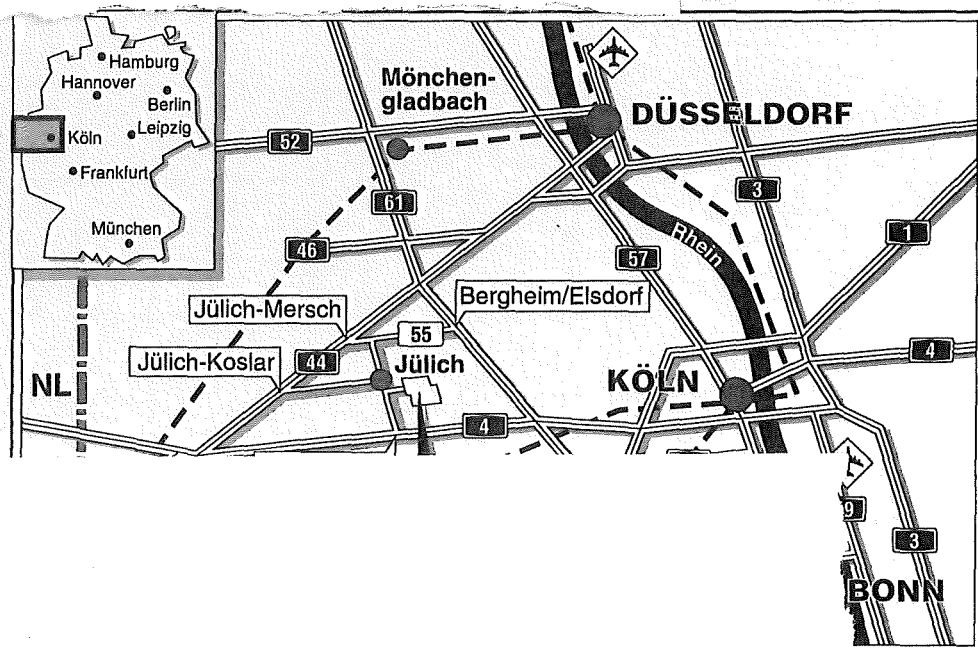


Institut für Biotechnologie

**Biotechnologische Untersuchungen
zur Denitrifikation von Grund- bzw.
Trinkwasser mit Fichtenrindenmulch**

Renate Palloks



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2505

ISSN 0366-0885

Institut für Biotechnologie Jül-2505

D 82 (Diss. T.H. Aachen)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Biotechnologische Untersuchungen zur Denitrifikation von Grund- bzw. Trinkwasser mit Fichtenrindenmulch

Renate Palloks

Inhaltsverzeichnis

	Seite
0	Abkürzungsverzeichnis
	V
1	Einleitung
	1
1.1	Stand der Forschung und Technik
	4
1.1.1	Biologische Grundlagen der Nitratreduktion
	4
1.1.2	Biotechnologische Denitrifikationsverfahren
	6
1.1.3	Fichtenrinde als Substrat
	9
1.1.4	Ziel der Arbeit
	12
2	Material und Methoden
	14
2.1	Aufbau der Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren
	14
2.1.1	Beschreibung der untemperierbaren Laboranlagen
	14
2.1.2	Beschreibung der temperierbaren Laboranlagen
	16
2.1.3	Beschreibung der technischen Anlage
	18
2.2	Probenmaterial
	21
2.2.1	Probenvorbereitung für die Laborversuche
	22
2.2.2	Probenvorbereitung für die Pilotanlage
	22
2.3	Gewinnung der Extrakte
	22
2.4	Chemisch-physikalische Analysen
	23
2.4.1	Sauerstoff, Temperatur, pH-Wert, Redoxpotential, Leitfähigkeit
	23
2.4.2	Messung des spektralen Absorptionskoeffizienten (SAK)
	23
2.4.3	Spektrenaufzeichnung
	23
2.4.4	Härtebestimmung
	24
2.4.5	Bestimmung des Säurebindungsvermögens (m-Wert)
	24
2.4.6	Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB)
	24
2.4.7	Phosphatbestimmung
	24
2.4.8	Bestimmung der anorganischen Stickstoffkomponenten
	25
2.4.8.1	Ammoniumbestimmung
	25
2.4.8.2	Nitritbestimmung
	25
2.4.8.3	Nitratbestimmung
	26
2.4.9	Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC)
	26
2.4.10	Ermittlung der Molekulargewichtsverteilung mittels Gelfiltrationschromatographie (GFC)
	27
2.4.11	Nachweis von Kohlenhydraten
	29

2.4.11.1	Summarische Erfassung reduzierender Zucker nach der Nelson-Somogyi-Methode	30
2.4.11.2	Trennung und Identifizierung einzelner Zucker	31
2.4.12	Aktivitätsbestimmung von Endo- β -1,4-Glucanase	31
2.4.13	Nachweis von Proteinen	32
2.4.14	Elementaranalyse mit der Atomemissions-spektroskopie bei Extrakten und Feststoffen	32
2.4.15	Feuchtigkeitsgehalt und Ascherückstand	33
2.4.16	Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS)	33
2.4.17	Gaschromatographische N_2O -Messung	34
2.5	Rasterelektronenmikroskopie	36
2.6	Mikrobiologische Untersuchungen	36
2.6.1	Sterilisation	36
2.6.2	Probennahme	36
2.6.3	Kulturmedien	37
2.6.4	Lebendkeimzahlbestimmung durch Plattieren auf Agar	39
2.6.5	MPN (most probable number)-Test	40
2.6.6	Anreicherungskulturen	40
2.6.7	Reinkulturen	41
2.6.7.1	Stammkulturen	41
2.6.7.2	Vorkulturen	41
2.7	Versuche zur Verwertung von Nitrat und Cellulose	42
2.7.1	Prüfung auf Denitrifikation	42
2.7.2	Prüfung auf Celluloseverwertung	42
2.7.2.1	Walseth-Cellulose (SWC)-Agar	43
2.7.2.2	Filterpapier	43
2.7.2.3	Zuckerlösungen	43
2.7.3	Misch-Kulturen von Bakterien und Pilzen	44
2.8	Taxonomische Untersuchungen	44
2.8.1	Morphologie	44
2.8.2	Beweglichkeit	45
2.8.3	Gram-Tests	45
2.8.3.1	Aminopeptidase-Nachweis	45
2.8.3.2	Nachweis mit dem KOH-Schnelltest	45
2.8.4	Cytochrom-Oxidase-Reaktion	45
2.8.5	Katalase-Reaktion	45
2.8.6	Gelatine-Verflüssigung	45
2.8.7	Fluoreszenz	46

2.8.8	Identifizierung der Bakterien mit dem Sensititre-Identifizierungs-Testsystem	46
3	Ergebnisse	48
3.1	Chemische Analyse der Rinde und der wässrigen Rindenmulchextrakte	48
3.1.1	Chemische Analyse der Fichtenrinde	48
3.1.2	Rindenmulch-Extraktanalysen	54
3.1.2.1	Molekulargewichtsverteilung mittels Gel-filtrationschromatographie (GCF)	55
3.1.2.2	Zuckerbestimmungen	58
3.1.2.3	Ergebnisse der Massenspektrenanalyse (GC-MS)	60
3.2	Denitrifikationsvermögen eines Rindenmulch-Denitrifikationsreaktors	63
3.2.1	Langzeitversuche mit Laborreaktoren bei Raumtemperatur	63
3.2.2	Nitratelimination mit Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren bei konstant niedriger Temperatur	68
3.2.2.1	DOC-Messungen	71
3.2.2.2	Spektrenaufzeichnungen und SAK	72
3.2.2.3	Stickstoffparameter	75
3.2.2.4	pH-Werte und Redoxpotential	80
3.3	Versuche zur Steigerung der Denitrifikationsleistung	84
3.3.1	DOC-Bereitstellung durch Rindenmulch-Teilerneuerung	84
3.3.2	DOC-Bereitstellung durch Ethanol dosierung	87
3.3.3	DOC-Bereitstellung durch Kaskadenschaltung mehrerer Rindenmulchreaktoren	89
3.4	Versuche zur Nachreinigung der Reaktorabläufe im Kiesfilter	93
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Laborversuchen	96
3.6	Nitrat-Elimination in der technischen Denitrifikationsanlage in Aschaffenburg	98
3.6.1	Rindenmulchbecken und Schnellsandfilter	100
3.6.1.1	DOC-Messungen	101
3.6.1.2	Stickstoffparameter	101
3.6.2	Nitratprofil in der Rindenschicht nach Zugabe eines DOC-haltigen Rindeneluats	104
3.6.3	Wassergesättigte und wasserungesättigte Bodenzone	108
3.6.3.1	DOC-Messungen	108

3.6.3.2	Stickstoffparameter	109
3.7	Isolierung von Mikroorganismen aus den Rinden- mulch-Laborreaktoren und Charakterisierung ihrer Eigenschaften in Bezug auf N- und C-Verwertung	112
3.7.1	Keimzahlbestimmungen und Selektionierung von Mikroorganismen	112
3.7.2	Selektion von cellulolytisch aktiven Mikro- organismen	117
3.7.3	Charakterisierung und Identifizierung der isolierten Bakterien	117
3.7.3.1	Stickstoffverwertung	117
3.7.3.2	Celluloseverwertung	120
3.7.3.3	Taxonomische Untersuchungen	122
3.7.4	Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Pilze	130
3.7.4.1	Taxonomische Untersuchungen	130
3.7.4.2	Stickstoffverwertung	131
3.7.4.3	Celluloseverwertung	132
3.7.5	Misch-Kulturen von Bakterien und Pilzen	134
4	Diskussion	135
4.1	Fichtenrindenmulch als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroorganismen	135
4.2	Denitrifikation im Rindenmulchreaktor	139
4.2.1	Nitritbildung	144
4.3	Mikroflora	147
4.4	Pilotanlage Aschaffenburg	150
4.5	Ausblick	153
5	Zusammenfassung	154
6	Verzeichnis der Abbildungen	157
7	Verzeichnis der Tabellen	159
8	Literatur	161

0 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
atro	absolut trocken
BSB	Biochemischer Sauerstoffbedarf
C	Kohlenstoff
CMC	Carboxymethylcellulose
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
d	Tag(e)
DEV	Deutsches Einheitsverfahren
dH	Deutsche Härte
DOC	Dissolved organic carbon = gelöster organischer Kohlenstoff
DSM	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
k_f	Hydraulischer Durchlässigkeitsbeiwert (m/s)
KFA	Forschungszentrum in Jülich
Konz.	Konzentration
l	Liter
Lf	Leitfähigkeit
lutro	lufttrocken
M	Molar
Min	Minute(n)
m	Meter
μ	Mikro
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPN	most probable number
M+R	Medium nach Mandels & Reese (1957)
n	Nano
n.	nach
N	Stickstoff
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar
NNB	Nitrat-Nährbouillon
P	Phosphor
pH	Negativer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
R	Reaktor
Redox	Redoxpotential
REM	Rasterelektronenmikroskop
RiMu	Rindenmulch
RMB	Rindenmulchbecken
s.	siehe
S	Siemens
SAK	Spektraler Absorptionskoeffizient
spec.	Species
SWC	swollen cellulose (Walseth Cellulose)
Tab.	Tabelle
TS	Trockensubstanz
TVO	Trinkwasserverordnung
U	Umdrehung(en)
V	Volumen

1 Einleitung

In der Bundesrepublik Deutschland werden zur Trinkwasserversorgung Quell-, Oberflächen- und Grundwässer genutzt. Den größten Teil stellt mit 63 % das Grundwasser (IWS-Schriftenreihe, 1987). Die Nutzung dieses Potentials ist in den letzten Jahren immer fraglicher geworden, da zahlreiche Wasserwerke seit geraumer Zeit Grundwasser fördern, das den Grenzwert von 50 mg NO_3/l entweder zeitweilig oder permanent überschreitet (Finck, 1987). Das Ziel, keine Schadstoffe in den Grundwasserleiter einzubringen, ist in der heutigen Zeit auf Grund der vorhandenen Agrarstrukturen und ebenso der Luftverschmutzung höchstens längerfristig möglich.

Als Hauptverursacher der Nitratproblematik im Grundwasser gilt die intensive Landwirtschaft, verbunden mit hoher Stickstoffdüngung (Obermann, 1985). So treten hohe Nitratbelastungen in Gebieten mit Intensiv- und Sonderkulturen, ausgeprägt auswaschungsgefährdeten Böden und in Regionen mit konzentrierter Tierhaltung auf (Finck, 1987). Stickstoff wird als Ammoniumstickstoff in Form von organischen Wirtschaftsdüngern oder mineralischen Kunstdüngern auf die Felder gegeben. Je nach Bodenstruktur, Produktionssystem und Klima kommt es zu Stickstoffverlagerungen durch Nitrifikationsprozesse, die das Ammonium zu Nitrat umwandeln. Dieses kann durch mikrobielle Denitrifikation als gasförmiges Endprodukt (N_2 oder N_2O) dem Boden und damit der pflanzlichen Verfügbarkeit entzogen werden. Ebenso kann das sehr mobile NO_3^- -Ion mit Wasser als Transportmittel in die unteren Bodenschichten und somit bis in das Grundwasser verlagert werden.

Zu einem kleinen Teil (ca. 8 % N der gesamten jährlichen Bodenbelastung) gelangt Stickstoff als NO_x über den atmosphärischen Niederschlag in den Boden (Soeder, 1988).

Vor allem die gesundheitliche Gefährdung des Menschen durch inkorporiertes Nitrat und insbesondere dessen Reduktionsprodukt Nitrit machen eine Grenzwert-Festlegung der Nitratkonzentration im Trinkwasser notwendig. Neben der durch Nitrit hervorgerufenen Methämoglobinämie bei Säuglingen (Borneff, 1982; Selenka,

1980) kann es im Körper zur Bildung von kanzerogenen Nitrosaminen kommen (Petri, 1976; Selenka, 1980). Auf Grund der medizinischen Notwendigkeit wurde die Trinkwasserverordnung 1986 novelliert und ein NO_3 -Konzentrationsgrenzwert von 50 mg/l (Richtwert: 25 mg/l) festgelegt.

Die vorrangige Möglichkeit zur Reinerhaltung unseres wichtigsten Lebensmittels ist die Emissionsverminderung durch Beschränkung und Kontrolle der Stickstoffdüngung in der Landwirtschaft. Diese Maßnahmen würden jedoch die bestehenden hohen Nitratkonzentrationen im Grundwasser ad hoc nicht ändern, da eine gewaltige "Nitrataltlast" bestehen bleibt, die es zu entsorgen gilt.

Häufig wird zur Minderung des Nitratgehalts im Trinkwasser nitratreiches mit nitratarmem Wasser verschnitten. In einigen Gebieten steht allerdings nitratarmes Wasser nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Das Verschneiden von Wässern ist in Hessen gesetzlich untersagt und ebenso wie Tiefbrunnenbohrungen und der Anschluß an ein Fernwasserversorgungsnetz keine Lösung, sondern lediglich eine Verschiebung des Nitratproblems.

Eine effektive Nitratentfernung aus dem Trinkwasser ist durch chemisch-physikalische Verfahren, wie Ionenaustausch, Umkehrosmose und Elektrodialyse möglich (Dobias et al., 1985; Rohmann & Sontheimer, 1985). Diese Verfahren sind kaum ionenspezifisch, d.h. neben Nitrat werden dem Wasser auch andere Salze entzogen, so daß eine hochkonzentrierte Salzlösung als Abfallprodukt zurückbleibt, die zu neuen Umweltbelastungen führt und deren Entsorgung kostenintensiv ist.

Selbst das neuartige Verfahren der edelmetallkatalysierten Nitrat-Entfernung weist bei guten Nitrat-Abbauleistungen unerwünschte Nebeneffekte wie hohe Ammoniumbildung auf (Vorlop & Tacke, 1989; Van Hecke et al., 1989).

Seit etwa 10 Jahren werden in Deutschland biotechnologische Verfahren gefördert, bei denen Nitrat mikrobiell zu N_2 abgebaut und somit selektiv und vollständig aus dem Wasser entfernt wird.

Nach Erkennung der Nitratproblematik und dessen Ursachen liegt es in erster Linie bei den Betreibern eines Wasserversorgungsunternehmens, das Trinkwasser nach den Richtlinien der TVO in

einwandfreier Form an die Verbraucher abzugeben und gegebenenfalls Maßnahmen zur kurzfristigen Beseitigung erhöhter Nitratkonzentrationen im Wasser einzuleiten.

Die Stadtwerke Aschaffenburg betreiben ein Wasserwerk mit einer durchschnittlichen Tagesförderung von 25.000-30.000 m³ Grundwasser, dessen Nitratkonzentrationen zwischen 50 und 90 mg/l je nach Förderbrunnen, eine Aufbereitung des Trinkwassers notwendig machen. Ein von Noll & Dietz (1985) entwickeltes biotechnologisches Verfahren zur Entfernung der Nitraten im Trinkwasser mit Hilfe von Fichtenrindenmulch wird im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht. Im Vordergrund stehen vor allem die Frage nach der Effektivität der Rindennutzung im Rahmen des Nitratabbaus und die großtechnische Realisierung dieses Verfahrens.

1.1 Stand der Forschung und Technik

Bevor in Kapitel 1.1.2 verschiedene biotechnologische Verfahren zur Nitratelimination vorgestellt werden, erfolgt zunächst eine kurze Einführung in die Grundlagen der biologischen Nitratreduktion.

1.1.1 Biologische Grundlagen der Nitratreduktion

Im Stickstoffkreislauf der Natur (Abb. 1) wird Nitrat einerseits von Pflanzen und Bakterien als Stickstoffquelle auf dem Weg der assimilatorischen Nitratreduktion, andererseits von Bakterien in Abwesenheit von Sauerstoff als Elektronen- bzw. Wasserstoffakzeptor bei der dissimilatorischen Nitratreduktion genutzt. Der erste Schritt beider Stoffwechselwege ist die Reduktion zu Nitrit. Die assimilatorische Nitratreduktion führt zur intrazellulären Bildung von Ammonium. Je nach Endprodukt der dissimilatorischen NO_3^- -Reduktion (NO_2^- , NH_4^+ oder die gasförmigen N-Produkte N_2O und N_2) unterscheidet man Nitratatmung, Nitratammonifikation und Denitrifikation.

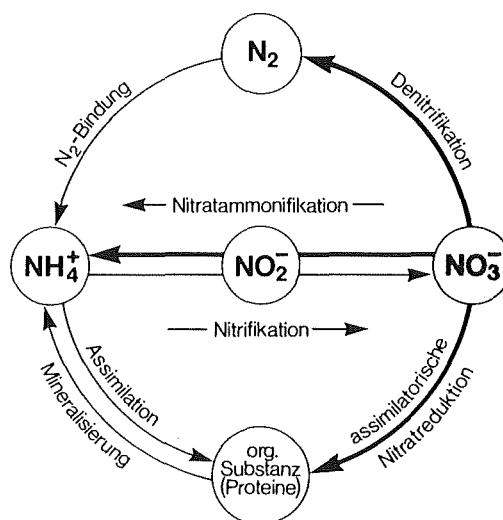


Abb. 1: Stickstoffkreislauf der Natur.
(nach Klemme, 1981)

Die Denitrifikation ist die enzymatische Reduktion von Nitrat (NO_3^-) über Nitrit (NO_2^-) und Stickstoffmonoxid (NO) zu N_2O und N_2 . Sie ermöglicht den denitrifizierenden Bakterien unter anoxischen Bedingungen, d.h. in Abwesenheit von Sauerstoff und in Anwesenheit von Nitrat, einen Energiegewinn über Elektronentransportphosphorylierung. Das dafür notwendige Enzymsystem (Abb. 2) wird erst unter anoxischen Bedingungen und in Gegenwart von Nitrat synthetisiert (Payne, 1981).

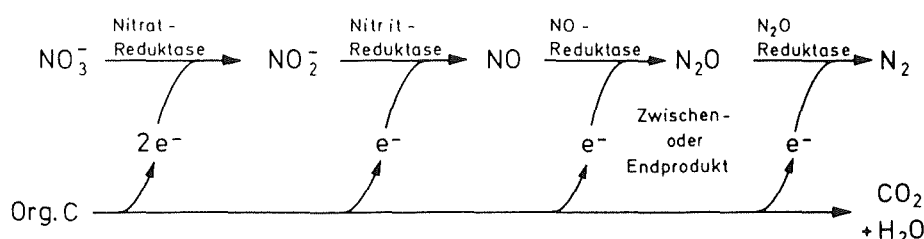


Abb. 2: Schema der enzymkatalysierten Elektronenübertragung bei der Denitrifikation.
(Seiler & Conrad, 1981)

Auf Grund ihres Ernährungstypus unterteilt man zur Denitrifikation befähigte Mikroorganismen in (chemolitho)autotrophe und (chemoorgano)heterotrophe Denitrifikanten. Die Mikroorganismen der ersten Gruppe nutzen anorganische Verbindungen (CO_2 , H_2 , H_2S , Fe^{2+}) als Kohlenstoff- und Wasserstoffquelle, die der zweiten Gruppe decken ihren Energiebedarf aus organischen Verbindungen (Ethanol, Essigsäure u.a.).

Wichtige Einflußgrößen auf Denitrifikationsrate und Endproduktzusammensetzung sind neben der Nitratkonzentration und der Substratart und -zusammensetzung vor allem die Parameter Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration und Verfügbarkeit essentieller Mineralstoffe (insbesondere Phosphor und Eisen) (Christensen, 1977; Dawson & Murphy, 1972; Knowles, 1982; Painter, 1970; Payne, 1981). Ebenso gibt es signifikante Unterschiede in der Rate und Regulation eines jeden Reaktionsschrittes der Denitrifikation in Abhängigkeit von den beteiligten Bakterienstämmen (Carlson & Ingraham, 1983; Yoshinari & Knowles, 1976).

Auf Grund des Fehlens einzelner Enzyme sind nicht alle Denitrifikanten zur vollständigen Denitrifikation ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$) befähigt. So werden in der Literatur zahlreiche Organismen beschrieben, die nur Teilschritte der Denitrifikation durchführen können. In Mischpopulationen sind Denitrifikationsrate und Endproduktzusammensetzung das Ergebnis einer komplexen Wechselwirkung zwischen Mikroflora und Lebensbedingungen.

Die meist ubiquitär vorkommenden denitrifizierenden Bakteriengattungen sind taxonomisch unterschiedlicher Herkunft und in ihrer Biochemie sehr heterogen. In der Literatur werden aus aquatischen Biotopen vor allem Arten der Gattungen *Acinetobacter*, *Alcaligenes* (einschließlich *Achromobacter*), *Bacillus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* und *Thiobacillus* beschrieben (Focht & Verstraete, 1977; Jeter & Ingraham, 1981).

Bei Eukaryonten sind lediglich Teilreaktionen der Denitrifikation bekannt. Einige Vertreter der Pilzgattungen *Fusarium*, *Aspergillus* und *Penicillium* können unter aeroben und anaeroben Bedingungen NO_2^- zu N_2O reduzieren (Bollag & Tung, 1972; Burth & Ottow, 1983; Gunner & Alexander, 1964; Yoshida & Alexander, 1970).

1.1.2 Biotechnologische Denitrifikationsverfahren

Die biotechnologische Nitratelimination wird meist in Festbettreaktoren, die mit feinkörnigen Trägermaterialien (Aktivkohle, Blähton, Koks, Sand, Styroporkugeln u.a.) als Bakterienaufwuchsfläche gefüllt sind, durchgeführt (Roennefahrt, 1982). Unter Zugabe von geeigneten Elektronendonatoren (organische Substanzen, H_2 u.a.) und anderen zum Wachstum benötigten Faktoren sowie unter anoxischen Bedingungen reduzieren Denitrifikanten NO_3^- zu N_2 und anderen gasförmigen Endprodukten (Rohmann & Sontheimer, 1985). Überschüssige Biomasse und eventuell vorhandene Restsubstratmengen machen dabei eine Nachreinigung (Belüftung, Flockung, Filtration, Desinfektion) des denitrifizierten Wassers notwendig.

Zur Zeit werden verschiedene autotrophe und heterotrophe Denitrifikationsverfahren großtechnisch angewendet. Ausführliche Beschreibungen der meisten Verfahren sind bei Rohmann & Sontheimer (1985), Rödelisperger & Rohmann (1989) und bei Müller (1989) nachzulesen.

Bei den autotrophen Verfahren mit Wasserstoff als Elektronendonator seien hier das DENITROPUR-Verfahren mit Sulzer-Mischelementen als Trägermaterial (Rutten, 1989) und die Verfahren im Wirbelschichtreaktor: das Berko-MFT-Verfahren (Hörner & Irmer, 1989) und das NOELL-AQUA KAT D-Verfahren (Noell GmbH Wassertechnik, 1988) genannt. Letzteres arbeitet mit in Ca-Alginat-Perlen eingeschlossenen, selektierten Mikroorganismen (*Paracoccus denitrificans*). Andere Verfahren arbeiten mit elementarem Schwefel als Elektronendonator (Kruithof et al., 1988; Overath et al., 1986).

Bei den heterotrophen Verfahren nutzen das NITRAZUR- und das OTV-(BioDeNit)-Verfahren Blähton als Trägermaterial (Richard & Partos, 1986; Frick & Richard, 1985), beim BIO-NET-Verfahren werden getauchte Rotoren mit Kunststoffnetzen als Aufwuchsfläche angeboten (Norddeutsche Seekabelwerke). Mit 300 m³/h Wasser-Durchsatz ist 1988 in Langenfeld-Monheim die größte Denitrifikationsanlage in Deutschland in Betrieb gegangen. Eingesetzt wurde hier das DENIPOR-Verfahren mit Styropor-Kugeln als Trägermaterial (Roennefahrt, 1989). Verfahren, die eine Rückspülung des Filterbettes vermeiden, sind Wirbelbett-Verfahren (Eppler, 1988) und das AmRoTec-Verfahren, welches durch rotierende Bewegungen des Reaktors einen Selbstreinigungseffekt des granulären Trägerkörpers bewirkt (Overath et al., 1988).

Denitrifikationsverfahren, die den natürlichen Untergrund als Festbett nutzen, können einmal wie das Aktivkohle-Verfahren nur die aerobe Nachbehandlung unterirdisch betreiben (Rödelisperger, 1988), oder aber wie das DENIPLANT-Verfahren (Stengel, 1985) den Boden als Denitrifikationsraum verwenden.

Bei jedem der oben genannten Verfahren, außer dem DENIPLANT-Verfahren, entstehen hohe Kosten durch die zugeführten, meist teuren, organischen Verbindungen (Ethanol, Methanol, Essigsäure), die bei einem Verbleib von Restmengen im denitrifizierten Wasser einer kostenintensiven Nachreinigung bedürfen.

Eine alternative Möglichkeit der biologischen Denitrifikation ist die Nutzung eines festen, mikrobiell abbaubaren Trägermaterials, das sowohl als Aufwuchsfläche für die Mikroorganismen dient als auch die Versorgung der Bakterien mit organischem Substrat als C- und H-Donator gewährleistet. Untersuchungen mit verschiedenen Substanzen, wie Stroh, hydrolysiertes Birkenholz und PVC-Weichgranulat, wurden unter dem Aspekt der biologischen Verwertbarkeit der Trägermaterialien von Müller et al. (1985) und Rauschmaier & Bardtke (1985) durchgeführt.

Das von Noll & Dietz (1985) entwickelte Verfahren mit Fichtenrinde als Trägermaterial wurde, auch im Hinblick auf die notwendige Aufbereitung des denitrifizierten Wassers, schon von Landt (1986) getestet.

Grundlage dieses Rindenmulch-(RiMu)-Verfahrens ist die Doppelfunktion des Rindenmulches als Trägermaterial und Nährstofflieferant für die Bakterien. Damit ist eine kostengünstige Betriebsweise eines solchen Denitrifikationsreaktors verbunden, da selbst ausgesuchter, als praktisch Schadstoff-frei zertifizierter Rindenmulch nur ca. DM 50,-/m³ kostet und die kontinuierliche Zudosierung einer C-Quelle für die Denitrifikanten entfällt.

Die Tauglichkeit der Fichtenrinde im Hinblick auf den Einsatz als Trägermaterial und Elektronendonator in einer Trinkwasser-Denitrifikationsanlage sollte im Auftrag der Stadtwerke Aschaffenburg von der Forschungsgemeinschaft Feige-Soeder-Niedermeyer überprüft werden. Im Rahmen dieses Projektes war es meine Aufgabe, die chemischen und mikrobiologischen Untersuchungen an der RiMu-Anlage durchzuführen. In Laboranlagen wurden schwerpunktmäßig der zeitliche Verlauf der Freisetzung organischer Substanzen aus der Rinde, die chemische Zusammensetzung der Eluate, die Intensität des Nitratabbaus und die ansässige Mikroflora analysiert. In einer Pilotanlage in Aschaffenburg werden seit 1989 Versuche zur Übertragbarkeit der im Labormaßstab gewonnenen Ergebnisse durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen sollten vor allem die Standzeiten der Fichtenrinde in der Denitrifikationsstufe ermittelt und die Nachbehandlungsschritte optimiert werden.

1.1.3 Fichtenrinde als Substrat

In der Bundesrepublik Deutschland fallen jährlich etwa 1,8 Millionen Tonnen Rinde als Abfallprodukt in der Holzwirtschaft an. Davon stammen 65 % von Nadelbäumen (Dix & Marutzky, 1982). Neben der Nutzung als Rohstoff für die Gewinnung von Gerbrinde oder zur Korkgewinnung werden zur Zeit technische Verwertungsmöglichkeiten von Rinden-Massenanfall bei der Papier- und Zellstoffindustrie getestet. So wird Rinde z.B. zur Energieerzeugung verbrannt, als Beimischung zur Herstellung von Faserplatten verwendet, zur physikalischen Bodenverbesserung genutzt und die phenolischen Rindenextrakte für die Produktion von Leimharzen gewonnen (Dix & Marutzky, 1982; Zöttl, 1977; Sachsse, 1965). Bei biotechnologischen Verfahren gewinnt die Rinde ebenfalls immer größere Bedeutung. Sie wird z.B. zur Aufbereitung von Gülle (Schalk, 1988) und in breitem Umfang zur Abluftreinigung (Windsperger, 1988) eingesetzt.

Rinde ist der zwischen Epidermis und Kambium gelegene Teil der Sprosse und Wurzeln höherer Pflanzen. Sie dient der Assimilat-Speicherung und dem -Transport und schützt die Pflanze vor Verletzung und Austrocknung. Beim Dickenwachstum der Pflanze werden primäre Rinde und Epidermis meist gesprengt und durch die sekundäre Rinde (Bast) ersetzt. Diese wird von einem meristematischen Gewebe (Kambium), der Grenze zwischen Holz und Rinde, nach außen abgeschieden.

Bei der sekundären Rinde unterscheidet man in äußere und innere Rinde. Die innere Rinde (Phloem) besitzt parenchymatische Zellen (Rindenstrahlparenchym), Siebzellen und sklerenchymatische Bastfasern. Die äußere Rinde ist durch abgestorbene und kollabierte Siebröhren gekennzeichnet und enthält eine weitere meristematische Schicht, das Korkkambium (Phellogen), die nach außen Korkzellen (Phellem), nach innen unverkorkte Zellen (Phelloderm) abgliedert.

Nach einer gewissen Zeit entsteht in tieferen Rindenschichten ein neues meristematisches Gewebe. Das Gewebe außerhalb des Korkkambiums stirbt ab und wird zur Borke.

Die chemische Zusammensetzung von Rinde weist im Gegensatz zum Holz eine höhere Extraktausbeute, einen höheren Anteil an Mineralstoffen, einen niedrigeren Anteil an Polysacchariden und das Vorhandensein von Polyphenolen und Suberin auf.

In Tabelle 1 sind die chemischen Bestandteile von Fichtenrinde (*Picea abies* Karst.) aufgeführt.

Tab. 1: Chemische Analyse von Fichtenrinde nach Dietrichs et al. (1978) und Scharkow (1938), verändert.
bez. atro Gesamtrinde = bezüglich absolut trockener Gesamtrinde

	% bez. atro Gesamtrinde	
	Dietrichs et al. (1978)	Scharkow (1938)
Lignin	37,8	21,5
Cellulose	47,9	18,8
Polyosen	17,4	22,9
Suberin	n.b.	1,4
Extrakte	21,0	30,5
Asche	2,1	2,3

Lignin ist ein amorphes Mischpolymer aus den Phenylpropan-Grundbausteinen Coniferyl-, p-Cumaryl- und Sinapylalkohol. Die Verknüpfung beginnt mit einer enzymatischen Dehydrogenierung, aus der mesomere freie Radikale hervorgehen, die spontan (ohne enzymatische Steuerung) miteinander reagieren.

Lignine führen durch Einlagerung (Inkrustierung) in die interfibrillären Räume der Zellwände zur Verholzung der Pflanzen. Sie sind diejenigen Pflanzenmassenprodukte, welche biologisch am langsamsten abgebaut werden.

Für den Abbau sind vorwiegend Basidiomyceten, die sogenannten Weißfäule-Pilzen (z.B. *Polyporus*), und einige Bakterien (z.B. *Pseudomonas*) verantwortlich. Die Abbauschritte des Lignins sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisher bekannte Reaktionen sind die Oxidation und oxidative Spaltung der Propylseitenkette, Demethylierung der Methoxylgruppe und Spaltung des aromatischen Ringes.

Cellulose ist ein Polysaccharid aus β -glycosidisch verbundenen Glucose-Einheiten mit einem Polymerisationsgrad bis etwa 1400. Die Cellulose ist in Form von Cellulosefibrillen eine wichtige Gerüstsubstanz der Pflanzen und die am häufigsten in der Natur vorkommende organische Verbindung.

Zur hydrolytischen Spaltung von Cellulose sind einige Bakterien (z.B. *Cellulomonas*, *Bacillus*) und Pilze (z.B. *Fusarium*, *Trichoderma*) befähigt. Die vorwiegend bei Pilzen vorgenommenen Untersuchungen des enzymatischen Cellulose-Abbaus zeigen, daß mindestens drei Enzyme an diesem Prozeß beteiligt sind:

Die Endo- β -1,4-glucanase hydrolysiert das Makromolekül zufallsmäßig in viele Oligosaccharide.

Die Exo- β -1,4-glucanase spaltet Cellobiose- oder Glucose-Einheiten vom nicht-reduzierenden Kettenende der Cellulose ab.

Die β -Glucosidase hydrolysiert Cellobiose zu Glucose.

Gewöhnlich ist Cellulose in Pflanzen mit anderen Polymeren wie Lignin, Hemicellulosen und Pektinen verbunden, wodurch der enzymatische Celluloseabbau gehemmt wird (Binder et al., 1980; Robson & Chambliss, 1989). Für biotechnologische Verfahren wird aus diesem Grund oft Lignin z.B. durch Ozonbehandlung gespalten und die Abbaubarkeit von Cellulose erhöht (Binder et al., 1980; Rehm, 1980).

Hemicellulosen (Polyosen) sind verzweigte Polysaccharid-Ketten mit niedrigeren Polymerisationsgraden als Cellulose. Man unterscheidet je nach dominierender Zuckereinheit Hexosane (z.B. D-Glucane) und Pentosane (z.B. D-Xylane). Meist liegen jedoch Heteroglucane (z.B. Xyloglucane) vor. Der Hauptanteil in Coniferen-Rinde sind Glucomannane und Xylane (Dietrichs et al., 1978).

Suberin ist eine hochpolymere, hydrophobe Substanz, die mit Wachsen in alternierenden Lamellen die Korkschichten auf sekundären Zellwänden bildet (Akkrustierung). Die Verbindung enthält unter anderem veresterte Hydroxyfettsäuren, Dicarbonsäuren und langkettige gesättigte und ungesättigte Fettsäuren.

Extrahierbare Substanzen sind verschiedene chemische Verbindungen, die aus der Rinde mit Wasser oder organischen Lösungsmitteln herausgelöst werden können. Die mit Wasser extrahierbaren Hauptkomponenten sind Kohlenhydrate (Mono- und Polysaccharide, Stärke, Pectine), Proteine, Alkaloide, Tannine, Polyphenole und Mineralstoffe. Die Extraktausbeute bei Fichtenrinde mit kaltem Wasser liegt nach Dietrichs et al. (1978) bei maximal 18 % (bez. auf Gesamtrinde). Bei der Extraktion mit heißem Wasser erhöht sich die Ausbeute auf 30,7 % (Dietrichs et al., 1978) bzw. 27,4 % (Dix & Marutzky, 1983).

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Literaturwerten sind dadurch bedingt, daß die Anteile der Gerüstsubstanzen wie auch der extrahierbaren Stoffe in den inneren und äußeren Rinden und in den Rinden des Stammfußes und der Stammspitze eines Baumes große Schwankungen aufweisen können. Ebenso treten in Bezug auf die Zusammensetzung der Extrakte Abhängigkeiten von Standort, Alter der Bäume und der Jahreszeit, in welcher die Rinde entfernt wurde, auf.

Den Hauptanteil der **Mineralstoffe** in der Rinde stellen Calcium, Kalium und Magnesium.

1.1.4 Ziel der Arbeit

In den letzten 20 Jahren wurde im Trinkwasser der Stadtwerke Aschaffenburg ein steter Anstieg der Nitratkonzentrationen beobachtet. Dies veranlaßte die Verantwortlichen zur Entwicklung eines Trinkwasseraufbereitungskonzepts. Erste Überlegungen zur Denitrifikation in einem Fichtenrindenfilter wurden bereits 1982 von Noll und Dietz entwickelt und führten 1984 zu Feldversuchen in der Kiesgrube Höfling und 1985 zu Laborversuchen, die eine Nachbehandlung des Wassers mit einschlossen (Landt, 1986). In der Kiesgrube Höfling wurden in einem 120 m³ großen Becken unter Einsatz von 70 m³ Rindenmulch bei Aufenthaltszeiten von 10-34 h maximale NO₃⁻-Eliminationsraten von 70 % bzw. durchschnittliche raumspezifische Abbauleistungen von 0,008 kg NO₃⁻-N/m³·d gemessen (Noll, 1989). Nach der Rindenmulchpassage besaß das behandelte Wasser keine Trinkwasserqualität. Erhöhte Ammo-

nium- und Nitritkonzentrationen sowie hohe Werte des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) beeinträchtigten die Wasserqualität erheblich. Die Freisetzung von organischen Kohlenstoffverbindungen aus der Fichtenrinde wurde weder quantifiziert noch analysiert.

In Laboranlagen mit Fichtenrindenmulch sollten chemische und mikrobiologische Untersuchungen die Bestimmung der Denitrifikationsleistung begleiten, wohingegen in der technischen Pilotanlage schwerpunktmäßig die Denitrifikationsraten bestimmt und die Standzeiten der Rindenpackung ermittelt wurden, bzw. werden. Als Nachbehandlungsstufe sollten Kiesfilter zur Simulation einer Untergrundpassage eingesetzt und getestet werden.

Die ersten Untersuchungen zum Thema Denitrifikation von Grundwasser mit Fichtenrinde ließen noch viele Fragen offen (Landt, 1986). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit habe ich versucht das Rindenmulch-Verfahren genauer zu untersuchen, die Vor- und Nachteile und eventuell auftretenden Risiken aufzuzeigen. Dabei wurden folgende Fragenkomplexe bearbeitet:

- Kann Fichtenrindenmulch als Trägermaterial und Substrat für die Mikroorganismen im Denitrifikationsreaktor dienen?
- Wie sind die spezifischen Denitrifikationsleistungen in einem System mit Fichtenrindenmulch?
- Welche organischen Stoffe werden aus der Rinde eluiert, und welche Stoffklassen werden bevorzugt von den Mikroorganismen verwertet?
- Welche Mikroorganismengruppen siedeln sich im Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor an, und welche Funktion üben sie innerhalb des Systems aus?
- Wie ist die großtechnische Umsetzung zu realisieren, und wie ist die Steuerungsmöglichkeit einer solchen Anlage?

2 Material und Methoden

2.1 Aufbau der Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren

2.1.1 Beschreibung der untemperierbaren Laboranlagen

Als Laborreaktoren zur Untersuchung der Denitrifikation von Trinkwasser mit Fichtenrindenmulch dienten für die Versuche R1 und R2 aufrechte, zylindrische Glassäulen mit einem Gesamtfassungsvolumen von 7 l (Tab. 2). Zwei geschlitzte Glasplatten grenzten ein Rindenmulch-Fassungsvolumen von 3,4 l ab. Die Reaktoren wurden über Schlauchpumpen (Fa. Abimed und Watson-Marlow) mit dem zu denitrifizierenden Wasser im Aufstrom beschickt (Abb. 3). Das hierfür verwendete Leitungswasser der KFA Jülich mit einer durchschnittlichen Nitratkonzentration von 32,5 mg/l ($\equiv 7 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$) wurde mit Kaliumnitrat (KNO_3) auf etwa 70 mg $\text{NO}_3\text{-/l}$ ($\equiv 15,8 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$) angereichert, um die Versuchsbedingungen den Aschaffenburgischen Gegebenheiten anzugleichen. Wenn nicht anders beschrieben, wurde die Sauerstoffkonzentration des Zulauf-Wassers durch Ausstrippen mit N_2 -Gas (99,999%, Fa. Linde) reduziert.

Täglich wurde die Temperatur, der pH-Wert, die Leitfähigkeit, das Redoxpotential, die Sauerstoffkonzentration und die Nitratkonzentration im Zu- und Ablauf gemessen. 0,2 μm -filtrierte Proben wurden zur späteren Analyse von NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ und DOC bei -20°C eingefroren.

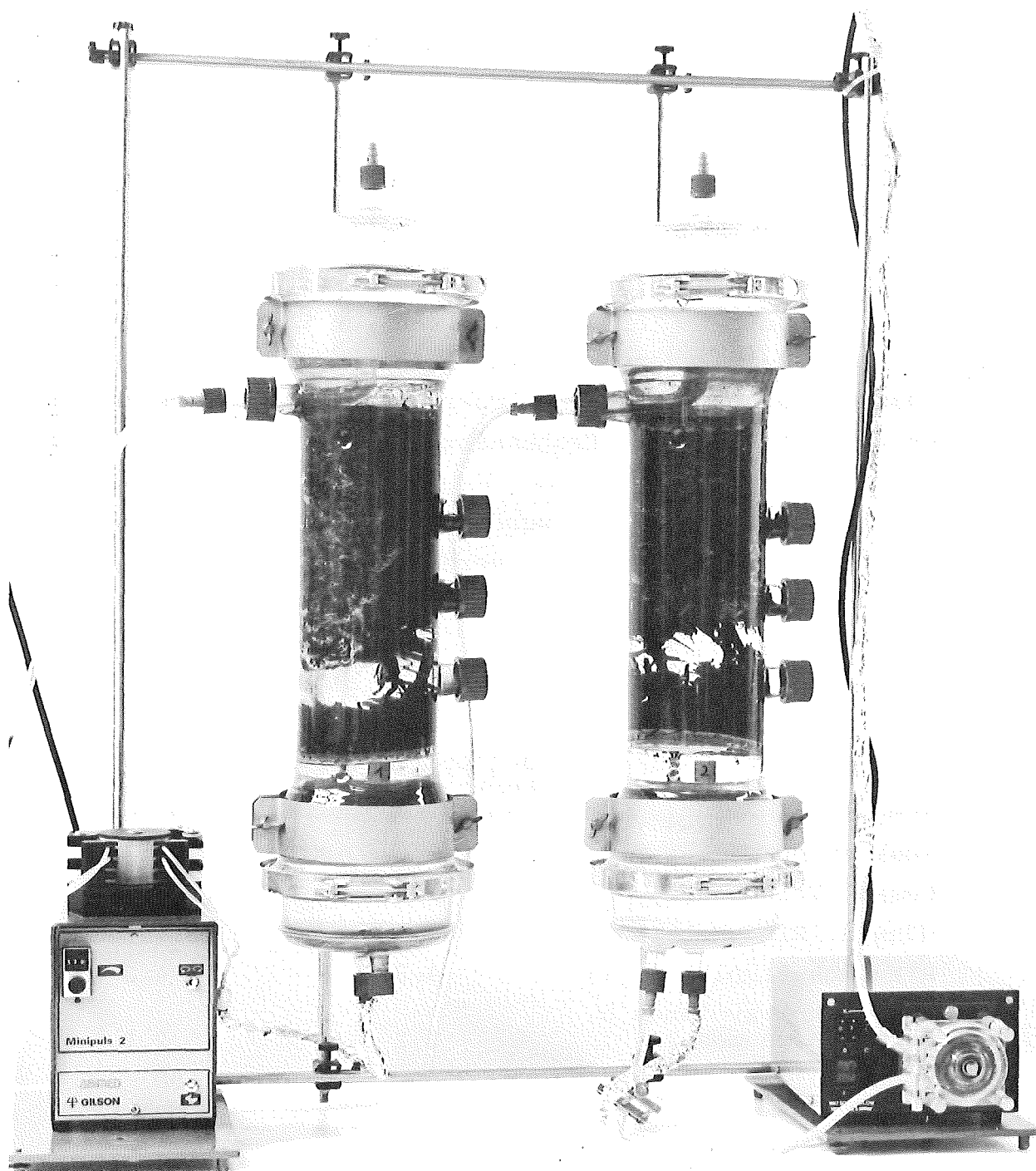


Abb. 3: Zwei Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.
Im linken Reaktor (R1) ist deutlich weißer Pilzbewuchs sichtbar. Während der Versuchsphasen wurden die Reaktoren abgedunkelt.

2.1.2 Beschreibung der temperierbaren Laboranlagen

Für die Untersuchungen der Denitrifikationsleistungen unter realitätsnahen niedrigen Temperaturbedingungen wurden temperierbare Laborreaktoren (R3-R7) eingesetzt. Bei gleichem Innendurchmesser und Rindenmulch-Fassungsvermögen der Glaszylinder betrug das Reaktor-Gesamtvolumen der temperierbaren Reaktoren 5 l (Tab. 2). Durch eine Ummantelung mit Wasser wurde die Betriebstemperatur über ein Kältethermostat (RCS 6-D, Fa. Lauda) auf 10°C eingestellt (Abb. 4). Bei einigen Versuchen wurde der pH-Wert des Zulauf-Wassers mit Hilfe einer pH-gesteuerten HCl(1,5%)-Dosierung auf pH 7 eingeregelt. Die Einstellung der anderen Parameter und die Probennahme erfolgte wie in 2.1.1 beschrieben.

Während der Versuchsphasen wurden sämtliche Gefäße sowie die Zu- und Ableitungen mit Folie verdunkelt, um Algenwachstum zu verhindern.

Tab. 2: Technische Daten der Rindenmulch-Laboranlagen.

	untemperierbare Reaktoren	temperierbare Reaktoren
Reaktor-Durchmesser (mm)	120	120
Gesamt-Volumen (l)	7	5
Höhe d. Rindenschicht (mm)	300	300
RiMu Schüttvolumen (l)	4,3	4,3
Flüssigkeitsvolumen d. Reaktionsraumes (l)	2,2	2,2
Rindenmulch-Einwaage (g)	350	450

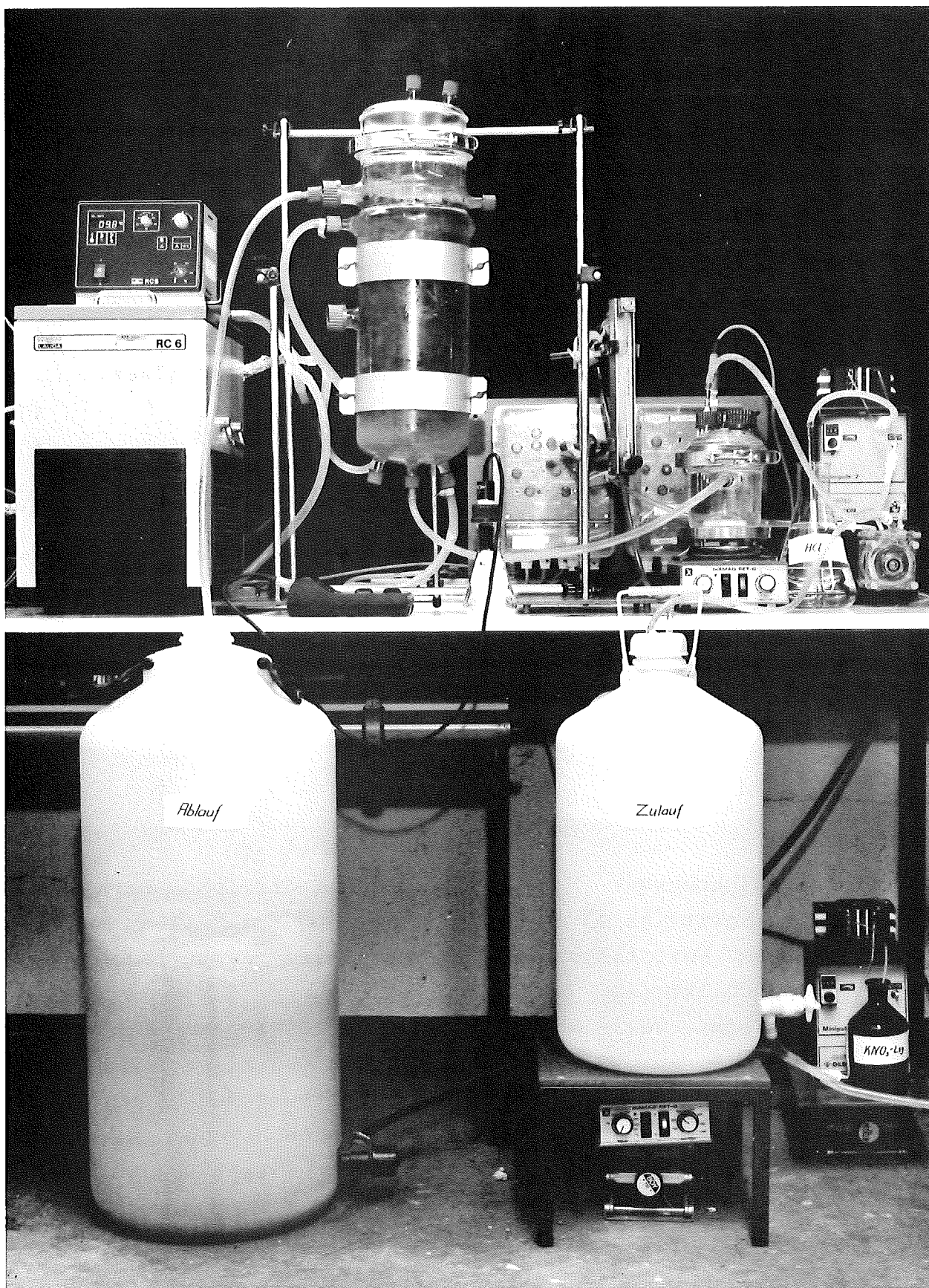


Abb. 4: Laboranlage mit temperierbarem Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor, Kühlgerät, Zu- und Ablaufbehälter und Meß- und Dosiereinrichtungen. Während der Versuchsphasen wurde der Reaktor abgedunkelt.

2.1.3 Beschreibung der technischen Anlage

Zur technischen Erprobung des Rindenmulch-Denitrifikationsverfahrens wurde von den Stadtwerken Aschaffenburg eine Pilotanlage gebaut.

Zur Anlage gehören zwei Rindenmulchbecken, zwei Schnellsandfilter, zwei Spülbehälter (Sammelbecken) und zwei Becken mit Kiesfüllungen, die die Bodenpassage simulieren (Tab. 3).

Tab. 3: Technische Daten der Denitrifikations-Pilotanlage.

Rindenmulchbecken-Volumen (m ³)	210
Rinden-Schüttvolumen (m ³)	200
Beckenvolumen der Schnellsandfilter (m ³)	23
Filterfläche (m ²)	7,8
Sand-Schüttvolumen (m ³)	8,9
Körnung des Filtersandes n. DIN 119623 (mm)	0,71-1,25
Beckenvolumen der Bodenzonen (m ³)	230

Die Rindenmulchbecken (RMB) wurden mit nitratreichem Grundwasser (durchschnittlich 73 mg NO₃⁻/l $\approx$ 16,5 mg NO₃-N/l) aus einem stillgelegten Vertikalbrunnen der Stadtwerke Aschaffenburg im Aufstrom beschickt (Abb. 5 & 6). Dabei gelangte das Wasser über fünf im Boden versenkte, geschlitzte Dränrohre (DN 100, Schlitzbreite 3 mm) in eine 20-30 cm mächtige Kiesschicht, die eine optimale Verteilung über die gesamte Becken-Grundfläche sicherstellte. Nach Durchströmen der Rindenpackung wurde das Wasser an den Becken-Längsseiten über geschlitzte Rohre gesammelt und auf eine Zackenrinne geleitet, um dort im freien Fall auf den offenen Einschicht-Schnellsandfilter (F1) zu gelangen.

