.068
Bruttostromerzeugung	531	10.622
Eigenstrombedarf	27	531
davon Fremdstrombezug	3,82	76
Fremdstrombezug primärenergetisch bewertet	11	229
Nettostromerzeugung	505	10.091

Tabelle 51: Der KEA<sub>N</sub> der 550 GV-Anlage

	KEA <sub>N</sub> Pilotbiogasanlage MWh	
Heizölbezug	3.461	90 %
Fremdstrombezug	229	6 %
Ersatzteilbedarf	141	4 %
Summe	3.831	100 %

Analog zur Berechnung der kumulierten Energieaufwendungen und Erntefaktoren der Pilotanlage (Kapitel A 6.13) ergeben sich die in Tabelle 52 dargestellten Werte.

Tabelle 52: KEAs und Erntefaktoren der 550 GV-Anlage

KEA der Herstellung	MWh	876
KEA der Nutzung	MWh	3.831
KEA der Entsorgung	MWh	-123
KEA Gesamt	MWh	4.584
<b>Erntefaktor für das Kraftwerk</b>	-	<b>11,29</b>
<b>Erntefaktor der Herstellung</b>	-	<b>11,52</b>
<b>Gesamterntefaktor</b>	-	<b>2,20</b>

### A 6.16 CO<sub>2</sub>-Bilanz einer zentralen BGA

Weil die relativ kleine Biogasanlage im Pilotmaßstab energetisch weniger effektiv arbeitet, wurden auch für die CO<sub>2</sub>-Bilanz die Berechnungen aus auf eine Biogasanlage bezogen, die auf eine Kapazität für 550 GV ausgelegt ist. Diese Größe entspricht etwa einer Anlage für den anfallenden Wirtschaftsdünger in der engeren Schutzzone des Wasserschutzgebiets Willinger Au.

*Zusammenfassung der CO<sub>2</sub>-Bilanz.* Die klimawirksamen Emissionen von Treibhausgasen angegeben in CO<sub>2</sub>-Äquivalenten, teilen sich wie folgt auf: 1% aus dem zusätzlichen Gülletransport, 26% aus dem Methanschlupf, 21% aus der Errichtung der Anlage, 2% indirekt

aus dem Netzstrom und 50% aus der Zündölverbrennung. Die gesamten jährlichen CO<sub>2</sub>-Emissionen umfassen so 93 Tonnen. Die CO<sub>2</sub>-Einsparung aufgrund der Stromproduktion und der Minderemissionen aus dem Endlager berücksichtigend, ergibt sich ein Plus der Bilanz in Höhe von 375 Tonnen CO<sub>2</sub>-Äquivalenten pro Jahr (Abbildung 44).

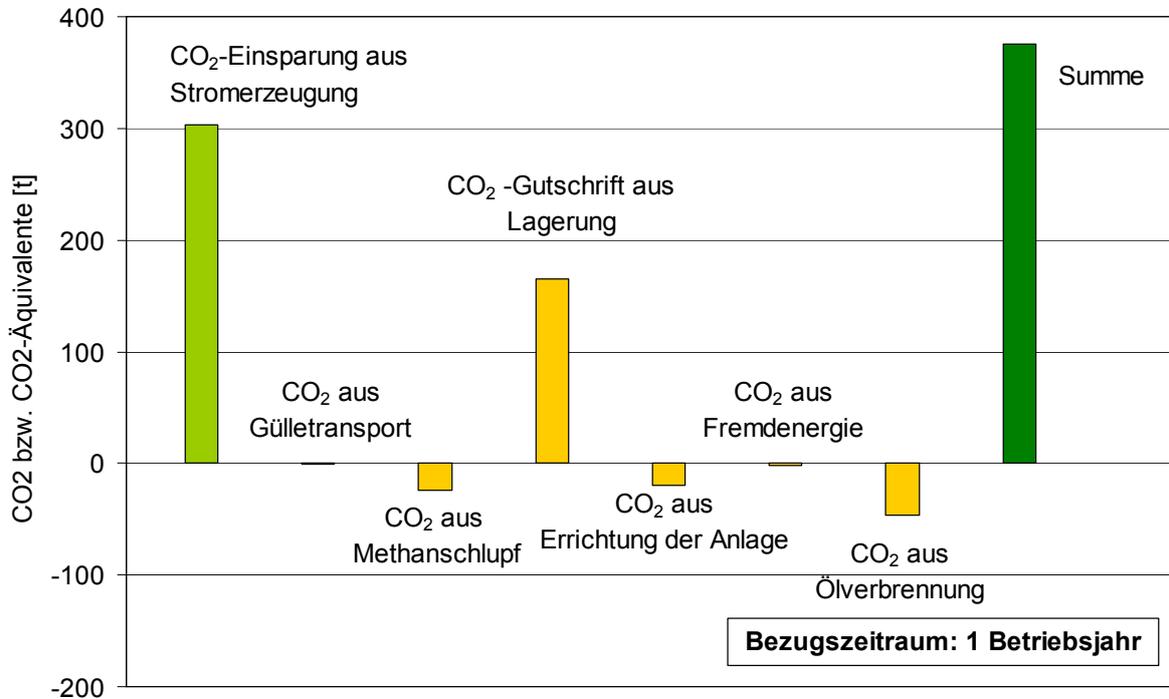


Abbildung 44: Die CO<sub>2</sub>-Bilanz der 550-GV Biogasanlage

*CO<sub>2</sub>-Einsparung.* Die Biogasanlage speist jährlich 505 MWh elektrischen Strom ins öffentliche Netz ein. Im deutschen Kraftwerksmix wird eine MWh Strom unter Freisetzung von 601 kg Kohlendioxid erzeugt (GEMIS 2005). Die Produktion von jährlich 505 MWh elektrischer Energie vermeidet zunächst 303 Tonnen Kohlendioxidemissionen aus dem deutschen Kraftwerksmix.

*CO<sub>2</sub> für Gülletransport.* Weil es sich um eine zentrale Anlage für die an die engere Schutzzone des Wasserschutzgebiets angrenzenden Betriebe handelt, ist im Vergleich zur Güllelagerung am Hof zusätzlicher Transport zur Biogasanlage nötig. Es wurde ein jährliches Güllevolumen von etwa 11.000 m<sup>3</sup> angenommen. Bei einer durchschnittlichen Transportentfernung von 4 km, einem Volumen des Transportfasses von 10 m<sup>3</sup> und einer Emission von 0,23 kg CO<sub>2</sub>-Äquivalenten pro km (GEMIS 2005) ergeben sich jährliche Emissionen in Höhe von 995 kg CO<sub>2</sub>-Äquivalenten.

*CO<sub>2</sub> aus Methanschluß.* Anders als auf der Pilotanlage wird ein Methanschluß von 4,15 g/m<sup>3</sup> dem BHKW zugeführtes Biogas angenommen. Dieser höhere Wert wurde angenommen, weil Messungen zeigen, dass größere Zündstrahlaggregate einen höheren Methanschluß aufweisen (Aschmann et al. 2005). Bei einer jährlichen Biogasmenge von 265.998 m<sup>3</sup> werden 1,15 t Methan über den BHKW-Auspuff emittiert. Diese Menge ist ähnlich klimawirksam wie 24 Tonnen Kohlendioxid.

*CO<sub>2</sub>-Gutschrift für Lagerung von Gärrest.* Relativ große Endlagerkapazitäten, wie für eine 550-GV-Rindergülleanlage (zwischen 5.000 und 6.000 m<sup>3</sup>) notwendig, werden aus

Kostengründen in der Praxis meistens ohne Abdeckung ausgeführt. Analog zu den Überlegungen in Kapitel unter „CO<sub>2</sub> –Gutschrift für Lagerung von Gärrest“ werden pro Jahr die Emission von 10.076 m<sup>3</sup> Methan vermieden. Der beobachtete oTS-Unterschied betrug 0,40 %. Multipliziert mit der jährlichen Volumenstrom<sup>1</sup> der 550 GV-Anlage von 11.000 m<sup>3</sup> ergeben sich 44,0 Tonnen oTS, die im Endlager in Methan umgewandelt werden. Bei einem Gasertrag von 229 m<sup>3</sup> Methan pro Tonne oTS ergeben sich Methanemissionen aus dem Endlager in Höhe von 10.076 m<sup>3</sup>. Umgerechnet in Kohlendioxidäquivalente entspricht das der Minderemission von 166 Tonnen pro Jahr.

*CO<sub>2</sub> aus Errichtung der Anlage.* Der Berechnung zu Grunde liegt die Ermittlung der entsprechenden CO<sub>2</sub>-Emissionen für die Pilotanlage. Die Anlage verarbeitet 5,6-mal soviel Gülle wie die Pilotanlage, Da der bauliche Aufwand relativ zum Durchsatz für größere Anlagen sinkt (z.B. weniger Beton pro m<sup>3</sup> Fermenterraum bei größerem Fermenter) und die 550 GV-Anlage auch nicht – wie die Pilotanlage – drei- sondern zweistufig geplant ist, wurde für die Errichtung nur das 3,8-fache (entspricht zwei Drittel von 5,6) des Aufwands der Errichtung der Pilotanlage angenommen. Für die Errichtung werden so 382 t CO<sub>2</sub>-Äquivalente angesetzt. Da der Bezugszeitraum im vorliegenden Fall ein Jahr ist, wird diese Menge auf 20 Jahre umgelegt, aus der Errichtung der Anlage fallen somit jährlich 19 t CO<sub>2</sub>-Äquivalente an.

*CO<sub>2</sub> aus Fremdenergie.* Lieferte das BHKW keinen Strom, so musste zum Betrieb der technischen Geräte auf der Biogasanlage Strom aus dem öffentlichen Netz bezogen werden. Dieser Strom wird unter Erzeugung von Emissionen bereitgestellt. Es wurde eine Jahreslaufzeit des BHKWs von 7.500 h und ein Eigenstrombedarf in Höhe von 5 % angenommen. Daraus ergibt sich, dass zu 14,4 % der Zeit wegen BHKW-Stillstand Fremdenergie aus dem Netz bezogen werden muss. Das entspricht 3,82 MWh Netzstrom, der, erzeugt im deutschen Kraftwerksmix, jährlich Emissionen von 2 Tonnen CO<sub>2</sub>-Äquivalenten verursacht.

*CO<sub>2</sub> aus Zündöl.* Hier wurde, im Gegensatz zur Pilotanlage, angenommen, dass die Wärmeenergie aus dem normalen Biogasbetrieb ausreicht, um die Fermenter zu beheizen. Als Zündölverbrauch im Biogasbetrieb wurden 10 % der zugeführten Brennstoffmenge angenommen. Pro Jahr werden so 17.170 Liter Heizöl eingesetzt. Legt man zu Grunde, dass bei der Verbrennung von einem Liter Heizöl 2,7 kg Kohlendioxid freigesetzt werden, so verursacht der Zündöleinsatz Emissionen in Höhe von 46 t CO<sub>2</sub>/a.

#### **A 6.17 Einordnung des KEA, der Erntefaktoren und der CO<sub>2</sub>-Bilanz einer zentralen Biogasanlage**

Die Einsparung von fossilem CO<sub>2</sub> aufgrund der Produktion von Strom aus Biogas errechnet sich analog zur Pilotbiogasanlage. Weil die postulierte 550-GV Anlage eine zentrale Anlage zur Güllebehandlung ist, muss zusätzlich Transportaufwand betrieben werden, um die Gülle anzuliefern. Die angenommenen Entfernungen sind geschätzt.

Weil Fremdstrom über die primärenergetische Bewertung mit dem Faktor 3 in die Bilanz eingeht, sollte der Fremdstromanteil möglichst niedrig bleiben. Wie auch bei der Pilotanlage wurde hier angenommen, dass während BHKW-Betrieb die Betriebsenergie aus Biogasstrom gedeckt wird. Fremdstrom kommt nur beim Stillstand des BHKWs zum Einsatz.

Die Emissionen aus der Errichtung der Anlage können nur eine grobe Orientierung liefern. Denn allein schon die Materialien, mit denen die Fermenter errichtet werden, können die CO<sub>2</sub>-Bilanz stark verändern.

**Fazit:**

Im Unterschied zur Pilotanlage wurden für die 550-GV Biogasanlage höhere Werte für den Methanschluß des BHKWs, und höhere Methanemissionen aus dem Endlager angenommen. Der deutlich geringer angenommene Bedarf an fossiler Energie für den Betrieb der Anlage führen zu einer deutlich positiven CO<sub>2</sub>-Bilanz von jährlich vermiedenen 376 t CO<sub>2</sub>-Äquivalenten.

**A 6.18 Wirtschaftliche Bewertung einer zentralen BGA**

Im Folgenden soll auf die Wirtschaftlichkeit der anaeroben Behandlung der Milchviehgülle eingegangen werden. Aus den Forschungsergebnissen geht hervor, dass ein zum dreistufigen Betrieb vergleichbarer Gasertrag und Hygienisierungseffekt auch mit einer zweistufigen thermophil-mesophilen Behandlung erreicht werden kann. Da aus den Kosten der Pilotanlage keine für die Praxis relevanten wirtschaftlichen Berechnungen durchgeführt werden konnten, wurde als Berechnungsgrundlage eine zentrale zweistufige Biogasanlage mit zwei stehenden Betonfermentern für die Behandlung der oben erwähnten 550 GV Milchviehgülle herangezogen. Diese Menge entspricht nach Angaben der Stadtwerke Rosenheim etwa dem Tierbestand im Einzugsbereich der engeren Schutzzone des Trinkwassergewinnungsgebiets Willinger Au.

**A 6.18.1 Einnahmen**

Eine Biogasanlage verstromt Biogas in einem Blockheizkraftwerk. Dabei wird Strom und Wärme erzeugt. Einnahmen entstehen aus dem Verkauf der thermischen und der elektrischen Energie. Die Einnahmen der Biogasanlage berechnen sich wie folgt (Tabelle 53):

Tabelle 53: Jährliche Einnahmen der Biogasanlage

<b>Biogasertrag</b>			[m <sup>3</sup> /a] 267.300
Primärenergie Biogas	Brennwert	5,65 [kWh/m <sup>3</sup> ]	[kWh/a] 1.490.150
Primärenergie Zündöl	Anteil an zugeführter Gesamtenergie	10 %	[kWh/a] 165.572
<b>Brennwert (Biogas + Zündöl)</b>			<b>[kWh/a] 1.655.722</b>
Thermische Energie	thermischer Wirkungsgrad	45 %	[kWh/a] 745.075
Abzügl. Heizenergie für Fermenter			[kWh/a] -745.075
<b>Thermische Energie zur weiteren Nutzung</b>			<b>[kWh/a] 0</b>
Elektrische Energie	Blockheizkraftwerk	80 kW <sub>el</sub>	
	Jahresbetriebsstunden	7.500 h/a	
	elektrischer Wirkungsgrad	32 %	[kWh/a] 529.831
Abzügl. elektrischer Betriebsenergie	Anteil an Stromprod.	4 %	[kWh/a] Zukauf ist billiger
<b>Eingespeiste elektrische Energie</b>			<b>[kWh/a] 529.831</b>
Einnahmen aus Wärmeverkauf	Vergütung	- €/kWh	€/a 0
Einnahmen aus Stromverkauf	Vergütung	17,16 Cent/kWh	€/a 90.919
<b>Einnahmen</b>			<b>€/a 90.919</b>

Der jährliche Biogasertrag beträgt 267.300 m<sup>3</sup> (vgl. Kap. 6.13.3). Bei einem Energiegehalt des Biogases in Höhe von 5,65 kWh/m<sup>3</sup> beträgt die Bruttoenergie des Biogases 1.490.150 kWh.

Hinzu kommt der Energiegehalt des Zündöls. Bei einem Zündölanteil von 10 % entspricht dieser einer Bruttoenergie von 165.572 kWh. Damit beträgt die Bruttoenergie insgesamt 1.655.722 kWh pro Jahr. Der Wärmewirkungsgrad des installierten Blockheizkraftwerkes wurde mit 45 % angenommen. Damit werden pro Jahr 745.075 kWh Wärme zur Beheizung der Fermenter bereitgestellt. Der elektrische Wirkungsgrad des installierten BHKWs beträgt 32 %. Damit werden pro Jahr 529.831 kWh elektrische Energie bereitgestellt. Die Biogasanlage verbraucht davon 4 % als Prozessenergie. Wirtschaftlich günstiger ist allerdings der Zukauf des Stroms, da der Verkauf von Biogasstrom 17,16 Cent/kWh einbringt, der Fremdstrom aber nur 13 Cent/kWh kostet. Da angenommen wurde, dass die Wärme vollständig zur Fermenterheizung benötigt wird, entstehen keine Einnahmen aus dem Wärmeverkauf oder durch die Substitution von Heizöl. Der Biogasstrom wird mit 17,16 Cent pro kWh<sub>el</sub> vergütet, damit ergibt sich ein Ertrag von 90.919 € pro Jahr.

### A 6.18.2 Gesamtinvestition

Die Investitionskosten für die Biogasanlage werden auf Grundlage vorliegender Angebote verschiedener Firmen abgeschätzt. Die Investitionskosten für die Anlage betragen insgesamt 660.000 € (Tabelle 54).

Tabelle 54: Investitionskosten einer Biogasanlage zur Behandlung der Gülle von 500 GV

Investitionskosten						
Bautechnik	Anteil	60	%	€		386.280
Anlagentechnik	Anteil	40	%	€		257.520
Bau- und Anlagentechnik		100	%	€		643.800
Zündstrahlmotor		400	€/kW	€		16.200
Gesamtinvestition				€		660.000

Es wurde davon ausgegangen, dass 60 % der Summe für Bau und Technik (643.800 €) für die Bautechnik aufgewendet werden muss (386.280 €). Die technische Lebensdauer der Bautechnik wird mit 20 Jahren angenommen. Die Anlagentechnik, mit einer technischen Lebensdauer von 10 Jahren, umfasst geschätzt 40 % der Investitionssumme für Bau und Technik (257.520 €). Der Zündstrahlmotor des BHKWs mit einer technischen Lebensdauer von 4,5 Jahren kostet bei geschätzten Kosten in Höhe von 400 €/kW 16.200 €.

### A 6.18.3 Jährliche Kosten und Unternehmergeinn

Die Anteile der Einzelkosten an den Gesamtkosten in Höhe von 131.502 € (inkl. Ausbringung des Gärrestes) sind in Abbildung 45 dargestellt. Die Jahreskosten setzen sich aus den Kosten für Abschreibung, Zinsen, Kosten für Betriebsenergien, Wartungs- und Reparaturkosten, Arbeitskosten und Substratkosten zusammen. Letztere umfassen sowohl den Transport der Gülle zur Biogasanlage, als auch die Ausbringung des Gärrestes.

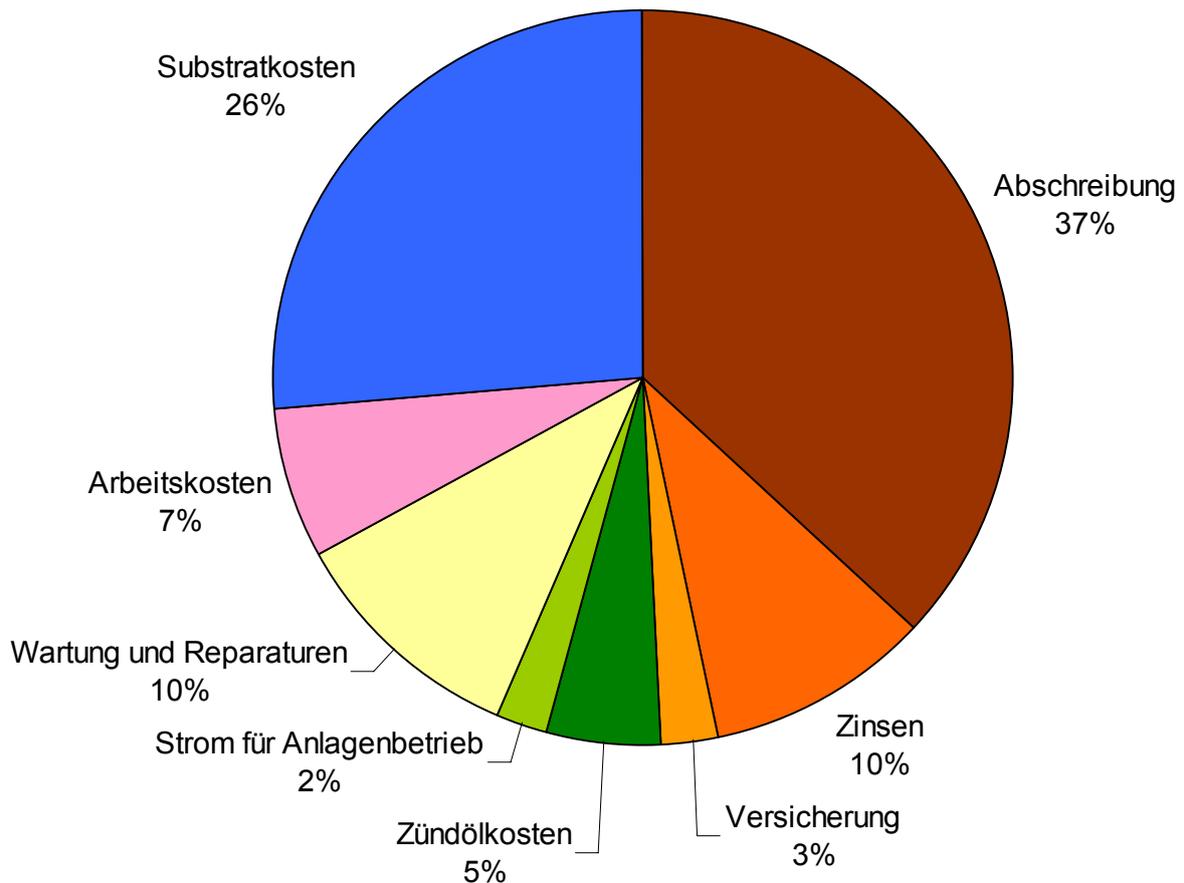


Abbildung 45: Aufteilung der jährlichen Kosten der Biogasanlage (inkl. Ausbringung des Gärrestes)

*Festkosten.* Insgesamt ergeben sich jährliche Kosten für die Abschreibung in Höhe von 48.666 €. Sie setzen sich zusammen aus 19.314 € für die Bautechnik, 25.752 € für die Anlagentechnik und 3.600 € für den Zündstrahlmotor. Der angenommene Zinssatz beträgt 4,0 %. Bei der hier angewandten vereinfachten statischen Methode wurde von einer Tilgung der Investitionssumme in immer gleichen Raten ausgegangen. Durchschnittlich ist so im Zeitraum der Kreditrückzahlung für die Hälfte der Investition Zins zu bezahlen. Die Zinsen in Höhe von 12.800 €/a berechnen sich mit 4,0 % von 330.000 €, der Hälfte der Gesamtinvestition. Nach KEYMER (2002) wird die jährliche Versicherung mit 0,5 % der Gesamtinvestition angenommen. Damit ergeben sich Ausgaben von 3.300 €/a.

Tabelle 55: Berechnung des Unternehmergewins

Fixkosten			
Abschreibung	Bautechnik	20 Jahre	€/a 19.314
	Anlagentechnik	10 Jahre	€/a 25.752
	Zündstrahlmotor	4,5 Jahre	€/a 3.600
Zinsen	Anteil an Gesamtinvestition	4,0 %	€/a 12.800
Versicherung	Anteil an Gesamtinvestition	0,5 %	€/a 3.300
Variable Kosten			
Wartung und Reparaturen	Bautechnik	1 % d. Invest.	€/a 3.863
	Anlagentechnik	3 % d. Invest.	€/a 7.726
	Zündstrahlmotor	0,4 Ct/kWh <sub>el</sub>	€/a 2.119
Zündölkosten	16.557 l/Jahr	0,40 €/l	€/a 6.623
Strom für Anlagenbetrieb	21.193 kWh/Jahr	0,13 €/kWh	€/a 2.755
Arbeitskosten			
	600 h/Jahr	15 €/h	€/a 9.000
Kosten für Gülletransport zur Biogasanlage und Ausbringung			
Transport	11.000 t/Jahr	à 1,29 €/m <sup>3</sup>	€/a 14.188
Ausbringung	11.000 t/Jahr	à 1,86 €/m <sup>3</sup>	€/a 20.462
Jährliche Gesamtkosten			
ohne Ausbringkosten			€/a 111.039
mit Ausbringkosten			€/a 131.502
Jährliche Gesamteinnahmen			
			€/a 90.919
Unternehmergeinn			
ohne Ausbringkosten			€/a <b>-20.120</b>
mit Ausbringkosten			€/a <b>-40.583</b>

*Variable Kosten.* Für die Bautechnik und die Anlagentechnik der Biogasanlage werden Reparatur- und Wartungskosten in Abhängigkeit der Investitionskosten angenommen. Für die Bautechnik werden 1 % der Investitionen in den Baubereich angenommen. Es ergeben sich Kosten in Höhe von 3.863 €/a. Die Anlagentechnik verursacht geschätzte Kosten in Höhe von 3 % ihrer Investitionssumme. Dadurch ergeben sich Kosten in Höhe von 7.726 €/a. Die Reparatur- und Wartungskosten für das BHKW werden geschätzt mit 0,4 Cent pro erzeugte kWh Strom. Bei einer Jahresstromproduktion von 529.831 kWh ergeben sich Kosten in Höhe von 2.119 €/a. Der Betrieb der Biogasanlage erfordert den Einsatz von Fremdenergie-einerseits wird Heizöl benötigt, andererseits Fremdstrom. Für Heizölkauf fallen Kosten in Höhe von 6.623 €/a an (16.557 l Heizöl à 0,40 €/l). Der Zukauf von 21.193 kWh Fremdstrom kostet bei einem Preis von 0,13 €/kWh 2.755 €/a.

*Lohnkosten.* Der Arbeitszeitanatz auf der Biogasanlage beträgt ca. 600 h/a. Die Arbeitsstunde des Anlagenbetreibers wurde mit 15 € vergütet. Damit ergeben sich Lohnkosten in Höhe von 9.000 €/a.

*Kosten für Gülletransport zur Anlage und Ausbringung.* Die Substratkosten setzen sich den Transportkosten in Höhe von 1,29 € pro m<sup>3</sup> angelieferte Gülle (14.188 €/a) und den Kosten für die Ausbringung der Gülle (1,86 €/m<sup>3</sup> bzw. 20.462€/a) zusammen. Insgesamt entstehen Substratkosten in Höhe von 3,15 €/m<sup>3</sup> Rindergülle bzw. 34.650 €/a. Die Volumenreduzierung von Rindergülle durch die Vergärung ist nur gering, weswegen auch für die Ausbringung mit den Inputmengen gerechnet wurde.

*Summe der Jahreskosten:* Werden alle aufgezählten Belastungen aufsummiert, ergeben sich jährliche Kosten in Höhe von 111.039 €. Werden auch die Ausbringkosten mit berücksichtigt, erhöhen sich die Kosten auf 131.502 €.

*Unternehmerverlust.* Die Anlage erwirtschaftet aus dem Stromverkauf 90.919 €/a. Damit beläuft sich der jährliche Unternehmerverlust auf 20.120 €/a. Zusammen mit den Ausbringkosten erhöht sich der Unternehmerverlust auf 40.583 €/a.

Auf die 550 Großvieheinheiten bezogen ergeben sich somit Behandlungskosten (einschließlich der Ausbringung) von 74 €/GV bzw. bei einer Produktionsmenge von 20 m<sup>3</sup> Flüssigmist je GV von 3,69 € je m<sup>3</sup> Flüssigmist. Geht man von einer jährlichen Förderrate von 5,2 Millionen m<sup>3</sup> Trinkwasser aus dem Wasserschutzgebiet „Willinger Au“ aus, so würden sich pro m<sup>3</sup> Wasser Mehrkosten in Höhe von 0,78 Cent ergeben. Der derzeitige Wasserpreis in Höhe von 0,92 Euro würde damit um 0,85 % steigen.

#### **A 6.18.4 Einordnung der wirtschaftlichen Bewertung**

Rindergülle liefert nur wenig Biogas im Vergleich zu energiereicheren nachwachsenden Rohstoffen. Die geringe Energiedichte und der hohe Wasseranteil erfordern sehr große Behälter um die für die Vergärung erforderliche Verweilzeit zu erreichen. Gleichzeitig reduziert sich auch das Gesamtvolumen nicht wesentlich im Vergleich zur Rohgülle. Auch das Endlager muss daher entsprechend groß ausgelegt werden. Dieses Zusammenspiel aus niedrigem Energieertrag bei gleichzeitig hohen Investitionen führt zu Kosten, die die Einnahmen übersteigen. Vorstellbar wäre eine Finanzierung des Defizits über den Wasserpreis.

#### **Fazit:**

Eine Biogasanlage zur Verarbeitung von Rindergülle von 550 GV erfordert Investitionen in Höhe von 660.000 Euro. Die Jahreskosten belaufen sich auf 111.000 bzw. 131.500 € (je nachdem ob die Gärrestausbringung enthalten ist), während die jährlichen Einnahmen aus dem Stromverkauf 91.000 € betragen. Ein jährliches Defizit von 40.600 € (inkl. Ausbringung) würden Kosten in Höhe von 3,69 € pro behandeltem m<sup>3</sup> Rindergülle verursachen. Bei Umlegung dieser Kosten auf den Trinkwasserpreis, wäre mit einem Anstieg von weniger als einem Prozent des heutigen Preises zu rechnen.

## A 7 Literatur

- Ahring, B. K., M. Sandberg, I. Angelidaki (1995): Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 559-565
- Angelidaki, I. and B. K. Ahring 1993. Anaerobic Thermophilic Digestion of Manure at Different Ammonia Loads: Effect of Temperature. *Wat. Res.* 28(3): 727-731
- Anonymus (1981): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Wasserchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der GDCh / in Gemeinschaft mit dem Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN e.V., Weinheim: Wiley-VCH.
- Anonymus (1998): Verordnung über die Verwertung von Bioabfällen auf landwirtschaftlich, forstwirtschaftlich und gärtnerisch genutzten Böden (Bioabfallverordnung - BioAbfV) vom 21.09.1998 (BGBl. I 1998 S. 2955)
- Anonymus (2005): Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushalts. BGBl I 1957, 1110, 1386; Neugefasst: 19.08.2002 I 3245; zuletzt geändert durch Art. 1 G v. 3. 5.2005 I 1224
- Aschmann, V., R. Kissel, A. Gronauer (2005): Effizienz und Abgasverhalten von biogasbetriebenen BHKW. In: Tagungsband der 14. Jahrestagung des Fachverbandes Biogas e.V., 11. bis 14. Januar 2005, Nürnberg, Fachverband Biogas e.V., Freising
- Asmus, F. und Linke, B. (1987): Zur pflanzenbaulichen Verwertung von Gülle-Faulschlamm aus der Biogasgewinnung. *Feldwirtschaft* 28, S. 354-355
- Bauer, J. (2003): Bilanz thermische Energie berechnet von der Bauer + Wiesner Planungsgesellschaft mbH, Riedering, Interne Unterlagen der Stadtwerke Rosenheim GmbH & Co. KG
- Bayerisches Landesamt für Umweltschutz (2004): Biogashandbuch Bayern – Materialienband, Augsburg 2004 [URL: <http://www.bayern.de/lfu/abfall/biogashandbuch/>]
- Besson, J. M., Lehmann, V. und Roulet, M. (1985): Influence de la préparation des lisiers sur leur composition et pertes d'azote dues à leur épandage.
- Böhm, R. (2002): Aspekte der Seuchenhygiene und Anforderungen an die Verwertung von Klärschlamm, Kompost und Gülle. In: Landwirtschaftliche Verwertung von Klärschlamm, Gülle und anderen Düngern unter Berücksichtigung des Umwelt- und Verbraucherschutzes, BMU / BMVEL Wissenschaftliche Anhörung, 25.-26.10.2001, Bonn (KTBL-Schrift 404), Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), Darmstadt, S. 61-84
- Buhr, H. O., J. F. Andrews (1977): The thermophilic digestion process. *Wat. Res.* 11(2): 129-143
- Bundesamt für Energiefragen (1992): Recycling: Verwertung und Behandlung von Bauabfällen. Bern: Bundesamt für Konjunkturfragen, zitiert nach KÖHLER *et al.* (1996)

- Burton, C. H. and C. Turner: Manure Management – Treatment Strategies for Sustainable Agriculture. 2<sup>nd</sup> Edition, Silsoe Research Institute, 2003, ISBN 0-9531282-6-1
- Carrington, E. G. (2001): Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction – final report. WRc Ref: CO 5026/1/12787-0, European Commission Directorate – General Environment
- Christ, O. (1999): Leistungscharakteristik der ein- und zweistufigen thermophilen und mesophilen Vergärung von Bioabfällen. Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft Nr. 148, ISSN 0942-914X
- Clemens, J., C. Rieger, P. Weiland, R. Vandré, I. Schumacher: Eigenschaften, Verwendung und Umgang mit Biogasgülle. In: Biogas – mit neuer Energie Ressourcen schonen, 10. Jahrestagung des Fachverbandes Biogas e.V., 09.-12.01.2001, Borken: S. 44-51
- Doll, L. (1999): Verfahrenstechnische Untersuchungen zur Entseuchung von Flüssigmist mittels thermophiler Faulung und aerob-thermophiler Stabilisierung. Forschungsbericht Agrartechnik des VDI-MEG Nr. 345, Stuttgart, ISSN 0931-6264
- Doll, L., H. Meyer, H. Oechsner, W. Philipp (1999): Verfahrenstechnische und mikrobiologische Untersuchungen zur Abtötung von Kryptosporidien in Flüssigmist mittels der Verfahren der aerob-thermophilen Stabilisierung und der thermophilen Anaerobbehandlung. Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen und Insitut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, Abschlussbericht an das Ministerium für Ländlichen Raum Baden-Württemberg, Projekt Nr. 0056
- DVGW (1995): Richtlinien für Trinkwasserschutzgebiete; I. Teil: Schutzgebiete für Grundwasser. Arbeitsblatt W 101. Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches (DVGW)
- Effenberger, M., M. Schlattmann, F. Kaiser., A. Gronauer: Stand der Biogastechnologie in Bayern. In: Biogasanlagen – Anforderungen zur Luftreinhaltung, Augsburg: Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, 2002
- Eggenmüller, M. (1996): Kumulierter Energieaufwand und Kostenstruktur einer Bioabfallvergärungsanlage. Diplomarbeit, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, Technische Universität München, Freising
- Elmashad H. M., G. Zeeman, G. Lettinga (2001): Thermophilic anaerobic digestion of cow manure – effect of temperature on hydrolysis. In: Anaerobic Digestion, 9th World Congress, 02.-06. September 2001, Technologisch Instituut, Antwerpen
- Europäische Gemeinschaften (1985): Biogasanlagen in Europa: Ein Handbuch für die Praxis. Report-Nr. EUR 9069DE, EN der Europäischen Gemeinschaften / Generaldirektion Informationsmarkt und Innovation, Verlag TÜV Rheinland, Köln, 1985, ISBN 3-88585-265-9
- FNR (2004): Handreichung Biogasgewinnung und –nutzung. Hrsg.: Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR). Leipzig, 2004, ISBN 3-00-014333-5

- Gallert, C. und J. Winter (1997): Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 405-410
- GEMIS Version 4.2 (2005): Instrument zur vergleichenden Analyse von Umwelteffekten der Energiebereitstellung und -nutzung. Freiburg, Darmstadt, Berlin, Kassel: Ökoinstitut und Gesamthochschule Kassel [Online im Internet]. URL: <http://www.oeko.de/service/gemis/de/index.htm> [01.07.2005, 10:30 MEZ]
- Gosch A. (1984): Anaerober Abbau von flüssigen Abfällen aus Tierhaltungen. Dissertation, Institut für Landtechnik, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Gronauer, A., M. Effenberger, F. Kaiser, M. Schlattmann: Biogasanlagen-Monitoring und Emissionsverhalten von Biogas-Blockheizkraftwerken. Abschlussbericht an das Bayerische Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen, Bayerische Landesanstalt für Landtechnik, Freising, 2002
- Gutser, R., Amberger, A. und Vilsmeier, K. (1987): Wirkung unterschiedlich aufbereiteter Gülle im Gefäßversuch zu Hafer und Weidelgras. VDLUFA-Schriftenreihe, 23. Kongressband, S. 279-293
- Hagedorn, G. (1992): Kumulierter Energieaufwand von Photovoltaik- und Windkraftanlagen. IfE Schriftenreihe Heft 25, München: Lehrstuhl für Energiewirtschaft und Kraftwerkstechnik der Technischen Universität München
- Hashimoto, A. G. (1983): Conversion of straw-manure mixtures to methane at mesophilic and thermophilic temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* 25(1983): 185-200
- Henkelmann, G. (2005): Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung, Projektteil: Lysimeter-, Labor- und Praxisversuche. Abschlussbericht der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Agrarökologie, Ökologischen Landbau und Bodenschutz, August 2005
- Hobson, P. N. and A. D. Wheatley: *Anaerobic Digestion – Modern Theory and Practice*. London: Elsevier Applied Science, 1993
- IPCC (2001): *Climate Change 2001: The scientific basis*. Eds: J. T. Houghton, Y. Ding, J. Griggs et al., Cambridge University Press
- Jäger, P. (2003): Wirtschaftlichkeit landwirtschaftlicher Biogasanlagen. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e. V. (KTBL), Darmstadt
- Jenseit, W., T. Lützkendorf, O. Eiermann (1999): Der Kumulierte Energieaufwand (KEA) im Baubereich, Arbeitspapier im Rahmen des UBA-F&E-Vorhabens Nr. 104 01 123: Erarbeitung von Basisdaten zum Energieaufwand und der Umweltbelastung von energieintensiven Produkten und Dienstleistungen für Ökobilanzen und Öko-Audits. Darmstadt, Karlsruhe, Weimar: Öko-Institut

- Kaiser, F. (2005): Persönliche Mitteilung, 06.08.2005. Felipe Kaiser, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik, Am Staudengarten 3, 85354 Freising
- Kaltschmitt, M., D. Merten, N. Fröhlich, M. Nill (2003): Energiegewinnung aus Biomasse, Externe Expertise für das WBGU-Hauptgutachten 2003 „Welt im Wandel: Energiewende zur Nachhaltigkeit“. Berlin, Heidelberg: Wissenschaftlicher Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderungen (WBGU)
- Kaltschmitt, M., A. Wiese (2003): Erneuerbare Energien: Systemtechnik, Wirtschaftlichkeit, Umweltaspekte. 3. Auflage Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag
- Katers J. F., J. Schultz (2003): Temperature-Phased Anaerobic Digestion System Monitoring Project at Tinedale Farm. Final report submitted to Wisconsin Department of Administration, October 2003
- Kayser, M., M. Kaltschmitt (1996): Ganzheitliche Energie- und Emissionsbilanzen einer hydrothermalen Wärmebereitstellung, in Geothermie Report 96-1. Potsdam: Geoforschungszentrum
- Kearney, T.E., M. J. Larkin, P. N. Levett (1993): The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 86-93
- Keymer, U. (2002): Wie rechnet sich Biogas? In: Biogas - Strom aus Gülle und Biomasse, Münster: Landwirtschaftsverlag, S. 40-45
- Köhler, D., G. Rosenbauer, K. Schwaiger, R. Wabro (1996): Ganzheitliche energetische Bilanzierung der Energiebereitstellung (GaBiE), Teil VI: Energetische Untersuchung von Blockheizkraftwerken, München: Forschungsstelle für Energiewirtschaft.
- KTBL (2004): Hygiene-Prüfsystem für Vergärungsanlagen und Umsetzung der Ergebnisse, Vorschlag zur Überarbeitung Anhang 2 BioAbfV, Stand: 17.09.2004. [URL: <http://www.ktbl.de/energie/hygiene.pdf>]
- KTBL (2005): Gasausbeuten in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), 2005, 24 S.
- Landesgewerbeanstalt Bayern (2004): Ökologisch geprüfte Bauprodukte, Primärenergieaufwand. Nürnberg: Landesgewerbeanstalt Bayern. [Online im Internet] [http://www.lga.de/de/bdb/bdb\\_primaerenergieaufwand.shtml](http://www.lga.de/de/bdb/bdb_primaerenergieaufwand.shtml) [01.01.2004, 13:45 MEZ]
- Lampel H. (1984): Energie aus Biomasse: Biogastechnologie – Biogasforschungsanlage Wieselburg. Forschungsberichte der Bundesanstalt für Landtechnik No. 14, Wieselburg, Österreich, April 1984
- Larsen, H.E., B. Munch (1990): Reduction of Pathogenic and Indicator organisms in Biological Waste - especially Slurry - subjected to Various Treatments. In: D. Strauch (Hrsg.): Aktuelle Probleme der Desinfektion von Nutztierställen sowie von Fest- und Flüssigmist, Bericht des 3. Hohenheimer Seminars, veranst. vom Inst. für Tiermedizin und Tierhygiene, Universität Hohenheim, Stuttgart, 18.- 19. September 1990, Dt. Veterinärmed. Ges. e. V. (DVG), Giessen, S. 169-177

- Lebuhn, M. (2006): Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung, Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen. Abschlussbericht der Technischen Universität München, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft, September 2006
- Levenspiel, O.: Chemical reaction engineering. 2<sup>nd</sup> edition, Wiley, New York u. a., 1967
- Mackie, R. I. and M. P. Bryant (1995): Anaerobic digestion of cattle waste at mesophilic and thermophilic temperatures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 346-350
- Marheineke, T., W. Krewitt, J. Neubarth, R. Friedrich, A. Voß (2000): Ganzheitliche Bilanzierung der Energie- und Stoffströme von Energieversorgungstechniken Forschungsbericht Band 74, Stuttgart: Institut für Energiewirtschaft und Rationelle Energieanwendung
- Martens, W., A. Fink, W. Philipp, A. Weber, D. Winter, R. Böhm (1999): Seuchenhygienische Bewertung von Anaerobanlagen. In: Böhm, R. (Hrsg.): 7. Hohenheimer Seminar Biologische Abfallbehandlung - Erste Erfahrungen mit der Bioabfallverordnung in Deutschland, Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., Giessen
- Meßner, H. (1988): Düngewirkung anaerob fermentierter und unbehandelter Gülle. Dissertation, Institut für Bodenkunde, Pflanzenernährung und Phytopathologie, Lehrstuhl für Pflanzenernährung, Technische Universität München
- Mohr, H. (1997): Technischer Stand und Potentiale von Diesel-/Gasmotoren. *Brennstoff Wärme Kraft* 49: 49-52 + 50-53
- Olsen, J.E., H. E. Larsen (1986): Bacterial decimation times in anaerobic digestions of animal slurries. *Biological Wastes* 21: 153-168
- Roth, K. (1995): Kumulierter Energieaufwand und Kostenstruktur zweier Bioabfallverwertungskonzepte. Diplomarbeit, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau, Technische Universität München, Freising
- Schattner-Schmidt, S., M. Eggenmüller, A. Gronauer: Möglichkeiten der Präventivbehandlung von Gülle bzw. Stallmist zur Vermeidung des Eintrags von pathogenen Organismen in das Grundwasser. Literaturrecherche im Auftrag der Stadtwerke Rosenheim GmbH & Co. KG, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising-Weihenstephan (unveröffentlicht)
- SCHMACK BIOGAS AG (2005): Kostenangebot über eine Biogasanlage am Standort Berbling, SCHMACK BIOGAS AG, Schwandorf
- Schulz, H. (1991): Stoffliche Veränderungen von Flüssigmist durch Biogasverfahren. In: J. Boxberger, A. Gronauer, L. Popp (Hrsg.): Tagungsband zu Fachgespräch Umweltschonende Verwertung von Fest- und Flüssigmist auf landwirtschaftlichen Nutzflächen, 27./28.06.1990, Freising-Weihenstephan

- Schwaiger, K. (1996): Ganzheitliche energetische Bilanzierung der Energiebereitstellung (GaBiE), Teil 1, Allgemeiner Teil. München: Forschungsstelle für Energiewirtschaft der Gesellschaft für Praktische Energiekunde e.V.
- Strauch, D., W. Baader, C. Tietjen (Hrsg.): Abfälle aus der Tierhaltung – Anfall, Umweltbelastung, Behandlung, Verwertung. Eugen Ulmer: Stuttgart, 1977. ISBN 3-8001-4328-3
- Strauch, D. (1996): Hygieneaspekte bei der Cofermentation. In: Braun, R. (ed): Internationale Erfahrungen mit der Verwertung biogener Abfälle zur Biogasproduktion, Tagungsberichte Bd. 14. Österreichisches Bundesministerium für Umwelt, Jugend und Familie, Tulln
- Strauch, D. (1998): Pathogenic microorganisms in sludge. Anaerobic digestion and disinfection methods to make sludge usable as a fertiliser. *European Water Management* 1(2): 12-26
- Sung S. and Santha H. (2003). Performance of temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) system treating dairy cattle wastes. *Wat. Res.*, 37(2003), 1628-1636
- Varel, V. H., H. R. Isaacson, M. P. Bryant (1977): Thermophilic methane production from cattle waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 33(2): 298-307
- Varel, V. H., A. G. Hashimoto, Y. R. Chen (1980): Effect of temperature and retention time on methane production from beef cattle waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 40(2): 217-222
- Umweltbundesamt (1999): KEA: Mehr als eine Zahl, Basisdaten und Methoden zum Kumulierten Energieaufwand (KEA). Berlin: Umweltbundesamt
- Umweltbundesamt (2000): Hintergrundpapier: Ökobilanzen für graphische Papiere. Berlin: Umweltbundesamt
- VDI (1998): Kumulierter Energieaufwand - Begriffe, Definitionen, Berechnungsmethoden, VDI-Richtlinie 4600. Berlin: Beuth-Verlag
- VDLUFA (1997): Methodenbuch Band III, Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Mit 4. Ergänzungslieferung 1997. Darmstadt: VDLUFA-Verlag
- von Stromberg, A. (1985): Mesophiler aerober bzw. fakultativ anaerober Keimbesatz von Frischgülle und Faulschlamm der Biogasgewinnung. Dissertation, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Weiland, P., C. Rieger, T. Ehrmann, D. Helffrich, R. Kissel, F. Melcher (2005): Ergebnisse des bundesweiten Biogasmessprogramms. In: Biogas – Energieträger der Zukunft, 12./13.04.2005, Osnabrück, VDI-Berichte 1872, ISBN 3-18-091872-1:117-128
- Wohlt, J. E., R. A. Frobish, C. L. Davis, M. P. Bryant, R. I. Mackie (1990): Thermophilic methane production from dairy cattle waste. *Biological Wastes* 32(1990): 193-207
- Wulf, S., A. Brenner, J. Clemens, H. Döhler, P. Jäger, K-H. Krohmer, M. Maeting, C. Rieger, I. Schumacher, M. Tschepe, R. Vandr , P. Weiland (2003): Bonner Agrarkulturchemische Reihe, Band 16: Untersuchung der Emission direkt und indirekt klimawirksamer

Spurengase ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  und  $\text{CH}_4$ ) während der Lagerung und nach der Ausbringung von Kofermentationsrückständen sowie Entwicklung von Verminderungsstrategien (DBU-AZ 08912), Bonn

Zeeman, G., W. M. Wiegant, M. E. Koster-Treffers, G. Lettinga 1985. The Influence of The Total Ammonia Concentration on The Thermophilic Digestion of Cow Manure. *Agricultural Wastes* 14: 19-35

## Anhang 1 Schutzgebiete für Grundwasser

Gemäß § 19 WHG können zum Schutz von Gewässern, die für die Wasserversorgung herangezogen werden, Wasserschutzgebiete festgesetzt werden, in denen Nutzungsbeschränkungen erklärt und die Eigentümer und Nutzungsberechtigten der betroffenen Grundstücke zur Duldung bestimmter Maßnahmen verpflichtet werden können (Anon., 2005). Sofern hierdurch die ordnungsgemäße land- oder forstwirtschaftliche Nutzung eines Grundstückes beschränkt wird, ist für dadurch verursachte finanzielle Nachteile ein angemessener Ausgleich gemäß Landesrecht zu leisten.

Eine Richtlinie für die Einrichtung von Trinkwasserschutzgebieten wurde vom DVGW herausgegeben (DVGW, 1995). Demnach soll ein Wasserschutzgebiet für die Trinkwassergewinnung aus Grundwasser das gesamte oberirdische und unterirdische Einzugsgebiet einer Trinkwassergewinnungsanlage umfassen und ist in der Regel in drei Schutzzonen zu gliedern:

- Weitere Schutzzone (Zone III): soll den Schutz vor weitreichenden, da schwer oder nicht abbaubaren chemischen oder radioaktiven Verunreinigungen gewährleisten.
- Engere Schutzzone (Zone II): soll den Schutz vor Verunreinigungen durch pathogene Mikroorganismen sowie vor Beeinträchtigungen mit geringer Reichweite gewährleisten.
- Fassungsgebiet (Zone I): soll den Schutz der Trinkwassergewinnungsanlage und ihrer unmittelbaren Umgebung vor jeglichen Verunreinigungen und Beeinträchtigungen gewährleisten.

Die Richtlinie gibt weiterhin Hinweise zur Bemessung der Schutzzonen, zu gefährlichen Handlungen, Einrichtungen und Vorgängen, zu betrieblichen Schutzmaßnahmen sowie zur Überwachung des Wasserschutzgebietes. Einzelne Wasserschutzgebietsverordnungen sind den jeweiligen örtlichen Verhältnissen anzupassen.

## Anhang 2 Spezifische Primärenergieaufwendungen für Transporte und Erdbewegungen

	Quelle	Bezugsgröße	Spezifischer Primärenergieaufwand kWh
LKW-Transporte (Ferntransport)	Schwaiger, 1996	km	4,42
LKW-Transporte (Baustellenverkehr)	Schwaiger, 1996	km	5,31
Erdarbeiten	Köhler et al., 1996	t	1,42

## Anhang 3 Ergebnisse der chemischen Analysen der Proben von Milchviehgülle

Anhangstabelle 1: Zusammensetzung der Proben von Rohgülle aus der Vorgrube der Pilot-Biogasanlage (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 3-26 Proben)

Probenahmezeitraum		04-12/2004
TM	Massen-% d. FM	7,8 $\pm$ 0,8
oTM	Massen-% d. TM	77,6 $\pm$ 3,0
oTM	g/kg	60,8 $\pm$ 6,4
CSB	g/kg	86,7 $\pm$ 8,6
pH	-	7,4 $\pm$ 0,1
FFS gesamt	mg/l	6844 $\pm$ 530
NH <sub>4</sub> -N	mg/l	2220 $\pm$ 710
Alkalinität	g CaCO <sub>3</sub> /l	12,1 $\pm$ 0,5

Anhangstabelle 2: Zusammensetzung der Trockenmasse [Massen-%] der Proben von Rohgülle aus der Vorgrube der Pilot-Biogasanlage (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 3-26 Proben)

Probenahmezeitraum		04-12/2004
oTM		77,6 $\pm$ 3,0
NH <sub>4</sub> -N		2,4 $\pm$ 0,5
Norg.		2,4 $\pm$ 0,1
Gesamt-P		1,0 $\pm$ 0,3
Rohprotein		15,0 $\pm$ 0,4
Rohfett		4,9 $\pm$ 0,9
Rohfaser		16,4 $\pm$ 2,8
Cellulose		11,4 $\pm$ 4,2
Hemicellulose		12,9 $\pm$ 6,7
Lignin		23,9 $\pm$ 5,5

Anhangstabelle 3: Zusammensetzung der Proben von Rohgülle aus dem Vorlagebehälter der Modell-Biogasanlage (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 6-18 Proben)

Probenahmezeitraum		06-11/2004
TM	Massen-% d. FM	7,4 $\pm$ 0,5
oTM	Massen-% d. TM	79,3 $\pm$ 0,5
oTM	g/kg	59,0 $\pm$ 3,8
CSB	g/kg	86,9 $\pm$ 11,7
pH	-	7,5 $\pm$ 0,2
FFS gesamt	mg/l	5912 $\pm$ 986
NH <sub>4</sub> -N	mg/l	2005 $\pm$ 483
Alkalinität	g CaCO <sub>3</sub> /l	11,1 $\pm$ 1,3

Anhangstabelle 4: Zusammensetzung der Trockenmasse [Massen-%] der Proben von Rohgülle aus dem Vorlagebehälter der Modell-Biogasanlage (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 4-16)

<b>Probenahmezeitraum</b>	<b>06-11/2004</b>
oTM-Gehalt	78,5 $\pm$ 2,3
NH <sub>4</sub> -N	2,6 $\pm$ 0,6
Norg.	2,4 $\pm$ 0,1

## Anhang 4 Musterformular des Betriebstagebuches der Pilot-Biogasanlage

Betriebstagebuch Pilot-Biogasanlage Hof Schweiger, Berbling

Datum:

Fax: 08161 / 71-4363



Ablesungen bitte möglichst täglich zum selben Zeitpunkt!

Tag	Uhrzeit	Mo/	Di/	Mi/	Do/	Fr/	Sa/	So/
Tauchpumpe	Betriebsstd. [h]							
Vorgrube	Beschickung [m <sup>3</sup> ]							
	Temperatur 1 [°C]							
Fermenter 1 (Mesophil 1)	Temperatur 2 [°C]							
	Füllstand [cm]							
	Beschickung 1 [m <sup>3</sup> ]							
	Gasmenge [m <sup>3</sup> ]							
	Temperatur 1 [°C]							
Fermenter 2 (Thermophil)	Temperatur 2 [°C]							
	Temperatur 3 [°C]							
	Temperatur 4 [°C]							
	Füllstand [cm]							
	Beschickung 2 [m <sup>3</sup> ]							
	Gasmenge [m <sup>3</sup> ]							
Fermenter 3 (Mesophil 2)	Temperatur 1 [°C]							
	Temperatur 2 [°C]							
	Füllstand [cm]							
	Beschickung 3 [m <sup>3</sup> ]							
Endlager	Entnahme [m <sup>3</sup> ]							
	CH <sub>4</sub> [Vol.-%]							
Biogas	H <sub>2</sub> S [ppm]							
	O <sub>2</sub> [Vol.-%]							
	CO <sub>2</sub> [Vol.-%]							
	Gasmenge [m <sup>3</sup> ]							
BHKW	Stromproduktion [kWh]							
	An E.ON [kWh]							
	Von E.ON [kWh]							
	Zählerst. Zündöl [l]							
	Betriebsstd. [h]							
	F1 Vor-/Rücklauf [°C]	/	/	/	/	/	/	/
Heizungs- temperaturen	F2 Vor-/Rücklauf [°C]	/	/	/	/	/	/	/
	F3 Vor-/Rücklauf [°C]	/	/	/	/	/	/	/
	Gesamt [MWh]							
Wärme- zähler	Fermenter 1 [MWh]							
	Fermenter 2 [MWh]							
	Fermenter 3 [MWh]							
	Wohnhaus [MWh]							
Arbeitsstunden								
Bemerkungen / Störungen:								
Witterung	A.temp. Min/Max [°C]	/	/	/	/	/	/	/
	Luftdruck [mbar]							

## Anhang 5 Materialspezifischer KEA und CO<sub>2</sub>-Äquivalente der Herstellung

Material	Datenquelle	KEA der Herstellung	Einheit	CO <sub>2</sub> -Äquivalent	Einheit
Beton					
Beton B25	GEMIS*	0,27	MWh/t	176	kg/t
Eisen und Stahl					
Stahl	GEMIS*	4,70	MWh/t	1.593	kg/t
Eisenguss	GEMIS*	3,61	MWh/t	1.008	kg/t
Nichteisenmetalle					
Aluminium	GEMIS*	53,89	MWh/t	19.672	kg/t
Kupfer	GEMIS*	26,71	MWh/t	4.022	kg/t
Nichtmetalle					
Steinwolle	GEMIS*	3,52	MWh/t	1.096	kg/t
Styrodur	LGA**	24,07	MWh/t	0	kg/t
EPDM	GEMIS*	10,10	MWh/t	3.509	kg/t
PVC	GEMIS*	10,52	MWh/t	2.409	kg/t
PE	GEMIS*	6,86	MWh/t	2.381	kg/t
PUR	GEMIS*	16,09	MWh/t	4.194	kg/t

\*) GEMIS (2005)

\*\*) LANDESGEWERBEANSTALT BAYERN (2004)

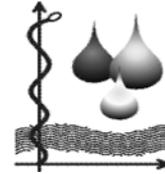
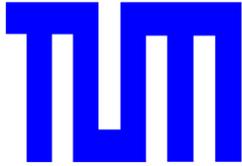
## Anhang 6 Chronologische Übersicht über den Betrieb der Pilotanlage

Datum	Maßnahmen und Betriebsbedingungen
06.04.2002	Baubeginn
28.08.2002	Beginn des Anfahrbetriebes: Befüllung der Fermenter 1 und 2 mit Rohgülle, Aufheizen auf Solltemperatur
20.09.2002	offizielle Inbetriebnahme der Pilotanlage
25.11.2002	technische Abnahme
Jan. – März 2003	Steigerung der täglichen Beschickungsmenge von 2 auf 6,3 m <sup>3</sup>
13.04.-24.04.2003	Ersatz der einwandigen Kunststoff-Gülleleitungen im Falle der Druckleitungen zu den Fermentern 2 und 3 durch Stahlleitungen mit Kunststoffmantelisolierung bzw. im Falle der Saugleitungen der Fermenter 1 und 2 durch PVC-Leitungen mit Vollisolierung; Aufschweißen von Heitzaschen auf dem vorderen unteren Drittel des F2; Ausrichtung der Rührwelle des F2; Beschickung komplett ausgesetzt
16.05.-18.07.2003	Beschickung der Anlage mit 5,7 m <sup>3</sup> Gülle pro Tag
16.07.2003	Vorbereitung des ersten Chargenversuches zur Keimreduktion, Aufheizen von F3 auf 55°C/48 h, Beschickung für vier Tage ausgesetzt
20.07.-18.08.2003	Wiederanhebung der täglichen Beschickungsmenge auf 5,7m <sup>3</sup> Gülle
26.08.-29.10.2003	Hygienische Begleituntersuchungen: Probenahme im Rahmen des ersten Chargenversuches
11.11.-13.11.2003	Umbau des Rührwerksantriebes F2
16.12.-19.12.2003	Erneuerung des undichten Kunststoffgleitlagers der Rührwelle F2, Aufschweißen von Blechen auf die Rührwelle und Anbringung von Kunststoffverlängerungen an den Rührpaddeln; Beschickung komplett ausgesetzt, Absenkung des Füllstandes im F2
28.12.2003	Wiederaufnahme der Fütterung mit 2,5 m <sup>3</sup> Gülle pro Tag; Saugleitung in der Vorgrube war eingefroren
05.01.2004	F2 erreicht normalen Füllstand
Jan. 2004	Steigerung der täglichen Beschickungsmenge auf 5,5 m <sup>3</sup> in Schritten von ca. 1 m <sup>3</sup> pro Woche
Febr. – Sept. 2004	Beschickung der Anlage mit durchschnittlich 5,5 m <sup>3</sup> Gülle pro Tag in 21 Teilmengen (voreingestelltes Beschickungsintervall: 1 h); Beschickungsmenge von F1 schwankt zwischen 5,3 and 5,7 m <sup>3</sup> pro Tag; durchschnittliche hydraulische Verweilzeit der Fermenterkaskade: 45 Tage
16.02.-24.02.2004	Reduzierte Beschickung wegen wiederholter Verstopfung der Druckleitung F1
19.02.-08.03.2004	Siphonbildung in der Gassammelleitung verursacht Störungen des BHKW-Betriebes
11.03.-14.03.2004	Eingabe von Fe(II) in die Fermenter aufgrund hoher H <sub>2</sub> S-Gehalte im Biogas von bis zu 1200 ppm; H <sub>2</sub> S-Gehalte übersteigen wiederholt 200 ppm bis Anfang Juni; Ausfall des Rührwerks verursacht Übersäumen im F1
15.03.-05.05.2004	Hygienische Begleituntersuchungen: zweiter Chargenversuch
28.03.2004	Bruch einer Tränkeleitung im Stall: Verdünnung der Gülle mit ca. 30 m <sup>3</sup> Wasser

29.03.-05.04.2004	Verdichtete Probenahme von Gülle und Gärrest
25.05.2004	Biogasverlust während des Einbaus der Gasdurchflussmesser
31.05.-02.06.2004	F1 schäumt erneut über; H <sub>2</sub> S im Biogas über 200 ppm
07.06.-05.07.2004	Erstes Markierungsexperiment im F2
08./09.06.2004	Keine/reduzierte Fütterung von F1 wegen fehlerhaft parametrierter Füllstandsmesser
24./25.07.2004	Reduzierte Beschickung von F1 wegen Fremdkörper in der Beschickungspumpe
12.08.2004	F1 schäumt nach Ausfall des Rührwerks erneut über.
13.-16.08.2004	Abkühlung von F2 um ca. 2 K durch starke Winde
26.08.2004	Abgas- und Wirkungsgradmessungen; Wartung des Motors: deutlich reduzierter Zündölverbrauch
07.09.2004	Veränderung des voreingestellten Beschickungsintervalles auf 4 h
07.09.-11.10.2004	Beschickung der Anlage mit durchschnittlich 5,2 m <sup>3</sup> Gülle pro Tag, abwechselnd in 5 oder 6 Teilmengen (voreingestelltes Beschickungsintervall: 4 h); durchschnittliche hydraulische Verweilzeit der Fermenterkaskade: 47 Tage
von 10.09.2004 an	Kühlere Witterung erfordert wieder Heizölbetrieb bei Nacht zur Aufrechterhaltung der Solltemperatur im F2.
20.09.-13.10.2004	Zweites Markierungsexperiment im F2
12.10.2004- 21.12.2005	Beschickung der Anlage mit durchschnittlich 5,4 m <sup>3</sup> Gülle pro Tag, abwechselnd in 5 oder 6 Teilmengen (voreingestelltes Beschickungsintervall: 4 h); durchschnittliche hydraulische Verweilzeit der Fermenterkaskade: 45 Tage
19.10.-27.10.2004	Verdichtete Probenahme von Gülle und Gärrest
28.10.2004	Blockierter Gasdurchflussmesser verursacht Abblasen von Biogas
26.11.2004	Eingabe von Fe(II) in die Fermenter aufgrund hoher H <sub>2</sub> S-Gehalte im Biogas von über 200 ppm
22.12.-25.12.2004	Reduzierte Beschickung wegen eingefrorener Saugleitung in der Vorgrube
23.02.2005	Umstellung auf Zwei-Fermenter-Betrieb (thermophil-mesophil), F1 stillgelegt
05.04.-17.06.2005	Thermophil-mesophiler Betrieb nach Entleerung von F1 und Neubefüllung mit Rohgülle, Vorwärmung der Gülle im F1 auf ca. 20°C, da sonst Solltemperatur im F2 nicht erreichbar; durchschnittliche Beschickung: in 21 Teilmengen; durchschnittliche hydraulische Verweilzeit (ohne F1):
ab 22.06.2005	Beheizung auch von F1, so dass möglichst die gesamte produzierte Wärme für die Fermenterbeheizung verwertet werden kann

## Anhang 7 Chronologische Übersicht über den Betrieb der Modellanlage

<b>Datum</b>	<b>Maßnahmen und Betriebsbedingungen</b>
16.06.2003	Erste Befüllung der Modellfermenter mit Inhalt der entsprechenden Fermenter der Pilotanlage
24.06.2003	Start der Beschickung
28.08. – 12.09.2003	Erstes Markierungsexperiment im MF2, vorzeitiger Abbruch nach Verstopfung der Beschickungspumpe 1
16.12.2003	Außerbetriebnahme der Modellanlage für die Wintersaison
29./30.04.2004	Wiederinbetriebnahme der Modellanlage
07.05. – 15.08.2004	Betrieb der Modellanlage mit einer täglichen Beschickungsmenge von 24,5 bis 26,5 l Rohgülle in 24 Teilmengen; durchschnittliche Verweilzeit der Fermenterkette: ca. 40 Tage
16.08. – 15.11.2004	Betrieb der Modellanlage mit einer täglichen Beschickungsmenge von 28,6 bis 29,1 l Rohgülle in 6 Teilmengen; durchschnittliche Verweilzeit der Fermenterkette: ca. 37 Tage
27.08.-02.09.2004	Versehentliche Überheizung des MF1 auf ca. 45°C
20.10. – 15.11.2004	Zweites Markierungsexperiment im MF2
15.11. – 17.12.2004	2-Fermenterbetrieb (MF2 und 3: thermophil-mesophil)
17.12.2004	Außerbetriebnahme der Modellanlage für die Wintersaison
15.03.2005	Wiederinbetriebnahme der Modellanlage im 2-Fermenterbetrieb (MF1 und 2: mesophil-thermophil) für hygienische Untersuchungen; Gaserfassung nur von MF1
06.07.2005	Außerbetriebnahme der Modellanlage



**Biogastechnologie zur umweltverträglichen  
Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in  
Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische  
Begleituntersuchung**

**B Berichtsteil TUM: Mikrobiologische, parasitologische und  
virologische Untersuchungen**

25.09.2006

**Dr. Michael Lebuhn  
Prof. Dr. Peter Wilderer**

**Technische Universität München  
Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft  
Am Coulombwall  
85748 Garching**

## Zusammenfassung Berichtsteil B

Zentraler Inhalt des Kooperationsprojekts war es, die speziell für Hygienisierung konzipierte Pilot-Biogasanlage bei Berbling im Praxisbetrieb auf Hygienisierungsleistung zu evaluieren. Fragen der Prozesseffizienz, der Dynamik von Gülle und Gärrest im Boden von Lysimetern sowie der Lyfthygiene wurden von den Kooperationspartnern bearbeitet. Die Ergebnisse dazu finden sich in separaten Berichten der Partner. Die wesentliche mikrobiologische Fragestellung war, ob der produzierte Gärrest eine hygienische Qualität aufwies, die nach wissenschaftlichen Erkenntnissen eine Ausbringung in sensiblen Gebieten wie (bestimmten Ausgleichsflächen in) der Wasserschutzzone II (WZ II) ermöglichen könnte. Bei verbesserter hygienischer Gärrest-Qualität könnte die Technik auch wesentlich zur Umsetzung von Forderungen der Wasserrahmenrichtlinie beitragen. Sie könnte z.B. im Zustrombereich von Badegewässern sowie in weiteren Schutzzonen in Karstgebieten eingesetzt werden, um die diffuse landwirtschaftliche Belastung zu verringern und den hygienischen Status der Einzugsgebiete zu verbessern.

Die untersuchten Kompartimente der Berblinger Biogasanlage bestanden aus einer Vorgrube, einem mesophilen Fermenter (F1) und in der Folge einem länglichen thermophilen Fermenter (F2), einem weiteren mesophilen Fermenter (F3) und dem Endlager. Das entscheidende Glied für die Hygienisierungseffizienz war der F2, der etwa ab Mitte der Projektlaufzeit mit optimaler Temperaturführung (55°C gesichert) betrieben werden konnte. Bis Mitte Februar 2004 wurden für den F2 immer wieder Ausfälle der Beheizung (Abfall teilweise auf 48°C), der Rührung und der Beschickung festgestellt, weshalb die Ergebnisse für diesen Zeitraum als Unfall-Szenario betrachtet werden können. Die gesicherte Verweilzeit im F2 betrug 8 - 9 h.

Die mikrobiologischen Untersuchungen sollten nach Möglichkeit anhand der nativen Populationen in Gülle durchgeführt werden. Dabei sollten klassische und parallel quantitative molekularbiologische Methoden eingesetzt werden, zum einen, um die Ergebnisse gegenseitig zu bestätigen, zu anderen, um eine Bildung aktiver aber nicht-kultivierbarer Zellen (ABNC) durch den Stress in den Fermentern zu evaluieren. Untersuchte Parameter waren Coliforme, *Enterobacteriaceae*, Fäkalcoliforme, *Escherichia coli*, intestinale Enterokokken, *Enterococcus faecalis* + *E. faecium*, thermophile *Campylobacter*, *Bacillus cereus*-Gruppe, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium parvum*, Rotaviren, *Enterovirus* und *Norovirus*. Zum Methodischen zeigte sich, dass über quantitative Real-Time PCR mit DNA als Zielmolekül (qPCR) zwar spezifische DNA präzise auch in Umweltproben quantifiziert werden kann und sich die Methode daher hervorragend zum Screening in äquilibrierten Systemen eignet. Die Methode differenziert jedoch bei direkter Extraktion von DNA aus den Proben nicht zwischen DNA aus toten und lebenden Zellen, weswegen sich nach (lethalem) Stress eine Überschätzung um den Anteil abgestorbener Zellen ergibt. Bei starkem Stress kann diese massiv sein. Der Einsatz von MPN-qPCR nach (selektiver) Voranreicherung erwies sich hier als zielführend. Den Daten für (Fäkal)Coliforme zufolge unterschätzte konventionelle (selektive) Kultivierung ABNC um 1 log<sub>10</sub>-Stufe, der genaue Betrag der Unterschätzung muss allerdings (noch) offen bleiben.

Zusätzlich zur Berblinger Pilotanlage wurde eine maßstäblich 1:6 reduzierte Modellanlage (ohne Endlager, konstant optimaler Betrieb des F2 bei 55°C) betrieben und zur Absicherung der Ergebnisse für die Pilotanlage auf Coliforme und Fäkalcoliforme untersucht. In der Modellanlage wurden auch Diffusions-Keimträger-Versuche zur Inaktivierung von Kryptosporidien-Oozysten durchgeführt. Dabei wurden verschiedene etablierte und neue Techniken eingesetzt, von denen sich vor allem ein vom Institut für Parasitologie, Leipzig, entwickelter und durchgeführter Zellkultur-Immunfluoreszenzassay als zuverlässig und zur Dokumentation einer Infektiositäts-Reduzierung um mehrere log-Stufen als geeignet erwies.

Da Gülle von gesundem Milchvieh vergoren wurde, konnten im Praxis-Material keine Krankheitserreger oder nur eine geringe Konzentration Pathogener nachgewiesen werden. Damit ließ sich für diese Pathogenen auch nicht die gewünschte Reduktion um 4 - 5 log-Stufen durch die Berblinger Anlage dokumentieren. Der Gärrest war jedoch in allen Proben frei von thermophilen *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Cryptosporidium parvum*, Rotaviren, *Enterovirus* und *Norovirus*. Infektiöse *C. parvum*-Oozysten wurden im Wasserbad bereits nach 1 h 55°C um über 5 log-Stufen reduziert. In Gülle bzw. Fermentermaterial lagen die Inaktivierungsraten prinzipiell höher als bei Verwendung reiner Suspension, entsprechend wurde in den Keimträgerversuchen in allen untersuchten Varianten mit 55°C-Phase (getestet 4 h, 12 h) eine Inaktivierung infektiöser *C. parvum*-Oozysten um > 5 log-Stufen erzielt. Die Temperatur war der dominante Inaktivierungsfaktor, eine entsprechende mesophile Behandlung war generell wesentlich ineffizienter.

In der Berblinger Pilotanlage (sowie der Modellanlage) wurden bei gesicherten 55°C im F2 Fäkalcoliforme von ca.  $10^5$  MPN / mL um 4,5 – 5 log-Stufen und Coliforme von ca.  $10^5$  MPN / mL um ca. 4 log-Stufen reduziert. Für beide Parameter ergab sich dabei Badegewässerqualität. Die Wiederverkeimung im mesophilen F3 bzw. im Endlager war bei optimalem Betrieb mit < 0,5 log-Stufen vernachlässigbar. Bei suboptimaler Temperaturführung im F2 ergab sich dagegen teilweise eine erhebliche Wiederverkeimung um über 2 log-Stufen im F3 bzw. Endlager. Wegen ihrer ausgeprägten Fähigkeit zu Rückverkeimung wird vorgeschlagen, Coliforme/Fäkalcoliforme als Parameter zur Prozessüberwachung im Gärrest zu untersuchen, wenn dieser in sensiblen Gebieten ausgebracht werden soll.

Intestinale Enterokokken wurden bei gesicherten 55°C im F2 von ca.  $10^{4,3}$  KBE / mL um 2,5 – 3 log-Stufen reduziert, bei suboptimalem Betrieb des F2 um 2,5 log-Stufen, wobei im Endlager Wiederverkeimung um etwa 0,5 log-Stufen (bei suboptimalem etwas mehr als bei optimalem Betrieb) auftrat. Badegewässergüte wurde hier nicht erreicht, die intestinalen Enterokokken wurden aber bei optimalem Betrieb des F2 auf eine offenbar sehr thermotolerante und stabile Fraktion von etwa 50 KBE / mL reduziert, was betragsmäßig auch der natürlichen Hintergrundbelastung in Dränwässern ungedüngter Ackerstandorte entspricht. Bei suboptimalem Betrieb des F2 lagen die intestinalen Enterokokken mit ca. 100 - 200 KBE / mL etwas über dieser Hintergrundbelastung. Die relativ geringen für die Berblinger Pilotanlage gemessenen Reduktionsraten sind über die geringen Anfangsgehalte in der Rohgülle, die 2-phasige Inaktivierungskinetik intestinaler Enterokokken und die Höhe der thermostabilen Residualfraktion zu erklären. Anhand bekannter D-Werte (unter vergleichbaren Bedingungen aufgenommen) ließ sich errechnen, dass der Berblinger F2 bei optimalem Betrieb (55°C, gesicherte Verweilzeit 8,5 h) und entsprechend hohem Anfangsgehalt eine Reduktion intestinaler Enterokokken um 5 log-Stufen bewirkt hätte. Den Erkenntnissen zufolge eignen sich die intestinalen Enterokokken wegen ihrer höheren Tenazität hervorragend als Indikator für die Inaktivierung praktisch aller hygiene-relevanter Viren, Parasiten und Bakterien (Ausnahme Sporenbildner, s.u.). Es wird daher vorgeschlagen, intestinale Enterokokken sowohl als Parameter zur direkten Prozesskontrolle als auch zur Produktprüfung im Gärrest zu untersuchen, wenn dieser in sensiblen Gebieten ausgebracht werden soll.

Die Gehalte der Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe (BcG) und *Clostridium perfringens* blieben in der Berblinger Pilotanlage mit ca.  $5 \times 10^3$  und ca.  $10^3$  KBE / mL praktisch unverändert. Vertreter beider Gruppen sind ubiquitäre bakterielle Tier- bzw. Zersetzungs-assoziierte aerobe bzw. anaerob-thermophile Sporenbildner. Eine Anreicherung dieser potentiell pathogenen Organismen nach Gärrest-Düngung im Boden über den natürlichen Hintergrund hinaus war nicht nachweisbar (s.u.). Bei Fütterung von Milchvieh mit pflanzlicher Nahrung wird daher die Ausbringung von Gärrest aus deren Gülle (evtl. in Co-Vergärung mit nachwachsenden pflanzlichen Rohstoffen) hinsichtlich dieser Parameter als

unkritisch gesehen. Wenn allerdings im Ausgangsmaterial eine Kontamination v.a. mit Kot von Fleischfressern oder durch Fütterung mit tierischen Produkten zu vermuten ist, sollten die Gärreste ohne eine Überprüfung nicht in sensiblen Bereichen ausgebracht werden. Für solches Gärgut wird vorgeschlagen, solange Produkt- oder Substratkontrollen mit *C. perfringens* als Leitparameter durchzuführen (s.u.), bis eine Anreicherung des Bodens oder des Drän-, Sicker- oder Grundwassers mit diesen Sporenbildnern infolge Ausbringung des Gärrests wissenschaftlich fundiert abgeklärt ist.