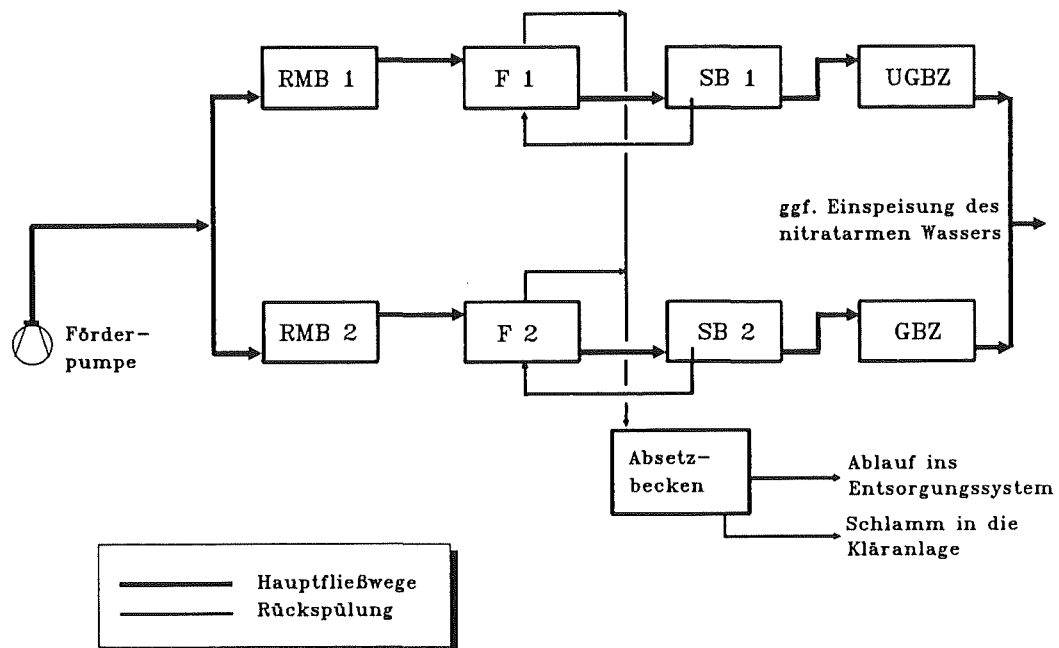


Abb. 5: Funktionsschema der technischen Rindenmulch-Denitrifikationsanlage.

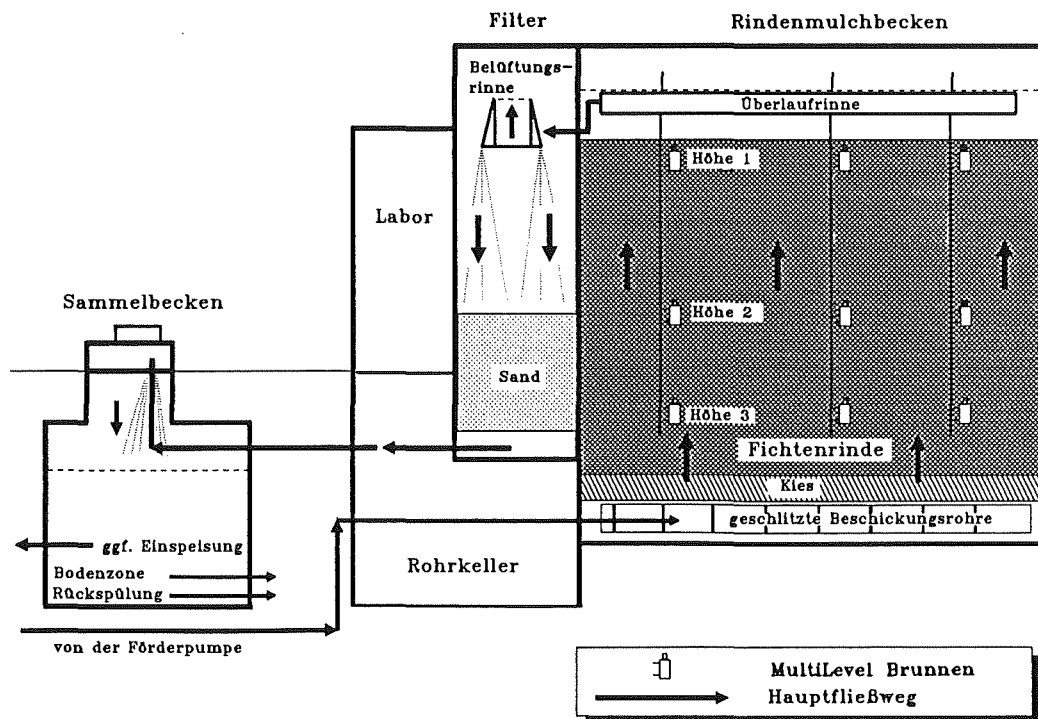


Abb. 6: Schematische Seitenansicht der technischen Rindenmulch-Denitrifikationsanlage.

Aus einem nachgeschalteten Sammelbecken (30 m^3) wurde das Filtrat in die Bodenzonen gepumpt. Die beiden Becken der Bodenzonen, die den natürlichen Untergrund im Aschaffener Raum simulieren sollten und zu diesem Zweck mit Kiesmaterial ($k_f = 5 \cdot 10^{-4} \text{ m/s}$) aus einer benachbarten Kiesgrube gefüllt waren, konnten wahlweise parallel oder in Reihe mit dem denitrifizierten Wasser beschickt werden. Dabei vertrat ein Becken die wasserungesättigte Bodenzone (UGBZ), das heißt einen Bodenbereich, der sowohl Luft als auch Wasser enthält. Dies wurde durch eine Verrieselung des denitrifizierten und filtrierten Wassers über 32 Tropfschläuche auf eine mit *Iris pseudacorus* bepflanzte Fläche gewährleistet. Der Wasserabzug erfolgte flächig über eine Bodendrainage. Das zweite Becken stellte einen Bodenbereich dar, in dem alle zusammenhängenden Hohlräume mit Wasser gefüllt sind, die wassergesättigte Bodenzone (GBZ). Hier wurde das Filtrat-Wasser über fünf vertikal an der Beckenstirnseite eingebaute Sickerschlitzzrohre (DN 150) in die Kiespackung gegeben. Die Entnahme erfolgte auf der Gegenseite ebenfalls über Sickerschlitzzrohre.

Um eine kontinuierliche Überwachung des Rohwassers und der einzelnen Ablaufströme (RMB1, F1, GBZ, UGBZ) zu gewährleisten, wurden Teilströme aus dem Rohrsystem einzeln über zeitschaltuhrgesteuerte Magnetventilschaltung mit Watson-Marlow-Schlauchpumpen zu den Meßgeräten (Dr. Lange Nitrat-Photometer, WTW-Meßzelle für die Temperatur-, O_2 -, pH-Wert, Lf- und Redoxpotential-Bestimmung und Hitachi Photometer zur SAK-Messung) gefördert. Zusätzlich wurden täglich entnommene Wasserproben $0,2 \mu\text{m}$ -filtriert, tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt hinsichtlich ihrer NO_2^- -, NH_4^+ - und DOC-Konzentrationen untersucht. Wöchentlich wurde die Härte und die Säurekapazität des Wassers bestimmt.

Zur Gewinnung von Meßdaten aus der Rindenmulchschicht konnten Wasserproben direkt aus dem Becken an drei verschiedenen Stellen parallel aus jeweils drei verschiedenen Tiefen (1 m, 2 m und 3 m über dem Kiesboden) entnommen werden (Abb. 6). Dazu wurden sogenannte Multilevel-Brunnen (MLB) der Firma Pumpen-

boese in das Becken eingebaut, so daß das Beckenwasser mit einer Saugpumpe aus den verschiedenen Tiefen gefördert werden konnte.

2.2 Probenmaterial

Als Aufwuchsmaterial und Nährstoffquelle für die Denitrifikanten in den Versuchen mit Denitrifikations-Laboranlagen sowie für die chemischen Extraktanalysen wurde Fichtenrindenmulch der Fa. Ewedra (Dezember 1986) verwendet (Tab. 4).

Die Pilotanlage in Aschaffenburg und weitere Laboranlagen wurden mit einer anderen Lieferung Rindenmulch der Fa. Fehring Holzspäne (Oktober 1989) beschickt (Tab. 4). Die angelieferte Fichtenrinde bestand aus zwei sehr unterschiedlichen Chargen (s. 3.1), die jedoch als Mischung genutzt wurden.

Tab. 4: Qualitäts-Definition der Fichtenrinde.

	1. Lieferung	2. Lieferung
Baumart	<i>Picea abies</i> (Karst.)	
Herkunft	Sauerland	
Tolerierbare Baumarten	< 10 %(v/v) von <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Larix ssp.</i> , <i>Abies ssp.</i>	
Partikelgröße	10-40 mm	10-40 mm
Tolerierbarer Feinanteil bis 10 mm	< 10 %(v/v)	< 10 %(v/v)
Degradationsphase	Frischrinde, nach Entrinden ca. vier Wochen abgelagert	
Artfremde Zuschlagstoffe	Keine	Keine
Lieferform	atmungsaktive Polysäcke	loses Schüttgut

In beiden Rindenlieferungen konnten optisch Xylem-(Holz-)stücke (jedoch in geringerer Menge), Teile der inneren und äußeren Rinde wie Kork, Borke und Kambium unterschieden werden. Die erste Charge der zweiten Lieferung war zudem deutlich mit Sandpartikeln verunreinigt (siehe auch 3.1).

2.2.1 Probenvorbereitung für die Laborversuche

Nach Trocknung der feuchten Rinde (ca. 12 % Wassergehalt) wurden die benötigten Mengen für die Versuchsanlagen sowie zur Extraktion und Analyse nach dem Kegel- oder Quadrantenverfahren portioniert (TAPPI T 605). Dieses Verfahren gewährleistet die Entnahme einer repräsentativen Probe.

Für die Untersuchungen der Denitrifikation mit Rindenmulch im Labormaßstab wurde die luftgetrocknete Rinde unverdichtet in die Glasreaktoren (s. 2.1) gegeben.

Zur Gewinnung der Extrakte wurde Rinde in einer Mikroschlagkreuzmühle (Typ Culatti; MFC, Jahnke und Kunkel) auf Partikelgrößen von $< 1,0$ mm gemahlen, da auf Grund der Oberflächenvergrößerung eine schnellere und höhere Extraktausbeute erreicht wird.

2.2.2 Probenvorbereitung für die Pilotanlage

Bei der technischen Anlage in Aschaffenburg (s. 2.1.3) wurde die Rinde feucht in das Becken gefüllt und zusätzlich verdichtet. Ein obenauf befestigter Maschendraht verhinderte das Aufschwimmen der Rinde.

2.3 Gewinnung der Extrakte

Die Versuchsbedingungen für die Kaltwasserextraktionen wurden in Anlehnung an die Standardtestmethoden zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit von Holz (ANSI/ASTM D 1110-56; TAPPI 207 om-81) gewählt. Da bei der Originalmethode eine kleinere Partikelgröße ($< 0,25$ mm) eingesetzt wird, wurde die Einwaage der gröberen Fichtenrinde ($< 1,0$ mm) auf die 5-fache Menge erhöht.

Es wurden 10 g (5 g) des luftgetrockneten Rindenmaterials in einem 600 ml-Becherglas vorsichtig mit 300 ml (30 ml) entionisiertem Wasser überschüttet und anschließend bei $23 \pm 2^\circ\text{C}$ auf einem Magnetrührer 48 Stunden mit ca. 100 U/Min gerührt.

Die Extraktionszeit wurde in einigen Versuchen abgeändert.

Das Wasser-Mulch-Gemisch wurde in einer Ultrazentrifuge (Sorvall) bei 10.000 U/Min ca. 20 Min zentrifugiert und der

Überstand filtriert (0,2 µm Membranfilter, Fa. Sartorius). Um die Beeinflussung der Proben durch die nachweisbaren DOC-Freisetzen aus den Cellulosenitratfiltern auszuschließen, wurden die Filter vor Gebrauch 24 Stunden in entionisiertem Wasser gewaschen.

Die so erhaltenen Extrakte wurden, falls sie nicht unmittelbar analysiert werden konnten, tiefgefroren aufbewahrt.

2.4 Chemisch-physikalische Analysen

2.4.1 Sauerstoff, Temperatur, pH-Wert, Redoxpotential, Leitfähigkeit

Die Messung des gelösten Sauerstoffs und der Temperatur erfolgte mit Hilfe eines Meßfühlers der Fa. Syland (Modell Simplair; Modell Aut-O₂-Control 6000-PPC).

Die pH-Werte wurden mit einer pH-Elektrode (Typ 405-60-57) der Fa. Ingold gemessen.

Die Messung des Redoxpotentials erfolgte mit einer Redox-Meßkette Pt 4805 der Fa. Ingold. Die gemessenen Spannungen wurden auf die Standardwasserstoffelektrode bezogen und dementsprechend umgerechnet.

Die Leitfähigkeit wurde mit einem WTW-Meßgerät LF 91 bestimmt. Eine Reinigung und Kalibrierung der Elektroden erfolgte mindestens einmal wöchentlich.

2.4.2 Messung des spektralen Absorptionskoeffizienten (SAK)

Mit Hilfe des SAK kann die durch gelöste Stoffe hervorgerufene Färbung eines Wassers quantifiziert werden. Die Färbung der Reaktorzu- und -abläufe wurden nach DIN 38404 des DEV (1979) in einem Spektralphotometer, Modell UVIKON 820 der Fa. Kontron, bzw. Hitachi U1100 bei einer Wellenlänge von 254 nm bestimmt.

2.4.3 Spektrenaufzeichnung

Die Absorptionsspektren der Reaktorabläufe wurden zwecks Charakterisierung der löslichen Inhaltsstoffe mit dem Spektralphoto-

tometer der Fa. Kontron (s.o.) in dem Wellenlängenbereich von 190-700 nm aufgezeichnet.

2.4.4 Härtebestimmung

Die Wasserhärte wurde titrimetrisch bestimmt. Dazu wurden 100 ml der Wasserprobe mit 1 ml konzentrierter Ammoniaklösung versetzt und die durch Zugabe einer Tablette Eriochromschwarz-Methylrot-Natriumchlorid rote Lösung mit Titriplex Lösung B (Merck 8420) bis zum Farbumschlag nach grün titriert. Dabei entsprachen 1 ml Titriplex Lsg.=1°dH=10 mg/l CaO.

2.4.5 Bestimmung des Säurebindungsvermögens (m-Wert)

Die Messung des m-Wertes erfolgte durch Titration der Probe mit 0,1N HCl gegen pH 4,3 mit dem Compact Titrator DL 20 der Fa. Mettler. Durch Umrechnung des m-Wertes kann die Menge an gebundenem CO₂ in mg/l ermittelt werden.

2.4.6 Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB)

Der CSB-Wert gibt den Sauerstoffbedarf an, der zur Aufoxidation der meisten gelösten organischen und anorganischen Substanzen in der Wasserprobe notwendig ist. Die CSB-Bestimmung wurde mit Hilfe des Dr. Lange-Küvetten-Tests (LCK 314, Meßbereich 15 - 150 mg/l und LCK 333, Meßbereich 150-1000 mg/l) durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird der Verbrauch von Dichromat-Ionen photometrisch bestimmt, im Gegensatz zur titrimetrischen Messung nach dem DEV (H41 DIN 38409).

2.4.7 Phosphatbestimmung

Das gelöste ortho-Phosphat wurde mit einer kolorimetrischen Methode nach Vogler bestimmt (Schwoerbel, 1980). Das Meßprinzip beruht auf der Reaktion der ortho-Phosphat-Ionen in saurer Lösung mit Molybdat unter Bildung von gelb gefärbter Phosphomolybdänsäure, die durch Reduktionsmittel, z.B. Zinn- oder Antimontartrat, in das Phosphormolybdänblau überführt wird. Die

Intensität der Blaufärbung wurde bei einer Wellenlänge von 690 nm gemessen. Der lineare Meßbereich lag bei 0,25-5,0 mg/l $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$.

2.4.8 Bestimmung der anorganischen Stickstoffkomponenten

Zur Bestimmung der Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentrationen in den Wasserproben wurden zwei Meßsysteme benutzt. Neben einem Autoanalyser der Fa. Cenco wurde der Flow-Injection-Analyser der Fa. Tecator verwendet.

2.4.8.1 Ammoniumbestimmung

Die Ammoniumkonzentration wird bei der Flow-Injection-Analyse mittels Gasdiffusion bestimmt. Dabei wird die Probe automatisch mit NaOH vermischt und in einer Gasdiffusionszelle entlang einer PTFE-Membran geleitet. Das entstandene Ammoniak (NH_3) diffundiert durch die Membran und färbt quantitativ einen Indikatorstrom. Detektiert wird dieser photometrisch bei 590 nm. Die Eigenfärbung der Probensuspension hatte nachweislich keinen Einfluß auf die Messung.

Im Autoanalyser wird Ammonium kolorimetrisch bestimmt. Bei Einwirkung von Hypochlorid-Ionen (Natriumdichlorcyanurat) auf Ammoniak in wässriger Lösung entstehen durch Substitutionsreaktionen Chloramine, die bei Anwesenheit eines Katalysators (Na-Nitroprussit) im alkalischen Bereich mit Phenolen (Natrium-salicylat) tief blau gefärbte Indophenole bilden, deren Absorption bei 660 nm photometrisch detektiert wurden. Der lineare Meßbereich lag zwischen 0-10 mg/l $\text{NH}_4\text{-N}$.

2.4.8.2 Nitritbestimmung

Im Flow-Injektion-Analyser wird Nitrit photometrisch mittels Sulfanilamid und N(1-Naphtyl)-ethyldiamindihydrochlorid bestimmt. In saurer Lösung reagieren Nitrit-Ionen mit primären Aminen zu Diazoniumsalzen, die mit aromatischen und Amino- oder Hydroxylgruppen-haltigen Verbindungen intensiv gefärbte Azoverbindungen eingehen. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge

von 540 nm photometrisch gemessen.

Der Chemismus der Nitritmessung im Autoanalyser entspricht der oben genannten Nitritbestimmung. Der lineare Meßbereich lag zwischen 0-1 mg/l $\text{NO}_2\text{-N}$.

2.4.8.3 Nitratbestimmung

Im Flow-Injection-Analyser wird Nitrat kolorimetrisch als Nitrit nach Passage einer Cd-Reduktorsäule bestimmt. Durch Differenzrechnung mit der $\text{NO}_2\text{-N}$ -Konzentration ergibt sich die $\text{NO}_3\text{-N}$ -Konzentration.

Im Autoanalyzersystem wird Nitrat im alkalischen Milieu mit Hydrazinsulfat zu Nitrit reduziert und wie unter 2.4.8.2 beschrieben analysiert.

Darüberhinaus wurde Nitrat täglich über die UV-Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 205 nm im Hitachi-Spektralphotometer (Modell 100-10), bzw. kontinuierlich im Dr. Lange Nitratprozeß-Photometer ermittelt. Dabei erforderte die anfänglich starke Gelbfärbung des Reaktorablaufs eine Behandlung mit pulverisierter Aktivkohle (Fa. Merck).

2.4.9 Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC)

Der DOC (dissolved organic carbon) in den Flüssigproben wurde mit einem Dohrmann Carbon Analyser der Fa. Xertex bestimmt.

Zur Entfernung des anorganischen Kohlenstoffs wurden die filtrierten Wasserproben (0,2 μm -Filter) mit konzentrierter Schwefelsäure angesäuert (pH 2-3) und das entstehende CO_2 mit Sauerstoff ausgestrippt. Der Kohlenstoff der gelösten organischen Substanzen wurde durch UV-Oxidation aufgeschlossen. Das gebildete CO_2 wurde mit CO_2 -freier Luft ausgetrieben und Infrarotspektroskopisch gemessen. Mittels Integrator wurde die Extinktion bei den jeweiligen Proben auf den durch eine Einpunkteichung mit Kaliumhydrogenphthalat ermittelten Bezugswert berechnet und als mg C/l ausgedruckt. Im Meßbereich 1-160 mg/l C wurden maximale Abweichungen von 20 %, im Meßbereich 10-800 mg/l C von 8 % ermittelt.

2.4.10 Ermittlung der Molekulargewichtsverteilung mittels Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Dieses säulenchromatographische Verfahren ermöglicht eine Fraktionierung von gelösten Wasserinhaltsstoffen nach ihren Molekülgrößen bzw. den im allgemeinen proportionalen Molekulargewichten.

Eine definierte Probenmenge wird mit einem Elutionsmittel auf die Säule bzw. das Gelbett gegeben. Das Trennprinzip beruht darauf, daß Moleküle, die größer sind als die größten Poren innerhalb der Gelpartikel, an diesen vorbeitransportiert werden, während kleinere Partikel in das Gel eindringen und dort unterschiedlich lange verweilen. Große Moleküle werden also zuerst eluiert, die kleinsten zuletzt (Determann, 1967).

Zur Trennung wurde ein hydrophiles, synthetisches Gel (Fractogel TSK HW-40 (S), Fa. Merck) eingesetzt. Der als Elutionsmittel verwendete Phosphatpuffer wurde mit einer Geschwindigkeit von 14 ml/h über die Säule ($d_1 = 1,7$ cm, $H = 120$ cm) gepumpt. In den Pufferstrom wurde ein Probevolumen von 1 ml injiziert. Das Eluat floß durch ein Refraktometer, das den Brechungsindex mißt, und anschließend in einen Fraktionssammler (Vorschub ein Glas pro 12 Minuten). Auf Grund der Empfindlichkeit des Refraktometers gegenüber Änderungen der Salzkonzentration wurde der Salzgehalt der aufgegebenen Extraktproben zuvor dem des verwendeten Phosphatpuffers durch Zugabe von Phosphatsalzen angeglichen.

In allen Fraktionen wurde zusätzlich die DOC-Konzentration bestimmt, da besonders die Molekulargewichtsverteilung der kohlenstoffhaltigen Verbindungen von Interesse war. Auf diese Weise konnten außerdem die durch Salze hervorgerufenen Signale des Refraktometers ermittelt und von denen der organischen Substanzen unterschieden werden. Bei der Auswertung wurden beide Detektionsmethoden, Brechungsindex- und DOC-Messungen, verwendet.

Zur Eichung der Säule wurden Standardlösungen mit Methanol, Glycerin, Glucose, Maltose und Polyethylenglykol der Molekulargewichte 1.000, 1.550 und 4.000 hergestellt (Abb. 7 & 8).

Eichlösung: je 1 g der o.g. Substanzen ad. 100 ml der Phosphatpufferlösung + Dextran Blau

Phosphatpufferlösung: 20,5 g $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ und 8,5 g KH_2PO_4 pro Liter Aqua dest.

Der hochmolekulare Farbstoff Dextran Blau markierte die Front (bzw. Ausschlußgrenze).

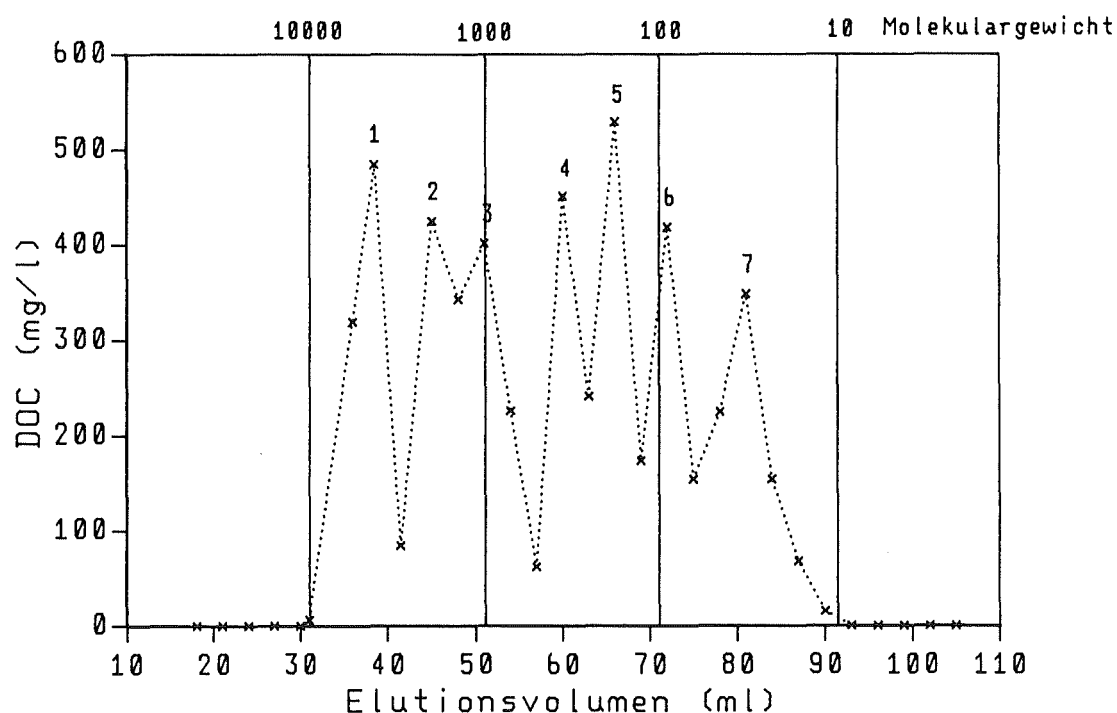


Abb. 7: DOC-Elutionsdiagramm der Standard-Eichlösungen bei der Molekulargewichtstrennung.

Peak	Eichsubstanz	Molekulargewicht
1	Polyethylenglykol 4000	3300 - 3700
2	Polyethylenglykol 1550	1350 - 1750
3	Polyethylenglykol 1000	950 - 1050
4	Maltose	360
5	Glucose	180
6	Glycerin	92
7	Methanol	32

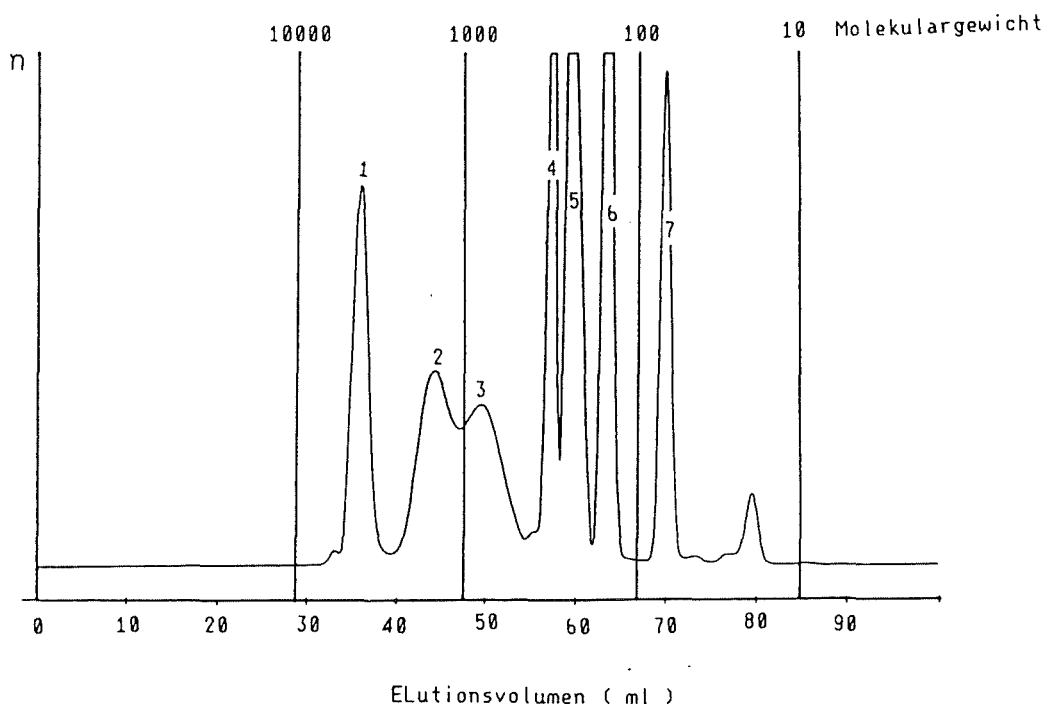


Abb. 8: Refraktometer-Elutionsdiagramm der Standard-Eichlösungen bei der Molekulargewichtstrennung.

Peak	Eichsubstanz	Molekulargewicht
1	Polyethylenglykol 4000	3300 - 3700
2	Polyethylenglykol 1550	1350 - 1750
3	Polyethylenglykol 1000	950 - 1050
4	Maltose	360
5	Glucose	180
6	Glycerin	92
7	Methanol	32

Die unterschiedliche Lage der Peaks in den beiden Elutionsdiagrammen ist darauf zurückzuführen, daß die refraktometrischen Messungen kontinuierlich, die DOC-Messungen diskontinuierlich (in den einzelnen Fraktionen) durchgeführt wurden.

2.4.11 Nachweis von Kohlenhydraten

Es wurde zunächst der Gehalt an reduzierenden Zuckern in den Rindenextrakten summarisch nach der Nelson-Somogyi-Methode bestimmt. Anschließend erfolgte in Proben mit ausreichenden Zuckergehalten die qualitative und quantitative Untersuchung der Einzelzuckerkomponenten.

2.4.11.1 Summarische Erfassung reduzierender Zucker nach der Nelson-Somogyi-Methode

Bei dieser Methode (Nelson, 1944) wird die reduzierende Eigenschaft von Zuckern ausgenutzt. Es liegt eine Redoxreaktion zugrunde, bei der die in der Aldehydform vorliegenden Zucker oxidiert und Kupfer-II zu Kupfer-I reduziert werden. Molybdän disproportioniert und bildet mit Arsen einen gefärbten Komplex. Die Messung erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 520 nm.

Reagenzien:

1. Kupfer-A-Reagenz: 25 g Na_2CO_3
 25 g $\text{KNa C}_4\text{H}_6\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$
 20 g NaHCO_3
 200 g Na_2SO_4 wurden nacheinander in
 1 Liter Aqua dest. gelöst. Die Lösung soll bei Temperaturen
 über 20°C aufbewahrt werden.
2. Kupfer-B-Reagenz: 15 Gew.-%ige $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung,
 der 1-2 Tropfen H_2SO_4 (konz.) pro
 100 ml zugegeben wurden.
3. Arsen-Molybdat-
 Reagenz: 25 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$
 wurden in 450 ml Aqua dest. gelöst und
 21 ml H_2SO_4 (konz.) unter Rühren zugeben. 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times$
 $7\text{H}_2\text{O}$ wurden in 25 ml Aqua dest. gelöst und ebenfalls zuge-
 geben. Die Lösung wurde 24-48 h bei 37°C inkubiert und in
 einer braunen Glasflasche aufbewahrt.

Durchführung:

Lösung 1 (A) und 2 (B) wurden kurz vor Gebrauch im Verhältnis 25 Teile A + 1 Teil B gemischt. 1 ml (0,2 ml) Kupfer-(A+B)-Lösung wurde mit 0,5 ml (0,2 ml) Probelösung bzw. Glucoselösung (zur Eichung) gemischt und 40 Min im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen im Eisbad wurde 1 ml (0,2 ml) Lösung 3 zugegeben und gemischt. Die Lösung wurde mit 10 ml (5 ml) Aqua dest. verdünnt und die Extinktion bei 546 (520) nm innerhalb von 15 bis 40 Minuten im Photometer (Uvikon 820, Fa. Kontron) in 1 cm-Küvetten gemessen.

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Eine Eichkurve wurde mit Glucose erstellt.

Durch Glucose-Additionsversuche wurde sichergestellt, daß sich

die Eigenfärbung der Extraktproben nicht störend auf die photometrische Messung auswirkte.

Bei der Bestimmung der Carboxymethylcellulase-Aktivität wurde der 5 ml-Testansatz 20 Min bei 4100g zentrifugiert, um das nicht umgesetzte Substrat (CMC) zu entfernen.

2.4.11.2 Trennung und Identifizierung einzelner Zucker

Die Bestimmung von monomeren und oligomeren reduzierenden Zuckern in den Rindenextrakten und ihren Hydrolysaten wurde mit einem Zuckeranalysator der Fa. Biotronik (System LC 2000) nach der Kupfer-bi-Cinchoninat-Methode durchgeführt.

Die Zucker und Polyalkohole bilden mit Borat unterschiedlich stark negativ geladene Komplexe, deren Stabilität und Ladung von der räumlichen Orientierung der OH-Gruppen abhängen.

Die Trennung erfolgte an einem stark basischen Anionenaustauscher (Aminex A27) in Boratform. In einem Heizbad reagierten die mit verschiedenen stark basischen Boratpufferlösungen eluierten Zucker mit dem Reagenz Kupfer-bi-Cinchoninat. Durch Oxidation der Zuckerboratkomplexe wird Kupfer-II zu Kupfer-I reduziert und bildet einen gefärbten Kupfer-I-Komplex.

Die Detektion erfolgt über photometrische Messung bei 570 nm (Bauer, 1975).

Zur Eichung wurden Trennungen mit einem Zuckergemisch aus neun Zuckern (Desoxy-D-Ribose, Cellobiose, Maltose, D-Ribose, D-Mannose, L-Arabinose, D-Galaktose, D-Xylose, D-Glucose) durchgeführt.

Verschiedene Rindenmulchextrakte wurden unverändert und nach Hydrolyse mit HCl (2 M Endkonzentration in der Probe, 1 Stunde gekocht, mit NaHCO₃ neutralisiert) getrennt. Hydrolyseniederschläge wurden abzentrifugiert.

2.4.12 Aktivitätsbestimmung von Endo- β -1,4-Glucanase

Zum Nachweis cellulolytischer Aktivität bei Cellulose-Verwertungstests in Flüssigkulturen wurde Kulturfiltrat mit Carboxy-

methylcellulose (CMC) versetzt und anhand der freigesetzten Zucker die Aktivität von Endo- β -1,4-Glucanasen (Carboxymethylcellulasen) bestimmt, die unspezifisch β -1,4-glykosidische Bindungen der Cellulose hydrolysieren. Eine Einheit (nkat/ml) ist die Enzymaktivität in einen ml Kulturfiltrat, die pro Sekunde bei 40°C und pH 4,8 aus CMC 1 nmol Glucoseäquivalente freisetzt.

Reagenzien:

1 %ige Lösung von Carboxymethylcellulose (Polymerisationsgrad 500-525, Methylierungsgrad 7 %; Serva) in 0,05 m Na-Citrat-Puffer (pH 4,8).

Durchführung:

0,5 ml Kulturfiltrat und 1,0 ml 1 %ige CMC wurden gemischt und 60 Min bei 40°C im Wasserbad inkubiert, wobei jeweils Doppelansätze durchgeführt wurden. Nach Abstoppen der Reaktion im Eisbad erfolgte mit 0,2 ml Ansatz eine Zuckerbestimmung nach Nelson (2.4.11.1). Der Gehalt an reduzierenden Zuckern im Kulturfiltrat wurde ebenfalls bestimmt und als "Leerwert" von dem Gehalt im Testansatz subtrahiert.

2.4.13 Nachweis von Proteinen

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer Methode von Bradford (1976).

Reagenzien:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva) wurden in 50 ml 95 %igem Ethanol gelöst. Nach Hinzufügen von 100 ml 85 %igem H_3PO_4 wurde die Lösung auf 1 l Aqua dest. aufgefüllt.

0,1 ml Probe und 1 ml Reagenz wurden gut vermischt und nach 30 Min die Extinktion bei 595 nm gemessen. Eine Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt.

2.4.14 Elementaranalyse mit der Atomemissionsspektroskopie bei Extrakten und Feststoffen

Mit der Methode der Atomemissionsspektroskopie (mit induktiv gekoppeltem Plasma, AES-ICP) können verhältnismäßig schnell

viele Elemente nebeneinander nachgewiesen werden.

Bei der AES konnten die Extrakte direkt, die Feststoffproben erst nach Überführung in die lösliche Form (Aufschluß mit 65 %iger Salpeter- und 70 %iger Perchlorsäure und Lithium-Borat-Aufschluß des säureunlöslichen Teils) analysiert werden. Der relative Fehler betrug bei Gehalten $>1000 \text{ mg/l} \pm 5 \%$, bei $100-1000 \text{ mg/l} \pm 10 \%$ und bei $<100 \text{ mg/l} \pm 20 \%$.

Die CHN-Analyse wurde mit einem CHN-Analyser der Fa. Perkin-Elmer (240B), nur bei den Feststoffproben, durchgeführt. Die Analysengenauigkeit betrug bei einer Mindestprobenmenge von 1 mg TS $\pm 0,1 \%$.

Die Bestimmungen wurden von der Zentralabteilung für Chemische Analysen der KFA Jülich durchgeführt.

2.4.15 Feuchtigkeitsgehalt und Ascherückstand

Zur Bestimmung des Ascherückstands der Mulchproben wurde nach der Standardtestmethode TAPPI 211 om-80 "Ash in Wood and Pulp" gearbeitet.

Der Aschegehalt, als Näherungsmaß des Gehaltes an Mineralsalzen und anderen anorganischen Substanzen in der Rinde, wurde nach der flammenlosen Verbrennung der Testmaterialien in einem Muffel-Ofen bei $575 \pm 25^\circ\text{C}$ bestimmt.

Der Feuchtigkeitsgehalt des Rindenmulches wurde durch Trocknung einer eingewogenen Menge des Materials bei $105 \pm 3^\circ\text{C}$ bis zur Gewichtskonstanz und Wägung nach Abkühlen im Exsikkator ermittelt.

2.4.16 Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS)

Die Kopplung von Gaschromatographie (GC) und Massenspektroskopie (MS) ermöglicht eine Strukturidentifizierung der im Gaschromatographen in Fraktionen zerlegten Untersuchungsgemische. Es wurde ein Gerät der Fa. Kratos, Typ MS 25, benutzt.

GC-Bedingungen:

Trägergas: Helium, 1 ml/Min

Detektortemperatur: 240°C

Injektortemperatur: 230°C

Temperaturprogramm: 50-240°C

Aufheizrate 10°C/Min

Es wurden zwei verschiedene Säulen eingesetzt. Bei einer Säule (CP SIL 5, 26 m, d_i 0,32 mm, Filmdicke 0,12 μ m) wurden die wässrigen Proben direkt aufgegeben, so daß auch flüchtige Stoffe mit auf die Säule gelangen konnten.

Um nachweisbare Mengen an detektierbaren Stoffen zu erhalten, war eine Aufkonzentrierung der Proben erforderlich. Dazu wurden 120 ml eines 1-Stundenextraktes bzw. 200 ml Reaktorablauf mit HCl auf pH 2 eingestellt und am Vakuumrotationsverdampfer auf 10 ml eingedampft. Von dieser Lösung wurde 1 μ l (Split 1/20) aufgetragen.

Die zweite benutzte Säule (CP-WAX-52 CB, 25 m, d_i 0,32 mm, Filmdicke 0,2 μ m) war im Vergleich zur ersten unpolarer, so daß die wässrigen Proben vor Aufgabe derivatisiert werden mußten. 100 ml Probe (pH 2 mit HCl) wurden erst mit 8 ml, dann zweimal mit 3 ml Essigsäureethylester ausgeschüttelt, das Lösungsmittel fast vollständig abgeblasen und der Rückstand mit 50 μ l eines Silanisierungsmittels (MSTFA) versetzt. 1 μ l dieser Lösung wurde aufgetragen (Split 1/20).

MS-Bedingungen:

Ionisationsenergie: 70 eV

Ionisationstemperatur: 200°C

Massenbereich: 30-600

2.4.17 Gaschromatographische N₂O-Messung

Zur Bestimmung von N₂O wurde ein Gaschromatograph der Fa. Hewlett Packard (Modell 5750 G) mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor eingesetzt. Dem Gaschromatographen war eine modifizierte Warburgapparatur vorgeschaltet (Hajirezai, 1989), deren Reaktionsgefäße direkt mit dem GC verbunden waren. Das im Reaktionsgefäß entstandene Gas wurde mit dem Trägergas (Helium, 5.6, Fa. Linde) ausgestrippt und in einer U-förmigen Vorsäule mit Flüs-

sigstickstoff ausgefroren. Durch Erwärmen wurde das Gas pfropfenartig auf die Säule gegeben und detektiert.

Vorsäule:

Material: V₄A Edelstahl
 Länge: 20 cm
 Durchmesser: 1/8 inch
 Füllung: Glasperlen 45-60 mesh
 Einfrieren mit Flüssigstickstoff (-196°C): 15 Min
 Auftauen mit heißem Wasser: (80°C): 1 Min
 Trennsäule für N₂O:

1 Meßsäule, 1 Bezugssäule

Material: V₄A Edelstahl
 Länge: 2,5 m
 Durchmesser: 1/8 inch
 Füllung: Porapak Q 100-120 mesh (Fa. Milipore Waters Chromatography Division)

Trärgasströmung: 14 ml/Min

Filamentstrom: 150 mA

Da die Eichgerade im erwarteten Konzentrationsbereich linear war, wurde eine Einpunkteichung mit 100 µl N₂O-gesättigtem Wasser vor der Messung durchgeführt.

Als direkter Nachweis der Denitrifikation gilt die Blockierung der vollständigen Nitratreduktion mit Acetylen (Yoshinari & Knowles, 1976). Acetylen hemmt spezifisch den Reduktionsschritt vom N₂O zum N₂ aller bisher untersuchten Denitrifikanten, ohne die Denitrifikationsrate signifikant zu beeinflussen (Payne, 1981). In vitro erfolgt bei 1 %(v/v) Acetylen eine stöchiometrische Umwandlung von Nitrat zu Lachgas (N₂O) (Yoshinari et al., 1977), welches gaschromatographisch gut erfaßbar ist.

Neben den Bakterienreinkulturen (NNB-Flüssigmedium, 1-2 Tage bei 30°C), von denen 2 ml in 43 ml Phosphatpuffer (6,3 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O & 4,2 mM KH₂PO₄, pH 7,2) und 5 ml 1 mM KNO₃-Lösung inkubiert wurden, wurden auch Rindenstückchen (4,5 g) direkt dem Laborreaktor entnommen und mit Reaktorwasser bzw. Rin-

denmulchextraktlösung (40 ml) unter Zugabe von 5 ml KNO_3 -Lösung (s.o.) in die Reaktionskolben gegeben. Nach 90 Min Inkubation bei 37°C wurde die in den Reaktionskolben entstandene N_2O -Konzentration bestimmt. Im Anschluß daran wurde jedem Kolben 0,5 ml acetylengesättigtes Aqua dest. gasdicht zugesetzt und 90 Min später das nach der Blockade entstandene N_2O gaschromatographisch bestimmt.

2.5 Rasterelektronenmikroskopie

Zur optischen Beurteilung des Rindenbewuchses wurden rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Rindenstückchen aus den Laborreaktoren durchgeführt. Die Proben wurden mit Glutar-dialdehyd fixiert, in einer aufsteigenden Ethanol-Wasserreihe entwässert und nach einer Kritischen-Punkt-Trocknung in einer Gasionisationskammer durch Kathodenzerstäubung (Sputtergerät SCD 040, Fa. Balzers Union) mit Gold beschichtet. Die Untersuchungen wurden an einem Rasterelektronenmikroskop (Leitz AMP 1600T) in der KFA Jülich durchgeführt.

2.6 Mikrobiologische Untersuchungen

2.6.1 Sterilisation

Alle autoklavierbaren Geräte und Medien wurden 20 Min bei 121°C und 1 Atm Druck in einem Autoklaven sterilisiert. Nicht autoklavierbare Medien wurden sterilfiltriert ($0,2\ \mu\text{m}$ Cellulosenitratfilter, Fa. Sartorius). Die sterilen Arbeiten erfolgten unter einer Clean-Bench.

2.6.2 Probennahme

Die Probennahmen wurden mit sterilen Geräten durchgeführt, und die Weiterverarbeitung erfolgte unter der Clean-Bench.

Die Rindenmulchstückchen wurden während der kontinuierlichen Versuche aus dem oberen Drittel der Reaktoren entnommen.

Die Flüssigproben wurden aus dem Reaktorwasser über der Schlitzplatte (2.1.1) entnommen.

2.6.3 Kulturmedien

Zur selektiven Erfassung von Denitrifikantenpopulationen und Pilzen aus den Laboranlagen dienten folgende Medien:

Nitrat-Nährbouillon (NNB) n. Focht & Joseph (1973)

Fleischextrakt	3 g/l
Pepton	5 g/l
KNO ₃	5 g/l
pH 7,2	

Mineralmedium n. Fabig & Ottow (1979)

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,8 g/l
KNO ₃	6,0 g/l
NH ₄ Cl	1,0 g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g/l
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,001 g/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,001 g/l
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,001 g/l
Mn(II)-sulfat · 1 H ₂ O	0,001 g/l
Fe(III)-citrat	0,002 g/l
Na-acetat	2,0 g/l
pH 7,2	

Zum Nachweis von mikrobieller Nitrit-Verwertung wurde das NNB-Medium verändert:

Nitrit-NB-Medium

Fleischextrakt	3 g/l
Pepton	5 g/l
NaNO ₂	2,4 g/l
pH 7,0	

NNB-Agar

Fleischextrakt	3 g/l
Pepton	5 g/l
KNO ₃	5 g/l
Agar-Agar	13 g/l

Nähragar

Pepton	5 g/l
Fleischextrakt	3 g/l
Agar-Agar	12 g/l

Cetrimid-Agar

Pepton aus Gelatine	20	g/l
Magnesiumchlorid	1,4	g/l
Kaliumsulfat	10	g/l
N-Cetyl-N,N,N-trimethyl- ammoniumbromid	0,3	g/l
Agar-Agar	13,6	g/l

44,5 g/l des Fertigmediums werden in Aqua dest. gelöst und mit
10 ml/l Glycerin (Merck Art. 4091) versetzt.
pH 7,2 ± 0,2

Gelatine-Medium

Fleischextrakt	3	g/l
Pepton	5	g/l
Gelatine	120	g/l

pH 7,0

HA-Medium n. Fähnrich & Irrgang (1981)

Hefeextrakt	4	g/l
Malzextrakt	10	g/l
Glucose	4	g/l
Agar-Agar	25	g/l

pH 6,6

M+R-Mineralmedium n. Mandels & Reese (1957), verändert

KH ₂ PO ₄	2	g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4	g/l
KNO ₃	5	g/l
MgSO ₄	0,3	g/l
CaCl ₂	0,4	g/l
FeSO ₄	0,005	g/l
MnSO ₄	0,0016	g/l
ZnSO ₄	0,0014	g/l
CoSO ₄	0,0037	g/l
Hefeextrakt	0,5	g/l
Na ₂ MoO ₄	0,001	g/l
Agar-Agar (tw.)	25	g/l

pH 6,5

Als C-Quelle wurde je nach Versuch eingesetzt:

- Whatman Filterpapier Nr.1

In 250 ml Erlenmeyer-Kolben wurde 100 ml Mineralmedium mit 16
Filterpapierstreifen der Größe 1 cm x 2,5 cm gegeben.

- **Walseth-Cellulose (SWC)** n. Ogawa et al., 1982; abgeändert
 5 g Avicel (Serva, Typ PH, Durchmesser 0,038 nm) wurde in 100 ml 85 %iger H_3PO_4 suspendiert und 3 Stunden bei 50°C häufig gerührt. Nach 17-stündigem Ruhen bei Raumtemperatur wurde die gelöste Avicel-Cellulose eiskühlt in 500 ml 4°C kaltes Wasser gegossen und gefällt. Das Präzipitat wurde nach ca. 12 Stunden 3x mit Aqua dest. gewaschen und jeweils 20-30 Min bei 4100 g (Minifuge, Fa. Heraeus Christ) zentrifugiert. Der End-pH-Wert lag zwischen pH 4-5. Es wurde noch je einmal mit 1 %iger $NaHCO_3$ -Lösung und mit Aqua dest. gewaschen und das Sediment in 60 ml Aqua dest. aufgenommen.

Um SWC-Agarplatten herzustellen, wurde die Walseth-Cellulose in einer Konzentration von 10 g/l dem M+R-Mineralagar zugegeben und etwa 4 ml als trübe Oberschicht über der klaren Mineralmedium-Agar-Unterschicht verteilt.

- verschiedene Zuckerlösungen

Alternativ wurden folgende Zucker zugegeben:

Glucose (0,4 %, 0,004 %)

Cellobiose (0,4 %, 0,03 %)

Cellodextringemisch I (0,4 %)

Zusammensetzung:	Glucose	0,9 %
	Cellobiose	14,3 %
	Cellobiose	14,3 %
	Cellobiose	25,5 %
	Cellobiose	30,2 %
	Cellobiose	16,3 %
	Cellobiose	3,9 %

2.6.4 Lebendkeimzahlbestimmung durch Ausplattieren auf Agar

Die auf R. Koch zurückgeführte Methode der Zählung von Kolonien auf festen Nährböden beruht auf der Idealvorstellung, daß jede vermehrungsfähige Zelle makroskopisch als Einzelkolonie sichtbar wird. Dabei muß beachtet werden, daß durch gegenseitige Beeinflussung der Mikroorganismen und Selektivität der Nährböden nur ein geringer Teil der Gesamtzellzahl zu erfassen ist.

Ausgewertet wurden nur Platten mit 30-300 Kolonien (Clark, 1965).

2.6.5 MPN (most probable number)-Test

Die Keimzahlbestimmung durch Koloniezählung kann durch Keimzahl-Analogwerte (MPN) ersetzt werden. Diese Methode wurde schon mehrfach von Focht & Joseph (1973), Fabig & Ottow (1979) und Dott et al. (1984) zur Bestimmung der Populationsdichte von Denitrifikanten angewendet.

Grundlage der Methode ist, in Flüssigkulturen durch Probenverdünnung eine "Grenzverdünnung" zu erreichen, die Rückschlüsse auf die Konzentration zufallsverteilter, vermehrungsfähiger Zellen in der Ausgangssuspension zuläßt. Dabei wird vorausgesetzt, daß jede vermehrungsfähige Einzelzelle nach genügend langer Inkubationszeit die Nährlösung trübt (10^7 - 10^8 Zellen/ml), während keimfreie Ansätze klar bleiben. Durch Gasauffangröhrchen nach Durham (1898) konnte zusätzlich die Gasentwicklung beobachtet werden. Für die MPN-Verdünnungsreihen wurden in fünf Parallelansätzen in jedes sterile Teströhrchen (Schraubverschlußröhrchen, Schott GL 14, Art. Nr. 261 351 15) 4,5 ml sterile Nitrat-Nährlösung gefüllt und mit 0,5 ml Proben-suspension aus den Reaktoren beimpft und 10 Verdünnungsstufen mit dem Verdünnungsfaktor 10 angesetzt. Nach einer Bebrütungszeit von 5 Tagen bei 20°C bzw. 10°C wurden die Röhrchen nach optischen (Trübung, Bildung einer Kahmhaut, Gasbildung) und nach chemischen (Nitrat-, Nitritkonzentration) Eigenschaften ausgewertet. Die Keimzahlen/ml sind aus Tabellen mit MPN-Codes, die sich aus der Ziffernfolge der Anzahl positiver Wachstumsreaktionen in 3 aufeinanderfolgenden Verdünnungen bei gleich großen Verdünnungsschritten und konstanter Anzahl von Parallelansätzen ergeben, direkt abzulesen.

2.6.6 Anreicherungskulturen

Aus den jeweils höchsten noch denitrifizierenden Verdünnungsstufen einer MPN-Reihe wurden 0,5 ml Probe entnommen, in steriles Medium übertragen und unter gleichen Bedingungen kultiviert.

Fand erneut Denitrifikation statt, so wurde dieser Vorgang zur Anreicherung 5 mal wiederholt. Bei fehlender Gasbildung wurde

der Ansatz verworfen. Die Anreicherungskulturen dienten als Ausgangskulturen zur Erhaltung von Reinkulturen.

2.6.7 Reinkulturen

Ausgehend von der Vielzahl der Kolonien, die nach der Verteilung eines Aliquots aus der Anreicherungskultur oder eines Rindenstückchens auf NNB-Agarplatten nach 2-5 Tagen bei einer Bebrütungstemperatur von 10° bzw. 20°C gewachsen waren, wurden einzeln stehende Kolonien erneut ausgestrichen und bebrütet. Dieses Verfahren wurde bis zur Erlangung von Reinkulturen wiederholt.

Die Pilze wurden nach der Inkubation von Rindenstücken oder Filterstreifen auf NNB-Agar durch Abimpfen isoliert und auf HA-Agar erneut inkubiert. Bildeten die Pilze Sporangien, wurden diese mit einer sterilen Kapillarpipette angestochen und die Sporen aufgesogen. Nach Ansetzen einer Verdünnungsreihe, Ausplattieren und Auskeimen der Sporen, konnten einzelne Keime isoliert werden. Die weitere Überimpfung erfolgte durch Ausstechen kleiner Agarblöckchen im Bereich der Hyphenspitzen.

2.6.7.1 Stammkulturen

Die isolierten Reinkulturen wurden auf Nähragar in Schrägagarröhrchen kultiviert und bei 5°C aufbewahrt. In Abständen von 2 Monaten wurden die Kulturen überimpft.

2.6.7.2 Vorkulturen

Als Vorkultivierung galt die 24-48-stündige Bebrütung bei 20°C (30°C) eines Bakterienausstriches auf NNB-Agar bzw. eines Pilzblöckchens auf HA-Agar.