Den Ergebnissen zufolge ist eine mehrstufige Prozessführung nicht nötig, um die erwünschte Hygienisierung zu erreichen, hierzu kann offenbar auch ein einstufig thermophiler Betrieb bei gesicherten  $\geq 55^{\circ}\text{C}$  und minimaler gesicherter Verweilzeit von  $> 4$  h (besser 8 - 9 h) ausreichen. Die Aufrüstung einer Biogasanlage mit weiteren Stufen über die thermophile Hygienisierungsstufe hinaus verstärkt allerdings die Hygienisierungsleistung und kann über den weiterführenden Substrataufschluss auch zu einer verbesserten Energiebilanz dienen.

Um erste Ergebnisse zu möglichen Effekten von Gärrest-Ausbringung im Boden zu erhalten, wurden Bodenproben von Gülle- und Gärrest-gedüngten Plots bis 1 m Bodentiefe klassisch-mikrobiologisch auf Coliforme, Fäkalcoliforme und intestinale Enterokokken sowie später auch auf *C. perfringens* und *BcG*-Vertreter untersucht. Zur Einschätzung der natürlichen Hintergrundbelastung dienten Bodenproben der WZ I und (teilweise) von einem Lysimeter sowie von verschiedenen Grünlandstandorten als Kontrollen. Eine zu Beginn angelegte Verlaufskontrolle konnte nicht gehalten werden. Die Ergebnisse sind wegen der Kürze des Beobachtungszeitraums und der teilweise hohen Variabilität im Boden als vorläufig zu betrachten.

Es konnten keine eindeutig negativen Effekte der Gärrest-Ausbringung im Boden festgestellt werden. Die Gehalte der untersuchten Parameter im Gärrest-Plot waren nicht von denen im Boden der WZ I verschieden. Höhere Gehalte intestinaler Enterokokken, *BcG*-Vertreter und *C. perfringens* schienen eher auf den Besatz mit Bodentieren bzw. deren Exkremente als auf die Düngung zurückzuführen zu sein. Allerdings ergaben sich in einzelnen Fällen Hinweise, dass es nach Gülle-Düngung zu einer Anreicherung mit diesen Organismen im Boden kommen kann.

Zur Absicherung der Werte für die natürliche Hintergrundbelastung sind weitere Untersuchungen dringend erforderlich, insbesondere für intestinale Enterokokken, *BcG*-Vertreter und *C. perfringens*. Hier sollten *C. botulinum* und *C. tetani* eingeschlossen werden. Es sollte auch über Tiefenbohrungen und Analyse des Grundwasserstroms insbesondere für die Sporenbildner geprüft werden, inwieweit Oberflächen-Düngung in verschiedenen Umweltszenarien - insbesondere in Folge eines Starkregens nach längerer Trockenperiode - Standort-spezifisch erhöhte Werte im Grundwasser verursacht. Entsprechende Daten sollten auch für Drän- und Sickerwässer erhoben werden. Ohne solche Ergebnisse lassen sich eventuelle Düngungs-Effekte nicht auf solider Basis diskutieren. Wünschenswert wären dabei auch Erkenntnisse zum Schicksal von Xenobiotika wie Arzneimittelrückständen und Mycotoxinen bei anaerob thermophiler Vergärung und Ausbringung des Gärrests auf den Boden. Auch eine Nitrifikation nach Gärrest-Ausbringung und eine Verlagerung des Nitrats in den Grundwasserstrom sollte untersucht werden.

Den Ergebnissen zur Hygiene zufolge ist eine Ausbringung von Gärresten statt unbehandelter Wirtschaftsdünger in wasserwirtschaftlich sensiblen Gebieten wie der weiteren Schutzzone im Karst und im Einzugsgebiet von Badegewässern sehr zu begrüßen. Für möglichst optimale Hygienisierungsergebnisse, auch im Hinblick auf eine mögliche Auswaschung von nicht abgetöteten Mikroorganismen in das Grundwasser, sollen insbesondere folgende Prüfkriterien beachtet werden:

#### A: Standortprüfung

Die hydrogeologische Situation sollte einen direkten Kurzschluss zum Grundwasserstrom ausschließen:

keine Gärrestausbringung z.B. über Karst, Kies oder Grobsand mit direktem Grundwasseranschluss, bei Böden mit typischerweise ausreichender Überdeckung und Filtereigenschaft sollten bodenart- und witterungsbedingte Ausschlussfälle im Rahmen von standortbezogenen Hinweisen zur Gärrestapplikation für Beratung und Praxis differenziert definiert werden. Gärrest sollte z.B. nicht auf einem tonreichen Boden nach längerer Trockenheit (Schwundrissebildung) ausgebracht werden.

#### B: Baumusterprüfung

Das Verfahren sollte bei thermophil anaerober Vergärung eine minimale gesicherte Verweilzeit (MGRT) von  $> 4$  h bei gesicherten  $\geq 55^{\circ}\text{C}$  im thermophilen Fermenter beinhalten (um einen Toleranzspielraum freizuhalten wären 8 - 9 h MGRT oder eine höhere Temperatur wünschenswert), alternativ eine Pasteurisierung oder einen adäquaten Schritt. Vorgeschlagene Technologien sollten im Rahmen einer Baumusterprüfung die geforderte MGRT nachweisen. Kurzschlüsse während des Prozesses sind auszuschließen (in Rührkessel-Fermentern bestimmt das Beschickungs-Intervall die MGRT), nach der thermophilen (oder adäquaten) Hygienisierungs-Stufe muss Schwarz-Weiß-Trennung gegeben sein.

#### C: Prozesskontrolle

Die Prozesstemperatur von  $\geq 55^{\circ}\text{C}$  sollte im Betrieb on-line verfolgt und dokumentiert werden (indirekte Prozesskontrolle)

Eine zumindest einmalig nach Inbetriebnahme (steady-state Betrieb) exemplarisch vorgenommene direkte Prozesskontrolle sollte die Reduktion intestinaler Enterokokken um  $> 4 \log_{10}$ -Stufen demonstrieren. Die Reduktion kann ggf. mit Hilfe in den Fermenterinhalt eingebrachter Keimträger mit  $10^6 - 10^7$  KBE *Enterococcus faecium* / mL nachgewiesen werden, wobei die für den Betrieb vorgesehene MGRT ( $> 4$  h) als Verweilzeit dient.

#### D: Substrat- und Endproduktkontrolle

Substrat ist Rindergülle von gesundem Milchvieh, ggf. unbefallene nachwachsende pflanzliche Rohstoffe aus biologischer Produktion (in Mischung mit solcher Rindergülle).

Nach Inbetriebnahme (steady-state Betrieb) sollte eine etwa 2 Wochen vor Ausbringung vorgenommene Produktprüfung (Endlagerprobe) dem Gärrest folgende Qualitäten bestätigen:

$< 150$  intestinale Enterokokken / mL (Membranfilter, Kultivierung auf Äsculin-Galle-Agar nach Slanetz-Bartley-Agar, s. B 2.3.2.2),

$< 5$  Fäkalcoliforme / mL und/oder  $< 100$  Coliforme / mL (Fluorocult®-System, s. B 2.3.2.1),

optional bei unklarer Herkunft des Gärguts, v.a. bei nicht ausgeschlossener Kontamination mit Kot von Fleischfressern:  $< 3000$  *Clostridium perfringens* / mL (TSCF-Plattenguss, s. B 3.1.7).

Diese Endproduktprüfung sollte bei gleichbleibender Prozessführung in der Anlage 1x jährlich wiederholt werden, insbesondere nach der Winterpause vor der ersten Frühjahrsdüngung.

#### E: Betriebsänderungen

Im Falle von Änderungen des Anlagenbetriebs sollte der unter den neuen Bedingungen produzierte Gärrest erst dann ausgebracht werden, wenn Prozess- und Endproduktkontrollen keine Beanstandungen ergaben.

Bei Einhaltung dieser Maßgaben kann auf Basis der aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnislage davon ausgegangen werden, dass von der Gärrest-Ausbringung in landwirtschaftlich üblicher Dosierung keine hygienisch relevante Gefährdung des Grundwasserstroms oder von Oberflächengewässern ausgeht. Sollten aktuellere Informationen insbesondere zu einer Anreicherung von Sporenbildnern im Boden und/oder im Drän-, Sicker- und Grundwasserstrom bzw. im Trinkwasser infolge Düngung mit Gärrest vorliegen, müsste die vorgeschlagene Konzeption neu überdacht werden.

## **B 1 Einleitung: Hintergrund, Problemstellung und Zielsetzungen**

### **B 1.1 Hintergrund der Studie**

Um in Zukunft die Versorgung der Bevölkerung mit hygienisch unbedenklichem und schadstofffreiem Trinkwasser gewährleisten zu können, werden auch in Bayern (Umsetzung der Beschlüsse des Rio-Gipfels in der Bayern-Agenda 21, STMLU, 1998) geänderte Anforderungen an den Bereich des Gewässerschutzes gestellt. 3,2 % (zukünftig 5 %) der Landesfläche von Bayern sind als Wasserschutzgebiete ausgewiesen, wovon 32 % als Acker- und 23 % als Grünland landwirtschaftlich genutzt werden. Mit der vorhandenen Tierhaltung fallen Wirtschaftsdünger an, die verwertet oder entsorgt werden müssen. Hieraus ergibt sich ein Spannungsfeld zwischen Land- und Wasserwirtschaft. In Zusammenhang mit der Erweiterung der Wasserschutzgebiete kann dies zu Konflikten mit landwirtschaftlichen Interessen führen, z.B. wenn aktuell landwirtschaftlich genutzte Fläche der engeren Schutzzone (Zone II) von Wasserschutzgebieten zugeordnet wird. Zum Schutz des Trinkwassers ist in Bayern in der Wasserschutzzone II die Ausbringung von Wirtschaftsdünger verboten (ANONYMUS, 1994).

In diesem Zusammenhang sind auch Zielsetzungen der Wasserrahmenrichtlinie zu sehen, Belastungen z.B. von Badegewässern durch diffuse Quellen aus der Landwirtschaft zu minimieren. Solche Belastungen stammen vor allem von Betrieben mit Tierhaltung und/oder Gülledüngung, wobei der Zustrom über Abschwemmung, Drän- oder Sickerwässer erfolgen kann (WEIß und POPP, 2004) oder durch schnelle Perkolation z.B. im Karst.

Für betroffene Betriebe würde ein Ausbringungsverbot ökonomische Einbußen und Wertminderung der Grundstücke zur Folge haben, es kann (bei hoher betrieblicher Viehbesatzdichte) zu Zielkonflikten mit der DüV kommen, und es werden bestehende Nährstoffkreisläufe unterbrochen. Für die Wasserwirtschaft bedeutet dies einen erhöhten Überwachungsaufwand, eventuell steigende Ausgleichszahlungen und einen Akzeptanzverlust bei den betroffenen Bauern.

Als Voraussetzung für eine Lockerung dieses Ausbringungsverbotes in Einzelfällen wird von den zuständigen Behörden eine präventive Behandlung der Gülle angeführt, die eventuell vorhandene pathogene Organismen so weit reduziert, dass für das Trinkwasser keine Gefährdung zu erwarten ist. Hintergrund ist, dass die Landwirtschaft als diffuse Quelle vor allem für die Grundbelastung eines Wassereinzugsgebietes mit pathogenen Mikroorganismen (wie auch mit Nähr- und Schadstoffen) verantwortlich gemacht wird. Da viele Infektionen von landwirtschaftlichen Nutztieren mit Beteiligung des Verdauungstraktes verlaufen, stellen Ausscheidungen der Tiere, die in Form von Stallmist, Jauche und Gülle anfallen, ein potentiell Reservoir für die Ausbreitung von Seuchen- und Krankheitserregern dar (STRAUCH, 1996). Eine Quantifizierung des tatsächlichen Eintrags von Krankheitserregern ist jedoch im Einzelfall sehr schwierig (LENHART, 2001). Hierüber sollte die vorliegende Studie Aufschluss geben.

Die Stadtwerke Rosenheim GmbH & Co. KG, die Stadtwerke Bad Aibling und die Stadt Kolbermoor betreiben im Gewinnungsgebiet „Willinger Au“ zwölf wasserrechtlich genehmigte Brunnen. Zur Untersuchung der Grundwasserverhältnisse im unteren Mangfalltal im Hinblick auf geplante Entnahmesteigerungen aus den Wassergewinnungsanlagen, sowie zur Sicherung dieses Grundwasservorkommens im Hinblick auf konkurrierende Nutzung wurden vom Lehrstuhl für Hydraulik und Gewässerkunde der TU-München die Grundwassermodelle „Unteres Mangfalltal“ und „Willinger Au“ erstellt. Die mit Hilfe dieser Modelle gewonnenen Erkenntnisse machen deutlich, dass die für die Gewinnungsanlagen der Stadtwerke Rosenheim, Stadtwerke Bad Aibling und der Stadt Kolbermoor ausgewiesenen Schutzgebiete keinen ausreichenden Schutz darstellen. Bei den in dem Gebiet ermittelten hohen Abstandsgeschwindigkeiten im Grundwasserleiter und wegen des Fehlens schützender

Deckschichten sind die bestehenden Schutzgebiete nicht ausreichend dimensioniert. Deshalb hatten die Stadtwerke Rosenheim, die Stadtwerke Bad Aibling und die Stadt Kolbermoor im Gewinnungsgebiet „Willinger Au“ die Ausweisung eines gemeinsamen Schutzgebietes mit den Zonen I, IIa, IIb, IIIa und IIIb beantragt. Da sich jedoch die politische Umsetzung der vorgeschlagenen Unterteilung als problematisch erweist, wird nach Alternativlösungen gesucht, zu denen die vorliegende Studie Entscheidungshilfen geben soll.

Aus Anlass der Erweiterung des Wasserschutzgebietes für die Wassergewinnungsanlagen der Stadtwerke Rosenheim, Bad Aibling und der Stadt Kolbermoor sollte die Möglichkeit ergriffen werden, den Kenntnisstand über Verfahrenskenndaten, Kostenstruktur, logistische Notwendigkeiten, Energieausbeute und Nutzungseffizienz aber vor allem über Auswirkungen auf die Umwelt einer hinsichtlich hygienischer Parameter zu optimierenden landwirtschaftlichen Biogasanlage deutlich zu erweitern. Dies erfolgte im Rahmen des Verbundprojekts der Stadtwerke Rosenheim (StwRo), des Instituts für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL-Landtechnik, Projektleitung Dr. Andreas Gronauer, Förderung durch das StMLF) und des Lehrstuhls für Siedlungswasserwirtschaft (vormals Wassergüte- und Abfallwirtschaft) der Technischen Universität München (TUM-SWW, Projektleitung Prof. Dr. Peter Wilderer) Förderung durch das StMUGV, vormals StMLU). StwRo (Dipl.-Ing. Ludwig Nesper) waren Koordinator, die wissenschaftliche Bearbeitung erfolgte in einem gemeinsamen Ansatz von LfL-Landtechnik (Bearbeitung durch Dipl.-Ing. Mathias Effenberger) und TUM-SWW (Bearbeitung durch Dr. Michael Leuhn), wobei LfL-Landtechnik den Aufgabenbereich Betrieb und Optimierung der Biogasanlage und TUM-SWW den Bereich Mikrobiologie übernahmen. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen sind im vorliegenden Abschlussbericht dokumentiert.

## **B 1.2 Problemstellung und Zielsetzungen**

### **B 1.2.1 Routinebetrieb in der Praxis**

Mitte 1997 traten die Stadtwerke Rosenheim an die Landtechnik Weihenstephan heran. Es sollten Möglichkeiten gesucht werden, Wirtschaftsdünger präventiv zu behandeln, um den Eintrag von pathogenen Organismen ins Grundwasser zu vermeiden, ohne ein Ausbringungsverbot für Wirtschaftsdünger erlassen zu müssen. Die anaerobe Vergärung im Rahmen der Biogastechnologie (RÜCKERT, 1991; FINK et al., 1997) weist besondere Vorzüge auf. Sie hat unter den verschiedenartigen Behandlungsverfahren für Wirtschaftsdünger den großen Vorteil, dass neben einer keimabtötenden Wirkung ein Netto-Energieüberschuss erzielt werden kann. Um hohen hygienischen Anforderungen zu genügen, müssen an die Verfahrenstechnik und den Betrieb einer Biogasanlage besondere Anforderungen gestellt werden, und es bedarf einer gründlichen mikrobiologischen Überwachung, um den Erfolg der Abtötung pathogener Keime zu kontrollieren und zu dokumentieren. Hinsichtlich der Zuverlässigkeit der keimabtötenden Behandlung von Wirtschaftsdünger im Routinebetrieb einer landwirtschaftlichen Biogasanlage gab es allerdings kaum Erfahrungen. Diese sollten im Rahmen der vorliegenden Studie gewonnen werden.

### **B 1.2.2 Reduktion bakterieller Keimzahlen und geeignete Verfahren**

In landwirtschaftlichen Biogasanlagen werden in der Praxis im Wesentlichen mesophile Verfahren eingesetzt (Betriebstemperatur um 35°C). Thermophile Verfahren reduzieren aber Indikatoren für fäkale Verunreinigungen deutlich stärker als mesophile. *Escherichia coli* mit durchschnittlichen Gehalten von  $9,1 \times 10^5$  KBE / mL im Ausgangssubstrat wurden durch mesophile Behandlung in 6 Tagen bis auf  $4,3 \times 10^1$  KBE / mL und durch thermophile Behandlung (Betriebstemperatur um 55°C) sogar auf  $0,6 \times 10^0$  KBE / mL reduziert, intestinale Enterokokken (Fäkalstreptokokken) mit  $1,0 \times 10^6$  KBE / mL im Ausgangssubstrat

mesophil auf  $1,8 \times 10^5$  KBE / mL und thermophil auf  $2,1 \times 10^2$  KBE / mL (FINK et al., 1997). Den Ergebnissen des StMLU-geförderten BayFORREST-Projekts F78 zufolge ist eine thermophile Behandlung bei 55°C und einer Verweilzeit von 6 Stunden ausreichend, um Salmonellen abzutöten, sie war allerdings für Bioabfall ohne nachgeschaltete mesophile Stufe aus verfahrenstechnischen Gründen ungünstig.

Durch eine zweistufige, am Lehrstuhl für Wassergüte- und Abfallwirtschaft der TU München entwickelte und inzwischen zur Marktreife gebrachte thermophil-mesophile Verfahrensführung (TherMes-Verfahren, CHRIST et al., 1997), konnten gute Behandlungsgrade bei guter Entwässerbarkeit der behandelten Suspension und geringer Stoffbelastung (CSB, Stickstoffverbindungen) des Filtratwassers erreicht werden (CHRIST, 1999). Um das Verfahren vor allem unter hygienischen aber auch wirtschaftlichen Aspekten zu optimieren, sollte im Rahmen dieses Projekts eine mesophil-thermophil-mesophile Prozesskaskade als neues Verfahren untersucht werden. Es leitet sich aus dem TherMes-Verfahren ab, beinhaltet aber aus unten dargestellten Gründen eine vorgeschaltete mesophile (später psychrophile) Stufe. Die mesophile wurde der thermophilen Phase vorgeschaltet, um eine Vor-Aufheizung der Gülle mit zusätzlicher Biogasproduktion zu bewirken und zusätzlich in dieser Phase Oozysten von Kryptosporidien zu exzystieren, die eventuell dann in der nachgeschalteten thermophilen Phase leichter zu inaktivieren wären (DOLL et al., 1999; OECHSNER und DOLL, 2000). Die 3-stufige Prozessführung wurde in den Untersuchungsobjekten, der Berblinger Pilot-Biogasanlage sowie der maßstäblich 1:6 reduzierten Modellanlage umgesetzt.

Die Hygienisierungseffizienz der Berblinger Biogasanlage sollte unter Praxisbedingungen anhand einer Reihe bakterieller und viraler Parameter sowie Parasiten (s. B 2.3) untersucht werden. Dabei wurde soweit möglich Wert darauf gelegt, dass nicht Laborstämme der Gülle zugesetzt wurden, die u.U. reduzierte Tenazität gegenüber den Behandlungsbedingungen aufweisen, sondern dass die Hygienisierung möglichst anhand der Inaktivierung der autochthon vorhandenen Mikroflora überprüft und dokumentiert wird.

### **B 1.2.3 Einsatz von Molekularbiologie, qPCR**

Die Wirkung einer keimabtötenden Behandlung auf Mikroorganismen wird konventionell in der Praxis über selektive Kultivierung und spezifische physiologische Tests durchgeführt. Allerdings lassen sich einige Pathogene, z.B. Norwalk-Viren und Kryptosporidien, die über Transmission von befalltem Rind über Gülle ins Trinkwasser Epidemien auslösen können (WHO, 2002; WHO, 2004a), nicht kultivieren. Zudem ist ein großer Nachteil der klassischen mikrobiologischen Methoden der hohe Arbeits- und Zeitaufwand, der erforderlich ist, um pathogene Mikroorganismen eindeutig zu identifizieren und im Probenmaterial zu quantifizieren. Dieses Manko führte zum „Indikatorkonzept“, demzufolge bestimmte coliforme Bakterien fäkalen Ursprungs (Fäkalcoliforme, im Wesentlichen *E. coli*) und/oder intestinale Enterokokken (Fäkalstreptokokken, im Wesentlichen *Enterococcus faecalis* und *E. faecium*) stellvertretend für andere pathogene Keime nachgewiesen werden.

Die Wirksamkeit dieses Prinzips wird aber inzwischen weltweit in Frage gestellt. Zum einen können Zellen, die sublethal gestresst wurden, teilweise auf routinemäßig eingesetzten Anzuchtmedien nicht mehr kultiviert werden, obwohl sie lebensfähig bleiben (ABNC, LLEÒ et al., 2001; THOMAS et al., 2002). Die bekannten Indikatororganismen sind auch nicht geeignet, die Überlebensfähigkeit potentiell pathogener bakterieller thermophiler Sporenbildner (z.B. Clostridien, Bakterien des *Bacillus-cereus*-Komplexes) und höherer Parasiten (z.B. Kryptosporidien, Giardien) stellvertretend anzuzeigen (ROSE et al., 2002; BASTOS et al., 2004). Auch für thermotolerante Nicht-Sporenbildner (z.B. *Campylobacter jejuni*) sind Ergebnisse der praxisüblichen Bestimmung der Indikatoren nicht unbedingt aussagekräftig (HÄNNINEN and KÄRENLAMPI, 2004).

Deshalb sollten im Rahmen des Projekts quantitative PCR-Methoden (qPCR) entwickelt und parallel zur klassischen Kultivierung eingesetzt werden, um die pathogenen Keime direkt in den Proben zu quantifizieren und die Ergebnisse und Aussagekraft im Vergleich beider Methoden zu evaluieren. Dabei war sicherzustellen, dass PCR-Inhibierung über Entwicklung geeigneter Methoden zur Nukleinsäure-Extraktion ausgeschlossen wurde, und dass die Nukleinsäure-Extraktions-Methoden sich auch zur Gewinnung relevanter Mengen DNA oder RNA aus Bildern von Sporen und Dauerstadien (s. B 1.2.4) eignete, die typischerweise einer chemischen Extraktion gegenüber inert sind.

Untersuchungen auf *Enterovirus*, humane Rotaviren und *Norovirus* sollten vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Oberschleißheim (LGL, Dr. Schindler, Dr. Bayer, vormals Landesuntersuchungsamt Südbayern, LUA), mit den dort etablierten Methoden durchgeführt werden. Zusätzlich wurden von TUM-SWW qPCR-Ansätze für *Enterovirus* sp. und *Norovirus* Gg2 entwickelt und parallel eingesetzt.

#### **B 1.2.4 Problematik widerstandsfähiger Krankheitserreger**

Insbesondere zu Fragen der Inaktivierung widerstandsfähiger Krankheitserreger wie Dauerstadien bildender Bakterien und Parasiten bestand erheblicher Forschungsbedarf. Daher sollte exemplarisch das Verhalten von sporenbildenden bakteriellen Pathogenen (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*) und von Oozysten-bildenden eukaryontischen Parasiten (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia*) während des Biogasprozesses untersucht werden.

Aus Untersuchungen zur aerob-thermophilen Stabilisierung von Gülle wurde die Empfehlung abgeleitet, dass für eine sichere Inaktivierung von Kryptosporidien eine Aufwärmphase von mindestens 12 h bei 35-45°C, gefolgt von einer Behandlung bei 50-55°C für mindestens 24 h eingehalten werden sollte (DOLL et al., 1999). Allerdings erschwerten Ausfälle des thermophilen Reaktors die Interpretationen, und es wurden keine Infektiositätstests durchgeführt, die eine Inaktivierung sicher dokumentieren können, während die durchgeführten Untersuchungen (Fähigkeit zur Exzystierung, Membranpermeabilität) die Inaktivierungsrate wahrscheinlich unterschätzten (BUKHARI et al., 2000; s. B 3.1.8.2). DOLL et al. (1999) und OECHSNER und DOLL (2000) zufolge sollten Oozysten während der vorgeschalteten mesophilen Phase exzystieren, und die freigesetzten, anfälligeren Sporozysten in der folgenden thermophilen Phase leichter abgetötet worden sein. Daher wurden in der Konzeption der Berblinger Biogasanlage und der verkleinerten Modellanlage der thermophilen zunächst eine mesophile Stufe vorgeschaltet. Da eine Inokulation mit Kryptosporidien in der Pilotanlage aus praktischen und rechtlichen Gründen nicht möglich war, wurden diese mit entsprechendem Substrat in Diffusionskeimträger (RAPP, 1995; KNIE et al., 2000) in die mit Material aus der Berblinger Vorgrube beschickten und analog zur Berblinger Anlage betriebenen Modellanlage eingesetzt, und nach Einwirken verschiedener Temperatur-/Zeitregimes auf Inaktivierung untersucht. Wesentlicher Bestandteil der Untersuchungen sollten Infektiositätstests mit der humanen HCT-8 Zelllinie (ROCHELLE, 2004) sein. Sie konnten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Parasitologie, Leipzig, (IPL, Prof. Dausgries, M. Najdrowski, C. Wackwitz) realisiert werden.

#### **B 1.2.5 Rückverkeimung im Endlager**

Die Problematik der Rückverkeimung im Endlager sollte ein Modell-Endlagerversuch klären, in dem die Entwicklung im Endlager mit der von verkleinerten Modellen ohne residuales Rückverkeimungspotenzial sowie ohne weiteren Substratzustrom verglichen wurde (s. B 2.1.1.3).

#### **B 1.2.6 Auswirkungen im Boden**

In einer sondierenden Begleitstudie (s. B 2.1.2) sollte festgestellt werden, ob nach Ausbringung des Gärrests eine Rückverkeimung im Boden stattfindet. Zu diesem Zweck

wurden 3 vergleichbare Versuchsplots auf den Mühläckern bei Berbling angelegt (praxisübliche Ausbringung von Gülle, Gärrest und ungedüngte Kontrolle), bis 1 m Bodentiefe beprobt und mikrobiologisch über selektive Kultivierung untersucht. Um den Belastungsstatus besser einordnen zu können, wurden zu Versuchsende zusätzliche Bodenproben (unbelasteter Lysimeter, verschiedene bayerische Wiesenböden) parallel untersucht.

#### **B 1.2.7 Lysimeterstudien, Keimverlagerung in Böden und Lufthygiene**

In einem Unterauftrag an das Institut für Agrarökologie, Ökologischer Landbau und Bodenschutz (LfL-Agrarökologie, Dr. Henkelmann) an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (vormals Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau) sollte in einem „worst case scenario“ die Keimverlagerung aus aufgebrachtener Gülle und von Gärrest in Lysimetern mit Böden verschiedener Herkunft überprüft werden. Diese Studie sollte erste Anhaltspunkte liefern, ob und in welchen Fällen mit einem Durchbruch eventuell hoher Keimfrachten ins Grundwasser gerechnet werden muss, ob dabei Unterschiede zwischen Gülle- und Gärrest-Düngung bestehen, ob Gülle und Gärrest verschiedene lufthygienische Eigenschaften haben und ob sich die Ergebnisse für die Gärrest-Ausbringung am Standort Berbling auf andere Standorte extrapolieren lassen.

Diese Studie ist als eigenständiger Bericht (HENKELMANN, 2006) dem vorliegenden Abschlussbericht beigelegt.

## B 2 Material und Methoden

### B 2.1 Beschreibung der Untersuchungsobjekte

Die Untersuchungen gliedern sich im Wesentlichen in zwei Bereiche auf:

Bestimmung der Hygienisierungsleistung der Fermenterkette incl. Endlager und der Wiederverkeimung v.a. im Endlager (s. B 2.1.1) sowie

Vergleichende Erfassung von Wiederverkeimung im Boden nach Ausbringung von Gülle und Gärrest (s. B 2.1.2) sowie Extrapolierungsmöglichkeiten der Ergebnisse über Lysimeterstudien (HENKELMANN, 2006).

#### B 2.1.1 Fermenterketten

Die meisten der mikrobiologischen Fragestellungen ließen sich anhand der Berblinger Pilotanlage lösen. Die Untersuchungen zur Desaktivierung von Kryptosporidien ließen sich besser in einer Modellanlage (vgl. B 1.2.4) untersuchen. Zur Untersuchung der Rückverkeimung im Berblinger Endlager wurde ein Modell-Endlagerversuch angelegt.

##### B 2.1.1.1 Pilotanlage Berbling

Abbildung 46 skizziert die Pilot-Biogasanlage Berbling und die Probenahmepunkte.

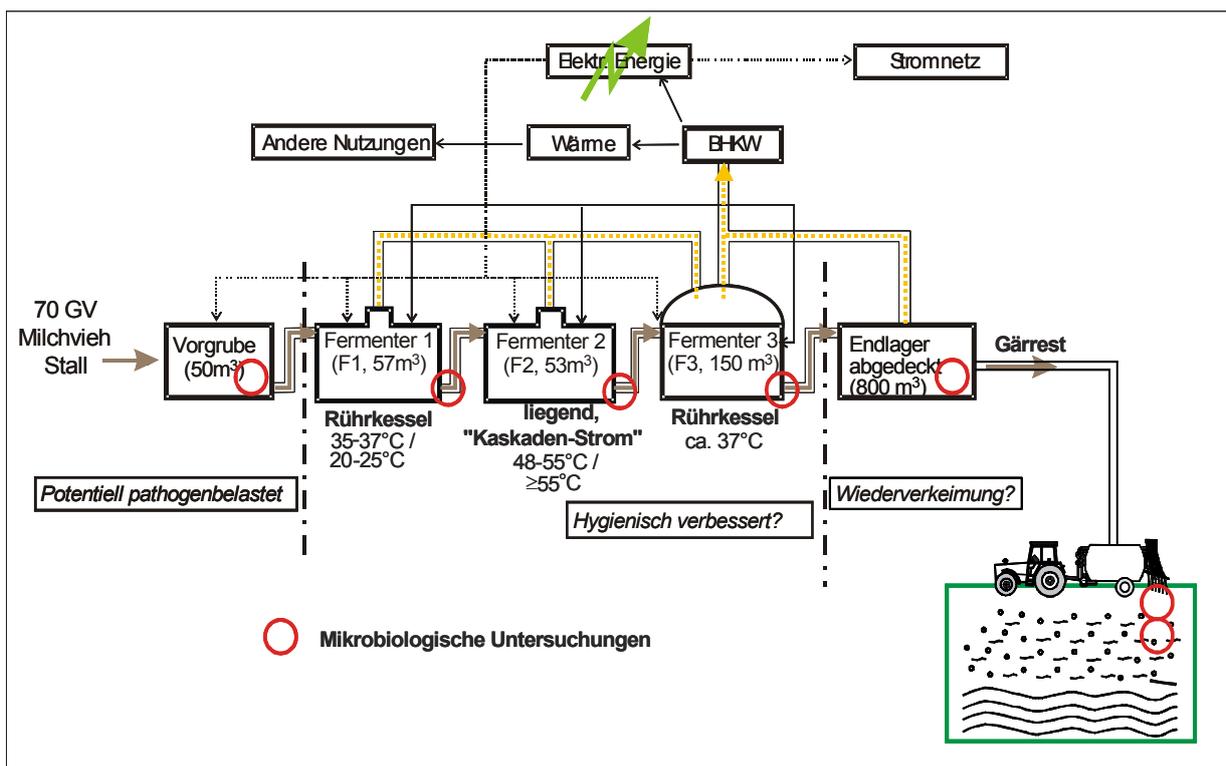


Abbildung 46: Schema der Biogasanlage Berbling mit Probenahmepunkten

Die Berblinger Anlage (Hof und Betreiber Fam. Schweiger) wurde ausschließlich mit Rindergülle von gesundem Milchvieh (teilweise von Nachbarbetrieben) beschickt. Verfüttert wurde ganzjährig eine TMR aus Grassilage, Heu, Korn und Mineralmischung. Die Gülle (Inhalt der Vorgrube) beinhaltete Strohmehl sowie das gesamte, im Stall anfallende Abwasser von Melkstand, Milchküche und Waschaum. Herr Schweiger wurde verpflichtet, eventuelle Tiererkrankungen und Gegenmaßnahmen zu melden. Es lagen bis zur Berichtverfassung keine Krankheitsmeldungen vor.

Im thermophilen Fermenter (F2) der Pilotanlage Berbling konnte die angestrebte Betriebstemperatur von 55°C erst nach den Ende 2003 beendeten Umbauten konstant gehalten werden. Davor kam es immer wieder zu Ausfällen des BHKWs und zu Beschickungsausfällen, was eine Absenkung der Temperatur auf z.T. bis 48°C im F2 sowie zeitweise lokale Überhitzungen zur Folge hatte. Von einem hinsichtlich der Temperatur zur Hygienisierung optimalen Betrieb kann daher erst ab Februar 2004 ausgegangen werden.

Bis 6.9.2004 erfolgte die Beschickung der Berblinger Pilotanlage und der Modellanlage stündlich, danach 4-stündlich. Die entsprechenden mittleren hydraulischen und die von LfL-Landtechnik über Tracerexperimente (EFFENBERGER et al., 2005a; EFFENBERGER et al., 2006) bestimmten gesicherten minimalen Verweilzeiten im F2 zeigt Tabelle 56. Die Hauptfracht des Peaks erschien im Auslauf des F2 48 h nach Einbringen. Aufgrund des praktisch gleichzeitigen Erscheinens von LiCl-Tracer und (radioaktiv markierten) im Sickerwasser nach Aufbringen dotierter Gülle und Gärrest auf Lysimeter mit verschiedenen Bodenformen (HENKELMANN, 2006) kann in erster Näherung davon ausgegangen werden, dass sich Fäkalcoliforme / *E. coli* auch im Massestrom der Fermenter ähnlich wie die verwendeten Tracer verhielten.

Tabelle 56: gesicherte minimale Verweilzeit und mittlere hydraulische Verweilzeiten in den Fermentern

gesicherte min. Verweilzeit (h)	F1 (mesophil)	F2 (thermophil)	F3 (mesophil)
stündl. Beschickung	1	9*	1
4-stündl. Beschickung	4	8 - 9*	4
<b>mittl. hydraulische Verweilzeit (d)</b>			
stündl. Beschickung	9,3	8,4	27,7
4-stündl. Beschickung	9,2	8,4	27,8

\* über Tracerstudien belegt (EFFENBERGER et al., 2006); Hauptfracht (Peak) des Li<sup>+</sup> erschien nach 48 h.

Zusätzlich zum Monitoring-Programm mit Entnahme von Zufalls-Stichproben wurden 3 Chargenversuche in der Berblinger Pilotanlage durchgeführt (s. B 2.1.1.1). In diesen wurde versucht, eine Gülle-Charge ausgehend vom Vorgruben-Material jeweils nach den mittleren hydraulischen Verweilzeiten in den Fermentern (Tabelle 56) zu verfolgen, um die relativ hohen Schwankungen der Keimzahlen im Ausgangsmaterial zu eliminieren und dadurch die Hygienisierungsleistung besser zu charakterisieren. Der erste Chargenversuch begann am 25.8.2003, der zweite am 3.9.2003 und der dritte am 15.3.2004. Die ersten beiden Chargenversuche fielen jeweils in Perioden, in denen die o.g. Instabilitäten im Betrieb des F2 auftraten. Sie sind damit nur unter Vorbehalten zu bewerten, aber sehr zur Abschätzung eines worst-case-Szenarios geeignet. Der dritte Chargenversuch erfolgte unter konstant optimalen Bedingungen und kann daher als repräsentativ angesehen werden.

Ab Anfang März 2005 wurde der mesophile Fermenter F1 auf psychophilen Betrieb bei 20 – 25°C umgestellt. Hierdurch sollte die Effektivität des zuvor dem thermophilen F2 vorgeschalteten mesophilen F1 hinsichtlich Keimreduzierung sowie der Einfluss des F1 auf den Gesamtprozess evaluiert werden.

#### B 2.1.1.2 Modellanlage

Zusätzlich zur Berblinger Pilotanlage wurde von LfL-Landtechnik eine maßstäblich 1:6 reduzierte Modell-Biogasanlage (ohne Endlager) konstruiert und an TUM-SWW analog zur Berblinger Pilotanlage betrieben. Sie diente v.a. zur Bearbeitung folgender Fragestellungen: Bestimmung der Inaktivierung von *Cryptosporidium parvum* Oozysten mit Hilfe von Diffusions-Keimträgern (sowie Wasserbad-Experimenten, in Zusammenarbeit mit IPL) Überprüfung der Hygienisierungsleistung der Pilotanlage anhand von Monitoring-Ergebnissen der Modellanlage mit Evaluierung von Up- bzw. Downscaling-Effekten

Bestimmung wahrscheinlicher hydraulischer Verweilzeiten (s. Tabelle 56) von Bakterien in den einzelnen Kompartimenten anhand von Tracerstudien (LfL in Zusammenarbeit mit LfL-Agrarökologie)

Die Betriebstemperatur des thermophilen Fermenters der Modellanlage konnte immer konstant bei 55°C gehalten werden.

#### B 2.1.1.3 Modell-Endlagerversuch

Um die Rückverkeimung im Berblinger Endlager abzuklären, wurde ein Modell-Endlagerversuch angelegt. Die Untersuchungen fanden im Zeitraum 28.4 – 25.10.2004 statt. Polypropylen-Kanister (5 L, gewaschen, desinfiziert) wurden am 28.4.2004 mit Ausfluss-Material des F3 (2. mesophiler Fermenter) befüllt und schattig in Berbling bei ambienten Verhältnissen gelagert. Gasauslass war ermöglicht. Es wurden 2 Varianten angelegt, die etwa monatlich mikrobiologisch untersucht wurden:

C1 (Endlager 2, ohne Austausch)

C2 (Endlager 3, wöchentl. Austausch von ca. 1/10 Vol. durch frisches F3-Material).

Untersucht wurden Coliforme und Fäkalcoliforme, da diese den Ergebnissen zufolge hinsichtlich Rückverkeimung am schnellsten reagierten.

### **B 2.1.2 Boden-Beprobung**

#### B 2.1.2.1 Berblinger Standorte

Abbildung 47 skizziert einen Lageplan des Hofes Schweiger, Berbling, mit der etwa 25 m nördlich angrenzenden Versuchsfläche (Wiesenboden). Die Länge der 3 Plots auf den Mühläckern betrug 120 m, die Breite 13 m und die Zwischenstreifen 2 m. Der westl. Plot war für die Gülle- und der östl. Plot für die Gärrest-Ausbringung bestimmt.

Vor Versuchsanlage im März 2003 waren alle Flächen regelmäßig gegüllt. Der Kontroll-Plot (Abbildung 47) ist damit keine echte Null-Variante sondern eher eine Verlaufskontrolle, eine Null-Variante (natürliche Belastung) wurde ab Sept. 2004 mit der Fläche in WZ I ins Programm aufgenommen (Abbildung 47). Die westl. Fläche (Gülle-Plot) war vor 20 Jahren ein Maisacker, die anderen beiden Parzellen waren immer als Wiese bewirtschaftet.

Da der Gülle-Plot zum Termin Mai 2004 mit Gärrest gedüngt wurde, musste auf die etwa 50 m südl. der Zufahrts-Straße gelegenen Dorfäcker (Abbildung 47) ausgewichen werden. Als Kontrollen dienten der bis Ende 2003 ungedüngt zentrale Plot (ab 2004 Gärrest-Ausbringung wegen Auslaufens des KuLaP) sowie im Mai 2004 der lt. Herrn Schweiger ungedüngte Randbereich nördl. der großen Lagerhalle (Abbildung 47) und danach die ca. 1 km nordöstl. gelegene Wasserschutzzone 1 (ca. 70 m südöstl. des Brunnens). Die Termine der Probenahmen, der jeweils letzten Düngung und die Lage der Entnahmestelle zeigt Tabelle 57.

Es ist zu vermerken, dass die Halme nördl. der großen Lagerhalle zur Probenahme 2004 auch Düngespuren aufwiesen. Zudem wuchsen in etwa 5 m Entfernung Brennnesseln, was auf N-Reichtum im Boden hinweist und u.U. wegen der Nähe der Hallen auf Ablagerung von Tierkot und damit auf fäkale Kontamination zurückzuführen sein kann. Die Aussagekraft der Kontroll-Probe des Mai-Termins 2004 ist damit stark in Frage gestellt.

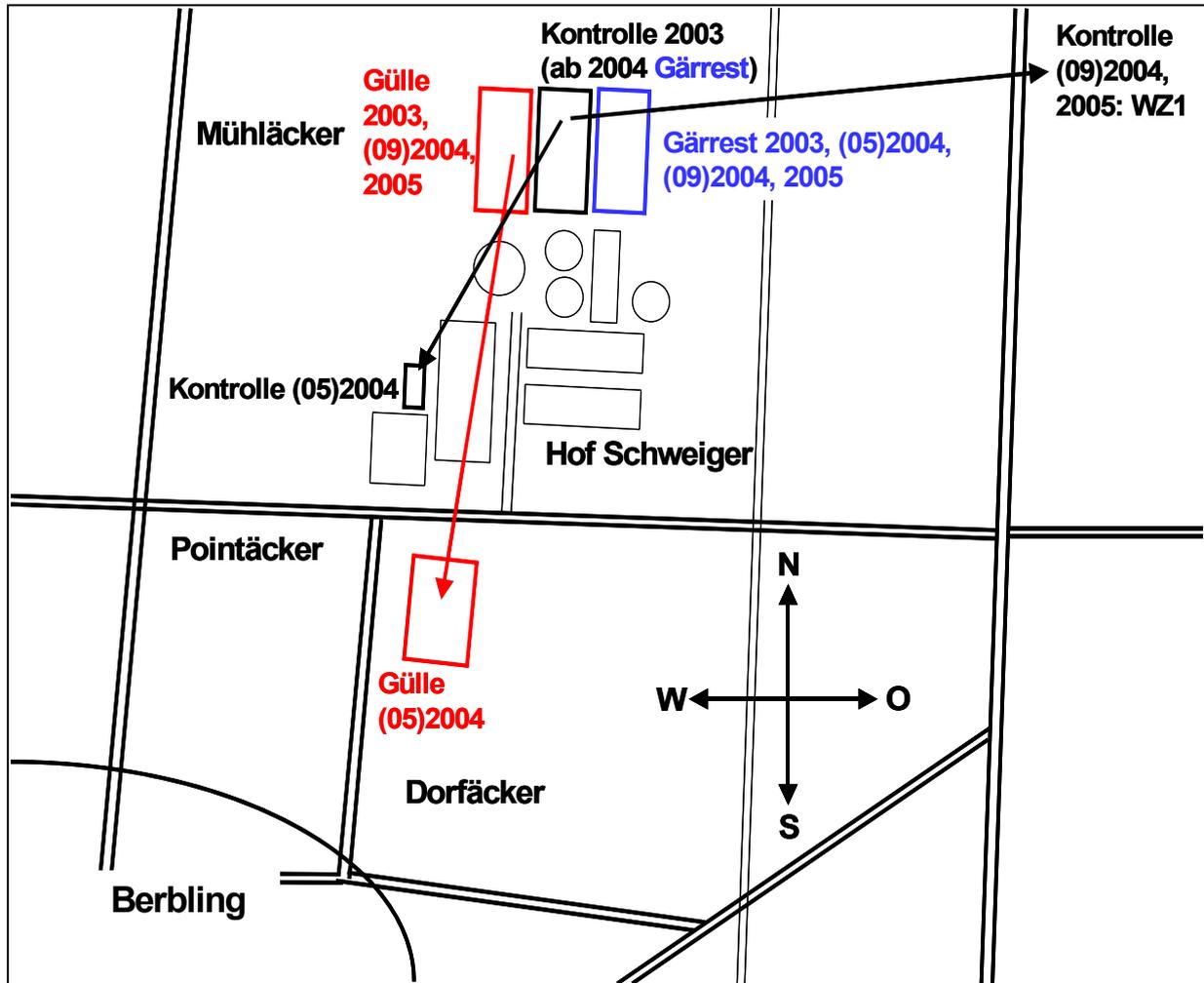


Abbildung 47: Lageplan der Versuchsfelder für die Bodenbeprobungen

Die pro Fläche ausgebrachte Gülle- und Gärrestmenge (Prallteller) betrug lt. Herrn Schweiger einheitlich  $12 \text{ m}^3 / \text{ha}$  und entsprach damit praxisüblichen Aufwandmengen. Pro Jahr wurde 5 mal geschnitten, wobei vor dem letzten Schnitt keine Gülle bzw. kein Gärrest gegeben wurde, und die Gülle lt. Herrn Schweiger vor einem Schnitt in der Hochsaison 1 + 1 verdünnt war. Da die Gärrest-Düngung 2003 wohl in Verbindung mit der trockenen und heißen Witterung Verätzungen des Gras-Bewuchses zur Folge hatte, verdünnte Herr Schweiger zu heiß-trockenen Hochsaison-Terminen das Endlager ebenfalls 1 + 1, woraufhin kaum oder keine Verätzungen mehr auftraten.

Die 4 untersuchten Berblinger Standorte waren sehr einheitlich im Profilaufbau und der Horizontierung (Parabraunerde-Pseudogley). Einem etwa 15 – 20 cm mächtigen  $A_h$ - folgte ein 20 – 25 cm starker  $A_h B_v$ -Horizont. Darunter befand sich ein typisches, etwa 20 – 40 cm mächtiges, kompaktes Schlufflehmband. Darunter, im Bereich 80 – 100 cm Bodentiefe, stieß das Ausgangssubstrat, Geschiebemergel, an.

Tabelle 57: Termine der Probenahmen und jeweils letzten Düngung für die Versuchsvarianten mit Lage der Entnahmestellen

Variante	Probenahme	letzte Düngung	Lage
Kontrolle	23.4.2003	28.3.2003 (vor 4 Wo.)	Kontroll-Plot Mühläcker
	<i>19.5.2004</i>	<i>unsicher (siehe Text)</i>	<i>Mühläcker nahe Masch.-Halle</i>
	20.9.2004	-	WZ I
	25.4.2005	-	WZ I
Gülle-Düngung	23.4.2003	28.3.2003 (vor 4 Wo.)	Gülle-Plot Mühläcker
	<i>19.5.2004</i>	<i>15.5.2004 (vor 1 Wo.)</i>	<i>Dorfäcker</i>
	20.9.2004	27.8.2004 (vor 3,5 Wo.)	Gülle-Plot Mühläcker
	25.4.2005	23.3.2005 (vor 4,5 Wo.)	Gülle-Plot Mühläcker
Gärrest-Düngung	23.4.2003	28.3.2003 (vor 4 Wo.)	Gärrest-Plot Mühläcker
	<i>19.5.2004</i>	<i>10.5.2004 (vor 1 Wo.)</i>	<i>Gärrest-Plot Mühläcker</i>
	20.9.2004	27.8.2004 (vor 3,5 Wo.)	Gärrest-Plot Mühläcker
	25.4.2005	23.3.2005 (vor 4,5 Wo.)	Gärrest-Plot Mühläcker

Kursive Einträge bezeichnen Probenahmen mit Unsicherheiten, vermutlich nicht repräsentativ für die Variante

#### B 2.1.2.2 Lysimeter Oberschleißheim

Zum Termin April 2005 wurden von LfL-Agrarökologie zusätzliche Bodenproben von einem unbelasteten Lysimeter aus Oberschleißheim, gefüllt mit einer Bodensäule vom Standort Puch, als Null-Referenzen zur Verfügung gestellt und parallel mikrobiologisch untersucht. Der Boden des Lysimeters beherbergte keine größeren Bodentiere. Tabelle 58 zeigt bodenphysikalische und -chemische Kennwerte der obersten (0 - 10 cm) Bodenlage des Lysimeters.

#### B 2.1.2.3 Bayerische Grünlandstandorte

Ebenfalls zum Termin April 2005 wurden von LfL-Agrarökologie Bodenproben verschiedener bayerischer landwirtschaftlich genutzter Wiesenböden aus dem Dauerbeobachtungsprogramm der LfL als Referenzen zur Verfügung gestellt. Anhand dieser Proben sollten erste Anhaltspunkte zur Variabilität der Belastung durch *Clostridium perfringens* durch die Landwirtschaft gewonnen werden.

Es handelte sich um einen Oberbayerischen Standort (Grünland 1), einen aus der Oberpfalz/Niederbayern (Grünland 2), einen aus Franken (Grünland 3) und einen aus Schwaben (Grünland 4). Tabelle 58 zeigt bodenphysikalische und -chemische Kennwerte der obersten (0 - 10 cm) Bodenlage dieser Wiesenböden.

Die Nährstoffrückführung erfolgte für die Flächen unterschiedlich (HENKELMANN, persönl. Mitteilg.), Grünland 1 gehört zu einem Betrieb mit Stall-/Wanderschafhaltung (Tiere ca. alle 3 Jahre auf der Fläche), der das Heu nur als Futter verwendet, aber keine Gülle hat. Auf den Standorten Grünland 2 und 3 wurde im Herbst 2004 Gülle und auf Standort Grünland 4 im Herbst 2004 Festmist ausgebracht. Die Probenahme erfolgte Anfang April noch vor der ersten Begüllung (Standorte Grünland 2 - 4).

Tabelle 58: Bodenphysikalische und -chemische Kennwerte der obersten (0 - 10 cm) Bodenlage des Lysimeters und der Bayerischen Wiesenstandorte

Standort	Bodenart	Hauptbodenart	Ton (Masse %)	Schluff (Masse %)	Sand (Masse %)	Rohdichte tr. (g / cm <sup>3</sup> )	pH	Kohlenstoffgehalt (%)
Lysimeter	Lu	U	19,6	58,0	22,4	1,45	5,8	1,86
Grünland 1	Ut4	U	17,7	70,6	11,7	1,49	5,3	1,69
Grünland 2	Ls3	L	24,8	38,7	36,5	1,12	5,2	4,39
Grünland 3	Ls4	L	17,2	17,8	65	1,06	5,9	5,04
Grünland 4	Lt2	L	25,2	47,5	27,3	1,04	5,5	5,23

Daten nach HENKELMANN (persönl. Mitteilg). Bestimmung der Bodenart nach Humuszerstörung (4 Stechzylinder). Textur wurde im Profil bestimmt.

## B 2.2 Probenahme und -vorbehandlung

### B 2.2.1 Vorgrube- Fermenter- und Endlagerproben

Die mikrobiologischen Untersuchungen der Prozessketten (s. B 2.1.1) fanden im Zeitraum 21.6.2001 (erste Probenahme) - 10.2.2005 (letzte Probenahme) statt. Die Proben wurden jeweils aus der Vorgrube und den Kanistern sowie am Ablauf der untersuchten Fermenter bzw. Endlager nach Ablauf einiger Liter des Inhalts entnommen und in 250 oder 500 mL Polypropylenflaschen (fabrikneu oder gewaschen und desinfiziert) abgefüllt. Sie wurden unverzüglich gekühlt ins Labor transportiert und sofort oder nach höchstens 3-tägiger Lagerung bei 4°C weiter verarbeitet. Eine Bestimmung der Fäkalcoliformen und Coliformen ergab selbst nach 4-tägiger Lagerung bei 4°C keinen Unterschied zur sofort analysierten Probe. Erste Aktivitäts-Einbußen waren erst nach etwa 10 Tagen erkennbar (nicht dargestellt). Die Proben wurden mit einem zu Beginn und vor jedem Probenwechsel gewaschenen und desinfizierten Ultra-Turrax etwa 1 min. homogenisiert. Für die (selektiven) Kultivierungen wurden serielle Verdünnungsreihen in sterilem PBS (0.13 M NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 in Wasser) angesetzt. Die Bestimmungen wurden mit geeigneten Mengen der unverdünnten Probe und/oder der Verdünnungen durchgeführt. Die analysierten Parameter sind bei B 2.3.1 dargestellt.

### B 2.2.2 Bodenproben

Die mikrobiologischen Untersuchungen der Bodenproben fanden im Zeitraum 23.4.2003 (erste Probenahme) - 25.4.2005 (letzte Probenahme) statt. Allgemein waren die Berblingler Flächen (s. B 2.1.2.1) zu allen Terminen von Wühlmäusen befallen. Es ist damit generell für diese Flächen mit Makro-/Megaporenfluss zu rechnen, obwohl unklar ist, ob sich dieser durch das charakteristische Lehmband (s. B 2.1.2.1) fortsetzen konnte. Im Frühjahr 2003 war der Wühlmausbefall besonders stark. Es wurde generell versucht, keine Wühlmausgänge bei den Bohrungen zu treffen. Dies war allerdings technisch nicht auszuschließen, und die Variabilität der Ergebnisse für verschiedene mikrobielle Parameter wies darauf hin, dass solche Gänge mit Kotablagerungen bei den Bohrungen getroffen wurden (s. B 3.2.3, B 3.2.4, B 3.2.5). Die Böden aller untersuchter Standorte waren bei allen Probenahmen über das gesamte Profil gut durchfeuchtet. Bei guter Bodendurchfeuchtung erfolgt eine vertikale Keimverlagerung schneller als in trockeneren Böden (PALUSZAK et al., 2003). Die Probenahmetermine (Tabelle 57) waren in entsprechendem Abstand nach der Düngung gewählt, um vertikale Keimverlagerung zu ermöglichen.

In der WZ I wurden bei den Probenahmen Rehe in der Einzäunung bemerkt. Beim Überfliegen von Vögeln gelangte zuweilen auch Vogelkot auf Oberflächen.

Bei allen Arbeitsschritten wurde darauf geachtet, Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Die Berblinger Proben wurden mit einem Pürkhauer bis 1 m Bodentiefe manuell oder mit maschineller Unterstützung genommen, wobei der Pürkhauer vor jeder Probenahme gereinigt und vor jedem Plot-Wechsel mit 70 % Ethanol desinfiziert wurde. Zu jedem Termin wurden  $\geq 6$  Bohrungen pro Plot vorgenommen. Die Bodensäulen wurden mit einem gewaschenen und desinfizierten Messer in 6 Tiefenstufen (0 – 10 cm, 10 – 20 cm, 20 – 30 cm, 30 – 50 cm, 50 – 70 cm und 70 – 100 cm) unterteilt. Die einzelnen Tiefenstufen wurden zu Mischproben vereinigt, und Skelettmaterial wurde manuell entfernt. Nur am Herbsttermin 2004 wurden die Proben bei LfL-Agrarökologie maschinell vom Skelett befreit und danach gesiebt ( $< 2$  mm). Dies wurde aber wegen der relativ aufwändigen Waschung von Sieben und Bürsten und dem gleichzeitig sehr geringen Skelett- aber hohen Lehm- bzw. Schluffanteil (machte Siebung praktisch überflüssig, gestaltete aber die Vermeidung von Kontamination schwierig) nicht wiederholt.

Die Mischproben wurden in Plastiktüten verpackt, gekühlt schnell ins Labor gebracht und 1 – 3 Tage bei 4°C re-äquilibriert. Danach wurden sie unter Vermeidung von Sedimentation seriell in PBS verdünnt, wobei sie jeweils etwa 1 min heftig manuell geschüttelt wurden, um Aggregate zu lösen. Die Verdünnungsreihen und Frischboden wurden entweder sofort oder nach Lagerung bei 4°C (bis 2 Tage) mikrobiologisch untersucht.

Von Aliquots der frischen Mischproben wurden für jede Tiefenstufe die Trockengewichte bei Gewichtskonstanz bestimmt (48 h 105°C). Die pro g FB bestimmten Keimzahlen wurden auf g TB umgerechnet. Der Wassergehalt schwankte allgemein nur unwesentlich, weswegen sich die pro g FB und pro g TB erhaltenen Ergebnisse relativ zueinander nicht unterschieden.

Die von LfL-Agrarökologie zur Verfügung gestellten Bodenproben des Lysimeters (s. B 2.1.2.2) waren in 5 Tiefenstufen (0 – 10 cm, 10 – 20 cm, 20 – 30 cm, 30 – 40 cm und 40 – 50 cm) unterteilt und wurden analog den Berblinger Bodenproben behandelt. Ebenso wurde mit den Referenzproben von den Wiesenstandorten (s. B 2.1.2.3) verfahren, die in 3 Tiefenstufen (0 - 10 cm, 10 - 20 cm, 20 - 30 cm) unterteilt waren.

## B 2.3 Mikrobiologische und molekularbiologische (qPCR) Untersuchungen

### B 2.3.1 Untersuchte Parameter

In Tabelle 59 sind die untersuchten physiologischen Gruppen und Mikroorganismen dargestellt.

Tabelle 59: Untersuchte mikrobiologische und virale Parameter

	Klassisch (v.a. Kultivierung)	(RT)qPCR
Routineuntersuchung	Coliforme	<i>Enterobacteriaceae</i>
	Fäkalcoliforme	<i>Escherichia coli</i>
	Intestinale Enterokokken	<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>E. faecium</i>
Sporadisch	Thermophile <i>Campylobacter</i>	Thermophile <i>Campylobacter</i> spp.: <i>Campylobacter jejuni</i> + <i>C. coli</i> + <i>C. lari</i> + <i>C. upsaliensis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> -Gruppe: <i>Bacillus cereus</i> + <i>B. thuringiensis</i> + <i>B. anthracis</i> + <i>B. mycoides</i>
	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

	Klassisch (v.a. Kultivierung)	(RT)qPCR
	<i>Cryptosporidium parvum</i> <sup>&amp;</sup> , ( <i>Giardia lamblia</i> <sup>%</sup> )	<i>C. parvum</i> [alle pv. außer 'dog'] + <i>C. hominis</i> + <i>C. meleagridis</i> + <i>C. wrairi</i>
	Rotaviren*	
	<i>Enterovirus</i> <sup>§</sup>	<i>Enterovirus</i> spp.
	<i>Norovirus</i> Gg1 <sup>§</sup> , Gg2 <sup>§</sup>	<i>Norovirus</i> Gg2

<sup>&</sup> nur in der Modellanlage und in Wasserbadversuchen, Infektiosität durch IPL, Exzystierung und Membranpermeabilität durch IPL und TUM-SWW; <sup>%</sup> nicht durchgeführt, s. Text; \* durch LGL über Enzym-Immunoassay; <sup>§</sup> durch LGL über RT-PCR

Die mikrobiologischen Untersuchungen gliederten sich in 2 Untersuchungsteile, in Verfahren mit (selektiver) Kultivierung bzw. etablierten Verfahren und in qPCR-Ansätze. Die einzelnen spezifischen Kultivierungs- bzw. etablierten und die qPCR-Ansätze wurden so gestaltet, dass die Zielgruppen weitestmöglich identisch und die Ergebnisse damit vergleichbar waren.

#### B 2.3.1.1 Berblinger Pilotanlage, Monitoring und Chargenversuche

Im Monitoring wurden für die Berblinger Pilotanlage (s. B 2.1.1.1) alle in Tabelle 59 genannten Parameter bestimmt (ausser Inaktivierungsparameter für *Cryptosporidium parvum*, <sup>&</sup> in Tabelle 59).

Die Chargenversuche (s. a. B 2.1.1.1) beinhalteten alle bakteriellen Parameter (Tabelle 59). Viren und Parasiten wurden in den Chargenversuchen nicht bestimmt, da sie bereits in der Gülle immer unter oder im Bereich der Nachweisgrenze lagen, und eine Vermehrung von Viren und Parasiten im Prozess ausgeschlossen werden kann.

Zu den Chargenversuchen ist anzumerken, dass versucht wurde, eine Gülle-Charge ausgehend vom Vorgruben-Material im Durchgang durch die Fermenterkette bis ins Endlager jeweils nach den mittleren hydraulischen Verweilzeiten (Tabelle 56) zu verfolgen. Die Überlegung dazu war, dass nach den hydraulischen Verweilzeiten > 95 % der jeweiligen Fermenterinhalt ausgetauscht waren und die Inhalte dann die des jeweils vorherigen Fermenters repräsentierten. Späteren Tracerexperimenten mit LiCl zufolge waren allerdings die Verweilzeiten im F2 deutlich kürzer als bei einem angenommenen Pfropfenstrom (Tabelle 56). Demnach sollte eine unvollständige Durchmischung aber kein echter Pfropfenstrom ("Kaskadenstrom") vorgelegen haben. In den Rührkesseln F1 und F3 wird das zugeführte Material bereits beim ersten Rühren voll durchmischt. Hier tritt bereits etwas Material der betrachteten Charge nach einem Beschickungs-/Entnahme-Intervall im folgenden Fermenter auf. Wegen der Vermischungs-Problematik kann also nur annähernd von einer Verfolgung einer Charge im Sinne einer Schwarz-Weiss-Trennung gesprochen werden. Für die keimreduzierende Wirkung der Fermenter(-Kette) ist allerdings die Fragestellung, ob wirklich eine bestimmte Charge verfolgt wurde, zumindest für das dritte Chargenexperiment (Beginn 15.3.2004, s. B 2.1.1.1) sekundär, da hier sowohl die Chargen vorher als auch die folgenden gleich behandelt waren.

#### B 2.3.1.2 Modellanlage, Keimträgerversuche, Wasserbadexperimente

In der Modellanlage (s. B 2.1.1.2) wurden ein Monitoring für Coliforme und Fäkalcoliforme durchgeführt.

In der Modellanlage fanden auch die Keimträgerversuche zur Bestimmung der Inaktivierung von *Cryptosporidium parvum* Oozysten statt. Dabei wurden Diffusions-Keimträger nach RAPP (1995) und KNIE et al. (2000) (Filter-Sandwich-Keimträger) aus Polycarbonat mit einem Volumen von 3 mL und 0,4 µm Membranfilter verwendet (s. B 2.3.2.7.2). Der Inhalt bestand aus *C. parvum* Oozysten vermengt mit Material jeweils aus den Kompartimenten der

Modellanlage (Vorgrube, F1, F2, F3, s. B 2.3.1.2). Damit konnten hohe Oozysten-Konzentrationen direkt den chemischen und physikalischen Einflüssen ausgesetzt und praktisch verlustfrei wiedergewonnen werden (s. B 2.3.2.7.2).

Zur Absicherung der Keimträgerversuche wurden durch IPL Wasserbad-Experimente mit reinen Oozysten-Suspensionen durchgeführt (s. B 2.3.2.7).

#### B 2.3.1.3 Modell-Endlagerversuch

Im Modell-Endlagerversuch (s. B 2.1.1.3) wurden Coliforme und Fäkalcoliforme bestimmt, da sie am schnellsten mit Wiederverkeimung reagierten (s. B 3.1.1, B 3.1.2).

#### B 2.3.1.4 Bodenproben

Für alle Bodenproben wurden ausschließlich kultivierungsabhängige Verfahren eingesetzt, da sich im Projekt zeigte, dass die qPCR-Verfahren mit DNA als Zielmolekül lebensfähige Keimzahlen z.T. gravierend überschätzten. Die Berblinger Bodenproben (s. B 2.1.2.1) wurden zunächst nur auf Coliforme, Fäkalcoliforme, Enterokokken und intestinale Enterokokken untersucht. Ab 2004 wurde zusätzlich auf *Clostridium perfringens* und 2005 zusätzlich auf *Bacillus cereus* untersucht, da diese Sporenbildner während des Biogasprozesses nicht oder nur marginal reduziert wurden.

Die 2005 hinzugekommenen Proben vom Lysimeter (s. B 2.1.2.2) wurden als zusätzliche Null-Referenz zusammen mit den Berblinger Proben auf dieselben Parameter hin untersucht.

Die 2005 hinzugekommenen Proben von den bayerischen Grünlandstandorten (s. B 2.1.2.3) dienten zur vorläufigen Einschätzung der Variabilität einer eventuellen landwirtschaftlichen Belastung durch *C. perfringens* und wurden daher auf diesen Parameter hin untersucht.

### **B 2.3.2 Kultivierungsabhängige Verfahren**

#### B 2.3.2.1 Coliforme und fäkalcoliforme Bakterien

Die Bestimmungen erfolgten über eine MPN-Methode (DE MAN, 1983) mit Fluorocult®-Laurylsulfat-Bouillon in Anlehnung an EG-Richtlinie 76/160/EWG (SCHINDLER, 1991). Die zu untersuchenden Proben (s. B 2.3.1) wurden mind. 30 s heftig geschüttelt und gevortext. Jeweils 3 x 1 mL der unverdünnten Suspension und geeigneter Verdünnungen (mindestens 3 Verdünnungsstufen) wurden sofort (zur Minimierung von Sedimentationseffekten) jeweils 9 mL Fluorocult®-Laurylsulfat-Bouillon zugesetzt, leicht gevortext und bei 37°C bebrütet.

Um Hinweise auf Präsenz sublethal geschädigter Zellen bzw. ABNC-Bildung (s. B 1.2.3) zu erhalten, wurde die konventionelle 24 h Bebrütung auf etwa 4 d ausgedehnt (Ablese nach 1 d, 2 d und ca. 4 d). Die Zahl der positiven Röhrchen erhöhte sich nämlich während der weiteren Inkubation z.T. noch deutlich (LEBUHN et al., 2005). Konstanz der Ergebnisse stellte sich etwa ab 4 d Bebrütung ein. Zu jedem Termin wurden coliforme Bakterien anhand Gasbildung im Durham-Röhrchen und Fäkalcoliforme über Fluoreszenz bei UV-Einstrahlung bestimmt. Anhand der positiven und negativen Röhrchen wurden jeweils die MPN bestimmt.

#### B 2.3.2.2 Intestinale und Gesamt-Enterokokken

Die Bestimmungen erfolgten nach ISO / DIS 7899-2. Ein mL geeigneter, mind. 30 s heftig geschüttelter und gevortexter Verdünnungen der Proben (s. B 2.3.1) (mind. 1 Wiederholung, mind. 2 Verdünnungsstufen) wurde sofort (vor Sedimentation) durch 0,45 µm Membranfilter (Sartorius 11406-50-ACN) Unterdruck-filtriert (Edelstahl-Filtationsanlage). Alles verwendete Material war sterilisiert oder desinfiziert. Nach jeder Filtrierung wurden die Trichterränder mehrfach mit 0,85 % KCl nachgespült, und vor jedem Probenwechsel wurden Trichter und Fritten erneut desinfiziert und abgeflammt. Bei den Bodenproben enthielten die beprobten Verdünnungen vorzugsweise die Stufe 10<sup>-1</sup>, da die Ergebnisse vermuten liessen, dass die Enterokokken sehr fest mit Ton-Humuskomplexen assoziiert waren (vgl. KAGAWA, 1971) und aus stärkerer Verdünnung daher unterbestimmt wurden.

Gesamt-Enterokokken wurden nach 48 h Kultivierung (feuchte Atmosphäre) des Filtrats bei 44°C auf m-Enterokokken- (bzw. Slanetz-Bartley-) Agar gezählt. Dabei wurden alle (auch pinpoint) rosa- bis braunroten Kolonien berücksichtigt. Die Bestimmung der Gesamt-Enterokokken erwies sich als problematisch (s. B 3.1.3) und kann daher nicht für die Routine empfohlen werden. Intestinale Enterokokken wurden nach weiterer 2 h Bebrütung der Filter auf vorgewärmtem Äsculin-Agar anhand deutlicher Schwarzfärbung im Agar gezählt. Typischerweise waren dies 0,5 – 1 mm große dunkel- bis braunrote Kolonien.

#### B 2.3.2.3 Thermophile *Campylobacter*

In Vorversuchen zeigte sich, dass eine direkte Plattierung von Gülle auf mCCDA-Agar (modifizierter CCDA-Preston-Agar, Oxoid CM0739+SR0155) Inkubation mikroaerob 2 d bei 42°C, s.u.) nicht genügend selektiv war, da sich eine zu starke Hintergrund-Mikroflora einstellte. Es wurde daher eine selektive Anreicherung vorgeschaltet und auf eine MPN-Strategie (s. B 2.3.2.1) mit Nachweis über qPCR zurückgegriffen. Der Nachweis über qPCR erwies sich dabei im Test von 23 *Campylobacter*-Referenzstämmen als wesentlich geeigneter als der konventionelle Test über Gram-Färbung (nicht dargestellt). Die Zusammensetzung des Anreicherungs-Mediums wurde für Gülle optimiert. Dabei war ein selektives Preston *Campylobacter* Anreicherungsmedium (sPCA, Oxoid CM0067+SR0084+SR0117+SR0048) am effektivsten (nicht dargestellt). Zur Quantifizierung wurde dann folgendermaßen vorgegangen:

Jeweils 3 x 1 mL der unverdünnten Suspension und der Verdünnungen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  der Proben (s. B 2.2.1) wurden mind. 30 s heftig geschüttelt und gevortext und sofort (vor Sedimentation) jeweils 9 mL sPCA zugesetzt. Nach Vortexen wurden die Proben mikroaerob (Anaerocult C; 2,5 L anaerobic jar; Merck) 2 d bei 42°C bebrütet. Nach Vortexen wurden 100 µL Aliquots auf mCCDA ausplattiert, und die Platten mikroaerob 2 d bei 42°C bebrütet. Platten mit typischen Kolonien wurden nach qPCR-Bestätigung auf Vertreter der thermophilen *Campylobacter* spp. als positiv gewertet. Anhand der positiven und negativen Platten wurden die MPN bestimmt (s. B 2.3.3.2.3).

#### B 2.3.2.4 *Yersinia enterocolitica*

Auch für *Yersinia enterocolitica* zeigten Vorversuche, dass eine direkte Plattierung von Gülle auf CIN-Agar (Oxoid CM0653+SR0109, Bebrütung 24 h bei 32°C) wegen starker Entwicklung von Hintergrund-Mikroflora nicht möglich war. Hilfreich war eine vorgeschaltete selektive Anreicherung (24 h, 30°C in Ossmer-Bouillon (Merck 1.16701.0500)). Die Quantifizierung wurde damit ebenfalls über MPN-Bestimmung (s. B 2.3.2.3, B 2.3.3.2.3) vorgenommen.

Jeweils 3 x 1 mL der unverdünnten Suspension und der Verdünnungen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  der Proben (s. B 2.2.1) wurden mind. 30 s heftig geschüttelt und gevortext und sofort (vor Sedimentation) jeweils 9 mL Ossmer-Bouillon zugesetzt. Nach Vortexen wurden die Proben 24 h bei 30°C bebrütet. Nach Vortexen wurden 100 µL Aliquots auf CIN-Agar ausplattiert, und die Platten 24 h bei 32°C bebrütet. Platten mit typischen Kolonien wurden nach qPCR-Bestätigung auf *Y. enterocolitica* als positiv gewertet. Anhand der positiven und negativen Platten wurden die MPN bestimmt.

#### B 2.3.2.5 *Bacillus cereus* (-Gruppe)

*Bacillus cereus* (incl. *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*) wurde über selektive Plattierung von 100 µL geeigneter Verdünnungen der Proben (s. B 2.3.1) auf PEMB-Agar (PEMBA, Oxoid CM0617+SR0099+SR0047) mit mindestens 1 Wiederholung nach Herstellerangaben bestimmt (Zählung typischer Kolonien nach 24 h Inkubation bei 35°C und danach 24 h bei ca. 20°C).

Obwohl sich eine relativ starke Hintergrundflora entwickelte, ließen sich typische blaue Kolonien zumeist noch erkennen. Zufällig ausgewählte Kolonien verschiedener Platten

erwiesen sich im qPCR-Test (s. B 2.3.3.2) auf Vertreter der *B.-cereus*-Gruppe durchwegs als positiv (Kolonien der Hintergrund-Mikroflora immer als negativ). Wegen der schwärmenden Kolonie-Wuchsform und des häufigen Überwuchses durch Hintergrund-Mikroflora war allerdings eine exakte Quantifizierung sehr schwierig. Die über Kultivierung ermittelten Werte für *B. cereus* müssen daher eher als Schätzungen betrachtet werden, sie entsprachen allerdings in der Größenordnung den direkten Bestimmungen aus den Proben über spezifische qPCR (s. B 3.1.6). Hier sind methodische Weiterentwicklungen wünschenswert.

#### B 2.3.2.6 *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* wurde im Koch'schen Plattengussverfahren in fluorogenem TSC-Agar (TSCF-Agar, Merck 1.11972.0500+1.00888.0001) bestimmt, da *C. perfringens*, insbesondere die Sporen, über Kultivierung in TSCF im Vergleich zu anderen Medien am spezifischsten nachgewiesen wurden, und gleichzeitig die Detektionseffizienz mit am höchsten war (ARAUJO et al., 2001; ARAUJO et al., 2004). Die Ergebnisse beinhalten Sporen + vegetative Zellen, da auf einen Abtötungsschritt vor der Inkubation verzichtet wurde.

1 mL geeigneter Verdünnungen der Proben (s. B 2.3.1) wurden mit jeweils mindestens einer Wiederholung in TSCF eingegossen und 24 h bei 44°C anaerob (Anaerocult A; 2,5 L anaerobic jar; Merck) bebrütet. Über einem UV-Tisch fluoreszierende, schwarz gefärbte Kolonien wurden als *C. perfringens* gezählt.

Als problematisch stellte sich heraus, dass teilweise zwischen Petrischale und Agar eine großflächige, wolkige Schwarzfärbung (bei Gasbildung teilweise leicht vom Boden abgehoben) mit starker Fluoreszenz des Rands auftrat, die eine Zählung der sonst typischen Kolonien unsicher machte. Die über Kultivierung ermittelten Werte für *C. perfringens* können daher vor allem bei den Bodenproben für den Probenahmetern Mai 2004, wo der Effekt besonders häufig auftrat, um ca. 1 log-Stufe überschätzt sein, da zu diesem Termin von der gefärbten Fläche auf die Anzahl der Kolonien geschlossen wurde. Zu den späteren Terminen wurden Platten mit 'Wolkigkeit' nicht ausgewertet, was durchwegs etwa 1 log-Stufe geringere Werte ergab. Eine Unterschätzung kann ausgeschlossen werden, da die TSCF-Werte für die Fermenterkette in der Größenordnung den direkten Bestimmungen über spezifische qPCR entsprachen. Methodische Weiterentwicklungen zur Verhinderung der angesprochenen Problematik sind wünschenswert.

#### B 2.3.2.7 *Cryptosporidium parvum*

*Cryptosporidium parvum* besteht aus 2 Genotypen mit unterschiedlicher Wirtsspezifität (ROBBEN and SIBLEY, 2004). Genotyp 1 scheint ausschließlich Primaten zu befallen und wurde in *C. hominis* umbenannt, während der 'bovine' Genotyp 2 sowohl für Menschen als auch teilweise für andere Wirte pathogen sein kann (ROBBEN and SIBLEY, 2004). In der hier präsentierten Arbeit wird der alte Species-Name *C. parvum* stellvertretend für *C. parvum* + *C. hominis* verwendet.