2.7 Versuche zur Verwertung von Nitrat und Cellulose

2.7.1 Prüfung auf Denitrifikation

Ein Aliquot der vorkultivierten Bakterienstämme wurde in 25 %iger Ringerlösung suspendiert und ein Zelltiter von ca. 10^7 Bakterien/ml eingestellt. Von dieser Probensuspension wurden 0,5 ml in verschraubbare Glasröhrchen (2.6.5) mit 4,5 ml NNB-Medium gegeben und homogenisiert. Zur Erkennung der Gasbildung wurden sterile Durham-Röhrchen zugegeben. Es wurden jeweils zwei Kulturen pro Stamm angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von drei Wochen bei 20°C wurden die Kulturen auf Wachstum (Trübung, Kahmhaut, Gasentwicklung) untersucht. Die Ansätze wurden bei 4100 g in einer Minifuge 30 Min zentrifugiert und im dekantierten Überstand die Konzentrationen an $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ und $\text{NH}_4\text{-N}$ bestimmt.

Inoculum für die Pilzisolate waren Agarblöckchen aus dem Bereich der Hyphenspitzen. Als Testmedium wurde neben NNB auch Nitrit-NB verwendet. Die Inkubationszeit betrug vier Wochen bei 30°C.

Die qualitative Überprüfung des entstandenen Gases bei den Denitrifikanten wurde in einem neuen Ansatz, wie bei 2.4.17 beschrieben, untersucht.

Versuche unter streng anoxischen Bedingungen wurden im Gaspak-Anaerobensystem (Fa. BBL) durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien- und Pilzisolate auf NNB- bzw. SWC-M+R-Agar (2.6.3) angeimpft und sieben Tage bei 20°C im Anaerobentopf inkubiert.

2.7.2 Prüfung auf Celluloseverwertung

Zum Nachweis für cellulolytische Aktivität der isolierten Mikroorganismen wurde ihnen Cellulose (Walseth-Cellulose und Cellulose-Filter) sowie Celluloseabbauprodukte in M+R-Medium (2.6.3) angeboten.

2.7.2.1 Walseth-Cellulose (SWC)-Agar

Die zu testenden Bakterien- bzw. Pilzstämmen wurden auf SWC-Agarplatten mit drei verschiedenen pH-Werten (pH 5, pH 6 und pH 7) ausgestrichen bzw. als mycelhaltige Agarblöckchen aufgelegt. Die Inkubationszeit betrug mindestens zwei Wochen bei 30°C.

Ein positives Ergebnis (Celluloseabbau) war optisch durch die Bildung von klaren Zonen (Höfen) um den Testorganismus zu erkennen.

2.7.2.2 Filterpapier

75 ml M+R-Medium mit 10 Cellulose-Filterstreifen (2.6.3) wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 10 mycelhaltigen Agarblöckchen der isolierten Pilze angeimpft. Die Kolben wurden mit Wattestopfen verschlossen und bei 30°C auf einem temperierbaren Schüttler mit 120 U/Min inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 25 Tagen. Kriterien für einen Celluloseabbau waren der optische Zerfall des Filterstreifens, CMCase-Aktivitätsbestimmungen (2.4.12) und der Nachweis reduzierender Zucker im Kulturmedium (2.4.11.1).

2.7.2.3 Zuckerlösungen

Zur Überprüfung, ob Mikroorganismen, die Cellulose nicht abbauen konnten, deren Abbauprodukte verwerteten, wurden folgende Lösungen angesetzt:

0,4 % Glucoselösung

0,4 % Cellobioselösung

0,4 % Cellodextringemisch I (2.6.3)

Da im Cellodextringemisch auch geringe Anteile von Glucose (0,004 %) und Cellobiose (0,03 %) enthalten waren, wurden in diesen Konzentrationen Kontrollansätze durchgeführt. So konnte überprüft werden, ob die Mikroorganismen nur auf Grund dieser geringen Zuckerkonzentrationen im Cellodextringemisch wachsen

konnten oder ob die Cellodextrine ebenfalls metabolisiert wurden.

180 µl der o.g. Lösungen wurden mit einer Multi Elektropette in die Vertiefung von Mikrotiterplatten pipettiert und mit 20 µl Bakterien-Inokulum (Titer in 25 %iger Ringerlösung ca. 10^7 Zellen/ml) beimpft. Es wurden jeweils Dreifachansätze durchgeführt. Die Platten wurden bei 20°C auf einem Schüttler vier Tage inkubiert und nach 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden in einem Photometer (Microplate Autoreader EL 309, Fa. BioTek Instruments) gemessen. Bestimmt wurde das Wachstum anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 540 nm.

2.7.3 Misch-Kulturen von Bakterien und Pilzen

Die Versuche wurden mit SWC-M+R- und NNB-Agar (pH 6,5) unter aeroben sowie anoxischen Bedingungen durchgeführt.

1 ml Bakteriensuspension (in 25 %iger Ringerlösung) wurden gleichmäßig auf die Agarplatten verteilt. Nach Antrocknen der Bakterienkultur wurden die Platten mit den Pilzisolaten (Agarblöckchen mit Hyphenspitzen) beimpft. Es wurden je zwei Ansätze aerob und zwei anoxisch im Anaerobentopf fünf Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

2.8 Taxonomische Untersuchungen

Zur Charakterisierung der isolierten Bakterien wurden mikroskopische Koloniemerkmale betrachtet und physiologisch-biochemische Tests durchgeführt und ausgewertet.

2.8.1 Morphologie

Die Beschreibung der Koloniemorphologie erfolgte nach zweitägiger Kultivierung der Reinkulturen auf NNB-Agar bei achtfacher Vergrößerung.

2.8.2 Beweglichkeit

Die Bewegungsfähigkeit der Bakterienisolate wurde im "Hängenden Tropfen"-Päparat bei 500facher Vergrößerung im Phasenkontrast (Leitz Dialux) beobachtet.

2.8.3 Gram-Tests

2.8.3.1 Aminopeptidase-Nachweis

Der Aminopeptidase-Nachweis wurde mit Bactident[®]-Aminopeptidase-Teststäbchen der Fa. Merck (Art. Nr. 13301) erbracht. Das Enzym kommt nur bei gram-negativen Bakterien vor.

2.8.3.2 Nachweis mit dem KOH-Schnelltest (Gregersen, 1978)

Auf einem Objektträger wurde ein Aliquot einer Kolonie in 3 %iger KOH-Lösung suspendiert. Bei einer positiven Reaktion (gram-negative Bakterien) bildet sich nach einiger Zeit eine visköse Flüssigkeit, die bei Anheben der Impföse dünne Fäden bildet.

2.8.4 Cytochrom-Oxidase-Reaktion

Für den Cytochrom-Oxidase-Nachweis wurden Bactident[®]-Oxidase-Teststäbchen von der Fa. Merck (Art. Nr. 13300) verwendet.

2.8.5 Katalase-Reaktion

Frische Bakterienkulturen auf Nähragar wurden mit 3 %igem H₂O₂ beträufelt. Positive Stämme reagierten mit heftiger Gasentwicklung (Sauerstoff). Bei einigen Stämmen (z.B. Lactobacteriaceae) fehlt das Hämin-Enzym Katalase.

2.8.6 Gelatine-Verflüssigung

Der Nachweis von exkretierten Proteinasen im Medium wurde durch die Verflüssigung von Gelatine nach zwei Wochen Inkubation bei 20°C erbracht.

2.8.7 Fluoreszenz

Zum Nachweis gelb-grünlicher Pigmente, die im UV-Licht (254 nm) fluoreszieren, diente Cetrimid-Agar (2.6.3) als Testmedium. Die Auswertung erfolgte nach 7 Tagen Inkubation bei 20°C. Fluoreszierende Farbstoffe sind besonders Kennzeichen einer Reihe von *Pseudomonas*-Arten.

2.8.8 Identifizierung der Bakterien mit dem Sensititre-Identifizierungs-Testsystem

Das Sensititre-Testsystem (Fa. Radiometer Copenhagen) stellt eine Verbindung von konventionellen biochemischen Tests mit Fluoreszenz-Tests her, deren Reaktion auf Freisetzung einer Fluorophorverbindung vom verbrauchten Substrat oder von einer positiven Testreaktion des fluoreszierenden Indikators nach pH-Wert-Abnahme beruht. Pro Mikrotiterplatte sind jeweils 3 x 32 verschiedene biochemische Tests angesetzt (Tab. 5).

Bakterien aus der Vorkultur (2.6.7.2) wurden in 4 ml sterilem Aqua bidest. homogen suspendiert und mit einem dem Testsystem zugehörigen Nephelometer ein Zelltiter von ca. 10^8 Bakterien/ml eingestellt. Ein automatischer Probennehmer pipettierte gleichmäßig 50 µl Bakteriensuspension in die einzelnen Reaktionsgefäße. Die Platten wurden mit einer sterilen Folie überzogen und 24 Stunden bei 35°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 18 und 24 Stunden, wobei die emittierten Fluoreszenzsignale mit einem Fluoreszenzphotometer gemessen wurden. Das Ergebnismuster des getesteten Bakterienstammes wurde über einen Computer mit 150 verschiedenen Identifikationsmustern bekannter fermentativer und nicht-fermentativer gram-negativer Bakterien verglichen (Ertl, 1988). Angegeben wurden die statistisch ermittelten möglichen Identifikationen mit ihren dazugehörigen Wahrscheinlichkeiten und die jeweiligen Testergebnisse, die mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit gegen das Ergebnis sprechen können.

Tab. 5: Konfiguration der AP80-Testplatten zur Identifizierung gram-negativer Bakterien.

Die 4x8 physiologischen Tests sind 3-fach auf der Platte angeordnet. FR=Fluoreszenz Reagenz.

	1	2	3	4
A	FR1	Harnstoff	Ornithin	Sorbit
B	Xylose	FR12	Saccharose	FR9
C	FR3	Trehalose	FR8	Mannit
D	Maltose	FR4	Inosit	FR10
E	FR5	Fructose	Asculin	Arabit
F	Arabinose	Lysin	TDA	Raffinose
G	FR7	Arginin	FR6	Cellobiose
H	Malonat	Pyruvat	Citrat	Agmatin

FR1	7-Amino-methyl-coumarin-lysin
FR3	4-Methylumbelliferylphosphat
FR4	4-Methylumbelliferyl- α -D-glucopyranosit
FR5	7-Amino-methyl-coumarin-prolin
FR6	4-Methylumbelliferyl- α -D-galactopyranosid
FR7	7-Amino-methyl-coumarin- γ -glutamin
FR8	4-Methylumbelliferyl-bis-phosphat
FR9	4-Methylumbelliferyl-glucuronid
FR10	4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid
FR12	4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxygluco- pyranosid + 4-Methylumbelliferyl-L-arabinopyranosid

Die Reinkulturen wurden mindestens zweimal mit dem Sensititre-System getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Chemische Analyse der Rinde und der wässerigen Rindenmulchextrakte

Um vor Beginn der verfahrenstechnischen und mikrobiologischen Untersuchungen eine gewisse Kenntnis über das eingesetzte Material zu erlangen, wurde sowohl die Fichtenrinde als auch das aus ihr gewonnene wässrige Eluat chemisch untersucht. Weiterhin wurde die Elementarzusammensetzung der Rinde nach der Nutzung in den Denitrifikationsanlagen unter dem Gesichtspunkt einer "Entsorgung" dieser gebrauchten Rinde in der Landwirtschaft und/oder im Gartenbau analysiert.

3.1.1 Chemische Analyse der Fichtenrinde

Das C:N-Verhältnis der Fichtenrinde lag eindeutig auf der Seite des Kohlenstoffs und deutet damit auf ein hohes Denitrifikationspotential hin. Dieser hohe Kohlenstoffanteil sagt jedoch noch nichts über die Bioverfügbarkeit der Kohlenstoffverbindungen aus.

Die Ergebnisse der CHN-Analyse des frischen luftgetrockneten Rindenmulches der ersten und zweiten Lieferung sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tab. 6: Prozentualer Anteil von C, H und N in der Rindenmulchprobe der ersten (Nov. 1987) und zweiten (Okt. 1990) Lieferung.

Rindenprobe	Kohlenstoff	Wasserstoff	Stickstoff	C:N
1. Lieferung	45,4 ± 0,1	5,52 ± 0,13	0,57 ± 0,15	80
2. Lieferung				
Charge A	37,7 ± 0,2	4,40 ± 0,11	1,13 ± 0,17	33
Charge B	44,9 ± 0,2	5,41 ± 0,13	0,51 ± 0,03	88

Die Analysenwerte der zweiten Rindenmulch-Lieferung, die bei einem Chargenverhältnis von 1:1 in der Pilotanlage und in Laborreaktor R7 zum Einsatz kam, unterschieden sich sowohl innerhalb der Chargen als auch in Bezug auf die Ergebnisse der ersten Lieferung.

Bei Betrachtung der C:N-Verhältnisse wird die Stickstoffarmut der Rinde deutlich. Je nach Rindencharge lag der C:N-Quotient der untersuchten Fichtenrinde zwischen 33 und 88. In der Literatur werden ebenfalls Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnisse von 35 (Kürschner, 1966), 77 (Schalk, 1988) und 90 (Zöttl, 1981) für Fichtenrinde beschrieben.

Die CHN-Analysen der Fichtenrinde aus den verschiedenen Versuchen nach unterschiedlich langen Betriebszeiten sind in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Prozentualer Anteil von C, H und N in den Rindenmulchproben nach unterschiedlich langen Expositionszeiten in Laborrektoren.

R2-R5 Durchflußrate: 11 l/d; R6 & R7 Durchflußrate: 3 l/d. Die Reaktoren R2-R6 waren mit Rinde der ersten, R7 mit Rinde der zweiten Lieferung gefüllt.

Reaktor (Betriebszeit)	Kohlenstoff	Wasserstoff	Stickstoff	C:N
R3 (112 d)	44,8 ± 0,3	5,22 ± 0,04	0,61 ± 0,04	73
R2 (119 d)	43,6 ± 0,4	5,28 ± 0,11	0,72 ± 0,08	61
R4 (341 d)	43,8 ± 0,3	5,51 ± 0,05	0,63 ± 0,04	70
R5 (413 d)	42,7 ± 0,2	4,94 ± 0,17	0,78 ± 0,16	55
R2 (609 d)	44,7 ± 0,4	5,53 ± 0,05	1,05 ± 0,05	43
R6 (280 d)	43,3 ± 0,4	5,36 ± 0,13	1,44 ± 0,16	30
R7 (218 d)	44,6 ± 0,2	5,45 ± 0,13	0,43 ± 0,13	104

Der Kohlenstoffanteil lag bei allen untersuchten Proben unter, der Stickstoffanteil über dem Wert des frischen Ausgangsmaterials (s.o.). Ein eindeutig höherer Stickstoffanteil mit zunehmendem Betriebsalter der Rinde wurde bei den Rindenproben aus

R2 (nach 609 Betriebstagen) und R6 (nach 280 Betriebstagen) festgestellt. Die N-Zunahmen der übrigen Rindenproben lagen im Rahmen des Streubereiches. Die Besonderheit bei Versuch R2 war der Betrieb bei Raumtemperatur. R6 wurde im Gegensatz zu den Versuchen R2-R5 mit einem geringeren Volumenstrom beschickt. Die geringfügige Erhöhung des Stickstoffanteils dürfte vor allem auf den mikrobiellen Abbau der leicht löslichen organischen Kohlenstoffverbindungen zurückzuführen sein. Dies wird durch die Zunahme des Aschegehaltes infolge des Abbaus organischer Substanz bestätigt (s.u.).

Bei Anwendung dieser Rinde zur physikalischen und chemischen Bodenverbesserung käme es infolge der immer noch weiten C:N-Verhältnisse zwischen 70 und 30 zu einer Festlegung von Stickstoff durch Bodenorganismen. Um daraus entstehende Mangelsituationen für die kultivierten Pflanzen zu vermeiden, müßte Stickstoff, und je nach Nährstoffverhältnissen im Boden eventuell Phosphor und Kalium, zuge düngt werden. Das C:N-Verhältnis sollte auf mindestens 25 eingeengt werden (Krapfenbauer, 1971).

In der frischen Rinde lag der Ascherückstand bei durchschnittlich $7,9 \pm 0,4$ %. Das aus den Laborreaktoren R4, R5 und R6 stammende Rindenmaterial besaß erwartungsgemäß mit $9,0 \pm 0,1$ % einen höheren Aschegehalt. Die Veränderungen im Ascherückstand geben Hinweise auf den Abbau der organischen Substanzen während der Exposition der Fichtenrinde im Denitrifikationsreaktor. Auf Grund der wenigen Untersuchungen nach der Rindennutzung konnten die mengenmäßigen Substanzverluste nicht bewertet, eine Tendenz aber erkannt werden.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse der verschiedenen Rindenchargen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Die Auswahl der untersuchten Elemente erfolgte unter dem Gesichtspunkt der Zusammensetzung von Nährmedien.

Tab. 8: Quantitative Multi-element-Analyse der frischen luftgetrockneten Fichtenrinde.

Die Konzentrations-Angaben sind in Gewichts-ppm (=mg/kg).

Elemente	1. Lieferung	2. Lieferung	
		Charge A	Charge B
Aluminium (Al)	2405	5000	1200
Barium (Ba)	183	150	120
Blei (Pb)	5	20	20
Bor (B)	5	10	15
Cadmium (Cd)	3	5	5
Calcium (Ca)	13295	10400	9600
Chrom (Cr)	64	440	60
Eisen (Fe)	1845	4300	2300
Kalium (K)	2975	3500	2500
Kobalt (Co)	3	5	5
Kupfer (Cu)	10	15	7
Lithium (Li)	10	5	5
Magnesium (Mg)	1360	1100	950
Mangan (Mn)	1652	900	1250
Molybdän (Mo)	5	40	5
Natrium (Na)	405	500	150
Nickel (Ni)	29	220	500
Phosphor (P)	528	470	520
Schwefel (S)	855	280	300
Silizium (Si)	13950	58900	6150
Strontium (Sr)	71	35	30
Vanadium (V)	4	5	5
Zink (Zn)	193	200	210

Wie aus der Tabelle 8 ersichtlich ist, wurden in den Rindenmulchproben hohe Konzentrationen von Calcium und Silizium, aber auch von Aluminium, Eisen, Kalium, Magnesium und Mangan gemessen.

Bei den einzelnen Rindenchargen traten deutliche Konzentrationsunterschiede der jeweiligen Nährelemente auf. Die Zusammensetzung und die Konzentrationen der Nährelemente sind von verschiedenen Faktoren, z.B. Nährstoffversorgung am Standort, Rindenalter und Zeitpunkt des Holzschlages abhängig (Zöttl, 1981).

Die hohen Aluminium- und vor allem Silikat-Konzentrationen und deren Unterschiede in den verschiedenen Rindenchargen sind auf die sichtbare Verunreinigung der Rinde (Charge A) mit Sand-Partikeln zurückzuführen. Die auffällig hohen Calciumkonzentrationen wurden auf Grund der in den Pflanzenzellwänden eingela-

gerten Calciumoxalat-Kristalle erwartet.

Analysen des ersten Rindenmulch-Reaktorablaufs und Extraktanalysen zeigten, daß große Mengen an Calcium, Kalium, Magnesium, Mangan, Natrium, Phosphor, Schwefel und Silizium eluiert wurden.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, daß die im Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor ansässige Mikroflora in der ersten Betriebsphase aus den Elutionsprodukten nicht nur ihren Kohlenstoffbedarf decken, sondern auch die Makro- und Mikro-Nährelemente nutzen könnten.

Die Ergebnisse der Elementaranalysen der Rindenproben verschiedener Laborreaktoren nach einem mindestens 100-tägigem kontinuierlichen Betrieb sind in Tabelle 9 aufgezeigt. Eine eindeutige Aussage über eine Veränderung der Elementarzusammensetzung bzw. eine Anreicherung von Schadstoffen (speziell Schwermetallen) im Fichtenrindenmulch nach der Nutzung als Aufwuchsfläche und Substrat im Denitrifikationsreaktor kann anhand dieser Ergebnisse nicht gemacht werden. Die Konzentrationsänderungen der untersuchten Elemente lagen meist im Fehlerbereich der Analysenmethode. Nur bei Barium, Kalium und Mangan waren die Konzentrationen eindeutig niedriger als in der frisch eingesetzten Rinde. Geringfügige Zunahmen waren bei Calcium und Zink zu messen. Als Ursachen für diese Veränderungen sind die Mineralstoff-Zusammensetzung des verwendeten Leitungswassers und die Kationenaustauschfähigkeit der Rinde, die mit zunehmender Humifizierung ansteigt, anzusehen.

Untersuchungen zur Abnahme der Rindenmasse nach dem Einsatz im Denitrifikationsreaktor konnten aus versuchstechnischen Gründen (z.B. Verluste durch ausgespülte Feinteile während des kontinuierlichen Betriebes) keine repräsentativen Ergebnisse liefern.

Tab. 9: Quantitative Multielement-Analyse der Rindenproben nach unterschiedlich langer Betriebsdauer.
 Die Konzentrations-Angaben sind in Gewichts-ppm (=mg/kg). Die Probennahme in der Pilotanlage erfolgte direkt über der Kiesschicht (RMB1u) und im oberen Meter der Rindenschicht (RMB1o).

Elemente	R2(119d)	R4(341d)	R5(413d)	R2(609d)
Aluminium (Al)	2400	2100	2600	3000
Barium (Ba)	70	110	55	100
Blei (Pb)	≤ 20	< 20	≤ 20	≤ 20
Bor (B)	< 10	< 10	10	< 10
Cadmium (Cd)	5	3	< 5	10
Calcium (Ca)	19400	17500	14000	18300
Chrom (Cr)	50	60	60	100
Eisen (Fe)	1700	1900	2900	2500
Kalium (K)	1100	1000	1100	1200
Kobalt (Co)	≤ 2	≤ 2	< 5	≤ 2
Kupfer (Cu)	10	20	890	30
Lithium (Li)	≤ 2	≤ 2	< 5	≤ 2
Magnesium (Mg)	1900	1300	1300	1600
Mangan (Mn)	270	220	95	1000
Molybdän (Mo)	5	7	< 5	10
Natrium (Na)	490	410	350	70
Nickel (Ni)	30	60	70	90
Phosphor (P)	510	440	430	10
Schwefel (S)	1500	1000	430	1800
Silizium (Si)	12100	12000	13000	15700
Strontium (Sr)	70	70	55	70
Vanadium (V)	6	5	< 5	11
Zink (Zn)	260	390	460	1100

Elemente	R6(280d)	R7(218d)	RMB1u(205d)	RMB1o(205d)
Aluminium (Al)	2600	1150	1950	2300
Barium (Ba)	75	55	75	85
Blei (Pb)	< 20	< 20	< 20	< 20
Bor (B)	15	≤ 10	≤ 10	≤ 10
Cadmium (Cd)	< 5	< 5	< 5	< 5
Calcium (Ca)	15400	13300	12000	12000
Chrom (Cr)	85	35	90	130
Eisen (Fe)	2050	7000	1550	2000
Kalium (K)	1250	880	870	1000
Kobalt (Co)	< 5	< 5	< 5	< 5
Kupfer (Cu)	35	290	15	10
Lithium (Li)	< 5	< 5	< 5	< 5
Magnesium (Mg)	1250	830	620	580
Mangan (Mn)	165	65	125	155
Molybdän (Mo)	10	< 5	8	15
Natrium (Na)	480	300	305	325
Nickel (Ni)	45	20	40	60
Phosphor (P)	370	440	590	370
Schwefel (S)	< 40	< 40	< 40	45
Silizium (Si)	12500	3200	9400	13800
Strontium (Sr)	65	50	50	50
Vanadium (V)	< 5	< 5	< 5	< 5
Zink (Zn)	165	530	55	205

3.1.2 Rindenmulch-Extraktanalysen

Das Einquellen und Inbetriebnehmen eines frisch gefüllten Rindenmulchbeckens ist am besten mit einer Kaltwasserextraktion zu vergleichen. Die nachfolgend beschriebenen Analysen wurden durchgeführt, um den Anteil niedermolekularer Stoffe in dem intensiv braungefärbten Wasserextrakt zu bestimmen, da sie für die Mikroorganismen leicht verfügbar sind.

Die Extraktion der < 1,0 mm gemahlenen Fichtenrinde erfolgte mit entionisiertem Wasser bei 23°C. Bei einem Mulch/Wasser-Verhältnis von 1:30 wurden nach einer 48-stündigen Extraktionszeit durchschnittlich 305 ± 25 mg C/l eluiert, was einem prozentualen Anteil von gelöstem Kohlenstoff am Gesamtkohlenstoff der Rinde von $2,0 \pm 0,2$ % entspricht. Der Hauptteil (78 %) der extrahierbaren Kohlenstoffverbindungen wurde in der ersten Stunde freigesetzt, danach verlangsamte sich der Lösungsprozeß (Abb. 9).

Bei der Extraktion mit ungemahlenem Mulch (10-40 mm) wurden unter den gleichen Bedingungen Kohlenstoffkonzentrationen von ca. 225 mg C/l gemessen.

Auf Grund der raschen Freisetzung von löslichen Inhaltsstoffen wurde in den nachfolgenden Laborversuchen das erste DOC-reiche Eluat aufgefangen und zu einem späteren Zeitpunkt dem Reaktor wieder zugeführt, um das für den Denitrifikationsprozeß verwertbare Kohlenstoffpotential dieses Eluats abzuschätzen (s. 3.6.2).

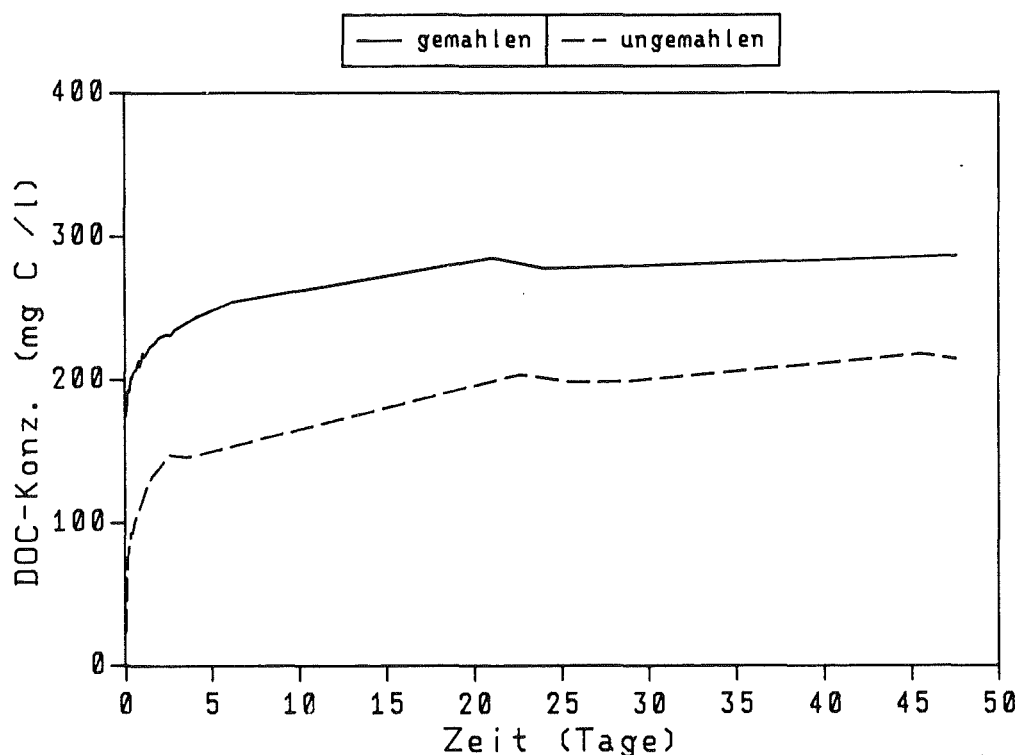


Abb. 9: Zeitabhängige DOC-Konzentrationen wässriger Extrakte von gemahlener (< 1,0 mm) und ungemahlener (10-40 mm) Fichtenrinde.

In verschiedenen Rindenmulchextraktproben wurde zur Charakterisierung der Extraktinhaltsstoffe die Molekulargewichtsverteilung bestimmt und eine Massenspektrenanalyse zur Identifizierung durchgeführt. Weiterhin wurden einzelne Proben auf ihren Zuckergehalt untersucht.

3.1.2.1 Molekulargewichtsverteilung mittels Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Eine gelfiltrationschromatographische Auftrennung der organischen Substanzen nach ihren Molekulargewichten wurde bei den wässrigen Extrakten von gemahlener Fichtenrinde (< 1,0 mm) durchgeführt. Bei allen Trennungen wurde sowohl die kontinuierliche Messung des Brechungsindex als auch die Bestimmung der DOC-Konzentration in den einzelnen Fraktionen zur Detektion angewendet.

In den wässrigen Proben wurden nach 48-stündiger Extraktionszeit zwei Peaks detektiert (Abb. 10 & 11). Der erste Peak lag

im Bereich der Ausschlußgrenze, so daß das Molekulargewicht nur mit > 4000 angegeben werden kann, da keine weitere Auftrennung mehr erfolgte.

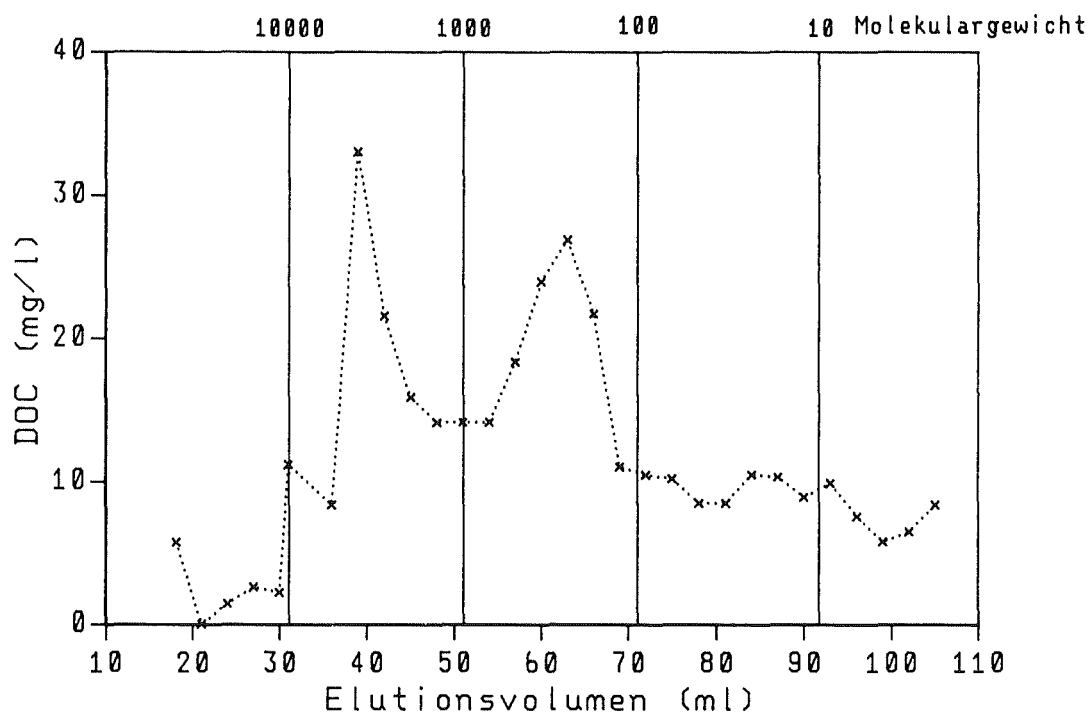


Abb. 10: DOC-Elutionsdiagramm einer wässrigen Fichtenrinden-Extraktprobe nach 48-stündiger Extraktionszeit zur Molekulargewichtsbestimmung.

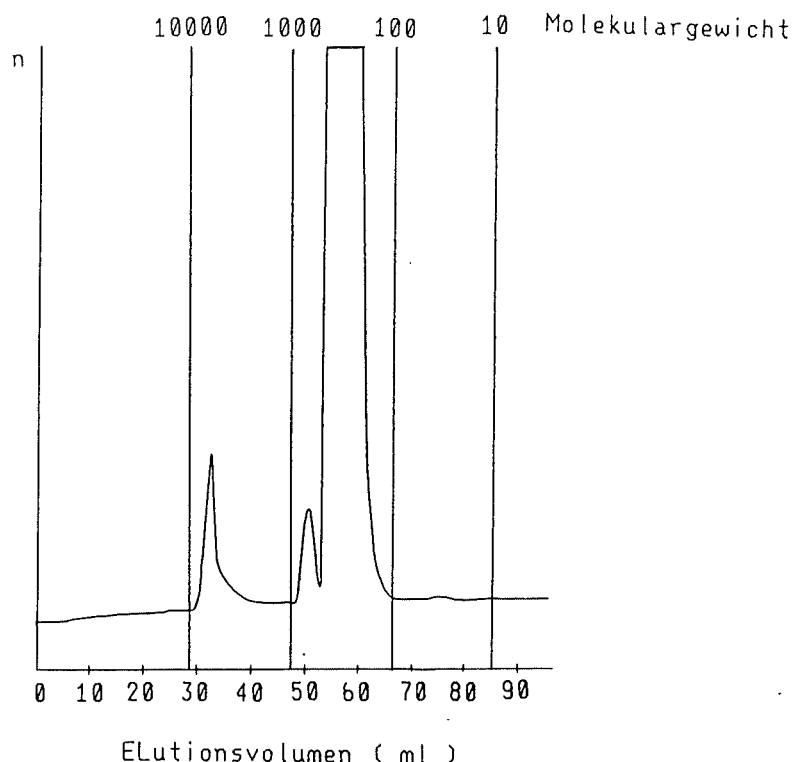


Abb. 11: Refraktometrisch ermitteltes Elutionsdiagramm einer wässrigen Fichtenrinden-Extraktprobe nach 48-stündiger Extraktionszeit zur Molekulargewichtsbestimmung.

Ein weiterer Peak beider Chromatogramme lag im Molekulargewichtsbereich von 100-1000 und konnte anhand der DOC-Eichkurve einem Molekulargewicht von ca. 250 zugeordnet werden. Bei anderen Trennversuchen wurden, berechnet nach DOC- und Refraktometer-Eichgeraden, diesem Peak Molekulargewichtswerte von MG 280 bzw. MG 480 zugeteilt.

Bei allen Proben wurde im Refraktometer-Elutionsdiagramm ein weiterer Peak im MG-Bereich von 100-1000 detektiert, der bei der DOC-Messung nicht nachgewiesen werden konnte. Dies läßt darauf schließen, daß es sich um nicht kohlenstoffhaltige Substanzen, z.B. Salze handelte (s. 2.4.10).

Bei der Molekulargewichtstrennung einer Extraktprobe nach 1-stündiger Extraktionszeit wurden neben den schon oben beschriebenen Peaks im Ausschluß- und Niedermolekularbereich Peaks im mittleren Molekularbereich (MG 300-700) und im Bereich < 100 gemessen.

Auf Grund vieler Fehlerquellen bei der Molekülgrößentrennung der extrahierten Stoffe und vor allem bei der Berechnung der Molekulargewichte, die eine logarithmische Abhängigkeit von der Retentionszeit zeigen, ist anhand der mit der GFC ermittelten Werte nur eine grobe Einteilung in Molekulargewichtsbereiche möglich. Die Retentionszeiten der Substanzen sind von verschiedenen Faktoren abhängig, die die Wechselwirkung mit den Gelpartikeln beeinflussen. Zu nennen sind als Einflußgrößen die Ionenkonzentration, der pH-Wert der Pufferlösung, die Konzentration der aufgegebenen Lösung, die Temperatur usw. (Fuchs, 1985).

3.1.2.2 Zuckerbestimmungen

Zuckeranalysen wurden durchgeführt, weil Zucker einerseits zu den mikrobiell am besten verwertbaren extrahierbaren Stoffen andererseits in Form von Cellulose und Hemicellulosen zu den Hauptkomponenten der Fichtenrinde gehören (Tab. 1 & 10). Zur Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen freien Zuckerkomponenten in wässrigen Rindenmulchextrakten wurden die Bestimmungen nach unterschiedlichen Extraktionszeiten im Biotronic-Zuckeranalysator nach der Kupfer-bi-Cinchoninat-Methode durchgeführt. Die Menge der in gebundener Form vorliegenden Zucker wurde nach einer sauren Hydrolyse der Fichtenrinden-Extraktproben bestimmt.

Nach einer Totalhydrolyse der gemahlenen "frischen" Fichtenrinde mit 72 %iger Schwefelsäure wurden Zuckeranalysen im Holzforschungsinstitut Hamburg durchgeführt (Tab. 10). Von 42,8 % Zuckeranteil an der Gesamtrinde entfielen 31 % auf Glucose als Hauptbestandteil der (Hemi)Cellulosen. Als Klason-Lignin wurden 40,3 % bestimmt. Diese Werte liegen im Bereich üblicher Literaturangaben (z.B. Dietrichs et al., 1978).

Eine Abhängigkeit der Zuckerzusammensetzung in den Fichtenrindenextrakten von der Extraktionszeit wurde nicht festgestellt. Es konnten sowohl nach 6, 24 und 48 h D-Glucose, D-Xylose, D-Galaktose, L-Arabinose, D-Mannose und D-Ribose nachgewiesen

werden. Mit zunehmender Extraktionszeit nahm allerdings die Konzentration an Glucose ab, die der übrigen Zucker stieg dagegen an (Abb. 12).

Die Abnahme der Glucosekonzentration mit zunehmender Extraktionszeit läßt auf eine bakterielle Verwertung schließen.

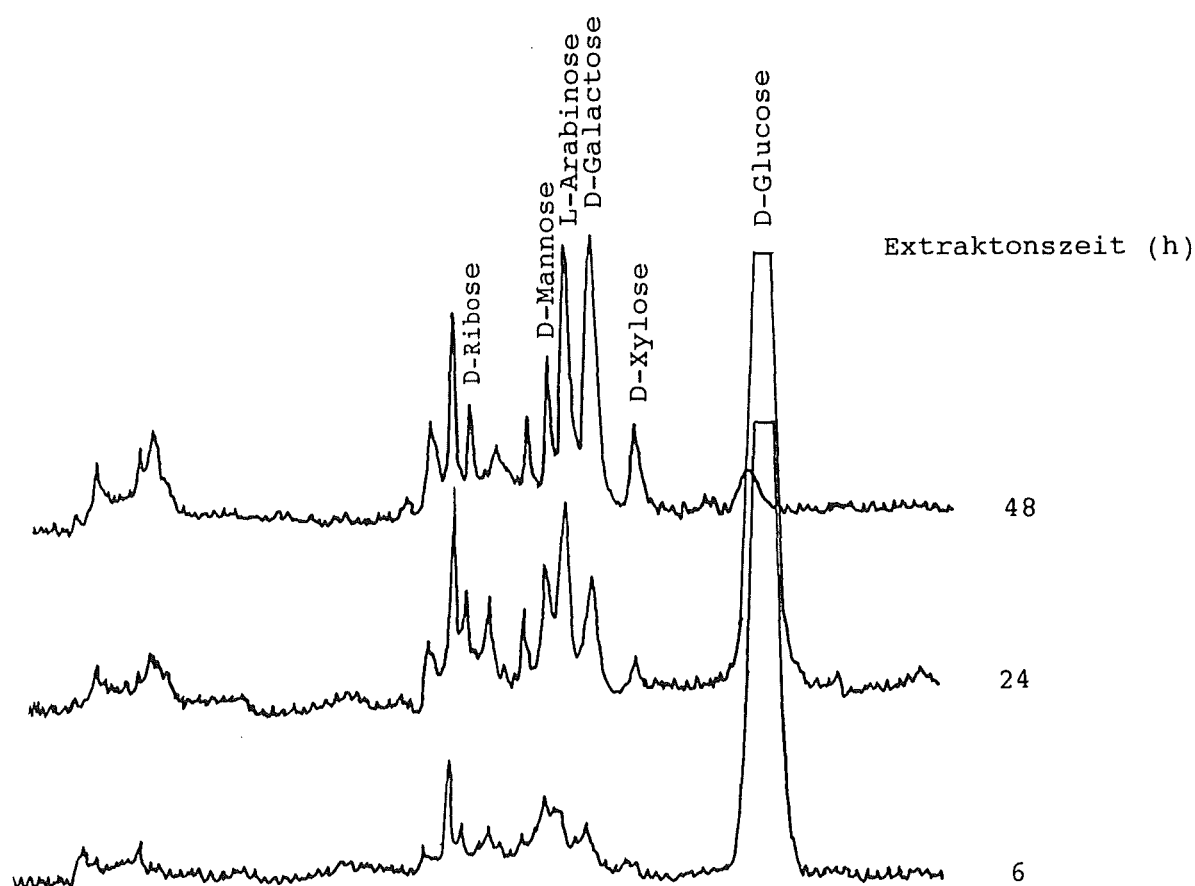


Abb. 12: Chromatogramme von Fichtenrindenmulch-Extrakten nach Extraktionszeiten von 6, 24 und 48 Stunden.

Um die oligo- und polymeren Zuckerverbindungen zu quantifizieren, wurden die Extraktproben nach 6, 24 und 48 Stunden mit Salzsäure hydrolysiert und aufgetrennt. Es konnten wiederum D-Glucose, D-Xylose, D-Galaktose, L-Arabinose, D-Mannose und zusätzlich L-Rhamnose identifiziert werden (Tab. 10).

Bei den Zuckerbestimmungen nach der Hydrolyse konnte L-Arabinose nicht mehr detektiert werden. Dies ist wahrscheinlich auf eine Strukturveränderung während der Hydrolyse zurückzuführen. Die Konzentrationen der anderen Zucker (Xyl, Gal, Man) stieg mit zunehmender Extraktionszeit an, was darauf hindeutet, daß

verstärkt wasserlösliche Hemicellulosen, Pektine und andere Extraktionsprodukte freigesetzt wurden. Der Anteil an polymergebundener Glucose nahm im Gegensatz zur frei löslichen Glucose mit zunehmender Extraktionszeit zu. L-Rhamnose als Bestandteil der Pektine wurde erst in den 48 h-Extrakten nach der Hydrolyse nachgewiesen.

Tab. 10: Zuckerzusammensetzung der Totalhydrolysate und Kaltwasserextrakte von Fichtenrinde (in %, bezüglich atro Gesamtrinde)
Ein Vergleich der eigenen Messungen mit denen von Dietrichs et al., 1978.

	Fru	Rha	Man	Ara	Gal	Xyl	Glu	Summe
Gesamtrinde	0,8	0,7	3,4	4,8	2,4	4,5	32,6	49,1
Kalt-Extrakt H ₂ O nach Dietrichs	0,1	0,2	0,3	0,8	0,9	0,1	2,8	5,2
Gesamtrinde	0	0,5	3,1	3,0	1,9	3,4	31,0	42,8
Kalt-Extrakt H ₂ O	0	0,06	0,01	0,02	0,09	0,04	0,09	0,3

Die Differenzen bei der quantitativen Zuckerzusammensetzung im Rindenmulch-Extrakt zwischen den eigenen Ergebnissen und den von Dietrichs et al. (1978) sind einmal auf unterschiedliche Extraktionsbedingungen (Rindenpartikelgröße, Mulch/Wasser-Verhältnis, Bestimmungsmethode), aber vor allem auf die Abhängigkeit der Rindenzusammensetzung vom Individuum Baum (Nährstoffversorgung, Alter usw.) zurückzuführen. So wiesen Dietrich und Mitarbeiter (1978) in einer anderen Fichtenrindenprobe nur Spuren von löslichen monomeren Zuckern nach.

3.1.2.3 Ergebnisse der Massenspektrenanalyse (GC-MS)

GC-MS-Analysen wurden sowohl an Extraktproben als auch an Proben des Reaktorablaufwassers (R1, R2 & R4) durchgeführt. Die erhaltenen Massenspektren wurden mit bekannten Spektren einer Computerbibliothek verglichen. Dabei konnten die Inhaltsstoffe teilweise identifiziert werden. Auf Grund fehlender Vergleichs-

substanzen stehen weitere Identifikationen der extrahierten Substanzen noch aus.

In beiden Probenmaterialien wurden sowohl aliphatische als auch aromatische Verbindungen qualitativ nachgewiesen. Häufig traten kurzkettige, leicht lösliche Carbonsäuren auf: Butansäure (Buttersäure), Pentansäure (Valeriansäure), Pentensäure, Hexansäure (Capronsäure) und Octansäure (Caprylsäure), sowie Aceton und Essigsäure. Möglicherweise sind die Säuren Bruchstücke von längerkettigen Fettsäuren und könnten somit Bestandteile von Wachsen und Suberinen sein.

Weiterhin wurden in den Extraktproben die heterocyclischen Verbindungen 2-Furancarbonsäure (Brenzschleimsäure) und Furfurylalkohol nachgewiesen, die nach Oxidation (Furancarbonsäure) bzw. nach Reduktion (Furfurylalkohol) aus Furfurol entstehen können. Das Furfurol könnte durch die aufbereitungsbedingte Ansäuerung der Proben (s. 2.4.16) aus Pentosen (z.B. Arabinose, Xylose) entstanden sein.

Als aromatische Verbindungen wurden Phenol, Dimethylbenzol (Xylol), Benzoesäure, eine Hydroxybenzoesäure, sowie die aus der Literatur bekannten Extraktinhaltsstoffe Protokatechusäure (Abb. 13), Vanillinsäure und Guaiacol (Browning, 1963; Fengel & Wegener, 1984) identifiziert. Einige der Verbindungen stammen aus dem Ligninmetabolismus oder sind Spaltprodukte von Pflanzenfarbstoffen.

Bei einer bicyclischen Verbindung handelt es sich wahrscheinlich um das zu den ätherischen Ölen gehörende Terpenketon α -Pinenon.

In größeren Mengen konnten nur Hexansäuren und Guaiacol in den Fichtenrindenextrakten nachgewiesen werden.

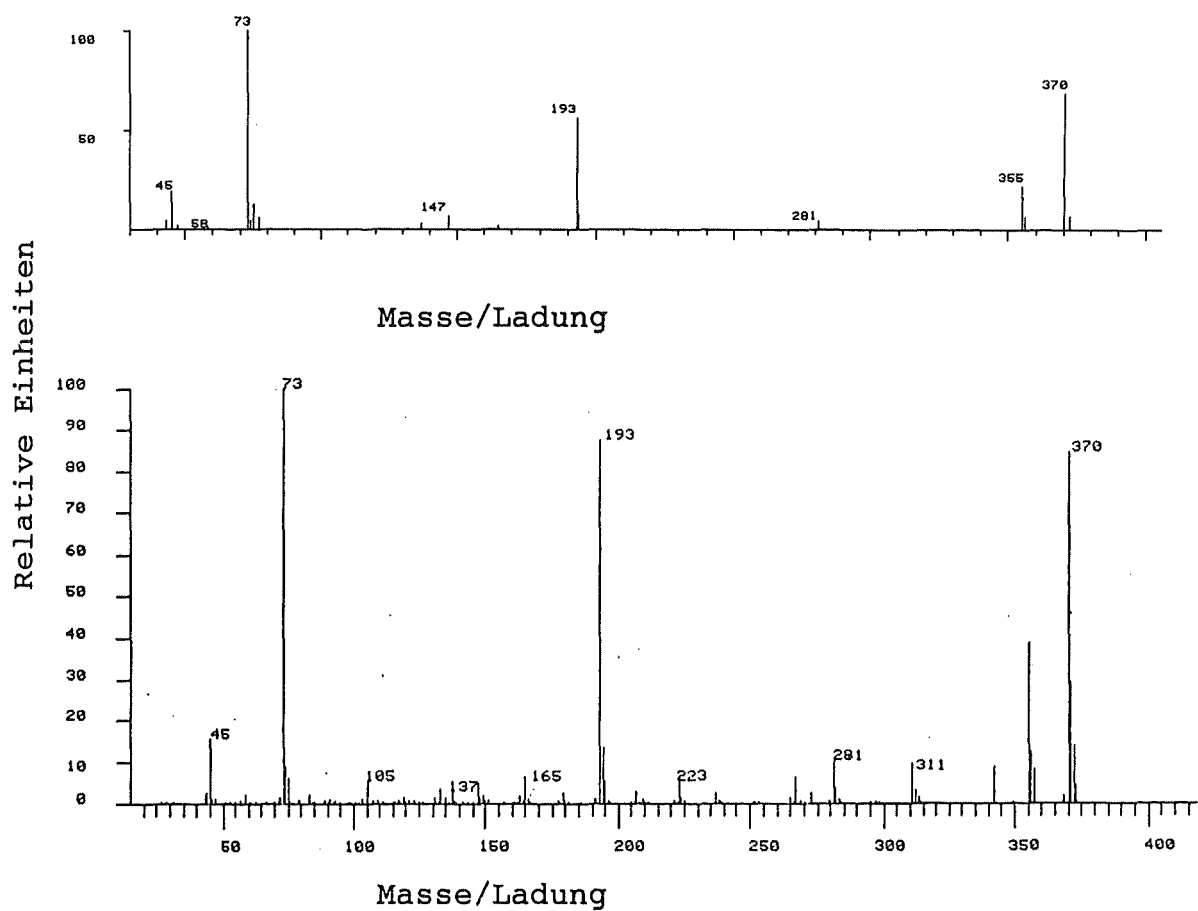


Abb. 13: GC-MS Spektrum einer unbekannten Substanz aus der Fichtenrinden-Extraktprobe im Vergleich zu dem Massenspektrum der Protocatechusäure.
(Oben unbekannte Substanz, unten Vergleichsspektrum von Protocatechusäure)

3.2 Denitrifikationsvermögen eines Rindenmulch-Denitrifikationsreaktors

Das RiMu-Verfahren zur Nitratabbau im Trinkwasser ist gekennzeichnet durch die Nutzung von Fichtenrinde als Aufwuchsmaterial und Kohlenstoffquelle für die Mikroorganismen im Reaktor. Nach den Extraktionsversuchen und den Ergebnissen von Landt (1986) konnte davon ausgegangen werden, daß die maximale DOC-Freisetzung und Denitrifikationsleistung in den ersten Betriebswochen erreicht wird und dann absinkt. Im Gegensatz dazu wird bei den üblichen biologischen Denitrifikationsverfahren eine C-Verbindung, meist Ethanol oder Essigsäure, stöchiometrisch oder überstöchiometrisch zugeführt, so daß eine Steuerung der Nitratkonzentration im Ablauf durch diese Zudosierung möglich ist. Es wurde erwartet, daß im RiMu-Reaktor die Nitratabbauleistung in erster Linie von der DOC-Freisetzung aus der Rinde und von der Besiedlung der Rinde mit denitrifizierenden Mikroorganismen abhängt.

In den folgenden Versuchen sollten die Standzeiten der Fichtenrinde im Denitrifikationsreaktor bei Raumtemperatur (3.2.1) und bei typischen Grundwassertemperaturen (3.2.2) untersucht werden. Bei konstanter Durchflußmenge wurden nach Absinken der Denitrifikationsraten im Reaktor Versuche zur Steigerung der Denitrifikationsleistung durchgeführt (3.3). Der Einfluß der Durchflußrate auf die Nitratabbauleistung wurde in der technischen Pilotanlage überprüft (3.6).

3.2.1 Langzeitversuche mit Laborreaktoren bei Raumtemperatur

In vielen Arbeiten ist beschrieben, daß die Denitrifikation erheblich durch molekularen Sauerstoff im Wasser beeinträchtigt wird (z.B. Rheinheimer et al., 1988; Rohmann & Sontheimer, 1985). Von der Arbeitsgruppe um Ottow (Gök, 1987; Sommer & Ottow, 1985) wurde jedoch gezeigt, daß molekularer Sauerstoff im Medium die Denitrifikationsrate steigert, wenn Cellulose oder Stroh als Substrat für die Denitrifikation eingesetzt wird. Es muß aber unterschieden werden zwischen dem zu messenden Gelöstsauerstoff im Medium (Wasser) und dem tatsächlichen

Sauerstoffgehalt am Reaktionsort (Biofilm an der Mulch/Wasser-Grenzschicht). So herrscht gerade in Biofilmen ein hohes Sauerstoffgefälle, was bei Untersuchungen von Christensen & Harremöes (1977) dazu führte, daß eine Denitrifikation erst bei O_2 -Konzentrationen $> 2 \text{ mg/l}$ gehemmt wurde. Um den Einfluß von Sauerstoff auf die Denitrifikation im Rindenmulch-Reaktor zu erforschen, wurde Reaktor R1 mit sauerstoffabgereichertem Wasser ($< 2 \text{ mg } O_2/\text{l}$) und R2 mit sauerstoffreichem Wasser ($7,8 \text{ mg } O_2/\text{l}$) beschickt.

Die ersten Versuche wurden mit untemperierbaren Laborreaktoren R1 und R2 bei mittleren Raumtemperaturen von $19\text{--}22^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Die Betriebsbedingungen sind in der Tabelle 11 aufgelistet.

Tab. 11: Betriebsparameter der Versuche in untemperierbaren Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.

	R1	R2
Rindeneinwaage (g)	350	350
Lagerungszeit d. Rinde bei Versuchsbeginn (Monate)	2	2,5
Durchfluß (l/d)	11,4	11,0
Temperatur ($^\circ\text{C}$)	$21,6 \pm 1,0$	$19,4 \pm 1,6$
Zulauf:		
$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/l)	$16,1 \pm 0,5$	$16,4 \pm 0,6$
DOC (mg C/l)	$1,4 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$
O_2 (mg/l)	$1,2 \pm 1,0$	$8,9 \pm 1,0$
pH	$8,8 \pm 0,3$	$8,5 \pm 6,1$
Lf (μS)	580 ± 9	580 ± 11
Besonderheit	-	Rinde 5 Tage ausgelaugt

Abbildung 14 zeigt die Nitrat- und Nitritkonzentrationen im Zu- und Ablauf von Versuch R1 während einer Versuchsdauer von 90 Tagen.