Die Untersuchungen erfolgten größtenteils im Rahmen eines Kooperationsvertrags mit IPL, das über die eingesetzten Methoden bereits berichtete (NAJDROWSKI et al., 2004; WACKWITZ, 2005). Es wurden Keimträger- und Wasserbad-Experimente durchgeführt. Die Gewinnung der Oozysten, die Reinigung sowie die Bestimmung der Infektiosität wurden von IPL übernommen. Die Parameter (Fähigkeit zur) Exzystierung und Membranpermeabilität wurden teilweise durch IPL und teilweise durch TUM-SWW bestimmt. TUM-SWW übernahm die Durchführung der Keimträgerexperimente sowie die Quantifizierungen über (RT)qPCR.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden durch IPL Wasserbadexperimente durchgeführt, in denen reine Oozysten-Suspensionen (definierte Mengen, in 2,5 mL Eppendorf-Cups) entsprechend den Vorgaben aus der Pilotanlage Temperaturen und Einwirkzeiten sowie relevanten Temperatur/Zeit-Kombinationen ausgesetzt wurden. Danach wurden die Aktivitätsparameter bestimmt.

### ***B 2.3.2.7.1 Reinigung der Oozysten über Kochsalzflotation (nach Passage)***

Der oozystenhaltige Kot von künstlich infizierten Rindern (Stamm IOWA) oder von wilden Infektionen wurde, falls notwendig, mit Wasser verdünnt, mit einem Küchenstab homogenisiert, durch ein Sieb passiert und zentrifugiert (2500 g, 10 min). Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest verworfen, das Sediment mit Ether gemischt und erneut zentrifugiert. Bis auf das Sediment wurde dann alles verworfen (Etherphase, Schmutzkuchen, wässrige Phase) und das erstere noch 2 - 3 mal mit Wasser gewaschen, bis kein Ethergeruch mehr feststellbar war. Zum Schluss wurde das Sediment mit kalter gesättigter Kochsalzlösung gemischt, mit kaltem dH<sub>2</sub>O überschichtet und 10 min bei 2300 g ungebremst zentrifugiert. Die Oozysten wurden dann an der Phasengrenze Salz-Wasser abgesaugt, in ein Gefäß mit Wasser überführt und noch mal zentrifugiert. Nach Bedarf wurde die Kochsalzflotation wiederholt. Zum Schluss wurden die Oozysten in PBS mit Zusatz von Penicillin (100 IE / mL), Streptomycin (50 µg / mL) und Amphotericin B (2,5 µg / mL) resuspendiert und gekühlt TUM-SWW für die Keimträgerexperimente (s. B 2.3.2.7.2) übersandt oder im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Kochsalzflotation wurde auch in den beiden ersten Keimträgerexperimenten (12 / 2003, 07 / 2004) zur Reinigung der Oozysten aus den Keimträgern eingesetzt. Wiederfindungsversuche zeigten aber, dass über diese Methode 50 - 90 % der Oozysten verloren wurden. Die Ergebnisse sprachen sogar dafür, dass die Methode für die lebende Fraktion der Oozysten selektiert (M. NAJDROWSKI, unveröffentlicht; s. B 3.1.8.2.2). In den folgenden Keimträgerexperimenten wurde daher eine Percoll-Gradientenzentrifugation (s. B 2.3.2.7.3) zur Reinigung der Keimträgerinhalte eingesetzt.

### ***B 2.3.2.7.2 Exposition in Diffusions-Keimträgern***

Definierte Mengen zuvor konzentrierter Oozysten (Bereich 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup>) wurden in den ersten beiden Keimträgerexperimenten (12 / 2003, 07 / 2004) mit Material jeweils aus den Kompartimenten der Modellanlage (Vorgrube, F1, F2, F3, s. B 2.3.1.2) vermengt, in 2,8 mL Diffusionskeimträger (Labor Dr. Rabe; 0,4 µm Membranfilter Millipore HTTP02500) eingefüllt, entsprechend der Substratherkunft im jeweiligen Kompartiment befestigt und den Versuchsbedingungen (entsprechend den gesicherten Verweilzeiten in den Fermentern, s. Tabelle 56, sowie relevanten Temperatur/Zeit-Kombinationen) ausgesetzt. Als Kontrollen dienten Varianten 4°C mit und ohne Gülle. Da sich vor allem in den mikroskopischen Analysen Probleme mit der Reinigung der Keimträger-Inhalte ergeben, wurden in den folgenden Keimträgerexperimenten Gülle und Fermentermaterial vor Oozysten-Zusatz abzentrifugiert (2500 g, 5 min), um partikuläres Material (ca. 10 %) zu entfernen aber das chemische Milieu und den osmotischen Druck beizubehalten. Die Sedimente wurden entfernt, die Oozysten den Überständen zugesetzt, und diese Suspensionen in den entsprechenden Kompartimenten der Modellanlage exponiert.

Die Keimträgerinhalte wurden nach den unterschiedlichen Behandlungen quantitativ wiedergewonnen (Spülung der Innenwände und Filter mit 0,85 % KCl), und die Suspensionen danach wieder auf 2,8 mL eingestellt. Etwa 2,5 mL der Proben wurden gekühlt per Express IPL zur weiteren Analyse zugesandt, der Rest wurde an TUM-SWW analysiert.

### ***B 2.3.2.7.3 Reinigung der Oozysten aus den Keimträgern über Percoll-Gradienten-Zentrifugation***

Am IPL wurden die Inhalte der Keimträger (mit den Oozysten) möglichst vollständig in ein Falcon-Röhrchen überführt. Es wurde in einem Röhrchen nach PEETERS und VILLACORTA (1995) ein Percollgradient aus 4 Schichten (jeweils ca. 2 - 2,5 mL) aufgebaut: unverdünntes Percoll (Dichte 1,13), 3:1-Gemisch Percoll-Wasser (Dichte 1,09), 7:13-Gemisch Percoll-Wasser (Dichte 1,05), 1:19-Gemisch Percoll-Wasser (Dichte 1,01 g / mL). Als oberste

Schicht wurde die oozystenhaltige Gülleflüssigkeit hineingegeben. Der Gradient wurde 15 min bei 650 g ungebremst zentrifugiert. Die Oozysten wurden an der Grenze zwischen den Phasen 1,09 und 1,05 abgesaugt und noch dreimal mit PBS gewaschen (1500 g, 10 min). Sie waren dann weitestgehend frei von Verunreinigungen.

Die Wiederfindungsrate über Percoll-Gradienten-Zentrifugation betrug mit Oozystenhaltigem Überstand (vgl. B 2.3.2.7.2) etwa 70 %. Die Methode war damit wesentlich besser geeignet als die Kochsalz-Flotation, die Oozysten repräsentativ für die folgenden physiologischen Untersuchungen aus den Keimträgern wiederzugewinnen.

#### **B 2.3.2.7.4 Zellkultur und Infektion in vitro**

Allgemein wird die Zellkultur (insbesondere die humane) gegenüber Tiermodellen bevorzugt, da die untere Infektivitätsschwelle eher der unteren Dosis für Infektiosität bei Menschen entspricht (ROSE et al., 2000). Die Ergebnisse für HCT-8-Zellen korrelierten auch gut mit dem CD-1-Maus-Modell (ROCHELLE, 2004). Die humanen Zellkulturen sind damit der geeignetste Standard zur Beurteilung der Infektiosität (zumindest) von Kryptosporidien.

Für die Infektionstests wurden adhärent wachsende HCT-8-Zellen (humane Adenocarcinomzellen, permanent) verwendet. Die Zellen wurden in T75-Flaschen in RPMI-1640-Medium mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat, 100 IE / mL und 100 µg / mL Streptomycin im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Alle 2 - 3 Tage wurden die Zellen subkultiviert: der Monolayer wurde mit PBS gewaschen, die Zellen bis zum Ablösen mit Trypsin/EDTA co-inkubiert, im frischen Medium resuspendiert. Etwa 1/5 Volumen wurde in eine neue Flasche überführt. Gleichzeitig mit der Passagierung wurden gegebenenfalls die Kulturen für die Infektionsversuche vorbereitet.

Die Zellen wurden in die Vertiefungen von LabTek Chamber Slides (4 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Vertiefung) eingesät und inkubiert, bis ein fast konfluenter Monolayer entstanden war (ca. 2 Tage). Unmittelbar vor der Infektion wurde das Medium gegen ein Exzystierungsmedium (RPMI-1640 mit 0,4 % Natriumtaurocholat) ausgetauscht. Die Oozysten wurden im Medium resuspendiert, in einer Neubauerkammer gezählt und auf eine Dichte von 10<sup>7</sup> pro mL eingestellt. Aus dieser Stammsuspension wurde durch 1:10 Verdünnung mit Medium eine Titrationsreihe hergestellt. Jeweils 100 µL dieser Suspension, entsprechend 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup> etc. Oozysten wurden auf die Zellen gegeben. Nach 2 Stunden wurde das Exzystierungsmedium 1:3 mit frischem Medium verdünnt, und die Zellen weitere 24 h inkubiert.

Für die Zellkultur-Immunfluoreszenz (s. B 2.3.2.7.6) wurden die Oozysten vor der Infektion gebleicht (10 min 5%iges Na-Hypochlorit), da die Bleichung Vorversuchen zufolge eine etwa 2-fach intensivierte (vmtl. beschleunigte) Ausprägung der Infektionsherde (Foci) bewirkte, die Gesamtanzahl der gebildeten Foci pro Oozyst und die Detektionsgrenze allerdings nicht veränderte.

#### **B 2.3.2.7.5 Zellkultur-PCR**

Der hier beschriebene Zellkultur-PCR-Ansatz wurde nur in den ersten beiden Keimträger-Experimenten (12 / 2003, 07 / 2004) eingesetzt, danach war die von IPL zur Routineanalytik entwickelte Zellkultur-Immunfluoreszenz einsatzbereit.

Die infizierten Zellkulturen wurden mit Trypsin/EDTA bzw. Accutase (PAA Laboratories, Cölbe) abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt, mit PBS gewaschen und in 200 µL PBS resuspendiert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach Herstelleranweisung. 2,5 µL Extrakt wurden über PCR amplifiziert. Die Primer wurden von PETRY et al. (1998) veröffentlicht. Die PCR-Gemische (25 µL) hatten folgende Zusammensetzung: 14,8 µL Wasser; 2,5 µL 10-fach PCR-Puffer; 3,5 µL MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 3,5 mM); 0,5 µL dNTP-Mix (je 500 µM); je 0,5 µL Primer (400 µM); 0,2 µL Taq-Polymerase (1 U / Reaktion). Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten: initiale Denaturierung bei 94°C für 3 min, gefolgt von 35 Wiederholungen von Denaturierung

(94°C für 45 sec), Annealing (57°C für 45 sec) und Extension (72°C für 1 min), und einem letzten Extensionsschritt (10 min bei 72°C). Die Produkte wurden auf 1,5 % Agarosegel in TBE-Puffer aufgetrennt, mit EtBr gefärbt und auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Bei sichtbaren Banden korrekter Größe wurde die Infektiosität der im Infektiositätstest eingesetzten Verdünnung als positiv gewertet.

#### **B 2.3.2.7.6 Zellkultur-Immunfluoreszenz**

Der hier beschriebene Infektiositätstest über Zellkultur-Immunfluoreszenz konnte ab dem dritten Keimträger-Experiment (11 / 2004) eingesetzt werden.

Das Medium in den Vertiefungen wurde entfernt, und die Zellen 2 - 3 mal mit PBS gewaschen. Die Kammeraufteilung wurde abgenommen und die Zellkulturen in kaltem 70 % Methanol 10 min fixiert, 3 x 2 min mit PBS gewaschen und mit mAK-Lösung (monoklonale Primär-AK aus Maus, U. Mackenstedt, Univ. Hohenheim) überschichtet. Nach Inkubation für 45 min wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen (2 - 3 mal), mit dem Sekundär-AK (FITC-markiert, Sigma, F4143) überschichtet und erneut 45 min inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen erneut gewaschen, mit Überschichtungspuffer und Deckglas bedeckt, das Deckglas mit Nagellack fixiert, und die Kulturen unter dem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dazu wurden die Monolayer auf das Vorhandensein von grün fluoreszierenden Punkten („Foci“, entsprechen den intrazellulären Entwicklungsstadien von *C. parvum*) untersucht und je nach Menge dieser Entwicklungsstadien entweder 20 zufällig ausgewählte Bilder pro Vertiefung oder alle aufzufindenden Foci-Aggregate mit einer Digitalkamera aufgenommen. Die Fläche der Foci wurde mit einem Bildbearbeitungsprogramm bestimmt und auf das gesamte Well hochgerechnet. Die Anzahl der Foci ergab sich durch die Teilung der gesamten Foci-Fläche durch die Fläche eines einzelnen Focus (durchschnittlicher Durchmesser 4 µm). Die Reduktion der Infektiosität ergab sich durch Vergleich der Foci-Flächen aus der Infektion der Zellen mit behandelten Oozysten und aus der Infektion mit vitalen Kontroll-Oozysten.

#### **B 2.3.2.7.7 (Fähigkeit zur) Exzystierung**

Die Oozysten wurden im Medium RPMI-1640 (s. B 2.3.2.7.4) mit 0,8 % Natriumtaurocholat resuspendiert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension im Eisbad gekühlt, gut gemischt und ein Tropfen auf einem Glasobjektträger mit Phasenkontrast mikroskopiert. Es wurden mindestens 100 Oozysten ausgezählt und dabei die intakten, nicht exzystierten von den exzystierten differenziert. Die Exzystierungsrate ergab sich als Quotient aus der Anzahl der exzystierten Oozysten und der Summe aller (exzystierter und intakter) Oozysten, multipliziert mit 100 %.

#### **B 2.3.2.7.8 Membranintegrität (Vitalfärbung)**

Die Oozysten wurden in 100 µL HBSS oder PBS resuspendiert, und jeweils 10 µL DAPI- und PI-Stammlösung (2 mg / mL in Methanol bzw. 1 mg / mL in 0,1 M PBS) wurden zugegeben. Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, danach die Oozysten 2 mal mit HBSS (PBS) gewaschen. Die gefärbten Oozysten wurden im Epifluoreszenz-Modus mikroskopiert und dabei mindestens 100 Oozysten gezählt und nach Farbstoffaufnahme differenziert (DAPI-positive blau, PI-positive rot). Die PI-positiven wurden als tot eingestuft, die ausschließlich DAPI-positiven als vital.

#### **B 2.3.2.8 Giardia duodenalis**

Auf die ursprünglich im Antrag vorgesehene (sporadische) Bestimmung von *Giardia lamblia* (bzw. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*, % in Tabelle 59) wurde in Absprache mit LGL (Dr. Schindler) und LfW (Dr. Herb) verzichtet, da die Resistenz von *G. duodenalis* und *C. parvum* gegenüber äusseren Einflüssen praktisch identisch ist (BETANCOURT and ROSE, 2004), und

damit bezüglich der Hygienisierungseffizienz keine Unterschiede zu erwarten waren. Der Aufwand, ein geeignetes Zellkultursystem für Giardien zu etablieren, hätte in keinem Verhältnis zum zu erwartenden Ergebnis gestanden. Die für *C. parvum* erhaltenen Ergebnisse bzgl. Verminderung der Infektiosität können BETANCOURT und ROSE (2004) zufolge stellvertretend in erster Näherung auch für Giardien angenommen werden.

#### B 2.3.2.9 Rotaviren

Humane Rotaviren wurden für die Berblinger Biogasanlage (incl. Vorgrube, Endlager, s. B 2.1.1.1) durch LGL bestimmt. Nach Homogenisierung der Proben wurde das Rotavirus-Antigen über den bei LGL (Dr. Bayer) etablierten und routinemäßig durchgeführten Enzym-Immunoassay (EIA) nachgewiesen.

Da über EIA sowohl infektiöse als auch nicht-infektiöse Partikel nachgewiesen werden, bedeutet ein negatives Ergebnis, dass in den Proben kein Ziel-Antigen vorhanden war, oder die Konzentration unter der Nachweisgrenze lag.

#### B 2.3.2.10 Enterovirus

Für die Proben aus der Berblinger Biogasanlage (incl. Vorgrube, Endlager, s. B 2.1.1.1) wurden Viren der Gattung *Enterovirus* durch LGL (Dr. Bayer) bestimmt. Nach Homogenisierung der Proben wurde virale RNA mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) extrahiert und RNA von Enteroviren mit dem *RealArt*<sup>TM</sup> Enterovirus LC Kit (Artus) bestimmt. Laut Herstellerangaben erfasst der Test folgende Enteroviren:

Coxsackievirus: A7, 9, 16, 21, B1-6;

Echovirus: E2-5, 7, 9, 11-20, 24, 26, 27, 29, 30-32, 128;

Enterovirus: R1, 5666, 5865, 70, 71;

Poliovirus: 2, 3, sowie laut LGL Typ 1;

Sabin: 2, 3.

Parallel zum Nachweis durch LGL wurde an TUM-SWW ein RTqPCR-System für die Gattung *Enterovirus* entwickelt (PUSCH et al., 2005) und in Verbindung mit der optimierten RNA-Extraktion für Gülle und Fermentermaterial (s. B 2.3.3.1.2) für Proben der Berblinger Biogasanlage eingesetzt.

Da über RT(q)PCR RNA sowohl infektiöser als auch nicht-infektiöser Partikel (quantitativ) nachgewiesen wird, bedeutet ein negatives Ergebnis, dass in den Proben keine Ziel-RNA vorhanden war, oder ihre Konzentration unter der Nachweisgrenze lag. Über den Anteil (nach einer Behandlung eventuell verbleibender) infektiöser Partikel in einer positiven Probe kann keine Aussage gemacht werden.

#### B 2.3.2.11 Norovirus

Für die Proben aus der Berblinger Biogasanlage (incl. Vorgrube, Endlager, s. B 2.1.1.1) wurden Viren der Gattung *Norovirus* durch LGL (Dr. Bayer) bestimmt. Nach Homogenisierung der Proben wurde virale RNA mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) extrahiert und RNA von *Norovirus* GgI sowie GgII über RTqPCR nach HÖHNE und SCHREIER (2004) nachgewiesen. Dabei wurden laut Dr. Bayer aktualisierte Primersequenzen (NV 192, NV 193, Sonde TM 7) verwendet.

Parallel zum Nachweis durch LGL wurde an TUM-SWW ein RTqPCR-System für die Genogruppe II von *Norovirus* entwickelt und in Verbindung mit der optimierten RNA-Extraktion für Gülle und Fermentermaterial (s. B 2.3.3.1.2) für Berblinger Proben eingesetzt.

Da über RT(q)PCR RNA sowohl infektiöser als auch nicht-infektiöser Partikel (quantitativ) nachgewiesen wird, bedeutet ein negatives Ergebnis, dass in den Proben keine Ziel-RNA vorhanden war, oder ihre Konzentration unter der Nachweisgrenze lag. Über den Anteil (nach einer Behandlung eventuell verbleibender) infektiöser Partikel in einer positiven Probe kann keine Aussage gemacht werden.

### **B 2.3.3 Molekularbiologische, (RT)qPCR basierte quantitative Nachweise**

Molekularbiologische, (RT)qPCR basierte quantitative Nachweise wurden für die Pilotanlage Berbling (s. B 2.1.1.1) im Rahmen des Monitorings und der Chargenversuche (s. B 2.3.1.1) durchgeführt, sowie für die Modellanlage zur Quantifizierung von *C. parvum* im Rahmen der Keimträgerexperimente (s. B 2.1.1.2, B 2.3.2.7). Die untersuchten Parameter sind in Tabelle 59 aufgelistet. Die Probenvorbehandlung erfolgte wie unter B 2.2.1 geschildert.

#### **B 2.3.3.1 Extraktion von Nukleinsäuren**

Zur Etablierung auch für die problematische Matrix Gülle geeigneter Nukleinsäure-Extraktionssysteme war ein erheblicher Arbeitsaufwand erforderlich, da zum einen Gülle hohe Konzentrationen der hochpotenten PCR-Inhibitoren Huminsäuren und -stoffe (TEBBE and VAHJEN, 1994; ZHOU et al., 1996) aufweist, und zum anderen Sporen und Dauerformen über chemisch-enzymatische Lyse nicht oder nur ungenügend aufgebrochen werden (s. B 1.2.3). Die Ergebnisse dieser Arbeiten mit den relevanten Beschreibungen der Techniken und Materialien wurden in einer Reihe von Veröffentlichungen und Mitteilungen publiziert (HUBER, 2002; LEBUHN, 2002; IHLE et al., 2003; LEBUHN, 2003; LEBUHN et al., 2003; GARCÉS-SANCHEZ et al., 2004a; GARCÉS-SANCHEZ et al., 2004b; LEBUHN et al., 2004a; LEBUHN et al., 2004b; GARCÉS et al., 2005; LEBUHN et al., 2005; PUSCH et al., 2005) und können wegen ihres großen Umfangs hier nicht im Detail dargestellt werden.

In der Essenz ging aus den vergleichenden Untersuchungen hervor, dass die meisten Nukleinsäure-Arten aus Umweltproben (incl. Gülle) am besten über GITC-Silica-Technologie extrahiert werden, für eukaryontische messenger-RNA (mRNA) eigneten sich paramagnetische, Oligo-dT-gekoppelte beads in Verbindung mit einem LiCl-Extraktionspuffer (Dynabeads, Dynal) bisher am besten. Für Bildner von Sporen und Dauerformen muss ein spezifisch adaptiertes physikalisches Zermahlen zwischen Glas/Keramik-Kügelchen (bead-beating, BB) der chemischen Extraktion vorgeschaltet werden, ein leichtes bead-beating erhöhte aber auch für sonst unproblematische Bakterien und Viren, wenn sie in komplexer Matrix (z.B. Gülle) vorlagen, die Extraktions-Effizienz.

Eine gute Extraktionseffizienz ist entscheidend, den angestrebten sensitiven Nachweis in den Proben zu erreichen. Die Extraktionseffizienz ist ein Teil der Methoden-Detektionseffizienz bzw. Wiederfindungsrate, die das Verhältnis von gemessenen zu gespikten (dotierten) Nukleinsäure-Kopien im Extrakt in Prozent wiedergibt. Die Detektionseffizienz (für DNA über qPCR-Analytik des Extrakts) war in den eigenen Analysen immer annähernd 100 % (nicht dargestellt). Es wurde eine mindestens 50 %ige Wiederfindungsrate angestrebt, was bedeutet, dass von 2 ursprünglich vorhandenen Nukleinsäure-Kopien mindestens eine nachgewiesen wird. Dies ist um so wichtiger, da nicht mehr als 40 - 50 mg Gülle in die gängigen Extraktionskits eingesetzt werden konnten, sonst wurde für den Extrakt (100 µL) PCR-Inhibierung erhalten (HUBER, 2002; LEBUHN, 2002). Um den Extrakt quantitativ zu erfassen, müssten 40 qPCR-Analysen (à 2,5 µL) durchgeführt werden. 25 Extraktionen à 40 qPCR-Analysen wären nötig, um bei 50 %iger Wiederfindungsrate eine Methoden-Detektionsgrenze von 1 - 2 Nukleinsäure-Kopien pro 1 mL Gülle zu erhalten. Dies unterstreicht die Bedeutung einer effektiven Homogenisierung bei Herstellung einer Mischprobe sowie einer repräsentativen Probenahme (LEBUHN, 2002).

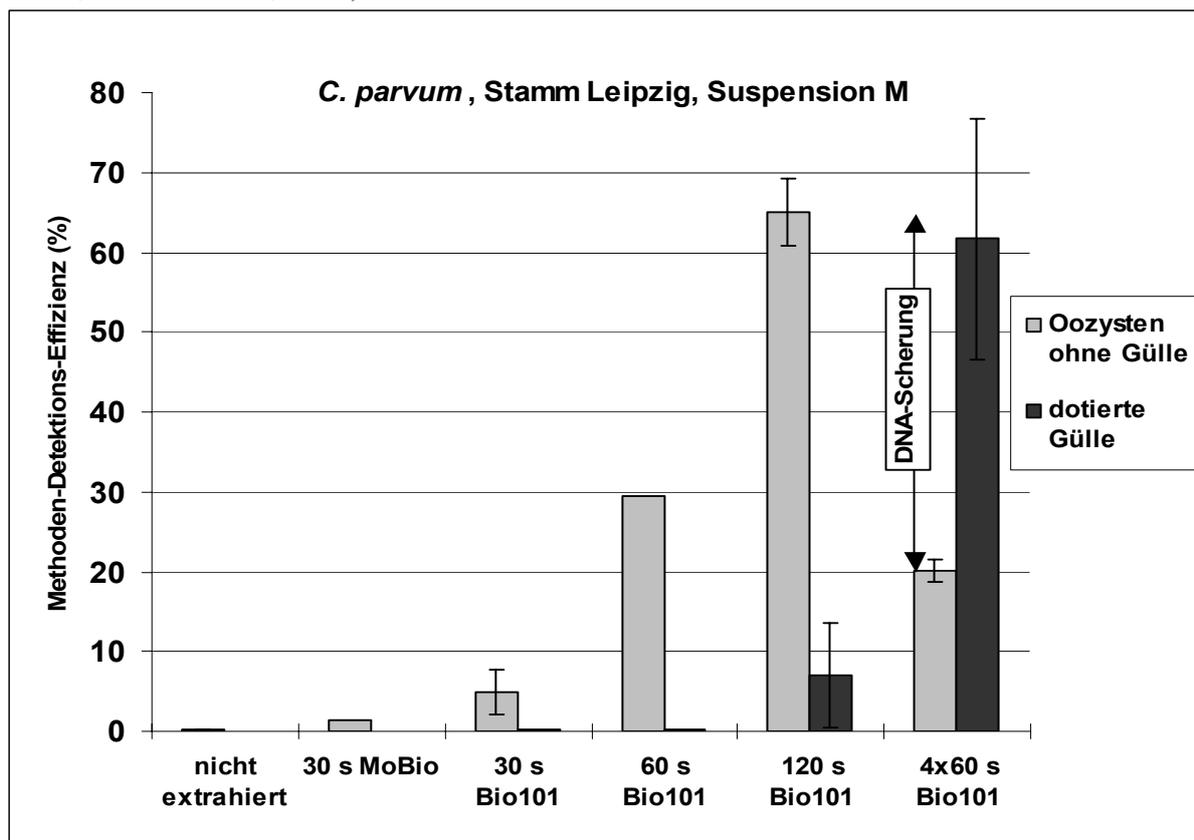
#### **B 2.3.3.1.1 *Extraktion von DNA***

Vier verschiedene, z.Zt. gebräuchliche und häufig empfohlene Systeme wurden hinsichtlich ihrer Eignung für Gülle vergleichend über *E.-coli*-qPCR untersucht: konventionelle Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI), QIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit von QIAGEN (QIA),

Ultra Clean™ Soil DNA Isolation Kit von MoBio Laboratories (MoBio, incl. 30 s vorgeschaltetes BB mit Vortex-Adapter),  
FastDNA® SPIN Kit for Soil von Bio 101 (Bio101, incl. 30 s vorgeschaltetes BB mit FastPrep 120, speed 4,5).

Mit der PCI-Methode konnte keine PCR-amplifizierbare DNA aus Gülle extrahiert werden. Von den drei Kits erwies sich das Bio101-System als am geeignetsten (kleinste Ct-Werte) und das QIA-System am wenigsten geeignet. In der Arbeit von Huber (2002) werden die Vergleiche ausführlich dargestellt. Dem BB vorgeschaltete Wasch-Schritte (1 x PBS, 2 x 0,85 % KCl) verbesserten die Amplifizierbarkeit des Extrakts wahrscheinlich durch Entfernung von PCR-inhibierenden Huminstoffen oder -säuren wesentlich, während andere Maßnahmen kaum effektiv waren (LEBUHN, 2003; LEBUHN et al., 2003).

Das modifizierte Bio101-System (mit den o.g. vorgeschalteten Waschschritten und 30 s BB, speed 4,5) wurde daher als Basis-Routinemethode verwendet, mit dem für die Parameter *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, thermophile *Campylobacter* spp. und *Yersinia enterocolitica* DNA-Wiederfindungsraten konsistent zwischen 70 – 90 % erzielt wurden. Für die Sporenbildner (*Bacillus cereus*-Gruppe, *Clostridium perfringens*) wurden allerdings geringere Ct-Werte (höhere DNA-Gehalte in den Extrakten) erzielt, wenn das BB verlängert und kumulativ gestaltet wurde, und für *C. parvum*-Oozysten waren die Wiederfindungsraten (Methoden-Detektions-Effizienz) aus gespikter Gülle drastisch verbessert (Abbildung 48, GARCÉS-SANCHEZ et al., 2004b; LEBUHN et al., 2004a; GARCÉS et al., 2005).



Zeiten auf der x-Achse: Längen und Intervalle des BB; MoBio, Bio 101: Extraktionskits, s.Text

Abbildung 48: Wiederfindungsraten für *Cryptosporidium parvum* Oozysten-DNA in Abhängigkeit verschiedener Extraktion

Mit einer kumulativen Extraktion mit 4-minütigem BB in Intervallen (30 + 90 + 120 s oder 4 x 60 s) ließen sich für *C. parvum*-Oozysten Wiederfindungsraten aus Gülle zwischen 60 – 90 % erzielen. Für reine *C. parvum*-Oozysten (Suspensionen ohne Gülle) war die

Wiederfindungsrate bei 4-minütigem BB wahrscheinlich infolge Scherung von DNA mangels Schutz durch die Gülle-Matrix wieder reduziert (Abbildung 48). Die guten Extraktionseffizienzen mit dem 4-minütigen kumulativen BB wurden allerdings nicht konsistent erzielt, zeitweise stellte sich in den Extrakten eine wahrscheinlich durch Glasabrieb verursachte Trübung (Glasmilch) ein. Glasmilch (Silika-Partikel) bindet bekanntermaßen DNA und verursachte wohl daher negative Ergebnisse (keine amplifizierbare DNA im Extrakt, nicht dargestellt). Hier besteht noch wesentlicher Optimierungs- bzw. Weiterentwicklungsbedarf.

#### **B 2.3.3.1.2 Extraktion von RNA (viral, eukaryontische mRNA)**

Zur Extraktion viraler RNA und eukaryontischer mRNA aus Gülle und Fermenterinhalt wurden unter Verwendung von 5'-Nuklease-Systemen für *Enterovirus*, *Norovirus* GgII und *Cryptosporidium parvum* (Tabelle 59) verschiedene Extraktionssysteme nach Herstellerempfehlung getestet:

RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (QIAGEN),

Strep Thermo-Fast<sup>®</sup> Plates (ABgene),

RNaid<sup>®</sup> Plus Kit with SPIN<sup>™</sup> (Bio 101),

QIAamp<sup>®</sup> MinElute<sup>™</sup> Virus Spin Kit (QIAGEN),

QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit (QIAGEN),

FastRNA<sup>®</sup> Pro Soil-Direct Kit (Bio 101),

Dynabeads<sup>®</sup> mRNA DIRECT<sup>™</sup> Kit (Dynal) (nur für *C. parvum*, incl. BB-Vorbehandlung der Probe und DNase-Behandlung des Extrakts).

Ausser für das FastRNA- und das Dynabeads-System lagen die Wiederfindungsraten für Gülle konsistent unter 5 %. Sie wurden auch durch DNeasy<sup>®</sup>-Nachreinigung der cDNA, Zusatz von T4-Gen-32-Protein, RNase H-Behandlung der cDNA sowie einer Reihe von Modifikationen nicht wesentlich verbessert. Deutlich bessere Wiederfindungsraten wurden mit allen getesteten Systemen für (gespikte) Abwasserproben erhalten (nicht dargestellt).

Die besten Wiederfindungsraten für virale RNA aus (gespikter) Gülle wurden mit etwa 20 % mit dem FastRNA-System erzielt, das daher, obwohl es relativ arbeitsaufwändig ist, als Standard-Methode an TUM-SWW etabliert wurde.

Die besten Ergebnisse für eukaryontische mRNA wurden mit dem Dynabeads-System und vorgeschaltetem 165 s (60 + 60 + 45 s) BB erhalten. Dabei wurde etwa um 2,7 log-Stufen mehr cDNA extrahiert als mit den anderen getesteten Systemen. Diese Ergebnisse wurden erst im April 2005 erzielt und konnten daher noch nicht in eine Routine-Methode innerhalb des Projekts umgesetzt werden. Auch für dieses System besteht noch Optimierungspotential (GARCÉS et al., 2005).

#### **B 2.3.3.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR), optional mit vorgeschalteter reverser Transkription (RTqPCR)**

Über (RT)qPCR können, sofern entsprechende Standards vorliegen und mitgemessen werden, für bestimmte Organismen(gruppen) spezifische Nukleinsäure-Sequenzen z.B. in Extrakten aus Umweltproben quantifiziert werden (HEID et al., 1996; LIE and PETROPOULOS, 1998; WILHELM and PINGOUD, 2003). (RT)qPCR hat gegenüber konventionellen Methoden eine Reihe entscheidender Vorteile (LEBUHN et al., 2003), allerdings muss man, insbesondere was die Quantifizierung von mRNA betrifft, ihre Anwendungs-Grenzen kennen (FREEMAN et al., 1999; BUSTIN and NOLAN, 2004; vgl. B 2.3.3.1).

#### **B 2.3.3.2.1 Phylogenetische (fluorogene) Primer und phylogenetische fluorogene Hydrolyse-Sonden**

Phylogenetische Primer und phylogenetische fluorogene Hydrolyse-Sonden (5'-6-FAM, TAMRA-3') bzw. LUX-Primer (NAZARENKO et al., 2002) für die in Tabelle 59 (in Spalte

(RT)qPCR) aufgeführten Organismen(gruppen) wurden mit Hilfe des Programms ‚Signature‘ (LEBUHN et al., 2005) entwickelt. Verwendet wurden prioritär für die Organismen(gruppen) relevante chromosomale Einzelkopie-Gene (Virulenzfaktoren, Haushaltsgene; LEBUHN, 2002), für breitere Gruppen wie *Enterobacteriaceae* und thermophile *Campylobacter* musste auf ribosomale DNA zurückgegriffen werden (Mittelwerte 6,4 bzw. 3 Operons pro Genom). Grundlage waren jeweils die aktuellsten Datenbankeinträge in EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>) bzw. GenBank, auf die über HUSAR (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>) zugegriffen wurde. Alle im Folgenden genannten Programm(pakete) sind in HUSAR implementiert. Sequenzen mit signifikanter lokaler oder overall-Ähnlichkeit wurden über BLASTN und FASTA gefunden und in CLUSTAL Alignments angeordnet, aus denen über Signature die für die Zielorganismen spezifischen und für 5'-Nuklease- bzw. LUX-Systeme geeigneten DNA-Bereiche identifiziert wurden.

Über BLASTN, FASTA und MatInspector (<http://www.genomatix.de/>) wurden die Primer- und Sondensequenzen gegen die gesamte EMBL-EBI (bzw. GenBank) Datenbank *in silico* getestet und bei dokumentierter Spezifität von Interaktiva (ThermoHybaid) synthetisiert. Aus Spezifitätsgründen wurden Längen angestrebt, die einen  $T_m > 60^\circ\text{C}$  ergaben. Die Systeme wurden dann *in vitro* gegen die an TUM-SWW verfügbare Stammsammlung (über 500 verschiedene relevante Bakterien, Viren und Parasiten) getestet. Für alle entwickelten Primer und Sonden waren die Ergebnisse spezifisch.

### B 2.3.3.2.2 (RT)qPCR

Sollte eine spezifische DNA Sequenz in Proben quantifiziert werden, wurden Aliquots der DNA-Extrakte (s. B 2.3.3.1.1) entsprechend aliquotierten Master-Mix-Portionen zugesetzt (Abbildung 49b) und die PCR gestartet (Kontrolle mit Wasser statt DNA). Diese wurde als 2-Schritt-Reaktion mit vorgeschalteter Aktivierung für die Platinum-*Taq*-Polymerase (Invitrogen) in Eppendorf twin.tec PCR Plates, semi-skirted, verschlossen mit ABI PRISM™ Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems), durchgeführt. Stringentes Annealing und Zusammensetzung des Master-Mix für die Anwendung mit Gülle-Extrakten waren zuvor auf annähernd 100 % PCR-Effizienz optimiert worden (HUBER, 2002; LEBUHN et al., 2003). Bei Einsatz von LUX-Primern wurde die Sonde durch Wasser ersetzt.

auf Eis!	x Ansätze		Endkonz. (nm)		x Ansätze		Endkonz. (nm)
	1 Ansatz (µL)	4,5			1 Ansatz (µL)	27	
Puffer (5x, enth. 40 mM MgCl <sub>2</sub> )	5	22,5	1x (8 mM Mg)	Puffer (10x, ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5	67,5	1x
RNase Inhibitor (40 u / µL)	1,25	5,625	50 u	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6	162	6 mM
dNTPs (10 mM each)	2,5	11,25	1 mM	dNTPs (10 mM each)	0,5	13,5	200 µM
rev.-Primer (10 µM)	1,25	5,625	1000	forw.-Primer (10 µM)	1,5	40,5	600
DTT (100µM)	1,25	5,625	5000	rev.-Primer (10 µM)	1,5	40,5	600
ThermoScript-RT (15 u / µL)	0,625	2,8125	9,375 u	Sonde (10 µM)	0,75	20,25	300
H <sub>2</sub> O (=ad Master-Mix Vol.)	8,125	36,5625		Rox (100 µM)	0,25	6,75	1000
Master-Mix	20	90		Platinum- <i>Taq</i> -Pol. (5 u / µL)	0,15	4,05	0,75 u
RNA	5	22,5		H <sub>2</sub> O (=ad Master-Mix Volumen)	9,35	252,45	
Ges.-Vol.	25	112,5		Master-Mix	22,5	607,5	
				DNA	2,5	67,5	
				Reaktions-Volumen	25	675	

A: Typischer Master-Mix für die RT

B: Typischer Master-Mix für die qPCR

Abbildung 49: Typische Ansätze für die (RT)qPCR

Sollte eine spezifische (m)RNA Sequenz in Proben quantifiziert werden, wurden Aliquots der RNA-Extrakte (s. B 2.3.3.1.2) zunächst mit DNase (Turbo DNA-*free*™ DNase, Ambion) behandelt (Kontrolle ohne DNase-Behandlung), entsprechend aliquotierten Master-Mix-Portionen zugesetzt (Abbildung 49a) und die Reverse Transcription (ThermoScript™ RNase H Reverse Transcriptase, RT, Invitrogen) gestartet (Kontrollen ohne RT). Ein Aliquot der Reaktionsprodukte (cDNA) wurde dann wie oben beschrieben in die qPCR eingesetzt. Die

Vergleiche mit den Kontrollen zeigten in allen Fällen (annähernd) 100 % Effizienz der DNase-Behandlung. Eventuelle Rest-DNA-Spuren wurden als Background von den spezifischen Signalen subtrahiert. Zugabe von T4-Gen-32-Protein zur RT und eine RNase H-Behandlung (Ambion) nach der RT ergaben keine Verbesserung der cDNA-Ausbeute (nicht dargestellt).

Jede Messung in der qPCR wurde als Triplikat im AB5700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurden die Ct-Werte bestimmt, die Kreuzungspunkte der exponentiellen Amplifikations-Kurven mit der Basislinie (Threshold). Bei der RTqPCR wurden die erhaltenen Ct-Werte um 1 reduziert, da die einzelsträngige (ss-)cDNA im ersten Zyklus lediglich zur ds-cDNA komplementarisiert wird, und 2 DNA-Stränge zur exponentiellen Amplifikation erforderlich sind.

#### ***B 2.3.3.2.3 Standard Spiking von Umweltproben und Quantifizierung***

Für MPN-Ansätze (s. B 2.3.2.3, B 2.3.2.4) wurde der Extrakt seriell verdünnt, Triplikate der Verdünnungen in die qPCR (s. B 2.3.3.2.2) eingesetzt, und aus geeigneten Verdünnungen die MPN bestimmt (DE MAN, 1983).

Zur exakten Quantifizierung der Ziel-DNA-Sequenzen und damit der Zielorganismen (tote und lebende, Anzahl der Kopien pro Zelle bekannt, s. B 2.3.3.2.1) in den zu untersuchenden Proben wurde ein Standard-Spiking (Dotierung verschiedener, bekannter Mengen der Zielorganismen) -Verfahren entwickelt (HUBER, 2002; LEBUHN, 2002; LEBUHN, 2003; LEBUHN et al., 2003; LEBUHN et al., 2004b). Dazu wurden mindestens 4, typischerweise aber 5 - 6 Aliquots der homogenisierten Probe extrahiert. Davon waren 1 - 2 Proben ungespikt (endogene Gehalte), 1 - 2 Proben mit geringen (0,3 - 30) DNA-Kopien (zur Absicherung der endogenen Gehalte und Evaluierung von PCR-Inhibierung) dotiert und 2 - 4 Proben mit hohen Kopienzahlen gespikt (je nach endogenen Gehalten  $> 10^4$  -  $10^7$ ). Aus letzteren wurde im Ct - log[Kopien] - Diagramm die Steigung der Dotierungskurve ermittelt, über die sich wiederum in einem Iterationsansatz die unbekanntenen endogenen Gehalte berechnen ließen. Für diese Berechnung wurde neben einer grafischen Auswertung der Diagramme (HUBER, 2002) ein DOS-basiertes Command-Line-Programm entwickelt ("CeTe", LEBUHN et al., 2003; LEBUHN and MAJEWSKI, 2005). Beide Datensätze flossen in die vergleichenden Analysen der Proben der Berblinger Pilot- (s. B 2.3.1.1) und der Modellanlage (s. B 2.3.1.2) ein.

Um Effekte eventueller PCR-Inhibierung oder unterschiedlicher Amplifikation von Ziel- und Referenzgen auszuschließen, ist ein solcher Standard-Spiking-Ansatz mit Dotierung der zu analysierenden Zielorganismen in bekannten Konzentrationen unerlässlich. Im Standard-Spiking-Verfahren betreffen alle Einflüsse, die nach Zugabe des Spike zur homogenisierten Probe auf diese einwirken, Spike und endogen vorhandene Mikroorganismen gleichermaßen. Die Berechnung anhand des Spike ist damit Behandlungs-unabhängig. Obwohl die Methode relativ aufwändig ist und für jede Probe einzeln durchgeführt werden muss, ist sie der einzige verlässliche Ansatz zur Quantifizierung in Proben, wenn mit in der Wirkung schwer abschätzbaren Einflüssen auf die Extraktions und/oder Analyse-Prozedur gerechnet werden muss.

## B 3 Ergebnisse und Diskussion

### B 3.1 Pilotanlage Berbling

Versuchsanlage und Probenahmepunkte sind bei B 2.1.1 beschrieben, Näheres zu Probenahme und -aufbereitung bei B 2.2.1. Es wurden Monitoring- und teilweise Chargenversuche durchgeführt (s. B 2.3.1.1). Das Wärmemanagement der Berblinger Anlage war bis Mitte Februar 2004 mit Temperaturen im thermophilen F2 teilweise bis 48°C suboptimal, während danach konstant 55°C gehalten werden konnten (s. B 2.1.1.1). Entsprechend sind die bis Mitte Februar 2004 erhaltenen Ergebnisse als "worst-case scenario", die folgenden dagegen für Regelbetrieb einzustufen. Die Zäsur Mitte Februar betraf sowohl das Monitoring als auch die Chargenversuche. Ab Anfang März 2005 wurde der erste mesophile Fermenter F1 psychrophil betrieben (s. B 2.1.1.1).

#### B 3.1.1 Fäkalcoliforme (Keimzahlen) und *Escherichia coli* (DNA)

Die Fäkalcoliformen-Keimzahlen wurden über das Fluorocult®-MPN-Verfahren (s. B 2.3.2.1), die *E. coli*-DNA-Kopien über Standard-Spiking qPCR (s. B 2.3.3.2.3) bestimmt.

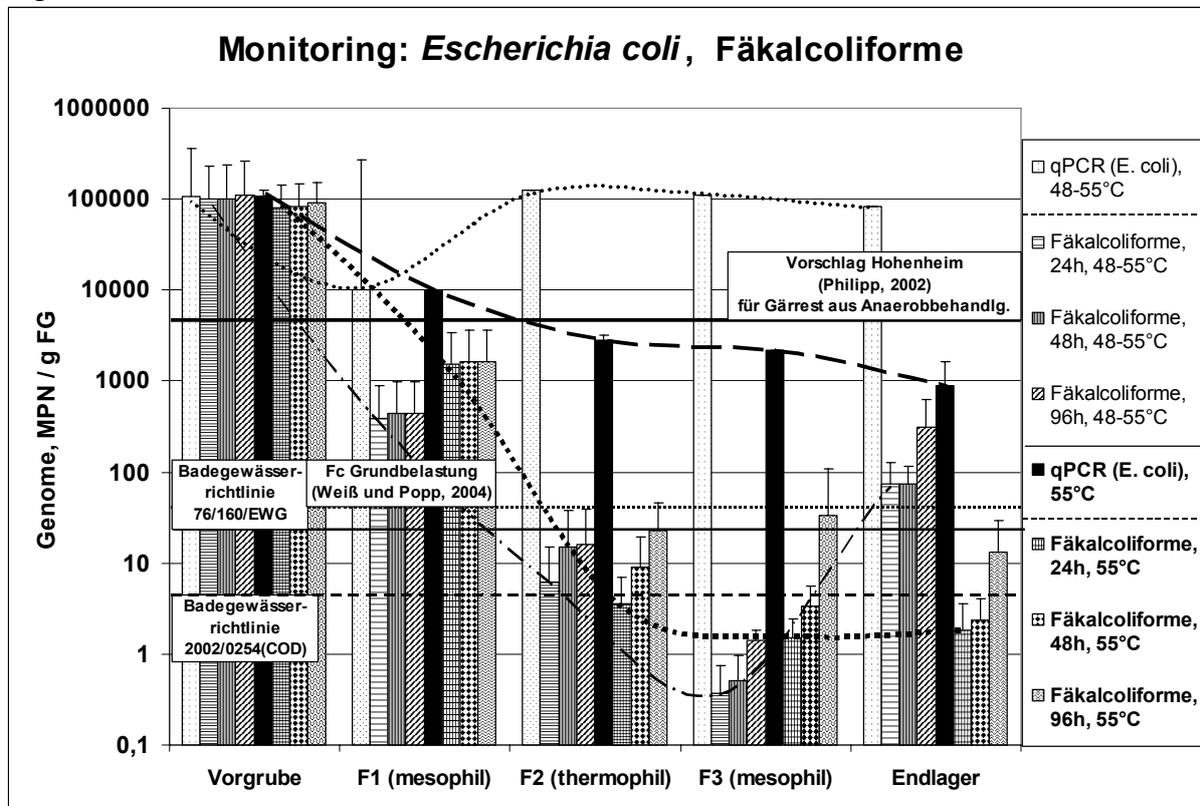
##### B 3.1.1.1 Monitoring Pilotanlage Berbling

Abbildung 50 zeigt die Monitoring-Ergebnisse für die MPN der Fäkalcoliformen und die Anzahl *E. coli*-DNA-Genome in den Kompartimenten der Berblinger Pilotanlage.

Während die Fäkalcoliformen in der Fermenterkette stark sanken und lediglich bei 48 - 55°C, nicht aber bei gesicherten 55°C im F2 im Endlager wieder zunahm, nahm die Anzahl der *E. coli* DNA-Kopien ausgehend vom gleichen, über das Fluorocult®-System bestimmten Ausgangsniveau nicht oder nur unerheblich ab (Abbildung 50). Dies weist einerseits auf hohe Spezifität beider Methoden hin, andererseits war Äquivalenz der Ergebnisse nur unter äquilibrierten Verhältnissen im Probenmaterial (hier Gülle in der Vorgrube) gegeben. Im Vorgrubenmaterial ist offenbar der Anteil abgestorbener Zellen, der über qPCR miterfasst wird (s. unten) vernachlässigbar. Bei zunehmender Temperatur unter den Vergärungsverhältnissen öffnete sich die Schere der Ergebnisse aus beiden Methoden, wobei über qPCR offenbar der Anteil abgestorbener Zellen miterfasst wird. Die nur leichte Abnahme der *E. coli*-DNA ist wohl auf einen entsprechend geringen Abbau der DNA zurückzuführen. LEBUHN et al. (2004b) zeigten, dass *Enterobacteriaceae*-DNA selbst 3 Tage nach Autoklavieren und 15 min UV-Bestrahlung noch in fast unveränderter Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Frischgülle-Probe nachzuweisen war, während bereits nach Autoklavieren keine coliformen Zellen mehr kultivierbar waren. Aufgrund der erheblichen Überschätzung der Lebendkeimzahlen ist die qPCR-Methode mit DNA als Zielmolekül nicht geeignet, lebende Zellen nach (partiell) lethalem Stress-Einfluss zu quantifizieren.

Andererseits scheint die Fluorocult®-Methode nach Stress-Einwirkung lebende Zellen zu unterschätzen, wie die ca. eine log-Stufe starke Zunahme der MPN für Fäkalcoliforme in den Fermentern F2 und F3 und im Endlager bei 4 Tagen Bebrütung gegenüber konventionell durchgeführter 1-tägiger Bebrütung nahelegt (Abbildung 50, Abbildung 51). Offenbar bewirkten die anaerobe mesophile und die thermophile Behandlung nicht nur Absterben von *E. coli*, sondern auch Bildung von sublethal geschädigten bzw. ABNC-Zellen, deren tatsächliches Ausmaß allerdings unklar bleibt. Bemerkenswert ist auch, dass in den Fluorocult®-Röhrchen von Fermenter- und Endlager-Proben zuweilen Fluoreszenz ohne Gasbildung auftrat (nicht dargestellt). Dieses Phänomen kann Folge von Stressatmung (HEILMANN et al., 1993; HEILMANN et al., 1995) sein, wobei Reparatur-Metabolismus mit verstärkter Veratmung leicht metabolisierbaren Substrats die Vergärung komplett unterdrückt. Vermutlich konnte *E. coli* MUG nach der thermophilen Behandlung zunächst zum Reparatur-

Metabolismus über (Stress-)Atmung verwerten, während die Vergärung erst später während der Inkubation in Fluorocult® aktiv werden konnte. Es könnten auch andere, nicht-gasbildende aber MUG-spaltende Organismen, nach der Behandlung relativ zu *E. coli* stark zugenommen haben.



24h, 48h und 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. B 3.1). Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt und relevante Vorschläge, Richtlinien und Belastungsniveaus skizziert.

Abbildung 50: *Escherichia coli* (Genome) und Fäkalcoliforme, Pilotanlage Berbling, Monitoring

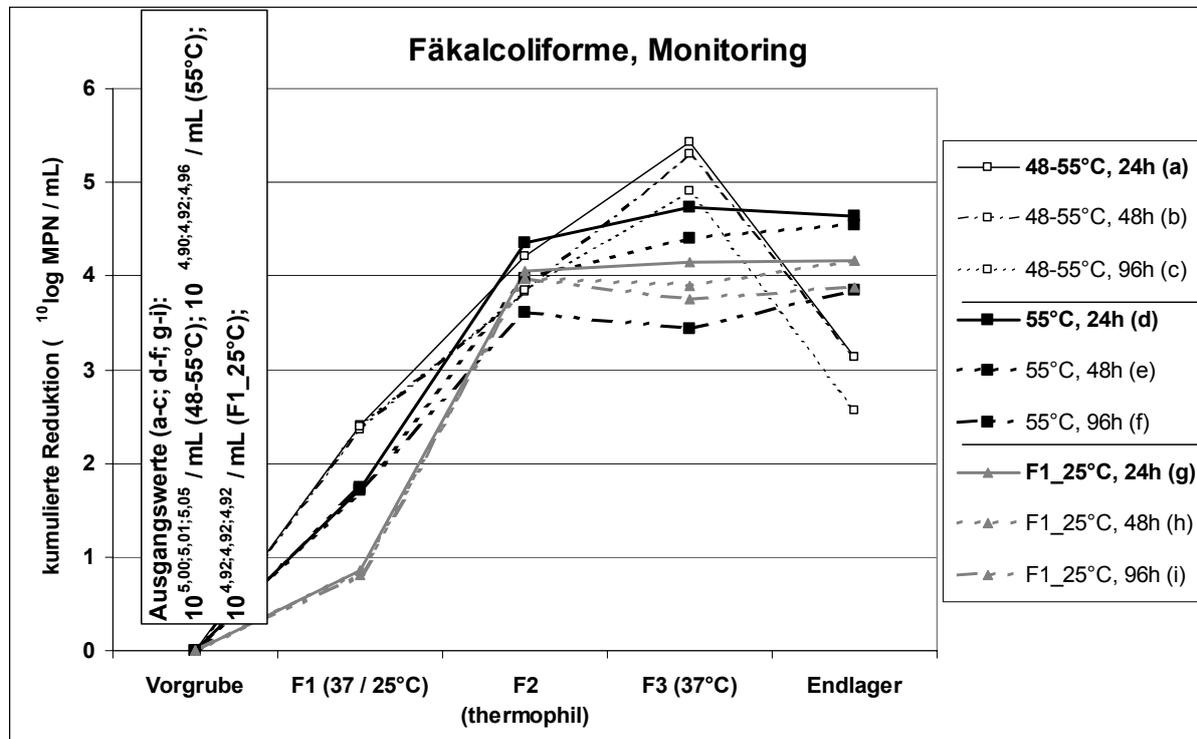
Abbildung 50 zeigt, dass die Fäkalcoliformen bereits nach Passage des mesophilen F1 unter dem Hohenheimer Vorschlag ( $5 \times 10^3$  Fäkalcoliforme / mL) für Gärrest aus Anaerobbehandlung lagen. Bei gesicherten 55°C im F2 lagen sie nach der thermophilen Behandlung (auch im Endlager) unter der bei WEIß und POPP (2004) angegebenen Hintergrundbelastung für Sicker- bzw. Dränwässer (10 – 100 MPN / mL bzw. Mittelwert 38 MPN / mL) sowie sogar unter dem Grenzwert der EU-Badegewässerrichtlinie 2002/0254(COD) (Abbildung 50). Bei solchen Vergleichen sind nur die Werte für die konventionelle 24 h Bebrütung zu berücksichtigen. Für die Proben mit suboptimalem Temperaturmanagement im F2 (48 - 55°C) wurde eine starke Reduzierung im F2 und F3, dann aber eine starke Wiederverkeimung im Endlager (Abbildung 50, Abbildung 51) erhalten. Demnach ist ein gesichertes Einwirken von 55°C erforderlich, um eine Rückverkeimung von *E. coli* im Endlager praktisch quantitativ zu unterbinden.

Abbildung 51 zeigt die über die Kompartimente der Berblinger Pilotanlage im Monitoring erhaltene kumulierte Reduktion der Fäkalcoliformen. Bei konventioneller (24 h) Bebrütung in den Fluorocult®-Ansätzen betrug sie nach Durchgang des thermophilen F2 bei gesicherten 55°C 4,39 log-Stufen, nach dem F3 sogar 4,77 log-Stufen und im Endlager bei marginaler Rückverkeimung immer noch 4,68 log-Stufen. Unter diesen Bedingungen waren im Endlager noch  $1,8 \pm 1,7$  Fäkalcoliforme / mL nachweisbar, was hart an der Nachweisgrenze des Systems liegt. Dies zeigt, dass Fäkalcoliforme bei 55°C mit gesicherter minimaler Einwirkzeit

von 8 – 9 h praktisch quantitativ abgetötet werden. Der genaue Betrag der ABNC-Bildung ist zwar nicht bekannt, ist aber wahrscheinlich unter diesen Bedingungen unerheblich.

Ähnlich effizient wie bei 55°C war die Reduktion der Fäkalcoliformen in der Berblinger Pilotanlage bei suboptimalem Temperaturmanagement im F2 (48 - 55°C) in den Fermentern, im Endlager nahmen sie aber um mehr als 2 log-Stufen auf  $73 \pm 55$  wieder zu (Abbildung 51). Hier scheint Bildung von sublethal geschädigten ABNC-Zellen stattgefunden zu haben, die über die Fluorocult®-Messung nicht oder zumindest nicht quantitativ erfasst wurden, und die sich unter den günstigen Bedingungen im Endlager offenbar stabilisierten und wieder vermehrten.

Material aus dem mesophil oder psychrophil betriebenen F1 erreichte weder bei stündlicher noch bei 4-stündlicher Beschickung das Niveau der bei WEIB und POPP (2004) angegebenen Hintergrundbelastung für Fäkalcoliforme (s. oben, Abbildung 50), und diese waren im Mittel auch nur um weniger als 2-log-Stufen reduziert (Abbildung 51). Mesophile oder psychrophile Behandlung allein mit gesicherter Verweilzeit von  $\leq 4$ h kann damit nicht als unbedenklich angesehen werden. Um bei Gärrest-Ausbringung in sensiblen Gebieten (z.B. Wasserschutzzone II) eine Belastung des Grundwassers durch Fäkalcoliforme auszuschließen, sollte daher auf einen Hygienisierungsschritt zumindest bei gesicherten 55°C nicht verzichtet werden.



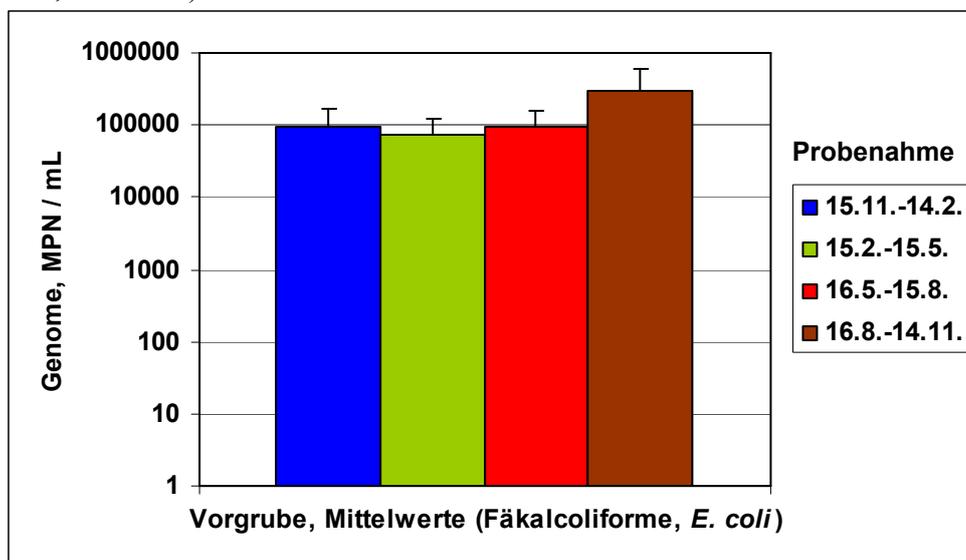
48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. B 3.1); F1\_25°C: nach Umstellung des F1 auf psychrophilen Betrieb (s. B 2.1.1.1); 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®

Abbildung 51: Fäkalcoliforme im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage

Nach Umstellung des F1 von mesophilem auf psychrophilen (20 – 25°C) Betrieb Anfang März 2005 war die abtötende Wirkung auf Fäkalcoliforme in diesem Fermenter um fast 1 log-Stufe geringer, der folgende F2 (Betrieb bei 55°C) kompensierte diesen Effekt jedoch völlig. Bei stabilem Betrieb des F2 bei 55°C waren Fäkalcoliforme nach dem F2 (unabhängig von der Betriebsweise des F1) um mehr als 4 log-Stufen reduziert (Abbildung 51). Rückverkeimung im Endlager war auch hier unerheblich. Hinsichtlich der Gesamtwirkung auf Fäkalcoliforme war kein Unterschied der psychrophil-thermophil-mesophilen gegenüber der vorherigen mesophil-thermophil-mesophilen Betriebsweise im Endprodukt erkennbar.

Die Werte für Fäkalcoliforme und *E. coli*-DNA in der Vorgrube schwankten stark. Der kleinste Wert betrug  $7,2 \times 10^3$  MPN Fäkalcoliforme / mL, der höchste  $9,7 \times 10^5$  Kopien *E. coli*-DNA / mL. Dies entspricht etwa den Werten bei WEIB und POPP (2004), dort zitierten Angaben oder z.B. FINK et al. (1997). Die Angaben in GELDREICH (1978) liegen mit  $2,3 \times 10^5$  Fäkalcoliformen ebenfalls in diesem Bereich. Wegen der beobachteten Schwankungen wurde über eine ANOVA (SPSS 10.0) analysiert, ob ein jahreszeitlicher Einfluss auf die Gehalte an Fäkalcoliformen und *E. coli*-DNA vorliegt. Innerhalb der 4 Jahreszeiten als unabhängige Variablen wurden jeweils die Daten zu Fäkalcoliformen und *E. coli*-DNA-Kopien äquivalent verwendet, da sich in Abbildung 50 keine Differenzen zwischen diesen Parametern in der Vorgrube zeigten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 dargestellt.

Abbildung 52 zeigt, dass zu den Herbstterminen die Gehalte an Fäkalcoliformen und *E. coli*-DNA im Mittel mit  $2,97 \times 10^5$  / mL um den Faktor 2 - 3 höher lagen als während der anderen 3 Jahreszeiten. Dieser Unterschied war gering aber im LSD-Post-Hoc-Test signifikant (Herbst - Frühjahr:  $p = 0,11$ ; Herbst - Winter:  $p = 0,24$ ; Herbst - Sommer:  $p = 0,27$ ). Homogenität der Varianzen (Levene-Test) war gegeben. Wohl infolge der relativ großen Streuung war im Bonferroni-Post-Hoc-Test kein Unterschied signifikant. Theoretisch sind Fütterungs-bedingte Einflüsse (jahreszeitlich verschiedene Zusammensetzung der TMR, s. B 2.1.1.1) denkbar, möglich sind auch Einflüsse, die von eventuell jahreszeitlich unterschiedlichen Gülle-Zusätzen wie z.B. Strohmehl, im Stall anfallendes Abwasser von Melkstand, Milchküche und Waschraum herrühren. Analysen mit höherer Probenahmedichte sollten bestätigen, ob und in welcher Art ein jahreszeitlicher Einfluss auf die Gehalte an Fäkalcoliformen und *E. coli* in Rindergülle bzw. in der Vorgrube besteht. Die Ergebnisse bestätigen allerdings, dass v.a in mehrstufigen Praxisanlagen Hygienisierung möglichst über ein Verfolgen definierter Chargen (s. B 2.3.1.1, B 3.1.1.2) dokumentiert werden sollte.



Probenahmeterminen: 15.11.-14.2.: Winter; 15.2.-15.5.: Frühjahr; 16.5.-15.8.: Sommer; 16.8.-14.11.: Herbst

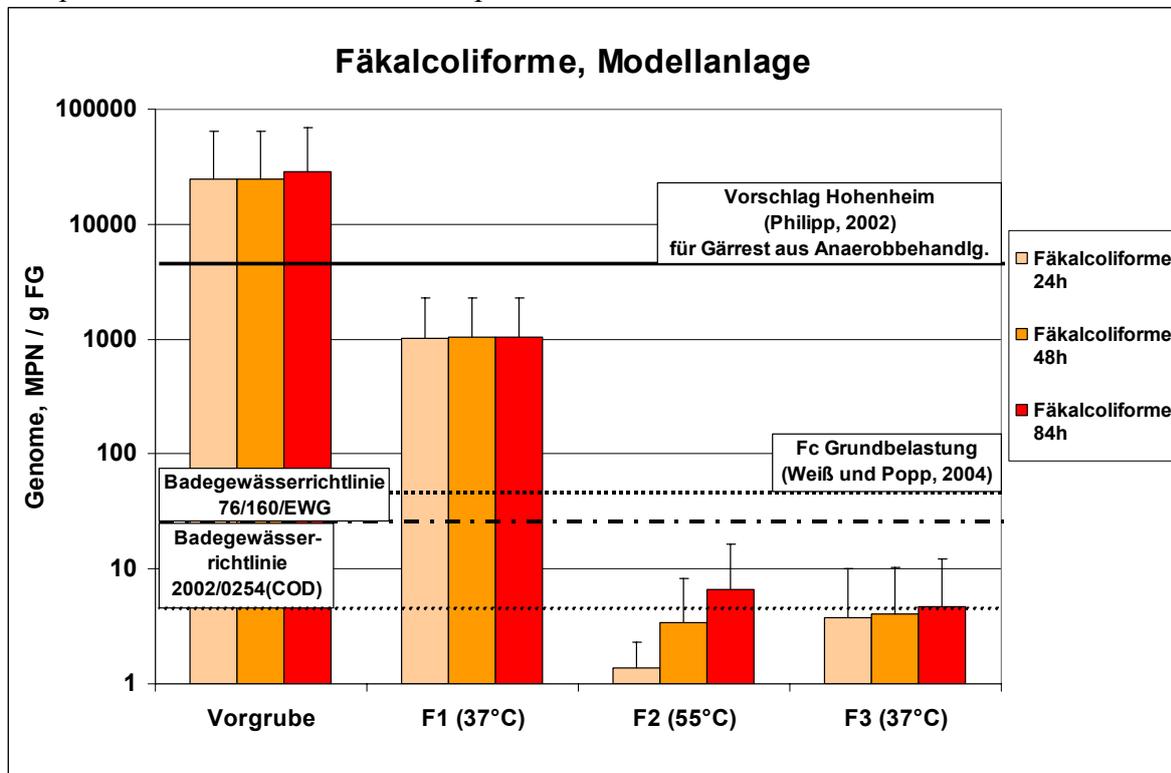
Abbildung 52: Jahreszeitlicher Gang der Fäkalcoliformen, *E. coli*-Genome in der Vorgrube der Berblinger Biogasanlage

### B 3.1.1.2 Monitoring Modellanlage

Die Untersuchung der Hygienisierungsleistung der 1:6 verkleinerten Modellanlage (s. B 2.1.1.2) diente der Überprüfung der entsprechenden Ergebnisse der Berblinger Pilotanlage (s. B 3.1.1.1) sowie zur Beurteilung eventueller Up- bzw. Downscaling-Effekte.

Die Reduktion der Fäkalcoliformen (Abbildung 53) verlief in der Modellanlage qualitativ und quantitativ nahezu identisch wie in der Berblinger Pilotanlage (Abbildung 50). Die Keimreduktion zwischen Vorgrube und Auslauf von F2 sowie F3 fiel zwar für die

Modellanlage mit etwa 4 log-Stufen etwas geringer (ca. 0,5 log-Stufen) aus als für die Pilotanlage (Abbildung 51), dies ist aber auf die im Mittel etwa 5-fach geringere Eingangskonzentration im Vorlagebehälter der Modellanlage zurückzuführen (vgl. B 3.1.3). Demnach wären Ergebnisse bzgl. Keimreduktion aus der Modellanlage auf die Pilotanlage übertragbar. Up- bzw. Downscaling-Effekte scheinen für die Keimreduktion zumindest im überprüften Bereich keine Rolle zu spielen.

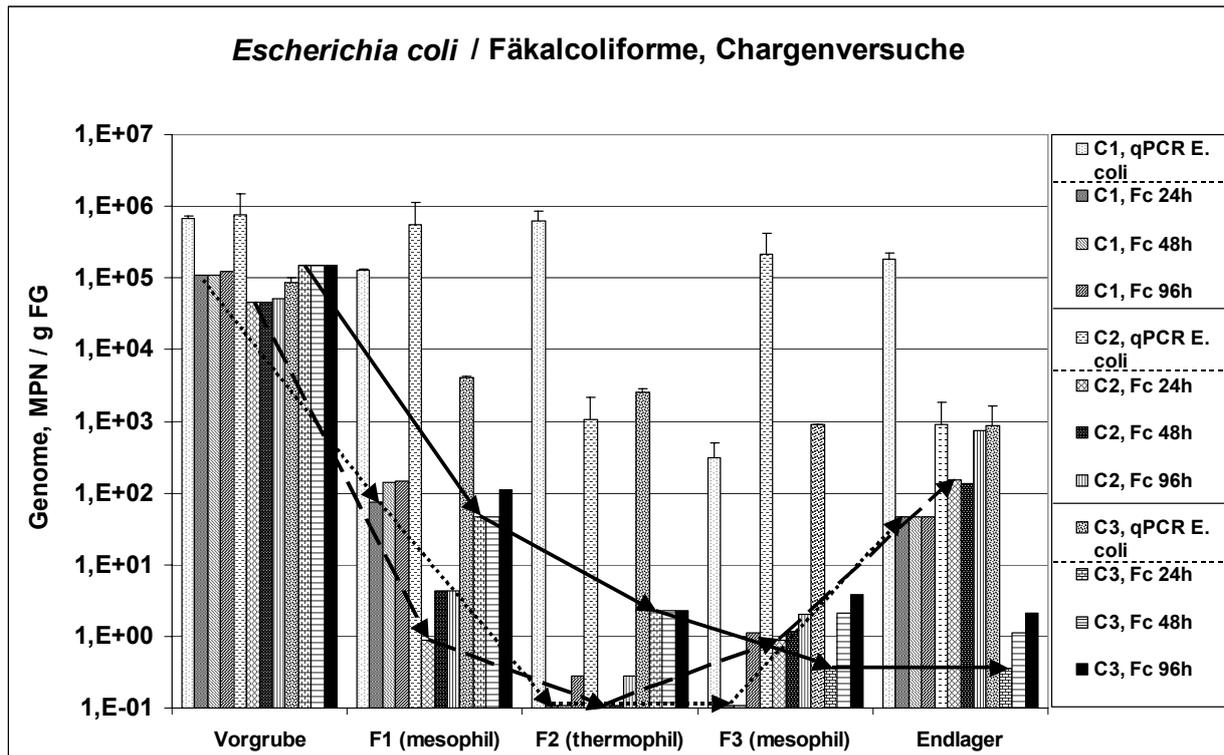


24h, 48h und 84h: Inkubationszeit in Fluorocult®

Abbildung 53: Fäkalcoliforme, Modellanlage, Monitoring

### B 3.1.1.3 Chargenversuche und Wiederverkeimung

Es wurden 3 Chargenversuche (s. B 2.3.1.1) durchgeführt, der erste (C1) begann am 25.8.2003, der zweite (C2) am 3.9.2003 und der dritte (C3) am 15.3.2004. Die in Abbildung 54 dargestellten Ergebnisse zur Reduktion von Fäkalcoliformen und *E. coli*-Genomen sind denen aus dem Monitoring (s. B 3.1.1.1, Abbildung 50) sehr ähnlich. Deutlich waren in gleicher Weise die Überschätzung lebender *E. coli*-Zellen durch die qPCR und die Unterschätzung der Fäkalcoliformen-Gehalte nach 24 h Inkubation in Fluorocult® nach den Stress-Einflüssen in den Fermentern sowie im Endlager. Im dritten Chargenversuch ergab sich eine langsame aber stetige Abnahme der *E. coli*-DNA-Zielsequenzen, während die Abnahme in den ersten beiden Chargenversuchen nicht stetig war. Hier kam es wegen BHKW-Ausfällen beim F2 zu Beschickungsausfällen und Unterbrechungen der Rührung (s. B 2.1.1.1), was wiederum wahrscheinlich lokale (v.a. an den Fermenterwänden) Überhitzungen und damit ein nicht kalkulierbares Absterben u.a. von *E. coli* ohne DNA-Abbau und die in den ersten beiden Chargenversuchen teilweise sehr hohen *E. coli*-DNA-Gehalte (Abbildung 53, vgl. Abbildung 50) zur Folge hatte. Wegen der zeitweise unterbrochenen Förderung in den ersten beiden Chargenversuchen könnten hier auch Chargen vor den Ziel-Chargen beprobt worden sein und die Turbulenzen in den DNA-Gehalten (höhere DNA-Gehalte im Folgefermenter bzw. im Endlager als im betrachteten Fermenter) bewirkt haben.

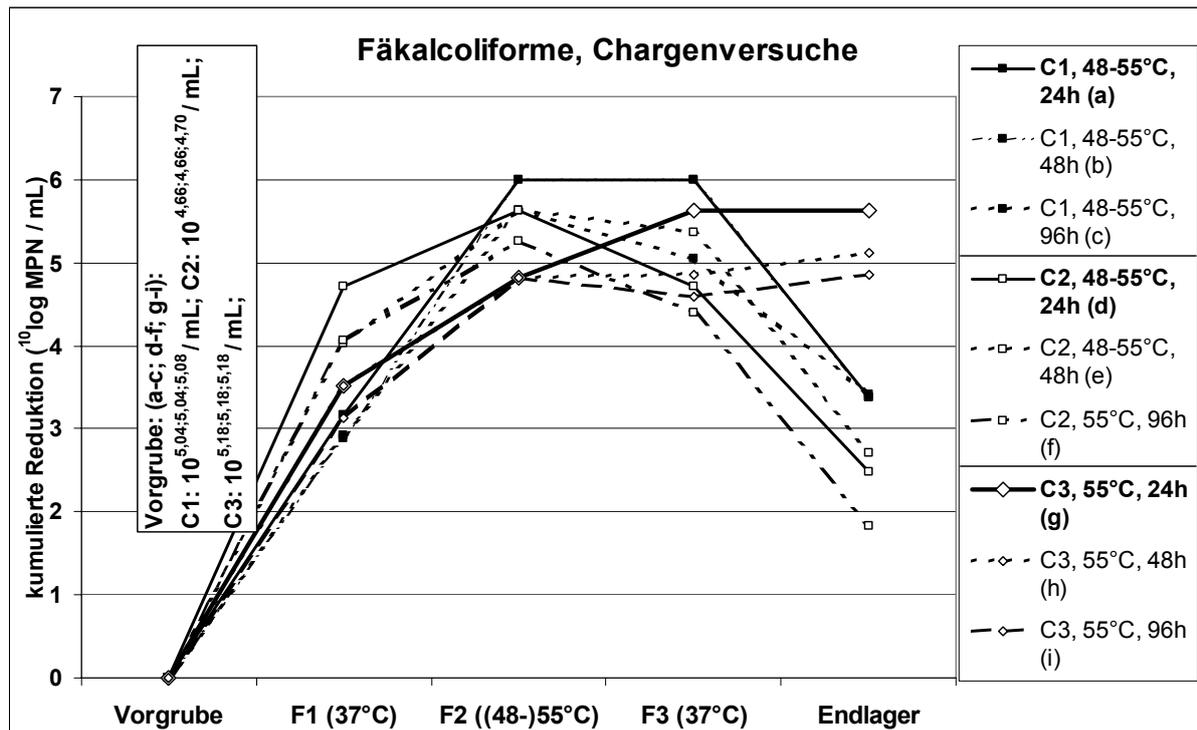


C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3 (s. Text); Fc: Fäkalcoliforme; 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe über Pfeile hervorgehoben.

Abbildung 54: *Escherichia coli* (DNA) und Fäkalcoliforme, Chargenversuche, Pilotanlage Berbling

Diese Turbulenzen waren im Gang der Fäkalcoliformen-Gehalte nicht erkennbar, allerdings wurde auch hier (nur in den ersten beiden Chargenversuchen) wohl infolge der Temperaturabfälle (48 - 55°C, s. B 2.1.1.1) eine Wiederverkeimung im Endlager um ca. 2 log-Stufen erhalten. Die Wiederverkeimung begann sogar teilweise bereits im F3 (Abbildung 53, Abbildung 54). Eine Wiederverkeimung Fäkalcoliformer war dagegen im 3. Chargenexperiment bei gesicherten 55°C im F2 nicht erkennbar. Hier betrug die Reduktion Fäkalcoliformer zwischen Vorgrube und Endlager je nach Dauer der Bebrütung sogar 4,85 - 5,62 log-Stufen (Abbildung 55).

Diese Ergebnisse dokumentieren die Wichtigkeit der Temperaturführung in der Hygienisierungsstufe. Bei gesicherten 55°C im thermophilen F2 erfolgte offenbar keine Rückverkeimung durch Fäkalcoliforme in den Stufen nach dem F2, während sich bei suboptimalem Betrieb eine deutliche Wiederverkeimung ergab. Ähnliche Befunde ergaben sich auch für die Coliformen (s. B 3.1.2) und die intestinalen Enterokokken (s. B 3.1.3). Die Ergebnisse aus dem Modell-Endlagerversuch waren in gleicher Weise zu interpretieren (s. B 3.1.1.4). Die Wiederverkeimung durch die mesophilen bis thermotoleranten Vertreter dieser Gruppen scheint daher generell durch eine 8 - 9 stündige Behandlung von Rindergülle bei 55°C völlig unterbunden oder zumindest sehr stark reduziert zu sein. Bei der hygienisierenden Wirkung ist sicher die Höhe der Temperatur und die Einwirkungsdauer dominant, ein zusätzlicher Effekt von Gülle-Inhaltsstoffen (z.B. NH<sub>3</sub>) ist aber zu berücksichtigen (s. B 3.1.8).



C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004; 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®

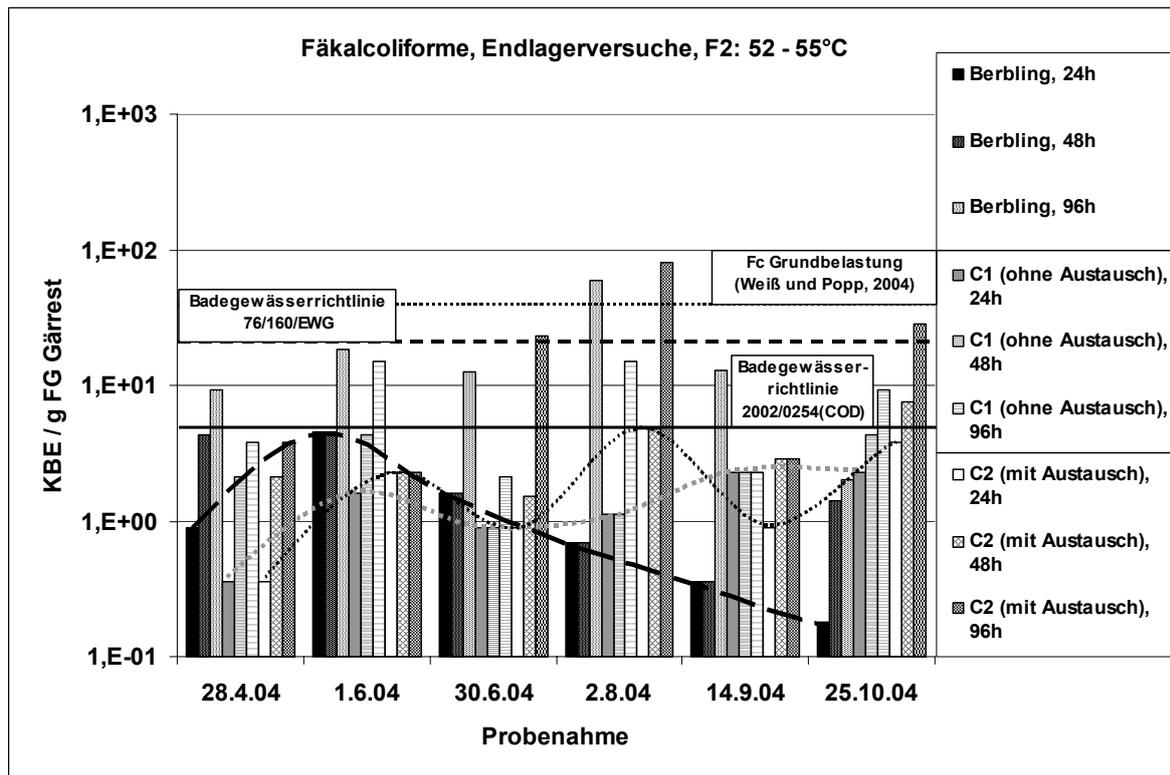
Abbildung 55: Fäkalcoliforme, Chargenversuche, kumulierte Reduktion, Pilotanlage Berbling

#### B 3.1.1.4 Modell-Endlagerversuch

Während des 4-monatigen Modell-Endlagerversuchs (s. B 2.1.1.3) mit Material aus der Berblinger Pilotanlage zu Zeiten suboptimalen Temperaturmanagements (48 - 55°C, s. B 2.1.1.1) war in den Endlagern kein eindeutiger, die 3 Varianten (Berblinger Endlager; C1: Modell-Endlager ohne Austausch; C2: Modell-Endlager mit Austausch; s. B 2.1.1.3) differenzierender Trend zu erkennen (Abbildung 56).

Das Material, das für die Versuchsanlage verwendet wurde stammte rechnerisch im thermophilen F2 (Versuchsanlage - hydraul. Verweilzeit F3 - Verweilzeit der Hauptfracht im F2 = ca. 30 d) aus dem Zeitraum 27.3.04 - 2.4.04, wo 52 - 55°C im F2 gemessen wurden (EFFENBERGER et al., 2006). Dementsprechend war die Belastung mit Fäkalcoliformen in diesem Material mit 0,36 MPN / g FG sehr gering. In allen 3 Varianten war eine Rückverkeimung um etwa oder weniger als 1 log Stufe zu beobachten, wobei die Werte aber immer unter der Marke von 5 KBE / mL Fäkalcoliforme der Badegewässerrichtlinie 2002/0254 (COD) blieben (Abbildung 56). Dies belegt, dass die Rückverkeimung Fäkalcoliformer in einem hygienisch einwandfreien Endlager und gesicherter Verweilzeit von mindestens 8 - 9 h in einer vorgeschalteten thermophilen Stufe mit gesicherten 55°C bei der Vergärung von Rindergülle maximal 1 log-Stufe beträgt. Eine spätere Rückverkeimung im Endlager ist, wenn Kontamination von außen ausgeschlossen ist, äußerst unwahrscheinlich (STRAUCH, 1987; DEUTRICH und PIOCH, 1991). Bei suboptimaler Temperaturführung (s. B 3.1.1.1, B 3.1.1.3) und Kontamination im Endlager kann die Rückverkeimung größer sein.

Eine Rückverkeimung im Endlager betrug auch für die ziemlich thermoresistenten Enterokokken nicht mehr als 1 log-Stufe (s. B 3.1.3), und für die anderen untersuchten Parameter war kein Anhalt für eine Rückverkeimung erkennbar (s. unten). Gleichartige Ergebnisse wurden auch für die Coliformen erzielt, diese reagierten allerdings auf suboptimale Temperaturführung im F2 am empfindlichsten mit Rückverkeimung (Abbildung 61). Sie stellen daher den geeignetsten Parameter dar, anhand von Produktprüfungen auf eventuelle Unregelmäßigkeiten bei der Prozessführung zu schließen.



C1, C2: Endlager ohne, mit Austausch. 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert hervorgehoben.

Abbildung 56: Fäkalcoliforme, Endlagerversuche

#### B 3.1.1.5 Diskussion: Fäkalcoliforme und *E. coli*

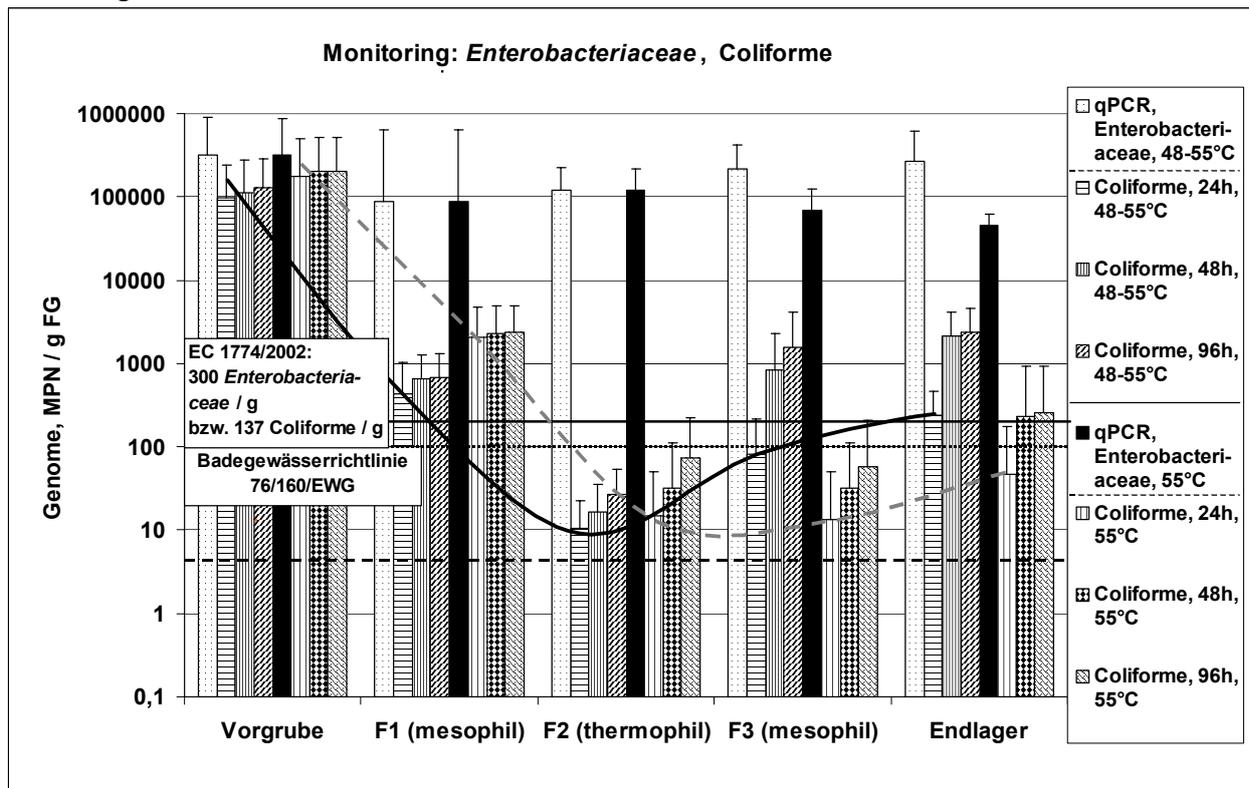
Die Ergebnisse bestätigen, dass die Dokumentation einer Hygienisierung wegen der möglichen Unterschätzung der Hygienisierungsleistung nicht über Quantifizierung der DNA erfolgen kann, sondern über (selektive) Kultivierung vorgenommen werden sollte. Eine Wiederverkeimung Fäkalcoliformer wird offenbar bei konsequentem Einhalten der 55°C-Marke so gut wie völlig unterbunden. Die Vor- oder Nachschaltung mesophiler Stufen ist offenbar zum Erreichen der durch die Fermenterkette erzielten Hygienisierungsleistung unnötig. Die relativ kurze Bebrütung in Fluorocult® sowie die Sensitivität Fäkalcoliformer und ihre schnelle Rückverkeimung empfehlen diesen Parameter zur Überwachung eines stabilen Betriebs von Biogasanlagen, mit dieser Methode werden aber pathogene *E. coli* (z.B. O157:H7), die in Tier-Faeces relevant sein können, nicht erfasst. Allerdings beschreibt HOFERER (2001) D-Werte bei 55°C für EHEC im Bereich 1,8 - 4,8 min, die wesentlich geringer als die von intestinalen Enterokokken sind (s. B 2.3.2.2) und damit bei der Hygienisierung bei weitem von diesen abgedeckt sind. EHEC/STEC unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit auch nicht wesentlich von *E. coli* (GODFREE and FARRELL, 2005).

In Verbindung mit den im Folgenden dargestellten Ergebnissen zu den anderen Parametern ist eine stabile Betriebstemperatur von 55°C eine wichtige Maßnahme, eine starke Hygienisierungseffizienz für einen Einsatz des Gärrests in wasserwirtschaftlich sensiblen Gebieten wie der Wasserschutzzone II einzustellen. Die offenbar nach Stresseinflüssen verstärkte ABNC-Bildung (in den Fermentern, im Endlager) sollte weiter untersucht werden.

#### B 3.1.2 Coliforme (Keimzahlen) und *Enterobacteriaceae* (DNA)

Die Bestimmung der Coliformen-Keimzahlen erfolgte über das Fluorocult®-MPN-Verfahren (s. B 2.3.2.1), die Bestimmung der *Enterobacteriaceae*-DNA-Kopien über Standard-Spiking qPCR (s. B 2.3.3.2.3). Abbildung 57 zeigt die Monitoring-Ergebnisse für die Coliformen

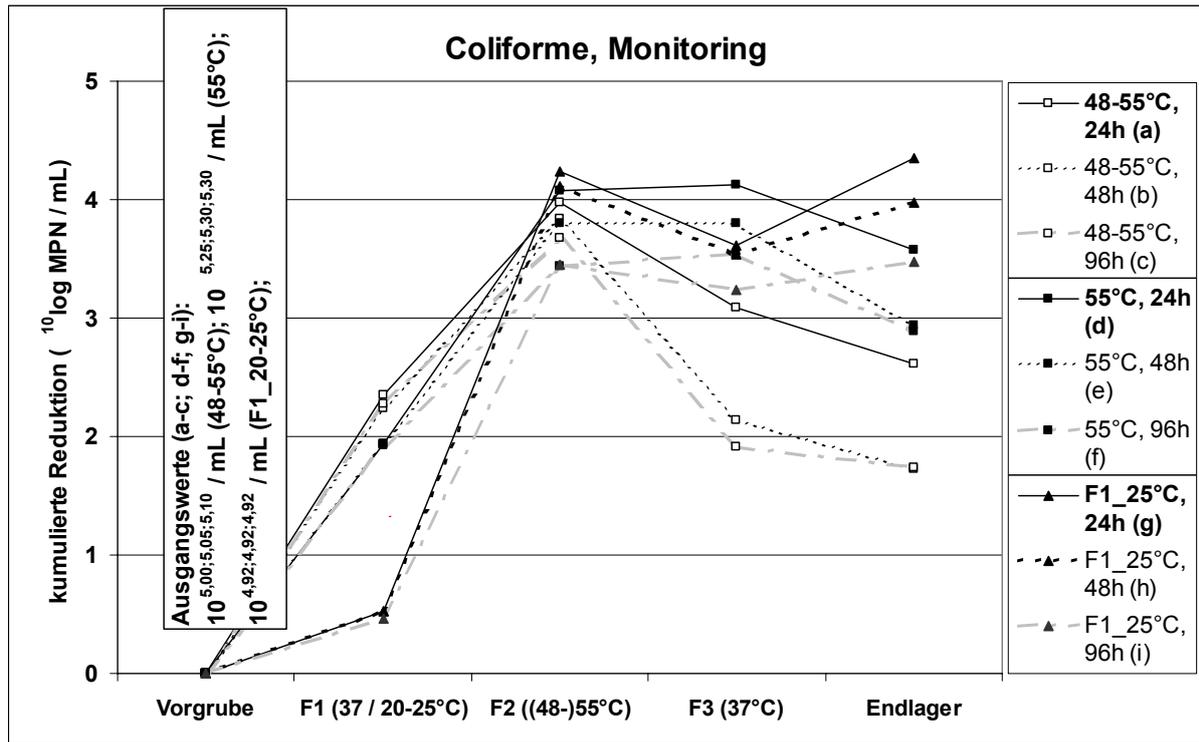
(MPN) und die Anzahl *Enterobacteriaceae*-Genome in den Kompartimenten der Berblinger Pilotanlage.



24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004, 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. B 3.1). Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt und relevante Richtlinien skizziert.

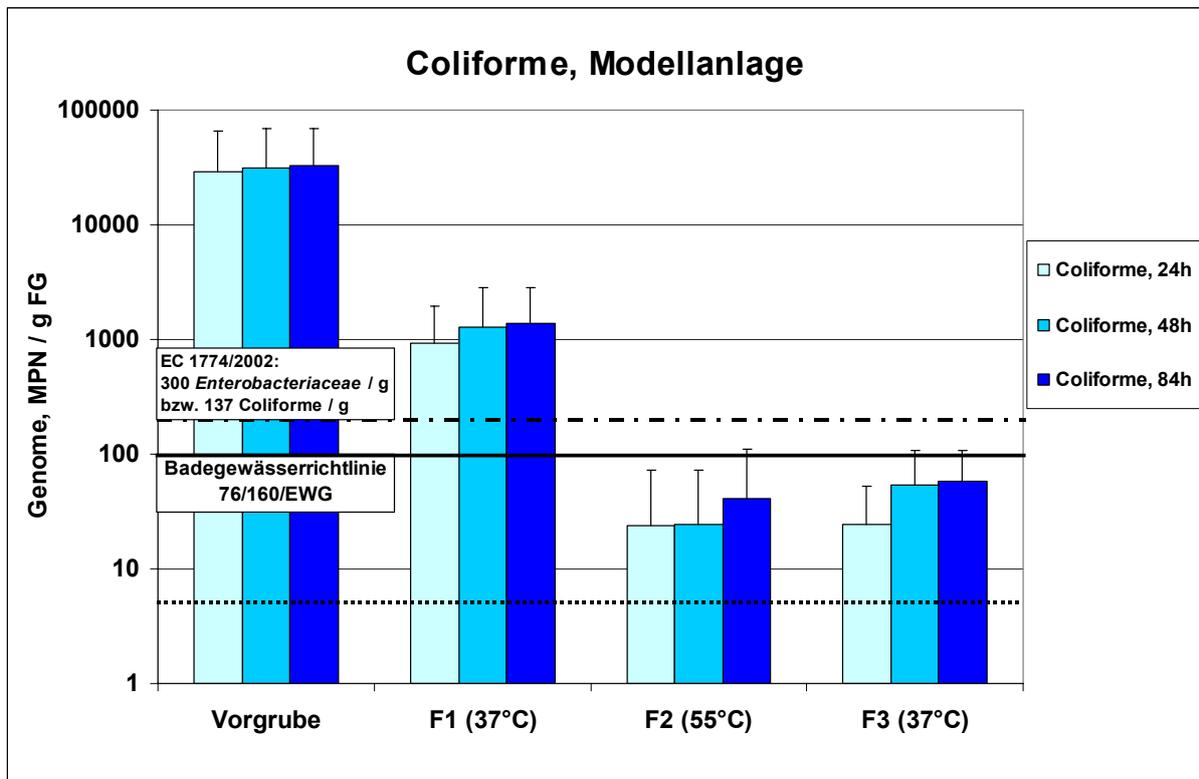
Abbildung 57: *Enterobacteriaceae* (Genome) und Coliforme, Pilotanlage Berbling, Monitoring

Im Gegensatz zur hervorragenden Übereinstimmung der Gehalte für *E. coli* (qPCR) und Fäkalcoliforme (Fluorocult®) (Abbildung 50) in Frischgülle wurden im Mittel 2,18 mal mehr *Enterobacteriaceae* als Coliforme in der Vorgrube gemessen (Abbildung 57). Da in der äquilibrierten Frischgülle praktisch keine abgestorbenen Fäkalcoliforme vorhanden waren (s. B 3.1.1.1), sollten die über qPCR bestimmten  $3,23 \times 10^5$  Genome *Enterobacteriaceae* in etwa  $1,48 \times 10^5$  MPN Coliformen entsprechen. Vorausgesetzt, dass das Colilert®-Verfahren spezifisch *Enterobacteriaceae* erfasst, würde der Grenzwert von 300 *Enterobacteriaceae* / g in der VERORDNUNG (EG) NR. 1774/2002 für Fermentationsrückstände aus nicht für den menschlichen Verzehr bestimmten tierischen Nebenprodukten etwa 137 MPN über das Fluorocult® bestimmten Coliformen entsprechen. Abbildung 57 zeigt, dass diese sowie die schärfere Marke von 100 KBE Coliformen / mL in der Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG bei stabilen 55°C im thermophilen F2 für Gärrest nach Durchgang durch den F2, den F3 sowie aus dem Endlagermaterial immer unterschritten wurde (bei solchen Vergleichen sind immer nur die Werte für die konventionelle 24 h Bebrütung zu berücksichtigen!). Bei 48 – 55°C im F2 entstand dagegen bereits im F3 Wiederverkeimung durch Coliforme (Abbildung 57, Abbildung 58). Die mesophile oder psychrophile Vergärung im F1 allein kann mit einer Reduktion von etwa 2 bzw. 0,5 log-Stufen (Abbildung 58) nicht als ausreichende Behandlung angesehen werden.



48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. B 3.1); F1\_25°C: nach Umstellung des F1 auf psychrophilen Betrieb (s. B 2.1.1.1); 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®

Abbildung 58: Coliforme im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage



24h, 48h und 84h: Inkubationszeit in Fluorocult®

Abbildung 59: Coliforme, Modellanlage, Monitoring

Ähnlich wie für die Anzahl der *E. coli*-Genome beobachtet (s. B 3.1.1.1, B 3.1.1.2), nahmen die *Enterobacteriaceae*-Genome während der Vergärung nur unwesentlich ab (Abbildung

57). Dies unterstreicht, dass Lebendkeimzahlen nach lethalen Stresseinflüssen durch qPCR mit DNA als Zielmolekül stark überschätzt werden können (s. B 3.1.1.1, B 3.1.1.5).

Ähnlich wie für die Fäkalcoliformen beobachtet (vgl. B 3.1.1.1, B 3.1.1.2), war auch für die Coliformen der Betrag der erhöhten MPN bei 96 h gegenüber 24 h Bebrütung in Fluorocult® nach der thermophilen Vergärung größer (Abbildung 57, Abbildung 58, Abbildung 63, Abbildung 64), was auf ABNC-Bildung coliformer Keime unklaren Betrags und auf Stressmetabolismus (s. B 3.1.1.1) hinweist. Eine Wiederverkeimung Coliformer im Endlager war insbesondere bei suboptimalem Temperaturmanagement erkennbar, betrug etwa 1,5 - 2 log-Stufen und setzte dort teilweise bereits im mesophilen F3 ein (Abbildung 57, Abbildung 58, Abbildung 63, Abbildung 64). Hier könnten wegen ihrer Thermotoleranz z.B. zu *Citrobacter*, *Enterobacter* oder *Klebsiella* zählende Species aber auch *E. coli* eine Rolle spielen (ALONSO et al., 1999).

Der jahreszeitliche Gang für die Gruppe *Enterobacteriaceae* / Coliforme in der Vorgrube war sehr ähnlich wie der Gang für *E. coli* / Fäkalcoliforme (s. Abbildung 52, B 3.1.1.1). Die Mittelwerte (in MPN / mL) betragen  $5,22 \times 10^5$  für die Herbst-,  $3,20 \times 10^5$  für die Sommer-,  $2,54 \times 10^5$  für die Frühjahrs- und  $1,64 \times 10^5$  für die Winterproben. Keiner der Unterschiede war im Bonferroni- oder LSD-ANOVA-Post-Hoc-Test (s. B 3.1.1.1) auf Niveau  $p = 0,05$  signifikant. Die Ähnlichkeiten im Verhalten beider Gruppen ist nicht erstaunlich, da *E. coli* / Fäkalcoliforme mit im Mittel  $9,75 \times 10^4$  MPN / mL etwa 30 % der *Enterobacteriaceae* ( $3,23 \times 10^5$  MPN / mL) bzw. 66 % der Coliformen ( $1,48 \times 10^5$  MPN / mL) in der Vorgrube ausmachten.

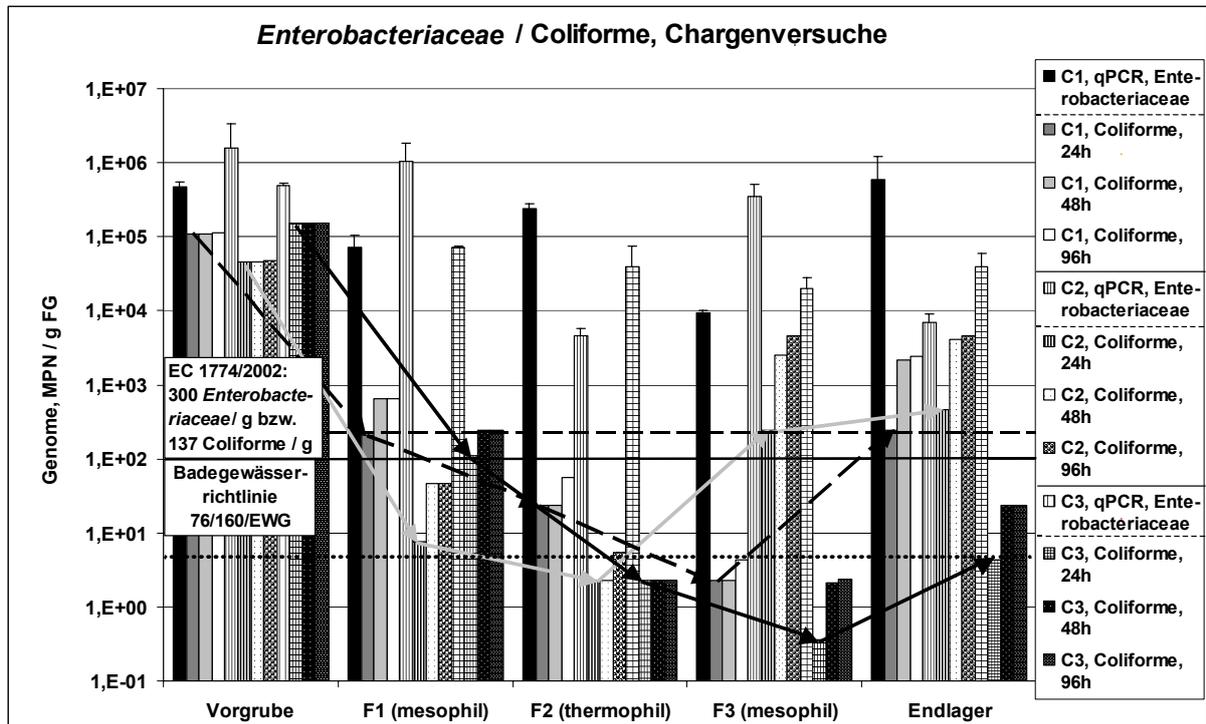
In der Modellanlage verlief die Reduktion der Coliformen (Abbildung 59) qualitativ und quantitativ nahezu identisch mit der Reduktion Coliformer in der Berblinger Pilotanlage (Abbildung 57). Die Keimreduktion zwischen Vorgrube Auslauf von F2 und F3 fiel für die Modellanlage mit etwa 3 log-Stufen etwas geringer (ca. 0,5 log-Stufen) aus als für die Pilotanlage (Abbildung 58). Das gleiche Bild bot sich für die Fäkalcoliformen (s. B 3.1.1.2). Die etwas geringere erzielte Reduktion ist auf die im Ansatz Modellanlage (für die Coliformen im Mittel etwa 4-fach) geringere Eingangskonzentration im Vorlagebehälter zurückzuführen (vgl. B 3.1.1.2, B 3.1.3). Dies bestätigt die Vermutung, dass Ergebnisse bzgl. Keimreduktion aus der Modellanlage auf die Pilotanlage übertragbar sind. Up- bzw. Downscaling-Effekte spielen offenbar für die Keimreduktion zumindest im überprüften Bereich keine Rolle.

Die Ergebnisse für Coliforme und *Enterobacteriaceae* aus den Chargenversuchen (Abbildung 54, Abbildung 55) waren im Wesentlichen denen aus dem Monitoring (Abbildung 57, Abbildung 58) sehr ähnlich. Auch hier überschritten die Coliformen in den Chargen C1 und C2, die unter suboptimalem Temperaturmanagement im thermophilen Fermenter F2 (48 - 55°C) verlaufen waren, im Endlager die Marken von 137 Coliformen / g FG sowie die 100 MPN / mL der Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG, in Charge C2 war das sogar bereits für den Ausfluss aus dem mesophilen Fermenter F3 der Fall (Abbildung 60). Bei gesicherten 55°C im F2 lagen ab dem F2 alle Werte immer unter diesen Marken.

Auch in den Chargenversuchen wurde keine wesentliche Reduktion der *Enterobacteriaceae*-DNA erhalten (Abbildung 60), was gegen die Eignung des auf Detektion von DNA basierenden qPCR-Ansatzes zur Evaluierung von Hygienisierung spricht. Ein RTqPCR-Ansatz mit Quantifizierung von mRNA-Bildung (GARCÉS et al., 2005) könnte hier zielführender sein.

In den Chargenversuchen wurde ebenfalls die höhere MPN-Ausbeute Coliformer bei 96 h gegenüber kürzerer Bebrütung in Fluorocult® in den Fermentern beobachtet, was für ABNC-Bildung unklaren Ausmaßes spricht. Zur Lösung der Problematik könnte ebenfalls ein RTqPCR-Ansatz hilfreich sein, da über RTqPCR Transkription bestimmter Zielgene und damit Aktivierbarkeit der Zielorganismen geprüft und quantifiziert werden kann. Bei sublethal geschädigten bzw. ABNC-Zellen ist die Fähigkeit zur Transkription noch gegeben,

während ABNC-Zellen sich wegen der hemmenden Zusatzstoffe im Medium nicht oder nur sehr schwer vermehren können und oft eine Resuszitierungsphase vor der selektiven Kultivierung benötigen (LLEÒ et al., 2001).

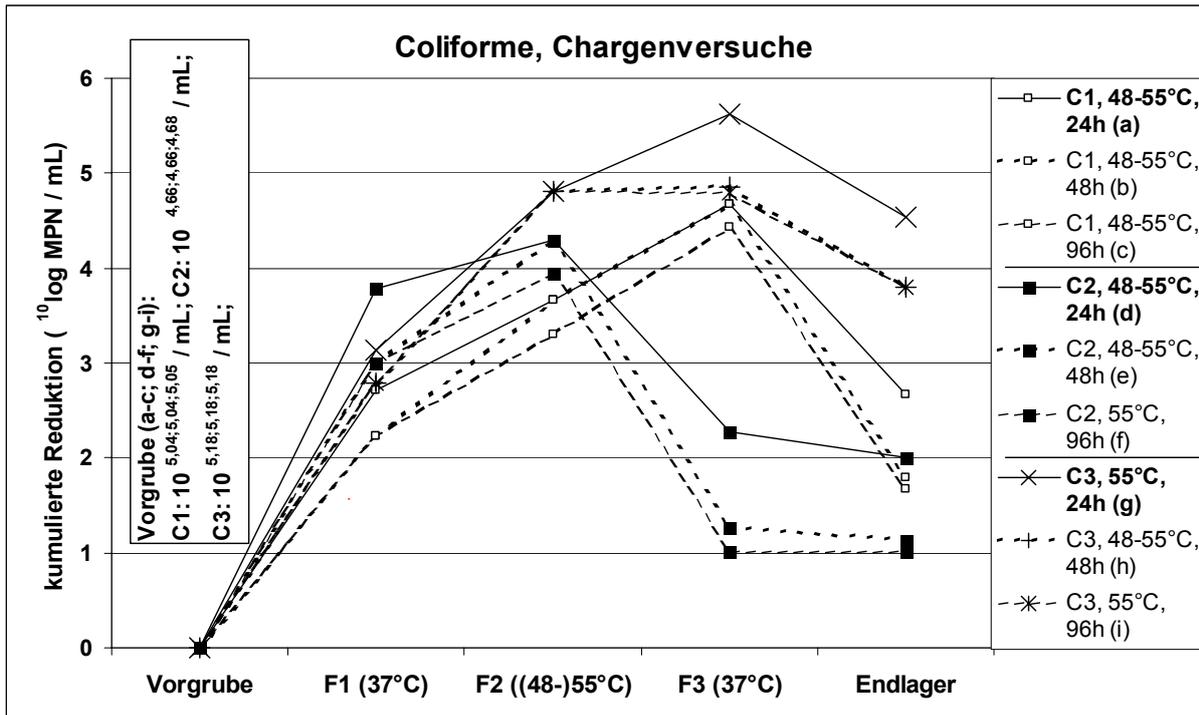


C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3 (s. Text); 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe über Pfeile hervorgehoben und relevante Richtlinien skizziert.

Abbildung 60: Chargenversuche zu *Enterobacteriaceae* (DNA) und Coliformen, Pilotanlage Berbling

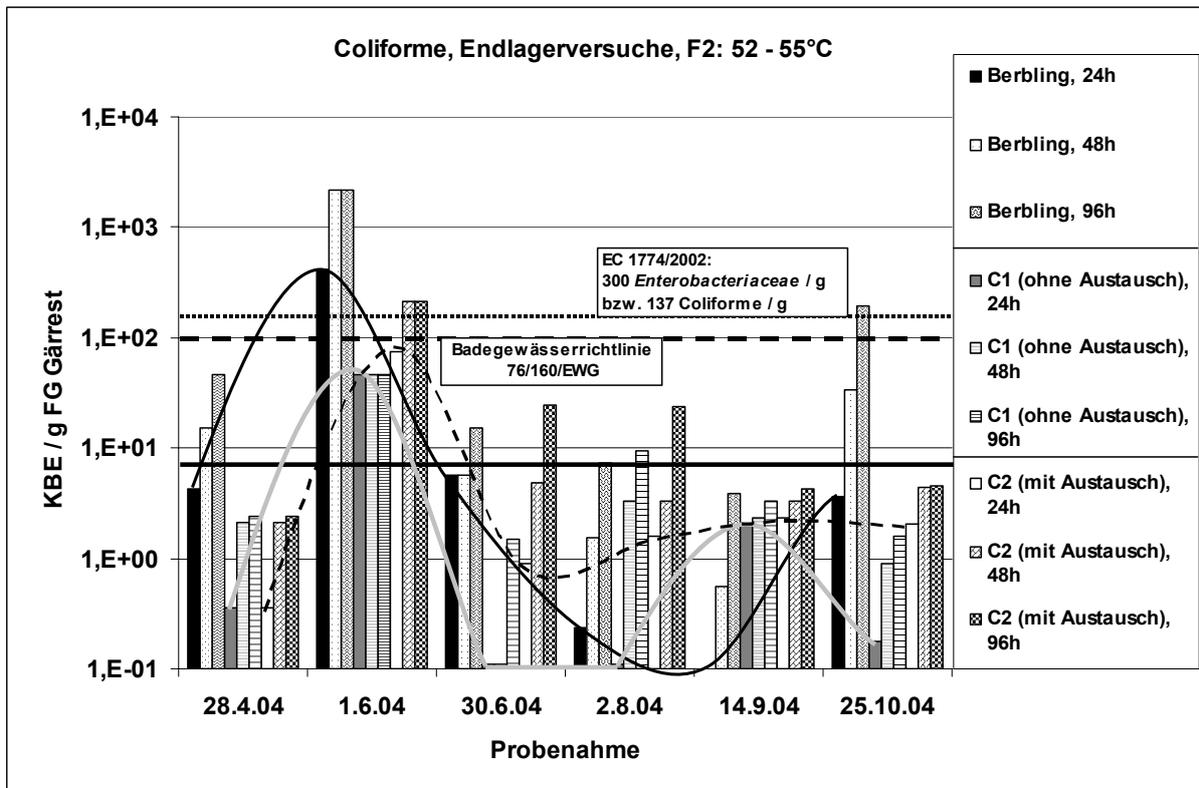
ZETHNER et al. (2002) schlagen als Grenzwert für hygienisch unbedenklichen Gärrest u.a.  $5 \times 10^3$  KBE Enterobakterien / g vor. Der analoge Coliformen-Wert wurde in der Biogasanlage Berbling zumeist bereits nach der ersten mesophilen Stufe F1 und in allen Fällen nach dem thermophilen Fermenter F2 unterschritten. Der Gärrest entsprach nach der thermophilen Behandlung bei gesicherten 55°C und gesicherter 8 - 9 h Verweilzeit (Tabelle 56) sogar den Kriterien der Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG (Abbildung 60, Abbildung 62, Abbildung 63). Nach dieser 55°C Behandlung wurde in allen Fällen eine Reduktion coliformer Keime um 3,5 – 4,5 log-Stufen (24 h Bebrütung in Fluorocult® erzielt, dabei schien die vorgeschaltete mesophile Phase zum Erreichen dieser Qualität ähnlich wie die nachgeschaltete mesophile Phase untergeordnete Bedeutung zu haben (Abbildung 58, Abbildung 61). Die Rückverkeimung im Endlager betrug bei gesicherten 55°C und gesicherter 8 - 9 h Verweilzeit im F2 maximal eine log-Stufe (24 h Bebrütung, Abbildung 58, Abbildung 61).

Ein eindeutiger, die 3 Varianten des Modell-Endlagerversuchs (Berblinger Endlager; C1: Modell-Endlager ohne Austausch; C2: Modell-Endlager mit Austausch; s. B 2.1.1.3) differenzierender Trend war auch für die Coliformen nicht zu erkennen (Abbildung 62). Allerdings betrug hier die Rückverkeimung (auch im Endlager ohne Austausch, C1) transient bis zu 2 log-Stufen und ging dann wieder zurück. Die Werte lagen dabei in allen Fällen unterhalb des imperativen Werts der Badegewässerrichtlinie 76/160/EWG (Abbildung 62).



C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004; 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®

Abbildung 61: Coliforme in den Chargenversuchen, kumulierte Reduktion in der Berblinger Pilotanlage



C1, C2: Endlager ohne, mit Austausch. 24h, 48h, 96h: Inkubationszeit in Fluorocult®. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert hervorgehoben.

Abbildung 62: Coliforme, Endlagerversuche

Offenbar können (thermophile/-tolerante) Coliforme besonders intensiv mit Rückverkeimung reagieren, was sie als geeigneten Parameter zur Überprüfung der

Hygienisierungseffizienz im Produkt erscheinen lässt (s. B 3.1.1.4). Anhand der vorliegenden Daten aus den Endlagerversuchen und den anderen untersuchten Parametern (vgl. B 3.1.1.4) kann z.Zt. ausgeschlossen werden, dass sich im Endlager nach thermophiler anaerober Vergärung (gesichert 55°C, gesicherte Verweilzeit 8 - 9 h) eine mikrobielle Population Besorgnis erregender Höhe oder Zusammensetzung aufbaut, wenn eine Kontamination von außen (Schwarz-Weiss-Trennung insbesondere nach der thermophilen Stufe) ausgeschlossen ist.

Aus den Ergebnissen kann man schließen, dass das thermophile Verfahren, ähnlich wie für die Fäkalcoliformen beschrieben (s. B 3.1.1.5), auch bezüglich der Coliformen geeignet ist, einen sehr guten hygienischen Zustand des Gärrests zu produzieren.

### **B 3.1.3 Intestinale Enterokokken, Gesamt-Enterokokken, *Enterococcus faecalis* und *E. faecium***

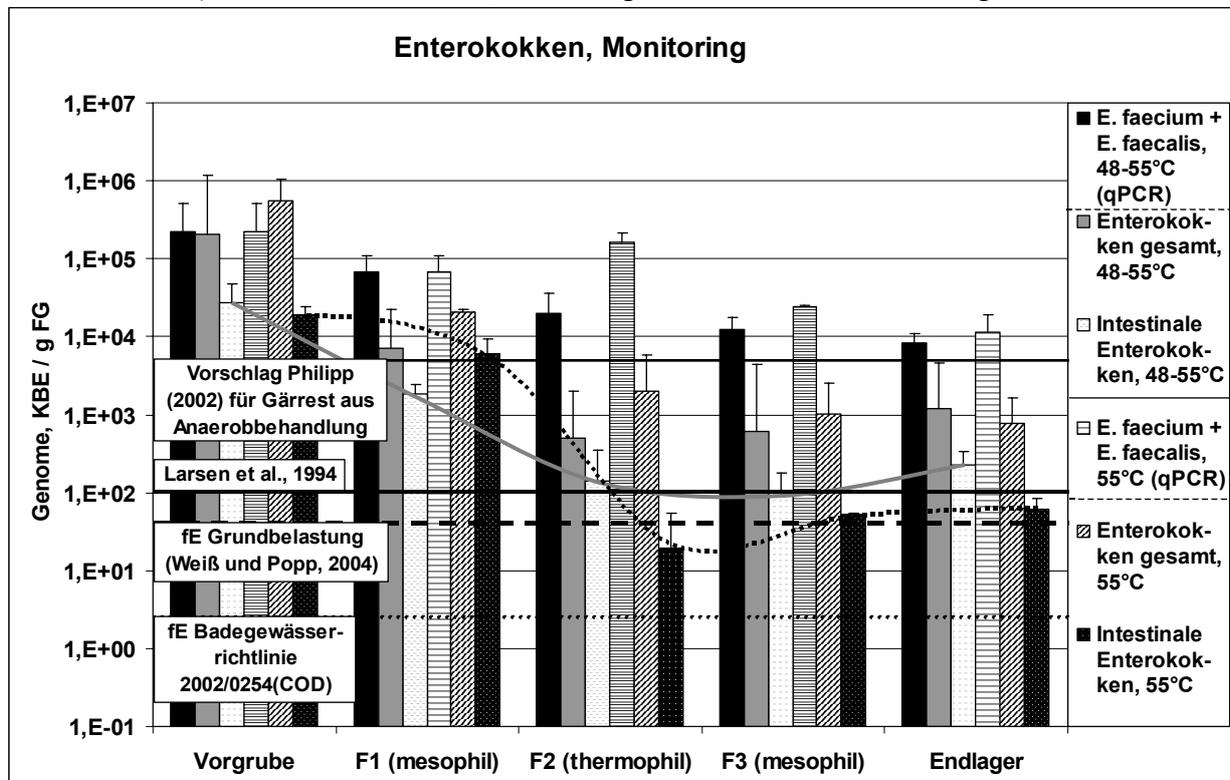
Intestinale (fäkale) und Gesamt-Enterokokken wurden über Membranfiltration und selektive Kultivierung nach ISO / DIS 7899-2 bestimmt (s. B 2.3.2.2), *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* über qPCR (s. B 2.3.3.2.3). Abbildung 63 und 17 zeigen die Monitoring-Ergebnisse und Abbildung 65 und 19 die Ergebnisse aus den Chargenversuchen für die KBE der gesamt- und intestinalen Enterokokken sowie die Anzahl *E. faecalis* und *E. faecium*-Genome in den Kompartimenten der Berblinger Pilotanlage.

Es ist vorzuschicken, dass die Werte für die Gesamt-Enterokokken äusserst vorsichtig interpretiert werden müssen, da sich teilweise auf den Filtern über m-Enterokokken-Agar eine flächige rosa Färbung einstellte, für die nicht mit Sicherheit festgestellt werden konnte, ob es sich um bakterielle (pin-point) Mikrokolonien handelte. Die entsprechenden Werte können daher überschätzt sein, und die Schätzung der Koloniezahlen für die entsprechenden Flächen ist sicher subjektiv. Zudem beinhalten 'Gesamt-Enterokokken' eine Reihe von in Umweltproben vorkommenden Spezies ohne oder zumindest mit wesentlich geringerer Hygiene-Relevanz als die intestinalen Enterokokken ('Fäkalstreptokokken'), bei denen bisher besonders *E. faecalis* und *E. faecium* als potentiell pathogen für Menschen beschrieben sind (MUNDY et al., 2000). Der Parameter Gesamt-Enterokokken kann daher nicht für eine mikrobiologische Evaluierung des hygienischen Status des Gärrests empfohlen werden und wird auch im Weiteren nicht berücksichtigt.

Anhand der Schwarzfärbung des Äskulin-Galle-Agars waren intestinale Enterokokken dagegen methodisch gut zu bestimmen. Es handelte sich meist um größere (ca. 0,5 - 1 mm) dunkel-braunrote Kolonien, seltener waren auch blassrosa (ca. 0,5 - 1 mm) Kolonien und sehr selten kleine (ca. 0,1 mm) rote Kolonien verantwortlich. Die Überprüfung zufällig ausgewählter Kolonien für intestinale Enterokokken ergab im qPCR-Test auf *E. faecalis* oder *E. faecium* immer positive Ergebnisse (nicht dargestellt). Der Parameter intestinale Enterokokken ist damit vom Methodischen her für eine mikrobiologische Evaluierung des hygienischen Status des Gärrests gut geeignet.

In den Proben aus der Berblinger Vorgrube lagen die intestinalen Enterokokken im Mittel im Bereich  $1,9 \times 10^4$  bis  $1,1 \times 10^5$  / g FG und damit im unteren Bereich der entsprechenden Ergebnisse von  $7,5 \times 10^3$  -  $3,8 \times 10^6$  Fäkalstreptokokken / mL (FINK et al., 1997) und  $2,3 \times 10^3$  -  $4,3 \times 10^6$  Fäkalstreptokokken / g (MEYER et al., 1999) und mehr als 1 log-Stufe niedriger als die bei GELDREICH (1978) beschriebenen  $1,3 \times 10^6$  KBE Fäkalstreptokokken / g Rinder-Faeces. Die Summe der qPCR-Werte für *E. faecalis* und *E. faecium* lag in den Proben der Vorgrube (äquilibrierte Verhältnisse, kaum abgestorbene Zellen, s. B 3.1.1.1) im Mittel etwa 5 mal so hoch wie die KBE-Werte für intestinale Enterokokken (Abbildung 63, Abbildung 65). Es wurden eher höhere KBE-Werte für intestinale Enterokokken erwartet, da hier neben *E. faecalis* und *E. faecium* auch *E. hirae* miterfasst werden sollte, der bei Rindern neben *E. faecium* als dominant beschrieben wurde (KÜHN et al., 2003) aber nicht in den qPCRs für *E. faecalis* und *E. faecium* reagierte. Dies weist auf eine Unterbestimmung (Faktor  $\geq 5$ )

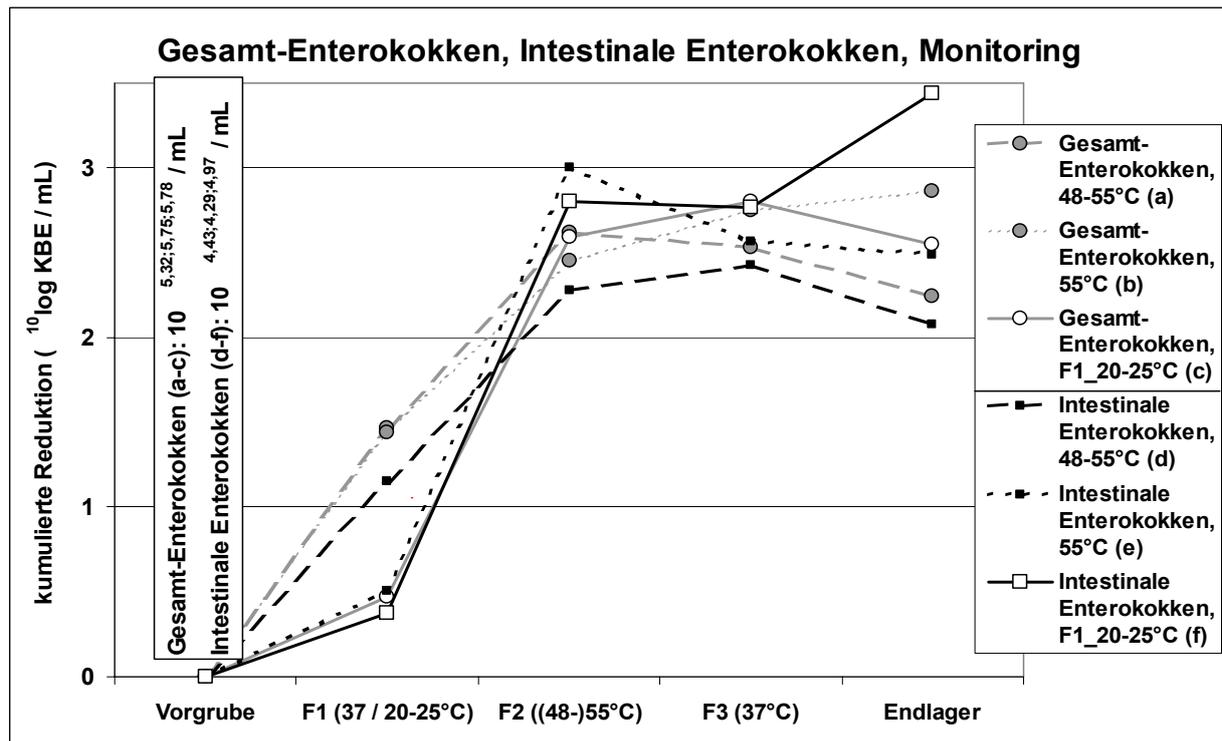
intestinaler Enterokokken durch die Membranfiltrationsmethode ISO / DIS 7899-2 hin. Ob die nicht erfassten intestinalen Enterokokken aus den Vorgruben-Proben als ABNC (LLEÒ et al., 2001) vorgelegen haben, oder ob andere Gründe (z.B. behinderte Nährstoff-Diffusion durch die Filter) verantwortlich waren, muss Gegenstand weiterer Forschung sein.



48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. B 3.1). Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt und relevante Vorschläge, Richtlinien und Belastungsniveaus skizziert.

Abbildung 63: Gesamt- und intestinale Enterokokken sowie *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* (qPCR), Pilotanlage Berbling, Monitoring

Nach Durchgang durch den thermophilen Fermenter F2 bei gesicherten 55°C lagen die Werte für intestinale Enterokokken immer unter der Marke von  $1 \times 10^2$  (intestinalen) Enterokokken / mL (LARSEN et al., 1994) und damit um mehr als eine Zehnerpotenz unter dem Vorschlag von PHILIPP (2002) mit  $5 \times 10^3$  Fäkalstreptokokken / g für Gärrest aus Anaerobbehandlung (Abbildung 63, Abbildung 65). Eine Reduktion auf die Grundbelastung in Sickerwässern ungedüngter Ackerflächen von etwa 35 KBE 'fäkale Streptokokken' / mL (WEIß und POPP, 2004) wurde nur direkt nach dem F2 nach gesicherten 55°C erreicht, danach lagen die Gehalte geringfügig darüber. Bis auf die 2 Darmenterokokken / mL der Badegewässerrichtlinie 2002/0254 (COD) gingen die Werte allerdings niemals zurück (Abbildung 63, Abbildung 65). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus stabilem Betrieb bei 55°C im F2 wurden bei suboptimalem Temperaturmanagement des F2 (48 - 55°C) 200 intestinale Enterokokken / g FG zumeist überschritten, in einem Fall wurden auch 500 intestinalen Enterokokken / g FG erreicht. Im mesophil betriebenen Fermenter F1 wurde in Einzelfällen auch die o.g. Marke von  $5 \times 10^3$  intestinalen Enterokokken / g FG überschritten (Abbildung 63, Abbildung 65).



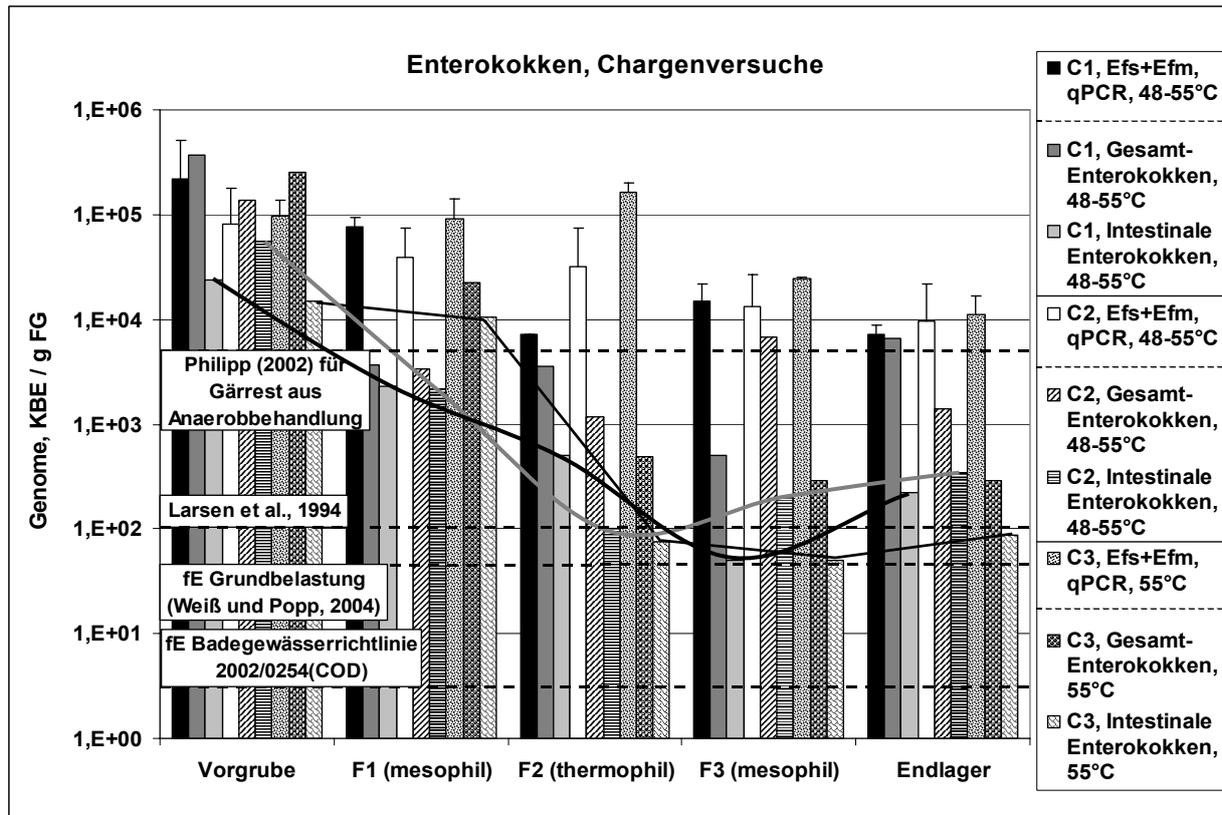
48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. B 3.1); F1\_25°C: nach Umstellung des F1 auf psychrophilen Betrieb (s. B 2.1.1.1).

Abbildung 64: Gesamt- und intestinale Enterokokken im Monitoring, kumulierte Reduktion, Berblinger Pilotanlage

Die Reduktion der intestinalen Enterokokken durch den mesophilen Fermenter F1 war mit 0,15 - 2,05 log-Stufen relativ gering. Nach Durchgang durch den thermophilen Fermenter F2 lag die Reduktion bei gesicherten 55°C im Bereich 2,5 - 3,3 log-Stufen (Abbildung 64, 21) und damit meist unterhalb der von LARSEN et al. (1994) als ausreichend eingestufte Reduktion (intestinaler) Enterokokken um 3 - 4 log-Stufen. Bei psychrophilem Betrieb des F1 (Intestinale Enterokokken, F1\_20-25°C in Abbildung 64), der kaum Reduktion intestinaler Enterokokken bewirkte, ergab sich durch den thermophilen F2 eine Reduktion der intestinalen Enterokokken um 2,39 log-Stufen. HOFERER (2001) beschreibt für *E. faecium* DSM 2146<sup>T</sup> einen D-Wert (T<sub>90</sub>-Wert) bei 55°C in Rindergülle von 1,70 h. Rechnerisch ergibt letztere Angabe, dass zu einer Reduktion um 2,39 log-Stufen nur 4,06 h bei 55°C in Rindergülle nötig sein sollten. Bereits bei der minimal gesicherten Verweilzeit von 8 - 9 h im F2 (Tabelle 56) hätte sich nach dem D-Wert von HOFERER (2001) rein rechnerisch durch den F2 der Berblinger Pilotanlage bei den intestinalen Enterokokken eine Reduktion um 5 log-Stufen zeigen sollen.

Eine Diskrepanz besteht allerdings nur vordergründig. Sensitivitätsunterschiede zwischen dem dotierten Laborstamm und den nativen Enterokokken bestehen wohl nicht (HOFERER, 2001), und die errechnete freie NH<sub>3</sub>-Konzentration entsprach mit im Mittel 600 mg / L im F2 (EFFENBERGER et al., 2006) in etwa den Angaben (582 mg / L) von HOFERER (2001) für die Vergärung von Rindergülle bei 55°C. Vielmehr lassen sich in der Inaktivierungskinetik sowohl von *E. faecium* (HOFERER, 2001) als auch von nativen intestinalen Enterokokken (O'REILLY and COLLERAN, 2004) zwei verschiedene Phasen beobachten, initial ein schnelles Absterben, für das HOFERER (2001) den D-Wert von 1,70 berechnete, und anschließend ein Stagnations-Plateau auf niedrigem Niveau, das bei HOFERER (2001) wie in den eigenen Ergebnissen im Bereich 10<sup>1</sup> - 10<sup>2</sup> KBE / mL lag und offenbar nur mit härteren Maßnahmen wie Pasteurisierung (O'REILLY and COLLERAN, 2004) unterschritten werden kann. Ein

solches 'Tailing' beschreiben auch UGWUANYI et al. (1999) u.a. für *Enterococcus faecalis* und führen es u.a. auf die Präsenz besonders thermotoleranter Subpopulationen zurück.



C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3 (s. Text); Efs+Efm: *Enterococcus faecalis* + *E. faecium*. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt und relevante Richtlinien skizziert.

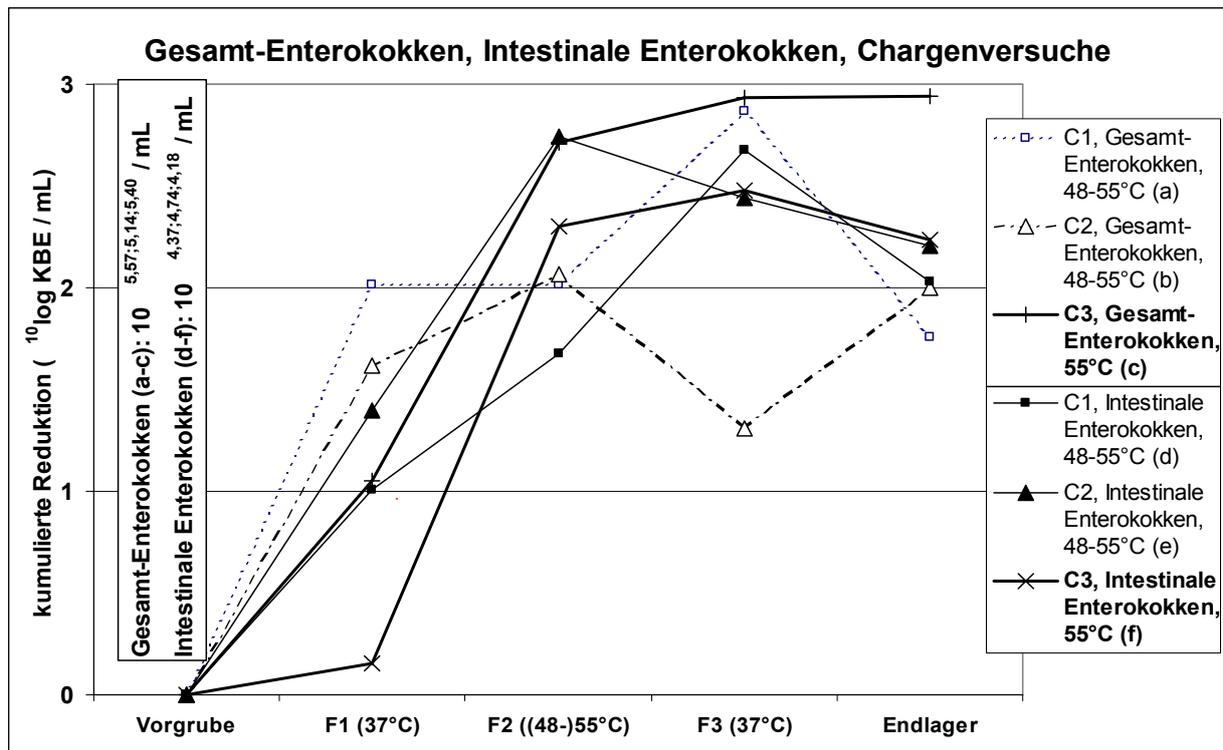
Abbildung 65: Gesamt- und intestinale Enterokokken sowie *Enterococcus faecalis* und *E. faecium* (qPCR), Pilotanlage Berbling, Chargenversuche

Da die intestinalen Enterokokken im F1 nur  $10^{4,53}$  KBE / g FG betragen (Intestinale Enterokokken, F1\_20-25°C in Abbildung 64), konnten diese bestenfalls auch nur um 2,8 log-Stufen auf das Niveau  $10^{1,7}$  KBE / g FG reduziert werden. Dies spricht für eine sehr gute und den Angaben von HOFERER (2001) entsprechende Hygienisierungsleistung des thermophilen Berblinger F2. Im Berblinger F2 war das Basal-Plateau von etwa  $10^{1,7}$  KBE / g FG wahrscheinlich bereits nach einer Verweilzeit von etwa 4 h (s. oben) erreicht und änderte sich beim weiteren Durchgang nicht mehr. Demnach würden wahrscheinlich im Berblinger F2 in der vermuteten Verweilzeit der Hauptfraktion von 48 h (Tabelle 56) auch wesentlich höhere Eingangs-Gehalte an intestinalen Enterokokken auf das Niveau von etwa  $10^{1,7}$  KBE / g FG reduziert werden, was einen wesentlich höheren Betrag abgetöteter Zellen ergäbe als die beobachtete Differenz von etwa 3 log-Stufen. Dementsprechend erreichten O'REILLY und COLLERAN (2004) bei 55°C in  $\leq 24$  h sowie HOFERER (2001) nach 12 h eine Reduktion intestinaler Enterokokken in Rindergülle um etwa 7 log-Stufen.

Ähnlich wie für *E. coli*- und *Enterobacteriaceae*-DNA beobachtet (s. B 3.1.1, B 3.1.2), nahm die Anzahl der DNA-Kopien von *E. faecalis* und *E. faecium* im Vergleich zu den KBE von intestinalen Enterokokken bis zum Endlager nur unwesentlich ab (Abbildung 63, 20). Dies unterstreicht, dass über qPCR mit DNA als Zielmolekül nach lethalem Stress lebende Zellen massiv überschätzt werden. Die Methode eignet sich daher zwar hervorragend für äquilibrierte aber nicht für (partiell) lethal gestörte Systeme.

Zwischen den Ergebnissen vom Monitoring (Abbildung 63, Abbildung 64) und den Chargenversuchen (Abbildung 65, Abbildung 66) ergaben sich für die intestinalen Enterokokken keine nennenswerten Unterschiede. Im Endlager trat bei suboptimalen

Temperaturen im F2 (48 – 55°C) immer eine leichte Wiederverkeimung mit intestinalen Enterokokken auf, bei 55°C im F2 war sie mit maximal 0,5 log-Stufen unerheblich oder nicht vorhanden (Abbildung 64, Abbildung 66). Bei suboptimalen Temperaturen im F2 lagen auch die Keimzahlen der intestinalen Enterokokken im F3 und im Endlager im Mittel und in den Chargenversuchen überwiegend knapp über der Marke von  $10^2$  KBE / mL (LARSEN et al., 1994), während sie bei 55°C im F2 immer knapp unter dieser Marke und im Bereich der Hintergrundbelastung in Dränwässern ungedüngter Ackerflächen lagen (Abbildung 63, Abbildung 65). Aus den extrapolierten Ergebnissen ergibt sich im Zusammenhang, dass bei einem entsprechend höheren Ausgangsniveau eine Reduktion intestinaler Enterokokken um 5 log-Stufen innerhalb der gesicherten minimalen Verweilzeit von 8 - 9 h erhalten worden wäre. Aus den Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass die Berblinger Fermenterkette, besonders der thermophile F2, bei gesichertem Betrieb bei 55°C geeignet war, auch intestinale Enterokokken ausreichend abzutöten.



C1, 2, 3: Chargen 1, 2, 3; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. B 3.1); F1\_25°C: nach Umstellung des F1 auf psychrophilen Betrieb (s. B 2.1.1.1).

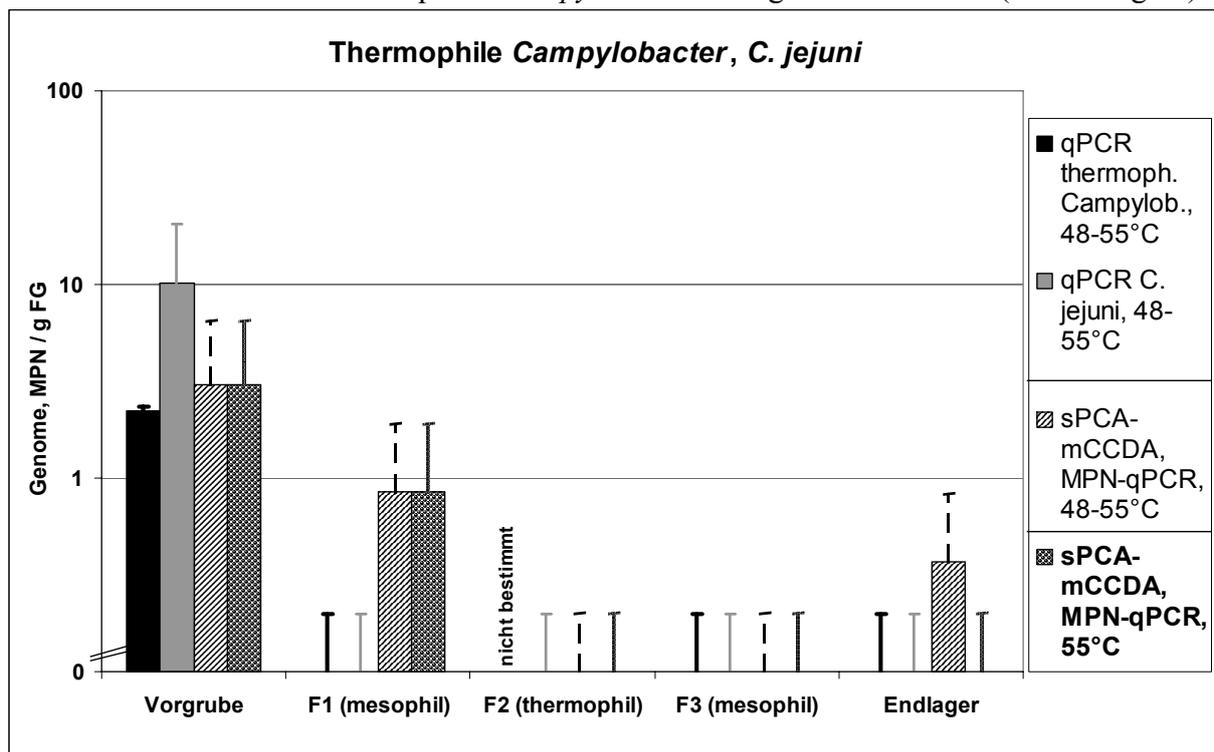
Abbildung 66: Gesamt- und intestinale Enterokokken, kumulierte Reduktion in den Chargenversuchen, Berblinger Pilotanlage

Obwohl die Bestimmung der intestinalen Enterokokken 2 Tage dauert, also viel Zeit vergeht bevor in der Praxis auf eventuell nötige Eingriffe reagiert werden kann, ist der Parameter infolge seiner Robustheit und wegen der Thermotoleranz und Tenazität der intestinalen Enterokokken sehr geeignet, den Hygienisierungserfolg der (thermophilen) anaeroben Vergärung zu dokumentieren. Hervorzuheben ist dabei, dass die Empfindlichkeit veterinärmedizinisch besonders wichtiger Viren, wie die Erreger der klassischen Schweinepest, der Aujeszky'sche Krankheit, der vesikulären Schweinekrankheit, der afrikanischen Schweinepest, der Maul- und Klauenseuche, von Polio- und Rotaviren sowie der meisten enteropathogenen Bakterien (außer Sporenbildner) bei der Vergärung von Rindergülle bzw. gegenüber 55°C größer ist als die der intestinalen Enterokokken (HOFERER, 2001; PHILIPP, 2002). Auch UGWUANYI et al. (1999) fanden, dass *E. faecalis* bei der thermophilen anaeroben Vergärung von landwirtschaftlichem Abfall bei 55°C und 60°C einen höheren D-Wert als *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas*

*aeruginosa* and sogar als die als thermotolerant bekannte *Serratia marcescens* aufwies. Demzufolge wären die genannten Pathogenen in der Berblinger Pilotanlage allein durch die 55°C-Behandlung im F2 (potentiell) um mindestens 5 log-Stufen reduziert worden. Eine Reduktion um mindestens 5 log-Stufen konnte bereits nach 4 h 55°C für infektiöse Kryptosporidien-Oozysten nachgewiesen werden (s. B 3.1.8), und auch für die anderen untersuchten Parameter ließ sich aus den vorhandenen Daten eine Reduktion um mindestens diesen Faktor extrapolieren (s. B 3.1.4, B 3.1.5, B 3.1.9, B 3.1.10, B 3.1.11, B 3.1.12). Eine Ausnahme bilden die bakteriellen Sporenbildner, die allerdings im Prozessverlauf auch nicht (nennenswert) zunahm (s. B 3.1.6, B 3.1.7). Damit stellen die intestinalen Enterokokken einen idealen Indikator für die Hygienisierungseffizienz in Biogasanlagen dar. ERREBO LARSEN and MUNCH (1990) kamen zum gleichen Schluss. LARSEN et al. (1994) schlugen vor, dass eine dokumentierte Reduktion intestinaler Enterokokken um 3 - 4 log-Stufen auf ein Niveau von etwa  $10^2$  KBE / mL im Gärrest eine uneingeschränkte Verwendung des (entgasten) Gärrests in der Landwirtschaft ermöglichen soll. Ihr Vorschlag gewinnt im Zusammenhang mit den eigenen Befunden (s. oben, s. Abbildung 63, Abbildung 64, Abbildung 65, Abbildung 66) erneut Bedeutung.

### B 3.1.4 Thermophile *Campylobacter*

Analysen über qPCR-Bestimmung mit direkter Nukleinsäure-Extraktion aus dem Probenmaterial (s. B 2.3.3.2.3) wiesen auf eine sehr geringe Konzentration thermophiler *Campylobacter*-Arten im Vorgruben-Material hin. In den Fermentern und im Endlager konnte mit diesem Ansatz keine thermophiler *Campylobacter* nachgewiesen werden (Abbildung 67).



sPCA: selektives Preston *Campylobacter* Anreicherungsmedium; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. B 3.1)

Abbildung 67: Thermophile *Campylobacter* und *C. jejuni*, Monitoring, Pilotanlage Berbling

Da die qPCR-Bestimmung mit direkter Nukleinsäure-Extraktion aus dem Probenmaterial bei sehr geringen Keimzahlen (bzw. Konzentrationen des Zielmoleküls) aus statistischer Sicht problematisch ist bzw. Extraktions- und Messwiederholungen in kaum praktikablem Umfang erfordert (s. B 2.3.3.1), andererseits die direkte Plattierung von Probenmaterial auf mCCDA-Agar wegen Bildung starker Hintergrundmikroflora nicht erfolgreich war, wurde der

Plattierung eine MPN-Anreicherung aus seriellen Verdünnungen vorgeschaltet (sPCA, s. B 2.3.2.3). Die auf mCCDA erhaltenen Kolonien wurden mittels spezifischer qPCR auf Zugehörigkeit zur Gruppe der thermophilen *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*) getestet und aus den positiven und negativen Platten die MPN bestimmt (s. B 2.3.3.2.3).

Abbildung 67 zeigt, dass eine leichte Reduktion thermophiler *Campylobacter* bereits im mesophilen F1 der Berblinger Pilotanlage stattfand, und im thermophilen F2 sowie im nachgeschalteten mesophilen F3 keine thermophilen *Campylobacter* mehr nachgewiesen werden konnten. Bei suboptimalen Temperaturen im F2 (48 - 55°C) waren thermophile *Campylobacter* im Endlager in nur einer von 5 analysierten Proben in sehr geringer Konzentration vorhanden, während bei gesicherten 55°C auch für die Endlagerproben alle Ergebnisse negativ waren. Dies spricht, ähnlich wie bereits zuvor diskutiert (s. B 3.1.1.5, B 3.1.2, B 3.1.3) dafür, die Vergärung thermophil und bei gesicherten 55°C durchzuführen, wenn der Gärrest in sensiblen Zonen oder Gebieten ausgebracht werden soll.

In der Literatur ist *C. jejuni* eher als wenig thermotolerant beschrieben (USFDA, 2000), besonders wenn landwirtschaftliche Abfälle und Gülle thermophil vergoren werden (UGWUANYI et al., 1999). Es ist nicht zu erwarten, dass die anderen Species des thermophilen *Campylobacter*-Komplexes wegen ihrer sehr ähnlichen Ökologie wesentlich resistenter als *C. jejuni* sind, allerdings wäre ein entsprechender Nachweis wünschenswert. Die D-Werte für *C. jejuni* lagen bei 55°C im Bereich 0,62 - 2,22 min (UGWUANYI et al., 1999; USFDA, 2000) und waren damit um den Faktor 8 - 50 kleiner als die Werte für *E. faecium* bzw. *E. faecalis* (UGWUANYI et al., 1999; HOFERER, 2001). Demzufolge wären thermophile *Campylobacter* in der Berblinger Pilotanlage allein durch die 55°C-Behandlung im F2 (potentiell) um mindestens 5 log-Stufen reduziert worden. Die thermophilen *Campylobacter* sind damit bei der thermophilen Vergärung kein kritischer Parameter und mit dem Indikator intestinale Enterokokken bei Weitem ausreichend abgedeckt.

### **B 3.1.5 *Yersinia enterocolitica***

*Yersinia enterocolitica* wurde quantitativ über MPN-qPCR nach Voranreicherung Ossmer-Bouillon und Plattierung auf CIN-Agar bestimmt (s. B 2.3.2.4) sowie über qPCR nach DNA-Extraktion direkt aus den Proben (s. B 2.3.3.2.3).

Mit vorgeschalteter selektive Anreicherung war der qPCR-Test auf *Y. enterocolitica* für die auf CIN-Agar gewachsenen (typischen) Kolonien für keine der analysierten Proben der Berblinger Biogasanlage positiv. Demnach hätten selbst in der Vorgrube weniger als 1 *Y. enterocolitica* pro g FG vorgelegen. Die Ergebnisse aus dem qPCR-Nachweis über direkte DNA-Extraktion aus den Proben wiesen allerdings etwa  $10^2$  *Y. enterocolitica*-Genomen / g FG in der Vorgrube und im mesophilen F1 aus (Abbildung 68), allerdings war nur ¼ der Proben aus der Vorgrube qPCR-positiv. Möglicherweise hatten die selektiven Zusätze bei den Kultivierungsschritten das Wachstum von *Y. enterocolitica* gehemmt. Die Gülle oder die Bedingungen in der Vorgrube könnten sublethale Effekte auf *Y. enterocolitica* gehabt haben, und möglicherweise wurden ABNC-Zellen gebildet, die sich nicht in der gegebenen Zeit bzw. unter den gegebenen Bedingungen kultivieren ließen. Wahrscheinlicher entsprachen die in der Vorgrube und im F1 gemessenen DNA-Gehalte abgestorbenen Zellen, da nach Durchgang durch den thermophilen F2 auch über die direkte qPCR keine *Y. enterocolitica*-Genome in den Kompartimenten der Berblinger Fermenterkette mehr nachweisbar waren (Abbildung 68). Die geringen Eingangskonzentrationen von *Y. enterocolitica*-DNA wurden offenbar im F2 abgebaut. Dies spricht dafür, dass die vor dem F2 gemessenen *Y. enterocolitica*-Genome aus abgestorbenen und weitgehend degradierten Zellen gestammt hatte, da DNA nur langsam abgebaut wird (s. B 3.1.1, B 3.1.2, B 3.1.3).