Drei Tage nach Inbetriebnahme wurden im Reaktor bei Zulaufkonzentration von $16,1 \pm 0,5 \text{ mg } \text{NO}_3\text{-N/l}$ Nitratkonzentrations-

abnehmen von durchschnittlich 54 % gemessen. Ab dem 35. Versuchstag stieg die NO_3 -Konzentration im Reaktorablauf auf $10,5 \pm 1,5 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$. Zwischen dem 35. und 77. Versuchstag betrug der Nitratabbau durchschnittlich 34 %. Die niedrige Nitratkonzentration am 28. Versuchstag ($1,1 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$) und die relativ niedrigen Werte zwischen dem 78. und 90. Versuchstag waren durch erheblich verlängerte Aufenthaltszeiten infolge eines Defektes der Zudosierungspumpe bedingt.

Ab dem 140. Betriebstag wurde die Durchflußrate in R1 von $11,4 \text{ l/d}$ auf $4,8 \text{ l/d}$ gesenkt, um die Auswirkung auf die Nitratabbaurate zu untersuchen. Bei Nitratkonzentrationen im Zulauf von $17,6 \pm 1,7 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ wurden im Ablauf durchschnittlich $9,8 \pm 2,6 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ gemessen, dies entspricht einer Abbauleistung von ca. 44 %. Damit wurde bestätigt, daß auch bei betriebsälteren Reaktoren (140.-210. Betriebstag) durch Reduktion der Zulaufmenge eine gewünschte Ablauf-Wasserqualität gewährleistet werden kann.

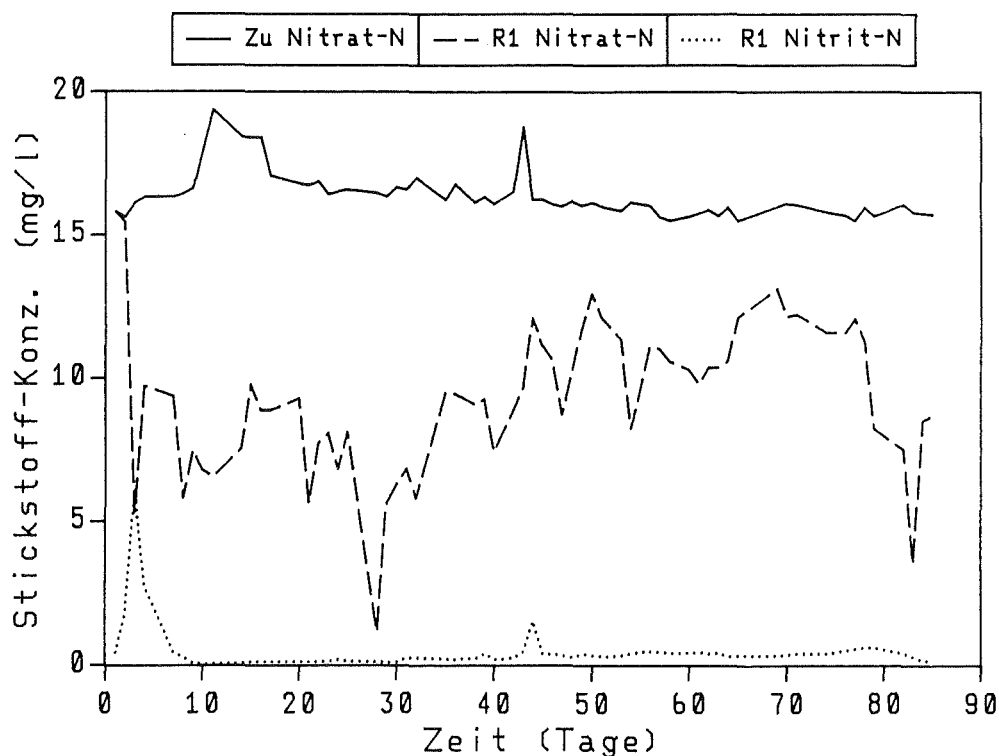


Abb. 14: Nitrat- und Nitritkonzentrationen in mg/l im Zu- und Ablauf bei untertemperierten Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren (R1).

Nitrit als erstes Reduktionsprodukt der Denitrifikation wurde direkt nach Inbetriebnahme (im ersten Reaktorablauf) gemessen. Die Nitritkonzentration stieg zu Beginn rasch auf maximal 6,1 mg NO₂-N/l an. Nach einer Abnahme der Konzentration auf Werte um den Grenzwert der TVO (0,1mg NO₂-/l $\equiv$ 0,03mg NO₂-N/l) folgte nach 15 Betriebstagen ein Anstieg auf durchschnittlich 0,11 $\pm$ 0,03 mg NO₂-N/l und nach 35 Tagen auf 0,42 $\pm$ 0,25 mg NO₂-N/l. Der Grenzwert von 0,03 mg NO₂-N/l wurde während des weiteren Versuchsbetriebes nicht unterschritten.

Abbildung 15 zeigt die Nitrat- und Nitritkonzentrationen des Reaktorzu- und -ablaufs von Versuchsreaktor R2 während einer Betriebsdauer von 80 Tagen. Im Gegensatz zu R1 wurde bei diesem Versuch die Fichtenrinde 5 Tage in Leitungswasser "ausgelaugt", um die starke Gelbfärbung des Reaktorablaufs in den ersten Tagen zu senken. Der mit KNO₃ auf 16,4 $\pm$ 0,6 mg NO₃-N/l eingestellte Reaktorzulauf blieb während des Versuchs sauerstoffgesättigt. Es zeigte sich bereits in den ersten Tagen nach Versuchsbeginn ein Nitratabbau von 64 %. Dies läßt auf eine Besiedlung des Rindenmulches mit nitratabbauenden Mikroorganismen und Adaptation der Denitrifikanten während der Auslaugung schließen.

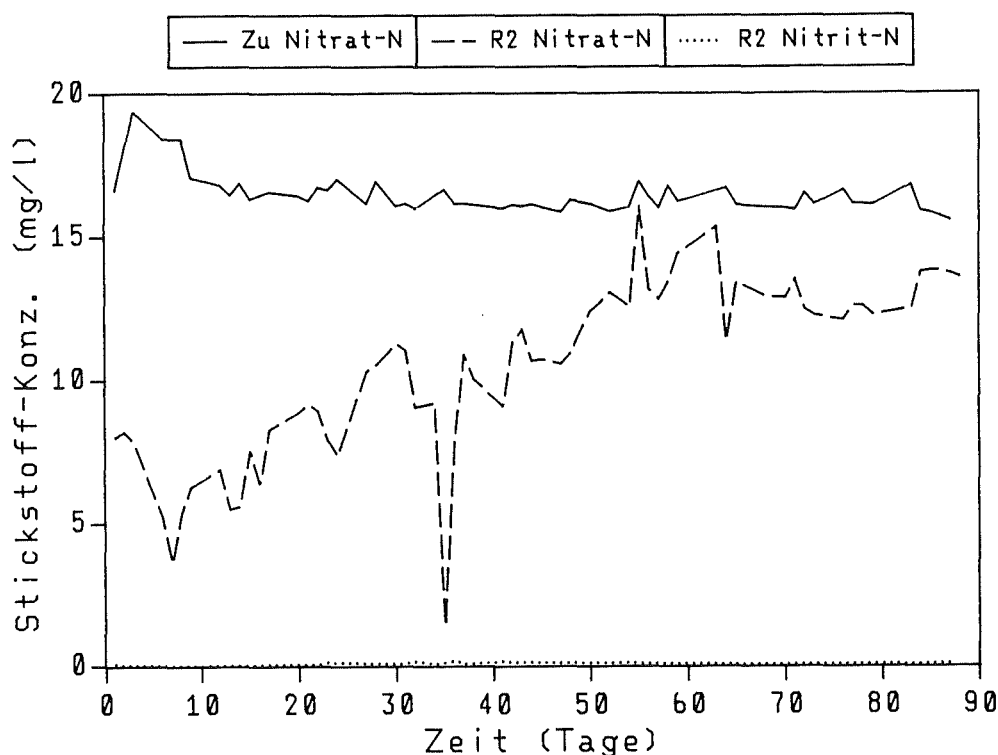


Abb. 15: Nitrat- und Nitritkonzentrationen in mg/l im Zu- und Ablauf bei untertemperierten Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren (R2).
Die Rinde wurde vor Versuchsbeginn 5 Tage gewässert.

Im Verlauf der ersten 55 Versuchstage sank der Nitratabbau bis zu 13 % Abbauleistung ab. Unterbrochen wurde die damit verbundene Zunahme der Nitratkonzentration im Reaktorablauf am 35. Betriebstag durch einen extrem niedrigen NO_3^- -Tageswert von etwa 1,4 mg NO_3^- -N/l, der auf Grund eines Pumpendefektes und daraus resultierender erhöhter Aufenthaltszeit des zu denitrifizierenden Wassers im Reaktor bedingt war. An diesen Tagen (siehe auch Versuch R1) traten erhöhte DOC- und SAK-Werte auf. Ab dem 50. Versuchstag lagen die Nitratkonzentrationen im Reaktorablauf mit durchschnittlich 13,1 mg NO_3^- -N/l beständig über dem Grenzwert der TVO (50 mg NO_3^- -N/l $\equiv$ 11,3 mg NO_3^- -N/l). Wäre das Ziel in diesem Versuchsabschnitt die Einhaltung der TVO-Grenzwerte gewesen, hätte man die Wasser-Zulaufmenge reduzieren müssen. Jedoch sollte zu einem späteren Zeitpunkt eine Denitrifikationssteigerung durch Rindenmulch-Teilerneuerung getestet werden (3.3.1).

Im Gegensatz zu R1 lagen die Nitritkonzentrationen im Reaktorablauf von R2 mit durchschnittlich $0,02 \pm 0,007$ mg $\text{NO}_2\text{-N/l}$ bis zum 15. Versuchstag weit unter dem Grenzwert der TVO. Während der folgenden Betriebszeit wurden Werte von durchschnittlich $0,09 \pm 0,04$ mg $\text{NO}_2\text{-N/l}$ gemessen.

Bedingt durch die Wässerung des Rindenmulches lag der anfängliche DOC-Gehalt im Ablauf von R2 um ca. 90 % niedriger als bei Versuch R1:

R1: maximale DOC-Konzentration 204 mg C/l

R2: maximale DOC-Konzentration 22 mg C/l

Ab dem 30. bzw. 25. Betriebstag der Denitrifikationsanlagen R1 und R2 wurden DOC-Konzentrationen von < 3 mg C/l gemessen.

Beim Vergleich der spezifischen Nitratabbauleistungen von R1 und R2 im Hinblick auf den Einfluß der unterschiedlichen Sauerstoffkonzentration im zulaufenden Wasser konnte kein gravierender Unterschied festgestellt werden. Die Abbauleistungen der ersten 40 Betriebstage lagen bei R2 mit durchschnittlich $0,033$ kg $\text{NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ sogar geringfügig über den Leistungen in R1 mit $0,031$ kg $\text{NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$. Während der weiteren Betriebszeit (bis zum 85. Betriebstag) wurden in beiden Reaktoren spezifische Abbauleistungen von $0,019$ kg $\text{NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ erreicht. Ein Grund für die geringe Beeinträchtigung der Denitrifikationsrate könnte die von Misra et al. (1977) gemachte Feststellung sein, daß die Denitrifikationsrate durch Sauerstoff im niedrigen Temperaturbereich stärker gehemmt wird als bei hohen Temperaturen. Im Rahmen einer Diplomarbeit untersuchte Uhe (1991) den Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentrationen im Zulauf-Wasser auf die Nitratabbauraten der technischen Rindenmulch-Pilotanlage (4.2).

3.2.2 Nitratelimination mit Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren bei konstant niedriger Temperatur

Über die Temperaturabhängigkeit der Denitrifikation gibt es zahlreiche Veröffentlichungen. So liegt nach Bremner & Shaw (1958), Keeney et al. (1979) und Nömmik (1956) das Temperatur-optimum für Denitrifikanten im Boden zwischen $60\text{--}65^\circ\text{C}$. Eine Denitrifikation wurde auch bei $0\text{--}5^\circ\text{C}$ nachgewiesen (Bailey &

Beauchamp, 1973; Bremner & Shaw, 1958). Dabei wurde festgestellt, daß bei diesen Temperaturen eine relativ größere Menge an N_2O - statt N_2 -Gas gebildet wird (Broadbent & Clark, 1965; Nommik, 1956). Im Temperaturbereich zwischen 10°C und 65°C erreicht man eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um 10°C (Rohmann & Sontheimer, 1985).

Zur Simulation der Temperaturverhältnisse in einer großtechnischen Rindenmulch-Denitrifikationsanlage wurden die Denitrifikationsleistungen in Laborreaktoren (2.1.2) bei 10°C , der durchschnittlichen Grundwassertemperatur, bestimmt.

Da im großtechnischen Betrieb die Denitrifikationsanlage direkt mit Grundwasser gespeist wurde, war mit größeren Temperaturschwankungen nicht zu rechnen. Unter diesen Bedingungen bildet sich im Denitrifikationsreaktor bei gleichbleibend niedrigen Temperaturen (10°C) eine Biozönose aus, die an diese Temperatur adaptiert ist (Christensen & Harremoës, 1978; Hartmann, 1983). Lange (1989) wies nach, daß bei einer Langzeitadaptation Bakterienmischkulturen bei 10°C noch ca. 35 % der Nitratabbauleistung aufwiesen, die sie bei 20°C zeigten.

Die Betriebsparameter der einzelnen Versuchsreihen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Im folgenden werden die Ergebnisse aller Reaktoren zusammengefaßt und nur Abweichungen vom "Normal-Verhalten" speziell beschrieben.

Tab. 12: Betriebsparameter der Versuche in temperierbaren Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.

	R4	R5	R6	R7
Rindeneinwaage (g)	450	450	450	450
Lagerungszeit der Rinde bei Versuchsbeginn (Monate)	11	18,5	20,5	1
Durchfluß (l/d)	12,1	11,2	3,1	3,1
Temperatur (°C)	10	10	10	10
Zulauf:				
NO ₃ -N (mg/l)	17,1 ± 1,3	16,7 ± 0,5	15,5 ± 1,3	14,4 ± 1,4
DOC (mg C/l)	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2
O ₂ (mg/l)	1,0 ± 0,4	1,4 ± 0,4	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2
pH	8,6 ± 0,3	7,3 ± 0,2	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1
Lf (µS)	580 ± 9	580 ± 11	606 ± 16	591 ± 16

In der ersten Phase nach Inbetriebnahme der Reaktoren fand hauptsächlich eine Auswaschung der Fichtenrinde statt, was durch den Vergleich der Abbildungen 16 und 17 deutlich wird. Diese Auslaugphase war gekennzeichnet durch die hohen CSB- (Maxima 522 ± 52 mg/l) und DOC-Konzentrationen (Maxima 198 ± 23 mg/l) im Ablauf.

Einfach nachzuweisen war diese verstärkte Auswaschung anhand der Leitfähigkeit oder mit Hilfe der visuell und photometrisch bestimmten Färbung des Wassers. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 254 nm zeigte eine eindeutige Korrelation mit der DOC-Konzentration (Abb. 19, s. auch 3.2.2.2), so daß diese Messung als eine schnelle Bestimmungsmethode für die DOC-Konzentration eingesetzt werden konnte.

Kennzeichen für die Auslaugungsphase waren neben der Elution von organischen Substanzen auch die Auswaschung von anorganischen Substanzen wie Phosphat (Abb. 16) und Ammonium (Abb. 22). Der Anstieg der Nitratkonzentration in den ersten Tagen im Reaktorablauf gegenüber der zudosierten NO₃-Menge lassen ebenfalls auf eine Nitratauswaschung schließen (Abb. 20, 21, 22).

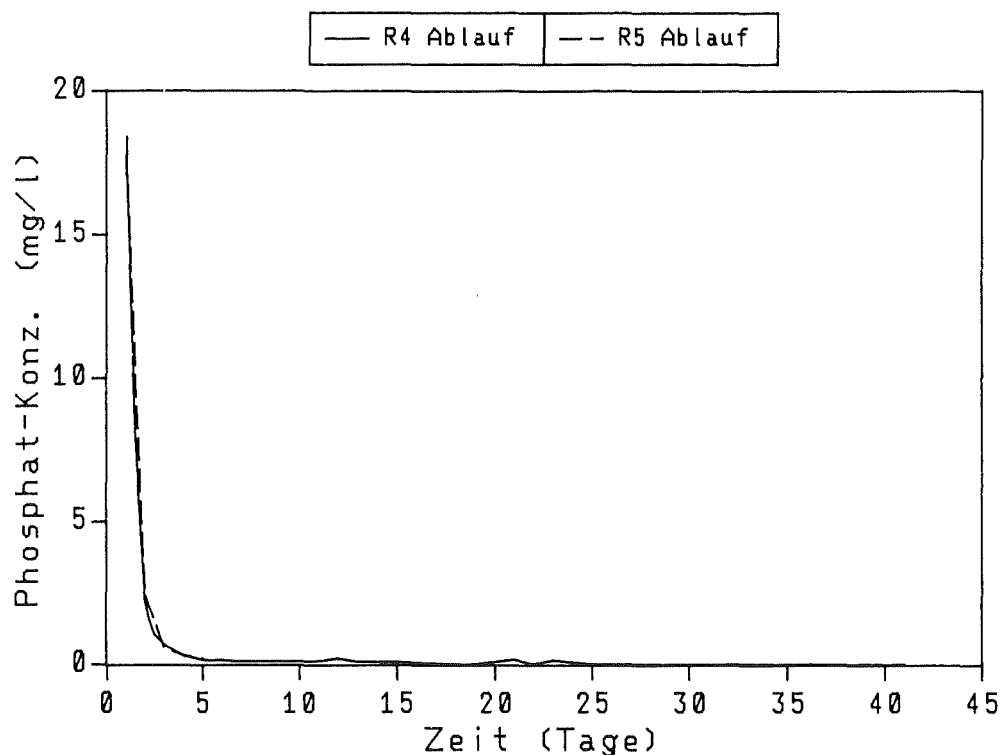


Abb. 16: Phosphatkonzentrationen im Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.

R4: $D = 12 \text{ l/d}$; R5: $D = 11 \text{ l/d}$.

3.2.2.1 DOC-Messungen

Die DOC-Konzentration im zugeführten Leitungswasser betrug im Durchschnitt $1,5 \pm 0,1 \text{ mg C/l}$.

Im Reaktorablauf lagen die maximalen Konzentrationen an gelösten organischen Substanzen zwischen 168 und 274 mg C/l. Nach einer exponentiellen DOC-Abnahme während der ersten Tage (Abb. 17) sanken die Ablauf-Konzentrationen nur noch langsam und erreichten bei den hohen Durchflußraten (R1, R4 und R5) nach ca. 20 Betriebstagen Werte unter 5 mg C/l. Bei den Reaktoren mit niedrigen Durchflußraten (R6 und R7) betrugen die Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt noch durchschnittlich 12 mg C/l.

Die gemessenen DOC-Konzentrationen im Reaktorablauf entsprachen mit zunehmender mikrobieller Besiedlung immer weniger der tatsächlichen DOC-Freisetzung bzw. dem verfügbaren organischen Kohlenstoffpotential, sondern waren Ergebnis der DOC-Freisetzung vermindert um den Verbrauch für die Denitrifikation und Biomasseproduktion.

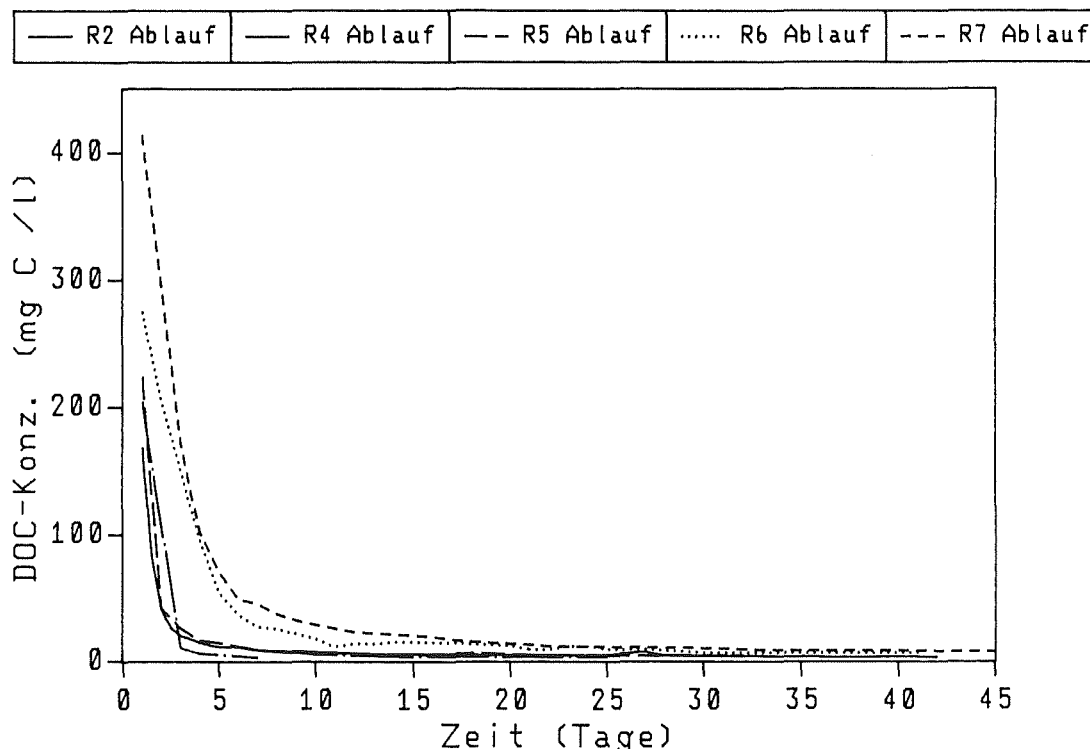


Abb. 17: DOC-Konzentrationen im Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.

R1 & R4: $D = 12 \text{ l/d}$; R5: $D = 11 \text{ l/d}$;
 R6 & R7: $D = 3 \text{ l/d}$.

Eine Abhängigkeit der DOC-Konzentration von der Verweilzeit des Wassers im Reaktor wurde, wie auch von Becker (1988) in Strohpertkolatoren, bei den Rindenmulchreaktoren festgestellt. Mit zunehmender Durchflußrate (abnehmender Aufenthaltszeit) sank die DOC-Konzentration im Ablauf.

Der Einfluß der Rindencharge auf die DOC-Freisetzung wird durch den Ansatz R7 deutlich. Im Vergleich zu R6 (gleiche Durchflußrate) war während des gesamten Versuchszeitraumes eine erhöhte DOC-Konzentration im Reaktorablauf meßbar (Abb. 17).

3.2.2.2 Spektrenaufzeichnungen und SAK

Mit Hilfe der Spektrenaufzeichnungen wurden Veränderungen im Absorptionsverhalten der Reaktorablaufproben festgestellt, die mit einer verminderten Färbung des Wasser gekoppelt waren.

Die Spektrenaufzeichnungen (Abb. 18) in dem Wellenlängenbereich 190-700 nm im ersten Reaktor-Ablaufwasser zeigten Absorptions-

sättel bei 280, 330 und 360 nm, die auf Anwesenheit von Huminsäuren und Ligninderivaten hinweisen. Das charakteristische Spektrum von Ligninsulfonsäuren (aus dem Abwasser der Zellstoffindustrie) weist ein Minimum bei 260 nm und einen Sattel (je nach pH-Wert) bei 280 nm auf (Haberer, 1985; Sontheimer et al., 1980). Zur genaueren Untersuchung hätten weitere Aufbereitungsschritte unternommen werden müssen (Sontheimer & Wagner, 1977). Nach 4-5 Tagen traten diese Sättel nicht mehr auf.

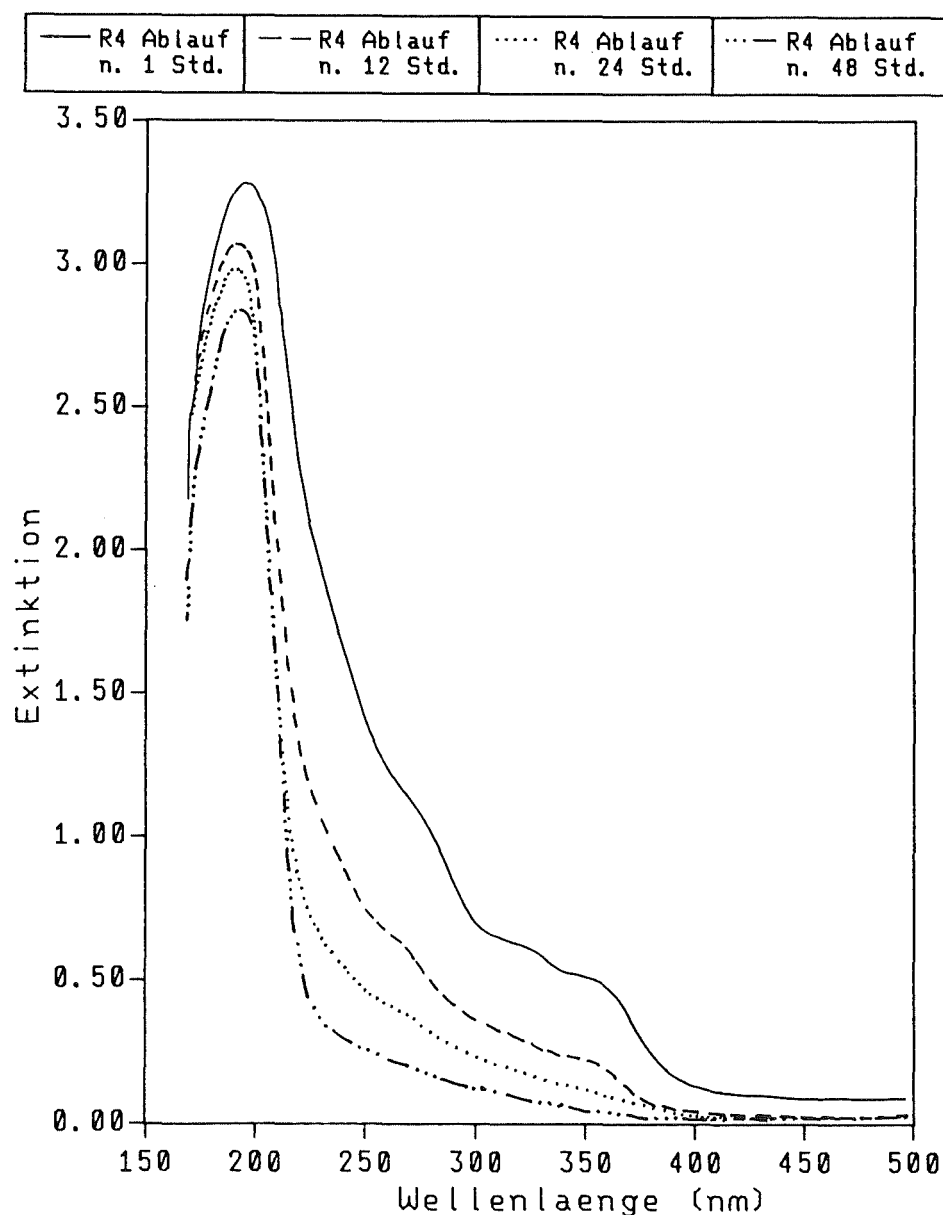


Abb. 18: Spektrenaufzeichnungen des Rindeneleuats von Versuchsreaktor R4 zu verschiedenen Betriebsstunden.

Der SAK_{254} ist ein Maß für die Färbung eines Wassers, die beim Rindenuelat hauptsächlich durch Huminstoffe, Ligninverbindungen und andere chromophore Verbindungen hervorgerufen wird. Durch die Wahl der Wellenlänge wurde zum einen sichergestellt, daß die UV-Absorption von NO_3^- , dessen Maximum bei 205 nm liegt, keinen Einfluß hatte, zum anderen wurden typische Absorptionseigenschaften der Rindenextrakte (s. Spektrenaufzeichnung) damit festgehalten. Auch von anderen Autoren wird der SAK-Wert als Kontrollparameter bei Veränderungen der Wasserqualität und zur Charakterisierung organischer Inhaltsstoffe genutzt (Haberer, 1985; Lienig & Schmidt, 1978; Randow & Ebert, 1982; Sontheimer & Wagner, 1977). Lienig & Schmidt (1978) fanden Relationen zwischen DOC und UV-Extinktionen bei 254 nm für ein Flußwasser. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,991$ kann bei den eigenen Ergebnissen von einer linearen Abhängigkeit gesprochen werden (Abb. 19). Im Falle der Freisetzung gelöster organischer Substanzen aus der Fichtenrinde beim Betrieb eines Denitrifikationsreaktors kann somit anstelle der kontinuierlichen DOC-Bestimmung die wesentlich einfachere Messung der UV-Extinktion bei 254 nm erfolgen. Dies gilt vorzugsweise im DOC-Bereich bis 50 mg C/l, bei höheren Konzentrationen lagen die SAK-Werte weit unterhalb der Regressionsgeraden und verfälschten das Ergebnis. Die Korrelation sollte jedoch in bestimmten Zeitabständen und bei Änderung der Rindencharge überprüft werden.

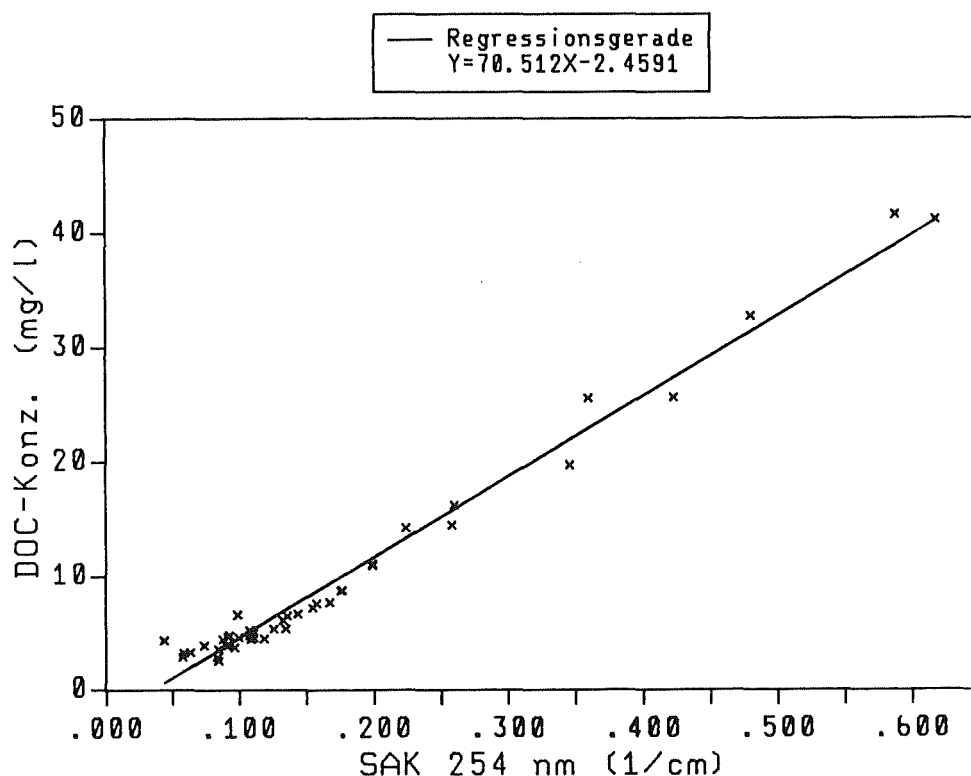


Abb. 19: Korrelation zwischen dem Spektralen Absorptionskoeffizienten bei 254 nm (SAK) und dem Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC) eines Rindenmulch-Denitrifikationsreaktors.

3.2.2.3 Stickstoffparameter

Im Ablauf der Laborreaktoren wurde innerhalb der ersten Betriebswochen eine starke Abnahme der Nitratkonzentration gemessen. Dabei spielte das Rindenalter und die -charge, die Durchflußmenge und die Temperatur eine große Rolle. In den auf 10°C gekühlten Reaktoren R4 und R5 (Abb. 20 & 21) waren die Abbauraten nicht so hoch wie bei der relativ frisch eingesetzten Rinde (gleiche Charge) der bei Raumtemperatur betriebenen Reaktoren R1 und R2. Bei Versuch R6 zeigte sich wie erwartet eine Steigerung der Nitratabbauleistung auf Grund der niedrigeren Durchflußmenge und damit erhöhten Aufenthaltszeit des zu denitrifizierenden Wassers im Reaktor (Abb. 22). Wurden bei R5 Nitratkonzentrationen von 12,7 mg NO₃-N/l im Ablauf erreicht, so sank die Konzentration bei einer 3,7-fach längeren Aufenthaltszeit in R6 auf 5,8 mg NO₃-N/l. In beiden Anlagen wurden diese Abbau-

raten nur während der ersten fünf Tage erzielt. Es folgte ein Anstieg der Nitratkonzentrationen im Reaktorablauf, wobei in R6 mit 52 % (bis zum 16. Betriebstag) und 33 % (16.-50. Betriebstag) höhere Nitratabbauraten als in R5 mit durchschnittlich 14 % erreicht wurden.

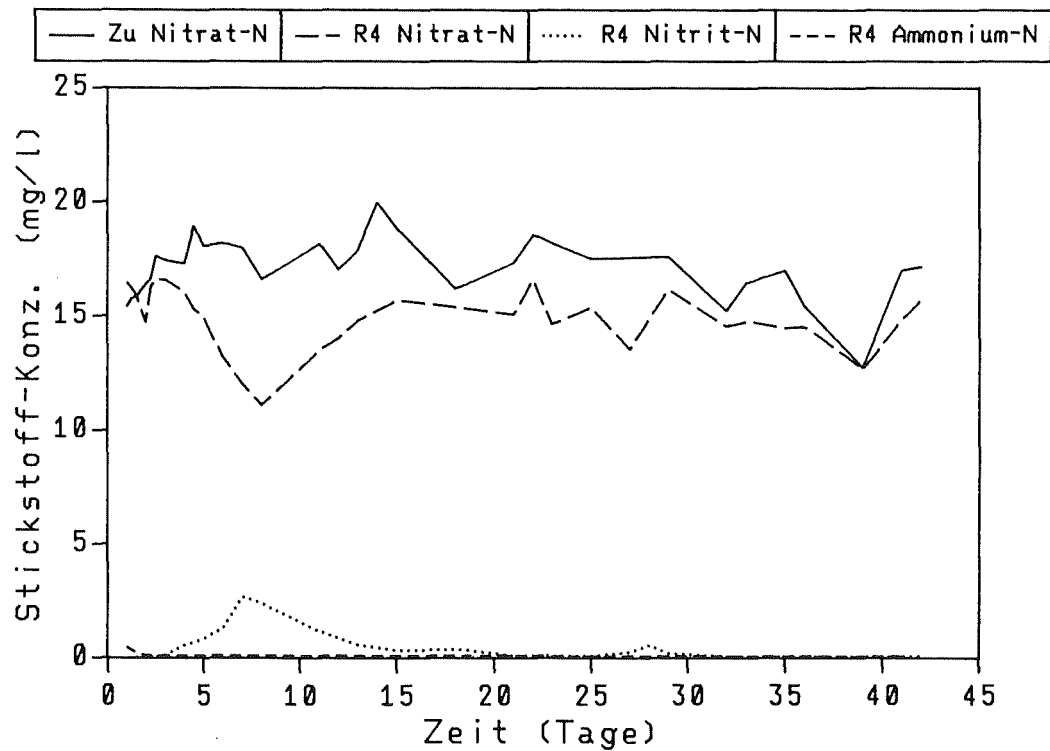


Abb. 20: Stickstoffparameter in mg/l im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R4.

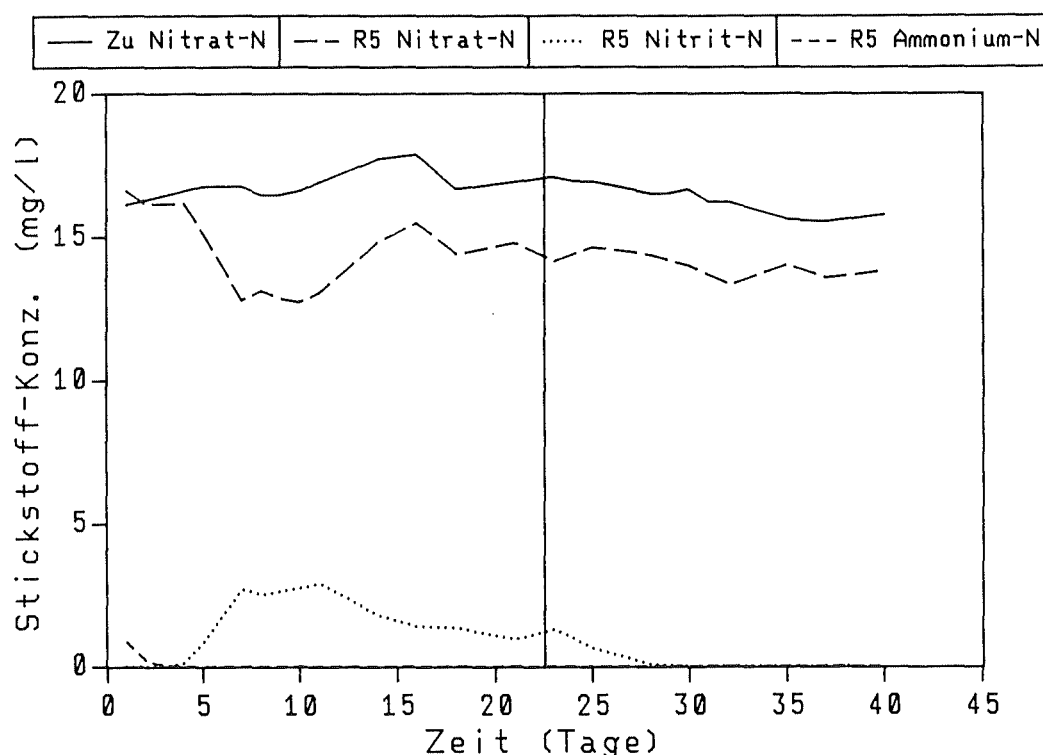


Abb. 21: Stickstoffparameter in mg/l im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R5.

Bei R7 wurde eine neue Rindencharge (s. 2.2) genutzt, die trotz der Betriebstemperatur von 10°C einen guten und dauerhaften Nitratabbau gewährleistete (Abb. 23). Nach anfänglichen Abbauleistungen von 48 % konnte im Zeitraum vom 14.-24. Betriebstag kein Nitrat im Reaktorablauf nachgewiesen werden. Im darauffolgenden Versuchszeitraum stiegen die Ablaufkonzentrationen auf $3,2 \pm 0,6$ mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$, die Nitratabbaurrate lag bei durchschnittlich 79 %. Die Nitritkonzentrationen war zu diesem Zeitpunkt mit durchschnittlich 2,3 mg $\text{NO}_2\text{-N/l}$ noch erhöht.

Ab dem 50. Betriebstag wurde die Stickstoffbegasung zur Verminderung der O_2 -Konzentration im Zulauf-Wasser abgestellt. Bei Sauerstoffkonzentrationen von $5,9 \pm 0,7$ mg $\text{O}_2\text{/l}$ im Zulauf wurden während der nächsten 50 Betriebstage Abbauleistungen von durchschnittlich 93 % erzielt. Nitrit konnte in dieser Zeitspanne nicht nachgewiesen werden.

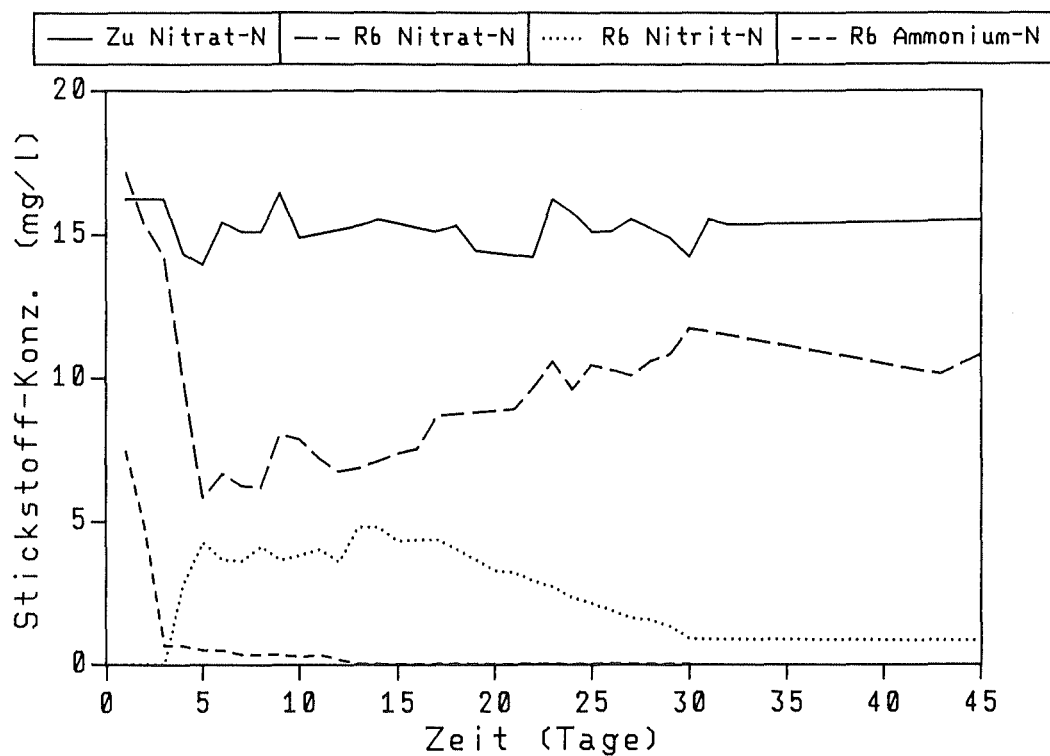


Abb. 22: Stickstoffparameter in mg/l im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R6.

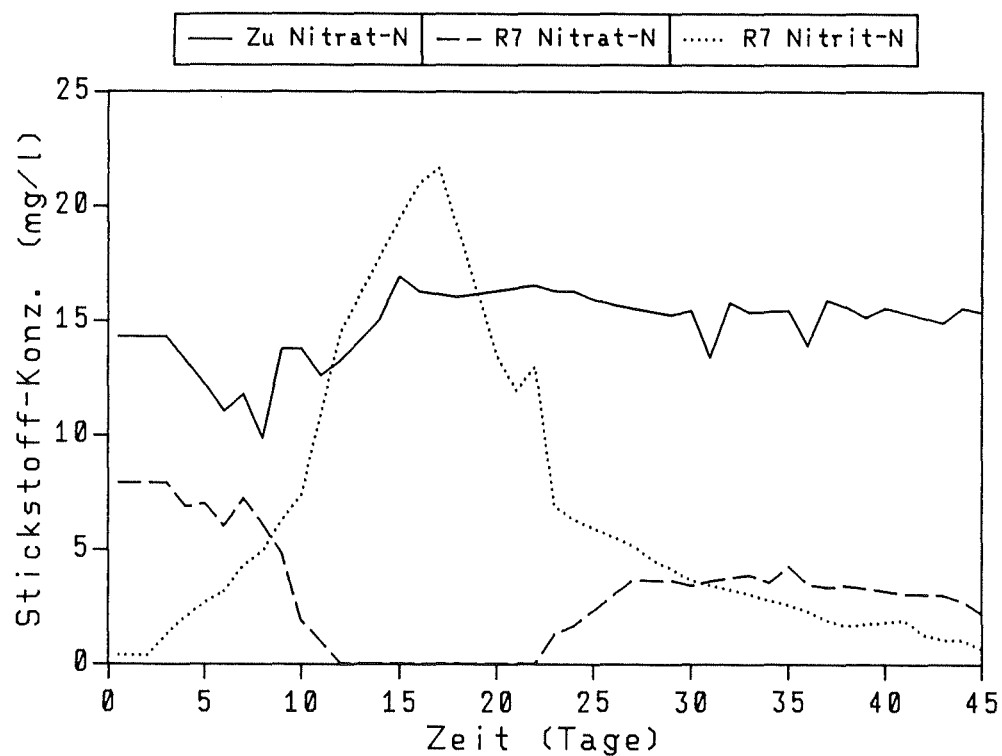


Abb. 23: Stickstoffparameter in mg/l im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R7.

Bei den Versuchen R4, R5 und R6 wurde am ersten Meßtag ein Anstieg der Nitratkonzentrationen gegenüber den zudosierten NO_3 -Mengen registriert. Dies läßt auf eine Nitrat Auswaschung aus dem Rindenmaterial schließen. Während der nächsten (fünf) Tage stiegen die Nitrat abbauraten auf die maximalen Werte an, die je nach Versuchsbedingungen unterschiedlich waren (s. Tab. 13).

Tab. 13: Vergleich der maximalen Nitrat abbauraten in vier verschiedenen temperierbaren Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.

Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus fünf Tagesmessungen.

Die Durchflußraten der einzelnen Reaktoren lagen bei 12 l/d (R4), 11 l/d (R5), 3 l/d (R6 + R7).

	max. NO_3 - Abbaurate (%)	max. spezif. NO_3 -Abbauleistung (kg NO_3 -N/m ³ ·d)	Anteil in NO_2 -N (%)	maximale NO_2 -N-Konz. (mg/l)
R4	30	0,019	35	2,7
R5	22	0,012	16	2,9
R6	57	0,006	45	4,8
R7	100	0,015	100	21,7

Gleichzeitig trat in allen Versuchen während der Phase des höchsten Nitrat abbau eine erhöhte Nitritkonzentration auf. Das Phänomen der Nitritakkumulation in der Anfangsphase ist bei fast allen biologischen Denitrifikationsverfahren und vor allem in Batch-Kulturen zu beobachten (Bollag et al., 1970; Kone & Behrens, 1981; Shimazu, 1978) und läßt darauf schließen, daß zuerst nur eine Nitratreduktion zu Nitrit stattfindet, da in einigen Organismen die Nitritreduktase zeitlich später synthetisiert wird (Williams et al., 1978). Dieser dem vollständigen Nitrat abbau sowohl zeitlich als auch in Säulenreaktoren räumlich vorangehende Nitrit-Peak wird von verschiedenen Autoren beschrieben (Claus & Kutzner, 1984; Landt, 1986; Wilderer et al., 1987).

Die Ergebnisse in Tabelle 13 machen deutlich, daß mit höheren Nitrat abbauraten zu Versuchsbeginn auch anteilmäßig mehr Nitrit akkumulierte. Die maximale Nitritkonzentration wurde im Reaktor mit den höchsten Nitrat anreicherungen nachgewiesen.

Ammonium wurde bei den Reaktoren 4, 5 und 6 nur zu Versuchsbeginn im Reaktorablauf gemessen, mit den Maximalkonzentrationen 0,5 mg/l $\text{NH}_4\text{-N}$ (R 4), 0,9 mg/l $\text{NH}_4\text{-N}$ (R 5) und 7,9 mg/l $\text{NH}_4\text{-N}$ (R 6). Ab dem 2., 4. bzw. 12. Tag waren die Konzentrationen $< 0,08$ mg/l $\text{NH}_4\text{-N}$. Die schnelle Abnahme läßt darauf schließen, daß es sich bei Ammonium, wie bei Phosphat, um ein Auswaschprodukt der Rinde handelt. Während des weiteren Versuchszeitraumes konnte kein Ammonium mehr nachgewiesen werden.

3.2.2.4 pH-Werte und Redoxpotential

Die pH-Werte im Leitungswasser der KFA mit durchschnittlich $\text{pH } 8,6 \pm 0,1$ lagen außerhalb des optimalen Bereichs für Denitrifikanten. Das pH-Optimum wird von verschiedenen Autoren zwischen $\text{pH } 7,0$ und $8,0$ angegeben (Rheinheimer et al., 1988). Aus diesem Grunde wurde bei einigen Laborreaktoren eine pH-Regulierung des Zulaufwassers auf Werte um $\text{pH } 7,0$ vorgenommen. Dabei muß beachtet werden, daß im Vergleich zum Aschaffener Brunnenwasser ($\text{pH } 6,9$; m-Wert $2,5$ mmol/l) das verwendete Leitungswasser der KFA mit m-Werten von durchschnittlich $1,4$ mmol/l eine deutlich niedrigere Säurekapazität besitzt, die durch die Senkung des pH-Wertes im Zulauf auf durchschnittlich $0,3$ mmol/l herabgesetzt wurde. Dadurch wirkte sich die Freisetzung von sauren Huminstoffen und organischen Säuren zu Beginn eines Reaktorbetriebes stärker auf den pH-Wert des Ablaufwassers aus.

Reaktor R4 wurde wie R1 und R2 (im Gegensatz zu R5, R6 und R7) mit nicht-pH-reguliertem Rohwasser ($\text{pH } 8,6 \pm 0,1$) beschickt (Abb. 24). Im ersten Reaktorablauf nach Inbetriebnahme lagen die pH-Werte bei $7,1$ (R1 und R2) bzw. $6,7$ (R4). Während der folgenden Betriebstage stiegen die Werte leicht an, doch blieben sie mit $\text{pH } 7,8 \pm 0,2$ (R1), $7,6 \pm 0,2$ (R2) und $7,7 \pm 0,1$ (R4) bis zum Versuchsende deutlich unter den Zulauf-pH-Werten. Bei den Langzeitversuchen von R1 und R2 waren nach 40 und 60 Betriebstagen geringe Abnahmen der pH-Werte im Reaktorablauf meßbar.

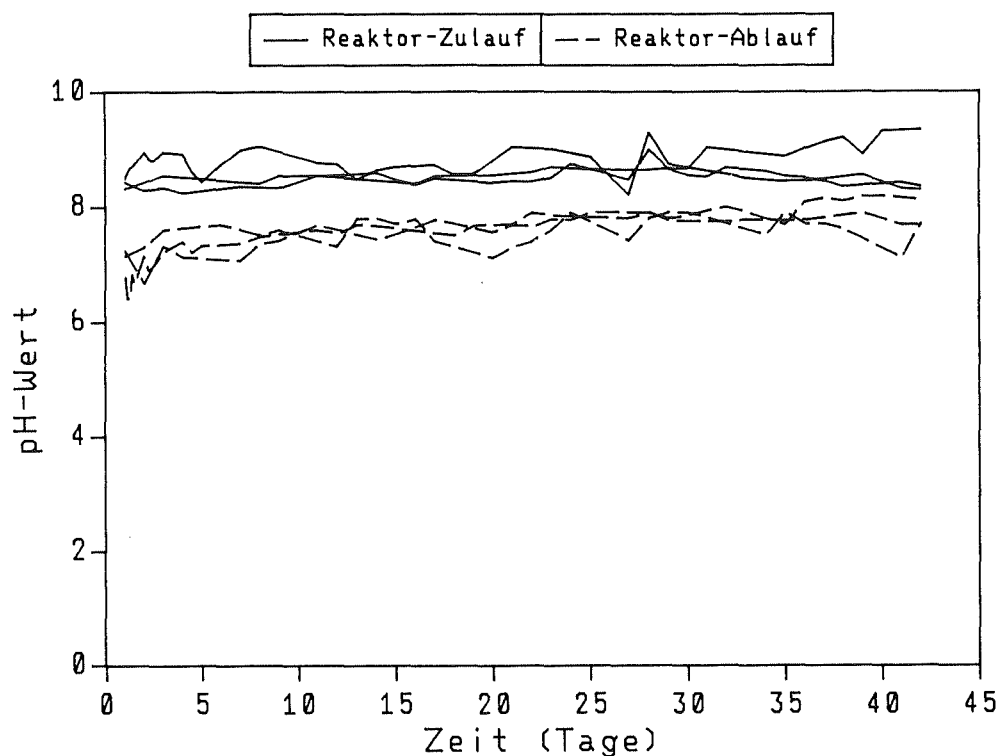


Abb. 24: pH-Werte im Zu- und Ablauf der Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren R1, R2 und R4.
Das zulaufende Leitungswasser war nicht pH-reguliert.

Zur Optimierung des pH-Wertes wurde mittels HCl-Dosierung im Zulauf von R5 ein pH von $7,3 \pm 0,2$ eingestellt. Da die pH-Werte im ersten Rindenmulch-Eluat relativ niedrig waren (pH 6,3), wurde der pH-Wert im Zulauf erst ab dem 4. Versuchstag, nach Erreichen von pH 7,3 im Ablauf von R5, reguliert. Infolge der pH-Senkung im zugeführten Wasser sank der pH-Wert im Ablauf während der nächsten Tage auf pH 6,5, um dann erneut auf durchschnittlich $pH\ 7,0 \pm 0,1$ anzusteigen.

Bei den Reaktoren R6 und R7 wurde von Versuchsbeginn an der pH-Wert im Zulauf auf $7,0 \pm 0,1$ eingestellt. Bei der frischen Rindencharge von R7 ist die anfängliche pH-Abnahme und der folgende pH-Anstieg besonders deutlich erkennbar (Abb. 25). Der niedrigste Wert wurde mit pH 5,2 am zweiten Betriebstag gemessen. Der pH-Wert am Versuchsende betrug pH 6,9.

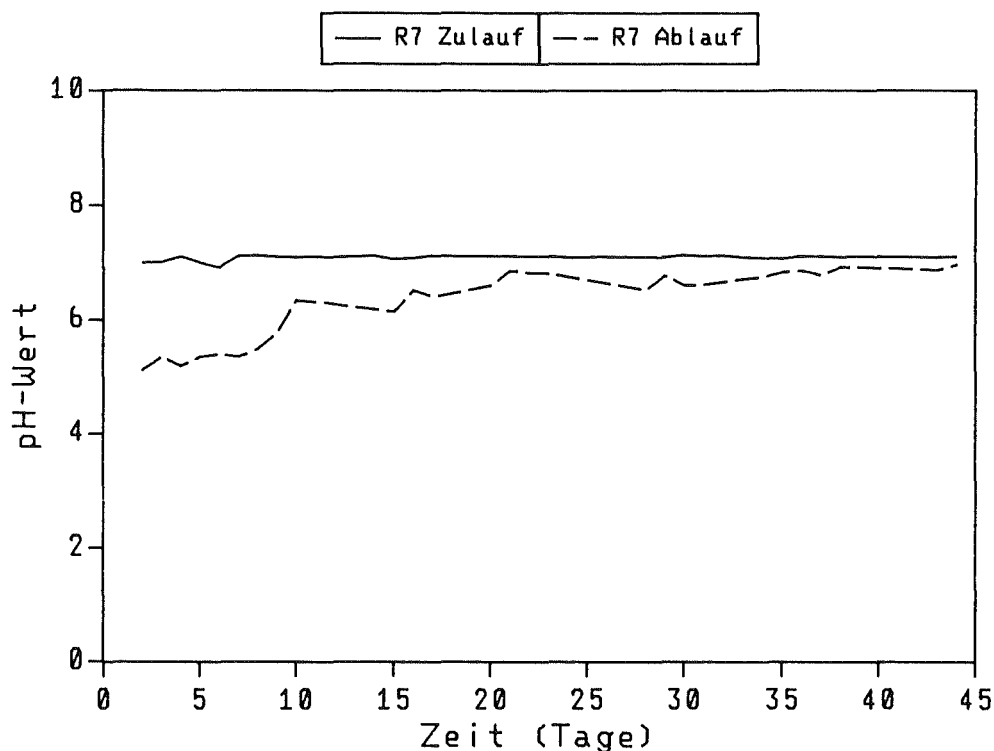


Abb. 25: pH-Werte im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R7.
Das zulaufende Leitungswasser wurde mit HCl auf pH 7 reguliert.

Die niedrigen pH-Werte im Reaktor waren offenbar durch die Freisetzung saurer Huminstoffe und anderer organischer Säuren aus der Rinde bedingt (s. 3.2.2.2 und 3.1.2.3).

Zu einem Anstieg der pH-Werte im Reaktorablauf kam es besonders in den ersten 5-10 Betriebstagen. Dies war zum einen auf die verminderte Auswaschung von sauren Verbindungen aus der Rinde, zum anderen auf die Erhöhung der Konzentration an Hydrogenkarbonationen beim Denitrifikationsprozeß zurückzuführen. Letzteres wurde besonders deutlich bei Versuch R7, da hier auf Grund der frischen Rindencharge ein höheres Potential an löslichen Kohlenstoffverbindungen vorhanden war, das im Zusammenhang mit den geringen Durchsatzmengen zu hohen Denitrifikationsraten führte, die den pH-Wert ansteigen ließen.

Das Redoxpotential als Maß für die Konzentration bzw. Aktivität der oxidierenden und reduzierenden Wasserinhaltsstoffe hat großen Einfluß auf die jeweils ablaufenden Stoffwechselvorgänge.

Der Bereich von 700 bis 300 mV wird als ideal für den Denitrifikationsprozeß angesehen (Rohmann & Sontheimer, 1985). Bei den gemessenen Redoxpotentialen gilt jedoch ebenso wie bei den pH-Werten und der Sauerstoffkonzentration, daß diese Werte nicht unbedingt die tatsächlichen Verhältnisse am Reaktionsort wiedergeben.

Das Redoxpotential im Reaktorzulauf betrug 503 ± 30 mV bei R5 (pH 7,3), 494 ± 19 mV bei R6 (pH 7,0) und 491 ± 23 mV bei R7 (pH 7,0). Die Werte für das Redoxpotential im Reaktorablauf lagen mit durchschnittlich 475 ± 13 mV (R5) und 443 ± 25 mV (R6) naturgemäß unter den Werten im Zulauf. Dies deutet auf eine Verschiebung des Verhältnisses von oxidierenden und reduzierenden Stoffen im Reaktorwasser hin.

Im Reaktor R7 sanken die Redoxwerte im Ablauf von 460 mV auf durchschnittlich 388 ± 18 mV innerhalb der ersten Betriebswochen. Zwischen dem 79. und dem 86. Betriebstag wurden die niedrigsten Werte mit 239 ± 14 mV erreicht. Niedrige Redoxspannungen im Reaktorablauf deuten auf günstige Bedingungen für Denitrifikationsprozesse hin, was durch die guten Nitratabbauleistungen in dieser Zeitspanne bestätigt wird. Im weiteren Versuchsverlauf stieg parallel mit einer geringen Verschlechterung der Denitrifikationsrate das Redoxpotential bis auf 457 mV an.

3.3 Versuche zur Steigerung der Denitrifikationsleistung

Bei einem Vergleich der Ergebnisse aus Versuch R1 und R2 wird deutlich, daß in R2 zu Beginn höhere Nitratabbauraten gemessen werden konnten, die jedoch relativ schnell wieder abnahmen (3.2.1). Grund hierfür könnte ein Substratmangel für die Denitrifikanten sein, der durch die Auslaugung der Rinde vor dem kontinuierlichen Betrieb bedingt war.

Zur Überprüfung dieser These wurde den länger betriebenen Reaktoren alternativ frische Rinde (3.3.1 und 3.3.3) oder Ethanol (3.3.2) als Kohlenstoffquelle zugeführt.

3.3.1 DOC-Bereitstellung durch Rindenmulch-Teilerneuerung

Unter der Annahme einer substratmangelbedingten Verminderung der Nitratabbaurate in den Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren wurde getestet, ob sich die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen im Reaktor durch Zugabe von frischer Rinde steigern ließ. Für diesen Versuch wurde die untere Hälfte der Rindenmulch-Packung des Reaktors (R2) nach 119-tägigem, kontinuierlichem Betrieb durch frische, luftgetrocknete Rinde (175 g) ersetzt. Die durchschnittliche Betriebstemperatur betrug $20,7 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$, die Sauerstoffkonzentration im Zulauf-Wasser lag bei durchschnittlich $0,4 \pm 0,1 \text{ mg O}_2/\text{l}$. Die übrigen Versuchsbedingungen sind der Tabelle 11 (3.2.1) zu entnehmen.

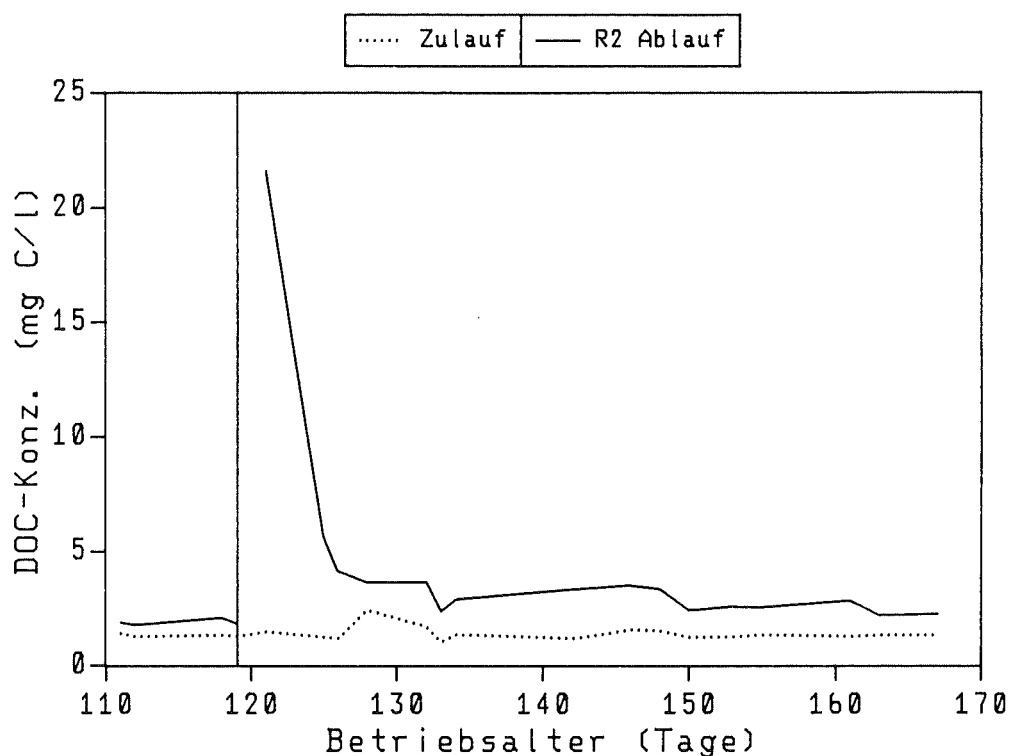


Abb. 26: DOC-Konzentrationen im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R2.

Am 119. Betriebstag wurde die Rindenfüllung in der unteren Hälfte des Reaktors durch frische Fichtenrinde ersetzt.

Als Reaktion auf die Zugabe frischer Rinde wurde ein Anstieg der DOC-Konzentration im Reaktorablauf von durchschnittlich 1,8 mg C/l auf 21,6 mg C/l gemessen (Abb. 26). Nach einer schnellen Abnahme auf 5,6 mg C/l stellte sich nach 15 Tagen eine Konzentration von $2,4 \pm 0,2$ mg C/l ein. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen bewirkte die Teilerneuerung der Rinde eine Steigerung des Nitratabbaus von 25 % auf 68 %, d.h. bei einer durchschnittlichen Nitratkonzentration von $15,3 \pm 0,5$ mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ im Zulauf wurden die Reaktorablauf-Konzentrationen von $11,4 \pm 0,7$ mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ auf $4,9 \pm 1,9$ mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ gesenkt (Abb. 27). Dieser Versuch zeigte ebenfalls, daß auf der ausgelaugten Rinde (in der oberen Reaktorhälfte) Mikroorganismen siedelten, die in der Lage waren, das DOC-reiche Eluat aus der frischen Rinde (in der unteren Reaktorhälfte) zur Denitrifikation zu nutzen.

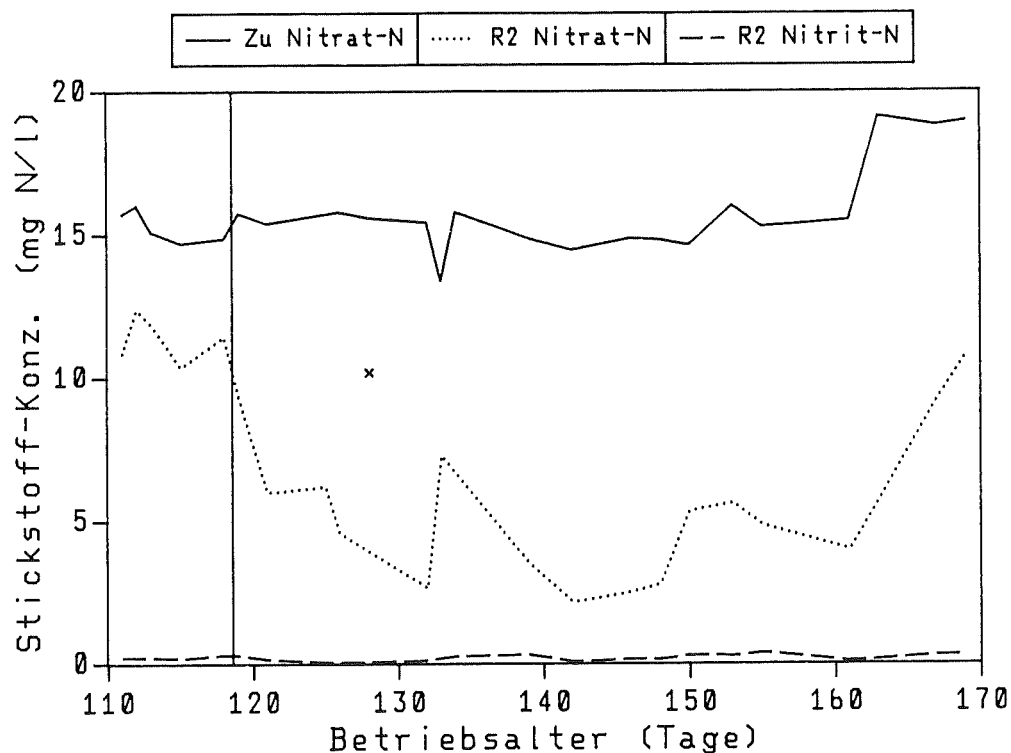
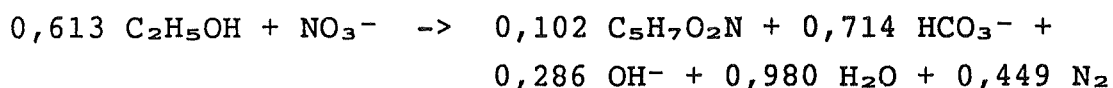


Abb. 27: Stickstoffkonzentrationen (Nitrat und Nitrit) im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R2. Am 119. Betriebstag wurde die Rinden-Füllung in der unteren Hälfte des Reaktors durch frische Fichtenrinde ersetzt.

Die Zugabe von frischer Rinde wirkte sich auch auf den pH-Wert im Reaktor aus. Bei einem durchschnittlichen Wert von $\text{pH } 8,8 \pm 0,2$ im zugeführten Leitungswasser lagen die Ablaufwerte vor der Teilerneuerung der Rinde im Mittel bei $\text{pH } 8,1 \pm 0,1$. Nach der Rindenzugabe sank er im Reaktorablauf auf $\text{pH } 7,4$ und stieg dann auf durchschnittlich $\text{pH } 7,5 \pm 0,1$.

3.3.2 DOC-Bereitstellung durch Ethanoldosierung

Die meisten biologischen Denitrifikationsverfahren nutzen Ethanol (EtOH) als Elektronendonator und C-Quelle für die Mikroorganismen. Dabei läßt sich der Ethanolbedarf pro g reduziertem Nitrat nach folgender Stöchiometrie der heterotrophen Denitrifikation unter Berücksichtigung der Biomassebildung berechnen (McCarty et al., 1969):



Statt der nach dieser Formel ermittelten Ethanolmenge von 0,45 g EtOH/g NO_3^- wird häufig eine höhere Menge zudosiert, um eine Nitritakkumulation durch Substratmangel zu vermeiden. Zusätzlich sollte zur Zehrung des im Rohwasser vorhandenen Sauerstoffs 0,6 g EtOH/g O_2 zugeführt werden (Rohman & Sontheimer, 1985).

In einem 10°C-temperierten Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor sollte die Wirkung einer Ethanolzugabe auf die Nitratabbauleistung überprüft werden. Dazu wurde der Reaktor R4 ausgewählt, in dem nach 60 Betriebstagen nur noch geringe Abbauleistungen erzielt wurden. Bei einer Zulauf-Nitratkonzentration von $16,4 \pm 0,4 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ ($72,7 \pm 1,9 \text{ mg NO}_3\text{-/l}$) konnten im Ablauf noch durchschnittlich $15,0 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ ($66,3 \pm 1,7 \text{ mg NO}_3\text{-/l}$) gemessen werden. Ethanol wurde ab dem 75. Betriebstag zuerst überstöchiometrisch ($0,95 \text{ g EtOH/g NO}_3^-$), nach 5 Tagen stöchiometrisch (n. McCarty et al., 1969; Rohmann & Sontheimer, 1985) zudosiert.

Bereits 17 Stunden nach Zugabe des Substrats wurde eine Steigerung des Nitratabbaus von 9 % auf 41 % gemessen (Abb. 28). Dies entsprach einer Senkung der Ablauf-Nitratkonzentration auf $9,3 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ ($41,3 \text{ mg NO}_3\text{-/l}$). Die maximale Abbaurate lag bei 97 % und wurde bei überstöchiometrischer Zugabe von Ethanol gemessen.

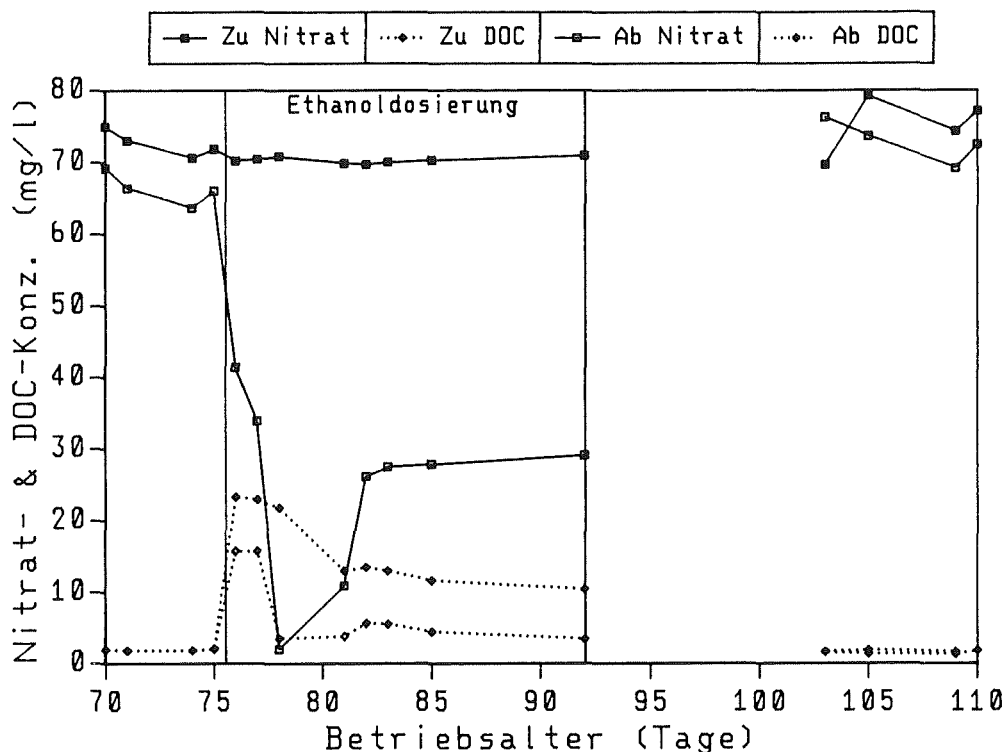


Abb. 28: DOC- und Nitratkonzentrationen im Zu- und Ablauf eines temperierten Rindenmulch-Denitrifikationsreaktors (R4) nach Ethanolzugabe.

Die Linien grenzen den Zeitraum der Ethanol dosierung ein. Zur besseren Übersicht der Abbildung wurden die Nitratkonzentrationen in $\text{mg NO}_3^-/\text{l}$ aufgetragen.

Die Ethanol dosierung führte jedoch auch zu erhöhten DOC-Konzentrationen im Reaktorablauf (Abb. 28). Nach der Senkung der Alkoholzugabe von 35 mg/l EtOH auf 20 mg/l EtOH ($\equiv 12,3 \pm 1,1 \text{ mg C/l}$) im Zulauf wurden DOC-Konzentrationen im Ablauf von $4,5 \pm 0,9 \text{ mg C/l}$ gemessen. Die NO_3^- -Abbauraten lagen bei durchschnittlich 61 %, die DOC-Abbauraten bei 63 %.

Parallel zur gesteigerten Nitratreduktion stiegen die Nitrit-Konzentrationen im Reaktorablauf von zuvor $0,1 \pm 0,03 \text{ mg NO}_2^-/\text{l}$ ($0,03 \text{ mg NO}_2^-/\text{N/l}$) auf durchschnittlich $10,4 \pm 1,2 \text{ mg NO}_2^-/\text{l}$ ($3,2 \pm 0,4 \text{ mg NO}_2^-/\text{N/l}$) an. 10 Tage nach Abbruch der Ethanolzugabe lagen die Ablaufkonzentrationen von NO_3^- , NO_2^- und DOC bei Werten, die vor der Dosierung gemessen wurden.

3.3.3 DOC-Bereitstellung durch Kaskadenschaltung mehrerer Rindenmulchreaktoren

Eine alternative Möglichkeit zur Steigerung der Denitrifikationsleistung in betriebsälteren RiMu-Reaktoren ist, abgesehen von der Verringerung der Wasserzulaufmenge, die Reihen- oder Kaskadenschaltung von Reaktoren. Bei der Kaskadenschaltung ist zu beachten, daß dem Reaktor mit der frischen, unverbrauchten Rinde betriebsältere Reaktoren nachgeschaltet werden.

Es wurde erwartet, daß durch Nutzung des DOC-reichen wässerigen Eluats aus dem ersten Reaktor als Substrat für die ansässige Denitrifikantenpopulation in den nachfolgenden betriebsälteren Reaktoren eine Steigerung des NO_3 -Abbaus meßbar wird. Die Kaskadenschaltung würde somit eine Verringerung der DOC- und SAK-Werte des ersten Ablaufs aus dem frisch eingesetzten Reaktor bewirken und zu gleichmäßigen Betriebsbedingungen durch ein ständiges Kohlenstoffangebot in den nachfolgenden Reaktoren führen.

Vier Laborreaktoren unterschiedlichen Betriebsalters wurden in Reihe geschaltet und nacheinander mit dem zu denitrifizierenden Wasser im Aufstrom beschickt. Die Reihenfolge der Reaktoren und deren Betriebsdaten gibt folgende Tabelle an. Die Probennahme innerhalb der Kaskade erfolgte aus den Verbindungsschläuchen zwischen den einzelnen Reaktoren, so daß der Ablauf des zuerst durchflossenen dem Zulauf des folgenden entsprach.

Tab. 14: Betriebsparameter einer Denitrifikationsreaktor-Kaskade.

Die Pfeile geben die Fließrichtung des Wassers an.

Parameter	R5	->	R3	->	R4	->	R2
Betriebsalter (d)	0		4		258		396
Rinden-Einwaage lutro (g)	450		450		450		350
Reaktortyp	temp.		temp.		temp.		untemp.
Besonderheit	-		Rinde 5 Tage ausgelaugt		-		-
Durchfluß (l/d)	11		11		11		11
n. 21 Tagen (l/d)	8		8		8		8

Der Reaktorzulauf wurde ab dem vierten Betriebstag mit HCl auf pH 7,3 einreguliert. Der pH-Wert des ersten Reaktorablaufs lag bei 6,4 und stieg bis zum fünften Meßtag auf pH 7,3.

Entlang der Kaskade wurde eine Zunahme des pH-Wertes festgestellt. Vor der Regulierung stieg der Wert von pH 6,6 (R5) auf pH 8,1 (R2), nach der pH-Steuerung von minimal pH 6,5 (R5) auf maximal pH 7,6 (R2).

Die maximale DOC-Konzentration im Reaktorablauf von R5 betrug 223 mg C/l. Diese leicht löslichen, organischen Kohlenstoffverbindungen der frischen Rinde wurden im Verlauf der Passage durch die Reaktor-Kaskade weitgehend abgebaut. Als maximale Ablaufkonzentration (R2) wurden 45 mg C/l nachgewiesen, wobei die intensivste DOC-Abnahme (81 mg C/l) während der Passage durch R4 erfolgte. Nach einem Tag sank die DOC-Konzentration im Ablauf von R5 auf 1/5 des Maximalwertes (41 mg C/l), wohingegen in den nachfolgenden Reaktoren R3 und R4 mit über 60 mg C/l noch das DOC-Signal des ersten Ablaufs von R5 erfaßt wurde. Ab dem fünften Versuchstag waren die Zu- und Ablaufkonzentrationen innerhalb der Kaskade mit durchschnittlich 14 mg C/l nahezu gleich. Am 21. Versuchstag lagen die Konzentrationen in den Abläufen bei ca. 3 mg C/l. Die Herabsetzung der Durchflußrate von 11 l/d auf 8 l/d ab dem 22. Tag ergab nur einen geringfügigen Anstieg von 1 mg C/l im Ablauf von R5. Die DOC-Konzentrationen betrugen bei Versuchsende (nach 40 Tagen) in allen Reaktorabläufen etwa 2 mg C/l.

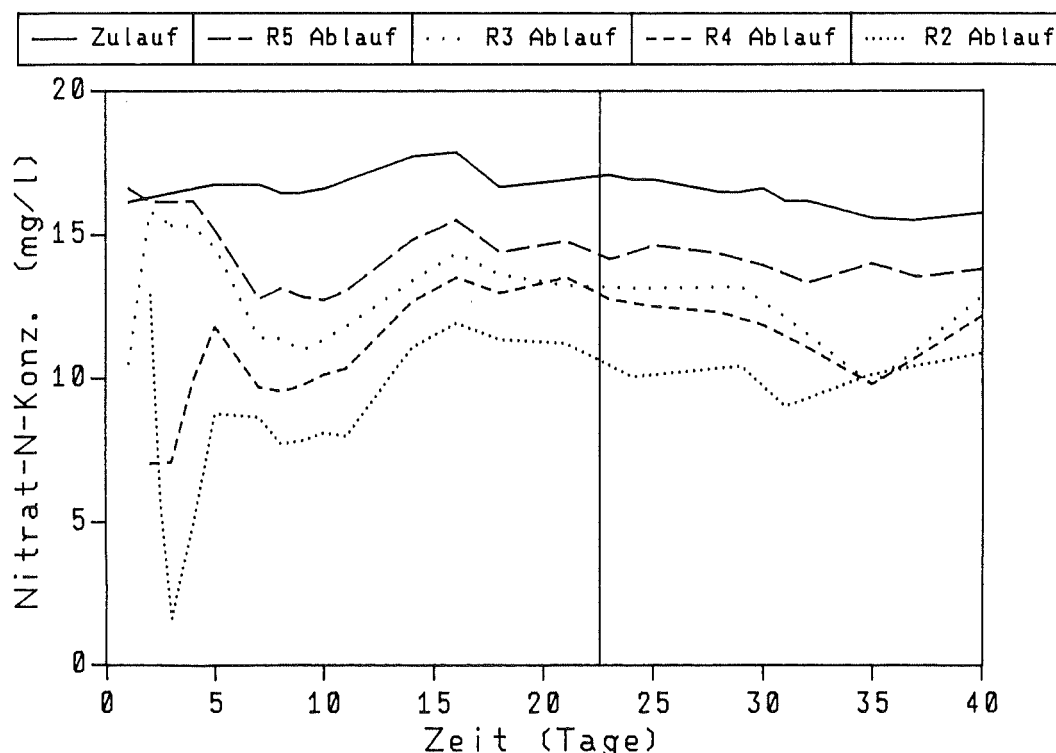


Abb. 29: Nitratkonzentrationen in mg/l in den Reaktor-Zu- und Abläufen entlang einer Denitrifikationsreaktor-Kaskade.

Die Nitratkonzentrationen waren nach jeder Reaktorpassage geringer als im zugeführten Wasser (Abb. 29). In den ersten Betriebstagen konnten Abbauraten von $76 \pm 10 \%$ erreicht werden. Bei der Betrachtung der einzelnen Abbauleistungen innerhalb der Kaskade fällt auf, daß die betriebsältesten Reaktoren R4 und R2 während der ersten drei Tage die in diesem Versuch höchsten Werte von $0,027 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ (R4) und $0,016 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ (R2) aufwiesen. Die Maximalleistungen der mit frischer Rinde befüllten Reaktoren R5 und R3 lagen zeitverzögert bei $0,013 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ (R5) und $0,006 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ (R3). Im weiteren Betrieb war R5 mit der durchschnittlichen Abbauleistung von $0,010 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ der leistungstärkste Reaktor der Kaskade.

Die Steigerung der Abbauleistung in den betriebsälteren Reaktoren R2 und R4 von ca. $0,004 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ auf maximal $0,016 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ verdeutlicht den positiven Effekt der Reaktor-Kaskade.

Durch die Nutzung des nährstoffhaltigen Eluats aus R5 in den nachfolgenden Denitrifikationsreaktoren fand zusätzlich eine Verringerung der DOC-Konzentration und Farbstoffbelastung im Ablauf des neu in Betrieb genommenen Reaktors statt.

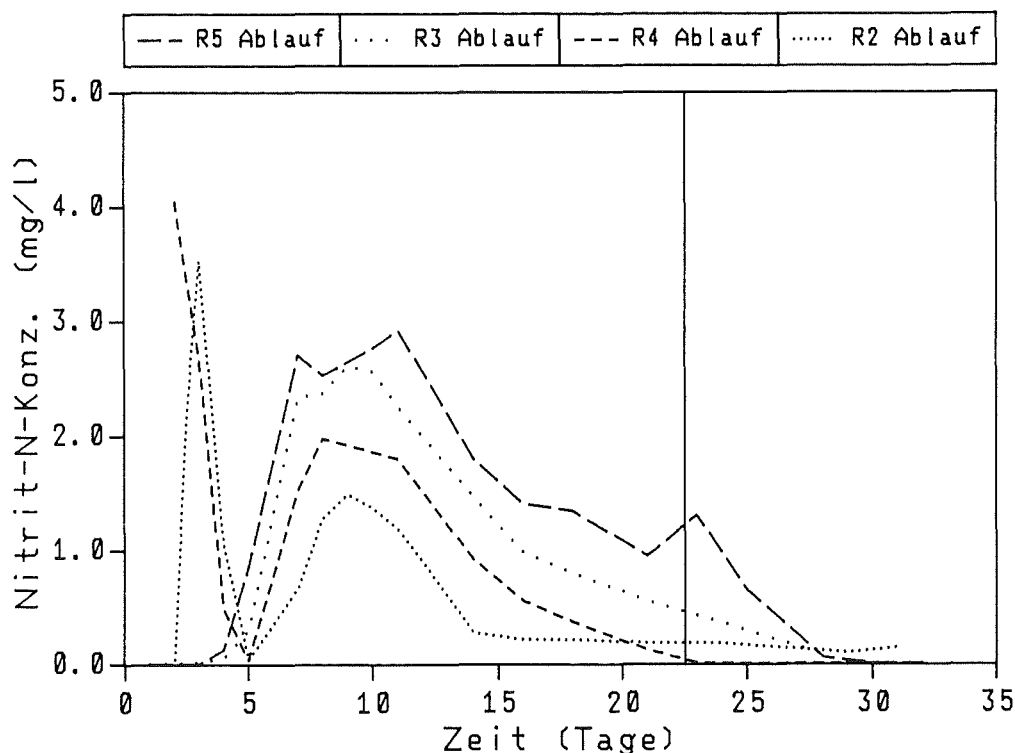


Abb. 30: Nitritkonzentrationen in mg/l in den Reaktor-Zu- und Abläufen entlang einer Denitrifikationsreaktor-Kaskade.

In allen Reaktoren der Kaskade wurden hohe Nitritkonzentrationen während der Phase des höchsten Nitratabbaus gemessen (Abb. 30). Während in R4 und R2 sofort nach der Beschickung mit Wasser Nitrit akkumulierte, stieg die Nitritkonzentration in den vorgeschalteten Reaktoren R5 und R3 bis zum dritten Meßtag nicht an. Danach wurden jedoch Konzentrationen von maximal 2,9 mg $\text{NO}_2\text{-N/l}$ im Ablauf von R5 gemessen. Innerhalb der Kaskade wurde das Nitrit weiter abgebaut, so daß im Kaskadenablauf die Maximalkonzentration um 59 % auf 1,2 mg $\text{NO}_2\text{-N/l}$ gesenkt war.

3.4 Versuche zur Nachreinigung der Reaktorabläufe im Kiesfilter

Im Ablauf des untemperierten Reaktors R1 lagen die Nitritkonzentrationen meist über dem in der Trinkwasserverordnung (TVO) festgelegten Grenzwert von $0,1 \text{ mg NO}_2\text{-/l}$ ($\equiv 0,03 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$) (s. 3.2.1). Die Ammoniumkonzentration im Reaktorablauf überschritt ab dem 132. Betriebstag zeitweilig die Grenzkonzentration von $0,5 \text{ mg NH}_4\text{+/l}$ ($\equiv 0,4 \text{ mg NH}_4\text{-N/l}$). Aus diesem Grund wurde an Reaktor R1 ab dem 153. Betriebstag ein Versuch zur Nachreinigung des denitrifizierten Wassers durchgeführt. Eine Glassäule, gefüllt mit $2,6 \text{ kg}$ Rollkies (Körnung $2\text{-}8 \text{ mm}$), wurde als Tropfkörper dem RiMu-Reaktor nachgeschaltet. Entsprechend der Reaktor-Zulaufmenge von $4,8 \text{ l/d}$ ($\equiv 200 \text{ ml/h}$) wurde diese Menge auf den Kieskörper getropft.

Die Nitratkonzentration im Zulauf betrug $17,6 \pm 1,7 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$. Ein Einfluß der Kiesfilterpassage auf die Reaktorablauf-Konzentrationen an DOC ($2,0 \pm 0,3 \text{ mg C/l}$) und Nitrat ($9,8 \pm 2,6 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$) konnte nicht festgestellt werden.

Die Nitritkonzentrationen im Reaktorablauf R1 lagen bei Werten von durchschnittlich $0,21 \pm 0,07 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$. Nach der Kiesfilterpassage erhöhten sich die Werte während der ersten Tage um $0,13 \pm 0,16 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ (Abb. 31). Ab dem zehnten Tag nach Inbetriebnahme des Kiesfilters sanken die Nitritkonzentrationen auf durchschnittlich $0,03 \pm 0,02 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$, mit der Tendenz zu Werten unter dem Grenzwert der TVO.

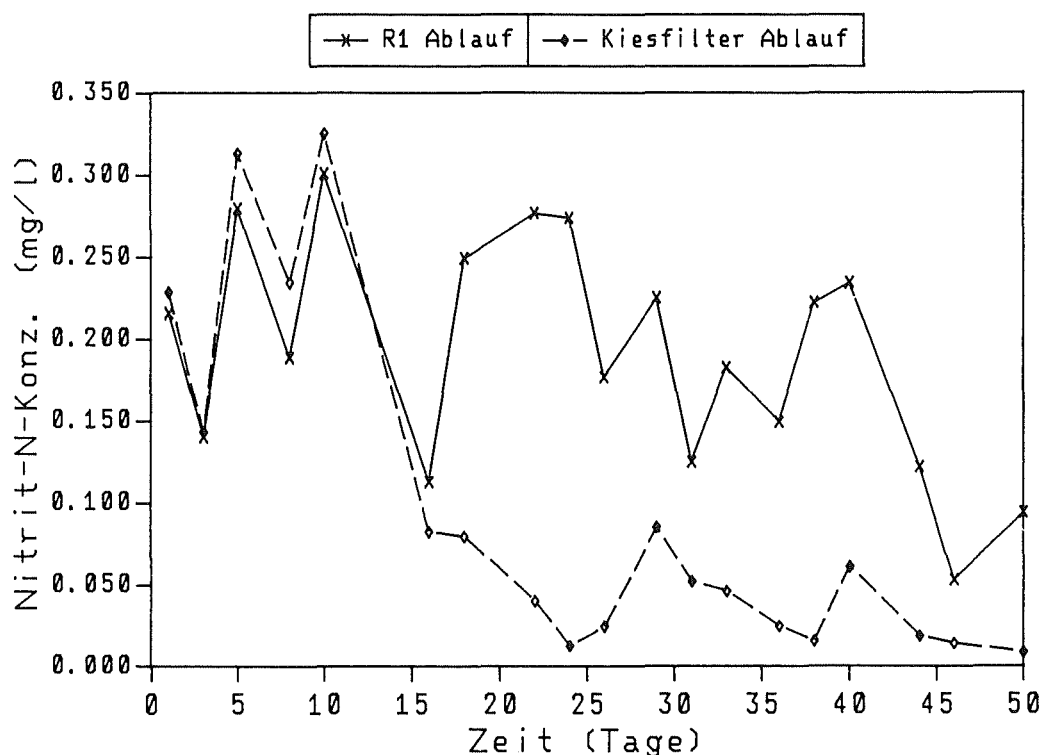


Abb. 31: Nitritkonzentrationen im Ablauf von Reaktor R1 und nach einer Kiesfilterpassage.
 Zum Zeitpunkt der Inbetriebnahme des Kiesfilters wurde der Rindenmulch-Reaktor seit 154 Tagen kontinuierlich mit nitratreichem Wasser beschickt.

Die Ammoniumkonzentrationen im Reaktorablauf lagen zu Versuchsbeginn mit durchschnittlich 0,50 mg $\text{NH}_4\text{-N/l}$ über dem Grenzwert (Abb. 32). Ab dem 10. Versuchstag (163. Betriebstag des Rindenmulchreaktors) sanken die Werte auf durchschnittlich $0,10 \pm 0,02$ mg $\text{NH}_4\text{-N/l}$.

Die NH_4^+ -Konzentrationen im Kiesfilterablauf lagen ab dem fünften Tag nach Einsatz der Kiesfiltersäule mit durchschnittlich $0,04 \pm 0,01$ mg $\text{NH}_4\text{-N/l}$ deutlich niedriger als die der Reaktorabläufe.

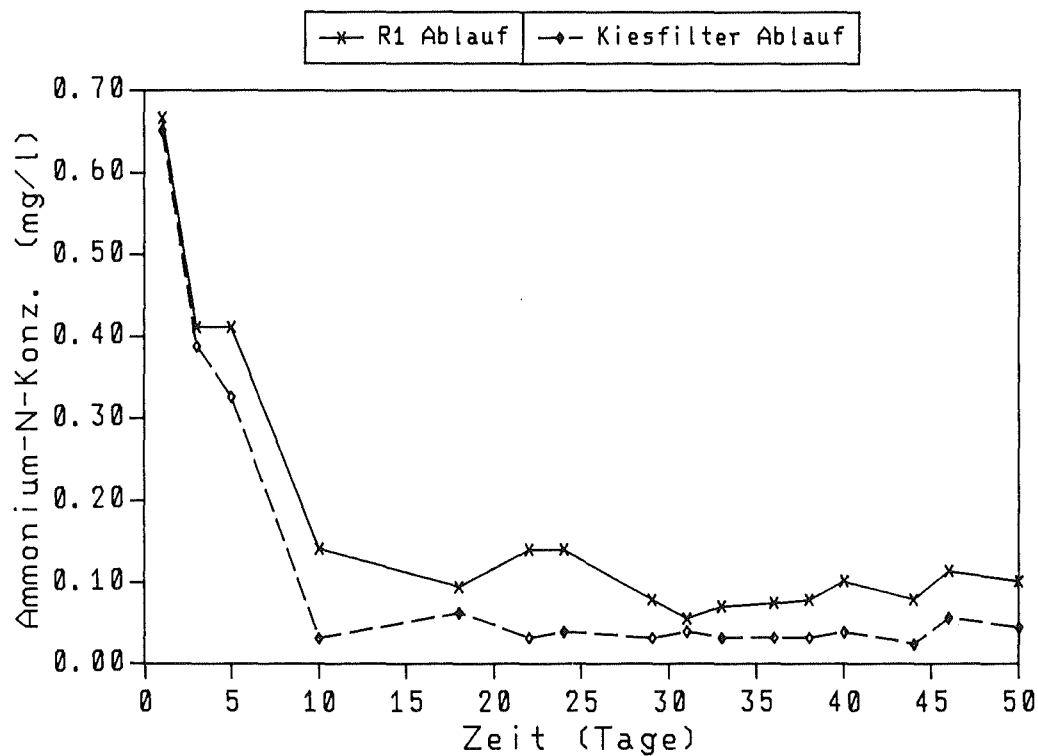


Abb. 32: Ammoniumkonzentrationen im Ablauf von Reaktor R1 und nach einer Kiesfilterpassage.
 Zum Zeitpunkt der Inbetriebnahme des Kiesfilters wurde der Rindenmulch-Reaktor seit 154 Tagen kontinuierlich mit nitratreichem Wasser beschickt.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Laborversuchen

In den Laborversuchen konnte zu Beginn einer Reaktor-Inbetriebnahme eine exponentielle DOC-Freisetzung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigten die Resultate der Extraktionsversuche. Es konnte nur ein Teil der gelösten Substanzen identifiziert werden. Mit Hilfe des Summenparameters DOC wurde die Abbaubarkeit der gelösten Inhaltsstoffe im wässrigen Eluat nachgewiesen (3.3.1 und 3.3.3).

In Laborreaktoren wurden spezifische Nitratabbauleistungen von durchschnittlich $0,013 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ ermittelt. Diese Ergebnisse fallen geringfügig höher aus als jene von Landt (1986).

Der Temperatureinfluß auf den Denitrifikationsprozeß wurde beim Vergleich der Untersuchungen von R1 & R2 zu R4, R5 und R6 aufgezeigt. Im Unterschied zu den bei 20°C gemessenen Abbauleistungen von durchschnittlich $0,019 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ wurden bei 10°C nur 32 % der Leistungen erzielt.

Der in der Literatur häufig beschriebene negative Einfluß hoher Sauerstoffkonzentrationen im Wasser auf die Denitrifikationsrate (Rheinheimer et al., 1988; Rohmann & Sontheimer, 1985) konnte in den Versuchen R1 und R2 nicht bestätigt werden (3.2.1). Mit durchschnittlich $0,019 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ entsprachen die Nitratabbauleistungen im Reaktor R1 (mit sauerstoffgesättigtem Zulaufwasser) den Werten, die im Reaktor R2 (mit sauerstoffabgereichertem Zulaufwasser) erreicht wurden.

Wie ein Vergleich der Werte von R6 mit R4 und R5 zeigt, resultierte aus der Verringerung der Zulaufmenge eine deutliche Abnahme der Nitratkonzentrationen im Reaktorablauf. Dieser Effekt konnte ebenfalls in betriebsälteren Reaktoren (R1 nach 140 Tagen) erzielt werden.

Die in den Laboranlagen gewonnenen Erkenntnisse führten zu Überlegungen, die den nachfolgenden Pilotanlagenbetrieb in Aschaffenburg entscheidend beeinflussten. So sollten die Rinden-

becken zu Versuchsbeginn mit sauerstoffgesättigtem Rohwasser beschickt und erst zu einem späteren Zeitpunkt die Auswirkungen von sauerstoffabgereichertem Rohwasser auf die Nitratabbauraten untersucht werden.

Zusätzlich wurde verfahrenstechnisch ermöglicht, das erste Ablauf-Wasser zu speichern und bei nachlassender Denitrifikationsleistung dem Rindenmulchbecken wieder zuzuführen.

Untersuchungen zum Einfluß der Durchflußrate auf die Nitratkonzentrationen im Reaktorablauf wurden in der technischen Anlage weitergeführt.

Zum besseren Vergleich von Betrieb und Leistungen der Denitrifikationsanlagen im Labor- und technischen Maßstab, werden im nächsten Kapitel (3.6) die Versuchsergebnisse der Pilotanlage in Aschaffenburg aufgezeigt.

Die mikrobiologischen Arbeiten, die aus arbeitstechnischen Gründen nur an Materialien aus den Laboranlagen vorgenommen wurden, sind in Kapitel 3.7 separat beschrieben.

3.6 Nitrat-Elimination in der technischen Denitrifikationsanlage in Aschaffenburg

Mit dem Betrieb der Pilotanlage sollte zum einen die Übertragbarkeit der in den Laboranlagen gewonnenen Ergebnisse auf Anlagen im technischen Maßstab überprüft und zum anderen die Effizienz des Rindenmulch-Verfahrens für ein Wasserversorgungsunternehmen getestet werden.

Das Anlagenkonzept wurde so entwickelt, daß eine relativ einfache Realisierbarkeit für eine großtechnische Anlage gegeben war.

Die Pilotanlage besaß mit einem Rindenfassungsvermögen von 200 m³/Becken das ca. $6 \cdot 10^4$ -fache Volumen der Laboranlagen (Rindenfassungsvolumen = 0,0034 m³). Zur Anlage gehörten neben den zwei Rindenmulch-Denitrifikationsbecken zwei Schnellsandfilter zur Abtrennung von Rindenfeinteilen und zwei Sammelbecken, aus denen das Filter-Spülwasser entnommen und die Bodenzonen beschickt wurden. Beim RiMu-Verfahren ist ein Grundgedanke der, das denitrifizierte Wasser aus der Rindenmulchanlage zur hygienischen Aufbereitung in den Untergrund zu leiten. Dieser Verfahrensschritt konnte nur in Becken, die mit Böden aus dem Aschaffenburg Raum befüllt waren, simuliert werden.

Die Betriebsbedingungen der RiMu-Denitrifikationsanlage wiesen grundlegende Übereinstimmungen zu den Laboranlagen auf. So waren die Nitratkonzentrationen im Zulauf der Laboranlagen den Verhältnissen des in Aschaffenburg verwendeten Brunnens angeglichen, und mit dem Versuch R7 konnte auf Grund der Verwendung der gleichen Rindencharge wie in der Pilotanlage die Übertragbarkeit von Labor- auf Pilotanlage geprüft werden.

Jedoch gab es baulich bedingte Unterschiede, die sich auf das Verhalten des Systems auswirkten. Auf Grund der Beckenkonstruktion in Aschaffenburg lag eine 4 m tiefe Rindenpackung vor, die beim Einbringen in die Becken verdichtet worden war. Dies führte erwartungsgemäß zu einer heterogenen Durchströmung der Rindenschicht. Im Gegensatz dazu konnte bei den Laborversuchen von einer relativ homogenen Rindenschichtung und resultierend daraus von einer gleichmäßigen Durchströmbarkeit des Reaktors ausgegangen werden.

Unter den gegebenen Voraussetzungen war es wahrscheinlich, daß im RiMu-Becken der Pilotanlage bei Zugabe von sauerstoffreichem Rohwasser (ca. 8 mg O₂/l) sowohl aerobe, anoxische als auch anaerobe Zonen vorlagen.

Zu Beginn der Untersuchungen an der Pilotanlage wurde der Wasserdurchsatz so eingestellt, daß die Aufenthaltszeit (etwa 11 h) dem Mittelwert der in den Laboranlagen getesteten Verweilzeiten entsprach. Durch eine stufenweise Erhöhung der Zulaufmenge sollte die Aussage über die Beziehung zwischen NO₃-Eliminationsleistung und Wasserdurchsatz nachgeprüft werden. Während des kontinuierlichen Betriebes wurde der Ablauf aus dem Rindenmulchbecken (RMB1) über den Schnellsandfilter (F1) gegeben, um eine Sauerstoffanreicherung im Wasser und eine Schmutzstoffverringerng zu erreichen. Aus dem nachgeschalteten Sammelbehälter wurde das Wasser mit einem verringerten Durchsatz den beiden Becken (GBZ und UGBZ), die die Bodenzonen simulierten, zugeführt. GBZ stellt dabei die wassergesättigte, UGBZ die wasserungesättigte Bodenzone dar.

Am 19.-20.10.1989 wurde das erste mit Rindenmulch gefüllte Becken (RMB1) mit etwa 300 m³ Rohwasser beschickt. Die ersten 200 m³ des stark gefärbten und organisch hoch belasteten Rindenmulchablaufs wurden in einem zweiten Becken gespeichert. Das Eluat wurde zu einem späteren Zeitpunkt bei nachlassender Denitrifikationsleistung (auf Grund von Nährstoffmangel) dem RMB1 zudosiert (s. 3.6.2). Ab dem 30.10.1989 wurde die Anlage kontinuierlich betrieben. Die Mittelwerte der Rohwasseranalysen während der Betriebszeit von 132 Tagen sind in Tab. 15 aufgeführt.

Tab. 15: Daten der Rohwasseruntersuchungen von Brunnen II der Stadtwerke Aschaffenburg.
Mittelwerte während einer 132tägigen Betriebszeit.

Nitrat-N (mg/l)	Nitrit-N (mg/l)	pH-Wert	Redox (mV)	Lf (µS/cm)	O ₂ (mg/l)	Härte (°dH)
16,5 ± 0,5	n.n.	6,9 ± 0,2	577 ± 28	583 ± 8	7,9 ± 0,3	14,3 ± 0,3

In der Anfangsphase des kontinuierlichen Betriebes der Anlage traten einige technische Probleme und Mängel auf, die sich teilweise auf die biologischen Prozesse auswirkten oder zumindest die Überwachung der Anlage erschwerten. Die gemessenen Werte der ersten Untersuchungen zeigten jedoch richtungsweisende Tendenzen auf.

3.6.1 Rindenmulchbecken und Schnellsandfilter

Zur Übersicht der einzelnen Versuchsphasen sind in Tabelle 16 die Betriebszustände und die Dauer der einzelnen Phasen aufgeführt.

Tab. 16: Betriebsdaten der technischen Rindenmulch-Denitrifikationsanlage.

Versuchs- phase	Versuchs- dauer in Tagen	Mittlere Zuflußmenge in m ³ /h
I	30	9,2
II	35	12,8
III	19	18,1
IV	3	21,7
V	45	9,2

In Versuchsphase I der kontinuierlichen Betriebsführung wurde für 30 Tage eine Zulaufmenge von 9 m³/h eingestellt. Nach einer stufenweisen Erhöhung auf 13 m³/h und 18 m³/h wurde in Versuchsphase IV das Rindenmulchbecken (RMB1) mit der maximalen Wassermenge beschickt. Ausgehend vom möglichen Maximalwert von 36 m³/h mußte der Wasserdurchsatz jedoch auf 22 m³/h gesenkt werden, da sonst Rohwasser aus den Zulauf-Überstaurohren heraus und ohne Rindenkontakt in die Ablaufsammelrohre floß. Mit Aufenthaltzeiten des Wassers im RiMu-Becken von durchschnittlich 4,6 h war diese Betriebsphase mit den Durchflußbedingungen der Versuche R1-R5 vergleichbar. Zur Überprüfung, ob durch die hohe hydraulische Belastung die Rinde vollständig ausgelaugt wurde oder ob noch Denitrifikationspotential in der Rinde enthalten war, wurde die Zulaufmenge anschließend wie in Phase I auf 9 m³/h gesenkt (Phase V).

3.6.1.1 DOC-Messungen

Im Verlauf des ersten Versuchsabschnitts sank die DOC-Konzentration im Ablauf von RMB1 deutlich ab. Wurden am Anfang noch 60 mg C/l gemessen, so konnten nach 27 Tagen nur noch 16 mg C/l nachgewiesen werden. Damit lagen die Werte im Ablauf von RMB1 geringfügig über den Werten der Laborreaktorabläufe. Zum Ende der Versuchsphase II (nach 62 Betriebstagen) betrug die DOC-Konzentrationen 4 mg C/l und sank während der weiteren Versuchszeit auf durchschnittlich 2,9 mg C/l ab.

Die Passage durch den nachgeschalteten Schnellsandfilter (F1) bewirkte in der ersten Betriebsphase eine Verringerung der Menge an gelöster organischer Substanz im denitrifizierten Wasser (RMB1-Ablauf) um durchschnittlich 6 mg C/l. Ab dem 40. Betriebstag lagen die DOC-Konzentrationen im Ablauf von F1 mit durchschnittlich 2,6 mg C/l nur noch geringfügig unter den Konzentrationen von RMB1.

Eine weitere DOC-Verminderung wurde in den Bodenzonen erreicht (3.6.3.1), so daß eine Konzentration von < 2 mg/l, wie sie nach Aussage des Bundesgesundheitsamtes und des Chemischen Landesuntersuchungsamtes Offenburg im Trinkwasser sein sollte, gewährleistet werden konnte.

3.6.1.2 Stickstoffparameter

Bei durchschnittlichen Nitratkonzentrationen im Zulauf von 16,5 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ (Tab. 16) stieg die $\text{NO}_3\text{-}$ -Abbauleistung innerhalb der ersten Versuchsphase von 0,011 kg $\text{NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ auf maximal 0,018 kg $\text{NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$. Es wurden Ablaufkonzentrationen von < 1 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ gemessen (Abb. 33). Die Durchschnittsabbauleistung lag bei 0,016 kg $\text{NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$. Dieses Ergebnis stimmte gut mit den Daten der Laboranlagen überein (3.2.2.3).

Die Nitratkonzentrationen im Filterablauf waren mit durchschnittlich 0,6 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ immer niedriger als im RMB1-Ablauf. In den ersten 10 Tagen wurde im RMB1-Ablauf ein Nitrit-Peak mit einer Maximalkonzentration von 5,5 mg $\text{NO}_2\text{-N/l}$ gemessen. Dieser Wert lag im Vergleich zu den Ergebnissen in Laborversuch R7

(gleiche Rindencharge) um $16,2 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ niedriger, was durch die 10tägige Wässerung der Rinde aus RMB1 und der damit verbundenen Bakterienbesiedlung bedingt sein könnte (s. auch Versuch R2, 3.2.1). Ab dem 19. Betriebstag sanken die Nitritkonzentrationen auf Werte zwischen $0,03$ und $0,06 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ (Abb. 33). Im Vergleich zum RMB1-Ablauf waren die Nitritkonzentrationen im Filtrat des Schnellsandfilters mit durchschnittlich $0,09 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ ($0,3 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$) eindeutig höher. Dieser Effekt der aeroben Filtration war auf eine sauerstoffbedingte Störung des Denitrifikationsprozesses zurückzuführen, der infolge der relativ hohen DOC-Konzentrationen im RMB1-Ablauf auch noch in F1 stattfand.