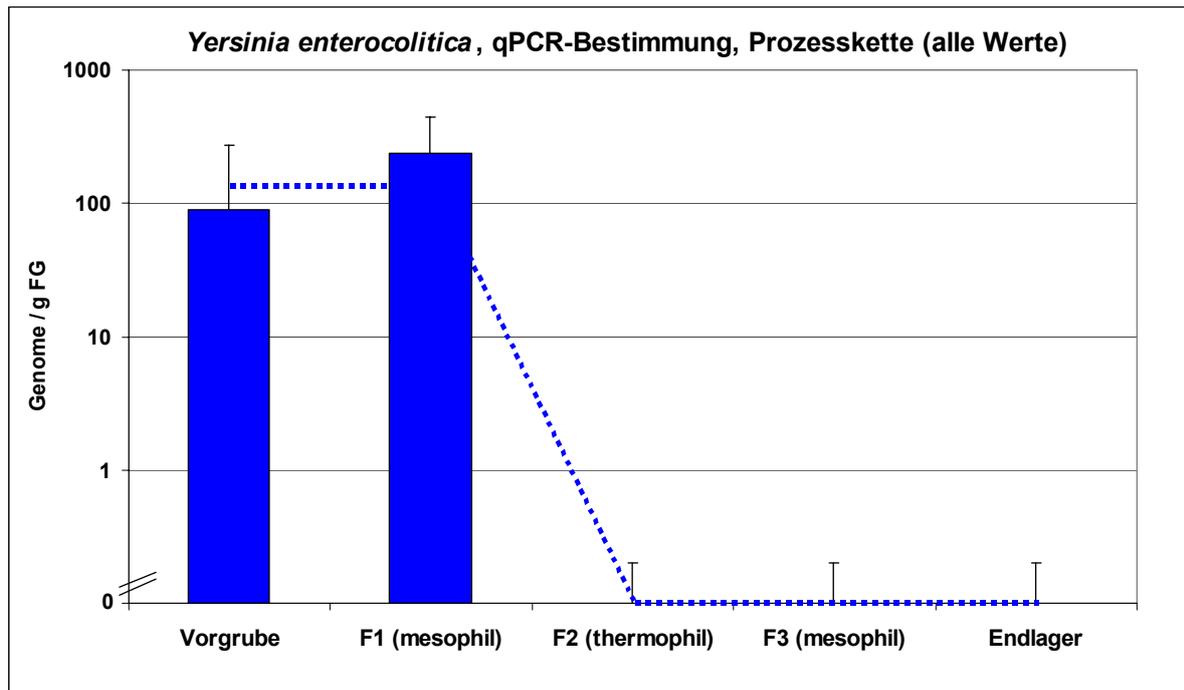


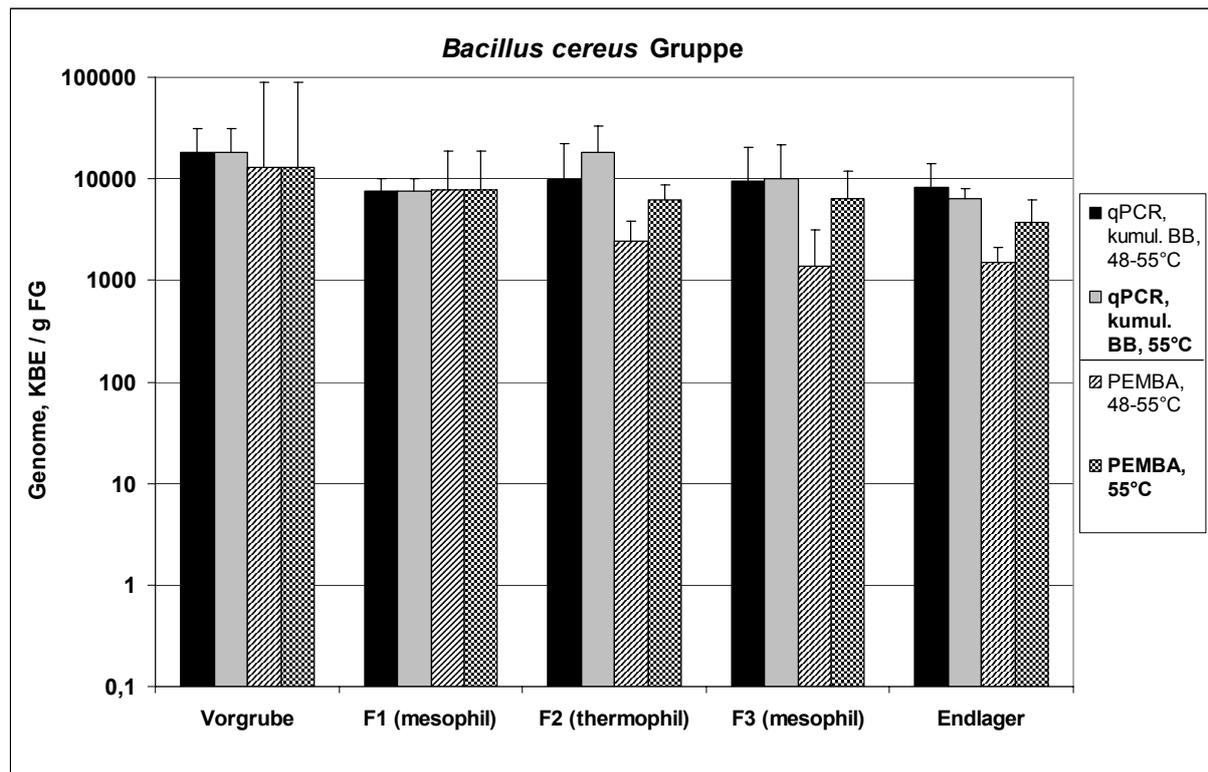
Abbildung 68: *Yersinia enterocolitica*, Monitoring, Pilotanlage Berbling

Bezüglich potentiellen hygienischen Gefahren bei Ausbringen des Gärrests ist *Y. enterocolitica* höchstwahrscheinlich ähnlich wie die thermophilen *Campylobacter*-Arten (s. B 3.1.4) ein unkritischer Parameter, da die für Inaktivierung von *Y. enterocolitica* bestimmten D-Werte bei 55°C im Bereich 0,03 - 0,05 h liegen (USFDA, 2000; LAKE et al, 2004), und damit um den Faktor 30 bis 50 kleiner sind als die D-Werte für intestinale Enterokokken (UGWUANYI et al., 1999; HOFERER, 2001). Demzufolge wäre *Y. enterocolitica* in der Berblinger Pilotanlage allein durch die 55°C-Behandlung im F2 (potentiell) um mindestens 5 log-Stufen reduziert worden. Die Inaktivierung von *Y. enterocolitica* ist damit bei Weitem ausreichend durch den Parameter intestinale Enterokokken als Indikator abgedeckt.

### B 3.1.6 *Bacillus cereus*-Gruppe

Die Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe (s. B 2.3.2.5) können verschiedene Toxingene in unterschiedlichem Ausmaß produzieren. Sie können zur Überdauerung ungünstiger Bedingungen Endosporen bilden und sind in diesem Zustand sehr resistent gegenüber Hitze und anderen Stressfaktoren (BROWN, 2000). Sie wurden direkt aus den Proben der Berblinger Vorgrube, der Fermenterkette und dem Endlager über Kultivierung auf PEMBA (s. B 2.3.2.5) sowie parallel zur Absicherung der Ergebnisse über qPCR (s. B 2.3.3.2) bestimmt.

Abbildung 69 zeigt praktisch identische Werte für die Analysen über qPCR und Kultivierung auf PEMBA. Dies spricht für annähernde Äquivalenz beider Techniken, obwohl die Auswertung spezifischer Kolonien auf PEMBA wegen teilweise starken Überwuchses durch Hintergrund-Mikroflora meist problematisch war (s. B 2.3.2.5). Eine methodische Problematik ergab sich innerhalb des qPCR-Ansatzes zuweilen auch beim 4-minütigen kumulativen Bead-Beating (nicht bei 30 s BB) infolge von Glasmilchbildung, die vermutlich durch Abrieb der Glaskugeln beim BB verursacht war. In diesen Fällen ergaben sich (fälschlich) negative qPCR-Ergebnisse, die vermutlich auf DNA-Sorption an die Glasmilch (Silika-Partikel mit großer Oberfläche) zurückzuführen war. Für beide Methoden sind daher Verbesserungen wünschenswert.



kumul. BB: kumulative Extraktion mit 4 min. Bead-Beating, s. B 2.3.3.1.1); 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. B 3.1)

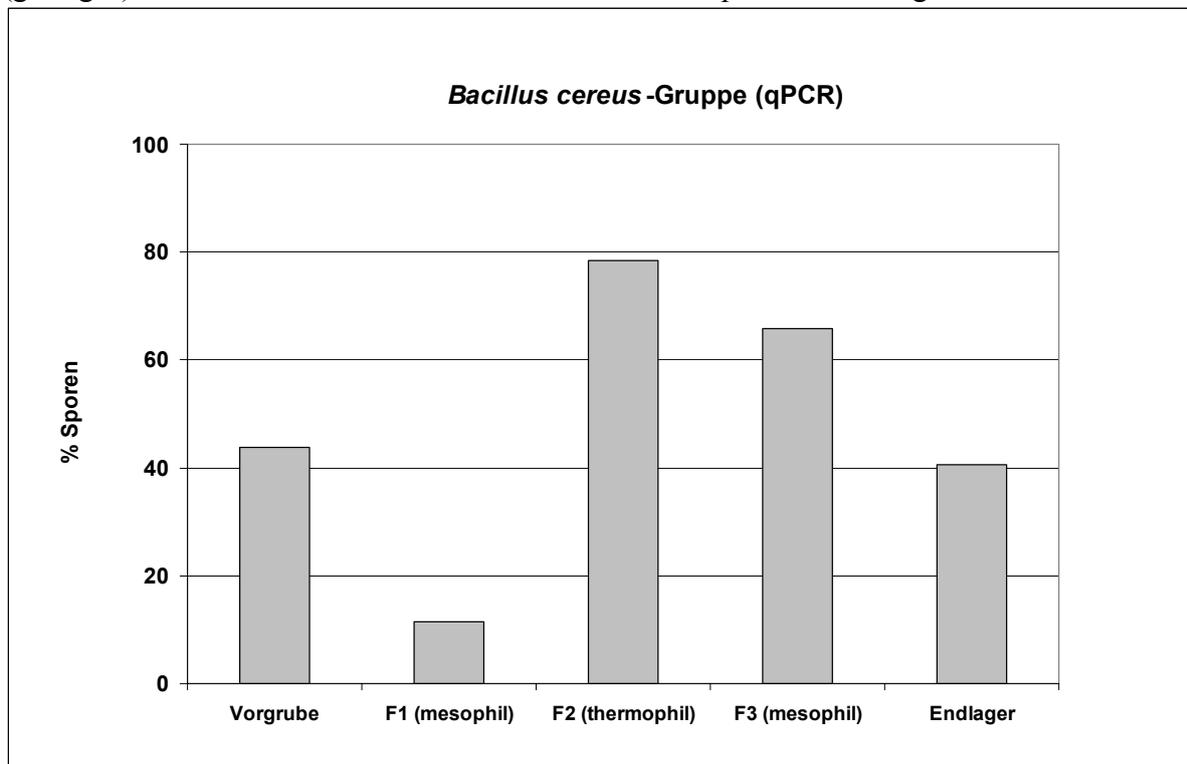
Abbildung 69: *Bacillus cereus*-Gruppe, Kultivierung und qPCR, Pilotanlage Berbling, Monitoring

In der Vorgrube fanden sich etwas über  $10^4$  KBE Vertreter der *B. cereus*-Gruppe (*BcG*) / g FG, was in dieser Höhe bei gesunden Tieren (s. B 2.1.1.1) nicht erwartet wurde. In der Literatur finden sich praktisch keine Daten zu *BcG*-Gehalten in Rindergülle. Die eigenen Ergebnisse lassen sich daher nur schwer einordnen.

Bis zum Endlager ergab sich eine marginale Reduktion der auf PEMBA bestimmten *BcG* um etwa 0,5 log-Stufen (Abbildung 69). Angesichts der ausgeprägten Hitzeresistenz der Sporen, die partiell sogar einige Minuten Abkochen überstehen (BROWN, 2000), war auch keine stärkere Reduktion zu erwarten. Entsprechend den eigenen Ergebnissen wurde *B. cereus* bei thermophiler Vergärung von Rinder- und Schweinegülle bei 53°C nicht reduziert (ERREBO LARSEN and MUNCH, 1990; BENDIXEN, 1999).

Die etwas geringeren auf PEMBA bestimmten *BcG*-Gehalte im F2, F3 und Endlager bei suboptimalen Temperaturen im F2 (48 - 55°C) könnten auf unter diesen Bedingungen verstärkte Sporulation zurückzuführen sein, da die qPCR-Werte im thermophilen F2 (55°C) entsprechend leicht erhöht waren (Abbildung 69). Möglicherweise keimt nur eine Fraktion der Sporen unter den gewählten Inkubationsbedingungen auf PEMBA aus, während das harsche, insgesamt 4 min währende Bead-Beating (BB) während der kumulativen Extraktion (s. B 2.3.3.1.1) offenbar auch bakterielle Sporen aufbricht, und damit über qPCR wahrscheinlich (annähernd) die gesamte Population erfasst wird. Hierfür spricht, dass vegetative gramnegative sowie grampositive Bakterien nach 30 s BB quantitativ aufgeschlossen wurden (s. B 3.1.1.1, B 3.1.1.3, B 3.1.2, B 3.1.3), während für die *BcG*-Gruppe durch das kumulative BB im Mittel 2,15 mal mehr *BcG*-Vertreter detektiert wurden als nach 30 s BB. Darauf, dass im thermophilen F2 eine Sporulation verstärkt stattgefunden hat, weist das besonders dort hohe Verhältnis der Ausbeute an *BcG*-Vertretern nach kumulativem 4 min. BB gegenüber 30 s BB hin, aus dem der prozentuale Gehalt an Sporen errechnet wurde (Abbildung 70). Danach verringerte sich dieses Verhältnis, was auf relative Zunahme vegetativer Zellen hindeutet. Gleichzeitig vergrößerte sich das Verhältnis qPCR /

PEMBA-detektierte *BcG*-Vertreter (Abbildung 69) etwas, was auf leichtes Absterben (ca. 0,5 log-Stufen) dieser vegetativen Zellen schließen läßt. Demnach hat im thermophilen F2 Sporulierung aber keine Inaktivierung der *BcG*-Vertreter stattgefunden, während ein (geringes) Absterben in den Stationen nach dem thermophilen F2 erfolgt ist.



Der prozentuale Gehalt an Sporen wurde aus dem Verhältnis vegetative Zellen + Sporen (4 min. kumulatives Bead-Beating) zu vegetativen Zellen (30 s Bead-Beating) errechnet

Abbildung 70: Prozentualer über differentielles Bead-Beating ermittelter Gehalt an Sporen, *Bacillus cereus*-Gruppe, Pilotanlage Berbling, Monitoring

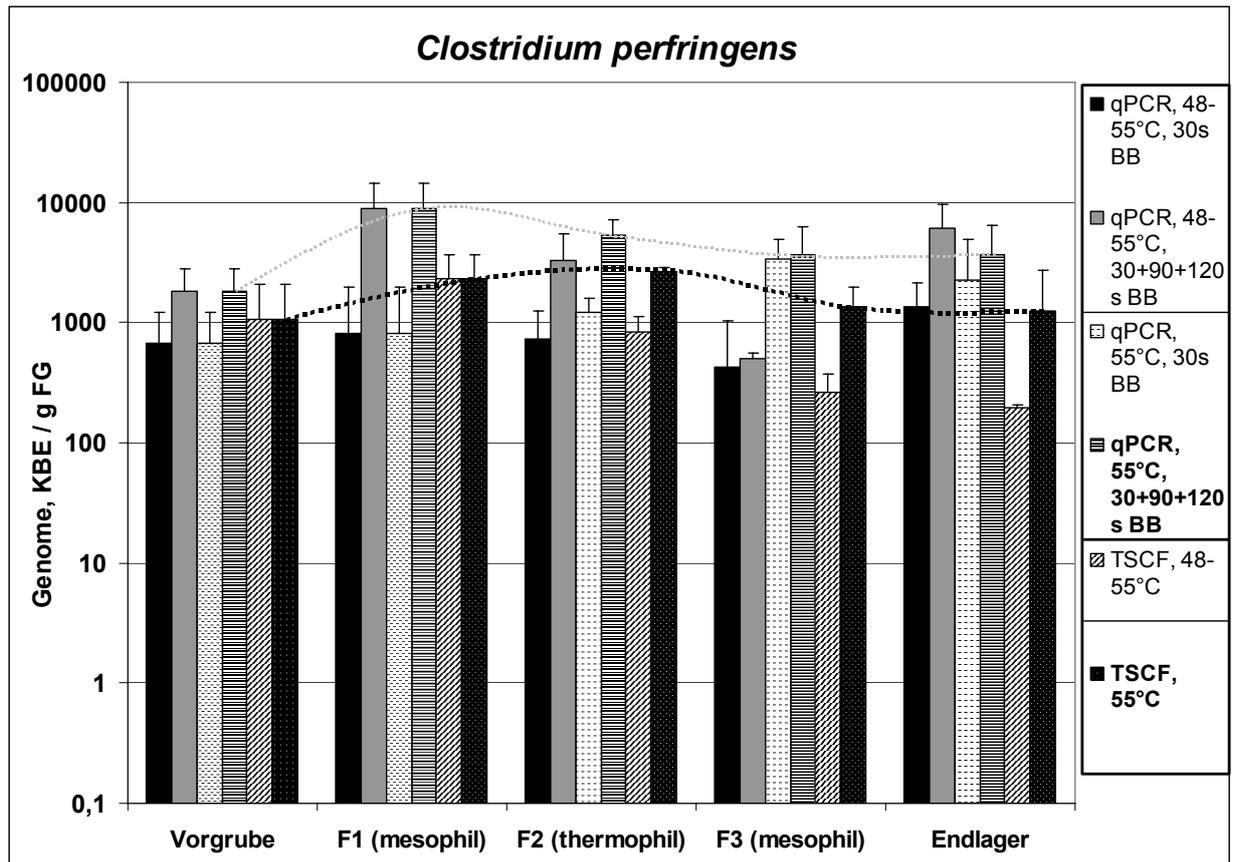
Eine nennenswerte Vermehrung der *BcG*-Vertreter während der anaeroben Vergärung in der Pilotanlage Berbling kann anhand der in Abbildung 69 dargestellten Ergebnisse ausgeschlossen werden, eher trat bis zum Endlager eine (sehr geringe) Reduktion ein. Bei Düngung mit (empfohlenerweise verdünntem) Gärrest werden also in etwas geringerem Ausmaß als bei Gülle-Düngung ausgebracht. Erste vorläufige Bodenanalysen auf *BcG*-Vertreter ergaben weder für Gärrest- noch für Gülledüngung Unterschiede zu *BcG*-Gehalten im Boden der Wasserschutzzone I (s. B 3.2.4). Zur Zeit kann also davon ausgegangen werden, dass bei Gärrest- und Gülledüngung im empfohlenen Ausmaß keine Beaufschlagung durch Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe über das natürliche Maß hinaus stattfindet, allerdings wird empfohlen, über weiterführende regelmäßige Analysen diese Einschätzung abzusichern.

### B 3.1.7 *Clostridium perfringens*

Ähnlich wie *B. cereus* (s. B 3.1.6) ist *Clostridium perfringens*, der Erreger des Gasbrands, ebenfalls ein Toxin-produzierender Sporenbildner, lebt allerdings anaerob und zeigt ein Wachstumsoptimum im thermophilen Bereich (BROWN, 2000). Er findet sich ubiquitär im Boden und in den Faeces verschiedener Tiere sowie des Menschen (GELDREICH, 1978). Er ist Indikator für Verunreinigungen des Trinkwassers durch Oberflächen-Abschwemmungen und spielt daher als fakultativer Parameter in der Trinkwasserverordnung eine Rolle.

*C. perfringens* wurde im Koch'schen Plattengussverfahren in TSCF-Agar bestimmt, da ARAUJO et al. (2001, 2004) zeigten, dass diese gegenüber anderen Methoden insbesondere für die Sporen eine höhere Wiederfindungsrate aufweist (Faktor knapp 1,5 gegenüber mCP-Agar)

und spezifischer ist. Demnach entsprächen 1000 in TSCF-Agar bestimmte *C. perfringens* etwa 750 in mCP-Agar. Das chromosomale  $\alpha$ -Toxin-Gen *plc* wurde als Ziel der qPCR verwendet, da dieses in Einzelkopie in allen *C. perfringens* Toxinotypen (A - E) vorkommt (PETIT et al., 1999). Zur Erfassung vegetativer Zellen wurde eine Extraktion mit 30 s Bead-Beating (BB) durchgeführt, zur Erfassung der Gesamtpopulation (vegetative Zellen + Sporen) eine kumulative Extraktion mit insgesamt 4-minütigem BB in Intervallen (s. B 2.3.3.1.1, B 3.1.6).



30+90+120s BB: kumulatives (4 min) Bead-Beating; 48-55°C: Probenahmen vor Mitte Februar 2004; 55°C: Probenahmen nach Mitte Februar 2004 (s. B 3.1). Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt.

Abbildung 71: *Clostridium perfringens*, Monitoring, Pilotanlage Berbling

Ähnlich wie für die *B. cereus*-Gruppe (s. B 3.1) war auch für *C. perfringens* praktisch keine Reduktion zwischen Vorgrube und Endlager festzustellen (Abbildung 71). Die Werte lagen im Mittel mit etwa  $10^3$  KBE bzw. Genome / g FG am oberen Rand der Spanne der von ZETHNER et al. (2002) angegebenen 10 - 3000 KBE *C. perfringens* / g FG Rindergülle. GELDREICH (1978) fand mit 200 KBE *C. perfringens* / g Rindergülle ebenfalls etwas geringere Werte. Hier können methodische Unterschiede (s.o.) Ursache einer Unterbestimmung gewesen sein, natürliche oder Fütterungs-bedingte Variabilität könnten ebenfalls eine Rolle spielen. ERREBO LARSEN and MUNCH (1990) fanden annähernd  $10^4$  KBE *C. perfringens* / mL in (Gärresten von) verschiedenen biologischen Abfällen. Es sollte untersucht werden, ob zwischen einem höheren Besatz von Gülle mit *C. perfringens* und Fütterung mit Produkten tierischer Herkunft ein Zusammenhang besteht. In Gülle von Milchvieh, das ausschließlich auf pflanzlicher Basis ernährt wird, sind keine erhöhten Gehalte potentiell toxinogener bakterieller Sporenbildner wie *C. perfringens* zu erwarten, der Gärrest ist daher hinsichtlich dieser Parameter bei pflanzlicher Fütterung als unkritisch anzusehen. Den Hinweisen zufolge könnten allerdings bei Fütterung mit (anteilig) tierischen Produkten höhere Gehalte bakterieller Sporenbildner (Leitparameter *C. perfringens*) in Gülle und

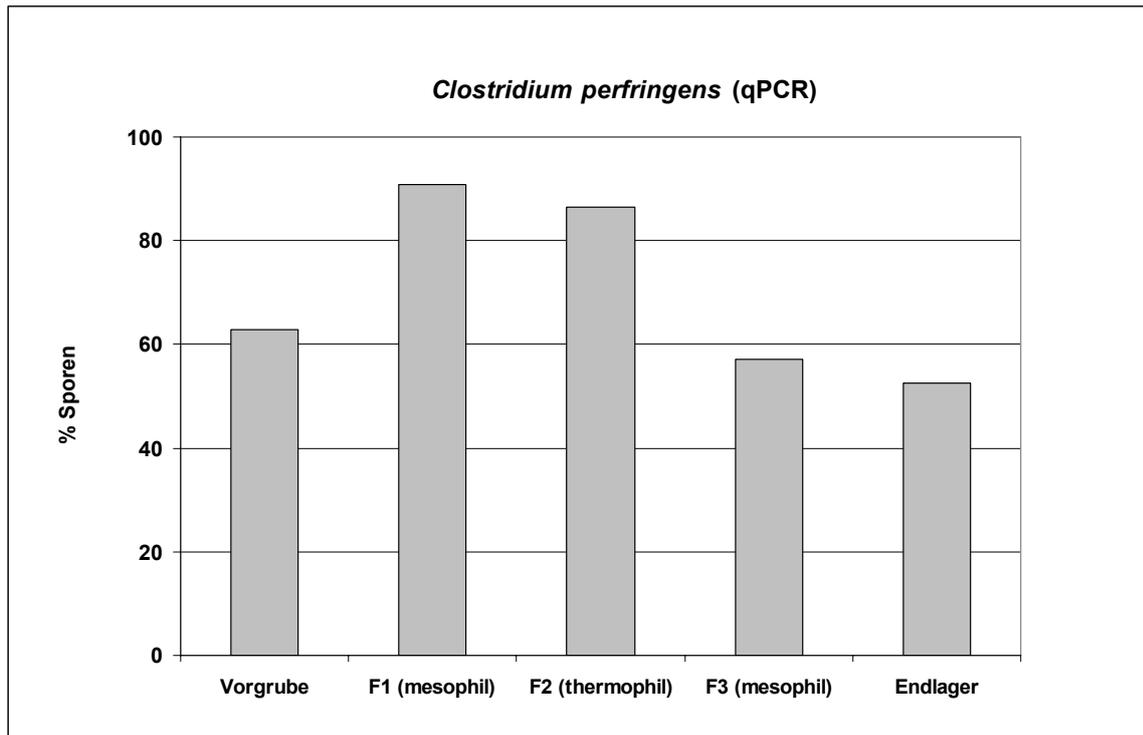
Gärrest auftreten, entsprechendes kann auch für Gärrest aus der Co-Vergärung mit anderem tierischem oder kontaminiertem pflanzlichen Material gelten.

In Fällen mit solchen Unsicherheiten ist anzuraten, das Eingangsmaterial und/oder den Gärrest auf *C. perfringens* zu überprüfen. Bei  $\geq 3000$  *C. perfringens* / mL (bzw. g FG) muss bei aktueller Kenntnislage von einer Kontamination (z.B. mit Kot von Fleischfressern) ausgegangen werden. Ein Gärrest mit solchen Gehalten an *C. perfringens* sollte nicht in sensiblen Gebieten wie der WZ II oder auch direkten Einzugsgebieten von Badegewässern ausgebracht werden (vgl. B 4.3, B 4.4), da sonst mit einer Anreicherung bakterieller Sporenbildner im Boden gerechnet werden muss bzw. eine Kontamination des Grundwasserstroms oder des Badegewässers nicht auszuschließen ist (s. B 3.2.5).

In keiner bekanntgewordenen Untersuchung konnte *C. perfringens* bisher durch anaerobe Vergärung reduziert werden (z.B. ERREBO LARSEN and MUNCH, 1990; BENDIXEN, 1999; ZETHNER et al., 2002), nicht einmal durch eine vorgeschaltete Pasteurisierung (O'REILLY and COLLERAN, 2004), was die eigenen Befunde (Abbildung 71) bestätigt. Ein sicheres Abtöten kann nur durch Dampfdrucksterilisation erreicht werden (BROWN, 2000), was für einen Landwirt nicht durchführbar ist. *C. perfringens*-Sporen bleiben in der Umwelt über Jahre, wahrscheinlich Jahrzehnte überlebensfähig (HILL et al., 1996) und können fäkale Verunreinigung indizieren (CONBOY and GOSS, 2001). Da *C. perfringens* aber ubiquitär in der Umwelt vorkommt (Trinkwasser sollte allerdings frei von *C. perfringens* sein) und die Verunreinigung wegen seiner langen Überlebensfähigkeit praktisch nicht zurückdatiert werden kann, ist er als Indikator für aktuelle fäkale Kontamination so gut wie wertlos (ASHBOLT et al., 2001).

Abbildung 72 zufolge fand besonders im mesophilen F1 und im thermophilen F2 Sporulation von *C. perfringens* statt, dabei nahm gleichzeitig auch die Gesamtpopulation der *C. perfringens* vorübergehend geringfügig zu (Abbildung 71). Im weiteren Verlauf ging die *C. perfringens*-Gesamtpopulation auf Werte um oder unwesentlich unter das Ausgangsniveau zurück, und gleichzeitig sank der Anteil der Sporen wieder auf etwa 50 % (Abbildung 71, Abbildung 72). Abbildung 71 zufolge schienen konstante Temperaturen von 55°C im thermophilen F2 die *C. perfringens*-Gesamtpopulation eher leicht zu fördern, während bei 48 – 55°C wegen der leicht unterschiedlichen Entwicklungen der TSCF- und qPCR-Werte kein klarer Trend erkennbar war.

Die Quantifizierung von *C. perfringens* war nicht unproblematisch (vgl. B 2.3.2.6). Die in vielen Fällen bei der Kultivierung in TSCF erhaltene Ausbildung konfluenter Schwarzfärbung mit fluoreszierenden Rändern in den Agarplatten erlaubte häufig nur eine grobe Schätzung der Anzahl verantwortlicher Einzelkolonien. Gut auswertbare Platten ohne die konfluenten Bereiche hatten meist nur 1 – 5 für *C. perfringens* typische Einzelkolonien, die Auswertung war damit allerdings statistisch ziemlich unsicher. Die Problematik der Glasmilchbildung beim 4-minütigen kumulativen Bead-Beating mit vermuteter DNA-Sorption und (fälschlich) negativen qPCR-Ergebnissen ist bei B 3.1.6 genauer dargestellt. Wegen der guten Übereinstimmung der qPCR- und TSCF-Ergebnisse (Abbildung 71) kann dennoch davon ausgegangen werden, dass diese zuverlässig sind. Verbesserungen sind allerdings für beide Methoden wünschenswert.



Der prozentuale Gehalt an Sporen wurde aus dem Verhältnis vegetative Zellen + Sporen (4 min. kumulatives Bead-Beating) zu vegetativen Zellen (30 s Bead-Beating) errechnet

Abbildung 72: Prozentualer über differentielles Bead-Beating ermittelter Gehalt an Sporen, *Clostridium perfringens*, Pilotanlage Berbling, Monitoring

Zusammenfassend wird festgestellt, dass *C. perfringens* wegen seiner ausgesprochen hohen Tenazität auch bei konstanten 55°C und gesicherter minimaler Verweilzeit von 8 – 9 h nicht oder nur unwesentlich reduziert wird. Eine vorübergehende (marginale) Zunahme um 0,2 – 0,5 log-Stufen ging zum Endlager wieder zurück (Abbildung 71). *C. perfringens* zeigte also praktisch keine Veränderungen in der Populationsgröße und nur vorübergehende geringe Veränderungen in der Populationsstruktur während des mesophil-thermophil-mesophilen Biogas-Prozesses. Dies steht im Einklang mit den eingangs erwähnten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. *C. perfringens* kann damit nicht als Parameter zur Bestimmung der Effizienz von Hygienisierungsprozessen in Biogasanlagen empfohlen werden, und wurde aus den genannten Gründen auch nicht in die VERORDNUNG (EG) NR. 1774/2002 für Material der Kategorie 3 aufgenommen.

Dennoch wird *C. perfringens* als wichtiger Parameter angesehen. Eine Anreicherung bakterieller toxinogener Sporenbildner in der Umwelt sollte vermieden werden, besonders wenn dadurch eine Gefährdung des Grundwassers und von Lebewesen entstehen könnte. Aus den eigenen Analysen und den o.g. Berichten geht hervor, dass *C. perfringens* in Gülle von gesundem Milchvieh mit adäquater Grünfütterung sowie im Gärrest nach anaerober Behandlung im Bereich  $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  ( $3 \times 10^3$  über TSCF-Kultivierung) KBE / mL liegt. Dieser Wert könnte als vorläufige Zielgröße für eine Substrat- oder Produktprüfung angesehen werden, wenn hinsichtlich der Herkunft des Ausgangssubstrat Zweifel bestehen (s. oben).

Es wird angeraten, das Verhalten der Populationsgröße nicht nur von *C. perfringens* sondern auch von *C. botulinum* in Gülle und Gärrest sowie nach deren Ausbringung in verschiedenen Böden verstärkt wissenschaftlich zu untersuchen. Nach der Güll- und Gärrest-Ausbringung konnten die eigenen Ergebnisse dazu (s. B 3.2.5) allenfalls eine Momentaufnahme für *C. perfringens* und ein kleines Spektrum verschiedener Böden bieten. Dabei ergab sich kein klarer Trend, allenfalls zeichnete sich eine leichte Belastung bei Gülle-Düngung ab (s. B

3.2.5). Die Ergebnisse konnten bisher nur in eine vorläufige Belastungsklassifikation geordnet werden, da vor allem die natürliche Hintergrundbelastung in Böden noch ungenügend geklärt ist. Möglicherweise wird aufgrund entsprechender Daten zu fordern sein, dass *C. parfringens* (sowie u.U. auch *C. botulinum*) in bestimmten Güllen und Gärresten durch geeignete Maßnahmen generell vor einer landwirtschaftlichen Verwertung zu reduzieren ist (vgl. B 3.2.5).

### B 3.1.8 *Cryptosporidium parvum*

Der alte Species-Name *C. parvum* wird hier stellvertretend für *C. parvum* + *C. hominis* verwendet (s. B 2.3.2.7). Das qPCR-System war spezifisch für die humanpathogenen Arten *C. parvum* und *C. meleagridis* sowie für *C. wrairi*, dessen Wirtsspezifität noch ungenügend bekannt ist. Das qPCR-Monitoring erfasste damit alle humanpathogenen Kryptosporidien.

#### B 3.1.8.1 Monitoring, Berblinger Pilotanlage

Das Monitoring der Berblinger Pilotanlage auf *C. parvum* wurde ausschließlich mit dem qPCR-System (s. B 2.3.3.2, B 3.1.8) durchgeführt, da über diese Technik die Gesamtpopulation (lebende + tote) überwacht als Screening werden kann. Eindeutig positive Befunde wären über metabolische Tests (s. B 2.3.2.7.5, B 2.3.2.7.6, B 2.3.2.7.7, B 2.3.2.7.8, B 2.3.3.2.2) zu bestätigen

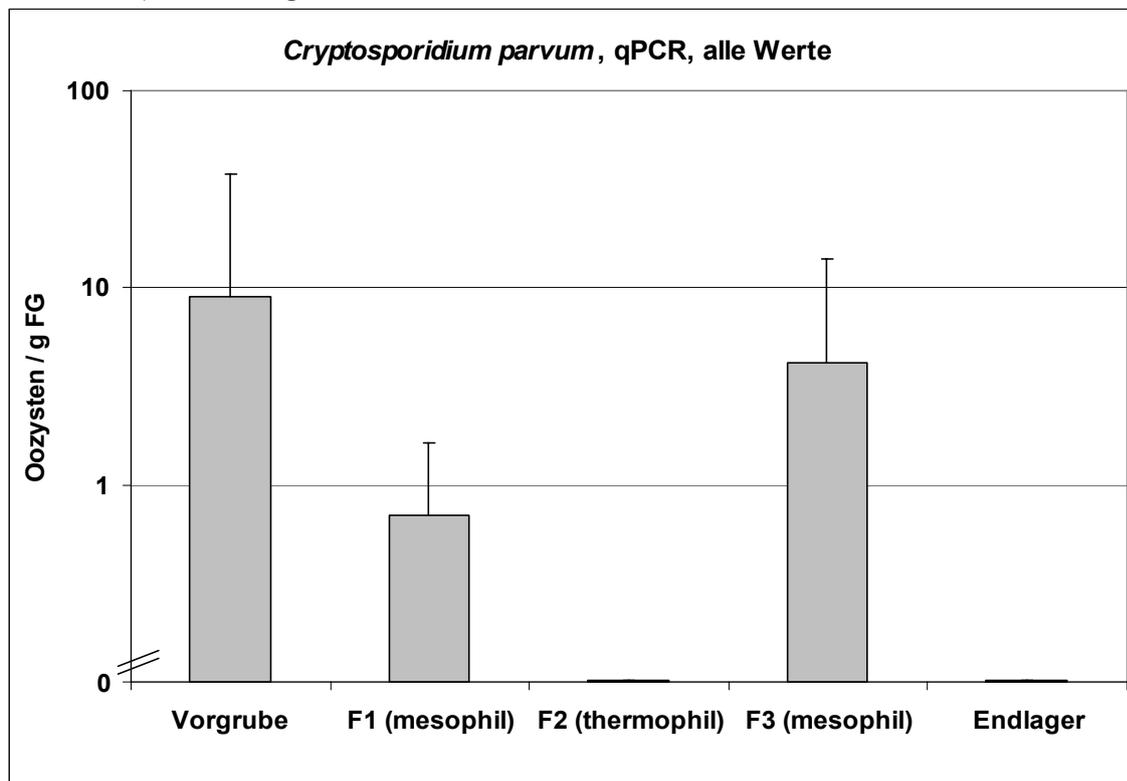


Abbildung 73: *Cryptosporidium parvum*-DNA, qPCR-Monitoring, Pilotanlage Berbling

gewesen, die wegen ihrer Aufwändigkeit im Routine-Screening nicht durchgeführt wurden. Abbildung 73 zeigt, dass in den Proben aus der Vorgrube und den Fermentern teilweise DNA-Spuren von *C. parvum* an der Nachweisgrenze (82,5 Oozysten bei 40  $\mu$ L extrahierter Michprobe) festgestellt wurden, in keinem Fall aber in den Endlager-Proben. Unterschiede zwischen suboptimalem (48 - 55°C) und optimalem Betrieb im F2 (gesicherte 55°C) konnten nicht festgestellt werden.

Da DNA in der Fermenterkette praktisch nicht abgebaut wird obwohl die Organismen abgestorben sein können (GARCÉS et al., 2005; LEBUHN et al., 2005; s. B 3.1.1 - B 3.1.7; Abbildung 77, Abbildung 78), und hohe statistische Unsicherheit bei sehr geringen

Konzentrationen des Ziel-Organismus in der (Misch-)Probe besteht, ist der positive Nachweis in einer von 6 Proben im mesophilen F3 in Abbildung 73 nicht verwunderlich. Dennoch sprechen die positiven Befunde dafür, dass entweder die von den Nachbarbetrieben zugeführte Gülle oder die des Betriebs Schweiger (ohne dass Symptome erkannt wurden, s. B 2.1.1.1) in Einzelfällen geringfügig kontaminiert war. Die unten dargestellten Ergebnisse zu metabolischen Parametern aus den Keimträgerexperimenten sowie der negative Nachweis für die Endlagerproben belegen aber, dass über den Gärrest wohl keine vitalen Oozysten ausgetragen wurden, während das für die ausgebrachte Gülle nicht gesagt werden kann.

### B 3.1.8.2 Keimträgerexperimente und Wasserbadversuche

#### **B 3.1.8.2.1 Wasserbadversuche**

In den Wasserbadexperimenten (s. B 2.3.1.2, B 2.3.2.7) zeigte sich für die Exzystierung eine 2-stufige Reduktions-Kinetik (Abbildung 74). Bei 55°C ergab sich eine sehr schnelle Reduktion der Exzystierbarkeit innerhalb 10 - 30 min auf 3,5 - 1,3 nicht-exzystierbare Oozysten und damit ein D-Wert von 8,76 min für die schnelle Inaktivierung. Die Anzahl nicht-exzystierbarer Oozysten blieb danach praktisch konstant (Abbildung 74).

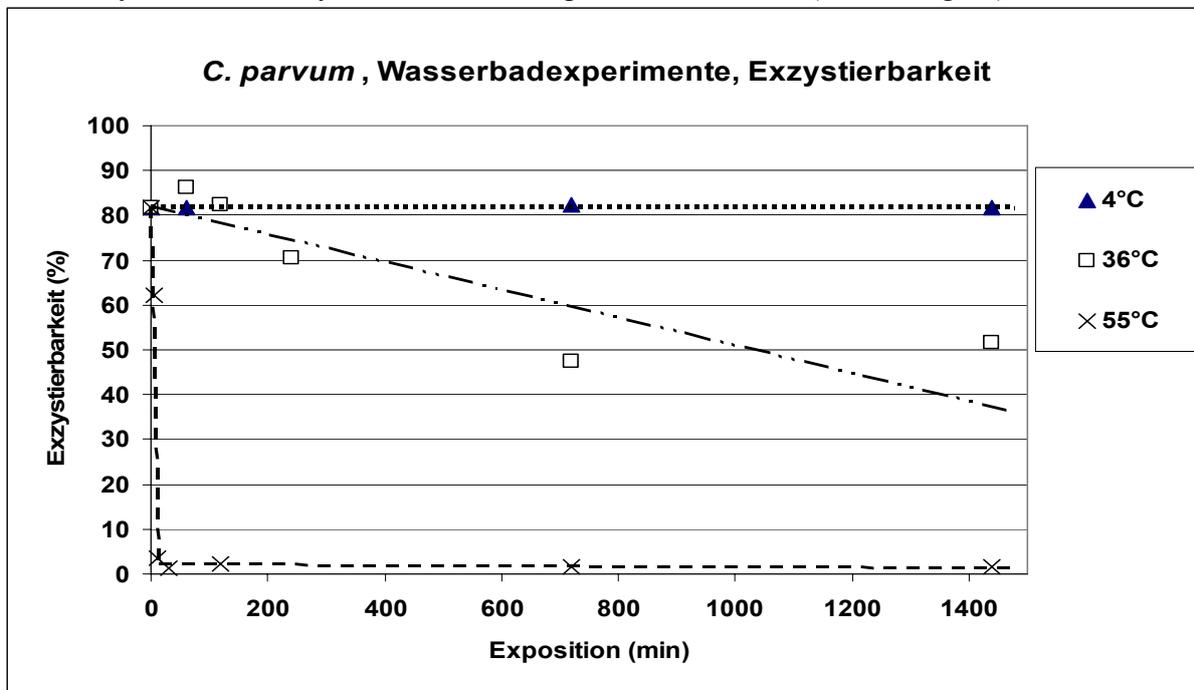
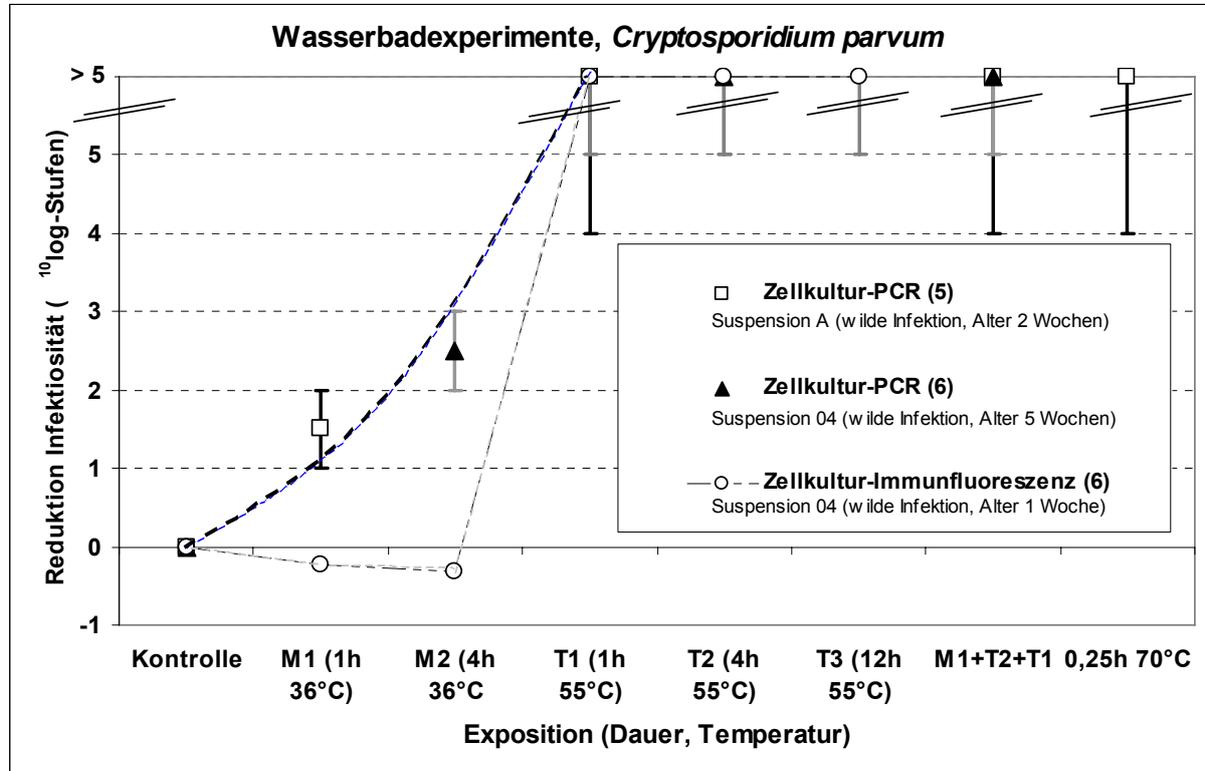


Abbildung 74: *Cryptosporidium parvum*, Wasserbadexperimente, Exzystierbarkeit in Abhängigkeit der Expositionszeit bei verschiedenen Temperaturen

Zellkultur-PCR (B 2.3.2.7.5) sowie Zellkultur-Immunfluoreszenz (B 2.3.2.7.6) zeigten bei 55°C eine Reduktion infektiöser Oozysten innerhalb einer Stunde um mehr als 5 log Stufen (Abbildung 75), was einer Reduktion um 1 log Stufe innerhalb < 12 min (D-Wert < 12 min) entspricht und damit etwa im Bereich der ersten, schnellen Inaktivierungs-Kinetik der Exzystierung (D-Wert zwischen 7 und 43 min; über Regression: 8,8 min,  $R^2=0,777$ ) liegt, die also wahrscheinlich als Surrogat die Inaktivierung anzeigen kann. Die residualen, nicht-exzystierbaren Oozysten in der zweiten Phase bei 55°C (ohne Veränderung) sind demnach ausschließlich nicht infektiös und abgetötet, und entsprechen einer Fraktion, um die die Exzystierung die Infektiosität nach Stress überbestimmt.

BUKHARI et al. (2000) berichten ebenfalls, dass nach Stresseinflüssen über Analyse der Exzystierbarkeit und der Membranintegrität infektiöse Oozysten überschätzt werden. NEUMANN et al. (2000) zeigten, dass in ungestressten Oozysten eine nicht-exzystierbare aber infektiöse Fraktion vorliegen kann. Auch in den eigenen Versuchen war eine solche Fraktion

zu erkennen (Abbildung 74). HOU et al. (2004) kamen trotz Optimierung der in-vitro-Exzystierung zu demselben Schluss. Sie folgerten, dass die Exzystierung kein geeigneter Parameter zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von *C. parvum*-Oozysten ist. Demnach wäre für eine realistische Beurteilung einer Gefährdung allein der Infektiositätstest (insbesondere mit menschlicher Zellkultur, s. B 2.3.2.7.4) bzw. ein daran standardisiertes Surrogat geeignet.



(5): maximal  $10^5$  Oozysten eingesetzt, daher nicht mehr als 4 log-Stufen Reduktion nachzuweisen; (6): maximal  $10^6$  Oozysten eingesetzt. Die farbigen Balken der Standard-Abweichungen stellen Detektionsgrenzen dar und bedeuten, dass die entsprechenden Werte innerhalb bzw. über diesen Schwellen lagen. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt.

Abbildung 75: *Cryptosporidium parvum*, Wasserbadexperimente, Infektiosität in Abhängigkeit der Expositionszeit bei verschiedenen Temperaturen

Bei 4°C sowie 20°C ergab sich innerhalb 24 h weder eine Reduktion der Exzystierbarkeit noch der Infektiosität. Bei 36°C waren nach 1 h die Exzystierbarkeit (Abbildung 74) und die über Zellkultur-Immunfluoreszenz bestimmte Infektiosität (Abbildung 75) leicht erhöht, danach ging die Exzystierbarkeit mit einem relativ geringen D-Wert von 83,3 h zurück. In Extrapolation wären damit 17,4 Tage zur mesophilen Reduktion vitaler Oozysten um 5 log-Stufen nötig, was allerdings schon aufgrund der Streuung der bisherigen Werte (Abbildung 74) zu bestätigen wäre. In der Literatur klaffen die entsprechenden Angaben mit D-Werten zwischen 8 h und keine Reduktion mesophil ebenfalls weit auseinander (GODFREE and FARRELL, 2005). Hierfür können etwas unterschiedliche Tenazitäten verschiedener und/oder verschieden alter Isolate verantwortlich sein. Dementsprechend wurden bei Verwendung verschiedener Isolate verschiedenen Alters sogar qualitativ verschiedene Infektiositätsergebnisse nach 1 h und 4 h Exposition bei 36°C erzielt (Abbildung 75): Diese Behandlungen steigerten die Infektiosität frischer (1 Woche alt) Oozysten etwas gegenüber gleichalten gelagerten, während sie ältere Oozysten schädigte. In der Literatur sind ähnliche Effekte der Alterung beschrieben (FAYER et al., 1998; BUKHARI et al., 2000; FAYER et al., 2000). Infektiositäts-Unterschiede zwischen den Oozysten aus den verschiedenen 'wilden' Infektionen können ebenfalls Ursache der verschiedenen Ergebnisse gewesen sein. Solche Unterschiede sind für verschiedene Kryptosporidien-Stämme bekannt (FAYER et al., 2000; ROSE et al., 2002; ROCHELLE, 2004).

Wegen der sehr unterschiedlichen Effekte im mesophilen Bereich (Abbildung 75) kann eine mesophile Behandlung ohne weitere Hygienisierungsstufe auf Basis der derzeitigen Datenlage keine Reduktion um mindestens 4,2 log-Stufen (WHO, 2004b) garantieren. Die mesophile Vergärung allein kann daher - auch im Zusammenhang mit den anderen Befunden dieser Studie - nicht gewährleisten, dass der Gärrest hygienisch einwandfrei ist, und kann damit auch nicht für eine Anwendung in Wasserschutzgebieten empfohlen werden.

Dagegen zeigen die Infektiositätstests im Wasserbad (Abbildung 75, Abbildung 76), dass die Reduktion um diese Spanne bereits bei  $\geq 1$ -stündigen gesicherten  $55^{\circ}\text{C}$  (und genügend hoher eingesetzter Oozysten-Konzentration) in allen getesteten Fällen erzielt wurde. Die Infektiosität frischer Oozysten wurde sogar um mehr als 5 log-Stufen reduziert. Abbildung 76 zufolge reichte allerdings das 1-stündige Einwirken von  $50^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad dazu nicht aus, und ein (langsam) Absterben begann bei 1 h Einwirkzeit erst bei  $44^{\circ}\text{C}$  (Abbildung 76). Bei  $47,5^{\circ}\text{C}$ , die bei Reaktor-Ausfällen durchaus erreicht werden (s. B 2.1.1.1), wären errechnet 3,24 h nötig, um die von WHO (2004b) empfohlene Reduktion um 4,2 log-Stufen zu erreichen. Ein entsprechender Puffer zumindest in diesem Ausmaß sollte bei der Verfassung von Richtlinien oder Empfehlungen zur Ausbringung thermophil behandelten Gärrests berücksichtigt werden, um bei (kurzfristigen) Reaktorausfällen ein Ausschleusen eventuell infektiöser Kryptosporidien ins Endlager zu verhindern.

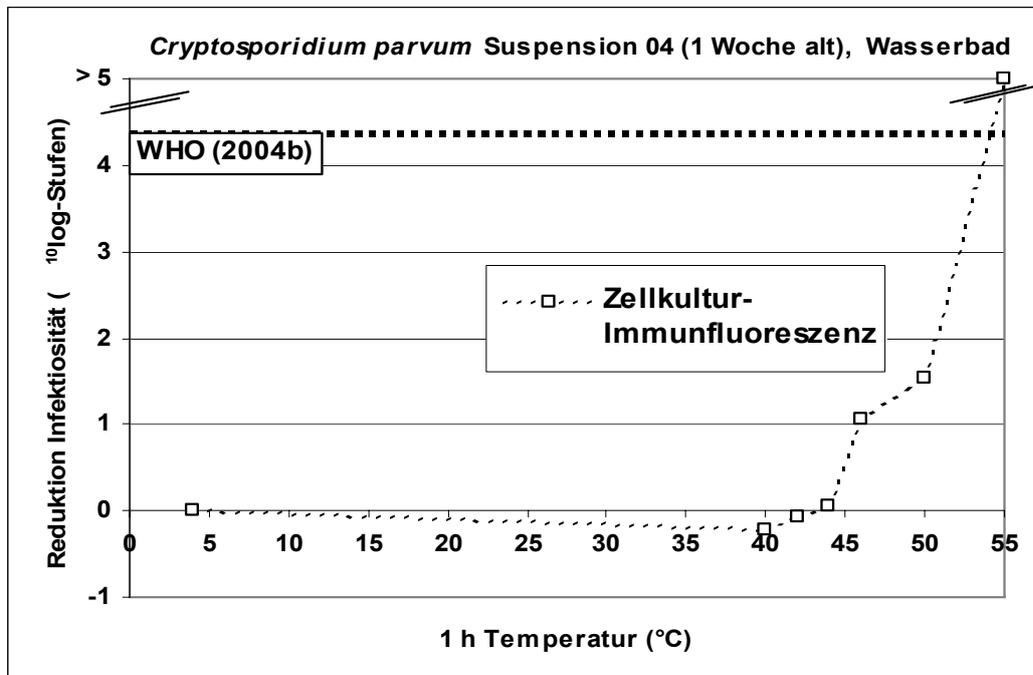


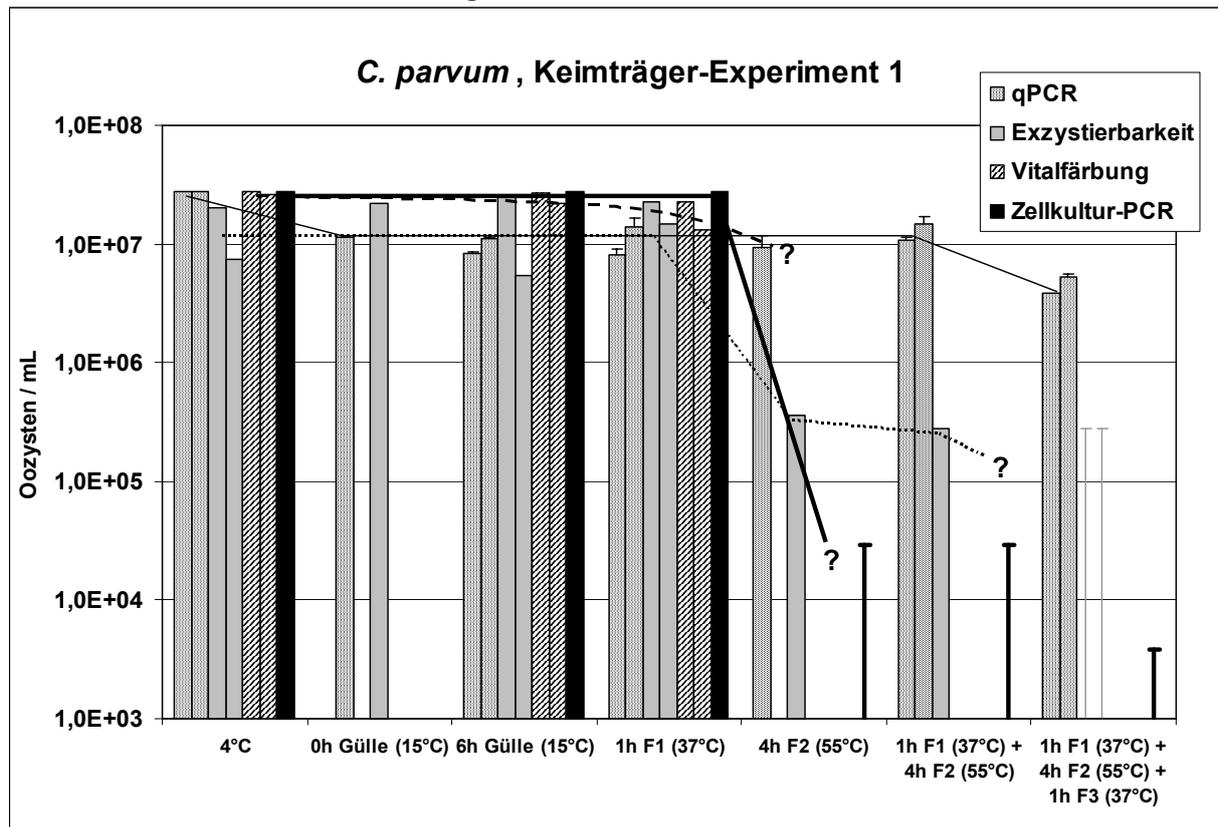
Abbildung 76: Einfluss 1-stündiger Einwirkzeit auf *Cryptosporidium parvum* Oozysten, Wasserbadexperiment

Den Daten aus den Wasserbadexperimenten zufolge weisen Oozysten von Kryptosporidien bei  $55^{\circ}\text{C}$  einen D-Wert von  $< 12$  min auf. Wegen der bioziden Einflüsse in Gülle und Gärrest (s. unten) sollte die Reduktionszeit in diesen Medien noch weiter verkürzt sein. Die Temperatur ist allerdings bei der Inaktivierung der dominierende Faktor (GODFREE and FARRELL, 2005). In jedem Fall sind Oozysten von Kryptosporidien deutlich empfindlicher als intestinale Enterokokken (D-Werte 60 - 102 min in Gülle). Um intestinale Enterokokken (in Gülle) um 4 log-Stufen zu dezimieren sind 4 - 6,8 h nötig (s. B 3.1.3), also wesentlich mehr als zum sicheren Abtöten der Kryptosporidien um über 5 log-Stufen. Die häufig als Surrogat für Parasiten verwendeten *Ascaris*-Eier zeigten D-Werte bei  $55^{\circ}\text{C}$  von nur 7 min (JONES and MARTIN, 2003) und wären damit ebenfalls wesentlich empfindlicher als intestinale Enterokokken. ERREBO LARSEN and MUNCH (1990) berichten, dass alle getesteten Parasiten-Eier nach 1 - 4 h Behandlung bei  $53^{\circ}\text{C}$  ihre Lebensfähigkeit verloren hatten. Die intestinalen

Enterokokken können damit als sicheres Surrogat für Kryptosporidien bei der Keimreduktion betrachtet werden.

### B 3.1.8.2.2 Keimträger-Experimente

In der Modellanlage (s. B 2.1.1.2) wurden 3 Keimträger-Experimente (s. B 2.3.2.7.2) durchgeführt, die sich in wesentlichen Punkten unterschieden: (i) der Art der Reinigung der Keimträgerinhalte, (ii) der Nachweismethode der Infektiosität und (iii) der Länge der Verweilzeiten in der einzelnen Kompartimenten.



Die Daten aus qPCR, Exzystierbarkeit (%), Vitalfärbung (%) und Zellkultur-PCR ( $10^5$  bzw.  $10^3$  bzw.  $10^4$  Oozysten eingesetzt, s. Text) wurden zur Vergleichbarkeit hochgerechnet auf den Gehalt an Oozysten in 1 mL Keimträger-Volumen. Die farbigen Balken der Standard-Abweichungen stellen Detektionsgrenzen dar und bedeuten, dass die entsprechenden Werte unter diesen Schwellen lagen. Zur Erleichterung der Interpretation sind charakteristische Prozessverläufe punktiert dargestellt.

Abbildung 77: *Cryptosporidium parvum*, Keimträger-Experiment 1, Modellanlage, qPCR, Exzystierbarkeit, Vitalfärbung und Zellkultur-PCR

In den ersten beiden Experimenten wurden die Keimträger-Inhalte über Kochsalzflotation gereinigt, die zum Teil sehr schlechte Wiederfindungsraten aufwies (s. B 2.3.2.7.1). Die im ersten Experiment (Abbildung 77) relativ hohen Werte für die metabolischen Parameter aus den meso- und thermophilen Behandlungen deuteten an, dass die Kochsalzflotation für vitale Oozysten selektierte. So ging z.B. die Exzystierbarkeit nach 4-stündiger 55°C Behandlung sowie bei 1 h 37°C + 4 h 55°C in Experiment 1 nur um ca. 81 % zurück (Abbildung 77), während nach der effizienteren Reinigung über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (s. B 2.3.2.7.3) nach diesen Behandlungen keine Oozysten mehr infektiös oder exzystierbar waren (Abbildung 78). Vergleichende mikroskopische Untersuchungen mit verschiedenen Reinigungstechniken stützten die Vermutung, dass vitale Oozysten durch Kochsalzflotation selektiv angereichert werden (M. Najdrowski, IPL Leipzig, persönl. Mitteilg.), und dadurch der Anteil lebender Oozysten in den entsprechenden Proben überschätzt wird. Zu den relativ hohen Werten für die metabolischen Parameter kann auch wesentlich beigetragen haben, dass

infektiöse Oozysten nach Temperatur-Stress über Bestimmung der Membranintegrität und der Fähigkeit zur Exzystierung überschätzt werden (s. B 3.1.8.2.1; BUKHARI et al., 2000).

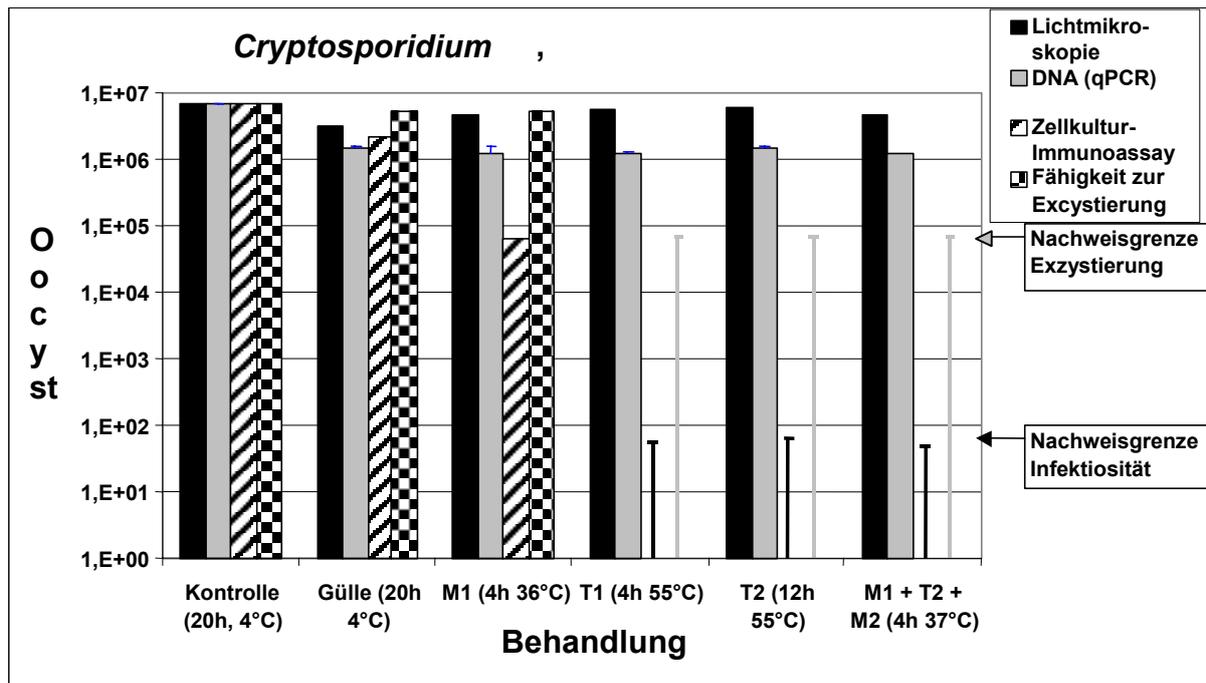
Wie in allen anderen Experimenten in dieser Studie beobachtet, nahm auch der *C. parvum*-DNA-Gehalt während der unterschiedlichen Behandlungen nicht oder nur marginal ab, während starke Reduktionen bei der Fähigkeit zur Exzystierung und der Infektiosität erkennbar waren (Abbildung 77, Abbildung 78). Auch hier zeigte sich also, dass sich qPCR hervorragend zur zuverlässigen spezifischen Quantifizierung der (DNA-) Gesamtpopulation eignet, die Ergebnisse aber keinen Aufschluss über den Anteil lebensfähiger Individuen in den Proben liefern können.

Zur Analyse auf Exzystierbarkeit werden gewöhnlich (nur) ca. 100 Oozysten untersucht. Deswegen kann auch keine Reduktion um über 2 log-Stufen dokumentiert werden (Nachweisgrenzen in Abbildung 77, Abbildung 78), selbst wenn ggf. stärker inaktiviert wurde. Zum Nachweis einer von der WHO (2004b) für *Cryptosporidium* vorgeschlagenen Reduktion um 4,2 log-Stufen, die nötig ist um ein tolerables Risiko bei der Wasseraufbereitung zu Trinkwasser zu erzielen, hätten also mehr als  $10^{4.2}$  Oozysten analysiert werden müssen, was praktisch nicht durchführbar ist. Selbst nach 4 h 55°C waren noch 1,3 % und nach 1 h F1 + 4 h F2 noch 1,0 % exzystierbare Oozysten vorhanden (Abbildung 77). MEYER et al. (1999) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Hier handelte es sich wohl um die in B 3.1.8.2.1 beschriebene, abgestorbene Restfraktion des 2-stufigen Abbaus (Abbildung 74). Die Zellkultur-PCR-Werte bestätigen, dass diese Oozysten-Fraktion nicht mehr infektiös war (Abbildung 77). Dies untermauert, dass infektiöse Oozysten nach Temperatur-Stress über Analyse der Exzystierbarkeit überschätzt werden (s. B 3.1.8.2.1).

Im ersten Experiment wurde zur Bestimmung der Infektiosität ein Zellkultur-PCR-Assay verwendet (s. B 2.3.2.7.5), während im dritten Experiment Infektiosität über einen Zellkultur-Immunfluoreszenz-Assay (s. B 2.3.2.7.6) bestimmt wurde. Mit der Zellkultur-PCR waren Infektiositäts-Unterschiede nur in ganzen log-Stufen darstellbar. Das kann neben der selektiven Anreicherung vitaler Oozysten dazu beigetragen haben, dass in Abbildung 77 nach 1 h mesophiler Behandlung keine Reduktion der Infektiosität über Zellkultur-PCR festgestellt wurde, während in Experiment 3 nach 1 h 37°C über den Immunfluoreszenz-Assay eine verminderte Infektiosität der Oozysten um 2 log-Stufen gemessen wurde (Abbildung 78). Das liegt etwas über entsprechenden Werten in der Literatur (FAYER et al., 1998; GODFREE and FARRELL, 2005). Dafür können neben den methodischen Differenzen auch Infektiositäts- und Alters-Unterschiede zwischen den verwendeten Oozysten verantwortlich sein (B 3.1.8.2.1).

Über Zellkultur-PCR war in Versuch 1 wohl vor allem aus methodischen Gründen (s. oben) keine Reduktion der Infektiosität nach 1 h mesophiler Behandlung festzustellen. Dagegen waren infektiöse Oozysten nach den 4 h im thermophilen F2 (55°C gesichert) sowie 1 h F1 + 4 h F2 um mehr als 3 log Stufen reduziert, nach 1 h F1 + 4 h F2 + 1 h F3 (Fermenterkette gesamt) sogar um mehr als 4 log Stufen (Abbildung 77). Eine höhere Abbaurate war in diesem Experiment kaum zu erzielen, da wegen Reinigungsverlusten (s. B 2.3.2.7.1) in den Varianten 4 h F2 sowie 1 h F1 + 4 h F2 nur  $10^3$  Oozysten und in in der Variante 1 h F1 + 4 h F2 + 1 h F3 nur  $10^4$  Oozysten eingesetzt werden konnten. Wegen der hohen Reinigungsverluste konnten für diese 3 Varianten auch keine Vitalfärbungen durchgeführt werden. Wegen der mangelhaften Nachweisgrenze wurde das Experiment wiederholt. Die Ergebnisse der Wasserbadexperimente (s. B 3.1.8.2.1) ließen ja Inaktivierungsraten über 5 log-Stufen erwarten.

In Experiment 2 ergaben die qPCR-Daten das gleich Bild wie in Experiment 1 (Abbildung 77) und 3 (Abbildung 78), und werden daher nicht dargestellt. Bei der Reinigung der Keimträgerinhalte durch Kochsalzflotation an IPL war der Verlust an Oozysten so groß (M. Najdrowski, persönl. Mitteilg.), dass keiner der metabolischen Parameter Exzystierbarkeit, Vitalfärbung und Infektiosität bearbeitet werden konnte.



Die Daten aus lichtmikroskopischer Zählung (Neubauer-Zählkammer), qPCR, Exzystierbarkeit (%) und Zellkultur-Immunoassay ( $10^5$  Oozysten eingesetzt) wurden zur Vergleichbarkeit hochgerechnet auf den Gehalt an Oozysten in 1 mL Keimträger-Volumen. Die farbigen Balken der Standard-Abweichungen stellen Detektionsgrenzen dar und bedeuten, dass die entsprechenden Werte unter diesen Schwellen lagen.

Abbildung 78: *Cryptosporidium parvum*, Keimträger-Experiment 3, Modellanlage, lichtmikroskopische Zählung, qPCR, Exzystierbarkeit und Zellkultur-Immunoassay

Es wurde daher ein drittes Keimträger-Experiment mit Reinigung über Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (s. B 2.3.2.7.3) und Bestimmung der Infektiosität über den Zellkultur-Immunfluoreszenz-Assay (s. B 2.3.2.7.6, B 3.1.8.2.1) durchgeführt. Dabei wurde grobes partikuläres Material vor Einsatz in die Keimträger zur leichteren Reinigung und störungsfreien Analyse durch IPL entfernt, und die Überständen mit den Oozysten (Keimträger-Inhalte) bei Beibehaltung des jeweiligen chemischen Milieus und osmotischen Drucks in den Gülle- bzw. Fermenter-Kompartimenten exponiert (s. B 2.3.2.7.2). Auf Bestimmung der Vitalität durch Membranintegrität (s. B 2.3.2.7.8) wurde in diesem Experiment verzichtet, da sich in einer Reihe von Bestimmungen vor allem in Gegenwart partikulären organischen Materials schlechte Färbungseffizienz, hohe Streuung der Werte und schlechte Reproduzierbarkeit ergab (nicht dargestellt). Zudem hätten über diesen Parameter mehr als  $10^{4,2}$  Oozysten analysiert werden müssen, um eine Reduktion über 4,2 log-Stufen (WHO, 2004b) demonstrieren zu können. Sie bringt damit gegenüber der Exzystierung keine Vorteile. Darüber hinaus ist die Überschätzung infektiöser Stadien mit dieser Methode dokumentiert (s. B 3.1.8.2.1; BUKHARI et al., 2000). Abbildung 78 zeigt die Ergebnisse für das dritte Keimträgerexperiment in der Modellanlage.

Bei zunehmender Behandlungs-Intensität nahm die Gesamtzahl der Oozysten (lichtmikroskopische Zählung, modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung) praktisch nicht, die Anzahl detektierter *C. parvum* Genome (qPCR) nur marginal, jedoch die Exzystierbarkeit und die Infektiosität besonders mit der thermophilen Behandlung drastisch ab (Abbildung 78). Dies bestätigt, dass DNA der Oozysten nur unwesentlich abgebaut wird, diese aber nicht mehr vital und infektiös sind. Dabei nahm die Zahl der Oozysten pro Zählkammervolumen nicht ab. Das spricht dafür, dass die Percoll-Dichtegradienten-Reinigung im Gegensatz zur Kochsalz-Flotation (s. oben) nicht für intakte Oozysten selektierte.

Abb 31 zeigt, dass sich bereits durch den Einfluss von Komponenten in der Gülle bei 4°C (wahrscheinlich hauptsächlich  $\text{NH}_3$ , HOFERER, 2001; LEPEUPLE et al., 2004) eine geringe

Reduktion bei allen Parametern ergab. Dies belegt, dass die Ergebnisse zur abtötenden Wirkung der Temperatur aus den Wasserbadexperimenten (s. B 3.1.8.2.1) realistisch sind und die tatsächlichen, in den Fermentern erzielten Abtötungsraten wegen der zusätzlichen bioziden Wirkung der Inhaltsstoffe sogar eher unterschätzen.

Die 4 h mesophile Behandlung reduzierte die Infektiosität der Oozysten um ca. 2 log-Stufen, während die Exzystierbarkeit praktisch unverändert blieb (Abbildung 78). Dies dokumentiert die potentielle Überschätzung infektiöser Oozysten durch Bestimmung der Exzystierung (s. B 3.1.8.2.1). Die Höhe der Reduktion um etwa 2 log-Stufen entsprach dem höchsten Ergebnis in den Wasserbadexperimenten nach 4 h 36°C (Abbildung 75) und war daher plausibel. Dennoch war die erzielte Reduktion zu gering, als dass die 4 h mesophile Behandlung allein als Hygienisierungsmaßnahme für sensible Gebiete als ausreichend bezeichnet werden könnte. In Extrapolation ergibt sich, dass zur Reduktion um 5 log-Stufen etwa 10 - 13 h mesophile Vergärung von Rindergülle ausreichen sollten.

Effektiv, um über 5 log-Stufen, reduzierten dagegen die 4- und 12-stündigen thermophilen (55°C gesichert) Behandlungen und genauso die Kombination mit den mesophilen Vor- und nachgeschalteten Stufen (Abbildung 78). Demnach reicht die 4-stündige thermophile anaerobe Vergärung von Rindergülle auch ohne die mesophilen Stufen, um die Infektiosität von Kryptosporidien-Oozysten um über 5 log Stufen zu reduzieren. Den Wasserbad-Experimenten zufolge ist dafür sogar 1 h 55°C ausreichend (Abbildung 75, Abbildung 76). Den D-Werten für die resistenteren intestinalen Enterokokken (s. B 3.1.8.2.1, B 3.1.3) zufolge würden diese rechnerisch in 4 h 55°C in Gülle um 2,4 – 4 h reduziert werden, was im Bereich des Vorschlags von LARSEN et al. (1994) liegt. Eine gesicherte Verweilzeit von 4 h bei gesicherten 55°C wäre damit eine sinnvolle Zielgröße zur Behandlung von Rindergülle in Biogasanlagen, wenn der Gärrest vom bakteriologischen und parasitologischen Standpunkt her einwandfrei und auch zur Ausbringung in sensiblen Regionen (WZ II) geeignet sein soll.

### **B 3.1.9 *Giardia duodenalis***

Auf die Bestimmung von *G. duodenalis* wurde aus den bei B 2.3.2.8 genannten Gründen verzichtet. Die Resistenz von *G. duodenalis* und *C. parvum* gegenüber äusseren Einflüssen ist BETANCOURT and ROSE (2004) zufolge praktisch identisch. Damit sind bezüglich der Hygienisierungseffizienz keine relevanten Unterschiede zwischen diesen beiden Parasiten zu erwarten. Bis zur Veröffentlichung gegenteiliger Befunde gelten damit die Ergebnisse und die Diskussion für *Cryptosporidium parvum* (s. B 3.1.8) stellvertretend auch für die Giardien.

### **B 3.1.10 Rotaviren**

Humane Rotaviren wurden für am 10.2.2005 genommene Proben aus den Kompartimenten der Berblinger Anlage durch LGL über den dort etablierten Enzym-Immunoassay gegen das Rotavirus-Antigen bestimmt (s. B 2.3.2.9). Im relevanten Zeitraum vor der Probenahme funktionierte die Berblinger Anlage optimal, nach Mitte Februar 2004 wurde im thermophilen Fermenter gesichert 55°C eingehalten (s. B 2.1.1.1).

Für alle Proben (Vorgrube, mesophiler F1, thermophiler F2, mesophiler F3, Endlager) fiel der Test auf humane Rotaviren negativ aus, allerdings ist die Detektionsgrenze des Systems für Rindergülle nicht bekannt.

Trotz der methodischen Unsicherheit kann davon ausgegangen werden, dass sowohl humane als auch bovine Rotaviren bei Vorhandensein in der Vorgrube wegen ihrer Temperatur-Sensitivität (D-Werte 7 - 18 min bei 55°C, SPILLMANN et al., 1987) durch die thermophile Behandlung bei 55°C und minimaler gesicherter Verweilzeit von 8 - 9 h im Berblinger F2 rechnerisch um weitaus mehr als 6 log Stufen reduziert worden wären. Bei der gegenwärtigen Kenntnislage müssen Rotaviren daher hinsichtlich Hygienisierung durch thermophile Vergärung als unkritischer Parameter angesehen werden.

### B 3.1.11 Enterovirus

Enteroviren wurden für am 10.2.2005 genommene Proben aus den Kompartimenten der Berblinger Anlage durch LGL über die dort etablierte RT-PCR nachgewiesen (s. B 2.3.2.10). Im relevanten Zeitraum vor der Probenahme funktionierte die Berblinger Anlage optimal, nach Mitte Februar 2004 wurde im thermophilen Fermenter gesichert 55°C eingehalten (s. B 2.1.1.1).

Für alle Proben (Vorgrube, mesophiler F1, thermophiler F2, mesophiler F3, Endlager) fiel der Test auf Enteroviren negativ aus, allerdings ist die Detektionsgrenze des von LGL verwendeten Systems für Rindergülle nicht bekannt.

In den Untersuchungen mit dem eigenen RTqPCR-System mit vorgeschalteter optimierter RNA-Extraktion (s. B 2.3.2.10) wurde ebenfalls in keiner der untersuchten Proben ein positiver Nachweis erzielt. Die Methoden-Detektionsgrenze (incl. Extraktion) lag hier bei  $8,3 \times 10^3$  RNA-Kopien pro mL Gülle, die Gehalte der Enteroviren daher sicher unter diese Marke.

Die Tenazität von Enteroviren ist der Literatur zufolge sehr gering. GODFREE and FARRELL (2005) beschreiben sie als kleiner als die der Coliformen. HOFERER (2001) bestimmte D-Werte für humane, bovine und porcine Enteroviren bei 55°C im Bereich 2 - 14 min. Polioviren, die auch zur Gattung *Enterovirus* gehören, waren mit D-Werten von 1,8 - 5,4 min bei 55°C eher noch empfindlicher (HOFERER, 2001). Sie wären damit durch die thermophile Behandlung bei 55°C und der minimalen gesicherten Verweilzeit von 8 - 9 h im Berblinger F2 rechnerisch um weitaus mehr als 6 log Stufen reduziert worden. Bei der gegenwärtigen Kenntnislage müssen Enteroviren daher hinsichtlich Hygienisierung durch thermophile Vergärung ebenfalls als unkritischer Parameter angesehen werden.

### B 3.1.12 Norovirus

Noroviren der Genogruppen I und II wurden für am 10.2.2005 genommene Proben aus den Kompartimenten der Berblinger Anlage durch LGL über die dort etablierten RT-PCR-Systeme nachgewiesen (s. B 2.3.2.11). Im relevanten Zeitraum vor der Probenahme funktionierte die Berblinger Anlage optimal, nach Mitte Februar 2004 wurde im thermophilen Fermenter gesichert 55°C eingehalten (s. B 2.1.1.1).

Für alle Proben (Vorgrube, mesophiler F1, thermophiler F2, mesophiler F3, Endlager) fiel der Test auf *Norovirus* Gg I und Gg II negativ aus, allerdings ist die Detektionsgrenze der von LGL verwendeten Systeme für Rindergülle nicht bekannt.

In den Untersuchungen mit dem eigenen RTqPCR-System mit vorgeschalteter optimierter RNA-Extraktion (s. B 2.3.2.11) wurde ebenfalls in keiner der untersuchten Proben ein positiver Nachweis erzielt. Die Methoden-Detektionsgrenze (incl. Extraktion) lag hier bei  $8,3 \times 10^3$  RNA-Kopien pro mL Gülle, die Gehalte der Noroviren daher sicher unter diese Marke.

Da für Noroviren bisher noch kein allgemein akzeptiertes System zur Bestimmung der Infektivität bekannt ist, wird konventionell das ebenfalls zu den *Caliciviridae* gehörende feline Calicivirus (FCV) als Surrogat für Noroviren verwendet. DOULTREE et al. (1999) beschreiben für das FCV einen D-Wert bei 56°C von 8 min. Das FCV (für Noroviren sollten ähnliche Verhältnisse gelten) ist damit ähnlich wie die Rotaviren (s. B 3.1.10) und Enteroviren (s. B 3.1.11) sehr empfindlich gegenüber Temperatur-Stress. Das FCV hätte damit durch die thermophile Behandlung bei 55°C und minimaler gesicherter Verweilzeit von 8 - 9 h im Berblinger F2 rechnerisch um weitaus mehr als 6 log Stufen reduziert werden können. Sobald ein geeignetes Modell zur Überprüfung der Infektivität für Noroviren zur Verfügung steht, sollten die Verhältnisse für Noroviren überprüft werden.

### B 3.2 Bodenproben

Ziel der Untersuchung war, erste Anhaltspunkte zu bekommen, ob sich durch Gärrest- im Vergleich zu Gülleausbringung mikrobiologische Bodeneigenschaften ändern. Insbesondere sollten die mikrobiologischen Ergebnisse erste Informationen liefern, ob sich bei

Ausbringung des Gärrests im Boden eine Wiederverkeimung oder eine Anreicherung mit bestimmten Keimen ergeben kann. Die Untersuchungen können wegen der Kürze des überspannten Zeitraums keinesfalls einen entgültigen Schluss zulassen, sollten aber Information darüber zulassen, ob und in welchen Bereichen ein Gefahrenpotential besteht, das ggf. verstärkt weiteruntersucht werden sollte.

Die Berblinger Standorte und wichtige Hintergrundinformationen zu diesen sind bei B 2.1.2.1 beschrieben. Abb. 2 zeigt eine Skizze der Probenahmepunkte mit der Abfolge der Beprobungen und Tabelle 57 Details zu den Probenahmen. Näheres zur Analyse zusätzlicher, als Referenzen verwendeter Standorte findet sich bei B 2.1.2.2 und B 2.1.2.3. Beobachtungen bei den Bodenprobenahmen, die Entnahme selbst und die Aufbereitung der Proben sind bei B 2.2.2 dargestellt. Hintergrundinformationen zu den für die Bodenproben untersuchten mikrobiologischen Parametern finden sich bei B 2.3.1.4.

Zum Verständnis der Ergebnisse ist wichtig, dass die als Verlaufskontrolle vorgesehene Kontrollparzelle bereits nach der ersten Beprobung 2003 aufgegeben werden musste. Der von Herrn Schweiger zum Frühjahrstermin 2004 empfohlene Probenahmepunkt (Abb. 2) war der Kontamination durch Gülle und Tierkot verdächtig (s. B 2.1.2.1). Die entsprechenden Proben können daher nicht als Kontrolle angesehen werden. Die einmalige Verschiebung der Beprobungsfläche der Gülle-Variante zum Frühjahrstermin 2004 (Abb. 2) bewirkte den Ergebnissen zufolge keine Unterschiede. Bodenprofil, -Substrat, Vorgeschichte und Düngung zwischen Gülleplot Hof Schweiger und dem nur wenige 100 m entfernten Standort unterschieden sich auch praktisch nicht (s. B 2.1.2.1). Ab dem Herbsttermin 2004 wurde in der Wasserschutzzone I eine Null-Variante (natürliche Hintergrundbelastung) angelegt (s. B 2.1.2.1).

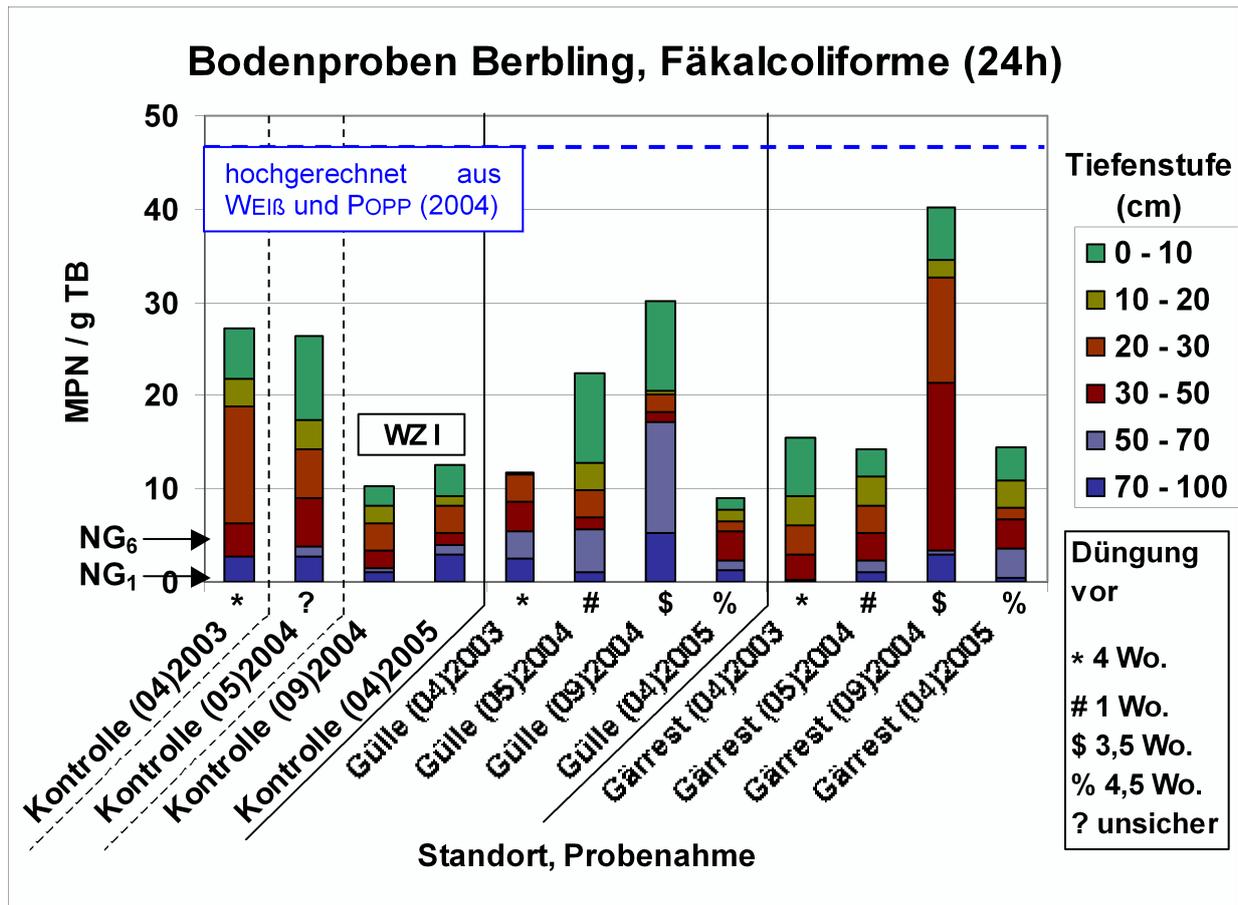
Bei allen Schritten von Bodenprobenahme über Aufbereitung bis Analyse wurde größter Wert auf Vermeidung von Kreuzkontamination gelegt. Dementsprechend wurden auch möglichst manuelle Techniken gewählt (s. B 2.2.2).

### **B 3.2.1 Fäkalcoliforme**

Die Fäkalcoliformen-Keimzahlen wurden über das Fluorocult®-MPN-Verfahren (s. B 2.3.2.1) bestimmt.

Abbildung 79 zeigt die Gehalte an Fäkalcoliformen im Boden der untersuchten Berblinger Standorte. Hier ist die lineare (nicht-logarithmische) Skalierung zu beachten. Ebenfalls ist generell in den Darstellungen der bakteriellen Gehalte in den Böden zu beachten, dass die Gehalte für die 6 beprobten Tiefenstufen kumuliert (aufsummiert) dargestellt sind. Zur Berechnung des mittleren Gehalts im Boden eines Standorts zu einem Termin muss der kumulierte Wert (y-Achse: MPN / g TB) durch 6 dividiert werden.

Abbildung 79 zeigt, dass sich die untersuchten Standorte nicht oder nur marginal im Besatz des Bodens mit Fäkalcoliformen unterschieden. Im Beprobungs-Zeitraum war auch keine eindeutige Tendenz einer Zu- oder Abnahme zu erkennen. Unterschiede infolge verschiedener Düngung (Gülle / Gärrest) waren nicht zu erkennen, allenfalls ein im Mittel marginal höherer Besatz mit Fäkalcoliformen im Gülle- (3,1 MPN / g TB) und Gärrest-Plot (3,5 MPN / g TB) gegenüber den Gehalten im Boden der WZ I (1,9 MPN / g TB). Für das LfL-Agrarökologie-Lysimeter (s. B 2.1.2.2) wurden im Mittel 0,7 MPN Fäkalcoliforme / g TB gemessen.



NG<sub>1</sub>, NG<sub>6</sub>: Nachweisgrenze bei Analyse einer Tiefenstufe bzw. kumuliert für 6 Tiefenstufen. 24h: Bebrütungszeit in Fluorocult®. WZ I: Wasserschutzzone I. Standort, Probenahme: Plot (Monat)Jahr.

Abbildung 79: Bodenproben Berbling, Gehalte an Fäkalcoliformen kumuliert über die analysierten Tiefenstufen

In der Literatur finden sich praktisch keine Angaben zu Gehalten an Fäkalcoliformen in den Berblinger Standorten vergleichbaren Böden. Hier besteht erheblicher Forschungsbedarf, da momentan keine abgesicherte Aussage zur 'natürlichen' Hintergrundbelastung gemacht werden kann, die eine vergleichende Einschätzung der eigenen Daten ermöglichen könnte. Für unbelastete (sub)tropische Süßwasser- bzw. marine Sedimentböden finden sich stark unterschiedliche Angaben zu *E. coli* / Fäkalcoliformen im Bereich (rechnerisch) 0 - 0,18 / g (PIANETTI et al., 2004), 0,3 - 5 / g (CRAIG et al., 2002), 10 - 20 / g (DESMARAIS et al., 2002) und 0,05 - 100 / g (SKANAVIS and YANKO, 2001), was eine für eine Einschätzung der Ergebnisse für die Berblinger Böden nicht hilfreich ist.

Zu einer Einschätzung, ob durch die Düngung eine Belastung entstanden sein könnte, sind demnach die eigenen Werte für das unbelastete LfL-Agrarökologie-Lysimeter und die Proben der WZ I am ehesten geeignet. Von diesen unterschieden sich die Werte für Fäkalcoliforme für die Gülle- und Gärrest-Plots nur marginal (s. oben). Demnach schien in den Berblinger Wiesenböden ein relativ schneller Abbau der eingetragenen Fäkalcoliformen stattgefunden zu haben, den Daten in Abbildung 79 zufolge wahrscheinlich sogar innerhalb 1 Woche. Hiermit konform sind Angaben zum Überleben Fäkalcoliformer von typischerweise < 15 d auf Pflanzenoberflächen und < 20 d in Böden (FAO, 1997). PALUSZAK et al. (2003) stellten ebenfalls einen schnellen, den Daten zufolge hauptsächlich bereits an der Bodenoberfläche stattfindenden Abbau Fäkalcoliformer im Boden nach Begüllung von Wiesenstandorten fest. Allerdings scheinen sich einzelne Stämme oder deren Abkommen auch lange im Boden halten zu können, da in der Literatur Überlebenszeiten von *E. coli* in Boden/Wasser von fast 1 Jahr zu finden sind (PICKUP et al., 2003). Den eigenen Daten zufolge fand also durch Gärrest-

und Gölledüngung allenfalls eine marginale Anreicherung Fäkalcoliformer im Boden statt. Die eigenen Werte lagen auch in allen Fällen unter den aus WEIB und POPP (2004) pro g TB hochgerechneten Werten aus der natürlichen Hintergrundbelastung in Dränabflüssen ungedüngter Ackerböden (Abbildung 79).

Wahrscheinlich sind die mit der Gülle bzw. dem Gärrest eingetragenen Fäkalcoliformen im Boden nicht verstärkt in einen ABNC-Zustand übergegangen, da der Faktor der MPN nach 96 h Bebrütung zu MPN nach 24 h Bebrütung für die Bodenproben aller Parzellen bei etwa 1,9 lag, und damit eher kleiner war als die für Gärreste beobachteten Werte (s. B 3.1.1).

Erstaunlich war, dass für alle Standorte selbst in 1 m Bodentiefe, also unterhalb des charakteristischen Schlufflehmbands (s. B 2.1.2.1), noch Fäkalcoliforme nachzuweisen waren, wenn auch in zumeist sehr geringer Konzentration (Abbildung 79). *E. coli* ist relativ leicht verlagerbar (s. B 2.1.1.1). Eine schnelle Verlagerung in die Tiefe könnten bei stärkerer Austrocknung des Bodens im Schlufflehmband auftretende Schwundrisse bewirken, die als Makroporen bei Beregnung bzw. Düngung Oberflächenwasser mit kleinen Partikeln wie Bakterien tiefgründig ableiten können. WEIB und POPP (2004) schlossen aus ihren Analysen, dass ein Makroporenfluss noch bis 4,5 m Bodentiefe stattfinden kann. Sogar für tiefe Quellen wurde beobachtet, dass ein Zusammenhang zwischen bakterieller Kontamination und heftigen Regenereignissen bestand (SANTAMARIA and TORANZOS, 2003). Definitive Aussagen, ob durch Düngung eine Belastung des Grundwassers (außer durch Oberflächenabschwemmung) bei Vorhandensein von tiefgründigen Schwundrissen durch direkten vertikalen Eintrag stattfinden kann, müssen Daten liefern, die über direkte Tiefenbohrungen bis in den Grundwasserbereich und Probenahme nach der Düngung bei entsprechenden Verhältnissen (Regen nach Trockenheit) gewonnen wurden.

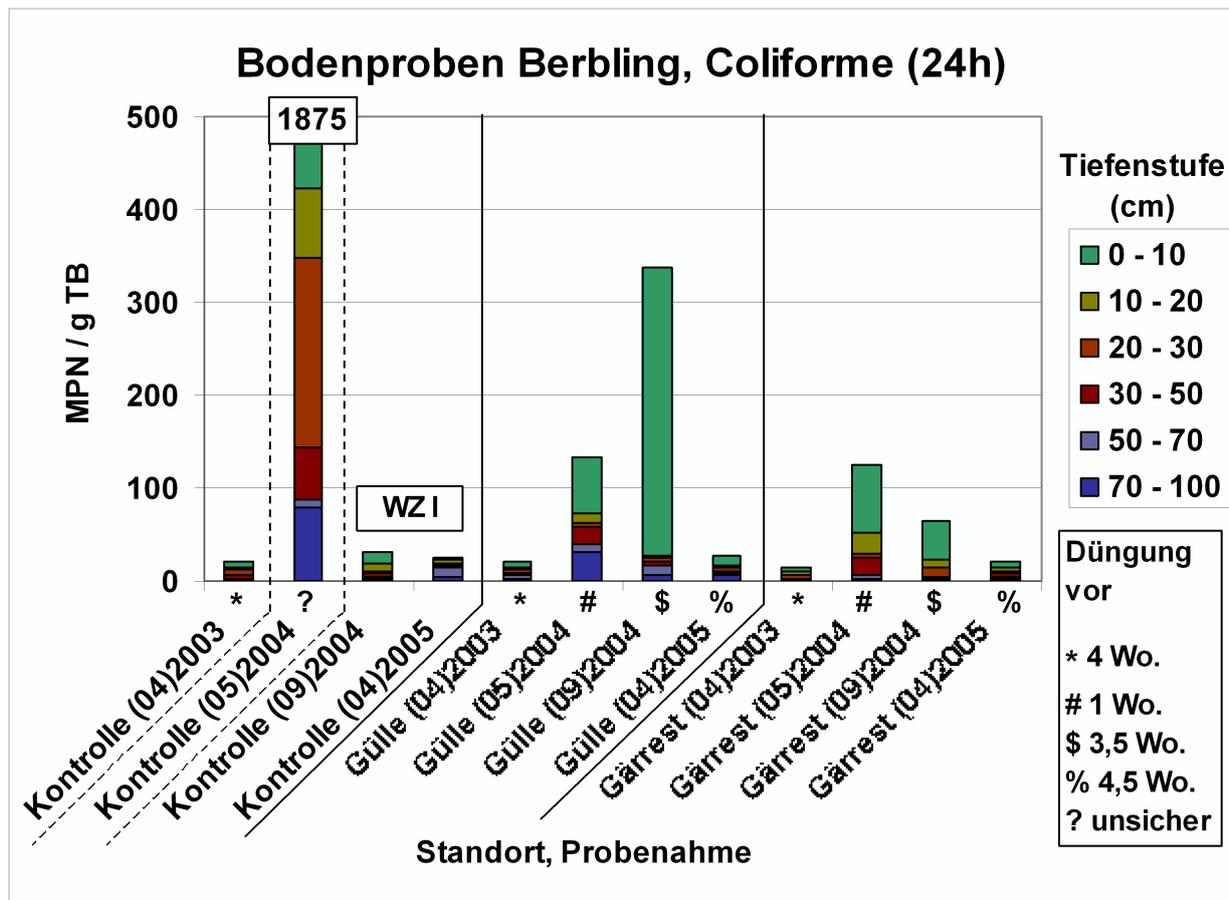
### B 3.2.2 Coliforme

Die Coliformen-Keimzahlen wurden über das Fluorocult®-MPN-Verfahren (s. B 2.3.2.1) bestimmt.

Abbildung 80 zeigt die Gehalte an Coliformen im Boden der untersuchten Berblinger Standorte. Die lineare (nicht-logarithmische) Skalierung sowie die kumulierte Darstellung über die Tiefenstufen sind zu beachten (vgl. B 3.2.1).

Im Beprobungs-Zeitraum war für keinen Standort eine eindeutige Tendenz zu einer Zu- oder Abnahme Coliformer zu erkennen. Die höchsten Gehalte an Coliformen fanden sich erwartungsgemäß immer im Oberboden. Positive Nachweise für Coliforme (im Gülleplot bis 30 MPN / g TB) ergaben sich in allen Standorten auch noch in 1 m Bodentiefe (Abbildung 80), was auf Bildung von Schwundrissen zurückzuführen sein könnte (s. B 3.2.1). Die untersuchten Standorte unterschieden sich voneinander im Besatz des Bodens mit Coliformen (Abbildung 80) etwas deutlicher als für die Fäkalcoliformen beobachtet (s. B 3.2.1). Der Besatz mit Coliformen lag im Mittel über die Tiefenstufen im Gülleplot mit 21,7 MPN / g TB höher als im Gärrest-Plot (9,4 MPN / g TB) sowie im Boden des Lysimeter (8,1 MPN / g TB) und der WZ I (4,8 MPN / g TB). Mit Abstand die meisten Coliformen fanden sich im Oberboden der 'Kontrolle' (Ausweichplot) im Mai 2004 (Abbildung 80), was den Verdacht der Kontamination durch Gölledüngung und Eintrag anderer Tierfaeces der Probenahmestelle (s. B 3.2) untermauert.

Auffällig war der in allen Parzellen und Tiefenstufen relativ hohe Faktor der MPN Coliformer nach 96 h gegenüber 24 h Bebrütung von im Mittel 8,9. Er lag damit im selben Bereich wie nach dem Stress der thermophilen Vergärung (s. B 3.1.2), was auf geringe Aktivierbarkeit Coliformer bzw. starkem Übergang im Boden in den ABNC-Status schließen lässt.



24h: Bebrütungszeit in Fluorocult®. WZ I: Wasserschutzzone I. Standort, Probenahme: Plot (Monat)Jahr.

Abbildung 80: Bodenproben Berbling, Gehalte an Coliformen kumuliert über die analysierten Tiefenstufen

Ähnlich wie zu Fäkalcoliformen (s. B 3.2.1) finden sich in der Literatur praktisch keine Angaben zu Gehalten an Coliformen in Böden, die den Berblinger Standorten vergleichbar wären. Momentan kann also auch bezüglich der Coliformen keine abgesicherte Aussage zur 'natürlichen' Hintergrundbelastung gemacht werden, die eine vergleichende Einschätzung der eigenen Daten ermöglichen könnte. Hier besteht ebenfalls Forschungsbedarf. Viele Coliforme sind autochthone Bodenbewohner, ein positiver Nachweis (in geringer Höhe) sagt also noch nichts über eine Kontaminations-Situation aus. Für marine Sedimentböden schwanken die Angaben zu Coliformen stark mit (rechnerisch) 0,04 - 10 / g (PIANETTI et al., 2004) und 0,05 - 100 / g (SKANAVIS and YANKO, 2001), geben also auch keinen Anhaltspunkt. Damit sind die eigenen Werte für das unbelastete LfL-Agrarökologie-Lysimeter und die Proben der WZ I am ehesten zu einer Einschätzung geeignet, ob die Düngung eine Belastung mit Coliformen bewirkt haben könnte. Von diesen unterschieden sich die Werte vom Gärrest-Plot nur marginal, während die Werte vom Gülle-Plot im Mittel um den Faktor 2 – 5 höher lagen (s. oben). Damit lag kein Anhalt für eine Belastung des Bodens durch Coliforme nach Ausbringung von Gärrest vor, während sich nach Güllendüngung eine Belastung im Oberboden abzeichnete (Abbildung 80), die weiter verfolgt werden sollte, um die Tendenz zu bestätigen und ggf. Gegenmaßnahmen einzuleiten. Hilfreich zur Einschätzung einer eventuellen Belastung wären Tiefenbohrungen unter den Flächen mit mikrobieller Analyse des Grundwassers (s. B 3.2.1).

### B 3.2.3 Intestinale (und Gesamt-) Enterokokken

Intestinale (und Gesamt-) Enterokokken wurden über Membran-Filtration und Kultivierung auf m-Enterokokken und Äsculin-Agar (s. B 2.3.2.2) möglichst aus den Verdünnungen  $10^{-1}$  bestimmt, da sich zeigte, dass in stärkeren Verdünnungen die tatsächlichen Gehalte

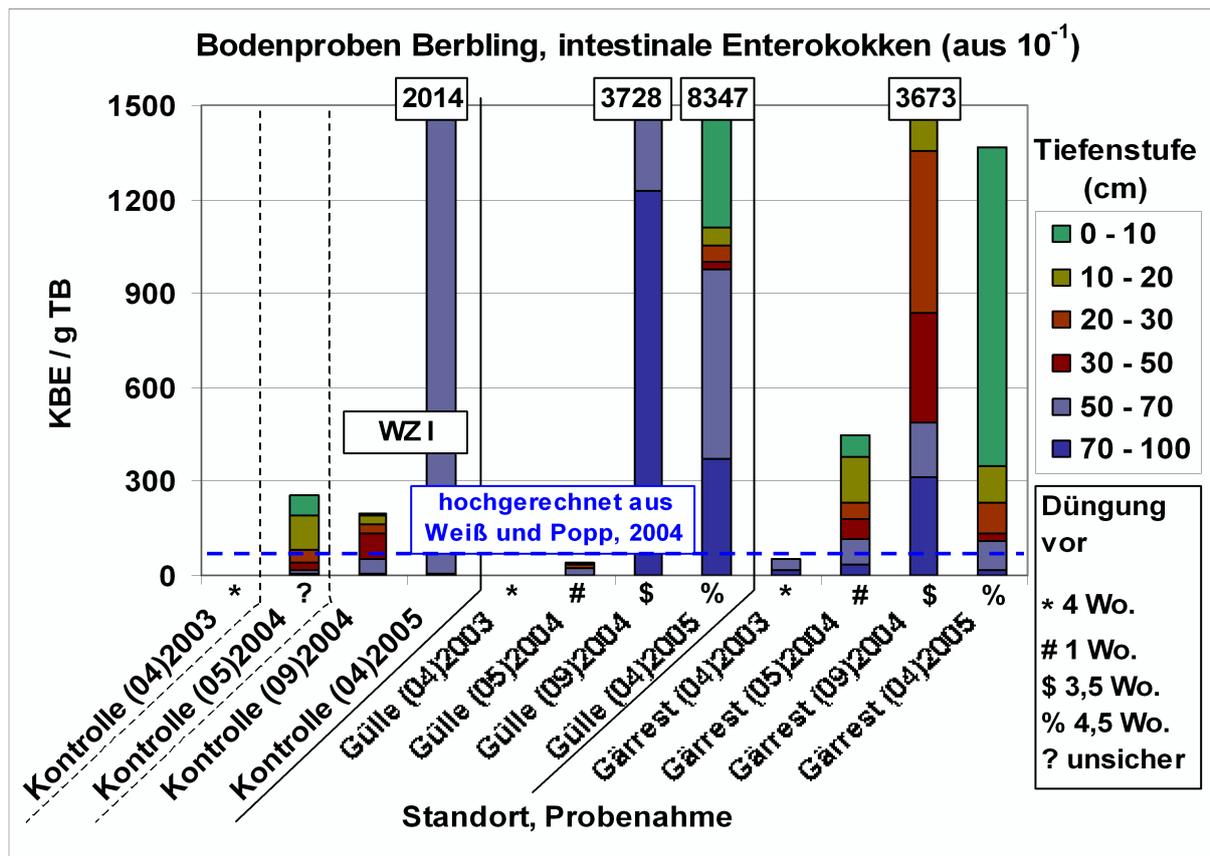
intestinaler Enterokokken unterschätzt wurden (s. B 3.1.3). Dies war für die Bodenproben besonders ausgeprägt (vgl. B 2.3.2.2), wahrscheinlich wegen starker Adsorption an Ton-Humuskomplexe, die typisch für viele Gram-positiver Bakterien ist (KAGAWA, 1971). Vergleichenden Berechnungen zufolge konnte die Unterschätzung  $> 1$  log-Stufe betragen (nicht dargestellt).

Für die Gesamt-Enterokokken (nicht dargestellt) wurden im Mittel über die Tiefenstufen und Beprobungstermine Werte von 310,9 KBE / g TB (WZ I-Kontrolle), 3525,8 KBE / g TB (Gülle-Plot), 521,6 KBE / g TB (Gärrest-Plot) und 47,7 KBE / g TB (Lysimeter) erhalten. Damit wurden etwa 1,5 - 7 mal mehr Gesamt- als intestinale Enterokokken (s. unten) im Boden festgestellt, wobei die Verteilungsmuster über die Tiefenstufen und Probenehmertermine denen für die intestinalen Enterokokken (Abbildung 81) praktisch entsprachen. Die Ergebnisse werden deswegen und aus den bei B 2.3.2.2 und B 3.1.3 genannten Gründen nicht diskutiert.

Abbildung 81 zeigt die Gehalte an intestinalen Enterokokken im Boden der untersuchten Berblinger Standorte. Die lineare (nicht-logarithmische) Skalierung sowie die kumulierte Darstellung über die Tiefenstufen sind zu beachten (vgl. B 3.2.1).

Besonders auffällig bei den Daten zu den Gehalten der intestinalen Enterokokken im Boden der Berblinger Standorte waren zum einen die vergleichsweise hohen Werte im Herbst 2004 und April 2005, die ziemlich niedrigen Werte für intestinale Enterokokken in Dränwässern ungedüngter Ackerstandorte (WEIß und POPP, 2004; umgerechnet auf 1 g Trockenboden bei Annahme eines mittleren Wassergehalts von 30 %) und die z.T. sehr hohen Gehalte intestinaler Enterokokken noch in 1 m Bodentiefe (Abbildung 81).

Die Zunahme bis Versuchsende war vor allem im Gülleplot zu beobachten, allerdings wurde auch für die Kontrolle WZ I eine solche Zunahme beobachtet, und im Gärrest-Plot schienen die Gehalte intestinaler Enterokokken wieder zurückzugehen. Damit war eine Zunahme allenfalls teilweise auf die Düngung zurückzuführen sondern wahrscheinlich stark von einem Witterungs-bedingten und jahreszeitlich-klimatischen Effekt überlagert. Zudem streuten die Wiederholungen für die einzelnen Tiefenstufen teilweise stark, was auf Inhomogenitäten in den Mischproben hinweist. Solche Inhomogenitäten können z.B. auf lokale Kotablagerungen von Bodenbewohnern (z.B. Wühlmäuse, s. B 2.2.2) in den Gängen zurückgehen, die bei den Bohrungen unterschiedlich getroffen werden können. Die Wühlmäuse können ihre Gänge durchaus bis in den Bereich des Lehmbands (s. B 2.1.2.1) vorgetrieben haben. Die teilweise hohen Gehalte intestinaler Enterokokken noch in 1 m Bodentiefe könnten dann über eine Weiterverlagerung durch bei Trockenheit gebildete Schwundrisse durch einen Spülstoß verursacht sein. Methodische Verbesserungen sollten insbesondere bei einer effektiveren Homogenisierung der Bodenproben angreifen, zudem sollten zukünftige Ergebnisse besonders für die intestinalen Enterokokken über eine höhere Anzahl der Analyse-Wiederholungen besser statistisch abgesichert werden. Eine Bestätigung der Vermutungen sowie die Verifizierung einer eventuellen Anreicherung kann nur über eine Weiterführung der Untersuchungen erreicht werden.



$10^{-1}$ : Daten aus Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ . WZ I: Wasserschutzzone I. Standort, Probenahme: Plot (Monat)Jahr. Hochgerechnet aus WEIß und POPP, 2004: berechnet aus Dränwasser-Gehalten ungedüngter Ackerstandorte, die allerdings als Referenz ungeeignet sind (s. Text).

Abbildung 81: Bodenproben Berbling, Gehalte an intestinalen Enterokokken kumuliert über die analysierten Tiefenstufen

Im Mittel über die Probenahmeterminale und Tiefenstufen betragen die intestinalen Enterokokken für den Lysimeterboden 35,4 KBE / g TB, die WZ I-Kontrolle 184,5 KBE / g TB, den Gärrest-Plot 230,7 KBE / g TB und den Gülle-Plot 504,9 KBE / g TB. Hier ist zu bemerken, dass in der Tiefenstufe 50 - 70 cm der WZ I-Kontrolle im April 2005 1953,5 intestinale Enterokokken / g TB festgestellt wurden. Ein Wert in dieser Höhe wurde zu keinem Termin in einer der Tiefenstufen des Lysimeters oder des Gärrest-Plots gemessen, im Gülle Plot aber einmal übertroffen. Die sehr geringen Gehalte intestinaler Enterokokken im Boden des Lysimeters lassen sich dadurch erklären, dass das Lysimeter frei von Wühlmäusen und damit auch von Kotablagerungen war. Das Lysimeter wies auch einen sehr hohen Schluff- und sehr geringen C-Gehalt im Oberboden auf (Tabelle 58), was Indiz für relative Nährstoffarmut und schlechte Durchwühlbarkeit ist. Orientierungswerte für eine natürliche Hintergrundbelastung in Böden temperater Klimabereiche finden sich in der Literatur auch für intestinale Enterokokken nicht. Für unbelastete (sub)tropische Süßwasser- bzw. marine Sedimentböden finden sich stark unterschiedliche Angaben zu intestinalen Enterokokken im Bereich (rechnerisch) 0 - 0,15 / g (PIANETTI et al., 2004), 1 - 100 / g (SKANAVIS and YANKO, 2001) und 10 - 1643 / g (DESMARAIS et al., 2002). Eine Einschätzung kann also am ehesten die Kontrolle WZ I liefern, für die die Ergebnisse allerdings stark streuten (Abbildung 81). Den Mittelwerten zufolge (s. oben) unterschied sich allenfalls der Gülle-Plot etwas von den Kontrollen. Dafür, dass dies eine Folge der Gülle-Düngung sein könnte, liefert die beobachtete Zunahme im Beprobungszeitraum (Abbildung 81) ein deutliches Argument. Für

den Gärrest-Plot war eine Düngungs-bedingte Anreicherung intestinaler Enterokokken den Daten zufolge eher unbedeutend.

Die vergleichsweise niedrigen Werte für intestinale Enterokokken in Dränwässern ungedüngter Ackerstandorte (44 KBE / g TB; Abbildung 81; WEIß und POPP, 2004) sind ebenfalls keine guten Referenzen, da in Äckern wegen der Pflüfung typischerweise keine Bodentiere wie Wühlmäuse vorkommen (und damit auch keine Kotablagerungen in Gängen). Die natürliche Belastung von Wiesenböden wäre damit stark unterschätzt. Zudem wird in den Dränwässern nur der Oberflächen- bzw. Oberbodenabfluss erfasst. Kotablagerungen von Wühlmäusen können sich aber viel tiefer finden, und die Enterokokken sorbieren relativ stark an die Bodenmatrix. Potentiell ist damit bei der Extrapolation der Gehalte (intestinaler) Enterokokken in Dränwässern auf Gehalte im Boden eine weitere Unterschätzung verbunden. Wegen der starken Adsorption der (intestinalen) Enterokokken an Ton-Humus-Komplexe ist nicht mit einer Belastung des Grundwasserstroms durch diese Organismen zu rechnen. Hier ist allerdings anzuraten, absichernde Analysen des Grundwassers über Tiefenbohrungen durchzuführen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die intestinalen Enterokokken im Boden sehr heterogen verteilt und dabei relativ fest an Bodenaggregate sorbiert sind. Dies bedingt, dass die natürliche Belastung in Wiesenböden mit autochthoner Bodenfauna sehr heterogen (lokale Kotablagerungen in Gängen im Boden) sein kann, und damit eine Belastungssituation nur schwer festzustellen ist. Gehalte intestinaler Enterokokken von  $2,0 \times 10^3$  KBE / g TB kommen natürlicherweise (offenbar als hot spots) vor, über das gesamte Profil scheinen mittlere Gehalte von 200 - 500 intestinale Enterokokken / g TB ein erster Anhaltswert für natürliche Hintergrundbelastung zu sein. Wegen der potentiellen Heterogenität ist eine Abschätzung einer Düngungs-bedingten Belastung auf Basis eines solchen Hintergrund-Werts nur im Zusammenhang mit einem gleichartigen Befund für einen anderen mikrobiellen Parameter belastbar. Zur Bestätigung der Befunde sind weiterführende Untersuchungen unerlässlich. Ein Anhalt für eine Anreicherung mit intestinalen Enterokokken im Boden war nach Gülledüngung zu erkennen, nicht aber nach Gärrest-Düngung. Die Tendenzen müssen zur Absicherung weiterverfolgt werden.

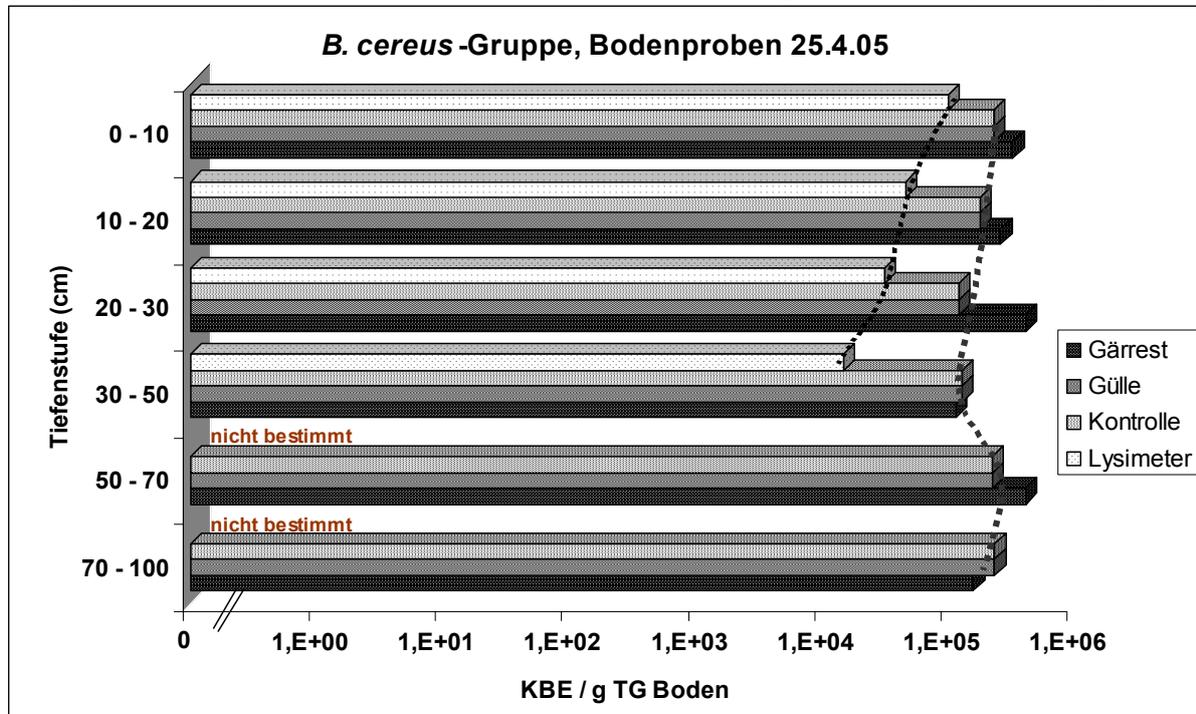
#### **B 3.2.4 *Bacillus-cereus* (Gruppe)**

Dieser Parameter wurde 2005 zusätzlich mit ins Programm aufgenommen, da diese Sporenbildner während des Biogasprozesses nicht oder nur marginal reduziert wurden (s. B 3.1.6). Die Vertreter der *B. cereus*-Gruppe (BcG, s. B 2.3.2.5) wurden aus den Verdünnungsreihen der Boden-Suspensionen (s. B 2.2.2) für die Berblinger Standorte (s. B 2.1.2.1) und das Lysimeter (s. B 2.1.2.2) über Kultivierung auf PEMBA (s. B 2.3.2.5) bestimmt.

Abbildung 82 zeigt die Ergebnisse für die am 25.4.05 beprobten Tiefenstufen. Zu beachten ist, dass das Lysimeter nur bis zur Tiefe 50 cm in 10 cm Abständen beprobt werden konnte. Der Wert für 30 - 50 cm ist daher der Mittelwert der Stufen 30 - 40 und 40 - 50 cm für das Lysimeter. Die Kontrolle wurde dem Boden der Wasserschutzzone I entnommen (s. B 2.1.2.1).

Aus Abbildung 82 geht hervor, dass weder im Gärrest- noch im Gülleplot eine Anreicherung mit Vertretern der *B. cereus*-Gruppe festgestellt werden konnte. Eine Anreicherung war allerdings auch angesichts des relativ hohen natürlichen Besatzes von Boden mit Vertretern der BcG im Bereich  $10^5$  KBE / g TB (Abbildung 82: Kontrolle) eher unwahrscheinlich. *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides* und *B. pseudomycoides* sind typische Bodenbewohner und zeichnen sich durch ausgeprägte proteolytische und chitinolytische Aktivität im Boden aus. Damit sind sie stark an der Zersetzung von Insekten und Tier-Rückständen beteiligt. Neben Nährstoffarmut und schlechter Durchwühlbarkeit im Oberboden (s. 0) kann dies erklären, warum im Boden des Lysimeter um 0,5 - 1 log-Stufe geringere

Werte als für die Berblinger Standorte erhalten wurden (Abbildung 82). Im Lysimeter waren keine größeren Bodentiere zu finden, an deren Zersetzung *Bacillus* spp. proteolytisch direkt beteiligt sind und auch indirekt über chitinolytische Zersetzung Tierteil-verwertender Insekten und Pilze. Dieser Mangel hat offenbar besonders in größeren Tiefen, in die z.B. Wühlmäuse natürlicherweise vordringen (s. B 3.2.3), eine geringere Populationsdichte der BcG im Boden des Lysimeters bewirkt, nicht aber in den Böden der Berblinger Standorte (Abbildung 82).



Kontrolle: Boden der Wasserschutzzone I

Abbildung 82: Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe in den Böden der Berblinger Standorte und im Lysimeter-Boden

Eine Erklärungsmöglichkeit für das starke Auftreten der Vertreter der BcG selbst noch in 1 m Bodentiefe der Berblinger Standorte liefert die Präsenz von Wühlmausgängen in Zusammenhang mit wahrscheinlich bei Trockenheit im Sommer auftretenden Schwundrissen im Lehmband (s. B 2.1.2.1), über die bei Starkregenereignissen überdauerungsfähige Mikroorganismen (s. B 3.2.3, B 3.2.5) mit dem Spülstoß in die Tiefe verlagert sein könnten. Während eine Belastung des Grundwassers durch (intestinale) Enterokokken wegen deren starker Adsorption an Bodenpartikel unwahrscheinlich ist (s. B 3.2.3), könnten die inerten Sporen der BcG und Clostridien mit dem Massenstrom durchaus bei mangelnder Filtereffizienz der darüberliegenden Bodenschichten in den Grundwasserstrom gelangen. Dabei wird allerdings wegen der extremen Überdauerungsfähigkeit der Sporen kaum zwischen einer (eventuellen) Belastung durch eine (eventuelle) Gärrest-Düngung in WZ II und einer Gölledüngung außerhalb dieses Bereichs unterschieden werden können. In einem solchen Fall sollte die (organische) Düngung generell, also auch im entfernteren Zustrombereich, auf ein Maß reduziert werden, das der Filterkapazität des darüberliegenden Bodens entspricht.

Den Ergebnissen zufolge sind die Daten für den Lysimeterboden nicht zur Definition einer natürlichen Hintergrundbelastung mit Vertretern der *B. cereus*-Gruppe geeignet sondern eher die Daten für die WZ I-Kontrolle. Vergleichbare Daten für andere Standorte konnten in der Literatur nicht gefunden werden, hier ist entsprechende Forschung wünschenswert.

Zusammenfassend konnte aufgrund der vorliegenden Daten keine Düngungs-bedingte Anreicherung im Boden mit Vertretern der *B. cereus*-Gruppe festgestellt werden, weder im Gülle- noch im Gärrest-Plot. Allerdings sollte ein solcher Trend über fortlaufende

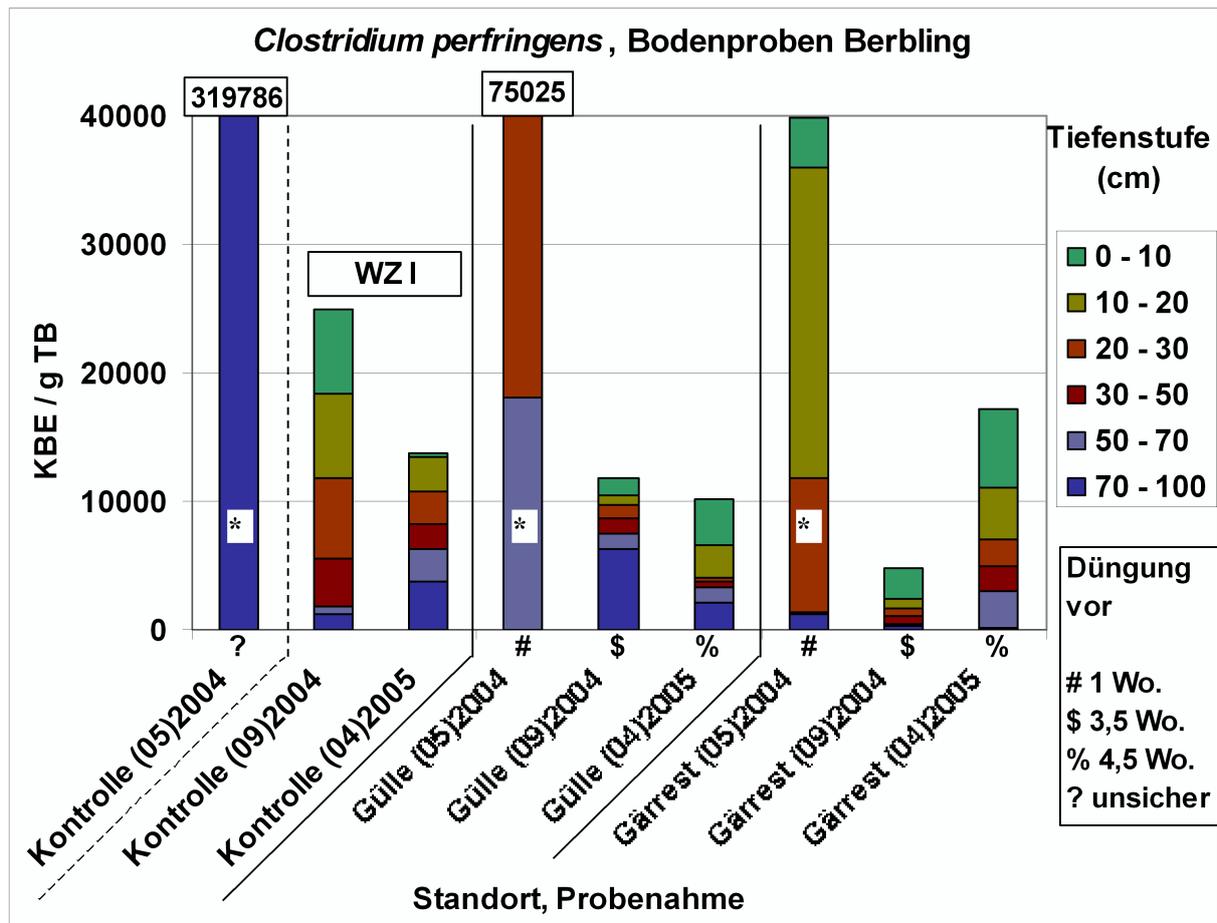
Untersuchungen bestätigt werden, da die momentane Beurteilung nur auf einer Einzeluntersuchung basiert.

### **B 3.2.5 *Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* wurde ab Mai 2004 zusätzlich mit ins Programm aufgenommen, da diese thermophilen Sporenbildner im Verlauf der Vergärung nicht reduziert wurden (s. B 3.1.7). *C. perfringens* wurde 2004 und 2005 für die Berblinger Standorte (s. B 2.1.2.1) und 2005 für das Lysimeter (s. B 2.1.2.2) sowie die bayerischen Standorte aus dem LfL-Dauerbeobachtungsprogramm (s. B 2.1.2.3) über Kultivierung in TSCF-Agar (s. B 2.3.2.6) bestimmt. Dabei traten methodische Probleme auf (s. B 2.3.2.6), wegen denen die Werte für den Maitermin 2004 wahrscheinlich systematisch um etwa 1 log-Stufe, möglicherweise sogar mehr, überschätzt wurden. Entsprechend sind in Abbildung 83 die sehr hohen Werte für alle Standorte zum Maitermin 2004 besonders auffällig und wahrscheinlich aufgrund der Auswertungsprobleme systematisch um etwa 1 log-Stufe überschätzt. Diese Werte werden daher im Folgenden nicht weiter diskutiert. Spätere Vergleiche mit Verdünnungsreihen erhärteten den Verdacht, dass eine wolkige Schwarzfärbung (s. B 2.3.2.6) von einer einzelnen Kolonie verursacht sein kann. Um dieses Problem zu vermeiden, sollten möglichst nur Platten mit < 10 Kolonien ausgewertet werden, da bei dieser Anzahl Kolonien die wolkigen Strukturen seltener auftreten. Das geht zwar auf Kosten der statistischen Sicherheit, vermeidet aber systematische Überschätzungen.

Abbildung 83 zeigt die Ergebnisse für die Berblinger Standorte. Die lineare (nicht-logarithmische) Skalierung sowie die kumulierte Darstellung über die Tiefenstufen sind zu beachten (vgl. B 3.2.1). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist die o.g. genannte vermutete Überschätzung für den Maitermin 2004 (\* in Abbildung 83) zu berücksichtigen.

Eine Tendenz zu einer Zu- oder Abnahme von *C. perfringens* im Versuchszeitraum konnte für keinen der untersuchten Standorte festgestellt werden. Dabei ist allerdings die Kürze des Untersuchungszeitraums zu bedenken. Hier ist eine Weiterverfolgung der Untersuchung zur Absicherung bzw. Feststellung von Trends unbedingt erforderlich. Anhand der vorliegenden Daten liegt z.Zt. kein Anhalt dafür vor, dass sich *C. perfringens* auf den Berblinger Standorten bei vergleichbarer Düngung im Boden anreicherte. Weder im Gülle- noch im Gärrestplot lagen die *C. perfringens*-Gehalte deutlich höher als im Boden der WZ I (Abbildung 83). Unterschiedliche *C. perfringens* Gehalte im Boden nach Gülle- bzw. Gärrestdüngung konnten nicht erwartet werden, da *C. perfringens* in beiden Düngemitteln in gleichen Anteilen vorhanden war (s. B 3.1.7). In anderen Böden ließ sich eine Anreicherung mit *C. perfringens*-Sporen aufgrund anthropogener Tätigkeiten (z.B. Klärschlamm-Ablagerung) feststellen (MATCHES et al., 1974; HILL et al., 1996; SKANAVIS and YANKO, 2002), und auch für die bayerischen Grünlandböden ergaben sich Anhaltspunkte für eine leichte Anreicherung mit *C. perfringens* im Boden infolge Gülle- bzw. Festmistdüngung (s. unten, Abbildung 84). DESMARAIS et al. (2002) konnten zwar keine Wiederverkeimung durch *C. perfringens* in Sedimentböden feststellen, *C. perfringens* kann sich aber infolge seiner saprophytischen Lebensweise mit wichtiger Mineralisationsfunktion im C- und N-Zyklus in Gegenwart geeigneten Substrats wie z.B. Tierkörperteilen (DENT et al., 2004) oder in offenen Wunden unter anaeroben (thermophilen) Bedingungen explosionsartig vermehren.



WZ I: Wasserschutzzone I. Standort, Probenahme: Plot (Monat)Jahr. \*: Wahrscheinlich systematische Überschätzung um ca 1 log-Stufe (s. Text).

Abbildung 83: Bodenproben Berbling, Gehalte an *Clostridium perfringens* kumuliert über die analysierten Tiefenstufen

Diese ökologischen Präferenzen können der Grund sein, warum im Mittel über die Beprobungstermine und Tiefenstufen im Gärrest- (1823 KBE / g TB) und Gülleplot (1835 KBE / g TB) sowie im Boden der WZ I (3227 KBE / g TB) deutlich höhere *C. perfringens*-Gehalte gemessen wurden als im Lysimeter (197 KBE / g TB). Der Lysimeterboden beherbergte keine größeren Bodentiere (s. B 2.1.2.2), war im Oberboden eher nährstoffarm und schlecht durchwühlbar (Tabelle 58), und bot wahrscheinlich daher für *C. perfringens* weniger günstige Vermehrungsmöglichkeiten. Ähnliches wurde für die (allerdings aeroben) intestinalen Enterokokken (s. B 3.2.3) und die Vertreter der *B. cereus*-Gruppe (s. B 3.2.4) diskutiert. Das Lysimeter kann damit keine gute Referenz für natürliche Hintergrundbelastung darstellen. Diese läge den eigenen (vorläufigen) Befunden nach im Bereich 1800 - 3300 KBE *C. perfringens* / g TB (s. oben). Für *C. perfringens* in unbelasteten (sub)tropischen Süßwasser- bzw. marinen Sedimentböden geben HILL et al. (1996) 40 - 200 KBE / g, DESMARAIS et al. (2002) 5 - 500 KBE / g und SKANAVIS and YANKO (2001) 10 - 1000 KBE / g an. Sehr unterschiedlich wird von den Autoren die Frage nach dem Beginn einer Kontamination beantwortet, die Angaben schwanken zwischen  $6 \times 10^2$  und  $10^8$  KBE *C. perfringens* / g. Angaben zu *C. perfringens* in Böden, die den Berblinger Standorten vergleichbar sind, finden sich in der Literatur nicht. Hier besteht akuter Forschungsbedarf. Ein erster Ansatz in dieser Richtung wurde für ausgewählte bayerische Grünlandstandorte bereits in dieser Studie begonnen (s. unten). Um diese Grundlagen zur Definition einer natürlichen Hintergrundbelastung mit *C. perfringens* zu erarbeiten und einen eventuellen Aufschlag mit *C. perfringens* durch Düngung mit Gülle oder Gärrest festzustellen, sollten die hier begonnenen Untersuchungen unbedingt weitergeführt werden.

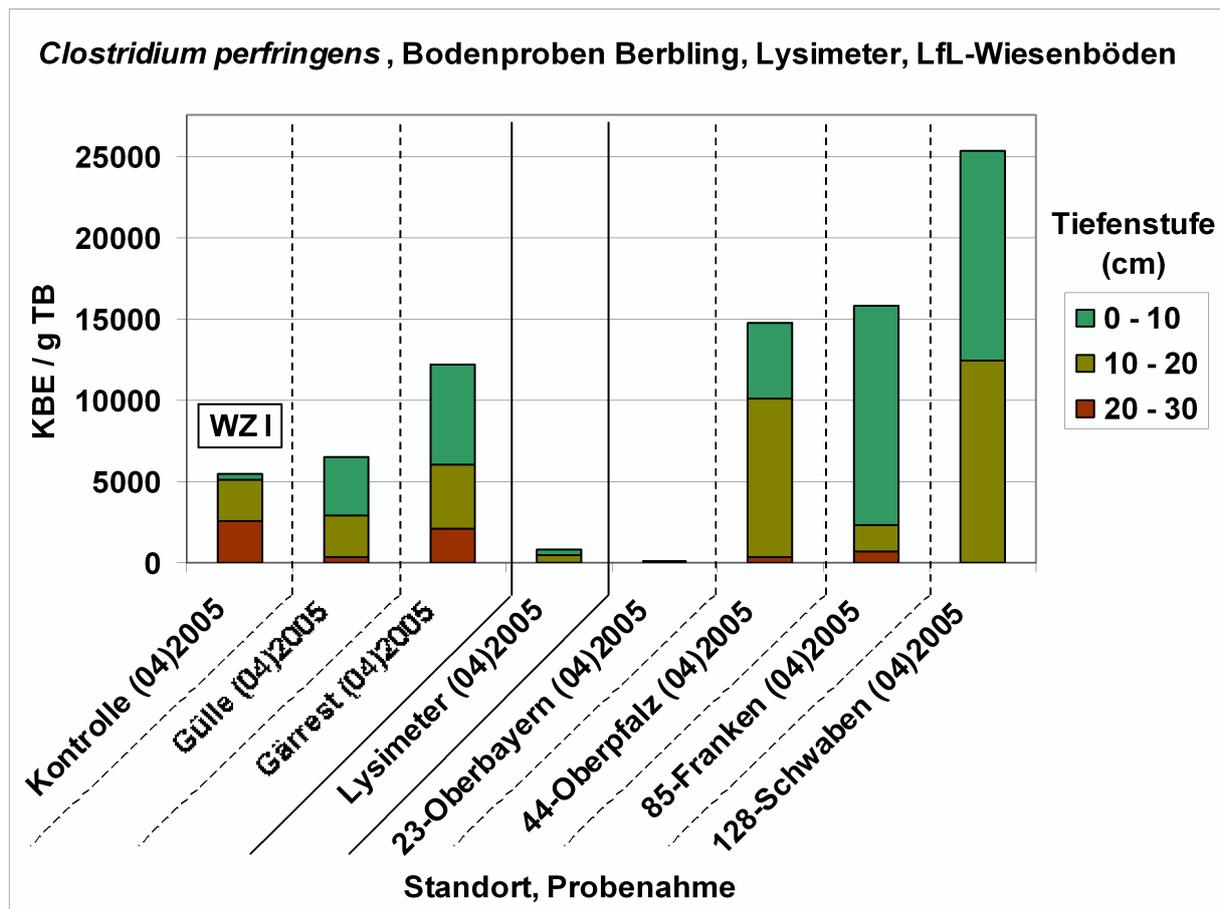
*C. perfringens* fand sich in z.T. erheblichen Konzentrationen selbst noch in 1 m Tiefe im Boden der Berblinger Standorte (Abbildung 83), während im Lysimeterboden an der Sohle (40 - 50 cm Bodentiefe) nur noch 23 KBE *C. perfringens* / g TB festgestellt wurden. Ähnlich wie für die anderen untersuchten mikrobiellen Parameter diskutiert (s. B 3.2.1; B 3.2.2; B 3.2.3; B 3.2.4) ermöglichten wahrscheinlich Wühlmausgänge in den Berblinger Böden (nicht im Lysimeterboden vorhanden) und ggf. Schwundrisse im Lehmband (s. B 2.1.2.1) einen schnellen Transport in die Tiefe. Möglich ist auch ein lateraler Zustrom von *C. perfringens* von benachbarten Standorten, da der Organismus extrem persistent in der Umwelt ist (s. B 3.1.7). Sehr wünschenswert wäre es, hier über Tiefenbohrungen *C. perfringens* im Grundwasser zu analysieren.

Bei der Frage einer eventuellen Kontamination des Grundwassers durch (pathogene) bakterielle Sporenbildner (insbesondere der *B. cereus*-Gruppe sowie toxische Clostridien) durch Aufbringen von Gärrest ist auch deren extreme Überdauerungsfähigkeit zu bedenken. Hier kann kaum zwischen einer (eventuellen) Kontamination durch Sporen im Zustrombereich in der WZ II und der WZ III oder entfernteren Bereichen unterschieden werden (s. B 3.2.4). In einem solchen Falle wäre generell die organische Düngung im Zustrombereich zu reduzieren (s. B 3.2.4).

Um die natürliche Hintergrundbelastung mit *C. perfringens* näher zu charakterisieren, wurden ausgewählte bayerische Grünlandstandorte aus dem Dauerbeobachtungsprogramm der LfL (s. B 2.1.2.3) auf *C. perfringens* analysiert. Die Proben wurden allerdings im Gegensatz zu den Proben vom Gülle- und Gärrestplot aus Berbling noch vor der ersten Güllendüngung genommen, und die Böden nur bis 30 cm Tiefe in 10 cm-Fraktionen (3 Tiefenstufen) beprobt (s. B 2.1.2.3). Die entsprechenden Vergleiche für den Probenahmetermin April 2005 sind in Abbildung 84 dargestellt.

Abbildung 84 zeigt eine starke Variabilität in den *C. perfringens*-Gehalten in den Böden der untersuchten Wiesenstandorte. Im Mittel über die Tiefenstufen wurden für den Standort Grünland 1 50 KBE *C. perfringens* / g TB gemessen, was sogar noch unter den entsprechenden Werten für das Lysimeter lag (s. oben). Vermutlich bedingte der auf Standort Grünland 1 nur unregelmäßige Tierbesatz (Stall-/Wanderschafhaltung, s. B 2.1.2.3) wesentlich die dort sehr geringen *C. perfringens*-Gehalte. Die zumindest im Oberboden sehr geringen C- und hohen Schluff-Gehalte (Tabelle 58) sind Indiz für relative Nährstoffarmut und schlechte Bedingungen für wühlende Bodentiere (s. B 3.2.3). Dies könnte auch zu den geringen *C. perfringens*-Gehalten beigetragen haben.

Die Grünlandstandorte 2, 3 und 4 wiesen im Oberboden relativ hohe C- und höhere Sand-Gehalte als Grünlandstandort 1 und Lysimeter auf (Tabelle 58), was auf nährstoffreichere Bedingungen und bessere Duchwühlbarkeit und damit intensiveres Bodenleben und bessere Vermehrungsmöglichkeiten (u.a.) für *C. perfringens* hinweist. Die Grünlandstandorte 2 und 3 wiesen im Mittel 1,5- bis 3-fach höhere *C. perfringens*-Gehalte als die Berblinger Standorte (incl. WZ I) auf, wurden aber vor der Probenahme letztmalig im Herbst des Vorjahrs mit Gülle gedüngt (s. B 2.1.2.3). Ob dies erste Anzeichen einer Anreicherung mit bakteriellen Sporen infolge Gülle-Düngung im Laufe der Jahre sind, sollte Gegenstand einer weiterführenden Untersuchung sein. Für den Festmist-gedüngten Standort Grünland 4 (s. B 2.1.2.3) wurde der höchste *C. perfringens*-Gehalt (im Mittel 8439 KBE / g TB) in dieser Studie gemessen. Möglicherweise ist dies auch auf Anreicherung mit Sporen zurückzuführen, die den Daten zufolge nach Festmistdüngung besonders ausgeprägt sein könnte. Allerdings ist eine gesicherte Einschätzung, ob wiederholte Gülle- oder Festmistdüngung eine Belastungssituation auslösen, wegen des Fehlens der notwendigen Referenzen (s. oben) z.Zt. noch nicht möglich. Es wird daher angeraten, diese Studien weiterzuführen.



WZ I: Wasserschutzzone I. Standort, Probenahme: Plot (Monat)Jahr bzw. LfL-Code (Monat)Jahr.

Abbildung 84: Bodenproben Berbling, Lysimeter, Bayerische Wiesenböden, Gehalte an *Clostridium perfringens* kumuliert über die analysierten Tiefenstufen

Aus den z.Zt. vorliegenden Daten läßt sich der vorläufige Schluss ziehen, dass *C. perfringens* bei der Biogasproduktion aus Rindergülle (sowie wohl auch aus nachwachsenden Rohstoffen) eine untergeordnete Rolle spielt, dass er sich also während des Prozesses offenbar nicht wesentlich vermehrt (s. B 3.1.7) und sich anscheinend auch nicht über Düngung mit Gärrest im Boden anreichert. Allerdings sollte dies über längerfristige Messreihen im Gärrest und im Boden nach Ausbringung des Gärrests dokumentiert werden, da eine Kontamination des Grundwassers oder von Badegewässern mit diesem Organismus vermieden werden sollte. Ein anderes Bild ergibt sich möglicherweise bei Verwertung anderer tierischer Produkte für die Biogasproduktion (z.B. Vogelkot), hier müssten entsprechende Untersuchungen durchgeführt werden. Bis zur endgültigen Evaluierung der Unbedenklichkeit könnten damit Richtlinien für den Gärrest von  $\leq 3000$  *C. perfringens* / mL geltend gemacht werden. Im Boden sollte die natürliche Hintergrundbelastung nicht überschritten werden, für den Berblingen Standorten vergleichbare Böden wäre das im Mittel über die Tiefenstufen  $\leq 3300$  *C. perfringens* / g TB.

## B 4 Übergreifende Diskussion

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um wissenschaftliche Grundlagen zur Beantwortung von 2 zentralen Fragen zu liefern:

ist die 3-stufig mesophil-thermophil-mesophil betriebene Berblinger Pilot-Biogasanlage geeignet, Rindergülle in einen hygienisch verbesserten Zustand zu bringen, der

a) im Falle eines hygienisch einwandfreien und gesicherten Zustands eine Ausbringung als Wirtschaftsdünger in sensiblen Gebieten wie (z.B. bestimmten Bereichen mit besonderen Merkmalen) der Wasserschutzzone II ermöglichen könnte?

b) bei Ausbringung wesentlich dazu beitragen kann, die diffusen Belastungen von sensiblen Oberflächen- (z.B. Bade-) Gewässern und Trinkwassereinzugsgebieten (z.B. im Karst, weitere Schutzzone) mit potentiell pathogenen Keimen stark zu reduzieren und damit kommende Richtlinien zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie bereits im Vorgriff zu erfüllen?

gibt es Anhaltspunkte für eine Rückverkeimung im Endlager oder im Boden, oder erfolgt ein unnatürlich hoher Aufschlag auf den Boden nach Ausbringung des Gärrests?

### B 4.1 Mikrobiologische Methodik

Zur Beantwortung der bei B 4 genannten zentralen Fragen wurden klassische (selektive) Kultivierung, Infektiositätstests für Kryptosporidien (neben anderen, weniger geeigneten Techniken) und quantitative Real-Time PCR (qPCR) mit direkter Extraktion von DNA aus den Proben (oder in Einzelfällen nach Voranreicherung) eingesetzt.

Es zeigte sich, dass qPCR mit direkter DNA-Extraktion zwar eine verlässliche Quantifizierung der insgesamt vorhandenen Ziel-DNA in den Proben erlaubt, aber nach Abtötungsmaßnahmen die vitale Fraktion der Ziel-Organismen massiv um die tote Fraktion überschätzt, deren DNA offenbar nur sehr langsam in den Fermentern und im Endlager abgebaut wird. Dagegen eignete sich qPCR nach (selektiver) Voranreicherung hervorragend, über klassische (selektive) Kultivierung sonst nur schwierig und aufwändig zu bestimmende Pathogene über einen MPN-Ansatz in Proben zu quantifizieren.

Infektiositätstests (mit humaner HCT-8-Zelllinie) waren hervorragend geeignet, infektiöse Kryptosporidien-Oozysten in den Proben zu quantifizieren und übertrafen herkömmlich verwendete Techniken (Membranintegrität, Exzystierung) hinsichtlich Verlässlichkeit und Spanne des Analysebereichs (Inaktivierung > 5 log-Stufen) bei weitem.

Die klassische (selektive) Kultivierung erwies sich als zuverlässig, auch wenn sich einzelne Methoden als verbesserungsbedürftig herausstellten, und nach den Abtötungsmaßnahmen eine Unterschätzung um die Fraktion sublethal geschädigter Zellen erkennbar war. Diese konnte zwar > 1 log-Stufe betragen, ist aber nach momentanem Kenntnisstand als eher unerheblich einzustufen.

### B 4.2 Hygienisierungsleistung der Berblinger Biogasanlage

Die Überprüfung der Hygienisierungsleistung der Berblinger Biogasanlage sollte, soweit möglich, anhand der autochthonen Pathogenen und Indikatororganismen erfolgen, da Ergebnisse für zugesetzte Laborstämme für diesen Zweck angezweifelt werden könnten. Da dabei die Zielorganismen im Ausgangssubstrat (Rindergülle von gesundem Milchvieh) teilweise nicht in ausreichenden Ausgangskonzentrationen vorhanden waren, ließen sich die angestrebten Reduktionsraten (> 5 log-Stufen) für diese Organismen zumeist nicht dokumentieren. Es konnte aber die Freiheit des Produkts (Gärrest) von diesen Organismen und eine sehr effiziente Reduktion der Gehalte der untersuchten Populationen festgestellt werden (Ausnahme: bakterielle Sporenbildner).

Bei gesicherten 55°C im thermophilen F2 der Berblinger Biogasanlage (sowie in der maßstäblich 1:6 verkleinerten Modellanlage) wurde in den folgenden Kompartimenten bezüglich Fäkalcoliformer und Coliformer Badegewässerqualität festgestellt. Die intestinalen Enterokokken wurden (infolge geringer Ausgangsgehalte in der Gülle nur) um 2,5 – 3,3 log-Stufen reduziert. Dabei standen mittlerweile Ergebnisse zur Verfügung, die eine Reduktion auch der intestinalen Enterokokken um > 5 log-Stufen durch gesicherte 55°C bei gesicherter Verweilzeit von (festgestellten) 8,5 h im thermophilen Berblinger F2 nahelegen, wenn die entsprechende Populationsgröße in der Rindergülle vorhanden gewesen wäre. Mit der Reduktion auf Gehalte zwischen 10 - 100 intestinale Enterokokken / g FG wurde die Marke der Badegewässerrichtlinie 2002/0254(COD) nicht ganz erreicht, die Werte lagen aber etwa im Bereich der in Dränwässern aus ungedüngten Ackerstandorten festgestellten (WEIB und POPP, 2004) natürlichen Hintergrundbelastung. Ergebnisse aus Experimenten mit Diffusions-Keimträgern in einer Modellanlage dokumentierten eine Reduktion infektiöser Kryptosporidien-Oozysten um > 5 log-Stufen bereits nach 4 h 55°C in Rindergülle. Die mesophile Behandlung allein war dazu keinesfalls in der Lage. Für die Sporenbildner (*Bacillus cereus*-Gruppe und *Clostridium perfringens*) blieb die Populationsgröße praktisch unverändert, eine Reduktion konnte aber wegen ihrer extremen Tenazität auch nicht erwartet werden. Eine nennenswerte Anreicherung mit diesen Pathogenen in der Biogasanlage (incl. Endlager) fand nicht statt.

Da die intestinalen Enterokokken eine höhere Tenazität aufweisen als alle anderen untersuchten Bakterien(gruppen) (Ausnahme: bakterielle Sporenbildner), Viren und Parasiten, eignen sich die intestinalen Enterokokken als idealer Indikator, die Hygienisierungseffizienz während der (thermophilen) Biogasproduktion zu dokumentieren. Hier wird der Vorschlag gemacht, die Prozesseffizienz über die Reduktion intestinaler Enterokokken um > 4 log-Stufen innerhalb der gegebenen minimalen gesicherten Verweilzeit in Prozesskontrollen (ggf. in Keimträgern) nachzuweisen. Um einen hygienisch einwandfreien Status des Gärrests auszuweisen, sollte der Gehalt intestinaler Enterokokken in einer Produktkontrolle (im Endlager, kurz vor Ausbringung) unter 150 KBE / mL liegen. In Grenzfällen sollte die Rückverkeimung über eine Bestimmung coliformer (und fäkalcoliformer) Keime kurz vor Ausbringung im Endlager überprüft werden, da diese am empfindlichsten mit Rückverkeimung auf Störungen im Prozess reagierten. Die Coliformen beinhalten eine Reihe thermotoleranter potentiell enteropathogener Bakterien, die bei (unentdeckten) Prozessstörungen wieder aufkeimen könnten. Coliforme sollten dabei 150 MPN / mL und Fäkalcoliforme 5 MPN / mL bei (konventioneller) 24 h Bebrütung bei 37°C nicht überschreiten.

Ein Effekt der in der Berblinger Fermenterkette vor- und nachgeschalteten mesophilen Stufen auf die Hygienisierungsleistung konnte nicht festgestellt werden. Die thermophile Stufe allein genügte (bei gesicherten 55°C) den Daten zufolge, die für die Gesamtanlage beobachtete Hygienisierungsleistung zu erreichen, keinesfalls aber eine mesophile Behandlung allein. Den Ergebnissen zufolge ist die konsequente Einhaltung einer Prozesstemperatur von 55°C über eine gesicherte Verweilzeit von mindestens 4 h (besser 8 - 9 h) unbedingt erforderlich. Interessanterweise wird eine 4 h Behandlung bei 55°C als einer Pasteurisierung (30min, 70°C) adäquat angesehen (GODFREE and FARRELL, 2005), und nach CARRINGTON (2001) ist ein derart behandelter Klärschlamm Pathogen-frei. Die DANISH NOTIFICATION NO. 823 (1996) bezeichnet sogar eine minimale garantierte Verweildauer von 6 h bei 55°C in einem (thermophilen) Fermenter als äquivalent einer einstündigen Behandlung bei 70°C (O'REILLY and COLLERAN, 2004).

Wenn möglichst optimale Hygienisierungsergebnisse erzielt werden sollen, auch im Hinblick auf eine mögliche Auswaschung von nicht abgetöteten Mikroorganismen in das Grundwasser, müssen an Technik und Umgang mit dem Düngegut zusätzliche Ansprüche gestellt werden. Die Temperatur sollte on-line im Substrat des thermophilen Fermenters dokumentiert werden.

Das Prinzip der Schwarz-Weiß-Trennung ist unbedingt zu beachten, nach Durchgang durch den thermophilen Fermenter sollte keine Kontaminationsmöglichkeit des Gärrests von außen bestehen. Hier wird auch angeraten, nachgeschaltete Lager/Fermenter/Ausbringbehälter zur Dokumentation regelmäßig auf einwandfreien hygienischen Zustand (z.B. auf Coliforme/Fäkalcoliforme) zu überprüfen und ggf. zu reinigen.