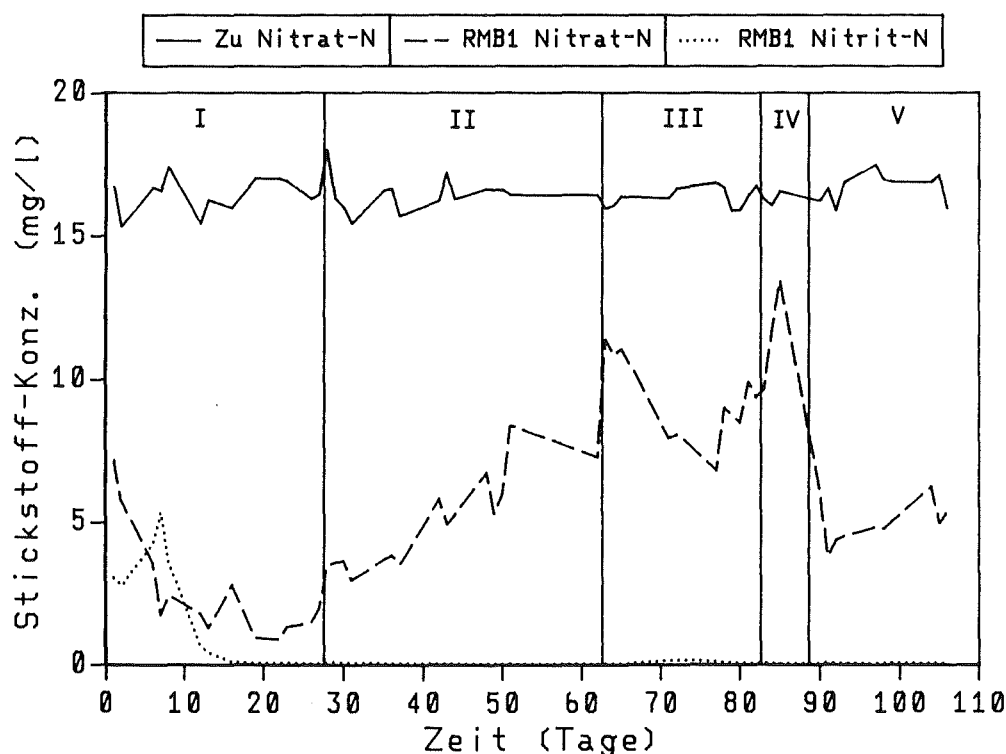


Abb. 33: Nitrat- und Nitritkonzentrationen im Zu- und Ablauf von Rindenmulchbecken 1 (RMB1).

Aus der Erhöhung der RMB1-Zulaufmenge in Phase II folgte ein Anstieg der Nitrat-Ablaufkonzentrationen von $1,6 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ auf zunächst $3,6 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ und nach 15 Tagen auf durchschnittlich $6,1 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ (Abb. 33). Bei Betrachtung der Abbauwerte zeigt sich jedoch eine geringe Erhöhung der spezifischen Abbauleistung von $0,016 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ in Phase I auf durchschnittlich $0,018 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ in Phase II.

Innerhalb des Versuchszeitraumes (35 Tage) wurde eine deutliche Abnahme der Nitratabbauleistung von $0,021 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ auf $0,014 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ gemessen. Dies korrelierte mit einem Rückgang an gelösten organischen Kohlenstoffverbindungen (DOC) im Ablauf von RMB1.

Die Nitratkonzentrationen sanken nach der Filterpassage um durchschnittlich $0,5 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ auf $4,4 \pm 0,9 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ ab.

Die Nitritkonzentrationen in RMB1 betrugen im Mittel $0,04 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$, in F1 $0,05 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$.

Ab dem 62. Betriebstag wurde die Zulaufmenge für 19 Tage auf $18,1 \text{ m}^3/\text{h}$ erhöht (Phase III). Die Nitratabbauleistung betrug durchschnittlich $0,015 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$. Einzelne Messungen ergaben Nitratkonzentrationen im Rindenmulchablauf, die über dem in der TVO festgelegten Grenzwert von $50 \text{ mg NO}_3\text{-/l}$ ($\equiv 11,3 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$) lagen. Alle Werte waren höher als der EG-Richtwert für Nitrat im Trinkwasser von $25 \text{ mg NO}_3\text{-/l}$.

Durch eine Betriebsstörung am 69./70. Betriebstag stieg die Nitritkonzentration im Ablauf von durchschnittlich $0,03 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ auf $0,14 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$. Von dieser Zeit an konnte der in der Trinkwasserverordnung festgelegte Grenzwert von $0,1 \text{ mg NO}_2\text{-/l}$ ($0,03 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$) in den Abläufen des Rindenmulchbeckens und des Schnellsandfilters nicht sicher eingehalten werden.

Bei der in Versuchsphase IV eingestellten maximalen Durchflußrate wurden Nitratabbauleistungen von $0,013 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ erreicht. Die Nitratkonzentrationen im Ablauf von RMB1 lagen jedoch immer über $50 \text{ mg NO}_3\text{-/l}$. Damit entsprachen die Werte den Ablauf-Konzentrationen der Versuchsreaktoren bei entsprechenden Aufenthaltszeiten (4,6 h) nach 90 Betriebstagen. Mit dem Ziel die Ablaufkonzentrationen zu senken, wurde die Wassermenge im Zulauf von RMB1 wieder gedrosselt.

Nach Herabsetzung der Zulaufmenge auf $9,3 \text{ m}^3/\text{h}$ (Phase V) betrug die Abbauleistung in RMB1 weiterhin $0,013 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$, wohingegen die Nitratkonzentration im Ablauf auf durchschnittlich $5 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ sank. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den Laborversuchen (3.5) und verdeutlicht den Einfluß der Durch-

flußmenge bzw. Aufenthaltszeit des zu denitrifizierenden Wassers auf die Nitratkonzentration im Ablauf.

Damit ist dem Betreiber der Anlage eine einfache Möglichkeit zur Steuerung, zwecks Erhalt einer gleichbleibenden NO_3 -Ablaufqualität, durch die Regelung der Durchflußrate gegeben.

Die durchschnittlichen Meßdaten der Parameter pH-Wert, Leitfähigkeit, Wasserhärte und Sauerstoffkonzentration des Rindenmulchablaufs während der Versuchszeit sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17: Meßparameter des RMB1-Ablaufs bei verschiedenen Betriebszuständen.

* Die O_2 -Konzentration während Phase III stieg nach 9 Tagen auf durchschnittlich 2,8 mg/l.

Betriebs- phase	I	II	III	IV	V
pH-Werte	6,7	6,7	6,7	6,8	6,8
Lf ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	564	573	576	578	568
O_2 (mg/l)	0	0,1	0*	3,8	0,3
Härte ($^\circ\text{dH}$)	-	14,7	14,4	14,2	14,5

Das Redoxpotential im Rindenmulchbecken-Ablauf sank in der Phase I von 496 mV auf -225 mV. In Phase II lagen die Redox-Werte bei 430 ± 45 mV.

Die Wassertemperatur im RMB1 lag je nach Außentemperatur zwischen 9,8 und 12,2°C.

3.6.2 Nitratprofil in der Rindenschicht nach Zugabe eines DOC-haltigen Rindeneluats

Die Beprobung des Rindenmulchbeckens erfolgte über Multilevel-Brunnen (MLB), die an drei Stellen im Becken (Abb. 6) in drei Horizonten (100 cm, 200 cm und 300 cm über dem Kiesboden) angebracht waren.

Am 131. Betriebstag der Pilotanlage wurde bei einer durchschnittlichen Rohwasser-Zulaufmenge von 9,3 m^3/h für 9 Tage das gespeicherte erste Rindeneluat (s. 3.6) mit 100 l/h (0,1 m^3/h)

zudosiert.

Es sollte überprüft werden, ob durch diese Zugabe höhere Nitratabbauraten erreicht werden konnten. Gleichzeitig sollte anhand der Veränderung von Leitfähigkeit und SAK direkt und über die Veränderungen der Nitrat- und Nitritkonzentrationen indirekt der Fließweg und die Verteilung des Rindeneluates im Rindenmulchbecken untersucht werden.

Das Eluat war kohlenstoffreich, aber auf Grund des CSB:BSB₅-Verhältnisses von 3,8:1 als nicht leicht abbaubar einzustufen (Tab. 18).

Tab. 18: Chemische Analyse des ersten Rindeneluats von RMB1.

Parameter	erstes Rindeneluat
pH	6,4
Lf (μS)	1159
DOC (mg C/l)	482
CSB (mg/l)	2120
BSB ₅ (mg/l)	560
NO ₃ -N (mg/l)	0
NO ₂ -N (mg/l)	0
NH ₄ -N (mg/l)	0,09

Vor Zugabe des Rindeneluats wurde bei der Passage des Rindenmulchbeckens die Nitratkonzentration im Wasser von durchschnittlich 18 mg NO₃-N/l auf 7,4 mg NO₃-N/l vermindert.

Nach Zudosierung des Eluats sank die Nitratkonzentration im Ablauf von RMB1 auf durchschnittlich 2,6 mg NO₃-N/l. Dies entspricht einer Steigerung der spezifischen Nitratabbauleistung von 0,012 kg NO₃-N/m³·d auf 0,017 kg NO₃-N/m³·d.

Trotz Steigerung der Nitratabbauraten wurde im Beckenablauf keine Erhöhung der Nitritkonzentration festgestellt.

Dagegen stieg die DOC-Konzentration durch die Eluatzudosierung von 2,3 ± 0,4 mg C/l auf 5,5 ± 0,9 mg C/l.

Nach 8 Tagen kontinuierlicher Eluat-Beimischung zum Rohwasser konnte die eingestellte Rohwasser-Zulaufmenge nicht mehr in das Rindenmulchbecken gefördert werden, da das Wasser an den Zulauf-Überstaurohren austrat. Die durch die Substratzugabe bedingte höhere Denitrifikationsrate mit verstärkter Gasbildung führte in Zusammenhang mit vermehrtem Bakterienwachstum zu einer Verstopfung der Rindenschicht, so daß das zugeführte Wasser

dem Weg des geringsten Widerstandes folgend an der Rinde vorbeifloß. Daraufhin wurde die Zudosierung des Rindeneluats gestoppt.

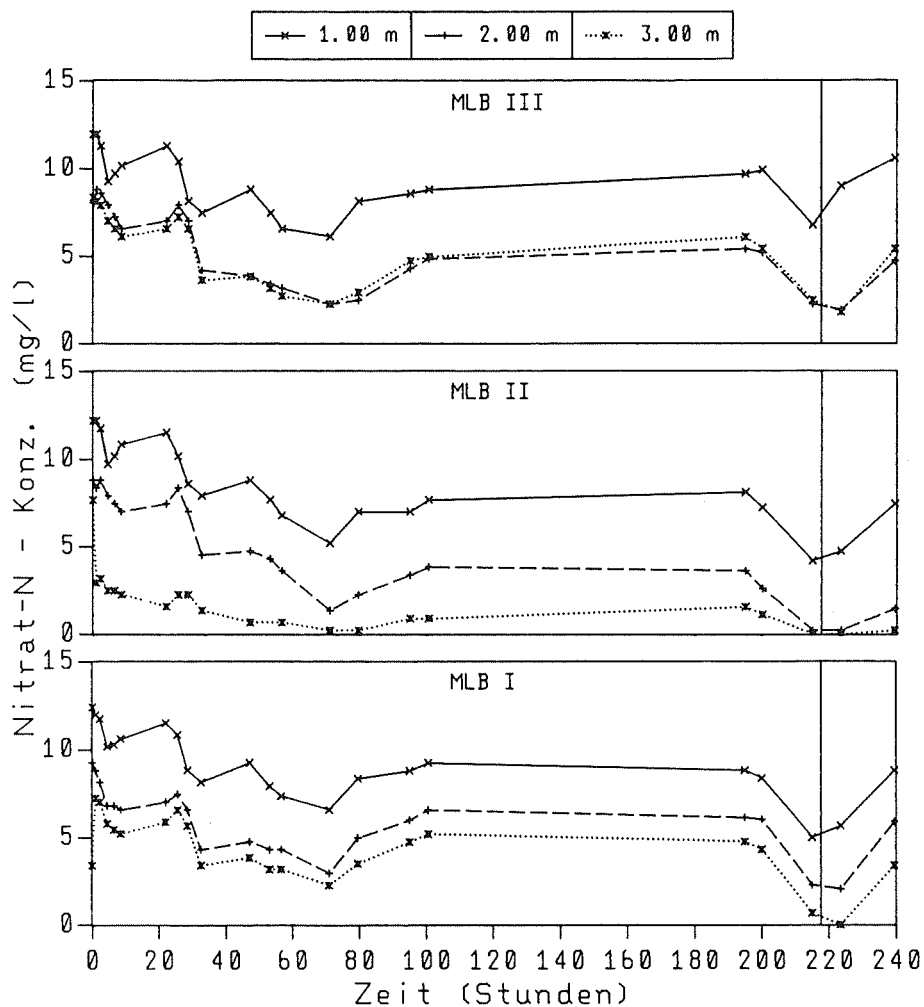


Abb. 34: Nitratkonzentrationen im Rindenmulchbecken 1 nach Eluatzugabe.
 Probenahmeorte waren drei Multilevel-Brunnen (MLB) mit drei Entnahmetiefen (1 m, 2 m und 3 m über dem Kiesboden).

Abbildung 34 zeigt anhand der Nitratkonzentrationen an den einzelnen Meßstellen der Multilevel-Brunnen, daß in RMB1 keine homogene Durchströmung gewährleistet war. Das Vertikalprofil an MLB II unterscheidet sich deutlich von denen der beiden anderen Entnahmebrunnen.

Bei einer Nitratkonzentration im Zulauf von 16,3 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ wurden bei MLB I und III an den Meßstellen "1m" durchschnittliche Nitratkonzentrationen von 8,2 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ gemessen. Dies

entspricht einer Nitratabbaurate von 50 % im ersten Meter der Rindenmulchschicht. Wasserproben aus dem Horizont "2m" (2 m über dem Kiesboden) hatten bei MLB I im Mittel Nitratkonzentrationen von 3,9 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$, bei MLB III von 5,2 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$. In der Höhe "3m" (über dem Kiesboden) wurden durchschnittlich 4,0 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ bei MLB I und MLB III gemessen, d.h. im oberen Drittel der Rindenschicht wurde nur noch wenig bzw. kein Nitrat abgebaut.

Im Gegensatz dazu waren die NO_3 -Konzentrationen schon am unteren Meßpunkt von MLB II mit 7,5 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ niedriger als die Werte der anderen Entnahmestellen in gleicher Höhe. Aus dem "2m"-Horizont wurden Durchschnittswerte von 3,4 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$ gemessen. Die Wasserproben aus der obersten Meßstelle ("3m") hatten Nitratkonzentrationen von durchschnittlich 0,9 mg $\text{NO}_3\text{-N/l}$. An dieser Stelle fand im obersten Meter der Rindenmulchschicht ein weiterer Nitratabbau von 16 % statt.

Ursache der unterschiedlichen Nitrat-Profile im Rindenmulchbecken könnte die Inhomogenität der Rindenschichtung sein. Durch eine solche ungleichmäßige Verteilung der Rinde kam es vermutlich zu Kurzschlußströmungen bzw. Zonen mit hoher Wasserverweilzeit. Während im ersten Fall die Wasser-Rindenmulch-Kontaktzeit nicht ausreicht, um eine optimale Denitrifikationsrate zu ermöglichen, kann es im zweiten Fall zu unerwünschten Reaktionen wie z.B. Sulfatreduktion kommen.

Tracerversuche zur Charakterisierung des Durchströmungsverhaltens von Rindenmulchbecken stehen noch aus.

Nach Rückkehr zum ursprünglichen Betrieb, ohne Eluatzugabe, wurde trotz reduzierter Wasserzulaufmenge (7,4 m^3/h) ein steter Anstieg der Nitratkonzentration an jedem Meßpunkt, außer bei MLB II in der obersten Schicht (3 m über dem Kiesboden), festgestellt. Die Besonderheiten der Meßstellen bei MLB II blieben auch nach einer Umschichtung der Rinde erhalten und werden zur Zeit im Rahmen einer Diplomarbeit untersucht.

3.6.3 Wassergesättigte und wasserungesättigte Bodenzone

Im kontinuierlichen Betrieb wurde der Rindenmulchablauf über den Schnellsandfilter (F1) geleitet und aus einem nachgeschalteten Spülwasserbehälter der gesättigten Bodenzone (GBZ) und/oder der wasserungesättigten Bodenzone (UGBZ) zugeführt.

Die mit Kiesen aus dem Maingebiet gefüllten Becken der Bodenzonen sollten den Aschaffenburg Boden mit seinen geologischen Eigenschaften simulieren.

Eine Überprüfung der hygienischen Anforderungen der Bodenzonen war nicht möglich, da dies bei Auslegung der Becken nicht berücksichtigt worden war. Bei anderen Verfahren hat sich gezeigt, daß die Untergrundpassage eine einfache und wirksame Methode zur Nachreinigung von nitratabgereichertem Wasser aus einer biotechnologischen Anlage ist (Rödelsperger, 1988).

Die maximal möglichen Durchflußmengen für die Bodenzonen wurden vor dem kontinuierlichen Betrieb mit Brunnenwasser bestimmt. Hauptkriterium bei der GBZ war, daß das stirnseitig zugeführte Wasser nicht oberirdisch fließen sollte. Bei der UGBZ wurde darauf geachtet, daß bei der Wasserverrieselung über die Tropfschläuche Pfützenbildungen vermieden wurden.

Bei Inbetriebnahme der GBZ entsprach die Durchflußmenge mit durchschnittlich 7,3 m³/h dem ermittelten Maximalwert.

Zwei Tage später wurde ein Teilstrom des Filtratwassers über der mit *Iris pseudacorus* bepflanzten UGBZ mit der für diese Bodenzone angestrebte Durchsatz von 1 m³/h verrieselt. Nach 14 Tagen war die Zuführung der angegebenen Menge nicht mehr möglich, da bei niedrigen Temperaturen das Wasser in den Tropfschläuchen gefror, bzw. die Poren der Tropfschläuche durch das verstärkte Wachstum schleimbildender Bakterien verstopft wurden.

3.6.3.1 DOC-Messungen

Die DOC-Konzentrationen im Filterablauf konnten nach der Bodenpassage (GBZ) um durchschnittlich 3,5 mg C/l gesenkt werden. Dies entsprach einer Tagesabbaufracht von 0,6 kg C. Nach Redu-

zierung der GBZ-Zuflußmenge auf 6 m³/h (s.u.) wurden im Ablauf mit durchschnittlich 2,5 mg C/l im Vergleich zum Filtrat 3,2-fach niedrigere Konzentrationen gemessen.

Bedingt durch die Erhöhung der Durchflußmenge in RMB1 ab dem 63. Betriebstag und durch die Abnahme des Potentials an leicht löslichen Stoffe aus der Rinde sanken die DOC-Konzentrationen im Ablauf von RMB1 und F1 ab. Bei DOC-Werten von 2,6 mg C/l im Filtrat lagen die GBZ-Ablauf-Konzentrationen während der weiteren Betriebszeit im Mittel bei 1,5 mg C/l. Über die chemische Zusammensetzung kann jedoch keine Aussage gemacht werden.

Die DOC-Zufuhr in die Bodenzone bewirkte eine üppige Bakterienentwicklung. *Zoogloea ramigera* wurde als auffälliger Bestandteil der schleimigen Bakterienmasse identifiziert. In den Schluckbrunnen und in der Kiesschicht war die Bakterienentwicklung so intensiv, daß es zur Verstopfung der GBZ kam. Daraus resultierte, daß das zugeführte Wasser durch die die Zulaufrohre umgebende Kiespackschicht nach oben gedrückt wurde, die Bodenzone oberirdisch passierte und in der Kiespackschicht der Ablaufsammelrohre versickerte. Ab dem 36. Betriebstag wurde die Zulaufmenge auf 6 m³/h gedrosselt. Nachdem immer noch oberirdische Kurzschlußströmungen beobachtet werden konnten, wurde ab dem 63. Betriebstag die Zulaufmenge nochmals auf 3,8 m³/h reduziert.

Die Konzentrationen im Ablauf der UGBZ lagen stets unter denen der GBZ-Abläufe. Bei Durchsätzen, die weit unter den angestrebten 1 m³/h lagen, wurden die DOC-Konzentrationen im F1-Ablauf (durchschnittlich 8,6 mg C/l) auf 2,4 mg C/l verringert.

3.6.3.2 Stickstoffparameter

Bei der Passage der wassergesättigten Bodenzone wurden durchschnittlich 0,2 kg NO₃-N/d reduziert. Die NO₃-Ablaufwerte oszillierten kurz vor der ersten Erhöhung der RMB1-Zulaufmenge um den Wert von 0,1 mg NO₃-N/l (Abb. 35). Nach der Erhöhung der Durchflußrate stiegen die Nitratkonzentrationen im Ablauf der GBZ auf durchschnittlich 2,3 mg NO₃-N/l an.

Die Nitratkonzentrationen lagen nach der Reduzierung der Zulaufmenge im RMB1 und GBZ ab dem 86. Betriebstag bei durchschnittlich $4,2 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$. Dies entspricht bei einer durchschnittlichen $\text{NO}_3\text{-N}$ -Konzentration im Fl-Ablauf von $5,1 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ einer Nitratreduktion von $0,08 \text{ kg NO}_3\text{-N/d}$.

Die Nitritkonzentrationen lagen ab dem 12. Betriebstag im Ablauf der GBZ bei $<< 0,03 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ ($<< 0,1 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$). Nach der Erhöhung der Zulaufmenge in RMB1 ab dem 28. Tag wurden Nitritkonzentrationen im Ablauf der GBZ von durchschnittlich $0,02 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ gemessen, einzelne Meßwerte lagen jedoch über dem Grenzwert der TVO.

Ab dem 86. Betriebstag lagen die Nitritkonzentrationen mit $0,25 \pm 0,16 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ über dem Grenzwert der TVO (s. RMB1, 3.6.1.2).

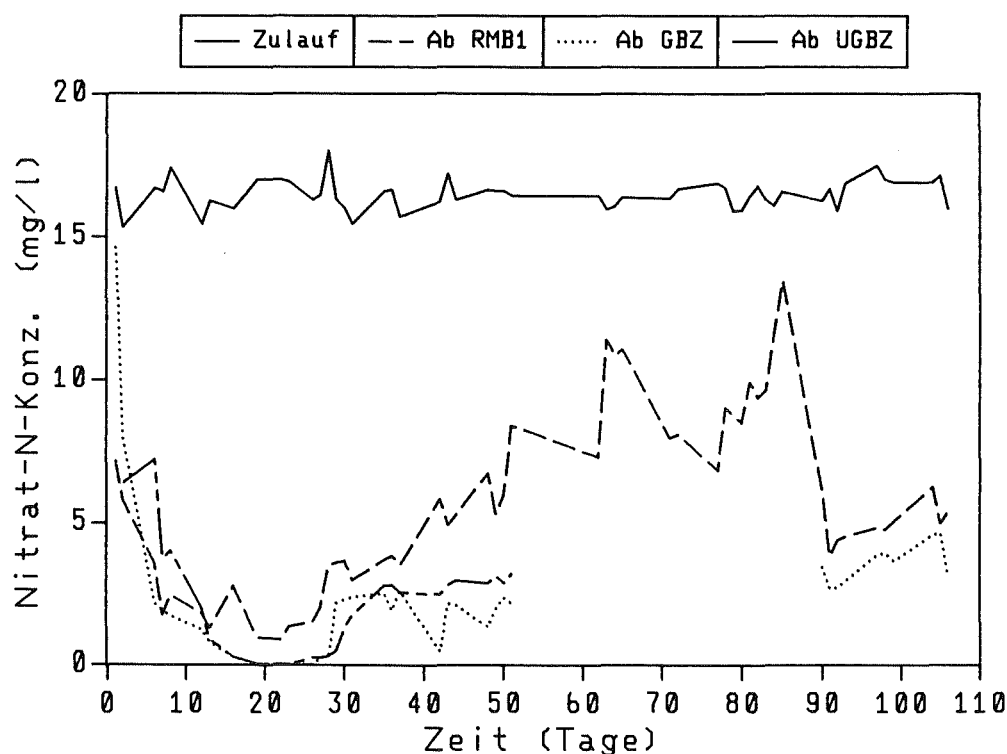


Abb. 35: Nitratkonzentrationen im Zu- und Ablauf von RMB1, GBZ und UGBZ.

Die wasserungesättigte Bodenzone (UGBZ) wurde zu Versuchsbeginn mit $0,73 \text{ m}^3/\text{h}$ Filtratwasser beschickt. Die Ablauf-Nitratkonzentrationen lagen ab dem 15. Betriebstag unter $0,2 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$, die Nitrit-Konzentrationen waren ab diesem Zeitpunkt $<< 0,03 \text{ mg}$

NO₂-N/l (Abb.35). Aus oben beschriebenen Gründen konnten keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden.

Mit durchschnittlich 15,9°dH nach Passage der GBZ und 16,2°dH im Ablauf der UGBZ waren diese Werte ebenso wie die Leitfähigkeits- und pH-Werte gegenüber denen des RMB1-Ablaufs deutlich erhöht, was auf Auswaschungen des Kieskörpers zurückzuführen war.

Die Wassertemperaturen in der wassergesättigten Bodenzone lagen zwischen 8,7 und 10,0°C.

Die Keimzahlen in den Abläufen der Bodenzonen lagen stets über 100 Keime/ml, d.h. die trinkwasserhygienischen Anforderungen nach der TVO bezüglich der Keimzahlen wurden in den Bodenzonen nicht erfüllt.

Bei den Becken, die die Bodenzonen simulierten, konnte eine Verringerung der DOC-Konzentration und auf Grund der organischen Belastung des zugeführten Wassers auch eine Nitrat-abreicherung festgestellt werden. Hohe DOC-Konzentrationen im Zulauf führten zu einer vermehrten Biomasseproduktion und konnten dadurch die Durchlässigkeit des Filters stark beeinträchtigen.

3.7 Isolierung von Mikroorganismen aus den Rindenmulch-Laborreaktoren und Charakterisierung ihrer Eigenschaften in Bezug auf N- und C-Verwertung

Bei den mikrobiologischen Untersuchungen wurde wenig Wert auf die trinkwasserhygienische Beurteilung nach der TVO gelegt. Vielmehr wurde versucht, eine Bakterien- und Pilzpopulation zu isolieren, die maßgeblich am "Geschehen" im Rindenmulchreaktor beteiligt war. Aus diesem Grunde wurden die aus Flüssig- und von Rindenproben isolierten Mikroorganismen vornehmlich auf ihre Fähigkeit zur Nitrat- und Celluloseverwertung hin untersucht.

3.7.1 Keimzahlbestimmungen und Selektionierung von Mikroorganismen

Zur quantitativen Erfassung der mikrobiellen Biomasse in Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren wurde zum einen die Koloniezählung (indirekte Methode), zum anderen der MPN-Test (Analogwertmethode) verwendet. Letztere Auswertung hatte den Vorteil, daß neben der quantitativen Erfassung der Gesamt-Bakterienpopulation auch eine Einteilung in Denitrifikanten und Nitratreduzierer vorgenommen werden konnte (2.6.5). Bei beiden Verfahren wurden statt einzelner Zellen selektiv deren Vermehrungsprodukte als Kolonien auf festen Nährsubstraten oder als Trübung in flüssigen Medien gewertet.

Das Auszählen der Bakterien im Reaktorablauf nach einer Proteinfärbung mit Coomassie (direkte Methode) erwies sich als schwierig, da nicht nur lebende und tote Keime gezählt wurden, sondern ausgespülte Rindenfasern mit angefärbt wurden. Bedingt durch die Inhomogenität der Proben war eine repräsentative Auswahl des Auszählfeldes auch nach Homogenisierung der Probe nicht möglich.

Neben diesen quantitativen Bestimmungen wurden Rindenproben rasterelektronenmikroskopisch auf ihren Bewuchs hin untersucht, um ein qualitatives Bild von den der Rinde anhaftenden Mikroorganismen zu erhalten.

Im folgenden werden die Keimzahlbestimmungen aus der Versuchsreihe mit Reaktor R5 und R7 beschrieben; weitere Ergebnisse sind in der Diplomarbeit von Tomaschewski (1990) aufgeführt.

Die Zellzahlen im Reaktorzulauf betrugen 10^3 - 10^5 Keime/ml. Diese hohen Keimzahlen waren bedingt durch die Wiederverkeimung des Leitungswassers in den unsterilen Rohr- und Schlauchverbindungen und in dem Vorratsbehälter. Dott (1983) wies nach einer 4-tägigen Inkubation Wiederverkeimungen von 10^4 Bakterien/ml im Trinkwasser nach, was diesen Beobachtungen entspricht.

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen von Rindenmulchablaufproben aus R5 und R7 sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tab. 19: Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen im Reaktorablauf von R5 und R7.

MPN Ges. = MPN-Gesamtkeimzahl

MPN Denitr. = Denitrifikanten-Keimzahl im MPN-Ansatz

MPN Nitr. = Keimzahl der Nitratreduzierer im MPN-Ansatz

Ablauf R5					
Datum (Betriebsstage)	NNB-Agar Nähr-Agar		MPN		
			Ges.	Denitr.	Nitr.
22.06.88 (2)		$5,5 \cdot 10^4$			
27.06.88 (7)	$1,3 \cdot 10^6$				
13.07.88 (23)			$3,5 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$
21.07.88 (31)			$3,5 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$
06.10.88 (108)			$1,7 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$
28.06.89 (371)	$2,8 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^2$	$6,0 \cdot 10^2$
17.07.89 (390)	$2,8 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$
02.08.89 (406)	$1,9 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^1$	$9,0 \cdot 10^2$

Ablauf R7					
Datum (Betriebsstage)	NNB-Agar Nähr-Agar		MPN		
			Ges.	Denitr.	Nitr.
25.10.89 (3)	$6,3 \cdot 10^6$	n.b.	$2,5 \cdot 10^7$	0	$2,5 \cdot 10^7$
01.11.89 (10)	$3,8 \cdot 10^6$	n.b.	$1,6 \cdot 10^7$	0	$1,6 \cdot 10^7$
22.11.89 (31)	$4,9 \cdot 10^5$	n.b.	$2,5 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6$
14.12.89 (53)	$6,8 \cdot 10^5$	n.b.	$2,5 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^6$
11.05.90 (201)	n.b.	n.b.	$6,0 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$

Die Ergebnisse der direkten Zählung nach Anfärbung der Ablaufproben aus R5 mit Coomassie lagen mit $7,3 \cdot 10^6$ - $2,2 \cdot 10^7$ Keime/ml (28.06.89 - 02.08.89) wie erwartet höher als die der indirekten Methoden.

Falls ein Vergleich der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden, in Anbetracht einer Übereinstimmung der Zehnerpotenzen der letzten drei Proben, zulässig ist, so zeigt sich bei R5 eine Zunahme der Zellzahlen von 10^4 Keime/ml (2. Betriebstag) auf etwa 10^6 Keime/ml (108. Betriebstag). Nach 350 Tagen Betriebszeit ging die Zellzahl auf durchschnittlich $5,5 \cdot 10^3$ Keime/ml, mit einem Denitrifikantenanteil von ca. 11 % ($5,9 \cdot 10^2$) zurück.

Der Titer der Nitratreduzierer lag bei etwa $1,3 \cdot 10^3/\text{ml}$ (24 %). Die zu diesem Zeitpunkt erreichte Nitrat-Abbaurate von durchschnittlich 11 % läßt darauf schließen, daß sich ein großer Teil der "aktiven" Mikroorganismen auf der Rinde befand. Dies wird auch durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen deutlich (Abb. 36 und 37).

Bei R7 konnte mit zunehmendem Betriebsalter im Ablauf des Reaktors ein Anstieg des Denitrifikantenanteils an der Gesamtkeimzahl festgestellt werden.

Die REM-Aufnahmen stellen den Versuch dar, ein aktuelles Bild des Rindenbewuchses wiederzugeben. Durch die Probennahme und -aufbereitung können Artefakte auftreten: Bakterien des Rinden-Haftwassers werden fälschlicherweise als Bewuchs angesehen, Deformationen entstehen oder der Bewuchs wird entfernt. Jedoch können die Bilder unter Berücksichtigung dieser Nachteile und im Zusammenhang mit den Begleitmessungen in einem Reaktorsystem einen ersten Einblick in den Mikrokosmos des Reaktors gewähren.

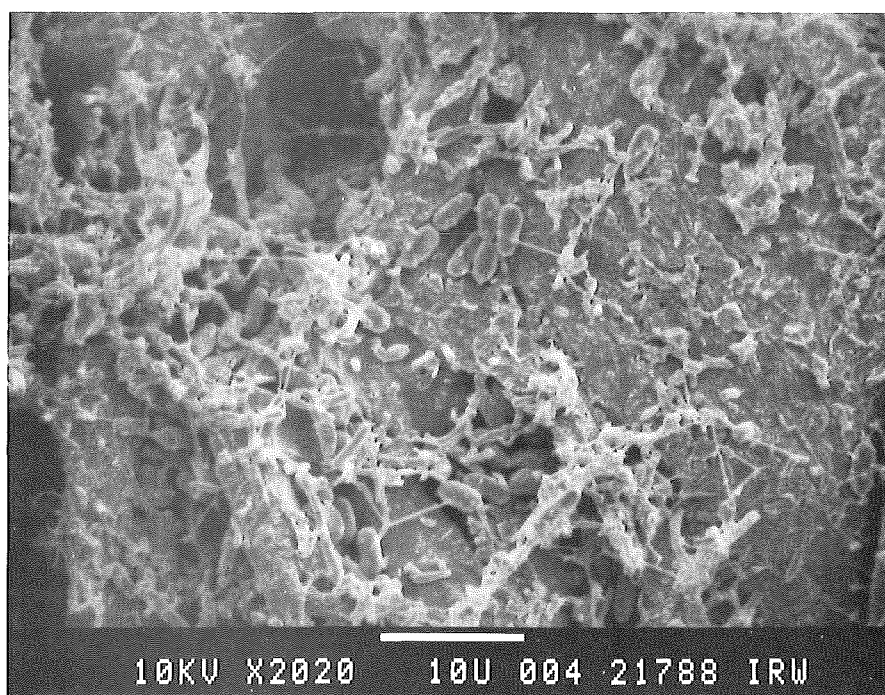


Abb. 36: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Fichtenrindenproben aus einem Denitrifikationsreaktor (R4). Das Betriebsalter des Reaktors betrug zur Zeit der Probennahme 159 Tage. Vergrößerung: 2000-fach.

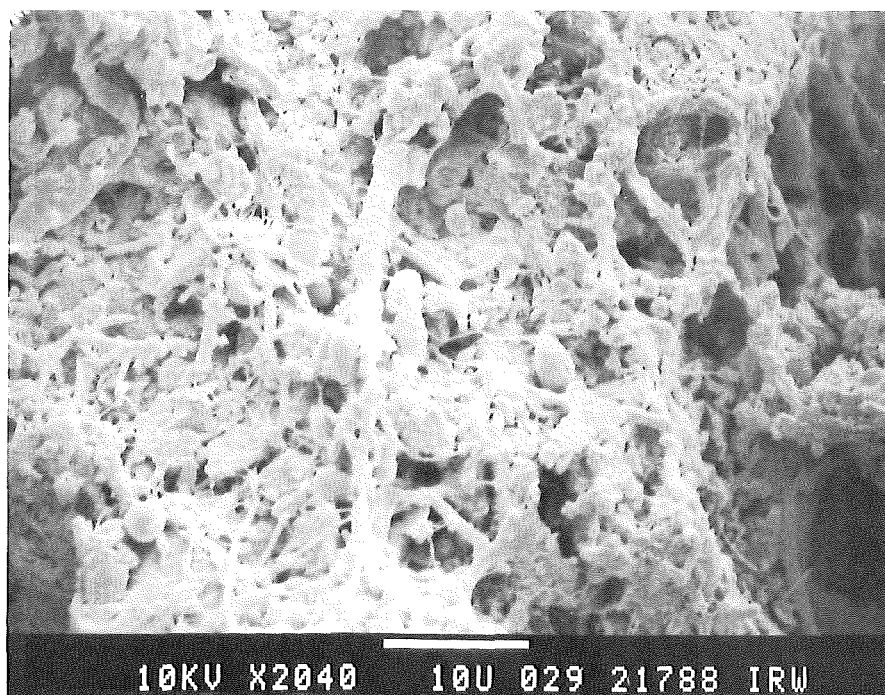


Abb. 37: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Fichtenrindenproben aus einem Denitrifikationsreaktor (R4). Zur Zeit der Probennahme waren dem Reaktor zwei Reaktoren mit frischem Rindenmulch vorgeschaltet (s. 3.3.3). Das Betriebsalter des Reaktors betrug 250 Tage.
Vergrößerung: 2000-fach.

Abb. 36 und 37 zeigen Rindenstücke aus Reaktor R4 zu unterschiedlichen Betriebszeiten und unter unterschiedlichen Betriebszuständen. Bei Abb. 36 betrug das Betriebsalter des Reaktors 159 Tage. Auf Abb. 37 war der Reaktor 250 Tage in Betrieb, jedoch lief er seit 23 Tagen innerhalb der in 3.3.3 beschriebenen Reaktorkaskade. Die vorgeschalteten Reaktoren mit frischer Fichtenrinde bedingten eine meßbar erhöhte Substratzufuhr in Reaktor 4. Anhand der REM-Bilder wird deutlich, daß der mikrobielle Bewuchs auf der Rinde nach der DOC-Erhöhung dichter wurde.

Aus den Ansätzen zur Keimzahlbestimmung im kontinuierlich betriebenen Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R5 wurden Mikroorganismen isoliert und zur Reinkultur gebracht. Die Bakterienstämme 2, 3, 4, 5, 7, 11 und 13 wurden so gewonnen.

3.7.2 Selektion von cellulolytisch aktiven Mikroorganismen

Eine einfache Methode, um Cellulose-Abbauer zu selektieren, ist die Inkubation von sterilen Papierfilterstreifen in nitratreichem (2,5 % KNO_3) Leitungswasser mit Rindenstückchen. Bei Aktivierung der cellulolytischen Eigenschaften der Mikroorganismen auf der Rinde wird der Abbau der Filtercellulose sichtbar.

Rindenproben aus R4 (Betriebsalter 233 Tage) und R5 (Betriebsalter 5 Tage) wurden entnommen, in je zwei sterile Glasröhrchen mit den oben genannten Substanzen gegeben und bei 20°C inkubiert. Nach vier Wochen war lediglich bei zwei Ansätzen eine Braunfärbung der Lösung zu erkennen, die Cellulosefilter waren sichtlich unversehrt. Vier Monate später wurden bei den Ansätzen aus R5 Pilze beobachtet, die sich auf dem Filter an der Wasser/Luft-Grenzschicht angesiedelt hatten. Nach einjähriger Inkubationszeit waren die Cellulosestreifen bei allen Proben stark angegriffen und bei je einer Probe aus R4 und R5 vollständig zerfasert. In den Lösungen dieser Proben wurden weder NO_3^- noch NO_2^- nachgewiesen. Die Parallelansätze zeigten eine Braunfärbung des Filterstreifens, und in den Lösungen wurde sowohl Nitrat als auch Nitrit qualitativ festgestellt.

Die Rindenstückchen und die Filterstreifen wurden getrennt auf NNB-Agar aufgelegt und bei 20°C inkubiert.

Vier Pilzstämme und die Bakterienstämme mit den Nummern 16-30 wurden daraus isoliert.

3.7.3 Charakterisierung und Identifizierung der isolierten Bakterien

3.7.3.1 Stickstoffverwertung

Die Bakterienisolate wurden in MPN-Röhrchen mit flüssigem NNB-Medium drei Wochen bei 20°C inkubiert. Anhand der Gasbildung und den Stickstoffkonzentrationen von NO_3^- , NO_2^- und NH_4^+ konnten Denitrifikanten, Nitratreduzierer und Nitratammonifizierer unterschieden werden (Tab. 20).

Die auf Grund ihrer Gasproduktion als Denitrifikanten bezeich

neten Bakterienstämme wurden erneut in NNB-Medium inkubiert und das entstandene Gas qualitativ analysiert. Dabei wurde die N_2O -Produktion vor und nach der Acetylen-Blockade gaschromatographisch gemessen (2.4.17).

Die Stämme 16 und 18 bauten das Nitrat im Medium vollständig zu gasförmigen Stickstoffverbindungen ab. Bei der Gasanalyse zeigte sich, daß bereits vor der Acetylen-Blockade N_2O gebildet wurde, d.h. N_2O ist unter diesen Bedingungen ein "natürliches" Endprodukt der Denitrifikation dieser Mikroorganismen.

Bei den gasbildenden Stämmen 3, 19, 22 und 27 wurden Mengen an $\text{NO}_3\text{-N}$ und $\text{NO}_2\text{-N}$ gemessen, deren Summen jedoch geringer waren als die eingesetzte Nitrat-N-Konzentration, so daß auf eine Denitrifikation geschlossen werden konnte. Während die Stämme 3, 19 und 27 überwiegend N_2O als gasförmiges Endprodukt der Denitrifikation bildeten, wurden bei Stamm 22 vor der Acetylen-Blockade nur Spuren von N_2O , nach der Blockade Konzentrationen von etwa $20 \mu\text{g N}_2\text{O-N/ml}$ detektiert. Stamm 22 war in der Lage Nitrat bis zu N_2 zu reduzieren.

Bei den Isolaten 11 und 23 war Nitrit nicht nachweisbar und Nitrat nur zu 10 % bzw. 20 % abgebaut. Da bei Stamm 11 Gasbildung beobachtet und im weiteren Versuch als N_2 analysiert wurde, konnte er als Denitrifikant bezeichnet werden.

Die fehlende Gasbildung bei Stamm 23 weist auf Nitratammonifikation hin. Dabei wird NO_3^- über NO_2^- zu NH_4^+ reduziert, welches primär zur physiologischen Nutzbarmachung des Stickstoffs dient (Yordy & Ruoff, 1981).

Sechs weitere Stämme bildeten kein Gas, reduzierten jedoch Nitrat zu Nitrit und konnten somit den Nitratreduzierern zugeordnet werden. Stammspezifisch wurden zwischen 3 % und 59 % des eingesetzten $\text{NO}_3\text{-N}$ zu $\text{NO}_2\text{-N}$ abgebaut.

Die isolierten Bakterien 4, 7, 17, 21, 28 und 29 konnten Nitrat nicht verwerten, es wurden weder NO_2^- noch gasförmige Produkte nachgewiesen. Eine Trübung der Ansätze und erhöhte Ammoniumkon-

zentrationen bestätigten jedoch ein Anwachsen der Mikroorganismen.

Die Stämme 2 und 5 wuchsen unter den gegebenen Bedingungen nicht.

Alle Testansätze mit Bakterienwachstum wiesen erhöhte Ammoniumkonzentrationen auf. Dieser gebildete NH_4 -Stickstoff stammte wahrscheinlich nicht aus dem Nitrat, sondern aus den komplexen N-Verbindungen des NNB-Mediums, das sowohl Amino-N als auch Harnstoff enthielt. Zahlreiche Bakterien sind in der Lage Proteine abzubauen und dabei Ammonium zu bilden (Ammonifikation) oder Harnstoff durch hydrolytische Desaminierung als N-Quelle zu nutzen.

Tab. 20: Konzentrationen der Stickstoffparameter im NNB-Medium nach 3-wöchiger Inkubation in MPN-Röhrchen.
Die Gasanalysen wurden in einem getrennten Versuch durchgeführt.

Stamm	Gasbildung		NO ₃ -N (mg/l)	NO ₂ -N (mg/l)	NH ₄ -N (mg/l)
	N ₂ O	N ₂			
16	+		0	0	267
18	+		0	0	267
3	+		98	42	185
19	+		171	80	139
22		+	413	12	204
27	+		384	35	214
11		+	583	0	107
23	-		514	0	222
13	-		660	16	84
20	-		387	239	206
24	-		216	382	382
25	-		215	362	322
26	-		513	193	167
30	-		527	150	180
4	-		670	0	216
7	-		684	0	145
17	-		680	0	158
21	-		678	0	148
28	-		661	0	155
29	-		676	0	257
2	-		652	0	86
5	-		693	0	88
Kontrolle	-		651	0	76

3.7.3.2 Celluloseverwertung

Bei der Denitrifikation mit Fichtenrinde ist Cellulose ein Hauptbestandteil der nutzbaren Kohlenstoffverbindungen. Aus diesem Grund wurde ein Teil der isolierten Mikroorganismen selektiv in einem Cellulose-Nitrat-haltigen Medium angereichert (2.6.3). In welchem Maße die isolierten Bakterien Cellulose und/oder deren Abbauprodukte verwerten konnten wurde anhand von Abbauprodukten mit amorpher Walseth-Cellulose (SWC) (2.7.2.1) und den Zuckern Cellodextrin, Cellobiose und Glucose untersucht (2.7.2.3).

Die Walseth-Cellulose wurde in M+R-Mineralmedium auf Agarplatten in fester Form angeboten, die Filterstreifen und die Zucker in verschiedenen Konzentrationen in M+R-Flüssigmedium.

Die isolierten Bakterien konnten Cellulose (SWC) weder unter aeroben noch unter anoxischen Bedingungen verwerten (Tab. 21). Einige Stämme konnten auf Grund der bei der SWC-Präparation gebildeten wasserunlöslichen Oligosaccharide und/oder des im Medium enthaltenen Hefeextraktes (0,05 %) auf den Testplatten wachsen, bildeten aber keine klaren Abbauhöfe.

Tab. 21: Ergebnisse der Cellulose- und Zuckerverwertung durch Bakterien.

+ Wachstum; - kein Wachstum; ? Wachstum wahrscheinlich nur auf Grund der im Medium enthaltenen Cellobiose- und Glucose-Anteile.

Stamm	Cellulose	Cellodextrin	Cellobiose	Glucose
3	-	?	+	+
4	-	+	+	+
11	-	?	+	+
17	-	+	+	+
19	-	+	+	+
22	-	+	+	+
27	-	+	+	+
16	-	-	-	+
18	-	-	-	+
26	-	-	-	+
29	-	-	-	+
2	-	-	-	-
5	-	-	-	-
7	-	-	-	-
13	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
28	-	-	-	-
30	-	-	-	-

In den Flüssigmedien mit Cellodextrin, Cellobiose oder Glucose als C-Quelle konnten sieben der 22 isolierten Stämme wachsen (Tab. 21). Davon wurden fünf als Denitrifikanten eingestuft (3, 11, 19, 22, und 27). Von den vier Stämmen, die nur Glucose ver-

werten konnten, zählten 16 und 18 zu den Denitrifikanten. Isolat 26 gehörte zu den Nitratreduzierern. Der Hauptanteil der isolierten Bakterien konnte auf den angebotenen Medien nicht wachsen. Von diesen elf Stämmen waren fünf (13, 20, 24, 25, 30) als Nitratreduzierer und Stamm 23 als Nitratammonifizierer klassifiziert worden. Die restlichen fünf Stämme konnten Nitrat nicht reduzieren.

3.7.3.3 Taxonomische Untersuchungen

Zur Identifizierung der 22 Reinkulturen wurden morphologische und physiologische Kriterien zugrunde gelegt. Die physiologischen Untersuchungen wurden hauptsächlich mit dem Sensititre-System durchgeführt (2.8.8). Die Überprüfung der Ergebnisse erfolgte anhand des Bergey's Manual (1984).

Von den aus Reaktor R5 isolierten Bakterien konnten acht zu den gram-negativen, aeroben beweglichen Stäbchen der Sektion 4 im Bergey's Manual (1984) zugeordnet werden. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die Familien der Pseudomonadaceae und der Neisseriaceae.

Tab. 22: Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Untersuchungen an Bakterienisolaten.

Pseudomonadaceae

+ positive Reaktion, - negative Reaktion,

d Reaktion nicht eindeutig, s stäbchenförmig

Stämme	16	18	30
<u>Sensititre-Tests</u>			
7-AMC-Lysine	-	-	-
Urea	-	-	-
Ornithine	-	d	-
Sorbitol	-	-	-
Xylose	+	+	-
Fr12	-	-	+
Sucrose	-	-	-
FR9	-	-	-
FR3	-	d	+
Trehalose	d	+	-
FR8	-	-	-
Mannitol	+	d	-
Maltose	-	-	+
FR4	-	-	d
Inositol	d	-	-
FR10	-	-	-
FR5	d	d	-
Fructose	d	d	d
Esculin	-	-	+
Arabitrol	+	+	-
Arabinose	+	+	-
Lysine	-	-	+
TDA	-	-	-
Raffinose	-	-	-
FR7	+	+	+
Arginine	+	+	d
FR6	-	-	-
Cellobiose	-	-	+
Malonate	d	d	d
Pyruvate	+	+	+
Citrate	+	+	d
Agmatine	+	+	+
<u>Zusatztests</u>			
gram	-	-	-
Morphologie	s	s	s
Länge (µm)	2	2	2
Bewegl.	+	+	-
Koloniefarbe	-	-	-
Katalase	+	+	+
Oxidase	+	+	-
Gelatinase	+	+	+
Fluoreszenz	+	+	-
Nitratreduktion	+	+	+
Denitrifikation	+	+	-

Zur Familie der Pseudomonadaceae werden gerade oder schwach gekrümmte, gram-negative, polarbegeißelte Stäbchen zusammengefaßt, die keine Sporen bilden. Die Energiegewinnung erfolgt durch aerobe Atmung mit Sauerstoff bzw. Nitrat als Elektronenakzeptor, aber nicht durch Gärung. Die Katalase- und gewöhnlich auch die Oxidase-Reaktionen sind positiv.

Zwei der untersuchten Stämme (16 und 18) wurden der Gattung *Pseudomonas* (RNA-Gruppe I) zugeordnet (Tab. 22). Auf Grund ihrer Fähigkeit zur Fluoreszenz, zur Bildung einer Arginindihi-

drolase und zur Denitrifikation kann die Identifikation auf die Arten *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescenz* und *Ps. chlororaphis* eingeschränkt werden. Um eine eindeutige Bestimmung vornehmen zu können, müßten weitere Kohlenstoffverwertungstests oder die Ermittlung des Guanin/Cytosin-Verhältnisses durchgeführt werden. Stamm 30 wurde in die *Ps. maltophila*-Xanthomonas-Gruppe (RNA-Gruppe V) eingeordnet. Gruppenmerkmale sind u.a. eine schwach ausgeprägte oder negative Oxidase-Reaktion und die Unfähigkeit zur Denitrifikation. Nach einer im Sensititre-Testsystem 100 %igen Wahrscheinlichkeit und in Übereinstimmung der zusätzlichen Tests (Tab. 22) konnte Stamm 30 als *Ps. maltophila* identifiziert werden.

Fünf Bakterienstämme konnten der Familie der Neisseriaceae mit den Gattungen *Neisseria*, *Klingella*, *Moraxella* und *Acinetobacter* zugeordnet werden (Tab. 23).

Die Organismen dieser Gruppe sind unbewegliche Kokken oder gekrümmte Stäbchen, die häufig paarig oder in kurzen Ketten angeordnet sind. Die Befähigung zur Nitrat- und Nitritreduktion ist bei einigen Arten aller Gattungen gegeben. Da der Oxidase-Test negativ ausfällt und auf Grund der anderen Merkmale (Tab. 23), werden die Stämme 19, 22, 26 und 27 als Vertreter der Gattung *Acinetobacter* zugeordnet.

Stamm 11 wurde im Sensititre-Test mit hoher Wahrscheinlichkeit als *Moraxella* spp. bestimmt.

Tab. 23: Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Untersuchungen an Bakterienisolaten.