### **B 4.3 Effekte der Gärrest-Ausbringung im Boden**

Im Rahmen des Gemeinschaftsprojekts wurde über dem Boden mit Gärrest ein gegenüber Gülle nur leicht höherer  $\text{NH}_3$ -Partialdruck festgestellt, der nicht als Geruchsbelästigung empfunden wurde (HENKELMANN, 2006). Anderen Ergebnissen zufolge ist die  $\text{NH}_3$ -Ausgasung aus Gärrest oft nicht stärker als aus Gülle (EFFENBERGER et al., 2006). Die C-Bilanz ist bei Gärrest- im Vergleich zu Gölledüngung günstig, da die direkte Emission des klimarelevanten  $\text{CO}_2$  (zunächst) um den Betrag des Methans reduziert ist, und der Gärrest wohl daher ein zur Düngung etwas günstigeres, engeres C/N-Verhältnis aufwies (Gülle: 17, Gärrest: 14, EFFENBERGER et al., 2006). Im Boden unter Gülle und Gärrest wanderten Bakterien und  $\text{Li}^+$ -Tracer gleichschnell (HENKELMANN, 2006), dabei dringt der Gärrest infolge geringerer Viskosität (höherer Wasseranteil) schneller als Gülle in den Boden ein und ist auch schneller pflanzenverfügbar. Bei sachgemäßer Düngung des Gärrests wurden durch Herrn Schweiger eher Vorteile beim Pflanzenwuchs festgestellt, allerdings kann unsachgemäße Düngung zu Pflanzenschäden führen (s. B 2.1.2.1). Bezüglich Nährstoffausbringung und Düngemanagement empfiehlt PERETZKI (2006, in EFFENBERGER et al., 2006) Gärrest und Gülle gleich zu behandeln. In den Bereichen Pflanzenversorgung und Emissionen bieten sich demnach bei Gärrestdüngung (außer der etwas höheren  $\text{NH}_3$ -Ausgasung) eher Vorteile, insbesondere wenn die mit der Produktion regenerativer Energieträger (i.e. Biogas) verbundene Einsparung fossiler Energieträger bei der Vergärung und die bessere hygienische Situation (s.u.) betrachtet wird.

Um Effekte einer Gärrest-Ausbringung im Boden zu evaluieren, wurden in der vorliegenden Studie ausschließlich bakterielle Parameter geprüft (Viren und Parasiten werden im Boden nicht wiederverkeimen). Nicht geprüft wurden Effekte der veränderten Nährstoffzusammensetzung (relativ hoher  $\text{NH}_4^+$ -Anteil im Gärrest) auf die  $\text{NO}_3^-$ -Fracht und eine mögliche Gefährdung des Grundwassers durch eventuell mitausgebrachte Xenobiotika wie Arzneimittelrückstände und Antibiotika. Bei der Frage einer eventuell erhöhten Nitratbelastung des Grundwassers über Nitrifizierung nach Gärrest-Düngung ist zu bedenken, dass der Gärrest empfehlerweise stärker verdünnt als Gülle (und mit Schleppschlauch/-schuh) ausgebracht werden sollte, um Verätzungen der Pflanzen zu vermeiden. Pflanzen nehmen auch vorzugsweise  $\text{NH}_4^+$  auf. Wegen des relativ großen  $\text{NH}_4^+$ -Anteils (um 21,6 % mehr  $\text{NH}_4\text{-N}$  als in Gülle, EFFENBERGER et al., 2006; Nitrat sollte in Gärrest primär nicht enthalten sein) sollte dennoch über Tiefenbohrungen überprüft werden, ob sich infolge Gärrest-Düngung eine relevante  $\text{NO}_3^-$ -Anreicherung im Grundwasserstrom ergibt. Es muss auch angenommen werden, dass Arzneimittelrückstände und Antibiotika während der thermophilen Behandlung abgebaut werden, allerdings ist die tatsächliche Belastung des Bodens und Grundwassers durch Gärrestausbringung unbekannt. Hier wird eine wissenschaftliche Untersuchung stark angeraten.

Bei der Diskussion einer eventuellen Düngungs-bedingten Anreicherung mit Bakterien im Boden ist die Kürze der Untersuchungsdauer und die ausgeprägte zeit-/räumliche Heterogenität des Bodens und die entsprechende Variabilität der Ergebnisse zu bedenken. Hier ist keine abschließende Bewertung möglich, wohl aber zeichneten sich teilweise Tendenzen ab, die in weiterführenden Untersuchungen bestätigt werden müssen.

Eine nennenswerte Anreicherung Fäkalcoliformer konnte, wahrscheinlich wegen schnellem Abbaus im Boden, weder nach Gärrest- noch nach Gölledüngung festgestellt werden. Den Befunden für die WZ I zufolge scheinen auch temperate Böden natürlicherweise mit etwa 2

Fäkalcoliformen / g TB belastet sein zu können. Eine Belastung mit Coliformen, die natürlicherweise mit etwa 5 – 10 MPN / g TB auftraten, konnte ebenfalls nicht eindeutig festgestellt werden, allenfalls ein leichter Aufschlag im Gülleplot. Kein Aufschlag konnte ebenfalls für die sporenbildenden Vertreter der *B. cereus*-Gruppe (*BcG*) und für *C. perfringens* festgestellt werden, hier schienen die geringeren Gehalte im Lysimeterboden eher auf den dort fehlenden Besatz mit Bodentieren und/oder Nährstoffarmut zurückzugehen. Die Populationen beider Parameter schienen aber im Boden eher stabil und nur in Ausnahmesituationen (Tierkadaver, Ablagerung von Faeces) deutlich erhöht zu sein. Für den Gülleplot wurden im Mittel deutlich und für den Gärrestplot geringfügig höhere Gehalte an intestinalen Enterokokken gegenüber der WZ I-Kontrolle erhalten, allerdings war auch hier kein klarer Trend erkennbar. Die Differenzen waren wahrscheinlich überlagert durch Effekte heterogener Verteilung von Bodentierkot im Boden und starker Adsorption der intestinalen Enterokokken an die Bodenmatrix, die hohe Variabilität der Ergebnisse bewirkten.

Während die Fäkalcoliformen und Coliformen als unkritisch angesehen werden, sollte eine eventuelle Anreicherung intestinaler Enterokokken und der Sporenbildner im Boden über Fortsetzung der Studien weiterverfolgt werden, um ggf. rechtzeitig eingreifen zu können. In diesem Zusammenhang sind auch die Ursachen der für alle Parameter beobachteten relativ hohen Gehalte noch in 1 m Bodentiefe abzuklären. Sollten hier Kurzschlüsse zum Grundwasser über die Wühlmausgänge und weiter über eventuelle Schwundrissbildung bei Trockenheit entstehen, könnten bei Starkregen mit dem Spülstoß unerwünschte Keime in den Grundwasserstrom gelangen. Im Falle von Gärrestdüngung sollte eine eventuelle Belastung des Grundwasserstroms mit den Sporenbildnern untersucht werden, da diese während des Biogasprozesses nicht reduziert wurden. Es ist anzuraten, entsprechende Untersuchungen mit Hilfe von Tiefenbohrungen vorzunehmen. Um einer Unfallsituation vorzubeugen, wird angeraten, im Falle einer vorgesehenen Ausbringung von Gärrest in sensiblen Gebieten (s. B 1.1, B 4) und gleichzeitigem Verdacht einer Kontamination des Gärguts (z.B. mit Kot von Fleischfressern) (s. B 3.1.7) auch *C. perfringens* regelmäßig im Gärrest (bzw. Gärgut) zu untersuchen (aerobe *BcG*-Vertreter sollten während des anaeroben Biogasprozesses nicht zunehmen). Dabei sollte *C. perfringens* ein Niveau von  $3 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  KBE / mL (gegenwärtiger Kenntnisstand) nicht überschreiten.

#### B 4.4 Fazit

Sauberes Trinkwasser ist sicher eines unserer wertvollsten Güter - und das muss auch so bleiben. Mit der Ausweitung der Wasserschutzgebiete sind allerdings für die betroffenen Landwirte (besonders mit Viehhaltung Entsorgungs-) Probleme verbunden, die über intelligente und umweltfreundliche Technologien wie der Biogasproduktion gelöst werden könnten. Der Einsatz der Biogastechnologie kann auch eine Belastungsverminderung von Badegewässern durch diffuse landwirtschaftliche Einträge bewirken. Ist vorgesehen, Gärrest aus der Vergärung von Gülle in sensiblen Bereichen, in denen der Eintrag von Krankheitserregern in das Grundwasser oder in andere Gewässer verhindert werden muss, als Dünger auszubringen, muss die effiziente Hygienisierung des Substrats über Prozess- und Produktkontrollen als zentraler Punkt dokumentiert werden, um den Grundwasserstrom nicht mit potentiell pathogenen Keimen zu infizieren und den Bodenfilter nicht über das natürliche Hintergrund-Niveau hinaus zu belasten.

Die vorliegende Studie bestätigte, dass die Berblinger Biogasanlage bei optimaler Prozessführung (gesicherte 55°C im thermophilen Fermenter bei minimaler gesicherter Verweilzeit von 8 - 9 h) in der Lage war, potentiell pathogene Keime (Bakterien, Parasiten, Viren) in Rindergülle in einem Maß abzutöten, dass der Gärrest als in hygienischer Qualität sehr stark verbessert einzustufen war. Nicht reduziert wurden allerdings bakterielle Sporenbildner (*Bacillus cereus*-Gruppe, *Clostridium perfringens* - sowie vsl. ähnlich potentiell pathogene Sporenbildner mit ähnlicher Tenazität wie z.B. *C. botulinum*, *C. tetani*).

Es wurde zwar innerhalb des kurzen Beobachtungszeitraums kein Anhalt für deren Anreicherung im Boden der Berblinger Standorte gefunden, es wird allerdings angeraten, dies in einer längerfristigen Studie zu bestätigen, sowie die Möglichkeit eines Kurzschlusses in den Grundwasserstrom, eine Anreicherung mit Xenobiotika (v.a. Arzneimittelrückstände, Antibiotika, Schwermetalle) und die Nitrifizierung im Boden nach Gärrest-Ausbringung mit Verlagerung von  $\text{NO}_3^-$  in den Grundwasserstrom zu untersuchen. In diese Studie sollten auch intestinale Enterokokken einbezogen werden.

Wo dies in wasserwirtschaftlich sensiblen Gebieten (noch) zulässig ist, z.B. in der weiteren Schutzzone im Karst und im Einzugsgebiet von Badegewässern, ist daher eine Ausbringung von Gärresten statt unbehandelter Wirtschaftsdünger sehr zu begrüßen. Für möglichst optimale Hygienisierungsergebnisse, auch im Hinblick auf eine mögliche Auswaschung von nicht abgetöteten Mikroorganismen in das Grundwasser, sollen insbesondere folgende Prüfkriterien beachtet werden:

#### A: Standortprüfung

Die hydrogeologische Situation sollte einen direkten Kurzschluss zum Grundwasserstrom ausschließen:

keine Gärrestausbringung z.B. über Karst, Kies oder Grobsand mit direktem Grundwasseranschluss,

bei Böden mit typischerweise ausreichender Überdeckung und Filtereigenschaft sollten bodenart- und witterungsbedingte Ausschlussfälle im Rahmen von standortbezogenen Hinweisen zur Gärrestapplikation für Beratung und Praxis differenziert definiert werden. Gärrest sollte z.B. nicht auf einem tonreichen Boden nach längerer Trockenheit (Schwundrissebildung) ausgebracht werden.

#### B: Baumusterprüfung

Das Verfahren sollte bei thermophil anaerober Vergärung eine minimale gesicherte Verweilzeit (MGRT) von  $> 4$  h bei gesicherten  $\geq 55^\circ\text{C}$  im thermophilen Fermenter beinhalten (um einen Toleranzspielraum freizuhalten wären 8 - 9 h MGRT oder eine höhere Temperatur wünschenswert), alternativ eine Pasteurisierung oder einen adäquaten Schritt. Vorgeschlagene Technologien sollten im Rahmen einer Baumusterprüfung die geforderte MGRT nachweisen. Kurzschlüsse während des Prozesses sind auszuschließen (in Rührkessel-Fermentern bestimmt das Beschickungs-Intervall die MGRT), nach der thermophilen (oder adäquaten) Hygienisierungs-Stufe muss Schwarz-Weiß-Trennung gegeben sein.

#### C: Prozesskontrolle

Die Prozesstemperatur von  $\geq 55^\circ\text{C}$  sollte im Betrieb on-line verfolgt und dokumentiert werden (indirekte Prozesskontrolle)

Eine zumindest einmalig nach Inbetriebnahme (steady-state Betrieb) exemplarisch vorgenommene direkte Prozesskontrolle sollte die Reduktion intestinaler Enterokokken um  $> 4 \log_{10}$ -Stufen demonstrieren. Die Reduktion kann ggf. mit Hilfe in den Fermenterinhalt eingebrachter Keimträger mit  $10^6 - 10^7$  KBE *Enterococcus faecium* / mL nachgewiesen werden, wobei die für den Betrieb vorgesehene MGRT ( $> 4$  h) als Verweilzeit dient.

#### D: Substrat- und Endproduktkontrolle

Substrat ist Rindergülle von gesundem Milchvieh, ggf. unbedingte nachwachsende pflanzliche Rohstoffe (in Mischung mit solcher Rindergülle). Andere Substrate oder Mischungen mit diesen sind vorher auf Eignung und Hygienisierung zu evaluieren.

Nach Inbetriebnahme (steady-state Betrieb) sollte eine etwa 2 Wochen vor Ausbringung vorgenommene Produktprüfung (Endlagerprobe) dem Gärrest folgende Qualitäten bestätigen:

$< 150$  intestinale Enterokokken / mL (Membranfilter, Kultivierung auf Äsculin-Galle-Agar nach Slanetz-Bartley-Agar, s. B 2.3.2.2),

$< 5$  Fäkalcoliforme / mL und/oder  $< 100$  Coliforme / mL (Fluorocult®-System, s. B 2.3.2.1),

optional, bei unklarer Herkunft des Gärguts, v.a. bei nicht ausgeschlossener Kontamination mit Kot von Fleischfressern: < 3000 *Clostridium perfringens* / mL (TSCF-Plattenguss, s. B 3.1.7).

Diese Endproduktprüfung sollte bei gleichbleibender Prozessführung in der Anlage 1x jährlich wiederholt werden, insbesondere nach der Winterpause vor der ersten Frühjahrsdüngung, da besonders nach längerer Lagerung Wiederverkeimung nicht auszuschließen ist und überprüft werden sollte.

#### E: Betriebsänderungen

Im Falle von Änderungen des Anlagenbetriebs sollte der unter den neuen Bedingungen produzierte Gärrest erst dann ausgebracht werden, wenn Prozess- und Endproduktkontrollen seinen hygienisch einwandfreien Zustand bestätigt haben.

Bei Einhaltung dieser Maßgaben kann auf Basis der aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnislage davon ausgegangen werden, dass von Gärrest-Ausbringung nach den oben definierten Kriterien in landwirtschaftlich üblicher Dosierung keine hygienisch relevante Gefährdung des Grundwasserstroms und von Oberflächengewässern ausgeht. Das Verfahren eignet sich nach jetzigem Kenntnisstand besonders, die diffusen landwirtschaftlichen hygienischen Belastungen von Trinkwassereinzugsgebieten, Badegewässern und Vorflutern zu vermindern. Wenn aktuellere Informationen insbesondere zu der Frage der Anreicherung von Sporenbildnern im Boden, Drän-, Sicker- Grund- und Trinkwasser vorliegen, könnte die vorgeschlagene Konzeption zu überdenken sein.

## B 5 Referenzen

- ALONSO, J.L., SORIANO, A., CARBAJO, O., AMOROS, I. and GARELICK, H. (1999): Comparison and recovery of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in water with a chromogenic medium incubated at 41 and 44.5°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3746-3749.
- ANONYMUS (1994): Arbeitshilfe – Musterverordnung für Wasserschutzgebiet vom 01.07.1994. Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen.
- ARAUJO, M., SUEIRO, R.A., GÓMEZ, M.J. and GARRIDO, M.J. (2001): Evaluation of fluorogenic TSC agar for recovering *Clostridium perfringens* in groundwater samples. *Water Sci. Technol.* 43, 201–204.
- ARAUJO, M., SUEIRO, R.A., GÓMEZ, M.J. and GARRIDO, M.J. (2004): Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in groundwater samples: comparison of six culture media. *J. Microbiol. Methods* 57, 175-180.
- ASHBOLT, N.J., GRABOW, W.O.K. and SNOZZI, M. (2001): Indicators of microbial water quality. In: *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*, L. Fewtrell and J. Bartram (Eds.). IWA Publishing, London, UK, pp. 289–315.
- BASTOS, R.K.X., HELLER, L., VIEIRA, M.B.M., BRITO, L.A., BEVILACQUA, P.D., and NASCIMENTO, L.E. (2004): *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts dynamics in southeast Brazil: occurrence in surface water and removal in water treatment processes. *Water Sci. Tech.: Water Supply* 4, 15-22.
- BENDIXEN, H.J. (1999): Hygienic safety: results of scientific investigations in Denmark (sanitation requirements in Danis Biogas Plants). In: *Proceedings of the IEA workshop: "Hygienic and environmental aspects of anaerobic digestion: legislation and experiences in Europe."* pp. 27-47. Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- BETANCOURT, W.Q. and ROSE, J.B. (2004): Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Vet. Parasitol.* 126, 219-34.
- BROWN, K.L. (2000): Control of bacterial spores. *Brit. Med. Bull.* 56, 158-171.
- BUKHARI, Z., MARSHALL, M.M., KORICH, D.G., FRICKER, C.R., SMITH, H.V., ROSEN, J. and CLANCY, J.L. (2000): Comparison of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2972-2980.
- BUSTIN, S.A. and NOLAN, T. (2004): Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 15, 155-166.
- CARRINGTON, E.G. (2001): Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction – final report. WRc Ref: CO 5026/1 / 12787-0, European Commission Directorate – General Environment, pp. 1-45.
- CHRIST, O., WILDERER, P.A. AND FAULSTICH, M. (1997): The TherMes-Process: Two stage thermophilic/mesophilic anaerobic treatment of suspended organic waste. In: 1st International BayFORREST conference on Treatment of Solid Waste and Wastewater, P.A. Wilderer, J.-P. Delgenes, D. C. Tartler and S. Graja, eds, BayFORREST, München.
- CHRIST, O. (1999) Leistungscharakteristik der ein- und zweistufigen thermophilen und mesophilen Vergärung von Bioabfällen. *Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft* Nr. 148, ISSN 0942-914X.

- CONBOY, M.J. and GOSS, M.J. (2001): Identification of an assemblage of indicator organisms to assess timing and source of bacterial contamination in groundwater. *Water Air Soil Poll.* 129, 101-118.
- CRAIG, D.L., FALLOWFIELD, H.J. and CROMAR, N.J. (2002): Enumeration of faecal coliforms from recreational coastal sites: evaluation of techniques for the separation of bacteria from sediments. *J. Appl. Microbiol.* 93, 557-565.
- DANISH NOTIFICATION NO. 823 (1996): Statutory order from the Ministry of Environment and Energy No. 823 of Sept. 16, 1996, on application of waste products for agricultural purposes. Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency.  
<http://www.mst.dk/rules/Ministerial%20Orders%20no%20longer%20in%20force/Agriculture%20not%20in%20force/05010500.doc>
- DE MAN, J.C. (1983): MPN tables, corrected. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 301-305.
- DENT, B.B., FORBES, S.L. and STUART, B.H. (2004): Review of human decomposition processes in soil. *Environ. Geol.* 45, 576-585.
- DESMARAIS, T.R., SOLO-GABRIELE, H.M. and PALMER, C.J. (2002): Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1165-1172.
- DEUTRICH, V. und PIOCH, G. (1991): Infektionsrisiko für Mensch und Tier durch langjährig gelagerte Rindergülle. *Mh. Vet.-Med.* 46, 651-655.
- DOLL, L., MEYER, H., OECHSNER, H. und PHILIPP, W. (1999): Verfahrenstechnische und mikrobiologische Untersuchungen zur Abtötung von Kryptosporidien in Flüssigmist mittels der Verfahren der aerob-thermophilen Stabilisierung und der thermophilen Anaerobbehandlung. Landesanstalt für Landwirtschaftliches Maschinen- und Bauwesen und Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, Abschlussbericht an das Ministerium für Ländlichen Raum Baden-Württemberg, Projekt Nr. 0056.
- DOULTREE, J.C., DRUCE, J.D., BIRCH, C.J., BOWDEN, D.S., and MARSHALL, J.A. (1999): Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.* 41, 51-57.
- EFFENBERGER, M., BACHMAIER, J., GARCÉS, G., GRONAUER, A., WILDERER, P. A. and LEBUHN, M. (2005a): Mesophilic-thermophilic-mesophilic anaerobic digestion of liquid dairy cattle manure. *Water Sci. Tech.*, submitted.
- EFFENBERGER, M., BACHMAIER, J. und GRONAUER, A. (2006): Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten. Abschlussbericht der Arbeitsgruppe Reststoffmanagement, Arbeitsbereich Umwelttechnik in der Landnutzung, Institut für Landtechnik, Bauwesen und Umwelttechnik (ILT) der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL).
- ERREBO LARSEN H.E. and MUNCH B. (1990): Reduction of pathogenic and indicator organisms in biological waste - especially slurry - subjected to various treatments. In: D. Strauch (ed.): Aktuelle Probleme der Desinfektion von Nutztierställen sowie von Fest- und Flüssigmist, 3. Hohenheimer Seminar, Institute for Environmental and Animal Hygiene and Veterinary Medicine, University Hohenheim, 18-19 September 1990. *Dt. Veterinärmed. Ges. e.V. (DVG), Giessen*, pp. 169-177.
- FAO (1997): Quality control of wastewater for irrigated crop production. (Water reports - 10). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1997, ISSN 1020-1203.

- FAYER, R., TROUT, J.M. and JENKINS, M.C. (1998): Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. J. Parasitol. 84, 1165-1169.
- FAYER, R., MORGAN, U. and UPTON, S.J. (2000): Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. J. Parasitol. 30, 1305-1322.
- FINK, A. WEBER, A., WINTER, D., MARTENS, W. und PHILIPP, W. (1997): Veterinär- und seuchenhygienische Untersuchungen zur Überprüfung von Gülleaufbereitungsverfahren und der erzeugten Gülleaufbereitungsprodukte“. In: „Umweltverträgliche Gülleaufbereitung und -verwertung“ KTBL-Arbeitspapier 242, S. 87-96.
- FREEMAN, W.M., WALKER, S.J. and VRANA, K.E. (1999): Quantitative RT-PCR: potential and pitfalls. BioTechniques, 26, 112–125.
- GARCÉS-SANCHEZ, G., IHLE, S. and LEBUHN, M. (2004a): Quantification of *Enterovirus* in environmental samples by Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR (RTqPCR) - optimization of RNA extraction and RTqPCR protocols. BIOSpektrum, Sonderausgabe 2004, p. 153.
- GARCÉS-SANCHEZ, G., EFFENBERGER, M., NAJDROWSKI, M., GRONAUER A., WILDERER, P.A. and LEBUHN, M. (2004b): Optimizing quantification of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cattle manure and effluents from anaerobic digesters by quantitative real-time PCR (qPCR). Proc. 10th World Congress on Anaerobic Digestion. Aug. 29 - Sep. 2, 2004, Montreal, Canada, ed. S. Guiot, pp. 1749-1752.
- GARCÉS, G., EFFENBERGER, M., NAJDROWSKI, M., WACKWITZ, C., GRONAUER, A., WILDERER, P.A. and LEBUHN, M. (2005): Quantification of *Cryptosporidium parvum* in anaerobic digesters treating manure by (reverse-transcription) quantitative real-time PCR, infectivity and excystation tests. Water Sci. Tech., submitted.
- GELDREICH, E.E. (1978): Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. In: Berg, G. (ed.), Indicators of viruses in water and food. Ann. Arbor Science, Ann. Arbor, Mich., 51-97.
- GODFREE, A. and FARRELL, J. (2005): Processes for Managing Pathogens. J. Environ. Qual. 34, 105–113.
- HÄNNINEN, M.-L. and KÄRENLÄMPI, R. (2004): *Campylobacter* in waterborne epidemics in Finland. Water Sci. Technol.: Water Supply 4/2, 39-45.
- HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J. and WILLIAMS, P.M. (1996): Real time quantitative PCR. Genome Res., 6, 986–994.
- HEILMANN, B., LEBUHN, M. und BEESE, F. (1993): Wirkungen chemischer Belastungen auf Struktur und metabolische Aktivität der Mikroflora eines Ackerbodens (Mikrokosmenversuch). Mitteilungen Dt. Bodenkundl. Gesellsch. 72, 539-542.
- HEILMANN, B., LEBUHN, M. und BEESE, F. (1995): Methods for the investigation of metabolic activities and shifts in the microbial community in a soil treated with a fungicide. Biol. Fertil. Soils 19, 186-192.
- HENKELMANN, G. (2006): Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten, Abschlussbericht des StMUGV-Teilprojekts: Wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchungen – Lysimeter-, Labor- und Praxisversuche, pp. 1-31.
- HILL, R.T., STRAUBE, W.L., PALMISANO, A.C., GIBSON, S.L. and COLWELL, R.R. (1996): Distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1741-1746.

- HOFERER, M. (2001): Seuchenhygienische Untersuchungen zur Inaktivierung ausgewählter Bakterien und Viren bei der mesophilen und thermophilen anaeroben alkalischen Faulung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft. Inaugural Dissertation beim Fachbereich Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin, Journal-Nr. 2528, S. 1-211.
- HOU, L., LI, X., DUNBAR, L., MOELLER, R., PALERMO, B., and ATWILL, E.R. (2004): Neonatal-mouse infectivity of intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after optimized in vitro excystation. Appl. Environ. Microbiol., 70, 642–646.
- HUBER, S. (2002): Entwicklung einer auf 5'-Nukleaseaktivität und Polymerase-Kettenreaktion basierenden Methode zum quantitativen Nachweis von *Escherichia coli* in Rindergülle. Studienarbeit im Rahmen des Aufbaustudiums Umweltschutztechnik, Lehrstuhl für Wassergüte und Abfallwirtschaft, Technische Universität München, 41 S.
- HÖHNE, M. and SCHREIER, E. (2004): Detection and characterization of Norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. J. Med. Virol. 72, 312-319.
- IHLE, S., PUSCH, D., LEBUHN, M., GRÄBER, I. and LOPEZ-PILA, J.M. (2003): Quantitative detection of enteroviruses in activated sludge: a comparison between cell culture detection and real-time PCR of the enteroviral RNA. Umweltmed. Forsch. Prax. 8 (4), 222.
- JONES, P. and MARTIN, M. (2003): A review of the literature on the occurrence and survival of pathogens of animals and humans in green compost. Institute for Animal Health, Compton, Newbury, Berkshire, RG20 7NN, UK, The Waste and Resources Action Programme, [www.wrap.org.uk](http://www.wrap.org.uk), ISBN: 1-84405-063-7, pp. 1-34.
- KAGAWA, H. (1971): Adsorption of bacteria by soil. Soil Sci. Plant Nutr. 17, 150-153.
- KNIE, A., MARTENS, W., PHILIPP, W. und BÖHM, R. (2000): Ergebnisbericht zu den begleitenden seuchenhygienisch-mikrobiologischen Untersuchungen bei der Verwertung von Inkontinenzwindeln aus Altenheimen zusammen mit Bio- und Gewerbeabfällen in der Anaerobanlage Erkheim. Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim (Prof. Dr. R. Böhm), Dezember 2000.
- KÜHN, I., IVERSEN, A., BURMAN, L.G., OLSSON-LILJEQUIST, B., FRANKLIN, A., FINN, M., AARESTRUP, F., SEYFARTH, A.M., BLANCH, A.R., VILANOVA, X., TAYLOR, H., CAPLIN, J., MORENO, M.A., DOMINGUEZ, L., HERRERO, I.A. and MÖLLBY, R. (2003): Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. Int. J. Food Microbiol., 88, 133-145.
- LAKE, R., HUDSON, A. and CRESSEY, P. (2004): Risk profile: *Yersinia enterocolitica* in pork. Institute of Environmental Science & Research Limited, Christchurch Science Centre, New Zealand, Client Report FW0328.
- LARSEN, H.E., MUNCH, B. and SCHLUNDT, J. (1994): Use of indicators for monitoring the reduction of pathogens in animal waste treated in biogas plants. Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 195, 544-555.
- LEBUHN, M. (2002): Erster Zwischenbericht des StMLU-Projekts: Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung, Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen, Technische Universität München, Lehrstuhl für Wassergüte- und Abfallwirtschaft, 12 S.
- LEBUHN, M. (2003): Zweiter Zwischenbericht des StMLU-Projekts: Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in

- Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung, Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen, Technische Universität München, Lehrstuhl für Wassergüte- und Abfallwirtschaft, 24 S.
- LEBUHN, M., EFFENBERGER, M., GRONAUER, A., WILDERER, P.A. and WÜRTZ, S. (2003): Using quantitative real-time PCR to determine the hygienic status of cattle manure. *Water Sci. Tech.* 48, 97-103.
- LEBUHN, M., EFFENBERGER, M., GARCÉS, G., NAJDROWSKI, M., GRONAUER, A. and WILDERER, P.A. (2004a): Quantification of *Cryptosporidium parvum* in cattle manure by Real-Time PCR - development of a suitable DNA extraction routine. *BIOspektrum*, Sonderausgabe 2004, p. 57.
- LEBUHN, M., EFFENBERGER, M., GARCÉS, G., GRONAUER, A. and WILDERER, P.A. (2004b): Evaluating Real-Time PCR for the Quantification of Distinct Pathogens and Indicator Organisms in Environmental Samples. *Water Sci. Tech.* 50, 263-270.
- LEBUHN, M. and MAJEWSKI, K. (2005): Reliable quantification of nucleic acid containing organisms in environmental samples using a standard spiking approach, Real-Time quantitative PCR, and data analysis by programme CeTe. In Vorbereitung.
- LEBUHN, M., EFFENBERGER, M., GARCÉS, G., GRONAUER, A. and WILDERER, P.A. (2005): Hygienization by anaerobic digestion: comparison between evaluation by cultivation and quantitative real-time PCR. *Water Sci. Tech.* 52/1-2, 93-99.
- LENHART, B. (2001): Bedeutung und Verminderung diffuser Belastungen im Einzugsbereich der Oberen Isar. In: Stoffbewertung und Gewässerökologie - Hygienische Aspekte von Oberflächengewässern aus wasserwirtschaftlicher Sicht. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft: 55. Fachtagung - Kurzfassung der Vorträge.
- LEPEUPLE, A.S., GAVAL, G., JOVIC, M. and DE ROUBIN, M.R. (2004): Literature review on levels of pathogens and their abatement in sludges, soil and treated biowaste. Anjou Recherche. Horizontal Project 6, WP3: Hygienic parameters, pp. 1-53. [ftp://ftp.ecn.nl/pub/www/society/horizontal/hor6\\_pathogens.pdf](ftp://ftp.ecn.nl/pub/www/society/horizontal/hor6_pathogens.pdf).
- LIE, Y.S. and PETROPOULOS, C.J. (1998): Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. ViroLogic, Inc, South San Francisco, California, USA. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 43-48.
- LLEÒ, M.M., BONATO, B., TAFI, M.C., SIGNORETTA, C., BOARETTI, M. and CANEPARI, P. (2001): Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J. Appl. Microbiol.* 91, 1095-1102.
- MATCHES, J.R., LISTON, J. and CURRAN, D. (1974): *Clostridium perfringens* in the environment. *Appl. Microbiol.* 28, 655-660.
- MEYER, J., PHILIPP, W. und BÖHM, R. (1999): Verfahrenstechnische und mikrobiologische Untersuchungen zur Abtötung von Kryptosporidien in Flüssigmist mittels der Verfahren der aerob thermophilen Stabilisierung und der thermophilen Anaerobbehandlung. Mikrobiologischer Teil des Abschlußberichts Az.: 28-8223.12, Projekt Nr. 0056. Inst. f. Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim, S. 1-78.
- MUNDY, L.M., SAHM, D.F. and GILMORE, M. (2000): Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13, 513-522.

- NAJDROWSKI, M., WACKWITZ, C., JOACHIM, A., DAUGSCHIES, A., und MACKENSTEDT, U. (2004): Development of a viability assay for *Cryptosporidium parvum* oocysts. Int. J. Med. Microbiol. 293 (Suppl. 38), 64.
- NAZARENKO, I., LOWE, B., DARFLER, M., IKONOMI, P., SCHUSTER, D. and RASHTCHIAN, A. (2002): Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. Nucleic Acids Res. 30(9), e37.
- NEUMANN, N.F., GYÜREK, L.L., FINCH, G.R. and BELOSEVIC, M. (2000): Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after in vitro excystation are infectious to neonatal mice. FEMS Microbiol. Lett. 183, 331-336.
- OECHSNER, H. and DOLL, L. (2000): Inactivation of pathogens using the aerobic-thermophilic stabilization process. In: J.A. Moore (ed.) Animal, Agricultural and Food Processing Waste, Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium, 09.-11.10.2000, Des Moines, Iowa, USA. American Society of Agricultural Engineers, St. Joseph, Michigan, USA, pp. 522-528.
- O'REILLY, C. and COLLERAN, E. (2004): The importance of hygienisation during anaerobic digestion. "Biogas without limits" AD-NETT Workshop, Leipzig, Germany, 28-30<sup>th</sup> January 2004.
- PALUSZAK, Z., OLSZEWSKA, H. and BREZA-BORUTA, B. (2003): Experimental study on fecal bacteria movement in soil amended with slurry. Electron. J. Polish Agric. Univ. 6/2, <http://www.ejpau.media.pl/series/volume6/issue2/environment/art-09.pdf>.
- PEETERS, J.E. and VILLACORTA, I. (1995). *Cryptosporidium*. In: Biotechnology - Guidelines on techniques in coccidiosis research (ed. Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P.), Office for official Publications of the European Communities, Luxemburg, pp. 202-240.
- PERETZKI (2006): Stoffstromanalyse und Gärrestverwertung. In: EFFENBERGER et al. (2006).
- PETIT, L., GIBERT, M. and POPOFF, M.R. (1999): *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol. 7, 104-110.
- PETRY, F., SHIRLEY, M.W., MILES, M.A. and McDONALD, V. (1998): Characterisation of a *Cryptosporidium parvum*-specific cDNA clone and detection of parasite DNA in mucosal scrapings of infected mice. Mol. Biochem. Parasitol. 95, 21-31.
- PHILIPP, W. (2002): Verfütterungsverbot von Speiseresten - Zukünftige Verwertung in Biogasanlagen? Tagungsband der 11. IBK Jahrestagung "Biogas und Bioenergie in der Landwirtschaft", 5.-6.12.2002, Rot/See, S. 93-109.
- PIANETTI, A., BRUSCOLINI, F., SABATINI, L. and COLANTONI, P. (2004): Microbial characteristics of marine sediments in bathing area along Pesaro-Gabicce coast (Italy): a preliminary study. J. Appl. Microbiol. 97, 682-689.
- PICKUP, R.W., RHODES, G. and HERMON-TAYLOR, J. (2003): Monitoring bacterial pathogens in the environment: advantages of a multilayered approach. Curr. Opin. Biotechnol. 14, 319-325.
- PUSCH, D., IHLE, S., LEBUHN, M., GRAEBER I. and LOPEZ-PILA, J.M. (2005): Concentration of enteroviruses in activated sludge by cell culture and by quantitative PCR. J. Water Health, 3/3, 313-324.
- RAPP, A. (1995): Hygienisch-mikrobiologische Untersuchungen zum Verhalten von ausgewählten Bakterien und Viren während der längerfristigen Speicherung von Flüssigmist in Biogemeinschaftsanlagen. Dissertation, Universität Hohenheim.

- ROBBEN, P.M. and SIBLEY, L.D. (2004): Food- and waterborne pathogens: you are (infected by) what you eat! *Microbes Infect.* 6, 406-413.
- ROCHELLE, P.A. (2004) Applications of *in-vitro* cell culture for measuring infectivity and inactivation of *Cryptosporidium parvum*. *Water Sci. Technol.: Water Supply* 4/2, 87-92.
- ROSE, J.B., HUFFMAN, D.E., and GENNACCARO, A. (2002): Risk and control of waterborne cryptosporidiosis, *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 113–123.
- RÜCKERT, V. (1991): Mikrobiologische Untersuchungen zur aeroben und anaeroben Flüssigmistbehandlung. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften.
- SANTAMARIA, J. and TORANZOS, G.A. (2003): Enteric pathogens and soil: a short review. *Int. Microbiol.* 6, 5-9.
- SCHINDLER, P.R.G. (1991): MUG-Laurylsulfat-Bouillon - ein optimales Nachweismedium für gesamtcoliforme und fäkalcoliforme Bakterien im Rahmen der hygienischen Überprüfung von Badegewässern gemäß der EG-Richtlinie 76/160 EWG. *Zbl. Hyg. Umweltmed.* 191, 438-444.
- SKANAVIS, C. and YANKO, W.A. (2001): *Clostridium perfringens* as a potential indicator for the presence of sewage solids in marine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 31-35.
- SPILLMANN, S.K., TRAUB, F., SCHWYZER, M. and WYLER, R. (1987): Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2077-2081.
- STLMU (1998): Bayern-Agenda 21, München.
- STRAUCH, D. (1987): Hygiene of Animal Waste Management. In: *Animal Production and Environmental Health*. Ausgb. *World Animal Science Bd. B6*. (Hrsg.: Strauch, D.) Elsevier Science Publishers B.V., 155-202.
- STRAUCH, D. (1996): Hygieneaspekte bei der Cofermentation. In: *Internationale Erfahrungen mit der Verwertung biogener Abfälle zur Biogasproduktion*. Ausgb. *Tagungsberichte Bd. 14*. (Hrsg.: Braun, R.) Bundesministerium für Umwelt, Jugend und Familie, Tulln, 53-92.
- TEBBE C.C. and VAHJEN W. (1994): Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2657-2665.
- THOMAS C., HILL D. and MABEY M. (2002). Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system. *J. Appl. Microbiol.* 92, 433-442.
- UGWUANYI, J.O., HARVEY, L.M. and MCNEIL, B. (1999): Effect of process temperature, pH and suspended solids content upon pasteurization of a model agricultural waste during thermophilic aerobic digestion. *J. Appl. Microbiol.* 87, 387–395.
- USFDA (2000): Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Overarching principles: kinetics and pathogens of concern for all technologies. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, June 2, 2000.
- VERORDNUNG (EG) NR. 1774/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* L 273, Brüssel, 3. Oktober 2002.

- WACKWITZ, C. (2005): Promotionsarbeit am Institut für Parasitologie, Leipzig, Prof. Dauschies. Vitalitätsbestimmung von *C. parvum* in einem Zellkultur-System mit Hilfe serologischer Assays. In Vorbereitung.
- WEIß, K. und POPP, W. (2004): Quantifizierung der diffusen Belastung von Gewässern mit Fäkalbakterien aus landwirtschaftlich genutzten Flächen. Schlussbericht, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Materialien Nr. 111, S. 1-74.
- WHO (2002): Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). In: Guidelines for drinking-water quality. 2<sup>nd</sup> ed. Addendum: Microbiological agents in drinking water. Geneva, World Health Organization, pp. 70-118.
- WHO (2004a): Microbial fact sheets. In: Guidelines for drinking-water quality. 3<sup>rd</sup> ed. Geneva, World Health Organization, pp. 221-295.
- WHO (2004b): Microbial aspects. In: Guidelines for drinking-water quality. 3<sup>rd</sup> ed. Geneva, World Health Organization, pp. 121-144.
- WILHELM, J. and PINGOUD, A. (2003): Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem* 4, 1120-1128.
- ZETHNER, G., PFUNDTNER, E. und HUMER, J. (2002): Qualität von Abfällen aus Biogasanlagen. Umweltbundesamt GmbH / Federal Environment Agency - Austria, Monographien Band 160, Wien, ISBN 3-85457-657-9, S. 1-50.
- ZHOU, J., BRUNS, M.A. and TIEDJE, J.M. (1996): DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316-322.





**Biogastechnologie zur umweltverträglichen  
Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in  
Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische  
Begleituntersuchungen**

**C Berichtsteil LfL-Agrarökologie: Lysimeter-, Labor- und  
Praxisversuche**

**Günter Henkelmann**

**Institut für Agrarökologie, Ökologischen Landbau und Bodenschutz  
Arbeitsbereich: Isotopentechnik und Ökosystemchemie  
Menzinger Str. 5  
80638 München**

## C 1 Einleitung

Bakterielle Verunreinigungen von oberflächennahem Grundwasser und Gewässern haben eine große Bedeutung für die Umwelt, die Qualität des Wassers und die Versorgung der Bevölkerung mit dem Lebensmittel Wasser. Fragen zur Qualitätssicherung von Wasser genießen daher eine hohe Aufmerksamkeit und ein großes öffentliches Interesse. Die Wasserqualität wird zunächst von Qualitätskriterien für Reinheit, Geschmacksneutralität und der Einhaltung von Grenzwerten für Verunreinigungen bestimmt. Darüber hinaus aber hat der Konsument sehr hohe Ansprüche an eine hygienisch einwandfreie Wasserqualität und erwartet eine nahezu umfassende Rückstandsfreiheit. Daher hat die Keimbelastung beim Gewässer- und Trinkwasserschutz einen hohen Stellenwert.

Um eine Keimbelastung von Trink- und Oberflächenwasser zu reduzieren, stellt sich zunächst die Frage nach den Ursachen. Mögliche Quelle der Verunreinigung sind Einträge über kommunale Abwässer, die Ausbringung von Gülle in der Landwirtschaft, aber auch über den Boden selbst, der durch Fäkalien von Tieren, Mäusen, Wildtieren oder Vögeln schon eine bakterielle Vorgeschichte hat (Tschirsch et al., 2002).

Für den Bereich Landwirtschaft kommt dies in der „Verordnung über die Grundsätze der guten fachlichen Praxis beim Düngen“ (Düngeverordnung, 1996) zum Ausdruck. Nährstoffverluste bei der Bewirtschaftung sowie damit verbundene Einträge in die Gewässer sollen weitestgehend vermieden werden. Durch geeignete Bewirtschaftungsmaßnahmen, Ausbringungs- und Höchstmengenbeschränkungen soll der Eintrag von Nährstoffen und im Falle der organischen Wirtschaftsdünger (Gülle, Mist, Jauche) auch von Fäkalbakterien und potentiell Pathogenen in Oberflächengewässer minimiert werden.

Ziel der Begleituntersuchungen zur Biogasanlage in Berbling waren wasserhygienische Untersuchungen zum Vergleich von konventioneller Gülle (Rohgülle), Biogasgülle (Gärrest) und Untersuchungen zur mikrobiellen Verlagerung und zum Verbleib von Mikroorganismen im Boden. Daneben wurden lufthygienische Untersuchungen zu konventioneller Gülle und Biogasgülle durchgeführt, da Ammoniakemissionen zur Eutrophierung von Gewässern und zur Beeinträchtigung von Oberflächengewässern beitragen können. Weiterhin sollten mit der Versuchsanstellung die Keimabtötung oder Keimverlagerung und eine mögliche Wiederverkeimung im Boden untersucht werden. In diesem Zusammenhang berichtete (Edmonds 1976), dass bestimmte *E. coli* Keime viele Monate im Boden verbleiben oder sich sogar anreichern können. Neuere Untersuchungen lassen allerdings auf Verweilzeiten eher von wenigen Tagen im Boden schließen (Lebuhn und Wilderer, 2006).

Ein wichtiger Aspekt der Begleituntersuchungen war die Frage nach der Auswaschung und den Frachten von Mikroorganismen im Wasser nach einer Bodenpassage sowie die Klärung der Frage, ob eine anaerob behandelte Gülle aus der Sicht der Umwelt, der Wasserwirtschaft, des Verbraucherschutzes und der Landwirtschaft bei der Ausbringung im Freiland entscheidende hygienische und chemisch-physikalische Vorteile gegenüber einer konventionellen Gülle aufweist.

## C 2 Versuchsanstellung / Methoden

Ein Großteil dieser Teiluntersuchungen wurde auf schichtenweise aufgebauten Lysimetern im Freiland durchgeführt, da es hier einerseits möglich war, durch Zugabe von Tracern zu der jeweiligen Gülle gezielten Fragestellungen nachzugehen und andererseits, weil diese Böden seit mehr als 20 Jahren nachweislich nicht mit Wirtschaftsdüngern gedüngt wurden. Somit können Artefakte ausgeschlossen werden, die bei landwirtschaftlich genutzten Flächen durch unzureichende Kenntnisse der Vorgeschichte des Bodens nicht auszuschließen sind.

Insgesamt wurden im Zeitraum von 2002 bis 2005 zwölf Grünlandlysimeter mit einer Klee gras/Weidelgrasmischung verwendet. Auf keinem der Lysimeter war organischer Dünger eingesetzt worden. Für jeden Versuch wurde ein neues, unbelastetes Lysimeter eingesetzt.

### C 2.1 Ausbringung von Rohgülle und Gärrest

In allen Versuchsansätzen wurden die Lysimeter mit Gärrest und Rohgülle in einer praxisnahen Menge entsprechend 20 - 25 m<sup>3</sup> pro ha gedüngt. Die Ausbringung erfolgte von Hand. Im Jahr 2003 wurden zwei Lysimeter mit Rohgülle und zwei Lysimeter mit Gärrest (Biogasgülle) beaufschlagt. Zwei Lysimeter dienten als Kontrollen.

Ende Mai wurden die Biogasgülle und die konventionelle Gülle mit Tracer-Substanzen auf zwei Lysimeter (Lehmboden) aufgebracht und im Langzeitversuchszeitraum bis Ende des Jahres 2003 untersucht.

Gleichzeitig fanden an jeweils einem Lysimeter mit Gärrest und Rohgülle Beregnungen für jeweils eine Woche statt.

Im Jahr 2004 wurden auf zwei Lysimeter (Lehmboden, Sandboden) radioaktiv markierte Keime zusammen mit der Rohgülle und Biogasgülle ausgebracht. Gleichzeitig wurden auf zwei weiteren Lysimetern Beregnungsversuche mit gleicher Gülle, aber ohne radioaktive Markierung durchgeführt. Diese dienten als Kontrollen für die Radionukliduntersuchungen. In Abbildung 85 ist das Funktionsbild eines Lysimeters dargestellt. Jedes Lysimeter bestand aus dem mit Boden gefüllten Lysimeter und einem „Übertopf“ der es ermöglichte, das Sickerwasser nach der Bodenpassage zu sammeln.

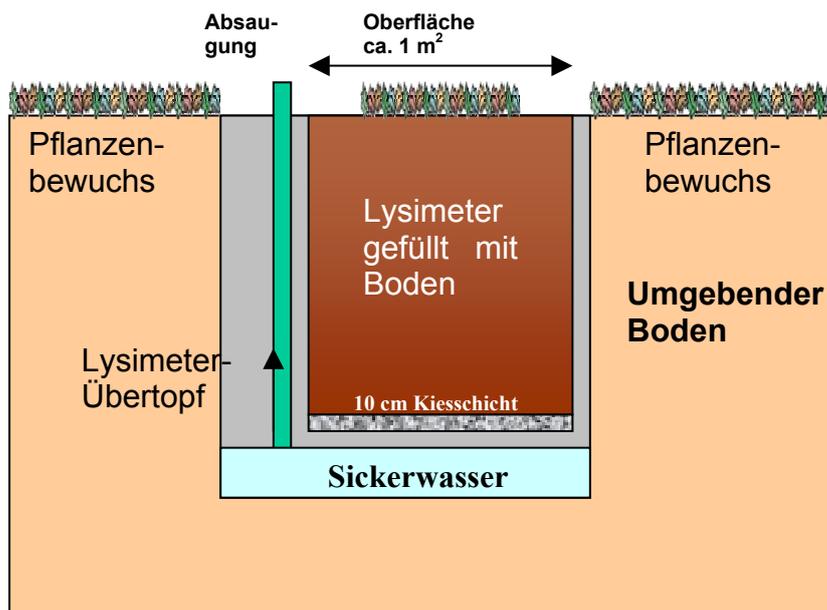


Abbildung 85: Funktionsbild eines Lysimeters

### C 2.2 Probenahme der Sickerwässer

Das gesammelte Sickerwasser wurde in regelmäßigen Abständen (etwa alle 30 Minuten) über die Absaugleitung und einen automatischen Probensammler der Firma ISCO (Abbildung 86) in einzelne Flaschen abgefüllt und die Inhaltsstoffe später im Labor untersucht. Die Lagerung der Wasserproben erfolgte im Kühlschrank bei 4° C. Die Zeit bis zur Analyse der fäkalcoliformen Keime, Tracer und Inhaltsstoffe betrug etwa 24 Stunden.

Als Böden wurden ein sandiger Braunerdeboden und ein Lehmboden verwendet. Die Böden



und die Sickerwässer der Lysimeter wurden vor Beginn der Messungen auf *Escherichia coli* (*E. coli*) untersucht. Bei zwei Lysimetern wurden die Wirtschaftsdünger zusätzlich mit einer definierten Konzentration radioaktiv markierter *E. coli* beaufschlagt. Die anfallenden Sickerwässer wurden auf die mitapplizierten Tracer und auf *E. coli*-Bakterien untersucht.

Abbildung 86. Probensammler in der Lysimeteranlage

### C 2.3 Wasserhygienische Untersuchungen

Bei den bakteriologischen Untersuchungen wurden Fäkalcoliforme (im wesentlichen *Escherichia coli*, *E. coli*) als Fäkalindikatorbakterien analysiert, da diese auf einfache Art zu bestimmen sind, überwiegend in Gülle und Kot auftreten und für die Beurteilung der Gewässergüte eine entscheidende Rolle spielen.

Andere Fäkalindikatoren oder pathogene Keime waren nicht im Untersuchungsumfang der Lysimeterstudien enthalten. Bei der Verwendung von fäkalen Indikatorkeimen ist die relativ hohe Empfindlichkeit von *E. coli* gegenüber Hitze, UV-Licht und äußeren Einflüssen im Boden zu beachten. So kann eine Population *E. coli* bereits im Boden verschwunden sein, manche Pathogene, insbesondere Sporenbildner, können aber noch länger im Boden überlebt haben.

### C 2.4 Beregnung für Kurzzeitversuche

In der Versuchsanstellung des Jahres 2003 wurde je ein Lysimeter mit Biogasgülle und je ein Lysimeter mit Rohgülle beregnet. Die Beregnung erfolgte 1 Stunde nach Aufbringung der Gülle über den ganzen Tag verteilt in Portionen zu je 5 mm Niederschlagsäquivalenten. Bei den Beregnungen des Jahres 2003 wurde in der ersten Woche mit 10 mm/h, d.h. mit insgesamt 40 mm pro Tag beregnet.

Im Jahr 2004 wurde am ersten Tag mit 10 mm/h, d.h. mit insgesamt 40 mm, am zweiten und dritten Tag mit jeweils 20 mm Niederschlagsäquivalenten beregnet. Bei jeweils zwei Lysimetern wurde die Gülle zusätzlich mit einer hohen Konzentration von Lithium- und Bromidtracer, in einem Fall mit Tritium ( $H^3$ ) Tracer beaufschlagt. Unmittelbar nach Beginn der Beregnung begann die Messung der Sickerwässer.



Abbildung 87: Beregnungskammer über einem Grünlandlysimeter

## C 2.5 Radioaktive Markierung

Um die Verlagerung der Bakterien im Boden verfolgen zu können, wurden *E. coli*-Bakterien in einem radioaktiven Medium (mit C14-Acetat und C14-Glucose angezogen und nach zwei Tagen abzentrifugiert, gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Die folgenden Generationen der Bakterien hatten den radioaktiven Kohlenstoff in die Zellen eingebaut. Diese radioaktiven Tracer-Bakterien wurden jeweils Gärrest und Gülle vor der Ausbringung auf die Lysoimeter zugefügt.

Die Aktivität der Zellsuspension, d.h. die radioaktiv markierten Zellen pro Lysoimeter, betrug  $1,67E+06$  Bq. Die zugesetzte *E. coli*-Menge lag unter 0,1 % der Gesamtkeimkonzentration der Rohgülle.

## C 2.6 Bestimmung fäkalcoliformer Keime

### C 2.6.1 Fluorocult®-Methode

Die Untersuchung der fäkalcoliformen Keime wurde mit der Fluorocult®-Methode vorgenommen. Dabei wurden die Sickerwässer zunächst mikroskopisch untersucht und der Versuch unternommen, die Bakterien optisch zu identifizieren. Jeweils 1 ml der Sickerwässer wurden zu dem nach Schindler (1991) für wasserhygienische Untersuchungen geeigneten Nährmedium, das mit einem Fluoreszenzmarker dotiert ist (Merck), zugegeben und bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Analysiert wurden 10 Messwiederholungen à 3 x 1 ml.

Nach 24 Stunden Bebrütung konnte im UV-Licht die Anwesenheit von *E. coli* durch Emission von Fluoreszenz ermittelt werden. Die eingestrahlte Wellenlänge war 254 nm.

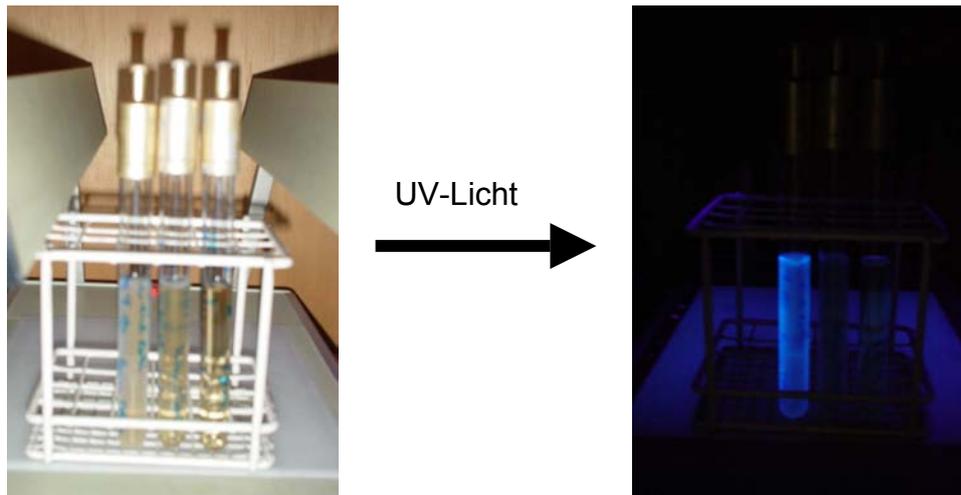


Abbildung 88: Visualisierung der Anwesenheit von *E. coli* im UV-Licht entsprechend der Fluorocult®-Methode. Der Gehalt an *E. coli* im Sickerwasser wurde über die Most-Probable-Number-Methode (MPN) nach De Man (1983) bestimmt. Sie liefert einen statistischen Wert der Keimkonzentration in einer Probe, die auf einem vorgegebenen Nährmedium wächst. Diese Methode eignet sich besonders für die Bestimmung sehr niedriger Zellkonzentrationen, z.B. in Wasserproben (Schindler 1991).

### C 2.6.2 Bestimmung von *E. coli* nach Merck, Art. Nr. 1.13303

Neben dem Fluorokultverfahren zur Bestimmung von Fäkalcoliformen wurde ein zusätzliches Nachweisverfahren angewendet. Das Prinzip der Identifizierung von *E. coli* erfolgt über den Nachweis der Enzyme  $\beta$ -D-Glucuronidase und Tryptophanase (Indolbildung). Für die meisten *E. coli* - Stämme ist diese  $\beta$ -D-Glucuronidase-Reaktion und die Bildung von Indol aus Tryptophan charakteristisch.

### C 2.7 Zellzahlbestimmungen

Bei der radioaktiven Markierung von Bakterien war die Bestimmung nach der MPN-Methode nicht möglich. Daher wurden in den Sickerwässern Untersuchungen der tatsächlich vorhandenen Zellzahlen durchgeführt. Dies erfolgte mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer durch Einbringen von mehreren Tropfen der Sickerwasserprobe. Das Kammervolumen betrug  $0,00025 \text{ mm}^3$ . Die Keimzahlbestimmung wurde bei 50-facher Vergrößerung mit einem Zeiss-Phasenkontrastmikroskop durchgeführt. Es wurden pro Probe jeweils zweimal 16 Kleinstquadrate mit o.g. Volumen ausgezählt und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

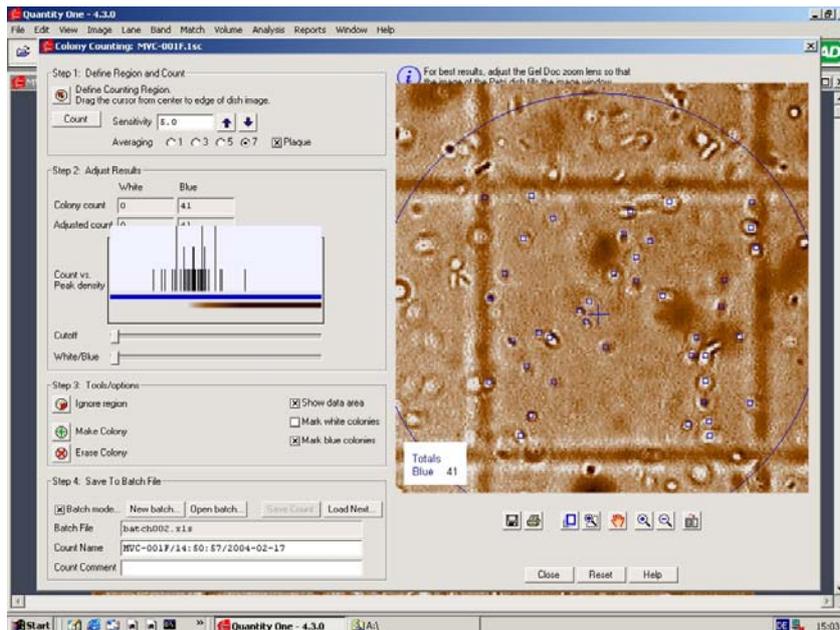


Abbildung 89: Mikroskopische Auszählung von *E. coli* in einer Neubauer-Kammer und Auswertung am PC.

## C 2.8 Messungen der radioaktiv markierten Sickerwässer

Bei dieser Methode wurde zur Probe ein Szintillationscocktail gegeben, der aus einem Szintillator und einem organischen Lösungsmittel besteht. Bei Anwesenheit eines radioaktiven Strahlers werden die Lösungsmittelmoleküle in einen angeregten Zustand versetzt. Die angeregten Lösungsmittelmoleküle geben ihre Energie an die Szintillatormoleküle ab, woraufhin diese in einen höheren Energiezustand gehoben werden. Beim Übergang der Szintillatormoleküle in den Grundzustand wird Energie in Form von Licht freigesetzt. Die Intensität des produzierten Lichts ist direkt proportional zur Energie eines Beta-Teilchens und wird quantitativ im Flüssigszintillationszähler (LSC) bestimmt. Aliquots der Sickerwässer von jeweils 1 ml wurden zusammen mit 20 ml Szintillator Aquasafe 300, Fa. Zinsser in einem Flüssigszintillationszähler Packard 2550 auf radioaktive Betastrahler analysiert.

## C 2.9 Digitale Autoradiographie / Imaging

Durch radioaktive Strahlung wird der Phosphor an der Oberfläche einer Folie mit einer dünnen Barium-Fluor-Bromid-Europium-Schicht (BaFBr:Eu) oxidiert. Dadurch werden Zonen höherer Energie gebildet. Bei der durch einen Laser verursachten Reduktionsreaktion wird die aufgenommene Energie in Form von Photonen wieder abgegeben. Durch die anschließende Bestrahlung des Screens mit einem Laser (Wellenlänge 635 nm) wird die Reduktionsreaktion in Gang gesetzt, wodurch die Phosphorionen wieder in ihren vorherigen Zustand zurückkehren. Die dabei freiwerdende Energie in Form von Photonen wird von einer Photomultiplieröhre eingefangen. An den Stellen des Phosphorscreens, an denen die Energiedichte der Strahlung am größten war, wird also auch am meisten Lichtenergie freigesetzt. Die Verteilung der Aktivität in einer Probe wird dadurch dargestellt, dass die Schwärzung eines Pixels proportional zur Strahlungsintensität der Probe an diesem Ort ist. So kann bei dieser Methode die Aktivität sichtbar gemacht werden. Verwendet wurde ein Scanner der Fa. Biorad.

## C 2.10 Lufthygienische Untersuchungen

Die Erfassung der  $\text{NH}_3$ -Emissionen erfolgte nach dem Prinzip der dynamischen Kammermethode mit Hilfe einer modifizierten Messtechnik nach Weber et al. (2000). Jede

der 6 gleichzeitig verwendeten Kammern hat einen Durchmesser von 15 cm und wurde kontinuierlich mit Umgebungsluft durchströmt.

Am Kammerausgang wurde von jeder Messstelle kontinuierlich Probenluft entnommen und über eine Messstellenschaltung einem Analysator AC31, Fa. Ansyco, Karlsruhe zur Bestimmung der  $\text{NH}_3$ -Konzentration zugeleitet. Mit Hilfe der Differenz der  $\text{NH}_3$ -Konzentration zwischen der Umgebungsluft und der Probenluft der Kammern wurde ein Emissions- bzw. Depositionsfluss errechnet.



Abbildung 90: Untersuchungen gasförmiger N-Emissionen aus Roh- und Biogasgülle mit offenen Küvetten

## C 3 Ergebnisse und Diskussion

### C 3.1 Langzeitmessungen über ein Jahr

Durch die anhaltende Trockenheit des Jahres 2003 musste bei den Langzeituntersuchungen (Lysimeter mit Lehmboden) durch Zugabe von Gießwasser eine nach ortsüblichem langjährigen Mittel er Niederschläge natürliche Regenmenge (Abb. 7) simuliert werden. Während des ganzen Jahres wurde täglich das Sickerwasser gesammelt und auf Inhaltsstoffe und Mikroorganismen untersucht.

Das der Gülle bzw. dem Gärrest zugegebene Bromid dient als Indikator dafür, wann gelöste Stoffe bzw. kleine Partikel im Wasser der Wirtschaftsdünger, die auf die Bodenoberfläche aufgebracht wurden, tatsächlich durch das Lysimeter gewandert waren. Anderenfalls könnte es sich sonst beim gemessenen Sickerwasser auch um Porenwasser des Bodens handeln. Eingesetzt wurden 100 g Ammoniumbromid pro Lysimeter.

Die Bromidbestimmung erbrachte im Zeitraum vom 30. Mai 2003 bis 10. Dezember 2003 Spitzenwerte bis etwa  $5 \text{ g} = 5.000 \text{ mg Bromid/l}$  Anfang Oktober 2003.

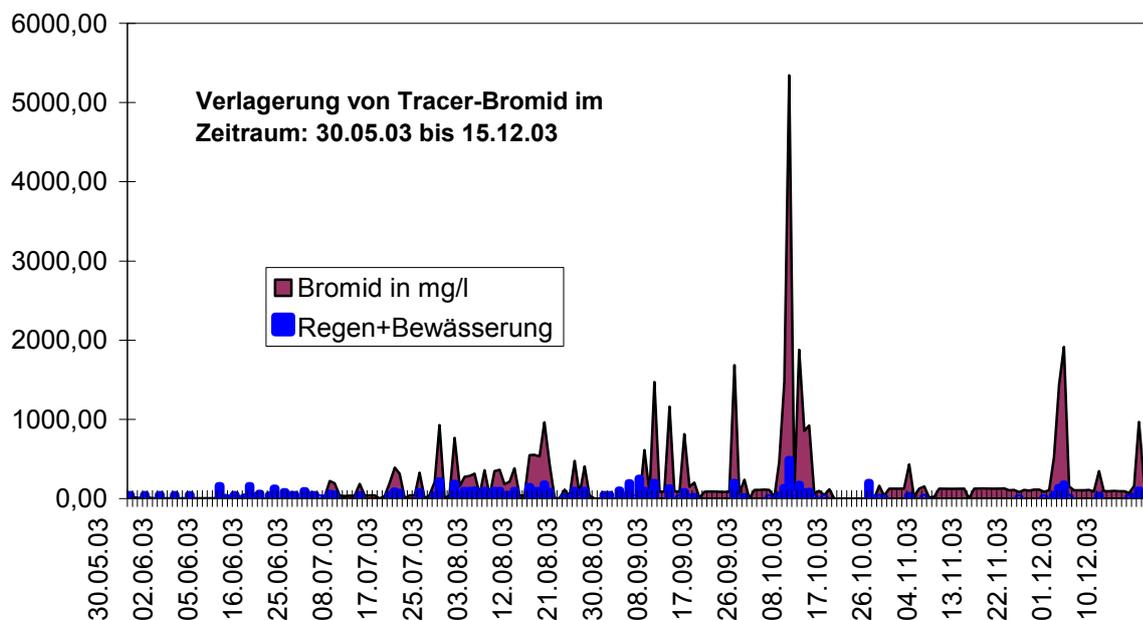


Abbildung 91: Verlagerung des im Wasser gelösten Tracers Bromid und die Gesamtmenge an Regen- und Beregnungswasser (Gärrest-Düngung; x-Achse: Datum der Probenahme, Y-Achse: mg Bromid pro Liter Wasser bzw. Regenmenge in mm / 10 m<sup>2</sup>)

Es ist aus dem Konzentrationsverlauf ersichtlich, dass die Spitzen der Bromidbelastung mit den Sickerwassermengen korrelieren (Abbildung 91). Belastungen wurden im Zeitraum vom 29.06. - 15.08., vom 01.09. - 09.09., am 06. - 08.10. und am 30.11.2003 gemessen. Verlagerung von Bromid, das im aufgetragenen Wasser gelöst war, trat etwa einen Monat nach der Applikation der Biogasgülle im Sickerwasser auf. Die Maximalmenge war etwa nach vier Monaten im Sickerwasser zu finden.

Die Keimbelastung im Sickerwasser stieg zu diesem Zeitpunkt (Anfang Oktober) nur geringfügig auf Werte von etwa 10-20 MPN/100 ml an und sank dann wieder auf Werte < 10 MPN/100ml ab. Ganzjährig konnte in nahezu jeder Sickerwasserprobe *E. coli* in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Mit Ausnahme geringerer Keimkonzentrationen im Gärrest-Lysimeter gab es aber keine Unterschiede im Versickerungsverhalten zwischen dem

Gärrest (Abbildung 91) und der Rohgülle (nicht dargestellt). Die Unterschiede sind über den Versuchszeitraum nicht signifikant und liegen im Bereich der Grundbelastung des Sickerwassers im Lysimeter zwischen 10 und 100 MPN/100ml.

### C 3.2 Kurzzeituntersuchungen / Beregnungen

#### C 3.2.1 Beregnungen im Jahr 2003

In mehreren Beregnungen sollte das Verhalten der aufgebrauchten Keime (*E. coli*) im Boden und deren Verlagerung mit dem Sickerwasser unmittelbar nach Regenereignissen untersucht werden. Exemplarisch soll hier am Beispiel von zwei Beregnungen der Biogasgülle und der konventionellen Gülle die Verlagerung ins Sickerwasser gezeigt werden.

Die in Abbildung 8 dargestellte Beregnung begann am 29.07.2003, unmittelbar nach der Ausbringung des Gärrests. Sie wurde über eine Woche fortgeführt. Die Wassermenge lag am ersten Tag bei 40 l/qm, an den weiteren Tagen bei 20 l/qm. Dies stellt somit einen Worst-Case-Fall für die Verlagerung von Mikroorganismen im Freiland dar.



Abbildung 92: Beregnungseinrichtung über einem Lysimeter zur Beregnung

Neben den Keimen wurde ein miteingebrachter Lithiumtracer untersucht, der zur Überwachung der in den Boden eindringenden Wassermengen dienen sollte. Verwendet wurde eine Menge von 100 g Lithiumtracer im Lysimeterversuch mit dem Gärrest, 25 g Lithiumtracer beim Rohgülleversuch. Unmittelbar nach der Beregnung konnte in den Proben die erste Lithiumkonzentration festgestellt werden. Die späteren Messungen ergaben, dass nach ca. 2-3 Stunden bis zu 1,4 g Lithium nachgewiesen werden konnten (Abbildung 93). Eine weitere Spitze erfolgte am nächsten Tag gegen Mittag, die dritte Spitze am übernächsten Tag, ebenfalls mittags.

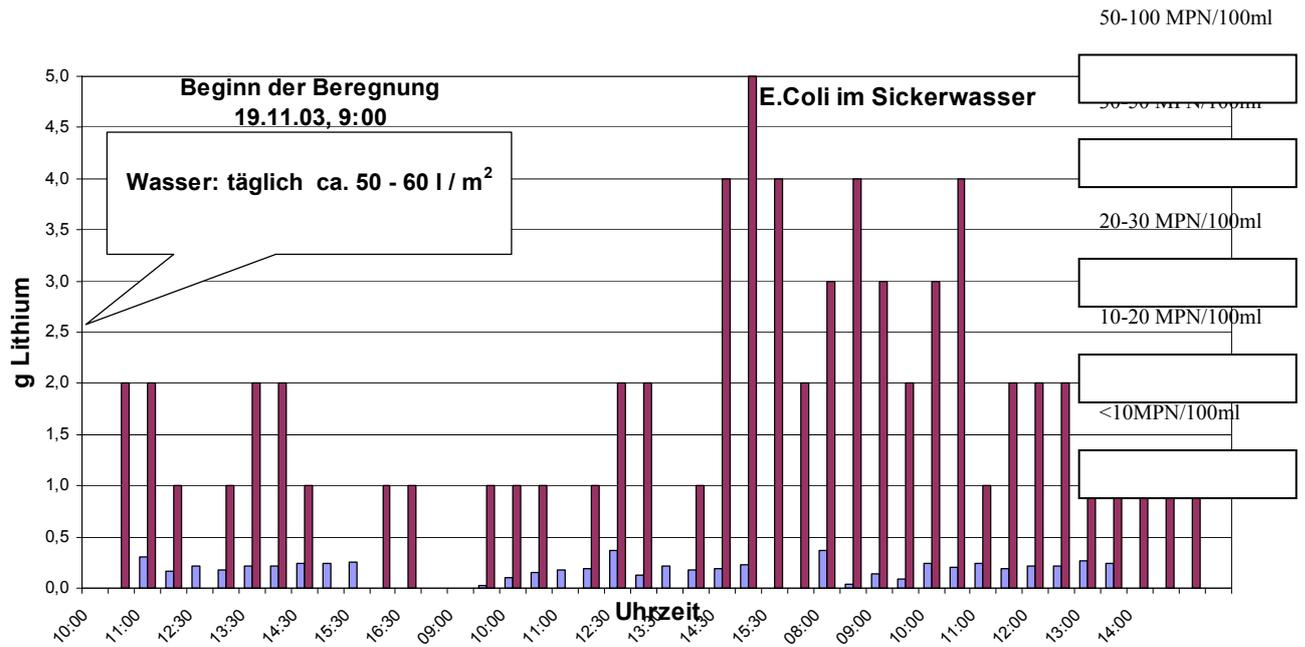


Abbildung 93: Verlagerung des im Wasser gelösten Tracers Lithium mit den Keimen im Gärrest = Biogasgülle (blaue Säulen: Lithiumkonzentration in g/l, braune Säulen: Keimbelastung in halbquantitativer Darstellung. Die Keimbelastung wurde in 3 Stufen im Bereich von <10 und 30 MPN/100 ml unterschieden.

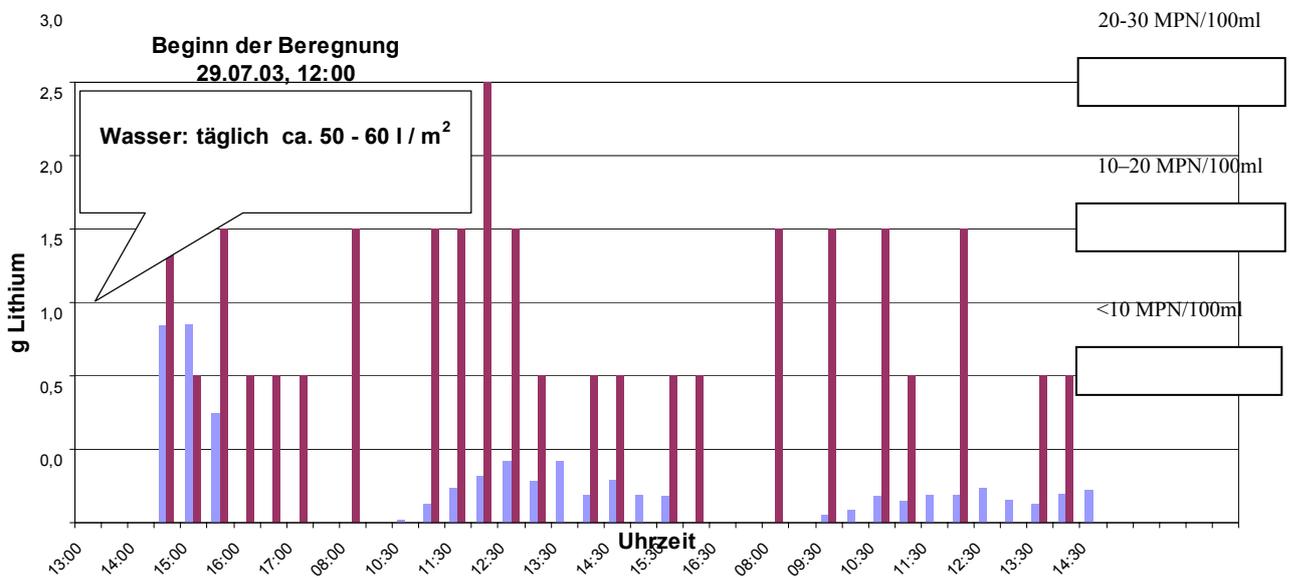


Abbildung 94: Verlagerung des im Wasser gelösten Tracers Lithium mit den Keimen in der Rohgülle (hblaue Säulen: Lithiumkonzentration in g/l, braune Säulen: Keimbelastung in halbquantitativer Darstellung. Es wurde nur Die Keimbelastung wurde in 5 Stufen zwischen <10 und 100 MPN/100 ml unterschieden

In einem weiteren Beregnungsversuch mit Rohgülle (Abbildung 94) wurde auf der gleichen Bodenart (Lehmboden), aber in einem neuen Lysimeter, wie beim Versuch mit der Biogasgülle (Abbildung 93) über eine Woche beregnet. Auch hier zeigte sich unmittelbar nach Beregnungsbeginn ein Konzentrationsanstieg von Lithium im Sickerwasser. Die

Lithiumkonzentration erreichte nach etwa 2-3 Stunden Werte um 0,3 g. Die gegenüber Abbildung 9 geringeren  $\text{Li}^+$ -Konzentrationen sind darauf zurückzuführen, dass nur  $\frac{1}{4}$  der Lithiummenge eingesetzt wurde.

Ähnlich wie für Gärrest (Abbildung 93) wurde auch für Rohgülle eine schnelle Verlagerung nach 2-3 Stunden beobachtet. Dabei handelte es sich um den sog. Makroporenfluss. Durch Risse, Makroporen und Regenwurmröhren konnten bei ausreichenden Niederschlagsmengen ein Teil der noch nicht im Boden sorbierten Gülle und die Tracer schnell in tiefere Bodenschichten ausgetragen werden. Dieser Makroporenfluss hält bei Niederschlägen einige Stunden nach der Aufbringung an.

Eine weitere Spitze erfolgte am nächsten Nachmittag, nach ca. 30 Stunden. In diesem Zeitraum wurden mit Hilfe des Merck Schnelltestverfahrens zur Bestimmung fäkalcoliformer Keime (Indolbildung) und des MPN-Verfahrens *E. coli*-Mengen von maximal 100 MPN/100 ml Sickerwasser gemessen. Bis zum folgenden Tag nahm die Menge an Lithium und *E. coli* dann wieder ab und blieb weiter auf niedrigem Niveau (< 10 MPN/100 ml).

### **C 3.2.2 Beregnungen im Jahr 2004**

#### **Quantitative Messungen der Keimbelastung im Sickerwasser**

Insgesamt wurden für die dreitägige Beregnung 20 Liter Wasser pro Lysimeter gegeben. Dies bedeutet ein Äquivalent von 40 mm Niederschlag am ersten Tag und jeweils 20 mm an den beiden folgenden Tagen. Der Gesamtsickerwasseranfall betrug in dieser Versuchsreihe mit vier Lysimetern zwischen 5,3 und 6,7 Litern (Abbildung 95). In dem sandigen Braunerdeboden war die Sickerwassermenge stets etwas höher als im Lehmboden. Die prozentuale Wiederfindung des Beregnungswassers betrug bei den Sandböden 32 bzw. 34 %, bei den Lehmböden 27 bzw. 30 % der aufgebrauchten Wassermenge.

Die Wiederfindungsrate der Ausschwemmung betrug nach der Beregnung in der Summe 0,14 % bei der Rohgülle auf der sandigen Braunerde und 0,13 % bei der Biogasgülle auf dem Lehmboden (Abbildung 96). Beide Ausschwemmversuche ergaben also praktisch dieselben Wiederfindungsraten. Ein gravierender Einfluss des Bodens und dessen Ton- und Humusgehalt konnte in diesem Versuch nicht festgestellt werden. Auch konnte ein Einfluss der Sickerwassermenge ausgeschlossen werden.

Dies zeigt, dass nach etwa zwei bis fünf Stunden nach der Beregnung die Auswaschung der *E. coli*-Keime, aber auch für Lithium am höchsten ist. Die Keimzahl in den Sickerwasserproben ist mit den Lithium-Konzentrationen stark korreliert.

Die verwendeten Lysimeter waren seit mindestens 10 Jahren nicht mit Gülle gedüngt worden. Es war daher auszuschließen, dass hohe Konzentrationen von *E. coli* aufgrund einer vorherigen Güllegabe aus den Lysimetern ausgeschwemmt werden konnten. Dennoch zeigten die Messungen der Vorberegnungen, dass fäkalcoliforme Keime in der Größenordnung von etwa 10 bis 100 MPN/100 ml aus dem Boden ausgeschwemmt wurden. Dieser Befund ist zur Zeit nicht erklärbar und könnte entweder bedeuten, dass es im Boden immer auch einen gewissen Grundbesatz an fäkalcoliformen Keimen gibt, dass z.B. *E. coli* durch Tierkot eingeschleppt wurde, oder die gefundenen Ergebnisse im Streubereich von Probenahme und Methode liegen.

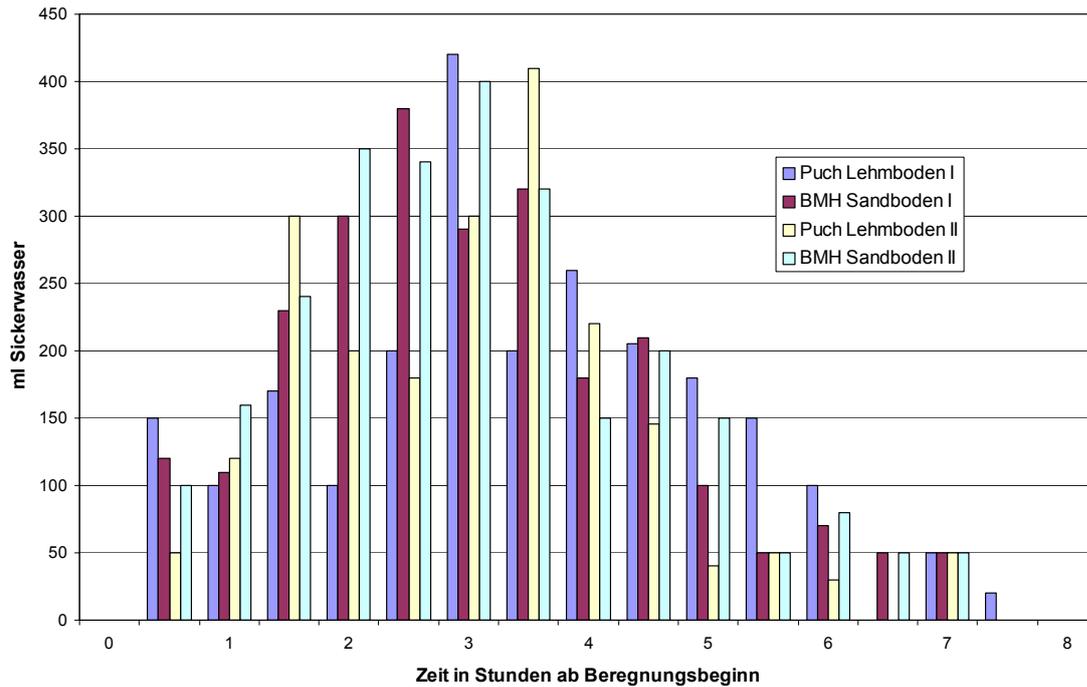


Abbildung 95: Sickerwasseranfall während der ersten 8 Stunden nach Beregnungsbeginn; Gesamtwassermenge: 40 mm Niederschlagsäquivalente

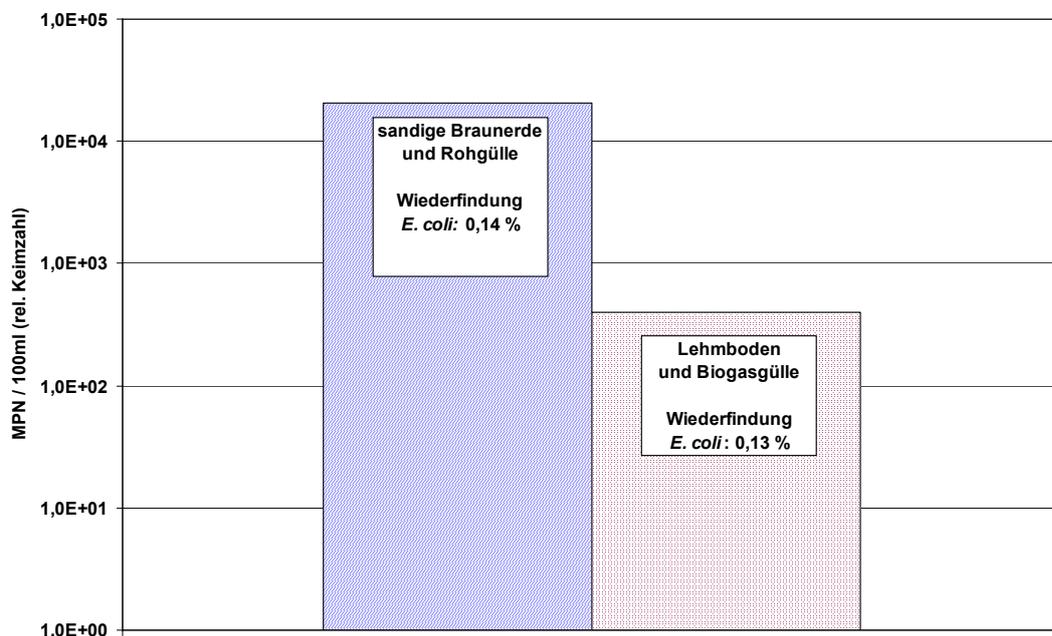


Abbildung 96: Ausschwemmung von fäkalcoliformen Keimfrachten (*E. coli*) nach der Gülleausbringung als Summenwert von drei Tagen

Die Wiederfindungsraten von *E. coli* im Sickerwasser waren etwa 2-3 Zehnerpotenzen kleiner als die Keimfracht in der auf die Lysimeterböden aufgetragenen Wirtschaftsdünger. Um der Frage der Herkunft der Keimbelastung im Sickerwasser nachzugehen, wurden radioaktiv markierte Mikroorganismen hergestellt. Eine Stammkultur von *E. coli* wurde in einem radioaktiven Nährmedium angezogen (C14-Glukose und C14-Acetat). Anhaftendes

C14-Substrat wurde mit nicht radioaktivem Nährmedium abgewaschen und diese C14-markierten *E. coli* dem Gärrest und der Rohgülle zugesetzt. Wenn im Sickerwasser radioaktiv markierte *E. coli* auftauchten, konnten diese nur von der aufgebrachten Gülle herrühren, nicht aber von einem möglichen Grundbesatz von fäkalcoliformen Keimen im Boden. Insgesamt wurden  $1,67 \cdot 10^6$  Bq markierte Keime eingesetzt. Die Gesamtmenge der eingesetzten radioaktiv markierten Bakterien betrug weniger als 0,1 % der Gesamtzellenzahl der aufgebrachten Gülle.

### **C 3.2.3 Lysimeteruntersuchungen mit Radiotracer**

Die Lysimeter wurden mit jeweils 5 Liter Wasser zwei Tage vor Versuchsbeginn vorbereitet (entspricht 20 mm Niederschlag).

Gärrest und Rohgülle wurden mit identischer Markierung auf das jeweilige Lysimeter aufgebracht. Auf den Sandboden wurde Biogasgülle mit den C 14-markierten Keimen, auf dem Lehmboden die Rohgülle mit diesen ausgebracht. Ein wesentlicher Unterschied der beiden eingesetzten Substrate war die um drei Zehnerpotenzen niedrigere Keimbelastung des Gärrests gegenüber der Rohgülle und der geringere Trockensubstanzgehalt des Gärrests.

Pro  $m^2$  wurde ein Äquivalent von 2 Liter Gülle (entspricht  $20 m^3/ha$ ) ausgebracht. Dabei wurde die Gülle 1:1 mit Wasser verdünnt, um die Wirtschaftsdünger auf gleichen Gehalt an Trockensubstanz einzustellen. Der Gärrest wurde unverdünnt ausgebracht. Die Lysimeter hatten einen dichten Bestand mit Grünlandaufwuchs.

Die Beregnung der Lysimeter erfolgte am ersten Tag mit einer Wassermenge von 10 Litern pro Lysimeter während 5 Stunden (entspricht 40 mm Niederschlag), in den folgenden Tagen mit jeweils 5 Liter Wasser (entspricht 20 mm Niederschlag). Die Sickerwässer der Lysimeter wurden über drei Tage gesammelt, ausgemessen und auf ihren Radionuklidgehalt untersucht. Die Proben des ersten Tages wurden in halbstündlichen Abständen mit einem automatischen Probenehmer genommen, die Proben der Folgetage als Sammelprobe.

Die im Sickerwasser auftretende Radioaktivität kann ausschließlich von den aufgebrachten *E. coli* stammen, da sich diese durch die C 14-Markierung von allen anderen Bakterien im Boden unterscheiden. Die gemessene Radioaktivität entstammt also nur den auf die Oberfläche aufgebrachten fäkalcoliformen Keimen oder deren Abbauprodukten. Allerdings ist der Zeitraum von 2 - 3 Stunden bis zum Auftreten der ersten Radioaktivität im Sickerwasser sehr kurz, ein nennenswerter Abbauprozess der *E. coli* sollte noch nicht stattgefunden haben. Ein Vorkommen von Colibakterien in den Sickerwässern konnte zwar lichtmikroskopisch untermauert werden, doch ist es nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob die C14-markierten *E. coli* auch nach dem Makroporentransport tatsächlich quantitativ vital im Sickerwasser angekommen sind. Eine Antwort auf diese Frage würde nur durch aufwändige mikrobiologische und radiochemische Verfahren zu klären sein. Nach persönlicher Mitteilung von Herrn Dr. Beck (Mikrobiologe an der LfL) ist es aber wahrscheinlich, dass auch Laborstämme von *E. coli* mehrere Tage im Boden überleben und als lebende Organismen mit dem Sickerwasser verlagert werden können.

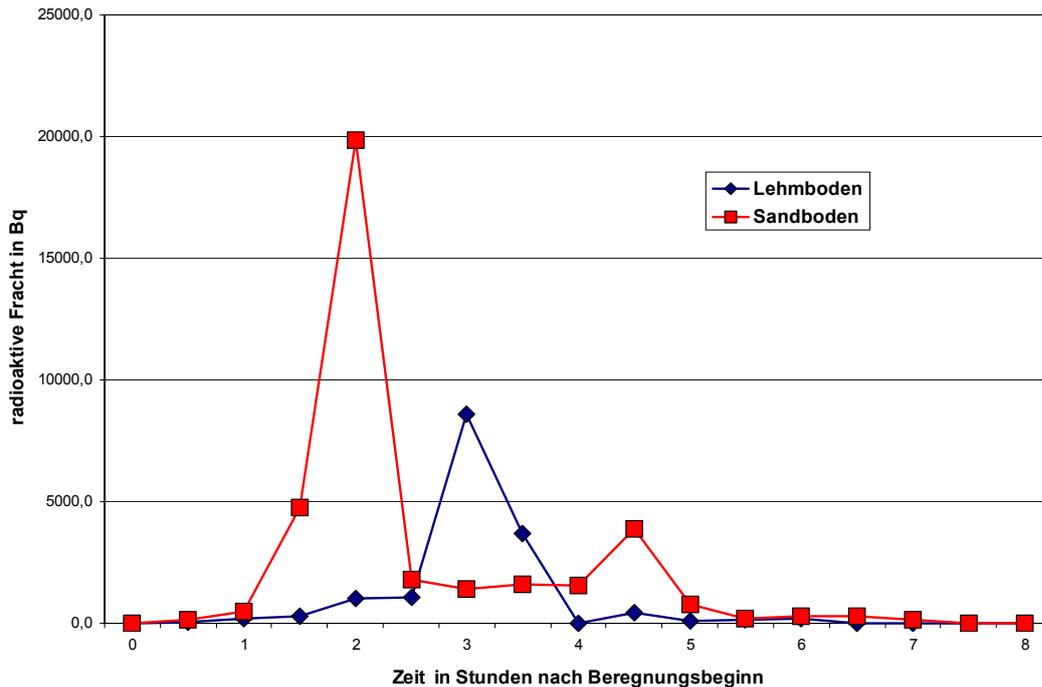


Abbildung 97: Radioaktive Frachten von C 14-markierten *E. coli* Bakterien im Verlauf eines Tages nach Beregnung mit 40 mm Wasser

In der Abbildung 97 ist die Verlagerung der Radioaktivität von fäkalcoliformen Keimen im Sickerwasser zu sehen. Im Sandboden (rote Kurve) war für die Passage von 1 m Boden (Lysimeterhöhe) nach etwa zwei Stunden ein Maximum der Aktivität zu beobachten. Beim Lehm Boden war die radioaktive Fracht nach etwa drei Stunden maximal.

In der Abbildung 98 sind die Summen aller radioaktiver Frachten an den Tagen 1-3 nach der Beregnung dargestellt.

Am 1. und 2. Tag war die Radioaktivität und, unter der Annahme, dass zumindest ein Großteil der Mikroorganismen über den dreitägigen Versuchszeitraum intakt geblieben war, auch die fäkalcoliforme Fracht im Sickerwasser des Sandbodens höher als beim Lehm Boden. Dies lässt sich über den im Sandboden höheren Makroporenanteil und damit stärkeren präferentiellen Fluss erklären.

Die radioaktiven Frachten nahmen zum dritten Tag hin deutlich ab. Der erste Hauptpuls mit dem präferentiellen Fluss war offenbar am dritten Tag beendet. Aus Kostengründen musste bei diesen Lysimeterversuchen zwar auf Parallelansätze und eine statistische Absicherung verzichtet werden, jedoch kann ausgesagt werden, dass am ersten Tag dieses Versuchsansatzes etwa 1 % der eingesetzten Radioaktivität beim Lehm Boden, und etwa 2 % beim Sandboden verlagert wurden. Die deutlich höhere Wiederfindung gegenüber den Bilanzen aus den quantitativen Messungen der Keimbelastung im Sickerwasser (0,13 - 0,14 %, s. 3.2.2) lassen vermuten, dass die Markierung im ersten Pulsstoß (Abbildung 97) wesentlich aus lysierten *E. coli* stammte, da die Zersetzungsprodukte der Zellen im Boden mobiler sind als die intakten Zellen. Die verzögerte Fracht nach 2 - 3 Tagen war dagegen wahrscheinlich überwiegend vital. Bei überwiegend lysierten Zellen wäre eher ein Anstieg der Radioaktivität am zweiten und dritten Tag zu vermuten gewesen.

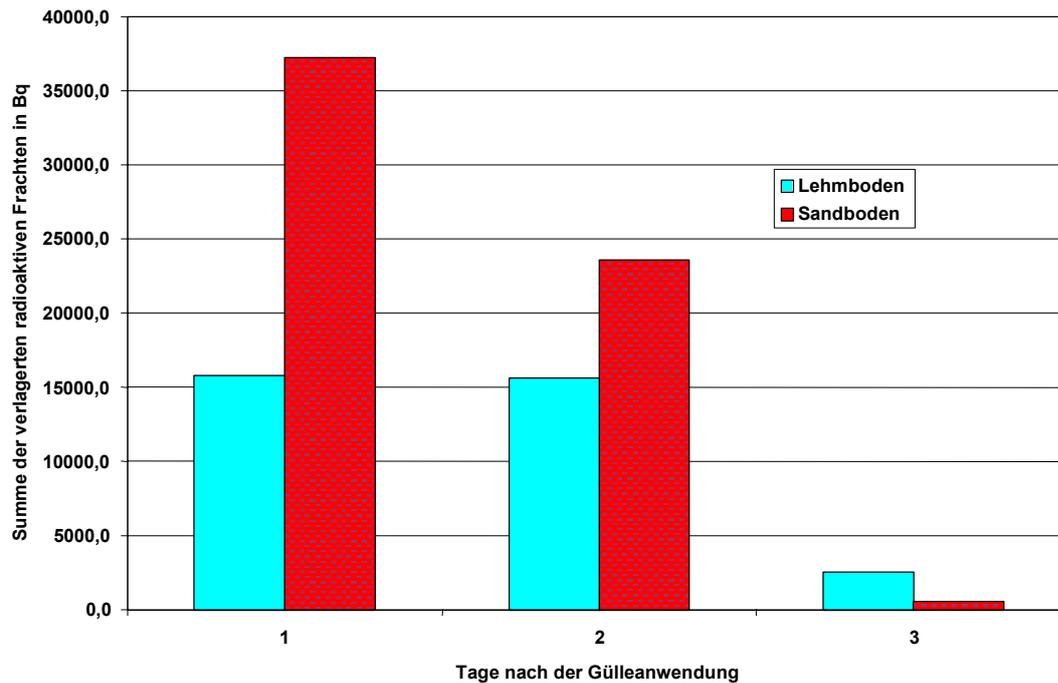


Abbildung 98: Radioaktive Frachten von C 14-markierten *E. coli* Bakterien im Verlauf von drei Tagen nach der Beregnung

Nach drei Tagen hatte die radioaktive Fracht im Sandboden gegenüber dem Lehmboden überproportional abgenommen. Dies deutet auf eine sehr geringe Sorption der Fäkalkeime an die Sandbodenmatrix hin. Im Lehmboden hingegen war am zweiten Tag noch immer eine ähnliche Verlagerung wie am ersten Tag zu erkennen. Am dritten Tag übertraf die radioaktive *E. coli*-Fracht im Sickerwasser des Lehmbodens die Fracht im Sickerwasser des Sandbodens deutlich. Die verzögerte Auswaschung lässt sich über stärkere Adsorption an Ton- und Schluffpartikel des Lehmbodens (Tabelle 60: Bodenkenndaten der verwendeten Lysimeterböden) und durch dessen höheres Mittel- und Feinporenvolumen erklären.

Während des gesamten Versuchszeitraums von 3 Tagen waren Gesamtfrachten der Verlagerung radioaktiv markierter Keime und evtl. deren Abbauprodukte in Höhe von 2,0 % der aufgetragenen Radioaktivität im Lehmboden bzw. 3,7 % aufgetragenen Radioaktivität im Sandboden zu messen. Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, wies der Lehmboden einen geringeren Kohlenstoffgehalt von 1,75 %  $C_{\text{total}}$  als der Sandboden 2,65 %  $C_{\text{total}}$  auf. Dies deutet darauf hin, dass der Humusgehalt für die Sorption von bakteriellen Keimen eine eher untergeordnete Rolle spielt, sondern wohl eher die Ausstattung des Bodens mit Mittel- und Feinporen bzw. sorptiven Oberflächen (höherer Schluff- und Tongehalt des Lehmbodens, Tabelle 60).

Tabelle 60: Bodenkenndaten der verwendeten Lysimeterböden

Bodenherkunft	$C_t$ -Gehalt (%)	Tongehalt (%)	Schluff (%)	Sandgehalt (%)
Lehmboden	1,75	9,3	68,3	22,4
Sandboden	2,65	4,4	19,7	75,9

### C 3.2.4 Eindringverhalten der C14-markierten *E. coli*-Gülle in den Boden

Nach sieben Tagen sollte geprüft werden, wie weit die Colibakterien in den Boden eingedrungen waren und wie die Verteilung der Keime im Boden war. Durch die radioaktive Markierung konnte durch Einstellen eines für C14 empfindlichen Imaging Plates (ähnlich einem Röntgenfilm) in den Boden und der anschließenden Auswertung mit einem Radioaktivscanner die Verteilung der Radioaktivität in den obersten 30 cm Bodenschicht visualisiert werden. Alle im Boden vorhandenen radioaktiven Bereiche konnten so bis auf ein Zehntel Millimeter genau ausgemessen und auch quantifiziert werden. Je grauer eine Zone in Abbildung 99 ist, desto höher ist die Aktivität in dieser Zone des Bodens. Kleine schwarze Punkte bedeuten Zonen höherer Aktivität („Hotspots“). Aus der digitalen Autoradiographie (Abbildung 99) ergab sich folgendes Bild: Die auf die Oberfläche aufgebrachten *E. coli*-Bakterien oder deren Zersetzungsprodukte hatten sich während der sieben Tage bis zur Belichtung weitgehend in der obersten Bodenlage verteilt. In den obersten 5 cm bis zur horizontalen Markierung, ist eine etwas dunklere Zone zu erkennen. Dort war die Radioaktivität etwas höher als in den darunter liegenden Bereichen.

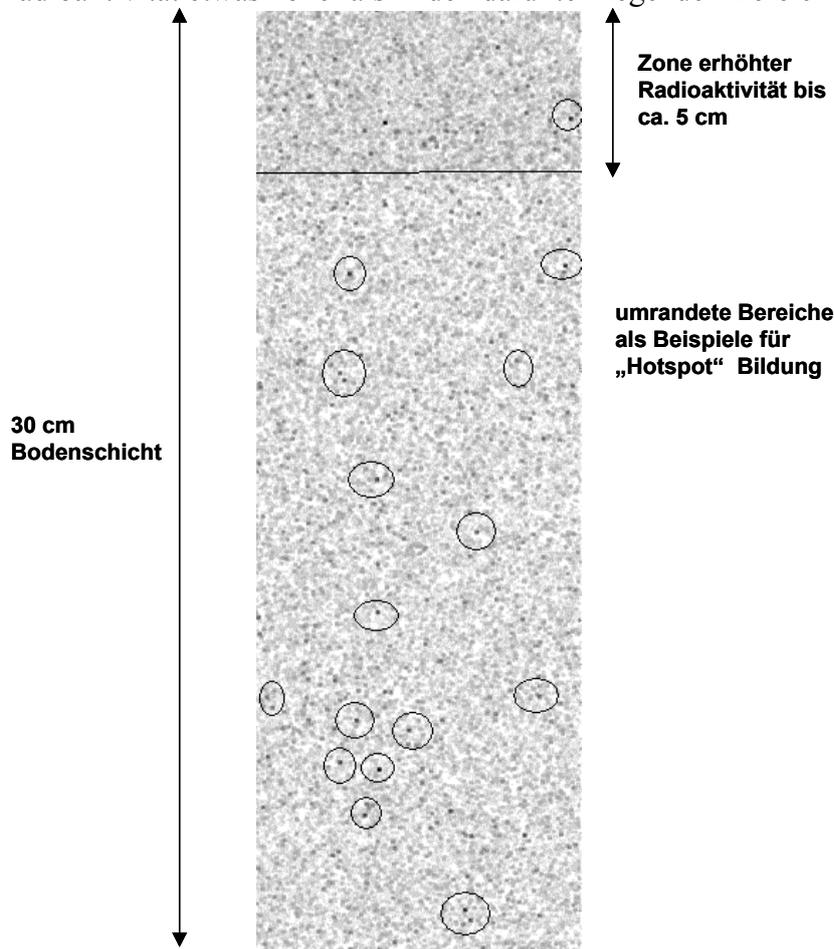


Abbildung 99: Eindringverhalten radioaktiv markierter Gülle in den Lehm Boden.

In allen Bodenschichten hatten sich winzige Bereiche mit erhöhter Aktivität gebildet. Beispiele dafür sind in der Abbildung umringt dargestellt. Diese Hotspots sind im Boden unregelmäßig verteilt und scheinen winzige Akkumulationszonen der radioaktiv markierten Bakterien zu sein. Gleichzeitig zeigt dies, wie heterogen die Verlagerung der Bakterien im Boden ist.

Die Heterogenität der Keimbelastung im Boden zeigte sich an der Beprobung von zwei Lysimetern für die Untersuchung der Keimkonzentrationen im Boden. Die Lysimeter wurden ein Jahr nach der Gülleaufbringung (Rohgülle und Gärrest) in 10 cm Bodenlagen beprobt. Die

Untersuchung der Einzelschichten ergab eine sehr inhomogene Verteilung der fäkalcoliformen Keime in der Größenordnung von <10 bis 500 Keime pro g Trockenboden. Eine Schichtung konnte nicht zugeordnet werden. Dies kann der Tatsache zugeschrieben werden, dass die Probenahme auf den Lysimetern wegen der zu kleinen Fläche und der geringen Anzahl der Einzelproben nicht repräsentativ erfolgen konnte, und zudem die Aktivitätsverteilung im Boden sehr inhomogen war. Die Heterogenität der Verteilung der C14-Aktivität folgt damit der Inhomogenität des Bodenaufbaus. Diese führt zu Zonen mit hohem und niedrigem Sorptionspotential, Makroporen und Bereichen hoher und niedriger Wasserkapazität (hydraulische Leitfähigkeit).

Der Transport von Mikroorganismen wird vor allem bestimmt durch diese Sorptionszonen und den strukturellen Aufbau des Bodens selbst. Durch die relativ großen Strukturen von Bakterien wird der Transport vom Ausschlussprinzip beeinflusst. Das bedeutet, dass größere Partikel, die nicht in das feinere Porensystem des Bodens eintreten können, schneller (an diesen Poren vorbei) transportiert werden als kleinere Teilchen und gelöste Tracermoleküle (McKay et al., 2000; Harvey, 1997).

Nach Aislabie et al. (2001) ist die Verlagerung von Mikroorganismen bestimmt durch Adsorptions- und Filtrationsprozesse im Boden und damit stark abhängig von der physikalischen Beschaffenheit des Bodens. Auch haben Bodenverdichtung und Bodentemperatur einen Einfluss auf die Transportvorgänge im Boden. Neben dem Mikro- und Makrogefüge bestimmen auch die Fruchtart, die Vorfrucht und die Bewirtschaftung die Verlagerung von Wasser und somit auch die Ausschwemmung der Bakterien.

Zudem spielt der präferenzielle Fluss in den Poren ohne Kontakt zum Sorbenten im Medium eine große Rolle. Die meist negative Ladung von Oberflächen vieler Mikroorganismen ist ein Grund für abstoßende Reaktionen der meist negativ geladenen, mineralischen Bodenfraktion und bewirkt damit eine geringere Sorption. Wegen dieser elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen Bodenmatrix und den Zelloberflächen bleiben diese Bakterien beim Transportvorgang vom direkten Kontakt mit der Matrix ausgeschlossen und werden so schneller im Boden verlagert (Auckenthaler, 2004).

Längerfristig können Mikroorganismen bei geeigneten Matrixbedingungen durch Van-der-Waals-Kräfte und Lewis-Säure-Base-Interaktionen an die Bodenmatrix angezogen und am Ton-Humus-Komplex sorbiert werden.

Dies bedeutet, dass auch der pH des Bodens und der pH der Wirtschaftsdünger einen großen Einfluss auf das Sorptionsverhalten der Bakterien haben können. Unter dem Einfluss des pH können die Oberflächenladungen von Matrix und Bakterienoberfläche verändert und somit eine Sorption erhöht oder erniedrigt werden. Scholl und Harvey (1992) berichten, dass bei einem tiefen pH die negativen Oberflächenladungen vermindert werden und somit die Adsorption an den Boden erleichtert wird. Überlagert werden diese Effekte jedoch auch von der Chemie der organischen Bodenfraktion, die durch vielfältige Bindungsstellen die Sorption stark beeinflusst.

Daher spielt auch der Wassergehalt im Boden eine große Rolle. Nach Schäfer (1997) haben hydrophobe Bakterien im ungesättigten Boden eine höhere Retention. Dies erklärt die insgesamt geringen Auswaschungsraten von Mikroorganismen im Boden, wenn man vom ersten schnellen Makroporenfluss (präferenzieller Fluss) absieht. Dabei ist nach Aislabie et al. (2001) das Überleben der Mikroorganismen im Boden bestimmt vom Wassergehalt, der Temperatur und dem pH.

### C 3.3 Lufthygienische Untersuchungen

#### C 3.3.5 Massenspektrometrischer Vergleich gasförmiger Emissionen im Überstand von Gärrest und Rohgülle

Die Entstehung von Biogas ist gekoppelt an Prozesse der Zersetzung organischer Verbindungen unter Luftabschluss. Verantwortlich sind dafür anaerobe Bakterien, die die Abbauvorgänge durchführen, ohne Sauerstoff zu benötigen. Die Biogasentstehung ist ein sehr komplexer Vorgang, bei dem eine Reihe von Bedingungen, Substrat, pH, Temperatur usw. die entstehenden Produkte beeinflusst.

Die Prozesse der Entstehung gasförmiger Stoffe finden in der Natur im Magen und Darmtrakt von Wiederkäuern, aber auch im Kot statt. Somit setzen sich diese Prozesse im Stall und in den Güllegruben fort und finden auch in den Biogasanlagen statt.

In der Hauptsache entstehen bei der anaeroben Vergärung Methangas und Kohlendioxid. Aber auch unerwünschte Stoffe, wie Schwefelwasserstoff, niedrige Alkansäuren und Mercaptane können gebildet werden. Biogas (= Sumpfgas, Faulgas) ist ein durch den anaeroben, mikrobiellen Abbau von organischen Stoffen entstehendes Gasgemisch, das zu 50 - 70 % aus dem hochwertigen Energieträger Methan ( $\text{CH}_4$ ) besteht (Gronauer und Aschmann 2003). Weitere Bestandteile sind 30-40% Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) sowie Spuren von Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ), Stickstoff ( $\text{N}_2$ ), Wasserstoff ( $\text{H}_2$ ) und Kohlenmonoxid ( $\text{CO}$ ).

Dabei ist vor allem das Methangas zur Energieerzeugung und thermischen Verwertung hervorragend geeignet. Andererseits zählt es zu den Hauptverursachern des Treibhauseffekts. Die Energienutzung ist weitgehend  $\text{CO}_2$ -neutral, da fossile Energieträger wie z.B. Erdöl oder Kohle eingesetzt werden. Dabei hat 1  $\text{m}^3$  Methangas nach Kaiser et al. (2004) einen Energieinhalt, der etwa einem halben Liter Heizöl entspricht. Aus der Vergärung der Gülle einer Kuh kann damit im Jahr ein Energieäquivalent von ca. 300 Liter Heizöl gewonnen werden. Im Vergleich zu anderen Substraten ist der Energieertrag aus Rindergülle allerdings gering (Tabelle 61). Daraus resultieren entsprechend den Trockenmasseerträgen (TM) die folgenden Methanerträge pro Hektar:

Maissilage	ca. 5000 - 7500 $\text{m}^3$
Grünland	ca. 1100 - 4700 $\text{m}^3$
Rüben	ca. 4600 - 5600 $\text{m}^3$

Tabelle 61: Durchschnittliche Gaserträge einiger häufig eingesetzter Substrate pro Tonne Frischmasse (Keymer und Schilcher, 1999)

Substrat	Gasertrag pro t
Milchviehgülle	25 $\text{m}^3/\text{t}$
Schweinegülle	36 $\text{m}^3/\text{t}$
Grüngut (Wiesengras)	90 $\text{m}^3/\text{t}$
Maissilage	170 - 200 $\text{m}^3/\text{t}$
Speiseabfälle	220 $\text{m}^3/\text{t}$
Altfett	600 $\text{m}^3/\text{t}$

Um die Bildung von Schwimmdecken und Sinkschichten in den Fermentern zu verhindern, muss das Substrat gerührt werden. Dadurch wird auch das Entweichen der entstandenen Gase erleichtert. Die Menge gebildeten Gases hängt von der Art des Substrats, von der Verweildauer und der Betriebstemperatur in der Biogasanlage ab.

Dabei ist die Geruchsbildung von Biogasgülle im Vergleich zur Rohgülle sehr viel geringer, da bei der Vergärung verschiedene Abbauprodukte von Aminosäuren nicht entstehen und

andere geruchsintensive Stoffe weitgehend abgebaut werden. Aus der Gülle, schätzt man, werden bis zu 150 flüchtige Verbindungen emittiert. Der subjektive Eindruck von Geruch ist von Person zu Person allerdings sehr unterschiedlich.

Durch den anaeroben Abbau ist der Kohlenstoffanteil in der vergorenen Gülle verringert und der Anteil an ammoniakalischem Stickstoff erhöht. Das C/N-Verhältnis verschiebt sich zu niedrigeren Werten. Dies bedeutet auch, dass Biogasgülle, wie im Folgenden gezeigt, bei der Ausbringung etwas mehr Ammoniak aber weniger Methan emittiert.

In der Abbildung 100 ist zunächst ein Massenspektrum der Luft mit den Hauptkomponenten Stickstoff ( $N_2 = 78,09\%$ ) und Sauerstoff ( $O_2 = 20,95\%$ ) dargestellt.

Im Vergleich dazu wies das Massenspektrum des Gärrests (Abbildung 101) bei den Massen 12, 15, 16, 18 und 44 deutlich höhere Signale auf als die Umgebungsluft, während Umgebungsluft reicher an  $O_2$  (Masse 32) war. Masse 12 steht für den Kohlenstoff, 14 für Stickstoff, Masse 15 für Methylgruppen, 16 für Sauerstoffanteile von Molekülen bzw. Methan, 18 für  $H_2O$  und 44 für  $CO_2$ .

Betrachtet man das Massenspektrum der Rohgülle im Vergleich zum Gärrest, so kann man erkennen, dass die Massen 12 (C), 15 ( $-CH_3$ ), 16 (O,  $CH_4$ ) und 44 ( $CO_2$ ) über Gülle höher sind als über Gärrest, während die Masse 14 (N) niedriger ausfiel (roter Pfeil in der Abbildung 102).

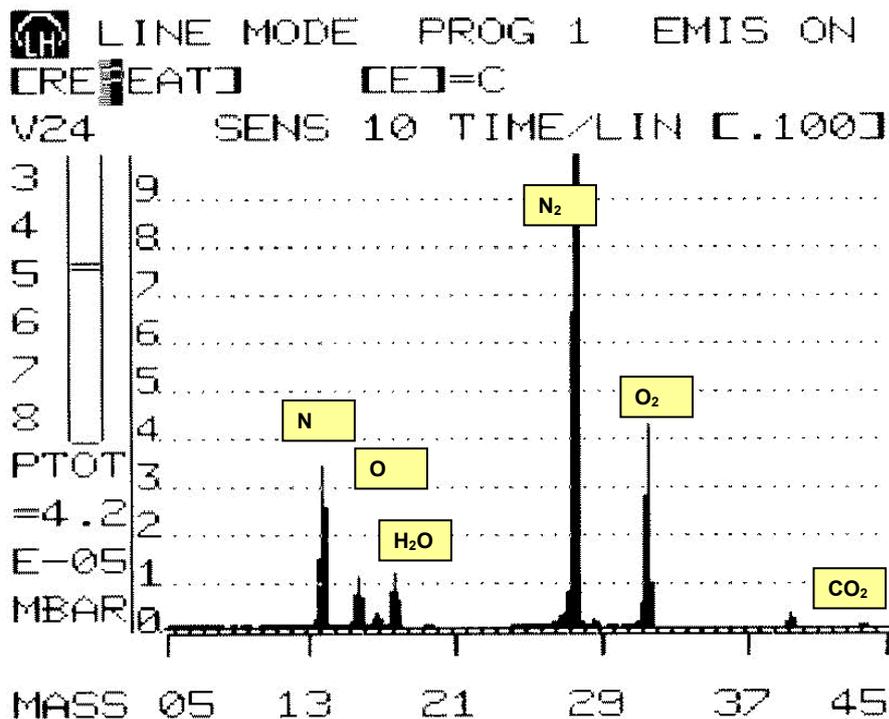


Abbildung 100: Massenspektrum von Umgebungsluft

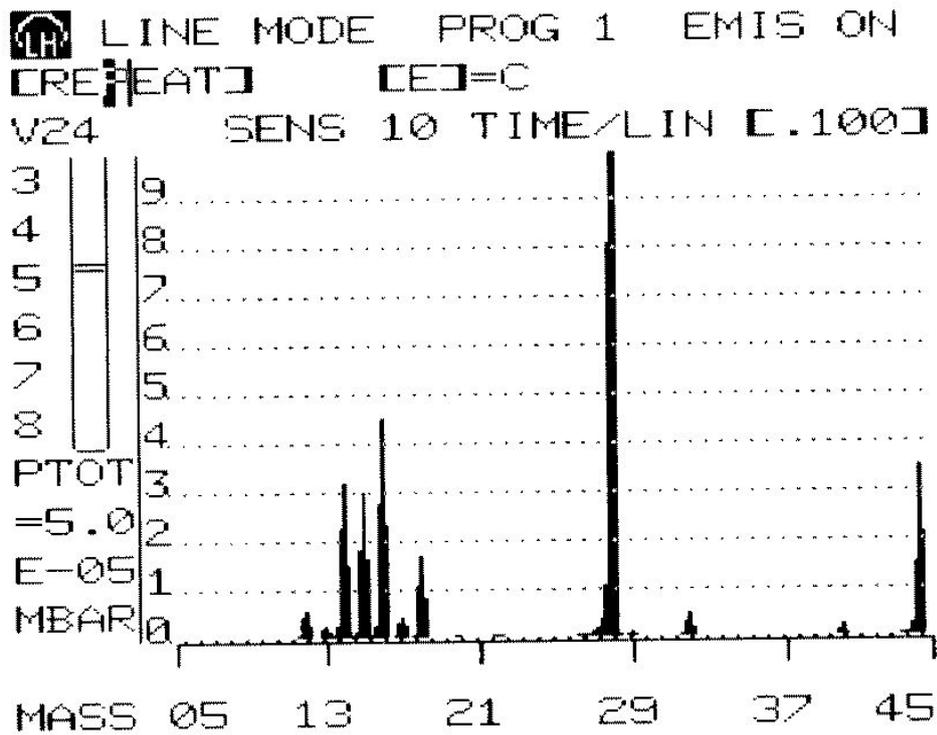


Abbildung 101: Massenspektrum des Luftraums über dem Gärrest im Gleichgewicht

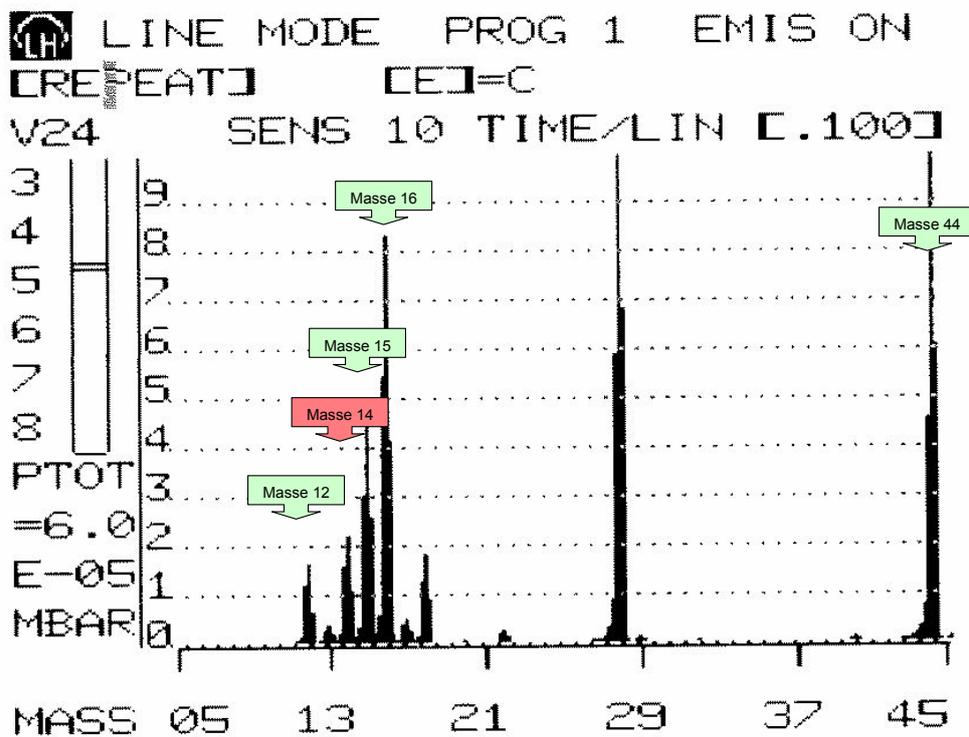


Abbildung 102: Massenspektrum des Luftraums über der Rohgülle im Gleichgewicht. Grüne Pfeile bedeuten rel. Zunahme des Massesignale gegenüber dem Gärrest. Roter Pfeil bedeutet rel. Abnahme des Massesignals gegenüber dem Gärrest

Auch wenn die qualitative Gaszusammensetzung im Überstand des Gärrests (Biogasgülle) und der Rohgülle qualitativ große Ähnlichkeiten aufwies, so hatte die Rohgülle höhere  $\text{CO}_2$ - sowie Gasanteile mit der Masse 12 (Kohlenstoff) und 15. Diese rühren von organischen Kohlenstoffverbindungen her. Auch wies die Rohgülle höhere Sauerstoffanteile (Masse 16), z.B. in organischen Säuren, Essig-, Propion- und Buttersäure, auf. In einer Untersuchung der Thüringischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Reinhold et al. 2004) wurde der Abbau von flüchtigen Fettsäuren ( $\text{C}_2$  bis  $\text{C}_6$ ) während des Biogasprozesses nachgewiesen. Im Mittel war durch die Vergärung der Gülle ein Abbau von 7470 mg Fettsäuren pro Liter auf 450 mg pro Liter festzustellen. Der in Gülle höhere Anteil an Masse 16 rührt sicher teilweise auch von Methan her. Wegen der geringeren Methanausgasung kann Gärrestdüngung einen wichtigen Beitrag zur Reduktion klimarelevanter Spurengase leisten, wenn Gölledüngung entsprechend eingeschränkt wird.

Gleichzeitig hatte der Luftraum über der Rohgülle niedrigere N-Anteile (Masse 14), z.B. Ammoniak,  $\text{NO}_x$  usw.). Die Rohgülle hatte im Gleichgewicht daher niedrigere N-Emissionen. Nach Klasink und Steffens (2003) ist Ammoniak jedoch nicht die Hauptursache für die Geruchsentstehung. Die Ammoniakanteile in den unterschiedlichen Göllelen können somit nicht die offensichtliche Geruchsverminderung der Biogasgülle erklären. Vielmehr sind Alkaloide (organische Stickstoffverbindungen), Amide, Amine (entstanden durch Dekarboxylierung der Aminosäuren), Mercaptane (schwefelhaltige Aminosäuren) und organische Säuren (z.B. Butter-, Essig- und Propionsäure) für den Geruch von Gölle verantwortlich. Diese Komponenten werden in der Regel gekennzeichnet durch den höheren Anteil an C, N und O (Massen 12, 14 und 16). Die Wahrnehmungsgrenze dieser Stoffe für die menschliche Nase ist so gering, dass sie schon in kleinsten Konzentrationen Belästigungen verursachen. Ammoniak hat einen höheren Geruchswert als andere Gase. Der Geruchswert von Ammoniak liegt im Volumenprozentbereich bei  $10^{-3}$  %, von Schwefelwasserstoff bei  $10^{-5}$  %. Die Buttersäure hat einen Geruchswert von  $10^{-12}$  % und Mercaptane etwa  $10^{-14}$  %. Dies zeigt, dass Ammoniak erst in sehr viel höheren Konzentrationen vom Geruchssinn erkannt werden kann.

### C 3.3.2 Emission von Ammoniak im Luftraum über Gärrest und Rohgülle

Unter anaeroben/anoxischen Bedingungen entstehen beim bakteriellen Abbau von organischen, stickstoffhaltigen Verbindungen und Nitrat die Produkte Nitrit ( $\text{NO}_2$ ), Lachgas ( $\text{N}_2\text{O}$ ), Stickstoff ( $\text{N}_2$ ), Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) und Stickoxide ( $\text{NO}_x$ ).

Lachgas entweicht in die Atmosphäre und verstärkt die Treibhauswirkung. Ammoniak ist ein farbloses Gas mit stechem Geruch, das teilweise in Lösung bleibt, aber teilweise in die Atmosphäre entweicht und so zur Eutrophierung von Gewässern und der Versauerung der Böden beitragen kann.

Bei der Ammoniakproduktion ist das Enzym Urease beteiligt. Die Urease im Kot spaltet vom Harnstoff den gasförmigen Ammoniak ab, welcher sich dann in der Gölle löst und bei der Lagerung und Ausbringung in die Luft entweicht (Wulf, 2003). In einer Versuchsreihe mit acht Messungen wurde jeweils die Emission von Ammoniak aus dem Überstand (Headspaceanalyse) von Gärrest und Rohgülle untersucht (Tabelle 62). Je ein ml der homogenisierten Wirtschaftsdünger wurde für 24 Stunden in eine gasdichte Küvette eingeschlossen und die emittierten Gase im Gleichgewicht zwischen gelöster und gasförmiger Phase auf Ammoniak untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass im Mittel die emittierte Ammoniakmenge aus 1 ml Gölle in einem Volumen von 2 Litern im Gärrest höher war als in der Rohgülle.

Im Luftraum über dem Gärrest hatte sich eine  $\text{NH}_3$ -Konzentration von 4,8 ppm und im Luftraum über der Rohgülle eine Konzentration von 3,4 ppm gebildet.

Tabelle 62: Ammoniakemissionen im Luftraum über Gärrest und Rohgülle

Messreihe	NH <sub>3</sub> - Emissionen in ppb								Mittelwert ppb
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Gärrest	3147	4152	5209	5735	5267	5115	4944	4790	4798
Rohgülle	2472	2476	2411	2399	4497	4606	4256	3901	3377

Im Luftraum über dem Gärrest war in dieser Messserie (mit nur einem Gärrest und einer Rohgülle) fast 30 % mehr Ammoniak enthalten. Bei nahezu gleichem N-Gesamtgehalt hat der Gärrest (Biogasgülle) einen höheren Ammoniumgehalt. Dieser Versuch kann mangels Wiederholungen nicht zur quantitativen Bewertung herangezogen werden, erlaubt aber auch ohne statistische Absicherung den Hinweis, dass bei der Gärrestausrückführung mit höheren Verlusten an gasförmigen Emissionen zu rechnen ist. In der Gülle betrug der NH<sub>4</sub>-N Anteil etwa 60 % des Gesamt N beim Gärrest und 40 % NH<sub>4</sub>-N bei der Rohgülle. Diese erhöhten Ammoniumanteile im Gärrest werden auch von Reinhold et al. (2004) und Peretzki et al. (2005) beschrieben.

### C 3.3.3 Emission von Ammoniak bei der Ausbringung von Gärrest und Rohgülle

Die Ausbringung von Gärrest und Rohgülle erfolgte praxisnah bei bedecktem Himmel und einer Lufttemperatur von 16 - 20° C. Die Bodentemperaturen während der Versuche betragen dabei zwischen 10 und 17° C. In jeweils drei Messreihen wurde der Tagesgang der Ammoniak- und NO<sub>x</sub>-Emissionen der ausgebrachten Wirtschaftsdünger untersucht (Abbildung 103, Abbildung 104). Wie sich zeigte, begann die Emission von Ammoniak in allen Versuchsreihen bereits nach wenigen Minuten, erreichte nach zwei bis drei Stunden ihren Höhepunkt und war nach etwa 8 - 10 Stunden beendet. Parallel dazu wurden die gasförmigen Emissionen von NO<sub>x</sub> (NO+NO<sub>2</sub>) gemessen. Diese lagen in beiden Varianten auf niedrigem Niveau und schwankten um Werte von 25 ppb.

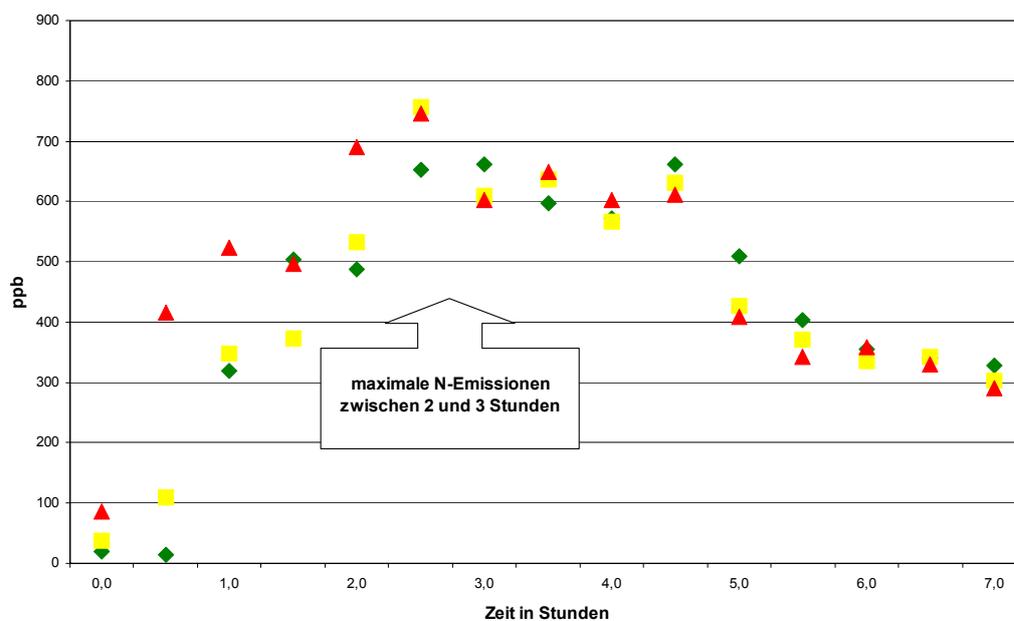


Abbildung 103: Drei Messreihen zur gasförmigen Emission von Ammoniak aus dem Gärrest

Die Emission von Ammoniak aus dem Gärrest war in den ersten Stunden stets höher als die Emissionen aus der Rohgülle. Dies kann daran liegen, dass der Stickstoffgehalt im Gärrest nach der Biogaserzeugung relativ zum Kohlenstoff ansteigt. Dies wird bestätigt durch Untersuchungen von Wulf et al. (2002), die in den ersten Stunden nach der Ausbringung von Gärrest im Freiland ebenfalls erhöhte Ammoniakemissionen gegenüber Gülle messen konnten. Dieser Effekt wurde jedoch nach etwa 24 Stunden vermutlich durch das bessere Eindringen des Gärrests in den Grünlandboden gegenüber der Rohgülle wieder aufgehoben.

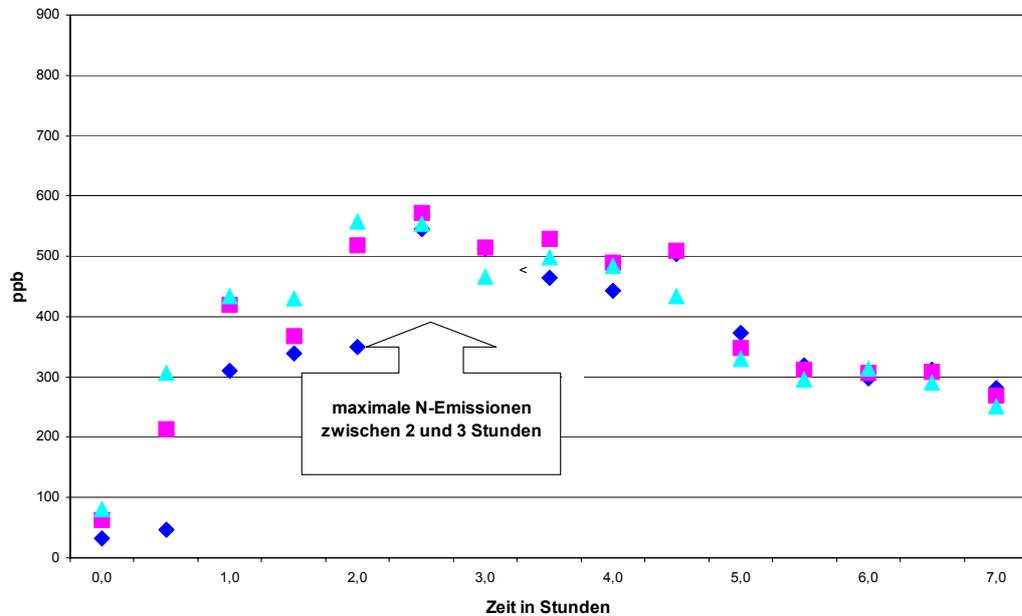


Abbildung 104: Drei Messreihen zur gasförmigen Emission von Ammoniak aus Rohgülle

Die Biogasgülle ist gegenüber der Rohgülle dünnflüssiger und dringt schneller in den Boden ein. Die geringere Viskosität und das bessere Eindringen in den Boden wirkt ebenfalls geruchsmindernd. Eine Verdünnung von Gärrest und Rohgülle ist daher auf alle Fälle vorteilhaft.

Ein Verbleib von festen, verkrusteten Gällerechten auf der Pflanzen- oder Bodenoberfläche, die eine punktförmige Quelle mit hohen (u.a. bakteriellen) Konzentrationen darstellen, wird somit vermieden. In einer Untersuchung von Weiß und Popp (2004) konnte gezeigt werden, dass Festmist höhere Konzentrationen fäkalcoliformer Bakterien aufwies als Gülle.

Aus hygienischer Sicht ist es daher besser, eine niedrigviskose, verdünnte Gülle die schneller in den Boden eindringt auszubringen, als eine Gülle mit hohem Trockensubstanzgehalt oder Festmist.

## C 4 Zusammenfassung und Bewertung

Es zeigte sich bei allen Lysimeteruntersuchungen, dass nach der Aufbringung von Gärrest und Rohgülle innerhalb weniger Stunden Gülleinhaltsstoffe, Tracer und *E. coli* im Sickerwasser zu finden waren. Die Ursache dieser ersten schnellen Verlagerung waren Makroporen, die den Boden durchziehen. Diese Makroporen sind durch die Bodenstruktur bedingt, können aber auch u.a. aus Wurzelkanälen, Regenwurmröhren oder Mäusegängen (Megaporen) bestehen.

Das Niveau des Leachings über Makroporentransport erreichte bei den Beregnungsexperimenten 2 - 3 Stunden nach der Gülle- und Gärrestanwendung ein Maximum und fiel dann langsam wieder ab. Die Verlagerung von fäkalcoliformen Keimen mit dem Sickerwasser war dabei weitgehend unabhängig von der Art des eingesetzten Wirtschaftsdüngers (Gärrest oder Rohgülle).

In den Beregnungsversuchen wurden innerhalb von 3 Tagen 28 % des aufgebrachten Wassers beim Lehmboden und 33 % beim Sandboden als Sickerwasser durch den Boden (1 m Tiefe) transportiert. Von den aufgebrachten Fäkalindikatorbakterien (*E. coli*) wurden mit dem Sickerwasser 0,13 % bei der Rohgülle (auf Lehmboden) und 0,14 % beim Gärrest (auf Sandboden) verlagert.

Diese Ergebnisse werden in der Größenordnung durch die Untersuchungen von Schwarz und Kaupenjohann (2000 und 2001) und Weiß und Popp (2004) bestätigt. Bei deren Untersuchungen in gedrähten Freilandflächen lagen die Gesamtausträge fäkalcoliformer Keime zwischen 0,05 % und 14,7 %.

Dabei geben diese Werte vor allem kurzfristige Verlagerungen bei Beregnungsversuchen und unterschiedlichem Makroporenbesatz wieder. So können z.B. Mäusegänge oder Trockenrisse die Fracht erheblich erhöhen. Gepflügte Flächen erhöhen hingegen die sorptionsfähige Oberfläche des Bodens, stören die Makroporen und verlangsamen den schnellen Makroporentransport in den Untergrund (Simard et al., 2000).

Bei den Lysimeteruntersuchungen ist zu berücksichtigen, dass es in den Lysimetern im Gegensatz zum Freiland keine Mäusegänge und nur wenige Regenwurmröhren gab, der Makroporenfluss daher in den Lysimetern geringer war.

Die Verlagerungen der Tracer Tritium, Lithium und Bromid sowie der fäkalcoliformen Keime über Makroporen verlief praktisch zeitgleich. Diese Tracer haben sich daher für die Beobachtung der Verlagerung von Bakterien bewährt.

Die Bodenart, der pH-Wert und der Kohlenstoffgehalt ( $C_t$ -Gehalt) spielten bei den hier durchgeführten Lysimeterversuchen für die Verlagerung über Makroporen nur eine untergeordnete Rolle. Aislabie et al. (2001) beschreiben, dass hohe Tonanteile im Boden keinen nennenswerten Einfluss auf die mikrobielle Verlagerung haben. Anhand der vorliegenden Ergebnisse könnte jedoch ein Zusammenhang zwischen höherer Ton- und Schlufffraktion und verlangsamer Keimverlagerung bestehen. Nach Berg (1999) beeinflussen besonders der Makroporenbesatz, die Korngrößenverteilung und die Ausprägung des Bodengefüges das Bodenwasser und dessen Bewegung im Boden.

Eine Abhängigkeit des Austrags von *E. coli* von der Sickerwassermenge über Makroporenfluss konnte in den Lysimeteruntersuchungen nicht beobachtet werden. Dies wird auch durch Untersuchungen von Weiß und Popp (2004) bestätigt, der beim präferentiellen Fluss keine Unterschiede im Gesamtaustrag nachweisen konnte.

Bei Ausbringung von Rohgülle im Spätherbst verzögerte sich die Keimverlagerung gegenüber der Ausbringung im Sommer um einige Stunden.

In den Langzeituntersuchungen wurden im Laufe eines Jahres neben den kurzfristigen Keimverlagerungen über Makroporen zu Zeiten starker Regenfälle immer wieder geringe

Mengen Indikatorkeime ausgewaschen. Diese Auswaschung blieb aber auf einem sehr niedrigen Niveau und lag zwischen 1 und 100 Kolonien bildenden Keimen pro 100 ml Sickerwasser.

In nahezu allen Sickerwässern, vor allem auch in den ungedüngten Varianten, konnten geringere Konzentrationen an *E. coli* auf diesem Niveau gemessen werden. Dies ist vermutlich auf eine natürliche Hintergrundbelastung der Böden mit fäkalcoliformen Keimen zurückzuführen. Diese natürliche Kontamination von Böden mit *E. coli* kann z.B. durch Kot von Vögeln, Mäusen, Maulwürfen, Hasen oder höheren Wildtieren verursacht werden. Um diese Hintergrundbelastungen mit fäkalcoliformen Keimen zu bewerten, fehlen jedoch Literaturwerte oder umfassende Untersuchungen aus der landwirtschaftlichen Praxis.

Bei den Versuchen mit radioaktiv markierten *E. coli* Keimen wurden während 3 Tagen Gesamtfrachten der Verlagerung (radioaktiv markierter Keime und evtl. Abbauprodukte) in Höhe von 2,0 % der aufgetragenen Radioaktivität im Lehmboden bzw. 3,7 % aufgetragenen Radioaktivität im Sandboden gemessen. Die höheren Wiederfindungsraten scheinen weniger auf der Art des Wirtschaftsdüngers sondern eher auf dem höheren Grobporenanteil des Sandbodens zu beruhen.

Die Heterogenität der Keimbelastung im Boden zeigte sich an der Bodenbeprobung. Die Untersuchung der Einzelschichten im Lysimeter ergab eine sehr inhomogene Verteilung fäkalcoliformer Keime in der Größenordnung von <10 bis 500 Keime pro g Trockenboden. Eine Schichtung konnte nicht zugeordnet werden.

Neben der Gewinnung von Energie hat die Biogasgülle (Gärrest) aus der Sicht der Landwirtschaft einige Vorteile gegenüber Rohgülle. Bei der anaeroben Schlammfäulung wird die organische Trockensubstanz um etwa 40 % (nach Gronauer und Aschmann, 2003) verringert. Dadurch wird die Biogasgülle dünnflüssiger und neigt bei der Ausbringung weniger zur Verkrustung an der Pflanzenoberfläche. Der Gärrest (Biogasgülle) lässt sich leichter rühren, pumpen und gleichmäßiger verteilen. Auch werden in der Biogasgülle kurzzeitige organische Säuren und Faserstoffe abgebaut, die bei der Rohgülle das Abfließen von den Pflanzen erschweren. Bei der Ausbringung dringt der Gärrest daher schneller in den Boden ein.

Der Gärrest hat einen angenehmeren Geruch als die Rohgülle und führt damit bei Lagerung und Ausbringung zu geringerer Geruchsbelastung. Er emittiert offenbar auch wesentlich weniger klimarelevantes CH<sub>4</sub>.

Die Rohgülle hat gegenüber dem Gärrest höhere Gehalte an organischen Säuren, z.B. Essig-, Propion- und Buttersäure. Bei der Vergärung werden diese flüchtigen Fettsäuren stark abgebaut. Nach Reinhold et al. (2004) hat ein Gärrest im Mittel weniger als 10 % flüchtiger Fettsäuren (C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub>) einer vergleichbaren Ausgangsgülle (Rohgülle).

Im Luftraum über dem Gärrest waren etwa 30 % höhere N-Anteile im Bezug zur Rohgülle zu messen. Dies liegt daran, dass der Gärrest (Biogasgülle) einen höheren Ammoniumgehalt im Verhältnis zum Trockenmassegehalt aufwies. Der NH<sub>4</sub>-N Anteil betrug etwa 60 % des Gesamt N beim Gärrest und 40 % NH<sub>4</sub>-N bei der Rohgülle. Dies wurde bestätigt durch Veröffentlichungen von Reinhold et al. (2004) und Peretzki et al. (2005).

Eine sachgerechte Nährstoffbewertung der Biogasgülle ist daher eine wesentliche Voraussetzung für die Festlegung von Düngemaßnahmen mit Gärresten. Die Einsatzmengen sind unter Berücksichtigung des N<sub>min</sub> Gehaltes im Boden und des Entzugs von Stickstoff an die Nährstoffmenge in der Gülle anzupassen. Dabei ist insbesondere die Begrenzung von 40 kg NH<sub>4</sub>-N/ha für die Gärreste zu beachten, da die Gärreste meist höhere Ammonium-N-Gehalte aufweisen.

Aus pflanzenbaulicher Sicht kann der erhöhte Anteil an rasch pflanzenverfügbarem Ammonium-Stickstoff kurzfristig zu geringen Ertragssteigerungen führen. Langfristig verändernde Auswirkungen auf die Humusbilanz, Bodenneubildung und Bodenbiologie durch das verringerte C/N-Verhältnis sind jedoch nicht auszuschließen.

Der etwas höhere Ammoniumgehalt und etwas höhere pH-Wert im Gärrest (7,83 gegenüber 6,82 in der Rohgülle) führt wohl auch bei der Lagerung zu erhöhten N-Emissionen. Es sollte bei der Konzeption der Biogasanlage daran gedacht werden, dass die Gärreste unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche in das Endlager gepumpt werden, um Stickstoffverluste zu reduzieren und um eine rasche Abkühlung der Gärreste aus dem Fermenter zu gewährleisten.

Zudem sollte nach Möglichkeit eine Abdeckung der Flüssigkeitsoberfläche erfolgen um N-Emissionen und somit Nährstoffverluste zu verhindern.

Aus hygienischer Sicht wiesen die von uns verwendeten Gärreste (Biogasgülle) um 3 - 4 log Stufen niedrigere Keimkonzentrationen (*E. coli*) als die Rohgülle (Normalgülle) auf. Dies ist aus der Sicht des Boden- und Gewässerschutzes für die Keimbelastung des Boden und des Sickerwassers als sehr positiv zu erachten.

Um jedoch Makroporentransportvorgänge zu vermeiden, sollte die Ausbringung der Gärreste auf ausgetrockneten Böden, besonders vor Starkregenereignissen, in sensiblen Zonen nicht empfohlen werden.

Eine Ausbringung von Gärresten hat, insbesondere vor dem Hintergrund einer eventuellen Ausbringung im erweiterten Wasserschutzgebiet, wegen der wesentlich geringeren Keimkonzentration im Gärrest deutliche Vorteile gegenüber Rohgülle. Aus Sicht der Auswaschung, Verlagerung und dem Verbleib von fäkalcoliformen Indikatorkeimen im Boden . zeigten die Wirtschaftsdüngervarianten keine wesentlichen Unterschiede. Lebuhn und Wilderer (2006) weisen allerdings darauf hin, dass bakterielle Sporenbildner während des Biogasprozesses nicht reduziert werden. Hier sind Untersuchungen nötig, ob eine Anreicherung im Boden bzw. Kontamination des Grundwasserstroms stattfindet.

Eine Empfehlung zur Ausbringung in erweiterten Wasserschutzgebieten könnte z.B. über Ausnahmeregelungen gegeben werden, wenn die Forderungen der Düngeverordnung eingehalten werden und Austräge von  $\text{NH}_4\text{-N}$  minimiert werden. Weiterhin darf die tatsächliche Verlagerung von fäkalcoliformen, pathogenen oder sporenbildenden Keimen, die durch eine Hygienisierung nicht ausreichend dezimiert wurden, über den Makroporenfluss nicht zu Grenzwertüberschreitungen im Wasser führen.

Daher könnte eine kontinuierliche Überwachung des Anlagenbetriebs und/oder der Keimbelastungen der Gärreste auf selektierte Problemkeime und ein Monitoring der Nährstoffgehalte zielführend sein, denn ein Ausbringverbot macht nur Sinn, wenn von dem Gärrest tatsächlich eine mikrobielle oder stoffliche Gefahr für Umwelt, Mensch und Tier ausgeht.

Sollte eine Hygienisierung über die thermophile Reaktorstufe (55°C) für pathogene Keime und Sporenbildner nicht ausreichend sein, könnten z.B. sehr zeit- und kostenintensive Verfahren der Drucksterilisation, eine thermische Nachbehandlung oder eine Bestrahlung mögliche technische Alternativen darstellen.

Ein realistische Möglichkeit zur Reduktion der Keimbelastung im Boden läge beispielsweise in der Reduzierung des Eintrags u.U. hygienisch bedenklicher Keime durch die Verringerung der Wirtschaftsdünger-Ausbringung generell, Verdünnung der Wirtschaftsdünger und in einem geeigneten Wirtschaftsdünger-Management. So könnten z.B. hygienisch und stofflich einwandfreie Wirtschaftsdünger auch in sensibleren Bereichen ausgebracht werden, höher belastete Wirtschaftsdünger auf unproblematischeren Ackerstandorten.

Güde (2002) beschreibt, dass bei längerer Lagerung von Rohgülle ebenfalls geringere Keimbelastungen in der Größenordnung von etwa drei Zehnerpotenzen erreicht werden können. Bei längerer Lagerung von Gärresten könnten allerdings die Vorteile der Hygienisierung durch Wiederverkeimung (Lebuhn und Wilderer, 2006) teilweise wieder aufgehoben werden. Es wäre daher aus hygienischer Sicht wünschenswert, zur Ausbringung der Gärreste in sensiblen Bereichen die optimale Lagerzeit und den besten Zeitpunkt zu ermitteln.

Auch ist die Vergärung von Ko-Substraten mit rein pflanzlicher Biomasse ein möglicher Weg zur weiteren Verringerung der Keimbelastungen in den Gärresten.

Nach Tidden (2003) könnte auch eine nachgeschaltete Behandlung des Gärrests (z.B. durch eine externe Kompostierung) zu einer weiterführenden Hygienisierung beitragen.

## C 5 Literatur

- Aislabie, J., Smith, J.J., Fraser, R. and McLeod, M. (2001):** Leaching of bacterial indicators of faecal contamination through four New Zealand soils. *Aust. J. Soil Res.*, 39, 1397-1406
- Auckenthaler, A.G. (2004):** Transport von Mikroorganismen in einem Karstaquifer am Beispiel der Lützelquelle, Dissertation, Philosophisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Basel, 2004
- Berg, W. (1999):** Neue Methoden zur Visualisierung und Quantifizierung bevorzugter Fließwege in der ungesättigten Zone. Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Zojer an der Karl-Franzens-Universität Graz, Institut für Hydrogeologie und Geothermie
- De Man, J.C. (1983):** MPN Tables, Corrected, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 301-305, 1983
- Düngeverordnung (1996):** Verordnung über die Grundsätze der guten fachlichen Praxis beim Düngen. *Bundesgesetzblatt Teil 1 Nr.6*, 118 – 121
- Edmonds, R.L. (1976):** Survival of coliform bacteria in sewage sludge applied to a forest clearcut and potential movement into groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 537-546
- Gronauer, A. und Aschmann, V. (2003):** Wissenschaftliche Begleitung einer Pilotanlage zur Feststoffvergärung von landwirtschaftlichen Gütern. Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten, Landtechnische Berichte aus Praxis und Forschung, Gelbes Heft 77
- Güde H. (2002):** Erfassung und Bewertung von Eintragungswegen für Belastungen mit Fäkalkeimen im Einzugsgebiet der Seefelder Aach (Bodenseekreis), Forschungsbericht der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg Langenargen Institut für Seenforschung
- Harvey, R.W. (1997)** In situ and laboratory methods to study subsurface microbial transport. *Manual of Environmental Microbiology*, ASM, 586-599, 1997
- Kaiser, F., Diepolder, M., Eder, J., Hartmann, S., Prestele, H., Gerlach, R., Ziehfrend, G. und Gronauer, A. (2004):** Ertragspotentiale verschiedener nachwachsender Rohstoffe in landwirtschaftlichen Biogasanlagen. *Biogas in Bayern*, LfL-Schriftenreihe 13, ISSN 1611-4159
- Keymer, U. und Schilcher, A. (1999):** Biogasausbeuten verschiedener Substrate. Ergebnisse des LTV-Arbeitskreises Biogas, *Landtechnik-Bericht 34*, Landtechnik Weihenstephan, TU München, Freising-Weihenstephan
- Klasink, A. und Steffens: G. (2003):** Odour and Ammonia Emissions From Grassland and arable Land, Landwirtschaftskammer Weser-Ems. UBA-Signatur, UBA LU600037
- Lebuhn, M. und Wilderer, P. (2006):** Abschlussbericht des StMUGV-Projekts Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in

Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung, Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen.

**McKay, L.D., Sanford, W.E. and Strong, J.M. (2000):** Field-scale migration of colloidal tracers in fractured shals saprolite. *Ground Water* 38 (1.), 139-147, 2000

**Peretzki, F., Müller, Ch. und Dittmann, Th. (2005):** Aspekte der Düngung mit Gärrückständen aus Biogasanlagen. Bayerisches Landwirtschaftliches Wochenblatt, Serie „Biogas“ Teil 8, 15.02.05

**Reinhold, G., König, V. und Herold, L. (2004):** Auswirkungen der Biogaserzeugung auf die Eigenschaften der Gärsubstrate. Kongressband zur VDLUFA-Tagung in Rostock 2004, Seite 256-262, ISBN 3-922712-91-6

**Schäfer, A. (1997):** Bacterial transport and pollutant degradation: influences of air-water interfaces and solid surfaces. PhD Thesis, Diss. ETH No. 12416, 1997

**Scheffer, F. und Schachtschabel, P. (1998):** Lehrbuch der Bodenkunde. 14. Aufl. Enke, Stuttgart

**Schindler P.R.G. (1991):** MUG-Laurylsulfat-Bouillon – ein optimales Nachweismedium für gesamtcoliforme und fäkalcoliforme Bakterien im Rahmen der hygienischen Überprüfung von Badegewässern gemäß der EG-Richtlinie 76/160 EWG (MUG-Lauryl Sulfate Broth – an Optimum Medium for the Enumeration of Total Coliform and Faecal Coliform Bacteria for the Quality Control of Bathing Waters According to the EC-Guideline 76/160 EWG). *Zbl. Hyg.* 191, 438-444

**Scholl, M.A. und Harvey, R.W. (1992):** Laboratory investigation on the role of sediment surface and groundwater chemistry in transport of bacteria through a contaminated sandy aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 26(7), 1410-1417, 1992

**Schwarz A. und Kaupenjohann M. (2000):** Grundwasserbelastungen durch in Böden eingetragene Schadstoffe unter besonderer Berücksichtigung des schnellen Flusses in bevorzugten Fließbahnen. In: AK "Schneller Stofftransport in Böden" im FA "Bodenschutz, Boden- und Grundwasserverunreinigungen" des ATV-DVWK, Abschlussbericht Hohenheim, 1-32

**Schwarz A. und Kaupenjohann M. (2001):** Vorhersagbarkeit des Stofftransportes in Böden unter Berücksichtigung des schnellen Flusses (preferential flow). *KA-Wasserwirtschaft, Abwasser, Abfall* 48, 48-53

**Simard, R.R., Beauchemin, S. and Haygarth, P.M. (2000):** Potential for preferential pathways of phosphorus transport. *J. Environ. Qual.* 29, 97-105

**Tidden, F. (2003):** Leistungsmerkmale und Grenzen der mehrphasigen anaeroben Behandlung kommunaler Bioabfälle. *Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft*, TU München, Berichtsheft Nr. 176, ISSN 0942-914X

**Tschirsich C., Pfisterer A. und Gebauer W.-G. (2002):** Einfluss von Landnutzung und Niederschlag auf das Vorkommen von *Escherichia Coli* im Grundwasser. *Wasser & Boden* 54, 40-43

**Weber, A., Gutser, R., Henkelmann, G. und Schmidhalter, U. (2000):** Unvermeidbare  $\text{NH}_3$ -Emissionen aus mineralischer Düngung (Harnstoff) und Pflanzenmulch unter Verwendung einer modifizierten Messtechnik, VDLUFA-Schriftenreihe 53/2000)

**Weiß, K. und Popp, W. (2004):** Quantifizierung der diffusen Belastung von Gewässern mit Fäkalbakterien aus landwirtschaftlich genutzten Flächen. Schlussbericht des Bayerischen Landesamts für Wasserwirtschaft, 2004

**Wulf, S., Maeting, M. und Clemens, J. (2002):** Application Technique and Slurry Co-Fermentation Effects on Ammonia, Nitrous Oxide, and Methane Emissions after Spreading: I. Ammonia Volatilization, J. Environ. Qual. 2002 31: 1789-1794

**Wulf, S. (2003):** Emissionen von Spurengasen während der Lagerung und nach der Ausbringung von Kofermentationsrückständen. BioGas-Journal, H. 1, 34-35