Neisseriaceae

+ positive Reaktion, - negative Reaktion,

d Reaktion nicht eindeutig, ks kokkoide Stäbchen,

s stäbchenförmig

Stämme	26	19	22	27	11
<u>Sensititre-Tests</u>					
7-AMC-Lysine	-	-	-	-	-
Urea	-	+	+	+	-
Ornithine	-	-	-	-	d
Sorbitol	-	d	d	+	-
Xylose	-	d	d	-	-
Fr12	-	+	+	+	-
Sucrose	-	d	d	d	d
FR9	-	-	-	-	-
FR3	d	-	-	-	-
Trehalose	-	-	d	d	-
FR8	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	d
FR4	-	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	-
FR10	-	d	d	d	-
FR5	-	+	+	+	-
Fructose	-	d	d	d	d
Esculin	-	+	+	+	-
Arabitol	-	d	d	-	-
Arabinose	-	-	-	d	-
Lysine	d	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-
FR7	-	+	+	+	-
Arginine	d	d	d	d	-
FR6	-	+	+	+	-
Cellobiose	-	d	+	+	-
Malonate	-	-	-	-	-
Pyruvate	+	+	+	+	-
Citrate	+	d	d	+	-
Agmatine	+	+	+	+	-
<u>Zusatztests</u>					
gram	-	-	-	-	-
Morphologie	ks	ks	ks	ks	s
Länge (µm)	<2	1	2	1,5	>2,5
Bewegl.	+	+	+	+	+
Koloniefarbe	-	-	-	-	-
Katalase	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	+
Gelatinase	-	-	-	-	-
Fluoreszenz	-	-	-	-	-
Nitratreduktion	+	+	+	+	+
Denitrifikation	-	+	+	+	+

Als fakultativ anaerobe gram-negative Stäbchen (Sektion 5 im Bergey's Manual, 1984) gelten die Familien Enterobacteriaceae, Vibrionaceae und Pasteurellaceae. Sie besitzen einen respiratorischen und fermentativen Stoffwechsel und bis auf einige Stämme können alle Nitrat zu Nitrit reduzieren. Mit Ausnahmen sind sie Katalase-, und außer den Enterobacteriaceae, auch Oxidase-positiv.

Nach dem Sensititre-Testsystem können die Stämme 17, 21, 23 und 28 zu dieser Gruppe gehören (Tab. 24). Jedoch sind weiterführende Untersuchungen zur genaueren Definition notwendig.

Tab. 24: Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Untersuchungen an Bakterienisolaten.

Enterobacteriaceae & Vibrionaceae

+ positive Reaktion, - negative Reaktion,

d Reaktion nicht eindeutig, s stäbchenförmig,

gl-w gelblich-weiß

Stämme	17	21	23	28
<u>Sensititre-Tests</u>				
7-AMC-Lysine	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-
Ornithine	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	d
Xylose	d	-	-	-
Fr12	+	+	+	+
Sucrose	-	-	-	-
FR9	-	-	-	-
FR3	+	+	d	+
Trehalose	-	+	+	+
FR8	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-
Maltose	-	d	-	d
FR4	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
FR10	-	-	-	-
FR5	+	-	-	-
Fructose	-	d	+	d
Esculin	-	+	+	+
Arabitrol	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-
Lysine	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
FR7	d	+	+	+
Arginine	-	-	-	-
FR6	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	-
Pyruvate	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-
Agmatine	-	-	-	-
<u>Zusatztests</u>				
gram	-	-	-	-
Morphologie	s	s	s	s
Länge (µm)	>2	2	2	2
Bewegl.	+	+	+	-
Koloniefarbe	gelb	gl-w	gl-w	-
Katalase	+	+	+	+
Oxidase	-	+	-	-
Gelatinase	-	+	+	+
Fluoreszenz	-	-	-	-
Nitratreduktion	-	-	+	+
Denitrifikation	-	-	-	-

Von den vier isolierten gram-positiven Bakterien konnten drei auf Grund ihrer unter dem Mikroskop stark lichtbrechenden Endosporen zu der Gattung *Bacillus* gerechnet werden. Lage, Größe und Form der Sporen sowie charakteristische Substratver-

wertungsmuster ermöglichen eine Bestimmung der Arten innerhalb dieser Gattung. Die drei Isolate waren unbeweglich, Katalase-positiv, Oxidase-negativ und zeichneten sich durch die Fähigkeiten der Gelatine-Verflüssigung und Nitratreduktion aus (Tab. 25). Nach Auswertung der oben genannten Kriterien konnte die Identifikation auf die Arten *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* und *B. thuringiensis* eingeschränkt werden. Stamm 25 wurde auf Grund seines pilzgeflechtähnlichen Wachstums als *B. mycoides* identifiziert.

Tab. 25: Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Untersuchungen an Bakterienisolaten.

Bacillaceae

+ positive Reaktion, - negative Reaktion,

d Reaktion nicht eindeutig, s stäbchenförmig

Stämme	20	24	25
<u>Sensititre-Tests</u>			
7-AMC-Lysine	-	-	-
Urea	-	-	-
Ornithine	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Xylose	-	-	-
Fr12	+	d	-
Sucrose	-	+	-
FR9	-	-	-
FR3	+	+	d
Trehalose	+	+	+
FR8	+	+	d
Mannitol	-	-	-
Maltose	+	+	+
FR4	-	d	-
Inositol	-	-	-
FR10	-	-	-
FR5	-	-	-
Fructose	+	+	d
Esculin	+	+	-
Arabitrol	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Lysine	-	-	-
TDA	-	-	-
Raffinose	-	-	-
FR7	-	-	-
Arginine	+	+	-
FR6	-	-	-
Cellobiose	-	-	-
Malonate	-	-	-
Pyruvate	-	-	-
Citrate	-	-	-
Agmatine	-	-	-
<u>Zusatztests</u>			
gram	+	+	+
Morphologie	s	s	s
Länge (µm)	<5	<5	<4
Bewegl.	-	-	-
Koloniefarbe	weiß	weiß	weiß
Katalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
Gelatinase	+	+	+
Fluoreszenz	-	-	-
Nitratreduktion	+	+	+
Denitrifikation	-	-	-

Sieben der 22 isolierten Bakterienstämme konnten auf Grund der morphologischen und physiologischen Untersuchungen nicht eindeutig klassifiziert werden. Die Charakteristika dieser Isolate sind in Tab. 26 aufgeführt.

Stamm 2 ist als gram-positives, nicht sporenbildendes Stäbchen der Sektion 14 im Bergey's Manual (1984) zuzuordnen. Die übrigen nicht identifizierten Stämme gehören zu den gram-negativen Stäbchen.

Stamm 3 ist ein Oxidase-positiver, nicht fluoreszierender Denitrifikant, der im Sensititre-Testsystem der Gattung *Moraxella* zugeordnet wurde. Jedoch sprechen vier Einzelergebnisse des Tests und die Bewegungsfähigkeit des Isolates gegen diese Bestimmung. Nach Überprüfung der Charakteristika könnte Stamm 3 zur Gattung *Alcaligenes* gerechnet werden.

Das unbewegliche, stäbchenförmige Bakterium Nr. 4 konnte mit Hilfe des Sensititre-Testsystems nicht identifiziert werden. Es ist Katalase-positiv, Oxidase-negativ, verwertet Celluloseabbauprodukte und bildet gelbe Kolonien.

Die Isolate 5 und 7 sind unbewegliche, gram-negative Stäbchen. Beide reagieren Oxidase-positiv und Katalase-negativ. Während Stamm 5 gelb gefärbte Kolonien bildet, ist bei Stamm 7 die Koloniefarbe rosa.

Zur Gattung *Flavobacterium*, einem aeroben, gram-negativen Stäbchen, wurde nach dem Sensititre-Test der Stamm 29 zugeordnet. Einige Testergebnisse widersprechen dieser Bestimmung jedoch. Stamm 13 konnte auf Grund seines langsamen Wachstums mit dem Sensititre-Testsystem nicht charakterisiert werden. Alle Reaktionen waren negativ.

Tab. 26: Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Untersuchungen an Bakterienisolaten.

Nicht identifizierte Stämme

+ positive Reaktion, - negative Reaktion,

d Reaktion nicht eindeutig, s stäbchenförmig

Stämme	2	3	5	4	29	7	13
<u>Sensititre-Tests</u>							
7-AMC-Lysine	+	-	-	+	-	d	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	-	-	-	-	-
Xylose	+	d	-	+	-	+	-
Fr12	-	+	+	d	+	+	-
Sucrose	+	d	-	-	-	+	-
FR9	-	-	-	d	-	+	-
FR3	-	-	-	+	+	+	-
Trehalose	d	-	-	-	d	d	-
FR8	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	d	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	+	-	d	-
FR4	+	+	-	-	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
FR10	-	+	-	d	-	+	-
FR5	+	+	+	+	+	-	-
Fructose	d	-	-	d	-	d	-
Esculin	+	-	-	+	d	+	-
Arabitrol	-	+	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	+	-	+	-
Lysine	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	d	-
FR7	-	+	-	+	-	d	-
Arginine	-	-	-	-	-	-	-
FR6	-	+	d	+	-	+	-
Cellobiose	d	-	-	+	-	d	-
Malonate	-	-	-	-	-	-	-
Pyruvate	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	-	-	-	-	-	-	-
Agmatine	-	-	-	+	d	-	-
<u>Zusatztests</u>							
gram	+	-	-	-	-	-	-
Morphologie	s	s	s	s	s	s	s
Länge (µm)	2,5	2	2	>2	>2	2	2
Bewegl.	-	+	-	?	-	-	?
Koloniefarbe	gelb	-	weiß	gelb	gl	rosa	-
Katalase	+	+	-	+	+	-	+
Oxidase	-	+	+	-	-	+	-
Gelatinase	-	-	-	-	-	-	-
Fluoreszenz	-	-	-	-	-	-	-
Nitratreduktion	-	+	-	-	-	-	+
Denitrifikation	-	+	-	-	-	-	-

3.7.4 Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Pilze

3.7.4.1 Taxonomische Untersuchungen

Die Identifikation der Pilzisolates wurde von der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig durchgeführt. Folgende Charakteristika wurden angegeben:

Fusarium oxysporum Snyder & Hansen

Koloniemerkmale: Mycelium farblos bis schwach violett, Kolonie fein filzig bis zottig. Rückseite rötlich durchscheinend. Sporodochien mit orangefarbenen Sporenmassen.

Gutes Wachstum von 5-30°C, kein Wachstum bei 37°C.

Morphologie: Konidienbildung anfangs an kurzen lateralen Phialiden im Luftmycel, etwa $3 \times 7-12 \mu\text{m}$; später an verzweigten Konidienträgern, mehrzellig, gebogen, mit typischer Fußzelle und apikaler Spitze, meist 3-4fach septiert, $4 \times 35-45 \mu\text{m}$.

Humicola grisea Traaen var. *grisea*

Koloniemerkmale: Mycelium anfangs blaß grau, später olivbraun. Kolonie filzig-wollig. Rückseite graubraun.

Gutes Wachstum von 5-30°C. Kein Wachstum bei 37°C.

Morphologie: Phialidokonidien in schleimigen Köpfchen, ellip-tisch-tropfenförmig, etwa $1,5-2 \times 3-5 \mu\text{m}$; Aleuriokonidien dunkelbraun, fast kugelförmig, etwa 12-15 μm im Durchmesser, meist einzeln.

Petriellidium boydii (Shear) Malloch

Koloniemerkmale: Mycelium farblos-grau, Kolonie fein filzig. Rückseite durchscheinend.

Gutes Wachstum von 5-30°C. Kein Wachstum bei 37°C.

Morphologie: Konidienbildung an Graphium-ähnlichen Konidienträgern und einzeln an kurzen Träger- bzw. Aleuriokonidien. Konidienträger mit Hyphenbündeln, apikal Penicillium-ähnlich verzweigt, konidienbildende Zellen irregulär anneliert. Konidien entweder zylindrisch, etwa $3 \times 8 \mu\text{m}$ oder elliptisch, etwa

5 * 8-10 µm, glattwandig.

Petriellidium wurde als selbstfertile Art beschrieben. Die Bildung von Perithezien in Kultur konnte bei dem vorliegenden Stamm nicht nachgewiesen werden, die dimorphe Konidienbildung erlaubt aber die Zuordnung mit hinreichender Sicherheit.

Phialophora lignicola Goidanich

Koloniemerkmal: Mycelium anfangs blaß rötlich, später dunkel olivbraun. Kolonie fein filzig-zottig mit einer deutlichen Randzone submerser Hyphen. Rückseite schwarzbraun. Der Stamm scheidet gelbes Pigment aus.

Gutes Wachstum von 5-30°C.

Morphologie: Konidienbildung an Phialiden mit deutlicher Krangenbildung, meist einzeln, auch stark reduziert (Adelophialiden); Konidien variabel in Größe und Form, 1,5-2,5 * 2,5-5 µm, zum Teil apikulat. Chlamydosporen vorhanden, terminal oder lateral, etwa 5 * 9 µm. Hyphen mit Anschwellungen (moniliform), später dickwandig.

3.7.4.2 Stickstoffverwertung

Die vier Pilzisolat wurden wie die Bakterien in MPN-Röhrchen mit flüssigem NNB-Medium 4 Wochen inkubiert und die Stickstoffparameter analysiert.

In keinem Medium konnte unter diesen Versuchsbedingungen eine Abnahme der Nitratkonzentration gemessen werden. Geringes Mycelwachstum ließ darauf schließen, daß die Pilze nur in der aeroben Phase zu Versuchsbeginn gewachsen waren.

In der Literatur wird oft beschrieben, daß Pilze, insbesondere Arten aus der Gattung *Fusarium*, in nitrihaltigem Medium unter sauerstofflimitierten Bedingungen wachsen und N₂O-Gas produzieren (Bollag & Tung, 1972; Burth & Ottow, 1983; Malinowsky & Ottow, 1984; Yoshida & Alexander, 1970). Nitratabbau konnte nur bei *Fusarium oxysporum* festgestellt werden (Gunner & Alexander, 1964).

Die Pilzisolat wurden daraufhin in Nitrit-Nährbouillon unter anoxischen Bedingungen inkubiert und auf Nitritabbau und Gasbildung überprüft (Tab. 27).

Tab. 27: Konzentrationen der Stickstoffparameter in Nitrit-Nährbouillon nach 4-wöchiger Inkubation der Pilz-isolate in MPN-Röhrchen.

	Gasbildung	NO ₃ -N (mg/l)	NO ₂ -N (mg/l)	NH ₄ -N (mg/l)
<i>F. oxysporum</i>	+	0	954	427
<i>H. grisea</i>	+	0	1137	431
<i>P. boydii</i>	+	0	909	363
<i>Ph. lignicola</i>	+	0	1122	354
Kontrolle	-	0	1132	260

In allen vier Röhrchen konnten kleine Gasblasen beobachtet werden. Bei *Fusarium oxysporum* und *Petriellidium boydii* war eindeutig eine Abnahme der Nitritkonzentration zu messen.

Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Burth et al. (1982) überein. Von 427 Pilzisolaten aus Kläranlagen-Schlamm konnten 110 in nitrithaltigem Medium N₂O produzieren. Nur einige Stämme setzten bei Inkubation mit Nitrat Spuren von N₂O-Gas frei. Vertreter der Gattung *Fusarium* waren mit 20 Stämmen das häufigste Isolat. Jedoch wurde unter anderem auch der Pilz *Petriellidium boydii* isoliert und als "denitrifizierende" Spezies eingestuft. Da, wie auch von Bollag & Tung (1972) beschrieben, Wachstum und Nitritverwertung unter völligem Mangel an Gelöstsauerstoff nicht oder nur sehr eingeschränkt stattfindet, ist die Funktion des Nitrits als terminaler Wasserstoffakzeptor nicht wahrscheinlich. So kann die N₂O-Bildung in nitrithaltigem Medium eher als Nitritentgiftung (Burth et al., 1982) oder als chemische Nebenreaktion (Bollag & Tung, 1972) angesehen werden. Bei Wiederfindungsraten von 13 % (Bollag & Tung, 1972) und 65 % (Malinowsky & Ottow, 1984) des Nitrit-N in N₂O-N wird ein hoher Anteil des Nitrit-Stickstoffs assimilativ genutzt.

3.7.4.3 Celluloseverwertung

Zum Nachweis für die cellulolytischen Fähigkeiten der Pilze wurden die Isolate auf SWC-beschichteten Agarplatten (2.7.2.1)

und mit Cellulose-Filterpapier in Flüssigmedien (2.7.2.2) inkubiert.

Alle vier Pilzisolate wuchsen unter aeroben Kulturbedingungen auf den SWC-Agarplatten und konnten Cellulose verwerten. Die Hydrolyse der Cellulose war bei *Humicola grisea*, *Petriellidium boydii* und *Phialophora lignicola* besonders deutlich als klarer Hof außerhalb des Pilzmycels zu erkennen. Bei *Fusarium oxysporum* verdeckte starkes Mycelwachstum die Hofbildung. Unter anaeroben Versuchsbedingungen konnte weder Pilzwachstum noch Celluloseabbau festgestellt werden.

Bei dem Versuch zum Abbau der Cellulose-Filterpapierstreifen in Flüssigkulturen waren schon nach vier Inkubationstagen Abbaureaktionen erkennbar, die sich während der nächsten 4 Wochen verstärkten.

Bei *F. oxysporum* waren die Filterstreifen vollständig zerfallen, wohingegen bei *Ph. lignicola* und *H. grisea* nur ein schwacher Abbau zu erkennen war. Die Papierstreifen bei *P. boydii* waren dicht von Pilzmycel bewachsen, so daß ein Abbau nicht erkennbar war.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde den Ansätzen am Ende des Versuchs Kulturfiltrat entnommen, mit CMC-Flüssigmedium inkubiert und die Endoglucanase-Aktivität bestimmt (2.4.12).

Bei allen vier Pilzisolaten konnte Endoglucanase-Aktivität nachgewiesen werden (Tab. 28), d.h. die Pilze gaben unter den Versuchsbedingungen das Enzym in das Medium ab, welches einen der ersten Schritte des Celluloseabbaus katalysiert. Somit ist der Filterpapierverfall höchstwahrscheinlich auf cellulolytische Abbauvorgänge zurückzuführen.

Im Kulturfiltrat selber waren keine reduzierenden Zucker nachzuweisen. Das bedeutet, daß die Bakterien mit den Pilzen um die Celluloseabbauprodukte in Konkurrenz treten müssen.

Tab. 28: Aktivität der Endoglucanase in Flüssigkulturen mit Filterpapier als C-Quelle.

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgt nach Zugabe von Kulturfiltrat in das CMC-Medium und wird in nkat/ml Kulturfiltrat angegeben.

Stamm	Endoglucanase-Aktivität (nkat/ml Kulturfiltrat)
<i>Fusarium oxysporum</i>	2,0
<i>Humicola grisea</i>	1,7
<i>Petriellidium boydii</i>	0,2
<i>Phialophora lignicola</i>	2,2

3.7.5 Misch-Kulturen von Bakterien und Pilzen

Um die fördernden oder hemmenden Wechselwirkungen zwischen Bakterien- und Pilzwachstum zu untersuchen, wurden die Suspensionen der Bakterien-Reinkulturen homogen auf SWC- und NNB-Agar aufgebracht und mit den Pilzisolaten, wie in 2.7.3 beschrieben, inkubiert. Von den Bakterien wurden die gram-negativen Denitrifikanten (3, 11, 16, 18, 19 und 22) und die schnell wachsenden gram-positiven Stämme 24 und 25 (*Bacillus spp.*) getestet.

Die Anzucht unter anoxischen Bedingungen gelang nicht, da die Pilze und einige Bakterien nicht wuchsen.

Bei den Stämmen 24 und 25 wurden im Bereich der Pilzinokula von *Fusarium* und *Phialophora* kreisförmige Zonen erkennbar, in denen sich keine Bakterienkolonien entwickelt hatten. Offensichtlich wurde von den Pilzen ein diffusibler, auf gram-positive Bakterien hemmend wirkender Stoff ausgeschieden. Das Wachstum der anderen untersuchten Bakterien wurde nicht gehemmt.

4 DISKUSSION

Die erzielten Versuchsergebnisse zeigen die grundsätzliche Tauglichkeit der Fichtenrinde als Aufwuchsmaterial und Elektromendonator für die biologische Denitrifikation. In den untersuchten Rindenmulchreaktoren konnten jedoch im Vergleich mit anderen biotechnologischen Denitrifikationsverfahren nur geringe Raum-Zeit-Ausbeuten erreicht werden. Zu Beginn jedes kontinuierlichen Anlagenbetriebes werden aus der Rinde große Mengen an organischen Kohlenstoffverbindungen ausgewaschen (ca. 170-270 mg C/l) und, nach erfolgreicher Besiedlung der Rinde, von den Mikroorganismen verstoffwechselt. Im Gegensatz dazu wird bei den üblichen biologischen Verfahren meist Ethanol als Substrat für die Mikroorganismen stöchiometrisch zugesetzt, so daß eine gleichbleibende DOC- und Nitratkonzentration im Reaktorablauf gewährleistet ist.

4.1 Fichtenrindenmulch als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroorganismen

Wie Analysen der Rindenmulch-Extrakte zeigten, waren leicht abbaubare Substanzen, wie monomere und oligomere Zucker, kurzkettige Säuren, aber auch phenolische Verbindungen, die als Nebenprodukte der Ligninbiosynthese auftreten können (Fengel & Wegener, 1984), wesentliche Bestandteile des wässrigen Eluats. In den batchweise betriebenen Kaltwasser-Extraktionen waren nach 48 Stunden ca. 2 % des Gesamtkohlenstoffgehaltes der Fichtenrinde in Lösung. Etwa 10 % (bez. auf Kohlenstoff) davon erwiesen sich als monomere Zucker und 49 % als oligo- oder polymer gebundene Zucker (3.1.3).

Die mit der Gelfiltrationschromatographie detektierten höhermolekularen Verbindungen (MG > 4000) können wasserlösliche Hemicellulosen (Weißmann, 1981), polyphenolische Substanzen (Hergert, 1960) und Huminstoffe sein. Protokatechusäure als Vorstufe der Gallussäure, deren wichtigste Derivate die hydrolysierbaren Gerbstoffe (Gallotannine) sind, wurde ebenso wie Guaiacol und Vanillinsäure als Produkte des Ligninabbaus

(Deschamps & Lebeault, 1982) mit Hilfe der GC-MS identifiziert. Mit Einschränkungen (3.2.2.2) kann anhand der UV-Spektren auf Ligninderivate und Huminsäuren im Ablauf der Rindenmulch-Reaktoren geschlossen werden.

Die Ergebnisse der Zuckeruntersuchungen (3.1.3.2) weisen ebenfalls auf die Anwesenheit von wasserlöslichen Hemicellulosen und Pektinen im Extrakt hin. Glucose, Mannose und Xylose als Zuckerbausteine der wichtigsten Hemicellulosen in der Fichtenrinde und Galactose, Arabinose und Rhamnose als Pektin-Bestandteile wurden, wie auch von Dietrichs (1975) und Painter & Purves (1960), im Fichtenrinden-Eluat gefunden.

An der raschen Abnahme der Glucosekonzentration beim Einquellen der Rinde wird deutlich, daß Glucose in den unsterilen Versuchen einer alsbaldigen mikrobiellen Verwertung unterliegt. Untersuchungen von Rashid & Schaefer (1988) zur Steigerung der Nitratreduktion im Boden nach Zugabe von Glucose, Cellulose oder Lignin unter anaeroben Bedingungen ergaben, daß Glucose den Nitratabbau in hohem Maße fördert. Bei Cellulose-Zugabe wurde die 24-fache Zeit benötigt, um Nitrat zu verwerten. Dies ist auf Grund der notwendigen Induktion des Celluloseabbaus nicht verwunderlich. Zudem sind nicht alle im Boden lebenden Mikroorganismen zu dieser enzymatischen Spaltung fähig, wohingegen Glucose ein leicht verwertbares Substrat ist.

Die Extraktausbeute aus Fichtenrinde mit kaltem Wasser ist mit 18 % gegenüber anderen Extraktionsmittel gering (Dietrichs et al., 1978). Es werden vor allem Kohlenhydrate, Proteine, Alkaloide und anorganische Substanzen freigesetzt (Fengel & Wegener, 1984).

Eine Vorbehandlung der Rinde mit verdünnter Natronlauge (NaOH) wäre eine Maßnahme zur Steigerung der Extraktausbeute. Bei einer alkalischen Behandlung werden vor allem die Hemicellulosen aus der Rinde gelöst und Ligninbindungen angegriffen. Mit Extraktmengen von 35 % (bezüglich atro Gesamtrinde) (Dietrichs et al., 1978) stünde nach einer solchen Behandlung den Mikroorganismen im Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor ein höheres

Potential an verwertbaren Kohlenstoffverbindungen zur Verfügung. Den Vorteil einer hohen Konzentration an löslichen C-Verbindungen "erkauft" man sich bei dieser Methode mit der Produktion eines stark alkalischen Rindeneluats in den ersten Betriebstagen, das für den Trinkwasserbereich ungeeignet ist und einer Aufbereitung bedarf, da die Speicherung einer so großen Menge unrentabel wäre. Zudem entstünden Kosten durch die notwendige Natronlauge.

Die Höhe der Extraktausbeute und die Geschwindigkeit der Rindenzersetzung ist auch von dem Zerkleinerungsgrad der Rindenstücke abhängig. Ein Vergleich der Extraktionsversuche zeigt, daß die Menge an gelöster organischer Substanz bei ungemahlener Rinde (10-40 mm) wesentlich geringer war als bei < 1,0 mm-gemahlener Fichtenrinde (3.1.3). Nach Isomäki (1967) ist bei einer Rindenkompostierung eine durchschnittliche Teilchengröße von 3-5 mm als ideal anzusehen. Diese Größe wurde in der RiMu-Denitrifikationsanlage nicht eingesetzt, da beim Betrieb der Pilotanlage unter Verwendung größerer Rindenstückchen Schwierigkeiten mit ausgespülten Rindenfeinteilen auftraten. Dieses technische Problem ist jedoch lösbar. Weitaus nachteiliger wirkt sich die Verkleinerung der Teilchengröße auf die Durchströmbarkeit einer Schüttung aus. In Verbindung mit starker Biomassebildung und Produktion von Schleimstoffen kann es zu Verstopfungen im kontinuierlich durchströmten Rindenmulchbecken kommen.

Die Extraktionsversuche dienten der Charakterisierung von eluierbaren Substanzen aus der Fichtenrinde. Weiterhin konnten Erkenntnisse über den Verlauf der Freisetzung von organischen Verbindungen gewonnen werden. In den unsterilen Batch-Ansätzen wurde der Hauptteil der Kaltwasserextrakte zu Beginn des Versuchs freigesetzt und ein Teil der Inhaltsstoffe im Verlauf der Extraktion durch Mikroorganismen verstoffwechselt. Dies war besonders deutlich an der Abnahme der Glucosekonzentration während einer 48-stündigen Extraktionszeit zu beobachten (3.1.3).

In Anlehnung an die Ergebnisse aus den Extraktionsversuchen wurde beim kontinuierlichen Rindenmulch-Reaktorbetrieb zwischen drei Phasen unterschieden:

1. Die Auswaschungsphase, gekennzeichnet durch die Freisetzung von leicht löslichen organischen und anorganischen Verbindungen aus der Rinde.
2. Die Denitrifikationsphase, gekennzeichnet durch die Ansiedlung einer Mikroorganismenpopulation, welche die eluierbaren Substanzen verstoffwechselt und Nitrat als Elektronenakzeptor nutzt.
3. Die Rindenzersetzungsphase, gekennzeichnet durch die mikrobielle Verwertung von höhermolekularen (Gerüst-)Substanzen und Verwendung der Abbauprodukte als C-Quelle für die Denitrifikation.

Die Auswaschung ist ein rein chemisch-physikalischer Vorgang, der besonders deutlich wird bei der Betrachtung der DOC-Konzentrationen im Reaktorablauf (3.2.2.1). Die Abnahme der eluierten organischen Substanzen erfolgte nach einer exponentiellen Funktion und war unter anderem von der Rindencharge und der Durchflußrate abhängig. Die DOC-Konzentrationen im Ablauf der Reaktoren mit den geringeren Durchflußraten (R6, R7) lagen eindeutig über den Werten von R1, R2, R4, und R5. Die Gesamtmenge an DOC im Reaktorablauf während der ersten 18 Betriebstage betrug durchschnittlich 4,3 g pro 450 g luftgetrocknetem Rindenmulch bei den Reaktoren R4 und R5 (mit 11,7 l/d). Bei gleicher Rindeneinwaage wurden von R6 (mit 3,1 l/d) 3,1 g DOC freigesetzt, von Reaktor R7, dessen Schüttung aus einer frischen Rindencharge bestand, wurden bei gleicher Durchflußrate 4,3 g DOC abgegeben. Diese Werte sind eindeutig höher als die im gleichen Zeitraum aus Stroh abgegebenen DOC-Mengen (Becker, 1988).

Die DOC-Konzentrationen im Reaktorablauf geben jedoch keine Hinweise auf die tatsächlich aus der Fichtenrinde eluierten Kohlenstoffmengen, da nach Ansiedlung der Mikroflora im Reaktor durch mikrobielle Abbauvorgänge eine Reduzierung der ausgelösten Substanzen erfolgte. Ein geringer, nicht quantifizierbarer Anteil des DOC-Wertes ist mit zunehmender mikrobieller Besiedlung den mikroorganismenbürtigen Kohlenstoffverbindungen

(Ausscheidungs- und Lyseprodukte) zuzuschreiben.

Die bakterielle Besiedlung der Rinde weist zwei Kennzeichen auf: 1. Eine Zunahme der Gesamtkeimzahlen innerhalb der ersten Betriebstage und 2. ein Wechsel in der Bakterienpopulation (3.6.1). Diese Dynamik der Mischpopulation beeinflusst die Art der Nitratverwertung (s. 4.3) und Kohlenstoffnutzung.

Bei Arbeiten mit sterilen und unsterilen Strohperkolatoren konnte von Becker (1988) nachgewiesen werden, daß nach mehreren Betriebstagen organische Kohlenstoffverbindungen zur Denitrifikation genutzt werden, die nicht durch reine Lösungsprozesse freigesetzt wurden. Voraussetzung dafür ist eine Besiedlung mit Mikroorganismen, die zum Abbau von höhermolekularen Stoffen wie Cellulose, Hemicellulosen und Lignin fähig sind. Diese Makromoleküle werden nur sehr langsam zersetzt, so daß monatelange Standzeiten der Rinde als Trägermaterial möglich sind, jedoch auf Grund der geringen DOC-Freisetzung nur relativ geringe Wasserdurchsätze von ca. $3,5 \text{ m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ gefahren werden können, um eine Nitrateliminationsleistung von mindestens $0,02 \text{ kg NO}_3\text{-N}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ zu erreichen.

4.2 Denitrifikation im Rindenmulch-Reaktor

Das Denitrifikationspotential im Rindenmulch-Reaktor wird von betrieblichen Parametern wie Wasserdurchsatz und Temperatur beeinflusst. Die raumspezifischen Abbauleistungen der Rindenmulch-Reaktoren betrugen bei 20°C betriebenen Reaktoren (R1 & R2) durchschnittlich $0,019 \text{ kg NO}_3\text{-N}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ und in den 10°C -temperierten Reaktoren (R4-R7) $0,006 \text{ kg NO}_3\text{-N}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$. Diese Differenz bei den NO_3 -Abbauleistungen unter den Temperaturbedingungen entsprach dem von Lange (1989) ermittelten Wert im Roto-Bio-Reaktor. Niedrige Temperaturen wirken sich auch nachteilig auf den Cellulose- und Ligninabbau aus, so daß es auf Grund geringer Kohlenstoffverfügbarkeit zu den niedrigen Nitrat-Abbauleistungen im Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor kommt.

Die Verminderung der Zulaufmenge bewirkte in jedem Fall eine Verringerung der Nitratkonzentration im Ablauf eines Rinden-

mulchreaktors, was die Versuche in R1 und RMB1 bewiesen (3.2.2.3 und 3.6.1.2). Beim Vergleich der Laborreaktoren R5 und R6 zeigt sich, daß bei geringerer Zulaufmenge (in R6) die Nitratkonzentration im Ablauf niedriger, d.h. die Denitrifikationsrate höher war als im Vergleichsreaktor (R5) mit hoher Zulaufmenge, die spezifische Denitrifikationsleistung aber geringfügig niedriger war (Tab. 29). In der Pilotanlage wurde hingegen bei Senkung der Zulaufmenge von 22 m³/h auf 9 m³/h die Nitratkonzentration im Ablauf stark verringert, die spezifische Abbauleistung blieb jedoch konstant. Dieser Unterschied beruhte wahrscheinlich auf der Nutzung einer frischen Rinde in der Aschaffenburg Pilotanlage, die zudem viel "ergiebiger" für die Mikroorganismen war, wie die hohen Abbauleistungen in R7 und RMB1 beweisen (Tab. 29).

Tab. 29: Vergleich der Nitratabbauraten (%) und der spezifischen Nitratabbauleistung (kg NO₃-N/m³·d) der verschiedenen Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.

Reaktor	Betriebszeit	spezifische Denitrifikationsleistung	Nitratabbaurate
	(d)	(kg NO ₃ -N/m ³ ·d)	(%)
R1	(1-35)	0,0305	94
R1	(1-82)	0,0187	35
R2	(1-43)	0,0325	63
R2	(1-88)	0,0187	35
R4	(1-67)	0,0067	11
R5	(1-32)	0,0074	14
R6	(1-32)	0,0057	40
R6	(1-95)	0,0054	37
R7	(1-95)	0,0108	83
RMB1	(1-30)	0,0158	87
RMB1	(30-65)	0,0177	70

Der Nitratabbau ist auch abhängig von der Verfügbarkeit an organischen Substanzen aus der Rinde als C- und H-Donatoren für den Prozeß der Denitrifikation. Das größte Potential an mikrobiell verwertbaren Nährsubstraten wird zu Beginn des Reaktorbetriebes durch Auswaschung freigesetzt, wohingegen bei längerer

Betriebsdauer nur die schwerer abbaubaren Gerüstsubstanzen (Cellulose und Lignin) als Nährstoffgrundlage vorhanden sind.

Versuche, in denen nach Zugabe einer externen C-Quelle bzw. durch Teilerneuerung der Fichtenrinde und Kaskadenschaltung eine Steigerung der Denitrifikationsleistung erreicht wurde, machen deutlich, daß in den Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren nach einer kurzen, ca. 1-monatigen Betriebszeit eine Substratlimitierung vorlag. Die Versuche beweisen auch, daß die Denitrifikanten das wässrige Eluat der Fichtenrinde gut verwerten können, was sich in den gesteigerten Nitratabbauraten widerspiegelt.

Diese Voraussetzungen ermöglichen eine Steuerung der Anlage mit dem Ziel, eine definierte Mindestabbauleistung im Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor aufrecht zu erhalten. Das DOC-reiche wässrige Rindeneluat aus den ersten Betriebsstunden läßt sich einfach speichern und später gezielt als Substrat einsetzen.

Die Nutzung des Nährstoffreichtums frischer Rinde ohne eine Zwischenlagerung wäre bei einer Kompartimentierung des Denitrifikationsraumes unter Verwendung von Rinden unterschiedlichen Betriebsalters möglich.

Die raumspezifischen Abbauleistungen, die mit dem Rindenmulch-Denitrifikationsverfahren erreicht werden können, liegen mit durchschnittlich $0,02 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ weit unterhalb der Leistungen einiger anderer biologischer Festbett-Verfahren, z.B. $0,25 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$, DENITROPUR- und $0,6 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$, NITRAZUR-Verfahren (Rutten, 1989; Frick & Richard, 1985), sind jedoch mit dem DENIPLANT-Verfahren (Stengel, 1985) vergleichbar: Für den Betreiber einer Denitrifikationsanlage mit Fichtenrindenmulch stellt sich vor allem die Frage nach dem Platzbedarf für eine solche Anlage. Ausgehend von den Ergebnissen der Pilotanlage würde unter folgenden Bedingungen: Nitratkonzentrationen im Rohwasser $70 \text{ mg NO}_3\text{-/l}$, Ablaufkonzentrationen $< 20 \text{ mg NO}_3\text{-/l}$, Tageswasserbedarf 25.000 m^3 und unter Beibehaltung einer Rindenschicht-Tiefe von 4 m ein Flächenbedarf von $50 \times 100 \text{ m}$ entstehen. Durch Optimierung der Durchströmungsverhältnisse in der Rindenpackung und Steigerung der Abbauleistung nach Zugabe

von Rindeneluat kann die Fläche reduziert werden.

Der direkte Denitrifikationsnachweis in Rindenmulch-Reaktoren konnte mit der Acetylen-Blockade-Technik erbracht werden.

Bei Einzeluntersuchungen mit isolierten Denitrifikanten schieden 70 % N_2O (und eventuell N_2) und 30 % N_2 aus. Messungen mit Rindenstückchen und Ablauf-Wasser aus R7 (nach 200 Betriebstagen) ergaben, daß kein N_2O -Gas vor der Acetylen-Blockade freigesetzt wurde, wohingegen nach der Blockade dieses Gas detektiert wurde. Somit war die Mischpopulation im Fichtenrindenmulch-Reaktor (in dieser Versuchsphase) zu einer vollständigen Denitrifikation fähig. Dies ist auch im Zusammenhang mit der Ozonproblematik (Deutscher Bundestag, 1988; Seiler & Conrad, 1981) ein wichtiges Ergebnis.

Die Abhängigkeit der Denitrifikationsrate von der Sauerstoffkonzentration bei Zugabe von Stroh oder Cellulose in Böden ist von Aulakh & Rennie (1987) und Gök (1987) beschrieben worden. Unter anoxischen Bedingungen mit Cellulose als einzigem Elektronendonator konnte keine Denitrifikation nachgewiesen werden (Sommer & Ottow, 1985). Aerobe Bedingungen begünstigen die Stickstoffentgasung in den Fällen, wo inerte bzw. mikrobiell schwer abbaubare Materialien wie Rindenmulch als Aufwuchsfläche dienen, da der Kohlenstoffabbau gefördert wird, und die Stoffwechselprodukte in anaeroben Mikrozonen zur Denitrifikation verwendet werden können.

Untersuchungen an R2 und R7 machen deutlich, daß sich hohe Sauerstoffkonzentrationen (6-9 mg O_2/l) im zufließenden Wasser eines RiMu-Denitrifikationsreaktors nicht nachteilig auf die Denitrifikation auswirkten. Die spezifische Denitrifikationsleistung in R2 ist mit durchschnittlich 0,02 kg $\text{NO}_3\text{-N}/\text{m}^3\cdot\text{d}$ so hoch wie die im vergleichbaren Reaktor R1. Dies steht im Gegensatz zu anderen Ergebnissen, wo eine Abnahme der Abbauleistung nach Umstellung des sauerstoffarmen auf sauerstoffgesättigtes Zulaufwasser gemessen wurden (z.B. Steffes, 1989). Hierbei wurde jedoch mit dem leicht verwertbaren Substrat Ethanol gearbeitet, dessen Verwertbarkeit auch unter anoxischen Bedingungen gut

dessen Verwertbarkeit auch unter anoxischen Bedingungen gut ist. Beim RiMu-Verfahren stehen nach der Auswaschungsphase im allgemeinen nur noch polymere Kohlenstoffverbindungen zur Verfügung, deren Abbau hauptsächlich von aerob wachsende Pilze getätigt wird. Eine Steigerung der Denitrifikationsleistung durch Verringerung der Sauerstoffkonzentration im Rohwasser nach 9-monatiger Betriebszeit konnte auch in der technischen Rindenmulchanlage nicht eindeutig belegt werden (Uhe, 1991). Da zu diesem Zeitpunkt die Freisetzung der löslichen und leicht abbaubaren Rindenstoffe stagnierte, könnte sich Sauerstoff im Rohwasser wahrscheinlich eher fördernd auf den Substratabbau (speziell Cellulose) in der Rinde auswirken ohne die Denitrifikation zu benachteiligen. Verschiedene Autoren konnten nachweisen, daß in einigen denitrifizierenden Bakterienpopulationen bei Sauerstoffkonzentrationen im Wasser, die Luftsättigungswerte erreichen, sowohl Respiration als auch Denitrifikation vorkommen (Lloyd et al., 1987; Ottow & Fabig, 1984).

Während des kontinuierlichen Reaktorbetriebes kam es in den ersten Betriebsstunden zu einer Ausspülung von NO_3^- und NH_4^+ . Die Ammoniumkonzentration im Reaktorablauf wies eine Abhängigkeit von Rindencharge und Durchflußrate auf. Während bei R1, R2 und R7 Ammonium nur in Spuren im Reaktorablauf nachgewiesen werden konnte, wurden bei R4, R5 und R6 Ammoniumkonzentrationen von 0,5-7,9 mg $\text{NH}_4\text{-N/l}$ gemessen. Die 11-fach höhere Maximalkonzentration in R6 ist wahrscheinlich auf die niedrigere Durchflußrate zurückzuführen. Das Fehlen von Ammonium im Ablauf von R7, bei gleicher Zulaufmenge wie in R6, ist auf Verwendung einer frischen Rindencharge zurückzuführen.

Ammonium kann aus der Rindenbiomasse freigesetzt oder als Reaktionsprodukt der dissimilatorischen Nitratreduktion (Nitratammonifikation) gebildet werden. Die Nitratammonifikation findet bei niedrigen Redoxpotentialen ($< 300 \text{ mV}$) und unter strenger Anaerobie statt (Nömmik, 1956). Der Energiegewinn ist geringer als bei der Denitrifikation. Von entscheidender Bedeutung für die Dominanz der jeweiligen Reaktion ist das Verhältnis von verfügbarem Kohlenstoff zum Elektronenakzeptor (NO_3^-) und die Art des Elektronendonators (Rehr & Klemme, 1989; Tiedje

rigen Nitratkonzentrationen läuft bevorzugt die dissimilatorische NO_3 -Reduktion zu NH_4^+ ab, bei hohen Nitratkonzentrationen dagegen wird die Denitrifikation stimuliert (DeCantanzaro et al., 1987; Reinheimer et al., 1988). Bei den eigenen Untersuchungen wurde nach der Auswaschungsphase nur in R2 eine Erhöhung der Ammoniumkonzentration im Ablauf gemessen (3.4). Da die Bedingungen für eine Nitratammonifikation auf Grund niedriger Kohlenstoff- und hoher Nitratkonzentrationen ungünstig waren, stammte das Ammonium wahrscheinlich aus proteolytischen Abbauprozessen.

4.2.1 Nitritbildung

Nitrit, als erstes Produkt der Nitratreduktion und TVO-relevanter Parameter mit einem Grenzwert von $0,1 \text{ mg NO}_2\text{-/l}$ für Trinkwasser, bedarf bei Trinkwasser-Denitrifikationsverfahren einer besonderen Beachtung.

Erhöhte Nitritkonzentrationen traten in allen Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren (außer in R2) ab dem 1.-5. Betriebstag auf. Intensität und Dauer der NO_2 -Akkumulation waren abhängig von Rindencharge, -alter und Durchflußrate. R7 wies mit maximal $22 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ die höchste Konzentration auf. Bei den Reaktoren R6 und R7 mit Aufenthaltszeiten von 17 Stunden konnten erhöhte Nitritwerte noch nach 45 Betriebstagen gemessen werden. Im Gegensatz dazu lagen die Werte bei R1, R4 und RMB1 nach 15 Tagen mit $0,02\text{-}0,2 \text{ mg NO}_2\text{-N/l}$ auf dem Level der durchschnittlichen Ablaufkonzentrationen während des weiteren kontinuierlichen Betriebes. Die Senkung der Nitritwerte im Reaktorablauf und die Vergleichmäßigung der zu Versuchsbeginn auftretenden NO_2 -Peaks können durch betriebliche Maßnahmen, wie Herabsetzung der Durchflußrate und anfänglicher Kreislaufbetrieb, gewährleistet werden.

Bei verschiedenen Denitrifikationsverfahren wurden erhöhte Nitritkonzentrationen im Reaktorablauf festgestellt (Becker, 1988; Ginocchio, 1980; Lange, 1989; Rödelberger, 1987). Die Nitritakkumulation tritt meist nur zu Beginn eines kontinuierlichen Betriebes auf. Mit einer Kreislaufführung des Wassers

werden diese hohen Konzentrationen abgefangen.

Die Nitritakkumulation ist von mehreren Faktoren abhängig, deren Wechselwirkungen in einem komplexen System wie dem Rindenmulch-Reaktor mit seinem heterogenen Bewuchs schwer zu erfassen sind. So können als Gründe ein verzögerter Start der Synthese der NO_2 -Reduktase (Williams et al., 1978, Zumft & Vega, 1979) oder höhere Aktivitäten der Nitratreduktase gegenüber der Nitritreduktase (Carlson & Ingraham, 1983) angenommen werden. Die von verschiedenen Autoren beschriebene Hemmwirkung von Nitrat auf die Nitritreduktase (Knowles, 1982; Körner & Zumft, 1989) kann bei den dem kontinuierlich durchströmten Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor zugeführten NO_3 -Konzentrationen ausgeschlossen werden.

Der Verlauf und die Intensität der Nitritakkumulation ist sowohl von der Nitratkonzentration (Koné & Behrens, 1981), als auch von der Art der Kohlenstoffquelle (Blaszczyk et al., 1980) abhängig. Bei einem Vergleich von Methanol, Ethanol, Essigsäure und Glucose als C-Quelle in Mischkulturen ist die stärkste und am längsten andauernde Nitritanreicherung bei Glucose zu verzeichnen (Blaszczyk et al., 1980), der Substanz, die nachweislich zu Versuchsbeginn aus der Fichtenrinde freigesetzt wurde.

Erhöhte Nitritkonzentrationen in R1 und R6 während des kontinuierlichen Reaktorbetriebes deuten auf eine Kohlenstofflimitierung hin. Dieser Zusammenhang wurde in verschiedenen Versuchen bei Limitierung der Elektronendonatoren beobachtet (Raphael, 1989; Van Versefeld et al., 1977).

Das Fehlen des Nitrit-Peaks zu Versuchsbeginn bei R2 ist wahrscheinlich auf die Rindenmulch-Vorbehandlung zurückzuführen. Während der 5-tägigen Wässerung konnten sich Nitratreduzierer und Denitrifikanten ansiedeln, und die lag-Phase bei der Synthese der NO_2 -Reduktase überwunden werden. Nachteilig wirkte sich diese Wässerung jedoch auf die Nitratabbauleistung aus. Ein Vergleich mit R1 macht deutlich, daß zwar zu Versuchsbeginn niedrigere Nitrat- und vor allem Nitritkonzentrationen gemessen werden konnten, jedoch war das Potential an leicht löslichen

Kohlenstoffverbindungen aus der Fichtenrinde schneller erschöpft und die Denitrifikationsleistung nahm ab.

Die hohen Sauerstoffkonzentrationen im Zulauf von R2 können sich auch negativ auf die Denitrifikationsleistung ausgewirkt haben, da Sauerstoff eine große Rolle bei der Regelung von Synthese und Aktivität der an der Denitrifikation beteiligten Enzyme spielt. Während die Nitratreduktase bei einigen Spezies unabhängig von der Sauerstoffkonzentration synthetisiert wird und arbeitet (Krul, 1976; Krul & Veening, 1977; Ferguson, 1987), ist die Nitritreduktase bei *Pseudomonas stutzeri* und *Paracoccus denitrificans* das sauerstoffempfindlichste Enzym (Körner & Zumft, 1989).

Bei allen Erklärungen und Deutungen über Entstehung und Ausprägung einer Nitritanreicherung unter Denitrifikationsbedingungen ist zu berücksichtigen, daß die Versuche der vorab zitierten Arbeiten weitgehend mit Reinkulturen durchgeführt wurden. Bollag und Mitarbeiter (1970) konnten jedoch nachweisen, daß Mischkulturen nach ihren eigenen Regeln reagieren.

Die Hemmwirkung von Nitrit auf das Wachstum verschiedener Mikroorganismen wird bei Bollag et al. (1970), Claus & Kutzner (1984) und Williams et al. (1978) beschrieben. Bei Nitritkonzentrationen über 10 mM wird das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* (Williams et al., 1978), sowie *Paracoccus denitrificans* (Shimizu et al., 1978; Van Versefeld et al., 1977) deutlich gehemmt. In eigenen Untersuchungen an, aus dem Rindenmulch-Reaktor isolierten, Reinkulturen konnte dieser Effekt bestätigt werden. Es zeigte sich, daß in NNB-Medium von 40 Bakterienstämmen 80 % Nitrat reduzieren und 63 % Stickstoffgas bilden konnten. In Nitrit-Nährbouillon produzierten von diesen 40 Isolaten nur 43 % Gas. Bei einigen Stämmen wirkten die hohe Nitritkonzentrationen zu Versuchsbeginn wahrscheinlich wachstumshemmend.

4.3 Mikroflora

Die Enzymsynthese und -aktivität im Denitrifikationsprozeß wird von äußeren Bedingungen (Redoxpotential, O_2 , pH und Substratangebot) beeinflußt und ist vor allem bakterienspezifisch, wie vergleichende Untersuchungen verschiedener Autoren zeigen (Betlach & Tiedje, 1981; Bollag et al., 1970; Carlson & Ingraham, 1983). So kann ein Populationswechsel im Rindenmulchsystem Einfluß auf die Qualität des ablaufenden Wassers haben, wie dies am Beispiel der Nitritakkumulationen durch Anreicherung von Mikroorganismen, die Nitrat nur bis zum Nitrit reduzieren können, gezeigt wird. Während des kontinuierlichen Betriebes der Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren wurde bei R7 parallel zur Nitritakkumulation und -abnahme ein Wechsel der Mikroorganismenpopulation beobachtet. Innerhalb der ersten 30 Betriebstage (hohe Nitritkonzentrationen) wurden nur Nitrat-reduzierer nachgewiesen, dann stieg der Anteil der Denitrifikanten am Gesamt-MPN ($1,4 \cdot 10^5$ Keime/ml) mit zunehmendem Betriebsalter auf 23 % an. Tomaschewski (1989) fand bei Untersuchungen an R6 (Gesamt-MPN: $7,0 \cdot 10^4$ Keime/ml) sogar einen Anstieg auf 67 % Denitrifikanten. Demgegenüber bestimmten Schmieder & Ottow (1981) in verschiedenen Seen und Teichen unter den heterotrophen Bakterien anteilmäßig 0,1-1 % Denitrifikanten. Die eigenen Messungen machen deutlich, daß Denitrifikanten-selektive Bedingungen einen erhöhten Anteil von denitrifizierenden Bakterien an der Gesamtkeimzahl bewirken.

Die Keimzahlen im Ablauf der Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren sagen noch nichts über den Anteil aktiver Biomasse im System aus. So ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß vergleichbar mit höheren Keimzahlen in See-Sedimenten gegenüber dem Wasser, ein großer Anteil aktiver Biomasse an der Rinde festhaftet.

Von den isolierten Denitrifikanten waren *Pseudomonas*-Arten und Vertreter der *Acinetobacter* / *Moraxella*-Gruppe am häufigsten vertreten. Dies entspricht den Untersuchungsergebnissen von Roennefahrt et al. (1988) und Schmieder & Ottow (1981). Als Vertreter der in geringer Anzahl isolierten gram-positiven Bak-

terien konnten von den vier Isolaten drei als *Bacillus spec.* identifiziert werden.

Jede Bakterienisolierung ist derart selektiv, daß nur etwa 10 % der lichtmikroskopisch bestimmbaren Organismen erfaßt werden (Dott et al., 1984). Bei Aussagen über den aktiven Teil der Biomasse im Reaktor kann es zu gegenteiligen Ergebnissen kommen. So können nicht aktive Ruhestadien (Dauersporen) erst durch für sie günstige Kulturbedingungen auf der Agarplatte oder in Flüssigmedium auskeimen. Dies ist vor allem bei Pilzen und *Bacillus*-Arten von Bedeutung. Auf rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten jedoch Pilze identifiziert werden (Abb. 38). In Arbeiten von Schmieder & Ottow (1981) wurde nachgewiesen, daß *Bacillus*-Arten den Hauptteil der Denitrifikanten in verschiedenen Böden und Sedimenten stellen. Demzufolge kann man bei den Versuchen im RiMu-Reaktor von einer aktiven Beteiligung der Bacillen am Denitrifikationsprozeß ausgehen.

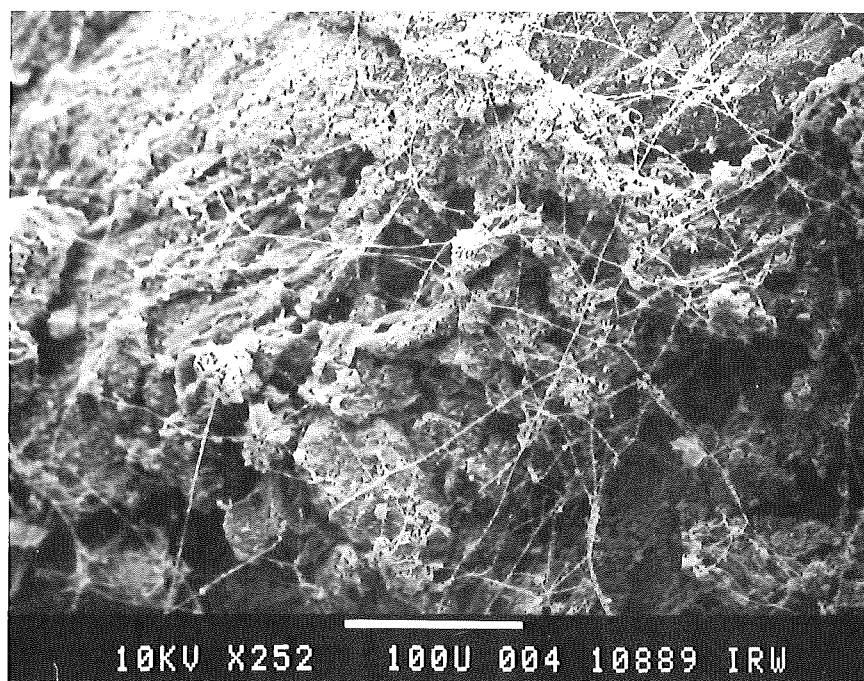


Abb. 38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Fichtenrindenproben aus einem Denitrifikationsreaktor (R5). Zur Zeit der Probennahme war der Reaktor seit 413 Tagen kontinuierlich in Betrieb. Vergrößerung: 250-fach.

Vier Pilze (*Fusarium oxysporum*, *Humicola grisea*, *Phialophora lignicola*, *Petriellidium boydii*) wurden aus Rindenmulch-Testansätzen mit Filterpapier als Cellulosequelle isoliert. In den Rindenmulch-Reaktoren konnten Pilze nur bei den betriebsälteren Systemen (R1, R2, R4, R5) mikroskopisch nachgewiesen und auf Agar kultiviert werden.

Auch Burth et al. (1982) und Grabinska-Loniewska & Slavikowa (1990) isolierten Pilze aus verschiedenen Denitrifikationsanlagen. *Fusarium spec.* stellte in beiden Fällen die häufigste Pilzart. Bei Burth et al. wurde ein Isolat als *Petriellidium boydii* identifiziert und wie die meisten *Fusarium*-Isolate als Denitrifikant (N_2O -Bildung aus Nitrit) eingestuft.

Von 22 isolierten Bakterien waren 91 % unter anoxischen Bedingungen lebensfähig, 27 % galten als Nitratreduzierer und 32 % wurden den Denitrifikanten zugeordnet. Kein Bakterium konnte unter anoxischen Bedingungen in Nitrat-haltigem Medium mit Cellulose als einziger C-Quelle wachsen. Jedoch waren 50 % in der Lage, Abbauprodukte der Cellulose als Substrat zu nutzen. Die daraus resultierende Schnittmenge mit den Denitrifikanten von 32 % läßt die Aussage zu, daß bei cellulolytischer Aktivität im Rindenmulch-Reaktor die Abbauprodukte von denitrifizierenden Bakterien verwertet werden konnten, also eine Wechselwirkung zwischen Celluloseabbauern (Pilze) und Nitratverwertern (Bakterien) wahrscheinlich ist.

Die Pilzisolates konnten nur unter aeroben Bedingungen kultiviert und ihre cellulolytische Fähigkeit nachgewiesen werden. Teilschritte der Denitrifikation ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$) können von verschiedenen Pilzspezies durchgeführt werden, jedoch nicht unter anoxischen Bedingungen (Burth et al., 1982; Bollag & Tung, 1972). Die Fähigkeit zur Denitrifikation ist bei Pilzen bis heute nicht eindeutig geklärt. Die vier aus dem Rindenmulch-System isolierten Pilze konnten in Nitrit-haltigem Medium wachsen. Dabei wurde in allen Ansätzen eine Gasbildung beobachtet. Nur bei *Fusarium oxysporum* und *Petriellidium boydii* fand zusätzlich eine Abnahme der Nitritkonzentration statt, so daß ohne genaue Analyse der Gase nicht ausgeschlossen werden kann,

daß bei den beiden anderen Pilzstämmen eine Gärung stattgefunden hat.

Die Voraussetzungen für ein synergistisches Zusammenwirken zwischen Pilzen und Bakterien sind im Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor gegeben. Unter aeroben Bedingungen verstoffwechseln Pilze die schwer abbaubaren Cellulosen und Hemicellulosen. Die Abbauprodukte (Cellodextrin, Cellobiose und Glucose) werden von den heterotrophen Bakterien zur Denitrifikation genutzt. Untersuchungen mit *Humicola grisea*, einem cellulolytisch aktiven Pilz, und einer Denitrifikanten-Mischkultur in Nitrat-haltigem Medium mit Cellulose als einziger C-Quelle beweisen eindeutig den positiven Effekt dieser Lebensgemeinschaft (Tomaschewski, 1989).

Fördernde Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Pilzen werden häufig beim Holzabbau beschrieben (Blanchette & Shaw, 1978; Henningson, 1967; Stevens, 1987; Veal & Lynch, 1987). Aber es gibt auch hemmende Mechanismen, wie Untersuchungen auf Agarplatten zeigten. Neben der gegenseitigen Beeinträchtigung des Wachstums durch Hemmstoffe (3.7.5) darf die Nahrungskonkurrenz zwischen Pilzen und Bakterien um verwertbare Celluloseabbauprodukte nicht unterschätzt werden (3.7.4.3).

4.4 Pilotanlage Aschaffenburg

In den Laboranlagen wurde die Eignung einer Fichtenrindenmulch-Schüttung als Trägermaterial und Elektronendonator zur Denitrifikation von nitratreichem Wasser nachgewiesen. Dieses Ergebnis konnte in den Versuchen an der Pilotanlage bestätigt werden. Die Laborversuche boten eine entscheidende Grundlage zur Durchführung der technischen Versuche, was sich in einer weitreichenden Übertragbarkeit der Ergebnisse (DOC-Freisetzung, erhöhte Nitritkonzentrationen im Ablauf zu Beginn der Inbetriebnahme, Steigerung der Denitrifikationsleistung durch Zugabe von kohlenstoffreichem Eluat) manifestierte. Die Denitrifikationsleistung entsprach mit $0,02 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ den in den Laboranlagen erreichten Werten.

Hauptprobleme der technischen Anlage stellten die ganz offensichtlich heterogenen Durchströmungsverhältnisse in der Rindenpackung dar. Die im Verlauf der Denitrifikation auftretenden Gasbläschen blieben erst in den kleinen Porenräumen hängen, verstopften so die Wasserwege und breiteten sich dann zu großen Gasblasen aus. Es entstanden Kurzschlußströmungen und Totzonen, in denen nur noch ein geringer Wasseraustausch stattfinden konnte. Die Verbackung und Verstopfung von Porenräumen durch Biomassebewuchs verstärkte diesen Effekt. Es kam zu Geruchsbelästigungen durch reduzierte Schwefelverbindungen, die in den schlecht durchströmten Zonen, in denen ein anaerobes Milieu mit sehr niedrigen Redoxpotentialen vorherrschte, gebildet wurden. Die Wahrscheinlichkeit ist groß, daß in diesen anaeroben Zonen auch Gärprozesse abgelaufen sind. Das Celluloseabbauprodukt Glucose wird, wie von verschiedenen Autoren beschrieben, nicht direkt, sondern erst nach der Fermentation zu Alkoholen und organischen Säuren zur Denitrifikation verwertet (Konè & Behrens, 1981; McCarty et al., 1969; Wilderer et al., 1987). Dies könnte neben der Auswaschung von sauren Huminstoffen aus der Rinde ein Grund für die niedrigen pH-Werte im Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor sein, die nie höher als die pH-Werte im Zulauf waren, wohingegen bei der mikrobiellen Denitrifikation ein Anstieg des pH-Wertes zu erwarten wäre.

Möglichkeiten zur Verhinderung solcher Totzonen bieten verschiedene technische Einrichtungen, die eine bessere Durchströmung der Rindenpackung gewährleisten. Die Unterteilung der Becken, sowie eine mäanderförmige Durchströmung, erhöhen die Strömungsgeschwindigkeit und reduzieren die Verstopfungsgefahr.

Ebenso verspricht die kontinuierliche oder periodische Bewegung der Rinde eine Reduktion dieser Phänomene. In jedem Fall ist dies ein strömungstechnisches Problem und mit entsprechenden Optimierungsschritten zu lösen. Weitere Untersuchungen werden sich neben der technischen Verbesserung der Pilotanlage in erster Linie mit den der Denitrifikation nachfolgenden Aufbereitungsschritten beschäftigen.

Nach einem einjährigen, kontinuierlichen Betrieb wurden im Januar 1991 Untersuchungen zur Denitrifikationsrate im Rinden-

mulchbecken bei unterschiedlicher Sauerstoffkonzentration im Rohwasser abgeschlossen. Weitere Ansätze zur Optimierung der Denitrifikationsleistung, wie die Reihenschaltung mehrerer Becken mit unterschiedlichen Rindenstandzeiten, werden im Frühjahr 1991 an der Pilotanlage erprobt.

Die Bodenzonen der Pilotanlage eigneten sich in ihren Dimensionen nicht zur Simulation der Untergrundpassagen. Die Untersuchungen konnten jedoch verdeutlichen, welche Gefahr besteht, wenn man Wasser mit hohen Konzentrationen an organischen Substanzen dem Boden zuführt. Durch verstärktes Wachstum schleimbildender Bakterien kann es in den oberen Bodenzonen zu Verstopfungen kommen, die eine Wasserinfiltration erschweren. Es wäre sinnvoll, Versickerungen über große Sandflächen durchzuführen, in Anlehnung an die in der Trinkwasseraufbereitung häufig verwendeten Langsandsandfilter.

Neben der Rückführung des denitrifizierten Wassers in den Untergrund ist eine verfahrenstechnische Aufbereitung eine interessante Alternative.

Eine gekoppelte Aktivkohle (AK)- und UV-Behandlung würde hierfür in Frage kommen. Dabei besteht bei einer AK-Behandlung des denitrifizierten Wassers der Vorteil, daß eventuell vorhandene Pestizid-Rückstände ebenfalls entfernt werden.

4.5 Ausblick

Als Konzept für den weiteren technischen Anlagenbetrieb ist eine Reihenschaltung zweier Becken mit unterschiedlichen Rindenstandzeiten geplant. Dabei wäre zu überlegen, ob der Durchsatz im ersten Becken (mit frischer Rinde gefüllt) flexibel eingestellt und der Ablauf mit Rohwasser vermischt dem nachfolgenden Becken zugeführt wird. Dadurch könnte eine definierte DOC-Konzentration im Zulauf des zweiten Beckens konstant eingestellt werden. Eine gleichmäßige Nitratabbauleistung und niedrige DOC-Belastungen im Ablauf wären das Resultat. Zudem kann durch die verringerte Durchflußrate im ersten Becken die Zeit der Auswaschung der organischen Substanzen aus der Rinde verlängert werden.

Mit dieser Nutzung des ersten wässerigen Rindeneluats besteht eine einfache Möglichkeit die Anlage zu steuern und erspart die von Landt (1986) vorgeschlagene, mit hohem technischen Aufwand verbundene Aufbereitung dieses organisch hoch belasteten Ablaufs.

Die Aufbereitungsschritte müssen durch Minimierung der DOC-Konzentration und Gewährleistung einer Sauerstoff-Mindestkonzentration im Ablauf des Rindenmulchbeckens optimiert werden. Die schon erwähnte Einspeisung des denitrifizierten Wassers in den Boden über Langsamsandfilter muß getestet werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Tauglichkeit des RiMu-Verfahrens zur Denitrifikation von Trinkwasser getestet. Neben der verfahrenstechnischen Beurteilung sollten mikrobiologische Untersuchungen die Zusammenhänge zwischen Rindenmulchabbau und Denitrifikation aufklären. Weiterhin trugen die Extraktionsversuche und die chemischen Analyse der rindenbürtigen Substanzen dazu bei, die Verwertbarkeit des Rindeneluats einzuschätzen.

Zur Erfassung der eluierbaren Kohlenstoffverbindungen aus der Fichtenrinde wurden Kaltwasserextraktionen durchgeführt und die Extrakte charakterisiert.

Die chemischen Analysen der Extrakte ergaben, daß leicht lösliche niedermolekulare Verbindungen wie Zucker und Säuren, polymere Kohlenhydrate wie Hemicellulosen und phenolische Substanzen freigesetzt werden.

Das Maximum der DOC-Freisetzung aus der Rinde erfolgt in den ersten Tagen nach Inbetriebnahme eines Rindenmulchreaktors und ist abhängig von dem Zerkleinerungsgrad der Rinde und der Durchflußrate.

Die maximalen Nitratabbauraten wurden in den ersten 15 Betriebstagen erzielt. Sie waren insbesondere von der Rindenbesiedlung und der Freisetzung organischer Verbindungen aus der Rinde abhängig.

Der Denitrifikationsnachweis wurde mit Rindenproben und Reaktorwasser durch Einsatz der Acetylen-Blockade-Technik erbracht. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen reduzierte die ansässige Mikroflora Nitrat vollständig zu N_2 .

In den Laboranlagen wurden durchschnittliche Nitratabbauleistungen von $0,02 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ gemessen.

Die Nitratabbauleistungen der bei 20°C betriebenen Reaktoren lagen mit $0,019 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$ um das 3-fache höher als die bei 10°C gemessenen Werte.

Die in der Literatur beschriebene Beeinträchtigung der Denitrifikation durch Sauerstoff konnte beim RiMu-Verfahren nicht bestätigt werden. Auf Grund des inhomogenen Trägermaterials liegen im Reaktor aerobe, anoxische und anaerobe Zonen nebeneinander vor.

Im Ablauf der Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren wurden Keimzahlen von $1,6 \cdot 10^3$ bis $2,5 \cdot 10^7$ Bakterien/ml ermittelt. Im Verlauf der Versuche kam es zu einer Anreicherung von Denitrifikanten im Reaktor.

Von 22 isolierten und charakterisierten Bakterienstämmen konnten 32 % Nitrat reduzieren und 32 % denitrifizieren.

Der Hauptteil der Isolate gehört zu den gram-negativen beweglichen Stäbchen.

Von vier gram-positiven Bakterienisolaten können drei der Endosporen-tragenden Gattung *Bacillus* zugeordnet werden. Bei den Denitrifikanten überwiegt der Anteil der Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter* und *Moraxella*.

Cellulolytische Aktivität konnte bei keinem Bakterienstamm nachgewiesen werden. 50 % konnten jedoch Cellulose-Abbauprodukte verwerten, davon waren anteilmäßig 64 % Denitrifikanten.

Von den vier kultivierten cellulolytisch aktiven Pilzen *Fusarium oxysporum*, *Petriellidium boydii*, *Humicola grisea* und *Phialophora lignicola* konnten die ersten beiden Isolate unter Gasbildung Nitrit reduzieren.

Nach diesen Ergebnissen können positive Wechselwirkungen zwischen celluloseabbauenden Pilzen und Denitrifikanten, die die Celluloseabbauprodukte verwerten können, angenommen werden.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Laborreaktoren mit 3,4 l Arbeitsvolumen auf die technische Pilotanlage in Aschaffenburg mit einem Arbeitsvolumen von 200 m³ war gut.

Bei einem Wasser-Durchsatz von 13 m³/Tag wurden Nitratabbauleistungen von durchschnittlich 0,02 kg NO₃-N/m³·d erreicht.

Die Heterogenität der Rindenschicht führte in Zusammenhang mit üppiger Biomassebildung zur Beeinträchtigung der homogenen Durchströmung im Becken. Verschiedene technische Einrichtungen zur Vermeidung dieses Problems werden im Sommer 1991 in Aschaffenburg getestet.

Eine Steuerung der Anlage ist auf Grund des exponentiellen Verlaufs der DOC-Freisetzung erforderlich. Möglichkeiten dazu bieten die Regelung der Durchflußrate, die Kompartimentierung der Becken und die Zugabe von Rindeneluat.

6 Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abb. 1: Stickstoffkreislauf der Natur.....	4
Abb. 2: Schema der enzymkatalysierten Elektronenübertragung bei der Denitrifikation.....	5
Abb. 3: Zwei Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.....	15
Abb. 4: Laboranlage mit temperierbarem Rindenmulch- Denitrifikationsreaktor, Kühlgerät, Zu- und Ablaufbehälter und Meß- und Dosiereinrichtungen.....	17
Abb. 5: Funktionsschema der technischen Rindenmulch- Denitrifikationsanlage.....	19
Abb. 6: Schematische Seitenansicht der technischen Rinden- mulch-Denitrifikationsanlage.....	19
Abb. 7: DOC-Elutionsdiagramm der Standard-Eichlösungen bei der Molekulargewichtstrennung.....	28
Abb. 8: Refraktometer-Elutionsdiagramm der Standard-Eich- lösungen bei der Molekulargewichtstrennung.....	29
Abb. 9: Zeitabhängige DOC-Konzentrationen wässriger Extrakte von gemahlener (< 1,0 mm) und ungemahlener (10-40 mm) Fichtenrinde.....	55
Abb. 10: DOC-Elutionsdiagramm einer wässrigen Fichtenrinden- Extraktprobe nach 48-stündiger Extraktionszeit zur Molekulargewichtsbestimmung.....	56
Abb. 11: Refraktometrisch ermitteltes Elutionsdiagramm einer Fichtenrinden-Extraktprobe nach 48-stündiger Extraktionszeit zur Molekulargewichtsbestimmung.....	57
Abb. 12: Chromatogramme von Fichtenrindenmulch-Extrakten nach Extraktionszeiten von 6, 24 und 48 Stunden.....	59
Abb. 13: GC-MS Spektrum einer unbekannten Substanz aus der Fichtenrinden-Extraktprobe im Vergleich zu dem Massenspektrum der Protokatechusäure.....	62
Abb. 14: Nitrat- und Nitritkonzentrationen in mg/l im Zu- und Ablauf bei untertemperierten Rindenmulch- Denitrifikationsreaktoren (R1).....	65
Abb. 15: Nitrat- und Nitritkonzentrationen in mg/l im Zu- und Ablauf bei untertemperierten Rindenmulch- Denitrifikationsreaktoren (R2).....	67
Abb. 16: Phosphatkonzentrationen im Ablauf von Rindenmulch- Denitrifikationsreaktoren.....	71
Abb. 17: DOC-Konzentrationen im Ablauf von Rindenmulch- Denitrifikationsreaktoren.....	72
Abb. 18: Spektrenaufzeichnungen des Rindeneluats von Ver- suchsreaktor R4 zu verschiedenen Betriebsstunden....	73
Abb. 19: Korrelation zwischen dem Spektralen Absorptions- koeffizienten bei 254 nm (SAK) und dem Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC) eines Rindenmulch-Denitrifikationsreaktors.....	75

Abb. 20:	Stickstoffparameter in mg/l im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R4.....	76
Abb. 21:	Stickstoffparameter in mg/l im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R5.....	77
Abb. 22:	Stickstoffparameter in mg/l im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R6.....	78
Abb. 23:	Stickstoffparameter in mg/l im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R7.....	78
Abb. 24:	pH-Werte im Zu- und Ablauf der Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren R1, R2 und R4.....	81
Abb. 25:	pH-Werte im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R7.....	82
Abb. 26:	DOC-Konzentrationen im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R2.....	86
Abb. 27:	Stickstoffkonzentrationen (Nitrat und Nitrit) im Zu- und Ablauf von Rindenmulch-Denitrifikationsreaktor R2.....	86
Abb. 28:	DOC- und Nitratkonzentrationen im Zu- und Ablauf eines temperierten Rindenmulch-Denitrifikationsreaktors (R4) nach Ethanolzugabe.....	88
Abb. 29:	Nitratkonzentrationen in mg/l in den Reaktor-Zu- und Abläufen entlang einer Denitrifikationsreaktor-Kaskade.....	91
Abb. 30:	Nitritkonzentrationen in mg/l in den Reaktor-Zu- und Abläufen entlang einer Denitrifikationsreaktor-Kaskade.....	92
Abb. 31:	Nitritkonzentrationen im Ablauf von Reaktor R1 und nach einer Kiesfilterpassage.....	94
Abb. 32:	Ammoniumkonzentrationen im Ablauf von Reaktor R1 und nach einer Kiesfilterpassage.....	95
Abb. 33:	Nitrat- und Nitritkonzentrationen im Zu- und Ablauf von Rindenmulchbecken 1 (RMB1).....	102
Abb. 34:	Nitratkonzentrationen im Rindenmulchbecken 1 nach Eluatzugabe.....	106
Abb. 35:	Nitratkonzentrationen im Zu- und Ablauf von RMB1, GBZ und UGBZ.....	110
Abb. 36:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Fichtenrindenproben aus einem Denitrifikationsreaktor (R4).....	115
Abb. 37:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Fichtenrindenproben aus einem Denitrifikationsreaktor (R4).....	116
Abb. 38:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Fichtenrindenproben aus einem Denitrifikationsreaktor (R5).....	148

7 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Chemische Analyse der Fichtenrinde nach Dietrichs et al. (1978) und Scharkow (1938), verändert.....	10
Tab. 2: Technische Daten der Rindenmulch-Laboranlagen.....	16
Tab. 3: Technische Daten der Denitrifikations-Pilotanlage...	18
Tab. 4: Qualitäts-Definition der Fichtenrinde.....	21
Tab. 5: Konfiguration der AP80-Testplatten zur Identifizierung gram-negativer Bakterien.....	47
Tab. 6: Prozentualer Anteil von C, H und N in der Rindenmulchprobe der ersten (Nov. 1987) und der zweiten Lieferung (Okt. 1990).....	48
Tab. 7: Prozentualer Anteil von C, H und N in den Rindenmulchproben nach unterschiedlich langen Expositionszeiten in Laborreaktoren.....	49
Tab. 8: Quantitative Multielement-Analyse der frischen luftgetrockneten Fichtenrinde.....	51
Tab. 9: Quantitative Multielement-Analyse der Rindenproben nach unterschiedlich langer Betriebsdauer.....	53
Tab. 10: Zuckerzusammensetzung der Totalhydrolysate und Kaltwasserextrakte von Fichtenrinde.....	60
Tab. 11: Betriebsparameter der Versuche in untemperierbaren Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.....	64
Tab. 12: Betriebsparameter der Versuche in temperierbaren Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.....	70
Tab. 13: Vergleich der maximalen Nitratabbauraten in vier verschiedenen temperierbaren Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.....	79
Tab. 14: Betriebsparameter einer Denitrifikationsreaktor-Kaskade.....	90
Tab. 15: Daten der Rohwasseruntersuchungen von Brunnen II der Stadtwerke Aschaffenburg.....	99
Tab. 16: Betriebsdaten der technischen Rindenmulch-Denitrifikationsanlage.....	100
Tab. 17: Meßparameter des RMB1-Ablaufs bei verschiedenen Betriebszuständen.....	104
Tab. 18: Chemische Analyse des ersten Rindeneluats von RMB1..	105
Tab. 19: Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen im Reaktorablauf von R5 und R7.....	114
Tab. 20: Konzentrationen der Stickstoffparameter im NNB-Medium nach 3-wöchiger Inkubation in MPN-Röhrchen..	120
Tab. 21: Ergebnisse der Cellulose- und Zuckerverwertung durch Bakterien.....	121
Tab. 22: Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Untersuchungen an Bakterienisolaten. Pseudomonadaceae.....	123

Tab. 23:	Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Untersuchungen an Bakterienisolaten. Neisseriaceae.....	125
Tab. 24:	Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Untersuchungen an Bakterienisolaten. Enterobacteriaceae & Vibrionaceae.....	126
Tab. 25:	Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Untersuchungen an Bakterienisolaten. Bacillaceae.....	127
Tab. 26:	Ergebnisse der physiologischen und morphologischen Untersuchungen an Bakterienisolaten. Nicht identifizierte Stämme.....	129
Tab. 27:	Konzentrationen der Stickstoffparameter in Nitrit-Nährbouillon nach 4-wöchiger Inkubation der Pilz-isolate in MPN-Röhrchen.....	132
Tab. 28:	Aktivität der Endoglucanase in Flüssigkulturen mit Filterpapier als C-Quelle.....	134
Tab. 29:	Vergleich der Nitratabbauraten (%) und der spezifischen Nitratabbauleistung ($\text{kg NO}_3\text{-N/m}^3\cdot\text{d}$) der verschiedenen Rindenmulch-Denitrifikationsreaktoren.....	140

8 Literatur

- AMERICAN STANDART TEST METHOD (ANSI/ASTM D1110-56) for "Watersolubility of wood"
- AULAKH, M.S. & RENNIE, D.A. (1987): Effect of wheat straw incorporation on the denitrification of N under anaerobic and aerobic conditions. *Can. J. Soil Sci.* 67, 825-834.
- BAILEY, L.D. & BEAUCHAMP, E.G. (1973): Effects of temperature on NO_3 and NO_2 reduction, nitrogenous gas production, and redoxpotential in a saturated soil. *Can. J. Soil Sci.* 53, 213-218.
- BAUER, H. (1975): Strukturaufklärung und metallkatalysierte Isomerisierungsreaktionen bei Kohlenhydraten. Ph. D. Thesis, Universität Tübingen.
- BECKER, G. (1988): Untersuchungen über die Bereitstellung gelöster organischer Substanz aus Weizenstroh für die Denitrifikation bei der Trinkwasseraufbereitung. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
- BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology (1984) Vol. 1. Ed.: J.G. Holt & N.R. Krieg, Verlag Williams & Wilkins. Baltimore.
- BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology (1984) Vol. 2. Ed.: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt. Verlag Williams & Wilkins, Baltimore.
- BETLACH, M.R. & TIEDJE, J.M. (1981): Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 42, No. 6, 1074-1084.
- BINDER, A., PELLONI, L. & FIECHTER, A. (1980): Delignification of straw with ozone to enhance biodegradability. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11, 1-5.
- BLANCHETTE, R.A. & SHAW, C.G. (1978): Associations among bacteria, yeast and basidiomycetes during wood decay. *Phytopathology* 68, 631-637.
- BLASZCZYK, M., MYCIELSKI, R., JAWOROWSKA-DEPTUCH, H. & BRZOSTEK, K. (1980): Effect of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentrations on the selection of denitrifying bacteria. I. Stationary cultures. *Acta Microbiologica Polonica*, Vol. 29, No. 4, 397-406.
- BOLLAG, J.-M. & TUNG, G. (1972): Nitrous oxide release by soil fungi. *Soil Biol. Biochem.* 4, 271-276.
- BOLLAG, J.-M., ORCUTT, M.L. & BOLLAG, B. (1970): Denitrification by isolated soil bacteria under various environmental conditions. *Soil Sci. Soc. Proc.*, Vol. 34, 875-879.

BORNEFF, J. (1984): Nitrat, Nitrit, Nitrosamine in Gewässern. Stand der Kenntnisse und der Forschung. DFB-Forschungsbericht, Verlag Chemie, Weinheim.

BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

BREMNER, J.M. & SHAW, K. (1958): Denitrification in soil. II Factors affecting denitrification. *J. Agric. Sci.* 51, 40-42.

BROADBENT, F.E. & CLARK, F.E. (1965): Denitrification. In: W.V. Bartholomew & F.E. Clark, eds., *Soil nitrogen*. Am. Soc. of Agron., Madison, Wis., 344-359.

BROWNING, B.L., Ed. (1963): *The chemistry of wood*. Interscience Publishers, John Wiley and Sons, New York-London.

BROWNING, B.L., Ed. (1967): *Methods of wood chemistry*. Interscience Publishers, John Wiley and Sons, New York-London-Sidney.

BURTH, I. & OTTOW, J.C.G. (1983): Influence of pH on the production of N_2O and N_2 by different denitrifying bacteria and *Fusarium solani*. In: Hallberg, R. (ed.), *Environmental Biogeochemistry Ecol. Bull.* 35, 207-215.

CARLSON, C.A. & INGRAHAM, J.L. (1983): Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (4), 1247-1253.

CHRISTENSEN, M.H. & HARREMOËS, P. in R. Mitchel (Ed.) (1978): Nitrification and denitrification in wastewater treatment. *Water Pollution Microbiology*, Vol. 2, John Wiley & Sons, New York-Chicester-Brisbane-Toronto.

CLARK, F.E. in C.M. Black (ED.) (1965): *Methods of soil analysis*, Part 2, American Society of Agronomy, Madison.

CLAUS, G. & KUTZNER, H.J. (1984): Mikrobieller Abbau von extrem hohen Stickstoffgehalten in Abwässern industrieller Herkunft. BMFT 02 WA 119.

DAWSON, R.N. & MURPHY, K.L. (1972): The temperature dependency of biological denitrification. *Water Res.* 6, 71-83.

DE CANTANZARO, BEAUCHAMP, E.G. & DRURY, C.F. (1987): Denitrification vs dissimilatory nitrate reduction in soil with alfalfa, straw, glucose and sulfide treatments. *Soil Biol. Biochem.*, Vol. 19, No. 5, 583-587.

DESCHAMPS, A.M. & LEBEAULT, J.M. (1982): Microbial production of phenolics from bark and wood wastes. Achema, Chemical & Biochemical Session, Frankfurt, Abstract.

DETERMANN, H. (1967): Gelchromatographie. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

Deutscher Bundestag, Referat Öffentlichkeitsarbeit (1988): Zwischenbericht der Enquete-Kommission des 11. Deutschen Bundestages. Vorsorge zum Schutz der Erdatmosphäre, Zur Sache, 88, 5.

DEV (1989): Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.): Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. VCH Verlagsgemeinschaft, Weinheim.

DIETRICH, H.H. (1985): Polysaccharide der Rinden. Holz Roh-Werkstoff 33, 13-20.

DIETRICH, H.H., GARVES, K., BEHRENSDORF, D. & SINNER, M. (1978): Untersuchungen über die Kohlenhydrate der Rinden einheimischer Holzarten. Holzforschung 32, 61-67.

DIX, B. und MARUTZKY, R. (1981): Untersuchungen zur Charakterisierung von Extrakten der Fichten- und Kiefernrinde. 5. Kolloquium über Rindenforschung und Rindenverwertung, Karlsruhe.

DIX, B. und MARUTZKY, R. (1983): Untersuchungen zur Gewinnung von Polyphenolen aus Nadelholzrinden. Holz Roh-Werkstoff 41, 45-50.

DOTT, W. (1983): Qualitative und quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. 6. Mitteilung: Wiederverkeimung im Trinkwasser. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B. 178, 263-279.

DOTT, W., FRANK, C. & WERNER, P. (1984): Mikrobiologische Untersuchung eines mit Kohlenwasserstoffen verunreinigten Grundwassers. 1. Mitteilung: Quantitative und qualitative Verteilung von Bakterienpopulationen. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B. 180, 62-75.

DURHAM, H.E. (1898): A simple method for demonstrating the production of gas by bacteria. British Med. J. S., 1387.

EPPLER, A. (1988): Wirbellbett-Reaktor. Beitrag zum Seminar "Nitratelimination bei der Trinkwasseraufbereitung" der Technischen Akademie Wuppertal am 19.10.1988.

ERTL, H.-D. (1988): Automatische Antibiotogramm-Erstellung und Keimidentifizierung durch Fluoreszenzmessung. Forum Mikrobiologie 11, 498-500.

EUROPÄISCHE GEMEINSCHAFT, Richtlinie des Rates v. 15.07.1980 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (80/778/EGW).

- FABIG, W. & OTTOW, J.C.G. (1979): Isolierung und Identifizierung neuer denitrifizierender Bakterien aus einer Modellkläranlage mit anaeroben Festbettreaktoren. Arch. Hydrobiol. 85 (3), 372-391.
- FÄHNRIK, P. & IRRGANG, K. (1981): Cellulase and protein by *Chaetomium cellulolyticum* strains grown on cellulosic substrates. Biotechnology Letters. 3 (5), 201-206.
- FENGEL, D. und WEGENER, G. (1984): Wood. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
- FERGUSON, S.J. (1987): Denitrification: a question of the control and organization of electron and ion transport. TIBS 12, 354-357.
- FINCK, H.-F. (1987): Nitratbelastung des Grundwassers, Teil 1: Anpassungsmöglichkeiten der Landwirtschaft. Schriftenreihe des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Reihe A, Heft 347.
- FOCHT, D.D. & JOSEPH, H. (1973): An improved method for the enumeration of denitrifying bacteria. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 37, 698-699.
- FOCHT, D.D. & VERSTRAETE, W. (1977): Biochemical ecology of nitrification and denitrification. Adv. Microbiol. Ecol. 1, 135-214.
- FRICK, B.R. & RICHARD, Y. (1985): Ergebnisse und Erfahrungen mit der biologischen Denitrifikation in einem Wasserwerk. Vom Wasser 64, 145-154.
- FUCHS, F. (1982): Charakterisierung höhermolekularer Wasserinhaltsstoffe durch spektroskopische und gelchromatographische Verfahren. In: Aktuelle Probleme der Wasserchemie und der Wasseraufbereitung, Heft 20, Engler-Bunte-Institut, Karlsruhe.
- FUCHS, F. (1986): Gelchromatographische Trennung von organischen Wasserinhaltsstoffen. Teil I, II, III, Vom Wasser 64, 65, 66.
- GATTERMANN, L. (1961): Die Praxis des organischen Chemikers. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- GINOCCHIO, J.C. (1980): Denitrifikation des Trinkwassers. Wasserwirtschaft 70, 12, 397-401.
- GÖK, M. (1987): Einfluß energiereicher Substrate (Cellulose oder Stroh) und O₂-Partialdruck auf Quantität und Qualität der Denitrifikation eines sandigen Lehms. Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart.
- GRABINSKA-LONIEWSKA, A. & SLAVIKOWA, E. (1990): Fungi in denitrification unit biocenosis. Wat. Res., Vol. 24, No. 5, 565-572.

- GREGERSON, T. (1978): Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5, 123-127.
- GUNNER, H.B. & ALEXANDER, M. (1964): Anaerobic growth of *Fusarium oxysporum*. *J. Bacteriol.* 87, 1309-1316.
- HABERER, K. (1985): Möglichkeiten der Wasseraufbereitungstechnik zur Nitratbeseitigung, Schriftenreihe WAR 22, 6. Wassertechnisches Seminar, Darmstadt.
- HAJIREZAEI, M.R. (1989): Vergleichende Untersuchungen einiger pflanzlicher Abfallstoffe als Substratquelle für die Denitrifikanten bei der Trinkwasseraufbereitung; Entwicklung und Einsatz einer Methode zur Bestimmung der Denitrifikationsrate im Kurzzeittest. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- HARTMANN, L. (1983): Biologische Abwasserreinigung. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- HENNINGSSON, B. (1967): Interactions between microorganisms found in birch and aspen pulpwood. *Stud. For. Suec.* 53, 5-32.
- HERGERT, H.L. (1960): Chemical composition of tannins and polyphenols from conifer wood and bark. *Forest Products Journal* 10 (11), 610-617.
- HERGERT, H.L. und KURTH, E.F. (1953): The chemical nature of the extractives from white fir bark. *TAPPI* 36 (3), 137-144.
- HILLIS, W.E. (1962): Wood extractives and their significance to the pulp and paper industries. Academic Press, New York.
- HÖRNER, G. & IRMER, A. (1989): Untersuchungen zur autotrophen biologischen Denitrifikation mit der Membran-Fließbett-Technologie mit Wasserstoff als Elektronendonator. Informationsschrift der Fa. Berkefeld-Filter Anlagenbau GmbH, Celle.
- JETER, R.M. & INGRAHAM, J.L. (1981): The denitrifying procaryotes. In: M.P. Starr, H. Stalp, H.G. Trüper, A. Balows & H.G. Schlegel (Hrsg.), *The Procaryotes, Handbook of habitats*. Springer Verlag, New York, 913-925.
- KEENEY, D.R., FILLERY, I.R. & MARX, G.P. (1979): Effect of temperature on the gaseous nitrogen products of denitrification in a silt loam soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43, 1124-1128.
- KLEMME, J.-H. (1981): Neuere Erkenntnisse über die mikrobielle Nitratreduktion. *Forum Mikrobiologie* 6, 330-337.
- KNOWLES, R. (1982): Denitrification. *Microbiological Reviews* 46 (1), 43-70.
- KÖRNER, H. & ZUMFT, W.G. (1989): Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (7), 1670-1676.

- KOIKE, I. & HATTORI, A. (1975): Growth yield of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas denitrificans*, under aerobic and anaerobic conditions. *Journal of General Microbiology* 88, 1-10.
- KONÉ, S. & BEHRENS, U. (1981): Zur Kinetik der Denitrifikation. Teil 1: Mischpopulation und Acetat als Kohlenstoffquelle. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 9 (5), 523-533.
- KRUITHOF, J.C., VAN BENNEKOM, C.A., DIERX, H.A.L., HIJNEN, W.A.M., VAN PAASSEN, J.A.M. & SCHIPPERS, J.C. (1988): Nitrate removal from groundwater by sulphur/limestone filtration. *Water Supply* 6, 207-217.
- KRUL, J.M. (1976): Dissimilatory nitrate and nitrite reduction under aerobic conditions by an aerobically and anaerobically grown *Alcaligenes* sp. and by activated sludge. *Journal of Applied Bacteriology* 40, 245-260.
- KRUL, J.M. & VEENINGEN, R. (1977): The synthesis of dissimilatory nitrate reductase under aerobic conditions in a number of denitrifying bacteria isolated from activated sludge and drinking water. *Wat. Res.* 11, 39-43.
- KURTH, E.F. (1947): The chemical composition of barks. *Chem. Revs.* 40, 33-49.
- LANDT, G. (1986): Aufbereitung des durch Rindenmulch denitrifizierten Grundwassers zu Trinkwasser unter Benutzung eines nachgeschalteten Aktivkohlefilters. Diplomarbeit, FH Gießen-Friedberg.
- LANGE, A. (1989): Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit des mikrobiellen Nitratabbaus in Drehrohr-Bioreaktoren unter Berücksichtigung der Einfahrmethodik und der Quantifizierung der Biomasse. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
- LIENIG, D. & SCHMIDT, A. (1978): Über die Anwendung verschiedener Summenbestimmungsverfahren - CSV-Cr, DOC, UV - zur Beurteilung organischer Inhaltsstoffe in einem Fließgewässer. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 6 (5), 383-386.
- LLOYD, D., BODDY, L. & DAVIES, K.J.P. (1987): Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions: the rule rather than the exception. *FEMS Microbiology Ecology* 45, 185-190.
- MANDELS, M & REESE, E.T. (1957): Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.* 73, 269-278.
- MCCARTY, P.L., BECK, L. & ST. AMANT, P.P. (1969): Biological denitrification of agricultural wastewaters by addition of organic materials. *Proc. 24th. Ind. Waste Conf., Purdue Univ.* Ext. Ser. 135, 1271-1285.
- METZNER, H. (1973): *Biochemie der Pflanzen*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

MISRA, C., NIELSON, D.R. & BIGGAR, J.W. (1974): Nitrogen transformation in soil during teaching. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 38.

MÜLLER, W.-R. (1989): Möglichkeiten und Verfahren der mikrobiellen Denitrifikation zur Aufbereitung von nitrathaltigem Rohwasser zu Trinkwasser. In: Wasser-Kalender 1989. R. Wagner (Hrsg.), Erich Schmidt Verlag, 64-116.

MÜLLER, W.-R., SPERANDIO, A. & ERNE, M. (1985): Denitrifikation mit biologische abbaubaren Trägermaterialien in der weitergehenden Abwasserreinigung. Landwirtsch. Forschung 38, 1-2, 132-138.

NÄVEKE, R. & TEPPER, K.P. (1979): Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York.

NELSON, N. (1944): A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. JBC 153, 375-380.

NICHOLAS, D.J.D. & WILSON, P.J. (1964): A dissimilatory nitrate reductase from *Neurospora crassa*. Biochim. Biophys. Acta, 86, 466-476.

NIKITIN, N.J. (1966): The chemistry of cellulose and wood.

NOELL GmbH Wassertechnik, Prospektmaterial und Firmenschrift, 1988.

NOLL, W. (1989): Persönliche Mitteilung.

NÖMMIK, H. (1956): Investigations on denitrification in soil. Acta Agric. Scand. 6, 195-228.

Informationsbroschüre der Norddeutsche Seekabelwerke, Nordenham.

NULTSCH, W. (1974): Allgemeine Botanik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

OBERMANN, P. (1981): Hydrochemisch/hydromechanische Untersuchungen zum Stoffgehalt von Grundwasser unter dem Einfluß landwirtschaftlicher Nutzung. Habilitation, Ruhr-Universität Bochum.

OBERMANN P. (1985): Die Belastung des Grundwassers aus landwirtschaftlicher Nutzung nach heutigem Kenntnisstand. In: H. Nieder (Hrsg.) Nitrat im Grundwasser: Herkunft, Wirkungen, Vermeidungen. Verlag Chemie Weinheim.

OBERZILL, W. (1967): Mikrobiologische Analytik, Grundlagen der quantitativen Erfassung von Umwelteinwirkungen auf Mikroorganismen. Verlag Hans Carl, Nürnberg.

OGAWA, K., TOYAMA, H. & TOYAMA, N. (1982): Native cellulose hydrolyzing cellulase of *Trichoderma reesei*. J. Ferment. Technology 60 (4), 349-355.

- OTTOW, J.C.G. & FABIG, W. (1984): Influence of oxygen aeration on denitrification and redox level in different bacterial batch cultures.
- OVERATH, H., HUSSMANN, A. & HABERER, K. (1986): Biologische Nitratentfernung mit *Thiobacillus denitrificans* unter Verwendung von elementarem Schwefel und Aktivkoks. *Vom Wasser* 66, 59-83.
- OVERATH, H., RAPHAEL, T., SALHANI, N. & SOEDER, C.J. (1988): Denitrifikation von Trinkwasser in Festbett-Drehrohr-Reaktoren. *Wasser Boden* 40, 199-201.
- PAINTER, H.A. (1970): A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Water Res.* 4, 393-450.
- PAINTER, T.J. & PURVES, C.B. (1960): Polysaccharides in the inner bark of white spruce. *TAPPI*, Vol. 43, No. 8, 729-736.
- PAYNE, W.J. (1981): Denitrification. John Wiley & Sons, New York.
- PETRI, H. (1976): Nitrate und die Trinkwasser-Verordnung. In: K. Aurand u. a. (Hrsg.) *Die Trinkwasserverordnung, Einführung und Erläuterung für Wasserversorgungsunternehmen und Überwachungsbehörden*. Erich Schmidt Verlag, Berlin, 75-91.
- RAMALINGAM, K.V. und TIMELL, T.E. (1964): Polysaccharides present in the bark of engelmann spruce. *Svensk Papperstidning* 67, 512-521.
- RANDOW, F.F.E. & EBERT, W. (1982): Der Einsatz der UV-Spektrometrie zur Kontrolle der Trinkwasseraufbereitung. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 10 (1), 9-14.
- RAPHAEL, T. (1989): Untersuchungen zum Abbau von Benzoesäure durch ein gram-negatives Bakterium unter Denitrifikationsbedingungen. Dissertation, TH Aachen.
- RASHID, G.H. & SCHAEFER, R. (1988): The influence of glucose and other sources of carbon on nitrate reduction rates in two temperate forest soils. *Plant and Soil* 106, 43-48
- RAUSCHMAIER, R. & BARDTKE D. (1985): Birkenholz als Wasserstoffdonator bei der mikrobiellen Elimination von Nitrat aus Wasser. *Material und Organismen*, Berlin, Vol. 20, No. 4, 253-264.
- REHR, B. & KLEMME, J.H. (1978): Competition of nitrate between denitrifying *Pseudomonas stutzeri* and nitrate ammonifying bacteria. *FEMS-Microbiology Ecology*, Vol. 62, No. 1, 51-59.
- RHEINHEIMER, G., HEGEMANN, W., RAFF, J. & SEKOULOV, I. (Hrsg.) (1988): Stickstoffkreislauf im Wasser. Oldenbourg Verlag, München, Wien.

- RICHARD, Y. & PARTOS, J. (1986): Elimination biologique des nitrates en vue de la production d'eau potable Bilan de fonctionnement de deux installations industrielles. In: T.S.M.-l'eau, 3, 141-147.
- ROBSON, L.M. & CHAMBLISS, G.H. (1989): Cellulases of bacterial origin. Enzyme Microb. Technol., Vol. 11, 626-644.
- RÖDELSPERGER, M. (1987): Biologische Nitratentfernung in anaerob betriebenen Aktivkohlefiltern mit anschließender Nachbehandlung im Untergrund. TAW-Seminar 116257 am 21.10.87.
- RÖDELSPERGER, M. (1988): Biotechnologische Nitratelimination (Denitrifikation); Denitrifikation mit Essigsäure. Beitrag zum Seminar "Nitratelimination bei der Trinkwasseraufbereitung" der Technischen Akademie Wuppertal am 19.10.1988.
- RÖDELSPERGER, M. & ROHMANN, U. (1989): Übersicht über Verfahrensvarianten mit mikrobieller Nitratreduktion.
- ROENNEFAHRT, K.W. (1977): Nitratentfernung aus dem Trinkwasser durch biochemische Verfahren. DVGW-Schriftenreihe "Wasser", Heft Nr. 14, 211-228.
- ROENNEFAHRT, K.W. (1982): Biologische Nitratentfernung bei der Trinkwasseraufbereitung. In: F. Selenka (Hrsg.) Nitrat, Nitrit, Nitrosamine in Gewässern. DFG-Symp., Verlag Chemie Weinheim, 198-215.
- ROENNEFAHRT, K.W. (1989): Entwicklung, Planung und Inbetriebnahme der DENIPOR-Anlage in Langenfeld-Monheim. Brunnenbau·Bau von Wasserwerken·Rohrleitungsbau, 3, 3-10.
- ROHMANN, U. & SONTHEIMER, H. (1985): Nitrat im Grundwasser: Ursachen, Bedeutung, Lösungswege. DVGW Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (TH).
- RUTTEN, P. (1989): Autotrophe biologische Nitratentfernung in Mönchengladbach. Neue Technologien in der Trinkwasserversorgung. Statusseminar 1988, Hrsg. BMFT, Bonn, KFK GmbH Karlsruhe, 217-239.
- SACHSSE, H. (1965): Bau und Eigenschaften der Rinde und ihre derzeitigen Nutzungs- und Verwertungsarten. Forstarchiv, 36. Jahrg., Heft 2, 25-32.
- SCHMIEDER, F. & OTTOW, J.C.G. (1981): Quantitative Differenzierung der denitrifizierenden Flora in unterschiedlich belasteten Biotopen (Gewässer, Böden, Abwasser). Landwirtsch. Forsch., Sonderh. 38, 667-677.
- SCHNEIDER, A. & BAUMS, A. (1970): Wohin mit der Rinde ? DRW-Verlags-GmbH, Stuttgart.
- SCHUURMAN, E. (1987): Untersuchungen zum Einsatz von Baumrinde zur Denitrifikation von Trinkwasser. Diplomarbeit, FH Niederrhein, Krefeld.

- SCHWALBE, G.G. und NEUMANN, K.E. (1930): Cellulosechemie 11, 113.
- SCHWOERBEL, J. (1980): Methoden der Hydrobiologie, Süßwasserbiologie. UTB 979.
- SEILER, W. & CONRAD, R. (1981): Mikrobielle Bildung von N_2O (Distickstoffoxid) aus Mineraldüngern-ein Umweltproblem? Forum Mikrobiologie 4 (6), 322-337.
- SELENKA, F. (1982): Nitrataufnahme durch Wasser und Lebensmittel. In: F. Selenka (Hrsg.) Nitrat, Nitrit, Nitrosamine in Gewässern. DFG-Symp., Verlag Chemie Weinheim.
- SHIMAZU, T. (1978): Metabolic characteristics of denitrification by *Paracoccus denitrificans*. J. Ferment. Technol., Vol. 56, No. 3, 207-213.
- SMID, A.E. & BEAUCHAMP, E.G. (1976): Effects of temperature and organic matter on denitrification in soil. Can. J. Soil Sci. 56, 385-391.
- SOMMER, K. & OTTOW, J.C.G. (1985): Denitrifikation mit Cellulose als einzigem Wasserstoffdonator. J. Basic Microbiol. 25, 1, 77-80.
- SONTHEIMER, H. & WAGNER, I. (1977): Zur Bestimmung von Huminsäuren und Ligninsulfonsäuren aus den UV-Spektren. Z. f. Wasser- und Abwasser-Forschung, 10. Jahrgang, Nr. 3/4/77, 77-82.
- STEFFES, B. (1989): Experimentelle Untersuchungen der spezifischen Denitrifikationsleistung von Roto-Bio-Reaktoren in Abhängigkeit wesentlicher Betriebsparameter. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.
- STENGEL, E. (1985): Perspektiven der Nitrateliminierung in künstlichen Feuchtbiotopen. In: Sammelband des Symp. "Grundlagen und Praxis naturnaher Klärverfahren-10 Jahre Othfresen." Lehrstuhl für Ökochemie der GH Kassel, 49-66.
- STEVENS, J.F. (1987): Interactions of the soft rot fungus *Phialophora richardisiae* and a bacterium. Mycologia, 79 (5), 794-797.
- TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry)
 T 207 om-81, WATERSOLUBILITY of WOOD and PULP
 T 211 om-80, ASH in WOOD and PULP
 T 605 , "Reducing a Gross Sample of Granular or Aggregate Material to Testing Size"
- TIMELL, T.E. (1965): Wood and bark polysaccharides. In: Cellular ultrastructure of woody plants. Cote, W.A., Ed. Syracuse University Press, Syracuse-N.Y., 127-156.
- TOMASCHEWSKI, C. (1990): Isolierung und Charakterisierung von Mikroorganismen eines Fichtenrindmulch-Denitrifikationsreaktors. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

- UHE, G. (1991): Untersuchung zu der Denitrifikationsrate im Rindenmulchbecken bei unterschiedlicher Sauerstoffkonzentration im Rohwasser. Diplomarbeit, FH Niederrhein, Krefeld.
- VAN HECKE, K., VAN CLEEMPUT, O. & BAERT, L. (1990): Chemo-denitrification of nitrate-polluted water. *Environmental Pollution* 63, 261-274.
- VAN VERSEVELD, H.W., MEIJER, E.M. & STOUTHAMMER, A.H. (1977): Energy conservation during nitrate respiration in *Paracoccus denitrificans*. *Archives of Microbiology*, Vol. 112, 17-23.
- VEAL, D.A. & LYNCH, J.M. (1987): Associative cellulolysis and N_2 fixation by co-cultures of *Trichoderma harzianum* and *Clostridium butyricum*: the effects of ammonium-N on these processes. *J. Appl. Biol.* 63, 245-253.
- Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (TVÖ) vom 22.05.1986. Bundesgesetzblatt, Jg.1986, Teil I.
- VORLOP, K.D. & TACKE, T. (1989): Erste Schritte auf dem Weg zur edelmetallkatalysierten Nitrat- und Nitrit-Entfernung aus Trinkwasser. *Chem.-Ing.-Tech.* 61, Nr. 10, 836-837.
- WEISSMAN, G. (1981): Untersuchungen der Rindenextrakte von *Picea abies* Karst. *Holz als Roh- und Werkstoff* 39, 457-461.
- WEISSMANN, G. (1984): Zusammensetzung der wässrigen Rindenextrakte von *Picea abies* Karst. im Verlauf einer Vegetationsperiode. *Holzforschung* 38, 7-10.
- WILDERER, P.A., JONES W.L. & DAU, U. (1987): Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Wat. Res.* Vol. 21, No. 2, 239-245.
- WILLIAMS, D.R., ROWE, J.J. ROMERO, P. & EAGON, R.G. (1978): Denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*: Some parameters of growth and active transport. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 257-263.
- YORDY, D.M. & RUOFF, K.-L. (1981): Dissimilatory nitrate reduction to ammonia. In: C.C. Delwiche (ed.): Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide. Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 171-190.
- YOSHIDA, T. & ALEXANDER, M. (1970): Nitrous oxide formation by *Nitrosomonas europaea* and heterotrophie microorganisms. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, Vol. 34, 880-882.
- YOSHINARI, T. & KNOWLES, R. (1976): Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 69, 705-710.
- YOSHINARI, T., HYNES, R.K. & KNOWLES, R. (1977): Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil Biol. Biochem.* 9, 177-183.

ZÖTTL, H.W. (1977): Rinde-Abfall oder Rohstoff? AFZ, 154-155.

ZÖTTL, H.W. (1981): Bestimmung und Beseitigung der Stickstoff-immobilisierung in Rindenhumus. In: Rindenprodukte für den Gartenbau. TASPO Verlag Thalacker, H. 1, Braunschweig, 7-11.

ZUMFT, W.G. & CARDENAS, J. (1979): The inorganic biochemistry of nitrogen bioenergetic processes. Naturwissenschaften 66, 81-88.

ZUMFT, W.G. & VEGA, J.M. (1979): Reduction of nitrate to nitrous oxide by a cytoplasmic membrane fraction from the marine denitrifier *Pseudomonas perfectomarinus*. Biochim. Biophys. Acta 548, 484-499.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Mein besonderer Dank gebührt:

-Herrn Prof. Dr. C.J. Soeder für die Bereitstellung von Thema, Arbeitsplatz und für die wissenschaftliche Unterstützung,

-Herrn Prof. Dr. F. Kreuzaler für die Übernahme des Referats,

-den Stadtwerken Aschaffenburg für die Finanzierung dieser Arbeit und Bereitstellung der Pilotanlage, und insbesondere Herrn Dipl.-Ing. G. Christl, Herrn W. Noll und Herrn Zimmermann für ihre hilfreiche Unterstützung in Aschaffenburg,

-Frau Dipl.-Ing. E. Schuurman und Frau Dipl.-Biol. C. Tomaschewski für die gute Kooperation auf den Gebieten der chemischen und mikrobiologischen Untersuchungen.

-den Mitarbeitern der Mechanischen und Elektronischen Werkstätten des IBT der KFA Jülich und der Stadtwerke Aschaffenburg für ihre Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen,

-dem Ingenieur-Geologischen Institut Dipl.-Ing. S. Niedermeyer, Herrn Prof. Dr. W. Feige und Herrn Dr. E. Zanders für die Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei verfahrenstechnischen und biotechnologischen Fragestellungen zur Pilotanlage,

-Frau Dipl.-Biol. G. Becker und Herrn Dr. E. Zanders für die Durchsicht der Arbeit.

